

機関番号 : 32612

研究種目 : 基盤研究(C)

研究期間 : 2008 ~ 2010

課題番号 : 20592058

研究課題名 (和文)

ドナー由来線維芽細胞による眼移植片対宿主病の発症機構の解明と治療法の開発

研究課題名 (英文) Analysis of the onset of ocular chronic graft versus host disease caused by donor derived fibroblasts and the development of the new therapeutic intervention

研究代表者

小川 葉子 (OGAWA YOKO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号 : 30160774

**研究成果の概要 (和文):**

ドナー由来線維芽細胞の細胞源を検討するためマウス GVHD モデルを用いた。培養を経ずに新鮮間葉系幹細胞(MSC)(Morikawa S, J Exp Med)及び新鮮造血幹細胞(HSC)(Matsuzaki Y, Immunity, 2004) を採取して移植し検討した。ミスマッチ MSC 移植では自己 MSC 移植に比較し、涙腺、肝臓、唾液腺、などに全骨髄細胞移植と同様の進行性の線維化を認めた。ドナー HSP47+GFP+ MSC の集積についても慢性 GVHD 線維化部位で確認した。これらの結果はドナー由来ミスマッチ MSC がドナー由来線維芽細胞の細胞源であり、慢性 GVHD の線維化形成にかかわる可能性を示した。

**研究成果の概要 (英文):**

To determine whether donor derived fibroblasts originate from bone marrow, we used an animal model of chronic graft versus host disease (cGVHD). (Zhang Y, J Immunol, 2002)

To examine the cellular sources of donor derived fibroblasts in cGVHD recipients, we analyzed mesenchymal stem cells (MSC) (Morikawa S, J Exp Med. 2009) and hematopoietic stem cells (HSC) (Matsuzaki Y, Immunity 2004) from bone marrow. We performed the prospective study using freshly isolated MSCs from donor and HSC from recipient. This is a MSC alone mismatched transplantation. In contrast, MSCs from recipients and HSCs from donor used as a syngeneic MSC transplantation.

In mismatched MSC transplantation, mallory staining of lacrimal gland, liver and salivary gland revealed progressive fibrosis, similar to whole bone marrow transplantation. In contrast, excessive fibrotic areas were scarcely detected 3 and 8 weeks after syngeneic MSC transplantation. When GFP B10.D2 mice were used as donors, GFP+MSCs were found residing in cGVHD fibrotic lesion such as the lacrimal gland, skin and intestine. These results suggest that donor MSCs are partially a source of HSP47+ fibroblasts in cGVHD fibrotic tissue. In addition, these results suggest that donor MSCs alone are sufficient to induce cGVHD fibrosis.

**交付決定額**

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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 : 眼病理学 移植片対宿主病 ドライアイ 線維化 線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

眼移植片対宿主病 (GVHD) は造血幹細胞移植後の重篤な難治疾患であり、眼瞼癒着を伴う重症ドライアイなどの重篤な眼表面障害をきたす。造血幹細胞移植は血液悪性疾患の根治療法として確立され、自己免疫疾患や血管再生医療へ適応の拡大により、移植後の晩期合併症としての眼 GVHD 難治例に対する対策の重要性が増している。そのため眼 GVHD の発症機構、病態形成過程の解明、新規治療法の開発が医学的にも社会的にも急務である。

## 2. 研究の目的

申請者は造血幹細胞移植患者涙腺 GVHD と酷似しているマウス GVHD モデルを用いて、次の3点の研究目標を達成することを目的とした。

- 1) GVHD におけるドナー由来線維芽細胞の細胞源の解明
- 2) ドナー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
- 3) GVHD 炎症および線維化形成における分子機構の解明と治療法の開発

## 3. 研究の方法

平成 20 年度計画

B10.D2 male(H-2d) マウスの骨髄細胞と脾臓細胞を、放射線照射後の female BALB/c(H-2d) レシピエントマウスに移植し慢性 GVHD モデルを作成する。(Zhang Y, J Immunol. 2002)

ドナー由来線維芽細胞の細胞源の除去およびドナー間葉系幹細胞 (MSC) 移植による線維化の評価については標準の移植の病態形成評価と同様、組織切片において mallory 染色にて線維化の面積を定量的に比較した。

### 1) ドナー由来の線維芽細胞の起源の検討

移植する骨髄細胞の中から病態形成に関わる線維芽細胞の起源となりえる細胞として造血幹細胞、間葉系幹細胞、SP 細胞等を単離して、マグネットセルソーティング法にて選択的に除去して移植または造血幹細胞、間葉系幹細胞を単離して移植する。3 週と 8 週で解析して標準の骨髄移植で認められた線維化の進行が形成されるか抑制されるかを検討した。

21年度以後

### 2) ドナー由来の線維芽細胞による眼GVHD発症と病態形成にかかわる役割

GVHD 涙腺結膜で増加しているドナー由来線維芽細胞の由来を明らかにする手法は、人涙腺でドナーとレシピエントのミスマッチ遺伝子に着目し検出する手法を習得し確立している。コラーゲン特異的分子シャペロンの heat shock protein 47 (HSP47) が線維芽細胞の有用なマーカーとなることを確認し、さらに GVHD 組織における、male のマウスのみ

に発現する Y 染色体遺伝子 Fluorescein in situ hybridization (Y-FISH) 法と免疫染色との併用により、GVHD マウスモデルにおいてドナー由来線維芽細胞の検出を試みた。

次に、ドナー由来線維芽細胞の候補となる細胞源の除去移植を施行し移植前と3週と8週で解析し、線維化面積の検討し単位面積あたりのドナー由来線維芽細胞の数の比較をした。

さらに、ドナーの B10D2 (H-2d) GFP マウス骨髄より、間葉系幹細胞、造血幹細胞、SP 細胞をそれぞれ分離して、wild type の全骨髄細胞と、マウス GFP 陽性各種幹細胞のそれぞれ分画を野生型マウスの全骨髄細胞と同時に移植して、眼 GVHD 病変部での GFP 陽性間葉系幹細胞の局在、遊走部位および病態形成への経時的かかわりを直接的に証明することを試みた。ドナー由来線維芽細胞を GFP と HSP47 の共発現でドナー由来線維芽細胞を検出し、発症機構と遊走経路を含め解析を試みた。

### 3) GVHD 炎症および線維化形成における分子機構の解明と治療法の開発

#### ケモカインの関与の検討

本研究ではGVHD涙腺結膜組織と、すでに樹立が成功しているGVHD培養涙腺、結膜線維芽細胞株を用いてSDF-1とSLCなどのケモカインおよびCXCR4とCCR7などのケモカインレセプターについてmRNAが発現されているかをRT-PCR, real time PCRを用いて検討した。

#### サイトカインの関与の検討

線維化に密接に関わるTGF- $\beta$ , CTGF等の

発現の検討と和抗体を移植後1日目、6日目に投与して、線維化抑制およびドナー由来線維芽の浸潤の有無を単位面積あたりで検討する。

以上の変化を経時的に解析してドナー由来線維芽細胞の病態形成への関わりを検証する。眼所見では、経時的に涙液量を測定し、病態進展との関係を判定した。

#### 4. 研究成果

##### 1) GVHDにおけるドナー由来線維芽細胞の細胞源の解明

B10.D2 male(H-2d) マウスの骨髄細胞と脾臓細胞を、放射線照射後の female BALB/c(H-2d) レシピエントマウスに移植し慢性 GVHD モデルを作成した。(Zhang Y, J Immunol. 2002) マウス涙腺結膜には、これは今までの人検体で得られた GVHD 病変の過剰な線維化、炎症性細胞浸潤、ドナー由来線維芽細胞の存在とその活性化の4点においてその所見を忠実に再現していることを確認した。

ドナー由来線維芽細胞の細胞起源を検討するために、移植する骨髄細胞の中から病態形成に関わる線維芽細胞の起源となりえる細胞として造血幹細胞、間葉系幹細胞、SP 細胞等を候補にあげ、マグネットセルソーティング法にて選択的に除去して移植した。3 週と 8 週で解析して標準の骨髄移植で認められた線維化の進行がドナー間葉系幹細胞の除去にて抑制されることを見出した。

##### 2) ドナー由来の線維芽細胞による眼GVHD 発症と病態形成にかかわる役割

レシピエントの GVHD 涙腺、結膜の線維化とドナー由来線維芽細胞浸潤数の程度を組織学的に検討し、有意差をもってドナー間葉系幹細胞移植において線維芽細胞数が増加していた。

さらに、現在、作成が完成したドナーの B10D2 (H-2d) GFP マウス骨髄より、間葉系幹細胞、造血幹細胞、SP 細胞をそれぞれ分離して、wild type の全骨髄細胞と、マウス GFP 陽性各種幹細胞のそれぞれ分画を野生型マウスの全骨髄細胞と同時に移植した。眼、小腸、皮膚において GVHD 病変部での GFP 陽性間葉系幹細胞の局在、遊走部位および病態形成への生着を証明した。FP と HSP47 の共発現でドナー由来線維芽細胞を検出した。

##### 3) GVHD 炎症および線維化形成における分子機構の解明と治療法の開発

###### ケモカインの関与の検討

GVHD涙腺組織における IL-6, TGF  $\beta$  について発現を確認した。

眼所見では、経時的に涙液量を測定し、GVHDおよびドナー間葉系幹細胞移植において8週時にコントロールに比して有意に涙液減少が生じていることが判明した。

発現が亢進している分子について抑制実験を解析検討中であり新規治療にむけて予備検討を重ねている。

本研究期間に下記研究助成に採択された。  
平成 21 年度日本女医会学術研究助成  
平成 22 年度日本医師会医学研究助成

#### 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9件)

1. Inagaki E, Ogawa Y\*, Matsumoto Y, Kawakita T, Shimmura S, Tsubota K. Four cases of corneal perforation in patients with chronic graft-versus-host disease. *Mol. Vis.* 17:598-606 (2011). (\*Corresponding author) 査読有
2. Ogawa Y, Shimmura S, Dogru M, Tsubota K. Immune processes and pathogenic fibrosis in ocular chronic graft versus host disease and clinical manifestations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ocular graft versus host disease. Cornea.* 29: s68-s77 (2010). 査読有
3. Wang Y, Ogawa Y\*, Dogru M, Tatematsu Y, Uchino M, Kamoi M, Okada N, Okamoto S, and Tsubota K. Baseline profiles of ocular surface and tear dynamics after

allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with or without chronic GVHD-related dry eye. *Bone Marrow Transplant.* **45**:1077-1083 (2010). (\* Corresponding author) 査読有

4. Ogawa Y\*, Dogru M, Uchino M, Tatematsu Y, Kamoi M, Yamamoto Y, Ogawa J, Ishida R, Kaido M, Hara S, R, Matsumoto Y, Kawakita T, Tsubota K. Topical tranilast for treatment of the early stage of mild dry eye associated with chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* **45**:565-569 (2010). (\*Corresponding author) 査読あり

5. Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Yoshida S, Kawakami Y, Tsubota K. Epithelial mesenchymal transition in human ocular chronic graft-versus-host disease. *Am. J. Pathol.* **175**:2372-2381 (2009). 査読有

6. Ban Y, Ogawa Y\*, Goto E, Uchino M, Terauchi N, Seki M, Nakaya M, Saiki M, Mori T, Okamoto S, Matsumoto Y, Dogru M, Shimazaki J, Tsubota K. Tear function and lipid layer alterations in dry eye patients with chronic graft-vs-host disease. *Eye.* **23**:202-208 (2009). (\*Corresponding author)

査読有

7. Ogawa Y, Shimmura S, Kuwana M, Yamazaki K, Kawakami Y, Tsubota K. Mini-review. Inflammation and pathogenic fibrosis in human ocular chronic graft versus host disease. *Inflammation and regeneration.*

**28**:533-540 (2008). 査読有

### 日本語 総説、執筆

1. 小川葉子 : 総説 造血幹細胞移植後の眼合併症 *Frontiers in dry eye 涙液からみたオキュラーサーフェス Frontiers in dry eye* 5;22-29 ; 2010 査読無

2. 小川葉子 ; 重症ドライアイの治療 *Frontiers in Dry Eye. メディカルレビュー社* 3:43-48;2008. 査読無

[学会発表](計17件)

### 国際学会

1. Ogawa Y. Symposium 22. Cicatrizing ocular surface disease. GVHD dry eye. The 2<sup>nd</sup> Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting. Kyoto, Japan, 1-3, Dec, 2010.

2. Ogawa Y, Shimmura Y, Morikawa S, Mabuchi Y, Inaba T, Okano H, Matsuzaki Y, Tsubota K : Bone marrow mesenchymal stem cells trigger pathogenic fibrosis in chronic graft-versus-host-disease. 6<sup>th</sup> International Conference on the Tear Film & Ocular Surface; Basic Science and Clinical Relevance. Florence, Italy, Sep 22-25, 2010

3. Ban Y, Ogawa Y, Ibrahim OMA, Tatematsu Y, Dogru M, Tsubota K. Morphologic evaluation of meibomian glands in chronic graft-versus-host disease. 6<sup>th</sup> International Conference on the Tear Film & Ocular Surface; Basic Science and Clinical Relevance. Florence, Italy, Sep 22-25, 2010

4. Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Inaba T, Okano H, Matsuzaki Y, Tsubota K. Donor fibroblast chimerism in animal model of ocular chronic graft versus host disease. The Association of Research for Vision and Ophthalmology (ARVO) 2010. Fort Lauderdale, FL, USA May 2-6, 2010
5. Ogawa Y, Shimmura S, Morikawa S, Mabuchi Y, Inaba T, Okano H, Matsuzaki Y, Tsubota K. Bone marrow mesenchymal stem cells trigger pathogenic fibrosis in chronic graft-versus-host disease. Gordon Conference. 1<sup>st</sup> Biology & Pathobiology of the Cornea. March 7-12, 2010. Ventura, CA, USA.
6. Ogawa Y. Symposium 【Theme: Ocular Surface Allergy & Immunology】 Immune Processes and Pathogenic Fibrosis in Ocular Chronic Graft versus Host Disease The 15<sup>th</sup> Annual Meeting of Kyoto Cornea Club Dec, 4<sup>th</sup>, 2009, Kyoto, Japan
7. Ogawa Y, Shimmura S, Inaba T, Okano H, Kawakami Y, Tsubota K. Analysis of pathogenic fibrosis in animal model of ocular chronic graft versus host disease. The 9<sup>th</sup> world congress of inflammation. July, 7<sup>th</sup>, 2009, Tokyo, Japan
8. Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Okano H, Kawakami K, Tsubota K. Epithelial-Mesenchymal Transition of Conjunctival Basal Epithelia in Human

Chronic Graft versus Host Disease. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO2008), Annual meeting, April 27-May 1, 2008. Florida, USA.

#### 国内学会

1. 小川葉子, 榛村重人, 森川 暁, 馬淵 洋, 谷口智恵, 鈴木禎史, 河上 裕, 岡野英之, 松崎有未, 坪田一男; 眼慢性移植片対宿主病におけるドナー由来線維芽細胞の細胞源の検討 角膜カンファレンス 2011 平成 23 年 2 月 18 日 東京
2. 小川葉子 第 6 回ドライアイリサーチアワード受賞講演 Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Yoshida S, Kawakami Y, Tsubota K. Epithelial mesenchymal transition in human ocular chronic graft-versus-host disease. *Am J Pathol.* 2009;175(6):2372-2381. オキュラサーフェス専門別研究会 第 64 回日本臨床眼科学会 神戸 平成 22 年 11 月 12-15 日
3. 小川葉子, 榛村重人, 川北哲也, 吉田悟, 河上 裕, 坪田一男 眼慢性移植片対宿主病における上皮間葉転換 第 30 回日本炎症再生医学会 平成 22 年 8 月 5-6 日
4. 小川葉子 シンポジウム 4 眼表面サイエンスの最前線 眼表面炎症と上皮-間葉転換 第 114 回日本眼科学会総会 名古屋平成 22 年 4 月 15-18 日
5. 小川葉子; シンポジウム ドライアイの上流のリスクファクター 全身の免疫炎症 第 3 回箱根ドライアイクラブ 平成 21 年 6

月 19 日 箱根

6. 小川葉子；要望演題 4 造血幹細胞移植後の眼合併症の診療と治療 第7回九州BMT研究会 平成21年2月21日 福岡
7. 小川葉子，榛村重人，稲葉隆明，河上裕，岡野栄之，坪田一男；マウス涙腺慢性移植片対宿主病モデルにおける病的線維化の発症と進展機序の解析 第113回日本眼科学会総会 平成21年4月16日 東京
8. 小川葉子，榛村重人，森川 暁，鈴木禎史，稲葉隆明，河上裕，岡野栄之，松崎有未，坪田一男；マウス慢性移植片対宿主病における線維化病変の検討 第8回日本再生医療学会 平成21年3月6日 東京
9. 小川葉子，榛村重人，川北哲也，河上裕，岡野栄之，坪田一男；慢性移植片対宿主病の結膜上皮における上皮間葉系移行 第32回角膜カンファレンス 平成20年2月28日 東京

〔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

なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

小川 葉子 (OGAWA YOKO)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：30160774

##### (2)研究分担者

榛村重人 (SHIMMURA SHIGETO)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：00235780

##### (3)連携研究者

松崎 有未 (MATSUZAKI YUMI)  
慶應義塾大学・医学部・准教授  
研究者番号：50338183

坪田一男 (TSUBOTA KAZUO)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：40163878