

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：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790990

研究課題名（和文） 急性移植片対宿主病分子マーカー-CCL8 の分子機能解析

研究課題名（英文） Analysis of molecular function of CCL8 as a biomarker for acute graft-versus-host disease

研究代表者 山本 雅樹 (YAMAMOTO MASAKI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80404664

研究成果の概要（和文）：急性移植片対宿主病（GVHD）における分子マーカーであるケモカイン CCL8 について検討した。GVHD マウスモデルにおいて移植後 5 日目の血漿中 CCL8 濃度は、その後の重症度や予後と相関関係を示した。ヒト検体においても血清中 CCL8 濃度は治療反応性を反映し、また GVHD 重症度と相関する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We studied about chemokine CCL8 as a biomarker of acute graft-versus-host disease (GVHD). The plasma CCL8 concentration in GVHD mouse model showed correlated with the severity and the prognosis of GVHD mice. Similarly, serum CCL8 concentration may reflect the response to the treatment against GVHD and correlate with the severity of GVHD in human.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：移植片対宿主病、バイオマーカー、ケモカイン、造血幹細胞移植、マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は血液腫瘍のみならず、悪性腫瘍、先天性免疫不全、代謝疾患などの根治療法としてその適応が拡大している。移植片対宿主病（graft-versus-host disease: GVHD）は造血幹細胞移植の成否を左右する重大な合併症である。我々はプロテオミクス技術を用いて GVHD の分子マーカー候補タンパクをケモカイン CCL8 と同定した。マウス及びヒトの血漿中で CCL8 濃度は GVHD 特異的に上昇し、シクロスポリンによる免疫

抑制療法により低下し、GVHD の有用な診断マーカーとしての可能性が示された。また我々は *in vitro* での CCL8 発現系を開発し、その系における CCL8 産生細胞を免疫染色により同定し、CCL8 発現機序の一部を解明した。しかしながら GVHD 病態における CCL8 の役割や CCL8 濃度と GVHD の重症度、予後との関連は明らかになっていない。

2. 研究の目的

GVHD マウスモデルを用いて CCL8 タンパ

クを定量的し、CCL8 と GVHD 重症度、予後との関係を明らかにする。またヒト検体において CCL8 濃度と GVHD の重症度、治療反応性との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 重症度の異なる GVHD マウスモデルの作製：レシピエントを BALB/c マウス、ドナーを C57BL/6 マウスとし 8.25Gy の全身放射線照射後に骨髄細胞 2×10^7 個を移植し GVHD モデルとした。骨髄細胞に追加して 0.1, 0.5, 1×10^7 個のドナー脾臓細胞を追加移植することで異なる重症度の GVHD マウスモデルを作製した。

(2) GVHD マウスモデル血漿を用いた CCL8 の定量：GVHD マウスモデルの血漿中 CCL8 をマウス CCL8 タンパクに特異的な抗体を使用し、ELISA 法により定量した。

(3) マウス GVHD スコアリングシステムによる GVHD マウスの重症度の定量化：GVHD マウスの臨床症状から GVHD マウスの重症度を点数化した。また移植後 14 日目のマウスを解剖し、皮膚、肺、肝、消化管など臓器別に病理組織学的重症度を点数化した。

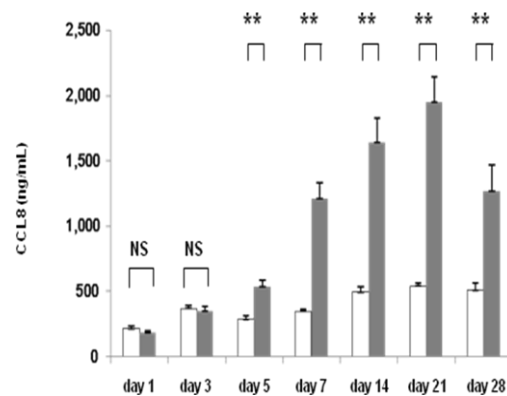
(4) GVHD マウスにおける GVHD 予防が血漿中 CCL8 濃度へ及ぼす影響：重症 GVHD マウスモデルにおいて移植 1 日前から移植後 5 日目まで連日シクロスポリンを腹腔内投与した。さらに移植後 5 日目の血漿中 CCL8 濃度とその後の生存率の関係を検討した。

(5) ヒト臨床検体における CCL8 定量：札幌医大小児科で保存されていた同種造血細胞移植後の血清サンプルを用いて ELISA 法により CCL8 の定量を行い、治療反応性、GVHD 重症度との関連を検討した。

4. 研究成果

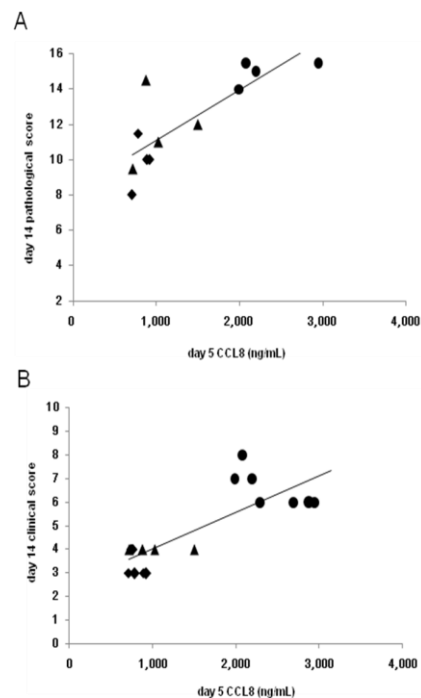
(1) 重症度の異なる GVHD マウスモデルの作製：ドナー脾臓細胞を追加移植することにより GVHD 臨床症状の悪化、生存期間の短縮など、重症度の異なる GVHD マウスモデルを作製した。

(2) GVHD マウスモデルの血漿中 CCL8 をマウス CCL8 タンパクに特異的な抗体を使用し、ELISA 法による定量した。その結果 GVHD マウスモデル血漿中で CCL8 は移植後 5 日目から有意に高値を示し、GVHD の病勢に一致して高値を維持した。(グレー：GVHD マウス、白：コントロールマウス)

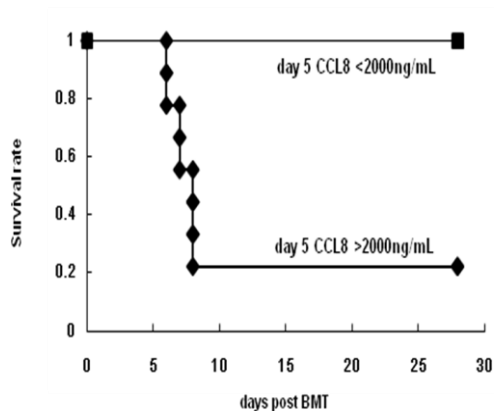


(3) 異なる重症度の GVHD マウスモデルにおいて移植後 5 日目の血漿中 CCL8 濃度と移植後 14 日目の病理学的スコアに正の相関関係を認めた。また移植後 14 日目の臨床症状から臨床的な重症度をスコア化したところ移植後 5 日目の血漿中 CCL8 濃度は移植後 14 日目の臨床的重症度および病理組織学的重症度と正の相関関係を認めた。

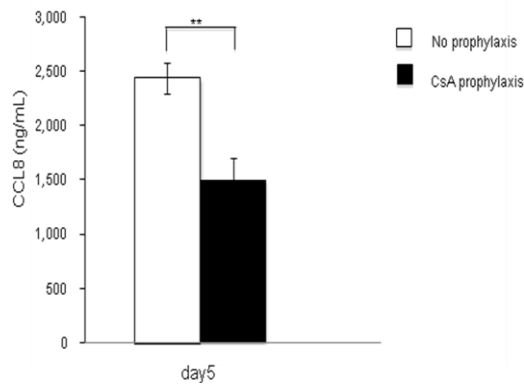
(A: 病理組織学的スコア、B: 臨床的スコア)



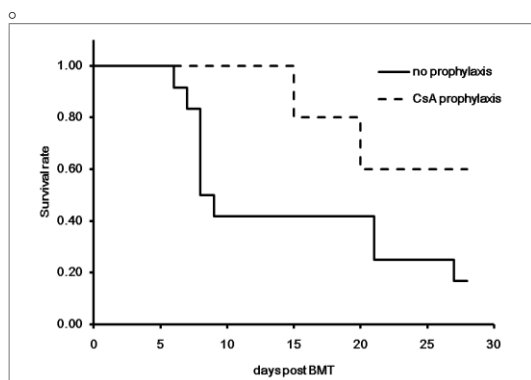
(4) 重症 GVHD マウスモデルにおいて移植後 5 日目の血漿中 CCL8 濃度が 2000 ng/mL 以上の群では移植後 2 週間以内の早期死亡率が高く、移植後 28 日目の生存率は有意に低下していた。



そこで重症GVHDマウスモデルにおいてシクロスポリンによるGVHD発症予防を行った群と行わなかった群を比較したところ、シクロスポリンの予防投与を受けた群では移植後5日目の血漿中CCL8濃度は2000ng/mL以下に低下していた。

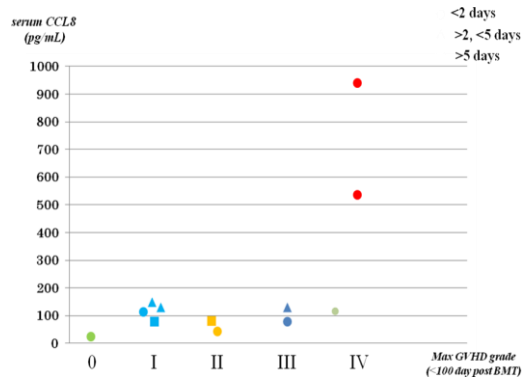


またこれらシクロスポリン予防投与を受けたGVHDマウスモデルでは予防投与を受けなかった群と比較して有意に生存率が改善していた

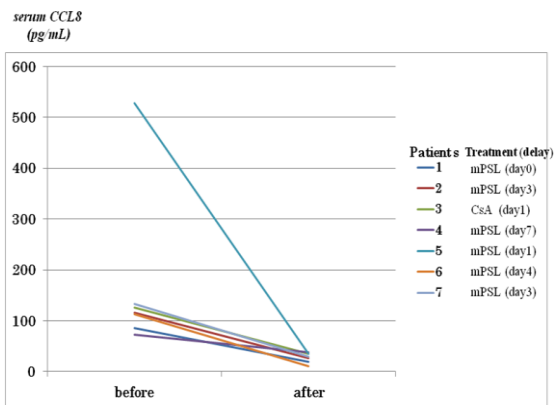


以上より移植後5日目の血漿中CCL8濃度は2000ng/mLをカットオフ値としてその後の予後と相関するバイオマーカーとして有用であり、予防措置の有効性が判断可能となることを示した。

(5) ヒトにおいてもマウスと同様GVHD群で血清CCL8が高い傾向を認めた。個々の症例の検討では、経過中のGVHD重症度がGRADE IVの患者においては、GVHD発症時の血清中CCL8濃度が高値を示す傾向が認められた。



また GVHD 治療前の血清中 CCL8 濃度と GVHD 治療開始後の血清中 CCL8 濃度を比較検討したところステロイド投与や免疫抑制剤の増量などの後にはマウス同様ヒトにおいても血清中CCL8濃度が優位に低下し、血清中CCL8濃度は治療反応性を反映するバイオマーカーとなりうることを示された。



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2件)

(1)急性GVHDの診断マーカーとしてのケモカインCCL8

山本雅樹、堀 司、太田明伸、小海康夫
血液・腫瘍科 2010; 60: 484-492. (査読なし)

(2) Early expression of plasma CCL8 closely correlates with survival rate of acute graft-vs.-host disease in mice

Yamamoto M, Ota A, Hori T, Imai S, Sohma H, Suzuki N, Hatakeyama N,

Inazawa N, Ito YM, Kimura H, Tsutsumi H,
Kokai Y.

Experimental Hematology
2011;39:1101-1112. (査読あり)
doi: 10.1016/j.exphem.2011.07.006.

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：宿主対移植片疾患の検査方法

発明者：小海康夫、山本雅樹

権利者：北海道公立大学法人 札幌医科大学

種類：特許

番号：PCT/JP2010/005271

出願年月日：平成 22 年 8 月 26 日

国内外の別：国外

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 山本 雅樹

(YAMAMOTO MASAKI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80404664