

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08410

研究課題名(和文) 同種造血幹細胞移植後のGVHDにおける腎障害発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of kidney injury associated with graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation

研究代表者

市川 一誠 (Ichikawa, Kazunobu)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：50436218

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)：本研究では急性移植片対宿主病(aGVHD)と急性腎障害(AKI)の関連に注目した。同種ドナーから骨髄移植を受けたマウスでは、腎臓にドナー由来のTリンパ球が多く浸潤し、これらのTリンパ球には活性化マーカーや疲弊マーカーが発現していた。同種移植レシピエントの腎臓では好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン(NGAL)とエラフィン蛋白の発現が増加していた。In vitroの実験系では、同種反応性T細胞との共培養によって腎細胞の細胞死が誘導されていることも確認した。同種ドナー由来のTリンパ球がレシピエントの腎臓を傷害していること、すなわちaGVHDが造血細胞移植後のAKIに寄与していることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血細胞移植の合併症として急性腎障害(AKI)がしばしば発生し、その原因として薬剤や感染症などの要因が想定されているが詳細には解明されていなかった。本研究では、同種ドナー由来のTリンパ球がレシピエントの腎臓を傷害していること、すなわちGVHDが造血細胞移植後のAKIに寄与していること実験系で示した。造血細胞移植患者の腎予後を改善するために、腎臓特異的GVHDのより詳細な病態解明と治療法の開発が望まれる。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether allogeneic donor T cells target kidney in murine models of aGVHD. Donor MHC-positive cells were present in the renal pathology specimens from allogeneic mice. The characteristics of these donor-derived T cells were analyzed using flow cytometry. Both CD4+ and CD8+ cells were increased in allogeneic animals and these T cells demonstrated elevated surface markers of activation and exhaustion as well as secretion of proinflammatory cytokines and cytotoxic proteins. Examination of protein expression in renal tissue showed an increase of neutrophil gelatinase-binding lipocalin (NGAL) and elafin in allogeneic recipients. In an in vitro cytotoxic T lymphocyte (CTL) assay, co-culture with alloreactive T cells increased apoptosis of renal cells. Our study demonstrated that immune responses induced by donor T cells are involved in renal cell injury in recipients, suggesting that the kidney is also an aGVHD target organ.

研究分野：腎臓病学

キーワード：造血幹細胞移植 急性移植片対宿主病 急性腎障害 allo-HCT aGVHD AKI エラフィン elafin

1. 研究開始当初の背景

急性移植片対宿主病 (aGVHD) は、同種造血細胞移植 (allo-HCT) 後に発症する重大な合併症であり、皮膚、肝臓、消化管が主な標的臓器として認識されている。aGVHD は、組織の損傷による抗原提示細胞の活性化によって始まり、ドナー由来の T 細胞の活性化とその結果としての標的臓器の傷害が続く。aGVHD の予防には通常、カルシニューリン阻害剤 (CNI) などの免疫抑制剤が用いられる。急性腎障害 (AKI) は allo-HCT の頻度の高い合併症の一つであり、allo-HCT を受けた患者の 50% 以上に発症し、CNI 腎症および血栓性微小血管症 (TMA) が主な腎病理である。AKI の主な原因は、移植後に投与された CNI であると考えられているが、HCT の前後に使用される化学療法剤や抗菌剤も腎毒性がある。薬剤以外にも、敗血症、BK ウイルスやアデノウイルスによる出血性膀胱炎、下痢、TMA など様々な合併症が AKI を引き起こす。慢性 GVHD はネフローゼ症候群を引き起こすことが知られているが、aGVHD と腎臓病との関係は不明である。臨床研究では、aGVHD が AKI の発症に関連することが報告されているが、詳細なメカニズムは不明で、腎臓は一般的に aGVHD の標的臓器とは認識されていない。既報では、同種レシピエントマウスにおいて尿所見の悪化、腎臓における炎症性サイトカインの発現増加、尿細管や間質への細胞浸潤が報告されている。またドナー由来の白血球がレシピエント動物の腎臓に浸潤することは、ラットの骨髄移植 (BMT) モデルの研究で報告されているが、これらの細胞の分類とその機能は解明されていない。腎臓が同種ドナー T 細胞の標的である可能性が最近の研究で示唆されているがまだ議論の余地がある。本研究では、aGVHD のモデルを用いて、HCT レシピエントの腎臓におけるドナー T 細胞の機能を解析した。

2. 研究の目的

同種造血細胞移植後に発生する腎障害への、ドナー由来 T 細胞による免疫反応の関与を検討し、腎臓における急性移植片対宿主病の病態を解明する。

3. 研究の方法

移植前処置として致死量の全身放射線照射を行ったマウスに、ドナー由来の骨髄細胞および T 細胞を輸注した。前処置や GVHD 予防のための薬剤は、薬剤性腎障害の影響を避けるために投与しなかった。

4. 研究成果

同種造血幹細胞移植マウスでは腎障害マーカーが上昇した

同種免疫応答が腎障害を引き起こすかどうかを調べるために、マウス HCT モデルを用いた。腎毒性作用との交絡を避けるため、GVHD 予防は行わなかった。予想通り MHC ミスマッチ C57BL/6 細胞の BALB/c 同種レシピエントは、同種レシピエントに比べて生存率が低く、aGVHD の臨床症状はより重篤で、体重減少はより顕著であった。HCT の 14 日後に測定した尿細管損傷のマーカーである尿蛋白および NAG のレベルは、同種移植レシピエントでは同種マウスと比較して有意に上昇した。allo-HCT レシピエントマウスでは腎障害の尿マーカーが増加することが示され、allo-免疫応答が直接腎障害を引き起こす可能性が示唆された。

ドナー T 細胞は同種レシピエントの腎臓に浸潤し、腎障害の病理組織学的徴候と関連している。
腎障害の尿マーカーの増加が腎病理組織学的変化と対応しているかどうかを調べた。同種 (C57BL/6 から BALB/c) または同系造血幹細胞移植の 14 日後に腎臓を採取した。同種マウスの腎臓では、同種マウスの腎臓と比較して、PAS 染色で単核球浸潤を伴う尿細管周囲毛細血管炎と尿細管炎の増加が観察された。糸球体は両群とも PAS 染色で影響を受けておらず、TMA の証拠は認められなかった。免疫染色を用いて炎症性細胞浸潤の特徴を調べた。同種マウスの間質には H-2Kb 陽性 (ドナー型) 細胞が認められ、同種 HCT レシピエントの糸球体、尿細管周囲毛細血管 / 間質、または動脈周囲領域では、CD3+ T 細胞の数が同種レシピエントのそれと比較して有意に増加していた。したがって、allo-HCT レシピエントの腎臓は同系レシピエントの腎臓よりも病理組織学的に炎症が強く、ドナー細胞および CD3+細胞が多量に浸潤していた。

腎臓浸潤ドナー T 細胞は活性化され、炎症性サイトカインを産生する

allo-HCT レシピエントの腎臓に浸潤したドナー T 細胞が活性化と炎症に一致するマーカーを発現しているかどうかを調べるために、HCT 後 14 日目にフローサイトメトリーを行った。同種レシピエントの腎臓から分離した H-2Kd+細胞と同種レシピエントの腎臓から分離した H-2Kb+細胞を分析した。腎臓浸潤 CD4+および CD8+ T 細胞の量は、同種マウスで増加した。CD4+および CD8+抗原経験エフェクターメモリー T 細胞 (CD44+CD62L-) は、同種移植レシピエントの腎臓で増加した。これと一致して、活性化マーカー (CD69 と CD25) と消耗マーカー (PD-1 と Tim-3) も、allo-HCT レシピエントの腎臓から単離された T 細胞で増加していた。しかしながら、CD4+CD25+Foxp3+制御性 T 細胞は、同種移植レシピエントにおいても腎臓では増加していなかった。炎症性サイトカインである TNF- と IFN- の産生も、allo-HCT レシピエントの腎臓から

