

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462668

研究課題名(和文) 眼慢性移植片対宿主病における老化細胞とドナー間葉系幹細胞の役割と治療法の開発

研究課題名(英文) A significant role of senescent cells and donor mesenchymal stem cells in ocular chronic graft-versus-host disease and development of new therapy

研究代表者

小川 葉子 (Ogawa, Yoko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授

研究者番号：30160774

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)：眼移植片対宿主病(GVHD)の線維化にドナー由来新鮮骨髄間葉系幹細胞(MSC)と老化マクロファージが主要な役割を担う事を証明した(Ogawa, Y. eLife, 2016)。眼GVHDでは、ドナーMSCとマクロファージは早期よりGVHD涙腺に浸潤しMSCと相互作用し活性化して老化にかかわる液性因子を分泌することを見出した。組織に浸潤するドナーMSCに免疫原性の高いMHC class II陽性分画が存在し生着することを確認した。ドナーMSC除去移植または老化関連液性因子の一つのサイトカインに対する中和抗体投与により眼GVHDの病態進展への関連性を検証した。

研究成果の概要(英文)：We found that a significant role of mesenchymal stem cells (MSCs) and senescent macrophages in the pathogenic fibrosis in ocular graft-versus-host disease (GVHD). Donor MSCs and senescent macrophages expressing p16 were infiltrated into lacrimal glands and activated by interacting each other in early onset of ocular GVHD by secreting senescent related factors. We confirmed immunogenic and MHC class II+ MSCs infiltrated into cGVHD target organs especially lacrimal gland. We analysed the effectiveness of depletion of MSCs transplantation or suppression of a senescent associated cytokine in development of fibrosis and inflammation in ocular GVHD.

研究分野：眼表面免疫応答

キーワード：眼GVHD ドライアイ 間葉系幹細胞 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ；造血細胞移植後に発症する慢性GVHDは重篤な晩期合併症であり、免疫原性線維化を主体として涙腺、角結膜を含めた粘膜、外分泌腺の機能不全を引き起こす(Ogawa Y, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, Am J Pathol, 2009; Shikari H, Surv Ophthalmol, 2013)。さらに、GVHDの発症にマクロファージの老化も関連する事を見出した(Kawai M, Ogawa Y, et al. Sci Rep, 2013)。しかしドナーMSCと老化マクロファージがどのように眼GVHDの病態にかかわるかは不明であった。近年、老化細胞が液性因子を持続的に放出し慢性炎症を導く機構が Senescence associated secretory phenotype (SASP)として報告された(Rodier F, J Cell Biol. 2011, Ohtani N, Nature, 2013)。さらに、老化マクロファージが加齢黄斑変性などの加齢性疾患に積極的に病態形成に関わる事が報告された(Sene A, Cell Metab, 2013)。本研究ではドナーMSCと老化マクロファージの眼GVHDでの役割を解明し、新規治療を確立する事を主たる目的とした。

(2) 申請時期までの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

GVHDの病態は古くから、ドナーリンパ球の同種抗原を標的とする免疫応答と考えられてきた。しかし、申請者はこれまでに慢性GVHD涙腺組織病変局所への高度な線維化を明らかにし(Ogawa Y, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci; 2001, 2003)、病変部位の病的線維芽細胞は、半数近くがドナー由来で免疫応答に関与し活性化することを示した(Ogawa Y, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci; 2005, 2007)。線維化の一部には涙腺結膜上皮の上皮間葉系転換が関与する事も示した(Ogawa, Y, et al. Am J Pathol, 2009)。2010年から2013年の研究で、線維化病態に積極的に関与する線維芽細胞の細胞源はドナー由来MSCであり老化マクロファージが関与する可能性を見出した。そこで、GVHD涙腺結膜では老化したマクロファージがドナーMSCの標的組織への遊走を促してGVHDの病態形成に関わり涙腺、結膜の線維化による機能障害に重要な役割を果たすという仮説を着想した。

2. 研究の目的

眼移植片対宿主病(GVHD)によるドライアイは眼表面粘膜と涙腺の免疫異常と線維化を主体とした難治疾患であり、発症機構と病態形成の解明、新規治療法の開発が医学的にも社会的にも急務である。申請者は眼GVHDの線維化にドナー由来新鮮骨髄間葉系幹細胞(MSC)が主要な役割を担い老化マクロファージとの相互作用が関与する事を見いだした。ヒト眼GVHDの病態を反映するマウスGVHDモデルにより、次の点を追究する。

- ①眼GVHDにおけるドナーMSCとマクロファージの局在と相互作用の解明
 - ②MSCと老化マクロファージの相互作用による眼GVHDの発症と慢性化の分子機構の解明
 - ③ドナーMSCまたは老化マクロファージ除去移植による新規治療法の開発
- の以上の3項目を主な目的とした。

3. 研究の方法

- (1)ドナーMSC移植後のマクロファージとMSCの局在、老化ストレスマーカーの発現状態、相互作用、MSC遊走因子について組織学的解析、分子レベルの解析にて、対照と比較して評価する。ドナーMSCのみを可視化するために、GFPマウスから新鮮GFP標識MSCを単離し、レシピエントの造血幹細胞とともにBALB/cマウスに移植して評価する。
- (2)マウスを生存させたまま炎症細胞を経時的に可視化するために、Inflammation probeを腹腔内投与し主にマクロファージを生体内で追跡して病変部への集積と局在を検討する。
- (3)ドナーの移植細胞源からMSCの除去移植を行い、慢性炎症進展と線維化の抑制の有無を検討し、臨床応用として新規治療法の開発の検討をする。

4. 研究成果

- (1)ドナーMSC移植後のマクロファージとMSCの局在、老化ストレスマーカーの発現状態、相互作用、MSC遊走因子について組織学的解析、分子レベルの解析にて、対照と比較して評価した。その結果、標的臓器におけるMSCおよびマクロファージに老化マーカー、酸化ストレス、各種サイトカイン、ケモカインの一部がそれぞれの細胞の一部に発現していることを確認した。ドナーMSCのみを可視化するために、GFPマウスから新鮮GFP標識MSCを単離し、レシピエントの造血幹細胞とともにBALB/cマウスに移植して評価した。その結果、ドナーMSCはGVHDの涙腺をはじめとした標的臓器においてレシピエントのTh17細胞等の免疫担当細胞と相互作用をしていた。一方対照群には免疫担当細胞の活性化が乏しかった。(Ogawa Y, eLife, 2016)
- (2)マウスを生存させたまま老化細胞を経時的に可視化するために、inflammation probeを用いて予備実験を行ったところGVHD発症時期に一致して、涙腺、唾液腺、皮膚、肺、肝臓、小腸部位の各標的臓器へマクロファージがコントロールに比して浸潤していることをイメージングで確認した。
- (3)ドナーの移植細胞源からMSCの除去移植を行い、慢性炎症進展と線維化の抑制を確認した。各標的臓器に浸潤する病的MSCに病原性の高い、MHC class II分画が存在するこ

とを確認した。

(4) MSC除去移植および老化関連液性因子中和抗体投与により GVHD の抑制効果を検証した。

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 9 件)

1. Mukai S, Ogawa Y, Urano F, Kudo-Saito C, Kawakami Y, Tsubota K: Novel Treatment of Chronic Graft-Versus-Host Disease in Mice Using the ER Stress Reducer 4-Phenylbutyric Acid. *Sci Rep*. 2017, 7:41939. doi: 10.1038/srep41939. 査読有

2. Ogawa Y, He H, Mukai S, Imada T, Nakamura S, Su CW, Mahabole M, Tseng SC, Tsubota K: Heavy Chain-Hyaluronan/Pentraxin 3 from Amniotic Membrane Suppresses Inflammation and Scarring in Murine Lacrimal Gland and Conjunctiva of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Sci Rep*. 2017, 7:42195. doi: 10.1038/srep42195. 査読有

3. Ogawa Y, Morikawa S, Okano H, Mabuchi Y, Suzuki S, Yaguchi T, Sato Y, Mukai S, Yaguchi S, Inaba T, Okamoto S, Kawakami Y, Tsubota K, Matsuzaki Y, Shimmura S. MHC-compatible bone marrow stromal/stem cells trigger fibrosis by activating host T cells in a scleroderma mouse model. *eLife*. 2016 Jan;5:e09394. doi: 10.7554/eLife.09394. 査読有

4. Yaguchi S, Ogawa Y, Kawakita T, Shimmura S, Tsubota K. Tissue renin-angiotensin system in lacrimal gland fibrosis in a murine model of chronic graft-versus-host Disease. *Cornea*. 2015 Nov;34 (Suppl 11):S142-52. doi: 10.1097/ICO.0000000000000586. 査読有

5. Fukui M, Ogawa Y, Shimmura S, Hatou S, Ichihashi Y, Yaguchi S, Hirayama M, Kawakita T, Tsubota K. Possible involvement of epithelial mesenchymal transition in the fibrosis associated with IgG4-related Mikulicz's disease. *Mod Rheumatol*. 2015 Sep;25(5):737-43. doi: 10.3109/14397595.2014.1002968. 査読有

6. Yamane M, Ogawa Y, Fukui M, Kamoi M, Saijo-Ban Y, Yaguchi S, Mukai S, Kawakita T, Shimmura S, Tsubota K. Long-term topical rebamipide and diquafosol in two cases of immune-mediated dry eye. *Opt Vis Sci*. 2015 Apr;92 (4S Suppl 1):S25-S32. doi: 10.1097/OPX.0000000000000523. 査読有

7. Tsuboi H, Asashima H, Takai C, Hagiwara S, Hagiya C, Yokosawa M, Hirota T, Umehara H, Kawakami A, Nakamura H, Sano H, Tsubota K, Ogawa Y, Takamura E, Saito I, Inoue H, Nakamura S, Moriyama M, Takeuchi T, Tanaka Y, Hirata S, Mimori T, Yoshifuji H, Ohta A, Matsumoto I, Sumida T: Primary and secondary surveys on epidemiology of Sjogren's syndrome in Japan. *Mod Rheumatol*. 2014 May; 24(3):464-470. doi: 10.1038/srep06680. 査読有

8. Inaba T, Hisatsune C, Sasaki Y, Ogawa Y, Ebisui E, Ogawa N, Matsui M, Takeuchi T, Mikoshiba K, Tsubota K: Mice lacking inositol 1,4,5-trisphosphate receptors exhibit dry eye. *PLoS One*. 2014 Jun; 9(6):e99205. doi: 10.1371/journal.pone.0099205. eCollection 2014. 査読有

9. Tatematsu Y, Ogawa Y, Abe T, Kamoi M, Uchino M, Saijo-Ban Y, Yaguchi S, Mukai S, Mori T, Okamoto S, Tsubota K. Comparisons for grading chronic ocular graft-versus-host disease: NIH eye score, Japanese dry eye score, and DEWS 2007 score. 2014 Oct; *Sci Rep*. 4: 6680. doi: 10.1038/srep06680. 査読有

[学会発表] (計 16 件)

1. Ogawa Y. Chronic GVHD. Intersecting Basic Aspects. Session I. Ocular GVHD: Diagnostic & Classification criteria. Chronic GVHD. Intersecting Basic and Clinical Aspects. Chicago (USA). 22 October 2016.

2. 小川葉子. 移植医に必要な合併症の知識 2 ; 眼科的合併症について. 第1回造血幹細胞移植後合併症セミナー ~ 移植医に役立つスペシャリストからのレクチャー ~. サピアタワーステーションカンファレンス東京 (東京都・千代田区) 2016/9/22.

3. Ogawa Y. Ocular Inflammatory Insults: Advances in understanding their mechanism and treatment. Keynote address. Chronic ocular graft-versus-host disease. 8th International Conference on the Tear Film & Ocular Surface: Basic Science and Clinical relevance. Montpellier (France). 7-10 September 2016

4. 山根みお, 小川葉子, 向井 慎, 坪田一男. 細胞老化分泌関連因子による慢性移植片対宿主病ドライアイの発表機構と病態形成の解明. フォーサム 2016. 第50回日本眼炎症学会. 東京国際フォーラム (東京都・千代田区) 2016/7/1-3

5. Ogawa Y. 147 - Basic and clinical research in chronic ocular graft-versus-host disease–Minisymposium. Stem Cells Migration and Immune Mediated Fibrosis in Chronic Ocular GVHD. The Association of Research for Vision and Ophthalmology 2016 (ARVO2016), Seattle (USA). 1-5 May 2016.
 6. 小川葉子. リウマチ性疾患によるドライアイの病態と最新治療. 鎌ヶ谷総合病院 鎌ヶ谷リウマチセミナー. 鎌ヶ谷総合病院 (千葉県・鎌ヶ谷市) 2016/1/20
 7. Ogawa Y, Tsubota K. Diagnostic criteria of ocular GVHD. The Chicago Chronic GVHD Meeting 2015. Chicago (USA) . 24, October, 2015.
 8. 山根みお, 小川葉子, 林 勇海, 福井正樹, 向井 慎, 坪田一男. 慢性移植片対宿主病によるドライアイの臨床像と末梢免疫担当細胞の活性化の関連性. 第 69 回日本臨床眼科学会. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市) 2015/10/22-10/25
 9. 山根みお, 小川葉子, 鈴木孝典, 向井慎, 坪田一男. マウス GVHD 涙腺における免疫担当細胞の相互作用. 第 36 回 日本炎症・再生医学会. 虎ノ門ヒルズ (東京都・港区) 2015/7/21-7/22
 10. Ogawa Y. Lacrimal obstruction as the basis for dry eye. Complex phenotypes. Dry Eye Workshop II Pathophysiology Subcommittee Paris Meeting. Paris, (France). 20 June 2015.
 11. 小川葉子, 向井慎, 坪田一男. 眼慢性移植片対宿主病における小胞体ストレスの関与. 第 15 回 日本抗加齢医学会総会 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市) 2015/5/29-5/31
 12. 小川葉子, 河合正孝, 榎村重人, 大多茂樹, 川村 直, 鈴木孝典, 桑名正隆, 河上 裕, 坪田一男. 重症ドライアイへの老化マクロファージの関与. 第 19 回シエーグレン症候群セミナー. HAKUYOH ビル (東京都・新宿区) 2014/5/24
 13. 小川葉子, 榎村重人, 坪田一男. Adoptive transferによる涙腺慢性GVHD発症機序の解明. 第 119 回日本眼科学会総会. ロイトン札幌 (北海道・札幌市) 2015/4/16-4/19
 14. 小川葉子. Special Lecture 2 重症ドライアイの基礎と臨床をつなぐ. 第 3 回 Shinjuku Ophthalmology Club. 京王プラザ(東京都・新宿区) 2014/12/18
 15. Ogawa Y, Shimmura S, Suzuki T, Kawai M, Tsubota K. Macrophage expressing oxidative stress marker play some role in lacrimal gland of chronic graft-versus-host disease. The Annual Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology 2014 (ARVO2014), Orlando (USA) May, 4-8, 2014.
 16. Ogawa Y. [IS-SA-167] New Concepts in Ocular Surface Inflammation. The Role of Donor Mesenchymal Stem Cells in cGVHD World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology (WOC2014), Tokyo (Japan) April, 2-6, 2014.
- [図書] (計 17 件)
1. 小川葉子. 巻頭言. 眼疾患と上皮間葉転換. 日本眼科学会雑誌 120(11):743-745, 2016. 総ページ数 820 頁 (3 頁)
 2. 小川葉子. リウマチ・膠原病診療に必要な他科の知識と診療のコツ. 第 2 回ドライアイの診断と最新治療. Keynote R・A. Rheumatic & Autoimmune Diseases. 先端医学社 4(1): 44-48,2016. 総ページ数 53 頁(5 頁)
 3. 小川葉子. 第 1 章 ドライシンドロームの概念. ①ドライアイからみたドライシンドローム. ドライシンドロームの基礎と臨床. 坪田一男, 斎藤一郎 監修 メディカルレビュー社 大阪. 初版 第 1 版:20-26,2016. 総ページ数 201 頁 (7 頁)
 4. 小川葉子. IV. GVHD とドライアイ. 眼科臨床エキスパート. シリーズ編集 吉村長久, 後藤 浩, 谷原秀信. 編集 島崎潤. 角結膜疾患の治療戦略. 薬物治療と手術の最前線. 医学書院 東京. 第 1 版第 1 刷:175-185,2016. 総ページ数 405 頁(11 頁)
 5. 小川葉子・鴨居瑞加. 涙液減少型ドライアイ/慢性移植片対宿主病(GVHD)によるドライアイ. 一目でわかる眼疾患の見分け方. 編集 井上幸次, 山本哲也, 大路正人, 門之園一明. 角結膜疾患, 緑内障. メディカルレビュー社 東京. 第 1 版第 1 刷:38,2016. 総ページ数 211 頁(1 頁)

6. 小川葉子. 涙腺と涙液分泌. シリーズ総編集 大鹿哲郎、大橋裕一. 編集 大鹿哲郎. 眼の発生と解剖・機能. 専門医のための眼科診療クオリファイ 30 眼の発生と解剖・機能. 中山書店 東京. 初版 第 1 刷:84-91,2016. 総ページ数 444 頁 (8 頁)
7. 小川葉子, 山根みお. 特集 エイジングと加齢眼疾患. エイジングからみたドライアイ. 眼科. 金原出版株式会社 東京. 58(6): 613-618,2016. 総ページ数 710 頁 (6 頁)
8. 小川葉子. 白血病. 大路正人, 後藤 浩, 山田昌和, 野田 徹 編集. 今日の眼疾患治療指針. 医学書院. 東京. 第 3 版:768-769, 2016. 総ページ数 873 頁 (2 頁)
9. 小川葉子. 多発性骨髄腫. 編集 大路正人, 後藤 浩, 山田昌和, 野田 徹. 今日の眼疾患治療指針. 医学書院 東京. 第 3 版:769-770, 2016. 総ページ数 873 頁(2 頁)
10. 小川葉子, 坪田一男. II 病気・病態の応じた使い方. 8. 眼科疾患患者に投与するときの注意. 田中廣壽. 編集 一冊で極めるステロイド診療ガイド. 第一版 第一刷 文光堂 東京 114-117, 2015. 総ページ数 293 頁 (4 頁)
11. 小川葉子, 坪田一男. IV 剤型別 使い分けのコツ・注意 2. ステロイド外用剤 ② 眼科. 田中廣壽. 編集 一冊で極めるステロイド診療ガイド. 第一版 第一刷 文光堂 東京 238-244, 2015. 総ページ数 293 頁 (7 頁)
12. 小川葉子. 慢性炎症と重症ドライアイ別冊 Bio Clinica 慢性炎症と疾患 眼疾患と炎症. 坪田一男・小澤洋子. 編集主幹 北隆館 4(3):14-19, 2015. 総ページ数 170 頁 (6 頁)
13. 小川葉子. 特集 ドライアイのあたらしい治療 炎症制御による治療法. あたらしい眼科メディカル 葵出版. 32(7):965-971, 2015. 総頁数 144 頁 (7 頁)
14. Carlos Belmonte 眼表面不快感に潜む末梢神経メカニズム—冷受容器 (cold thermoreceptor) の役割— 小川葉子 監修 Frontiers in Dry Eye 10(1): 16-22, 2015. 総ページ数 71 頁 (7 頁)
15. 小川葉子, 坪田一男. 6 涙腺生検病理診断 シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 改訂第 2 版 監修 住田孝之, 川上 純 編集 シェーグレン症候群学会 診断と治療社 86-93, 2014. 総ページ数 211 頁(13 頁)
16. 小川葉子. ドライアイ 今日の治療指針 2014 年版 医学書院 1314-1316: 2014. 総ページ数 2014 頁 (3 頁)
17. 小川葉子. 小児のドライアイ 小児科 金原出版株式会社 55(3): 287-295, 2014 総ページ数 370 頁 (9 頁)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 2 件)
- ①名称: 移植片対宿主病の治療剤又は予防剤、ファイブロサイト浸潤抑制剤
発明者: 小川葉子、坪田一男
権利者: 小川葉子、坪田一男、慶應義塾大学
種類: 特許出願
番号: 2016-064376
出願年月日: 2016/03/28
国内外の別: 国内
- ②名称: Phenyl butyric acid による慢性移植片対宿主病における炎症と線維化の抑制と新規治療法の開発
発明者: 小川葉子、向井慎、坪田一男
権利者: 小川葉子、向井慎、坪田一男、慶應義塾大学
種類: 特許出願
番号: 62/318, 404
出願年月日: 2016/4/5
国内外の別: 国外
- 取得状況 (計 0 件)
[その他]
なし
6. 研究組織
- (1)研究代表者
小川 葉子 (Yoko Ogawa)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号: 30160774
- (2)研究分担者
なし -
- (3)連携研究者
坪田 一男 (Kazuo Tsubota)
慶應義塾大学・医学部・教授+-
研究者番号: 40163878
榛村 重人 (Shigeto Shimmura)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 00235780
- (4)研究協力者
なし