

200934032A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

間葉系幹細胞を利用した新しい  
造血幹細胞移植技術の開発に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小澤 敬也

平成 22 (2010) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

間葉系幹細胞を利用した新しい  
造血幹細胞移植技術の開発に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小澤 敬也

平成 22 (2010) 年 5 月

## 目 次

I. 総括研究報告書	
間葉系幹細胞を利用した新しい造血幹細胞移植技術の 開発に関する研究 -----	1
小澤 敬也	
II. 分担研究報告書	
間葉系幹細胞によるGVHD抑制機構の解析 -----	6
尾崎 勝俊	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	9
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	12

# I. 総括研究報告書

## 間葉系幹細胞を利用した新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究

研究代表者 小澤 敬也 自治医科大学医学部 教授

**研究要旨** 間葉系幹細胞（MSC: mesenchymal stem cell）には造血支持作用以外に、近年になって免疫抑制作用があることが明らかにされ、その臨床応用（MSC を用いた細胞治療）として、同種造血幹細胞移植後のステロイド不応性の重症急性移植片対宿主病（acute GVHD）に対する治療効果が期待されている。本研究は MSC の免疫抑制能に関する基礎研究を行い、造血幹細胞移植への MSC の臨床応用の安全性を高めるのが目的である。以前、我々はマウスの MSC を解析し、NO (nitric oxide) が抑制因子として重要であることを報告した。しかし、ヒトではマウスに比べて NO の産生量が遥かに少ないことが判明した。ヒトの場合は、PGE2 が重要な働きをしていることが示唆された。また、IL-21 が GVHD を増強する証拠を得ており、IL-21 のデコイ受容体を強制発現した MSC を作製し、その遺伝子修飾 MSC の投与により GVHD 局所で IL-21 デコイ受容体を発現して IL-21 の作用を阻害するという実験を行っている。レトロウイルスベクターでは MSC で十分な発現が得られなかったが、アデノウイルスベクターで高発現が得られたため、治療実験への応用を検討していく予定である。ヒト間葉系幹細胞バンクについては、これまでに 48 症例から樹立を行った。ステロイド抵抗性 acute GVHD に対する MSC 投与の臨床研究に関しては、当大学の倫理委員会で承認を受けており、2007 年に 1 例、さらに本年度もう 1 例に投与した。残念ながら、本年度の症例は多剤抵抗性の重症 GVHD 例であり、無効であった。この症例では投与のタイミングが遅すぎた可能性があり、MSC 治療の開始時期や MSC の投与量・投与期間についてさらに検討が必要と考えられた。

### 研究分担者

尾崎 勝俊  
自治医科大学医学部  
講師

安全性を確保することは、極めて重要な課題となっている。このような観点から、免疫抑制活性と造血支持能を有すると考えられる間葉系幹細胞（MSC: mesenchymal stem cell）の利用が注目されている。欧米で行われた第二相臨床研究の成績が報告されており、MSC をステロイド抵抗性 GVHD の細胞療法として使用した場合、約 7 割の奏効率が得られている。本研究は日本での臨床投与のエビデンスを集めることと、その作用機序を明らかにすることの二つを目指している。この両輪で進

### A. 研究目的

造血幹細胞移植は既にほぼ確立された医療技術であるが、移植片対宿主病（GVHD）や移植後再発は依然として大きな問題であり、また最近急速に広まりつつある臍帯血移植の場合は、生着不全のリスクを抱えている。そこで、移植技術のさらなる向上により、その

めていくことにより、より安全な MSC の投与方法などを明らかにしていくことが可能になると考えられる。

## B. 研究方法

1) 我々が作製、貯蔵しているヒト間葉系幹細胞バンクの細胞を用いて、その T 細胞抑制能を調べた。培養上清中に産生された NO (nitric oxide) の濃度を NO アッセイキットで直接測定し、さらに NO 産生の阻害剤である L-NAME を添加して NO の重要性を検討した。次に、PGE2 の重要性を見るために、PGE2 の産生阻害剤である indomethacin の影響を調べた。indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) の重要性については、その産生阻害剤である 1-MT の作用を検討した。

2) IL-21 のデコイ受容体は PCR を使って作成し、アデノウイルスベクター (Takara) に挿入した。発現は FACS とウエスタンブロッティングで確認した。

3) ヒト間葉系幹細胞バンク：自治医大倫理委員会の承認後、同意を得られた患者から間葉系幹細胞を樹立しているが、これを本年度も継続した。

4) 難治性急性 GVHD に対する MSC による治療の臨床研究：治療用 MSC のソースとなる骨髄液は、当大学の倫理委員会の審査を経て対象患者の血縁者 (4 親等以内) から提供を受けた。骨髄液を 10ml 採取し、臨床用細胞プロセッシング室にて単核球分離後、 $1.0 \times 10^6$  cells/ml の細胞密度で  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  存在下で培養した。患者体重あたり  $1 \times 10^6$  /kg で投与するのに十分な数まで増やし、投与までに期間がある場合は、自己末梢血幹細胞の保存に準じ細胞凍害保護液 (CP-1 (極東製薬工

業)) と 25% ヒトアルブミン (日本赤十字) を用いて凍結保存した。安全を担保するために凍結保存直前に培養上清の細菌培養、真菌培養、を施行し、 $\beta$ -D glucan、endotoxin、cytomegalovirus、EB virus、mycoplasma、および細胞の染色体を検査し、陰性および正常であることを投与前に確認した。細胞数は  $1.0 \times 10^6$  cells/kg、輸注速度は約 4ml/min とした。Osiris 社の臨床研究では投与時細胞密度を  $2.5 \times 10^6$  cells/ml に設定しており、本研究でもそれを踏襲している。

### (倫理面への配慮)

マウスを用いた実験では、動物倫理面 (動物愛護上の配慮など) を含めて自治医大動物実験指針規程に従って行った。ヒトの細胞を用いた実験は、自治医大倫理委員会の承認を得て、その計画に基づいて行った。

ヒトに関しては大学倫理委員会の承認を経て、提供者から文書での同意を得て、骨髄液を採取している。その内容は臨床プロトコールとして大学病院医療情報ネットワーク (UMIN) 研究センターに登録し、公表済みである。

## C. 研究結果

1) ヒト間葉系幹細胞を用いて、その T 細胞増殖抑制能を比べた。NO を直接測定したが、検出できなかった。さらに NO 産生の阻害剤を加えても、抑制能に変化はなかった。これに対して、PGE2 産生阻害剤では抑制的部分的解除が認められた。IDO の産生阻害剤では抑制解除は認められなかった。

2) IL-21 のデコイ受容体を作成し、アデノウイルスベクターに組み込んだ。蛋白の高発現がウエスタンブロットと FACS で確認できた。

3) ヒト間葉系幹細胞バンクの樹立と NO 産生能：ヒト骨髄から間葉系幹細胞を樹立し、様々な年齢層のものをそろえるべく症例を集積した。本年度は 17 例が新規登録され、現在までに 48 症例分を集めた。その内訳は、正常骨髄 23 例、造血不全 5 例、急性白血病 9 例、骨髄増殖性疾患 5 例、その他 4 例、増殖不良 2 例となっている。

4) 2006 年からこれまでに計 9 名の MSC を準備した。実際に使用に至ったのは 2007 年の 1 例と本年度の 1 症例である。本年度の症例は 33 才の男性。FAB 分類で M0 の急性骨髄性白血病で、第一寛解期での非血縁者間移植を施行した。消化管 GVHD が出現し、MMF, ATG, ステロイドによる治療を行ったが無効であったため、MSC (1x10<sup>6</sup>/kg) を 2 回、5 日間の間隔で投与したが、効果は得られなかった。

#### D. 考察

1) MSC の免疫抑制能の分子機序については、ヒトでは NO の関与は認められず、PGE2 が関与しているものと考えられた。ヒトでは IDO が関与するという報告もあるが、我々の結果はこれを支持しなかった。

2) IL-21 のデコイ受容体を MSC に発現させるため、昨年度はレトロウイルスベクターを用いたが、十分な発現が得られなかった。今年度はアデノウイルスベクターを用いたところ高発現を得ることができた。

3) ヒト間葉系幹細胞バンクと NO 産生：長期培養していると細胞増殖が止まり、安定した解析が困難である一面はあるものの、48 例が集まったので、当初計画した年齢による違いなどを検討していきたい。

4) 当院でこれまでに臨床研究として間葉系幹細胞が 2 症例に投与されているが、本年度の症例では無効であった。現在我が国で進行中の治験では厳密にステロイド投与第 3 日目増悪、第 5 日目不変ですぐに MSC が投与されるプロトコールとなっており、第 2 選択薬として使われている。これに比べて、本臨床研究の今回の症例は既に ATG, MMF が投与されていて 3 剤に対して治療抵抗性であり、MSC の投与時期も遅い傾向にあった。MSC 治療の開始時期や MSC の投与量・投与期間についてさらに検討が必要と考えられた。

#### E. 結論

- ・ MSC の免疫抑制能に関して、マウスで重要な免疫抑制因子の NO はヒトでは関与が明らかでなく、PGE2 の関与が示唆された。
- ・ アデノウイルスベクターの使用により、IL-21 デコイ受容体を MSC に高発現させることができた。
- ・ ヒト間葉系幹細胞バンクについて、これまでに 48 症例から樹立を行った。
- ・ 難治性急性 GVHD に対する MSC による治療の臨床研究：難治性（ステロイド抵抗性）急性 GVHD 患者の第 2 例目が登録され、MSC が投与された。MSC 投与時に既に 3 剤治療抵抗性であり、MSC 投与後にも明らかな臨床的効果は認められなかった。

#### F. 健康危険情報

2 症例とも本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Oh I, Ozaki K, Meguro A, Hatanaka K, Kadowaki M, Matsu H, Tatara R, Sato K,

- Iwakura Y, Nakae S, Sudo K, Teshima T, Leonard WJ, Ozawa K: Altered effector CD4<sup>+</sup> T cell function in IL-21R<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cell-mediated graft-versus-host disease. *J. Immunol.* (in press)
- 2) Meguro A, Ozaki K, Oh I, Hatanaka K, Matsu H, Tatara R, Sato K, Leonard WJ, Ozawa K: IL-21 is critical for GVHD in a mouse model. *Bone Marrow Transplant.* 45: 723-729, 2010.
- 3) Kobayashi H, Matsuyama T, Ueda M, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Ozawa K: Predictive factors of response and survival following chemotherapy treatment in acute myeloid leukemia progression from myelodysplastic syndrome. *Intern. Med.* 48(18): 1629-1633, 2009.
- 4) Ishiwata A, Mimuro J, Mizukami H, Kashiwakura Y, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Ozawa K, Sakata Y: Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice. *J. Gene Med.* 11(11): 1020-1029, 2009.
- 5) Masuda S, Ageyama N, Shibata H, Obara Y, Ikeda T, Takeuchi K, Ueda Y, Ozawa K, Hanazono Y: Cotransplantation with MSCs improves engraftment of HSCs after autologous intra-bone marrow transplantation in nonhuman primates. *Exp. Hematol.* 37(10): 1250-1257, 2009.
- 6) Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koefler HP, Ogawa S: Gain-of-function of mutated c-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* 460(7257): 904-908, 2009.
- 7) Oka S, Nagatsuka Y, Kikuchi J, Yokote T, Hirabayashi Y, Hanafusa T, Ozawa K, Muroi K: Preferential expression of phosphatidylglucoside along neutrophil differentiation pathway. *Leuk. Lymphoma* 50(7): 1190-1197, 2009.
- 8) Oka S, Muroi K, Matsuyama T, Sato K, Ueda M, Toshima M, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Takubo T, Nagai T, Hanafusa T, Ozawa K: Correlation between flow cytometric identification of CD33-positive cells and morphological evaluation of myeloblasts in bone marrow of patients with acute myeloblastic leukemia. *Hematology* 14(3): 133-138, 2009.
- 9) Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K: Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. *J. Gene Med.* 11: 373-381, 2009.
2. 学会発表
- 1) Tatara R, Ozaki K, Oh I, Hatanaka K, Meguro A, Matsu H, Sato K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Th17 Differentiation through PGE2 Production  
2009 Annual Meeting of ASH at New Orleans (*Blood* 2009; 114(22): 1403)
- 2) 翁 家国、尾崎 勝俊、目黒 明子、畑中 恵子、多々良 礼音、松 春子、佐藤 一也、永井正、室井 一男、小澤 敬也: CD4陽性T細胞の移植によって誘導されるGVHDとIL-21の重要性



第71回日本血液学会総会、京都 (臨床血液  
Vol.50, 322)

3) 多々良 礼音、尾崎 勝俊、畑中 恵子、  
翁 家<sub>ノ</sub>、松 春子、目黒 明子、佐藤  
一也、永井正、室井 一男、小澤 敬也：  
間葉系幹細胞 (MSC) がTh17、Treg分化に  
及ぼす影響

第71回日本血液学会総会、京都 (臨床血液  
Vol.50, 518)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含  
む。)

特になし。

## II. 分担研究報告書

## 間葉系幹細胞による GVHD 抑制機構の解析

研究分担者 尾崎 勝俊 自治医科大学医学部 講師

**研究要旨** 間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cell) には造血支持作用以外に、近年になって免疫抑制作用があることが明らかにされ、その臨床応用 (MSC を用いた細胞治療) として、同種造血幹細胞移植後のステロイド不応性の重症急性移植片対宿主病 (acute GVHD) に対する治療効果が期待されている。本研究は MSC の免疫抑制能に関する基礎研究を行い、造血幹細胞移植への MSC の臨床応用の安全性を高めるのが目的である。以前、我々はマウスの MSC を解析し、nitric oxide が抑制因子として重要であることを報告した。また、nitric oxide の産生には IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  が必要であることを報告した。当初はヒトでも nitric oxide が間葉系幹細胞の免疫抑制に重要な働きを果たしていると考えていたが、実際にはヒト間葉系幹細胞はマウスと同様の刺激を与えても nitric oxide の産生は認めなかった。結局、マウスでも作用している PGE2 がヒトでも重要な働きをしている可能性が示唆された。また、我々は独自に IL-21 が GVHD を促進する証拠を得ているため、IL-21 のデコイ受容体を作成し、アデノウイルスを利用してデコイ受容体を高発現した MSC の作製に成功した。

### A. 研究目的

造血幹細胞移植は既にほぼ確立された医療技術であるが、移植片対宿主病 (GVHD) や移植後再発は依然として大きな問題であり、また最近急速に広まりつつある臍帯血移植の場合は、生着不全のリスクを抱えている。そこで、移植技術のさらなる向上により、その安全性を確保することは、極めて重要な課題となっている。このような観点から免疫抑制活性と造血支持能を有すると考えられる間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cell) の利用が注目されている。欧米で行われた臨床研究 Phase II の成績が報告されており、MSC をステロイド抵抗性 GVHD の細胞療法として使用した場合、約 7 割の奏効率が得られた。しかしながらその作用機序は未だ明らかではない。そこで本研究では、MSC による細

胞療法の科学的基盤を明らかにすることを目的としている。これまでも MSC の造血支持能力と免疫抑制能力が示唆されているが、その分子機構はほとんど解明されていない。

### B. 研究方法

1) 我々が作製、貯蔵しているヒト間葉系幹細胞バンクの細胞を用いて、その T 細胞抑制能を調べた。培養上清中に産生された NO (nitric oxide) の濃度を NO アッセイキットで直接測定し、さらに NO 産生の阻害剤である L-NAME を添加して NO の重要性を検討した。次に PGE2 の重要性を見るために、PGE2 の産生阻害剤である indomethacin の影響を調べた。Indoleamine-2, 3-dioxygenase (IDO) の重要性を見るために、その産生阻害剤である 1-MT の作用を使用した。

2) IL-21 のデコイ受容体は PCR を使って作成し、アデノウイルスベクター (Takara) に挿入した。発現は FACS とウエスタンブロッティングで確認した。

3) ヒト間葉系幹細胞バンク：自治医大倫理委員会の承認後、同意を得られた患者から間葉系幹細胞を樹立しているが、これを本年度も継続した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験では、動物倫理面 (動物愛護上の配慮など) を含めて自治医大動物実験指針規程に従って行った。ヒトの細胞を用いた実験は、自治医大倫理委員会の承認を得て、その計画に基づいて行った。

#### C. 研究結果

1) ヒト間葉系幹細胞を用いて、その T 細胞増殖抑制能を比べた。NO は培養上清中にほとんど検出されなかった。さらに NO 産生の阻害剤を加えても、抑制能に変化はなかった。これに対して、PGE2 の産生阻害剤では抑制の部分的解除が認められた。IDO の阻害剤では抑制解除は認められなかった。

2) IL-21 のデコイ受容体を作成し、アデノウイルスベクターに組み込んだ。蛋白の発現はウエスタンブロットと FACS で確認できた。

3) ヒト間葉系幹細胞バンクの樹立と NO 産生能：ヒト骨髄から間葉系幹細胞を樹立し、様々な年齢層のものをそろえるべく症例を集積した。本年度は 17 例が新規登録され、現在までに 48 症例分を集めた。その内訳は、正常骨髄 23 例、造血不全 5 例、急性白血病 9 例、骨髄増殖性疾患 5 例、その他 4 例、増

殖不良 2 例となっている。

#### D. 考察

1) MSC の免疫抑制能の分子機序については、ヒトでは NO の関与は認められず、PGE2 が関与しているものと考えられた。ヒトでは IDO が関与するという報告もあるが、我々の結果はこれを支持しなかった。

2) IL-21 のデコイ受容体を MSC に発現させるため、昨年度はレトロウイルスベクターを用いたが、十分な発現が得られなかった。そのため今年度はアデノウイルスベクターを用いたところ、MSC 上での高発現を得ることができた。

3) ヒト間葉系幹細胞バンクと NO 産生：長期培養していると細胞増殖が止まり、安定した解析が困難である一面はあるものの、48 例が集まったので、当初計画した年齢による違いなどを検討していきたい。

#### E. 結論

- ・ MSC の免疫抑制能に関して、マウスで重要な免疫抑制因子の NO はヒトでは関与が明らかでなく、PGE2 の関与が示唆された。
- ・ アデノウイルスベクターの使用により、IL-21 デコイ受容体を MSC に高発現させることができた。
- ・ ヒト間葉系幹細胞バンクについて、これまでに 48 症例から樹立を行った。

#### F. 健康危険情報

該当せず。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Oh I, Ozaki K, Meguro A, Hatanaka K,

Kadowaki M, Matsu H, Tatara R, Sato K, Iwakura Y, Nakae S, Sudo K, Teshima T, Leonard WJ, Ozawa K.: Altered effector CD4<sup>+</sup> T cell function in IL-21R<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cell-mediated graft-versus-host disease. J. Immunol. (in press)

- 2) Meguro A, Ozaki K, Oh I, Hatanaka K, Matsu H, Tatara R, Sato K, Leonard WJ, Ozawa K: IL-21 is critical for graft-versus-host disease in a mouse model. Bone Marrow Transplant. 2010; 45(4): 723-729

## 2. 学会発表

- 1) Tatara R, Ozaki K, Oh I, Hatanaka K, Meguro A, Matsu H, Sato K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Th17 Differentiation through PGE2 Production  
2009 Annual Meeting of ASH at New Orleans (Blood 2009; 114(22): 1403)
- 2) 翁 家国、尾崎 勝俊、目黒 明子、畑中 恵子、多々良 礼音、松 春子、佐藤 一也、永井正、室井 一男、小澤敬也：CD4陽性T細胞の移植によって誘導されるGVHDとIL-21の重要性  
第71回日本血液学会総会、京都(臨床血液 Vol.50, 322)
- 3) 多々良 礼音、尾崎 勝俊、畑中 恵子、翁 家国、松 春子、目黒 明子、佐藤 一也、永井正、室井 一男、小澤敬也：間葉系幹細胞(MSC)がTh17、Treg分化に及ぼす影響  
第71回日本血液学会総会、京都(臨床血液 Vol.50, 518)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

特になし。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K	Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy.	J. Gene Med.	11	373-381	2009
Ishiwata A, Mimuro J, Mizukami H, Kashiwakura Y, Takano K, Ohmori T, Madoiwa S, Ozawa K, Sakata Y	Liver-restricted expression of the canine factor VIII gene facilitates prevention of inhibitor formation in factor VIII-deficient mice.	J. Gene Med.	11	1020-1029	2009
Oka S, Muroi K, Matsuyama T, Sato K, Ueda M, Toshima M, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Takubo T, Nagai T, Hanafusa T, Ozawa K	Correlation between flow cytometric identification of CD33-positive cells and morphological evaluation of myeloblasts in bone marrow of patients with acute myeloblastic leukemia.	Hematology	14(3)	133-138	2009
Oka S, Nagatsuka Y, Kikuchi J, Yokote T, Hirabayashi Y, Hanafusa T, Ozawa K, Muroi K	Preferential expression of phosphatidylglucoside along neutrophil differentiation pathway.	Leuk. Lymphoma	50(7)	1190-1197	2009
Sanada M, Suzuki T, Shih, LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koeffler HP, Ogawa, S	Gain-of-function of mutated c-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms.	Nature	460(7257)	904-908	2009

Masuda S, Ageyama N, Shibata H, Obara Y, Ikeda T, Takeuchi K, Ueda Y, <u>Ozawa K</u> , Hanazono Y	Cotransplantation with MSCs improves engraftment of HSCs after autologous intra-bone marrow transplantation in nonhuman primates.	Exp. Hematol.	37(10)	1250-1257	2009
Kobayashi H, Matsuyama T, Ueda M, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, <u>Ozawa K</u> .	Predictive factors of response and survival following chemotherapy treatment in acute myeloid leukemia progression from myelodysplastic syndrome.	Intern. Med.	48(18)	1629-1633	2009
Meguro A, Ozaki K, Oh I, Hatanaka K, Matsu H, Tataru R, Sato K, Leonard WJ, <u>Ozawa K</u> .	IL-21 is critical for GVHD in a mouse model. Bone Marrow Transplant. 45: 723-729, 2010.	Bone Marrow Transplant.	45	723-729	2010
Sakoe Y, Sakoe K, Kirito K, <u>Ozawa K</u> , Komatsu, N.	OXO3A as a key molecule for all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia.	Blood	115	3787-3789	2010
Kikuchi J, Wada T, Shimizu R, Izumi T, Akutsu M, Mitsunaga K, Noborio-Hatano K, Nobuyoshi M, <u>Ozawa K</u> , Kano Y, Furukawa Y	Histone deacetylases are critical targets of bortezomib-induced cytotoxicity in multiple myeloma.	Blood			In press
Ishiwata A, Mimuro J, Mizukami H, Kashiwakura Y, Yasumoto A, Sakata A, Ohmori T, Madoiwa S, Ono F, Shima M, Yoshioka A, <u>Ozawa K</u> , Sakata, Y.	Mutant macaque factor IX T262A: A tool for hemophilia B gene therapy studies in macaques.	Thromb. Res.			In press
Nagai T, Ohmine K, Fujiwara S-I, Uesawa M, Sakurai C, <u>Ozawa K</u>	Combination of tipifarnib and rapamycin synergistically inhibits the growth of leukemia cells and overcomes resistance to tipifarnib via alteration of cellular signaling pathways.	Leuk. Res.			In press



<p>Oh I, Ozaki K, Meguro A, Hatanaka K, Kadowaki M, Matsu H, Tatara R, Sato K, Iwakura Y, Nakae S, Sudo K, Teshima T, Leonard WJ, <u>Ozawa K</u></p>	<p>Altered effector CD4<sup>+</sup> T cell function in IL-21R<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cell-mediated graft-versus-host disease.</p>	<p>J. Immunol.</p>			<p>In press</p>
--	--	--------------------	--	--	-----------------

#### IV. 研究成果の刊行刊行物・別刷

(主なもの)

## ORIGINAL ARTICLE

# IL-21 is critical for GVHD in a mouse model

A Meguro<sup>1</sup>, K Ozaki<sup>1</sup>, I Oh<sup>1</sup>, K Hatanaka<sup>1</sup>, H Matsu<sup>1</sup>, R Tataru<sup>1</sup>, K Sato<sup>1</sup>, WJ Leonard<sup>2</sup> and K Ozawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Hematology, Department of Medicine, Jichi Medical University Tochigi, Tochigi, Japan and <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Immunology, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Immunological effects of IL-21 on T, B and natural killer (NK) cells have been reported, but the role of IL-21 in GVHD remains obscure. Here, we demonstrate that morbidity and mortality of GVHD was significantly reduced after BMT with splenocytes from IL-21R<sup>-/-</sup> mice compared with those from wild type mice. To further confirm our observation, we generated a decoy receptor for IL-21. GVHD was again less severe in mice receiving BM cells transduced with the IL-21 decoy receptor than control mice. These results suggest that IL-21 critically regulates GVHD, and that blockade of the IL-21 signal may represent a novel strategy for the prophylaxis for GVHD. *Bone Marrow Transplantation* (2010) 45, 723–729; doi:10.1038/bmt.2009.223; published online 31 August 2009

**Keywords:** GVHD; IL-21; hematopoietic SCT

### Introduction

Interleukin (IL)-21 is a member of the common cytokine receptor gamma chain ( $\gamma_c$ ) family that also includes IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 and IL-15. The receptors for each of these cytokines are composed of more specific chain(s) and a  $\gamma_c$  chain.<sup>1,2</sup> The lack of functional  $\gamma_c$  causes X-linked SCID disease (X-SCID) in humans,<sup>3</sup> which is characterized by a reduced number of T cells and natural killer (NK) cells, and a normal number but non-functional B cells. The phenotypes of IL-7 and IL-15 knockout (KO) mice suggest that the reduced number of T and NK cells is because of the lack of IL-7 and IL-15 signaling, respectively.<sup>4,5</sup> We previously proposed that the non-functionality of B cells might be attributed to the lack of both IL-4 and IL-21, based on the observation that IL-4 and IL-21R double KO mice exhibit a B-cell phenotype similar to that found in X-linked SCID disease.<sup>6</sup> The switch from IgM to IgG was impaired but still present in IL-21R<sup>-/-</sup> mice.<sup>6</sup>

IL-21 was cloned as a co-stimulatory cytokine for T-cell proliferation and NK-cell expansion *in vitro*.<sup>7</sup>

IL-21 is primarily produced by CD4 T cells,<sup>7</sup> and the receptor is primarily expressed on T, B and NK cells.<sup>7,8</sup> It has been reported that IL-21 suppresses the function of DCs<sup>9</sup> and increases the number of hematopoietic progenitor cells.<sup>10</sup> IL-21 has been shown to have critical roles in Ig production.<sup>6</sup> IL-21 is not required, but promotes Th17 differentiation in the presence of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ ,<sup>11–13</sup> whereas reports have differed regarding its contributions to Th1- and Th2-differentiation.<sup>6,14–17</sup> Evidence for a relationship between IL-21 and autoimmune disease has been accumulating. For example, overexpression of IL-21 induces inflammation, and in the BXSB.6-Yaa<sup>+</sup>/J mouse, a model of systemic lupus erythematosus, affected mice have high levels of IL-21,<sup>18</sup> whereas IL-21R<sup>-/-</sup> BXSB.6-Yaa<sup>+</sup>/J mice no longer develop systemic lupus erythematosus.<sup>19</sup> In addition, IL-21R<sup>-/-</sup> NOD mice are resistant to the development of diabetes mellitus.<sup>20,21</sup>

Graft-versus-host disease is a serious complication after hematopoietic SCT.<sup>22</sup> Severe GVHD is difficult to treat because of refractory characteristics and infectious complications resulting from immunosuppressive treatment.

Here, we have investigated the function of IL-21 in GVHD and demonstrate that IL-21 is critical for GVHD, and that blockade of the IL-21 signal could lead to a treatment or prophylaxis for GVHD.

### Methods

#### Mice

Interleukin-21R<sup>-/-</sup> (KO) mice were generated previously.<sup>6</sup> Balb/c mice were purchased from Clea Japan (Tokyo, Japan). *Perforin*-deficient mice and *FasL* deficient (*gld/gld*) mice were purchased from Taconic (Hudson, NY, USA) and Japan SLC (Shizuoka, Japan), respectively. All mice were housed in our mouse facility, which is regulated by an intramural small animal committee, and were treated in accordance with the guidelines of Jichi Medical University.

#### Mouse models of GVHD and GVL

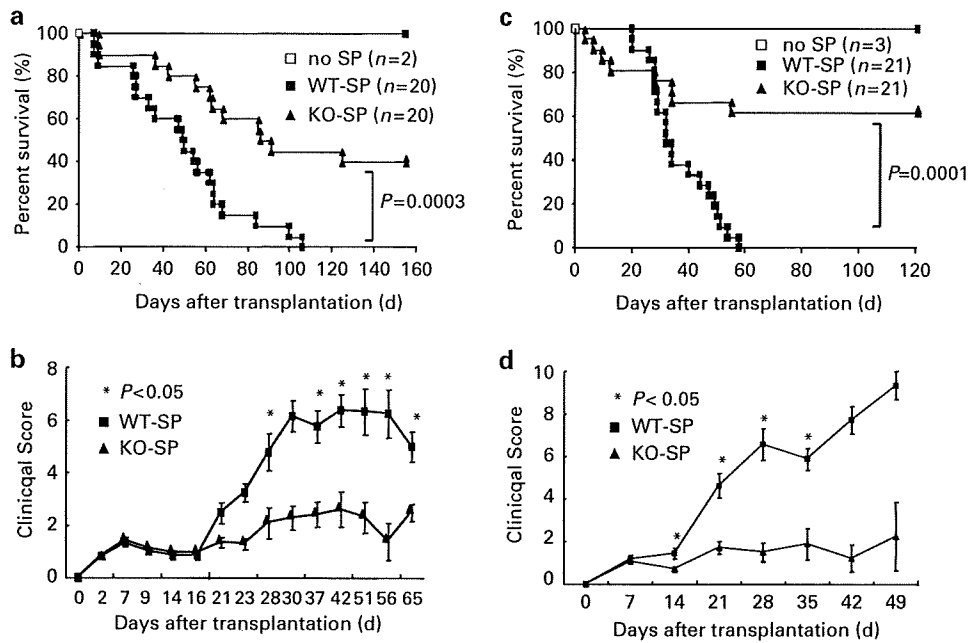
Clinical symptoms of GVHD were scored as previously reported.<sup>23</sup>

**GVHD group 1 (WT-BM and KO-SP vs WT-BM and WT-SP):** Balb/c mice were irradiated with 8 Gy and

Correspondence: Dr K. Ozaki, Division of Hematology, Department of Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke-shi, Tochigi, 329-0498, Japan.

E-mail: ozakikat@jichi.ac.jp

Received 20 April 2009; revised and accepted 6 July 2009; published online 31 August 2009



**Figure 1** IL-21R<sup>-/-</sup> (knockout (KO)) splenocytes (SPs) ameliorated GVHD. (a and b) Survival and clinical score of GVHD with BM cells from wild type (WT) C57BL/6 mice (WT-BM). Balb/c recipients were transplanted with  $5 \times 10^6$  WT-BM and either  $5 \times 10^6$  SPs from WT or IL-21R KO C57BL/6 mice (KO-SP) or WT-SP. Open squares ( $n=2$ ), filled squares ( $n=20$ ) and filled triangles ( $n=20$ ) indicate transplants without SPs as controls, with WT-SP, and with IL-21R KO-SP, respectively. The combined results of three independent experiments are shown. *P*-values were calculated by the log-rank method. (c and d) Survival and clinical score of GVHD with IL-21R KO-BM. Balb/c recipients were transplanted with  $5 \times 10^6$  IL-21R KO-BM and either  $5 \times 10^6$  IL-21R KO-SP or WT-SP. Open squares ( $n=3$ ), filled squares ( $n=21$ ) and filled triangles ( $n=21$ ) indicate transplants without SPs as controls, with WT-SP, and with IL-21R KO-SP, respectively. The combined results of three independent experiments are shown. *P*-values were calculated by the log-rank method.

injected intravenously with  $5 \times 10^6$  wild type (WT)-BM and  $5 \times 10^6$  splenocytes (SPs) from either WT or KO mice.

**GVHD group 2 (KO-BM and KO-SP vs KO-BM and WT-SP):** To delete the contaminated WT T cells in BM, we used KO-BM.

#### Flow cytometric analysis

Fc-block (BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, CA, USA) was used to prevent non-specific Ab binding to Fc receptors. Anti-CD4, CD8, H-2<sup>b</sup> and H-2<sup>d</sup> Abs were purchased from BD Biosciences-Pharmingen. A LSR flow cytometer (BD Biosciences-Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) was used for data collection, and the data were analyzed using CellQuest software (BD Biosciences-Immunocytometry Systems).

#### Decoy receptor of IL-21

The primers, 5'-TTCTAGCTACCAGCTGCAGGT-3' and 5'-TCCTGAAGTTCCTCATATTCA-3', were used to produce a truncated IL-21R lacking the region from box 1 to the C-terminus.<sup>8</sup> All nucleotide sequences were confirmed by sequencing. Extracellular expression of this receptor was confirmed by flow cytometric analysis using anti-IL-21-receptor polyclonal Ab (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and a secondary Ab conjugated with FITC (R&D Systems).

**Table 1** Donor CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-cell numbers in spleen at day 14 after transplantation

	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
WT spleen ( $n=6$ )	$2.9 \pm 1.2^a$	$3.2 \pm 1.3^a$
KO spleen ( $n=10$ )	$3.7 \pm 1.1^a$	$3.3 \pm 1.2^a$
<i>P</i> -value	NS	NS

Abbreviations: KO = knockout; NS = not significant ( $P \geq 0.05$ ) by Student's *t*-test; WT = wild type.

<sup>a</sup>Mean  $\pm$  s.e.m. ( $\times 10^{-6}$ ) from three independent experiments.

#### Retrovirus mediated transduction into BM

A retrovirus construct containing the decoy receptor of IL-21 was transfected into the packaging cell line, PLAT-E, and the viruses produced were transduced into pre-stimulated BM cells using Retronectin according to the manufacturer's instructions (Takara, Osaka, Japan). We used  $5\text{--}15 \times 10^5$  BM cells from 5-FU injected mice at the beginning of cultivation.

#### Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester staining

Splenocytes were stained with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) for 15 min in phosphate-buffered saline, washed and injected into irradiated mice. Staining was carried out according to the manufacturer's instructions (Invitrogen-Molecular probe, Carlsbad, CA, USA).