

## 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25年5月31日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590365

研究課題名（和文）血漿 GVHD バイオマーカー CCL8 の病態形成機能に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Fundamental study of pathologic role of CCL8 in GVHD

研究代表者

小海 康夫 (Kokai Yasuo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20178239

研究成果の概要（和文）：我々はマウスモデルの血漿をプロテオミクス解析することにより急性移植片体宿主病（GVHD）の血漿バイオマーカーとして CCL8 を同定した。本分子は GVHD の発症、治療、予後を反映し、ヒトおよびマウスにおいて GVHD の初めての客観的バイオマーカーとして期待が寄せられている。そこで、CCL8 の GVHD における機能を明らかにすることを目指し、GVHD 発症における CCL8 の役割を解析した。

研究成果の概要（英文）：The early and preclinical expression of CCL8 in plasma predicts overall survival of GVHD in vivo. Together with an involvement of allorecognition in CCL8 expression, it suggests that CCL8 plays an important role in GVHD pathology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	45,500,000

研究分野：歯科薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：再生医学、造血幹細胞移植、移植片対宿主病、GVHD、バイオマーカー、客観診断、治療効果判定、予後予測

## 1. 研究開始当初の背景

我々はマウスモデルの血漿をプロテオミクス解析することにより急性移植片体宿主病（GVHD）の血漿バイオマーカーとして CCL8 を同定した（Blood, 2008, 111:4403-4412）。本分子は GVHD の発症、治療、予後を反映し、ヒトおよびマウスにおいて GVHD の初めての客観的バイオマーカーとして期待が寄せられている。本分子は GVHD 病態に重要な機能を果たしていることが示唆され、その検討は GVHD の客観診断系の論理構築のうえで必須である。

## 2. 研究の目的

造血幹細胞移植は血液、悪性腫瘍に対する根治的な治療法であり、その適応は先天性免疫不全や代謝疾患など多岐にわたっている。しかし、重篤な合併症としての GVHD が造血幹細胞移植の成否を左右するため GVHD の克服は非常に重要な課題である。我々はプロテオミクス技術を用いて GVHD マウスモデルにお

いて GVHD のバイオマーカーとしてケモカイン CCL8 を同定した。血清中に含まれる単一分子として GVHD のバイオマーカーとして同定された唯一の分子であり、内外で高い評価を受けている。CCL8 はマウスおよびヒトのサンプルにおいて GVHD 血清で高値を示し、治療や重篤度に強い相関を示すことを独自に開発した immunoSELDI 法および定量 ELISA キットにて証明した (Blood. 2008, 111:4403-4412、Exp Hematol. 2009, 37(4):523-531.)。さらにヒトにおいて GVHD 患者血清の解析で有意に高値を示し、早期血清 CCL8 濃度が GVHD の重篤度を予測する可能性が示唆された。本研究では、CCL8 の GVHD における機能を明らかにすることを目的し、GVHD 発症における CCL8 の役割を解析し、バイオマーカー診断への分子基盤を確立することを目指す。

### 3. 研究の方法

本研究は GVHD という重篤な疾患の分子マーカーの作用機序を明らかにすることを目的とする。我々の現在までの研究により、ケモカイン CCL8 は GVHD の早期診断のみならず GVHD 病勢の把握、重症化予測に有用なバイオマーカーとなる可能性があり、ヒト臨床への応用に対する有用性が高い研究である。GVHD の予防及び治療は従来ステロイドやシクロスポリン、タクロリムスなどの免疫抑制剤によってなされてきたが、本研究はケモカイン及びケモカインレセプターをターゲットとした分子標的療法の開発につながる可能性があり、その点でも独創的である。また免疫担当細胞全体に対する強い免疫抑制療法と異なり、ターゲットを限定して GVHD の予防及び治療が可能になれば臨床的に非常に意義深いものとなる。GVHD は、①ホストへの放射線照射や抗がん剤治療などによる組織傷害から、②移植 T 細胞のアロ抗原認識と活性

化そして③組織傷害性 T 細胞、マクロファージ、炎症性サイトカインがかかわる組織傷害の 3 ステージからなると考えられている。

そこで、本研究では CCL8 の発現が、

(1) CCL8 の発現細胞、臓器および時期の同定

(2) 発現された CCL8 が結合する細胞および受容体の同定

(3) CCL8 変異体および遺伝子改変マウスを用いた GVHD の発症と進展における CCL8 の役割を明らかにする。これらの解析は、GVHD の病態形成、臓器特異性、重篤度との関連を病理学的に検討しながら、

以下のように取り組む。おおむね (1)、(2)、

(3) を初年度、2 年度、3 年に取り組む。

(1) CCL8 の発現細胞、臓器および時期の同定

①昆虫細胞によるリコンビナントマウス CCL8 の大量産生系の確立：初期の昆虫細胞でマウス CCL8 の抗体作成、変異体 CCL8 作成などの種々の目的のため、昆虫細胞を用いたリコンビナントマウス CCL8 とヒト CCL8 の大量産生系を確立する。

②抗体の作成：免疫組織学的同定、フローサイトメーターによる同定、細胞および臓器タンパク質抽出液による同定が必要である。ホルマリン固定パラフィン切片、フローサイトメーターなどに適する抗体を作成する。

③GVHD モデルマウスの免疫細胞組織学的解析：GVHD は移植後早期からさまざまな臓器にドナー細胞が以降し体内で免疫炎症反応を起こす。移植後、各ステージにおいて CCL8 を発現する細胞をホルマリン固定標本および凍結切片標本にて検討する。一方、得られた細胞の多重カラーフローサイトメーターによる解析にて同定した CCL8 陽性細胞は、ソーティングにより単離し、さらなる細胞系譜の検討を加える。

④CCL8 欠損マウスは米国の Charo ら(J Clin Invest 2007, 117:902-909)が作成しており、現在入手手続き中である。入手後は速やかに、育種および戻し交配を開始する。

(2) 発現された CCL8 が結合する細胞および受容体の同定

①リコンビナントマウス CCL8 による受容体の生化学的解析:リコンビナントマウス CCL8 を用いて発現細胞が優位に存在する細胞または臓器から CCL8 結合タンパク質をプルダウンし質量分析により結合タンパク質を同定する。CCL8 受容体は、数種類報告されており、同定されたタンパク質から GVHD において CCL8 に結合するタンパク質を見出す。また、リコンビナント CCL8 を蛍光ラベルし、受容体発現細胞をフローサイトメーターにて解析、同定する。

②受容体の組織、細胞分布の検討:CCL8 受容体の GVHD における発現を細胞組織レベルで GVHD 各ステージごとに検討し、GVHD 病態形成と CCL8 受容体の動態を明らかにする。

③変異体組換え CCL8 の作成:遺伝子組換え技術にて各種 CCL8 変異体を作成する。作成した変異体を用いて、CCL8 受容体発現細胞での作用を検討し、GVHD 病態形成との関連を解析する。

(3) CCL8 変異体および遺伝子改変マウスを用いた GVHD の発症と進展における CCL8 の役割

①発現修飾による GVHD 病態の検討:変異体 CCL8、KO マウスなどを用いて GVHD の病態修飾を病理学的に解析し、CCL8 の GVHD 病態形成における役割を明らかにする。

②変異体 CCL8 などによる GVHD 治療の可能性の検討:変異体などによる GVHD 軽減の可能性が示唆された場合は、治療の可能性について次年度以降検討できるよう基礎検討につなげる。

これらの研究により、GVHD 病態において時期および部位特異的な CCL8 発現細胞および結合細胞を細胞組織別に同定し、CCL8 の GVHD 病態での機能を明らかにする。

#### 4. 研究成果

CCL8は、免疫活性化を起点として各種骨髄由来細胞、血管内皮細胞など種々の細胞に発現することが報告されている。しかし、GVHDにおける発現細胞の詳細は不明である。そこで、発現細胞の同定によりCCL8のGVHDにおける発現機序を理解する目的でCCL8発現細胞をGVHDの各ステージ、細胞、組織特異的に解析する。

(1) CCL8の発現細胞、臓器と時期の同定

①昆虫細胞での発現が予想を下回ったため酵母(pichya)によりリコンビナントマウスCCL8の大量産生系の確立した。一方ヒトCCL8の大量生産は昆虫および酵母双方で発現効率が低く無細胞系を用いたin vitro transplationにて作成した。

②抗体の作成:免疫組織学的同定、フローサイトメーターによる同定、細胞および臓器タンパク質抽出液による同定が必要である。ホルマリン固定パラフィン切片、フローサイトメーターなどに適する抗体を作成することを目指し、複数の抗体を作成し、抗体の特異性を検討している。1種ですべての用途を満たす抗体は得られておらず、ELISA用、nativeCCL8を凍結切片で検出することが可能である抗体が得られた。今後さらに特異性の高い有用な抗体を作成していく。

③GVHDモデルマウスの免疫細胞組織学的解析:GVHDは移植後早期からさまざまな臓器にドナー細胞が以降し体内で免疫炎症反応を起こす。移植後、各ステージにおいてCCL8を発現する細胞をホルマリン固定標本および凍結切片標本にて検討する。一方、得られた細胞の多重カラーフローサイトメーターによる解析にて同定したCCL8陽性細胞は、ソーティン

グにより単離し、さらなる細胞系譜の検討を加えることを目指した基礎的検討を実施した。とくに多重免疫染色によるフローサイトメーターおよび共焦点レーザー顕微鏡での解析に集中し、細胞系譜のin vivoでの検討を行い、肺においてCD11b(++)Mac1(++)強陽性の細胞群が大量のCCL8を産生していることを明らかにした。

#### ④KOマウスの作出

当初戻し交配で近交系 CCL8 欠損マウスを作成する予定であったが、経過中 CCL8 以外の遺伝子にも変異があるとの報告を受け、改めて CCL8 欠損マウスを作成した。Zinc finger nuclease 法により 5 ライン CCL8 欠損マウスを得ることができ、基礎的検討にて CCL8 欠損マウスをレシピエントにした場合、GVHD の著しい抑制が見られた。すなわち CCL8 は GVHD 発症に極めて重要な分子であることが示唆された。今後、さまざまなマウスを用いてドナーでの CCL8 発現欠損、ホストでの CCL8 発現欠損および骨髄移植による血液系のみ CCL8 発現が欠損したマウスは CCL8 の GVHD における機能を解析するうえで極めて重要な実験系を確立する。

#### (2) CCL8 受容体の同定と受容体発現細胞の同定

CCL8は化学的遊走を誘導するケモカインファミリータンパク質である。過去の試験管内での検討では、種々の細胞に受容体が発現していることが報告されている。しかし、GVHDにおいて働いている受容体は不明である。単一受容体なのか、複数の受容体が作用しているのかなど、重要な点である。2年度は、初年度に準備したリコンビナントマウスCCL8などを用いて、受容体の細胞および分子病理学的な解析を行い、GVHDにおけるCCL8受容体および受容体発現細胞を同定を試みた。

#### ① リコンビナントマウスCCL8によるリコ

ンビナントマウスCCL8を用いて発現細胞が優位に存在する細胞または臓器からCCL8結合タンパク質をプルダウンし質量分析により結合タンパク質を同定を目指した。CCL8受容体は、数種類報告されており、同定されたタンパク質からGVHDにおいてCCL8に結合するタンパク質を見出す。受容体は複数存在することが示唆され、さらに検討する予定である。

②受容体の検討中であるため、組織細胞での分布の検討には至らなかった。

③変異体組換えCCL8の作成：Zinc finger nuclease法を用いた遺伝子組換え技術にて5種のCCL8欠損マウスを作出した。作成した変異体を用いて、CCL8受容体発現細胞での作用を検討し、GVHD病態形成との関連を解析する。作出した変異体CCL8の基礎的検討で、ホモ欠損では完全なCCL8発現欠損を、ヘテロ欠損では約50%の血中濃度を検出した。基礎的検討にてCCL8欠損マウスをレシピエントにした場合、GVHDの著しい抑制が見られた。すなわちCCL8はGVHD発症に極めて重要な分子であることが示唆された。

④CCL8機能改変によるGVHDにおける役割の解析を目指して、発現修飾によるGVHD病態の検討：前年度に作成した変異体CCL8、KOマウスなどを用いてGVHDの病態修飾を病理学的に詳細に解析し、CCL8のGVHD病態形成における役割を明らかにする準備を開始した。すなわち、変異体CCL8などによるGVHD治療の可能性の検討を開始した。今後は治療の可能性について検討できるよう基礎検討につなげる。

これらの研究により、GVHD病態において時期および部位特異的なCCL8発現細胞および結合細胞を細胞組織別に同定し、CCL8のGVHD病態での機能を明らかにしていく予定である。

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4件)

1. Sohma H, Imai S, Takei N, Honda H, Matsumoto K, Utsumi K, Matsuki K, Hashimoto E, Saito T, Kokai Y.  
Evaluation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease and Dementia with Lewy bodies. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2013, 5:15-23. (査読有)
2. Oki G, Wada T, Iba K, Aiki H, Sasaki K, Imai S, Soh H, Matsumoto K, Yamaguchi M, Fujimiya M, Yamashita T, Kokai Y.  
Metallothionein deficiency in the injured peripheral nerves of complex regional pain syndrome as revealed by proteomics *Pain* 2012, 153:532-9. (査読有)
3. Yamamoto M, Ota A, Hori T, Imai S, Soh H, Suzuki N, Hatakeyama N, Inazawa N, Ito M-Y, Kimura H, Tsutsumi H, Kokai Y.  
Early expression of plasma CCL8 closely correlates with survival rate of acute graft-versus-host disease in mice. *Exp Hematol* (2011) 39(11):1101-11112. (査読有)
4. Kobayashi S, Tatenno M, Woo T, Utsumi K, Soh H, Ito Y-M, Kokai Y. Saito T.  
Apolipoprotein E4 frequencies in Japanese population with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *PLoS ONE*. 2011;6(4):1-5(e18569) (査読有)

[学会発表] (計0件)

[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

<http://web.sapmed.ac.jp/bme/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小海 康夫 (Kokai Yasuo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：

20178239

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：