

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 6 月 19 日現在

機関番号：83301
 研究種目：若手研究 B
 研究期間：2011 年～2012 年度
 課題番号：23791213
 研究課題名（和文）PUVA 処理制御性樹状細胞による移植片対宿主病への新たな治療戦略
 研究課題名（英文）New treatment strategy for GVHD by infusion of
 PUVA-treated-tolerogenic-dendritic cells
 研究代表者
 前馬 秀昭 (MAEBA HIDEAKI)
 国立病院機構金沢医療センター臨床研究部 小児科医師
 研究者番号：10419335

研究成果の概要（和文）：PUVA 処理で樹状細胞が制御性樹状細胞の性質を獲得した。その性質が、どのような機序で獲得したか検討した。トリプトファン代謝による細胞増殖の抑制をみるため、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の発現を定量 PCR 法にて測定したところ、樹状細胞の PUVA 処理にて 5 倍以上の発現増加を認めた。PUVA 処理が樹状細胞以外の他の血球、リンパ球 (CD4、CD8、B220) にもその作用が及ぶか検討した。PUVA 処理したリンパ球 (CD4、CD8、B220) および PUVA 処理した樹状細胞と同系統の骨髄由来樹状細胞を stimulator として、混合リンパ球反応 (MLR) を行った。結果、PUVA 処理した樹状細胞とともに MLR を施行した群のみ、その反応は抑えられた。体外で樹状細胞を培養し、それに PUVA 療法を施行して、体内に輸注する細胞療法が GVHD に対して有効な治療法となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Extracorporeal photopheresis (ECP) is a leukapheresis-based immunomodulatory therapy by exposing isolated white blood cells to photoactive 8-MOP (psoralen) and UVA radiation (PUVA) for refractory acute and chronic graft-versus-host disease (GVHD). We have reported that bone marrow-derived dendritic cells (BM-DCs), which are generated from bone marrow cells plus GM-CSF, acquired tolerogenicity by PUVA-treatment in mice. To clarify the mechanisms of how PUVA-treated DCs induce tolerogenicity in further detail, we compared the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), which induces T-cell anergy by tryptophan depletion and by the production of metabolic byproducts collectively known as kynurenines, by real-time PCR between PUVA-DCs and BM-DCs. An increased IDO gene transcription level was observed in PUVA-DCs about 5 times more than in BM-DCs. The question we have to consider next is whether tolerogenic capacity is acquired only in DCs or other lymphocytes subpopulations. To test this, PUVA-treated CD4, CD8, or B220 cells from the same strain of stimulator cells were added into the MLR mixture. MLR was suppressed only when PUVA-DCs were added. Infusion of PUVA-treated DCs could have a great potential to treat lethal acute GVHD in clinical settings.

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：小児科学

科研費の分科・細目：小児血液学

キーワード：GVHD、制御性樹状細胞、造血幹細胞移植、PUVA 療法

1. 研究開始当初の背景

難治性造血器腫瘍の根治的治療法として造

血幹細胞移植が確立されているが、急性 GVHD のために、十分な治療成績が得られていない現状がある。急性 GVHD は、移植片に存在する末梢のナイーブ T 細胞が輸注後 2 次性リンパ組織（末梢リンパ節、パイエル板、脾臓、腸管膜リンパ節など）に集積し、ホスト由来の樹状細胞と反応し爆発的に増殖する。その後、GVHD 標的臓器である肝臓、皮膚、腸管に浸潤し組織が傷害される。このメカニズムを発症させないために、幹細胞移植前にホストタイプの制御性樹状細胞を大量投与することによって、急性 GVHD を抑制できることがマウスモデルにて示された。しかし臨床の間では、ホストタイプの制御性樹状細胞の作成は白血病細胞の混入や骨髄の疲弊のため不可能である。我々の作成した psoralen+紫外線照射を利用した制御性樹状細胞（PUVA-DC）は、ドナータイプおよびサードパーティからの作成でも混合リンパ球反応を抑える事が可能であった。この結果から PUVA-DC を用いて HLA の壁を乗り越える造血幹細胞移植の開発の可能性がでてきた。

2. 研究の目的

psoralen+紫外線照射を利用した制御性樹状細胞 (PUVA-DC) における免疫抑制の制御性メカニズムを詳細に解析する。将来的には HLA 不一致の造血幹細胞移植における GVHD 予防ならびに治療にこの PUVA-DC を用いた細胞療法を行うことを目的とする。

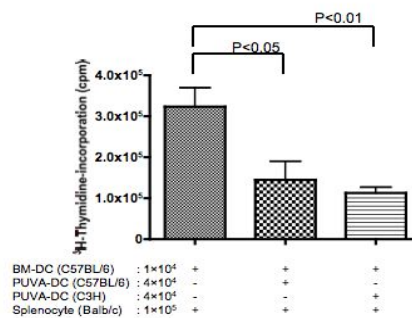
3. 研究の方法

マウス骨髄細胞から、GM-CSF を用い 10 日間かけて大量の未熟樹状細胞を作製する。その未熟樹状細胞に対して、psoralen (200ng/ml) を添加、その後 UVA 照射 (2J/cm²) を施行し 24 時間経過したものを、PUVA-DC として実験に用いる。PUVA-DC と UVA 照射のみ施行し、24 時間経過した樹状細胞

(UVA-DC) と未熟樹状細胞を用いて Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) を行った。トリプトファンを枯渇させることにより細胞増殖を抑える indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 酵素の発現を mRNA で骨髄由来樹状細胞および PUVA 処理した樹状細胞で比較した indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) を mRNA にて発現量を比較した。また PUVA 処理が樹状細胞以外の他の血球、リンパ球 (CD4、CD8、B220) にもその作用が及ぶか検討した。PUVA 処理したリンパ球 (CD4、CD8、B220) および PUVA 処理した樹状細胞と同系統の骨髄由来樹状細胞を stimulator として、混合リンパ球反応 (MLR) を行いその抑制性の反応を検討した。

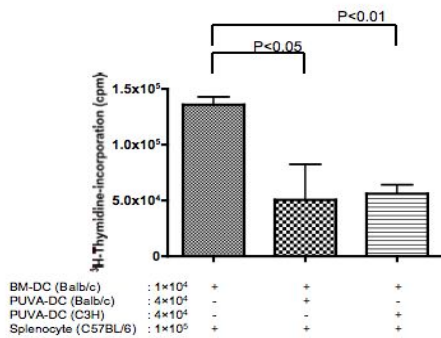
4. 研究成果

(1) responder (Balb/c) および stimulator (C57BL/6) とは異なる系統の PUVA-DC (C3H) を加え、混合リンパ球反応が抑制される効果を持つか検討を行った。

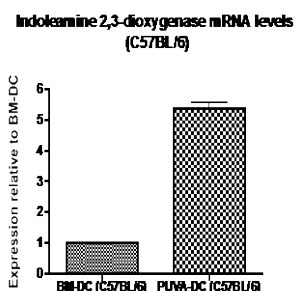


結果、図に示すように Third-party における PUVA-DC を混合リンパ球反応に加えることで抑制作用を示した。(p<0.01)

(2) 同様の混合リンパ球反応を responder (C57BL/6) および stimulator (Balb/c) に変更し異なる系統の PUVA-DC (C3H) を加えても Third-party における PUVA-DC にてその反応を抑えることが出来た。(p<0.01)

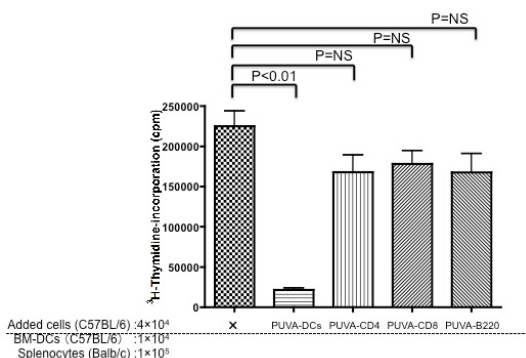


(3) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の発現を定量PCRにて測定



IDOmRNA の発現は、約 5 倍以上に増加していた。この結果から免疫寛容の誘導の機序として IDO 発現によるトリプトファン枯渇作用による細胞増殖の抑制が示唆された。

(4) PUVA 処理を樹状細胞以外の血球、リンパ球 (CD4、CD8、B220) に施行し寛容を誘導するか検討した。PUVA 処理したリンパ球 (CD4、CD8、B220) (C57BL/6) および PUVA 処理した樹状細胞と同系統の骨髄由来樹状細胞を stimulator (C57BL/6) として、responder (Balb/c の脾臓細胞) を用いて混合リンパ球反応 (MLR) を行った。



PUVA 処理した樹状細胞群のみ混合リンパ球反応 (MLR) を抑えた。PUVA 処理による免疫寛容を誘導する機序は主に樹状細胞のみであることが判明した。

上記の結果から、体外で樹状細胞の培養を行い、その細胞に PUVA 処理を行って体内に戻すことで寛容を誘導されることが予想され GVHD に対する有効な治療法となりうる可能性が示唆された。

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)

Ikawa Y, Nishimura R, Maeba H, et al
Expansion of a liver-infiltrating cytotoxic T-lymphocyte clone in concert with the development of hepatitis-associated aplastic anaemia.
British Journal Haematology.

査読有. volume 191, 2013. 599-602.

doi: 10.1111/bjh.12259.

福田正基, 西村良成, 前馬秀昭 他
フローサイトメトリー法による細胞解析が診断と病勢把握に有用であった EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症. 臨床血液. 査読有. volume 53(3), 2012. 337-341.

[学会発表] (計 3 件)

Hideaki Maeba, Ryosei Nishimura, et al
Only Dendritic Cells, but Not Lymphocytes, Acquired Tolerogenicity by PUVA-Treatment by Upregulation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO)

第 53 回アメリカ血液学会総会

2011 年 12 月 10 日~13 日

Rie Kuroda, Hideaki Maeba, Ryosei Nishiura,
et al

Attempting to classify prolonged
graft-versus-host disease according to
monocyte activation status in addition to
T-cell.

第 53 回アメリカ血液学会総会
2011 年 12 月 10 日～13 日

Rie Kuroda, Hideaki Maeba, Ryosei Nishiura,
et al

Both tissue-derived and bone
marrow-derived host IL-17 producing cell
are required for preventing acute
graft-versus-host disease.

第 53 回アメリカ血液学会総会
2011 年 12 月 10 日～13 日

Rie Kuroda, Hideaki Maeba, Ryosei Nishiura,
et al

Evaluating Prolonged GVHD Based On
Monocyte and T-Cell Activation, Leads to
Early Detection of Immunological Changes
Before GVHD Exacerbations

第 54 回アメリカ血液学会総会
2012 年 12 月 8 日～11 日

Shintaro Mase, Hideaki Maeba, Ryosei
Nishiura, et al

Allogeneic Cytokine-Induced Killer
Cell-Dependent Elimination of Host
Dendritic Cells Leads to Less
Graft-Versus-Host Disease

第 54 回アメリカ血液学会総会
2012 年 12 月 8 日～11 日

[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://ped.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前馬 秀昭 (MAEBA HIDEAKI)
国立病院機構金沢医療センター臨床研究
部 小児科医師
研究者番号：10419335

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()