

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 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591351

研究課題名（和文）小児血液腫瘍性疾患に対する抗腫瘍効果のみを増強した新たな造血幹細胞移植療法の開発

研究課題名（英文）Research toward the development of stem cell transplantation augmented graft-versus-tumor effect against childhood malignancies

研究代表者

西村 良成（NISHIMURA RYOSEI）

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：50324116

研究成果の概要（和文）：

Cytokine-induced killer (CIK) 細胞は、同種骨髄移植モデルにおいて優れた抗腫瘍効果を示し、かつ重篤な急性移植片対宿主病 (GVHD) を発症しない。しかしながら慢性 GVHD を発症する場合がある。慢性炎症に関与する IL-17 を欠損させた骨髄細胞を用いた場合、慢性 GVHD が減弱した。IL-17 を制御することで慢性 GVHD を抑制し、抗腫瘍効果を維持した骨髄移植が可能かもしれない。

研究成果の概要（英文）：

Cytokine-induced killer (CIK) cells exert strong graft-versus tumor effect (GVT) without causing severe acute graft-versus-host disease (GVHD) in a murine model. However, in some cases CIK cells causes mild chronic GVHD. To reduce chronic GVHD, we studied the role of IL-17, which are involved in the pathogenesis of chronic inflammation, in a murine model. We demonstrated that the mice receiving bone marrow cells from IL-17 knockout mice showed very mild chronic GVHD compared to the mice receiving wild type bone marrow cells. Bone marrow transplantation augmented GVT without causing chronic GVHD might be possible by controlling IL-17.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：小児血液学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：骨髄移植、移植片対宿主病、IL-17、Cytokine-induced killer 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

る重大な問題である。GVHD は、大きく急性と慢性の 2 種類に分けられその病態も大きく異なる。急性 GVHD はドナー骨髄移植片に含まれるナイーブ T 細胞がレシピエントに輸注され主要組織適合抗原やマイナー組織適合抗原の違いにより急激に活性化され、主にレシピエントの皮膚、腸ならびに肝臓を攻撃する (Ferrara et al. Bone Marrow Transplant 1994;14:183-184)。慢性 GVHD は胸腺、胸腺外でのドナー未分化 T 細胞の成熟傷害ならびに B 細胞を巻き込んでの自己免疫疾患に近い病態をとる。

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抗腫瘍効果 (GVT: graft-versus-tumor effect) と呼ぶ。理想的には、GVHD のみを抑えて最大の GVT 効果が得られるように造血幹細胞移植を行えばよいが現実の臨床の間では、GVHD と GVT を分離して制御する方法はない。

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な大学骨髄移植部門 (Negrin 教授) に留学中ならびに留学後の共同研究として詳細な解析を行い論文として発表した (Nishimura et al. Blood. 2008;112:2563-74)。概要を述べるとマウス脾臓細胞を IFN- γ 、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軽度の慢性 GVHD の発症も一部のマウスで認められており今後はこの点についての研究を完遂することで臨床応用へと発展させることができると考えた。

2. 研究の目的

CIK 細胞には、強力な抗腫瘍効果がある反面、軽度の慢性 GVHD を誘導する可能性がある。本研究課題の申請時に我々は、IL-17 が慢性 GVHD の発症に寄与しているデータを得た。ここから発展して、IL-17 を制御することにより、CIK 細胞輸注の欠点が補われるかどうかを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

CIK 細胞は、マウスの脾臓細胞に IFN- γ 、抗 CD3 抗体、IL-2 を添加し 14-21 日間培養して得られる heterogenous な細胞群である。主たる抗腫瘍効果を有する細胞は、CD8+ かつ NK 細胞の活性化レセプターの一つである NKG2D が陽性の細胞である。その他の細胞群として CD8+NKG2D- の群、CD4+ の細胞群も存在し、それらの割合はマウスの種により異なる。そのため野生型と IL-17KO マウス間群における subpopulation の比較、サイトカイン産生能ならびに腫瘍細胞を用いた killing assay を行い両群間で比較検討を行う。

次に 800cGy の放射線照射マウス (Balb/c : H-2^d) に、放射線照射後 T 細胞除去を行った C57BL/6 (H-2^b) マウスの骨髄を移植する。また今回の移植の系では、ホストマウスの残存細胞は H-2^d かつ Thy1.2 で、T 細胞除去骨髄には、C57BL/6 のコンジェニックマウスを用いるため H-2^b かつ Thy1.1 であり IL-17KO マウ

スならびに野性型 C57BL/6 では、H-2^b かつ Thy1.2 である。そのため FACS や免疫染色を用いれば自分の関心のある細胞を特異的に観察、解析することができる系とした。具体的には以下の項目について評価する。

(1)生存曲線

(2)病理学的 GVHD スコア

(3)GVHD の進展ならびに抑制に関与するとされる経時的血清サイトカインの測定 (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17)

(4)FACS を用いた CIK 細胞内サイトカインの移植後の経時的測定。(IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-4, IL-10)

(5)IL-17 は、好中球とのクロストークを有するサイトカインである。そのため GVHD 標的臓器である肺、皮膚、腸管組織中における好中球の役割を解析するためにミエロペルオキシダーゼ、好中球エラスターゼを指標として病変浸潤部の好中球の活性化を評価する。

4. 研究成果

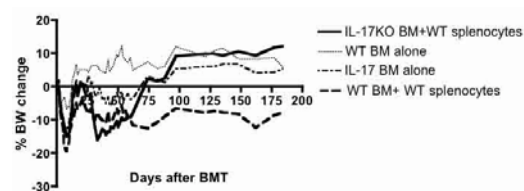
まず野生型 B6 マウス由来 CIK 細胞と IL-17 ノックアウトマウス (IL-17KO) 由来 CIK 細胞を比較検討を行った。培養期間は、両者共に 14 から 21 日間で行った。CD8+NKG2D⁺、CD8+NKG2D⁻、わずかの CD4 細胞からなる heterogenous な細胞群であるが、両者間に優位な差を認めなかった。また A20 マウス白血病リンパ腫細胞に対して Cr release assay で殺細胞活性を測定したが両者間で優位な差を認めなかった。以上から *in vitro* では、CIK 細胞の増殖効率、殺細胞能には IL-17 は関与しないことが判明した。

次に、800cGy の放射線照射マウス (Balb/c : H-2^d) に、放射線照射後 T 細胞除去を行った C57BL/6 (H-2^b) マウスの骨髄を移植し、更に野生型の CIK 細胞、IL-17KO CIK

細胞を輸注した群のマウスを比較検討した。いずれの群も急性 GVHD の発症はわずかでそれによる死亡も認めなかった。しかしながら野生型 CIK 細胞投与群と IL-17KO CIK 細胞投与群での慢性 GVHD の発症は、両者とも軽度ではあるが存在し、二群間で明らかな有意差を示せなかった。以上から輸注された CIK 細胞の IL-17 の発現の有無では慢性 GVHD の発症がコントロールされているわけではないことが判明した。その理由として輸注した CIK 細胞の生体内での生存期間が慢性 GVHD が発症してくる時期には、ほとんど存在しないのではないかと考えた。

上記の結果をうけ、輸注された CIK 細胞の IL-17 ではなく、骨髄から新たに産生されてくる IL-17 産生細胞の有無が慢性 GVHD の発症に関わってくるのではないかと考えた。

すなわち 800cGy の放射線照射マウス (Balb/c : H-2^d) に、野生型 B6 骨髄、または B6 由来 IL-17KO 骨髄を輸注し、ごく少量の脾細胞を輸注することにより慢性 GVHD の誘導を試みた。下図に示したよう IL-17KO 骨髄を輸注したマウス群では、体重の変化が慢性 GVHD を発症しない骨髄輸注単独群とほとんど同じであった。

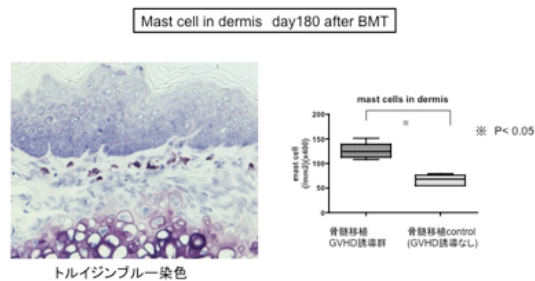


このことから CIK 細胞を用いた、造血幹細胞移植において抗腫瘍効果を増強させるには、CIK 細胞自身の IL-17 を欠損させるよりも骨髄細胞由来の IL-17 を欠損させれば慢性 GVHD を発症せず、抗腫瘍効果を増強させることが可能と考えられた。

また当初の実験仮説では、IL-17 と好中球とのクロストークが喘息モデルなどを中心

に報告がなされていた。慢性 GVHD 病理組織像でも IL-17 の有無により好中球の浸潤程度が異なり病変増悪との関連を予想していたが、今回の検討では明確な関連性を示せず、継続検討課題となった。

しかしながらマウスの慢性 GVHD 病変部位をトルイジンブルー染色で肥満細胞の検討を行った。慢性 GVHD 誘導群で優位に肥満細胞の集属がみられた。肥満細胞と IL-17 との関連も最近報告され、この点についても今後の慢性 GVHD の制御に向けての重要課題と位置づけ継続研究課題とした。



最後に輸注する骨髓細胞を IL-17 欠損に加えて、ホスト側も IL-17 欠損マウスにした場合、慢性 GVHD が更に発症しないのではないかと予想した。しかしながら予想とは大きく異なり、急性 GVHD が非常に増悪して短期間にマウスが死亡してしまう現象を見出した。慢性 GVHD ばかりでなく急性 GVHD の発症機構を探索する上で重要な発見であった。

今後は、ホスト側、ドナー側の IL-17 を役割を更に解析すると同時に、肥満細胞との関わりを明らかにし、GVHD 特に慢性 GVHD を制御した造血幹細胞移植の開発に尽力したい。

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)

[学会発表] (計 7 件)

1. Kuroda R, Nishimura R, et al, Both tissue-derived and bone marrow-derived host IL-17 producing cells are required for

or preventing acute graft-versus-host disease, 第53回米国血液学会, 2011.12.10-13, San Diego convention center (米国)

2. Kuroda R, Nishimura R, et al, Attempting to classify prolonged graft-versus-host disease according to monocyte activation status in addition to T-cell, 第53回米国血液学会, 2011.12.10-13, San Diego convention center (米国)

3. Maeba H, Nishimura R, et al, Only dendritic cells, but not lymphocytes, acquired tolerogenicity by PUVA-treatment by upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), 第53回米国血液学会, 2011.12.10-13, San Diego convention center (米国)

4. Kuroda R, Nishimura R, et al, Role of IL-17 varies at different periods after hematopoietic stem cell transplantation: protection from acute graft-versus-host disease and exacerbation of chronic graft-versus-host disease, 第52回米国血液学会, 2010.12.4-7, Orange country convention center (米国)

5. Mase S, Nishimura R, et al, Cytokine-induced killer cells facilitate immune reconstitution after allogeneic BMT in mice, 第52回米国血液学会, 2010.12.4-7, Orange country convention center (米国)

6. Maeba H, Nishimura R, et al, Potent strategy for treatment of GVHD and a autoimmune disease by infusion of donor-typed or even third-party tolerogenic dendritic cells by psoralen plus UVA treatment, 第52回米国血液学会, 2010.12.4-7, Orange country convention center (米国)

7. Maeba H, Nishimura R, et al, Strong inhibition of alloreaction by newly generated tolerogenic dendritic cells by psoralen plus UVA treatment, 第51回米国血液学会, 2009.12.8, New Orleans convention center (米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 良成 (NISHIMURA RYOSEI)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：50324116