

令和元年8月31日現在

機関番号：11501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06537

研究課題名(和文) Novel mechanisms of graft-versus-host disease (GVHD) and graft-versus-tumor (GVT) effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT)

研究課題名(英文) Novel mechanisms of graft-versus-host disease (GVHD) and graft-versus-tumor (GVT) effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT)

研究代表者

東梅 友美 (TOBAI, TOMOMI)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：40802111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：NOD-like receptor family pyrin domain containing 6 (NLRP6)は主に消化管上皮等に発現し、腸内細菌叢や恒常性維持に重要な役割を果たしている。我々はNLRP6がT細胞に発現し、活性化すると発現が増強することを発見した。また、メカニズム解析では活性化T細胞における負の制御機構となる可能性を明らかにした。マウス骨髄移植モデルでは、NLRP6 KOマウス由来T細胞を輸注した場合、野生型群に比較して有意に生存率の低下と移植片対宿主病の悪化を認めた。以上の結果はT細胞におけるNLRP6の機能はGVHD制御機構において重要な役割を持つことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、炎症反応においてNLRP6がインフラマゾーム依存性メカニズムを持つだけでなく、非依存性メカニズムを持っていることを明らかにしたことにより、NLRP6が種々の免疫反応において多種多様な機能を持つことを明確に示すことができた。NLRP6の免疫細胞における機能解析を進展させる事で、敗血症などの炎症性疾患のみならず移植片対宿主病や自己免疫疾患、さらには悪性腫瘍内の微小環境下における免疫抑制機構の解明にも貢献すると考えられる。NLRP6の制御機構を明らかにする事で、将来的な免疫チェックポイントや免疫抑制剤の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：NOD-like receptor family pyrin domain containing 6 (NLRP6) plays an important role in regulating gut microbiota and homeostasis. However, whether NLRP6 regulates T cell functions remains unknown. We found that naive T cells express NLRP6 but the absence of NLRP6 did not affect the numbers and the subpopulation of T cells, such as regulatory T cells. The expression of NLRP6 in T cells was dramatically increased following stimulation with anti-CD3/CD28 antibodies. NLRP6 deficient T cells exhibited significantly greater proliferation after non-specific T cell receptor stimulation as well as mixed lymphocyte reaction (MLR). We also demonstrated that the absence of NLRP6 on donor T cells exacerbated graft-versus-host disease (GVHD) in multiple irradiated and non-irradiated BMT models. We suggest that NLRP6 is a potentially novel negative regulator of T cell responses, and maybe a useful target to mitigate GVHD.

研究分野：造血幹細胞移植、血液内科学

キーワード：移植片対宿主病 NLRP6 T細胞 同種移植

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

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植療法は急性白血病などの血液悪性腫瘍をはじめ、種々の血液・免疫疾患の根治療法として本邦では2018年現在、年間3500例余の件数が施行されている。本療法ではドナーのT細胞等がレシピエントの残存腫瘍細胞を攻撃し死滅させる graft-versus-tumor (GVT) 効果が期待できる一方、重篤な合併症の一つである急性移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) を発症することも多い。一般的に急性GVHD予防として、免疫抑制剤(カルシニューリンインヒビターなど)投与が行われるが、30-80%の患者に本合併症が発症することから、急性GVHDの新規予防及び治療法の開発が不可欠である。

急性GVHDの発症機序として、1)前処置による組織障害及び炎症性サイトカインの放出によるドナー及びレシピエント由来抗原提示細胞の活性化^{1,2}、2)活性化抗原提示細胞によりドナーT細胞が刺激され増殖を繰り返し、エフェクターT細胞へと分化^{3,4}、3)エフェクターT細胞のGVHD標的臓器への浸潤と組織破壊が知られている。従って、前処置に伴う組織障害保護と炎症抑制、活性化抗原提示細胞やドナーT細胞の効果的な制御誘導法の開発が急性GVHD予防及び治療において極めて重要である。

インフラマソームの一種であるNOD-like receptor family pyrin domain containing 6 (NLRP6)は主に消化管上皮等に発現しており⁵、正常腸内細菌叢⁶や恒常性維持⁷等に重要な役割を果たしているが、我々は腸管上皮におけるNLRP6の発現が腸内細菌叢・インフラマソーム非依存的に急性GVHDを増悪させることを発見した⁸。しかし、T細胞におけるNLRP6の機能については知られていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1)活性化T細胞におけるNLRP6の免疫学的機能、2)NLRP6のドナーT細胞発現と急性GVHD発症に関する病態生理学的検討である。

3. 研究の方法

(1)活性化T細胞におけるNLRP6の発現は、野生型(WT)マウスの脾臓由来T細胞をmagnetic activated cell sorting (MACS)にて分離後、*in vitro*にて抗CD3・CD28抗体を用いてT cell receptor (TCR)を非特異的に刺激し、継時的に回収したT細胞のメッセンジャーRNAを測定して行った。

(2)NLRP6のT細胞分化及び活性化に与える影響は、NLRP6欠損(KO)とWTマウスの脾臓由来T細胞の亜分画や活性化マーカーの発現をFluorescence-activated cell sorting (FACS)にて検討した。また、抗CD3・CD28抗体によるT cell receptor (TCR)非特異的刺激とBALB/cマウス由来照射脾臓細胞及び骨髓細胞由来樹状細胞との混合リンパ球培養反応(mixed lymphocyte reaction)を³H-thymidine取り込み試験及びcarboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)染色を用いて行なった。

(3)NLRP6発現T細胞のGVHDに与える影響については、一般的に汎用されている主要組織適合抗原不一致同種骨髓移植マウスモデルのB6(H2^b) BALB/c(H2^d)系を用いて生存率及びGVHD重症度を比較検討した。

4. 研究成果

(1)活性化T細胞におけるNLRP6の発現: WTマウス由来T細胞を抗CD3・CD28抗体を用いて刺激したところ、刺激後3-6時間後に発現の上昇を認め、24時間後には定常状態に回復した。

(2)NLRP6発現のT細胞亜分画及び非刺激時の活性化マーカーに与える影響:NLRP6KOとWTマウスから脾臓を抽出し、naïve (CD44-CD62L⁺)、effector (CD44+CD62L⁻)、central memory (CD44+CD62L⁺)、regulatory T cell (CD4+CD25+Foxp3⁺)の亜分画をFACSにて検討したが明らかな有意差は認めなかった。また、CD69やCD25などの活性化マーカー及びPD-1などの疲弊マーカーも検討したが明らかな有意差は認められなかった。

(3)非特異的TCR刺激: NLRP6KOとWTマウスの脾臓からMACSでT細胞を分離し、抗CD3抗体(2µg/ml)と抗CD28抗体(2µg/ml)の刺激を加えたところ、刺激48時間及び72時間後の³H-thymidine取り込み試験において、NLRP6KO T細胞にて有意な増殖を認めた。同様にCFSE法にてCFSE陰性増殖細胞を検討したところ、刺激48時間及び72時間後ではNLRP6KO T細胞で有意な増加を認めた。

(4)混合リンパ球培養(MLR): 共同研究先であるミシガン大学で行われたNLRP6KOとWTマウスの脾臓からMACSでT細胞を分離し、これを反応細胞として、照射されたBALB/c由来骨髓細胞誘導樹状細胞(30Gy)を刺激細胞として、96wellにて72-120時間の共培養を実施したところ、

NLRP6 T 細胞では ^3H -thymidine 取り込み試験にて有意な増殖を認めた。同様に NLRP6 KO と WT マウスの脾臓から MACS で T 細胞を分離し、これを反応細胞として、照射された BALB/c 由来秘蔵細胞 (30Gy) を刺激細胞として、96 well にて 72-120 時間の共培養を実施したところ、CFSE にて CFSE 陰性増殖細胞を検討したところ、 ^3H -thymidine 取り込み試験同様に NLRP6 KO T 細胞で有意な増殖を認めた。

(5) マウス GVHD モデル: レシピエントとして BALB/c マウスを用い、移植前日に前処置として 8 Gy の照射を施行後、移植当日 (day 0) に同系コントロールとして BALB/c マウスの骨髄細胞 (5×10^6) 及び脾臓由来 T 細胞 (1×10^6) を、同種移植として WT 由来の骨髄細胞 (5×10^6) 及び WT または NLRP6 KO マウスの脾臓由来 T 細胞 (1×10^6) を尾静脈から輸注し生存率及び GVHD 重症度を観察した。NLRP6 KO マウス由来 T 細胞輸注群では WT T 細胞を輸注群に比較して、有意に生存率の低下を認め、GVHD 臨床スコアでも有意に悪化していた。同様に、共同研究先であるミシガン大学 Dr. Reddy 研究室で行なった移植実験でも同様な結果を得ることができた。このことは、異なった飼育環境下でも同様な結果が得られていることから、NLRP6 発現 T 細胞は腸内細菌非依存的にドナー T 細胞の活性化を制御していることが明らかにされた。

< 引用文献 >

1. Reddy, P. *et al.* A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med* **11**, 1244-1249 (2005).
2. Toubai, T. *et al.* Siglec-G-CD24 axis controls the severity of graft-versus-host disease in mice. *Blood* **123**, 3512-3523 (2014).
3. Toubai, T. *et al.* Induction of acute GVHD by sex-mismatched H-Y antigens in the absence of functional radiosensitive host hematopoietic-derived antigen-presenting cells. *Blood* **119**, 3844-3853 (2012).
4. Toubai, T. *et al.* Ikaros-Notch axis in host hematopoietic cells regulates experimental graft-versus-host disease. *Blood* **118**, 192-204 (2011).
5. Levy, M. *et al.* Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* **163**, 1428-1443 (2015).
6. Elinav, E. *et al.* NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* **145**, 745-757 (2011).
7. Wlodarska, M. *et al.* NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell* **156**, 1045-1059 (2014).
8. Toubai, T. *et al.* Host NLRP6 exacerbates graft-versus-host disease independent of gut microbial composition. *Nat Microbiol* **4**: 800-812 (2019)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Toubai T, Fujiwara H, Rossi C, Riwes M, Tamaki H, Zajac C, Liu C, Mathew AV, Byun J, Oravec-Wilson K, Matsuda I, Sun Y, Peltier D, Wu J, Chen J, Seregin S, Henig I, Kim S, Brabbs S, Pennathur S, Chen G, Reddy P. Host NLRP6 exacerbates graft-versus-host disease independent of gut microbial composition. *Nat Microbiol* **4**: 800-812, 2019. 査読有, DOI: 10.1038/s41564-019-0373-1.
2. Toubai T, Tamaki H, Peltier DC, Rossi C, Oravec-Wilson K, Liu C, Zajac C, Wu J, Sun Y, Fujiwara H, Henig I, Kim S, Lombard DB, Reddy P. Mitochondrial Deacetylase SIRT3 Plays an Important Role in Donor T Cell Responses after Experimental Allogeneic Hematopoietic Transplantation. *J Immunol* **201**: 3443-3445, 2018. 査読有, DOI: 10.4049/jimmunol.1800148.
3. Fujiwara H, Docampo MD, Riwes M, Peltier D, Toubai T, Henig I, Wu SJ, Kim S, Taylor A, Brabbs S, Liu C, Zajac C, Oravec-Wilson K, Sun Y, Núñez G, Levine JE, van den Brink MRM, Ferrara JLM, Reddy P. Microbial metabolite sensor GPR43 controls severity of experimental GVHD. *Nat Commun* **9**: 3674, 2018. 査読有, DOI: 10.1038/s41467-018-06048-w.
4. Toubai T, Rossi C, Tawara I, Liu C, Zajac C, Oravec-Wilson K, Peltier D, Sun Y, Fujiwara H, Wu SR, Riwes M, Henig I, Kim S, Reddy P. Murine Models of Steroid Refractory Graft-versus-Host Disease. *Sci Rep* **8**: 12475, 2018. 査読有, DOI: 10.1038/s41598-018-30814-x.
5. 東梅友美: I. 移植片対宿主病 (GVHD) の病態解明 3) 移植片対宿主病 (GVHD) におけるバイオマーカー. *血液フロンティア* **28**: 39-48, 2018. 査読無

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Toubai T, Suto M, Eri M, Sekiguchi E, Ishizawa K. Murine Steroid Refractory GVHD model. The 10th JSH International Symposium 2019 in Ise-Shima. 2019.5.17-18, Toba, Japan.
2. Toubai T, Rossi C, Tawara I, Liu C, Zajac C, Oravec-Wilson K, Peltier D, Sun Y, Fujiwara H, Wu SR, Riwes M, Henig I, Kim S, Suto M, Ishizawa K, Reddy P. Donor T Cell Independent Mechanism Is Critical for Mediating Steroid Refractory Gvhd in Murine Models. The 45th Annual Meeting of the European Society of Blood and Marrow Transplantation, 2019. 3.24-27, Frankfurt, Germany.
3. Suto M, Eri M, Yanagiya R, Takabatake I, Kikuchi Y, Sakurai M, Kimura A, Ishizawa Y, Tawara I, Ishizawa K, Reddy P, Toubai T. Murine models of steroid refractory GVHD. 第41回日本造血細胞移植学会総会 大阪市 2019.3.7-9.
4. Toubai T, Peltier D, Tamaki H, Rossi C, Reddy P. Mitochondrial deacetylase SIRT3 regulates donor T cell activation in GVHD. 第41回日本造血細胞移植学会総会 大阪市 2019.3.7-9.
5. Toubai T, Rossi C, Tawara I, Liu C, Zajac C, Oravec-Wilson K, Peltier D, Sun Y, Fujiwara H, Wu SR, Riwes M, Henig I, Kim S, Suto M, Ishizawa K, Reddy P. Donor T cell independent mechanism may contribute to enhancing steroid refractory GVHD in murine models. 2019 Transplantation & Cellular Therapy Meetings, 2019. 2.20-24, Houston, TX, USA.
6. Toubai T, Rossi C, Tawara I, Liu C, Zajac C, Oravec-Wilson K, Peltier D, Sun Y, Fujiwara H, Riwes M, Henig I, Kim S, Suto M, Ishizawa K, Reddy P. Donor T Cell Independent Mechanism Is Critical for Mediating Steroid Refractory Gvhd in Murine Models. 60th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2018. 12. 1-4, San Diego, CA, USA.
7. Toubai T, Rossi C, Tawara I, Ishizawa K, Reddy P. Murine models of steroid refractory graft-versus-host disease. 第80回日本血液学会総会 大阪市 2018. 10.12-14.
8. Toubai T: "Update on findings from mouse models of acute GVHD pathophysiology". The International Congress of BMT 2018. Busan Korea. 2018, 8.31.
9. Toubai T, Rossi C, Tawara I, Liu C, Zajac C, Oravec-Wilson K, Peltier D, Sun Y, Fujiwara H, Wu J, Riwes M, Henig I, Kim S, Ishizawa K, Reddy P. Murine models of establishing steroid refractory GVHD. 23th Congress of the European Hematology Association (EHA). 2018. 6. 15-17, Stockholm, Sweden.
10. Toubai T, Rossi C, Oravec-Wilson K, Zajac C, Chen L, Tamaki H, Ishizawa K, Reddy P. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) are required for protecting gastrointestinal GVHD. 第40回日本造血細胞移植学会総会 札幌市 2018.2.1-3.

〔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

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：Reddy Pavan

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。