

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659176

研究課題名(和文) ヒト化マウスを用いた移植片対宿主病(GVHD)に対する新規分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Development of the novel molecular target therapy for the graft versus host disease (GVHD) using the humanized mice

研究代表者

渋谷 和子 (Shibuya, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00302406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、急性GVHDの新規抗体療法を検討するために、新たに遺伝子を導入したヒト化マウスを作製し、ヒトの急性GVHDの免疫応答を再現出来る系を確立し、さらに、この系を利用して、私達がマウスの系で急性GVHD病態との関連を見いだしたDNAM-1に対する抗体療法の治療効果を検討することを目的とし、ヒトDNAM-1リガンドトランスジェニック超免疫不全マウスの作製と抗ヒトDNAM-1抗体の作製を行った。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that DNAM-1 plays an important role in the development of GVHD in a mouse model and is an ideal molecular target for therapeutic approaches to GVHD.

In this project, to investigate whether the administration of anti-human DNAM-1 antibodies ameliorates human GVHD, we have generated humanized mice expressing the human DNAM-1 ligand, CD155. For this experiment, we established 87 anti-human DNAM-1 monoclonal antibodies.

研究分野：免疫学、臨床免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：分子標的 移植片対宿主病 骨髄移植 ヒト化マウス 免疫応答制御

1. 研究開始当初の背景

(1)急性移植片対宿主病(graft versus host disease:GVHD)の現状

急性移植片対宿主病(graft versus host disease:GVHD)は、骨髄移植における最も重篤な合併症であり、移植の成否を左右するばかりでなく、生命予後にも直接影響する。急性GVHDは、骨髄移植症例の約3分の2に合併する(日本造血細胞移植学会全国調査)。現在、治療はステロイドなどの非特異的な免疫抑制剤が主体であり、急性GVHDに対する特異的な治療法の開発が望まれている。

(2)抗DNAM-1抗体による急性GVHD治療の基礎的研究

DNAM-1は、細胞傷害を惹起する活性化受容体である。T細胞、NK細胞などの免疫細胞に発現している。急性GVHDは、ドナーのT細胞がレシピエント組織の細胞を非自己と認識して起こすアロ免疫応答であるが、最近、応募者らは、急性GVHDにおいて、ドナーT細胞上のDNAM-1とレシピエントの組織に存在するCD155の結合が、ドナーT細胞を活性化し、病態を増悪させていることを見いだした(*Proc Natl Acad Sci USA*. 107:18593. 2010)。さらに、応募者らは、急性GVHDを発症したマウスに抗マウスDNAM-1抗体を投与すると病態が改善することを観察した。しかし、抗ヒトDNAM-1抗体によってヒトの急性GVHDが治療できるかどうかについては不明である。

2. 研究の目的

近年注目されている分子標的療法のひとつに抗体療法がある。標的分子の探索とそれに対する抗体療法の検討には、通常マウスモデルが利用されるが、抗マウス抗体と抗ヒト抗体のエピトープやFcの差異などにより、マウスで観察した治療効果が必ずしもヒトで認められるとは限らない。最近開発されたヒト化マウスは、免疫不全マウス体内でヒトの造血系を再構築したマウスで、抗ヒト抗体の効果を検討するのに極めて有用である。しかし、造血系だけがヒト化されているため、急性GVHDなどの臓器障害に対する治療効果については検討できない。本研究では、急性GVHDの新規抗体療法を検討するために、新たに遺伝子を導入したヒト化マウスを作製し、ヒトの急性GVHDの免疫応答を再現出来る系を確立し、さらに、この系を利用して、私達がマウスの系で急性GVHD病態との関連を見いだしたDNAM-1に対する抗体療法の治療効果を検討することを目的とし、ヒトDNAM-1リガンドCD155トランスジェニック超免疫不全マウスを作製と抗ヒトDNAM-1抗体の作製を行った。

3. 研究の方法

(1)ヒトの急性GVHDの免疫応答を生体内で再現出来るヒト化マウスの作製

ヒト化マウスはNOD/scidマウスとIL-2レセプター γ 鎖遺伝子欠損マウスを掛け合わせた複合型重症免疫不全マウス(NOGマウス)にヒトの造血系を再構築したマウスであり、マウスの体内でヒトの免疫応答を観察することができる有用な系である。一方、急性GVHDは、ドナーT細胞がレシピエントの組織のアロ抗原に対して免疫応答を起こす事が病態の主体であるため、造血系のみがヒト化されている従来のヒト化マウスでは、急性GVHDの免疫応答をマウス体内で再現することはできない。そこで、ドナー免疫細胞上のDNAM-1とレシピエント細胞上のDNAM-1リガンドCD155の結合がマウス体内で再現できるように、ヒトCD155トランスジェニックNOGマウスを作製を試みた。具体的には、ICR由来のヒトCD155トランスジェニックマウスをNODマウスに戻し交配し、NODの遺伝背景を有するCD155トランスジェニックマウスを作製する。このマウスを、次にNOGマウスと交配して、ヒトCD155トランスジェニックNOGマウスを得る。

