

**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：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461443

研究課題名(和文) M2マクロファージを用いた移植後慢性GVHDに対する新規細胞治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment for GVHD following hematopoietic cell transplantation using M2 macrophage

研究代表者

平山 雅浩 (Hirayama, Masahiro)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90293795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：造血細胞移植後の予後を左右する慢性GVHDの治療法はいまだ確立されていない。我々は以前に慢性GVHDでは主に抗炎症性単球がIL-10を産生し、障害された標的臓器の修復に関与していることを証明した。マクロファージには炎症型M1タイプと抗炎症型M2タイプが存在する。このM2マクロファージを用いてGVHDの新規治療法の開発を行った。マウス骨髄細胞よりGM-CSFおよびM-CSFのサイトカインで培養することでそれぞれM1およびM2の2種類のマクロファージの誘導を行った。マウスGVHDモデルにおいてM2マクロファージは致死性GVHDを抑制し、生存率向上させた。今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Treatment of chronic GVHD, which influences prognosis after hematopoietic cell transplantation, has not yet been established. We have previously demonstrated that anti-inflammatory monocytes produce IL-10 in chronic GVHD and are involved in the repair of damaged target organs. There are inflammatory M1 type and anti-inflammatory type M2 type in macrophages. Using this M2 macrophage, a novel treatment for GVHD has developed. Two types of macrophages M1 and M2 were induced by culturing them with cytokines of GM-CSF and M-CSF from mouse bone marrow cells. In murine GVHD model, M2 macrophages reduced lethal GVHD and improved survival rate. Future clinical application has been expected.

研究分野：造血細胞移植

キーワード：移植片対宿主病 マクロファージ 単球 造血細胞移植

1. 研究開始当初の背景

(1)慢性 GVHD は急性 GVHD と並び、造血細胞移植後の予後を左右する上で、最も制御が必要とされる合併症の1つである。慢性 GVHD の治療は重症な場合、いまだ確立された方法はない。これまで急性 GVHD の治療についての研究は多数の報告が見られ、向上の途にあるが、慢性 GVHD の治療に関しては近年ほとんど進歩がみられない。

(2)本研究代表者は ELISPOT 法 (Enzyme-linked immunospot assay) という手法を用い、急性および慢性 GVHD の発症予測および診断において他に先駆けて造血細胞移植の臨床に応用してきた(Hirayama et al. Transplantation 2005 & 2006)。ELISPOT 法は ELISA 法に比べ、感度にすぐれ、産生細胞を定量的に判定できるため (Tanguary et al. Lymphokine Cytokine Res. 1994;13:259)、様々なサイトカイン産生細胞を測定することで、*in vivo* での免疫現象の把握が可能であった。従来、慢性 GVHD の中心的働きをする細胞はT細胞やB細胞と考えられていたが、新たに単球が重要な役割を担っていることを ELISPOT 法を使い証明した (Hirayama et al. Haematologica 2013, Hirayama et al. Eur J Hematology 2013)。それによると慢性 GVHD では主に抗炎症性単球 (ヒトでは Intermediate monocyte、マウスでは Gr1 陰性 monocyte) が IL-10 を産生し、障害された標的臓器の修復に関与していることがわかった。その単球は近年脚光を浴びている調節性 (M2) マクロファージに関係している (Sato et al. Nature Immunol. 2010;11:936)。

(3)マクロファージには M1 型 (炎症性) と M2 型 (調節性) が存在し、それぞれを支配している転写因子として IRF-5 および IRF-4 が報告されている (Krausgruber et al. Nature Immunol. 2011;12:231)。これらの知見を元に、M2 マクロファージを用いた慢性 GVHD の新規

治療法の開発およびその病態解明を行うものである。マウス脾細胞より GM-CSF および G-CSF のサイトカインで培養することによりそれぞれ M1 および M2 の2種類のマクロファージの誘導が可能である (Xiao et al. JCI. 2008;118:924) (図1)。これら2種類のマクロファージを用いて、慢性 GVHD モデルにおいて細胞治療を行いその効果を検証し、標的臓器の免疫学的評価も合わせて行う。

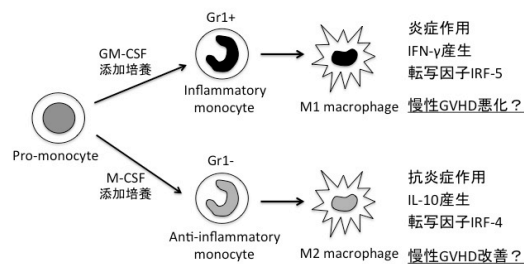


図1 脾細胞からのマクロファージの誘導

(4)近年、GFP (Green fluorescent protein) 遺伝子組換えマウスが作成されたことで、医学研究分野においてもその有用性が認められるようになった (Irons et al. Cell Transplant. 2004;13:283)。このマウスはほぼ全身組織において CAG プロモーターにより E (enhanced) GFP を発現し、緑色蛍光を呈する。細胞に何らの前処置を施すことなく、非侵襲的に EGFP を観察できるため、細胞移植実験に極めて有用なツールとなっている。この GFP マウスを使うことで移植したドナータイプの単球やマクロファージの同定においてフローサイトメーターや免疫組織染色での識別評価が容易となる。

2. 研究の目的

(1)近年造血細胞移植の進歩により多くの難治性疾患患者が救命されるようになった。一方救命された患者の生活の質 (QOL) は未だ満足出来るレベルではない。長期生存者の QOL や生命的予後と密接に関係する合併症として慢性移植片対宿主病

(Graft-versus Host disease; GVHD) があげられる。その治療法は免疫抑制剤であるサイクロスポリン、ステロイドの交替法以来大きな進歩はみられていない。慢性 GVHD の制御には免疫抑制剤投与の視点だけでは限界があり、新しい細胞治療法が必要と考えられる。

(2)最近我々は慢性 GVHD の病態に調節性単球 (M2 マクロファージ) が関与していることを発見した (Hirayama et al. Haematologica 2013, Hirayama et al. Eur J Hematology 2013)。その発見を基に本研究では GFP 遺伝子組換えマウスを利用した慢性 GVHD のマウスモデルを作成し、調節性 (M2) マクロファージを使った新しい慢性 GVHD の細胞治療法の開発をするものである。

### 3. 研究の方法

慢性 GVHD の新しい治療法を開発するためマウスを利用して効果的な評価が可能な慢性 GVHD モデルを作成する。フローサイトメーターを使って生着した細胞のフェノタイプを調べ、慢性 GVHD 病態の中心をなすと考えられる単球/マクロファージの転写因子を Immunoblot 法にて評価する。GM-CSF や M-CSF を使って炎症性および抗炎症性マクロファージの誘導を行い、治療に応用する。慢性 GVHD の標的臓器である皮膚、腸管の免疫組織学的な評価を行う。あわせて慢性 GVHD での *in vivo* の免疫学的評価が可能な ELISPOT 法を用いてサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17 等) 産生細胞を測定して診断および治療の評価に使用する。この研究は造血細胞移植後の QOL を向上させる上で臨床に極めて有益な情報を与える。

(1)GFP 遺伝子組換えマウス用いた慢性 GVHD モデルの作成:準致死量の放射線 550cGy を照射した BALB/c マウスに MHC 一致でマイナー抗原不一致ドナーである DBA/2 マウスの脾細胞を移植することで慢性 GVHD が 2, 3 週で発

症するモデルを確立する。

(2)慢性 GVHD における 2 つの単球分画の解析:フローサイトメーターを使って生着した細胞の各細胞分画を解析する。特に単球の 2 つの分画である炎症性単球 (Gr1 陽性)、抗炎症性単球 (Gr 1 陰性) の解析を行い、慢性 GVHD における動態を解析する。抗体は CD3, CD4, CD8, B220, DX1 により各細胞分画を調べるとともに、単球/マクロファージのフェノタイプ同定には Gr1, CCR2, CXCR1 を、機能的解析には IL-10, IFN- $\gamma$ , CCL2, CCL5, CCL18 を使用して解析する。

(3)単球/マクロファージの転写因子の測定:移植したマウスの脾細胞より RNA を抽出し、SDS-PAGE を使って、Immunoblot 法にて炎症性および抗炎症性マクロファージのそれぞれの転写因子である IRF-4 および IRF-5 の同定を行う。

(4)造血因子を使ったマクロファージの培養:マウスの脾細胞を造血因子である M-CSF および GM-CSF で培養すると、約 1 週間でそれぞれ炎症性 (M1) および抗炎症性 (M2) マクロファージに誘導される。この細胞を移植された慢性 GVHD モデルのレシピエントに移植することで慢性 GVHD が改善するか、悪化するかの反応を観察する。

(5)標的臓器の免疫組織学的慢性 GVHD の評価:移植後 2 週間で皮膚、腸管、肝臓の臓器をそれぞれのグループ (コントロール群、炎症性マクロファージ群、抗炎症性マクロファージ群) のマウスより取り出し、ホルマリン固定の後、パラフィンブロックを作成する。4  $\mu$ m の厚さで切片を切り出し、免疫組織染色を行って解析する。1 次抗体としては Gr1, CCR2, CXCR1, CCL5, CCL18, IL-10 等により浸潤細胞の性状の同定を行うとともに、細胞外マトリックスとして Fibronectin を染色して浸潤細胞との関わりを検証する。Fibronectin は皮下、上皮

下の細胞浸潤部位に慢性 GVHD の際に増加することが知られており、浸潤細胞との関係を調べることが出来る。また、本研究代表者はヒトでの慢性 GVHD の皮膚において Fibronectin が増加することを発見している (Hirayama et al. Haematologica, 2013)。

(6)ELISPOT 法を用いてサイトカイン産生細胞の測定:移植後のマウスの末梢血および脾細胞を単核球に分離し、Type 1 サイトカインである IFN- $\gamma$ 、Type 2 である IL-4、IL-13、調節性タイプである IL-10、IL-22、Th17 タイプである IL-17 のそれぞれの産生細胞を測定することで、免疫状態の評価を行い、慢性 GVHD の診断および治療効果の判定を行う。

(7)実験データの解析とまとめ:データの詳細な解析とまとめをこれまでの知見をもとに新規結果としてまとめる。統計解析はすべて SPSS 統計用ソフトを用いて解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1)M1 および M2 マクロファージの誘導

C57BL6/J マウスの骨髓細胞を採取し、Histopaqu1077 で単核球分離した後に、M-CSF 20ng/mL 濃度のサイトカインを入れて RPMI1640 培養液で 3 日間の培養を CO2 インキュベーターで行った。フラスコより、付着性細胞を取り出して、さらに 7 日間 M-CSF 20ng/mL で培養した。その後 2 つに分け、一方は LPS 10ng/ml と IFN- $\gamma$  10ng/ml で、もう一方は IL-4 10ng/ml で 48 時間培養を行ったところ、前者は M1 マクロファージが誘導され、後者は M2 マクロファージが誘導された。フローサイトメーターを用いて解析したところ、M1 マクロファージは CD11b と F4/80 が陽性であるマクロファージ中の CD38 陽性の分画に誘導されていた (図 2 左)。一方、M1 マクロファージは CD11b と F4/80 に加えて、CD206 陽性分画に誘導されていた (図 2 右)。

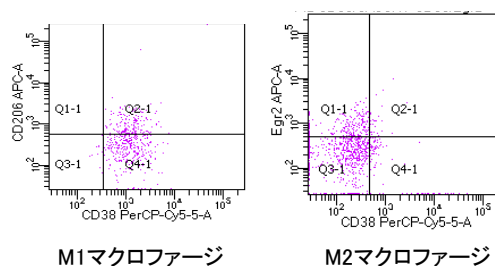


図 2 M1/M2 マクロファージの解析

(2)RT-PCR による M1/M2 マクロファージの特性の解析

これまで M0、M1、M2 マクロファージの特性があることがわかっており、M1、M2 マクロファージの遺伝子の関与を見るため、13 種のプライマーを作成して検証を行った (表 1)。

表 1 解析プライマー一覧

	forward	reverse
CD 11b	ATGGACGCTGATGGCAATACC	TCCCATTACAGCTCTCCA
F4/80	CTTTGGCTATGGCTTCCAGTC	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
Ly6C	GCAGTGCTACGAGTGCTATGG	ACTGACGGGCTTTAGTTTCCTT
CD38	TTGCAAGGGTCTTGGAAAC	CGCTGCCTCATTACACTCA
Gpr18	TGAAGCCCAAGGTCAAGGAGAAGT	TTCATGAGGAAGGTGGTGAAGGCT
Fpr2	TCTACCATCTCCAGAGTCTGTGG	TTACATCTACCAATGTGAACTA
CD206-1	TTCAGTATTGGACGCGAGG	GAATCTGACACCCAGCGGAA
CD206-2	CAGGTGTGGGCTCAGGTAGT	TGTGGTGAGCTGAAAGGTGA
CX3CR1	CAGCATCGACCGGTACCTT	GCTGCACTGTCCGGTTGT
Egr2	CTACCCGGTGGAAAGACCTC	AATGTTGATCATGCCATCTCC
c-Myc	ctgctgtctcagagctct	gcctctctccagacacc
Arg-1	CTCCAAGCCAAAGTCTTAGAG	AGGAGCTGTATTAGGACATC
iNOS	CTAGTGAGTCCAGTTTTGAAG	CCCTGGCAGCAGCATCAGTA
$\beta$ -Actin	GGCTGATTCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAAACATGCCATGT

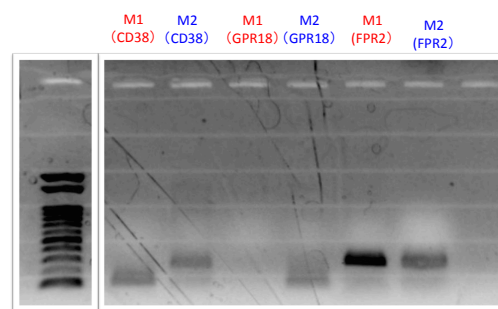


図 3 M1 マクロファージの関連遺伝子の検索

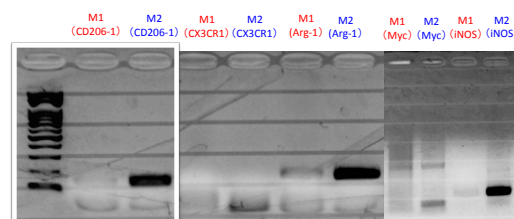


図 4 M2 マクロファージの関連遺伝子の検索

先に報告した M1 マクロファージに培養誘導した細胞中の遺伝子の関与について調

べたところ、FPR 遺伝子が発現が増幅していることがわかった (図3)。一方、M2 マクロファージ培養誘導細胞においては CD206、Arg-1、iNOS の3つの遺伝子で発現増幅が同定された (図4)。

### (3) マウス GVHD モデルの確立

致死量の放射線 750cGy を照射した BALB/c (H-2d) マウスに MHC 抗原不一致ドナーである C57BL/6 J (H-2b) マウスの骨髄細胞  $5 \times 10^5$  個及び脾細胞  $5 \times 10^5$  個を移植することで GVHD が移植後3週間で発症するモデルを確立した (図5)。

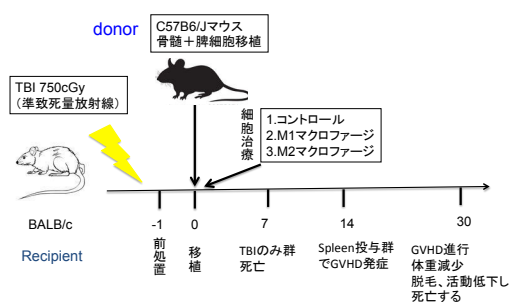


図5 マウス GVHD モデルの確立

移植後に体重減少、皮膚脱毛、活動性、姿勢、毛並みの5項目で GVHD スコアを評価することで GVHD を数値化することができる。

### (4) M1 / M2 マクロファージの GVHD 抑制効果の検証

マウス GVHD モデルを使用して M1 / M2 マクロファージの GVHD 抑制効果を検証した。上記モデルに、移植 Day0 にコントロール、M1 マクロファージ  $5 \times 10^5$  個投与 (n=6)、M2 マクロファージ  $5 \times 10^5$  個 (n=7) を投与したところ、有意差は認められなかったが、GVHD スコアは M1 マクロファージ投与群で増加、M2 マクロファージ投与群で減少を認めた (図6)。

また、生存率においても有意差は認められなかったが、M1 マクロファージ群で生存率が短縮した。一方、M2 マクロファージ群で生存率が延長した (図7)。

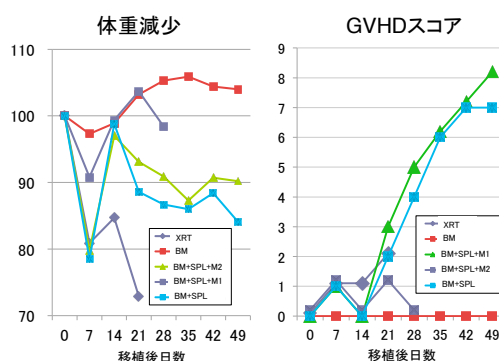


図6 M1/M2 マクロファージの GVHD に対する効果 1

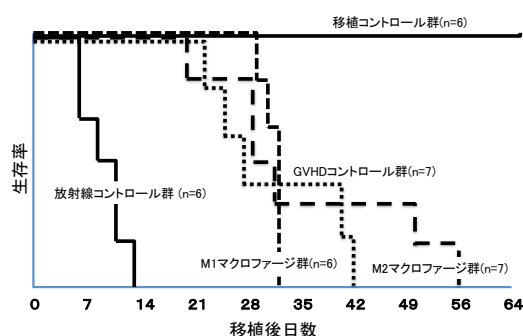


図7 M1/M2 マクロファージの GVHD に対する効果 2

### < 引用文献 >

- 1) [Hirayama M](#), et al. Prediction of acute graft-versus-host disease and detection of distinct end-organ targets by enumeration of peripheral blood cytokine spot-forming cells. *Transplantation* 80: 58-65, 2005
- 2) [Hirayama M](#), et al. Discrimination of acute graft-versus-host disease from infections by enumeration of peripheral blood interferon-gamma spot-forming cells. *Transplantation* 81: 632-5, 2006
- 3) [Hirayama M](#), et al. Interleukin-10 spot-forming cells as a novel biomarker of chronic graft-versus-host disease. *Haematologica* 98:41-49, 2013
- 4) [Hirayama M](#), et al. High frequency of CD29 intermediate monocytes correlates with the activity of chronic graft-versus-host disease. *European Journal of Haematology* 91(3):280-282, 2013

### 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2件)

- ① [Yodoya, N.](#), [Iwamoto, S.](#), [Matsumine, A.](#), [Azuma, E.](#), [Toyoda, H.](#), [Miura, Y.](#), [Nakatani, K.](#),

Imai, H., Hirayama, M., Komada, Y. Ewing Sarcoma of the Bone With EWS/FLI1 Translocation After Successful Treatment of Primary Osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* (査読あり) 39(1), 6-9, 2017

② Toyoda, H., Wada, H., Miyata, T., Amano, K., Kihira, K., Iwamoto, S., Hirayama, M., Komada, Y. Disease Recurrence After Early Discontinuation of Eculizumab in a Patient With Atypical Hemolytic Uremic Syndrome With Complement C3 I1157T Mutation. *J Pediatr Hematol Oncol* (査読あり) 38, e137-9, 2016

[学会発表] (計7件)

① 出口隆生、堀 浩樹、木平健太郎、平山雅浩. Long term follow up for childhood cancer survivor in Mie University Hospital. 第120回日本小児科学会学術集会. グランドプリンスホテル新高輪. 東京都港区. 2017年4月15日.

② 栗原康輔、天野敬史郎、坂田佳子、木平健太郎、豊田秀実、岩本彰太郎、出口隆生、堀 浩樹、東英一、平山雅浩. Hereditary tyrosinemia type 1 mimicking heptoblastoma. 第120回日本小児科学会学術集会. グランドプリンスホテル新高輪. 東京都港区. 2017年4月15日.

③ 國米崇秀、澤田博文、三谷義英、大橋啓之、淀谷典子、中藤大輔、浅野 舞、大槻祥一郎、早川豪俊、平山雅浩. 第120回日本小児科学会学術集会. グランドプリンスホテル新高輪. 東京都港区. 2017年4月15日.

④ 森本真理、岡村 聡、栗原康輔、鈴木尚之、杉浦勝美、花木 良、坂田佳子、天野敬史郎、木平健太郎、岩本彰太郎、豊田秀実、出口隆生、堀 浩樹、東 英一、平山雅浩. Successful treatment of kaposiform hemangioendothelioma with disseminated intravascular coagulation using mTOR inhibitor in 2 cases. 第58回日本小児血液がん学会. 品川プリンスホテル. 東京都品川区. 2016年12月16日.

⑤ 岩本彰太郎、奥野祐希、末藤美貴、井倉千佳、坂本由香、松原行志、河俣あゆみ、大森絵里子、谷口美佳、中西健二、前田多見、小田都紀子、福永稚子、松原貴子、高橋義行、平山雅浩. Interprofessional collaborateon workshop for pediatric cancer care in Tokay-Hokuriku reginal childhood cancer hospital. 第58回日本小児血液がん学会. 品川プリンスホテル. 東京都品川区. 2016年12月15日.

⑥ 山下敦士、天野敬史郎、岡村 聡、栗原康輔、鈴木尚之、杉浦勝美、花木 良、坂田佳子、木平健太郎、豊田秀実、岩本彰太郎、出口隆生、堀 浩樹、東 英一、平山雅浩. Palliative care of children with malignant brain tumors in our hospital. 第58回日本小児血液がん学会. 品川プリンスホテル. 東京都品川区. 2016年12月15日.

⑦ 森本真理、岩本彰太郎、山下敦士、大森あゆみ、岡村 聡、栗原康輔、鈴木尚之、杉浦勝美、花木良、坂田佳子、天野敬史郎、木平健太郎、澤田博文、豊田秀実、出口隆生、堀 浩樹、東 英一、

平山雅浩. Efficacy of ultra-low dose AraC in DS-AMKL patient complicated by cardiopulmonary disease. 第78回日本血液学会学術集会. パシフィコ横浜. 神奈川県横浜市. 2016年10月13日.

[図書] なし (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 なし (計0件)

○取得状況 なし (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平山 雅浩 (HIRAYAMA, Masahiro)  
三重大学大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90293795

### (2) 研究分担者

岩本 彰太郎 (IWAMOTO, Shoutaro)  
三重大学大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20456734

### (3) 連携研究者

豊田 秀実 (TOYODA, Hidemi)  
三重大学医学部附属病院・講師  
研究者番号：60525327

### (4) 研究協力者

花木 良 (HANAKI, Ryo)  
三重大学医学部附属病院・医員  
研究者番号：40780408