

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 19 日現在

機関番号： 82612

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2009 ~2011

課題番号： 21591379

研究課題名 (和文) マルチカラーマーキング法による同種造血幹細胞移植後の慢性 GVHD 発症機序の解明

研究課題名 (英文) Analysis of mechanisms of chronic GVHD post allo-SCT by marking with multicolor florescent proteins

研究代表者

小野寺 雅史 (ONODERA MASAFUMI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・成育遺伝研究部・部長

研究者番号： 10334062

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、miHA が異なることで GvHD を発症するマウスを用いて、そこに関与する T 細胞や抗原提示細胞などを異なるマーカー遺伝子にて識別し、移植後から GvHD 発症までの各々の細胞の相互関係を解明する。これまでに必要となるウイルスベクターを作製し、miHA のみが異なる B6、C3H マウス間の移植実験を行い、GvHD 発症時の免疫担当細胞の機能を介して急性・慢性 GvHD の機序を解析している。

研究成果の概要 (英文)：

The purpose of this study is to elucidate the mutual relations between immunocompetent cells such as T cells and antigen presenting cells until the GvHD onset after transplant using mice that GvHD develop due to difference of miHA. To address this issue, I have made virus vectors used in the study and performed transplants between mice with only different miHA (B6 and C3H) and analyzed mechanisms of acute or chronic GvHD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
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： 内科系臨床医学・小児科学

キーワード： 小児血液学、造血幹細胞移植、移植片対宿主病、蛍光色素、レトロウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

現在、白血病など造血系悪性腫瘍に対する有効な治療法として、主要組織適合抗原 (HLA) が一致した同種造血幹細胞移植 allo-SCT が広く行われている。ただ、allo-SCT においても患者・ドナー間の副組織適合抗原 (miHA) は一致しておらず、時に重篤な副作用の移植片対宿主病 (GvHD) が発症する。この GvHD には移植後 100 日目を境に病態の著しく異なる急性 GvHD と慢性 GvHD があるが、その詳細な発症機序や急性 GvHD から慢性 GvHD への移行のメカニズムには不明な点が多い。近年、マウスモデルを用いた実験により GvHD、特に急性 GvHD の発症機序が解明されつつある (Nat Med 10: 987, 2004)。それによると、造血幹細胞とともに移入されたドナー由来 CD8 陽性細胞は、レシピエントの抗原提示細胞 (APC) により内在性抗原として自己抗原を提示され、活性化される。そして、このレシピエント由来 APC は移植後より急速に消失するが、代わりにドナー由来 APC が cross presentation により抗原を提示し続け、GvHD の増強や維持に関わり、その際、発症するサイトカイン・ストームや急激におこる組織破壊が自己反応性 T 細胞を出現させ、結果的に自己免疫疾患様の慢性 GvHD を発症するとされている。実際、臨床の場でも急性 GvHD の重度が上がるほど慢性 GvHD の発症率が増加することが確認されており、急性 GvHD の責任細胞が何らかの形で慢性 GvHD の発症に関わっていることが推測される。ただ、ここで出現する自己反応性 T 細胞がもともと移入されたドナー T 細胞由来なのか、あるいはドナー幹細胞から患者胸腺で教育を受けた T 細胞なのかは不明であり、さらには前処置としての放射線照射を受けた患者胸腺がどのように慢性 GvHD に関与しているかも不明である。

2. 研究の目的

本研究では miHA が異なることで GvHD を発症するマウスモデルを用い、そこに関与する細胞群を異なるマーカーを有するレトロウイルスベクターにて遺伝的に識別し、さらには、適時、ドナーリンパ球を排除できるよう移植ドナーリンパ球に自殺遺伝子であるヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子を導入し、これらマウスを移植時から FACS や免疫組織染色法で解析することで、急性 GvHD ならびに慢性 GvHD に関与する責任細胞群を同定する。さらには、これら遺伝子改変細胞を用いて詳細に解析することで、移植後の急性 GvHD から慢性 GvHD への移行過程を解明し、臨床面ではヒト免疫系制御のために新戦略の開発に、基礎分野においては「免疫の自己破綻」の機序の解

明に役立てたいと考えている。

3. 研究の方法

本研究におけるレトロウイルスベクターを用いたマルチカラー・マーキング実験は、以下の材料を用いて行う。

使用する材料

1) ベクター

申請者が開発した gene silencing 抵抗性レトロウイルスベクター-DNspap

2) マウス

C57BL/6(B6)(H-2^b,Ly5.1)、B6.129S7.Rag-1 欠損マウス(H-2^b,Ly5.1)、C3H.SW (C3H)(H-2^b,Ly5.2、B6 と miHA が異なる)、B6xBalb/c(H-2^d)による F1(BDF1、H-2^{b/d})

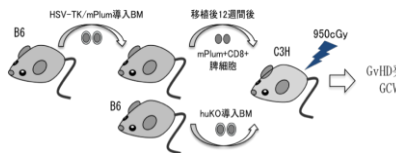
3) 導入遺伝子

緑色蛍光色素 EGFP (FACS にて FL1 チャンネルにて検出)、橙色蛍光色素 huKO (FL2 チャンネル)、赤色蛍光色素 mPlum (FL4 チャンネル)、自殺遺伝子 HSV-TK。尚、HSV-TK に関しては、internal ribosomal entry site(IRES)の下流に mPlum 遺伝子を持つベクターに組み込み、mPlum の発現にて HSV-TK 遺伝子導入細胞の回収を行う。

方法

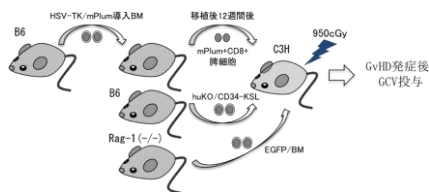
1) 移植時に移入されるドナー由来 CD8+ 細胞の慢性 GvHD への関与

B6 マウス(5.1)より骨髓細胞を採取し、HSV-TK/mPlum レトロウイルスベクターを感染させ、B6 マウス(5.1)に移植する。骨髓造血能が安定する 12 週目以降に、これらマウスの脾臓より mPlum 陽性 CD8+ 細胞を FACS にて回収し、これをドナー CD8+細胞とする。この操作は、遺伝子導入に際しに用いられる in vitro の培養が、CD8+細胞のアロ抗原に対する反応性を低下させることを防ぐためである。B6 マウス(5.1)より採取した骨髓細胞に huKO 遺伝子を導入し、上記ドナーCD8+細胞とともに放射線照射した C3H マウス (5.2) に移植する。移植初期では C3H マウス由来 APC が自己抗原を提示し、ドナーCD8+細胞は活性化する。その後、huKO 陽性ドナーAPC が C3H マウス由来 APC の代わり cross presentation にて抗原を提示し、GvHD は維持される。体重減少など著明な急性 GvHD が発症した後、これら C3H マウスにガンシクロビル (GCV) を投与し、ドナーCD8+細胞を死滅させ、移植時に移入されたドナーCD8+細胞の影響の無い状態での GvHD の変化を詳細に解析する。



2) 移植された造血幹細胞由来 CD8+細胞の慢性 GvHD への関与

骨髄細胞中には胸腺前駆細胞が存在し、実際に GvHD に関与している細胞が新たに宿主胸腺で教育を受けた CD8+細胞であるかを判断するのは難しい。そこで、ドナー造血幹細胞由来で、新たに宿主胸腺において教育された CD8+細胞の GvHD の関与を解析するために、投与する幹細胞を極めて純度の高い CD34 陰性 c-KIT 陽性 Scf 陽性 Lineage 陰性 (CD34-KSL) 細胞とし、これら細胞に huKO 遺伝子を導入して C3H マウスに移植する。ただ、CD34-KSL 細胞から APC が即座に分化しないので、Rag-1 欠損マウスより得られた骨髄細胞を EGFP にてマーキング後、レスキュー細胞として移植する。上記と同様、体重減少など著明な急性 GvHD が発症した後に C3H マウスに GCV を投与することでドナー-CD8+細胞を死滅させ、幹細胞由来ドナー-CD8+細胞の GvHD の関与を詳細に解析する。



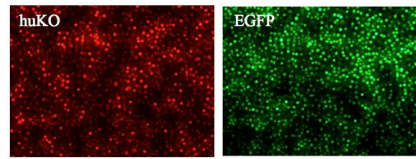
4. 研究成果

1) 申請者が開発した gene silencing 抵抗性レトロウイルスベクター DNsap に緑色蛍光色素 (EGFP)、橙色蛍光色素 (huKO)、赤色蛍光色素 (mPlum) ならびに自殺遺伝子であるヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ (HSV-TK) を組み込み、水疱性口内炎ウイルス由来 G タンパク (VSV-G) を発現するパッケージング細胞株の 293pgg に導入することで上記遺伝子を安定して発現するウイルス産生細胞株を樹立した。

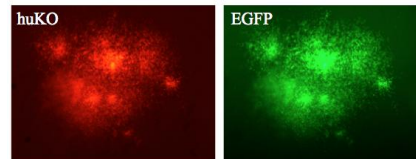
2) 研究者が樹立した緑色蛍光色素 (EGFP)、橙色蛍光色素 (huKO)、赤色蛍光色素 (mPlum) 発現レトロウイルスベクター (DNsap) を用いて、これら蛍光色素遺伝子を B6 マウス由来の骨髄細胞に導入し、致死量放射線照射したマウスに移植することで、各蛍光色素の発現がマウス骨髄造血に与える影響を解析した。その結果、いずれの蛍光色素導入骨髄

細胞も致死量放射線照射したマウスの骨髄造血能を再構築したことから、その影響は極めて低いものと思われた。

EGFPあるいはhuKO発現マウス末梢血



EGFPあるいはhuKO発現骨髄細胞



3) マウスとして C57BL/6(B6)(H-2^b, Ly5.1)、C3H.SW(C3H)(H-2^b, Ly5.2、B6とmiHAが異なる)及びB6xBalb/c(H-2^d)による F1(BDF1,H-2^{b/d}) マウスを用意し、使用するマウスとして C56BL/6(B6)(H-2^b, Ly5.1)と Balb/c(H-2^d)を交配させた F1(BDF1, H-2^{b/d})を用意し、移植実験に備えた。

4) B6マウス (Ly5.1) より骨髄細胞を採取し、DNsapTK/mPlumウイルスを感染させ、これら造血幹細胞を致死量放射線照射した B6 マウス (Ly5.1) に移植し骨髄再構築能を確認した。現在、in vivoにおける GCV の効果を確認するため、これらマウスに GCV を投与し、Ly5.1 細胞の死滅率を検討している。

5) 今後は、これらマウスより脾臓細胞 (TK/mPlum導入T細胞) を回収し、huKO遺伝子を導入した B6 マウス (5.1) 造血幹細胞と共に C3H マウスに移植し、GvHD が発症した後にガンシクロビル (GCV) を投与することで、ドナー-CD8⁺細胞を死滅させ、移植時に移入されたドナー-CD8⁺細胞がない状況での GvHD の変化を詳細に解析する。

なお、研究期間内に実験が終了できないかった理由は、実験に必要なウイルス産生細胞の樹立や移植するマウスの系の樹立が遅れたためであり、現段階で大方の実験に必要なマテリアルは準備できたので、今後、これらを用いることで当初の研究目的を達成する予定である。

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 17 件)

- ① Namba T, Mochizuki H, Suzuki R, Onodera M, Yamaguchi M, Namiki H, Shioda S, Seki T: Time-lapse imaging reveals symmetric division of GFAP-expressing progenitors for expansion of postnatal dentate granule neurons. *PLoS ONE* 6:25303, 査読有, 2011. DOI:21966492
- ② Kawahara M, Chen J, Sogo T, Teng J, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Ueda H, Nagamune T: Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using antibody/c-Mpl chimera. *Cytokine* 55:402-408, 査読有, 2011. DOI:21700475
- ③ Maeyama Y, Otsu M, Kubo S, Yamano T, Iimura Y, Onodera M, Kondo S, Sakiyama Y, Ariga T: Intracellular estrogen receptor-binding fragment associated antigen 9 exerts in vivo tumor promoting effects via its coiled-coil region. *Int J Oncology* 39:41-49, 査読有, 2011. DOI:21573489
- ④ Fujisawa Y, Nabekura T, Kawachi Y, Otsuka F, Onodera M: Enforced ROR(γ) expression in haematopoietic stem cells increases regulatory T cell number, which reduces immunoreactivity in vivo. *Asian Pac J Allergy Immunol*, *Asian Pac J Allergy Immunol* 1, 29:86-93, 査読有, 2011. DOI:21573489
- ⑤ Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, Saito H: Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing a constitutive activation of the α IIb β 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood*, 117: 5479-5484, 査読有, 2011. DOI:21454453
- ⑥ Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, Takeuchi K, Onodera M, Nakanuma Y, Yamamoto M, Hyodo I, Shoda J: Potent In Vitro and In Vivo Antitumor Activity of Sorafenib Against Human Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cells. *J Gastroenterol* 46:779-789, 査読有, 2011. DOI: 21331764
- ⑦ Kawai T, Kusakabe H, Seki A, Kobayashi S, Onodera M: Osteomyelitis due to triethoprim/sulfamethoxazole-resistant *Edwardsiella tarda* infection in a patient with X-linked chronic granulomatous disease. *Infection* 39:171-173, 査読有, 2011. DOI:21246245
- ⑧ Tozuka Y, Kumon M, Wada E, Onodera M, Mochizuki H, Wada K: Material obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochem Int* 57: 253-257, 査読有り, 2011. DOI:20538025
- ⑨ Hirata Y Hamanaka S, Onodera M: Transactivation of the dopamine receptor 3 gene by a single provirus integration results in development of B cell lymphoma in transgenic mice generated from retrovirally transduced embryonic stem cells. *Blood* 115: 3930-3938, 査読有, 2010. DOI: 20220117
- ⑩ Miyamoto N, Tanaka R, Shimura H, Watanabe T, Mori H, Onodera M, Mochizuki H, Hattori N, Urabe T: Phosphodiesterase III inhibition promotes differentiation and survival of oligodendrocyte progenitors and enhances regeneration of ischemic white matter lesions in the adult mammalian brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:299-310, 査読有, 2010. DOI:19826432
- ⑪ Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Hoshii T, Ohmura M, Kinoshita M, Tanaka S, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, Okano H, Suda T, Hamada J, Hirao A: Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17163-17168, 査読有, 2009. DOI:19805150
- ⑫ Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Mamiko, Yanagimoto S, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita Junko, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Morihara H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koeffler HP, Ogawa S: Gain-of-function of mutated c-Cbl tumour suppressor associated with myeloid neoplasms with 11q UPD. *Nature* 460: 904-908, 査読有, 2009. DOI:19620960
- ⑬ Okabe M, Otsu M, Ahn DH, Kobayashi T, Morita Y, Wakiyama Y, Onodera M, Eto K, Ema H, Nakauchi H: Definitive

ve proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. Blood 114: 1764-1767, 査読有, 2009. DOI:19564635

- ⑭ Miyamoto N, Tanaka R, Zhang N, Shimura H, Onodera M, Mochizuki H, Hattori N, Urabe T: Crucial role for pCREB signaling in the differentiation and survival of neural progenitors under chronic cerebral hypoperfusion. Neuroscience 162: 525-536, 査読有, 2009. DOI:19426786
- ⑮ Horiuchi Y, Onodera M, Miyagawa Y, Sato B, Onda K, Katagiri YU, Okita H, Okada M, Otsu M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Kuratsuji T, Kiyokawa N: Kinetics and effect of integrin expression in human CD34+ cells during MLV-derived retroviral transduction using a recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. Hum Gene Ther 20: 777-783, 査読有, 2009. DOI:19284246
- ⑯ Sogo T, Kawahara M, Ueda H, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Nagamune T: T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. Cytokine 46: 127-136, 査読有, 2009. DOI:19223197
- ⑰ Fujisawa Y, Nabekura T, Nakao T, Nakamura Y, Takahashi T, Kawachi Y, Otsuka F, Onodera M: The induction of tumor-specific CD4+ T cells via major histocompatibility complex class II is required to gain optimal anti-tumor immunity against B16 melanoma cell line in tumor immunotherapy using dendritic cells. Exp Dermatol 18: 396-403, 査読有, 2009. DOI:19054057

[学会発表] (計 6 件)

- ① 小野寺雅史: 遺伝子治療における我が国と欧米の違い第1回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム、2011, 東京
- ② Tadokoro K, Ichida Y, Onodera M. An effect of the transcription factor ZFP809 on gene silencing of the retroviral vectors. The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, 2010. 12. 7-10.
- ③ Horiuchi Y Onodera M, Miyagawa Y, Sato B, Onda K, Katagiri YU, Okita H, Okada M, Otsu M, Kume A, Okuyama T, Fujimoto J, Kuratsuji T, Kiyokawa N: Kinetics and defect of integrin expression on human CD34+ cells during MLV-derived

retroviral transduction with a recombinant fibronectin for stem cell gene therapy. 第15回日本遺伝子治療学会、2009. 7. 9 吹田

- ④ Tadokoro K, Azuma N, Onodera M: A reciprocal regulation between PAX2 and PAX6. The 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. 2009. 12. 10 Yokohama
- ⑤ 小野寺雅史: 我が国における遺伝子医薬品承認に向けての課題と取り組み。第9回小児免疫リウマチ研究会 2009, 4, 10 東京
- ⑥ 小野寺雅史: 我が国における遺伝子医薬品承認に向けての課題と取り組み。第8回遺伝子治療シンポジウム 2010. 2. 5 大阪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺雅史 (ONODERA NASAFUMI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・成育遺伝研究部・部長

研究者番号: 10334062

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし