

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08321

研究課題名(和文) 移植前にGVHD関連T細胞を推定するヒト急性GVHDにおけるT細胞応答の解析

研究課題名(英文) Frequency analysis of graft-versus-host reactive T cell clones in human acute graft-versus-host disease tissues

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト急性移植片対宿主病(GVHD)の皮膚浸潤T細胞に関する種々の解析を行い、以下の結果を得た。急性GVHDが重症の場合、または治療抵抗性の場合、GVHD診断時の皮膚浸潤T細胞レパトアの偏りは、そうでない場合と比べてより強かった。治療抵抗性となった急性GVHDの皮膚浸潤T細胞の多くは、GVHD診断時の皮膚浸潤T細胞とは異なるクローンに置換されていた。患者・ドナーのペア血液を混合培養し、アロ反応性ドナーT細胞クローンを決定したが、それらは実際に発症したGVHD皮膚組織中T細胞にはほとんど含まれていなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果はヒトの急性GVHDの病態解明に寄与するとともに、急性GVHDに対する新しい予防戦略、治療戦略の開発基盤になるものと期待される。例えば、生検皮膚組織を用いて急性GVHDの病理診断を行う際、T細胞浸潤や組織破壊の程度に加えて、TCRレパトアの偏りの強さも調べることで、GVHDの重症度をより正確に判定したり、その後の治療反応性を予測したりすることができる可能性がある。このような研究成果は、移植成績の向上、難治性血液疾患患者の予後改善につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The T cell repertoire in the skin tissues with acute graft-versus-host disease (GVHD) was more skewed when acute GVHD was severe or refractory. The frequent T cell clones in the GVHD skin tissues with a treatment failure were different from those in the GVHD skin tissues at diagnosis. Mixed culture of peripheral blood mononuclear cells that were obtained from pre-transplant recipient and donor could not identify the GVHD-associated T cell clones in the GVHD skin tissues.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞移植 移植片対宿主病 T細胞 T細胞受容体

### 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) に対するステロイド一次治療の有効率はおよそ 6 割に留まる [引用文献]。そして確立された二次治療法は未だない [引用文献]。GVHD に対する新しい予防戦略、治療戦略が求められている。急性 GVHD の発症機序は、ドナー T 細胞が患者抗原提示細胞からアロ抗原刺激を受けて細胞傷害性 T 細胞となり、皮膚などの標的臓器に移動、浸潤し、組織を傷害することで発症すると理解されている。ヒトの急性 GVHD においては、このアロ反応性ドナー T 細胞が GVHD 組織浸潤 T 細胞の過半数からときに 9 割以上を占めることもある [引用文献]。しかし、そのヒト急性 GVHD 組織浸潤 T 細胞のレパトアの偏りと GVHD 重症度との関係や、レパトアが GVHD 治療によりどう変化するのかなどはほとんど明らかにされていない。

ところで、ヒト急性 GVHD 組織に浸潤するアロ抗原反応性ドナー T 細胞クローンを、GVHD 発症前に推定することができれば、例えば末梢血中の T 細胞をモニタリングするなどにより GVHD の発症を予測したり、GVHD 治療の効果を T 細胞応答の増減という別の指標で評価したりすることが可能になるかもしれない。しかし造血幹細胞移植において、アロ抗原反応性ドナー T 細胞クローンを GVHD 発症前に推定できるとの報告はまだない。

近年、次世代シーケンサー (NGS) の普及により、T 細胞受容体 (TCR) 塩基配列を網羅的に決定することが比較的容易に可能となった。腎移植領域においては、患者とドナーのリンパ球混合培養 (MLR) を行い、得られた分裂患者 T 細胞の TCR V CDR3 塩基配列を NGS で決定することで、移植腎の拒絶に関与する T 細胞クローンを移植前に推定する試みが報告されている [引用文献]。これらの手法を利用しながら、ヒト急性 GVHD 組織 (皮膚) 浸潤 T 細胞に関する以下の様々な解析を試みた。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト急性 GVHD 皮膚組織浸潤 T 細胞のレパトアの偏りと、GVHD 重症度や GVHD 治療反応性などとの関連を明らかにする。GVHD 組織浸潤 T 細胞レパトアの GVHD 治療に伴う変化を明らかにする。GVHD 組織浸潤高頻度 T 細胞クローンの移植前推定を試みる。

### 3. 研究の方法

急性 GVHD を発症した患者の末梢血や GVHD 皮膚組織、ならびにドナー末梢血などを採取し、それらに含まれる T 細胞の TCR 塩基配列を NGS により網羅的に決定した。具体的には、T 細胞または末梢血単核球 (PBMC) から RNA を抽出し、SMARTer RACE cDNA Kit (Clontech) を用いて TCR V cDNA を合成。MiSeq (illumina) を用いて deep sequence (10 万 reads/sample) を行い、得られた FASTQ 形式ファイルを IMG-T-HighV-QUEST で解析した。