分離した T 細胞で増加していた。さらに、allo-HCT レシピエントの腎臓からの CD8+ T 細胞は、グランザイム B やパーフォリンなどの細胞傷害性マーカーをより多く分泌した。これらのデータを総合すると、腎臓の同種ドナー T 細胞は活性化され、細胞傷害性タンパク質と炎症性サイトカインを発現し、組織損傷を誘導した可能性があることが示された。

同種レシピエントの腎臓で組織傷害マーカーが増加した

同種免疫応答が腎臓障害を引き起こすかどうかを調べるため、HCT 後 14 日目のレシピエントマウスの腎臓における腎臓障害および同種免疫介在性傷害のタンパク質マーカーの発現を測定した。AKI の指標である NGAL は、同種レシピエントの腎臓溶解液と比較して、HCT 後 14 日目に有意に高かった。同様に、急性 GVHD の組織マーカーであるエラフィンも同種移植群で高かった。エラフィンの局在を評価するための免疫組織化学染色により、エラフィン陽性細胞は同種レシピエントの遠位尿細管上皮に優位に存在することが明らかになった。これらのデータから、同種移植動物の腎臓は同種免疫応答によって損傷を受けていることが示唆された。

同種ドナー T 細胞は腎細胞を直接攻撃する

同種ドナー T 細胞が腎細胞を直接攻撃できるかどうかを確認するため、HCT の 14 日後にレシピエント動物の腎臓の病理組織標本で TUNEL 染色を行った。この *in vivo* 実験では、同種移植群でさえ TUNEL 陽性細胞はほとんど存在しなかった。そこで、*in vitro* の細胞傷害性 T リンパ球殺傷アッセイを行った。BALB/c (同種) または B6 (同種) のエフェクター T 細胞を、それぞれ照射した BALB/c 脾臓細胞と 6 日間培養して活性化した。次に、これらのエフェクター T 細胞を標的 BALB/c 由来の腎内皮細胞または尿細管上皮細胞と共培養した。TUNEL 染色によって検出されたアポトーシス標的細胞は、同種エフェクター T 細胞と共培養した場合に比べ、同種エフェクター T 細胞と共培養した場合に有意に高かった。同種 T 細胞エフェクターとの共培養後のアポトーシスの増加は、腎内皮および上皮標的細胞間で同様であった。これらのデータから、同種ドナー T 細胞は腎細胞を直接攻撃し、腎臓における aGVHD を媒介する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyata Masahiro, Ichikawa Kazunobu, Matsuki Eri, Watanabe Masafumi, Peltier Daniel, Toubai Tomomi	4. 巻 12
2. 論文標題 Recent Advances of Acute Kidney Injury in Hematopoietic Cell Transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.779881	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 Miyata Masahiro, Matsuki Eri, Ichikawa Kazunobu, Takehara Tomohiro, Hosokawa Yuka, Sekiguchi Erika, Peltier Daniel, Reddy Pavan, Ishizawa Kenichi, Watanabe Masafumi, Toubai Tomomi	4. 巻 7
2. 論文標題 Allogeneic T cells cause acute renal injury after hematopoietic cell transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 6936 ~ 6948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2023009721	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Miyata Masahiro
2. 発表標題 Allogeneic Donor T Cells Directly Attack Renal Endothelial and Epithelial Cells in Mice
3. 学会等名 ASH. New Orleans (国際学会)
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 宮田匡大
2. 発表標題 同種造血幹細胞移植後の腎障害と移植片対宿主病の関連
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田匡大
2. 発表標題 同種造血細胞移植後の腎障害にドナーT細胞が関与する
3. 学会等名 第67回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2024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
研究分担者	東梅 友美 (Toubai Tomomi) (40802111)	山形大学・医学部・講師 (11501)	

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
---------	---------