

令和元年6月18日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08730

研究課題名(和文)慢性GVHDにおける骨髄造血ニッチ傷害の細胞分子機序

研究課題名(英文)Molecular and cellular mechanisms of the chronic GVHD-associated impairment of bone marrow hematopoietic niche

研究代表者

上羽 悟史(Ueha, Satoshi)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・准教授

研究者番号：00447385

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)：本研究では、慢性GVHDに伴う骨髄間葉系細胞障害の細胞・分子機序を解明し、新規予防・治療戦略の礎を築くことを目的とした。マウス慢性GVHDモデルを用いて、慢性GVHD発症時には骨髄線維化を伴う広範な血球減少が発症すること、骨髄線維化の進展にはPDGF-A、CTGFなどの成長因子を介したNF- κ B、STATパスウェイが関与すること、PDGFシグナルを阻害すると骨髄線維化病変が抑制されること、移植後早期に抗CD4抗体を投与することで、骨髄障害を予防出来ることを見いだした。本研究の成果をもとに、造血幹細胞移植の生命予後を改善する予防・治療法が開発されることを期待している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでallo-HSCTに伴う免疫再構築不全の克服を目指す多くの研究は、GVHDによる胸腺障害に着目し、これを予防・治療するものがほとんどであった。我々は、急性GVHDモデルの解析から見出した新たな概念である骨髄GVHD、すなわち骨髄造血ニッチ障害によるリンパ球産生の抑制が、胸腺におけるT細胞産生抑制の上流で免疫再構築を障害していることを示してきた。本研究成果は、慢性GVHDにおける骨髄造血ニッチ障害の分子・細胞機序の一端を明らかにしたものであり、国際的にも極めて独創性の高い研究と言える。社会的にも、allo-HSCT後に遷延する免疫不全を予防出来れば、生命予後とQOLの改善が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular and cellular mechanisms of chronic GVHD-associated impairments in bone marrow (BM) mesenchymal cells to establish the bases for novel prevention and therapy for allo-HSCT. In a murine chronic GVHD model, we found the development of broad suppression of hematopoiesis and BM fibrosis. PDGF and CTGF signaling are involved in the activation of NF- κ B and Stat pathway, and inhibition of PDGF signaling suppressed the BM fibrosis. Early administration of anti-CD4 mAb prevented BM failure. These findings may provide a preventive and therapeutic clue to improve the survival and QOL after allo-HSCT.

研究分野：移植免疫

キーワード：造血幹細胞ニッチ T細胞 線維化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植(allo-HSCT)は、造血器腫瘍や骨髄不全の患者を対象とした、大量化学療法と移植片対腫瘍効果による根治を狙った治療であるが、強力な治療効果と表裏一体として現れる同種免疫による合併症、移植片対宿主病(graft-versus host disease: GVHD)の克服が大きな課題となっている。慢性GVHDは、通常移植後100日以降に皮膚、肝臓、肺、造血・リンパ組織など多臓器に渡って自己免疫疾患に類似した病態を示し、最終的に線維化を伴う臓器不全をきたす。骨髄における慢性GVHDは、血小板を含む広範な血球減少、とりわけT細胞、B細胞の著減として顕現し、移植関連死の約3割を占める出血や感染症などの主要因となる。臨床的には、免疫グロブリン製剤や抗生剤の投与といった対症療法に依存せざるを得ないのが現状であり、慢性GVHDに伴う移植後免疫不全の発症機序解明と、根本的な予防・治療法の確立が急務の課題であった。

正常骨髄では、線維芽細胞/CXCL12 abundant reticular (CAR) cell、血管内皮細胞、そして骨芽細胞などの非血球系細胞が、造血因子・分化制御シグナルを供給する微小環境(造血ニッチ)を形成し、造血幹細胞を頂点とする造血システムを支持している。申請時に行っていた慢性GVHDモデルの予備検討に基づき、研究代表者は、慢性GVHD発症時の骨髄で生じる造血・リンパ球産生不全機序として1)骨芽細胞の病的な分化・成熟による造血支持機能の低下、2)線維芽細胞/CXCL12 abundant reticular (CAR) cellの病的な活性化と造血支持機能の低下、という仮説を考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、マウス慢性GVHDモデルを用いて、血球産生抑制を発症した骨髄における骨芽細胞、線維芽細胞、内皮細胞などの骨髄造血ニッチ構成細胞の数的、質的变化を明らかにすることを目的とした。また、予防・治療戦略を確立するため、慢性GVHDにおける骨髄造血ニッチ構成細胞の障害をもたらすallo-T細胞サブセットを同定した上で、包括的遺伝子発現解析、遺伝子改変マウスなどを用いて骨髄造血ニッチ障害をもたらすエフェクター・ターゲット分子を同定することを目的とした。

3. 方法

(1) マイナーミスマッチ慢性GVHDモデルにおける骨髄障害の検証

基本モデルとして、移植前日にX線照射前処置を施したC3H.SW-H2b(H-2b)マウスにB6マウス(H-2b)由来T細胞除去骨髄細胞(TCD BM)のみ(GVHD(-))もしくはTCD BMとともに脾臓T細胞を移植した(GVHD(+))。

(2) ドナーT細胞、血球系細胞、造血ニッチ構成細胞の定量的解析

移植後経時的に大腿骨、下腿骨から骨髄細胞を調整し、フローサイトメトリーにより浸潤ドナーT細胞サブセット、間葉系細胞ならびに内皮細胞の量的変化を定量した。

(3) 骨髄GVHDのトランスクリプトーム解析

移植後14日目および40日目のGVHD(-)およびGVHD(+)群の骨髄組織のトランスクリプトーム解析を行った。また、データベースに基づくネットワーク解析を行い、病的な性質変化に関わる転写因子や、上流および下流シグナルを検討した。

(4) 慢性GVHDに伴う造血障害をもたらすエフェクタードナーT細胞集団の同定

慢性GVHD発症の転機と思われるタイミングに前後して抗CD4または抗CD8除去抗体を投与し、造血障害へのCD4⁺またはCD8⁺T細胞の関与を解析した。

4. 研究成果

(1) マイナーミスマッチ慢性GVHDモデルにおける骨髄障害

GVHD群では移植後21日目から42日目にかけて体重減少およびGVHDスコアの上昇が顕著になり、これに伴い骨髄総細胞数、骨髄B細胞数が著明に減少した(図1)。63日目の大腿骨病理切片を解析したところ、GVHD(+)群では海綿骨領域の骨化、皮質骨領域におけるALP陽性領域の拡大を認めた。これは、慢性GVHDにおける骨髄・造血障害が急性GVHDにおけるそれと異なる

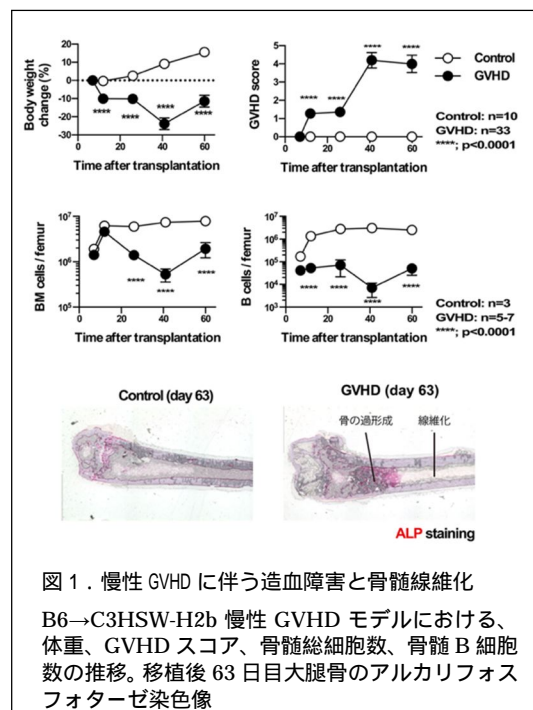


図1. 慢性GVHDに伴う造血障害と骨髄線維化

B6→C3H.SW-H2b慢性GVHDモデルにおける、体重、GVHDスコア、骨髄総細胞数、骨髄B細胞数の推移。移植後63日目大腿骨のアルカリフォスフォターゼ染色像

