

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16309

研究課題名（和文）慢性GVHDとGVL効果におけるネオ・セルフの同定解析

研究課題名（英文）mechanisms of vasculopathy in chronic GVHD

研究代表者

森田 薫（Morita, Kaoru）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20813223

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：慢性GVHDは同種移植後に生じる、全身性の自己免疫疾患様の合併症であるが、組織内でどの細胞が標的にされているかは十分に明らかでない。本研究では、血管内皮細胞が慢性GVHDのバイオマーカーでもある種々のケモカイン・サイトカインを産生することで、免疫細胞を局所に誘導し、活性化することを明らかにした。またこれらの因子を産生するにはIFN- γ が関わっており、ROCK2阻害剤がその制御に有効であった。さらに、血管内皮細胞は同種抗原/HLA class II複合体を膜上に発現するが、白血病細胞の一部からもこの複合体が出現しており、血管内皮細胞はcGVHDだけでなく、GVL効果にも関わ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

慢性GVHDは適切なマウスモデルがないこともあり、病態解明が十分に進んでいない。本研究によって、血管内皮細胞が慢性GVHDにおいて重要な役割を果たすことが明らかになったことで、疾患の病態生理学的メカニズムに新たな知見を提供できると考えている。また、IFN- γ やROCK2阻害剤が慢性GVHDの制御に関与することが示され、今後、新たな治療戦略の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Chronic GVHD (Graft-versus-Host Disease) is a systemic autoimmune-like complication that occurs after allogeneic transplantation, but the specific cells targeted within tissues are not well understood. This study revealed that vascular endothelial cells produce various chemokines and cytokines, which are biomarkers of chronic GVHD. These factors attract and activate immune cells locally. The production of these factors involves IFN- γ , and ROCK2 inhibitors were found to be effective in regulating this process. Furthermore, vascular endothelial cells express alloantigen/HLA class II complexes on their membranes, and some leukemia cells also exhibit these complexes. This suggests that vascular endothelial cells are involved not only in chronic GVHD but also in the Graft-versus-Leukemia (GVL) effect.

研究分野：GVHD

キーワード：GVHD GVL endothelium

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性移植片対宿主病 (Chronic Graft-Versus-Host Disease: cGVHD) は、造血器腫瘍に対して同種造血幹細胞移植後、3 ヶ月以降に発症する自己免疫疾患様の合併症である。近年、HLA 半合致のドナーを用いたハプロ移植が急増したことで、増加が懸念されている。cGVHD は有効な薬剤が限られ、一度発症すると難治化しやすい。そのため、病態解明と新規治療法の開発が強く求められている。cGVHD の病態生理は、疾患モデルマウスの研究成果を中心に、3 つの段階を経て、生じると考えられている。すなわち、組織傷害による初期の炎症 (第 1 段階) に加え、胸腺傷害や未熟な骨髄機能によって免疫寛容が破綻することで、アロ・自己反応性の T 細胞、B 細胞の出現を許し、炎症が慢性化する (第 2 段階)。その後、炎症により傷害を受けた組織の修復過程でマクロファージが過剰に働くことで、線維化が起きる (第 3 段階)。しかし、これらの病的な免疫細胞が、組織内で何を標的に炎症を起こすのかは十分にわかっていない。

(2) 同種造血幹細胞移植は自身の造血機能を根絶やしするほどの強力な移植前処置と、ドナー由来の免疫細胞が残存する腫瘍を認識して攻撃する移植片対白血病・リンパ種 (Graft-VersusLeukemia/Lymphoma: GVL) 効果の 2 つの作用を期待して行う治療法である。この中で、GVL 効果は cGVHD と密接に関係している。つまり、cGVHD が発症している限り GVL 効果が発揮され、白血病・リンパ腫が再発しないというジレンマがある。cGVHD と GVL 効果が表裏一体である理由として、ドナーリンパ球が共通の同種/自己抗原を認識することが想定されるが、共通の抗原は十分に明らかになっていない。

(3) cGVHD のリスク因子として、HLA 不適合/異性間/非血縁者間移植、急性 GVHD、高齢ドナーなどが知られている (文献 1)。これまで、私達は cGVHD の発症リスクが高いとされる女性ドナーから男性レシピエントへの異性間移植に注目し、血管内皮細胞膜上で異所性に形成される Y 染色体由来の H-Y タンパク質 (ペプチドに分解されない) と HLA class II の複合体が同種抗体の標的となり、cGVHD を引き起こすことを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では HLA class II、血管内皮の 2 つの要素に着目し、cGVHD と GVL 効果について、(1) 同種蛋白質/HLA class II 複合体は、cGVHD と GVL 効果を引き起こす共通抗原になり得るかどうか、(2) 血管内皮は cGVHD の重要な標的細胞かどうか、解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 同種蛋白質/HLA class II 複合体は、cGVHD と GVL 効果を引き起こす共通抗原になり得るかどうか

白血病細胞における H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体の発現の分析

H-Y 蛋白質全体が HLA class II と複合体を形成して、白血病細胞の膜上に発現するかを検証した。まず、男性由来のヒト白血病細胞株について、real-time qPCR、フローサイトメトリー、免疫染色などにより、H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体の細胞膜上への発現を解析した。次に、実際の患者検体も使って、H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体が細胞膜上に発現しているか解析を行った。

HLA 適合造血幹細胞移植において、GVL 効果に関与する HLA class II アレルの分析

日本造血・免疫細胞療法学会が実施する全国規模の TRUMP (造血細胞移植登録一元管理プログラム) データベースを用いて、急性骨髄性白血病に対する HLA 適合造血幹細胞移植において、再発リスク低下に関わる HLA class II アレルがあるかどうか解析した。

(2) 血管内皮は cGVHD の重要な標的細胞かどうか

血管内皮によるケモカイン・サイトカイン産生の分析

免疫細胞を組織に遊走させるケモカインの候補に関して、血漿中の CXCL9、CXCL10 が cGVHD の発症と重症度に関連することが報告されている (文献 2、3、4)。CXCL9、CXCL10 に対する受容体は CXCR3 であるが、レシピエント側の CXCR3 における一塩基多型が cGVHD の発症に関連することも報告されている (文献 5)。cGVHD の発症に関わる血漿バイオマーカーは他にも BAFF (B-cell activating factor) が上げられ、レシピエント由来の BAFF がドナー B 細胞を過剰に刺激して cGVHD を引き起こすことがマウスモデルで証明されている (文献 6)。cGVHD の罹患組織にはリンパ球以外にドナー由来のマクロファージも浸潤しており、線維化に関与することがマウスモデルで示されている (文献 7)。マクロファージの活性には成長因子の CSF-1 が重要であり、CSF-1 受容体に対する阻害剤 Axatilimab は第 I/II 相試験で治療抵抗性の cGVHD に有効な効果を示した (文献 8)。以上のように cGVHD の病態生理にはケモカインでは CXCL9、CXCL10、サイトカインでは BAFF、CSF-1 が重要であることが報告されている。そこで、cGVHD の皮膚病理組織を用いて、

これらの因子の免疫染色を行い、血管内皮細胞からの産生を分析した。

移植環境下における血管内皮細胞の解析

CXCL9、CXCL10、BAFF、CSF-1 が、cGVHD の血管内皮細胞から産生する機序について、HUVEC を用いて cGVHD に関与するサイトカインや放射線を網羅的に解析し、血管内皮細胞から CXCL9、CXCL10、BAFF、CSF-1 が産生される原因の特定を試みた。

病的な血管内皮細胞の制御因子の解析

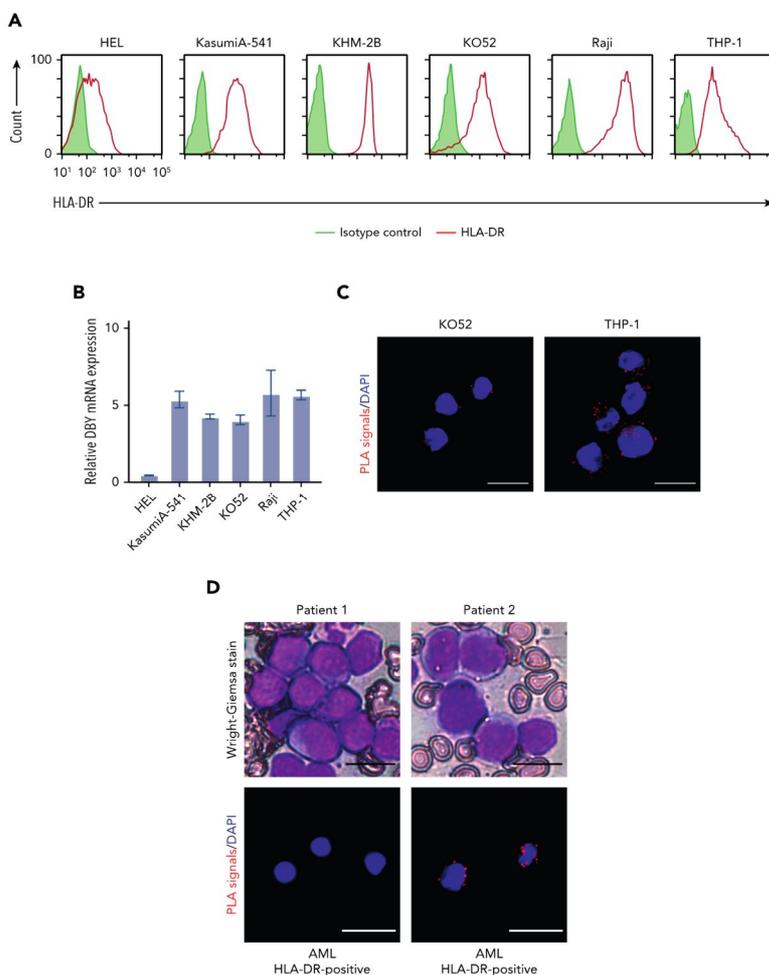
で明らかになった cGVHD の環境下で、血管内皮細胞が CXCL9、CXCL10、BAFF、CSF-1 を産生するのを阻害できる因子について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 同種蛋白質/HLA class II 複合体は、cGVHD と GVL 効果を引き起こす共通抗原になり得るかどうか

白血病細胞における H-Y 蛋白質/HLA class II 複合体の発現の解析

男性由来の白血病細胞株 (HEL、KasumiA-541、KHM-2B、K052、Raji、THP-1) の中で HEL 細胞株以外は全て HLA class II と H-Y 抗原 (DBY) を発現していた。その中で、K052、THP-1 細胞株は H-Y 蛋白質と HLA class II の複合体を膜上に発現していた。次に、2022 年度に自治医科大学附属病院で診断した、男性白血病患者 14 人の骨髓検体を用いて、H-Y 蛋白質と HLA class II の複合体の発現を解析した。14 人中、2 人は HLA class II の発現が見られなかったが、H-Y 蛋白質と HLA class II の複合体は 12 人中 7 人で認められた (下記図) (文献 9)。以上より、H-Y 蛋白質と HLA class II の複合体は cGVHD と GVL 効果の共通の抗原になり得ると考えられた。



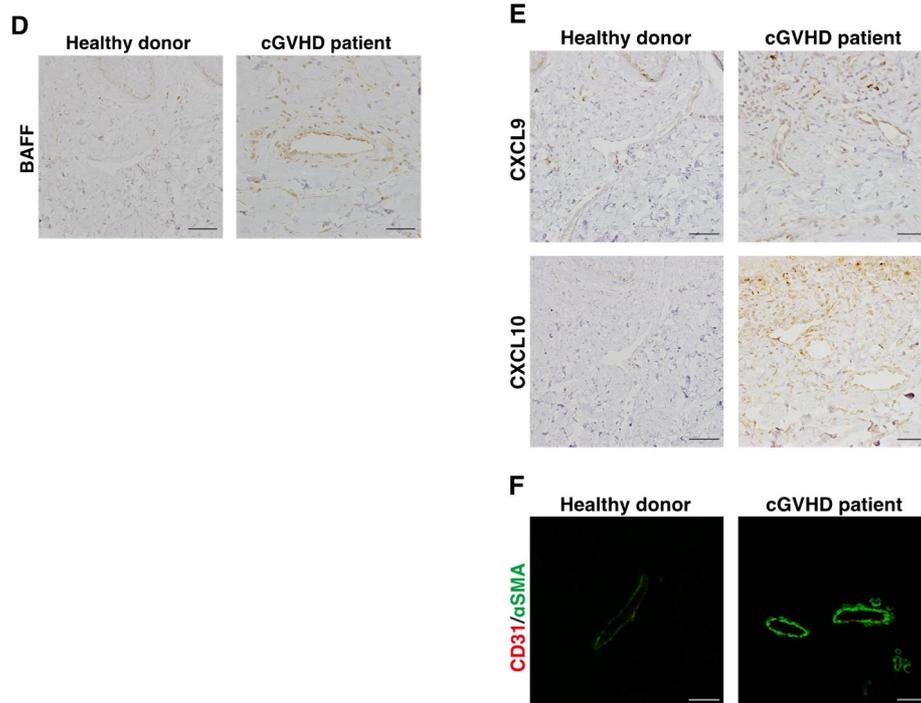
HLA 適合造血幹細胞移植において、GVL 効果に関与する HLA class II アレルの解析

急性骨髄性白血病の同種移植後の再発は、HLA class II の発現低下に因ることが、他の研究グループから近年報告されている (文献 10)。このことから、同種蛋白質と HLA class II の複合体が GVL 効果の鍵を握っている可能性が推測された。そこで、全国規模の TRUMP データを用いて、GVL 効果 (= 再発低下) に関与する特定の HLA class II アレルについて解析を行った。HLA の不一致を避けるために HLA 適合移植に限定した。また、移植前に非寛解のケースでは、前処置治療や、移植後の免疫抑制剤の調整方法が施設によって差が激しいため、移植前は寛解のケースに限定した。その結果、特定の HLA class II アレルでは多変量解析でも有意に再発の低下が見られた。

(2) 血管内皮は cGVHD の重要な標的細胞かどうか

血管内皮によるケモカイン・サイトカイン産生の分析

これまで、女性ドナーから男性レシピエントへの同種移植の cGVHD において血管内皮細胞が同種抗体の標的として重要であることを明らかにした。本研究では血管内皮について、患者皮膚検体を用いてさらに分析を行った。その結果、cGVHD の血管内皮の周囲には線維化が生じており、さらに、免疫細胞を組織に遊走させる CXCL9、CXCL10、B 細胞を活性化させる BAFF、マクロファージの活性に関わる CSF-1 も血管内皮細胞で発現していることが明らかとなり、血管内皮細胞は cGVHD の病態形成において、免疫細胞を組織に遊走し、活性化するのに重要な細胞であることが明らかとなった。



移植環境下における血管内皮細胞の解析

通常の血管内皮細胞からは CXCL9、CXCL10、BAFF、CSF-1 は発現しない。cGVHD の血管内皮細胞からこれらの因子が産生される原因として、cGVHD の病態に関わるサイトカイン(IFN- γ 、IFN- α 、TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β 1、LPS) 放射線を HUVEC に加え、網羅的に解析した。その結果、IFN- γ が mRNA、タンパクレベルでもこれらの因子を最も効率的に発現させることが明らかとなった。この結果は、cGVHD の皮膚組織の RNA-seq を行った既報の結果とも一致しており(文献 11) さらに IFN- γ は HLA class II も誘導したことから、cGVHD の血管内皮の病態形成には IFN- γ が重要であることが明らかとなった。

病的な血管内皮細胞の制御因子の解析

近年、線維化に関わる因子として ROCK-2 が注目されており、その阻害剤である KD025 は、T 細胞を制御することで cGVHD に効果があることが報告されている(文献 12、13)。そこで、ROCK-2 が血管内皮にも発現しているか、患者検体で解析したところ、ROCK-2 と pROCK-2 は血管内皮細胞にも発現していることが判明した。次に、で明らかとなった IFN- γ で HUVEC を刺激し、そこに KD025 を加えると、CXCL9、CXCL10、BAFF、CSF-1 の産生が有意に低下することが明らかとなった。以上より、cGVHD における病的な血管内皮細胞を制御するには KD025 が有力な候補であることが明らかとなった。

<引用文献>

- 文献 1. Blood.2017;129(1):13-21.
- 文献 2. Blood.2014;123(5):786-93.
- 文献 3. Blood.2016;127(24):3082-91.
- 文献 4. Blood Adv.2023;7(14):3612-23.
- 文献 5. Blood Cancer J.2021;11(2):42
- 文献 6. Blood.2021;137(18):2544-57.
- 文献 7. J Clin Invest.2014;124(10):4266-80.
- 文献 8. J Clin Oncol.2023;41(10):1864-75.
- 文献 9. Blood.2023;142(11):1008-1021.

- 文献 10. Nat Med.2019;25(4):603-611.
文献 11. Blood Adv. 2022; 6(9):2805-2811.
文献 12. Blood. 2016;127(17):2144-2154.
文献 13. Blood.2021;138(22):2278-2289.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11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 Umino Kento, Morita Kaoru, et.al.	4. 巻 142
2. 論文標題 Antibody-mediated pathogenesis of chronic GVHD through DBY/HLA class II complexes and induction of a GVL effect	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1008 ~ 1021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2023019799	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 Wakita Satoshi, Marumo Atsushi, Morita Kaoru, et.al.	4. 巻 114
2. 論文標題 Mutational analysis of <i>DNMT3A</i> improves the prognostic stratification of patients with acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1297 ~ 1308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15720	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 Chihiro, Morita Kaoru, Kanda Yoshinobu, et.al.	4. 巻 30
2. 論文標題 Cost-Effectiveness of Anti-BCMA Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Transplantation and Cellular Therapy	6. 最初と最後の頁 118.e1 ~ 118.e15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtct.2023.10.001	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 Ikeda Takashi, Sato Kazuya, Kawaguchi Shin-ichiro, Izawa Junko, Takayama Norihito, Hayakawa Hiroko, Umino Kento, Morita Kaoru, Matsumoto Kana, Ushijima Kentaro, Kanda Yoshinobu	4. 巻 212
2. 論文標題 Forodesine Enhances Immune Responses through Guanosine-Mediated TLR7 Activation while Preventing Graft-versus-Host Disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 143 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2300003	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 Minakata Daisuk, Fujiwara Shin ichiro, Morita Kaoru, Kanda Yoshinobu, et.al.	4. 巻 200
2. 論文標題 Relapsed and refractory multiple myeloma: A systematic review and network meta analysis of the efficacy of novel therapies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 694 ~ 703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.18654	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 Nagayama Takashi, Fujiwara Shin ichiro, Morita Kaoru, Kanda Yoshinobu	4. 巻 37
2. 論文標題 Early reversal of the lymphocyte to monocyte ratio after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with reduced relapse and improved prognosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Transplantation	6. 最初と最後の頁 e15116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ctr.15116	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 Nakano Hirofumi, Sato Kazuya, Izawa Junko, Takayama Norihito, Hayakawa Hiroko, Ikeda Takashi, Kawaguchi Shin-Ichiro, Mashima Kiyomi, Umino Kento, Morita Kaoru, Ito Ryoji, Ohno Nobuhiko, Tominaga Kaoru, Endo Hitoshi, Kanda Yoshinobu	4. 巻 8
2. 論文標題 Fatty Acids Play a Critical Role in Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Effector T Cells in Graft-versus-Host Disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 228 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/immunohorizons.2300115	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 Oyama Takashi, Morita Kaoru, Kanda Yoshinobu, et.al.	4. 巻 38
2. 論文標題 Effects of CD34 ⁺ cell dose on engraftment and long term outcomes after allogeneic bone marrow transplantation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Clinical Transplantation	6. 最初と最後の頁 e15313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ctr.15313	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 Oh Iekuni, Morita Kaoru, Kanda Yoshinobu, et.al.	4. 巻 137
2. 論文標題 Phase 2 trial of induction with dasatinib and consolidation with hyper-CVAD plus dasatinib followed by allografting for Ph-positive acute lymphoblastic leukemia in adults	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Leukemia Research	6. 最初と最後の頁 107438 ~ 107438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.leukres.2024.107438	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 Wakita Satoshi, Marumo Atsushi, Morita Kaoru, Kanda Yoshinobu, Yamaguchi Hiroki et.al.	4. 巻 114
2. 論文標題 Mutational analysis of <i>DNMT3A</i> improves the prognostic stratification of patients with acute myeloid leukemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1297 ~ 1308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15720	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 Yamamoto Chihiro, Minakata Daisuke, Morita Kaoru, Kanda Yoshinobu et.al.	4. 巻 140
2. 論文標題 Daratumumab in first-line therapy is cost-effective in transplant-eligible patients with newly diagnosed myeloma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 594 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021015220	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森田薫、海野健斗、仲宗根秀樹、森島聡子、神田善伸
2. 発表標題 Antibody-mediated immunity to DBY/HLA class II complex formation in chronic GVHD and GVL effect
3. 学会等名 第85回日本血液学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許権	発明者 森田薫、神田善伸、 海野健斗	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-079282	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------