

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17376

研究課題名（和文）ドナー骨髄由来M2マクロファージによる急性GVHDの新規治療

研究課題名（英文）Novel treatment of acute GVHD with donor bone marrow-derived M2 macrophages

研究代表者

花木 良（Hanaki, Ryo）

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40780408

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：難治性白血病治療の最後の砦である造血細胞移植において、移植片対宿主病（Graft-Versus Host disease; GVHD）は移植後免疫作用による重篤な合併症です。今回、ドナーマウス由来の細胞から誘導し作成した抑制性マクロファージを、患者に見立てたGVHDを発症するレシピエントマウスに投与することによって、GVHDの重症化を軽減することに成功しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GVHDに対する治療は主にステロイド、カルシニューリン阻害剤などの主にT細胞を標的とした免疫抑制剤が中心であり、長期に渡る内服継続によって生じる易感染性等の副作用や、それに加えてGVL効果の減弱などが問題となっており、新たな視点での新規治療の開発が待たれております。本研究結果は、GVHD発症機序に関する新たな知見となり、また、マクロファージを標的とした新しい視点での急性GVHD治療法の開発につながると考えます。

研究成果の概要（英文）：Graft-Versus Host disease (GVHD) is a serious complication of post-transplant immune effects in hematopoietic cell transplantation, the last resort in the treatment of refractory leukemia. In this study, we succeeded in reducing the severity of GVHD by inducing suppressive macrophages from cells derived from donor mice and injecting them into recipient mice that develop GVHD as if they were patients.

研究分野：造血細胞移植

キーワード：GVHD 造血細胞移植 M2 macrophage

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、自然免疫において中心的な役割を果たしているマクロファージは病原体の侵入の際に活性化してそれらの排除に働く classically activated macrophage (M1 マクロファージ)と、それらとは異なり、損傷治癒やアレルギー応答・脂肪代謝に関与し、腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) としても働き抗炎症作用をもつ alternatively activated macrophage (M2 マクロファージ) に分類される。加えて、疾患各々で関与するマクロファージの発現する遺伝子は異なっており、疾患特異的マクロファージという概念が提唱され、疾患別に関与するマクロファージの研究が進んでいる。しかし、造血細胞移植後の急性 GVHD に関しては、機能しているマクロファージのサブタイプ解析や、その T 細胞との関係性について不明であり、また、M2 マクロファージの直接的関与の有無について検証された報告は認めていない。

2. 研究の目的

GVHD に関わるマクロファージの特異性については未だ解明されていない。GVHD 発症に関与する炎症性 M1 マクロファージにおいて特異的に発現している遺伝子を探索し、その機能を阻害することによって抗炎症性 M2 マクロファージへ誘導する事によって、急性 GVHD を抑制することを目指す。マクロファージを標的とした新しい視点での急性 GVHD 治療法の開発が、本研究のテーマである。

