様式Ｃ－１９

科研費
KAKENHI

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２８日現在

機関番号：17701
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2010 ～ 2012
課題番号：22591164
研究課題名（和文）　インターロイキン８を介した末梢血幹細胞動員の分子機序の解明と臨床応用
研究課題名（英文）　Molecular mechanisms of peripheral blood stem cell mobilization through Interleukin-8 and its clinical application
研究代表者
岡本　康裕(OKAMOTO　YASUHIRO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：30398002

研究成果の概要（和文）：
顆粒球コロニー刺激因子で刺激した好中球と血管内皮細胞(HUVEC)を共培養し、mRNA の発現のパタンからインターロイキン-8(IL-8)産生に関与する遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子の mRNA と、細胞表面の蛋白が発現することを確認した。これらの遺伝子のうち、Toll like receptor-2 の中和抗体やシグナル伝達経路の阻害ペプチドを用いると、HUVEC からの IL-8 の産生は 35～50%に減少した。

研究成果の概要（英文）：
Several genes were elucidated by the expression pattern when HUVEC was co-cultured with G-CSF stimulated neutrophils. Moreover, mRNA was confirmed by real time PCR and surface expression was confirmed by FACS. Within several genes, antibody to TLR2 or inhibitory peptide of TLR2 signaling decreased the IL-8 production in HUVEC as low as 35 to 50 %.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
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
キーワード：G-CSF、血管内皮細胞、IL-8、TLR

１．研究開始当初の背景

造血幹細胞は、定状状態でも骨髄の微小環境と末梢循環の間で行き来している。この性質を利用して、末梢血中にある造血幹細胞を末梢循環からフェレーシスによって採取し、小児がん患者に対する末梢血幹細胞移植術(PBSCT)における移植細胞源として用いている。造血幹細胞を末梢循環に動員する方法は、1)化学療法による骨髄抑制からの回復期の動員、2)G-CSFによる動員、3)その組み合わせ、

がある。我々は、G-CSF投与時に血清のIL-8が上昇すること、しかもIL-8の上昇の程度と、動員される造血幹細胞数に正の相関があることを報告した。その後の我々の研究によって、1）in vitroでは好中球と血管内皮細胞の相互作用によってIL-8が産生されること、2）この産生は好中球をG-CSFで刺激すると増強されること 、3）好中球と血管内皮細胞が直接接触する必要があることを見いだした。この直接接触に必要な蛋白分子の候補（CD87、ウロキナーゼなど）はすでにいくつか報告されているが、その機序は十分に解明されていない。さて、末梢血幹細胞を動員する上での臨床的な問題は、いわゆるpoor mobilizer (PM)である。PM とは、G-CSG を投与しても末梢血に幹細胞が動員されない例のことで、5%程度存在しているとされる。しかし、なぜPMであるのかはわかっておらず、またPMであるかどうかを予測もできない。このためG-CSF を5～ 6日投与した後、末梢血幹細胞を採取する時になって初めて、末梢血幹細胞が十分に動員できていないことが判明する。これは患者に大変な時間的、精神的な負担である。前述のように、G-CSF 投与時の血清IL-8 濃度と動員される造血幹細胞数が相関することから、我々はIL-8 の産生に関与する遺伝子群の多型によってPM を同定できると考えた。その意味でもIL-8 産生の分子機序の解明は重要である。また、G-CSF 投与には、発熱、腰痛などの有害事象があること、5～ 6 日の連日の皮下注射が必要であることなど、改善すべき点があり、末梢血幹細胞のための新たな薬剤の開発が望まれている。造血幹細胞の表面にあるCXCR4 は、骨髄ニッシェにあるCXCL12 と接着しているが、この結合を阻害する薬剤（AMD3100）は、幹細胞動員薬としての臨床応用が始まっている。IL-8 はこのCXCR4/CXCL12とは異なる経路であることから、IL-8 産生の分子機序の解明は新しい薬剤の開発に結びつくと考えられる。本邦でも今後益々普及することが予測される同種PBSCT では、健常なボランティアのドナーから末梢血幹細胞を動員・採取する。よってIL-8 を介した末梢血幹細胞動員の分子機序を解明することによって、PM を同定し、より安全で、確実な動員方法に臨床応用することが望まれる。

２．研究の目的

in vitro において、IL-8 産生に必要な、好中球と血管内皮細胞の直接接触・相互作用を介する遺伝子を、マイクロアレイ法を用いて網羅的に検索し、さらにそのフローサイトメトリー、培養実験や機能実験から、その遺伝子産物を同定する。上記で同定された遺伝子産物と IL-8 の、G-CSF 投与時の in vivo での動態を患者および PBSCT ドナーで解析し、動員された増結幹細胞数との関係を解析する。IL-8 の産生に関与する遺伝子の多型を MALT 法や SSCP 法で検討し、poor mobilizer (PM) を同定する。

３．研究の方法

(1) G-CSFで刺激した好中球とHUVECを2日間、共培養する。
(2) 好中球、HUVECを分離し、mRNAを抽出し、マイクロアレイ法でmRNAの発現を網羅的に測定する。
(3) アレイ法のコントロールには、個別に培養した好中球とHUVECから抽出したmRNAを用いる。
(4) 2、3の差異から、好中球と血管内皮で発現が増加する遺伝子をスクリーニングする。
(5) 4で候補と考えられる遺伝子産物である蛋白が、好中球とHUVECのそれぞれの細胞膜上に存在するかどうかをFACS確認し、候補を絞る。
(6) 培養によりこれらの候補蛋白分子の発現が増加するかをFACSで確認し、候補をさ

らに絞る。

(7) 6で絞られた候補蛋白分子に対する中和抗体やシグナルの阻害薬等を上記の培養系を用いて、2の培養条件で、IL-8産生が阻害されるかどうかを確認する。

4．研究成果

(1) G-CSFで刺激した好中球とHUVECを4日間、共培養し、ELISA法で培養液上清のIL-8を測定した（図１）。IL-8は、24時間ですでに上昇していた。好中球とHUVECの非接触培養でもIL-8は上昇するが、接触培養では5～6倍発現が増加した。接触培養では、48時間以降は増加しなかった。

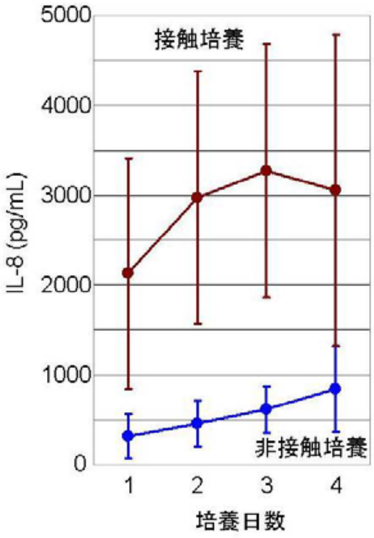

図1　共培養によるIL-8の産生

(2) 発現遺伝子：上記の接触培養の条件で、HUVEC細胞を対象に、アレイ法で発現を網羅的に測定した。ICAM-1、ICAM-2、TRAF1、Bcl3、fractalkaine、E-selectin、lymphotoxin beta、VCAM-1、VWF、VEGFR、VEGFA、endoglin、integrin-α5、TLR-2、TLR-4などの遺伝子の発現が上昇していた。

(3) このうちreal time PCRでは、ICAM-1、ICAM-2、E-selectin、VCAM-1、VEGFR、VEGFA、TLR-2、TLR-4の発現がHUVECで上昇していることを確認した。

(4) 同様に、E-selectin、VCAM-1、VEGFR、TLR-2、TLR-4はHUVECの細胞膜上で発現が増加することをFACSで確認した。

(5) IL-8産生に関与すると考えられるTLR-2に対する中和抗体を、G-CSFで刺激された好中球とHUVECとの共培養に加えると、抗体を加えない場合の培養に比べてIL-8の産生は、35 %に減少した（図２）。

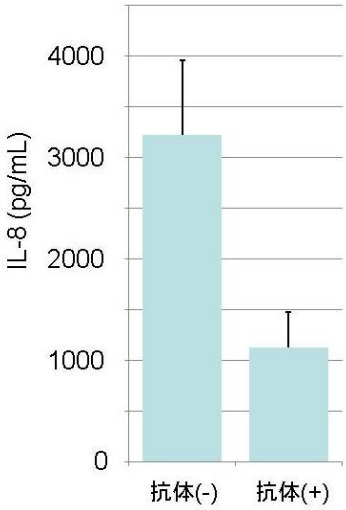

図2　IL-8産生に対する
TLR-2抗体の影響

(6) 同様に、TLR-2のシグナル伝達阻害ペプチドを加えて、共培養すると、TLR-2の活性は25 %に減少し、さらに、IL-8の産生は50 %に減少した（図３）。

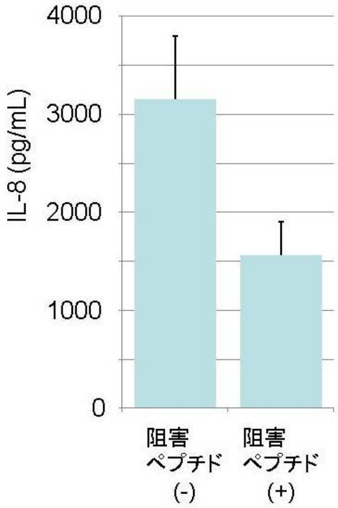

図３　IL-8産生に対するTLR-2
シグナル阻害ペプチドの影響

(7) 以上の結果から、G-CSFで刺激された好中球と血管内皮細胞がTLR-2を介したシグナルを通じて、IL-8の産生を行っていることがわかった。G-CSFをヒトに投与した

時にも同様にIL-8の産生が亢進し、これがPBSCの動員を促進していると考えられる。

(8) 次に、PBSCの動員に対して、TLR-2を介した経路がどのように関与しているかを検討した。まず、さまざまな病態、病気で重要性が知られているIL-8のプロモーター領域の、既知の遺伝子多型を検討したが、既知の多型とPBSCの採取細胞量には一定の関係を認めなかった。TLR-2の発現、TLR-2のシグナル伝達に関連する多型についても検討する必要がある。

５．主な発表論文等〔雑誌論文〕(計６件)

① Kodama Y, Okamoto Y, Hashiguchi T, Shinkoda Y, Nishikawa T, Tanabe T, Kawano Y. Vascular endothelial growth factor corrected for platelet count and hematocrit is associated with the clinical course of aplastic anemia in children. Int J Hematol. 95:494-499, 2012 査読有
doi: 10.1007/s12185-012-1074-1

② Nishikawa T, Miyahara E, Horiuchi M, Izumo K, Okamoto Y, Kawai Y, Kawano Y, Takeuchi T. Benzene Metabolite, 1,2,4-Benzenetriol, Induces Halogenated DNA and Tyrosines Representing Halogenative Stress in Human Myeloid Cell Line HL-60. Environ Health Perspect 120:62-67, 2012 査読有
doi: 10.1289/ehp.1103437

③ Nishikawa T, Izumo K, Miyahara E, Horiuchi M, Okamoto Y, Kawano Y, Takeuchi T. Benzene induces cytotoxicity without metabolic activation. J Occup Health 53: 84-92, 2011 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/joh/53/2/53_10-002-OA/_article

④ Nishikawa T, Okamoto Y, Tanabe T, Shinkoda Y, Kodama Y, Kakihana Y, Goto M, Kawano Y. Acute respiratory distress syndrome as an initial presentation of hemophagocytic lymphohistiocytosis after induction therapy for acute myeloid leukemia. Pediatr Hematol Oncol 3: 244-8, 2011 査読有
doi: 10.3109/08880018.2010.514038

⑤ Nishikawa T, Okamoto Y, Kodama Y, Tanabe T, Shinkoda Y, Kawano Y. Serum derivative of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in pediatric hemato-oncological patients with neutropenic fever. Pediatr Blood Cancer 55: 91-94, 2010 査読有
doi: 10.1002/pbc.22507

⑥ Okamoto Y, Kodama Y, Nishikawa T, Yamaki Y, Mougi H, Masamoto I, Tanabe T, Shinkoda Y, Kawano Y. Successful Bone Marrow Transplantation for Children with Aplastic Anemia based on a Best-Available Evidence Strategy. Pediatr Transplant 14: 980-985, 2010 査読有
doi: 10.1111/j.1399-3046.2010.01388.x

〔学会発表〕(計１０件)

1) Okamoto Y,. Combined analysis of treatments for pediatric ALL in KYCCSG protocols, ALL-96 and ALL-02. 第74回日本血液学会学術集会 2012.10.19-21 京都
2) Okamoto Y: Transplant for aplastic anemia. St.Jude-VIVA Forum in Pediatric Oncology 2012, Mar 2-4, 2012, Singapore
3) 岡本康裕、他　小児急性骨髄性白血病の非寛解期の造血細胞移植術の成績と予後因子の検討　第34回日本造血細胞移植学会　2012/2/24-25 大阪
4) 岡本康裕、他　小児急性リンパ性白血病の非寛解期の造血細胞移植術の成績と予後因子の検討　第34回日本造血細胞移植学会　2012/2/24-25 大阪
5) 岡本康裕、ダウン症に合併した脳腫瘍の２例　第25回日本小児血液・がん学会　2011.11.25-27.　前橋
6) 岡本康裕、治療の大幅な減量、治療中止後に寛解を維持しているALLの３例

第 72 回日本血液学会　2011.10.14-16. 名古屋

7) 岡本康裕,他　小児血液腫瘍患者の DIC に対するトロンボモジュリン製剤の安全性と効果に関する検討. 第 24 回日本小児血液学会総会　2010.12.17-19 大阪

8) Okamoto Y,. Combined analysis of treatments for pediatric T-ALL in KYCCSG protocols, ALL-96 and ALL-02. 第 72 回日本血液学会学術集会 2010.9.24-26 横浜

9) Nagatoshi Y, Okamoto Y, Pharmacokinetic study of intravenous busulfan in hematopoietic stem cell transplantation: results of a prospective study with 25 children. 36th Annual Meeting of the EBMT 2010/3/21-24 Vienna, Austria

10) Okamoto Y. Treatment outcome of KYCCSG ALL96 protocol. St. Jude - VIVA Forum in Pediatric Oncology 2010. 2010/3/3-5, Singapore

６．研究組織

(1)研究代表者

岡本　康裕 (OKAMOTO YASUHIRO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：30398002

(2)研究分担者

河野　嘉文 (KAWANO YOSHIFUMI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20260680