

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08836

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスC/EBP を用いた移植後慢性GVHDの病態解明と新規治療

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiology and novel treatment of chronic GVHD after transplantation using genetically modified mouse C / EBPb

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：移植片対宿主病(GVHD)は造血細胞移植の重要な合併症である。近年、マクロファージ(M<sub>φ</sub>)はM1(炎症性)とM2(抗炎症性)の2つのタイプに分けられた。そこで、M2のGVHD抑制効果を検証した。まず、骨髄細胞をGM-CSFとM-CSFで培養することでM1(CD38陽性)とM2(CD206陽性)の誘導に成功した。それらを用いてマウスGVHDモデルで調べたところ、M2は有意にGVHDを抑制し、生存率の改善がみられた。臨床・病理学的GVHDスコアでも改善を確認できた。GVHDの抑制された臓器ではM2が優位に多く浸潤していた。以上からM2細胞療法は今後GVHD抑制が期待される結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血細胞移植は難治性血液腫瘍性疾患の治療で有効な治療法となっている。その中で、移植片対宿主病(GVHD)は移植後の極めて重要な合併症である。近年、マクロファージの免疫作用が注目される中、この細胞を用いてGVHDを克服するための細胞療法をマウスモデルで開発した。今後、ヒト、臨床に応用することで、学術的および社会的な意義は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：Graft-versus-host disease (GVHD) is an important complication of hematopoietic cell transplantation. In recent years, macrophages (M<sub>φ</sub>) have been divided into two types: M1 (inflammatory) and M2 (anti-inflammatory). Therefore, we examined a GVHD suppression effect of M2. First, we performed in inducing M1 (CD38 positive) and M2 (CD206 positive) by culturing bone marrow cells in GM-CSF and/or M-CSF. By using the murine GVHD model, M2 significantly suppressed GVHD and improved survival rate. Improvement was also confirmed in the clinical and pathological GVHD scores. In organs in which GVHD was suppressed, M2 was predominantly infiltrated. After all, M2 cell therapy is expected to suppress the GVHD on hematopoietic cell transplantation.

研究分野：血液腫瘍分野

キーワード：GVHD 造血細胞移植 マクロファージ 単球

## 1. 研究開始当初の背景

移植片対宿主病 (Graft-versus-host disease; GVHD) は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。また病態についても未だ不明な点が多い。我々はこれまで GVHD の病態に抗炎症性単球が関与していることを報告してきた (Hirayama et al. Haematologica 2013)。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。マクロファージには M1 型 (炎症性) と M2 型 (調節性) が存在し、それぞれ免疫反応が相違していることが分かっている。

## 2. 研究の目的

これらの知見を元に、M2 マクロファージを用いた 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。これら 2 種類のマクロファージを用いて、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。

## 3. 研究の方法

1) GVHDモデルの作成: 致死量の放射線750cGyを照射したBALB/cマウスにMHC不一致ドナーであるB6マウスの脾細胞を移植することでGVHDが2,3週で発症するモデルを確立した。また、他にドナーとして遺伝子改変マウスを入れることで欠損した単球の影響を解析する。

2) B6マウスの骨髄細胞をGM-CSFおよびM-CSFのサイトカインを使い培養をすることで、M1およびM2マクロファージの誘導を行なった。それぞれの特徴をウェスタンブロットとフローサイトメーターで解析した。

3) GVHDにおけるM1とM2の2つの単球分画の解析を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 (Gr1陰性) の解析を行い、GVHDにおける動態を解析する。

4) 抗炎症性(M2)マクロファージを移植された GVHD モデルのレシピエントに移植することでGVHD が改善するか、悪化するかの反応を観察する。標的臓器の免疫組織学的 GVHD の評価 を移植後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、免疫組織染色を行って解析する。

## 4. 研究成果

移植片対宿主病 (GVHD) は造血細胞移植後の予後を左右する重要な合併症である。

GVHD は主に皮膚、腸、肝臓に病変がみられます。近年マクロファージは 2 つに分けられることが分かっています。1 つは M1 マクロファージで炎症誘発性または免疫反応性のもので、もう 1 つは M2 マクロファージで抗炎症または免疫抑制の作用を持っています。我々は M2 マクロファージを用いてマウス GVHD モデルを用いて、M2 マクロファージの GVHD 抑制効果を検証しました。まず、ドナータイプである B6 マウスの骨髄細胞を GM-CSF と M-CSF のサイトカインを使って培養することで、M1 と M2 マクロファージの誘導に成功しました。誘導された M1 マクロファージ

は iNOS、TNF- $\alpha$ 、CD38 が陽性、M2 マクロファージは Ym-2、Arg-1、CD206 が陽性であり、それぞれの特徴の細胞に誘導が可能であった。それらを用いて GVHD モデルマウスで検証したところ、M2 マクロファージは有意に GVHD を抑制し、生存率の改善が見られました。臨床 GVHD スコアも有意な改善を見せました。更に、GVHD の標的臓器である肝臓、皮膚、腸管において病理 GVHD スコアの改善が見られました。GVHD が抑制された臓器においては M2 マクロファージの浸潤がより多く見られました。以上から、M2 マクロファージによる GVHD を抑制する細胞療法が期待される結果が得られました。また in vitro の検証では GVHD 抑制メカニズムとしては液性免疫よりも細胞間の免疫作用による機序が示唆された。今後、さらに検証を積み重ねる事でヒトへの応用も期待できると考えられた。またこれらの成果は 2021 年に Immunity, Inflammation and Disease 誌に掲載された。

## 5 . 成果文献

Hanaki R, Toyoda H, Iwamoto S, Morimoto, M, Nakato D, Ito T, Niwa K, Amano K, Hashizume R, Tawara I, Hirayama M. Donor-derived M2 macrophages attenuate GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immun Inflamm Dis* 9:1489-1499, 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hanaki Ryo, Toyoda Hidemi, Iwamoto Shotaro, Morimoto Mari, Nakato Daisuke, Ito Takahiro, Niwa Kaori, Amano Keishiro, Hashizume Ryotaro, Tawara Isao, Hirayama Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Donor derived M2 macrophages attenuate GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity, Inflammation and Disease	6. 最初と最後の頁 1489 ~ 1499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iid3.503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	岩本 彰太郎  (Iwamoto Shotaro)  (20456734)	三重大学・医学部附属病院・准教授    (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関