

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 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790918

研究課題名（和文）：間葉系幹細胞の免疫抑制能に関する研究

研究課題名（英文）：The study of the mechanisms of immunomodulatory function of mesenchymal stem cells.

研究代表者：

多々良 礼音（TATARA RAINE）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：90570268

研究成果の概要（和文）：難治性急性 GVHD の治療法として、MSC 投与が試みられているが、その作用機序には不明な点が多い。一方、Th17 や Treg などが、急性 GVHD の病態生理に深く関わっていると推測されている。我々は、MSC がもつ免疫抑制機序の解明のため、MSC の Th17、Treg 分化に及ぼす影響を解析した。その結果、MSC は Treg 分化を維持し、Th17 分化を抑制することが確認された。さらに、プロスタグランジン阻害薬や、トリプトファン分解酵素阻害薬を添加すると、MSC による Th17 分化誘導抑制が解除された。MSC の産生する PGE2 やトリプトファン分解酵素が、Th17 分化抑制に重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Mesenchymal stem cells (MSCs) possess an immunomodulatory function and show promise as a cell therapy for graft-versus-host disease (GVHD). But the molecular mechanism(s) underlying immunomodulation by MSCs has not been fully established. Th17 is a recently recognized differentiation category, in which CD4 cells produce IL-17, and regulatory T cells (Treg) are another newly recognized differentiation category, in which CD4 T cells have high levels of Foxp3 expression and suppress T cell proliferation. These two differentiations are thought in a reciprocal relationship. While the role of Th17 in GVHD is still controversial, some investigators reported that Th17 has aggravating effects on GVHD. Treg has been reported to suppress GVHD in a mouse model. To elucidate the molecular mechanism(s) of the immunomodulatory function of MSCs, we herein sought to identify the effects of MSCs on these relatively new T cell differentiations. MSCs inhibited Th17 differentiation even in conditions in which T cell growth was not completely inhibited. Interestingly, an inhibitor of prostaglandin production, indomethacin, and an inhibitor of IDO, 1-methyltryptophan (1-MT), partially restored Th17 differentiation. These results suggest that PGE2 and depletion of tryptophan mediate inhibitory effects of MSCs on Th17. On the other hand, Treg differentiation was not significantly enhanced by MSCs. The mechanisms by which IDO and PGE2 regulate these differentiations are unknown.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：間葉系幹細胞、同種骨髄移植、移植片対宿主病（GVHD）、Th17、制御性 T 細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は、難治性造血器疾患に対する標準的な治療選択肢の一つとして確立された治療法であるが、特に同種造血幹細胞移植においては、合併症で死亡する危険性が依然として高い。この合併症の一つとして移植片対宿主病 (GVHD) がある。治療には、免疫抑制剤であるステロイドホルモンが用いられるが、ステロイド抵抗性の症例も多く、このような難治症例に対する標準的な治療法は確立していない。最近注目されているのが、従来の免疫抑制剤を用いた治療とは一線を画した細胞療法、間葉系幹細胞 (MSC) 投与である。

2008 年には、EBMT によるステロイド抵抗性急性 GVHD 55 症例に対して行われた Phase II study の結果が報告された。奏効率は実に 70% と、非常に良好な成績を報告している。

上記のように、MSC は臨床試験において重症急性 GVHD に対する治療薬として、良好な治療成績が報告されているが、その作用機序はいまだ確立していない。

申請者の研究室ではマウス MSC を用いて、MSC の T 細胞増殖抑制因子として NO (一酸化窒素) が重要な働きをしていることを報告した (Sato K et al. Blood 109:228-234,2007)。さらに、IFN- γ と TNF- α など、少なくとも 2 つの因子が、NO 産生に不可欠である事などを示した (Oh I et al. BBRC 355:956-962,2007)。同時に、Th1、Th2 分化誘導条件下での MSC の免疫抑制能に関する検討から、MSC は Th1 分化誘導条件下では著明な分化誘導抑制を示す一方、Th2 分化誘導条件下では、分化抑制能が軽微である事を報告した。

2. 研究の目的

今回一連の仕事の延長として、Th17、Treg 分化に及ぼす MSC の影響について検討する。Th17 と Treg は、マウスの細胞を用いた in vitro の系の場合、IL-6 の有無によって相反する方向に分化する。さらに、Th17 は炎症誘導に、Treg は抗炎症に働き、機能的にも相反する関係にある。

ここで、MSC が Treg を誘導すると同時に Th17 を抑制するという仮説をたて検証する。さらに、このような MSC の機能が明らかになれば、その機能分子の同定と、その機能分子発現のメカニズムを解析する。

これらが明らかになれば、MSC の免疫抑制能のメカニズムについて新たな知見が得られることになる。これらの知見は、MSC の GVHD 治療における臨床応用を進める上で、貴重な基礎的知見となると考える。

3. 研究の方法

(1) WT B6 マウスの脾細胞よりナイーブ CD4 陽性 T 細胞および CD4 陽性 T 細胞を純化する。これを Th17 分化誘導条件、Treg 分化誘導条件下で、MSC との共培養群、非共培養群の 2 群に分けて培養する。T 細胞と培養上清を回収し、T 細胞は、CFSE で細胞増殖の程度を確認するとともに、Th17 のマーカーとして IL-17 を、Treg のマーカーとして Foxp3 を細胞内染色した上で、フローサイトメトリーで分化を確認する。Th17 分化に関しては、培養上清中の IL-17 についても ELISA で確認する。これにより、MSC の Th17 分化、及び induced Treg (iTreg) 分化に対する影響を評価する。

(2) 続いて MSC の Th17 分化、iTreg 分化に対する作用因子の同定を試みる。

はじめに、transwell を用いて MSC の Th17、Treg 分化に対する作用が、リンパ球 - MSC の直接的な接着によるものなのか、液性因子によるものなのか、あるいは接着因子、液性因子、両方の因子の相加的作用によるものかを検討する。

また、すでに回収してある各分化誘導条件下での培養上清中の、Th17、Treg 分化関連サイトカイン (IL-17、IL-21、IL-23、IL-1 β 、IL-10、TGF- β など) や Th17、Treg 分化を阻害する Th1、Th2 サイトカイン (IL-4、IFN- γ など) について ELISA で測定し、MSC のサイトカインに対する影響を検討する。

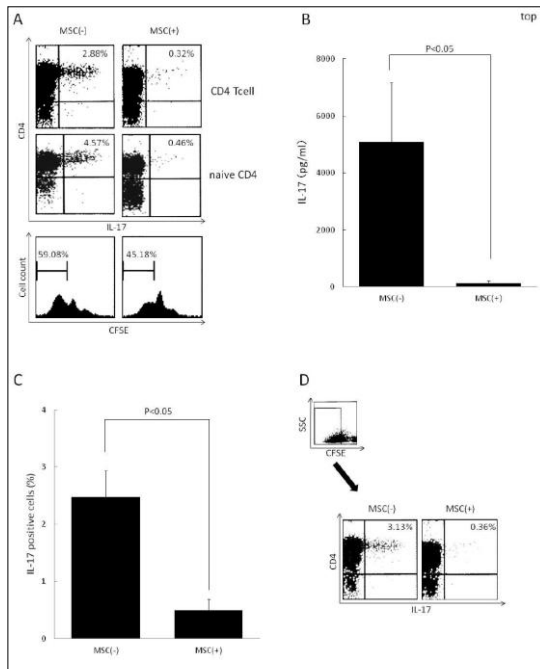
(3) ナーブ CD4 陽性 T 細胞および CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化誘導条件、iTreg 分化誘導条件下で MSC と共培養し、各免疫抑制作用発現候補分子の阻害薬や中和抗体を加え、MSC の作用が解除されるかを確認する。

同時に、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化誘導条件、iTreg 分化誘導条件下で MSC 非存在下で培養し、これに MSC の作用発現候補分子を直接添加することにより、MSC 共培養時と同様の変化を認めるかを確認して、作用発現因子の同定を試みる。