3. 研究の方法

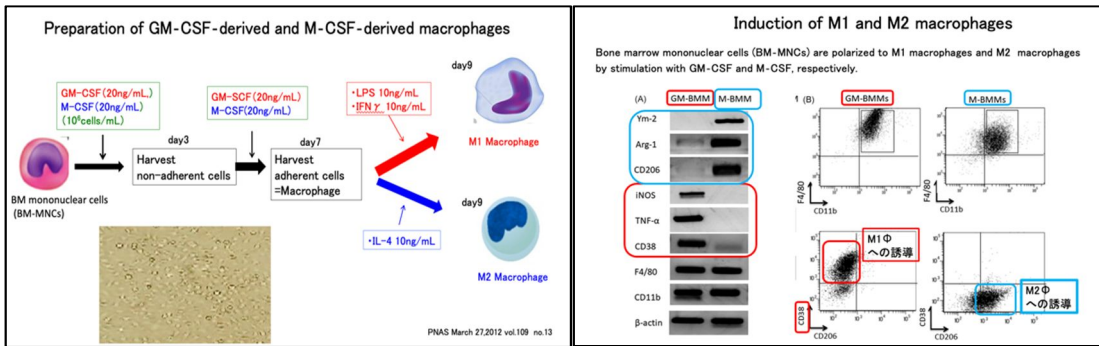
- ・既存の報告を参考に、ドナーマウス骨髄細胞から M1, M2 マクロファージを各々誘導し、各々における遺伝子発現と細胞表面抗原の発現を、RT-PCR 及び FCM を用いて確認した。
- ・ドナー骨髄由来 M1 マクロファージ、M2 マクロファージ各々を GVHD 移植モデルレシピエントマウスに投与し、臨床的 GVHD スコア及び生存率を評価した。
- ・GFP 遺伝子組換えドナー骨髄由来 M2 マクロファージを投与し、GVHD 標的臓器であるレシピエントの皮膚・肝臓・消化管への到達有無を確認した。また、各々の標的臓器にて、M2 マクロファージの割合及び病理学的な GVHD 重症度を評価した。
- ・機能解析として、Mixed Lymphocyte reaction を施行した。レシピエント脾臓細胞 (Stimulator) に対するドナー T 細胞 (Responder) の増殖が、ドナー骨髄由来 M2 マクロファージの共培養により抑制されるかどうかを評価した。

4. 研究成果

実験 1. ドナー骨髄由来 M1 および M2 マクロファージの誘導

ドナー (C57BL/6) マウス骨髄由来 M1 及び M2 マクロファージは、ドナーマウス骨髄単核球を GM-CSF 及び M-CSF 添加培地で培養することで作成した。既報を参考に、骨髄単核球を GM-CSF で刺激してマクロファージに分化させた後に IFN- γ 、LPS にて刺激して M1 マクロファージを誘導した。一方、骨髄単核球を M-CSF にて刺激してマクロファージに分化させた後に IL-4 で刺激することで、M2 マクロファージを誘導した。

誘導した細胞は RT (Reverse Transcription) -PCR 及びフローサイトメーターにて評価した。CD11 $^+$ F4/80 $^+$ 細胞をマクロファージとして評価し、サブタイプ解析として、M1 (CD38, iNOS, IL-6, TNF) 及び M2 (CD206, Arg1, Fizz1) マクロファージマーカーの発現を各々確認し、誘導に問題が無い事を確認した。



【M1,M2 マクロファージの誘導】

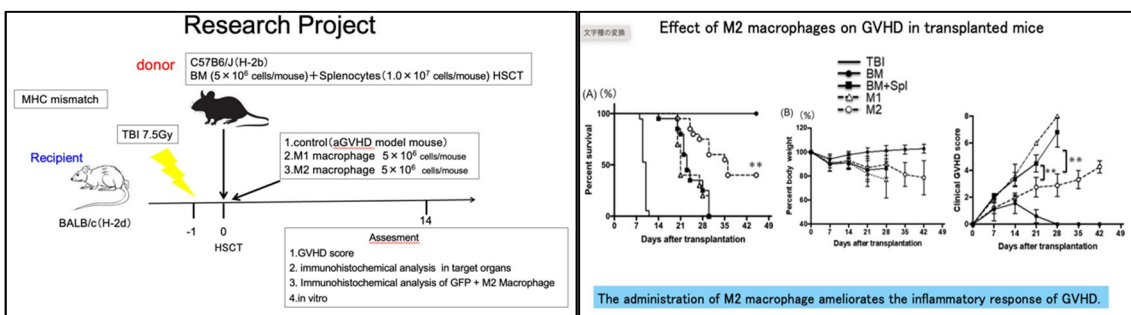
Fig1: M1,M2 マクロファージ誘導の確認

実験 2. 急性 GVHD マウスモデルの作成

マウス骨髄移植実験としては、Balb/c(H-2d) レシピエントマウスに全身照射(7.5Gy)を施行後、主要組織適応抗原の異なる C57BL/6(H-2b) ドナーマウスの骨髄細胞及び T 細胞投与量を調整し、移植後約 14 日目には臨床的に GVHD を発症し、約 30 日目に死亡する重症急性 GVHD モデルマウスを作成した。

実験 3. 骨髄由来 M2 マクロファージ静注による急性 GVHD 抑制効果

造血幹細胞移植を施行した上でドナー骨髄由来 M2 マクロファージを静注し、移植後の急性 GVHD 抑制効果を生存率ならびに臨床的急性 GVHD スコア(体重、皮膚、姿勢など)を観測する事で GVHD 抑制効果を評価した。具体的には、TBI 群: TBI のみ施行、BM 群: TBI 照射した後にドナー骨髄細胞のみ投与、GVHD 群: TBI 照射後にドナー骨髄細胞及び脾臓細胞を投与、M1 マクロファージ群: GVHD 群にドナー骨髄由来 M1 マクロファージ細胞を投与、M2 マクロファージ群: GVHD 群にドナー骨髄細胞由来 M2 マクロファージを投与、に群分けし、造血細胞移植後経過を観察した。移植後 7 日毎に各群の臨床スコアを観察し、生存率に加えて GVHD 症状を点数化し、M2 マクロファージによる GVHD 抑制効果を統計学的に評価した。



【実験計画】

Fig2: M2 マクロファージ投与にて GVHD・生存率改善



BM 群

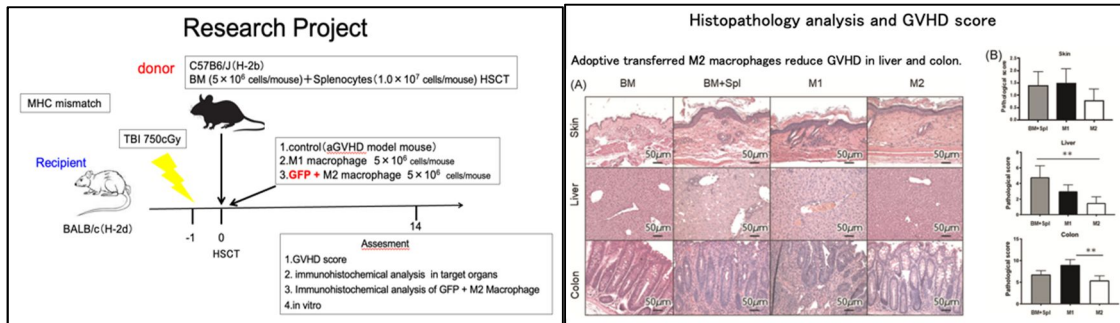
GVHD 群

M1 マクロファージ群

M2 マクロファージ群

実験 4. 病理学的 GVHD 重症度評価

移植後 14 日目に、急性 GVHD 標的臓器である皮膚、肝臓、腸管の各標的臓器をホルマリン固定で保存し、HE 染色にて病理所見を評価した。既報に基づき病理学的 GVHD スコアを観察し点数化し評価したところ、肝臓、腸管において、M2 マクロファージ投与群では統計学的に有意に、GVHD スコアの改善を認めた。



【GFP-M2 マクロファージを投与】

Fig3:M2 マクロファージ投与群にて GVHD 改善

実験 5. GFP 遺伝子組換えマウス細胞を使用した M2 マクロファージ投与

実際に投与したマクロファージが標的臓器に到達して機能しているかどうかを調べるため、GFP 遺伝子組換えマウス細胞を用いて M2 マクロファージを誘導し、投与した M2 マクロファージが実際に GVHD 標的臓器に到達していることを、GFP 染色にて確認した。

実験 6. 標的臓器の免疫学的病理評価

HE 染色による病理学的 GVHD 重症度に加え、標的臓器において存在するマクロファージサブタイプ (F4/80, CD38, CD206) を解析した。M1, M2 どちらが優位に存在しているかを調べ、GVHD 重症度との相関について調べた。

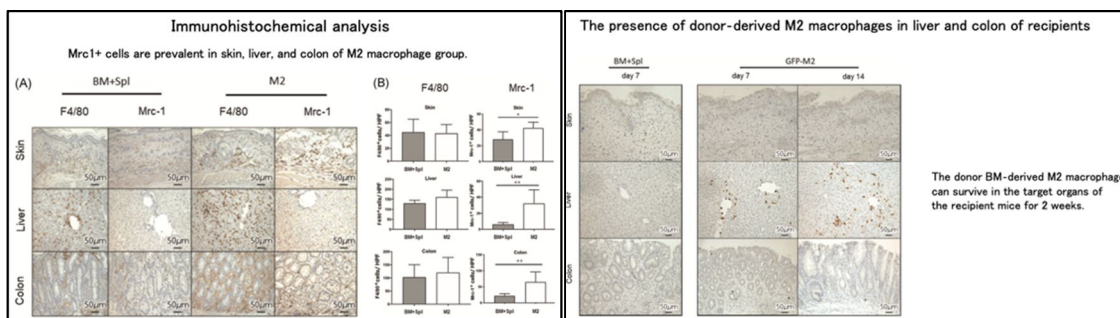
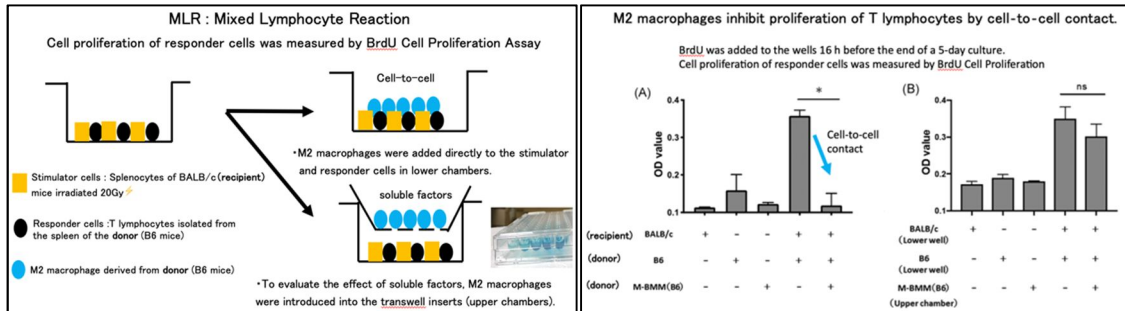


Fig4 (左): M2 マクロファージ投与群では、非投与群と比較して GVHD 標的臓器において、M2 マクロファージが有意に多く存在した

Fig5 (右): 投与した GFP-M2 マクロファージは、day14 に標的臓器にて存在を認めた

実験 7. Mixed Lymphocyte Reaction による機能解析

機能解析として、Mixed Lymphocyte reaction を施行した。レシピエント脾臓細胞 (Stimulator) に対するドナーT細胞 (Responder) の増殖は、ドナー骨髄由来 M2 マクロファージを共培養すると抑制されることを確認した。一方、メッシュで M2 マクロファージの直接的な接触を妨げた上で培養すると増殖は抑制されないことを確認した。



【ドナーT細胞のレシピエントに対する反応は、M2 マクロファージを共培養にて抑制】

結語

- ドナー由来 M2 マクロファージを投与することで、臨床的 GVHD が抑制され、加えて、生存率が改善する事を、重症急性 GVHD モデルマウスを用い立証した。
- 病理学的評価では、M2 マクロファージ投与群では標的臓器に有意に M2 マクロファージが存在し、肝臓及び消化管にて GVHD スコアが改善していることを立証した。
- ドナー由来 M2 マクロファージは cell-to-cell contact にてドナーT細胞のレシピエント細胞に対する反応を抑制し、GVHD 抑制効果を有することを立証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryo Hanaki, Hidemi Toyoda, Shotaro Iwamoto, Mari Morimoto, Daisuke Nakato, Takahiro Ito, Keishiro Amano, Ryotaro Hashizume, Isao Tawara, Masahiro Hirayama	4. 巻 -
2. 論文標題 Donor derived M2 macrophages attenuate GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity Inflammation and Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iid3.503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------	---------