

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461438

研究課題名(和文)造血幹細胞移植後の貪食細胞システムの再構築

研究課題名(英文) Reconstitution of mononuclear phagocyte system following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

橋本 大吾 (Hashimoto, Daigo)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：20419576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血幹細胞後の貪食細胞系の再構築と、移植片対宿主病での役割を検討した。マウス同種骨髄移植後の組織常在マクロファージの再構築の検討をおこなったところ、同系移植では、数ヶ月かけて再構築される組織常在マクロファージが、同種移植後にGVHDが重症化した臓器では、2週間程度でドナー型に置換されていた。炎症性マクロファージは、定常状態では組織にほとんど存在しないが、同種造血幹細胞移植後の肺や皮膚では、炎症性マクロファージの浸潤が認められ、これをモノクローナル抗体で除去すると、GVHDが軽減した。こうした所見は、移植後の免疫寛容や移植片対宿主病の発症機序を考える上で重要である。

研究成果の概要(英文)：Reconstitution of tissue resident macrophages and inflammatory macrophages after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (SCT) were assessed using murine model of allogeneic bone marrow transplantation (BMT). We found that severe GVHD promoted replacement of tissue resident macrophages in the target organs by donor-derived macrophages on day +14 after allogeneic BMT. Contrary, it took at least a few months for reconstitution of donor macrophages after syngeneic BMT, suggesting that allogeneic response accelerated donor reconstitution of tissue resident macrophages. Next, we addressed turnover of inflammatory macrophages after SCT. Massive infiltration of inflammatory macrophages was found in the lung and skin, and depletion of these cells using monoclonal antibodies ameliorated graft versus host disease (GVHD) after allogeneic SCT. Our findings have important clinical implications with respect to establishment of tolerance and pathophysiology of GVHD after allogeneic SCT.

研究分野：造血幹細胞移植学

キーワード：同種造血幹細胞移植 マクロファージ 移植片対宿主病 GVHD 貪食細胞

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは、自然免疫システムの中心的な役割を果たす細胞であり、感染微生物・外来物質のみならず、自己の死細胞や分泌物を処理して有害な炎症反応を防いでいる。申請者は以前、これらのマクロファージが造血幹細胞移植後、その他の免疫担当細胞が消失した後も一定期間生存して貪食能を保持しており、生体を守る免疫システムの最後の砦となっていることを報告した (Hashimoto, *J Exp Med* 2011)。また、マクロファージは、生体の向上性を保つ働きをしている組織常在マクロファージと、炎症時に出現する、炎症性マクロファージに大別されるが、申請者は、組織常在マクロファージは、胎生期に前駆細胞から分化し、その後は、血液細胞とは独立して組織で維持されていることを示した (Hashimoto, *Immunity* 2013)。一方で、炎症性マクロファージは炎症時に血液中の単球が組織に浸潤して分化する。

同種造血幹細胞移植は難治性白血病の治療を目指す上で必須の治療法であるが、ドナーT細胞によるレシピエント細胞の傷害によって発症する、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) や感染症は移植の成功を阻む重大な合併症である。GVHD の予防・治療は、移植の成功に必須であるが、現行の広範な免疫抑制によるGVHD 予防・治療は、移植後の免疫抑制を招き、感染症や腫瘍の再発を招く。このような、獲得免疫系が抑制されている状況では、マクロファージなどの自然免疫系の果たす役割は大きなものとなる。申請者は、移植後に残存するレシピエント型の組織常在マクロファージが、有害なアロ反応性ドナーT細胞を貪食することによりGVHD を抑制している事を示したが (Hashimoto, *J Exp Med*. 2011)、一方でドナー造血系から移植後に新たに生じるマクロファージの機能や役割は解明されていない。

2. 研究の目的

(1) マウス同種骨髄移植後の組織常在マクロファージの再構築の検討

申請者は、Syngeneic (同系) のマウス骨髄移植後に様々なマクロファージの再構築を検討した結果、ドナー由来の組織常在マクロファージの再構築は、臓器によっても差があるものの、例えば脾臓では半年から1年程度かかることを報告している (Hashimoto, *Immunity*, 2013)。同種造血幹細胞移植後の、ドナー由来の組織常在マクロファージの再構築については、これまで研究が進んでいない。本研究では、マウスモデルを利用して、同種骨髄移植後の組織常在マクロファージの再構築を検討する。

(2) 炎症性マクロファージの分化の検討

Syngeneic 移植後は炎症性マクロファージの分化はほとんどみられなかったが、同種移植後はSubclinical な炎症による炎症性マクロファージの分化が起こりうる。種々の組織における炎症性マクロファージの分化をFlow cytometry にて

評価する。

(3) 炎症性マクロファージのGVHDにおける役割の検討

マウス同種骨髄移植後に、サイトカイン阻害等によってマクロファージを選択的に除去し、こうしたマクロファージがGVHDの病態生理で果たす役割を解明する。

3. 研究の方法

マウス同種骨髄移植: レシピエントであるB6D2F1マウス(H-2^{b/d})に全身放射線照射 (total body irradiation: TBI) 12Gy で前処置をして、MHC不一致ドナーである、B6マウス(H-2^{b/b})から採取した、脾細胞 5×10^6 個と骨髄細胞 5×10^6 個を尾静脈から輸注する。マウス同種骨髄移植後、脾臓・腸管・肺を経時的に採取し、組織常在および炎症性マクロファージの再構築/分化をフローサイトメトリーにより解析した。コントロールの同系(Syngeneic)移植は、B6-CD45.1ドナーから、B6 レシピエントへの移植を行った。MHC一致マイナー抗原不一致のモデルとして、B10.D2(H-2^{d/d})ドナーから、BALB/c (H-2^{d/d})レシピエントへの移植も使用した。

GVHD 重症度の評価: 移植後、GVHDの重症度の評価は、体重・活動性・姿勢・毛並み・皮膚病変などを点数化した、Clinical GVHDスコアを週2回算出して行った。また、病理学的GVHDスコアは、肝臓・腸管・皮膚などの切片を作成しH&E染色ののち点数化した。

フローサイトメトリー: 移植後、皮膚・脾臓・腸管などを、コラゲナーゼ処理をおこない、細胞懸濁液とする。蛍光色素標識抗体で染色を行った後、組織常在マクロファージ・炎症性マクロファージ・T細胞などをFACSCantoIIもしくは、FACSARIAIIを用いて解析した。

マクロファージ除去: 移植後に長期に渡ってマクロファージを除去するために、抗CSF-1レセプター抗体 (anti-CSF1 receptor antibody: α CSF1) を、マウス1匹あたり500 μ gで週3回、6週間にわたって投与した。

4. 研究成果

(1) マウス同種骨髄移植後の組織常在マクロファージの再構築の検討

B6 B6D2F1 (MHC不適合) の骨髄移植後、脾臓・肺・腸管の組織常在マクロファージの再構築を検討した。脾臓・肺・腸管で、マクロファージはそれぞれ、CD11b^{low}F4/80^{high}, CD45⁺CD11b^{low}F4/80^{high}, CD45⁺CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD103⁻で定義した。レシピエントタイプは、H-2Kd⁺、ドナータイプは H-2Kd⁻の細胞として同定した。コントロールのSyngeneic移植は、CD45.1 B6 B6で行い、ドナー型はCD45.1⁺、レシピエント細胞はCD45.1⁻として同定した。これらの細胞を移植後14日目に解析したところ、同種造血幹細胞移植後GVHDが重症化している臓器では、ドナー型マクロファージに置換されていた。一方でコントロールのSyngeneicマウスでは、腸管のマクロファージは速やかにドナー型に置換されたものの、

脾臓では 10-20%程度がドナー型に置換されたのみで、肺ではほとんど置換されていなかった。これらの結果より、造血幹細胞後の同種免疫反応によってレシピエント型のマクロファージが除去され、ドナー型のマクロファージに置換されることが判明した。これは、同種移植後の患者の皮膚のランゲルハンス細胞が、やはり同種免疫反応で置き換わると言う結果とも合致し、移植後の同種免疫反応は、レシピエントの抗原提示細胞を除去することが改めて確認された。こうした反応は、移植後の免疫寛容の成立のために重要な役割を持つ可能性がある。

(2) 炎症性マクロファージの分化の検討

Naïve マウスの脾臓には、組織常在マクロファージは存在するが、炎症性マクロファージはほとんど存在しない。一方で、脾臓は単球を貯蔵しており、炎症が生じた際はこうした単球が速やかに組織に遊走して炎症性マクロファージへと分化する(Science. 2009, 325: 612)。マウスの同種移植後の脾臓を見ると、通常は 1%程度の単球の比率が 50%程度まで増加しており、単球の増殖が生じていることが確認された。こうした単球は、肺や皮膚で CD11b⁺CD115⁺F4/80⁺CD11c^{int}NHCII^{int} の炎症性マクロファージへと分化する。同種造血幹細胞移植後の皮膚の切片を、F4/80 で免疫染色したところ、Syngeneic コントロールではほとんど存在しない炎症性マクロファージが多数浸潤していた。こうした炎症性マクロファージは TGF-β を豊富に産生しており、皮膚の線維化など GVHD の病変の形成に関わっていると考えられた。

(3) 炎症性マクロファージの GVHD における役割の検討

上記の炎症性マクロファージの GVHD 病変への著明な浸潤や、TGF-β の産生を元に、これらの細胞が GVHD の病変の出現に重要な役割を果たしていることが予測された。そのため、こうしたマクロファージを移植後に除去して、GVHD が改善するかどうかを検討した。ここでは、皮膚の線維化病変が重症化する、B10.D2 BALB/c のモデルを使用して、移植後 αCSF1 を週 3 回投与してマクロファージ除去を試みた。移植後 42 日目の皮膚の免疫染色を行ったところ、同種移植後に αCSF1 を投与したマウスでは、Syngeneic 移植を行った群と同程度に減少していた。同様に TGF-β の産生も減少していた。さらに重要な事は、線維化病変においてコラーゲン産生に必須な分子である、HSP47 の発現が著明に減少しており、GVHD における線維化の治療として炎症性マクロファージが標的となりうることを示している。さらに、HSP47 そのものが GVHD の治療薬として有望である可能性もあり、今後の研究に繋がる結果となった。

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 17 件)

1. Shimoji S, Hashimoto D, et al. (他 10 人, 2 番目). Graft-versus-host disease targets ovary and causes female infertility in mice. *Blood*. 129:1216-1225, 2017. 査読有
doi: 10.1182/blood-2016-07-728337.
2. Matsukawa T, Hashimoto D, et al. (他 13 人, 2 番目). Reduced-dose methotrexate in combination with tacrolimus was associated with rapid engraftment and recovery from oral mucositis without affecting the incidence of GVHD. *Int J Hematol*. 104:117-24, 2016. 査読有
doi: 10.1007/s12185-016-1996-0.
3. Salmon H, Hashimoto D, et al (他 20 人, 15 番目). Expansion and activation of CD103(+) dendritic cell progenitors at the tumor site enhances tumor responses to therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity*. 44:924-38, 2016. 査読有.
doi: 10.1016/j.immuni.2016.03.012.
4. Ochando J, Hashimoto D (他 4 人, 5 番目). The mononuclear phagocyte system in organ transplantation. *Am J Transplant*. 16:1053-69, 2016. 査読有
doi: 10.1111/ajt.13627.
5. 高橋 秀一郎, 橋本 大吾, 豊嶋 崇徳. 移植片対宿主病 (GVHD) の分子病態と分子標的療法. **血液内科**. 72: 330-336, 2016. 査読無
6. Eriguchi Y, Hashimoto D, et al (他 6 人, 3 番目). Decreased secretion of Paneth cell α-defensins in graft-versus-host disease. *Transpl Infect Dis*. 17:702-6, 2015. 査読有
doi: 10.1111/tid.12423.
7. Hashimoto D, Teshima T. Key players in intestinal GVHD. **臨床血液**. 56:807-14, 2015. 査読有
doi: 10.11406/rinketsu.56.807.
8. Uryu H, Hashimoto D, et al (他 13 人, 2 番目). α-Mannan induces Th17-mediated pulmonary graft-versus-host disease in mice. *Blood*. 125: 3014-23, 2015. 査読有
9. Moskalenko M, Hashimoto D, et al (他 12 人, 5 番目). Requirement for innate immunity and CD90+ NK1.1- lymphocytes to treat established melanoma with chemo-immunotherapy. *Cancer Immunol Res*. 3, 296-304, 2015. 査読有
doi: 10.1182/blood-2014-12-615781.
10. 橋本大吾, 瓜生英尚, 豊嶋崇徳. 真菌感染による GVHD 発症のメカニズム. **血液内科**. 71: 775-780, 2015. 査読無
11. Muller PA, Hashimoto D, et al (他 14 人, 6 番目). Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell*. 158: 300-13, 2014. 査読有
doi: 10.1016/j.cell.2014.04.050.
12. Mortha A, Hashimoto D, et al (他 5 人, 3 番

- 目). Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science*. 343: 1249288, 2014. 査読有
doi: 10.1126/science.1249288.
13. Shono Y, Hashimoto D, et al (他 15 人, 8 番目). Bone marrow graft-versus-host disease: evaluation of its clinical impact on disrupted hematopoiesis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 20:495-500, 2014. 査読有
doi: 10.1016/j.bbmt.2013.12.568.
14. Agudo J, Hashimoto D, et al (他 9 人, 6 番目). The miR-126-VEGFR2 axis controls the innate response to pathogen-associated nucleic acids. *Nat Immunol*. 15:54-62, 2014. 査読有
doi: 10.1038/ni.2767.
15. Koyama M, Hashimoto D, et al (他 9 人, 2 番目). Expansion of donor-reactive host T cells in primary graft failure after allogeneic hematopoietic SCT following reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 49:110-5, 2014. 査読有
doi: 10.1038/bmt.2013.134.
16. 橋本大吾. マクロファージは末梢組織でも自己増殖する?! **炎症と免疫**. 22:411-415, 2014. 査読無
17. Eriguchi Y, Hashimoto D, et al (他 10 人, 9 番). Reciprocal expression of enteric antimicrobial proteins in intestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013, 19: 1525-9. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. Yamakawa T, Hashimoto D, et al (他 3 人, 2 番目). Vitamin A-coupled liposomes carrying siRNA against HSP47 ameliorate skin fibrosis in chronic graft-versus-host disease. *58th ASH Annual Meeting*, Dec 3-6 2016, San Diego Convention Center (San Diego, USA).
2. 橋本大吾. マクロファージ研究の最前線. **第 26 回日本樹状細胞研究会**. 2016 年 9 月 2 日, ホテル日航熊本 (熊本県熊本市)
3. Takahashi S, Hashimoto D, et al (他 2 人, 2 番目). Topical ruxolitinib protects LGR5+ stem cells in the hair follicle and ameliorates skin graft-versus-host disease. *2016 BMT Tandem Meetings*, Feb 18-22 2016. Hawaii Convention Center (Honolulu, USA).
4. Hayase E, Hashimoto D, (他 6 人, 2 番目). R-spondin1 promotes Paneth cell growth, maintains intestinal microbial ecology, and ameliorates GvHD. *57th ASH Annual Meeting*, Dec 5-8 2015, Orange County Convention Center (Orlando, USA).
5. Hashimoto D. GVHD prophylaxis without

- systemic suppression of T cell mediated immunity. *2nd meeting of Japan-Australia Hematology Consortium*, Sep 11-12 2015, QIMR Berghofer Medical Research Institute (Brisbane, Australia).
6. Shimoji S, Hashimoto D, et al (他 4 人, 2 番目). Graft-versus-host disease targets granulosa cell of ovarian follicle and causes infertility after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *2015 BMT Tandem Meetings*, Feb 11-15 2015, Manchester Grand Hyatt, (San Diego, USA).
7. 橋本大吾. Key players in intestinal GVHD. **第 76 回日本血液学会学術集会**. Oct 31 - Nov 2 2014, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市).
8. Hashimoto D. Tissue resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *The 22nd International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages*. June 2-3 2014. 神戸商工会議所 (兵庫県神戸市)

[その他]

ホームページ等

北海道大学医学研究院内科系部門

内科学分野 血液内科学教室ホームページ

<http://www.hokudai-hematology.jp/medical/result/s/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 大吾 (HASHIMOTO, DAIGO)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号: 20419576

(2)研究分担者

なし