

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17373

研究課題名(和文)慢性GVHD発症機序の探索 -リコモジュリンの慢性GVHD予防機序解明を通して-

研究課題名(英文)The preventive mechanism of recombinant thrombomodulin for sclerodermatous chronic GVHD in the rodent model.

研究代表者

藤木 俊寛 (Fujiki, Toshihiro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：40823555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植は、白血病などの難治性造血器腫瘍の根治的治療法であるが、重篤な合併症である移植片対宿主病(Graft-Versus-Host-Disease: GVHD)を伴う。申請者は、マウスを用いた移植実験で、日本発の画期的なDIC治療薬であるリコモジュリンが皮膚慢性GVHDを抑制できることを証明した。その作用機序は、慢性GVHD発症機序として既に明らかとなっている全身や皮膚局所の炎症細胞・サイトカインの抑制ではなかった。慢性GVHDの発症には、リコモジュリンが制御しうる未だ明らかとなっていない炎症機序が関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性GVHDの治療で使用されるステロイドや免疫抑制薬は、全身の免疫反応を抑制し、造血幹細胞移植の最大の目的である移植片対腫瘍効果を減弱させ再発を来たしうる。一方リコモジュリンは、これまでの実験から炎症細胞・サイトカインに作用しないことが示されており、GVT効果を損なわない理想的な皮膚慢性GVHD予防法となりえる。今後さらなる実験を経て、慢性GVHDの発症にリコモジュリンが制御しうる未だ明らかとなっていない炎症機序が明らかとなれば、慢性GVHDの新たな制御法開発につながり、最終的に安全な移植治療の確立に資する。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cell transplantation, the curative treatment for refractory hematopoietic malignancies such as leukemia, could develop serious complication including Graft-Versus-Host-Disease (GVHD). Recombinant thrombomodulin, the drug for DIC developed in Japan, had been proven to prevent Sclerodermatous chronic GVHD in the rodent models.

Its mechanism was not the suppression of systemic or local inflammatory cells and cytokines, which had already been clarified as the pathogenic mechanism of chronic GVHD. The pathogenesis of chronic GVHD was thought to involve an unknown inflammatory mechanism that could be controlled by recombinant thrombomodulin.

研究分野：小児血液がん

キーワード：造血幹細胞移植 慢性GVHD リコンビナント・トロンボモジュリン マウス

1. 研究開始当初の背景

難治性造血器腫瘍の根治的治療法として造血幹細胞移植は確立されているが、重篤な合併症である移植片対宿主病(Graft-Versus-Host-Disease: GVHD)を伴う。成人と異なり小児は移植後も長期生存を期待するため、生命予後に影響を及ぼす慢性 GVHD を発症させない移植治療の開発が必要である。

リコモジュリン(rTM)は抗凝固・抗炎症作用を併せ持つ日本発の画期的な DIC 治療薬である。既に臨床でも、移植後急性期の凝固・血管障害に関連した合併症(DIC・SOS・TMA)への有効性が報告されており、かつ多様な抗炎症作用も併せ持つことから、慢性炎症・複雑な免疫反応が関与する慢性 GVHD に対しても効果があるのではと考えた。

申請者は、過去に皮膚慢性 GVHD モデルマウスに rTM を投与することにより皮膚病変の発症を予防することを報告した。その機序は全身性ではなく皮膚局所での作用と推定した。また、皮膚慢性 GVHD の病態に血管障害や凝固活性化の関与が新たに考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、rTM の皮膚慢性 GVHD 予防機序の解明である。本研究では、浸潤細胞の解析、および rTM の特徴的な作用である血管障害・凝固活性化の評価を行う。また、rTM は構成するドメイン毎に多様な抗炎症作用を持つことが明らかとなっている。皮膚慢性 GVHD 予防効果を示す rTM の責任ドメインを特定することで、慢性 GVHD 発症への、既知の細胞・サイトカイン以外の新たな発症機序を探索する。

3. 研究の方法

ドナーマウス(B10D2)から採取した脾臓細胞・骨髄細胞を、前処置として全身放射線照射されたレシピエントマウス(Balb/c)に輸注し、皮膚慢性GVHDモデルを作成する。

血管障害・凝固活性化を評価するため、皮膚病変が出現後の血漿FDPをELISAで測定する。皮膚局所での変化を検討するため、移植後の皮膚から細胞を採取し、細胞分画や、T細胞・マクロファージからのサイトカイン産生をフローサイトメトリーで測定する。また、病理にてrTMの代表的な抗炎症作用であるHMGB1の免疫染色も行う。

次に、慢性GVHD予防効果がリコモジュリンを構成するいずれのドメインにあるかを明らかにするため、移植後マウスにリコモジュリンの各ドメインを投与し皮膚変化を観察する。

4. 研究成果

実験結果：rTM 投与群のほうが、非投与群と比較し、皮膚 GVHD は有意に軽度だったが(図 1a)、血漿 FDP は有意差を認めなかった(図 1b)。

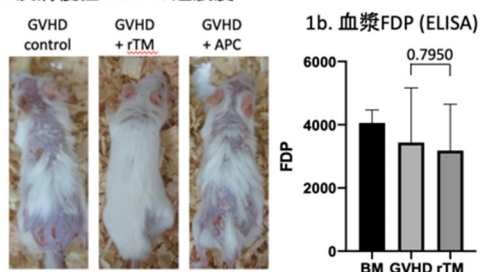
HMGB1 の免疫染色では rTM 投与群のほうが陽性細胞は少なかったが(図 2a)、血漿 HMGB1 は有意差を認めなかった(図 2b)。血漿 HMGB1 を低下させる作用をもつ活性化プロテイン C(APC)を投与した群は、血漿 HMGB1 は低下していたが(図 2b)、皮膚 GVHD は改善しなかった(図 1a)。

皮膚浸潤細胞の解析では、浸潤細胞数は rTM 投与群のほうが、非投与群と比較し明らかに少なかったが、細胞分画や線維化に関わるサイトカインである IL6・LAP の産生は有意差を認めなかった。各ドメインの比較では、ドメイン 1 が有意に皮膚 GVHD を軽減した(図 3)。

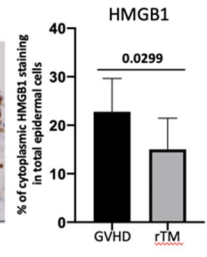
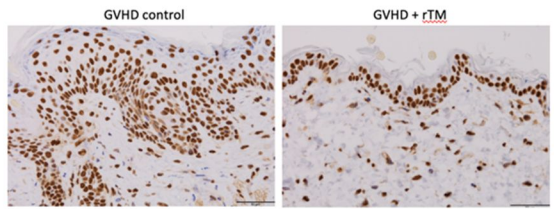
考察：rTM の皮膚慢性 GVHD 予防効果は、抗凝固作用によるものではなかった。その予防効果はドメイン 1 に由来することが明らかとなった。ドメイン 1 の最たる抗炎症作用は HMGB1 抑制作用だが、血漿 HMGB1 を低下させる APC を投与しても皮膚病変は改善しなかったことから、HMGB1 は皮膚慢性 GVHD の発症機序というよりは結果と考えられた。よって皮膚慢性 GVHD の発症に、ドメイン 1 が抑制する好中球・単球の内皮接着や、未だ明らかとなっていない抗炎症機序が関与している可能性が考えられた。

図

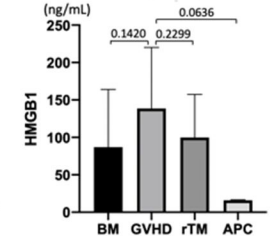
1a. 皮膚慢性GVHDの進展度



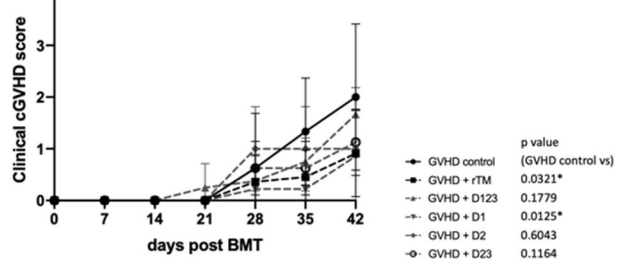
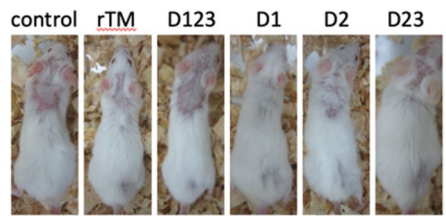
2a. 皮膚病理 HMGB1染色



2b. 血漿HMGB1 (ELISA)



3. ドメイン毎の比較



p value (GVHD control vs)

- GVHD + rTM: 0.0321*
- GVHD + D123: 0.1779
- GVHD + D1: 0.0125*
- GVHD + D2: 0.6043
- GVHD + D23: 0.1164

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------