

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592590

研究課題名(和文)ドナー由来間葉系幹細胞による眼慢性移植片対宿主病の発症機構と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Focus on mechanism of chronic ocular graft-versus-host disease caused by donor-derived mesenchymal stem cells toward development of new treatment.

研究代表者

小川 葉子(Ogawa, Yoko)

慶應義塾大学・医学部・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) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植後の合併症である眼移植片対宿主病(GVHD)は重症ドライアイをきたす治療困難な疾患である。本研究では、眼GVHDの線維化にドナー骨髄間葉系幹細胞(MSC)が主要な役割を担う可能性を見出した。ドナーMSC由来線維芽細胞が眼、小腸、肺などのGVHD各標的臓器に生着していることを確かめた。次にドナーMSC由来線維芽細胞がT細胞と相互作用して眼GVHDの発症機構と病態形成にかかわることを見出した。さらに、MSCによる眼GVHD免疫応答および線維化形成においてIL-6, IL-17などのサイトカイン、免疫応答を抑制する制御性T細胞が関与していることが確かめられた。

研究成果の概要(英文)：Chronic ocular graft-versus-host disease(GVHD), i.e. chronic GVHD related dry eye, is a major complication after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. We have found that donor-derived mesenchymal stem cells play a significant role for underlying mechanism of chronic ocular GVHD fibrosis. We have found donor MSCs engrafted GVHD target organs such as lacrimal gland, conjunctiva, salivary gland, lung, skin, liver and intestine. We also suggested that donor MSCs interacted with T cells in the pathogenic regions and contributed to the onset of cGVHD and chronicity of this disease. We further showed donor MSCs increased IL-6 leading to decreased Tregs and conversely an increase in Th 17 cells in peripheral blood. Our results show that donor MSCs trigger immune responses in T cells and immune mediated fibrosis of chronic ocular GVHD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：ドライアイ 線維化 免疫応答 造血幹細胞移植 T細胞 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

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、過剰な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, 2001, 2005, Am J Pathol, 2009; Robinson MR, Bone Marrow Transplant, 2004,)。最近、培養骨髄間葉系幹細胞(MSC)を用いた重症急性 GVHD に対する治療効果が報告されている (Le Blanc K, Lancet 2008)。しかし培養 MSC は経静脈的投与後、その大部分が肺毛細血管に捕捉され 48 時間以内に消滅することが知られている。(Rombouts WJ, Leukemia, 2003; Morikawa S, J Exp Med, 2009) 近年、マウス骨髄中に存在する MSC を、培養を経ず直接分離する手法が報告された (Morikawa S, J Exp Med, 2009)。新鮮 MSC は培養 MSC とは異なり、投与後、肺毛細血管には捕獲されずに全身組織に遊走・生着し間質系細胞へ分化能を示す。

申請者はヒト眼慢性 GVHD に酷似した病態を示すマウスモデルを用いて、培養を経ない新鮮ドナーMSC はむしろ眼慢性 GVHD 発症の原因となりうることを見出した。ドナーMSC の眼慢性 GVHD との関連性を解明することが、本研究の主たる目的である。

これ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 T 細胞の浸潤に加えて線維芽細胞と細胞外基質の著明な増加を明らかにした (Ogawa Y, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci; 2001, 2003)。涙腺 GVHD 患者の病的線維芽細胞の由来の解析で、半数近くがドナー由来であり、それらの線維芽細胞は同一病変部で免疫応答に関与し活性化していることを示した (Ogawa Y, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci; 2005, 2007)。さらに 2008 年から 2010 年の研究で、ドナー由来線維芽細胞の細胞源が MSC であることを確認した。そこで、GVHD 涙腺結膜に存在するドナーMSC 由来線維芽細胞が眼粘膜のみならず、GVHD の病態形成に関わり涙腺、角結膜の機能障害において重要な役割を果たすという仮説を着想するに至った。

これまでの研究成果を発展させる内容 ; 申請者は既にドナーMSC 移植 (MSC のみをドナー細胞として使用し、他の移植造血細胞はレシピエント由来の細胞を使用) によりヒト眼慢

性 GVHD に酷似したマウスモデルの作成に成功している。このマウスモデルを用いてドナーMSC による眼慢性 GVHD の発症機構と進展過程をドナーMSC の動態、線維化、免疫応答の面から検討する。