患者・ドナーの末梢血を共培養して、患者抗原に反応するドナー T 細胞を同定した。具体的には、ドナー PBMC と 25Gy 照射患者 PBMC を異なる蛍光色素で標識後、IL-2 加で 7 日間共培養、分裂したドナー T 細胞分画を分離した。コントロールとして、25Gy 照射ドナー PBMC との共培養で分裂したドナー T 細胞分画も分離した。それぞれの分画に含まれる T 細胞の TCR 塩基配列を NGS により決定し、サブトラクションすることにより患者抗原反応性ドナー T 細胞クローンの TCR を決定した。

以上の T 細胞解析結果と急性 GVHD の重症度や治療反応性などの臨床結果との関連を解析した。

### 4. 研究成果

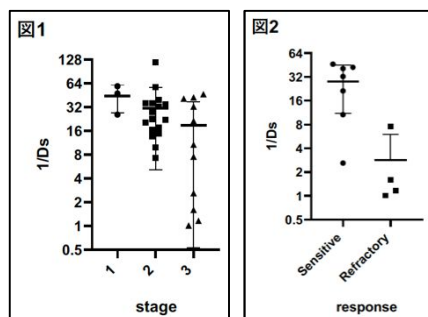
#### (1) ヒト急性 GVHD 皮膚浸潤 T 細胞レパトアの偏り

急性 GVHD を発症した患者から診断時 (治療開始前) の GVHD 皮膚生検組織 29 検体の提供を受け、それら組織に浸潤する T 細胞の TCR 塩基配列を NGS により決定した。次に、TCR レパトアの偏り (Simpson's diversity index, 1/Ds) と GVHD 重症度 (皮膚 stage) との関係解析した。皮膚 GVHD 重症度が高い程、1/Ds は低下する (TCR レパトアの偏りは強くなる) 傾向を認めた (図 1,  $P = 0.085$ )。

1/Ds と GVHD 治療反応性との関係を明らかにするため、対象を stage 2 と 3 の皮膚 GVHD に限定した場合と、stage 3 のみに限定した場合 (図 2) の 2 通りで解析した。いずれの場合も GVHD 治療が無効に終わった症例で、治療開始前の 1/Ds が有意に低値を示した ( $P = 0.028$ ;  $P = 0.019$ )。因みに、患者年齢、移植前処置強度、患者とドナーの HLA 適合度、移植細胞源の違いなどと 1/Ds との間に相関は認めなかった。

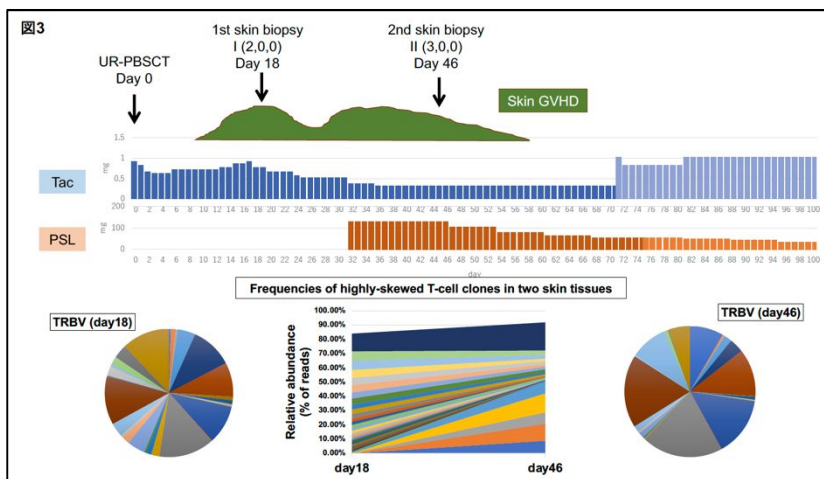
これらの結果から、皮膚生検組織を用いて急性 GVHD の病理診断を行う際、浸潤している T 細胞レパトアの偏りの強さも調べることで、GVHD の重症度をより正確に判定したり、その後の治療反応性を予測したりすることができる可能性が示唆された。

#### (2) ヒト急性 GVHD 皮膚浸潤 T 細胞レパトアの治療に伴う変化



皮膚急性GVHDを発症した患者3名から、複数回のGVHD皮膚生検組織の提供を受けた。うち1例の臨床経過とTCR解析結果を図に示す(図3)。

本患者は、非血縁ドナーから末梢血幹細胞移植を受けた後、10日目に皮疹を呈した。移植後18日目に1回目の皮膚生検を行い、急性GVHDとの病理診断を得た。タクロリムス増量および外用剤を投与することで皮疹は一旦消退傾向となったが、その後再び増悪。ステロイド全身投与を行い、2回目の皮膚生検を実施した。

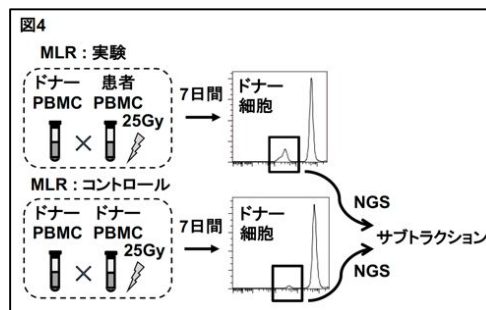


2つのGVHD皮膚生検組織に浸潤しているT細胞のTCR塩基配列をNGSにより決定し、各TRBV familyの割合を解析した。1回目の生検皮膚と2回目の生検皮膚とでTRBV familyの分布が異なることが分かった(図3、下段左右の円グラフ)。また、2回の生検皮膚のいずれかにおいて比較的高頻度(頻度1%以上)を示したTCRの頻度を確認すると、1回目のGVHD皮膚で比較的高頻度を示したT細胞クローンの多くは2回目のGVHD皮膚では頻度が低下しており、逆に2回目のGVHD皮膚で比較的高頻度を示したT細胞クローンの多くは1回目のGVHD皮膚では頻度が低かった(図3、下段中央)。他の2例の解析においてもほぼ同様の結果を得た。

これらの結果から、急性GVHD発症時の皮膚組織で優勢だったT細胞クローン(GVHD発症に関わったであろうT細胞クローン)は、その後GVHD治療が進むに従って消失していくが、今度は別のT細胞クローンが優勢となりGVHDの再燃あるいは増悪を招くのではないかと推察された。

### (3) MLRを用いた急性GVHD関連T細胞の移植前推定

移植前患者末梢血とドナー末梢血からPBMCを分離しMLRを行った(図4)。そして患者PBMCの刺激により分裂したドナーT細胞分画と、ドナーPBMCの刺激により分裂したドナーT細胞分画(コントロール)のTCR塩基配列を決定し、それらの違いに着目してアロ抗原反応性T細胞クローンを決定した。4名の患者が実際に移植後急性GVHDを発症した。その4名のMLRにおいて、それぞれ228、221、261、73種類のアロ抗原反応性ドナーT細胞が決定された。一方、発症した急性GVHD皮膚生検組織に浸潤していたT細胞のTCR塩基配列を網羅的に決定し、MLRで同定したアロ抗原反応性ドナーT細胞クローンのGVHD組織における頻度を確認した。予想に反して228、221、261、73種類のT細胞クローンの中で、GVHD組織に高頻度に浸潤しているクローンはなかった。



上記4名の患者はいずれもHLA一致ドナーから移植を受けていた。それ故、GVHD皮膚組織に浸潤していたアロ抗原反応性ドナーT細胞は、主として患者の皮膚組織で高発現しているマイナー組織適合抗原特異的だったと考えられる。しかし、MLRは患者血液細胞と共培養するため、血液細胞で高発現しているマイナー組織適合抗原特異的なドナーT細胞を分離してしまった可能性がある。そこで、患者の移植前生検皮膚組織とドナーPBMCを共培養し、その培養皮膚組織からPBMCを抽出、TCR塩基配列を決定した。するとある移植患者の急性GVHD皮膚浸潤T細胞中の高頻度クローン1位(7.1%)、2位(5.4%)、3位(4.4%)は、移植前の患者皮膚とドナーPBMCの共培養で同定されたそれぞれ頻度1位(8.2%)、5位(4.4%)、2位(7.3%)のT細胞クローンと一致していた。

以上より、移植前患者皮膚とドナーPBMCを共培養することで、移植後急性GVHD皮膚組織に高頻度に浸潤するT細胞クローン(GVHD責任T細胞クローンと考えられる)を推定できる可能性が示唆された。

### <引用文献>

Murata M, et al. Clinical factors predicting the response of acute graft-versus-host disease to corticosteroid therapy: an analysis from the GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2013;19(8):1183-9.

Murata M, et al. Low-dose thymoglobulin as second-line treatment for steroid-resistant acute GvHD: an analysis of the JSHCT. Bone Marrow Transplant. 2017;52(2):252-257.

Koyama D, Murata M, et al. Quantitative Assessment of T Cell Clonotypes in Human Acute Graft-versus-Host Disease Tissues. Biol Blood Marrow Transplant. 2019;25(3):417-423.

Morris H, et al. Tracking donor-reactive T cells: Evidence for clonal deletion in tolerant kidney transplant patients. Sci Transl Med. 2015;7(272):272ra10.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Murata M, Takenaka K, Uchida N, Ozawa Y, Ohashi K, Kim SW, Ikegame K, Kanda Y, Kobayashi H, Ishikawa J, Ago H, Hirokawa M, Fukuda T, Atsuta Y, Kondo T.	4. 巻 25
2. 論文標題 Comparison of outcomes of allogeneic transplantation for primary myelofibrosis among hematopoietic stem cell source groups.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Blood and Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 1536-1543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbmt.2019.02.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kamoshita S, Murata M, Koyama D, Julamanee J, Okuno S, Takagi E, Miyao K, Goto T, Ozawa Y, Miyamura K, Terakura S, Nishida T, Kiyoi H.	4. 巻 111
2. 論文標題 Donor single nucleotide polymorphism in ACAT1 affects the incidence of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 112-119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-019-02739-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koyama D, Murata M, Hanajiri R, Akashi T, Okuno S, Kamoshita S, Julamanee J, Takagi E, Miyao K, Sakemura R, Goto T, Terakura S, Nishida T, Kiyoi H.	4. 巻 24
2. 論文標題 Quantitative assessment of T cell clonotypes in human acute graft-versus-host disease tissues.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Blood and Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 417-423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbmt.2018.10.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Wakamatsu M, Terakura S, Ohashi K, Fukuda T, Ozawa Y, Kanamori H, Sawa M, Uchida N, Ota S, Matsushita A, Kanda Y, Nakamae H, Ichinohe T, Kato K, Murata M, Atsuta Y, Teshima T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Impacts of thymoglobulin in patients with acute leukemia in remission undergoing allogeneic HSCT from different donors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 105-115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2018025643.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyao K, Terakura S, Okuno S, Julamanee J, Watanabe K, Hamana H, Kishi H, Sakemura R, Koyama D, Goto T, Nishida T, Murata M, Kiyoi H.	4. 巻 6
2. 論文標題 Introduction of genetically modified CD3 improves proliferation and persistence of antigen-specific CTLs.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Immunology Research	6. 最初と最後の頁 733-744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-17-0538.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishida T, Kobayashi T, Sawa M, Masuda S, Shibasaki Y, Goto T, Fukuhara N, Fujii N, Ikegame K, Sugita J, Ikeda T, Kuwatsuka Y, Suzuki R, Najima Y, Doki N, Kato T, Inagaki Y, Utsu Y, Aotsuka N, Masuko M, Terakura S, Onishi Y, Maeda Y, Okada M, Teshima T, Murata M.	4. 巻 100
2. 論文標題 A multicenter phase II study of intrabone single-unit cord blood transplantation without antithymocyte globulin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 743-752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-020-04365-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto F, Suzuki S, Mizutani A, Shigenari A, Ito S, Kametani Y, Kato S, Fernandez-Via M, Murata M, Morishima S, Morishima Y, Tanaka M, Kulski JK, Bahram S, Shiina T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Capturing Differential Allele-Level Expression and Genotypes of All Classical HLA Loci and Haplotypes by a New Capture RNA-Seq Method.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.00941	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Terakura S, Nishida T, Sawa M, Kato T, Miyao K, Ozawa Y, Goto T, Kohno A, Ozeki K, Onishi Y, Fukuhara N, Fujii N, Yokoyama H, Kasai M, Iida H, Kanemura N, Endo T, Ago H, Onizuka M, Iyama S, Nawa Y, Nakamae M, Nagata Y, Kurahashi S, Tomiya Y, Yanagisawa A, Suzuki R, Kuwatsuka Y, Atsuta Y, Miyamura K, Murata M.	4. 巻 55
2. 論文標題 Prospective evaluation of alternative donor from unrelated donor and cord blood in adult acute leukemia and myelodysplastic syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 1399-1409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-020-0859-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 村田 誠.
2. 発表標題 ヒト急性GVHDにおけるT細胞応答、診断、治療.
3. 学会等名 第67回日本輸血・細胞治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田 誠, 竹中克斗, 内田直之, 小澤幸泰, 大橋一輝, 金 成元, 池亀和博, 廣川 誠, 福田隆浩, 熱田由子, 近藤 健.
2. 発表標題 原発性骨髄線維症に対する同種造血幹細胞移植の成績：移植ソース間の比較.
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田 誠.
2. 発表標題 造血幹細胞移植における間葉系幹細胞の臨床応用.
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田 誠.
2. 発表標題 間葉系幹細胞と造血幹細胞移植.
3. 学会等名 第41回日本造血細胞移植学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murata M, Takenaka K, Uchida N, Ozawa Y, Ohashi K, Kim SW, Ikegame K, Atsuta Y, Hirokawa M, Fukuda T, Kondo T.
2. 発表標題 Comparison of outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation for primary myelofibrosis among stem cell source groups.
3. 学会等名 The 60th annual meeting of the American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Murata M.
2. 発表標題 HSCT for Myelofibrosis in Japan.
3. 学会等名 The International Congress of BMT 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------