

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09498

研究課題名(和文) 組織浸潤アロT細胞の標的抗原とクロナイプに着目したGVHDバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Quantitative assessment of TCR repertoire and allo-reactivity of human acute GVHD tissue-infiltrating T cells

研究代表者

村田 誠 (Murata, Makoto)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40378063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト急性移植片対宿主病(GVHD)組織に浸潤しているT細胞の多様性は非常に低く、ヒト急性GVHDに限られたごく少数のアロ抗原特異的細胞傷害性T細胞クローンにより発症することが示された。また、ヒト急性GVHD発症に関わるT細胞クローンは、GVHD臓器ごとに異なること、同じ臓器のGVHDであっても患者ごとに異なることが示された。さらに、組織浸潤T細胞repertoireの偏りを数値化することで急性GVHDの治療反応性を予測するバイオマーカーを樹立できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：T cell repertoire was extremely skewed in human acute GVHD tissues. Two allo-reactive cytotoxic T cell clones were isolated from GVHD skin of a patient. Interestingly, their clonotypes were identical to the most and second most frequent clonotypes in the skin and accounted for almost all of the skin-infiltrating T cells. These results suggest that human acute GVHD can result from a few different allo-reactive cytotoxic T cell clones. In the analysis for 12 acute GVHD tissues, the frequent T cell clonotypes differed from tissue to tissue of the same patient, and the frequent T cell clonotypes in the same tissue differed from patient to patient. Importantly, there was an association between the low 1/Ds of GVHD tissue-infiltrating T cells and poor response to first-line steroid treatment, suggesting that evaluation of the degree of skewing of tissue-infiltrating T cells may allow us to establish a novel biomarker that predicts treatment response.

研究分野：血液内科

キーワード：造血幹細胞移植 移植片対宿主病 T細胞 抗原 HLA

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病 (GVHD) は克服すべき重要な合併症である。急性 GVHD の発症機序は、マウス移植モデルを用いたこれまでの研究結果から以下のように理解されている。すなわち、二次リンパ組織内で患者抗原提示細胞からアロ抗原刺激を受けたドナー T 細胞の一部が effector memory T 細胞となり、皮膚などの標的組織に遊走、浸潤し、組織を傷害して急性 GVHD が発症する。

最近、ヒト腸急性 GVHD 生検組織に浸潤している T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) 塩基配列を次世代シーケンサー (NGS) で網羅的に決定 (TCR deep sequence) した結果が報告された。その中で、腸急性 GVHD 組織では末梢血と比べ TCR repertoire の偏り (skewing) が著しいことが示されている。しかし、TCR deep sequence は、細胞傷害活性やサイトカイン産生能など T 細胞の機能に関する情報は何も与えてくれない。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト急性 GVHD 生検組織に浸潤している T 細胞について、NGS による TCR deep sequence を行うとともに、生検組織よりアロ抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (アロ T 細胞) クローンを分離して、その TCR 塩基配列を決定する。それにより、組織浸潤 T 細胞全体におけるアロ T 細胞クローンの頻度を推定する。

得られた解析結果と臨床データを連結することで、組織浸潤 T 細胞におけるアロ T 細胞の頻度や、組織浸潤 T 細胞の TCR repertoire の skewing の程度などと急性 GVHD 臨床経過との相関を解析し、急性 GVHD 治療反応性の予測因子同定を試みる。

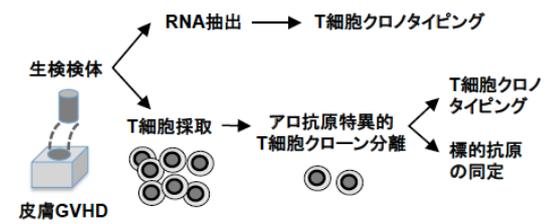
3. 研究の方法

(1) 患者から文書による同意を得た上で、急性 GVHD に対する一次治療開始前に採取され、かつ急性 GVHD と病理診断された生検組織の一部の提供を受ける。また同時期の末梢血の提供も受ける。

(2) NGS を用いて GVHD 組織浸潤 T 細胞および末梢血中 T 細胞の TCR V $\beta$  CDR3 target deep sequence を行い、Simpson's diversity index (1/Ds) により TCR repertoire の skewing を数値化する。

(3) 急性 GVHD 組織から T 細胞を採取し、limiting dilution 法と Cr 放出試験を組み合わせアロ T 細胞クローンを分離する。cDNA expression cloning 法などを用いてその標的抗原を同定する。分離したアロ T 細胞クローンの TCR 塩基配列を決定することで、GVHD 組織浸潤 T 細胞全体におけるアロ T 細胞頻度を推定する (図 1)。

< 図 1 >



(4) 同様に末梢血中 T 細胞についても TCR repertoire の skewing 程度や、アロ T 細胞頻度を解析する。

(5) 組織浸潤 T 細胞 repertoire の程度 (1/Ds) と急性 GVHD 臨床経過との相関について、統計学的解析を行い、GVHD 予後予測マーカーの同定を試みる (図 2)。

< 図 2 >

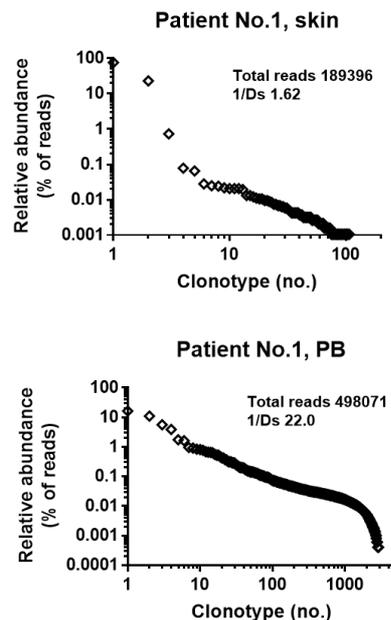


4. 研究成果

(1) 急性 GVHD 患者 8 名から GVHD 生検検体 12 個と同時期に採取した末梢血 8 本の提供を受けた。

(2) 症例 1 の皮膚 GVHD 組織浸潤 T 細胞と末梢血中 T 細胞について、NGS を用いて TCR deep sequence を行ったところ、それぞれの 1/Ds が 1.6 vs. 22.0 と、皮膚組織において TCR repertoire の著しい skewing が観察された (図 3)。

< 図 3 >



(3)症例1の皮膚GVHD組織より、患者由来細胞を傷害するがドナー由来細胞を傷害しない2つのアロT細胞クローンの分離に成功した。これら2つのクローンの認識する抗原同定を試みたところ、少なくとも1つのクローンは患者のみが有する不適合HLA分子を認識することを確認した。

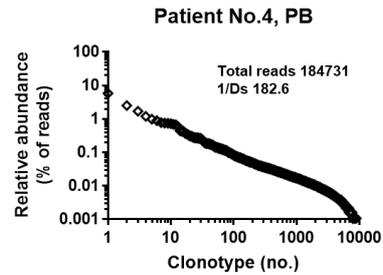
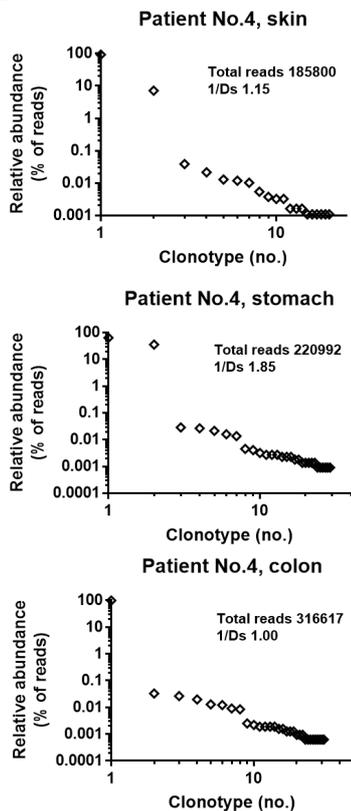
次にこれら2つのクローンのTCR塩基配列を決定し、先に得た症例1の皮膚GVHD組織浸潤T細胞のTCR deep sequenceの結果と照合した。興味深いことに、これら2つのアロT細胞クローンは皮膚浸潤T細胞のうち頻度第1位、第2位と一致した。それらの頻度は75%と23%であり、すなわち症例1の皮膚GVHD組織では2つのアロT細胞クローンが98%を占めていた。

以上より、症例1の皮膚GVHDはわずか2つのアロT細胞クローンによって発症したことが示唆された。

(4)症例4の皮膚、胃、大腸GVHD組織において、頻度第1位のT細胞クローンはそれぞれ93%、64%、99%を占めていた(図4)。それらのTCR塩基配列は互いに全て異なっていた。また、症例2の少なくとも1つのGVHD組織で5%以上を占める比較的頻度の高いTCRについて、症例2の他のGVHD組織における頻度を確認したところ、他の組織では検出できない、もしくは極めて低い頻度で検出した。

すなわちこれらの結果は、症例2の皮膚、胃、大腸のGVHD発症には、それぞれ異なるアロT細胞クローンが関与したことを示唆している。

< 図 4 >



(5)症例6を除く計7症例の皮膚GVHD組織において、少なくとも1症例の皮膚組織で5%以上を占める比較的頻度の高いTCRについて、他の症例の皮膚組織における頻度を確認したところ、他の症例では検出できない、もしくは極めて低い頻度で検出した。

すなわちこれらの結果は、同じ皮膚組織であっても発症に関与するアロT細胞クローンは患者ごとに異なることを示唆している。

(6)上記7症例の皮膚GVHD組織において、少なくとも1症例の皮膚組織で5%以上を占める比較的頻度の高いTCRについて、同時期の末梢血中における頻度を確認したところ、皮膚組織における頻度の多寡と末梢血中頻度の多寡に相関は認めなかった。

(7)全てのGVHD組織を対象とした解析において、グレードIII-IVのGVHD組織と比較して、組織浸潤T細胞のTCR repertoireがより著しくskewingしていた。また、ステロイド治療に抵抗性を示したGVHD組織はステロイド治療に感受性を示したGVHD組織と比較して、組織浸潤T細胞のTCR repertoireがより著しくskewingしていた。

(8)以上より、急性GVHD組織浸潤T細胞 repertoireの多様性は非常に低く、ヒト急性GVHDに限られた少数のアロT細胞クローンにより発症することが示された。また、GVHD関連T細胞クローンは組織ごとに異なること、同じGVHD組織であっても患者ごとに異なることが示された。

また、組織浸潤T細胞 repertoireのskewingの程度とGVHD治療反応性が相関したことから、生検時に組織浸潤T細胞 repertoireの偏りの程度を数値化することで、ヒト急性GVHDの予後予測に応用できる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計13件)

① Koyama D, Murata M, Hanajiri R, Okuno S, Kamoshita S, Julamanee J, Takagi E, Hirano D, Miyao K, Sakemura R, Goto T, Hayakawa F, Seto A, Ozawa Y, Miyamura K, Terakura S, Nishida T, Kiyoi H. High incidence of extensive chronic graft-versus-host disease in patients with the

- REG3A* rs7588571 non-GG genotype. PLoS One, 査読有, 12(9); e0185213, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0185213.
- ② Murata M, Maeda Y, Masuko M, Onishi Y, Endo T, Terakura S, Ishikawa Y, Iriyama C, Ushijima Y, Goto T, Fujii N, Tanimoto M, Kobayashi H, Shibasaki Y, Fukuhara N, Inamoto Y, Suzuki R, Kodera Y, Matsushita T, Kiyoi H, Naoe T, Nishida T. Phase 2 study of intrabone single unit cord blood transplantation for hematological malignancies. *Cancer Sci*, 査読有, 108(8); 1634-1639, 2017, doi: 10.1111/cas.13291.
- ③ Murata M, Ikegame K, Morishita Y, Ogawa H, Kaida K, Nakamae H, Ikeda T, Nishida T, Inoue M, Eto T, Kubo K, Sakura T, Mori T, Uchida N, Ashida T, Matsuhashi Y, Miyazaki Y, Ichinohe T, Atsuta Y, Teshima T. Low-dose thymoglobulin as second-line treatment for steroid-resistant acute GVHD: an analysis of the JSHCT, Bone Marrow Transplant. 査読有, 52(2); 252-257, 2017, doi: 10.1038/bmt.2016.247.
- ④ Kanda J, Morishima Y, Terakura S, Wake A, Uchida N, Takahashi S, Ono Y, Onishi Y, Kanamori H, Aotsuka N, Ozawa Y, Ogawa H, Sakura T, Ohashi K, Ichinohe T, Kato K, Atsuta Y, Teshima T, Murata M. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia*, 査読有, 31(3); 663-668, 2017, doi: 10.1038/leu.2016.288.
- ⑤ Sakemura R, Terakura S, Watanabe K, Julamanee J, Takagi E, Miyao K, Koyama D, Goto T, Hanajiri R, Nishida T, Murata M, Kiyoi H. A Tet-on inducible system for controlling CD19-chimeric antigen receptor expression upon drug administration. *Cancer Immunol Res*, 査読有, 4(8); 658-668, 2016, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0043.
- ⑥ Goto T, Nishida T, Takagi E, Miyao K, Koyama D, Sakemura R, Hanajiri R, Watanabe K, Imahashi N, Terakura S, Murata M, Kiyoi H. Programmed death-ligand 1 on antigen-presenting cells facilitates the induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes: application to adoptive T-cell immunotherapy. *J Immunother*, 査読有, 39(8); 306-315, 2016, doi: 10.1097/CJI.000000000000136.
- ⑦ Sakai R, Taguri M, Oshima K, Mori T, Ago H, Adachi S, Morita S, Taniguchi S, Fukuda T, Ohashi K, Eto T, Miyamura K, Iwato K, Kobayashi N, Kanamori H, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Murata M. A comparison of tacrolimus and cyclosporine combined with methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis, stratified by stem cell source: a retrospective nationwide survey. *Int J Hematol*, 査読有, 103(3); 322-333, 2016, doi: 10.1007/s12185-016-1939-9.
- ⑧ Arai Y, Kanda J, Nakasone H, Kondo T, Uchida N, Fukuda T, Ohashi K, Kaida K, Iwato K, Eto T, Kanda Y, Nakamae H, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Hirokawa M, Atsuta Y, Murata M. Risk factors and prognosis of hepatic acute GvHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 査読有, 51(1); 96-102, 2016. doi: 10.1038/bmt.2015.205.
- ⑨ Imahashi N, Ohashi H, Terakura S, Miyao K, Sakemura R, Kato T, Sawa M, Yokohata E, Kurahashi S, Ozawa Y, Nishida T, Kiyoi H, Watanabe K, Kohno A, Kasai M, Kato C, Iida H, Naoe T, Miyamura K, Murata M. Chimerism status after unrelated donor bone marrow transplantation with fludarabine-melphalan conditioning is affected by the melphalan dose and is predictive of relapse. *Ann Hematol*, 査読有, 94(7); 1139-1148, 2015, doi: 10.1007/s00277-015-2312-4.
- ⑩ Nakane T, Fukuda T, Kanda J, Taniguchi S, Eto T, Ohashi K, Nakamae H, Kurokawa M, Mori T, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Murata M. Age influences post-graft-versus-host disease non-relapse mortality in adults with acute graft-versus-host disease of varying severity following allogeneic hematopoietic cell transplant. *Leuk Lymphoma*. 査読有, 56(8); 2392-2397, 2015, doi: 10.3109/10428194.2015.1009056.
- ⑪ Hanajiri R, Murata M, Sugimoto K, Murase M, Sakemura R, Goto T, Watanabe K, Imahashi N, Terakura S, Ohashi H, Akatsuka Y, Kurahashi S, Miyamura K, Kiyoi H, Nishida T, Naoe T. Integration of humoral and cellular HLA-specific immune responses in cord blood allograft rejection. *Bone Marrow Transplant*, 査読有, 50(9); 1187-1194, 2015, doi: 10.1038/bmt.2015.119.
- ⑫ Nakasone H, Fukuda T, Kanda J, Mori T, Yano S, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kanamori H, Iwato K, Uchida N, Mori S, Nagamura T, Ichinohe T, Atsuta Y, Teshima T, Murata M. Impact of conditioning intensity and TBI on acute GVHD after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 査読有, 50(4); 559-565, 2015, doi: 10.1038/bmt.2014.293.
- ⑬ Murata M. Prophylactic and therapeutic treatment of graft-versus-host disease in Japan. *Int J Hematol*, 査読有, 101(5); 467-486, 2015, doi: 10.1007/s12185-015-

## 〔学会発表〕 (計 14 件)

- ① Murata M, Koyama D, Hanajiri R, Okuno S, Kamoshita S, Julamanee J, Takagi E, Hirano D, Miyao K, Sakemura R, Goto T, Hayakawa F, Seto A, Ozawa Y, Miyamura K, Terakura S, Nishida T, Kiyoi H. High incidence of extensive chronic GVHD in patients with the REG3A rs7588571 non-GG genotype. 2018 BMT Tandem Meetings, 2018.
- ② 村田 誠. HSCT の課題克服に向けて ～ GVHD 制御の観点から～. 第 40 回日本造血細胞移植学会総会, 2018.
- ③ Koyama D, Murata M, Hanajiri R, Okuno S, Kamoshita S, Takagi E, Julamanee J, Miyao K, Sakemura R, Goto T, Terakura S, Nishida T, Kiyoi H. Quantitative assessment of TCR repertoire and allo-reactivity of human acute GVHD tissue-infiltrating T cells. The 59th annual meeting of the American Society of Hematology, 2017.
- ④ 小山大輔, 村田 誠, 葉名尻 良, 奥野真吾, 鴨下園子, 高木えり奈, Jakrawadee Julamanee, 宮尾康太郎, 後藤辰徳, 酒村玲央奈, 寺倉精太郎, 西田徹也, 清井 仁. ヒト急性 GVHD における組織浸潤アロ反応性 T 細胞レパトアの定量的評価. 第 79 回日本血液学会学術集会, 2017.
- ⑤ 村田 誠. 造血幹細胞移植における間葉系幹細胞の臨床応用. 第 39 回日本造血細胞移植学会総会, 2017.
- ⑥ 小山大輔, 村田 誠, 奥野真吾, 鴨下園子, Jakrawadee Julamanee, 高木えり奈, 宮尾康太郎, 後藤辰徳, 酒村玲央奈, 葉名尻良, 寺倉精太郎, 西田徹也, 清井 仁. ヒト GVHD 組織におけるアロ反応性 T 細胞の解析. 第 39 回日本造血細胞移植学会総会, 2017.
- ⑦ 村田 誠, 松下 正, 後藤辰徳, 入山智沙子, 寺倉精太郎, 西田徹也, 清井 仁. ステロイド抵抗性急性 GVHD に対するヒト骨髄由来間葉系幹細胞治療: 単一施設における後方視的検討. 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017.
- ⑧ Murata M, Ikegame K, Morishita Y, Ogawa H, Nakamae H, Ikeda T, Nishida T, Inoue M, Eto T, Ichinohe T, Atsuta Y, Teshima T. Low-dose thymoglobulin as second-line treatment for steroid-resistant acute GVHD: a JSHCT analysis. 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016.
- ⑨ Murata M, Maeda Y, Masuko M, Onishi Y, Endo T, Terakura S, Ishikawa Y, Iriyama C, Ushijima Y, Goto T, Fujii N, Tanimoto M, Kobayashi H, Shibasaki Y, Fukuhara N, Inamoto Y, Suzuki R, Matsushita T, Kodera Y, Kiyoi H, Naoe T, Nishida T. Intrabone transplantation of a single cord blood unit using non-irradiated

reduced-intensity conditioning. The 58th annual meeting of the American Society of Hematology, 2016.

- ⑩ Murata M, Ikegame K, Ogawa H, Nakamae H, Ikeda T, Nishida T, Inoue M, Eto T, Ichinohe T, Atsuta Y, Teshima T, Morishita Y. Potential value of low-dose ATG treatment for steroid-resistant acute GVHD. 2016 BMT Tandem Meetings, 2016.
- ⑪ 村田 誠. 急性 GVHD の治療. 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016.
- ⑫ 村田 誠. 間葉系幹細胞を用いた GVHD 治療. 第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会, 2016.
- ⑬ Murata M, Hanajiri R, Koyama D, Miyao K, Sakemura R, Goto T, Watanabe K, Terakura S, Nishida T, Kiyoi H. Detecting donor-reactive T cell clones involved in cord blood allograft rejection. The 20th annual congress of Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation Group, 2015.
- ⑭ 村田 誠. 急性 GVHD の予防. 第 77 回日本血液学会学術集会, 2015.

## 〔図書〕 (計 5 件)

- ① 村田 誠, 他 (23 名), 医薬ジャーナル社, 骨髄線維症, 187 (p144-150), 2016.
- ② 村田 誠, 他 (105 名), 診断と治療社, 血液科研修ノート, 533 (p208-212), 2016.
- ③ 村田 誠, 他 (95 名), 日本臨床社, 白血病学 (下), 582 (p359-364), 2016.
- ④ 村田 誠, 他 (95 名), 日本臨床社, 白血病学 (下), 582 (p365-370), 2016.
- ⑤ 村田 誠, 他 (著者多数), 医学書院, 今日の治療指針, 2096 (p684-686), 2016.

## 6. 研究組織

## (1) 研究代表者

村田 誠 (MURATA, Makoto)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号: 40378063

## (2) 研究分担者

なし

## (3) 連携研究者

なし

## (4) 研究協力者

なし