

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860373

研究課題名(和文) 移植片対宿主病における特異的バイオマーカーとしての血清miRNAと免疫機構の解明

研究課題名(英文) Altered Exosomal miRNA expression of late onset acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

研究代表者

吉澤 成一郎 (Yoshizawa, Seiichiro)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：70421063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、同種移植後のGVHD発症および非発症患者の血漿および血漿内エクソソーム分画を用いて、late on set aGVHDの発症に關与するエクソソーム内miRNAの発現プロファイルを解析した。そして、GVHD発症群と比較して非発症群では、エクソソーム内miRNAの発現パターンが異なることを見出した。また、非GVHD群と比較して、late on set aGVHD群で有意に低下するエクソソーム内miRNAを検討した結果、miR-128を含むいくつかのmiRNAが候補として抽出された。GVHD発症に關わるmiRNAの同定に成功し、GVHDの発症予測、重症度判定への臨床応用が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Exosomes, small endosome-derived extracellular vesicles, are present in various biological fluids, such as plasma, thus have potential in facilitating molecular diagnosis. The aim of this study is to determine clinically relevant exosomal miRNAs in patients developing LA GVHD after HSCT.

We evaluated blood samples obtained from 10 patients who underwent HSCT for treatment of hematologic diseases. Exosomal miRNA profiling was done using a TaqMan low-density array.

We found that a subset of miRNAs was significantly up-regulated in the exosomes of LA GVHD groups compared to non-GVHD controls. Accordingly, the predicted target genes of altered miRNAs were extracted by MirTarBase. To estimate the biological implication of LA GVHD related miRNAs, we then investigated comprehensively possible related pathway using DAVID bioinformatics tools. Our study indicates that altered expression of certain exosomal miRNAs may play an important role in the immunoregulation of LA GVHD.

研究分野：血液学

キーワード：移植片対宿主病 造血幹細胞移植 エクソソーム miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) GVHD のバイオマーカーの探究

同種造血幹細胞移植（Hematopoietic stem cell transplantation; HSCT）後の造血能はドナー由来の細胞に置換されるため、ドナー由来の免疫細胞（主に T 細胞）が宿主を異物とみなして生じる免疫反応が問題となる。移植片対宿主病（graft-versus-host disease; GVHD）の誘因が同種抗原に対する免疫反応であり、種々のサイトカインを放出することで引き起こされる病態であることから、バイオマーカーの探究においては、これまで種々の免疫担当細胞（CD4 陽性ヘルパー T 細胞、制御性 T 細胞）や炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  が探索されてきた。さらには、プロテオミクス解析も行われ、発症メカニズムの解明に寄与していると考えられるが、いまだ不十分である。近年、GVHD で変動する血清 miRNA の報告（Xiao B et al. *Blood.*, 2013）がなされ、多くの生命現象を司る非翻訳型機能性 RNA である miRNA が、GVHD にも関与することが分かった。さらに、GVHD 発症に関わる miRNA の機能とその調節を明らかにすることは、間違いなく GVHD の病態の理解を深めると考えられる。

### (2) GVHD のバイオマーカーがどうして必要か？

同種移植において、HSCT 関連合併症は死に直面しうするため、早期診断と治療が特に重要である。なかでも高率に発症する GVHD の診断は病理学的所見によってなされるが、腫瘍性病変や病原体を同定すれば診断できる感染症の診断とは異なり、血液病理においては大変診断の難しい分野の一つと言える。その理由として、移植後の放射性障害、薬剤性障害、ウイルス感染症など種々の合併症が複合的に絡むため、病理診断を困難にしていると考えられる。また、臨床においても同様であり、GVHD とその鑑別疾患の狭間で診断に苦渋し、治療方針の選択を余儀なくされるケ

ースが少なくない。そのため、GVHD の診断においては簡便なバイオマーカーの探究が必要不可欠と考えられる。

### (3) miRNA は疾患特異的バイオマーカーである

miRNA が世界で精力的に研究されるようになって以降、免疫機構においても miRNA が重要な役割を果たしていることが知られるようになった。とりわけ、血液細胞の分化、癌、ホメオスターシス、自己免疫疾患等において、特異的に変動する miRNA が同定されている。こうした miRNA を架け橋とした遺伝子ネットワークの構築が日々更新されている。

我々は、世界に先駆けて造血器腫瘍において白血病患者では健常人と比べ、血清 miR-92a が著減していることを報告した（Tanaka et al. *PLoS One.*, 2009）。さらに、血清 miRNA レベルと悪性リンパ腫の再発との関係や（Ohyashiki et al. *PLoS One.*, 2011）、多発性骨髄腫と免疫学的監視機構の破綻により変動する miRNA の関係を明らかにした（Yoshizawa et al. *Blood Cancer J.*, 2012）。

このような背景を踏まえ、本研究では GVHD における血清 miRNA および最近リキッドバイオブシー分野で注目を集めている細胞外小胞“エクソソーム”に焦点をあて、特定の miRNA の発現様式および GVHD の病態について研究を進めた。

## 2. 研究の目的

同種造血幹細胞移植患者に特有の合併症である移植片対宿主病（GVHD）は移植片の宿主に対する免疫反応であるが、特異的な客観的マーカーは見出されていない。血清 miRNA による検討は、臨床所見および病理所見が診断特異的ではない GVHD における非侵襲的なバイオマーカーになる。本研究では GVHD の発症に関わる血清 miRNA および血

漿中に存在するエクソソームに内包された miRNA の発現プロファイルについて、GVHD 発症前後の患者の血清を用いて定量 PCR 法で解析し、GVHD の発症予測、治療効果判定や重症度判定への臨床応用、さらには、血清 miRNA の観点から移植免疫の病態に迫ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) GVHD 特異的な候補血清 miRNAs の同定と定量解析

網羅的遺伝子発現解析には 384-well カード型アレイ (TaqMan® Gene Signature Array) を用いて GVHD 発症前後の患者の血清 miRNA を網羅的に解析した。健常人 7 例、非 GVHD 症例 5 例、late on set aGVHD 症例 5 例の血漿サンプルを用いて、ath-miR-159 をリファレンスとした定量系によって解析を行った。

#### (2) late on set aGVHD 患者由来エクソソームに内包された特異的 miRNA の解析

TaqMan MicroRNA assays (ABI) で解析する。使用する主な microRNA specific stem-loop primers は hsa-miR-128 (002216; ABI) である。

### 4. 研究成果

初年度 (H26 年度) では、同種移植後の GVHD 発症および非発症患者の血漿および血漿内に遊離する細胞外小胞 (エクソソーム) 分画を用いて、late on set aGVHD の発症に關与するエクソソーム内 miRNA (exosomal miRNA) の発現プロファイルを解析した。そして、GVHD 発症群と比較して非発症群では、エクソソーム内 miRNA の発現パターンが異なることを見出した。また、非 GVHD 群と比較して、late on set GVHD 群で有意に低下するエクソソーム内 miRNA を検討した結果、miR-128 を含むいくつかの miRNA が候補として抽出された (図 1)。

次年度 (H27 年度) では、初年度に引き続

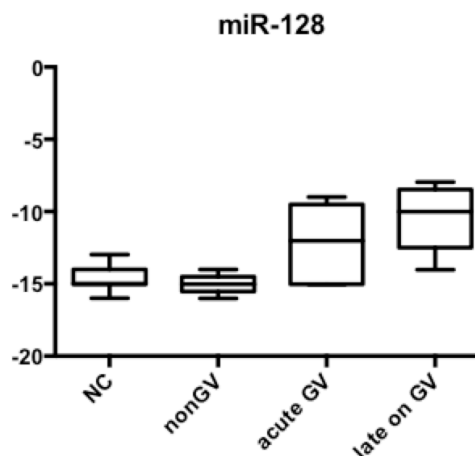


図 1. エクソソーム内 miR-128 の発現変化

き同種移植後の GVHD 発症群および非発症群における exosomal miRNA の発現プロファイルの解析を進めるとともに、late on set GVHD 群で有意に低下する exosomal miRNA から、特に有意差の高い miR-128 について、miRNA ターゲット予測データベース “miRTarBase” によりターゲットとなりうる因子の絞り込みを行った。その結果、DCX、BMI1、FBXW7、TGFB1R1 などが候補因子として抽出された (表 1)。

最終年度である H28 年度は、抽出された候補 miRNA の機能解析および、GVHD 発症メカニズムの解明を目的として、急性 GVHD モデルマウスの作製とそれらを用いた in vivo 解析を予定していたが、研究期間内において in vivo モデルを確立することが不可能であった。その一方で、臨床検体を用いた解析をさ

表 1. miR-128 のターゲット候補因子の探索

Target	Validation methods					
	Strong evidence			Less strong evidence		
	Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC Other
BMI1	*	*	*	*		*
FBXW7	*	*		*	*	*
DCX	*	*	*			*
RELN	*	*	*			*
EGFR	*	*	*			

らに進行させる方向へと重点を移し、GVHD 発症前後での継時的なサンプリングを行い、GVHD 発症に関わる miRNA の候補として抽出された miR-128 について定量 RT-PCR を用いて発現を解析した結果、GVHD 発症の数週間前からエクソソーム内 miR-128 の発現が患者血漿中で上昇していることを見出した（未発表）。また、miR-128 の他にも候補となる miRNA が数種類抽出されており、本研究期間が終了した現在も miR-128 の解析と並行して解析を進めており、雑誌論文への投稿も準備中である。当初の計画には解析予定の臨床検体数に到達することができなかったが、GVHD 発症に関わる miRNA の同定に成功した。さらに、最近明らかにされつつあるエクソソーム miRNA における細胞間伝達物質の意義に着目し、すなわち、細胞間伝達物質のひとつであるエクソソーム miRNA の研究をしており（Umezumi et al. *Oncogene*, 2012）、エクソソーム miRNA の観点から GVHD における免疫機構の解明を行う点が、これまでになく新たな展開である。

本研究では GVHD 関連 miRNA を同定することで、臨床の場において、少量の血液サンプルのみで可能な非侵襲的な方法として診断活用できれば、患者の治療への早期介入ができ、GVHD をコントロールすることで、移植成績の向上につながると考えられる。さらには、HLA 一致度の低いドナーからも移植可能となり、ドナー選択の幅が確実に広がる。また miRNA を介した免疫システムの一端を解明することで、GVHD 予防における免疫全般の抑制を起こす現在の免疫抑制剤は、抗原特異的な免疫抑制、すなわち免疫寛容を目指した miRNA による遺伝子治療といった新たな分野に対する貢献も期待される。

##### 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）

(1) Gotoh M, Yoshizawa S, Katagiri S, Suguro T, Asano M, Kitahara T, Akahane D, Okabe S, Gotoh A, Tauchi T, Ito Y, Ohyashiki K. Human herpesvirus 6 reactivation on the 30<sup>th</sup> day after allogenic hematopoietic stem cell transplantation can predict grade 2-4 acute graft-versus-host disease. *Transplant Infectious Disease*. 2014, 16(3): 440-449. (査読有)

(2) Gotoh M, Yoshizawa S, Katagiri S, Suguro T, Asano M, Kitahara T, Akahane D, Okabe S, Gotoh A, Tauchi T, Ito Y, Ohyashiki K. A novel reduced-intensity umbilical cord blood transplantation using a recombinant G-CSF combined with high-dose Ara-C for active myeloid malignancies. *Bone Marrow Transplantation*. 2014, 49(7): 955-960. (査読有)

〔学会発表〕（計 3 件）

(1) Yoshizawa S, Umezumi T, Saitoh Y, Gotoh M, Akahane D, Kobayashi C, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Exosomal miRNA signature of late onset acute graft-versus-host disease in allogenic hematopoietic stem cell transplantation. 第 77 回日本血液学会学術総会 2015 年 10 月 16 日 金沢

(2) Yoshizawa S, Umezumi T, Saitoh Y, Gotoh M, Akahane D, Kobayashi C, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Distinct exosomal miRNA expression of late onset graft-versus-host disease in allogenic hematopoietic stem cell transplantation. 20<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association (EHA) 2015 年 6 月 11 日 Vienna, Austria

(3) 吉澤成一郎、梅津知宏、斎藤優、後藤守孝、赤羽大悟、小林千晶、大屋敷純子、大屋敷一馬 同種造血幹細胞の GVHD に特異的な exosomal miRNA の解析 第 174 回東京医科大学医学会総会 2014 年 11 月 1 日 東京

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 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 0 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

吉澤 成一郎 (YOSHIZAWA, Sei-ichiro)  
東京医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70421063

### (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

梅津 知宏 (UMEZU, Tomohiro)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40385547