

201023019A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小澤 敬也

平成 23 (2011) 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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小澤 敬也

平成 23 (2011) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

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

1. 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 -----	1 1
-----------------------	-----

I . 総括研究報告

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）
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。また、NO の産生には IFN- γ と TNF- α が必要であることを報告した。今回は Th17 分化、制御性 T 細胞分化に及ぼす影響を解析した。興味深いことに、MSC は Th17 分化を強力に抑制するにも関わらず、制御性 T 細胞分化への影響はほとんど認められなかった。Th17 分化抑制の作用機序を検討したところ、Th17 分化条件下では NO の産生は認められず、PGE2 と indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) が関与していることが示唆された。炎症性の Th17 分化を抑制し、炎症抑制性の制御性 T 細胞分化を抑制しない MSC の特徴は、免疫活性化状態にある移植後急性 GVHD の細胞治療として優れている可能性が示唆された。ヒト間葉系幹細胞バンクについては、これまでに 52 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、本年度 1 症例に投与された（計第 3 症例目）。但し、本例では TNF- α 阻害剤の投与が先行し、培養に時間のかかる MSC の効果に関する評価はできなかった。MSC の投与細胞数と投与時期が今後の課題と考えられた。

研究分担者

尾崎 勝俊

自治医科大学医学部

講師

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

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

ることの二つを目指している。この両輪を進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) T 細胞分化条件、評価方法： マウス MSC をマウス T 細胞と共培養した。Th17 分化条件として IL-6 と TGF- β を添加したうえで T 細胞を抗 CD3/CD28beads で刺激した。制御性 T 細胞分化条件として IL-2 と TGF- β を添加し、T 細胞を抗 CD3/CD28beads で刺激した。評価はそれぞれの分化マーカーである IL-17 と Foxp3 を細胞内染色し、フローサイトメーターで解析した。

2) 作用機序の解析： 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。PGE2 の重要性を見るために、PGE2 の産生阻害剤であるインドメタシンを、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 を使用した。

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、 1.0×10^6 cells/ml の細胞密度で 37°C、5%CO₂ 存在

下で培養した。患者体重あたり 1×10^6 /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。安全性を担保するために培養上清の細菌培養、真菌培養、を施行し、 β -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 1.0×10^6 cells/kg で投与した。

（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。

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) マウス MSC は T 細胞の Th17 分化を強力に抑制した。MSC は T 細胞増殖抑制効果があるため、この増殖抑制が分化に関与している可能性がある。この問題点を解決するために T 細胞を CFSE でラベルして、細胞増殖を終えた細胞群だけを解析したが、結果は変わらなかった。これに対し、制御性 T 細胞分化には大きな影響が認められなかった。

2) Th17/制御性 T 細胞分化条件下で培養上清中の NO は検出されなかった。さらに NO 産生

の阻害剤を加えても、Th17 分化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 の阻害剤でも部分的抑制解除が認められた。

3) ヒト間葉系幹細胞バンクの樹立：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。現在までに 52 症例分を集めた。その内訳は、リンパ腫などの正常骨髄 23 例、造血不全 8 例、急性白血病 9 例、骨髄増殖性疾患 6 例、多発性骨髄腫などのその他の疾患 6 例となっている。

4) これまでに計 10 名の MSC を準備した。このうち、実際に投与に至ったのは 3 症例である。本年度の症例は 66 才のマントル細胞リンパ腫の男性。同種移植後、ステロイドパルス不応性の消化管 GVHD が出現し、MSC を準備した。増殖に時間がかかったため、他の免疫抑制剤レミケード (TNF- α 阻害剤) の投与が先行した。やや改善傾向が認められる段階で MSC の投与を行ったため、MSC の効果に関する評価はできなかった。

D. 考察

炎症性の Th17 分化を抑制し、抑制性の制御性 T 細胞分化を抑制しないことから、MSC の細胞療法は GVHD の治療として好ましい可能性が示唆された。

2) 作用機序を完全に解明するには至っていないが、PGE2 やトリプトファン分解酵素の部分的関与が示唆された。

3) ヒト間葉系幹細胞バンク：52 症例の MSC が集まったので、T リンパ球増殖抑制活性な

どについて、年齢による違いを検討していく準備が整った。

4) 当院でこれまでに臨床研究として間葉系幹細胞が 3 症例に投与されている。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 日目不変ですぐに投与されるプロトコールとなっており、明確に第 2 選択薬として使われているが、本臨床研究の症例では 1 例目は MMF が、2 例目では ATG、MMF が先行投与されていた。3 例目も MSC の増殖不良でレミケードが先行投与された。他の免疫抑制剤が先行投与される理由として、MSC の増殖に時間がかかり、十分な数の MSC を望ましいタイミングで投与できないという問題点が浮かび上がった。

E. 結論

- ・ マウス MSC では Th17 分化を強く抑制し、制御性 T 細胞分化にはほとんど抑制効果が認められなかった。
- ・ Th17 分化抑制の作用機序として、NO ではなく、PGE2 やトリプトファン分解酵素 (IDO) の関与が示唆された。
- ・ ヒト間葉系幹細胞バンクについて、これまでに 52 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 3 例目が登録され、MSC が投与された。3 例とも安全に投与を行うことができたが、投与細胞数や投与時期など今後の課題も明らかとなった。

F. 健康危険情報

MSC を投与された 3 例とも、特に有害事象や健康上の不都合は観察されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Meguro, A., Ozaki, K., Hatanaka, K., Oh, I., Sudo, K., Ohmori, T., Matsu, H., Tatara, R., Sato, K., Sakata, Y., Nakae, S., Leonard, W.J., and Ozawa, K.: Lack of IL-21 signal attenuates graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells. *Bone Marrow Transplant.* (in press)
- 2) Tatara, R., Ozaki, K., Kikuchi, Y., Hatanaka, K., Oh, I., Meguro, A., Matsu, H., Sato, K., and Ozawa, K.: Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation. *Cytherapy.* (in press)
- 3) Yagi, H., Ogura, T., Mizukami, H., Urabe, M., Hamada, H., Yoshikawa, H., Ozawa, K., and Kume, A.: Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. *J. Gene Med.* 13(2): 114-122, 2011.
- 4) Sato, K., Ozaki, K., Mori, M., Muroi, K., and Ozawa, K.: Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease: basic aspects and clinical outcomes. *J. Clin. Exp. Hematop.* 50(2): 79-89, 2010.
- 5) Muramatsu, S., Fujimoto, K.I., Kato, S., Mizukami, H., Asari, S., Ikeguchi, K., Kawakami, T., Urabe, M., Kume, A., Sato, T., Watanabe, E., Ozawa, K., and Nakano, I.: A phase I study of aromatic l-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease. *Mol. Ther.* 18(9): 1731-1735, 2010.
- 6) 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⁺ T cell function in IL-21R^{-/-} CD4⁺ T cell-mediated graft-versus-host disease. *J. Immunol.* 185(3): 1920-1926, 2010.
- 7) Kikuchi, J., Wada, T., Shimizu, R., Izumi, T., Akutsu, M., Mitsunaga, K., Noborio-Hatano, K., Nobuyoshi, M., Ozawa, K., Kano, Y., and Furukawa, Y.: Histone deacetylases are critical targets of bortezomib-induced cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 116(3): 406-417, 2010.
- 8) Kobayashi, M., Murakami, T., Uchibori, R., Chun, N.A., Kobayashi, E., Morita, T., and Ozawa, K.: Establishment and characterization of transplantable, luminescence labeled rat renal cell carcinoma cell lines. *J. Urol.* 183(5): 2029-2035, 2010.
- 9) Sakoe, Y., Sakoe, K., Kirito, K., Ozawa, K., and Komatsu, N.: FOXO3A as a key molecule for all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 115(18): 3787-3795, 2010.
- 10) Nagai, T., Ohmine, K., Fujiwara, S.-I., Uesawa, M., Sakurai, C., and Ozawa, K.: 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.* 34(8): 1057-1063, 2010.
- 11) 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.* 45(4): 723-729, 2010.

