

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月25日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790432

研究課題名（和文） 骨髄移植に伴う CD4 T 細胞依存的な骨芽細胞性造血ニッチ傷害の分子機序解明

研究課題名（英文） Elucidation of the molecular mechanisms of CD4 T cell-induced osteoblastic hematopoietic niche impairments after bone marrow transplantation

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：マウス allo-HSCT モデルの解析から、骨芽細胞のみならず線維芽細胞・間葉系幹細胞が移植後早期から傷害されること、GVHD 誘導群では X 線照射後の骨芽細胞の回復が抑制されることが示唆された。骨芽細胞障害は、非血球系細胞に発現する MHC class II に部分的に依存的であり、また骨芽細胞の傷害および増殖抑制には allo-CD4 T 細胞の活性化が必要であることが明らかとなった。遺伝子発現解析から、allo-CD4 T 細胞に高発現する骨髄 GVHD のエフェクター分子候補として、骨芽細胞抑制因子を取得した。これらの結果は、骨髄 GVHD の早期診断、予防・治療法の開発に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Using mouse allo-HSCT models, we revealed that fibroblasts/mesenchymal stem cells as well as osteoblasts were damaged early after allo-HSCT, and that the recovery of osteoblasts from X-ray irradiation-mediated damage was impaired in mice with GVHD. The osteoblast impairments were partially dependent on MHC class II on host non-hematopoietic cells, whereas the killing and growth inhibition of osteoblast cell lines required activation of allo-CD4 T cells. Based on gene expression analyses, we identified an osteoblast inhibitory factor, which was specifically expressed in allo-CD4 T cells, as a candidate mediator of osteoblast impairment during BM GVHD. We expect that our results would contribute to the development of early diagnostic markers as well as the preventive and therapeutic strategies against BM GVHD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症、移植免疫、造血幹細胞、GVHD、骨芽細胞

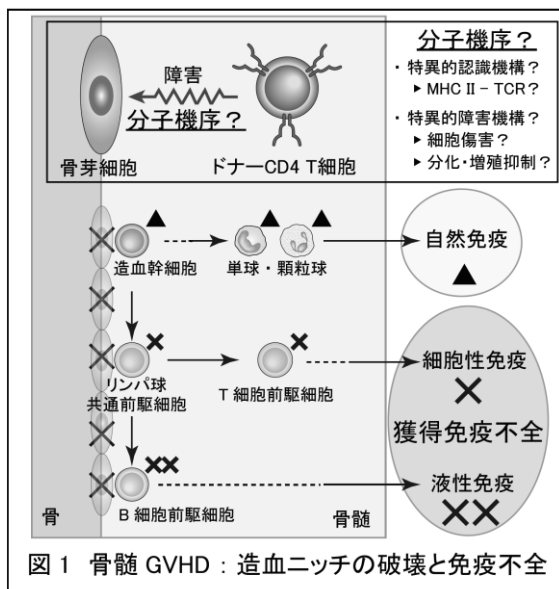
1. 研究開始当初の背景

免疫抑制剤の臨床応用により近代的移植が確立して以降、同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) は、移植片対腫瘍 (graft-versus-tumor: GVT) 効果に基づく

強力な治癒効果により、白血病などの造血器系腫瘍に対する細胞療法として大きな成果をあげてきた。しかしながら、同種免疫反応(造血幹細胞とともに宿主へ移植され

るドナーT細胞が、宿主細胞を異物と認識して起こす排除応答)により GVT 効果と表裏一体をなして現れる 移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) や、移植後の免疫不全に伴う感染症などの致死合併症は未だに克服されておらず、allo-HSCT の5年生存率は5割程度にとどまる。近年では同種免疫反応の分子機序に基づく GVHD の選択的予防、治療法開発の試みが申請者の研究グループを含む国内外の研究グループによりなされている。一方で、骨髄移植後に遷延する免疫不全に起因する感染症は、移植関連死の約3割を占める重大な問題であるにも関わらず、免疫グロブリン製剤や抗生剤の投与といった対症療法に依存せざるを得ないのが現状であり、移植後免疫不全の発症機序解明と予防、治療法の確立が急務の課題である。

