

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09657

研究課題名(和文)急性移植片対宿主病の病態解析及びその分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Pathological analysis of acute graft-versus-host disease and development of molecular targeted therapy for acute GVHD

研究代表者

山本 雅樹 (Yamamoto, Masaki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80404664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスおよびケモカインCCL8ノックアウトマウス由来細胞を用いた白血球混合培養を行ったところCCL8タンパクの低発現を確認した。またCCL8 mRNA特異的なsiRNAを用いたin vitro RNAiを行ったところ、CCL8タンパクの発現が軽度抑制された。grade II-IVのヒトGVHD症例31例においては、血清CCL8濃度は移植後30日以内に最高値を示す例が多く、移植後100日以内に血清CCL8タンパク濃度が213pg/mL以上となった症例では移植後非再発死亡率が高率であった。これより移植後早期のCCL8タンパクの発現は移植後の非再発死亡を予測できる因子となりうる事が示された。

研究成果の概要(英文)：We performed mixed leukocyte reaction assay using wild type and CCL8-knockout mice. CCL8 protein were not detected in the supernatant of CCL8 KO mice. Also we performed RNA interference assay with ccl8 specific siRNA. By the RNAi, CCL8 protein were slightly decreased in the supernatant. Thus, gene manipulation maybe the treatment option of acute GVHD. To explore the role of Chemokine (C-C motif) ligand 8 (CCL8) as a potential biomarker for acute graft-versus-host disease (aGVHD), we retrospectively analyzed the sera and clinical course of 31 patients with grade II to IV aGVHD. No deaths occurred in the ten patients with serum CCL8 concentrations less than 213 pg/mL, whereas 11 of the 21 patients with more than 213 pg/mL died within 180 days post-transplantation. Thus, elevated serum CCL8 concentration before day 100 post-transplantation may predict aGVHD prognosis.

研究分野：造血細胞移植

キーワード：移植片対宿主病 ケモカイン CCL8

1. 研究開始当初の背景

急性移植片対宿主病 (acute graft-versus host disease; aGVHD) は造血細胞移植の成否を左右する重大な合併症であり、その克服は重要な課題である。

我々は、先行研究でケモカイン CCL8 がヒト GVHD 患者及びマウス GVHD モデルの血漿中で上昇している事をプロテオミクス解析の手法を用いて発見し、ケモカイン CCL8 は GVHD のバイオマーカーとして有用である事を報告した。(Hori T et al. Blood 2008;111:4403-4412)

また、主要組織適合性抗原 (MHC) の異なるマウス間での骨髄移植では、ケモカイン CCL8 が血漿中に高濃度で検出され、GVHD の病勢、早期死亡率と相関する事を明らかにした。*in vitro* CCL8 発現系では、MHC の異なるマウスの脾臓細胞を混合培養 (白血球混合培養) する事で、培養上清中に CCL8 タンパクが高濃度に発現する事を明らかにした。この系において同種抗原認識、反応性リンパ球増殖を契機に CCL8 は発現し、CCL8 濃度は誘導刺激となるサイトカイン (IFN- γ 、IL-2、TNF- α) をブロックする事により低下した。(Yamamoto M et al. Exp Hematol 2011; 39: 1101-1112.)

我々は CCL8 ノックアウトマウスを作製し、さらなる GVHD の病態解析、GVHD 病態におけるケモカイン CCL8 の役割を明らかにする研究を継続している。

2. 研究の目的

a) ケモカイン CCL8 の *in vitro* 発現系を用いて、CCL8 ノックアウトマウスや、RNA 干渉 (RNAi) を用いた遺伝子操作による CCL8 発現ノックダウンなどを行い、GVHD の分子標的治療を開発する。

b) ヒト GVHD 患者検体中の CCL8 濃度を測定、臨床経過、予後との関連を解析し、血清 CCL8 タンパクの早期発現と移植後の非再発死亡との関連を検討する。

3. 研究の方法

a-1) CCL8 ノックアウトマウス細胞を用いた白血球混合培養系での CCL8 タンパク発現を評価した。Zinc Finger nuclease を用いて作製した CCL8 ノックアウトマウスを用いた。(Background は C57BL/6 及び Balb/c マウスである)

Stimulator (放射線照射を行って細胞増殖能をなくした脾臓由来白血球) と Responder (stimulator からの allo 抗原刺激を受けて、CCL8 を発現すると考えられる脾臓由来白血球) をそれぞれ、wild type と CCL8 KO マウスから調整し、白血球混合培養を行った。

a-2) CCL8 ノックアウトマウスを用いた骨髄移植を行い、CCL8 タンパクの発現、生存率

について検討した。

a-3) 野生型 Balb/c マウス、C57BL/6 マウス、CCL8 ノックアウト (KO) Balb/c マウス、CCL8 KO C57BL/6 マウスの脾臓由来細胞を用いて白血球混合培養を行い、培養上清中の CCL8 タンパク発現を解析した。

a-3) CCL8 mRNA 特異的 siRNA を用いて *in vitro* RNAi を行い CCL8 タンパク発現のノックダウンを試みた。

b) 当院及び名古屋第一赤十字病院で非血縁者間同種造血細胞移植を受けた患者さんの血清を用いて、血清中 CCL8 タンパクを ELISA 法にて定量した。臨床経過、予後との関連を統計学的手法にて解析した。

4. 研究成果

a-1) Stimulator (wild type C57BL/6) と Responder (wild type Balb/c) の組み合わせでは、培養上清中に CCL8 タンパクを高濃度で検出した。

(day6 1307.3pg/mL, 1883.9pg/mL) 一方、Stimulator (wild type Balb/c) と Responder (CCL8 KO C57BL/6) の組み合わせでは、syngeneic (stimulator, responder とも wild type Balb/c の組み合わせと同程度の CCL8 タンパク発現しか認めなかった。(day6 128.4pg/mL, 231.3pg/mL)

a-2) CCL8 ノックアウトマウスを用いた移植における、CCL8 タンパクの発現、生存率などについて検討した。

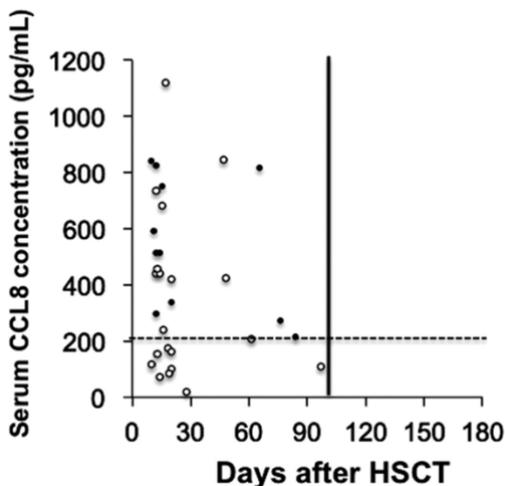
ドナーを C57BL/6_wild type とし、レシピエントを Balb/c_CCL8KO マウスまたは Balb/c_wild type とした群での比較を行った。結果: ドナーレシピエントとも wild type の組合せでは移植後早期から血漿中 CCL8 タンパクの発現がみられるが、レシピエントを CCL8KO マウスとすると移植後 1 週間を過ぎるまで CCL8 の発現は見られず、生着後にドナー由来の細胞から CCL8 が発現しているものと考えられた。

生存率に関しては、早期に CCL8 を発現しない、ドナー CCL8KO、レシピエント wild type の組み合わせで有意に生存期間が延長した。移植後早期の CCL8 発現は、GVHD において早期死亡に関連するファクターであることが確認された。

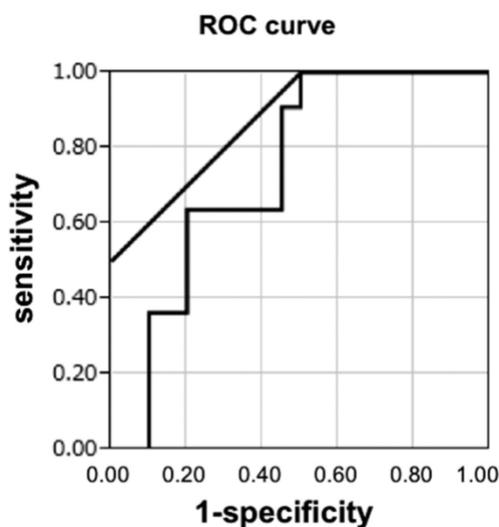
a-3) 脾臓由来細胞を用いた白血球混合培養を行い、CCL8 mRNA 特異的な siRNA を用いて *in vitro* RNAi を試みた。その結果培養上清中の CCL8 タンパクは軽度の発現低下を認めた。

b) 対象症例 grade II-IV の急性 GVHD 患者

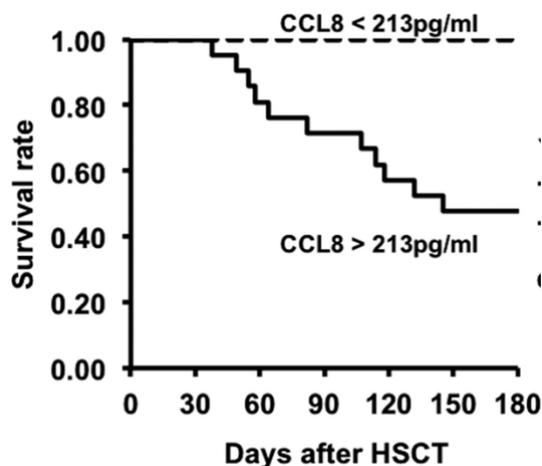
31 例の血清中 CCL8 タンパクを ELISA 法にて定量した。血清 CCL8 濃度は移植後 100 日以内に最高値を示す事が多く、その多くは移植後 30 日以内に高値を示していた。



血清 CCL8 濃度と予後の相関に関しては、ROC カーブを作成し、感度 100%、特異度 50%で予後を分ける CCL8 濃度は 213pg/mL という事が明らかとなった。

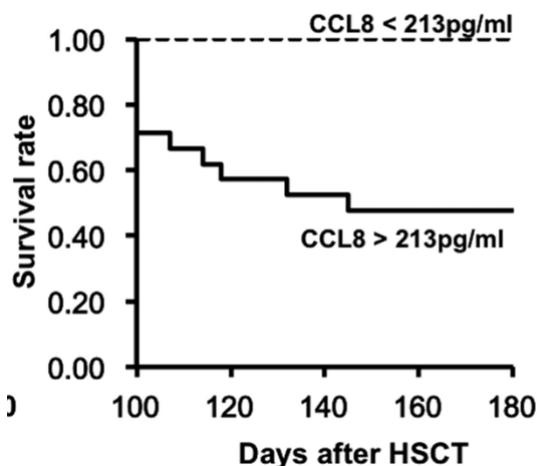


血清 CCL8 濃度が 213pg/mL 以上であった 21



名中 11 名が移植後 180 日以内に原疾患の再発以外の要因で死亡していた。一方、血清 CCL8 濃度が 213pg/mL 以下であった 10 名には死亡例は認められなかった。

ランドマーク解析にても移植後の血清 CCL8 濃度が 213pg/mL 以上の症例では明らかに生存率が低かった。



これらの結果より、移植後 100 日目の血清 CCL8 濃度の上昇は急性 GVHD の予後を予見しうる事が示された。今後症例数を集め、さらなる臨床研究が必要と考えられた。

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 1 件)

札幌医学雑誌 2017 年 86 巻 45-51 頁、査読あり。

Early expression on serum CCL8 closely correlates with non-relapse mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Masaki Yamamoto, Tsukasa Hori, Naoki Hatakeyama, Keita Igarashi, Natsuko Inazawa, Nobuhiro Suzuki, Norio Takei, Yoichi M. Ito, Kimikazu Matsumoto, Koji Kato, Hiroyuki Tsutsumi, Yasuo Kokai.

DOI: 10.15114/smj.86.45

〔学会発表〕(計 1 件)

山本雅樹、堀 司、畠山直樹、五十嵐敬太、稲澤奈津子、鈴木信寛、武井則雄、伊藤陽一、松本公一、加藤剛二、堤裕幸、小海康夫
ケモカイン CCL8 の移植後早期発見は同種造血細胞移植における非再発死亡率の増加と相関する。

第 39 回日本造血細胞移植学会総会
2017 年 3 月 2 日、島根県松江市

〔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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅樹 (YAMAMOTO, Masaki)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：80404664

(2) 研究分担者

堀 司 (HORI, Tsukasa)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20398324

斉藤 淳人 (SAITO, Makoto)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号：40749420

五十嵐 敬太 (IGARASHI, Keita)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：70580017