

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591543

研究課題名(和文)慢性移植片対宿主病の発症に關与する多様な細胞群の同定とその制御法の確立

研究課題名(英文) Identification of immune cells involved in chronic graft-versus-host disease and its disease control

研究代表者

西村 良成 (NISHIMURA, RYOSEI)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：50324116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥満細胞はIgEとケミカルメディエータの放出の観点からアレルギー関連細胞群として認識されてきたが、近年の研究から免疫調節能を有する細胞として認識されつつある。同種造血細胞移植において肥満細胞の役割は不明である。

本研究では、肥満細胞の造血細胞移植における肥満細胞の役割を明らかにした。In vitroの実験では、リンパ球混合反応を用いて肥満細胞の同種免疫反応の抑制効果を明らかにした。また肥満細胞欠損マウスを用いた移植実験から、レシピエント側と共に宿主側の肥満細胞も移植片対宿主病(GVHD)の軽減効果を有することが判明した。以上から肥満細胞を用いた難治性のGVHDの細胞療法の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Originally mast cells have been known as effector cells in the IgE-mediated allergic responses. In addition, recent studies demonstrated that mast cells exerted pro-inflammatory or anti-inflammatory effects in complicated immune response depending on the situation. In allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), exact role of mast cells in graft-versus-host disease (GVHD) remains unclear.

Firstly, we have demonstrated that both host-type and donor-type mast cells suppressed mixed lymphocyte reaction in vitro. Secondly, we have shown that absence of both host-typed and donor-typed mast cells exacerbated acute GVHD utilizing mast cell deficient mice. Taken together, mast cells have a protective role against GVHD and cell therapy using cultured mast cell would be promising for refractory GVHD in clinical settings.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：造血幹細胞移植 移植片対宿主病 肥満細胞

## 1. 研究開始当初の背景

難治性血液腫瘍性疾患の根治的治療法として骨髄移植が始まり30年以上経過し広く普及した治療法となっているが、依然として移植片対宿主病 (Graft-versus-Host Disease: GVHD) のため命を落とすことがある。GVHDは、大きく急性と慢性の2種類に分けられる。慢性GVHDは、ひとたび発症すると経過が遷延し、原病が治癒しても慢性GVHDのため命を落とす場合もあり長期予後を考えると、造血細胞移植において最も克服すべき課題となっている。急性GVHDの病態研究は、移植片中に含まれるT細胞を中心に研究が進んでいるが慢性GVHDの研究は進んでいない。その理由の一つとして関与する細胞群が多彩で、病態がより複雑なことが要因となっている。

造血幹細胞移植には、前述したGVHDという最大の欠点が存在するが、また最大のメリットとして、免疫反応による自己・非自己の認識の違いから腫瘍細胞を排除する能力があり、これを移植片対腫瘍効果 (GVT: graft-versus-tumor effect) と呼ぶ。GVHDとGVTを人為的に制御することを目的に、我々はマウス骨髄移植モデルを用いて基礎的検討を行ってきた。特にGVT効果を著しく増大する新たな造血幹細胞移植の確立を目指してきた (Nishimura et al. Blood.2008;112:2563-74)。概要を述べるとマウス脾臓細胞をIFN- $\gamma$ 、抗CD-3抗体、IL-2で14日から21日間培養するとT細胞とNK細胞マーカーを両方発現した細胞が大量に作製されCytokine-induced killer cells (CIK細胞)と呼ばれる。CIK細胞の特徴は、NK細胞の活性化レセプターであるNKG2Dを介して自家ならびに同種腫瘍細胞に対して著しい抗腫瘍効果を発揮する。T細胞マーカーを有することからマウス骨髄移植モデルにCIK細胞を輸注するとGVT効果以上に重篤なGVHDが誘導されることが危惧されたが、実際

には重篤な急性GVHDは発症せず強力な腫瘍除去能があることが証明された重篤なGVHDは発症しないものの慢性GVHDの発症も一部のマウスで認められることが今後の臨床応用に向けての課題となった。

近年炎症を増悪させる細胞群としてTh17細胞が同定され、まず我々はマウス骨髄移植モデルにてIL-17A欠損マウスを利用して、造血幹細胞移植とIL-17Aとの関連を明らかにしてきた。その過程で、慢性GVHD誘導群では、表皮内の肥満細胞が増多していること興味深い現象に気が付いた。肥満細胞はIgEとケミカルメディエータの放出の観点からアレルギー関連細胞群として認識されてきたが、近年の研究から免疫担当細胞の役割を演ずることが明らかとなってきている。本研究では、慢性GVHDの病態、制御に肥満細胞がどのように関与しているかを明らかにしたい。

## 2. 研究の目的

骨髄移植領域における肥満細胞の役割は、不明である。上述したように、肥満細胞にはアレルギー学的側面以外にも免疫調整能力を有する細胞群であることが判明しつつある。我々の病理組織学的解析から慢性GVHDの皮膚組織には肥満細胞が増多している。この解釈として慢性GVHDを惹起または増悪させる細胞群としての可能性、逆に制御性T細胞 (Treg) のように慢性GVHD病変を改善させる働きを有しているのかもしれない。肥満細胞は、人為的な大量培養も可能で有り、もし肥満細胞にGVHD抑制作用を有するようであれば、今後の肥満細胞を用いた臨床応用 (細胞療法) に向けた基礎的実験を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

病態解析のためには、肥満細胞を欠損したマウスの導入が不可欠となる。c-kit遺伝子を操作した遺伝子改変マウスでは従来から

肥満細胞が欠損することが知られていたが、造血系への影響がでるため骨髄移植モデルへの導入は不可能であった。しかしながら同じ c-kit 遺伝子が自然変異した B6-Kit-Wsh/Wsh マウスは、造血系への影響がほとんどなく骨髄移植実験にも使用可能である。

(1) マウス骨髄細胞から、IL-3 と Stem cell factor (SCF) を利用して肥満細胞の大量培養系を確立する。これらの細胞を利用することで以下の肥満細胞ノックアウトマウスを用いた実験と、この培養系で確立した肥満細胞を再輸注することで肥満細胞の関与を確定できる。

(2) In vitro での肥満細胞の allo-reaction に対する役割

大量培養した肥満細胞を用いて、GVHD の試験管での評価法として標準的に用いられている Mixed lymphocyte reaction (MLR) を検討する。具体的には、通常樹状細胞を stimulator とし CD4 T 細胞を responder として MLR を実施する。この系に、stimulator と同種類の肥満細胞、または responder と同種類の肥満細胞を加えて MLR の増減の有無を検討する。

(3) In vivo における肥満細胞の慢性 GVHD 病変に対する役割

B6-Kit-Wsh/Wsh マウスとバッククロスした Balb/c-Kit-Wsh/Wsh マウスを用いて移植実験を行う。生存率の他に病理組織学的なスコアリング化と共に免疫担当細胞の評価、具体的には GVHD の進展・抑制に関与するとされているサイトカインの測定 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, IL-4, IL-10) し、病態との関係を明らかにする。

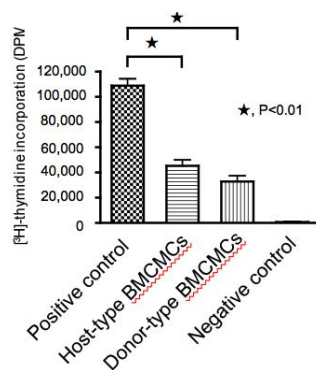
#### 4. 研究成果

(1) 肥満細胞の大量培養の確立

本研究では、各種野生型マウス、各種肥満細胞欠損マウス、GFP を導入した各種マウスから、肥満細胞の培養が同程度に可能かどうかを検討した。いずれのマウスを用いても骨髄細胞から IL-3 などを添加することにより肥満細胞が培養可能であることを確認した。

(2) In vitro での肥満細胞の allo-reaction に対する役割

B6 マウス骨髄由来の樹状細胞を stimulator、Balb/c の脾細胞を effector としてリンパ球混合培養 (MLR) を行った。培養肥満細胞をこの系に添加すると MLR が優位に減弱し、肥満細胞が免疫抑制効果を示す細胞群であることが判明した。下記に示すように stimulator、effector 細胞の由来に関係なく、培養肥満細胞は、MLR 反応を抑制した。肥満細胞内にある各種メディエーターを介した反応ではなく、細胞間接触を介しての抑制効果であることを確認した。



(3) 培養肥満細胞の生体内での長期生存の有無

GFP を発現する B6 マウス骨髄から、肥満細胞を培養し、Balb/c マウスを宿主として同系移植を行った。移植後経時的に各種組織を採取し、GFP の発光を利用して培養肥満細胞が生体内でも長期に生存していることを証明した。

(4) In vivo における肥満細胞の慢性 GVHD 病変に対する役割

下図に示すように肥満細胞欠損マウスに肥満細胞欠損マウス骨髄と脾臓細胞でGVHDを誘導すると野生型GVHDに比較してGVHDがより重症になり早期に死亡する。

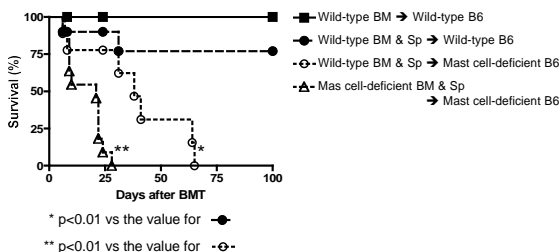


図: 移植後生存曲線。野生型GVHD非誘導群(実線)、野生型GVHD群(点線)、ドナーホストともに肥満細胞欠損GVHD誘導群(点線)、ホストのみ肥満細胞欠損GVHD誘導群(点線)

(5)まとめ

以上から、肥満細胞は慢性GVHDを抑制する細胞群であることを同定した。

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0件)

[学会発表](計7件)

- Rie Kuroda, Shintaro Mase, Hideaki Maeba, Raita Araki, Yasuhiro Ikawa, Toshihiro Fujiki, Masaki Fukuda, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie, Ryosei Nishimura. Simplified monitoring of CD4 T-cell receptor repertoire provides effective managements strategies in the patients with persistent or recurrent graft-versus-host disease. 56<sup>th</sup> American society of hematology annual meeting. 2014年12月6日-9日. サンフランシスコ(米国)
- Yasuhiro Ikawa, Raita Araki, Toshihiro Fujiki, Masaki Fukuda, Shintaro Mase, Rie Kuroda, Hideaki Maeba, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie, Ryosei Nishimura. Highly elevated IL-18 is a reliable predictor of progression to hemophagocytic syndrome in the patients with Langerhans cell histiocytosis. 56<sup>th</sup> American society of hematology annual meeting. 2014年12月6日-9日. サンフランシスコ(米国)

Raita Araki, Hideaki Maeba, Rie Kuroda, Shintaro Mase, Toshihiro Fujiki, Yasuhiro Ikawa, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie, Ryosei Nishimura.

Both host-type and donor-type mast cells protect against acute graft-versus host disease. 55<sup>th</sup> American society of hematology annual meeting. 2013年12月7日-10日. ニューオリンズ(米国)

Shintaro Mase, Toshihiro Fujiki, Rie Kuroda, Raita Araki, Hideaki Maeba, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie, Ryosei Nishimura. Allogeneic cytokine-induced killer cells eliminate host dendritic cells due to the enhanced killing activity by IFN- $\gamma$ , leading to less graft-versus-host disease. 55<sup>th</sup> American society of hematology annual meeting. 2013年12月7日-10日. ニューオリンズ(米国)

Hideaki Maeba, Rie Kuroda, Toshihiro Fujiki, Shintaro Mase, Raita Araki, Yasuhiro Ikawa, Akihiro Yachie, Ryosei Nishimura. Normal course of serum ferritin in childhood cancer survivors: Need for iron removal therapy? 55<sup>th</sup> American society of hematology annual meeting. 2013年12月7日-10日. ニューオリンズ(米国)

Rie Kuroda, Toshihiro Fujiki, Shintaro Mase, Raita Araki, Hideaki Maeba, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie, Ryosei Nishimura. Evaluating prolonged gvhd based on monocyte and T-cell activation, leads to early detection of immunological changes before gvhd exacerbations. 54<sup>th</sup> American society of hematology annual meeting. 2012年12月8日-11日. アトランタ(米国)

Shintaro Mase, Hideaki Maeba, Toshihiro Fujiki, Rie Kuroda, Raita Araki, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie, Ryosei Nishimura. Allogeneic cytokine-induced killer cell-dependent elimination of host dendritic cells leads to less graft-versus-host disease. 54<sup>th</sup> American society of hematology annual meeting. 2012年12月8日-11日. アトランタ(米国)

[図書](計0件)

[雑誌論文](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西村 良成 (NISHIMURA, Ryosei)  
金沢大学・大学病院・講師  
研究者番号：50324116

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

荒木 来太 (ARAKI Raita)  
黒田 梨絵 (KURODA Rie)  
馬瀬 新太郎 (MASE Shintaro)  
前馬 秀昭 (MAEBA Hideaki)