臨床所見では GVHD の重症度と免疫不全が強い相関性を示すこと、さらに GVHD 発症時に骨髄抑制(血球減少)が顕現することから、申請者は、移植後の免疫不全は骨髄における免疫担当細胞の産生異常に起因すると推察した。マウス allo-HSCT モデルを解析した結果、MHC class II 不適合による CD4 T細胞依存的な GVHD 発症マウスでは、造血幹細胞を含む全ての血球画分が減少しており、中でもリンパ球共通前駆細胞 (T細胞およびB細胞の骨髄における前駆細胞) およびB細胞の回復が重度に抑制されていた。さらに、GVHD 発症マウスの骨髄組織では、造血ニッチ (血球の増殖、分化、維持に必要な因子を提供する“畑”) を構成する骨芽細胞が移植早期より完全に消失することを見出し、GVHD 発症に伴い免疫担当細胞を供給する場である 骨髄の造血ニッチが CD4 T細胞により障害されることが、移植後に遷延する免疫不全の根幹をなすことを明らかにした (Shono Y, et al. *Blood* 2010)。



申請者はドナーCD4 T細胞による宿主の骨芽細胞障害ならびにリンパ球分化抑制を“骨髄 GVHD”という新規概念として提唱するとともに、その予防・治療法についても移植前または移植後早期にドナーCD4 T細胞を除去することで、GVT 効果を損なうことなく骨髄 GVHD を回避し、T細胞およびB細胞の産生を回復出来ることを見出している (図1)。

一方で、細胞・分子レベルにおける骨芽細胞障害の発症機序は依然としてブラックボックスの中にある。これまでに CD8 T細胞依存的な GVHD モデルでは骨芽細胞障害が生じないこと、またドナーCD4 T細胞に発現する細胞傷害性因子 FasL が部分的に関与することを明らかにしてきた。しかしながら、MHC I/II 不適合モデルの予備的解析から、骨髄浸潤細胞数は CD4 T細胞より CD8 T細胞が多く、また FasL の発現も CD4 T細胞より CD8 T細胞が優位であることを確認しており、骨髄浸潤細胞数および FasL の発現強度のみでは骨芽細胞障害の CD4 T細胞依存性を説明することは出来ない。

2. 研究の目的

本研究では、ドナーCD4 T細胞による骨芽細胞の特異的障害機序について、障害過程の可視化、同種抗原認識の必要性の検証、CD4 T細胞由来エフェクター分子の同定、を通じて細胞・分子レベルの理解を深化させることにより、移植後免疫不全の予防・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

骨芽細胞障害の機序としては1) 直接の細胞傷害、または分化・増殖抑制が考えられる。また、CD4 T細胞依存性に関する仮説としては、2) CD4 T細胞による骨芽細胞の選択的認識、3) CD4 T細胞選択的なエフェクター分子 (細胞傷害性因子、骨芽細胞分化・増殖制御因子) の発現、が考えられる。これらの仮説を検証するために、本研究では臨床的に行われている骨髄移植のモデルとして、MHC またはマイナー組織適合抗原 (mHA) 不適合マウス allo-HSCT モデルを作成し、以下の基礎的解析を行った。

- ① GVHD 誘導群において骨芽細胞が消失する7日目まで、移植後経時的にドナーCD4 T細胞の骨髄浸潤および骨芽細胞のクラスター形成をフローサイトメトリーおよび免疫組織染色により

解析した。骨芽細胞の障害については、H&E 染色、骨芽細胞マーカーである alkaline phosphatase (ALP) 反応、osteocalcin, osterix などの免疫染色により定性的に解析するとともに、骨組織から RNA を抽出し、RT-PCR による骨芽細胞マーカー遺伝子発現の定量的解析を行った。これらの解析を通じて、CD4 T 細胞の骨芽細胞浸潤と骨芽細胞障害の相関、骨芽細胞障害が進行するタイミングを検討した。

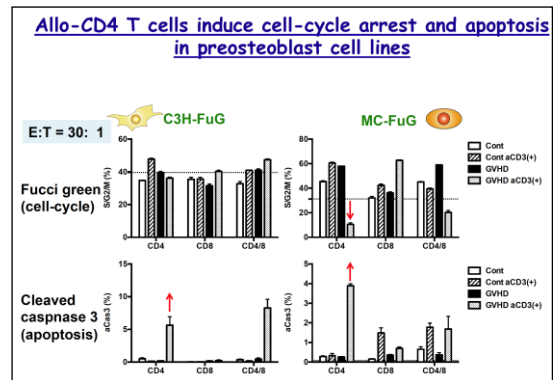
- ② 骨芽細胞障害に CD4 T 細胞による骨芽細胞の allo-MHC II 認識が関与するかを検証するために、非血球系細胞が syngenic かつ血球系細胞が allogenic な骨髄キメラマウスをレシピエントとして allo-HSCT を行い、骨芽細胞障害および免疫再構築を評価した。また骨芽細胞における MHC II および Fas の発現を解析した。
- ③ 骨髄 GVHD におけるドナー T 細胞による骨芽細胞障害の細胞・分子機序を明らかにするため、GVHD マウスより調整した allo-T 細胞と、細胞周期 indicator Fucci を遺伝子導入した間葉系幹細胞株 C3H10、および骨系前駆細胞株 MC3T3 との共培養系を確立し、allo-T 細胞がこれらの細胞株の細胞周期ならびに active caspase 3 を指標としたアポトーシスへ及ぼす影響をフローサイトメトリーにより解析した。

CD4T 細胞特異的骨髄 GVHD 媒介因子の検索：ドナー由来 CD44^{hi} エフェクター CD4 および CD8 T 細胞について、次世代 DNA シークエンサーを用いた包括的遺伝子発現解析を行い、ドナー由来エフェクター CD4 T 細胞に選択的に発現する細胞膜結合型または分泌型タンパク質を検索した。得られた候補分子について、GVHD 発症マウスにおける発現の分布および kinetics を解析した。

4. 研究成果

- ① ドナー CD4 T 細胞による骨芽細胞の特異的障害機序について、障害過程の可視化するため、GVHD(+)群において骨芽細胞が消失する 7 日目まで、経時的にフローサイトメトリー

解析を行った。エフェクター型ドナー CD4 T 細胞の骨髄浸潤は、移植後 3-7 日目に著明になり、14 日目にかけて増加した。非脱灰凍結骨切片について経時的に alkaline phosphatase (ALP) 染色を行い、骨芽細胞の分布を検証したところ、ドナー T 細胞の浸潤 kinetics と一致して、移植後 4 日目および ALP 陽性骨芽細胞が骨髄腔内より消失した。これらのデータと一致して、Runx2, Osterix, Osteocalcin などの骨芽細胞系列に発現する遺伝子は移植後 3 日目から 7 日目にかけて著減した。この傾向は骨系列細胞の中でも主に骨芽細胞選択的に発現する Keratocan において著明である一方、骨細胞に主に発現する Dmp1 や、内皮細胞特異的遺伝子 Plvap の抑制は軽度であった。また、線維芽細胞に主に発現する Col1a2 についても Osteocalcin, Kera と同程度の発現抑制を認め、骨芽細胞とともに線維芽細胞も骨髄 GVHD の標的となっている事が明らかと



なった。

- ② 骨芽細胞障害における CD4 T 細胞による骨芽細胞上の allo-MHC II 認識の関与:骨髄 GVHD による骨芽細胞障害 CD4 T 細胞による骨芽細胞の allo-MHC II 認識が関与するか検証するために、非血球系細胞が syngenic かつ血球系細胞が allogenic な骨髄キメラマウスをレシピエントとして allo-HSCT を行ったところ、骨髄における B 細胞の回復は同骨髄キメラにおいても重度に抑制されていたが、骨芽細胞障害は部分的な回復を認めたことから、骨芽

Allo-CD4 dominant genes

CD4	CD8	CD4/CD8	Gene
3173	16	198.3	CD4 antigen (Cd4)
122	1	122.0	lectin, galactose binding, soluble 7 (Lgals7)
339	3	113.0	XXXX
1089	16	68.1	XXXX
274	7	39.1	XXXX
237	8	29.6	XXXX
54	2	27.0	WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (Wisp1)
2155	89	24.2	Osteoblast inhibitory factor
447	19	23.5	RANKL
5575	238	23.4	folate receptor 4 (delta) (Folr4)
506	26	19.5	lymphocyte antigen 6 complex, locus C1 (Ly6c1)
487	28	17.4	insulin-like growth factor I receptor (Igf1r)
601	709	1.2	Interferon gamma (IFNg)

細胞抑制にはドナーT細胞による非血球系細胞の直接認識が部分的に関与することが明らかとなった。

- ③ ナイーブT細胞は抗CD3抗体による活性化刺激の有無にかかわらず、骨芽細胞誘導条件で培養したMC3T3の分化・成熟に影響を与えなかったが、allo-T細胞はCD3刺激依存的にOsterix、Runx2、アルカリフォスファターゼといった骨芽細胞分化マーカーの発現上昇を阻害した。また、細胞周期およびアポトーシスへの影響を解析したところ、allo-CD4+T細胞はCD3刺激依存的にC3H10およびMC3T3にアポトーシスを誘導し、またMC3T3選択的に細胞周期を抑制した。これらの結果は、allo-CD4+T細胞が間葉系幹細胞および骨系前駆細胞へ活性化依存的にアポトーシスを誘導し、さらに骨系細胞選択的に増殖・分化を抑制することで、骨髄GVHDにおける骨芽細胞障害を誘導していることを示唆するものである。

- ④ 包括的遺伝子発現解析から、allo-CD4 T細胞はナイーブCD4 T細胞やallo-CD8 T細胞に比較し、TNFファミリーに属する細胞死、活性化、分化調節因子を高発現していることが明らかになった。また、骨芽細胞の増殖・分化に抑制的に働く骨芽細胞抑制因子の発現も認め、特に骨芽細胞抑制因子のGVHD誘導骨髄における発現動態はallo-CD4 T細胞の骨髄浸潤と正の相関を示す一方、骨芽細胞数ならびに骨芽細胞マーカーとは負の相関を示すことが明らかとなった。

今後、骨髄GVHDの病態形成におけるこれらの因子の関与を明らかにし、骨髄GVHDの新規予防・治療法開発の基礎を築くとともに、早期診断マーカーとしての有用性をヒト検体で検討する予定である。

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4件)

- ① Hoshino A 他 (9名中2番目), Roles of chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts and osteoclasts. J Cell Sci, 査読有り、2013(126) 1032-1045. (DOI: 10.1242/jcs.113910.)
- ② Nagao K 他 (20名中7番目), Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin, Nat Immunol. 査読有り、2012(13)744-752. (DOI: 10.1038/ni.2353)
- ③ Ueha S 他 (3名中1番目), Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. Front Immunol. 査読有り、2012(3) 71. (DOI: 10.3389/fimmu.2012.00071.)
- ④ 上羽悟史、他 (3名中1番目)、骨髄GVHD、医学のあゆみ、査読無し、2012(242)671-676

[学会発表] (計5件)

- ① 上羽悟史, 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. 平成23年5月25日、全日空ゲートタワーホテル大阪、大阪
- ② 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、平成23年11月27日、幕張メッセ、千葉
- ③ 末永 文子, 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、平成 23 年 11 月 29 日、幕張メッセ、千葉

- ④ 小杉 瑞葉, Destruction of hematopoietic niche after allogenic hematopoietic stem cell transplantation, 第 34 回日本炎症再生医学会, 平成 24 年 7 月 5 日、ホテル日航福岡 (福岡)
- ⑤ 小杉 瑞葉, Bone marrow dysfunction and defective B lymphopoiesis during chronic GVHD, 第 41 回日本免疫学会, 平成 24 年 12 月 5 日、神戸国際展示場 (兵庫)

〔図書〕 (計 1 件)

庄野雄介、他、中外医学社、Annual Review 血液、2012 P31-40

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者