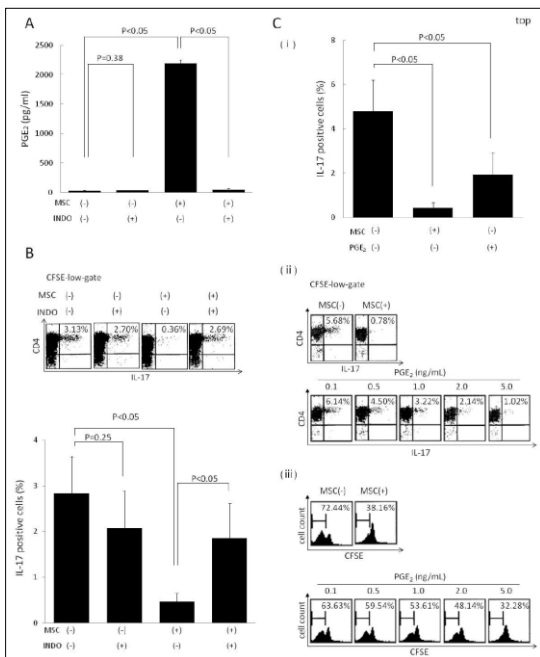
4. 研究成果

(1) Th17 分化誘導条件下でマウス CD4 陽性 T 細胞を培養すると、マウス MSC 共培養群で

は著明な Th17 分化抑制が確認された。

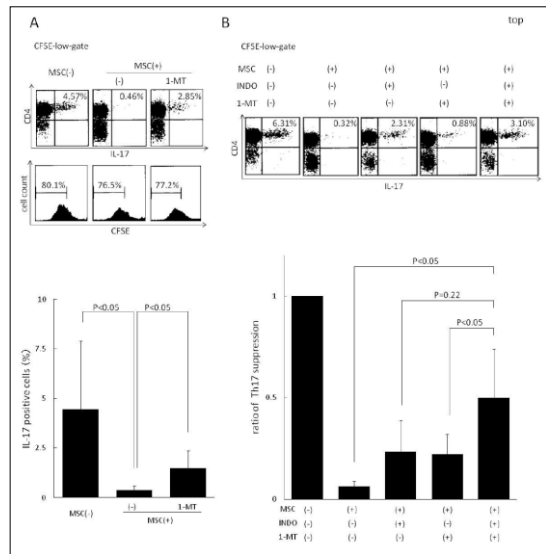


(2) 続いてそのメカニズムを解析したところ、インドメタシン (プロスタグランジン阻害薬) 添加にて、マウス MSC による Th17 分化誘導抑制が解除された。マウス MSC 存在下では PGE2 が多く産生されており、マウス MSC の産生する PGE2 が Th17 分化を抑制している事が示唆された。

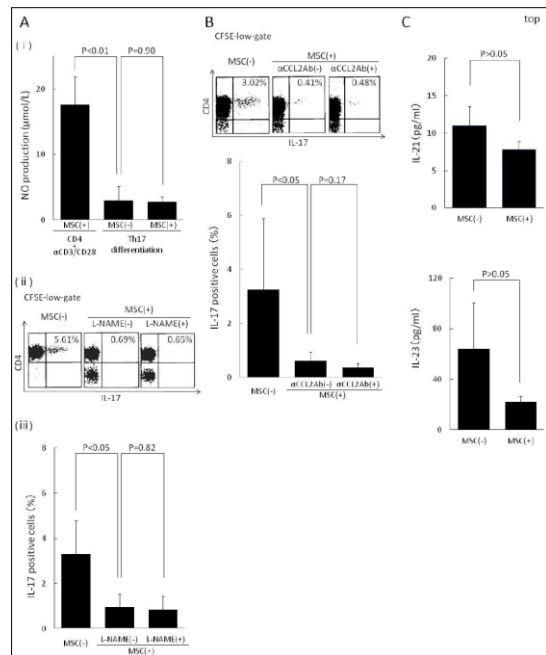


また、1-MT (トリプトファン分解酵素阻害薬) を添加した場合も、Th17 分化誘導抑制は解除され、MSC の産生する IDO (トリプトファン

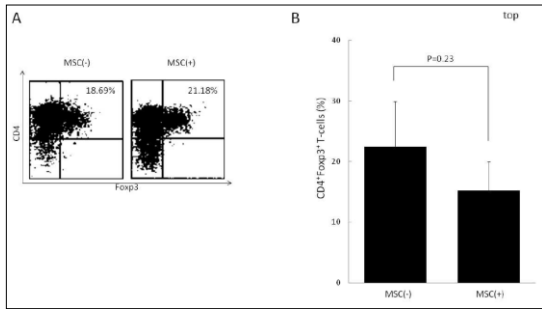
分解酵素) が Th17 分化を抑制されている事が示唆された。



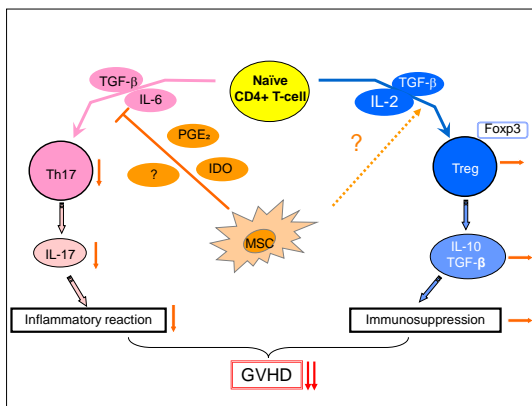
Th17 分化にかかわる IL-21 や IL-23 などのサイトカインや、マウス MSC の重要な免疫抑制因子である NO の関与は、ほとんど認められなかった。



また、申請者の実験系では、マウス MSC による Treg の分化誘導促進能は確認できなかった。



これらの結果により、急性 GVHD の発症や促進あるいは抑制に大きく関与すると考えられている、新しい T 細胞サブセットである Th17 と Treg に対するマウス MSC の作用の一端が明らかとなり、免疫抑制メカニズムについての新たな知見が得られた。



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 5 件)

- ① Tatara R, Ozaki K, Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A, Matsu H, Sato K, Ozawa K. Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation. *Cytotherapy*. 13:686-694, 2011
DOI: 10.3109/14653249.2010.542456
- ② Meguro A, Ozaki K, Hatanaka K, Oh I, Sudo K, Ohmori T, Matsu H, Tatara R, Sato K, Sakata Y, Nakae S, Leonard WJ, Ozawa K. Lack of IL-21 signal attenuates graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells. *Bone Marrow Transplant*. 46:1557-1565, 2011
DOI:10.1038/bmt.2010.342.
- ③ Tatara R, Nagai T, Kobayashi H, Hatano K, Suzuki T, Muroi K, Ozawa K. AA amyloidosis associated with

macroglobulinemia. *Int J Hematol*. 92:675-677, 2010

DOI:10.1007/s12185-010-0700-z

- ④ Oh I, Ozaki K, Meguro A, Hatanaka K, Kadowaki M, Matsu H, Tatara R, Sato K, Iwakura Y, Nakae S, Sudo K, Teshima T, Leonard WJ, Ozawa K. Altered effector CD4+ T cell function in IL-21R^{-/-} CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease. *J Immunol*. 185:1920-1926, 2010
DOI:10.4049/jimmunol.090221
- ⑤ Meguro A, Ozaki K, Oh I, Hatanaka K, Matsu H, Tatara R, Sato K, Leonard WJ, Ozawa K. IL-21 is critical for GVHD in a mouse model. *Bone Marrow Transplant*. 45: 723-729, 2010
DOI: 10.1038/bmt.2009.223

[学会発表] (計 2 件)

- ① 多々良 礼音、尾崎 勝俊、菊池 裕二、畑中 恵子、翁 家國、目黒 明子、松春子、佐藤 一也、永井 正、室井 一男、小澤 敬也、マウス間葉系幹細胞による Th17 分化の抑制：PGE2 と IDO を介したメカニズム、第 74 回日本血液学会学術集会
- ② 多々良 礼音、尾崎 勝俊、菊池 裕二、畑中 恵子、翁 家國、目黒 明子、松春子、佐藤 一也、永井 正、室井 一男、小澤 敬也、Mesenchymal Stem Cells Inhibit Th17 Differentiation through indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) and PGE2 Production. 第 16 回日本遺伝子治療学会年次学術集会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多々良 礼音 (TATARA RAINE)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：90570268

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：