

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461459

研究課題名(和文) IL-21シグナル遮断を利用した急性GVHDに対する新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategy for acute GVHD using IL-21 signal blockade

研究代表者

翁 家 国 (oh, iekuni)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20398514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスGVHDモデルを用いた実験結果を総合すると、骨髄移植後にIL-21シグナルを遮断するとGVL効果を損ねることなくGVHDを減弱させることが可能である。IL-21シグナル遮断はGVHD治療の理想的な標的分子である可能性がある。更に、ヒトに投与可能な抗ヒトIL-21中和抗体が開発されれば、既にリウマチの治療に利用されているアクテムラやレミケードの様に、抗体医薬品として利用が可能になると思われる。

研究成果の概要(英文)：Over the past several years, some studies have been made on relationship between GVHD and IL-21 by using experimental mouse GVHD model. From these animal studies, blocking the IL-21 signaling after bone marrow transplantation can attenuate GVHD without compromising the GVL effect. IL-21 signal blockade may be an ideal therapeutic target molecule to treat GVHD. Near future, when anti-human IL-21 neutralizing antibody that can be administered to human are developed, they can be used as antibody drugs like tocilizumab and infliximab already used for the treatment of rheumatoid arthritis.

研究分野：移植片対宿主病

キーワード：IL-21

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マウスの骨髄移植モデルを用いて、同種造血幹細胞移植後免疫反応である移植片対宿主病 (GVHD) と移植片対白血病効果 (GVL) における IL-21 の機能解析を進めてきた。その結果、骨髄移植後 IL-21 シグナル遮断は GVL 効果を温存しつつ GVHD だけを減弱させることができることが判明した。IL-21 は GVHD 治療の理想的な標的分子であると考えている。

### 2. 研究の目的

ヒトを対象とした translational research として以下の 2 点を研究したいと考えた。

ヒト GVHD においても IL-21 が増悪因子として作用することを実際の臨床検体を用いて検証する。

既に製品化されている抗 IL-21 中和抗体の投与でヒトの GVHD 治療が可能であるのか pilot study を実施したい。

### 3. 研究の方法

IL-21 中和抗体が同種免疫反応を抑制することを *in vitro* で確認する

(1) 末梢血単核球を分離し anti-CD3 で刺激した際の IL-21 の産生能

(2) IL-21 中和抗体が、患者末梢血単核球のリンパ球混合試験を抑制することを、IFN- $\gamma$  の産生、及びサイミジンの取り込みを指標に評価する。

IL-21 が GVHD の増悪因子であることを臨床検体で確認

(1) 造血幹細胞移植前後、及び GVHD 発症前後の血清 IL-21 濃度の比較

(2) 臨床的に GVHD と診断した患者の消化管粘膜、及び皮膚生検組織において免疫染色により IL-21 の発現を確認する

IL-21 中和抗体が同種免疫反応を抑制することを *in vivo* で確認する

(1) ヒト IL-21 中和抗体を実際の GVHD 患者に投与し効果と毒性を評価する pilot study を計画する

### 4. 研究成果

(1) ヒトにおいても IL-21 シグナルが同種免疫反応を促進する分子であると仮定した。予備的な検証として健常ボランティアの末梢血単核球を用いて、リンパ球混合反応で検証した。培養 96 時間後の Responder の増殖と培養上清の IFN- $\gamma$  と IL-21 を測定した。自家の反応系 (A+A: 陰性コントロール) では 3H-thymidine の取り込みが  $386 \pm 202$  cpm である一方、同種免疫反応 (A+B) では  $1199 \pm 240$  cpm と有意に高値であった ( $p < 0.001$ ) (図 1)。この時、IFN- $\gamma$  を測定すると陰性コントロールでは  $27 \pm 14$  pg/ml である一方、同種免疫反応では  $1254 \pm 728$  pg/ml と明らかに高値であった ( $p = 0.009$ ) (図 2)。しかし IFN- $\gamma$  と同様の変化をすると予想された IL-21 はそれぞれ  $32.4 \pm 2.2$  vs.  $34.0 \pm 2.2$  pg/ml ( $p = 0.1$ ) と両者に有意差がないことが判明した (図 3)。図 1.

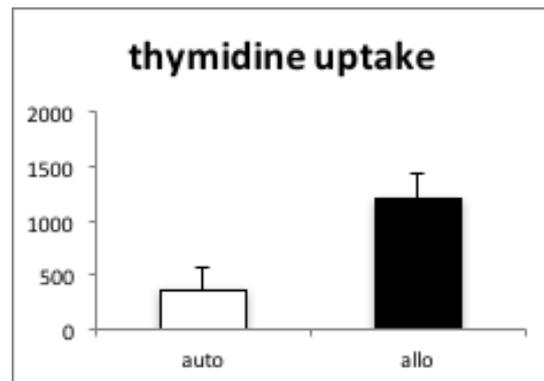


図 2.

