

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890026

研究課題名（和文） 移植片対宿主病における DNAM-1 の関与

研究課題名（英文） Involvement of DNAM-1 in the development of graft-versus-host disease

研究代表者

鍋倉 幸 (NABEKURA TSUKASA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・研究員

研究者番号：80550095

研究成果の概要（和文）：移植片対宿主病（GVHD）は骨髄移植後の重篤な合併症である。GVHDの本態はドナーT細胞による免疫応答であるが、発症機序は完全には明らかになっていない。DNAM-1はT細胞に発現する受容体である。本研究ではGVHDモデルマウスを用い、GVHD発症におけるDNAM-1の関与を検討した。DNAM-1欠損ドナー細胞を移植されたマウスは高い生存率を示した。抗DNAM-1中和抗体を投与されたモデルマウスの生存率も亢進した。*In vitro*にて、DNAM-1共刺激によってCD8陽性T細胞の増殖とインターフェロン γ 産生が増強した。GVHD発症後の同抗体の治療的投与により、モデルマウスの生存率が亢進した。以上から、DNAM-1はGVHD発症に決定的な役割を担い、治療における有用な分子標的であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Graft-versus-host disease (GVHD) is a life-threatening complication following bone marrow transplantation; however, no effective molecular targeting therapy has been determined. Here, we show that mice that received allogeneic splenocytes deficient in DNAM-1 had significantly lower mortality than those that received wild-type (WT) splenocytes. Donor CD8+ T cells deficient in DNAM-1 showed less proliferation and produced less interferon γ after coculture with allogeneic splenocytes than WT CD8+ T cells. Mice prophylactically treated with an anti-DNAM-1 antibody showed low mortality. Moreover, treatment with a single administration of the antibody after the onset of GVHD prolonged survival. These results indicate that DNAM-1 plays an important role in the development of GVHD and is an ideal molecular target for therapeutic approaches to GVHD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：医歯薬学・血液内科学

キーワード：移植片対宿主病、GVHD、DNAM-1、抗体療法、骨髄移植

1. 研究開始当初の背景

(1) 移植片対宿主病 (GVHD) について

同種骨髄移植は多様な造血器疾患に対する根治療法である。GVHD はそのうち 6 割以上に発症する合併症である。GVHD は移植の成否を左右し、患者の生命予後にも直接影響する。しかし GVHD の特異的な治療法は開発されていない。GVHD の本態はドナー T 細胞による免疫応答であり、T 細胞が宿主組織を傷害することで発症する。これまでの研究により、ドナー T 細胞上のいくつかの受容体が GVHD 発症に関与することが明らかにされている。しかし、これら受容体を標的とした分子標的療法は、臨床応用されていない。

(2) DNAM-1 (CD226) について

DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1、CD226) は T 細胞などに構成的に発現する活性化受容体である。DNAM-1 は、そのリガンドである CD155・CD112 を発現する細胞に対する CD8 陽性 T 細胞の細胞傷害活性に関与する。近年、DNAM-1 欠損マウスを用いた研究により、DNAM-1 が CD8 陽性 T 細胞によって担われる免疫監視機構に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、マウス GVHD モデルを用いて GVHD 発症における DNAM-1 の関与を検証した。その際、GVHD の発症及び増悪における DNAM-1 の果たす役割を解明することに加え、DNAM-1 が GVHD 治療の標的分子となり得るかを評価した。そこから得られた成果を鑑み、GVHD 特異的かつ効果的な治療法を開発することを到達目標とした。

3. 研究の方法

(1) GVHD モデル①

ドナー細胞における DNAM-1 の関与を検討するため、DNAM-1 欠損あるいは野生型 B6 マ

ウス由来脾細胞を B6C3F1 へ移入する GVHD モデルを用い、生存率と組織障害を観察した。また、野生型 B6 マウス由来脾細胞を移入されたマウスに対し、抗 DNAM-1 中和抗体あるいはコントロール抗体を予防的あるいは治療的に投与し、生存率を観察した。

(2) *In vitro* アッセイ

ドナー CD8 陽性 T 細胞における DNAM-1 の役割を検討するため、DNAM-1 野生型あるいは欠損マウスから CD8 陽性 T 細胞を単離し、抗 CD3 抗体と抗 DNAM-1 抗体あるいはコントロール抗体により架橋刺激した。またアロ反応性刺激細胞によっても刺激した。その後、CD8 陽性 T 細胞の増殖とインターフェロン (IFN)- γ 産生を評価した。

(3) DNAM-1 リガンド発現解析

GVHD の標的臓器である肝臓と腸管における DNAM-1 リガンド CD155・CD112 の発現レベルを、定量的 RT-PCR 法にて評価した。

(4) GVHD モデル②

致死量放射線照射した C3 マウスに対し、B6 マウス由来骨髄細胞と T 細胞を移植するマイナー組織適合抗原不一致骨髄移植モデルを用い、抗 DNAM-1 中和抗体の GVHD 治療効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 「3. 研究の方法 (1)GVHD モデル①」の DNAM-1 欠損マウス由来脾細胞を移入されたレシピエントマウスは、DNAM-1 野生型脾細胞を移入されたマウスと比較し、有意に高い生存率を示した。また、抗 DNAM-1 中和抗体を予防的に投与されたレシピエントマウスの生存率も有意に亢進した。更に、明確な GVHD 発症が確認された移植後 14 日目から抗 DNAM-1 中和抗体を治療的に投与したところ、レシピエントマウスの生存率が有意に亢進することが確認された。

(2) *In vitro* アッセイにおいて、DNAM-1 の共刺激によってドナー由来エフェクターCD8 陽性T細胞の細胞増殖とIFN- γ の産生が増強することが確認された。この DNAM-1 の共刺激効果は、アロ反応性刺激細胞による刺激においても観察された。

(3) 「3. 研究の方法 (1)GVHD モデル②」のマイナー組織適合抗原不一致骨髄移植後GVHD モデルマウスに対し、明確なGVHD 発症後に抗 DNAM-1 中和抗体を治療的に投与したところ、レシピエントマウスの生存率も有意に亢進した。

以上から、DNAM-1 はGVHD の発症に決定的な役割を担っていると考えられた。現在まで、GVHD モデルマウスを用いた実験系において、明確なGVHD 発症後に中和抗体投与によって顕著なGVHD 治療効果が得られた分子標的はほぼ皆無であることから、DNAM-1 はGVHD の予防および治療における新規の有用な分子標的であると考えられた。

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2件)

① Tsukasa Nabekura, Kazuko Shibuya, and Akira Shibuya, Reply to Seth et al.: DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) plays an important role in alloreactive CD8+ T cells responsible for the exacerbation of acute graft-versus-host disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有、2011; 108: 10E34.

② Tsukasa Nabekura, Kazuko Shibuya, Eri Takenaka, Hirayasu Kai, Kai Shibata, Yumi Yamashita, Kyoichi Harada, Satoko Tahara-Hanaoka, Shin-ichiro Honda, and Akira Shibuya, A critical role of DNAM-1

in the development of acute graft-versus-host disease in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有、2010; 107: 18593-18598.

[学会発表] (計7件)

① 鍋倉 宰, A critical role of DNAM-1 in the development of acute graft-versus-host disease, 第5回つくば医科学研究交流会、2011年1月22日、筑波大学(茨城県)

② 鍋倉 宰, 抗DNAM-1モノクローナル抗体を用いた移植片対宿主病に対する新規予防および治療法の開発、第2回造血器腫瘍免疫療法研究会、2010年8月28日、大和屋本店(愛媛県)

③ Tsukasa Nabekura, A critical role of DNAM-1 in the development of acute graft-versus-host disease, The 14th International Congress of Immunology, 2010年8月26日、神戸国際会議場(兵庫県)

④ 鍋倉 宰, DNAM-1 は移植片対宿主病の発症において重要な役割を果たす、第20回京都T細胞カンファレンス、2010年6月5日、京都大学(京都府)

⑤ Tsukasa Nabekura, A critical role of DNAM-1 in the development of acute graft-versus-host disease, The Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2010年3月1日、Beaver Run Resort(コロラド州、米国)

⑥ 鍋倉 宰, 抗DNAM-1モノクローナル抗体を用いた移植片対宿主病に対する新規予防および治療法の開発、2009年12月3日、第39回日本免疫学会、大阪国際会議場(大阪府)

⑦ 鍋倉 宰, 抗DNAM-1モノクローナル抗体を用いた移植片対宿主病に対する新規予防お

よび治療法の開発、2009年10月23日、第
71回日本血液学会、京都国際会館（京都府）

〔その他〕

ホームページ等

筑波大学免疫学研究室

<http://www.immunologylab-tsukuba.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍋倉 宰 (NABEKURA TSUKASA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・

研究員

研究者番号：80550095