

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：20101
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2012～2013
課題番号：24890180
研究課題名（和文）慢性移植片対宿主病における調節性 T 細胞の BH3 プロファイリング
研究課題名（英文）BH3 profiling for regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease (cGVHD)
研究代表者
河野 豊 (KAWANO YUTAKA)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：8039832
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）2,300,000 円、（間接経費）690,000 円

研究成果の概要（和文）：慢性移植片対宿主病（以下cGVHD）患者末梢血中におけるCD4陽性調節性T細胞（Regulatory T cell以下Treg）とnon-TregであるCD4 conventional T cell（以下Tcon）でのアポトーシスにおけるプロファイリング（BH3 profiling）を検討し，Treg及びTconにはアポトーシスに差があることを見出した．さらにIL-2を投与した場合において，Bcl-2がTregの生存に寄与していたことも見出し，BH3プロファイリングによってcGVHD患者におけるIL-2治療効果のメカニズムの一端が解明された．

研究成果の概要（英文）：BH3 profilings for CD4 positive regulatory (Treg) and non-regulatory (Tcon) T cells were examined. Different priming between Treg and Tcon was associated to the effect of IL-2, especially on Treg, which contributes to cell survival. This profiling can explain how low dose IL-2 therapy works in patients with chronic graft-versus-host disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：CD4 調節性 T 細胞，慢性移植片対宿主病，BH3 プロファイリング

1. 研究開始当初の背景

同種血液幹細胞移植治療 (Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation 以下 HSCT) は白血病やリンパ腫といった悪性疾患に有効な治療法であり，近年感染予防や支持療法の発達に伴い HSCT 治療により長期に生存し得る患者が増えつつある．一方慢性移植片対宿主病 (chronic graft-versus host disease 以下 cGVHD) は HSCT 後の長期合併症の 1 つであり，皮膚や腸管，肝臓，肺といった様々な臓器に自己免疫性疾患様の病状を呈する．cGVHD の発生率は 40-70% と比較的高く，移植後長期生存患者の Quality of life の低下や生命予後を損ねる重大な合併症である．cGVHD の病因の 1 つとして CD4 陽性 T 細胞のサブセットである CD4 陽性調節性 T 細胞 (Regulatory T cell 以下 Treg) の関与が知られている．Treg は一般的に T 細胞や B 細胞

などによる免疫反応に対して負に調節する細胞として働き，その低下および欠損は自己免疫疾患の発症と関連があることも知られている．

申請者はこれまで cGVHD 患者における Treg と non-Treg である CD4 conventional T cell (以下 Tcon) のテロメラーゼ活性に着目して，Treg のテロメラーゼ活性が cGVHD の重症度と相関していることを発見し学術雑誌に報告した (Blood 2011) ．さらに Treg のテロメラーゼ活性が，抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 蛋白の発現とも正の相関を認めていたことを発見し，cGVHD 患者における Treg のホメオスターシスの 1 つとして抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 蛋白発現が重要であることを解明した．定常状態においては Treg の Bcl-2 の発現は Tcon に比べて低いためにアポトーシスしやすい細胞であることから，テロ

メレース活性の上昇に一致したTregのBcl-2 蛋白発現の増強は、cGVHD 患者における活性化された Treg の生存に寄与する一因と考えられた。これに対してマウスの研究においては、Treg においてアポトーシス誘導蛋白の1 つである Bim 依存性にアポトーシスが誘導されていることが報告された (Journal of Immunology 2011)。また活性化された T リンパ球においてはアポトーシス蛋白のみならず抗アポトーシス蛋白も発現が変化していることから (Immunity 2006)、活性化 T リンパ球においてこれらのアポトーシス関連蛋白の発現変化のみでは実際の機能的なアポトーシスの変化を十分に反映していない可能性が考えられる。さらに Treg が末梢血単核球中において少ない細胞集団であること (通常 CD4 陽性 T リンパ球の 2-10%) や、cGVHD 患者重症例において CD4 陽性 T リンパ球数は特に低値であることから、cGVHD 発症例移植患者のヒト T リンパ球サブセットにおける詳細なアポトーシスの解析は今まで困難であった。

一方申請者が所属していた Dana-Farber Cancer Institute 内の共同研究先である Letai Anthony らは、アポトーシスの新しいプロファイリングアッセイ (BH3 profiling) を確立し、その有効性をアメリカ学術雑誌に報告した (Science 2011, PNAS 2010)。彼らは各アポトーシス誘導蛋白の活性部位である BH3 (Bcl-2 homology domain 3) 領域のペプチドを細胞に添加することにより変化するミトコンドリア電位を測定し、その電位変化のパターンによって細胞がどの抗アポトーシス蛋白に依存して生存しているかを明らかにした。この方法はすでに発現しているアポトーシス関連蛋白の発現多寡に関わらず実際のアポトーシスを測定することができるため、上述した活性化された T リンパ球の解析には有用と考えられた。またこのアッセイはフローサイトメトリー法を用いており、1つのサンプル内で異なった細胞集団を同時に測定することが可能であるため、サンプル量が有限な臨床検体においても応用が可能と考えられた。さらに彼らの既報では陽イオン性の蛍光色素である JC-1 を用いていたが、別の陽イオン性の蛍光試薬である TMRE を用いることによってペプチドの使用量を約 1/10 程度に減らすことも可能にしている (投稿中)。

2. 研究の目的

本研究では、cGVHD 患者の検体を用いて Treg 及び Tcon の TMRE を用いた BH3

profiling アッセイの樹立を試み、Tcon および Treg における詳細なアポトーシスの解析を行うことを目的とした。さらには cGVHD に対する低用量 IL-2 を用いた第 I/II 相臨床試験において、cGVHD が改善した患者では Treg の増幅が確認されていることから (NEJM 2011)、分離した Tcon および Treg を IL-2 存在下で in vitro 培養し、培養した細胞のテロメレース活性の変化や Bcl-2 蛋白の発現ならびに BH3 profiling を解析し、低用量 IL-2 療法における Treg 細胞増幅のメカニズムの解析を行うことも目的とした。

3. 研究の方法

(1) Tcon および Treg の細胞集団の同定

ヒト末梢血単核球は比重遠心法を用いて分離した (Ficoll-Paque; GE Healthcare)。分離した単核球 1×10^6 を蛍光標識された CD4 抗体、CD25 抗体、CD127 抗体で染色した後、フローサイトメトリー (BD FACS Canto II; BD Biosciences) にて細胞集団を解析 (FACS Diva; BD Biosciences) した。すなわち Tcon は $CD4+CD25^{\text{negative-low}} CD127^{\text{medium-high}}$ 、Treg は $CD4+CD25^{\text{medium-high}} CD127^{\text{low}}$ と申請者の既報 (Blood 2011) に従ってそれぞれ定義した。上述した細胞表面抗原に対する染色を同様に行った後に細胞を固定および細胞透過し、その後さらに蛍光標識された細胞内転写因子である Foxp3 抗体 (eBioscience) で染色して Tcon および Treg の同転写因子の発現をフローサイトメトリーで解析した。

(2) Tcon および Treg の JC-1 を用いた BH3 profiling

BH3 profiling に用いたペプチドは既報に従って作成した (PNAS 2010, Science 2011)。単核球 4.0×10^6 を、研究方法 (1) で上述した細胞表面抗原に対する抗体で染色したあと、細胞透過液 (T-E 液; PNAS 2010) で細胞を懸濁して 10 サンプルに分注した。分注したサンプルに 100 μ M の BH3 ペプチドをそれぞれ添加し、30 分間ペプチドと細胞との反応を行った。次に JC-1 (Invitrogen) を最終濃度が 100 nM となるように添加してさらに 30 分間反応させた。その後フローサイトメトリーを用いて Tcon および Treg における FL-1 (FITC) と FL-2 (PE) のシグナルを検出した。陰性コントロールには溶媒である DMSO (Sigma) を、陽性コントロールには脱共液剤である FCCP (Sigma) を用いた。陰性コントロール投与時の FL-2 の intensity、もしくは FL-1 の intensity を FL-2 の intensity で割った値を 0%、陽性コントロール時を 100% とし、各ペプチド投与時の脱分極 (% depolarized)、すなわちアポトーシスの程度を測定した。

