

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：83301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461604

研究課題名(和文) PUVA処理した制御性樹状細胞によるヒトGVHDに対する新たな細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of the new cell therapy for GVHD using tolerogenic dendritic cells treated by PUVA treatment

研究代表者

前馬 秀昭 (Maeba, Hideaki)

独立行政法人国立病院機構(金沢医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：10419335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨髄細胞からpsoralen と紫外線(UVA)を用いて、制御性樹状細胞(PUVA-DC)を作製する技術を開発した。In vitroの解析ではMHC非依存性にTリンパ球に対し抑制作用を示し、細胞間接着およびIDO増加による免疫寛容誘導が示唆された。しかしIDO阻害物質下におけるリンパ球混合培養では免疫抑制作用は解除されなかった。マウスGVHDモデルでPUVA-DC(Host, Donor, Third-party)を輸注したがGVHD抑制作用は認めなかった。生体内での生着・生存が不十分であることが考えられ、生体内投与後においても生存するPUVA-DC作成を探索する研究へと繋がった。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow-derived cultured DCs acquired tolerogenicity by PUVA (psoralen+UVA) treatment in mice. In vitro assays, strong tolerogenicity was observed when adding PUVA-DC even from third party strain into MLR. That is, the PUVA-DC have tolerogenic function in a MHC-independent manner. We showed that cell-to-cell contact was needed to mediate the regulatory effect by transwell experiment. Next, we compared the expression of the IDO, which induces T-cell anergy, by real-time PCR between PUVA-DC and BM-DC. An increase IDO gene transcription level was observed in PUVA-DC about 5 times more than in BM-DC. But adding 1-MT, which is an inhibitor of IDO, had no effects on MLR with PUVA-DC.

We transfused PUVA-DC (Host-type, Donor-type, Third-party-type) in a mouse GVHD model, but the GVHD inhibitory effects were not observed. It was thought the survival of PUVA-DC was insufficient. These data leads us to search for technique to make PUVA-DC to survive after in vivo administration.

研究分野：GVHD

キーワード：制御性樹状細胞 PUVA GVHD

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植の合併症である GVHD は allele レベルでの HLA 適合や免疫抑制剤の開発がなされてきた現在においても II 度以上の GVHD は非血縁者間で 40%以上発症している。そのため原疾患の治癒が得られても QOL 改善が得られない症例や死亡する症例が存在する。急性 GVHD 発症には、移植片に存在する末梢のナイーブ T 細胞が移植後 2 次性リンパ組織 (末梢リンパ節、パイエル板、脾臓、腸管膜リンパ節など) に集積し、ホスト由来の樹状細胞と反応し爆発的に増殖する。その後、GVHD 標的臓器である肝臓、皮膚、腸管に浸潤し組織が傷害される (Ferrara et al. Bone Marrow Transplant 1994;14:183-184)。移植時にナイーブ T 細胞を刺激する樹状細胞は、これまでの研究から複数のサブセットから構成されていて、その成熟段階や分化経路が異なっている事が明らかとなった。そのサブセットの中において免疫寛容を誘導させる制御性樹状細胞の存在が明らかになり、人工的に作製する技術もいくつか開発された。血管作動性腸管ペプチド (Vasoactive intestinal peptide, VIP) を用いて作製した制御性樹状細胞では、マウス GVHD モデルにて急性 GVHD を抑制できることが示された (Chrony et al. Blood 2006;107:3787-94)。しかしこのモデルではホストタイプの制御性樹状細胞の投与時のみ急性 GVHD 抑制作用を示したが、ドナータイプおよびサードパーティーから作製した制御性樹状細胞では急性 GVHD 抑制作用が認められなかった。この結果は、ヒトへの臨床応用を検討した場合、多大な困難を伴うことになる。すなわち、ホストタイプの制御性樹状細胞による GVHD 予防は、白血病細胞の混入や骨髄の疲弊のため不可能であり、また血管作動性腸管ペプチドはヒトへの安全性は確認されておらず試薬も高価であることから実現性が低い。

我々は、この欠点を補う制御性樹状細胞の作製を目指し、ようやくその作製に成功した。我々が作成した psoralen+紫外線照射を利用した制御性樹状細胞 (PUVA-DC) は、ドナータイプさらにはサードパーティーにおいても混合リンパ球反応を抑える事が可能であった。免疫寛容のメカニズム解析では、共刺激分子 (CD80, CD86) の低下等実験にて明らかとなり、マウス GVHD モデルにおける PUVA-DC の可能性をアメリカ血液学会 (50~52nd American Society of Hematology) において報告している。この PUVA-DC を用いて HLA の壁を乗り越えるヒトへの造血幹細胞移植を目的として研究を続けている。

2. 研究の目的

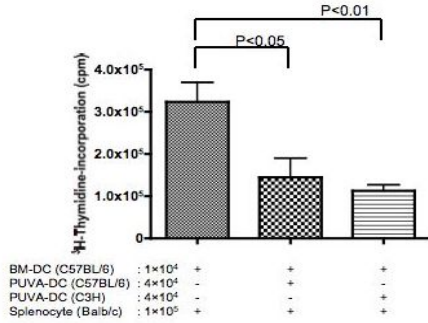
psoralen+紫外線照射を利用した制御性樹状細胞 (PUVA-DC) における免疫抑制の制御性メカニズムを解析し、将来的には HLA 不一致の造血幹細胞移植における GVHD 予防ならびに治療に PUVA-DC を用いた細胞療法を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

マウス骨髄細胞から、GM-CSF を用い 10 日間かけて大量の未熟樹状細胞を作製する。その未熟樹状細胞に対して、psoralen (200ng/ml) を添加、その後 UVA 照射 ($2\text{J}/\text{cm}^2$) を施行し PUVA-DC としてマウス GVHD 移植実験および *in vitro* 実験に用いた。

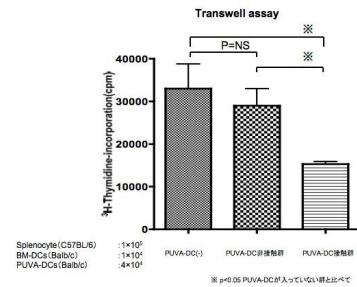
4. 研究成果

(1) responder (Balb/c) および stimulator (C57BL/6) とは異なる系統の PUVA-DC (C3H) を加え、混合リンパ球反応 (MLR) が抑制される効果を持つか実験を行った。



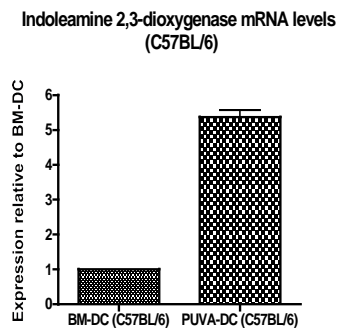
Third-party における PUVA-DC を混合リンパ球反応に加えることで抑制作用を示した。

(2)PUVA-DC が接触して抑制作用を示すのか、非接触にて抑制作用を示すのか Transwell を用いて実験を行った。



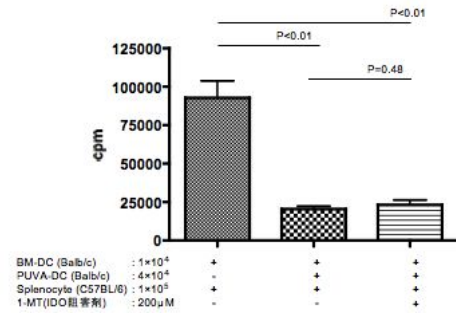
PUVA-DC の MLR 抑制効果は、接触群においてのみ認められ抑制効果は細胞間接触によるものと判明した。

(3)Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の発現を定量 PCR にて測定



IDO mRNA の発現は、約 5 倍以上に増加していたため、免疫寛容の誘導の機序として IDO 発現によるトリプトファン枯渇作用による細胞増殖の抑制が示唆された。

(4) IDO 阻害物質 (1-MT) による PUVA-DC の抑制作用解除の有無を検討



IDO 阻害剤 (1-MT) 下においても MLR が抑制されたため、IDO 発現増加による免疫抑制作用の増強ではないと考えられた。

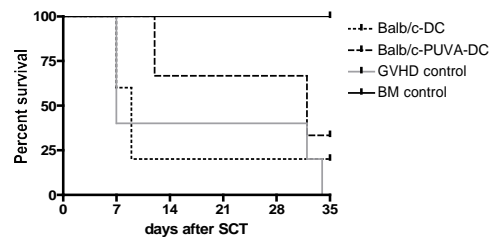
(5) マウス GVHD モデルによる PUVA-DC の GVHD 抑制作用の検討

Host-mouse (Balb/c)

