

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17874

研究課題名（和文）レナリドミドの移植片対宿主病に及ぼす影響の解明—制御性T細胞を中心として—

研究課題名（英文）Investigation of the effects of lenalidomide on graft-versus-host disease, with a focus on regulatory T cells.

研究代表者

吉村 英晃（YOSHIMURA, Hideaki）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：70646976

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：急性GvHDマウスモデルを用いてレナリドミドのGvHDに及ぼす影響を検討した。当初の予測ではレナリドミドはGvHDを悪化すると予測していたが、生存はレナリドミド投与にて有意に生存率が向上した。組織に関しても腸管・肝臓に浸潤を認めておりGvHDが生存に寄与していることが判明した。脾細胞中のT細胞の増殖や分画、特に制御性T細胞においても有意な差は認めなかった。T細胞の遊走に係わるL-PAM1（ $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン）の発現がFoxp3-CD4⁺T細胞で低下しており、それらの腸管への遊走が低下していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞移植は近年増加傾向である。また造血幹細胞移植後に維持療法を行うことで予後の向上を認める報告も多い。レナリドミドもまた多発性骨髄腫だけでなく悪性リンパ腫等へ適応の拡大を認めている。造血幹細胞移植前後にレナリドミドを使用する機会は増加すると予測されるが同種免疫へのレナリドミドの影響は判明しておらず、重要な合併症であるGvHDへの影響は不明確であった。本研究においてはマウスモデルにおいてレナリドミドはGvHDを軽減することが判明し、新たな治療ターゲットの候補となりうることを示唆された。造血幹細胞の成績、ひいては血液疾患患者の予後・QOLの向上につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The effect of lenalidomide on GvHD was examined in a mouse model of acute GvHD.

The initial prediction was that lenalidomide would worsen GvHD, but survival was significantly improved with lenalidomide. Regarding the histology, cellular infiltration was observed in the intestinal tract and liver, indicating that GvHD contributes to survival. No significant differences were observed in the proliferation or fractionation of T cells in spleen, especially regulatory T cells. The expression of L-PAM1 ($\alpha 4 \beta 7$ integrin), which is involved in T cell migration, was decreased in Foxp3-CD4⁺ T cells, suggesting that their migration to the intestinal tract was reduced.

研究分野：血液疾患

キーワード：造血幹細胞移植 移植片対宿主病 レナリドミド L-PAM

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は多くの造血器腫瘍に対する根治的な治療法である。特に成人T細胞性白血病リンパ腫のような難治性の血液腫瘍においては、造血幹細胞移植の成否がその患者の予後に大きく関わるため、その成績の向上は必要不可欠である。造血幹細胞移植には同種免疫が深く関わっており、一方では抗腫瘍効果として大きな利益となるが、他方で合併症である移植片対宿主病(GvHD)とも密接な関係があることが知られている。移植後早期に頻発する急性 GvHD は皮疹・下痢・肝障害が代表的な症状であり、この発症が予後や移植後期の合併症に直接関与している。制御性 T 細胞 (Treg) は Foxp3 をマスター遺伝子に持ち、自己応答性 T 細胞の活性化を制御し、免疫寛容を維持する上で重要となる T 細胞のサブセットの一つである。Treg は自己免疫応答だけでなく、非自己抗原に対する同種免疫にも作用しており、Treg の減少が GvHD の重症度と相関することがこれまで報告されている。GvHD のコントロールには Treg による移植後の免疫寛容が大きな鍵となる。

レナリドミドはサリドミド誘導体として開発され、多発性骨髄腫に対してデキサメタゾン等との組み合わせにて治療の第一選択としても頻用され、臨床的な効能が十分に認められている薬剤である。近年成人T細胞白血病リンパ腫に対しても奏功することが見いだされ、2017年に再発又は難治性の成人 T 細胞白血病リンパ腫に対する使用の追加承認がなされたことにより、使用頻度が増加している。レナリドミドは現在までに Cereblon をターゲット蛋白としていることが判明(Leukemia (2012) 26, 2326-2335)し、その直接的抗腫瘍効果に加え、免疫調節作用や細胞接着阻害、血管新生抑制など多数の作用機序を持つことが徐々に明らかになってきている。中でも NK 細胞の活性化促進、IL-2 の転写促進や Foxp3 の転写抑制を介した CD4+T 細胞の活性化・制御性 T 細胞の抑制がなされているとの報告(Cancer Immunol Immunother (2009) 58:1033-1045)がある。これらの作用は免疫賦活を促し、抗腫瘍免疫の一部を担うものと考えられている。

造血幹細胞移植の前後で、早期再発に対する治療や維持療法、病勢コントロール等の目的でレナリドミドの投与が必要となる場面は臨床的に認められ、今後増加していくと思われる。しかし、その多彩な作用機序のため、レナリドミドが造血幹細胞移植に与える影響に関しては解明されていない。少数例であるが多発性骨髄腫患者の同種造血幹細胞移植後のレナリドミド投与にて GvHD の悪化が報告されるなど、臨床的には関連が示唆されており、造血幹細胞移植の成績が直接予後に影響する造血器疾患においては、レナリドミド投与と GvHD 発症の関連を解明することは急務である。

2. 研究の目的

本研究では、レナリドミド(LEN)が同種移植後の T 細胞・NK 細胞に与える作用や、移植後合併症である急性 GVHD に対する影響について、確立された急性 GvHD マウスモデルを用いて評価・検討を行い、LEN が Treg を中心とした免疫細胞に及ぼす作用を解明することで、免疫学的作用を考慮した適切な移植後 LEN 利用のための基盤となるデータを得ることを目的とする。

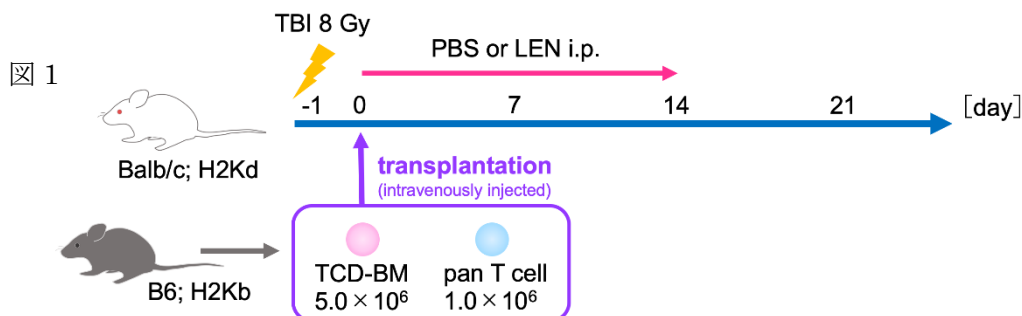
3. 研究の方法

(1) 非移植マウスの免疫細胞 (T 細胞、NK 細胞) に対する LEN の作用を検討した。

①磁気ビーズおよびセルソーターを用いて、移植を行っていない C57BL/6 (B6) マウスの脾細胞から Treg (Foxp3-GFP⁺ CD4⁺) や Tconv (Foxp3-GFP⁻ CD4⁺) を分取し、その分裂能や Treg の抑制能に対する LEN の影響について検討した。②移植未実施の B6 マウスに対し LEN を投与し、脾細胞における T 細胞分画やその表現形質についてフローサイトメトリーを用いて解析した。

(2) 急性 GvHD マウスモデルを作成し、移植後免疫に対する LEN の作用を検討した。

Balb/c マウスに放射線照射 (8.0Gy) を行い、B6 マウス由来の T 細胞除去骨髄細胞 (5.0x10⁶ 個/匹) に加え T 細胞 (1.0x10⁶ 個/匹) を輸注することで急性 GvHD マウスモデルを作成 (図 1) し、以下の検討を行った。

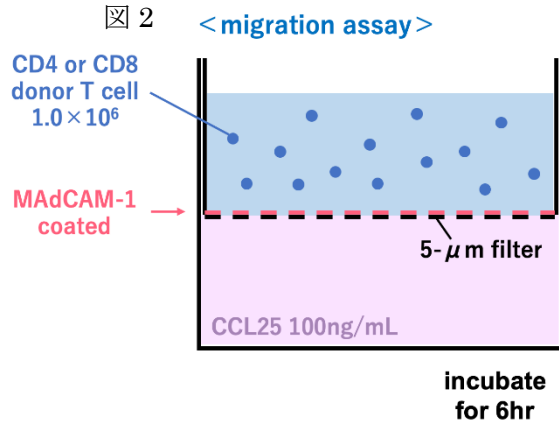


① マウス急性 GVHD モデルに対し、輸注当日より LEN を 14 日間腹腔内投与することで GVHD スコア (体重変化・姿勢の保持、毛並み、活動度) や生存に与える影響を検討した。

② 移植後 14 日目における大腸・小腸・肝臓の病理組織像の変化や、脾臓・腸間膜リンパ節由来 T 細胞の表面抗原の発現及びサイトカインについて評価した。

(3) レナリドミドの T 細胞の遊走を評価するため遊走能試験を行った。

上室に GvHD ホストマウス由来の T 細胞を入れ、メンブレンには L-PAM のリガンドである MadCAM1 をコーティングした。下室に CCL25 入りのメディウムを入れ下室への細胞遊走をフローサイトメトリーにて解析した。(図 2)

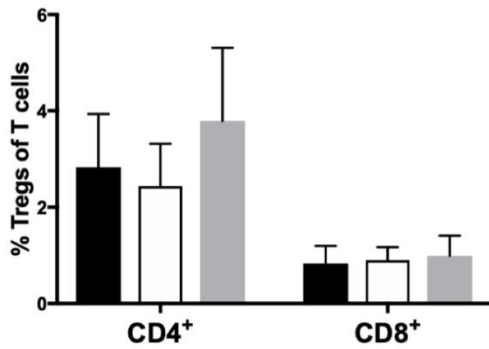


4. 研究成果

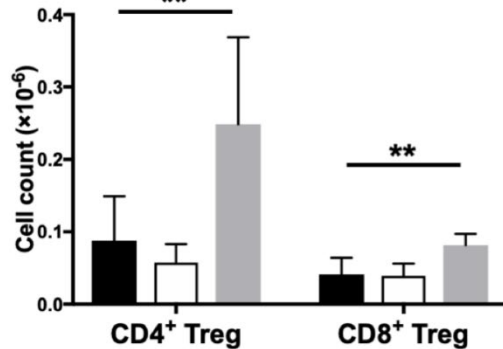
(1) in vitro において、Tconv と Treg の分裂能や Treg の抑制能に対して明らかな LEN の影響は認めなかった。in vivo では LEN の投与により脾細胞中の NK 細胞の比率は増加していたが、Treg の割合は僅かに減少する傾向を認めるのみであった。(図 3)

図 3

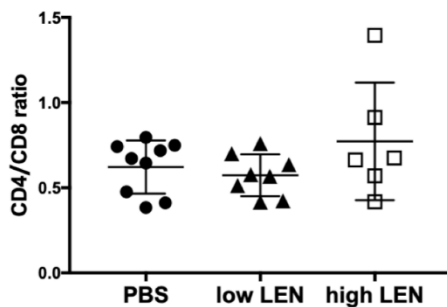
< 脾細胞中の Treg 割合 >



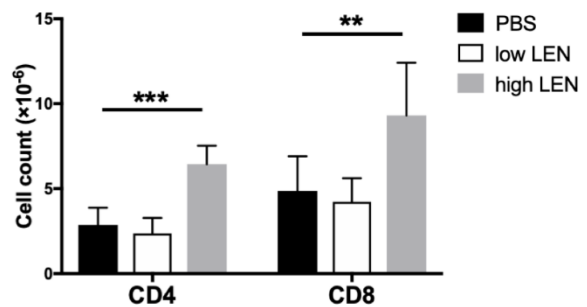
< 脾細胞中の Treg 絶対数 >



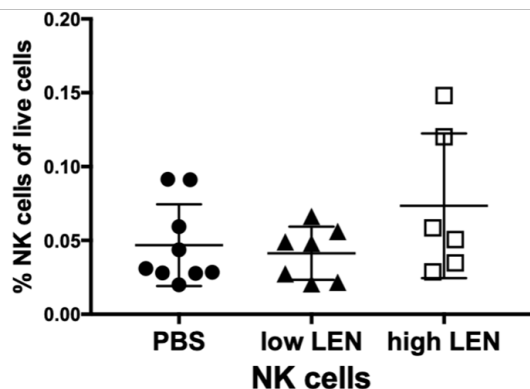
< CD4/CD8 比 >



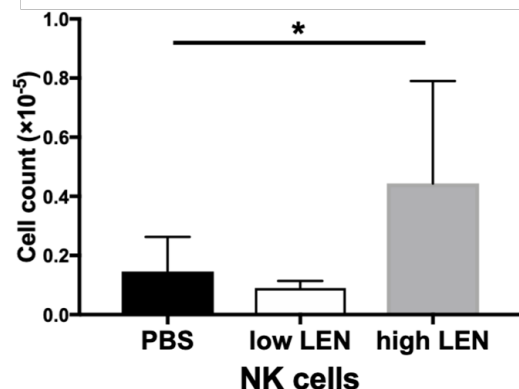
< 脾細胞中の各 T 細胞数 >



< 脾細胞中の NK 細胞の割合 >



< 脾細胞中の NK 細胞の絶対数 >



(2) マウス急性 GVHD モデルを用いて、移植日より LEN を 14 日間投与したところ、生存率は高用量の LEN を投与した場合に有意に改善した。また、移植後 day14 のマウスでは、LEN 投与群で小腸上皮細胞の損傷が軽度となる傾向が見られた。(図 4)

図 4

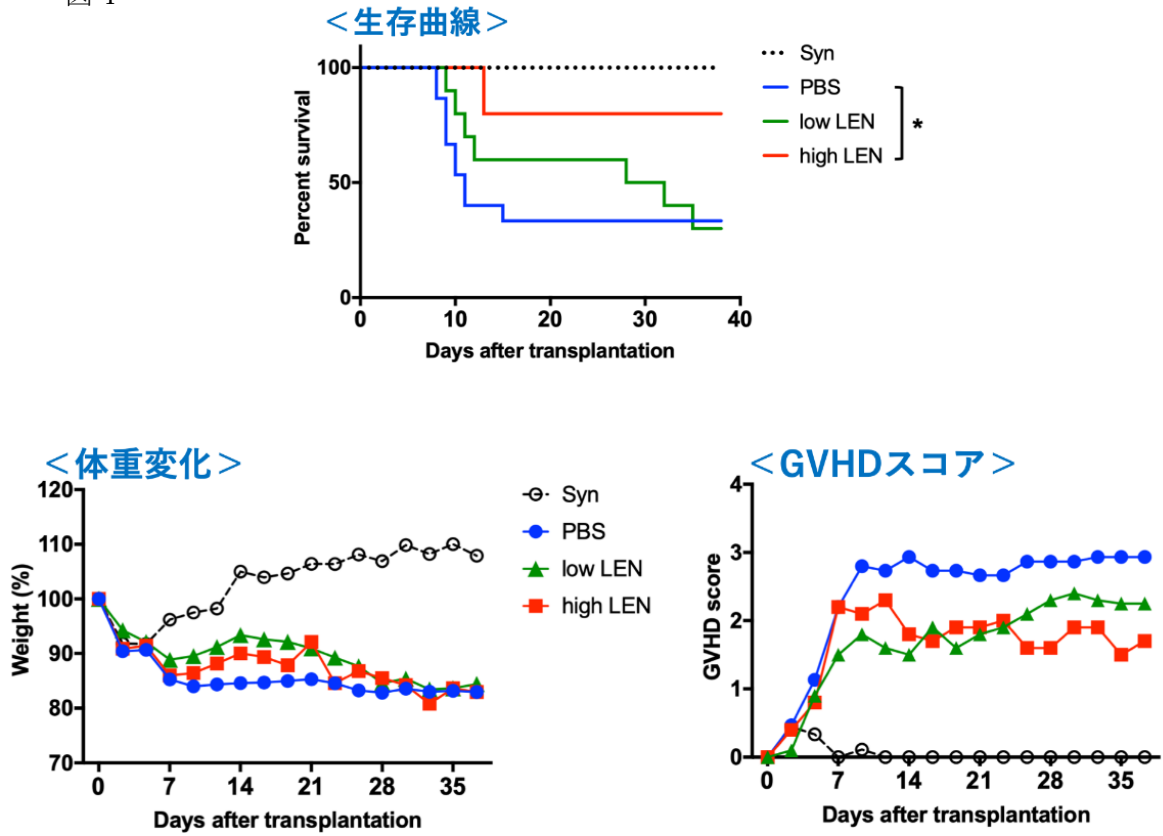
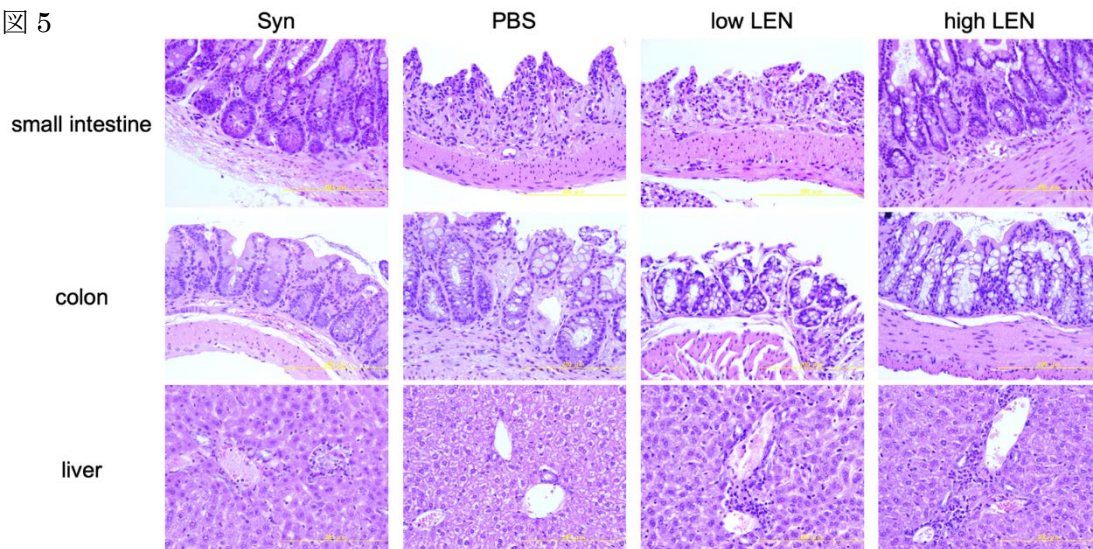
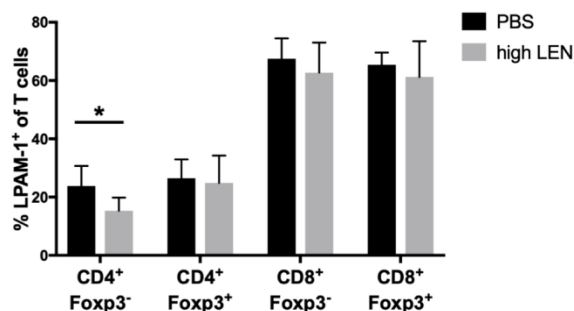


