

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790960

研究課題名(和文) 移植片対宿主病の早期診断を可能とするバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Investigation of biomarkers that enable early diagnosis of graft-versus-host disease

研究代表者

栗田 尚樹(Kurita, Naoki)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30555561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血幹細胞移植において、移植片対宿主病(GVHD)は重要な合併症である。リンパ球におけるNotchシグナルはGVHDの増悪に関与することがマウスで示されたことから、我々はヒト同種移植後のリンパ球におけるNotch分子の発現を網羅的に解析した。その結果、同種移植後のNK細胞上にはのみNotch1分子が発現し、その発現にはドナーソースによる相違(臍帯血移植で高発現)を認めた。またNK細胞上にNotch1を高発現している症例群で、GVHDの増悪はなかったが、再発が抑制された。このことは、Notch1によるNK細胞の活性化が、GVHDを増悪させずに移植片対腫瘍効果を発揮させる可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Graft-versus-host disease (GVHD) is a fatal complication of allogeneic stem-cell transplantation (allo-SCT). GVHD-model mice showed that Notch signaling of lymphocytes exacerbates GVHD. Therefore we conducted comprehensive analysis of Notch expression on lymphocytes after allo-SCT by using human samples. As a result, Notch1 was expressed only on NK cells and the expression was significantly higher in recipients of cord-blood transplantation. Not GVHD exacerbation, but reduction of relapse was seen in the recipients whose NK cells expressed Notch1 strongly. This result showed the possibility that enhancing graft-versus-tumor effect without worsening GVHD by manipulating Notch signal.

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：移植片対宿主病 Notchシグナル 移植片対腫瘍効果 同種造血幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

(1) 同種造血幹細胞移植は、現在確立している唯一の幹細胞療法であり、また造血器腫瘍に対する最も強力な治療法である。この治療で同種免疫反応による抗腫瘍作用すなわち移植片対腫瘍 (graft versus tumor, GVT) 効果が期待できる反面、同種免疫反応による移植片対宿主病 (graft versus host disease, GVHD) が重症化すると、致命的な経過を辿る。GVHD は早期に診断し治療することが不可欠であるが、しばしばそれは困難であり、感染症など他疾患との鑑別もまた問題となる。GVHD に関わる免疫調節機構を明らかにしそれを制御することにより、GVHD の迅速かつ確実な診断が可能となるのみならず、移植時の同種免疫反応において GVHD を最小限に抑えつつ GVT 効果を保つことができる可能性がある。

(2) Notch シグナルは血液細胞を含め種々の細胞の分化の決定に重要な役割を担っている。我々の共同研究者は、Notch2 がマウス CD8 陽性 T 細胞の活性化に必須である事を示した (Maekawa, Nat Immunol 2008)。またマウスにおいて、リンパ球上の Notch シグナルが GVHD の増悪に関与することが複数の研究グループにより示された (Zhang, Blood 2011; Toubai, Blood 2011)。しかしヒトの GVHD における、Notch シグナルの関与を明らかにした報告はなかった。

2. 研究の目的

(1) 同種造血幹細胞移植後のヒトの臨床検体を用いて、ドナー由来のリンパ球における Notch 分子の発現を、フローサイトメトリーを用いて大規模かつ網羅的に明らかにする。またそれらに関わる Notch 分子のサブタイプ (Notch1, 2, 3) も同時に同定する。それらの臨床検体を用いて得た Notch の発現データの結果と、急性あるいは慢性 GVHD、再発、全生存などの移植成績との関連を解析する。

(2) GVHD マウスモデルを用いて、(1)で同定された Notch 受容体-リガンド関係が GVHD の発症や増悪に関与していることを実験的に証明する。

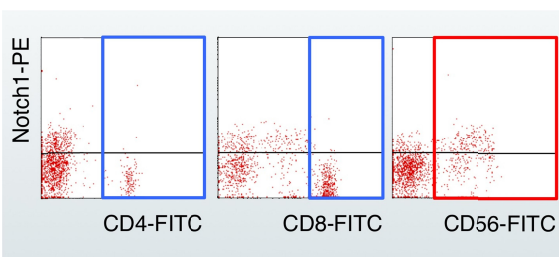
3. 研究の方法

(1) 本研究は患者検体を用いた前向き観察研究であるため、計画内容は筑波大学附属病院の研究倫理審査委員会承認を受けた。対象は同種造血幹細胞移植後の造血器疾患患者 84 症例 (590 検体) および健常ボランティア 20 例。同種造血幹細胞移植 1 ヶ月後、2 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後および 12 ヶ月後に末梢血を採取し、T リンパ球 (CD4 陽性または CD8 陽性)、NK 細胞 (CD56 陽性) 分画における Notch1、Notch2、Notch3 分子の発現を、各分子に対する特異抗体を用いたフローサイトメトリーで解析した。本研究は (株) 三菱化学メディエンスとの共同研究として行った。

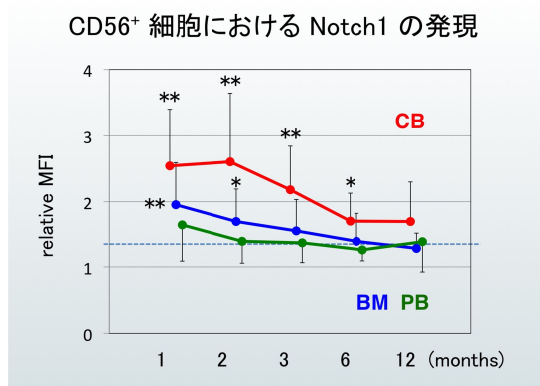
(2) 移植後の臨床成績 (急性 GVHD、慢性 GVHD、生存率、移植関連死亡、再発) と、各リンパ球サブセット上の Notch 発現との関連を解析した。

4. 研究成果

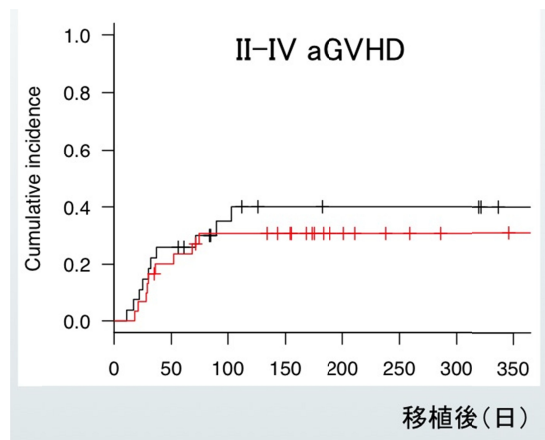
(1) 当初の予測に反し、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞には Notch 分子の発現を認めなかった。しかし CD56 陽性 NK 細胞上に Notch1 分子の有意な発現を認めた。次図に代表的なフローサイトメトリーの結果を示す。(左: CD4 陽性 T 細胞, 中: CD8 陽性 T 細胞, 右: CD56 陽性 NK 細胞)



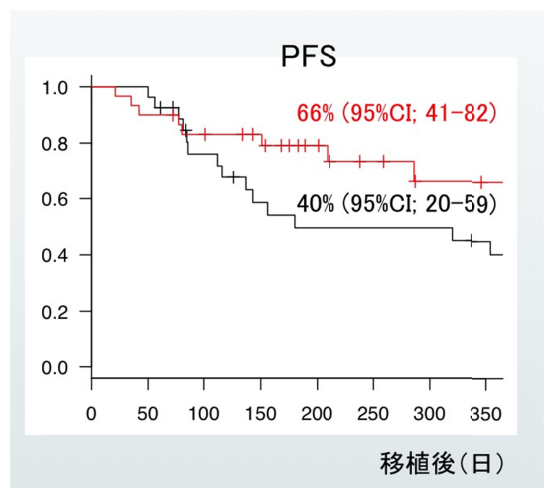
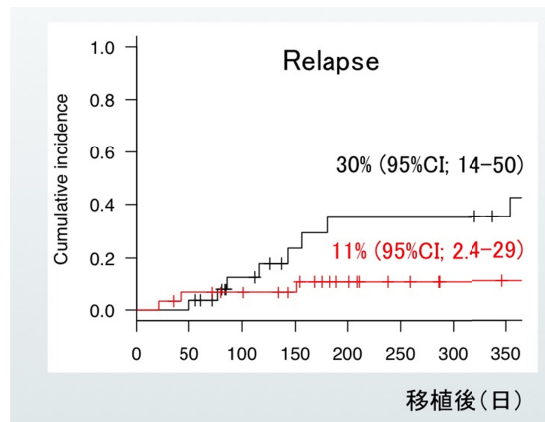
Notch1 陽性分画の蛍光強度を、陰性分画の蛍光強度との比として示した数値を相対蛍光強度とする。移植後早期では、健常ボランティアと比較して臍帯血移植症例(CB)にて有意にNK細胞上のNotch1分子の相対蛍光強度が強かった(臍帯血移植症例: 2.5 ± 0.8 , 健常人: 1.4 ± 0.3 , $p < 0.01$)。これは同種骨髓移植症例 (1.9 ± 0.6) および同種末梢血幹細胞移植症例 (1.7 ± 0.6) と比較しても、明らかに高い値であった。それ以降は経時的に減弱し、移植1年後には、移植後症例のNotch1の発現強度は健常ボランティアとほぼ同等となった。また全検体でNotch2, Notch3分子の発現を認めなかった。幹細胞ソース別のNK細胞上のNotch1の相対蛍光強度の経時的变化を下図に示す。



(2) リンパ球(NK細胞)上Notch1の発現と、移植後の急性GVHD発症との関連を解析した。当初の予想に反し、リンパ球上のNotch1の発現強度と、急性GVHDの発症との関連を認めなかった。グレードII-IVのGVHD発症とNK細胞上のNotch1発現の強弱(赤: Notch1高発現症例群, 黒: Notch1低発現症例群)との関連を次の図に示す。また、移植後の急性GVHDと同様、慢性GVHDとNK細胞上のNotch1の発現にも関連性は見いだせなかった(data not shown)。



しかし驚くべきことに、移植後早期にNK細胞上にNotch1が高発現している症例で、移植後の再発が抑制され(1年再発率11% vs 30%)、無再発生存(progression-free survival, PFS)が有意に良好であった(1年無再発生存率66% vs 40%)(赤: Notch1高発現群, 黒: Notch1低発現群)。



以上の結果から、ヒトにおいて同種移植後

の T リンパ球上の Notch シグナルが GVHD の発症に關与するとする当初の仮説は否定されたものの、同種移植後の NK 細胞における Notch シグナルを介した NK 細胞の活性化が、移植後の再発を抑制する可能性を見出した。このことは、移植後の Notch シグナルを制御することにより、移植時の同種免疫反応において GVHD を最小限に抑えつつ、GVT 効果を発揮することができる可能性を示したものであり、同種造血幹細胞移植の成績向上に寄与することが期待される。

現在、NK 細胞の抗腫瘍効果に対する Notch1 の役割を明らかにするため、B6RV2, Lewis 肺癌, B16, S129 等の細胞を皮下へ移植した担癌マウスモデルに対して、OP19-Delta1 細胞により Notch シグナルを刺激した同種異型マウス由来 NK 細胞投与による抗腫瘍効果の解析を計画している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

栗田尚樹，同種造血幹細胞移植後の末梢血リンパ球における、Notch 分子の発現解析，第 36 回日本造血幹細胞移植学会総会，2014 年 3 月 7 日～9 日，宜野湾

栗田尚樹，Comprehensive analysis of Notch expression on lymphocytes after allogeneic stem cell transplantation，第 75 回日本血液学会学術集会，2013 年 10 月 11 日～13 日，札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 尚樹 (KURITA NAOKI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30555561

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし