

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19547

研究課題名(和文) SOCS1/3欠失マウスで増加する特異なT細胞分画が移植片対宿主病に及ぼす役割

研究課題名(英文) Regulation of inflammation by SOCS1 and SOCS3 in the syngeneic bone marrow transplantation

研究代表者

牛木 隆志(Ushiki, Takashi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：80579152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：SOCS1/3欠失マウスでは同種骨髄移植により急激な炎症が誘発された。SOCS1ノックアウト(KO)マウスではCD8+44highのリンパ球分画の増加が認められ、この分画は種々のhoming markerと共に RANTES、MIP1a、GM-CSF、IL-3などのケモカインやサイトカインを高発現することでリンパ球浸潤とその後の局所炎症を誘発していると考えられた。また、SOCS3KOは顆粒球にG-CSFやIL-6などに対するhypersensitivityの機能を付与することで、顆粒球増加に寄与していた。SOCS1/3欠失マウスではこれらの相互作用により急激に炎症の進展がみられた。

研究成果の概要(英文)：Combined hematopoietic loss of SOCS1 and SOCS3 causes rapid inflammatory disease in the syngeneic bone marrow transplantation. Loss of SOCS1 increases the number of CD8+CD44high cells. The expression of homing markers on these T cells may facilitate migration to organs and tissues, and the propensity for production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as RANTES, MIP1a, GM-CSF and IL-3 for recruiting myeloid cells, as well as development of high circulating G-CSF concentrations, can account for the pathological infiltration of neutrophils, monocytes, eosinophils and lymphocytes at the numerous sites of inflammation in SOCS1KO mice. Our data extend the model to suggest that the absence of SOCS3 in the already pro-inflammatory environment established by SOCS1 deficiency, results in hyper-responsiveness of immune cells to cytokines such as G-CSF and IL-6, and dramatically accelerates myeloid proliferation and inflammatory infiltration of target tissues.

研究分野：血液内科学

キーワード：SOCS1 SOCS3 慢性炎症 遺伝子間相互作用 骨髄移植

1. 研究開始当初の背景

Suppressors of Cytokine Signalling (SOCS) proteinはサイトカインシグナルを負に制御するネガティブフィードバック調節因子として発見され、生体内において過剰なサイトカイン刺激に伴う炎症反応を抑える重要な役割を担っている。SOCSファミリーの中でもSOCS1とSOCS3は特に強い抗炎症作用を有しており、SOCS1はIFN $\gamma$  や $\gamma$ c receptorを介したサイトカインシグナルを、SOCS3はIL-6、G-CSFなどのサイトカインを制御している。また、これまで個々のSOCSファミリー遺伝子について機能解析が行われてきたが、SOCSファミリーの遺伝子間における機能的な分担やその相互作用に関する知見は得られていない。

2. 研究の目的

SOCSファミリーの遺伝子間における機能的な分担やその相互作用を明らかとする。また、骨髄移植を用いて、その機能解析を行うことで骨髄移植に及ぼす役割も検討する。

3. 研究の方法

胎生致死であったSOCS1&3ダブルノックアウト (DKO) マウスおよびSOCS3ノックアウト (KO) マウスをCreERT2/loxPシステムによるコンディショナルノックアウトを用いて新規に作成した。これらのマウスをドナーとしてC57BL/6 マウスへSyngenic Bone Marrow Transplantationを行い、SOCS1/3DKO、SOCS1KO、SOCS3KOのドナー血球による炎症のモニタリングを行った。

4. 研究成果

SOCS1/3DKO、SOCS1KOおよびSOCS3KO群のモニタリングの結果、SOCS3KOマウスでは炎症の発症はみられなかったが、SOCS1/3DKOマウスでは皮膚潰瘍をはじめとして肺、肝臓、十二指腸に炎症細胞浸潤を来し、重症炎症によりSOCS1KOマウスの平均生存期間を180日から50日へと短縮した(図1)。

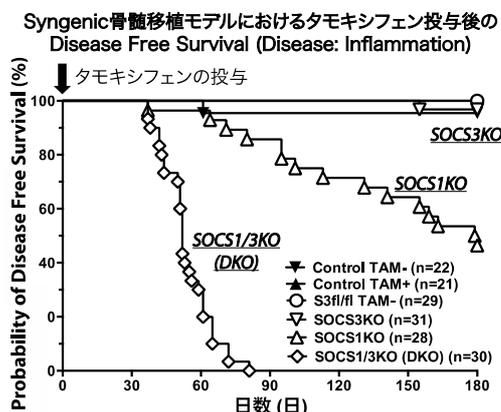


図1 SOCS3ノックアウトはSOCS1ノックアウトにおける炎症反応を加速する。Control= *Ifng<sup>+/+</sup>Socs1<sup>+/+</sup>Socs3<sup>+/+</sup>CreERT2<sup>+/+</sup>*, SOCS3KO= *Ifng<sup>+/+</sup>Socs1<sup>+/+</sup>Socs3<sup>fl/fl</sup>CreERT2<sup>+/+</sup>TAM+*, SOCS1KO= *Ifng<sup>+/+</sup>Socs1<sup>-/-</sup>Socs3<sup>fl/fl</sup>CreERT2<sup>+/+</sup>TAM-*, SOCS1/3KO(DKO)= *Ifng<sup>+/+</sup>Socs1<sup>-/-</sup>Socs3<sup>fl/fl</sup>CreERT2<sup>+/+</sup>TAM+*, fl= loxP-flanked allele, TAM= tamoxifen

また、SOCS1/3DKOマウスでは著明な好中球増多症を来した。

この機序を解明するために以下の実験を行った。

1) In vivoにおける免疫状態の解析  
SOCS1KO および SOCS1/3DKO において CD8+44<sup>high</sup>のTリンパ球分画が特異的に増加していた。これらは生後よりみられ、SOCS1KOによる影響と考えられた。また、SOCS1/3DKOマウスでは炎症の発症に伴い早期から末梢血の顆粒球増加を来した。

2) Colony Assay  
SOCS1/3DKOマウスにおける顆粒球増加のメカニズムを検討するため、骨髄細胞を用いて colony assayを行った。G-CSFによる刺激ではSOCS1/3DKO群がSOCS1KOおよびコントロール群に比して有意に総colony forming cells (CFC)数およびGranulocyte-CFC数の上昇がみられた。SOCS1/3DKO群とSOCS3KO群では有意差がみられず、SOCS3KO群においてもSOCS1/3DKO群と同様にGranulocyte-CFC数の増加が認められた。このため、顆粒球増加に関してはSOCS3KOの影響が考えられた。

3) 顆粒球pSTATシグナル解析  
顆粒球 (CD11b+Gr-1+) をFACS sortingし、G-CSFあるいはGM-CSFで刺激を行った。G-CSFでの刺激においてSOCS1/3DKOおよびSOCS3KO群ではSOCS1KOおよびコントロール群に比して有意にpStat3シグナルの延長を認めた。SOCS1/3DKOおよびSOCS3KO間では差を認めなかった。また、GM-CSFの刺激に関しては各群でpSTAT5シグナルに差は認めなかった。

4) 骨髄由来マクロファージのpSTATシグナル解析  
骨髄細胞よりM-CSFを用いて骨髄細胞由来マクロファージを作成した。これらの細胞をIL-6で刺激したところ、SOCS1/3DKOおよびSOCS3KO群ではSOCS1KOおよびコントロール群に比して有意にpSTAT1とpSTAT3シグナルの延長を認めた。ただし1)2)での解析と同様にSOCS1/3DKOおよびSOCS3KO間では差を認めなかった。

5) リンパ球解析  
リンパ球の解析ではSOCS1KO および SOCS1/3DKOにおいてCD8+44<sup>high</sup>のTリンパ球分画が特異的に増加していた。この分画はCD25、CD69などのactivation markerは発現していないもののCD49d、CXCR3、ICAM-1、CD11a、LPAM-1、CD62Lなどのhoming markerを高発現していた。

なお、SOCS1/3DKOおよびSOCS1KOにおけるCD8+44<sup>high</sup> T細胞の出現割合および

activation marker、homing markerには有意差は認められなかった。

また、各群よりCD8+44high T cellをFACS sortingし、IL-15あるいはIL-2+CD3/28で72時間の刺激をおこなったところ、SOCS1KOおよびSOCS1/3DKO群でeffector memory T cellの出現率が高く、さらにRANTES、MIP1a、GM-CSF、IL-3などの炎症に關与するケモカイン/サイトカインが高分泌された。

以上の結果を元に以下の2点の結論を得た。

①SOCS1KOはリンパ球分化に、SOCS3KOは顆粒球分化に影響を与える。SOCS1/3DKOにおける炎症の発症機序はJak-StatシグナルがDKOにより相乗的に亢進したためというよりも、SOCS1およびSOCS3のKOにより分化が変化し、それぞれ血球群がindependentに相互作用したためと考えられた。

②SOCS1KOに關連して特異に増加するCD8+44high Tリンパ球はhoming markerを高発現すると共に、刺激によりケモカインを高発現しやすい状態にある。SOCS1KOが炎症の発症に必要なことから、CD8+44high Tリンパ球は炎症の初期巢の形成に關与し、全身炎症の発症に強く寄与する可能性が示唆された。

Syngenic BMT において SOCS1 および SOCS3 は independent に血球分化を制御し、さらにはそれらの血球間の相互作用を抑制することで BMT 後の炎症の抑制に關与することが確認された。

## 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 Shibusaki Y, Suwabe T, Katagiri T, Tanaka T, Kobayashi H, Fuse K, Ushiki T, Sato N, Yano T, Kuroha T, Hashimoto S, Narita M, Furukawa T, Sone H, Masuko M. The Glasgow Prognostic Score as a pre-transplant risk assessment for allogeneic hematopoietic cell transplantation. Clin Transplant. 査読有. 2017. e13103  
DOI: 10.1111/ctr.13103.

② Ushiki T, Huntington ND, Glaser SP, Kiu H, Georgiou A, Zhang JG, Metcalf D, Nicola NA, Roberts AW, Alexander WS. Rapid Inflammation in Mice Lacking Both SOCS1 and SOCS3 in Hematopoietic Cells. PLoS One. 査読有. Sep 1;11(9). 2016. e0162111.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0162111. eCollection 2016.

③ Delconte RB, Kolesnik TB, Dagley LF, Rautela J, Shi W, Putz EM, Stannard K, Zhang

JG, Teh C, Firth M, Ushiki T, Andoniou CE, Degli-Esposti MA, Sharp PP, Sanvitale CE, Infusini G, Liao NP, Linossi EM, Burns CJ, Carotta S, Gray DH, Seillet C, Hutchinson DS, Belz GT, Webb AI, Alexander WS, Li SS, Bullock AN, Babon JJ, Smyth MJ, Nicholson SE, Huntington ND. CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity. Nature Immunology. 査読有. Jul;17(7). 2016. 816-824.

DOI: 10.1038/ni.3470.

④ Delconte RB, Shi W, Sathe P, Ushiki T, Seillet C, Minnich M, Kolesnik TB, Rankin LC, Mielke LA, Zhang JG, Busslinger M, Smyth MJ, Hutchinson DS, Nutt SL, Nicholson SE, Alexander WS, Corcoran LM, Vivier E, Belz GT, Carotta S, Huntington ND. The Helix-Loop-Helix Protein ID2 Governs NK Cell Fate by Tuning Their Sensitivity to Interleukin-15. Immunity. 査読有. Volume 44, Issue 1. 2016. 103-115.

DOI: 10.1016/j.immuni.2015.12.007

⑤ Shibusaki Y, Katagiri T, Kobayashi H, Ushiki T, Narita M, Sone H, Furukawa T, Masuko M. The Dinakara equation for adjusting DLCO for hemoglobin in the HCT-CI is superior to the Cotes equation for predicting high-risk patients in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. American Journal of Hematology. 査読有. May;91(5). 2016. E296

DOI: 10.1002/ajh.24318.

〔学会発表〕(計9件)

① Fuse K, Uemura S, Suwabe T, Katagiri T, Tanaka T, Ushiki T, Shibusaki Y, Sato N, Yano T, Kuroha T, Hashimoto S, Furukawa T, Narita M, Sone H, Masuko M. Patient-Based Prediction Algorithm of Relapse after Allo-HSCT for Acute Leukemia Using Machine Learning Approach. 59th American Society of Hematology Annual Meeting. 2017年.

② Shibusaki Y, Suwabe T, Uemura S, Katagiri T, Tanaka T, Ushiki T, Fuse K, Narita M, Sone H, Masuko M. Further Prognostic Factors for Stratification of Patients in the High-Risk HCT-CI Group Undergoing Allogeneic HCT. 59th American Society of Hematology Annual Meeting. 2017年.

③ Uemura S, Shibusaki Y, Katagiri T, Ito H, Tanaka T, Kobayashi H, Ushiki T, Fuse K, Narita M, Sone H, Masuko M. Unique profile of immune reconstruction after three types of HLA-mismatched allogeneic hematopoietic cell transplantations. The 8th JSH International Symposium. 2017年.

④ **Ushiki T**, Roberts A, Alexander W. SOCS1 and SOCS3 work coordinately in inflammation by affecting cell differentiation. 第78回日本血液学会総会. 2016年.

⑤ Tsubaki T, Kadonosono T, Shiozawa T, Kuchimaru T, **Ushiki T**, Masuko M, Kizaka-Kondoh S. Elucidation of Tumor-Promoting Effects of Novel Adherent Immature Myeloid Cells in Tumor. 58th American Society of Hematology Annual Meeting. 2016年.

⑥ Fuse K, Katagiri T, Shibasaki Y, Tanaka T, **Ushiki T**, Sato N, Yano T, Kuroha T, Hashimoto S, Furukawa T, Narita M, Sone H, Masuko M. The Predictive Factors of Favorable Prognosis after Allo-HSCT for Refractory Acute Leukemia. 58th American Society of Hematology Annual Meeting. 2016年.

⑦ Suwabe T, Shibasaki Y, Katagiri T, Miyakoshi S, Kobayashi H, Fuse K, **Ushiki T**, Sato N, Yano T, Moriyama M, Kuroha T, Takizawa J, Hashimoto S, Narita M, Furukawa T, Sone H, Masuko M. A pre-transplant biomarker risk index based on serum ferritin, albumin, and Creactive protein levels that can predict the outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation independently of the HCT-CI. 21st Congress of European Hematology Association. 2016年.

⑧ Kawamoto K, Shibasaki Y, Kobayashi H, **Ushiki T**, Sato N, Yano T, Moriyama M, Kuroha T, Takizawa J, Hashimoto S, Narita M, Furukawa T, Sone H, Masuko M. PERIPHERAL BLOOD EOSINOPHIL COUNT AT DAY 28 AS A PROGNOSTIC INDICATOR IN ALLOGENEIC. HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION. 20th Congress of European Hematology Association. 2015年.

⑨ Katagiri T, Shibasaki Y, Kobayashi H, **Ushiki T**, Sato N, Yano T, Moriyama M, Kuroha T, Takizawa J, Hashimoto M, Narita M, Sone H, Furukawa T, Masuko M. The clinical relevance of MDS Transplantation Risk Index in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patents. The 6th JSH International Symposium 2015. 2015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〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### 1) 研究代表者

牛木 隆志 (Ushiki, Takashi)  
新潟大学医歯学総合病院  
生命科学医療センター  
講師  
研究者番号：80579152

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )