

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～2009
 課題番号：20790735
 研究課題名 (和文) 急性移植片対宿主病における分子マーカーの定量系の確立及びその機能解析
 研究課題名 (英文) Development of the quantitative method and the analysis of function of the molecular marker for acute graft-versus-host disease.
 研究代表者
 山本 雅樹 (YAMAMOTO MASAKI)
 札幌医科大学・医学部・助教
 研究者番号：80404664

研究成果の概要 (和文)：急性移植片対宿主病 (GVHD) における分子マーカーとしてケモカイン CCL8 について検討した。重症度の異なる GVHD マウスモデルを作製し、血漿中の CCL8 を ELISA 法により定量した。次に白血球混合培養を応用した *in vitro* での CCL8 発現系を確立し、CCL8 の発現機序解析を行った。さらに蛍光免疫染色により CCL8 の発現細胞の同定を行った。また Toll-like receptor (TLR) 刺激の CCL8 発現へ関与も検討した。

研究成果の概要 (英文)：We studied about chemokine CCL8 as a biomarker of acute graft-versus-host disease (GVHD). We developed ELISA for plasma CCL8 level in the GVHD mouse models. We analyzed the expression mechanism of CCL8 using *in vitro* and *in vivo* model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：血液学、造血幹細胞移植、移植片対宿主病、バイオマーカー、ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は血液腫瘍のみならず、悪性腫瘍、先天性免疫不全、代謝疾患などの根治療法としてその適応が拡大している。移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) は造血幹細胞移植の成否を左右する重大な合併症である。我々はプロテオミクス技術を用いて GVHD の分子マーカー候補タンパクをケモカイン CCL8 と同定した。マウス及びヒトの血漿中で CCL8 濃度は GVHD

特異的に上昇し、シクロスポリンによる免疫抑制療法により低下し、GVHD の有用な診断マーカーとしての可能性が示された。しかしながら GVHD 病態における CCL8 の役割は明らかになっていない。

2. 研究の目的

GVHD マウスモデルを用いて CCL8 タンパクを定量的に検討し、GVHD 病態における CCL8 の動態を明らかにする。また CCL8 産

生細胞の同定、CCL8の発現機序解析を行いGVHD病態におけるCCL8の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 重症度の異なるGVHDマウスモデルの作製：レシピエントをBALB/cマウス、ドナーをC57BL/6マウスとし8.25Gyの全身放射線照射後に骨髓細胞 2×10^7 個を移植しGVHDモデルとした。骨髓細胞に追加して0.1, 0.5, 1×10^7 個のドナー脾臓細胞を追加移植することで異なる重症度のGVHDマウスモデルを作製した。

(2) GVHDマウスモデル血漿を用いたCCL8の定量：GVHDマウスモデルの血漿中CCL8をマウスCCL8タンパクに特異的な抗体を使用し、ELISA法による定量系を確立した。

GVHDマウスモデルにおける血漿中CCL8濃度を経時的に測定し、GVHD病勢とCCL8濃度の関連を検討した。

(3) ヒト臨床検体におけるCCL8定量性の確認：札幌医大小児科で保存されていた同種造血細胞移植後の血清サンプルを用いてELISA法によりCCL8の定量を行った。

(4) *in vitro*でのCCL8タンパクの発現機序解析

① *in vitro*でのCCL8タンパクの発現系の確立：GVHDマウスモデルと同様の組み合わせによりレシピエント側樹状細胞とドナー側の脾臓細胞により*in vitro*でのCCL8タンパクの発現系を確立した。

② CCL8発現にかかわる細胞の絞り込み：ドナー側脾臓細胞を磁気ビーズ法により分離し、CCL8発現にかかわる細胞を絞り込みもっともシンプルなCCL8発現系を確立した。

③ CCL8発現にかかわるサイトカインの同定Real-timePCRによりCCL8のmRNAに先行して発現するサイトカインのmRNAを同定した。またこれらの中和抗体をCCL8発現系に加えることにより、CCL8発現抑制効果を確認し、CCL8の発現を誘導するサイトカインを同定した。

④ *in vitro*CCL8発現系を用いたCCL8産生細胞の同定：*in vitro*CCL8発現系から細胞を回収し、蛍光免疫染色により*in vitro*におけるCCL8産生細胞を同定した。

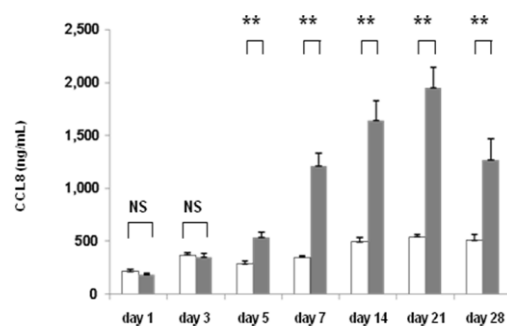
(5) CCL8発現機序におけるToll-like receptor(TLR)の関連の検討：CCL8の発現機序におけるTLRの関連を検討するためにBalb/cマウスに各種TLRのリガンドを投与し血漿中CCL8を定量した。またTLR刺激伝達経路に含まれるMyD88ノックアウトマウスを用いてGVHDマウスを作製、CCL8発現が見られるかどうかを検討した。

4. 研究成果

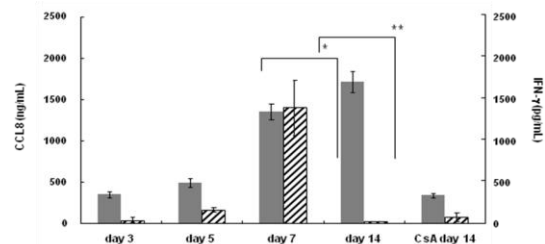
(1) 重症度の異なるGVHDマウスモデルの作製：ドナー脾臓細胞を追加移植することによりGVHD臨床症状の悪化、生存期間の短縮など、重症度の異なるGVHDマウスモデルを作製することに成功した。

(2) GVHDマウスモデルの血漿中CCL8をマウスCCL8タンパクに特異的な抗体を使用し、ELISA法による定量系を確立した。マウス血漿中のCCL8タンパク検出感度は7.81-5000 pg/mLであった。これによりGVHDマウスの血漿中CCL8タンパクを定量的に評価することが可能となった。

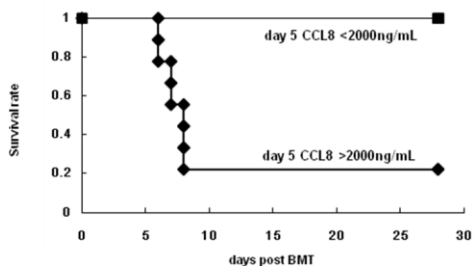
GVHDマウスモデル血漿中でCCL8は移植後5日目から有意に高値を示し、GVHDの病勢に一致して高値を維持した。(グレー：GVHDマウス、白：コントロールマウス)



IFN- γ との比較ではIFN- γ が移植後7日目をピークとして自然に低下するのにに対しCCL8はシクロスポリンA(CsA)の投与を行わない限り高値を維持し、GVHDのバイオマーカーとしてより有用であると考えられた。血漿中CCL8はCsAによる治療に反応して低下することから治療反応性を評価可能なバイオマーカーとなる可能性が示された。(グレー：血漿中CCL8, 斜線：血漿中IFN- γ)



移植後5日目の血漿中CCL8濃度は移植後14日目の臨床的、病理学的GVHDスコアと正の相関関係にあり、移植後5日目のCCL8濃度が高値を示す群では移植後28日目の生存率が低いことが明らかとなった。

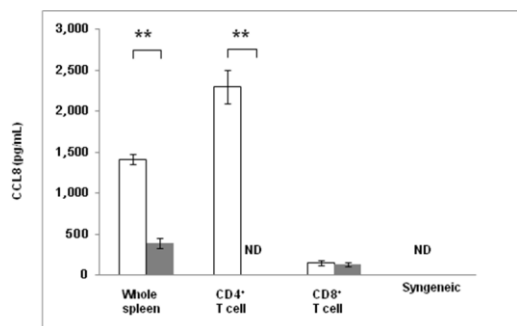


(3) ヒトにおいてもマウスと同様GVHD群で血清CCL8が高い傾向を認めた。個々の症例の検討では、種々の免疫抑制剤による治療でCCL8の低下が見られた。GVHD発症早期のCCL8濃度はGVHDの重症度と相関を示す可能性が示された。(図なし)

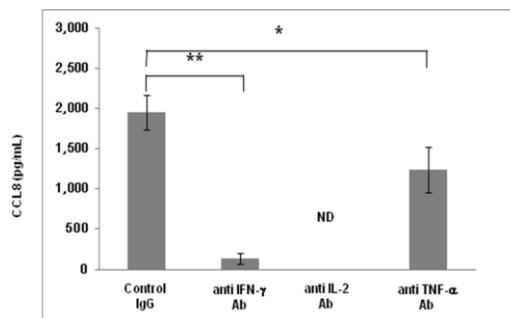
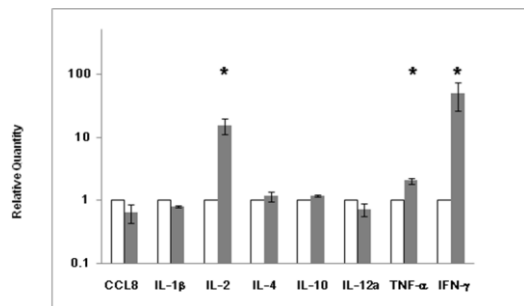
(4)

①レシピエント由来樹状細胞とドナー由来脾臓細胞の白血球混合培養により、in vitroでのCCL8発現系を確立した。

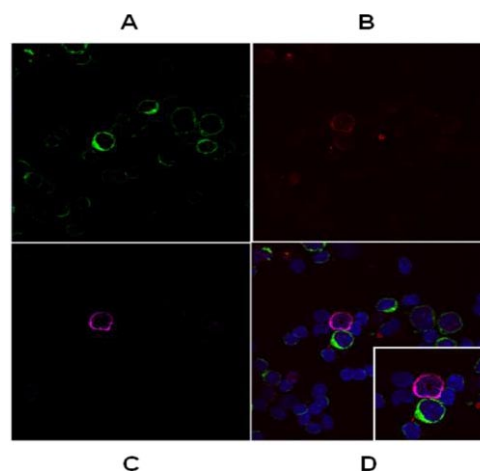
②レシピエント由来樹状細胞とドナー由来CD4陽性T細胞のみでCCL8タンパクは発現し、MHC classIIをブロックすることでCCL8の発現は低下した。(白:anti-MHC classII抗体なし、グレー:anti-MHC classII抗体あり)



③real-time PCRによる検討ではCCL8に先行して発現するサイトカイン mRNAはIL-2, IFN- γ , TNF- α であった。これらの中和抗体を添加することによってCCL8濃度は低下した。以上よりCCL8の発現にはIL-2, IFN- γ , TNF- α が関与していることが明らかとなった。(白:コントロール、グレー:MHCの異なる組み合わせによる白血球混合培養)



④in vitro CCL8発現系から細胞を回収し、蛍光免疫染色にてin vitroにおけるCCL8発現細胞を同定した。その結果MHCの異なるCD4陽性T細胞の刺激を受けたレシピエント由来樹状細胞がCCL8を産生していることが明らかとなった。



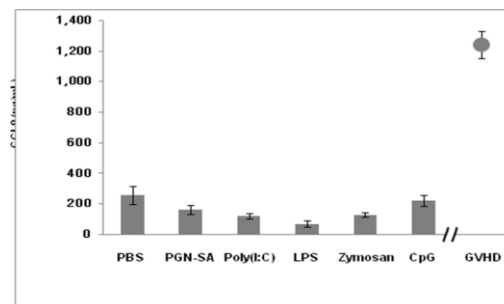
A:CD4陽性細胞(緑)

B:CD11c陽性細胞(赤)

C:CCL8陽性細胞(マゼンダ)

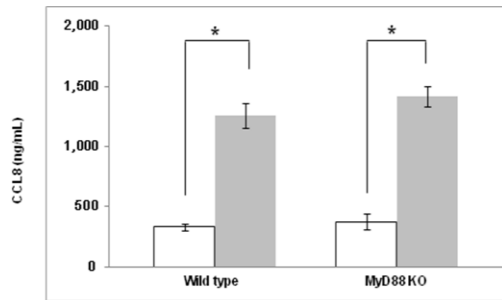
D:合成イメージ

(5)Balb/cマウスに各種TLRのリガンドを投



与し血漿中CCL8を定量した。その結果TLR刺激ではCCL8タンパクの発現は誘導されなかった。

またMyD88ノックアウトマウスを用いたGVHDマウスモデルではCCL8の発現は見られ、CCL8発現にMyD88分子は必須ではないことが示された。(白:コントロールマウス、グレー:GVHDマウス)



これらの結果により CCL8 は移植後の感染症と GVHD を鑑別可能なバイオマーカーとなる可能性が示された。

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 1 件)

- (1) Ota A, Yamamoto M, Hori T, Miyai S, Naishiro Y, Sohma H, Maeda M, Kokai Y. Upregulation of plasma CCL8 in mouse model of graft-versus-host disease. *Exp.Hematol* 2009, 37(4):523-531. 査読あり。

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 欧州骨髓移植学会(EBMT2010)
2010年3月22日(ウィーン)
Yamamoto M, Ota A, Hori T, Imai S, Sohma H, Suzuki N, Hatakeyama N, Inazawa N, Tsutsumi H, Kokai Y. CCL8 as a biomarker intimately associated with murine Graft-versus-host disease (GVHD)
- (2) 第71回日本血液学会総会(京都)
2009年10月24日
山本雅樹, 太田明伸、小海康夫、堀 司、畠山直樹、鈴木信寛、堤 裕幸
マウスモデルを用いた GVHD バイオマーカー候補 CCL8 の発現機序解析

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：宿主対移植片疾患の検査方法

発明者：山本 雅樹

権利者：札幌医科大学

種類：特願

番号：2009-195951

出願年月日：平成 21 年 8 月 26 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅樹 (YAMAMOTO MASAKI)

研究者番号：80404664