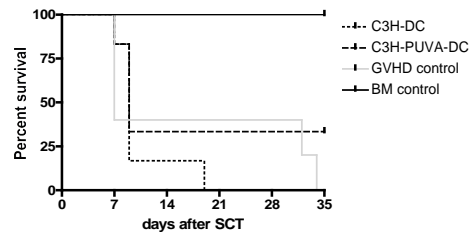
Donor-mouse (C3H)

Third-party mouse (C57BL/6)

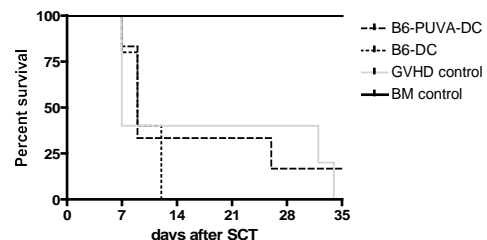
Host-typed の PUVA-DC 輸注実験



Donor-type の PUVA-DC 輸注実験



Third-party の PUVA-DC 輸注実験



Host-type, Donor-type, Third-party-type 全ての PUVA-DC の輸注においても、統計上有意

な GVHD の改善効果が得られなかった。(p=NS) 過去の我々の報告では、in vitro の系においては、MHC の壁を乗り越えた強力な免疫抑制作用を有していた PUVA-DC であり、in vivo における生着・生存が不十分であったと考えられる。生体内投与後においても生存および免疫抑制作用を有する PUVA-DC 作成を探索する研究へと繋がった。

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 3 件)

1. Araki R, Nishimura R, Mase S, Fujiki T, Kuroda R, Maeba H, Koizumi S, Yachie A, Niida Y. Effective prophylaxis against various adverse events from mitochondrial cytochrome b gene mutation triggered by transplant-related chemotherapy and immunosuppressants. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63:374(査読あり)
2. Goto Y, Nishimura R, Nohara A, Mase S, Fujiki T, Irabu H, Kuroda R, Araki R, Ikawa Y, Maeba H, Yachie A. Minimal contribution of severe hypertriglyceridemia in L-asparaginase-associated pancreatitis developed in a child with acute lymphocytic leukemia. *Rinsho Ketsueki*. 2016;57:994-998 (査読あり)
3. Ikawa Y, Nishimura R, Araki R, Noguchi K, Muraoka M, Fukuda M, Fujiki T, Kuroda R, Mase S, Maeba H, Nomura K, Yachie A. Pathognomonic serum cytokine profiles identify life-threatening Langerhans cell histiocytosis. *Br J Haematol*. 2016 : Apr 7 :495-497 (査読あり)

[学会発表](計 3 件)

1. Hideaki Maeba, Rie Kuroda, Toshihiro Fujiki, Kazuhiro Noguchi, Masaki Fukuda, Shintaro Mase, Raita

Araki, Yasuhiro Ikawa, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie and Ryosei Nishimura. Frequently observed long-lasting abnormal serological tests against cytomegalovirus after allogenic hematological transplantation. BMT Tandem meeting(国際学会)2016年2月18日～22日ハワイ

2. Kuroda R, Mase S, Fujiki T, Maeba H, Araki R, Ikawa Y, Fukuda M, Koizumi S, Yachie A, Nishimura R. Third party cytokine-induced killer eliminate highly activated T-cells, leading to protect from murine lethal graft-versus-host disease. 57th American society of hematology annual meeting. 2015 年 12 月 5 日-8 日. Orange County Convention Center (USA)
3. Hideaki Maeba, Rie Kuroda, Toshihiro Fujiki, Kazuhiro Noguchi, Masaki Fukuda, Shintaro Mase, Raita Araki, Yasuhiro Ikawa, Shoichi Koizumi, Akihiro Yachie and Ryosei Nishimura. Quantitative PAIgG predicts clinical course of immune thrombocytopenia 日本小児血液がん学会 2015 年 11 月 27 日～29 日山梨

[その他]
ホームページ等
<http://ped.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
前馬 秀昭 (MAEBA HIDEAKI)
国立病院機構金沢医療センター臨床研究部 小児科医師
研究者番号 : 10419335
- (2)研究分担者
伊川 泰広 (IKAWA YASUHIRO)
金沢大学医学部附属病院小児科 助教
研究者番号 : 1072204
- (3)研究分担者
荒木 来太 (ARAKI RAITA)
金沢大学医学部附属病院小児科 助教
研究者番号 : 60768779