

201023019B

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 20 年度～22 年度 総合研究報告書

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 20 年度～22 年度 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	8
--------------------------	---

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	1 2
------------------------	-----

# I . 総合研究報告

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）  
総合研究報告書

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- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  が必要であることを報告した。ヒト MSC でも NO は重要な働きをしていると考えられたが、ヒト MSC はマウス同様に T 細胞増殖を抑制するものの、NO の産生は検出されなかった。これらは種による違いと考えられた。我々は IL-21 が GVHD を増強することを明らかとしたため、IL-21 のデコイ受容体を強制発現した MSC を作製し、GVHD モデルマウスに投与した。効果に関しては引き続き検討が必要である。マウス MSC が 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、マウス 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 GVHD の細胞治療のソースとして優れている可能性が示された。ヒト MSC バンクについては、これまでに 52 症例から樹立を行った。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。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、投与症例が計 3 例となった。これまでの臨床研究で MSC 投与の安全性を日本国内でも確立できたものとする。

分担研究者

尾崎 勝俊

自治医科大学医学部

講師

A. 研究目的

造血幹細胞移植ではステロイド不応性の重症急性 GVHD に対して確立した二次治療法はなく、大きな課題として残されている。また、成人患者に対しても積極的に行われ

るようになった臍帯血移植では、生着不全のリスクを抱えている。そのような観点から、免疫抑制活性と造血支持能を持つ間葉系幹細胞(MSC)の利用(細胞治療)が造血幹細胞移植領域で注目されている。欧米の臨床研究でも、難治性GVHDに対するMSC投与の有用性が報告された(Lancet 371:1579, 2008)。一方、MSCの免疫抑制活性については、現象面での報告は数多くみられるものの、その詳細な分子機序については依然として不明な点が多く、一定の見解は得られていないのが実情である。そこで本研究では、その科学的分子基盤を解明すると共に、急性GVHDに対するMSC治療の臨床応用を推進し、この治療法を確立することが目的である。

我々は従来の研究で、MSCがNOを介してT細胞増殖を抑制することを示した(Blood 109:228, 2007; BBRC 355:956, 2007)。今回の研究では以下の項目を目的とした。1)最近注目されているTh17や制御性T細胞への分化に対するMSCの作用、その作用機序を解明する。2)MSCによるGVHD治療の効果増強を図る新しいストラテジーとして、IL-21受容体ノックアウトマウスではGVHDが軽減することを我々は見出しており、IL-21作用の阻害がGVHD治療の一つの方法になりうると考えている。デコイIL-21受容体を発現するMSCを作製し、治療に使用する。3)至適MSCドナーに関する基礎データを得るため、研究用MSCバンクを構築し、年齢別・疾患別のMSC機能(増殖能・免疫抑制活性など)を比較検討する。4)現在実施している臨床研究(課題名「造血幹細胞移植後に発症した難治性急性GVHDに対する血縁者由来間葉系幹細胞を用いた治療」)についても症例を重ね、臨床データを蓄積する。

## B. 研究方法

1) マウスMSCの分離: マウスの骨髄細胞をdishに撒き、接着性を利用して、それ以外の細胞を除く。これらの細胞が増殖した後、細胞表面マーカー、脂肪細胞への分化、骨芽細胞への分化を評価した(Blood 109:228, 2007)。

2) Th17, Treg分化への影響はマウスMSCを使用し、Th17分化にはTGF- $\beta$ とIL-6を、Treg分化にはTGF- $\beta$ とIL-2を用いた。増殖刺激にはCD3/CD28抗体のビーズを使用した。分化の評価にはそれぞれの分化マーカー、IL-17、Foxp3の発現を用いてフローサイトメーターで評価した。

3) IL-21のデコイ受容体はPCRを使って作成し、レトロウイルスベクター(pMX-IRES-GFP)と、アデノウイルスベクター(Takara)に挿入した。マウスMSC上の発現はFACSとウエスタンブロッティングで確認した。マウスのGVHDの系は尾崎が既に利用している方法をそのまま使用した(BMT JI 185:1920, 2010)。

4) ヒト間葉系幹細胞バンク: 大学倫理委員会の承認後、同意を得られた患者のみから間葉系幹細胞を樹立した。マウスMSCの場合と同様に、細胞の接着性を利用してMSCを分離、増殖させた。

5) 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MSCの分離と培養を無菌的に行った。即ち、単核球分離、赤血球溶血後、 $1.0 \times 10^6$  cells/mlの細胞密度で37°C、5%CO<sub>2</sub>

存在下で培養した。これまでの基礎的検討で凍結保存操作による MSC のバイアビリティの低下はごく僅かであった。この培養条件では、100×20mm 細胞培養プラスチックディッシュ（培養面積約 78.5cm<sup>2</sup>）を用いて、培養開始後 5-7 日後にディッシュに付着する線維芽細胞様のコロニー形成を認め、約 10 日間でコンフルエントに到達し、細胞数は約 1.0×10<sup>7</sup>cells 以上となった。患者体重あたり 1x10<sup>6</sup>/kg で投与するのに十分な数まで増やし（約 14-21 日間培養）、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、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<sup>6</sup>cells/kg、輸注速度はシリンジポンプを用いて 4ml/min とした。Osiris 社の臨床研究では細胞濃度を 2.5×10<sup>6</sup>cells/kg に設定しており、本研究でもそれを踏襲している。レシピエントの体重を 50kg とした場合、輸注投与量は約 20ml となり、投与時間は 5 分間である。これまでの検討から細胞は表面抗原の CD45、CD11c が陰性で、CD90、CD73(SH3)を高発現していることを確認している。また分化誘導培地にてこれらの細胞が脂肪細胞及び骨芽細胞へと ex vivo にて形態学的に変化し、それぞれ Oil red O 染色、Alkaline Phosphatase 染色にびまん性に陽性で多分化能を有していることが確認されている。

（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。

臨床研究（治療）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。

## B. 研究結果

1) T 細胞分化の際にマウス MSC を共培養すると、Th17 分化は強く抑制された。阻害剤の実験から作用機序は PGE<sub>2</sub>, indoleamine-2,3-dioxygenase の一部関与が示唆された。これに対して、制御性 T 細胞への分化はほとんど抑制されなかった。

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で高効率に MSC に発現させることに成功した。この細胞をマウス GVHD モデルに投与したが、現時点では明らかな生存延長は認められていない。

3) ヒト間葉系幹細胞バンクの樹立と NO 産生能：ヒトの骨髄から MSC を樹立した。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。この中の一部の細胞を用いて T 細胞の増殖抑制を測定した。増殖抑制効果はみられたが、NO の産生に関しては、マウスと異なり通常のアッセイ系では検出できなかった。

4) 重症 GVHD に対する MSC 投与の臨床研究で

は、これまでに計 10 名で MSC を準備した。そのうち、実際に投与に至ったのは 3 例であった。症例数が限られており、MSC 細胞療法の治療効果を評価することはできなかったが、少なくとも  $1 \times 10^6 / \text{kg}$  のヒト MSC を安全に投与できることが証明された。投与に関する有害事象は報告されなかった。

#### D. 考察

1) これまでの報告では Th17 分化は MSC によって増強されるとされていた。我々は少なくとも 1 次分化の段階では Th17 分化は抑制されることを示した。また、これまでの報告では制御性 T 細胞を増やすとされてきたが、我々の系ではその割合に変化は認められなかった。これらの事実は GVHD の成因を考えた場合、炎症性の IL-17 を抑制し、抑制性の制御性 T 細胞分化に変化を与えないため、重症 GVHD の細胞治療のソースとして、MSC が優れた特性を持っている可能性を示している。

2) IL-21 のデコイ受容体を発現した MSC を GVHD モデルマウスに投与したが、現時点で生存率の上昇は明らかではない。条件の最適化などが検討課題である。

3) ヒト MSC バンクと NO 産生：マウス MSC では NO 産生が T 細胞増殖抑制に重要な働きをしているが、ヒト MSC では NO 産生がほとんど認められなかった。NO 以外でこれまでの報告のある免疫抑制因子、TGF- $\beta$ 、PGE<sub>2</sub>、indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) などが関与していると考えられた。

4) 臨床研究では、単施設の移植症例では症例数に限りがあり、ステロイド不応の重症 GVHD 症例は少なかった。10 症例で MSC を準備し

たが、MSC 投与に至った症例は計 3 例であった。有効性に関する評価はできない症例数であるが、日本国内で MSC 投与の安全性が確認された。

#### E. 結論

1) マウス MSC はマウス T 細胞の Th17 分化を抑制した。その機序として、PGE<sub>2</sub>、indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) の一部関与が示唆された。これに対して、制御性 T 細胞分化には大きな変化を認めなかった。

2) MSC はアデノウイルスベクターを使用すると高効率に高発現を得られた。IL-21 デコイ受容体を MSC に高発現させたが、その治療効果は検討中である。

3) 52 症例のヒト骨髄由来の MSC バンクが構築された。ヒト MSC ではマウス MSC と異なり、NO が中心的役割を果たしていない可能性が示唆された。

4) 難治性 (ステロイド抵抗性) GVHD の患者数は限られており、MSC を培養・準備した症例は 10 名いたが、投与に至ったのは 3 名であった。この研究により、患者への同種 MSC 投与の安全性が確認された。

#### F. 健康危険情報

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) 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) Tataru, 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, Tataru 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.* 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, Tataru 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.
  - 12) 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.
  - 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takeuchi K, Katsura K, Mizukami H, Kume A, Ookawara S, Ikeda U, Katayama Y, Ozawa K: Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther.* 16(3): 383-91, 2009.
- 20) Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Sheykholeslami K, Nomoto T, Muramatsu SI, Mizukami H, Kume A, Xiao S, Ichimura K, Ozawa K: Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. *Mol Ther* 16: 474-80, 2008.
- 21) Nonaka-Sarukawa M, Okada T, Ito T, Yamamoto K, Yoshioka T, Nomoto T, Hojo Y, Shimpo M, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *J Gene Med* 10: 368-74, 2008.
- 22) Oka S, Muroi K, Mori M, Matsuyama T, Fujiwara S, Oh I, Sato K, Kikuchi S, Ueda M, Toshima M, Suzuki T, Ozaki K, Nagai T, Ozawa K: Prediction of response to imatinib in patients with chronic myelogenous leukemia by flow cytometric analysis of bone marrow blastic cell phenotypes. *Leuk*

Lymphoma. 2009; 50(2): 290-293.

- 23) Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y, Ozawa K: Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene*. 2009; 28(2): 231-242.
- 24) Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H, Kume A: Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun*. 2008;30(3):121-127.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特になし。

## Ⅱ. 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, Tataru 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
Tataru 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, Tataru 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 <sup>-/-</sup> 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, <u>Ozawa K</u> , 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, <u>Ozawa K</u>	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, <u>Ozawa K</u> , 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, <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.	34(8)	1057-1063	2010
Meguro A, <u>Ozaki K</u> , Oh I, Hatanaka K, Matsu H, Tatara R, Sato K, Leonard WJ, <u>Ozawa K</u>	IL-21 is critical for GVHD in a mouse model.	Bone Marrow Transplant.	45(4)	723-729	2010
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.	125(6)	533-537	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	116(3)	406-417	2010
Sakoe Y, Sakoe K, Kirito K, <u>Ozawa K</u> , Komatsu, N.	FOXO3A as a key molecule for all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia.	Blood	115(18)	3787-3789	2010
Meguro A, <u>Ozaki K</u> , Oh I, Hatanaka K, Matsu H, Tatara 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(4)	723-729	2010
Kobayashi H, Matsuyama T, Ueda M, Suzuki T, <u>Ozaki K</u> , 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
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

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
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
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
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
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(5)	373-381	2009
Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takeuchi K, Katsura K, Mizukami H, Kume A, Ookawara S, Ikeda U, Katayama Y, Ozawa K	Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat.	Gene Ther.	16(3)	383-391	2009
Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Sheykholeslami K, Nomoto T, Muramatsu SI, Mizukami H, Kume A, Xiao S, Ichimura K, Ozawa K	Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea.	Mol. Ther.	16	474-480	2008

Nonaka-Sarukawa M, Okada T, Ito T, Yamamoto K, Yoshioka T, Nomoto T, Hojo Y, Shimpo M, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ikeda U, Shimada K, <u>Ozawa K</u>	Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats.	J. Gene Med.	10	368-374	2008
Oka S, Muroi K, Mori M, Matsuyama T, Fujiwara S, Oh I, Sato K, Kikuchi S, Ueda M, Toshima M, Suzuki T, <u>Ozaki K</u> , Nagai T, <u>Ozawa K</u>	Prediction of response to imatinib in patients with chronic myelogenous leukemia by flow cytometric analysis of bone marrow blastic cell phenotypes.	Leuk. Lymphoma	50(2)	290-293	2009
Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, <u>Ozaki K</u> , Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y, <u>Ozawa K</u>	Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma.	Oncogene.	28(2)	231-242	2009
<u>Ozawa K</u> , Sato K, Oh I, <u>Ozaki K</u> , Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H, Kume A	Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs).	J. Autoimmun.	30(3)	121-127	2008



### Ⅲ. 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 Meguro<sup>1</sup>, K Ozaki<sup>1</sup>, K Hatanaka<sup>1</sup>, I Oh<sup>1</sup>, K Sudo<sup>2</sup>, T Ohmori<sup>3</sup>, H Matsu<sup>1</sup>, R Tataru<sup>1</sup>, K Sato<sup>1</sup>, Y Sakata<sup>3</sup>, S Nakae<sup>4</sup>, WJ Leonard<sup>5</sup> and K Ozawa<sup>1</sup>

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

Previously, we have shown that IL-21R<sup>-/-</sup> splenocytes ameliorate GVHD as compared with wild-type splenocytes. Here, we investigated whether or not IL-21R<sup>-/-</sup> splenocytes diminish the graft-versus-leukemia (GVL) effect. Surprisingly, IL-21R<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup> 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  $5 \times 10^5$  and  $5 \times 10^6$  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<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup> 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.<sup>10–13</sup> Moreover, IL-21 can drive Th17 differentiation.<sup>14–16</sup> IL-21 also contributes to the development of autoimmune disease as has been reported in mouse models,<sup>17–20</sup> 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,<sup>21–28</sup> but nothing is available in the clinical setting at this point.

Previously, we have shown that IL-21R<sup>-/-</sup> (KO) splenocytes ameliorate GVHD as compared with wild-type splenocytes,<sup>29</sup> 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.<sup>30</sup> 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  $\gamma$  chain family of cytokines.<sup>1–3</sup> IL-21 is mainly produced by activated CD4<sup>+</sup> T cells and acts on T-, B-, NK-cells and other lineages.<sup>3–5</sup> IL-21 has a critical role in Ig production<sup>6</sup> and the lack of both IL-21 and IL-4 signals impairs normal germinal center formation.<sup>6</sup> Antitumor effects of IL-21 have been reported<sup>7–9</sup> with ongoing

## Materials and methods

### Mice

IL-21R<sup>-/-</sup> (KO) mice were generated previously<sup>6</sup> and mice were C57BL/6 background.<sup>29</sup> IL-21R<sup>+/+</sup> (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<sup>-/-</sup> splenocytes (KO-SP) or wild type splenocytes (WT-SP). C57BL/6-DBA F1 strain mice were used as recipients. The number of splenocytes was  $5 \times 10^7$  and P815 leukemic cells were coinjected ( $2 \times 10^4$ ). T cell depletion from BM was performed using Thy1.2 microbeads and an autoMACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA). P815 cells (mast cell leukemia line, H-2<sup>d</sup>) were used as a model of residual leukemic cells and C57BL/6 mice were used as donors (H-2<sup>b</sup>). P815 was originally derived from DBA2 mice (H-2<sup>d</sup>); therefore, P815 can cause lethal leukemic conditions in C57BL/6-DBA2 F1 recipients.<sup>21</sup>

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  $2 \times 10^7$ , and P815 leukemic cells were coinjected ( $2 \times 10^4$ ). Either decoy receptor or empty vector-transduced BM cells (starting dose of BM was  $5 \times 10^5$ ) 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  $5 \times 10^5$ ) instead of P815 cells, and the number of splenocytes ( $2 \times 10^7$ ).<sup>31</sup>

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

#### <sup>51</sup>Cr release assays (cytotoxic T cell lysis assays)

As previously described,<sup>21</sup> 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<sup>+</sup> cells was determined by flow cytometric analysis, and counts were normalized for CD8<sup>+</sup> T cell numbers. Cell lines, P815 (H-2<sup>d</sup>) and EL4 (H-2<sup>b</sup>), were used as allogeneic and syngeneic targets, respectively. Target cells ( $2 \times 10^6$ ) were labeled with 100  $\mu$ Ci of <sup>51</sup>Cr for 1.5 h. After washing twice, target cells were plated at  $1 \times 10^4$  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. <sup>51</sup>Cr in the supernatants after incubation was determined using LumaPlate-96 and TopCount NXT (PerkinElmer, Boston, MA, USA).

#### MLR and ELISA

T cells and CD8<sup>+</sup> T cells were purified using CD90 and CD8 microbeads (Miltenyi Biotech), and  $1 \times 10^5$  cells were cocultured with 30 Gy irradiated splenocytes ( $1 \times 10^5$ ) 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.<sup>32</sup> After 6 days of culture, concentrations of interferon- $\gamma$  and tumor

necrosis factor  $\alpha$  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<sup>b</sup> and H-2<sup>d</sup> 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.<sup>29</sup> 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.<sup>5,29</sup> 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).

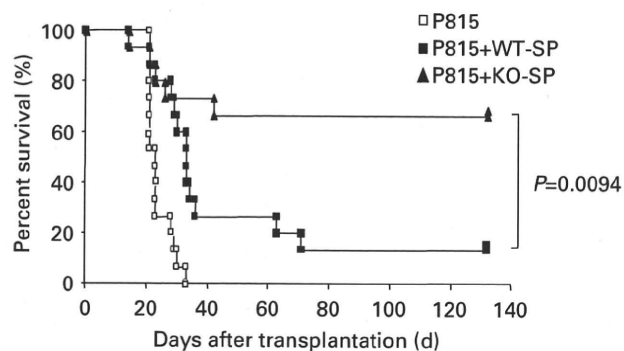
#### Statistical analysis

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<sup>d</sup>/H-2<sup>b</sup>) were transplanted with  $2 \times 10^4$  P815 leukemic cells (H-2<sup>d</sup>),  $5 \times 10^6$  TCD-BM (H-2<sup>b</sup>) and either  $5 \times 10^7$  WT-SP or KO-SP (H-2<sup>b</sup>). 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.

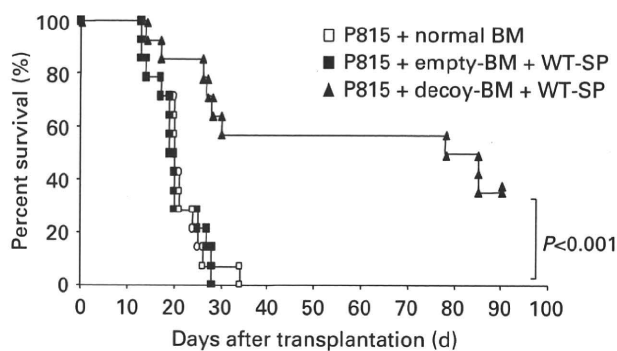
depleted wild-type BM cells together with P815 leukemic cells (H-2<sup>d</sup>, DBA2 mouse derived) into recipient C57BL/6-DBA2 F1 mice. Only mice transplanted with splenocytes survived beyond 4 weeks, suggesting that the leukemic cells were eliminated by either WT-SP or KO-SP (Figure 1). KO-SP-transplanted 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 results<sup>29</sup> 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,<sup>29</sup> 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.<sup>29</sup> 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<sup>-/-</sup> 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 ( $2 \times 10^7$ ),  $2 \times 10^4$  P815 leukemic cells and either empty-vector or decoy-receptor transduced BM (starting dose:  $5 \times 10^5$ ). 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<sup>b</sup> (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<sup>b</sup>/H-2<sup>d</sup> (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  $1 \times 10^7$  splenocytes because a dose of  $5 \times 10^7$  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  $5 \times 10^6$  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  $5 \times 10^5$  and  $5 \times 10^4$ ; 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