図 5



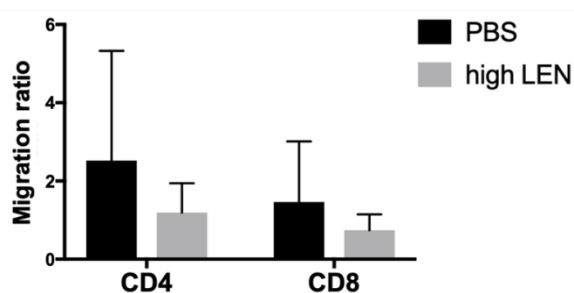
(3) 移植後マウス脾細胞中のドナー由来 T 細胞数は高用量の LEN を投与した群で有意に増加していたが、増殖やサイトカインの発現はコントロール群と同程度であった。また、ドナー Tconv では、リンパ球の接着・遊走に関する LPAM-1 の発現が LEN 投与群で有意に低下していた。(図 6)

図 6
<脾細胞中の各T細胞分画におけるLPAM-1発現>



(4) LEN が LPAM-1 を介して消化管における急性 GvHD の発症に関与していると考え、移植後マウスの小腸粘膜固有層から T 細胞を単離してフローサイトメトリーで解析を行った。LEN 群でわずかに Tconv の割合が減少する傾向であったものの、Treg の割合は両群で有意な差を認めなかった。次に、トランスウェルを用いて遊走試験を行い、T細胞の腸管への遊走能を検討した。有意差はなかったものの LEN 群にて T細胞の浸潤は少ない傾向にあった。(図 7)

図 7
< migration ratio >



当初はレナリドミド投与後の GvHD 悪化の報告や NK 細胞の増加等の報告からレナリドミドが T 細胞に何らかの影響を及ぼし、GvHD を悪化させる予想を行っていた。しかしながら予想に反して本研究にて用いたモデルにおいては GvHD の生存率を改善し、T 細胞の増殖や Treg の機能、iTreg への分化に影響を及ぼさず腸管への遊走に関与している可能性が明らかとなった。さらなる詳細なメカニズムやヒトにおいても同様であるのか等は検討の余地を残しているが、GvHD に対するレナリドミドの基礎データが得られたことで今後 GvHD 予防や治療における標的としての可能性が高まった。

レナリドミドのターゲットであるセレブロンと GvHD の関連も示唆される結果でありレナリドミドを治療に用いる多発性骨髄腫や成人 T 細胞白血病リンパ腫だけではなく、造血幹細胞全体へ理解が深まったと考える。これは血液疾患患者の予後・QOL に対して良い影響を与える可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsubokura Y, Yoshimura H, Satake A, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Early administration of lenalidomide after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation suppresses graft versus host disease by inhibiting T cell migration to the gastrointestinal tract.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Immun Inflamm Dis.	6. 最初と最後の頁 688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iid3.688	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------