

令和元年6月18日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09880

研究課題名(和文) 顆粒球単球コロニー刺激因子の免疫抑制作用を利用した慢性GVHD制御法の開発

研究課題名(英文) Development of treatment for chronic GVHD using the immunosuppressive action of the granulocyte-macrophage colony stimulating factor

研究代表者

佐竹 敦志 (SATAKE, Atsushi)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50412028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病(graft-versus-host disease; GVHD)は、移植の成否を左右する重要な合併症である。特に慢性GVHDは、第一選択薬であるステロイドに抵抗性を示す場合、有効な二次治療は未だ確立されておらず、新たな治療法の確立が期待されている。制御性T細胞(regulatory T cell; Treg)は免疫寛容の維持に働き、GVHDに代表される同種免疫応答に対しても抑制的に働く細胞である。本研究ではGM-CSF投与によって増加したCD4+CD8-DCがTregの選択的誘導に関わり、Tregに依存して慢性GVHDを抑制できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tregの維持・増殖には、IL-2シグナルと樹状細胞(Dendritic cell; DC)のT細胞受容体(T cell receptor; TCR)刺激や副刺激因子からのシグナルが重要な役割を果たす。GM-CSFは同種造血幹細胞移植後のDCサブセットの比率に変化をもたらす、Treg増幅を導くことで慢性GVHDを抑制しうることが明らかになった。ステロイドに抵抗性を示す場合、有効な二次治療が未だ確立されていない慢性GVHDの治療において、GM-CSFを用いた生体内Treg増殖療法は、慢性GVHDの新たな治療選択肢として応用できる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Tregs) attenuate excessive immune responses, making their expansion beneficial in immune-mediated diseases, including graft-versus-host disease (GVHD). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) increases DC number and may promote DC-dependent Treg proliferation. We demonstrate that GM-CSF treatment increases CD4+CD8-DCs, which is associated with Treg expansion. In a mouse chronic GVHD (cGVHD) model, GM-CSF therapy expanded Tregs, protected against the development of skin GVHD, and regulated both T helper (Th)1 and Th17 responses in the peripheral lymph nodes, resulting in an attenuation of skin cGVHD. These data suggest that GM-CSF induces Treg proliferation by expanding CD4+CD8-DCs which in turn regulates alloimmune responses in a cGVHD mouse model. Thus, GM-CSF could be used as a therapeutic DC modulator to induce Treg expansion and inhibit excessive alloimmune responses in immune-related disease.

研究分野：血液内科学

キーワード：GVHD 制御性T細胞 GM-CSF 樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、支持療法の進歩や移植細胞ソースの多様化によって同種造血幹細胞移植件数は増加している。晩期合併症である慢性 GVHD は、重症化すると致死率が 80%に達する重大合併症であり、その制御は着実に増加する長期生存者の管理において最も重要である。慢性 GVHD の発症メカニズムは完全に解明されていないが、自己免疫疾患様の多彩な症状を呈し初期治療としてはステロイド投与が行われる。しかし、ステロイド長期投与による副作用や、ステロイド抵抗性慢性 GVHD に対する確立した治療がないことが臨床上の問題であり、新たな効果的治療法の開発が必要である。

Treg は慢性 GVHD に対する抑制効果をもつことが明らかにされており (Zhao D et al. Blood 2008)、生体内での Treg 選択的増幅により GVHD を制御できると考えられる。これまでに申請者はカルシニューリン阻害薬と IL-2 の併用は Treg の選択的増幅を導き、自己免疫疾患モデルに対して疾患抑制的に働く (Satake et al J Autoimmun 2013) が、GVHD モデルでは抑制効果が得られないことを明らかにした (Satake et al. PLoS One 2014)。一方、IL-2 単独投与では GVHD 抑制効果が得られたことから、Treg 増加による GVHD 抑制には、IL-2 の他にカルシニューリンを含むシグナル伝達経路の活性化が重要であると考えられる。T 細胞のシグナル伝達開始には抗原提示細胞からの受容体刺激が必要であるため、抗原提示細胞は Treg による GVHD 抑制に重要であると考えられる。特に抗原提示細胞の中でも、顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)によって増加する CD8 $\alpha$  DC は Treg を効率的に増殖させ、自己免疫疾患を抑制することが示されている。このことから、GM-CSF 投与は慢性 GVHD にも抑制的に働くことが期待できるが、同種造血幹細胞移植後に Treg を中心とした免疫機構に対する GM-CSF の働きは明らかになっていない。そこで今回 GM-CSF が移植後免疫機構に及ぼす影響を解明して、GM-CSF を利用した新たな慢性 GVHD 制御法を開発するために本研究計画を着想した。

### 2. 研究の目的

申請者は生体内で制御性 T 細胞(Treg)の増幅により移植片対宿主病(GVHD)抑制効果を得るには、カルシニューリン活性化が不可欠であることを明らかにしている。カルシニューリンは T 細胞シグナル経路下流に位置するため、Treg による GVHD 制御には抗原提示細胞が重要であると考えられる。特に顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)で誘導される樹状細胞(DC)は Treg を効率的に増幅させるため、GM-CSF は GVHD 抑制的に働くことが期待されるが、慢性 GVHD への効果については明らかになっていない。本研究では同種造血幹細胞移植後の重大合併症である慢性 GVHD に対する、GM-CSF を用いた新規治療法開発を目指すことを目的とした。本研究によって GM-CSF による慢性 GVHD 抑制作用とそのメカニズムが明らかになると考えられ、新たに慢性 GVHD 治療への臨床応用が期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) GM-CSFIC が慢性 GVHD に及ぼす効果の解明

##### a. 造血幹細胞移植後マウスにおいて GM-CSFIC が DC や Treg に及ぼす効果を解明。

GM-CSF の効果を短期間投与で効率よく引き出すために、申請者らが見出した GM-CSF 免疫複合体(IC)を用いた。移植を行っていない野生型マウス(B6)に対して GM-CSFIC を腹腔内投与した場合、GM-CSF そのものの投与と比較して CD4+CD8 $\alpha$  DC の比率を増加させ、有意に Treg が増加することが判明した。よって、本研究では *in vivo* の実験では GM-CSFIC を用いて研究を行った。

慢性 GVHD モデル (B10.D2 BALB/c) を用いて、1) PBS 投与群、2) GM-CSFIC 投与群に分け、移植後 17 日目から 3 日間投与を行い、慢性 GVHD の重症度を皮膚 GVHD スコアを用いて評価した。

1) syngeneic 移植 (BALB/c BALB/c) 群、2) PBS 投与群、3) GM-CSFIC 投与群マウスで脾臓やリンパ節での DC サブセット、絶対数、Treg 比率や Treg に特徴的な表面抗原 (CD25, GITR, CTLA-4, CD122, OX-40 等) を解析し、比較検討を行った。

##### b. 免疫機能や病理組織学的解析による慢性 GVHD 抑制効果の検討。

1) Syngeneic 移植、2) PBS 投与群、3) GM-CSFIC 投与群のマウスで移植後 3 週間後に脾臓やリンパ節から単核球を単離し、*in vitro* で刺激を加え、慢性 GVHD に関わる炎症性サイトカイン (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-4, IL-10) 産生 T 細胞比率をフローサイトメトリーで解析した。また、T 細胞と DC から RNA 抽出し qPCR によって他のサイトカイン測定 (IL-10, IL-2, CCL22) を行った。更に、皮膚、肺、唾液腺、肝臓、消化管等の病理組織学的検討を行い慢性 GVHD 抑制効果の病理学的評価を行った。

#### (2) GM-CSFIC による慢性 GVHD 抑制効果の Treg 依存性を検討

GM-CSFIC による慢性 GVHD 抑制効果が Treg に依存したものか、あるいは他の細胞や GM-CSF そのものなど Treg 非依存性の効果であるかを検討するため、B10.D2<sup>Foxp-GFP</sup> マウスから細胞分取器を利用して、Treg を含まない CD4<sup>+</sup>T 細胞(Tconv)と Treg を同時に採取する。Tconv のみを用いて

慢性 GVHD を誘導したマウスと Tconv に Treg を加えた CD4<sup>+</sup>T 細胞により慢性 GVHD を誘導したマウスでそれぞれ、GM-CSF IC 投与を行ってその抑制効果を非投与群と比較検討した。

### (3) Treg の機能解析

GM-CSF IC により導かれた慢性 GVHD 抑制作用は、Treg 比率の増加に起因するものか、あるいは免疫抑制機能が向上した結果によるものかを検討するため、Treg の機能を比較検討した。この実験では、移植後に Treg だけを高純度で採取し解析を行うために、Foxp3-GFP 遺伝子導入マウスと B10.D2 マウスを交配し、B10.D2<sup>Foxp3-GFP</sup> マウスを作成しドナーとして使用した。移植後に GM-CSF IC 投与したマウスと PBS 投与したマウスのそれぞれの脾細胞から細胞分取器で Treg(GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)を採取し、in vitro での免疫抑制機能解析を行った。

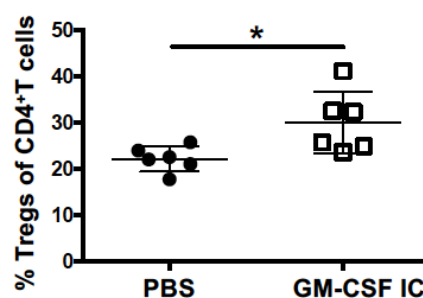
### (4) GM-CSF の治療薬としての効果を検討

慢性 GVHD が発症後であっても Treg の増幅や治療効果が得られるかどうかを明らかにするために、GVHD 増悪後の移植後 4 週目に GM-CSF IC を 3 日間投与し、その臨床効果を比較検討すると共に、脾臓やリンパ節での Treg 比率や絶対数の解析を行った。

## 4. 研究成果

GM-CSF 投与は同種造血幹細胞移植後に CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>DC 比率の増加を誘導し、Treg の増殖 (図 1) を誘導することで IL-17 産生 T 細胞を減少させ慢性 GVHD 抑制効果を発揮していることが示唆された。この効果は Treg に依存したものであることが明らかとなり、更に Treg の免疫抑制機能が高まったために得られた結果ではなく、Treg 比率の増加によるところが大きいことが分かった。上記の効果は GM-CSF を投与した場合だけでなく、慢性 GVHD 発症後に投与を行った場合も、皮膚 GVHD の増悪抑制効果が得られることがわかった。

図 1 末梢リンパ節での Treg 比率



## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

GM-CSF therapy inhibits chronic graft-versus-host disease via expansion of regulatory T cells  
Hotta Masaaki, Yoshimura Hideaki, **Satake Atsushi**, Tsubokura Yukie, Ito Tomoki, Nomura Shosaku M.H, H.Y., and A.S contributed equally to this work.  
*European Journal of Immunology* 49;179-191 (2019) 査読有り

### 〔学会発表〕(計 4 件)

GM-CSF THERAPY INHIBITS CHRONIC GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE VIA EXPANSION OF REGULATORY T CELLS

Masaaki Hotta, Hideaki Hotta, **Atsushi Satake**, Yukie Tsubokura, Tomoki Ito, Shosaku Nomura  
45th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (2019)

GM-CSF による制御性 T 細胞増殖を介した慢性 GVHD の制御

堀田 雅章、吉村 英晃、**佐竹 敦志**、野村 昌作  
第 27 回日本サイトメトリー学会学術集会 (2017)

GM-CSF による制御性 T 細胞増殖を介した慢性 GVHD の制御

堀田 雅章、吉村 英晃、**佐竹 敦志**、野村 昌作  
第 39 回日本造血細胞移植学会総会 (2017)

GM-CSF Therapy Expands Regulatory T Cells and Protects Against Chronic Graft Versus Host Disease

Hideaki Yoshimura, **Atsushi Satake**, Masaaki Hotta, Shosaku Nomura

58th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition (2016)

### 〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://research.kmu.ac.jp/kmuhp/GsApp>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
該当なし

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：堀田 雅章  
ローマ字氏名：HOTTA Masaaki

研究協力者氏名：吉村 英晃  
ローマ字氏名：YOSHIMURA Hideaki

研究協力者氏名：上林 拓  
ローマ字氏名：KAMBAYASHI Taku

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。