

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17366

研究課題名(和文)慢性移植片対宿主病と肝類洞閉塞症候群に対する線維化特異的バイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Development of fibrosis specific biomarker for graft-versus-host disease

研究代表者

大東 寛幸(Ohigashi, Hiroyuki)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：20845284

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)：同種造血細胞移植は造血器腫瘍への根治的治療法だが、移植片対宿主病(Graft-versus-Host disease; GVHD)は重大な合併症である。過去にheat shock protein 47 (HSP47)が慢性GVHDモデルマウスの線維化で治療標的となることを明らかにしており、血清HSP47が線維化のバイオマーカーとなるかをGVHDモデルマウスを用いて検討した。本研究ではHSP47のバイオマーカーとしての有用性を示せなかったが、肝臓に浸潤するマクロファージから産生されるTGF β が胆管上皮の組織幹細胞を傷害すること、一過性疲弊T細胞が慢性GVHDの責任細胞であることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同種造血細胞移植は難治性造血器腫瘍への根治的治療法だが、移植片対宿主病(Graft-versus-Host disease; GVHD)は治療の成否や患者の長期のQOLに関わる重要な合併症である。本研究で線維化特異的バイオマーカーの開発には至らなかったが、急性GVHDの主要な標的臓器である肝臓GVHDの病態が明らかになることで、慢性GVHDへの移行が低下する可能性がある。また、一過性疲弊T細胞が慢性GVHDの責任細胞であることが明らかになったことで、新たなGVHD予防法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is a curative treatment for hematologic malignancies, but graft-versus-host disease (GVHD) remains a serious complication. Previous studies have demonstrated that heat shock protein 47 (HSP47), a fibrosis-specific molecular chaperone, is highly expressed in a chronic GVHD model mouse and may serve as a therapeutic target. This study investigated whether serum HSP47 could be a biomarker for assessing the indication of antifibrotic therapy using a GVHD model mouse. Although the utility of HSP47 as a biomarker could not be demonstrated, it was revealed that TGF β produced by macrophages infiltrating the liver injures the tissue stem cells of the bile duct epithelium and that transiently exhausted T cells are the responsible cells in chronic GVHD.

研究分野：hematopoietic cell transplantation

キーワード：HSP47 transplantation

1. 研究開始当初の背景

HSP47 は 1980 年代に発見されたコラーゲン特異的分子シャペロンであるが、病態との関連に着目した研究は 1990 年代以降に進み、肝硬変や肺線維症などで HSP47 が高発現することが報告された(Masuda H, et al; *J Clin Invest* 1994, 94: 2481, Kakugawa T, et al; *Eur Respir J*, 2004, 24: 57). 現在も HSP47 と疾患との関連の報告は相次いでおり、近年では様々な癌において HSP47 が高発現していることが報告され、治療ターゲットとして注目を集めている(Duarte BDP, Bonatto D; *J Cancer Res Clin Oncol* 2018, 144:2319). HSP47 は細胞内に存在する分子シャペロンであるがマウス皮膚線維症モデル及び全身性強皮症患者の血清において HSP47 が上昇することが知られている(Chu H, et al; *Protein Cell* 2015, 6: 589). 慢性 GVHD におけるバイオマーカーの研究では ST2, CXCL9, MMP3, OPN の 4 種類を組み合わせた panel 診断の有用性を示唆する研究(Yu J, et al. *J Clin Oncol* 2016, 34: 2583)や CXCL10 の有用性を示唆する研究などが報告されている(Karimnia A, et al; *Blood* 2016, 127: 3082). しかし、GVHD での血清 HSP47 を検討する研究は行われておらず線維化を直接反映するバイオマーカーとなり得るという点で本研究は非常に新規性が高い研究であると考えた。さらに我々は以前の研究において HSP47 が慢性 GVHD モデルマウスの線維化を来した臓器で高発現し、small interfering RNA (siRNA) を含有したビタミン A 結合リポソーム(vitamin A coupled liposome containing HSP47 siRNA; VA-lip HSP47)を投与することで線維化の改善が得られることを報告していた。抗線維化薬の VA-lip HSP47 の有効性が期待できる患者の層別に役立てることができる可能性も考慮して本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

慢性 GVHD の診断は NIH consensus 2014 を用いて、その臨床的徴候を根拠に診断するが、急性 GVHD が肝臓・皮膚・腸管の 3 臓器に発症し、比較的均一な疾患であるのに対し、慢性 GVHD は罹患臓器が多様で臨床症状が多彩な疾患であり、診断に苦慮する場合も少なくない。さらに慢性 GVHD の診断では病理検査が偽陰性となることもあり、診断に苦慮する一因となる(Shulman HM, et al; *Biol Blood Marrow Transplant* 2015, 21: 589). 慢性 GVHD のバイオマーカーとして CXCL9, ST2, MMP3, osteopontin, CXCL10, CXCL11, CD163 などが報告されている(Wolff D, et al; *Bone Marrow Transplant* 2018, 53: 832). しかし、これらのバイオマーカーは線維化を直接反映するバイオマーカーではないので、過度な免疫抑制療法を行わずに線維化治療薬を有効に適用するための線維化特異的バイオマーカーの開発が必要となる。近年、全身性強皮症の患者血清で HSP47 が上昇していることが報告されており(Chu H, et al; *Protein Cell* 2015, 6: 589)、HSP47 は線維化を主体とする慢性 GVHD でもバイオマーカーとして有用な可能性がある。HSP47 がどのような慢性 GVHD 患者で上昇するかを検討することで慢性 GVHD を線維化を主体とするタイプ 炎症を主体とするタイプに分類し、過度な免疫抑制を避けた治療アルゴリズムを提唱するために本研究を立案した。過度な免疫抑制を避けることは感染合併症の抑制のみでなく、抗腫瘍免疫を過度に抑制しないことにも繋がるため同種移植後の造血器悪性腫瘍の再発抑制にも繋がる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では、慢性 GVHD モデルマウスを利用して移植後 day+7, +14, +21, +28, +35 と各時期のマウス血清を採取して血清 HSP47 値と慢性 GVHD の重症度の関連について評価した。また、急性 GVHD モデルマウスでも検討を行い、肝臓や脾臓の T 細胞をフローサイトメトリーにて解析した。さらに、肝臓の病理学的検討や肝臓オルガノイドの作成を行い、オルガノイド形性能の評価を行った。

4. 研究成果

(1)慢性 GVHD モデルでの血清 HSP47 について

慢性 GVHD モデルマウスを用いて移植後 day+7, +14, +21, +28, +35, +42 と各ポイントで血清を採取し、ナイーブマウスの血清も加えて ELISA 法を用いて HSP47 の測定を行った。しかし、どのタイムポイントにおいても血清 HSP47 の有意な上昇を認めることはなかった。そこで、ELISA 試薬を変更して改めて HSP47 の測定を行ったが同様に有意な上昇を認めることはなかった。

(2)急性 GVHD モデルマウスでの血清 HSP47 について

モデルマウスを変更して急性 GVHD モデルマウスを用いた実験を行うこととした。急性 GVHD モデルマウスは肝中心静脈閉塞症モデルマウスとしても用いられており、HSP47 の上昇が認められる可能性があると考えて血清の測定を行うこととした。day+14, day21 の血清を採取し、HSP47 の測定を行ったが、同様にマウス血清で HSP47 の上昇を確認することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Senjo Hajime, Harada Shinpei, Kubota Shimpei I., Tanaka Yuki, Tateno Takahiro, Zhang Zixuan, Okada Satomi, Chen Xuanzhong, Kikuchi Ryo, Miyashita Naoki, Onozawa Masahiro, Goto Hideki, Endo Tomoyuki, Hasegawa Yuta, Ohigashi Hiroyuki, Ara Takahide, Hasegawa Yoshinori, Murakami Masaaki, Teshima Takanori, Hashimoto Daigo	4. 巻 142
2. 論文標題 Calcineurin inhibitor inhibits tolerance induction by suppressing terminal exhaustion of donor T cells after allo-HCT	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 477 ~ 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2023019875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chen Xuanzhong, Hashimoto Daigo, Ebata Ko, Takahashi Shuichiro, Shimizu Yu, Shinozaki Ryuga, Hasegawa Yuta, Kikuchi Ryo, Senjo Hajime, Yoneda Kazuki, Zhang Zixuan, Harada Shinpei, Hayase Eiko, Ara Takahide, Ohigashi Hiroyuki, Iwakura Yoichiro, Nakamura Kiminori, Ayabe Tokiyoshi, Teshima Takanori	4. 巻 119
2. 論文標題 Reactive granulopoiesis depends on T-cell production of IL-17A and neutropenia-associated alteration of gut microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2211230119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuta Hasegawa, Daigo Hashimoto, Ryo Kikuchi, Zixuan Zhang, Hajime Senjo, Tomoko Sekiguchi, Eiko Hayase, Takahiro Tateno, Emi Yokoyama, Shuichiro Takahashi, Xuanzhong Chen, Kazuki Yoneda, Hiroyuki Ohigashi, Takahide Ara, and Takanori Teshima
2. 発表標題 GVHD Targets Organoid-forming Biliary Epithelial Stem Cells via a TGF- β -Dependent Manner
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会（福岡，10月15日）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hajime Senjo, Daigo Hashimoto, Shinpei Kubota, Yuki Tanaka, Shinpei Harada, Kazuki Yoneda, Zixuan Zhang, Xuanzhong Chen, Ryo Kikuchi, Yuta Hasegawa, Hiroyuki Ohigashi, Takahide Ara, Yoshinori Hasegawa, Masaaki Murakami, DVM., Ph.D. and Takanori Teshima
2. 発表標題 Calcineurin Inhibitors Inhibit Tolerance Induction By Suppressing Terminal Differentiation of Donor Exhausted T Cells after Allogeneic SCT
3. 学会等名 64th ASH Annual Meeting and Exposition, Oral presentation (New Orleans, 12月11日) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinpei Harada, Daigo Hashimoto, Hajime Senjo, Kazuki Yoneda, Zixuan Zhang, Xuanzhong Chen, Ryo Kikuchi, Masahiro Chiba, Hiroyuki Ohigashi, Takahide Ara, Masao Nakagawa, Masashi Suganuma, Rick C. Tsai, and Takanori Teshima.
2. 発表標題 Intercellular Mitochondrial Transfer Enhances Metabolic Fitness and Anti-Tumor Effects of CAR T Cells
3. 学会等名 64th ASH Annual Meeting and Exposition, Oral presentation (New Orleans, 12月11日) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------