

平成 22 年 2 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790396  
 研究課題名 (和文)  
 血小板由来マイクロパーティクルの測定による急性移植片対宿主病の評価  
 研究課題名 (英文) Evaluantion of acute graft versus host disease by measur ing platelet derived microparticle.  
 研究代表者  
 柴倉 美砂子 (SHIBAKURA MISAKO)  
 岡山大学・大学院保健学研究科・准教授  
 研究者番号：30314694

## 研究成果の概要：

同種骨髄移植後 3 ヶ月以内に生じる急性GVHDの治療には、強力な免疫抑制療法がその治療に行われるが、なかにはそれらが奏効しない場合がある。従来のようなリンパ球の増殖機構やサイトカイン産生のみに着目した研究では、その到達点に限界があると思われる。私は、細胞接着分子であるセレクトインに着目し、その免疫応答反応における役割について研究した。セレクトイン欠損マウスを用いた実験で、セレクトインがT細胞の分化・成熟に影響を与えている可能性がある。また、T細胞機能に影響を与えている可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	300,000	2,900,000

研究分野：血液検査学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：急性移植片対宿主病、セレクトイン、T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

同種骨髄移植は、白血病等の難治性造血器悪性腫瘍に対する治療を望める治療法として、世界中で広く行われている。移植後 3 ヶ月以内に生じる急性移植片対宿主病 (GVHD) は主に皮膚、腸管や肝臓がドナーTリンパ球により傷害される状態であり、強力な免疫抑

制療法がその治療に用いられるが、なかにはそれらが奏効せず、白血病などの原疾患が抑制されても、このような予後不良因子となる副反応によって患者が命をおとす場合も少なくない。このような移植医療現場での重大な問題についての機序の理解はまだ浅いものであり、従来のようなリンパ球の増殖

機構やサイトカイン産生のみに目を向けた研究では、その到達点に限界があると思われる。近年、HBV 感染時における細胞障害性 T 細胞の肝組織障害に血小板が関与していることがマウスにおいて示された (Iannacone M, et al. Nat Med. 2005)。活性化血小板は、マイクロパーティクルを分泌するが、このマイクロパーティクルは P-セレクトインを発現しており、P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) を介して白血球に結合し、その組織浸潤を促進する。また炎症により PSGL-1 を発現した CD4 陽性細胞は、P-セレクトインを介して腸粘膜下層へ移動する (Haddad W, et al. J Exp Med. 2003) ことが報告されている。今まで血小板とリンパ球の結合について報告されていなかったが、CD4 陽性 T 細胞の CD40L や PSGL-1 が、血小板の  $\beta 1$  関連インテグリンおよび  $\alpha 2b \beta 3$  インテグリンを介して凝集し、内皮下組織に接着する (Solpov A, et al. Thromb Haemost. 2006) 事が証明された。さらに、血小板は単球に結合し、その血管内皮への結合を促進し、血管外浸潤を促進することが証明されている (de Costa Martins PA, J Leuk Biol. 2006)。また、活性化血小板は樹状細胞の成熟・分化を誘導することが報告されている。これらの事から申請者らは、移植後 GVHD の進展に P-セレクトインを含む血小板由来マイクロパーティクルがリンパ球と結合しリンパ球による臓器浸潤に関与しているのではないかと考えた。本研究の目的は、(1) マウス GVHD モデルを用いて、急性 GVHD 発症にセレクトインが関与している事を *in vivo* で証明する、(2) 骨髄移植後の患者血漿中の、もしくは末梢血中リンパ球表面に付着した血小板由来マイクロパーティクルを測定し、GVHD 症状と血小板由来マイクロパーティクル量の変化を観察し、その関連を探る、という 2 段階からなる。

## 2. 研究の目的

血小板の炎症反応への関与やリンパ球と血小板との結合機序などは、ここ数年で注目されて来ている非常に新しい研究分野である。現在までの GVHD 研究の大半は、リンパ球自身の増殖能やサイトカイン産生に注目したもののだが、このリンパ球を標的とした免疫抑制療法が無効である患者が多数認められることから、単にリンパ球のみに注目しているのではこの問題の解決にはつながらず、新たな組織障害理論とその機序の解明が必須と筆者は考えている。骨髄移植後のドナー抹消血中血小板由来マイクロパーティクル量と臨床症状の関連を見ることで、血小板由来マイクロパーティクルは急性 GVHD による臓器障害進展のマーカーになりうると考えられ、GVHD の分野では独創的な理論である。ひいては、同種造血幹細胞移植後の非常に大きな合併症であるこの病態の病勢把握や発症予測に役立つ可能性があり、臨床上大きな意義がある。また、これまで臨床応用されてこられなかった血小板を標的とした GVHD 新規治療法開発の礎となることを期待した。

## 3. 研究の方法

まず急性 GVHD モデルにて、急性 GVHD へのセレクトインの関与を検討する。ドナーにセレクトインノックアウトマウスまたは野生型マウスを用い、レシピエントマウスの急性 GVHD 症状を観察する。急性 GVHD の誘発には骨髄細胞と脾細胞を用いるが、申請者らは現在までに、セレクトインノックアウトマウスの骨髄細胞と脾細胞を移植した場合、野生型マウスのものを移植した場合より急性 GVHD が著しく軽減される事を見出している。そこで、セレクトインノックアウトマウスの骨髄と脾臓のどちらに GVHD を制御する因子が存在するのかを明らかにするために、移植時にセレクト

チンノックアウトマウス由来骨髄細胞を用いた場合と、セレクトチンノックアウトマウス由来脾細胞を用いた場合の移植で、急性GVHDの程度を比較する。この実験によって急性GVHDを制御する因子がセレクトチンノックアウトマウスの骨髄に多いのか、脾臓に多いのかが明らかとなる。また、セレクトチンがノックアウトされていることによるリンパ球の成熟や分布の違いを確認するために、野生型マウスとノックアウトマウスの骨髄、脾臓のリンパ球や制御性T細胞、樹状細胞の機能、組成の違いをリンパ球混合培養試験やフローサイトメトリー、免疫組織化学染色にて検討する。血小板の急性GVHDへの関与を検討するため、GVHDの進展に重要な役割を果たすと言われている、リンパ球や制御性T細胞、樹状細胞の細胞表面上の血小板マイクロパーティクル由来と考えられる血小板抗原を免疫組織化学染色によって検出する。

#### 4. 研究成果

最初に、マウス急性移植片対宿主病 (GVHD) モデルを用い、炎症・免疫反応におけるセレクトチンの役割を明らかにしようとした。特に、血小板由来マイクロパーティクルが炎症・免疫反応増強に関与しており、急性GVHDの増悪を招いていると推測した。そこで、血小板由来マイクロパーティクルを測定することで、急性GVHDの発症、または重症度を予測できないかと考えた。図1に示すようなマウス急性GVHDモデル実験において、セレクトチンノックアウトマウス由来骨髄と野生型マウス由来脾臓T細胞を移植した場合と、野生型マウス由来骨髄とセレクトチンノックアウトマウス由来脾臓T細胞をレシピエントマウスに移植した場合では、野生型マウス由来骨髄とセレクトチンノックアウトマウス由来脾臓T細胞を移植した場合で、生存曲線の延長が確認され、セレクトチンノックアウトマウスの脾臓にGVHDを軽減させる因子が存在することが判明した。

クチンノックアウトマウスの脾臓にGVHDを軽減させる因子が存在することが判明した。

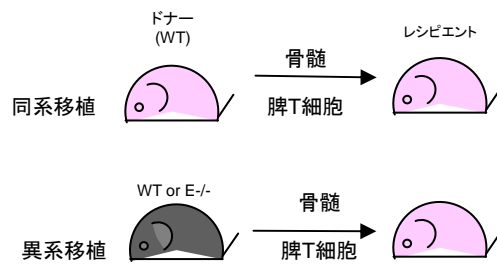


図1

そこで、セレクトチンノックアウトマウス由来脾臓T細胞を移植した場合と野生型由来脾臓T細胞を移植した場合の、レシピエントマウスの生存率を比較したところ、図2に示すように、セレクトチンノックアウトマウス由来脾臓T細胞を移植した群で、生存曲線の延長が認められた。

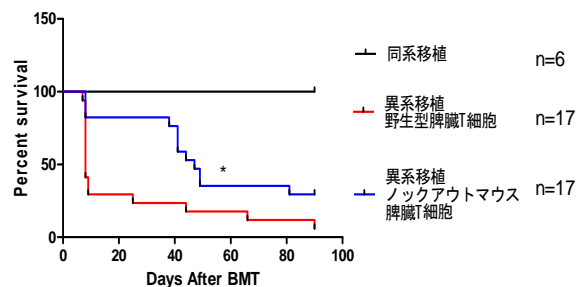


図2

セレクトチンノックアウトマウス脾臓T細胞による急性GVHDが野生型脾臓T細胞によるものより明らかに軽減されていたことから、移植したセレクトチンノックアウトマウスの脾臓T細胞分布の違いや機能異常が疑われた。現在までセレクトチンは血管内皮細胞と血小板で発現するとされている。そこで、セレクトチンがT細胞の分布、分化・成熟、機能などに影響を与えている可能性が考えられた。

セレクトチンノックアウトマウスの脾臓におけるT細胞分布をフローサイトメトリーにて調べたところ、制御性T細胞数がセレクトチンノックアウトマウスで増加していた。(図3)

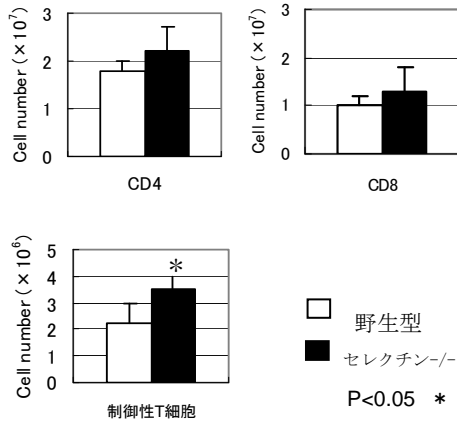


図3

そこで、制御性T細胞を除去したT細胞にて急性GVHDの生存曲線を調べたところ、セレクトインノックアウトマウス由来T細胞を移植した系での生存曲線の延長が認められた。これにより、制御性T細胞数の違いにより、生存曲線が延長しているのではなく、T細胞機能に変化が生じていることが判明した。次に、リンパ球増殖能試験にてT細胞機能を調べたところ、セレクトインノックアウトマウスが野生型より増殖能が明らかに低下していた。しかし、確認のため兄弟間の野生型とノックアウトマウスのT細胞機能を比較したが、明らかな機能の差を再現できなかった。環境因子が影響する可能性があるが、当初の実験で得られたノックアウトマウスのT細胞機能異常を示す結果はマウスの育った環境の違いだけとは考えにくい。早急にマウスの種類を変えてノックアウトマウスを作製し、同様な実験をする必要があると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴倉 美砂子 (SHIBAKURA MISAKO)

岡山大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：30314694