2. 研究の目的

眼移植片対宿主病 (GVHD) は眼粘膜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 の線維化にドナー骨髄間葉系幹細胞 (MSC) 由来の線維芽細胞が主要な役割を担う可能性を見出した。ドナーMSC の眼 GVHD の病態への関与についてマウス GVHD モデルを用い、次の 3 点を研究目的とする。

(1) GVHD におけるドナーMSC 由来線維芽細胞の局在の解明

(2) ドナーMSC 由来線維芽細胞による眼 GVHD の発症機構と病態形成にかかわる役割の解明

(3) MSC による眼 GVHD 免疫応答および線維化形成における分子機構の解明と新規治療法の開発

3. 研究の方法

平成 23 年度

(1) GVHD におけるドナーMSC 由来線維芽細胞の局在の解明

(2) ドナーMSC 由来線維芽細胞による眼 GVHD の発症機構と病態形成にかかわる役割の検討

全骨髄細胞移植 (ドナー B10.D2 マウスオス, レシピエント Balb/C メス) を標準の移植とした。(Zhang Y, et al. J Immunol, 2002)

次にドナーMSC のみを B10.D2 マウスオスから分離し、他の移植造血細胞をレシピエント由来 BALB/c メスから分離し、各細胞を同時に BALB/c レシピエントメスに移植し移植後の線維化形成過程、ドナー線維芽細胞の局在を涙腺、結膜を用いて調べ、浸潤数を全骨髄細胞移植およびコントロールと比較した。

GVHD 各臓器で増加している線維芽細胞がドナーMSC 由来かを明らかにするため、以下の方法を用いて区別した。マウス線維芽細胞のマーカーとして HSP47 を選択し、線維芽細胞を検出する。Fluorescein in situ hybridization (FISH) 法によりメス GVHD 組織における、オス由来 Y 染色体遺伝子の発現を検出し、HSP47 免疫染色との併用により、より確定的なドナーMSC 細胞由来線維芽細胞の検出を行った。代替の方法としてドナー細胞源採取のために手元で作成した GFPB10.D2 マウスの骨髄細胞を使用した。

平成 24 年度

(3) MSC による眼 GVHD 免疫応答および線維化形成における分子機構の解明

マウスモデルにおいて末梢血のIL-6、抑制性T細胞、Th-17T細胞数の推移を移植前よりprospicitve に検討した。各分子の間葉系幹細胞移植数との関連性を確認した。

線維化に関わるTGF- β 、IL-6、抑制性T細胞とおよびそれに関わるTh17T細胞についてドナーMSC移植後に各分子の経時的な変化と線維化及びドナーMSC由来線維芽細胞数との関連を検討した。ドナーMSCが眼GVHD発症機転に關与するかを検証した。

マウス各種MSC移植後のレシピエントのT細胞とB10.D2およびBALB/cマウスの新鮮MSCを共培養しBr d U ELISA (Roche社)を用いてT細胞の増殖能を、培養上清についてはELISA (BD bioscience)にてTGF-、IL-6、IL-17、IL-23について培養上清のサイトカインの変動を、また組織における局在の検討をコントロールと比較検討した。

診断のために得られたヒト涙腺、結膜組織切片についても同様の分子と各種T細胞の検証をした。

平成25年度

MSC 除去移植による線維化抑制の確認

MSC 除去移植について線維化抑制の機序と安全性を検証した。

MSC除去移植を施行後、涙腺および結膜ならびにGVHD各臓器での線維化抑制を確認した。

MSC除去移植後の、IL-6、IL-17、TGF- についてのサイトカインの変動と抑制性T細胞数の推移を全骨髄細胞移植と比較検討した。

臨床的には全骨髄細胞からヒト間葉系幹細胞(Mabuchi Y, Matsuzaki Y. *Inflam and Regene* 2008)除去移植の適応決定の準備を開始した。倫理委員会と登録臨床研究の準備を開始した申請者はKE10 BMT programとして同一チームで造血幹細胞移植患者の眼科領域診察、治療を担当し、内科との連携において臨床応用への準備を進める。

4 . 研究成果

(1)ドナーの移植各種骨髄幹細胞である造血幹細胞、MSC、血管内皮前駆細胞などの候補の中からMSCがドナー線維芽細胞の細胞源であり病態の中心的役割をはたしていることを示した。(論文 *Stem Cell Reports* に投稿中)

