

機関番号：83301

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009 年度～2010 年度

課題番号：21790973

研究課題名（和文） 制御性樹状細胞の大量培養を用いた新たな造血幹細胞移植の開発

研究課題名（英文） The treatment strategy for GVHD by infusion of PUVA-treated dendritic cells

研究代表者 前馬 秀昭

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

研究成果の概要（和文）：マウス骨髄細胞から GM-CSF を添加し未熟樹状細胞を大量に培養した後、psoralen と紫外線を併用し（いわゆる PUVA 療法の応用）制御性樹状細胞を大量に作製することに成功した。その細胞は、混合リンパ球反応（MLR）において MHC 非拘束性に抑制性の機能を有していた。メカニズムは、抗炎症性サイトカイン（IL-10 や TGF- β ）によるものではなく、細胞間の接触によって引き起こされていた。トリプトファン代謝による細胞増殖の抑制をみるため、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の発現を定量 PCR 法にて測定したところ、骨髄由来の樹状細胞に比べて 5 倍以上発現していた。IDO を発現し、MHC 非拘束性に抑制機能を有する PUVA 処理した樹状細胞による細胞療法は、致死的な GVHD に対して有用な治療法と成りうる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： Bone marrow-derived cultured DCs acquired tolerogenicity by PUVA (psoralen+UVA) treatment in mice. In MLR assays, strong tolerogenicity was observed when adding PUVA-DCs generated from the same strain of stimulator cells, or responder cells, or even from third party strain into MLR mixture. That is, the PUVA-treated DCs have tolerogenic function in a MHC-independent manner, in part, due to the reduced expression levels of CD80 and CD86. To clarify the mechanisms of how PUVA-treated DCs induce tolerogenicity in further detail, we performed MLR with the addition of neutralizing antibodies against IL-10 or TGF- β 1 or both. Neutralization of immunosuppressive cytokines had no effects on MLR. We then showed that cell-to-cell contact between PUVA-DCs and alloreactive T-cells was needed to mediate the regulatory effect by transwell experiment. Next we compared the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), which induces T-cell anergy by tryptophan depletion and by the production of metabolic byproducts collectively known as kynurenines, by real-time PCR between PUVA-DCs and BM-DCs. An increase IDO gene transcription level was observed in PUVA-DCs about 5 times more than in BM-DCs ($p < 0.01$). In conclusion, PUVA-DCs acquired regulatory function in a MHC-independent manner by upregulation of IDO. Infusion of PUVA-treated DCs could have a great potential to treat lethal acute GVHD in clinical settings.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：小児血液学

キーワード：GVHD、制御性樹状細胞、造血幹細胞移植、PUVA 療法

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植が難治性造血器腫瘍の根治的治療法として確立され久しいが、依然として移植成績は急性 GVHD の重症度によって決定づけられているのが現状である。急性 GVHD は、移植片に存在する末梢のナイーブ T 細胞が輸注後 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）。急性 GVHD を抑制するために各種強力な免疫抑制剤が開発されてきたが GVHD のみを抑制することは困難で、結果的に正常免疫も抑制し重度の免疫不全症となり移植成績の劇的な改善には貢献していないのが現状である。その他の方法として GVHD を引き起こす T 細胞を予め除去する T 細胞除去骨髄移植や造血幹細胞（CD34 陽性）のみを選択して移植する方法も試みられてきた。これらの方法は、確かに GVHD の発症頻度は減少したものの骨髄移植片の生着不全、抗腫瘍効果の減少など負の部分が目立ったため現在は標準的移植方法となっていない。

最近の研究では、急性 GVHD を細胞療法でコントロールする試みも行われている。制御性 T 細胞 (Treg) は、CD4+CD25+Foxp3+ のマーカーを発現し強力な免疫制御機能を有し末梢の自己寛容作用の中心的役割をになっている細胞群である。マウス骨髄移植モデルにおいては、これらの細胞を輸注すると急性 GVHD の発症が抑制されることが判明している。しかしながらヒトへの臨床応用に向けては、大量の Treg が必要になることから培養の問題など乗り越えなければならない

障壁があるのが現状である。

マウス骨髄細胞に GM-CSF を添加し 10 日間培養すると大量の未熟樹状細胞が作製される。この細胞に psoralen を添加し紫外線を照射（いわゆる PUVA 療法の応用）すると制御性樹状細胞に性質が変化することが、基礎的実験より判明した。今回、この PUVA 処理した樹状細胞が、どのようなメカニズムで制御性の作用を示し最終目標として、ヒトへの GVHD の予防ならびに治療を目的として研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

