

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09504

研究課題名(和文) カルシニューリン阻害薬によるTreg疲弊を救援する低用量IL-2療法の開発

研究課題名(英文) Low-dose IL-2 therapy to maintain Treg homeostasis under the use of calcineurin inhibitor

研究代表者

谷本 光音 (Tanimoto, Mitsune)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・特命教授

研究者番号：10240805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：B6ドナーより致死放射線を与えたB6D2F1マウスに骨髄移植を施行後、複数の免疫抑制剤を投与し、Treg動態を検証した。シクロスポリン群では、活性化T細胞はよく抑制されるものの、Tregも強く抑制がかかり、CD4T細胞中の割合は大きく低下していた。一方、シロリムスとMMFでは移植後早期のTreg分画を増加させた。この系に、LD-IL2を加えたところ、MMF群では活性化T細胞の増加がみられたが、シロリムス群では活性化T細胞の増加はみられず、Treg分画のさらなる増加が確認された。これらより、LD-IL2がTregホメオスタシスに与える影響は、併用される免疫抑制剤により多様であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We performed allogeneic bone marrow transplantation from B6 donor into B6D2F1 recipient, and thereafter, we administrated immune suppressive agents including CsA, sirolimus and MMF. We found that CsA interfered Treg recovery while sirolimus and MMF promote Treg recovery. Moreover, we observed that low-dose IL-2 therapy and sirolimus synergistically increased Treg population. Our findings suggest that the impact of LD-IL2 on Treg homeostasis after allogeneic SCT is mostly dependent on the kind of concomitant immune suppressive agents.

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞移植 制御性T細胞 移植片対宿主病 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

難治性血液癌に対する根治療法である同種造血幹細胞移植は、近年、支持療法の進歩やドナーソースの多様化を背景に、高齢症例や非寛解症例にも適用を拡大している。より多くの患者に治療選択肢が増える一方で、移植片対宿主病 (GVHD) のリスクの高い移植は益々増加しており、GVHD を必要十分に管理しつつ、移植片対白血病効果 (GVL effect) を最大化する免疫制御が求められる。この観点において、マウス骨髄移植モデルにて GVHD を抑制しながらも GVL を減じない対象選択的な働きが報告されている制御性 T 細胞 (Regulatory T cell; Treg) の移植後再構築は、免疫合併症のない質の高い治癒を目指す上で、極めて重要なポイントである。

我々は、慢性 GVHD 患者の血液検体の解析から、移植後 Treg の恒常性異常が、慢性 GVHD を発症させる要因となっていることを明らかにした (Matsuoka et al, *JCI* 2010)。Treg は移植後のリンパ球減少環境に駆動されて旺盛な末梢分裂を示したが、この効果は同時に促進された Fas 誘導アポトーシスにより相殺され、効率的な Treg 数の回復に貢献せず、移植後 9 カ月以降に Treg 数が減少、枯渇し、慢性 GVHD の発症を認めた。この知見に基づき、Treg 恒常性の維持に不可欠な役割を担っているインターロイキン 2 (IL-2) を、ステロイド不応性慢性 GVHD 患者に連日低用量投与することで Treg を体内増幅させる臨床試験を施行したところ、半数以上の症例において臨床 GVHD の改善が認められた (Koreth, Matsuoka et al, *NEJM* 2011)。持続的に Treg が増加した機序として、IL-2 は Treg の末梢分裂を駆動するだけでなく、胸腺からの供出、抗アポトーシス活性を高めることにより、安定した Treg 恒常性を回復させていることが明らかになった (Matsuoka et al, *Science* 2013)。この一連の結果から、従来の薬物療法に不応である難治性 GVHD 症例には、Treg の恒常性を積極的に安定化させることで寛容導入を図るという治療戦略の方向性を明らかにした。

移植後 Treg の恒常性を治療標的とする低用量 IL-2 療法 (LD-IL2) は、難治性 GVHD に対する新たな治療法として確立が期待される。今後、本治療法を非常に多彩な臨床症例に広く適用するには、その作用点をより明確にすることが望ましい。とりわけ、従来からの免疫抑制剤であるカルシニューリン阻害薬との併用は実臨床上不可避であり、LD-IL2 と免疫抑制剤の相互の作用機序についての検討が必要である。現代の移植医療で中心的な役割を持つシクロスポリン (CsA) は、カルシニューリンとカルモジュリン、カルシウムイオンの相互作用を阻害することで、NFAT の活性化を

抑制し、IL-2 の転写と産生を抑制、同種抗原に反応する活性化 T 細胞を効率的に抑制する。しかし、LD-IL2 が登場してきた現在において、IL-2 産生を阻害する CsA と IL-2 を補充する LD-IL2 を併用する理論的妥当性は正確には示されていない状況にある。

CsA が臨床移植での免疫制御に不可欠な役割を果たす一方で、実験免疫学の分野では、古くから、T 細胞を抑制するはずのこの薬剤が自己免疫疾患を惹起するという逆説的な現象が知られてきた (Sakaguchi S et al, *JEM* 1988)。これは、CsA が T 細胞から産生される IL-2 を阻害することにより、この IL-2 によって維持される Treg 恒常性を破綻させることが原因であることが考えられている (Treg 疲弊)。実際、われわれは、マウス骨髄移植モデルにおいて、移植後に CsA を長期投与することが Treg 再構築を阻害し、慢性 GVHD を顕在化させることを明らかにした (Sugiyama H et al, *BBMT* 2014)。

2. 研究の目的

CsA の双局的な免疫効果を理解するため、われわれは、移植後患者の Treg 維持機構を「炎症部位」と「非炎症部位」に分ける多元的モデルを仮説として立てた。Treg は非炎症部位での定常状態において生理的な IL-2 によって維持され、Treg プールを形成し、炎症環境へ供給される。炎症部位 (GVHD 臓器及び所属リンパ節) では、活性化 T 細胞 (Tact) が大量の IL-2 を産生し、増殖する。ここで投与される CsA は、Tact からの IL-2 産生を抑制するが、これは同時に非炎症環境における少量の生理的 IL-2 産生も阻害するため、正常 Treg プールを形成するはずの非炎症環境でのホメオスタシスが破綻する。この状態に、IL-2 が少量投与されると、既に豊富な IL-2 で満たされている炎症環境への影響は限定的である一方で、生理的 IL-2 が枯渇した状態にある非炎症環境では、Treg の正常ホメオスタシスを回復させるのではないかと考えられる。

今回の研究では、本仮説の妥当性を、マウス実験から検証することを目的とする。

3. 研究の方法

CsA 投与による Treg 疲弊に由来する慢性 GVHD をモデル化するマウス実験系を確立し、LD-IL2 の併用により、炎症部位の活性化 T 細胞に影響を与えることなく、非炎症部位の正常 Treg ホメオスタシスを回復させる免疫戦略の有効性を明らかにする。CsA に加え、シロリムスと MMF についても、Treg ホメオスタシスに与える影響を検討する。

4. 研究成果

シクロスポリンによる移植後 Treg の疲弊を再現するマウス実験モデルの作成を行った。B6 ドナーより致死放射線を与えた B6D2F1 マウスに骨髄移植を施行し、まず Treg のキメリズム解析を行ったところ、移植後 3 週目までは、移植片に含まれる成熟した Treg の分裂により Treg 分画が維持されることが分かった。この分画がどのように免疫抑制剤による影響を受けるかを検証するために、移植後より、シクロスポリンを含む複数の免疫抑制剤を投与し、Treg 動態を検証した。その結果、シクロスポリン群では、活性化 T 細胞はよく抑制されるものの、Treg も強く抑制がかかり、CD4T 細胞中の割合は大きく低下していた。この変化はほかの免疫抑制剤では観察されなかった。一方、シロリムスと MMF では移植後早期の Treg 分画を増加させる作用があることが示唆された。この系に、LD-IL2 を加えたところ、MMF 群では活性化 T 細胞の増加がみられたが、シロリムス群では活性化 T 細胞の増加はみられず、Treg 分画のさらなる増加が確認され、シロリムスと IL-2 によるシナジー効果が示唆される結果となった。

さらに、移植後シクロフォスファミド療法 (PT-Cy) が、各種免疫抑制剤使用下の Treg 動態に及ぼす影響についても検証したところ、シクロスポリン群では PT-Cy 後の Treg 数低下は見られなかったが、シロリムス群では PT-Cy 後に Treg の低下が顕著であった。これらより、LD-IL2 や PT-Cy といった免疫修飾療法が Treg ホメオスタシスに与える影響は、その使用中の免疫抑制剤により多様であることが示唆された。

これらより、LD-IL2 や PT-Cy といった免疫修飾療法が Treg ホメオスタシスに与える影響は、その使用中の免疫抑制剤により多様であることが示された。今回の研究で得られた基礎的知見は、移植後患者に対する免疫介入を検討する上で重要な情報となる。臨床的観点から、個々の患者の病態に応じて GVHD と GVL をバランスよくコントロールする免疫制御技術の確立を急ぎたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

Efficacy and safety of switching to nilotinib in patients with CML-CP in major molecular response to imatinib: results of a multicenter phase II trial (NILSw trial).

Ishikawa J, Matsumura I, Kawaguchi T, Kuroda J, Nakamae H, Miyamoto T, Matsuoka KI, Shibayama H, Hino M, Hirase C, Kamimura T, Shimose T, Akashi K, Kanakura Y.

Int J Hematol. 2018 May;107(5):535-540. 査読有

Progressive multifocal leukoencephalopathy after T-cell replete HLA-haploidentical transplantation with post-transplantation cyclophosphamide graft-versus-host disease prophylaxis. Ikegawa S, Fujii N, Tadokoro K, Sato K, Iwamoto M, Matsuda M, Inomata T, Sugiura H, Asano T, Yoshida S, Nishimori H, Matsuoka KI, Maeda Y.

Transpl Infect Dis. 2018 Apr;20(2):e12850. 査読有

Mild renal dysfunction defined by creatinine clearance rate has limited impact on clinical outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Ikegawa S, Matsuoka KI, Inomata T, Ikeda N, Sugiura H, Kuroi T, Asano T, Yoshida S, Nishimori H, Fujii N, Kondo E, Maeda Y, Tanimoto M.

Int J Hematol. 2018 May;107(5):568-577 査読有

Low-dose interleukin-2 as a modulator of Treg homeostasis after HSCT: current understanding and future perspectives.

Matsuoka KI.

Int J Hematol. 2018 Feb;107(2):130-137. 査読有

Prognostic Impact of Donor Source on Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcomes in Adults with Chronic Myelomonocytic Leukemia: A Nationwide Retrospective Analysis in Japan.

Itonaga H, Aoki K, Aoki J, Ishikawa T, Ishiyama K, Uchida N, Sakura T, Ohashi K, Kurokawa M, Ozawa Y, Matsuoka KI, Nakamura Y, Kimura F, Iwato K, Nawa Y, Hirokawa M, Kato K, Ichinohe T, Atsuta Y, Miyazaki Y. Biol Blood Marrow Transplant. 2018 Apr;24(4):840-848. 査読有

Impact of a Low CD34+ Cell Dose on Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation.

Yamamoto C, Ogawa H, Fukuda T, Igarashi A, Okumura H, Uchida N, Hidaka M, Nakamae H, Matsuoka KI, Eto T, Ichinohe T, Atsuta Y, Kanda Y.

Biol Blood Marrow Transplant. 2018 Apr;24(4):708-716. 査読有

PD-1 modulates regulatory T-cell homeostasis during low-dose interleukin-2 therapy.

Asano T, Meguri Y, Yoshioka T, Kishi Y, Iwamoto M, Nakamura M, Sando Y, Yagita H, Koreth J, Kim HT, Alyea EP, Armand P, Cutler CS, Ho VT, Antin JH, Soiffer RJ, Maeda Y, Tanimoto M, Ritz J, Matsuoka KI. Blood. 2017 Apr 13;129(15):2186-2197. 査読有

Graft-versus-leukemia effect with a WT1-specific T-cell response induced by azacitidine and donor lymphocyte infusions after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Ishikawa T, Fujii N, Imada M, Aoe M, Meguri Y, Inomata T, Nakashima H, Fujii K, Yoshida S, Nishimori H, Matsuoka KI, Kondo E, Maeda Y, Tanimoto M. Cytotherapy. 2017 Apr;19(4):514-520. 査読有

Phase I/IIa Study of Low Dose Subcutaneous Interleukin-2 (IL-2) for Treatment of Refractory Chronic Graft Versus Host Disease.

Asano T, Matsuoka KI, Iyama S, Ohashi K, Inamoto Y, Ohwada C, Murata M, Satake A, Yoshida C, Nakase K, Mori Y, Tanimoto M. Acta Med Okayama. 2016 Oct;70(5):429-433. 査読有

Pretransplantation Anti-CCR4 Antibody Mogamulizumab Against Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma Is Associated With Significantly Increased Risks of Severe and Corticosteroid-Refractory Graft-Versus-Host Disease, Nonrelapse Mortality, and Overall Mortality.

Fuji S, Inoue Y, Utsunomiya A, Moriuchi Y, Uchimarui K, Choi I, Otsuka E, Henzan H, Kato K, Tomoyose T, Yamamoto H, Kurosawa S, Matsuoka K, Yamaguchi T, Fukuda T. J Clin Oncol. 2016 Oct 1;34(28):3426-33. 査読有

11. Treatment of thrombotic microangiopathy after hematopoietic stem cell transplantation with recombinant human soluble thrombomodulin.

Fujiwara H, Maeda Y, Sando Y, Nakamura M, Tani K, Ishikawa T, Nishimori H, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, Tanimoto M. Transfusion. 2016 Apr;56(4):886-92. 査読有

12. Vigorous inflammatory responses in noninfectious pulmonary complication

induced by donor lymphocyte infusion. Nishie M, Fujii N, Mimura Y, Asano T, Mimura-Kimura Y, Aoe K, Aoe M, Nakashima H, Fujiwara H, Nishimori H, Matsuoka K, Kondo E, Maeda Y, Tanimoto M. Transfusion. 2016 Jan;56(1):231-6. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

Low-Dose IL-2 Can Intensify Graft-versus-Leukemia Effect without Worsening GVHD Through Sequential Enhancement of Effector T Cell and CD62L+ Regulatory T Cell Subset

Yusuke Meguri, Ken-ichi Matsuoka, Shuntaro Ikegawa, Hiroyuki Sugiura, Yasuhisa Sando, Makoto Nakamura, Miki Iwamoto, Takanori Yoshioka Takeru Asano and Yoshinobu Maeda

第59回 米国血液学会総会, 2017/12/6 米国アトランタ

Liposomal Alpha-Galactosylceramide Ameliorates GVHD with Remaining Intensified GVL Gained by Dose-Reduction of Posttransplant Cyclophosphamide after Haploidentical BMT

Makoto Nakamura, Ken-ichi Matsuoka, Yusuke Meguri, Shuntaro Ikegawa, Hiroyuki Sugiura, Yasuhisa Sando, Miki Iwamoto, Takeru Asano, Yasuyuki Ishii and Yoshinobu Maeda

第59回 米国血液学会総会, 2017/12/6 米国アトランタ

Loss of the GVL effect by Distinct Expression of Migration Markers as a Mechanism of Immune Escape in Adult T Cell Leukemia/Lymphoma (ATLL), a Malignant Counterpart of Regulatory T Cells

Yasuhisa Sando, Ken-ichi Matsuoka, Yusuke Meguri, Shuntaro Ikegawa, Hiroyuki Sugiura, Makoto Nakamura, Miki Iwamoto, Takeru Asano, Takanori Yoshioka and Yoshinobu Maeda

第59回 米国血液学会総会, 2017/12/6 米国アトランタ

Essential Role of Regulatory T Cells on Early B Cell Reconstitution after Haploidentical BMT with Posttransplant Cyclophosphamide

Miki Iwamoto, Ken-ichi Matsuoka Yusuke Meguri, Takeru Asano, 杉浦、池川、Makoto Nakamura, Yasuhisa Sando, Yoshinobu Maeda

第59回 米国血液学会総会, 2017/12/6 米国アトランタ

Impact of Incomplete Blood Count

Recovery Prior to Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation on Engraftment and Early Infection in Patients with Acute Myeloid Leukemia
Takeru Asano, Shuntaro Ikegawa, Tomoko Inomata, Naoto Ikeda, Hiroyuki Sugiura, Taiga Kuroi, Shohei Yoshida, Hisakazu Nishimori, Ken-ichi Matsuoka, Nobuharu Fujii, Eisei Kondo, Yoshinobu Maeda, Mitsune Tanimoto
第 58 回 米国血液学会総会, 2016/12/6 米国サンディエゴ

Takeru Asano, Yuriko Kishi, Yusuke Meguri, Takanori Yoshioka, Miki Iwamoto, Yoshinobu Maeda, Hideo Yagita, Mitsune Tanimoto, John Koreth, Jerome Ritz, Ken-ichi Matsuoka
PD-1 signaling has a critical role in maintaining Regulatory T Cell Homeostasis; Implication for Treg depletion therapy by PD-1 Blockade
第 57 回 米国血液学会総会, 2015/12/5 Orland

Takanori Yoshioka, Yusuke Meguri, Takeru Asano, Yuriko Kishi, Miki Iwamoto, Yoshinobu Maeda, Mitsune Tanimoto, Ken-ichi Matsuoka
Acute Gvhd Induce the Critical Depletion of Naïve Pool in Regulatory T Cells: Implication for Linked Pathogenesis into Chronic Gvhd
第 57 回 米国血液学会総会, 2015/12/5 Orland

Yuriko Kishi, Yusuke Meguri, Miki Iwamoto, Takeru Asano, Takanori Yoshioka, Yoshinobu Maeda, Mitsune Tanimoto, John Koreth, Jerome Ritz, Ken-ichi Matsuoka
Interval of IL-2 Administration Has a Major Impact on Treatment Efficacy for Regulatory T Cell Expansion and Homeostasis
第 57 回 米国血液学会総会, 2015/12/5 Orland

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 光音 (Mitsune, Tanimoto)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・特命教授
研究者番号 : 10240805

(2) 研究分担者

松岡 賢市 (Ken-ichi, Matsuoka)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号 : 90432640