2. 学会発表

- 1) Ozaki K., Meguro A, Oh I, Matsu H,

Hatanaka K, Tatara R, Leonard WJ, Sato K, Ozawa K: Lack of IL-21 signal attenuates graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells. 52th ASH Annual Meeting, Orlando, FL, USA, Dec.4-7, 2010. (Blood 116: 3739)

2) Tatara R, Ozaki K, Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A, Matsu H, Sato K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K: Mesenchymal stem cell mediated suppression of Th17 differentiation through PGE2 and IDO production. 第72回日本血液学会総会, 京都, 2010年9月24日～26日.(臨床血液 51(9): 909, 2010)

3) 目黒 明子、尾崎 勝俊、畑中 恵子、翁 家国、松 春子、多々良 礼音、佐藤 一也、大嶺 謙、鈴木 隆浩、森 政樹、永井 正、室井 一男、須藤 カツ子、中江 進、小澤 敬也 : IL-21のシグナル抑制と graft-versus-leukemia 効果. 第72回日本血液学会総会, 京都, 2010年9月24日～26日.(臨床血液 51(9): 993, 2010)

4) 松 春子、尾崎 勝俊、畑中 恵子、多々良 礼音、目黒 明子、翁 家国、佐藤 一也、森 政樹、鈴木 隆浩、室井 一男、永井 正、植松 智、審良 静男、小澤 敬也 ; 移植片対宿主病におけるSTAT3の役割に関する発生工学的手法を用いた検討 . 第72回日本血液学会総会, 京都, 2010年9月24日～26日.(臨床血液 51(9): 1097, 2010.

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

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- γ と TNF- α が必要であることを報告した。以前にマウスの MSC の Th1/Th2 分化への影響を調べたこともあり、今回は Th17 分化、制御性 T 細胞分化に及ぼす影響を解析した。興味深いことに、MSC は Th17 分化を強力に抑制するにも関わらず、制御性 T 細胞分化への影響はほとんど認められなかった。Th17 分化抑制の作用機序を NO の産生量や阻害剤によって探ってみると、Th17 分化条件では NO の産生は認められず、PGE2 と indoleamine-2,3-dioxygenase が関与していることが示唆された。炎症性の Th17 分化を抑制し、炎症抑制性の制御性 T 細胞分化を抑制しない MSC の特徴は、免疫活性化状態にある移植後 GVHD の細胞治療として優れている可能性が示唆された。

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。これまでにも 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) 培養条件: マウス MSC をマウス T 細胞と共培養した。Th17 分化条件として IL-6 と TGF- β を添加したうえで T 細胞を抗 CD3/CD28beads で刺激した。制御性 T 細胞分化条件として IL-2 と TGF- β を添加し、T 細胞を抗 CD3/CD28beads で刺激した。評価はそれぞれの分化マーカーである IL-17 と Foxp3 を細胞

内染色し、フローサイトメーターで解析した。

2) 作用機序の解析: 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インドメタシンの影響を調べた。

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 を使用した。

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) マウス MSC は T 細胞の Th17 分化を強力に抑制した。MSC は T 細胞増殖抑制効果があるため、この増殖抑制が分化に関与している可能性がある。この問題点を解決するために T 細胞を CFSE でラベルして、細胞増殖を終えた細胞群だけを解析したが、結果は変わらなかった。これに対し、制御性 T 細胞分化には大きな影響が認められなかった。

2) Th17/制御性 T 細胞分化条件下で培養上清中の NO は検出されなかった。さらに NO 産生の阻害剤を加えても、抑制能に変化はなかつ

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 の阻害剤でも部分的抑制解除が認められた。

3) ヒト間葉系幹細胞バンクの樹立: 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。現在までに 52 症例分が集められた。その内訳は、リンパ腫などの正常骨髄 23 例、造血不全 8 例、急性白血病 9 例、骨髄増殖性疾患 6 例、多発性骨髄腫などのその他の疾患 6 例となっている。

D. 考察

1) MSC は炎症性の Th17 分化を抑制し、抑制性の制御性 T 細胞分化を抑制しないことから、MSC 細胞療法は GVHD の治療として好ましい可能性が示唆された。

2) 作用機序を完全に解明するには至っていないが、PGE2 やトリプトファン分解酵素の部分的関与を示唆する結果であった。

3) ヒト間葉系幹細胞バンク: 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、52 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できる。

E. 結論

- マウス MSC は Th17 分化を強力に抑制するが、制御性 T 細胞への分化には大きな変化がなかった。
- Th17 分化抑制の作用機序としては、NO の関与は認められず、PGE2 やトリプトファン分解酵素である indoleamine-2, 3-dioxygenase の関与が示唆された。

- ・ ヒト間葉系幹細胞バンクについて、これまでに 52 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⁺ T cell function in IL-21R^{-/-} CD4⁺ T cell-mediated graft-versus-host disease. *J. Immunol.* 2010; 185(3): 1920-1926
- 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
- 3) Tatara R, Ozaki K, Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A, Matsu H, Sato K, Ozawa K: Mesenchymal stem cells inhibit Th17 but not regulatory T cell differentiation. *Cytherapy* (In Press)
- 4) Meguro A, Ozaki K, Hatanaka K, Oh I, Sudo K, Ohmori T, Matsu H, Tatara R, Sato K, Sakata Y, Nakae S, Leonard WJ, Ozawa K: Lack of IL-21 signal attenuates graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells. *Bone Marrow Transplant.* (In Press)

2. 学会発表

- 1) Ozaki K, Meguro A, Oh I, Matsu H, Hatanaka K, Tatara R, Leonard WJ, Sato K, Ozawa K: Lack of IL-21 signal attenuates

graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells. 52th ASH Annual Meeting, Orlando, FL, USA, Dec.4-7, 2010. (*Blood* 116: 3739)

- 2) Tatara R, Ozaki K, Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A, Matsu H, Sato K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K: Mesenchymal stem cell mediated suppression of Th17 differentiation through PGE2 and IDO production. 第72回日本血液学会総会, 京都, 2010年9月24日～26日. (*臨床血液* 51(9): 909, 2010)
- 3) 目黒 明子、尾崎 勝俊、畑中 恵子、翁 家 国、松 春 子、多々良 礼音、佐藤 一也、大嶺 謙、鈴木 隆浩、森 政樹、永井 正、室井 一男、須藤 カツ子、中江 進、小澤 敬也 : IL-21のシグナル抑制とgraft-versus-leukemia効果. 第72回日本血液学会総会, 京都, 2010年9月24日～26日. (*臨床血液* 51(9): 993, 2010)
- 4) 松 春子、尾崎 勝俊、畑中 恵子、多々良 礼音、目黒 明子、翁 家 国、佐藤 一也、森 政樹、鈴木 隆浩、室井 一男、永井 正、植松 智、審良 静男、小澤 敬也 ; 移植片対宿主病におけるSTAT3の役割に関する発生工学的手法を用いた検討. 第72回日本血液学会総会, 京都, 2010年9月24日～26日. (*臨床血液* 51(9): 1097, 2010.

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

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
Meguro A, <u>Ozaki K</u> , Hatanaka K, Oh I, Sudo K, Ohmori T, Matsu H, Tatara R, Sato K, Sakata Y, Nakae S, Leonard WJ, <u>Ozawa K</u>	Lack of IL-21 signal attenuates graft-versus- leukemia effect in the absence of CD8 T-cells.	Bone Marrow Transplant.			in press
Tatara R, <u>Ozaki K</u> , Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A, Matsu H, Sato K, <u>Ozawa K</u>	Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation.	Cytherapy			in press
Yagi H, Ogura T, Mizukami H, Urabe M, Hamada H, Yoshikawa H, <u>Ozawa K</u> , Kume A	Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self- complementary adeno-associated virus vector.	J. Gene Med.	12(2)	114-122	2011
Sato K, <u>Ozaki K</u> , Mori M, Muroi K, <u>Ozawa K</u>	Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease: basic aspects and clinical outcomes.	J. Clin. Exp. Hematop.	50(2)	79-89	2010
Muramatsu S, Fujimoto KI, Kato S, Mizukami, H, Asari, S, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, <u>Ozawa K</u> , Nakano I	A phase I study of aromatic l-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson's disease.	Mol. Ther.	18(9)	1731-1735	2010
Oh I, <u>Ozaki K</u> , 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>	Altered effector CD4+ T cell function in IL-21R-/- CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease.	J. Immunol.	185(3)	1920-1926	2010

Kikuchi J, Wada T, Shimizu R, Izumi T, Akutsu M, Mitsunaga K, Noborio-Hatano K, Nobuyoshi M, Ozawa K, Kano Y, Furukawa Y	Histone deacetylases are critical targets of bortezomib-induced cytotoxicity in multiple myeloma.	Blood	116(3)	406-417	2010
Kobayashi M, Murakami T, Uchibori R, Chun NA, Kobayashi E, Morita T, Ozawa K	Establishment and characterization of transplantable, luminescence labeled rat renal cell carcinoma cell lines.	J. Urol.	183(5)	2029-2035	2010
Sakoe Y, Sakoe K, Kirito K, Ozawa K, Komatsu N	FOXO3A as a key molecule for all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia.	Blood	115(18)	3787-3795	2010
Nagai T, Ohmine K, Fujiwara S-I, Uesawa M, Sakurai C, Ozawa K	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.	34(8)	1057-1063	2010
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(4)	723-729	2010

IV. 研究成果の刊行物・別刷

(主なもの)

ORIGINAL ARTICLE

Lack of IL-21 signal attenuates graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells

A Meguro¹, K Ozaki¹, K Hatanaka¹, I Oh¹, K Sudo², T Ohmori³, H Matsu¹, R Tatara¹, K Sato¹, Y Sakata³, S Nakae⁴, WJ Leonard⁵ and K Ozawa¹

¹Division of Hematology, Department of Medicine, Jichi Medical University, Tochigi, Japan; ²Animal Research Center, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan; ³Research Division of Cell and Molecular Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, Tochigi, Japan; ⁴Frontier Research Initiative, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan and ⁵Laboratory of Molecular Immunology, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Previously, we have shown that IL-21R^{-/-} splenocytes ameliorate GVHD as compared with wild-type splenocytes. Here, we investigated whether or not IL-21R^{-/-} splenocytes diminish the graft-versus-leukemia (GVL) effect. Surprisingly, IL-21R^{-/-} splenocytes efficiently eliminate leukemic cells as well as wild-type splenocytes, suggesting the retention of GVL effects in the absence of IL-21 signaling. To compare the GVL effect between IL-21R^{-/-} and wild-type cells, we titrated the number of splenocytes required for the elimination of leukemic cells and found that the threshold of GVL effect was obtained between 5×10^5 and 5×10^6 with both types of splenocytes. Cotransplantation with CD8-depleted splenocytes but not with purified CD8 T-cells resulted in a significant reduction in anti-leukemic effect of IL-21R^{-/-} cells compared with wild-type cells, suggesting that the lack of IL-21 signaling primarily impairs CD4 T-cell rather than CD8 T-cell function and the comparable GVL effect with IL-21R^{-/-} bulk splenocytes results from cooperative compensation by CD8 T-cells.

Bone Marrow Transplantation advance online publication, 24 January 2011; doi:10.1038/bmt.2010.342

Keywords: cytokine; GVL; interleukin-21; IL-21

clinical trials.^{10–13} Moreover, IL-21 can drive Th17 differentiation.^{14–16} IL-21 also contributes to the development of autoimmune disease as has been reported in mouse models,^{17–20} which is possibly related to Th17 differentiation.

GVHD is one of the major complications after hematopoietic SCT and the same graft simultaneously induces the graft-versus-leukemia (GVL) effect, which reduces the relapse rate. In clinical practice, there is no GVHD-specific treatment, and all currently available immunosuppressive reagents attenuate GVL effect as well as GVHD. In mouse models, possible strategies were reported to specifically suppress GVHD,^{21–28} but nothing is available in the clinical setting at this point.

Previously, we have shown that IL-21R^{-/-} (KO) splenocytes ameliorate GVHD as compared with wild-type splenocytes,²⁹ indicating a critical role of IL-21 in GVHD. Bucher *et al.* reported that IL-21 neutralization resulted in the same results as ours and they found that it did not attenuate GVL effect.³⁰ However, they did not titrate the required T-cells for GVL effect, making it impossible to determine if the GVL strength was similar in the normal and the IL-21-neutralized conditions. Here, we sought to quantify and compare the strength of GVL effect between WT and KO splenocytes, and moreover, to analyze the contributions of CD4 and CD8 cells to GVL effect.

Introduction

IL-21 is a pleiotropic cytokine belonging to the common cytokine receptor γ chain family of cytokines.^{1–3} IL-21 is mainly produced by activated CD4⁺ T cells and acts on T-, B-, NK-cells and other lineages.^{3–5} IL-21 has a critical role in Ig production⁶ and the lack of both IL-21 and IL-4 signals impairs normal germinal center formation.⁶ Anti-tumor effects of IL-21 have been reported^{7–9} with ongoing

Materials and methods

Mice

IL-21R^{-/-} (KO) mice were generated previously⁶ and mice were C57BL/6 background.²⁹ IL-21R^{+/+} (WT) mice were interbred progeny from the same littermate. C57BL/6-DBA2-F1 mice were purchased from Clea Japan (Tokyo, Japan). All mice used were 6–12 weeks old and housed in a small animal facility in Jichi Medical University, which is regulated by an intramural small animal committee, and were treated in accordance with the Jichi Medical University guidelines.

GVL models

We have used two different models of leukemic cells. GVL group 1 compared transplantation with the P815 leukemic

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

E-mail: ozakikat@jichi.ac.jp

Received 8 April 2010; revised 4 November 2010; accepted 6 December 2010

cell line, T-cell depleted wild type BM cells (TCD-BM) and either IL-21R^{-/-} splenocytes (KO-SP) or wild type splenocytes (WT-SP). C57BL/6-DBA F1 strain mice were used as recipients. The number of splenocytes was 5×10^7 and P815 leukemic cells were coinjected (2×10^4). T cell depletion from BM was performed using Thyl.2 microbeads and an autoMACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA). P815 cells (mast cell leukemia line, H-2^d) were used as a model of residual leukemic cells and C57BL/6 mice were used as donors (H-2^b). P815 was originally derived from DBA2 mice (H-2^d); therefore, P815 can cause lethal leukemic conditions in C57BL/6-DBA2 F1 recipients.²¹

GVL group 2 compared transplantation with either an IL-21 decoy receptor or empty vector-transduced BM in the presence of WT-SP. C57BL/6-DBA F1 strain mice were used as recipients. The number of wild-type splenocytes was 2×10^7 , and P815 leukemic cells were coinjected (2×10^4). Either decoy receptor or empty vector-transduced BM cells (starting dose of BM was 5×10^5) were transplanted instead of T cell-depleted BM cells.

GVL group 3 compared transplantation with p185 *bcr-abl*-transduced recipient BM, T-cell-depleted wild type BM cells, and either KO-SP or WT-SP. Transplantation was performed as in the GVL group 1 except for the coinjection of p185 *bcr-abl*-transduced recipient BM cells (starting dose of BM was 5×10^5) instead of P815 cells, and the number of splenocytes (2×10^7).³¹

CD8⁺ T cell depletion from splenocytes was performed using CD8 magnetic-microbeads and an autoMACS (Miltenyi Biotech). The average proportion of CD8⁺ T cells in spleen was 12–13% and after purification it declined to 3.4–3.6% in average. CD8⁺ T cell purification from splenocytes was performed as above, not with negative selection but with positive selection. The purity was ~85%.

⁵¹Cr release assays (cytotoxic T cell lysis assays)

As previously described,²¹ T cells were purified with CD90 microbeads (Miltenyi Biotech) from splenocytes of C57BL/6-DBA-F1 recipient mice 14 days after BMT, and T cells from three mice were combined in each group. The percentage of CD8⁺ cells was determined by flow cytometric analysis, and counts were normalized for CD8⁺ T cell numbers. Cell lines, P815 (H-2^d) and EL4 (H-2^b), were used as allogeneic and syngeneic targets, respectively. Target cells (2×10^6) were labeled with 100 μ Ci of ⁵¹Cr for 1.5 h. After washing twice, target cells were plated at 1×10^4 per well in U-bottom 96-well plates. T cells were added to each well at different target/effector ratios in quadruplicates and incubated 4–5 h. ⁵¹Cr in the supernatants after incubation was determined using LumaPlate-96 and TopCount NXT (PerkinElmer, Boston, MA, USA).

MLR and ELISA

T cells and CD8⁺ T cells were purified using CD90 and CD8 microbeads (Miltenyi Biotech), and 1×10^5 cells were cocultured with 30 Gy irradiated splenocytes (1×10^5) from either C57BL/6-DBA2-F1 or C57BL/6 mice, as allogeneic or syngeneic stimulator in U-bottom 96-well plates. Culture medium was the same as described previously.³² After 6 days of culture, concentrations of interferon- γ and tumor

necrosis factor α in the supernatants were determined by ELISA (BD Biosciences-Pharmingen, San Diego, CA, USA) as per the manufacturer's instructions.

Flow cytometric analysis

Fc-block (BD Biosciences-Pharmingen) was used to prevent nonspecific Ab binding to Fc receptors. Anti-CD4, CD8, H-2^b and H-2^d antibodies were purchased from BD Biosciences-Pharmingen. An 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

We used the retrovirus-vector previously described.²⁹ Briefly, the primers, 5'-TTCTAGCTACCAGCTGCAGG T-3' and 5'-TCCTGAAGTTCCTCATATTCA-3', were used to produce a truncated IL-21R lacking the region from box 1 to the C-terminus.^{5,29} Cell surface expression of this truncated 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 PE (R&D Systems).

Retrovirus-mediated transduction into BM

A retrovirus construct containing p185 *bcr-abl* or the decoy IL-21R was transfected into the packaging cell line, PLAT-E, and the produced viruses were transduced into prestimulated BM using Retronectin according to the manufacturer's instructions (Takara, Osaka, Japan).

In vivo imaging

Luciferase gene was transduced into the P815 cell line using a lentiviral vector, which also includes modified green fluorescent protein gene. Green fluorescent protein-positive cells were purified using FACS sorter, FACSaria Cell-Sorting System, (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). At indicated time points, after transplantation, 3 mg of luciferin, a substrate of luciferase, was injected into mice i.v. Detection was performed with IVIS imaging system (Xenogen, Alameda, CA, USA) and the strength of light was measured by analyzing software 'Living ImageR ver2.5' (Xenogen).

Statistical analysis

Kaplan–Meier plots were used to compare survival rates. The Logrank test was used to evaluate *P*-values. Statistical analyses were performed using 'Stat Mate ver. 6' (ATMS, Tokyo, Japan). Unless otherwise specified, all error bars in this study are s.d.

Results

KO-SP retained GVL effect against P815 leukemic cell line

To evaluate the potential clinical utility of IL-21, we wished to determine whether the loss of an IL-21 signal abolished the GVL effect. To this end, we transplanted T-cell

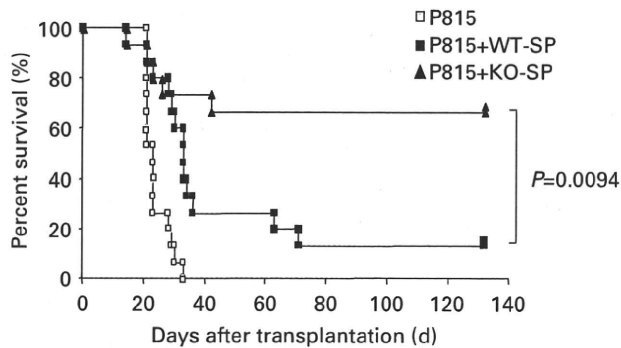


Figure 1 Survival curve with the leukemic cell line, P815. C57BL/6-DBA2 F1 recipients (H-2^d/H-2^b) were transplanted with 2×10^4 P815 leukemic cells (H-2^d), 5×10^6 TCD-BM (H-2^b) and either 5×10^7 WT-SP or KO-SP (H-2^b). Open squares, filled squares and filled triangles indicate transplantations without splenocytes ($n=15$), with WT-SP ($n=15$) and with KO-SP ($n=15$), respectively. The combined results of two independent experiments are shown. *P*-value was calculated by the Log-rank method.

depleted wild-type BM cells together with P815 leukemic cells (H-2^d, DBA2 mouse derived) into recipient C57BL/6-DBA2 F1 mice. Only mice transplanted with splenocytes survived beyond 4 weeks, suggesting that the leukemic cells were eliminated by either WT-SP or KO-SP (Figure 1). KO-SP-transplanted mice survived longer than WT-SP-transplanted mice (Figure 1). The transplanted mice without splenocytes died within 4 weeks, all with paralyzed hind legs, and almost half with leukemic nodules on the liver. In contrast, the mice with probable GVHD did not show such phenotypes and suffered from diarrhea, ruffled hair, a hunched posture and weight loss. GVHD appeared to be the cause of death for these mice. Our previous results²⁹ suggest that the worse survival of recipients of WT-SP is because of GVHD.

IL-21 decoy receptor retained GVL effect against P815 cell line

To confirm these results, we used a previously constructed decoy receptor for IL-21,²⁹ in which the major cytoplasmic domain encompassing from box 1 through C-terminus was deleted. Theoretically, it can bind to IL-21 ligand but cannot evoke signals from the receptor, and in fact, the decoy receptor was shown to attenuate GVHD in the previous study.²⁹ To confirm that the decoy receptor does not abrogate the GVL effect analogous to KO-SP, we performed GVL experiments with P815 leukemic cells. As shown in Figure 2, P815 efficiently killed recipient mice without splenocytes as in Figure 1, and the decoy receptor transduced BM prolongs survival, suggesting that the blockade of IL-21 signal retains GVL effect.

IL-21R^{-/-} splenocyte retained GVL effect against *bcr/abl*-transformed recipient-BM cells

To further confirm the above results, we used another leukemic model, *bcr-abl*-transduced recipient-BM, instead of the established P815 leukemic cell line. Consistent with the results above, KO-SP-transplanted mice survived longer than WT-SP-transplanted mice (Figure 3a). In this model, 2 weeks after transplantation, peripheral blood cells

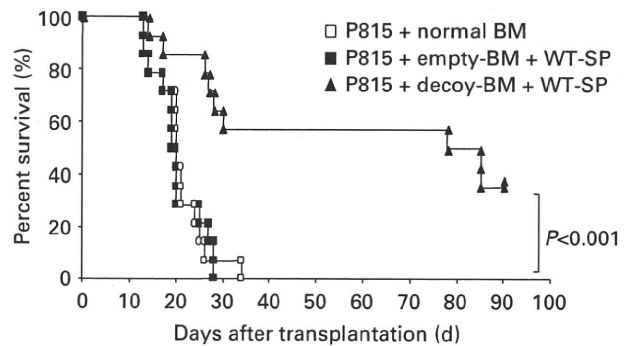


Figure 2 Survival curve with decoy receptor and P815 leukemic cells. C57BL/6-DBA2 F1 recipients were transplanted with WT-SP (2×10^7), 2×10^4 P815 leukemic cells and either empty-vector or decoy-receptor transduced BM (starting dose: 5×10^5). Filled squares, filled triangles and open squares indicate transplantations with empty-vector transduced BM ($n=14$), decoy-receptor transduced BM ($n=14$) and no splenocytes ($n=14$), respectively. The combined results of two independent experiments are shown. *P*-value was calculated by the Log-rank method.

showed the H-2^b (C57BL/6) complete donor-phenotype (Figure 3b, middle and lower panels), suggesting an eradication of leukemic cells by both types of splenocytes. Whereas peripheral blood from the recipients without splenocytes showed the H-2^b/H-2^d (C57BL/6-DBA2 F1) recipient-phenotype (Figure 3b, upper panel, arrowhead), suggesting the proliferation of *bcr-abl*-transduced recipient BM-derived leukemic cells. All mice we analyzed demonstrated the same pattern in peripheral blood. These results together with transplantation with P815 leukemic cells suggest that the lack of IL-21 signaling does not abolish the GVL effect. In this model, we found late relapse, suggesting that the GVL effect might not be sustained (Figure 3a, KO-SP).

Dose-reduction experiment with luciferase-expressing P815 leukemic cell line

We decided to perform dose-response experiments to determine the number of splenocytes required to eliminate leukemic cells after transplantation, as otherwise it is impossible to compare the strength of GVL effect between the WT and KO cells. To make the leukemia visible in live mice, we used luciferase-transduced P815 cell line and IVIS imaging system (Xenogen). With this system, we could see GVL effect in color (Figure 4). We started with 1×10^7 splenocytes because a dose of 5×10^7 splenocyte was used in Figure 1. Without coinfection of splenocytes, control mice died around 30–40 days after transplantation (Figure 5, top left panel) with a marked increase in luciferase activity (Figure 5, top right panel), whereas recipients of both WT-SP and KO-SP demonstrated an eradication of P815 leukemic cells (Figure 5, top right panel). Second, we used 5×10^6 splenocytes; with this number, almost no mice died because of GVHD, but the graft still eradicated leukemic cells completely (Figure 5, second panels from top). Third, we used 5×10^5 and 5×10^4 ; with these numbers, graft could not eliminate leukemic cells anymore and mice died because of leukemia (Figure 5, third and bottom panels). The reduction in the relative signal intensity at two later time-points resulted