

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591063

研究課題名（和文）メモリー細胞を標的とした移植片対宿主病の新規治療法の開発

研究課題名（英文）The new development of treatment for graft-versus-host disease through memory T cells

## 研究代表者

加藤 光次（KATO KOJI）

九州大学・大学病院・血液腫瘍内科・助教

研究者番号：20571764

## 研究成果の概要（和文）：

多くの遺伝子を制御するヒストンメチル化に関わる遺伝子 EZH2 が GVHD の治療標的となりうるかどうか、マウス GVHD モデルを用い検証した。EZH2 を抑制する薬剤 DZNep を投与、GVHD に対する予防および治療効果を認めた。一方、GVL 効果は維持されていた。DZNep 投与群の T 細胞の解析から、EZH2 がエフェクター関連遺伝子 (IFN $\gamma$ , Trail, Eomes など) にはあまり影響しない一方で、アポトーシス関連遺伝子 Bim の発現を上昇、T 細胞をアポトーシスに導き、GVL を保持しながら、GVHD を抑制することを示した (Kato K et al. BLOOD 2012)。本研究は、遺伝子制御による GVHD の新規治療開発の発端となりうることで期待される。

## 研究成果の概要（英文）：

Histone methylation is thought to be important for regulating antigen-driven T cell responses. However, little is known about the impact of modulating histone methylation on inflammatory T cell responses. We demonstrate that in vivo administration of the histone methylation inhibitor 3-deazaneplanocin A (DZNep) arrests ongoing graft-versus-host disease (GVHD) in mice after allogeneic bone marrow transplantation (BMT). DZNep caused selective apoptosis in alloantigen-activated T cells mediating host tissue injury. This effect was associated with DZNep's ability to selectively reduce trimethylation of histone H3 lysine 27 (H3K27me3), deplete the histone methyltransferase Ezh2 specific to H3K27me3 and activate pro-apoptotic gene Bim repressed by Ezh2 in antigenic-activated T cells. In contrast, DZNep did not impact the survival of alloantigen-unresponsive T cells in vivo and naive T cells stimulated by IL-2 or IL-7 in vitro. Importantly, inhibition of histone methylation by DZNep treatment in vivo preserved the anti-leukemia activity of donor T cells and did not impair the recovery of hematopoiesis and lymphocytes, leading to significantly improved survival of recipients after allogeneic BMT. Our findings indicate that modulation of histone methylation may have significant implications in the development of novel approaches to treat ongoing GVHD and other T cell-mediated inflammatory disorders in a broad context.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞移植学

## 1. 研究開始当初の背景

1970年代に臨床応用として本格的に始まった同種造血幹細胞移植 (Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Allo-HSCT) のあゆみは、移植片対宿主病 (Graft-Versus-Host-Disease, GVHD) との闘いの歴史と言っても過言ではない。1980年以降のサイクロスポリンや FK506 の導入は GVHD 予防に一定の効果をもたらし、allo-HSCT の治療成績を向上させた。その結果、多くの患者が allo-HSCT によって長期生存できるようになった。しかし、未だ 30% の患者で重症 GVHD を併発し、ステロイドを中心とした現行の治療のみではその反応性が乏しいことに加え、薬剤そのものによる副作用を併発し、しばしば治療に難渋している。すなわち、難治性 GVHD 克服のためには、従来の単純な T 細胞機能抑制に留まらず、表面抗原や転写因子、シグナル伝達レベルでのメカニズムの理解が必要で、GVHD の原因となっている因子を標的とするような、副作用が少なく、効果的な治療法の開発が望まれる。

アロ反応性エフェクター CD8 陽性 T 細胞は、GVHD において、標的臓器への組織障害の原因となり、その長期の生存持続は治療抵抗性の原因となる。一般に、これらのアロ反応性エフェクター CD8 陽性 T 細胞は最終分化段階であり、apoptotic induced cell death (AICD) で多くの細胞が速やかに消失するはずである。しかし、allo-HSCT において、一部の細胞がメモリー T 細胞として生存することで、GVHD が持続する (Nature Med 2005)。このメカニズムについては、未だ詳しく解明されていない。

我々は、クロマチンリモデリング因子であるポリコーム遺伝子に注目し、これらが GVHD におけるメモリー CD8 陽性 T 細胞の維持および GVHD の進展に関わると仮説をたてた。ポリコーム遺伝子は幹細胞システムに共通な制御分子として機能することが明らかにされ、最近では癌幹細胞におけるエピジェネティクス異常などにも深くかかわることが注目されつつある。アロ反応性エフェクター CD8 陽性 T 細胞においても、AICD から逃れ、メモリー細胞として生存させる仕組みとして、特に、我々はポリコーム遺伝子である EZH2 に注目した。

## 2. 研究の目的

多くの幹細胞システムに共通な制御分子として機能するポリコーム遺伝子により、

GVHD におけるメモリー T 細胞の形成維持がどのように制御されているかについて研究を進める。特に EZH2 に焦点を絞り、GVHD において、「EZH2 によるメモリー T 細胞の形成のメカニズム」や「EZH2 の標的転写因子群」を明らかにする。これらの研究を通して、エピジェネティックな制御によりメモリー T 細胞をコントロールする、GVHD の新規治療法の開発を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) DZNep の治療可能性について

EZH2 を抑制する 3-Deazanepanocin A (DZNep) を投与、GVHD に対する予防および治療効果を検討する。DZNep 投与により GVHD が抑制されたマウスでは、エフェクター T 細胞 ( $T_E$ ) の有意な減少と、セントラルメモリー T 細胞 ( $T_{CM}$ ) および以前我々のグループが同定したより未分化なメモリー細胞である memory stem cell ( $T_{MSC}$ ) の維持が選択的に認められた。 $T_E$  と比較し、 $T_{CM}$  や  $T_{MSC}$  細胞群の存在は GVHD を起こす可能性があるものの、その程度は弱い (Nature Med 2005)。一方で、腫瘍免疫モデルにおける養子免疫療法において、 $T_E$  と比較し、 $T_{CM}$  や  $T_{MSC}$  による持続的な高い抗腫瘍効果が報告されている (PNAS 2006, Nature Med 2009)。したがって、DZNep の投与においても、移植片対白血病効果 (GVL) を減弱することなく、GVHD が抑制されることが期待される。DZNep による臨床で非常に重要な課題である「GVHD と GVL の分離」の可能性について、B6>BALB/c+ A20 腫瘍細胞の系で、in vivo imagingなどで評価する。

### (2) ドキシサイクリンによる制御可能な EZH2 ノックダウンシステムの構築

前述の DZNep は EZH2 を含む複合体 PRC2 (Polycomb repressive complex 2) を抑制する。EZH2 特異的な、より詳細な解析を行うため、EZH2 特異的なノックダウンシステムを構築した。このシステムはドキシサイクリンを使用することにより、EZH2 の発現を制御し、移植の特定の時期における EZH2 の機能解析が可能となる。レンチウイルスを用い、T 細胞に遺伝子を導入することで EZH2 の発現の程度による GVHD の評価が可能であり、メモリー T 細胞を標的とするエピジェネティックな治療介入の、適切な時期の評価が可能となる。

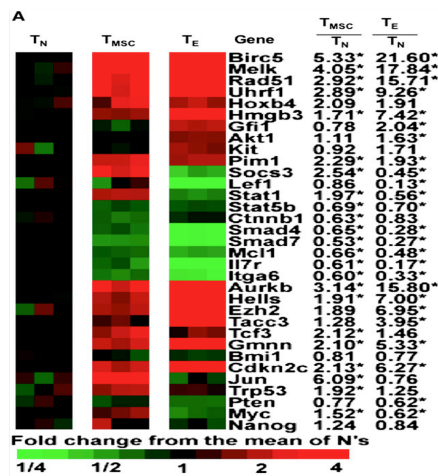
### (3) メモリー T 細胞形成に関わる EZH2 の標的遺伝子の同定

エフェクター T 細胞の遺伝子プロファイリングで、多くの転写遺伝子群の発現低下を認

めた。これらの遺伝子群を EZH2 はメチル化し、抑制すると考えられる。クロマチン免疫沈降法を用い、可能性のある EZH2 の標的遺伝子を探査する。下流の遺伝子の探索は、より効果が高く、副作用の少ない標的治療の開発に結びつく。さらに、上記のノックダウンシステムを用いることで、EZH2 発現の有無により活性化される転写因子を同定、網羅的なメチル化パターンの検討も行う。これらにより、メモリーT細胞の形成における EZH2 の役割について、詳細な分子メカニズムが明らかになることが期待される。

#### 4. 研究成果

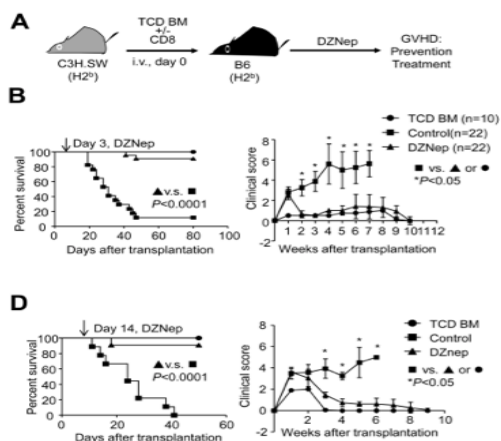
(1) EZH2 は、GVHD の進展に関与する。



マウス GVHD モデルを用いた CD8 陽性 T 細胞の遺伝子プロファイリングにおいて、EZH2 の発現が亢進し、一方で、多くの転写遺伝子群の発現低下を認めた。EZH2 はこれらの遺伝子群をメチル化し、発現を抑制していると考えられた。これらが、GVHD におけるメモリー CD8 陽性 T 細胞の維持および GVHD の進展に関わると考えられた。(Kato K. et al. BBMT 2010)。

(2) EZH2 が GVHD の治療標的となりうる。

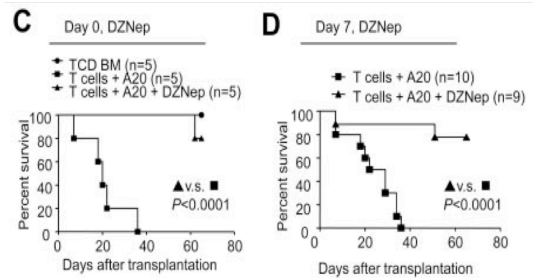
マウス GVHD モデルを用い、EZH2 が GVHD の治療標的となりうるかどうか検証した。



EZH を抑制する 3-Deazaneplanocin A (DZNep) を投与、GVHD に対する予防および治療効果を認めた。

(3) DZNep は、GVL を保持し、GVHD を抑制する。

一方、GVL 効果は維持されていた。DZNep 投与群の T 細胞の解析から、EZH2 がエフェクター関連遺伝子 (IFN $\gamma$ , Trail, Eomes, Tbx21 など) にはあまり影響しない一方で、アポトーシス関連遺伝子 Bim の発現を上昇、T 細胞をアポトーシスに導き、GVL を保持しながら、GVHD を抑制することを示した (Kato K. et al. BLOOD 2012)。



#### 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 12 件)

① Kato K, Miyamoto T, Numata A, Nakaike T, Oka H, Yurino A, Kuriyama T, Mori Y, Yamasaki S, Muta T, Takenaka K, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K. Diffuse panbronchiolitis after humanized anti-CCR4 monoclonal antibody therapy for relapsed adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Hematol.* 2013; 97: 430-2. (査読有) DOI: 10.1007/s12185-013-1278-z

② He S\*, Wang J\*, Kato K\*, Xie F, Varambally S, Mineishi S, Kuick R, Mochizuki K, Liu Y, Nieves E, Mani RS, Chinnaiyan AM, Marquez VE, Zhang Y. Inhibition of histone methylation arrests ongoing graft-versus-host disease in mice by selectively inducing apoptosis of alloreactive effector T cells. *Blood.* 2012; 119: 1274-82. (\*Equal contribution to this work) (査読有) DOI: 10.1182/blood-2011-06-364422

③ Ishida T, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Taniguchi S, Eto T, Takatsuka Y, Miyazaki Y, Moriuchi Y, Hidaka M, Akashi K, Uike N, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Nishiyama T, Utsunomiya A. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma with special emphasis on preconditioning regimen: a nationwide retrospective study. *Blood.* 2012; 120:

1734-41. (査読有)

DOI: 10.1182/blood-2012-03-414490

④ Mori Y, Teshima T, Kamezaki K, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Nagafuji K, Eto T, Akashi K. Validation of pretransplantation assessment of mortality risk score in the outcome of hematopoietic SCT in non-Caucasians. *Bone Marrow Transplant.* 2012; 47: 1075-81. (査読有)

DOI: 10.1038/bmt.2011.229.

⑤ Takenaka K, Nagafuji K, Takase K, Kamimura T, Mori Y, Ito Y, Nishi Y, Henzan H, Kato K, Harada N, Eto T, Miyamoto T, Teshima T, Akashi K. Initial low-dose valganciclovir as a preemptive therapy is effective for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Int J Hematol.* 2012; 96: 94-100. (査読有)

DOI: 10.1007/s12185-012-1087-9.

⑥ Mori Y, Miyamoto T, Kato K, Kamezaki K, Kuriyama T, Oku S, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Shiratsuchi M, Abe Y, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K. Different risk factors related to adenovirus- or BK virus-associated hemorrhagic cystitis following allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18: 458-65. (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbmt.2011.07.025

⑦ Mori Y, Miyamoto T, Kamezaki K, Kato K, Kikushige Y, Takashima S, Urata S, Shimoda S, Shimono N, Takenaka K, Iwasaki H, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K. Low incidence of adenovirus hemorrhagic cystitis following autologous hematopoietic stem cell transplantation in the rituximab era. *Am J Hematol.* 2012; 87: 828-30. (査読有)

DOI: 10.1002/ajh.23247

⑧ Zhang Y, Sandy AR, Wang J, Radojicic V, Shan GT, Tran IT, Friedman A, Kato K, He S, Cui S, Hexner E, Frank DM, Emerson SG, Pear WS, Maillard I. Notch signaling is a critical regulator of allogeneic CD4+ T cell responses mediating graft-versus-host disease. *Blood.* 2011; 117: 299-308. (査読有)

DOI: 10.1182/blood-2010-03-271940

⑨ He S\*, Kato K\*, Jiang J, Wahl DR, Mineish S, Fisher EM, Murasko DM, Glick GD, Zhang Y. Characterization of the metabolic phenotype of rapamycin-treated CD8+ T cells with augmented ability to generate long-lasting memory cells. *PLoS ONE.* 2011; 6(5): e20107. (\*Equal contribution to this

work) (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0020107

⑩ Kato K, Cui S, Kuick R, Mineishi S, Hexner E, Ferrara JL, Emerson SG, Zhang Y. Identification of stem cell transcriptional programs normally expressed in embryonic and neural stem cells in alloreactive CD8(+) T cells mediating graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16: 751-71. (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.01.012

⑪ Numata A, Miyamoto T, Ohno Y, Kamimura T, Kamezaki K, Tanimoto T, Takase K, Henzan H, Kato K, Takenaka K, Fukuda T, Harada N, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K, Harada M and Eto T for the Fukuoka Blood and Marrow Transplantation Group. Long-term outcomes of autologous PBSCT for peripheral T-cell lymphoma: retrospective analysis of the experience of the Fukuoka BMT group. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45: 311-6. (査読有)

DOI: 10.1038/bmt.2009.165

⑫ Mori Y, Miyamoto T, Nagafuji K, Kamezaki K, Yamamoto A, Saito N, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Abe Y, Teshima T, Akashi K. High incidence of HHV6-associated encephalitis/myelitis following a second unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16: 1596-1602. (査読有)

DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.05.009

[学会発表] (計 12 件)

① Kato K. BK virus (BKV) subtype 3 is associated with hemorrhagic cystitis (HC) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Analysis of data from FBMTG. 2013 BMT Tandem Meetings. (2013. 2. 14. アメリカ)

② 加藤光次. BKV subtype is associated with haemorrhagic cystitis after allo-HSCT: Analysis of data from FBMTG. 第 74 回日本血液学会. (2012. 10. 20.)

③ 加藤光次. Cord blood transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma. 第 74 回日本血液学会. (2012. 10. 19.)

④ 加藤光次. Diagnosis and treatment of GVHD: a new era. Stem Cell Research Symposium (2012. 5. 22.)

⑤ 加藤光次. メモリーT細胞からみた GVHD 発症のメカニズム. 東北信血液疾患フォーラム (2012. 1. 14.)

⑥ 加藤光次. メモリーT細胞からみた GVHD 発症のメカニズム. CBT meeting. (2011. 11. 10.)

⑦ Kato K. BK virus hemorrhagic cystitis

in allo-HSCT: Is seasonal distribution caused by nosocomial infection? 第 73 回日本血液学会(2011.10.15.)

⑧ Kato K. Long term follow-up of allo-HSCT for ATLL in Fukouka BMT group: Is allo-HSCT a curative therapy? 第 73 回日本血液学会.(2011.10.14.)

⑨ 加藤光次. 同種造血幹細胞移植後再発に対する再移植の成績:福岡 BMT グループ (FBMTG) における検討-ドナーソースに中心に-. 第 33 回日本造血細胞移植学会総会.(2011.3.9.)

⑩ 加藤光次. GVHD/GVL の基礎と臨床 -ドナー T 細胞の視点から-. 造血幹細胞移植講演会.(2010.11.8.)

⑪ 加藤光次. ラパマイシンによる酸化的リン酸化を介したメモリー T 細胞の生成. 第 72 回日本血液学会学術集会.(2010.9.24.)

⑫ 加藤光次. 同種造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症に対する遺伝子組換えトロンボモジュリン製剤による治療の可能性. 第 72 回日本血液学会学術集会.(2010.9.24.)

[図書] (計 4 件)

① 加藤光次, 宮本敏浩. 「B 細胞性悪性リンパ腫治療のパラダイムシフト: Rituximab 時代における造血幹細胞移植の位置付け」血液フロンティア. 医薬ジャーナル社 2011; 21(10): 97-105.

② 加藤光次 「チーム医療で行う造血幹細胞移植プラクティカルガイド: 成人 T 細胞性白血病」 南江堂 2011; p126-31.

③ 加藤光次 「症例とエビデンスに学ぶ造血細胞移植と感染症: 真菌感染症 接合菌症の診断と治療」 医薬ジャーナル社 2011; p280-2.

④ 加藤光次 「がん免疫療法 -実用化へのチャレンジ-: 免疫療法におけるメモリー T 細胞」 シーエムシー出版 2010; 1: 94-103.

[その他]

ホームページ等

<http://www.1nai.med.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

研究代表者

加藤 光次 (KATO KOJI)

九州大学・大学病院・血液腫瘍内科・助教

研究者番号: 20571764