(2)ドナーGFPB10.D2 マウスの作成に成功し、GFPB6マウスとBALB/cマウスとのバッククロスにて10代目 GFPB10.D2 マウスが完成した。理論的に99.9999%の遺伝子がドナータイプB10.D2 に置換され、実験に使用可能となった。すでに30例のBALB/cマウスに移植し、ドナ

ーMSC やドナーHSC 由来の細胞の組織の局在が確認可能となった。

(3)線維芽細胞のマーカーHSP47とGFPの組み合わせによりGVHDマウスにドナー間葉系幹細胞を検出した。GVHDマウスにおいて炎症性細胞浸潤部位のTh 17 T細胞とMSCに加えて抑制性T細胞とMSCの相互作用の局在を確認した。

(4)下記英文論文が掲載され、慶應義塾大学でPress releaseされ新聞に報道された。(Kawai M, Ogawa Y, et al. *Scientific Reports* 2013.) 本研究ではGVHD涙腺に浸潤する炎症細胞に老化マクロファージが存在しT細胞へ抗原提示をしている事が示された。MSC除去により線維化の大部分が抑制されることからMSCがマクロファージと相互作用している可能性が示された。

(5)以上の研究成果によりさらに眼GVHDの病態解明と新規治療法の開発にむけて研究領域を涙腺は外分泌腺として、結膜は粘膜としての全身所見の一症状として全身の慢性GVHDの病態解明に加えて線維化および最近国内外で注目されている免疫老化(Immune aging)の病態解明と今後の新規治療にも繋がる可能性があり領域を広げて研究をすすめている。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(総計 20 件中 14 件)

1. Ogawa Y, Kim SK, Dana R, Clayton J, Jain S, Rosenblatt MI, Perez VL, Shikari H, Riemens A, Tsubota K. International chronic ocular graft-vs-host-disease (GVHD) consensus group: Proposed diagnostic criteria for chronic GVHD (Part I). *Sci Rep*. 2013 Dec;3:3419. doi: 10.1038/srep03419 査読有
2. Ogawa Y, Tsubota K. Review Article. Dry eye disease and inflammation. *Inflam Regen*. 2013 Nov; 33 (5): 238-48. https://www.jstage.jst.go.jp/article/inflamregen/33/5/33_238/_pdf 査読有
3. Kawai M, Ogawa Y, Shimmura S, Ohta S, Suzuki T, Kawamura N, Kuwana M, Kawakami Y, Tsubota K. Expression and localization of aging markers in lacrimal gland of chronic graft-versus-host disease. *Sci Rep* 2013 Aug; 3: 2455 doi: 10.1038/srep02455 査読有
4. Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Hatou S, Satofuka S,

- Nakamura S, Imada T, Miyashita H, Yoshida S, Yaguchi T, Ozawa Y, Mori T, Okamoto S, Kawakami Y, Ishida S, Tsubota K. Angiotensin II type 1 receptor antagonist attenuates lacrimal gland, lung, and liver fibrosis in a murine model of chronic graft-versus-host disease. *PLoS ONE*. 2013 Jan; 8(6): e64724. doi: 10.1371/journal.pone.0064724 査読有
5. Tsuboi H, Hagiwara S, Asashima H, 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, Matsumoto I, Sumida T. Validation of different sets of criteria for the diagnosis of Sjögren's syndrome in Japanese patients. *Mod Rheumatol*. 2013 Mar;23(2):219-25. doi: 10.1007/s10165-012-0812-9. 査読有
 6. Yaguchi S, Ogawa Y, Kamoi M, Uchino M, Tatematsu Y, Ban Y, Ohba E, Okamoto S, Goto E, Tsubota K. Surgical management of lacrimal punctal cauterization in chronic graft-versus-host disease related dry eye with recurrent punctal plug extrusion. *Bone Marrow Transplant*. 2012, Nov;47(11):1465-1469. doi: 10.1038/bmt.2012.50. 査読有
 7. Kamoi M, Ogawa Y, Nakamura S, Dogru M, Nagai T, Obata H, Ito M, Kaido M, Kawakita T, Okada Y, Kawakami Y, Shimmura S, Tsubota K. Accumulation of secretory vesicles lacrimal gland epithelia is related to non-Sjögren's type dry eye in visual display terminal users. *PLoS One*. 2012 Sep;7(9):e43688. doi: 10.1371/journal.pone.0043688. 査読有
 8. Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, Hatou S, Nakamura S, Inaba T, Imada T, Ozawa Y, Kawakami Y, Ishida S, Tsubota K. Presence and physiologic function of the Renin-Angiotensin System in mouse lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Aug;53(9):5416-5425. doi: 10.1167/iovs.12-9891 査読有
 9. Uchino Y, Kawakita T, Miyazawa M, Ishii T, Onouchi H, Yasuda K, Ogawa Y, Shimmura S, Ishii N, Tsubota K. Oxidative stress induced inflammation initiates functional decline of tear production. *PLoS One*. 2012 Oct;7(10):e45805. doi: 10.1371/journal.pone.0045805. 査読有
 10. Kojima T, Wakamatsu TH, Dogru M, Ogawa Y, Igarashi A, Ibrahim OM, Inaba T, Shimizu T, Noda S, Obata H, Nakamura S, Wakamatsu A, Shirasawa T, Shimazaki J, Negishi K, Tsubota K. Age-related dysfunction of the lacrimal gland and oxidative stress: evidence from the Cu,Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1) knockout mice. *Am J Pathol*. 2012 May;180(5):1879-1896. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.01.019. 査読有
 11. Tatematsu Y, Ogawa Y, Shimmura S, Dogru M, Yaguchi S, Nagai T, Yamazaki K, Kameyama K, Okamoto S, Kawakami Y, Tsubota K: Mucosal microvilli in dry eye patients with chronic GVHD, *Bone Marrow Transplant* 2012, Mar;47(3):416-425. doi: 10.1038/bmt.2011.89. 査読有
 12. Uchino M, Ogawa Y, Uchino Y, Mori T, Okamoto S, Tsubota K. Comparison of stem cell sources in the severity of dry eye after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Ophthalmol*. 2012 Jan;96(1):34-37. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300514. 査読有
 13. Ban Y, Ogawa Y, Ibrahim OM, Tatematsu Y, Kamoi M, Uchino M, Yaguchi S, Dogru M, Tsubota K. Morphologic evaluation of meibomian glands in chronic graft-versus-host disease using in vivo laser confocal microscopy. ; *Mol Vis*. 17(2) 2533-2543 ; 2011 PMID: 22025888 [PubMed - indexed for MEDLINE] 査読有
 14. Kamoi M, Ogawa Y, Uchino M, Tatematsu Y, Mori T, Okamoto S, Tsubota K. Donor-recipient gender difference affects severity of dry eye after hematopoietic stem cell transplantation. ; *Eye*. 73 : 860-865 2011/07/25. doi: 10.1038/eye.2011.73 査読有
- 〔学会発表〕(総計 47 件中 15 件)
1. 小川葉子. シンポジウム1 シェーグレン症候群の臓器病変と腺病変の最前線炎症とドライアイ. 第22回日本シェーグレン症候群学会学術集会. 大阪.

2013/9/13-9/14.

2. 小川葉子. 若手ドライアイ研究者育成プログラム 上皮に着目した研究. 第7回箱根ドライアイクラブ. 神奈川. 2013/5/31-6/1.
3. Ogawa Y, Shimmura S, Yaguchi S, Inaba T, Tsubota K. Donor mesenchymal stem cells expressing MHC class II molecule trigger immune responses in an animal model of lacrimal gland chronic graft-versus-host disease. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Florida, USA 2013, Florida, USA 5-9 May 2013.
4. Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Mabuchi Y, Sato Y, Suzuki S, Yaguchi T, Inaba T, Yaguchi S, Okamoto S, Kawakami Y, Okano H, Matsuzaki Y, Tsubota K. Donor mesenchymal stem cells induce immune response in lacrimal gland chronic graft versus host disease in an animal model. The 12th International Symposium on Sjögren's Syndrome. Kyoto, Japan; 9-12 Oct 2013
5. Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Okano H, Matsuzaki Y, Tsubota K. Mismatched mesenchymal stem cells as an initial trigger of ocular chronic graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. The 3rd International Conference on Clinical & Experimental Ophthalmology Hilton Chicago/Northbrook, USA. 14, April 2013
6. 小川葉子. ドライアイの話題の最前線. 第2回レディースフォーラム in 横浜 神奈川 2012/9/12
7. Matsuzaki Y, Ogawa Y, Morikawa S, Okano H, Tsubota K, Shimmura S. Minor antigen-mismatched MSC react with residual host T cells to trigger the progression of chronic GVHD. International Society of Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan. 2012/6/13-16
8. 小川葉子. 自己免疫疾患様の病態を示す慢性移植片対宿主病マウスモデルの検討. 第17回シェーグレン症候群セミナー 東

京 2012/5/19

9. Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Yaguchi T, Yaguchi S, Inaba T, Kawakami Y, Okano H, Matsuzaki Y, Tsubota K. Interaction between donor mesenchymal stem cells and recipient-derived T cells in the pathogenesis of ocular chronic graft versus host disease. The association for research in vision and ophthalmology 2012 (ARVO 2012) Annual Meeting, Fort Lauderdale, Florida, USA. 2012/5/6-5/10
10. Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Mabuchi Y, Yaguchi Y, Inaba T, Kawakami Y, Okano H, Matsuzaki Y, Tsubota K. A role of recipient-derived T cells in ocular chronic graft-versus-host disease. 1st Conference on the Tear Film and Ocular Surface in Asia, Kanagawa, Japan. 2012/4/2-4
11. Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Mabuchi Y, Yaguchi T, Inaba T, Kawakami Y, Okano H, Matsuzaki Y, Tsubota K. A Significant Role of Mesenchymal Stem Cells in Immune Processes and Pathogenic Fibrosis In Ocular Chronic Graft Versus Host Disease. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Annual meeting, May 4, 2011, Florida, U.S.A.
12. Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, Tsubota K. Lacrimal Gland Inflammation And Fibrosis In Murine Model Of Ocular Graft Versus Host Disease. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Annual meeting, May 3, 2011, Florida, U.S.A.
13. Tatematsu Y, Ogawa Y, Shimmura S, Dogru M, Nagai T, Yaguchi S, Yamazaki K, Kameyama K, Kawakami Y, Tsubota K. Mucosal Microvilli In Dry Eye Patients With Chronic Graft-versus-host Disease The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Annual meeting, May 3, 2011, Florida, U.S.A.
14. Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Mabuchi Y, Yaguchi T, Inaba T, Yaguchi S, Kawakami Y, Okano H, Tsubota K, Matsuzaki Y. Donor mesenchymal stem cells trigger chronic graft-versus-host disease following minor antigen-mismatched bone marrow transplantation. 第40回日本免疫学会総会千葉 2011/11/28

15. 小川葉子. シンポジウム From Basic Science. Inflammation とドライアイの接点 - 基礎研究の本質を見抜く箱根ドライアイクラブ 神奈川 2011/06/24

〔図書〕(総計 11 件中5件)

1. 小川 葉子. 13. 眼表面疾患とドライアイ慢性移植片対宿主病とドライアイ「専門医のための眼科診療クオリファイ 19 ドライアイスペシャリストへの道」 中山書店 372-5. 2013/11/05.
2. 小川 葉子. II. 臨床編：診断 5. 眼科からみた GVHD 「みんなに役立つGVHD(移植片対宿主病)の基礎と臨床」医薬ジャーナル 171-184. 2013/08/20.
3. 小川 葉子. ドライアイ 「外来で診る眼科疾患」 慶應義塾大学薬学部 51-70. 2013/07.
4. 小川葉子. 眼科と他科との関連疾患「TEXT 眼科学」 改訂 3 版 310-324, 2012/12/5.
5. 小川 葉子. ドライアイリサーチアワード受賞論文 ヒト眼慢性移植片対宿主病における上皮間葉転換 「Frontiers in dry eye」 6(2) 64-69 2011

〔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〕

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

連携研究者

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

慶應義塾大学・医学部・教授
河上 裕 (Kawakami Yutaka)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授
(現 島根大学医学部 教授)
松崎 有未 (Matsuzaki Yumi)

慶應義塾大学・医学部・教授
岡野 栄之 (Okano Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部・教授
岡本 真一郎 (Okamoto Shinichiro)

慶應義塾大学・医学部・助教
森川 暁 (Morikawa Satoru)