(3) TMRE を用いた BH3 profiling

Preliminary data では、TMRE (Invitrogen) 色素を用いた場合での BH3 profiling は、

JC-1 色素を用いたときと比べておよそ 1/10 程度のペプチド量でほぼ同様の結果が得られたので(投稿中), これを参考にしてアッセイに必要な細胞数およびペプチドの至適投与量を算定した. 末梢血単核球 3.0×10^6 を研究方法(2)と同様の細胞表面抗原に対する抗体で染色し, 細胞透過液に懸濁して 10 サンプルに分注した. 分注したサンプルに 10 μ M の各 BH3 ペプチドをそれぞれ添加して 30 分間ペプチドと細胞との反応を行った. 次に TMRE を最終濃度が 25nM となるように添加してさらに 30 分間反応させた. その後フローサイトメトリーを用いて Tcon および Treg の FL-2 (PE) のシグナルを検出した. 研究方法(2)と同様陰性コントロールには DMSO を, 陽性コントロールには FCCP を用いた. 陰性コントロール投与時の FL-2 の intensity を 0%, 陽性コントロール時を 100% として, 各ペプチド投与時の脱分極(% depolarized)を測定した. 樹立した BH3 profiling アッセイをまず健康人の末梢血単核球で検討し, その後 cGVHD 患者検体の末梢血単核球を用いた.

(4) Tcon および Treg の細胞分離ならびにテロメラーゼ活性とテロメア長の測定

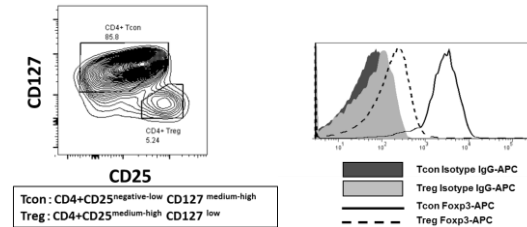
研究計画(1)と同様に末梢血単核球を Tcon および Treg の細胞表面抗原で抗体染色したあとにセルソーター (BD FACSAria II Cell Sorter; BD Biosciences) を用いて, Tcon 及び Treg 各々の細胞分離を行った. 高純度(95%以上)に分離された Tcon および Treg の一部は Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS kit (Roche Diagnostics) を用いて, テロメラーゼ活性を測定した. 残りの Tcon および Treg はゲノム DNA を抽出して, テロメア DNA に対するプライマーもしくは内在性コントロールである beta-globin に対するプライマーを用いて PCR を行った. 各々のプライマーを用いて得られたサンプルの PCR の結果はコントロール細胞である Jurkat 細胞株の PCR の結果と比較することによって, サンプル間におけるテロメア長の半定量的な測定を行った.

(5) IL-2 の Tcon および Treg に対するテロメラーゼや BH3 profiling への影響

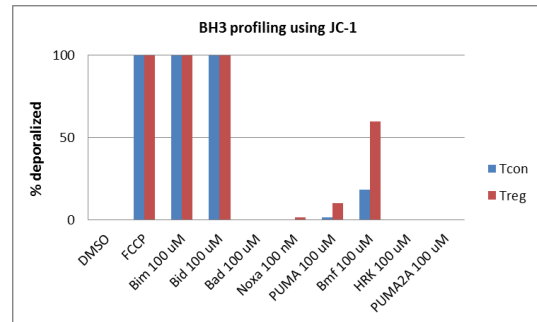
研究計画(4)と同様の方法で分離された Tcon および Treg それぞれ 1×10^5 を 6well plate を用いて Recombinant human IL-2 存在下で 6 日間培養した. 培養期間内および培養終了後に細胞を回収して Trypan blue を用いた dye exclusion 法にて細胞数を測定した. さらに培養した細胞のテロメラーゼ活性の測定と Bcl-2 蛋白 (抗 Bcl-2 抗体; BD Biosciences) の発現をフローサイトメトリーで測定した. さらには TMRE 色素を用いた BH3 profiling を検討した.

4. 研究成果

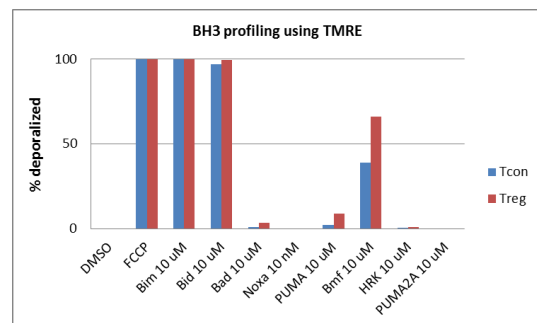
(1) Tcon および Treg の細胞集団の同定: フローサイトメトリーにて CD4 陽性 T リンパ球細胞中の CD25 と CD127 の発現パターンより Tcon および Treg を同定した. さらに両細胞の FoxP3 発現を測定し Tcon と比べて Treg において高く発現していた.



(2) Tcon および Treg の JC-1 を用いた BH3 profiling: JC-1 色素を用いた BH3 profiling 法により, Puma 100 μ M, Bmf 100 μ M 投与時において Tcon より Treg の方が priming されていた.

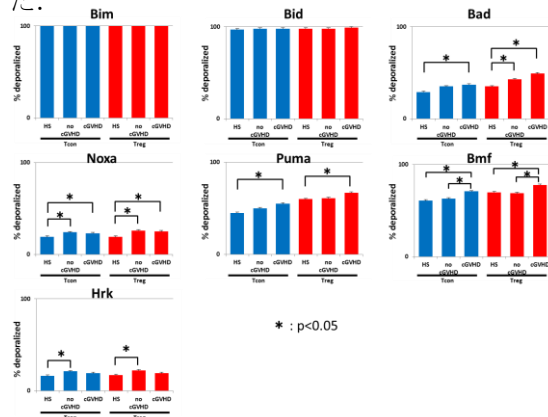


(3) TMRE を用いた BH3 profiling: TMRE 色素を用いた BH3 profiling 法においては, JC-1 色素を用いたときと同様に Puma, Bmf ペプチド投与時において Tcon より Treg の方が priming されており, 1/10 量のペプチドでも同様に priming されていることが確認できた.

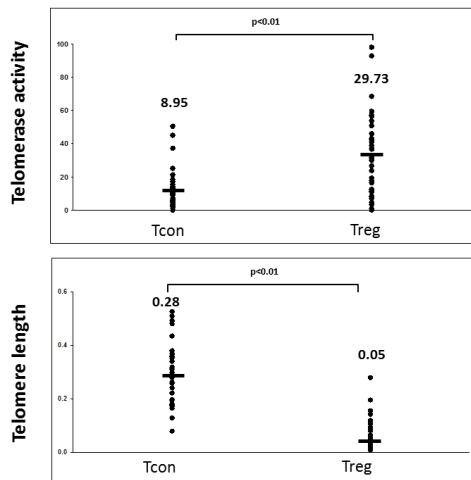


以上の基礎的検討をもとに, 健康人, HSCT 後の cGVHD を発症した患者および発症していない患者の末梢血単核球を用いて Tcon と Treg の BH3 profiling を検討した. Bad, Noxa, Puma, Bmf ペプチド投与において, cGVHD 発

症患者の Tcon, Treg いずれも健常人の場合と比べて priming されていることが確認された。



(4) Tcon および Treg の細胞分離ならびにテロメラーゼ活性とテロメア長の測定：cGVHD 発症患者における Tcon 及び Treg では両細胞ともにテロメラーゼ活性を有しており、Treg の方が優位に高い活性を示していた。一方テロメア長については Treg の方が優位に短縮しており、Treg においてテロメラーゼ活性のみではテロメア長を維持できないことが観察された。



(5) IL-2 の Tcon および Treg に対するテロメラーゼや BH3 profiling への影響：分離した Tcon 及び Treg を IL-2 存在下で in vitro で培養したところ、培養 72 時間後より両者ともテロメラーゼ活性の上昇を認めた (図 1)。一方培養 72 時間後における BH3 profiling では Treg において IL-2 投与により Bim, Bad, Noxa, Puma ペプチド投与時の priming が低下していた (図 2)。Bcl-2 の発現においては Tcon と比べて低濃度 IL-2 において Treg での発現が増強していた (図 3)。これらの結果から、Treg においては IL-2 が Bcl-2 蛋白発現の増強といった抗アポトーシスに働いていることが機能的に確認された。

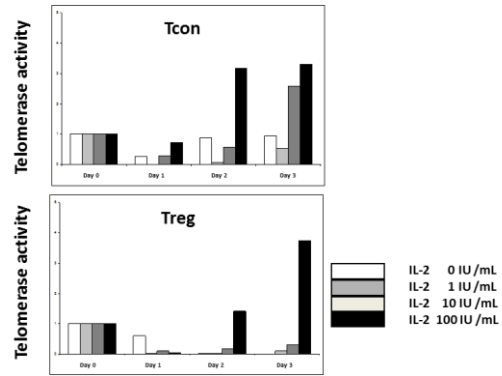


図 1 IL-2 投与によるテロメラーゼ活性

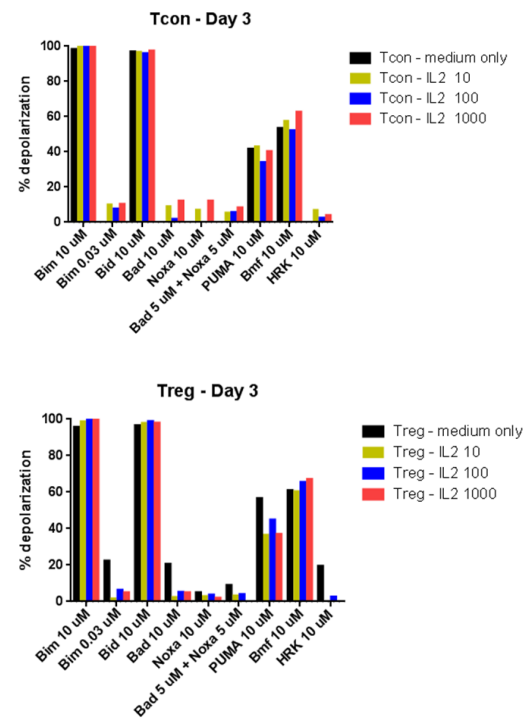


図 2 IL-2 投与による BH3 プロファイリング

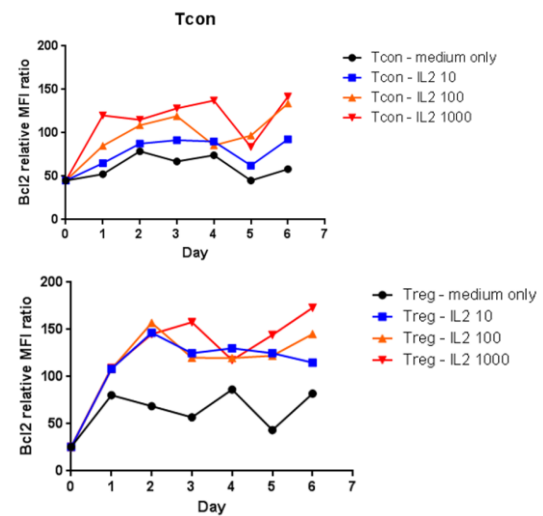


図 3 IL-2 投与による Bcl-2 発現

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 1 件)

村瀬和幸, 河野豊, Jeremy Ryan ら,
Low-dose-IL-2 induces Bcl2 expression and
resistance to apoptosis in CD4 regulatory
T cells. アメリカ血液学会, 2013年12月9
日, ニューオーリンズ, アメリカ

[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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 豊 (KAWANO YUTAKA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80398320

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: