

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659216

研究課題名(和文) 骨髄GVHDにおける骨芽細胞障害過程の可視化

研究課題名(英文) Visualization of osteoblast impairments during 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

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)：骨髄GVHDにおける骨芽細胞障害の細胞・分子機序解明を目的とした。マイナー組織適合抗原ミスマッチマウスGVHDモデルを作成し、骨髄障害を解析したところ、GVHD誘導マウスでは移植後早期にALP+骨芽細胞が著減する一方、移植後期には髄腔内における骨の過形成ならびに線維化を呈することが明らかになった。また、ex vivo 共培養系により、ドナーCD4+ T細胞が骨芽細胞および間葉系幹細胞株に細胞死を誘導するとともに、骨芽細胞株に対しては増殖ならびにbmp依存的成熟を抑制することが明らかになった。これらの成果をさらに深化することで、allo-HSCT後の免疫・造血不全の克服に繋がると期待している。

研究成果の概要(英文)：We aimed to reveal the cellular and molecular mechanisms of the osteoblast impairments during bone marrow GVHD. In a minor mismatched mouse GVHD model, ALP+ osteoblasts were lost in the early phase, whereas hyperostosis and fibrosis in the marrow occurred in late phase. Ex vivo co-culture experiments demonstrated that donor CD4+ T cells induced apoptosis in osteoblastic cell line MC3T3 and mesenchymal stem cell C3H10. In addition, donor CD4+ T cells also suppressed cell cycle and BMP dependent maturation of MC3T3 but not C3H10. Further studies on the cellular and molecular mechanisms of donor CD4+ T cell-induced impairments in bone marrow mesenchymal cells would lead to the development of strategies to overcome immuno-deficiency after allo-HSCT.

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：移植・再生医療 免疫学 細胞・組織 病理学 癌

1. 研究開始当初の背景

骨髄移植をはじめとする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療効果により、白血病などの造血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 (移植片に含まれるドナー T 細胞が、宿主細胞を異物と認識して起こす排除応答) が正常組織を傷害する移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) や、移植後免疫不全に伴う感染症などの致命的合併症は未だ克服されておらず、allo-HSCT の 5 年生存率は 5 割程度にとどまる。とりわけ、骨髄移植後の免疫不全に起因して遷延する感染症は、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。申請者は、臨床的に GVHD の重症度と免疫不全が強い相関性を示すことを発端に、マウス allo-HSCT モデルを用いて GVHD が免疫再構築に及ぼす影響を詳細に解析した結果、骨芽細胞性造血ニッチ (増殖・分化因子を提供する微小環境) が CD4 T 細胞により重度かつ選択的に障害されることを明らかにし、骨髄 GVHD という新規概念として提唱した (Shono Y, et al. Blood 2010)。またこれまでの予備的検討により、骨芽細胞障害には移植前処置として行う X 線照射依存的な極早期の障害機序と、移植後 4 日目から 7 日目にかけて進行する CD4 T 細胞依存的な障害機序が存在することが明らかになっている。さらに、骨髄 GVHD 発症の分子機序を検索する中で、申請者らは、ドナー CD4 T 細胞が細胞傷害性分子とともに骨芽細胞抑制因子を高発現していることを見出した。これらの基礎データから、申請者は CD4 T 細胞依存的な骨芽細胞の障害機序として、1) 細胞死の誘導、2) 間葉系幹細胞からの分化抑制、3) 増殖抑制、を想定するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が見出した骨髄 GVHD について、何故ドナー T 細胞によって骨芽細胞が選択的に障害されるのかという、従来の免疫学では説明出来ない enigma の解明を目的とした。これらの研究を通じて最終的には、炎症・免疫疾患の病態形成過程において免疫系による間葉系細胞サブセット特異的な制御が働くことを実証し、移植後の免疫不全の早期診断、治療、予防法開発の基礎を築くことを目指す。

3. 研究の方法

① minor mismatch allo-HSCT モデルの確立: 致死量の X 線照射を施した C3H.SW (C3, H-2b) マウスに C57BL/6 (B6, H-2b) の T 細胞除去骨髄 (TCD BM) のみ、または TCD BM+T

細胞を移植し、GVHD (-) 群または GVHD (+) 群を作成した [C57BL/6 → C3H.SW] (図 1)。また、蛍光レポーターマウスをレシピエントに使用する目的で、ドナーとレシピエントの系統を入れ替えた [C3H.SW → C57BL/6] を作成した。移植後経時的に大腿骨における ALP⁺骨芽細胞の組織学的分布解析ならびに下腿骨における線維芽細胞および骨芽細胞関連遺伝子の発現解析を行い、線維芽細胞および骨芽細胞の障害を検証した。

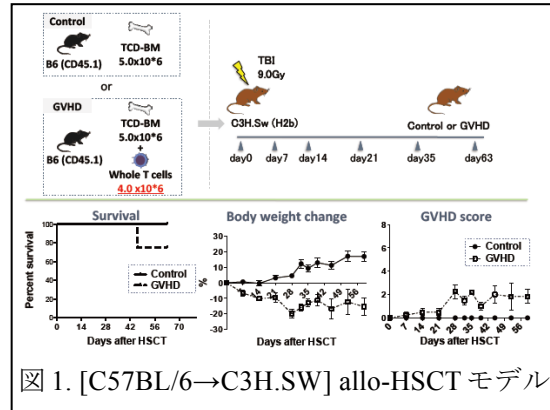


図 1. [C57BL/6 → C3H.SW] allo-HSCT モデル

② 細胞周期レポーター蛍光タンパク質である Fucci を遺伝子導入したマウス間葉系幹細胞株 C3H10 ならびに骨芽細胞株 MC3T3 を用いて、GVHD 誘導マウスより調整したドナー CD4⁺または CD8⁺ T 細胞との共培養を行い、ドナー T 細胞がこれらの間葉系細胞株の細胞周期、細胞死に与える影響フローサイトメトリーにより検証した。

③ 骨芽細胞の分化・成熟促進因子である Bmp2 存在下で C3H10 および MC3T3 と、ドナー CD4⁺T 細胞との共培養を行い、RT-PCR により骨芽細胞関連遺伝子の発現を解析した。

4. 研究成果

① [C57BL/6 → C3H.SW] minor mismatch allo-HSCT モデルにおける骨髄 GVHD の発症の有無を検証するため、移植後経時的に急性 GVHD における骨髄障害の指標の一つである骨髄 B 細胞の再構築不全をフローサイトメトリーにより評価した。GVHD (-) コントロール群では、移植後 14 日目以降に B220 (+) IgM (-) B 細胞前駆細胞ならびに B220 (+) IgM (+) 未成熟 B 細胞が未処置マウスと同程度まで回復したのに対し、GVHD (+) 群ではこれらの細胞数が GVHD (-) 群の 1/10 以下に抑制されていた。また、大腿骨切片の ALP 染色により、急性 GVHD における骨髄障害のもう一つの特徴的所見である骨芽細胞障害を評価した。GVHD (-) 群では移植後 14 日目から 21 日目にかけて皮質骨および海綿骨領域における骨芽細胞の回復を認めしたが、GVHD (+) 群では 21 日目においても骨芽細胞の回復を認めなかった (図 2)。

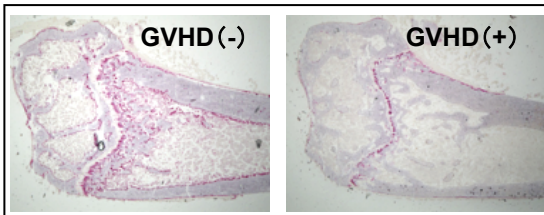


図2 GVHDによる骨芽細胞の消失
[C57BL/6→C3H.SW]モデルにおける移植後21日目の大腿骨切片のALP染色像

これらの結果から、同モデルにおいても急性GVHDによる骨髄GVHD、すなわちB細胞の回復不全および骨芽細胞障害が発症することが明らかになった。さらに、同GVHDモデルにおいて移植後28日目以降の慢性期において、骨髄GVHDがどのような変遷をたどるのかを解析した。GVHD(+)群では移植後63日まで観察期間を通じてB細胞の回復を認めず、一方、移植後35日目に海綿骨領域におけるALP+細胞の過形成を認め、さらに63日目には異所性の骨化と皮質骨領域における線維化を認めた(図3)。

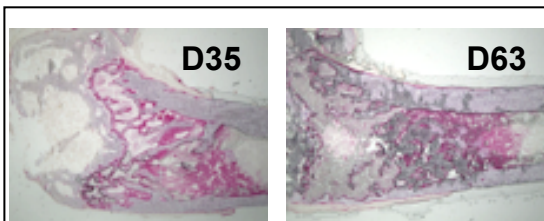


図3 慢性期における骨髄GVHD

RT-PCRにより、下腿骨における骨芽細胞、線維芽細胞関連遺伝子の遺伝子発現を経時的に解析したところ、GVHD(+)群では移植後35日目以降に成熟骨芽細胞マーカーであるKeraの発現が抑制される一方、Fibronectin, Osteopontinなどの線維芽細胞の活性化に関わる遺伝子発現が亢進しており、またTGFβ応答遺伝子であるPAI-1の発現も亢進していた(図4)。これらの結果から、急性期と慢性期では骨髄GVHDの病態が大きく異なることが示唆された。

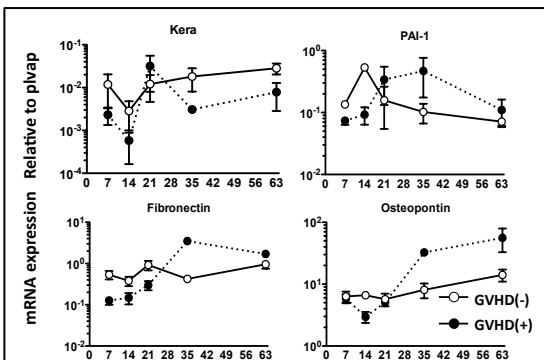


図4 骨髄GVHDにおける遺伝子発現

② マウス間葉系幹細胞株C3H10および骨芽細胞株MC3T3にレトロウイルスを用いて細胞周期レポーターであるFucciを遺伝子導入した。これらの細胞と、[C57BL/6→BDF1]allo-HSCTモデルにおいて、GVHD誘導10日目の脾臓から調整したドナーCD4+またはCD8+T細胞を抗CD3抗体存在下で共培養した後、Fucciの発現ならびにアポトーシスの指標である活性型caspase3の発現をフローサイトメトリーにより解析した。ドナーCD8+T細胞による共培養ではFucciならびに活性型caspase3の発現に著明な影響を認めなかったが、ドナーCD4+T細胞との共培養によりC3H10およびMC3T3両細胞株にアポトーシスが誘導された。このアポトーシス誘導は、FasLに対する中和抗体により阻害され、またFasLの機能欠損を有するFasL^{gld}CD4+T細胞では誘導されないことから、FasL-Fasシグナル依存的であることが明らかとなった(図5)。また、ドナーCD4+T細胞とC3H10の共培養では、Fucci-green陽性細胞の割合に著明な影響を認めなかったが、MC3T3との共培養によりFucci-green陽性率が低下した(図5)。

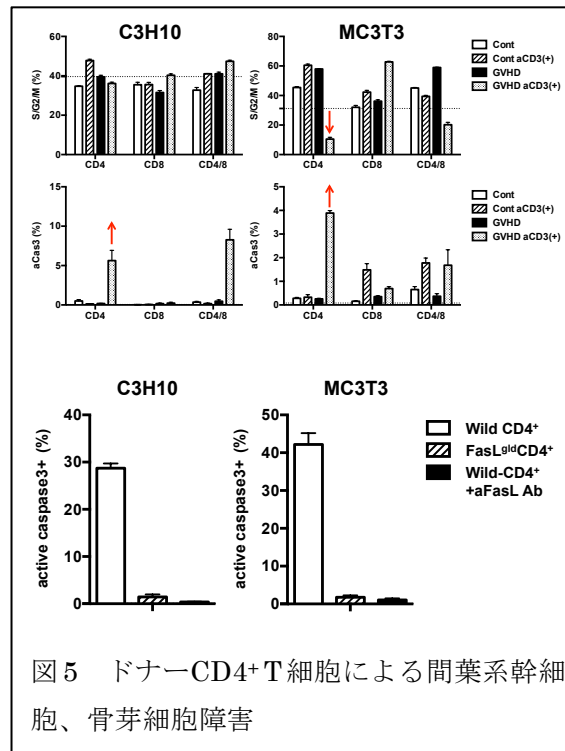
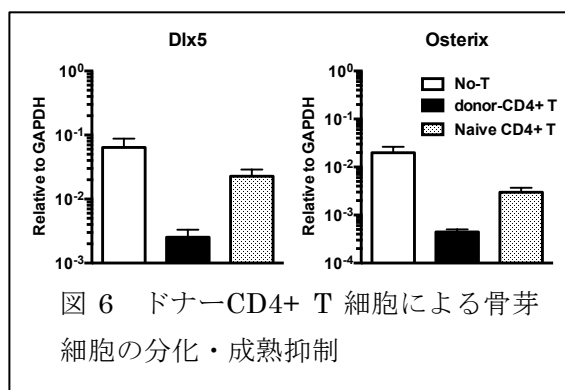


図5 ドナーCD4+T細胞による間葉系幹細胞、骨芽細胞障害

これらの結果から、ドナーCD4+T細胞がFasL依存的に間葉系幹細胞ならびに骨芽細胞に対してアポトーシスを誘導するとともに、骨芽細胞に対しては細胞周期の抑制作用を示すことが明らかになった。

③ 骨芽細胞の分化・成熟に対してドナーCD4+またはCD8+T細胞が及ぼす影響を明らかにするため、Bmp2存在下でMC3T3とドナーCD4+T細胞との共培養を行い、RT-PCRによ

り骨芽細胞関連遺伝子の発現を解析した。骨芽細胞分化に重要な転写因子である Osterix および Dlx5 は、T 細胞非存在下またはナイーブ CD4+T 細胞との共培養では Bmp2 により強力に発現誘導されたが、ドナーCD4+T 細胞との共培養系では発現誘導が抑制された(図 6)。これらの結果から、ドナーCD4+T 細胞による骨髄間葉系細胞の障害機序として、FasL 依存的な細胞傷害のみならず Bmp 依存的な骨芽細胞の分化・成熟抑制の関与も示唆された。



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 3 件)

- ① Shono Y, Ueha S (17 人中 4 番目), Matsushima K (17 人中 14 番目), 他, Bone marrow graft-versus -host disease: evaluation of its clinical impact on disrupted hematopoiesis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Biol Blood Marrow Transplant. 査読有り, 2014(4) 495-500. (DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.12.568)
- ② Nagao K, Ueha S (20人中7番目), Matsushima K (20人中14番目), 他, 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 Hashimoto S, Matsushima K 他 (17人中 17番目), Coordinated Changes in DNA Methylation in Antigen-Specific Memory CD4 T Cells, J Immunol. 査読有り, 2013(190)4076-4091. (DOI: 10.4049/jimmunol.1202267)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kouji Matsushima, Delayed and aberrant immunological reconstitution in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, 11th World Congress on Inflammation, 平

成 25 年 9 月 21 日, Natal (Brazil)

- ② 上羽 悟史, 骨髄 GVHD における間葉系細胞障害の細胞・分子機序, 第 34 回日本炎症・再生医学会, 平成 25 年 7 月 2 日, 国立京都国際会館 (京都)
- ③ 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)
- ④ 小杉 瑞葉, Destruction of hematopoietic niche after allogeneic 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)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

東京大学 分子予防医学教室ホームページ
<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・講師
 研究者番号: 00447385