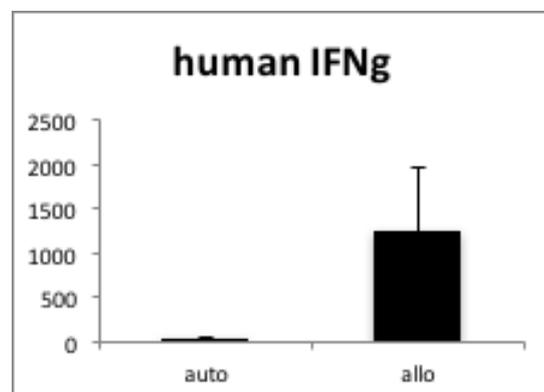
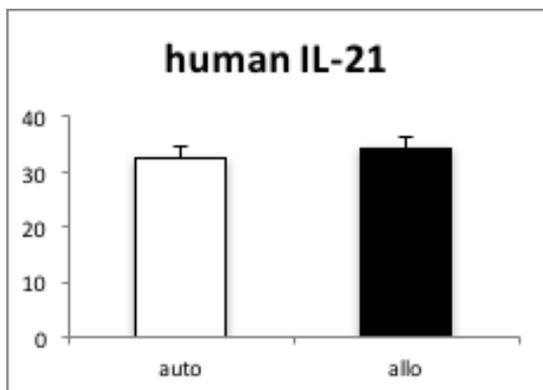


図 3.

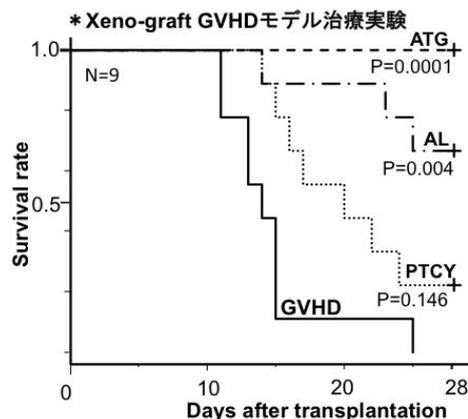


(2) CRISPR/Cas9 システムを利用して T 細胞受容体を遺伝子改変し GVHD を減弱させる研究をおこなった。TCR 鎖 (142-162) を標的とする sgRNA 発現ベクタ (pRGEN-U6-sgRNA) と Cas9 タンパクを発現する pRGEN-Cas9-CMV を作成した。マウス T 細胞リンパ腫細胞株 (EL4) を用いて遺伝子導入実験をおこなった。エレクトロポレーションを用いるとコントロール遺伝子 (eGFP) は 40-60% の導入効率であるものの、目的とする RGEN 発現ベクターを遺伝子導入しても TCR の低下した細胞は 3.3% と僅かであった。

(3) ヒト化マウス GVHD モデルを用いて HLA 半合致移植に最適な免疫抑制療法を検討する研究をおこなった。NOG マウスにヒト末梢血単核球を移植し GVHD を惹起し 30 日以内に全例が死亡することを確認した (xeno-graft model)。

Alentuzumab/ATG/PT-CY を用いて治療実験をおこなった。ATG 治療群は 100% 生存した (p=0.001)。一方、PT-CY 群は僅かに生存を延長した (p=0.146)。更に、Alentuzumab は ATG と PT-CY の中間の生存率を示した (p=0.004) (図 4)。

図 4.



## 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)

Oh Yukiko, Oh iekuni, et al.

Osteopontin has a crucial role in Osteoclast-like multinucleated giant cell formation. JCB, 115, 2014, 585-95

Oh iekuni, Oh yukiko, Adaptive immunotherapy utilizing anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cells for B-cell malignancy. 臨床血液, 57, 2016, 2365-2372

〔学会発表〕(計 2 件)

翁 家国他、ステロイド無効・不耐容特発性血小板減少性紫斑病に対するエルトロンパグの効果と副作用に関する報告  
2013 年 10 月 11 日日本血液学会総会

翁 家国他、フィラデルフィア染色体陽性急性白血病に対する PSL 併用 Dasatinib 療法の効果と安全性に関する報告  
2014 年 10 月 31 日日本血液学会総会

〔図書〕(計 1 件)

小澤 敬也、翁 家国 血液のがんと言われたら、保健同人社 2016 年 10 月 31 日

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

翁 家国 (OH, iekuni)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20398514

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )