

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591247

研究課題名（和文） IL-21 抑制による GVHD 制御のメカニズム

研究課題名（英文） Mechanisms for the attenuated GVHD by blocking IL-21

研究代表者

尾崎 勝俊（OZAKI KATSUTOSHI）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10286453

研究成果の概要（和文）：これまでの研究（平成 17-18 年若手研究 B、平成 19-20 年科学研究費 C）から、IL-21R を欠損した脾細胞を用いると GVHD が減弱すること、実際に IL-21 デコイ受容体で GVHD の治療効果が得られることを示してきた。今回の研究では IL-21 抑制が GVHD 制御をもたらすメカニズムを明らかにすることを目的とした。IL-21R 欠損脾細胞を移植した群ではエフェクター T 細胞からのサイトカインの産生が低下していることが明らかとなった。さらにその原因として制御性 T 細胞の増加が考えられた。しかし抗 CD25 抗体で制御性 T 細胞を除去しても GVHD 抑制には大きな変化が見られなかったことから、制御性 T 細胞自体が原因なのではなく、エフェクター T 細胞の効率的産生が低下していることが原因と推論した。

研究成果の概要（英文）：We have shown that splenocytes from IL-21R-deficient mice ameliorates GVHD as compared to that from wild-type mice and that a decoy receptor for IL-21 attenuates GVHD. This time, we aimed to investigate the mechanisms for the attenuated GVHD by blocking IL-21. We found that the production of cytokines was impaired in effector T cells and an increase of Treg cells in spleen. A depletion of Treg cells by anti-CD25 antibody did not change the attenuation of GVHD by blocking IL-21, suggesting that the cause of attenuation of GVHD could be the loss of functional effector cells rather than the increase of Treg cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 血液内科学

キーワード：血液免疫学

1. 研究開始当初の背景
インターロイキン-21は2000年にクローニン

グされた比較的新しいサイトカインである (J. Parrish-Novak, Nature. 2000)。インターロ

イキリン-2のファミリーに属し、共通（コモン） γ 鎖を受容体を含む(H. Asao, J Immunol. 2001)。この γ 鎖受容体の遺伝子変異が人の遺伝病であるX連鎖重症複合免疫不全症の原因である(M. Noguchi, Cell. 1993)。この病気の症状の1つにインターロイキン-21が貢献している可能性が動物実験で示された(K. Ozaki, Science. 2002)。

申請者はこれまでにインターロイキン-21のクローニングを行い(K. Ozaki, PNAS. 2000)、そのノックアウトマウスを作成し、生体内でインターロイキン-21がインターロイキン-4と協調して抗体産生に非常に重要な働きをしていることを明らかにした(K. Ozaki, Science. 2002)。平成17年、我々の当初の研究開始時点ではインターロイキン-21と移植片対宿主病との関連は報告されていなかった。

移植片対宿主病は骨髄移植の合併症の1つで、死亡することもある。その一方で、移植片には対白血病作用があることが知られており、近年増加しているミニ移植はまさにこの移植片対白血病作用を利用して白血病を治そうという治療法である。移植片対宿主病と移植片対白血病作用は臨床的に好ましくないものと好ましいものの組み合わせであり、古くからこの2つを分離して対白血病作用だけを強めよう、もしくは対宿主病だけを弱めようという試みがあるものの、実地臨床では成功していない。

申請者はサイトカインに注目し、サイトカインを制御することにより移植片対宿主病だけを抑制し対白血病作用を保つことが出来るのではないかとの仮説に基づき、平成17年度から科学研究費補助金若手研究(B)で研究をスタートさせた。この研究によってインター

ロイキン-21は移植片対宿主病をプラスの方向に制御していること、インターロイキン-21のシグナルが入らない脾細胞(インターロイキン-21受容体ノックアウトマウス由来の脾細胞)でも通常通りの移植片対白血病作用を示すことを明らかにした。

この実験結果はインターロイキン-21のシグナルを抑えることが対宿主病の治療になる可能性を示唆している。そこで我々は平成19-20年の科学研究補助金基盤研究(C)で、インターロイキン-21のシグナルを抑制することで移植片対宿主病を治療する治療モデルを、マウスの系で確立することに成功した。IL-21のデコイ受容体を用いると、GVHDが実際に減弱することを証明した。

2. 研究の目的

今回はこれまでの研究成果を元に、IL-21抑制がGVHD減弱をもたらす機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

IL-21RのノックアウトマウスからCD4細胞を純化し、MHCがハプロ合致のBDF1マウスをレシピエントとして移植した。純化にはautoMACSを使用し、純度は約90%であった。骨髄細胞の移植は通常の移植と同様に行った。これによりIL-21のシグナルを欠損したCD4が引き起こすGVHDを解析した。

移植後脾細胞をCD3/CD28抗体で刺激し、サイトカインの産生を調べた。また、BDF1細胞でも刺激を行い、同様にサイトカイン産生を調べた。培養上清中のIFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-21、IL-6、IL-17などをELISA法にて測定した。細胞内染色をフローサイトメータ

一で解析することにより、IFN- γ 、TNF- α を産生している細胞自体の解析を施行した。

次に脾臓の CD4 細胞数、制御性 T 細胞数を解析した。制御性 T 細胞は CD4+Foxp3+ を指標とした。

制御性 T 細胞を生体内から除去するためにもう一つのマーカー CD25 を利用した。抗 CD25 抗体をマウスに持続的に投与することにより、制御性 T 細胞(CD4+Foxp3+)を 50% 以上除去することに成功した。試験管内ではソーターを使用して CD4+CD25+細胞を完全に除去してから、刺激を加え、サイトカイン濃度を測定した。

4. 研究成果

これまでの研究成果(平成 17-18 年若手研究 B、平成 19-20 年基盤研究 C)から IL-21R を欠損した脾細胞を用いると誘導される GVHD が減弱することがわかっている。純化していない脾細胞の移植でサイトカイン産生を調べたが、両群間(ワイルドタイプ群 vs. ノックアウト群)の差ははっきりしなかった。そこで、CD4 細胞を純化して移植をしたところ、生存率の差がより顕著となり、両群の解析がしやすくなった。この系で移植後脾細胞を採取し、サイトカインの産生を調べると IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 で明らかに産生が低下していた。CD4 純化、および、細胞内染色により、サイトカインの産生が低下している細胞は CD4 細胞であることが明らかとなった。

CD4 細胞数、制御性 T 細胞数を解析したところ、制御性 T 細胞の増加を認め、この増加が GVHD の減弱を引き起こしている可能性が考えられた。この点を解析するために試験管内の実験と、生体内実験の二つを行った。ソーターで、移植後脾細胞の中から CD4+CD25+細胞を純化し、サイトカインの産生を調べた。この系では、理論上ほとんどの

制御性 T 細胞は除かれているにも関わらず、サイトカインの産生は抑制されたままであった。また、GVHD マウスに移植直後から抗 CD25 抗体を大量に投与した。これにより、生体内で制御性 T 細胞は最低でも 50%以上が除去されていた。この状態でも GVHD は明らかに減弱しており、我々は GVHD 減弱の原因は制御性 T 細胞よりもむしろエフェクター細胞の機能不全に起因しているのではないかと推論した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Meguro A, Ozaki K, Oh I, Hatanaka K, Matsu H, Tatara R, Sato K, Leonard WJ, Ozawa K: IL-21 is critical for graft-versus-host disease in a mouse model. Bone Marrow Transplant. 2010;45(4):723-9.
2. Oh I, Ozaki K, Meguro A, Hatanaka K, Kadowaki M, Matsu H, Tatara R, Sato K, Iwakura Y, Nakae S, Sudo K, Teshima T, Leonard WJ, Ozawa K: Altered effector CD4+ T cell function in IL-21R-/- CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease. J Immunol. 2010;185(3):1920-1926.
3. Tatara, R., Ozaki, K., Kikuchi Y., Hatanaka, K., Oh, I., Meguro, A., Matsu, H., Sato, K. Ozawa, K: Mesenchymal stem cells inhibit Th17 but not regulatory T cell differentiation. Cytotherapy 2011;13(6):686-694.
4. Meguro A, Ozaki K, Hatanaka K, Oh I, Sudo K, Ohmori T, Matsu H, Tatara R, Sato K, Sakata Y, Nakae S, Leonard WJ, Ozawa K: Lack of IL-21 signal attenu

- ates graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells. Bone Marrow Transplant. 2011;46(12):1557-1565
5. Teshima T, Maeda Y, Ozaki K: Regulatory T cells and IL-17-producing cells in graft-versus-host disease. Immunotherapy. 2011;3(7):833-52.
6. Tomiyama Y, Miyakawa Y, Okamoto S, Katsutani S, Kimura A, Okoshi Y, Ninomiya H, Kosugi H, Nomura S, Ozaki K, Ikeda Y, Hattori T, Katsura K, Kanakura Y: A Lower Starting Dose of Eltrombopag is Efficacious in Japanese Patients with Previously Treated Chronic Immune Thrombocytopenia (ITP). J. Thromb. & Hemost. (in press)

[学会発表] (計 8 件)

- 1) Meguro A, Ozaki K, Oh I, Matsu H, Hatanaka K, Sato K, Tatara R, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Muroi K, Ozawa K: Blocking of IL-21 signal attenuates graft-versus-host disease but not graft-versus-leukemia effect in a mouse model.

第 72 回日本血液学会学術集会、名古屋 (0-181, Program p87) 2009

- 2) Ozaki K, Matsu H, Hatanaka K, Meguro A, Oh I, Tatara R, Suzuki T, Mori M, Muroi K, Nagai T, Ozawa K: Stat3 activation in donor CD4 T-cells is critical for acute GVHD.

2011 Annual Meeting of ASH at San Diego, CA (Blood 2011;118(21): 831)

- 3) Tatara R, Ozaki K, Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A, Matsu H, Sato K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K: Mesenchymal stem

cell mediated suppression of Th17 differentiation through PGE2 and IDO production.

第 72 回 日本血液学会学術集会、横浜 (臨床血液 51(9): 909, 2010)

- 4) 目黒 明子、尾崎 勝俊、畑中 恵子、翁 家^国、松 春子、多々良 礼音、佐藤 一也、大嶺 謙、鈴木 隆浩、森 政樹、永井 正、室井 一男、須藤 カツ子、中江 進、小澤 敬也: IL-21 のシグナル抑制と graft-versus-leukemia 効果

第 72 回 日本血液学会学術集会、横浜 (臨床血液 51(9): 993, 2010)

- 5) 松 春子、尾崎 勝俊、畑中 恵子、多々良 礼音、目黒 明子、翁 家^国、佐藤 一也、鈴木 隆浩、森 政樹、永井 正、室井 一男、永井 正、植松 智、審良 静男、小澤 敬也: 移植片対宿主病における STAT3 の役割に関する発生工学的的手法を用いた検討

第 72 回 日本血液学会学術集会、横浜 (臨床血液 51(9): 1097, 2010)

- 6) 多々良礼音, 尾崎勝俊, 畑中恵子, 翁家^国, 松春子, 目黒明子, 佐藤一也, 永井正, 室井一男, 小澤敬也: 間葉系幹細胞がTh17、Treg分化に及ぼす影響.

第71回 日本血液学会学術集会, 京都, 2009年10月23日~25日. (臨床血液 50(9): 1210, 2009)

- 7) 翁家^国, 尾崎勝俊, 目黒明子, 畑中恵子, 多々良礼音, 松春子, 佐藤一也, 永井正, 室井一男, 小澤敬也: CD4陽性T細胞の移植によって誘導されるGVHDとIL-21の重要性.

第71回 日本血液学会学術集会, 京都, 2009年10月23日~25日. (臨床血液 50(9):

1014, 2009)

8) Tatara R, Ozaki K, Oh I, Hatanaka K, Meguro A, Matsu H, Sato K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K: Mesenchymal stem cells inhibit Th17 differentiation through PGE2 production.

2009 Annual Meeting of ASH at New Orleans (Blood 2009;114(22): 1403)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/usr/hema/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 勝俊 (OZAKI KATSUTOSHI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号 10286453