マウス骨髄細胞から GM-CSF を用いて 10 日間培養し得られた未熟樹状細胞に対して、psoralen 添加および UVA 照射（いわゆる PUVA 療法の応用）を施行して得られた樹状細胞（以下 PUVA-DC）が、どのような機序で制御性の作用を示すのか、どのような性質をもっているのか詳細なメカニズムに対して、マウスモデルを用いアプローチを行う。最終的には、ヒトへの GVHD の予防ならびに治療を目的とした。

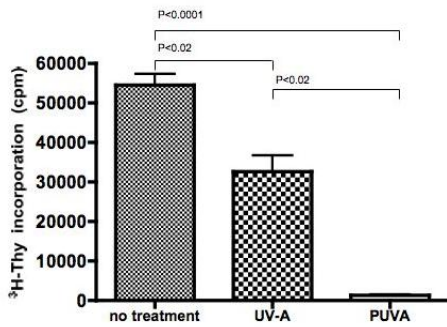
3. 研究の方法

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 (2J/cm²) を施行し 24 時間経過したものを、PUVA-DC として実験に用いた。

はじめに、PUVA-DC と UVA 照射のみ施行し、24 時間経過した樹状細胞 (UVA-DC) と未熟樹状細胞を用いて Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) を行った。概略を説明すると C57BL/6 マウスの骨髄から未熟樹状細胞と制御性樹状細胞を作製し放射線照射を行った。これらの細胞と Balb/c の脾臓細胞を混合

培養しチミジンを利用した MLR を行った。

図 1-A



グラフの一番左のバーは、未熟樹状細胞のままであると激しくリンパ球が反応することを示している。代わりに PUVA-DC を用いるとリンパ球の反応が著しく低下していることが分かる ($p < 0.0001$)。

図 1-B

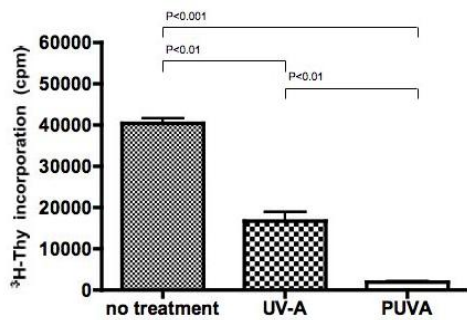
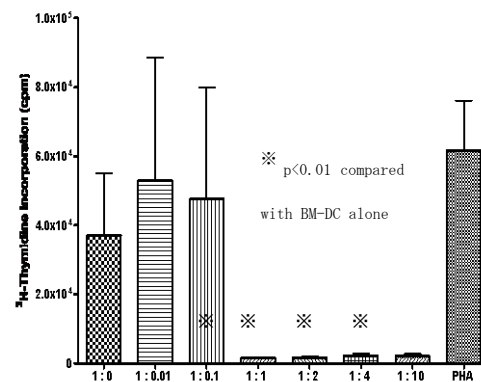


図 1-B は、マウスの種を変更して同様の実験を行ったが、この場合も制御性樹状細胞の免疫抑制効果が示された ($p < 0.001$)。

次に PUVA-DC を通常の MLR に加えることで、抑制効果を得られることができるかどうか、stimulator (樹状細胞) と同系統の PUVA-DC を加えることで実験を行った。

図 2

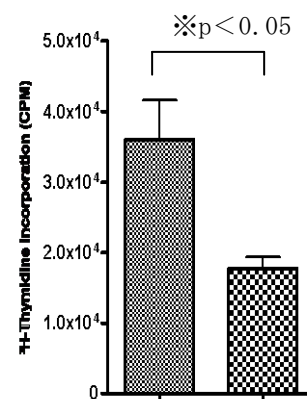


BM-DC : PUVA-DC (C57BL/6 より樹状細胞 (DC) を作製) responder は、Balb/c の脾臓細胞を使用

上記の実験の結果、図 2 は、同系統の PUVA-DC を等倍以上加えることで MLR が抑制されることを示した。PUVA-DC は、実際に抑制性の機能を有していることが判明した。(等倍以上 PUVA-DC を加えた群は全て $p < 0.01$)

また、図には示していないが、マウスの種を変更した (Balb/c より樹状細胞、C57BL/6 より脾臓細胞) 同様の実験でも等量以上加えることで、MLR を抑制した。

図 3-A

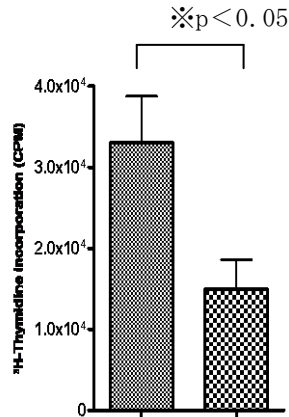


PUVA-DCs (Balb/c)	×	○
BM-DCs (C57BL/6)	○	○
Splenocytes (Balb/c)	○	○

図 3-A は、responder と同系統の PUVA-DC を加えることで、MLR が抑制されるか検討を行

った。図に示すように抑制効果を有意に認めた。(※ $p < 0.05$)

図 3-B



PUVA-DCs (C57BL/6)	×	○
BM-DCs (Balb/c)	○	○
Splenocytes (C57BL/6)	○	○

図 3-B は、種を変更しても同様に PUVA-DC を加えることで抑制効果が得られることを示した。(p<0.05)

Donor-type および recipient type の PUVA-DC を加えることで、MLR を抑制させたことから、次に Third-party から作製した PUVA-DC を加えることで、MLR に抑制作用を示すか検討を行った。

図 4-A

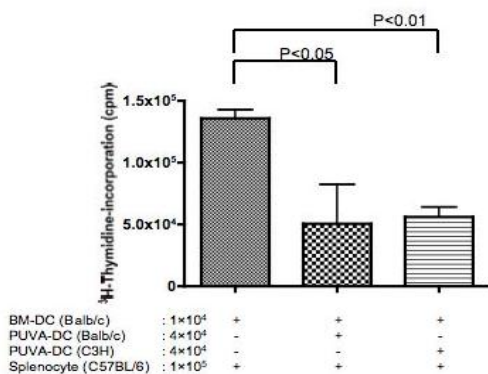


図 4-A では、responder (C57BL/6) および stimulator (Balb/c) とは異なる系統の PUVA-DC (C3H) を加えることにおいても、MLR が抑制される効果を持つか検討を行った。

結果、図に示すように Third-party における PUVA-DC を MLR に加えることで抑制作用を示した。(p<0.01)

図 4-B

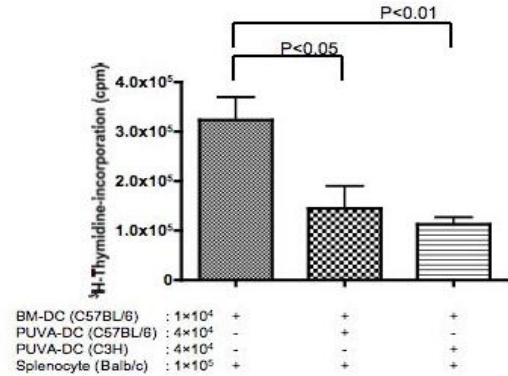


図 4-B は、種を変更しても同様に Third-party の PUVA-DC を加えることで抑制効果が得られることを示した。(p<0.05)

次に、PUVA-DC がどのような機序で免疫抑制作用を働くのかアプローチを行った。

共刺激分子 (CD80 および CD86) の発現がたの制御性樹状細胞と同様に発現低下をしているのかフローサイトメトリー法にて確認を行った。

図 5-A

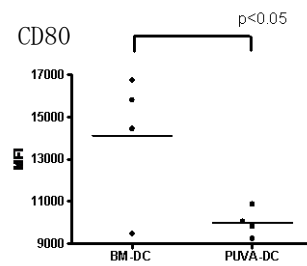
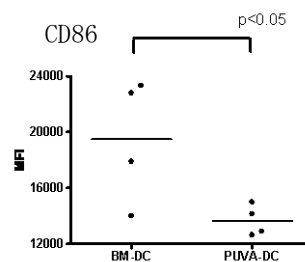


図 5-B



上記の結果、コントロール群の樹状細胞に比べて、PUVAS-DC は共刺激分子 (CD80 および CD86) の発現が低下していることにより、抑制性の獲得の一因と考えられた。

次に 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。

図 6

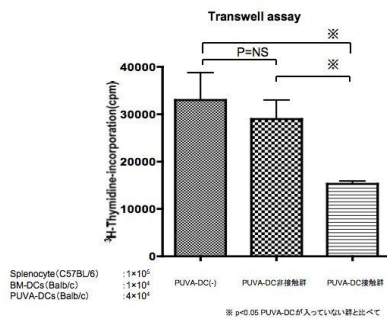


図 6 における一番左のグラフは、PUVA-DC が入っていない通常の MLR 群、真ん中のグラフは PUVA-DC が Transwell によって区切られ通常の MLR に対して、非接触によって加えられた群、一番右のグラフが、PUVA-DC が通常の MLR に対して接触するように加えられた群である。PUVA-DC の MLR 抑制効果は、接触群においてのみ認められた。そのため、PUVA-DC の抑制効果は細胞間接触によるものと判明した。

つぎに、PUVA-DC が発現する抗炎症性サイトカイン (IL-10 および TGF-β) が、抑制作用を示すのか、抗 IL-10 抗体および抗 TGF-β 抗体を、通常の MLR に対し、PUVA-DC を加えた系にそれぞれ加えて実験を行った。

図 7

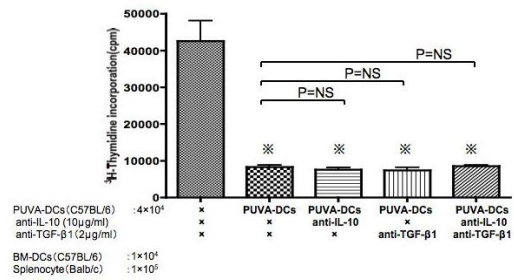


図 7 は、PUVA-DC を加えることで抑制された MLR は、抗炎症性サイトカイン (IL-10 および TGF-β) に対する抗体を加えても、抑制効果を認めていることが示された。このことは、PUVA-DC の抑制作用は、抗炎症性サイトカイン (IL-10 および TGF-β) によるものではないことが判明した。

次にトリプトファン代謝によって細胞増殖を抑制させる Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の mRNA の定量を PUVA 処理の有無によって、発現が増強するかどうか実験を行った。

図 8

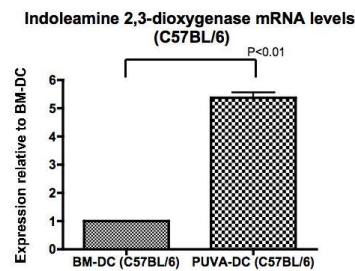


図 8 では、PUVA 処理後に、IDO の発現が約 5 倍に増強したことが示された。トリプトファン代謝が、免疫抑制作用の一因と考えられた。

4. 研究成果

PUVA 処理した樹状細胞は、MHC 非拘束性

に MLR を抑制させる機能を有していた。また、その機序は液性因子や抗炎症性サイトカイン (IL-10、TGF- β) によるものではなく、接触反応にておこるものと考えられた。また、共刺激分子 (CD80/86) の発現は低下していること、IDO の発現が増強していることも抑制性の機序に関与しているものと考えられた。この発表は、第 52 回アメリカ血液学会にて報告した際に、大きな反響を得ることができた。発表後には、エール大学癌研究所の Francine 教授らと共同研究が持ちかけられており、今後の実験計画をこれから進めていく予定である。

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)

[学会発表] (計 4 件)

1. Hideaki Maeba, Ryosei Nishimura, et al. Strong Inhibition of alloreaction by newly generated tolerogenic dendritic cells by psoralen plus UVA treatment. 第 51 回アメリカ血液学会総会 2009 年 12 月 5 日～8 日
2. Hideaki Maeba, Ryosei Nishimura, et al. Potent Strategy for Treatment of Gvhd and Autoimmune-Diseased by Infusion of Donor-Typed or Even Third-Party Tolerogenic Dendritic Cells by Psoralen Plus UVA Treatment 第 52 回アメリカ血液学会総会 2010 年 12 月 4 日～7 日
3. 前馬秀昭、西村良成、他 5 名. A marked reduction of alloreaction by newly generated tolerogenic dendritic cells by PUVA treatment 第 71 回日本血液学会 京都市 国立京都国際会館 2009 年 10 月 23 日～25 日
4. 前馬秀昭、西村良成、他 5 名. The

treatment strategy for GVHD by infusion of donor-typed PUVA-treated dendritic cells. 第 72 回日本血液学会 横浜市 パシフィコ横浜国際会議場 2010 年 9 月 24 日～26 日

[その他]
ホームページ等

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