る機序で発症することを示唆するものであった。

(2) 慢性 GVHD に伴う造血障害の細胞・分子機序

内皮や線維芽細胞などが産生する Scf、線維芽細胞が主に産生する IL-7 などの発現は、骨髄 B 細胞数と強い正の相関を示し、一方、強力な線維化誘導因子 TGF- β により発現が誘導される Pai-1 の発現は B 細胞数と強い負の相関を示していた (図 2)。また、内皮細胞数と B 細胞数の相関は認めず、一方間葉系細胞数と B 細胞数は強い正の相関を示した。これらの結果から、慢性 GVHD に伴い造血・リンパ球分化を支持する増殖・分化因子を供給する間葉系細胞の機能および/または細胞数が低下することで、慢性 GVHD に伴う造血障害が起きていることが示唆された。

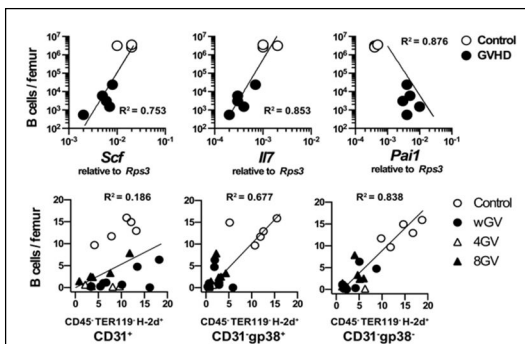


図 2. 慢性 GVHD に伴う造血障害の細胞・分子機序 (上段) 骨髄 B 細胞数と大腿骨における造血・線維化関連分子発現の相関。(下段) 骨髄 B 細胞数と骨髄 CD31+内皮、CD31+gp38+線維芽細胞、CD31+gp38+間葉系細胞の相関。

(3) 慢性 GVHD に伴う骨髄障害のネットワーク解析

造血障害・骨髄線維化の分子メカニズムを解明すべく、慢性 GVHD モデルの大腿骨を急性期から慢性期まで経時的に取得し、マイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を行った (図 3)。その結果、移植後 14 日目の急性期、移植後 40 日目の慢性期のそれぞれで特異的に発現変動する遺伝子群が見出された。gene ontology 解析により、上記遺伝子群はいずれも、線維化関連遺伝子を有意に数多く含むことが明らかとなった。これらの遺伝子発現の制御機構を予測するソフトウェアを用いて上記遺伝子群の調節因子を推定したところ、PDGF, CTGF などの成長因子を介した、NF-k β , STAT パスウェイの関与が示唆された。

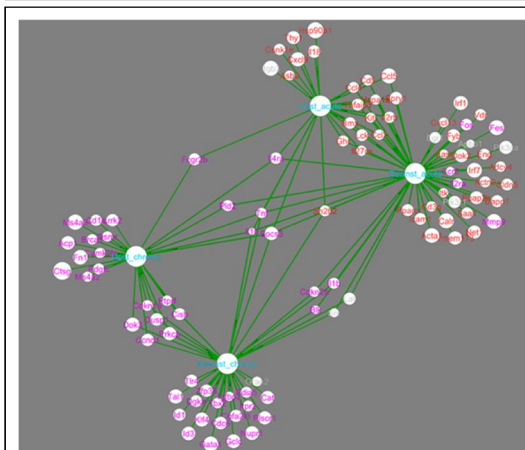


図 3. 慢性 GVHD に伴う骨髄障害のネットワーク解析 移植後急性期 (14 日目) および慢性期 (40 日目) の大腿骨についてマイクロアレイ解析を行い、発現変動した遺伝子について gene ontology 解析、上流、下流 pathway 解析を行った。

(4) 慢性 GVHD における PDGF シグナルを介する骨髄線維化

造血抑制および骨髄線維化の発症における PDGF シグナルの関与と治療標的としての可能性を検証するため、PDGF 受容体シグナルの阻害剤であるイマチニブを移植後 14 日目から 39 日目まで投与し、骨髄における遺伝子発現、病理組織像、造血への影響を検証した (図 4)。イマチニブ投与群では、体重および GVHD スコアに有意な改善は認めず、有意な骨髄細胞数の回復も認めなかった。Scf や Il7 などの造血因子の遺伝子発現も有意な差は認めなかったが、PDGF により誘導される Spp1/Osteopontin および Col3a1 の発現は著明に抑制されており、また線維化スコアも有意に低下していた。これらの結果より、慢性 GVHD による骨髄線維化に PDGF シグナルが関与すること、また造血抑制には骨髄線維化とは異なる機序も関与することが示唆された。

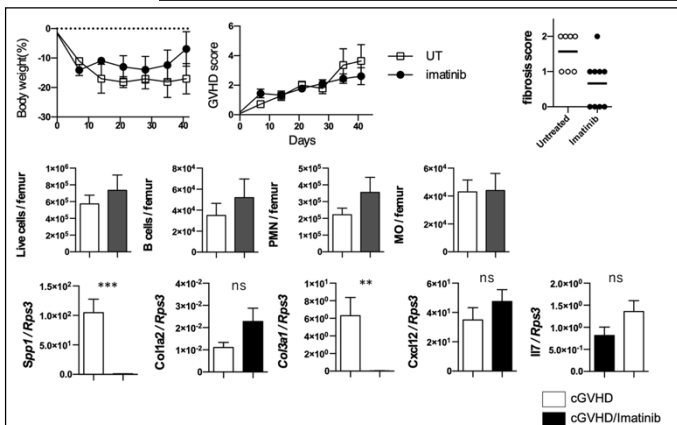


図 4. 慢性 GVHD に伴う骨髄障害における PDGF シグナルの関与 慢性 GVHD 誘導 14 日目より 39 日目まで Imatinib を (100 mg/kg/shot, 5 日連続投与、2 日休薬) \times 4 コールで投与し、体重と GVHD スコアの推移、40 日目における骨髄線維化の病理定量評価、白血球細胞の回復、骨髄における遺伝子発現を評価した。

(5) 慢性 GVHD に伴う造血障害をもたらすエフェクターDナ- T 細胞集団の同定

移植後 4、6、11 日目に除去活性を有する抗 CD4 抗体および/または抗 CD8 抗体を投与し、造血障害をもたらすエフェクターDナ- T 細胞集団の同定を試みた (図 5)。抗 CD4 抗体単独、抗 CD8 抗体単独および抗 CD4/CD8 抗体併用群では、未処置マウスに比較し体重減少および

GVHD スコアの上昇が軽減していた。また、骨髄細胞数、B 細胞数、好中球数はとりわけ抗 CD4 抗体単独投与群において著明な回復を認め、さらに骨髄線維化の指標とした Spp1 および Fn の発現も著明に改善していた。一方、移植後 14 日目からの抗体投与では、骨髄細胞数の回復ならびに線維化マーカーの低下を認めなかった(図示せず)。これらの結果から、CD4⁺T 細胞が慢性 GVHD に伴う骨髄障害の主なエフェクター細胞であることが示唆された。また、早期の抗 CD4 抗体投与が慢性 GVHD による造血障害・骨髄線維化の予防に有用であることが示唆された。

本研究を通じて、慢性 GVHD に伴う造血・免疫不全の細胞・分子機序が明らかになった。これらの研究成果は、今後 allo-HSCT の生命予後や QOL を改善する新たな予防・治療法の開発に資するものと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

以下全て査読有り

1. Shiraishi, K., S. Shichino, T. Tsukui, S. Hashimoto, S. Ueha, and K. Matsushima. 2019a. Engraftment and proliferation potential of embryonic lung tissue cells in irradiated mice with emphysema. *Sci. Rep.* 9:3657. doi:10.1038/s41598-019-40237-x.
2. Chen, C.-Y., S. Ueha, Y. Ishiwata, S. Yokochi, D. Yang, J.J. Oppenheim, H. Ogiwara, S. Shichino, S. Deshimaru, F.H.W. Shand, S. Shibayama, and K. Matsushima. 2019. Combined treatment with HMG1 and anti-CD4 depleting antibody reverses T cell exhaustion and exerts robust anti-tumor effects in mice. *J. Immunother. cancer.* 7:21. doi:10.1186/s40425-019-0503-6.
3. Shiraishi, K., S. Shichino, S. Ueha, T. Nakajima, S. Hashimoto, S. Yamazaki, and K. Matsushima. 2019b. Mesenchymal-Epithelial Interactome Analysis Reveals Essential Factors Required for Fibroblast-Free Alveolosphere Formation. *iScience.* 11:318-333. doi:10.1016/j.isci.2018.12.022.
4. Aoki, H., S. Ueha, S. Shichino, H. Ogiwara, S.-I. Hashimoto, K. Kakimi, S. Ito, and K. Matsushima. 2018. TCR Repertoire Analysis Reveals Mobilization of Novel CD8(+) T Cell Clones Into the Cancer-Immunity Cycle Following Anti-CD4 Antibody Administration. *Front. Immunol.* 9:3185. doi:10.3389/fimmu.2018.03185.
5. Shichino, S., S. Ueha, S. Hashimoto, M. Otsuji, J. Abe, T. Tsukui, S. Deshimaru, T. Nakajima, M. Kosugi-Kanaya, F.H. Shand, Y. Inagaki, H. Shimano, and K. Matsushima. 2019. Transcriptome network analysis identifies protective role of the LXR/SREBP-1c axis in murine pulmonary fibrosis. *JCI insight.* 4. doi:10.1172/jci.insight.122163.
6. Ueha, R., K. Kondo, S. Ueha, and T. Yamasoba. 2018a. Dose-Dependent Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 in the Aged Olfactory Epithelium. *Front. Aging Neurosci.* 10:385. doi:10.3389/fnagi.2018.00385.
7. Souma, K., S. Shichino, S. Hashimoto, S. Ueha, T. Tsukui, T. Nakajima, H.I. Suzuki, F.H.W. Shand, Y. Inagaki, T. Nagase, and K. Matsushima. 2018. Lung fibroblasts express a miR-19a-19b-20a sub-cluster to suppress TGF-beta-associated fibroblast activation in murine pulmonary fibrosis. *Sci. Rep.* 8:16642. doi:10.1038/s41598-018-34839-0.
8. Ueha, R., S. Ueha, K. Kondo, S. Kikuta, and T. Yamasoba. 2018c. Cigarette Smoke-Induced Cell Death Causes Persistent Olfactory Dysfunction in Aged Mice. *Front. Aging Neurosci.* 10:183. doi:10.3389/fnagi.2018.00183.
9. Ueha, R., S. Shichino, S. Ueha, K. Kondo, S. Kikuta, H. Nishijima, K. Matsushima, and T. Yamasoba. 2018b. Reduction of Proliferating Olfactory Cells and Low Expression of Extracellular Matrix Genes Are Hallmarks of the Aged Olfactory Mucosa. *Front. Aging Neurosci.* 10:86. doi:10.3389/fnagi.2018.00086.
10. Ueta, H., Y. Kitazawa, Y. Sawanobori, T. Ueno, S. Ueha, K. Matsushima, and K. Matsuno. 2018. Single blood transfusion induces the production of donor-specific alloantibodies and regulatory T cells mainly in the spleen. *Int. Immunol.* 30:53-67. doi:10.1093/intimm/dxx078.
11. Hosoi, A., K. Takeda, K. Nagaoka, T. Iino, H. Matsushita, S. Ueha, S. Aoki, K.

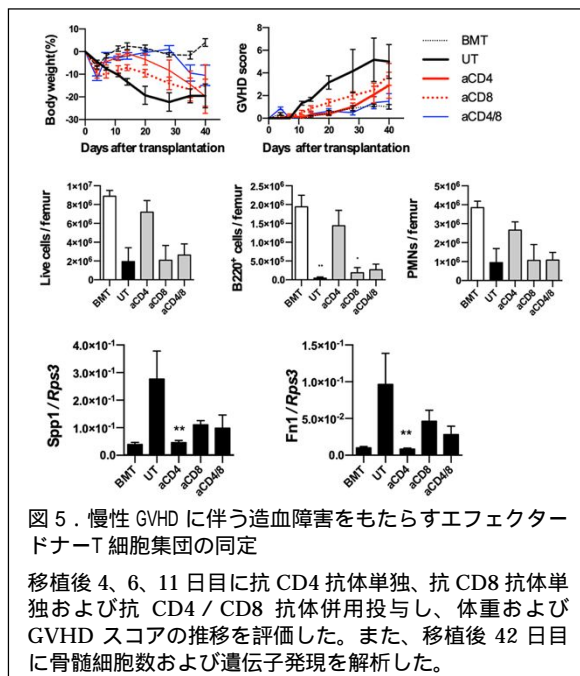


図5. 慢性 GVHD に伴う造血障害をもたらすエフェクタードナーT細胞集団の同定

移植後 4、6、11 日目に抗 CD4 抗体単独、抗 CD8 抗体単独および抗 CD4 / CD8 抗体併用投与し、体重および GVHD スコアの推移を評価した。また、移植後 42 日目に骨髄細胞数および遺伝子発現を解析した。

- Matsushima, M. Kubo, T. Morikawa, K. Kitaura, R. Suzuki, and K. Kakimi. 2018. Increased diversity with reduced “diversity evenness” of tumor infiltrating T-cells for the successful cancer immunotherapy. *Sci. Rep.* 8:1058. doi:10.1038/s41598-018-19548-y.
12. Lee, J.-W., A. Hoshino, K. Inoue, T. Saitou, S. Uehara, Y. Kobayashi, S. Ueha, K. Matsushima, A. Yamaguchi, Y. Imai, and T. Imura. 2017. The HIV co-receptor CCR5 regulates osteoclast function. *Nat. Commun.* 8:2226. doi:10.1038/s41467-017-02368-5.
 13. Kosugi-Kanaya, M., S. Ueha, J. Abe, S. Shichino, F.H.W. Shand, T. Morikawa, M. Kurachi, Y. Shono, N. Sudo, A. Yamashita, F. Suenaga, A. Yokoyama, W. Yong, M. Imamura, T. Teshima, and K. Matsushima. 2017. Long-Lasting Graft-Derived Donor T Cells Contribute to the Pathogenesis of Chronic Graft-versus-Host Disease in Mice. *Front. Immunol.* 8:1842. doi:10.3389/fimmu.2017.01842.
 14. Ueha, S., S. Yokochi, Y. Ishiwata, M. Kosugi-Kanaya, Y. Shono, S. Shibayama, S. Ito, and K. Matsushima. 2017b. Combination of anti-CD4 antibody treatment and donor lymphocyte infusion ameliorates graft-versus-host disease while preserving graft-versus-tumor effects in murine allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Sci.* 108:1967–1973. doi:10.1111/cas.13346.
 15. Kurachi, M., J. Kurachi, Z. Chen, J. Johnson, O. Khan, B. Bengsch, E. Stelekati, J. Attanasio, L.M. McLane, M. Tomura, S. Ueha, and E.J. Wherry. 2017. Optimized retroviral transduction of mouse T cells for *in vivo* assessment of gene function. *Nat. Protoc.* 12:1980–1998. doi:10.1038/nprot.2017.083.
 16. Ueha, R., S. Ueha, K. Kondo, T. Nito, Y. Fujimaki, H. Nishijima, K. Tsunoda, F.H.W. Shand, K. Matsushima, and T. Yamasoba. 2017a. Laryngeal mucus hypersecretion is exacerbated after smoking cessation and ameliorated by glucocorticoid administration. *Toxicol. Lett.* 265:140–146. doi:10.1016/j.toxlet.2016.11.023.
 17. Ueha, R., S. Ueha, T. Sakamoto, K. Kanaya, K. Suzukawa, H. Nishijima, S. Kikuta, K. Kondo, K. Matsushima, and T. Yamasoba. 2016. Cigarette Smoke Delays Regeneration of the Olfactory Epithelium in Mice. *Neurotox. Res.* 30:213–224. doi:10.1007/s12640-016-9617-5.

〔学会発表〕(計 23 件)

1. 七野成之、移植片由来 T 細胞の慢性 GVHD 病態形成における意義についての検討、第 4 回骨免疫学会、2018 年
2. Satoshi Ueha、TCR sequencing reveals the generation and expansion of tumor-specific CD8+T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice、第 45 回内藤カンファレンス、2018 年
3. Chang-Yu Chen、Co-administration of the low-dose HMGN1 with anti-CD4 depleting antibody exerts robust anti-tumor effects in mice、第 45 回内藤カンファレンス、2018 年
4. 上羽 悟史、がん免疫療法の新たなムーブメント：抗 CD4 抗体、第 39 回日本炎症・再生医学会（招待講演）2018 年
5. Satoshi Ueha、An anti-CD4 depleting antibody reverses regulatory T cell-induced suppression of dendritic cells while preventing non-specific CD4+ T cell responses in tumor-bearing mice、36th Sapporo International Cancer Symposium（国際学会）2017 年
6. Satoshi Ueha、An anti-CD4 depleting antibody reverses regulatory T cell-induced suppression of dendritic cells while preventing non-specific CD4+ T cell responses in tumor-bearing mice、AACR Annual Meeting 2017（国際学会）2017 年
7. Satoshi Ueha、Identification of a functional and transcriptional signature for tumor-infiltrating dendritic cells in mouse、5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society（国際学会）2017 年
8. Satoshi Ueha、TCR sequencing reveals the generation and expansion of tumor-specific CD8+T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice、The 46th Japanese Society for Immunology、2017 年
9. Satoshi Ueha、TCR sequencing reveals the generation and expansion of tumor-specific CD8+T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice、Kyestone Symposia（国際学会）2018 年
10. Satoshi Ueha、TCR sequencing reveals the generation and expansion of tumor-specific CD8+ T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice、第 21 回日本がん免疫学会総会、2017 年
11. Satoshi Ueha、TCR sequencing reveals the generation and expansion of tumor-specific CD8+ T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年

12. 上羽 悟史、抗 CD4 抗体と DLI を併用した同種造血幹細胞移植による低免疫原性固形がん治療の可能性、第 26 回 日本癌病態治療研究会、2017 年
13. 青木 寛泰、担がんマウスにおける CD8+ T 細胞レパトアの臓器別解析、第 3 回日本骨免疫学会、2017 年
14. 上羽 悟史、肺線維症における細胞動態、第 40 回日本リンパ学会総会（招待講演）、2016 年
15. Satoshi Ueha, An anti-CD4 depleting antibody induces transient CD80/CD86 up-regulation on dendritic cells in tumor-bearing mice、第 24 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム(MMCB2016)、2016 年
16. 上羽 悟史、抗 CD4 抗体療法の作用機序と特異性、第 25 回日本癌病態治療研究会、2016 年
17. 上羽 悟史、慢性 GVHD における骨髓線維化と汎血球減少、第 2 回日本骨免疫学会、2016 年
18. 上羽 悟史、抗 CD4 抗体と抗 PD-1/PD-L1 抗体の併用によるがん免疫療法、第 56 回日本リンパ網内系学会総会（招待講演）、2016 年
19. 上羽 悟史、腫瘍会合性マクロファージ・樹状細胞：担がん宿主内動態と治療への応用、第 44 回日本臨床免疫学会総会（招待講演）、2016 年
20. Satoshi Ueha, Macrophage regulation of inflammation and tissue remodeling in pulmonary fibrosis、第 89 回生化学会大会（招待講演）、2016 年
21. Satoshi Ueha, An anti-CD4 depleting antibody reverses regulatory T cell-induced suppression of dendritic cells while preventing nonspecific CD4+ T cell responses in tumor-bearing mice、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年
22. UEHA Satoshi, An anti-CD4 depleting antibody induces transient CD80/CD86 up-regulation on dendritic cells in tumor-bearing mice、第 45 回日本免疫学会学術集会、2016 年
23. 上羽 悟史、抗 CD4 抗体と抗 PD-1/PD-L1 抗体の併用によるがん免疫療法、第 14 回日本免疫治療学研究会学術集会（招待講演）、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

東京理科大学 生命医科学研究所 炎症・免疫難病制御部門ホームページ

<https://k-matsushimalab.org/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：七野成之、松島綱治、

ローマ字氏名：Shichino Shigeyuki, Matsushima Kouji