

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21日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659095

研究課題名（和文） 骨髄GVHDの分子機序解明と治療標的の同定

研究課題名（英文） Studies on molecular mechanisms and therapeutic targets of bone marrow GVHD

研究代表者

松島 綱治 (MATSUSHIMA KOUJI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50222427

研究成果の概要（和文）：骨髄GVHDの分子機序解明および治療標的の同定を目的としてマウス allo-HSCT モデルの解析を行い、1) 骨髄GVHDにおけるB細胞分化抑制は間質系細胞における同種抗原の発現に非依存的であること、2) allo-CD4⁺ T細胞に骨芽細胞抑制因子（OIF）が特徴的に高発現すること、3) allo-CD4⁺ T細胞存在下で前骨芽細胞株の分化が抑制されること、4) OIFの単独阻害は骨髄GVHDの予防に不十分であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed mouse allo-HSCT models to identify the molecular mechanisms and therapeutic targets of bone marrow GVHD and revealed that: 1) B cell suppression is independent of alloantigen expression on non-hematopoietic stromal cells, 2) allo-CD4⁺ T cells specifically express osteoblast inhibitory factor (OIF), 3) pre-osteoblast cell line differentiation is suppressed in the presence of allo-CD4⁺ T cells, 4) inhibition of OIF is not sufficient to suppress BM GVHD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫制御・移植免疫・造血幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

臨床上しばしば認められるGVHDに伴う血球減少（骨髄抑制）は、allo-HSCTの治療関連死の主要因である感染症や出血等の原因となる。治療関連死の克服には、GVHDが骨髄抑制を引き起こす機序の解明と予防法・治療法の開発が不可欠であるが、従来考えられてい

たGVHDの発症機序（同種抗原反応性ドナーT細胞による皮膚、腸管、肝臓の上皮組織障害）ではこれを達成し得なかった。私達はこのような臨床からの問題提起を受け、各種マウスGVHDモデルを用いて、GVHDに伴う骨髄抑制の詳細と発症機序を解析した結果、その原因がドナーCD4⁺ T細胞（allo-CD4⁺ T細胞）に

よる、骨髄造血ニッチ（主に骨芽細胞）の障害であることを突き止め、骨髄 GVHD という新規な概念を提唱した。骨髄 GVHD 環境下ではリンパ球系細胞の再構築が著しく遅延し、特に骨芽細胞に依存して分化する B 細胞の産生が極度に障害される。これに対して、移植後早期に抗 CD4 抗体を投与することで allo-HSCT による抗腫瘍効果（GVT 効果）を維持しつつ、骨髄 GVHD の抑制が可能であった。しかし、骨髄 GVHD 発症の分子機序について Fas-FasL 経路の限定的な関与を明らかにしたものの、骨髄内における allo-CD4⁺ T 細胞による標的細胞の認識機序および分子機序の詳細は未だ解決すべき課題として残されている。

2. 研究の目的

本研究では、マウス GVHD モデルを用いて、骨髄 GVHD による骨髄造血ニッチ障害の発症過程を詳細に解析し、allo-CD4⁺ T 細胞による標的細胞の認識、障害の分子機序を解明することで、骨髄 GVHD の新規診断・予防・治療法開発の基礎を築くことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨髄 GVHD における間質系細胞に発現する同種抗原の意義

骨髄 GVHD を誘導する allo-CD4⁺ T 細胞の骨髄におけるエフェクター機能発現に、骨髄間質細胞が発現する同種抗原が必須かどうかを検討するため、致死量の X 線照射を施した B6 マウスを bm12 マウス由来骨髄で再構築した B6→bm12 骨髄キメラを作成し、同マウスをレシピエント、B6 マウスをドナーとした allo-HSCT モデルを作成した。GVHD 誘導 14 日目に骨髄 B 細胞の回復をフローサイトメトリーで、骨芽細胞障害を骨髄凍結切片のアルカリフォスフォターゼ染色で解析した。

(2) allo-CD4⁺ T 細胞のトランスクリプトーム解析および治療標的の探索

allo-CD4⁺ T 細胞による骨芽細胞障害のエフェクター分子を検索するため、CD45.1 マウス T 細胞を用いて GVHD を誘導した BDF1 (CD45.2) マウスの脾臓から CD45.1⁺CD44^{hi}CD4⁺ T 細胞 (allo-CD4 Te) または CD45.1⁺CD44^{hi} CD8⁺ T 細胞 (allo-CD8 Te) を磁気分離法およびセルソーティングにより調整し、同細胞について包括的遺伝子発現解析を行った。Allo-CD4 Te に特徴的に高発現する分子

については RT-PCR により未刺激 CD4⁺ T 細胞および GVHD マウス骨髄における発現を検証した。

(3) 骨芽細胞マーカーおよび OIF の発現動態

OIF の治療標的としての妥当性を検証するため、移植後経時的に骨髄における骨芽細胞マーカーおよび骨芽細胞抑制因子 (OIF) の遺伝子発現を Real-time RT-PCR により解析した。

(4) allo-CD4 Te による骨芽細胞障害機序

allo-CD4 Te による骨芽細胞障害が細胞増殖抑制、細胞死誘導、分化障害、いずれによるものかを検証するため、前骨芽細胞株 MC3T3 と GVHD 誘導 7 日目の脾臓より調整した allo-T 細胞の共培養を行い、細胞増殖を WST-1 proliferation assay で、細胞死を LDH release assay で、骨芽細胞分化を ALP 染色で解析した。

(5) OIF 欠損マウスを用いた GVHD モデルの解析

野生型および OIF 欠損マウス由来 T 細胞を用いて B6→BDF1 GVHD モデルを作成し、B 細胞の回復および骨芽細胞障害を解析した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞を含む間質系細胞がドナー T 細胞にとって syngenic となる

B6→(bm12→B6) モデルにおいても、間質系細胞が allo となる B6→(bm12→bm12) モデルと同様に重度の B 細胞の回復抑制を認めた。また、骨髄の ALP 染色においても同等の骨芽細胞障害を認めたことから、allo-CD4⁺ T 細胞の骨髄におけるエフェクター機能発現は間質細胞における同種抗原の発現に非依存的であることが明らかになった。

(2) 次世代 DNA シークエンサーと独自に開発したトランスクリプトーム解析法を用いて、allo-CD4 Te、allo-CD8 Te について包括的・定量的遺伝子発現解析を行い、それぞれ 4,554,208 および 5,605,706 の unique tag を得た。得られた allo-CD4 Te と allo-CD8 Te の遺伝子発現プロファイルを比較したところ、CD40L, RANKL などの TNF ファミリー分子に加え、骨芽細胞抑制因子が allo-CD4 Te に特徴的に高発現する事が明らかになった。また、活性化状態の異なる CD4⁺ T 細胞および正常または GVHD 発症マウス骨髄組織における骨芽

細胞抑制因子の遺伝子発現を解析したところ、エフェクター型CD4⁺ T細胞に特徴的に発現し、またGVHD発症骨髄においても高発現することが明らかになった。

- (3) 骨髄において、骨芽細胞マーカーである *ALP*, *Osterix*, *Osteocalcin*, *Kera* の相対的mRNAはGVHD誘導の有無にかかわらず、移植後3日目に血球系細胞の消失にともなう一過性の増加を示した。これらのmRNA発現はGVHD誘導群ではT細胞浸潤が始まる7日目にかけて著減し、回復を認めなかった。骨細胞マーカー *Dmpl* および内皮細胞マーカー *P1vap* は観察期間を通じてGVHD誘導群においてもコントロール群と同程度の発現を認める一方、線維芽細胞マーカー *Col1 α 2* はGVHD誘導群で7日目以降著減しており、またOIFの発現はGVHD群において7日目以降に上昇していた。これらの結果からGVHDに伴う骨髄組織細胞の障害は主に骨芽細胞、線維芽細胞に強く誘導され、骨細胞、内皮細胞の障害は軽度であることが示唆された。
- (4) Allo-T細胞と前骨芽細胞株MC3T3の共培養系において、比較対象とした移植前T細胞(Naïve-T)と、GVHDマウス由来ドナーT細胞(GVHD-T)いずれもCD3/CD28刺激の有無にかかわらずMC3T3の増殖および細胞死に影響を与えなかった。一方、GVHD-T細胞との共培養により、骨芽細胞マーカーであるALP活性および*Osterix* mRNAの誘導抑制を認め、この抑制作用はCD3/CD28刺激によりさらに亢進した。これらの結果から、allo-T細胞による骨芽細胞抑制は主に分化過程の障害であることが示唆された。
- (5) 野生型およびOIF KOマウス由来T細胞を用いて作成したB6→BDF1 GVHDモデルにおいて骨髄B細胞および骨芽細胞障害を検討したところ、OIF KOマウス由来T細胞も野生型と同程度のB細胞回復抑制および骨芽細胞障害を誘導した。これらの結果から、OIFの単独阻害のみでは急性GVHDにおける骨髄GVHDの回避は困難であることが示唆された。

本研究から、急性GVHDモデルにおいてCD4 T細胞が特異的に骨髄B細胞および骨芽造血ニッチを障害する分子機序として、骨芽細胞抑制因子OIFの関与の可能性を見いだした。OIFの単独阻害のみでは骨髄GVHDの回避は困難であったが、今後OIFとFasLとの二重阻害

による予防・治療の可能性、OIFの骨髄GVHDの診断マーカーとしての可能性、また慢性GVHDにおけるOIFの関与を検証する必要がある。

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1件)

- ① Matsushima K (著者10名、10番目): Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche following MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**. 115(26):5401-5411, 2010 (査読有)
DOI: 10.1182/blood-2008-01-136895

[学会発表] (計11件)

- ① SUENAGA Fumiko: Lymph node graft-versus-host disease: CD8⁺ T cell-mediated destruction of lymph nodes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 第40回日本免疫学会学術総会、2011年11月29日、幕張メッセ、千葉県
- ② 末永文子: 同種造血幹細胞移植後のCD8⁺T WANG Yong: Pre-conditioning and the Immune Response Cooperatively Impair the Osteoblastic Hematopoietic Niche in Murine Bone Marrow Graft-versus-host Disease. 第40回日本免疫学会学術総会、2011年11月27日、幕張メッセ、千葉県
- ③ MATSUSHIMA Kouji: Delayed and aberrant immune reconstitution due to destruction of hematological and immunological niches in the acute and chronic phases of GVHD. 第40回日本免疫学会学術総会、2011年11月27日、幕張メッセ、千葉県
- ④ 末永文子: 細胞依存的なリンパ節破壊(LN GVHD). 第32回日本炎症・再生医学会、2011年6月3日、京都国際会館、京都府
- ⑤ UEHA Satoshi: Bone marrow graft-versus-host disease: immune attack to osteoblastic hematopoietic niche after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 19th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 2011年5月25日、全日空ゲートタワーホテル大阪、

大阪府

- ⑥ 上羽悟史：骨髄 GVHD：同種造血幹細胞移植に伴う骨髄造血ニッチの破壊. The 7th Osteoimmunology Forum, 2011年2月2日、山上会館、東京都
- ⑦ UEHA Satoshi：Depletion of allo-CD4 T cells protects hematopoietic niche while preserves graft-versus-tumor effects after allo-HSCT. The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2010年9月22日、大阪国際会議場、大阪府
- ⑧ WANG Yong: Depletion of allo-CD4 T cells protects hematopoietic niche while preserves graft-versus-tumor effects after allo-HSCT. 14th International Congress of Immunology, 2010年8月26日、神戸国際展示場、兵庫県
- ⑨ UEHA Satoshi：Depletion of allo-CD4 T cells protects hematopoietic niche while preserves graft-versus-tumor effects after allo-HSCT. *14th Annual Meeting of Japanese Association of Cancer Immunology*, 2010年7月22日、KKRホテル熊本、熊本県
- ⑩ 庄野雄介：同種造血幹細胞移植におけるCD4 T細胞の除去は骨髄造血幹細胞ニッチを保護し移植片対腫瘍効果を保存する. 第19回日本癌病態治療研究会, 2010年6月30日, 東京ステーションコンファレンス、東京都
- ⑪ UEHA Satoshi：Destruction of Bone Marrow Osteoblastic Niche for Hematopoiesis Mediated by Donor CD4 T Cells after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 3rd International Conference on Osteoimmunology, 2010年6月20日, Santorini, Greece.

[図書] (計2件)

- ① 松島 綱治「改訂版 分子予防医学」分子予防環境医学会 編、本の泉社、p5-19、2011年
- ② 上羽 悟史「臨床粘膜免疫」清野宏 編、シナジー、p445-454、2010年

[その他]

ホームページ：

<http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 綱治 (MATSUSHIMA KOUJI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50222427

(2) 研究分担者

上羽 悟史 (UEHA SATOSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00447385

(3) 連携研究者

今村 雅寛 (IMAMURA MASAHIRO)
北海道大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20160062