

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461441

研究課題名(和文)慢性GVHD組織線維化病態におけるテネイシン Cの役割の解明と標的治療法の開発

研究課題名(英文) Role of tenascin-C in development of fibrosis in chronic GVHD tissue and establishment of its targeted therapy

研究代表者

俵 功 (Tawara, Isao)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80378380

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)：同種造血幹細胞移植後に起こる移植片対宿主病(GVHD)は、移植成功への障壁となる合併症の一つである。慢性GVHDは組織線維化病態を伴うのが特徴であるが、発症メカニズムは不明な点が多く、治療法も確立していない。

本研究では、組織線維化を制御するテネイシン-C(TN-C)の慢性GVHD発症における役割を、マウスモデル、臨床検体を用いて検討した。マウス移植モデルでは、TN-Cを産生する細胞はレシピエント由来であることが明らかとなり、TN-Cを発現しないノックアウトマウスでは、GVHDが増悪する傾向が認められた。現在、移植患者血漿中TN-Cと慢性GVHD発症との関係を検討中である。

研究成果の概要(英文)：Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is a curative therapy for refractory hematological malignancies. Complication occurred after allo-HSCT such as graft-vs-host disease (GVHD) is an obstacle for successful allo-HSCT. Pathophysiology of chronic GVHD (cGVHD) that features tissue fibrosis is still unclear and standard therapy for cGVHD has not been established yet.

Tenascin-C (TN-C) is involved in tissue fibrosis and its role in cGVHD pathophysiology is unknown. In this study, we investigated the role of TN-C in cGVHD using mouse model and clinical samples. Mouse models demonstrated that TN-C was produced by recipient-origin cells and there was a tendency that GVHD was exacerbated in TN-C-deficient mice. Analysis of relation between TN-C level in patient's plasma and cGVHD onset is underway.

研究分野：血液内科学

キーワード：GVHD テネイシン-C

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は、白血病等の造血器腫瘍に対する根治的治療法として実施されている。血縁者あるいは非血縁者をドナーとする同種造血幹細胞移植では、移植細胞中に含まれるリンパ球等の免疫細胞が、レシピエントの正常組織を攻撃する病態である移植片対宿主病 (Graft-vs-Host Disease, GVHD) が合併症として問題となる。

GVHD の病態は、移植前処置による組織傷害に続く、レシピエントおよびドナー抗原提示細胞の活性化、ドナーT細胞の活性化と機能分化、ドナー細胞の細胞傷害活性、炎症反応による標的細胞のアポトーシスおよび組織破壊の三相の免疫病態と、組織修復過程の異常 (線維化) が関与すると考えられている。上記のうち は主に慢性 GVHD の病態を形成すると考えられる。造血幹細胞移植後の組織線維化メカニズムは不明であり、それ故確立した治療法がないため、臨床的に大きな課題である。

GVHD 病態は上記のごとく非常に複雑で、本研究開始時点では、上記 ~ の詳細なメカニズムは不明であった。臨床的には ~ に対して、免疫抑制剤 (カルシニューリン阻害薬およびメトトレキサート) による予防法が確立しており、実地臨床において実施されていた。しかしながら、上記により、皮膚 (硬化、脱毛、脱色) 眼 (涙腺) 口 (唾液腺) 筋膜 (硬化) 腱 (萎縮) 等に病変を形成し、長期生存患者の生活の質を著しく低下させる慢性 GVHD の治療法は未確立であった。そこで我々は同種造血幹細胞移植後の組織線維化病態メカニズムの解明が必要であると考えた。

線維化は傷害組織の修復過程の異常により起こると考えられているが、その制御にかかわる分子として、細胞外マトリックスタンパク質・テネイシン C (Tenascin-C, TN-C) が知られている。本研究開始時点では、TN-C はマウス慢性肝炎モデルでの線維化が軽度であることや、心筋梗塞や拡張型心筋症など、臓器リモデリングが進行する疾患において、患者血清 TN-C レベルが予後因子となることが、研究分担者らによって報告されていた。

2. 研究の目的

前項に記したように、慢性 GVHD の治療法

は未確立であり、患者の生活の質 (Quality of Life, QOL) を著しく低下させることより治療法の確立が待たれるが、治療法開発に先立つ病態メカニズムの解明が必要である。

GVHD 以外の動物モデルおよびヒト線維化・組織リモデリング病態 (肝疾患、心疾患など) において、TN-C が重要な役割を果たしていることがわかっていたが、造血幹細胞移植後の免疫病態や組織線維化における TN-C の役割を検討した報告はなかった。本研究では、移植後病態における TN-C の役割を、モデル研究および臨床検体を用いた研究より明らかにし、TN-C を標的とした移植後線維化制御モデルを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

臨床病態メカニズムの解明において、ヒトと類似した症状を呈する動物モデルを用いることの有用性が示されてきた。ヒト GVHD に類似した症状を呈するマウスモデルを用いた病態メカニズムの解明と、臨床検体を用いた研究によるそのメカニズムの検証は、病態制御法の開発につながる可能性があるため本研究では、マウスモデル研究と、臨床検体を用いた研究を行った。

(1) マウスモデル研究

GVHD マウスモデル実験系は、三重大学においてすでに確立しており、複数の GVHD モデルの作製が可能であったため、まず標的 (線維化) 臓器の組織構造の変化、TN-C の発現、膠原繊維の蓄積を、経時的に病理組織学的に明らかにし、TN-C の移植後組織線維化への関わりを検討した。

三重大学では C57BL/6 および BALB/c バックグラウンド TN-C ノックアウトマウス (C57BL/6-TNC^{-/-}、BALB/c-TNC^{-/-}) およびコントロールの同腹の野生型 (WT) マウス (C57BL/6-TNC^{+/+}、BALB/c-TNC^{+/+}) を維持、繁殖させている。それらを用いた実験は、三重大学組み換え DNA 実験安全委員会へ DNA 実験計画書を提出し、承認が得られていたため、C57BL/6 をドナー、BALB/c をレシピエントとした主要組織適合複合体 (MHC) 不一致骨髄移植・GVHD モデルを作製した。レシピエントマウスに 7 Gy の全身 X 線照射の前処置を実施し、翌日に T 細胞除去骨髄と脾臓由来 T 細胞 (T 細胞からの TN-C の産生は認められないため、第三者となる C57BL/6 マウスより採取)

を混合し、尾静脈より輸注した。実験では T 細胞除去骨髄のドナーとして C57BL/6-TNC^{+/+} および C57BL/6-TNC^{-/-}を用い、レシピエントとしては BALB/c-TNC^{+/+}および BALB/c-TNC^{-/-}を用いて以下の組み合わせ（骨髄ドナー-レシピエント）の移植を実施した。

C57BL/6-TNC ^{+/+}	BALB/c-TNC ^{+/+}
C57BL/6-TNC ^{-/-}	BALB/c-TNC ^{+/+}
C57BL/6-TNC ^{+/+}	BALB/c-TNC ^{-/-}
C57BL/6-TNC ^{-/-}	BALB/c-TNC ^{-/-}

この実験により移植後に TN-C を発現する細胞が、ドナー/レシピエントのいずれかを知ることが可能となるが、移植マウスより、継時的に皮膚を採取し、TN-C 発現を免疫組織化学的に、コラーゲンの蓄積をシリウスレッド染色により検討した。

また同様の C57BL/6 BALB/c 移植モデルで、ドナーとしてコンジェニックマウスを用いた実験により、移植後に GVHD 標的臓器に浸潤している血球系細胞が、レシピエント由来からドナー由来に置換される経過を、免疫蛍光染色法により検討した。T 細胞除去骨髄ドナーとして、CD45.1 を発現する C57BL/6、T 細胞ドナーとして CD90.1 を発現する C57BL/6 を用い、レシピエントとして BALB/c を用いた。この組み合わせの移植では、レシピエントの BALB/c は CD45.1 および CD90.1 を発現していない（CD45.2 を発現している）ため、CD45.1、CD90.1 の検出により、ドナー骨髄由来（CD45.1 陽性）か、移植片の中の T 細胞由来（CD90.1）かを識別することが可能である。

次に BALB/c と MHC が一致している B10.D2 マウスをドナー、BALB/c-TNC^{+/+}または BALB/c-TNC^{-/-}をレシピエントとする移植・GVHD モデルを作製した。C57BL/6 BALB/c 移植モデルと同様に、7 Gy の全身 X 線照射の前処置を実施し、翌日に骨髄と脾臓由来 T 細胞を輸注した。臨床的には、HLA（ヒト MHC）不適合は GVHD を発症させるため、原則的に HLA 適合度の高いドナーが選択されるが、MHC 一致・B10.D2 BALB/c 移植モデルは、MHC 不一致・C57BL/6 BALB/c 移植モデルと比べ、GVHD は軽度であり、より「臨床に近い」モデルであると考えられる。また B10.D2 BALB/c 移植モデルは、皮膚を主体とする GVHD を発症するため、慢性 GVHD 発症メカニズムの解析に用いられることが多いモデルであ

る。

上記、MHC 一致・B10.D2 BALB/c 移植モデルは、臨床的に多く実施されている HLA 適合（一致）移植における GVHD 病態メカニズムを解析するために有用なモデルといえるが、近年 HLA 一致ドナーが得られないケースや HLA 一致ドナーからの移植後再発ケースなどで、HLA 半合致ドナーからの移植が行われるようになってきている。HLA 遺伝子は 6 番染色体短腕にあり、2 本の 6 番染色体は両親から受け継がれるため、親子の関係であれば HLA 半合致となり、また同胞間で HLA 半合致となる確率は 1/2 となる。HLA 半合致移植では GVHD が強度になることが考えられるが、免疫抑制法の工夫により安全性が高まってきている。本研究では当初、MHC 半合致移植モデルによる検討は予定していなかったが、HLA 半合致移植例が今後増えることが予想されるため、C57BL/6 と BALB/c の交配により得られる F1 マウス・CB6F1 をレシピエントとして用い、BALB/c CB6F1 移植モデルの確立を試みた。

（2）臨床検体を用いた研究

動物（マウス）モデル研究で得られた知見が、臨床病態の理解に応用できるかどうかを検討するためには、臨床検体を用いた検討が必要となる。しかしながらモデル研究のように、継時的に組織を生検などにより採取することは侵襲が大きく困難であるため、比較的小さな侵襲により採取できる末梢血を、通常の診療（血液検査）に合わせて採取、保存することとした。検体収集は、国立がん研究センター中央病院との共同研究として、同センターにおける倫理審査を経て、同中央病院の北野、伊藤らの協力により実施した。同院の同種造血幹細胞移植患者の中で、検体保存に同意のあった患者より、通常血液検査に合わせて採取した末梢血を分離して得られた血漿を凍結保存し、継時的に保存された血漿中の TN-C を測定した。

4. 研究成果

（1）マウスモデル研究

C57BL/6 BALB/c 移植モデルで、ドナーとしてコンジェニックマウスを用いた実験では、移植後 1 週目よりドナー T 細胞（CD90.1 陽性）が、GVHD 標的臓器に浸潤し、4 週目以降も持続していることが明らかとなった。ま

た組織中のマクロファージは、移植後1週目はレシピエント由来 (CD45.2 陽性) のものが優位であるが、4週目以降はドナー由来 (CD45.1 陽性) のものが優位となることが明らかとなった。

TN-C ノックアウトマウスを用いた C57BL/6 BALB/c 移植モデルでは、GVHD 標的臓器中の TN-C 発現は、BALB/c-TNC^{+/+} レシピエントである移植群 (前頁、) で検出され、最も強く検出されたのはドナーが C57BL/6-TNC^{+/+} の群 (前項) であった。一方、TN-C を産生しない BALB/c-TNC^{-/-} がレシピエントの群 (前項、) では、ドナーが C57BL/6-TNC^{+/+}、C57BL/6-TNC^{-/-} に関わらず TN-C は検出されなかった。TN-C 発現は移植後4週目がピークであり、この結果より、TN-C は GVHD 標的臓器の組織修復が始まる頃に発現が高まり、主たる産生細胞はレシピエント由来の細胞であることが示唆された。また GVHD 標的臓器におけるコラーゲン蓄積が、移植後4週目には観察されたことより、現在継時的なコラーゲン蓄積の検討をおこなっている。

移植後 GVHD については、MHC 不一致・C57BL/6 BALB/c 移植モデル、MHC 一致・B10.D2 BALB/c 移植モデルとともに、BALB/c-TNC^{-/-} がレシピエントの群で移植後期の GVHD が強い傾向が認められたため、現在のメカニズムの詳細を検討中である。MHC 一致・B10.D2 BALB/c 移植モデルについては、本研究の中で確立した移植条件が、抗体や薬剤による GVHD 制御モデルに応用され、論文報告された。

MHC 半合致移植モデルについては、C57BL/6 と BALB/c の交配により得られる F1 マウス・CB6F1 をレシピエントとして用い、BALB/c CB6F1 移植モデルを確立した。三重大学では BALB/c および C57BL/6 バックグラウンド TN-C ノックアウトマウスが使用可能で、CB6F1-TNC^{-/-} の作製が可能である。BALB/c CB6F1 移植モデルは野生型マウスを用いて確立したが、CB6F1-TNC^{-/-} をレシピエントとする、MHC 半合致移植の実施も可能であり、準備が整い次第研究を開始する予定である。本研究の一環として確立した BALB/c CB6F1 移植モデルは、「造血幹細胞移植後再発腫瘍に対する腫瘍特異的 T 細胞受容体遺伝子改変細胞輸注療法」モデルにも応用し、2016 年 12 月に米国血液学会年次総会にて報告した。

(2) 臨床検体を用いた研究

国立がん研究センター中央病院にて収集された血漿を用いて、移植後の血中 TN-C レベルを ELISA 法によって測定した。個々の症例における TN-C レベルの継時変化は移植条件によって異なることが明らかとなったが、現在、慢性 GVHD 発症との関連性を検討している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Itamura H, Shindo T, Tawara I, Kubota Y, Kariya R, Okada S, Komanduri KV, Kimura S. The MEK inhibitor trametinib separates murine graft-versus-host disease from graft-versus-tumor effects. *JCI Insight*. 2016;1:e86331 (査読有) URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5033881/>
2. Zhang J, Ramadan AM, Griesenauer B, Li W, Turner MJ, Liu C, Kapur R, Hanenberg H, Blazar BR, Tawara I, Paczesny S. ST2 blockade reduces sST2-producing T cells while maintaining protective mST2-expressing T cells during graft-versus-host disease. *Sci Transl Med*. 2015;7:308ra160 (査読有) doi: 10.1126/scitranslmed.aab0166.
3. Machino-Ohtsuka T, Tajiri K, Kimura T, Sakai S, Sato A, Yoshida T, Hiroe M, Yasutomi Y, Aonuma K, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C aggravates autoimmune myocarditis via dendritic cell activation and Th17 cell differentiation. *J Am Heart Assoc*. 2014;3:e001052 (査読有) doi: 10.1161/JAHA.114.001052.

[学会発表](計 1 件)

1. Tawara I, Okamori K, Katayama N, Shiku H, Ikeda H. Tumor-specific donor lymphocyte infusion for tumor relapse after MHC-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. 58th American Society of Hematology Annual Meeting. Dec 3 2016, San Diego, U.S.A.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

俵 功 (Tawara Isao)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80378380

(2)研究分担者

吉田 恭子 (今中 恭子)

(Imanaka-Yoshida Kyoko)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00242967

(4)研究協力者

北野 滋久 (Kitano Shigehisa)

国立がん研究センター・中央病院・医員

研究者番号：60402682

伊藤 歩 (Ito Ayumu)

国立がん研究センター・中央病院・医員