(2)抗ヒトDNAM-1抗体の作製

抗ヒトDNAM-1抗体投与によるヒトの急性GVHDの治療効果を検討する目的で、上記ヒト化マウスを作製と並行して抗ヒトDNAM-1抗体産生ハイブリドーマを樹立した。具体的には、ヒトDNAM-1トランスフェクタントとリコンビナントヒトDNAM-1タンパクを作製し、これらを用いて、マウスに免疫を行った。その後、リンパ節細胞を採取し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製した。スクリーニングは、ヒトDNAM-1トランスフェクタントを染色してフローサイトメトリーで解析する方法と、リコンビナントヒトDNAM-1タンパクを用いてELISAにて検出する方法により、2重に確認した。また、得られたハイブリドーマのV領域をシーケンス解析した。

4. 研究成果

(1)ヒトの急性GVHDの免疫応答を生体内で再現出来るヒト化マウスの作製

ヒトDNAM-1リガンドCD155トランスジェニックNOGマウスを作製は、ヒトCD155トランスジェニックマウスのNODに戻し交配が終了し、現在、超免疫不全NOGマウスと交配中である。

(2)抗ヒトDNAM-1抗体の作製

抗ヒトDNAM-1抗体産生ハイブリドーマを87クローン樹立した。これらのハイブリドーマのシーケンス解析を行い、抗体のV領域がすべて異なっていることを確認した。すなわち、得られた87クローンはすべて異なる抗

体を産生するハイブリドーマであることが確認できた。

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7件)

- ① Yamashita Y, Abe F, Hirochika R, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A, Shibuya K. Establishment and characterization of a novel anti-DNAM-1 monoclonal antibody. Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, 32(1):60-64, 2013 査読有
DOI:10.1089/mab.2012.0083
 - ② Danisch S, Qiu Q, Seth S, Ravens I, Dorsch M, Shibuya A, Shibuya K, Förster R, Bernhardt G. CD226 interaction with CD155 impacts on retention and negative selection of CD8 positive thymocytes as well as T cell differentiation to follicular helper cells in Peyer's Patches. Immunobiology, 218(2):152-158, 2013 査読有
DOI: 10.1016/j.imbio.2012.02.010
 - ③ Yoh K, Morito N, Ojima M, Shibuya K, Yamashita Y, Morishima Y, Ishii Y, Kusakabe M, Nishikii H, Fujita A, Matsunaga E, Okamura M, Hamada M, Suto A, Nakajima H, Shibuya A, Yamagata K, Takahashi S. Overexpression of ROR γ t under control of the CD2 promoter induces polyclonal plasmacytosis and autoantibody production in transgenic mice. Eur J Immunol, 42(8):1999-2009, 2012 査読有
DOI: 10.1002/eji.201142250
 - ④ Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shoji M, Okoshi Y, Nakano-Yokomizo T, Ohkohchi N, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Nagata S, Shibuya A. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. J Exp Med, 209(8):1493-1503, 2012 査読有
DOI:10.1084/jem.20120096
 - ⑤ 急性 GVHD 発症における活性化免疫受容体 DNAM-1 の重要な役割 金谷 穰、鍋倉 幸、渋谷 和子、渋谷 彰 臨床血液 53(5):497-503, 2012 査読無
<http://ci.nii.ac.jp/naid/10030831285>
- [学会発表] (計21件)
- ① Iguchi A, Shibuya A, Shibuya K. Involvement of soluble CD155 in cancer immune escape. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 2013.12.13 幕張メッセ (千葉)
 - ② Totsuka N, Kim YG, Tahara-Hanaoka S, Nakahashi-Oda C, Honda S, Shibuya K,

- Shibuya A. Involvement of CD300a in the pathogenesis of DSS-induced colitis. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 2013.12.13 幕張メッセ (千葉)
- ③ Honda S, Yoshizawa Y, Sato K, Fujimoto M, Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Fca/mR (CD351) regulates inflammatory responses of marginal zone B cells against experimental septic shock. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 2013.12.12 幕張メッセ (千葉)
- ④ Abe F, Shibuya K, Shibuya A. Critical role of DNAM-1 in acute and chronic allograft rejection. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 2013.12.11 幕張メッセ (千葉)
- ⑤ Yamashita Y, Takahashi Y, Wang Y, Shibuya A, Shibuya K. A co-stimulatory molecule CD155 on CD4+ T Cells regulates allergic reactions by induction of interferon- γ -dependent th1 development. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 2013.12.11 幕張メッセ (千葉)
- ⑥ Kanaya M, Shibuya K, Shibuya A. Soluble DNAX accessory molecule-1 (sDNAM-1) is a novel predictive biomarker for acute graft-versus-host disease. 第42回日本免疫学会総会・学術集会 2013.12.11 幕張メッセ (千葉)
- ⑦ Yamashita Y, Takahashi Y, Abe F, Shibuya A, Shibuya K. CD155 is a co-stimulatory molecule involved in Th1 development. International Symposium Immune Regulation by Immunoreceptors. 2013.4.12 University of Tsukuba. (つくば)
- ⑧ Takenaka E, Shibuya A, Shibuya K. The role of an activating receptor, DNAM-1 (CD226), on small peritoneal macrophages (SPMs). International Symposium Immune Regulation by Immunoreceptors. 2013.4.12 University of Tsukuba. (つくば)
- ⑨ Yamashita Y, Takahashi Y, Abe F, Shibuya A, Shibuya K. CD155 mediates a costimulatory signal for Th1 development and is involved in the development of allergic diseases. JST-CREST 国際シンポジウム Frontiers in Immunology & Inflammation 2013.2.12 一橋記念講堂 (東京)
- ⑩ Shibuya K. The paradoxical role of an immune receptor, DNAM-1, in tumor development. 第3回発がんスパイラル国際シンポジウム 2013.1.24 金沢エクセルホテル東急 (金沢)
- ⑪ Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Yasui T, Kikutani H, Honda S, Shibuya K, Nagata S, Shibuya A. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. 第41回日本免疫学会国際

シンポジウム 2012.12.6 神戸国際会議場
(兵庫)

- ⑫ Yamashita Y, Takahashi Y, Wang Y, Abe F, Yoshioka A, Shibuya A, Shibuya K. CD155 is a co-stimulatory molecule involved in Th1 differentiation. 第41回日本免疫学会総会・学術集会 2012.12.5 神戸国際会議場(兵庫)
- ⑬ Abe F, Shibuya K, Shibuya A. Critical role of DNAM-1 in acute and chronic allograft rejection. 第41回日本免疫学会総会・学術集会 2012.12.5 神戸国際会議場(兵庫)
- ⑭ Yamashita Y, Takahashi Y, Abe F, Shibuya A, Shibuya K. CD155 mediates a costimulatory signal for Th1 development and is involved in the development of allergic diseases. The 7th Tsukuba Medical Science Research Meeting. 2012.10.1 Tsukuba International Congress Center. (つくば)
- ⑮ 金谷 穰、渋谷 和子、阿部 史枝、鍋倉 幸、渋谷 彰 活性化免疫受容体 DNAM-1 の急性肝 GVHD の病態形成における重要な役割 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会 2012.8.18 金沢市文化ホール(金沢)
- ⑯ 金谷 穰、広近 玲、渋谷 和子、岡田 昌文、我妻 ゆき子、坂巻 壽、渋谷 彰 可溶性 DNAM-1 の急性 GVHD 発症予測マーカーとしての有用性 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会 2012.8.18 金沢市文化ホール(金沢)
- ⑰ 山下 由美、高橋 勇一、王 軼楠、吉岡 文、鍋倉 幸、渋谷 彰、渋谷 和子 CD155 (poliovirus receptor) の Th1 分化における役割と疾患への関与 第22回 Kyoto T Cell Conference 2012.7.7 和順会館(京都)
- ⑱ Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. 9th International Conference on Innate Immunity. 2012.6.27 Rodos Palace Conference Center, Ixia, Rhodes, Greece

[図書] (計2件)

- ① 細胞内染色法を用いたサイトカイン産生の解析 金丸 由美、渋谷 和子 実験医学別冊 最強のステップ UP シリーズ 直伝! フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる! 275 ページ (90-99), 2014
<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758101882/index.html>
- ② 免疫細胞上の活性化受容体 DNAM-1(CD226) 竹中 江里、渋谷 和子、渋谷 彰 公益財団法人金原一郎記念医学医療振興財団「生体の科学」 64(5): 522 ページ (454-455), 2013
<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalDetail.do?journal=35200>

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

1. 名称: 免疫疾患に対する医薬組成物
発明者: 渋谷 和子、渋谷 彰、山下 由美
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 2014-050077
出願年月日: 2014年3月13日
国内外の別: 国内

2. 名称: 同種間での移植心臓、移植血管、または移植腎臓の生着を維持するために用いられる薬剤
発明者: 渋谷 彰、渋谷 和子、阿部 史枝
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 2012-117542
出願年月日: 2012年5月23日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tulips.tsukuba.ac.jp/dspace/simple-search?query=%E6%B8%8B%E8%B0%B7%E3%80%80%E5%92%8C%E5%AD%90&submit=%E6%A4%9C%E7%B4%A2>

(つくばリポジトリ)

<http://trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000001639>
(TRIOS)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渋谷 和子 (SHIBUYA, KAZUKO)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号: 00302406

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし