

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591425

研究課題名(和文)同種造血幹細胞移植後の効率的免疫寛容の誘導法の開発

研究課題名(英文)The role of PD1 pathway on tolerance after allogeneic transplantation

研究代表者

谷本 光音(TANIMOTO, Mitsune)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10240805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚上皮細胞におけるPD-L1発現は移植直後が最も強くその後慢性GVHDが発症する時期には低下することが明らかとなった。次にPD-L1抗体を投与することにより慢性GVHDが悪化すること、さらにPD-L1ノックアウトマウスをレシピントにして移植することによりコントロール群と比べ有意に慢性GVHDが増悪することが明らかとなった。さらに血液系細胞か上皮系細胞に発現しているPD-L1のどちらが重要であるかは、キメラマウスを作製することによって検討した結果、上皮系細胞に発現しているPD-L1が重要であった。最後にagonistic PD-1抗体を使用して検討した結果、慢性GVHDが抑制された。

研究成果の概要(英文)：The results of this study show that the PD-1 pathway is important in the alleviation of chronic GVHD. Blockade of the PD-1 pathway using anti PD-1, anti PD-L1, or anti PD-L2 mAbs exacerbated chronic GVHD, and chimeric mice showed the importance of PD-L1 expression in host tissues in attenuating chronic GVHD. BMT into PD-L1 deficient recipients revealed IL-17+IFN-gamma+ T cell expansion and Am80 administration of Am80 overcame the IL-17+IFN-gamma+ T cell expansion caused by PD-L1 deficiency, resulting in reduced chronic GVHD damage in PD-L1 deficient recipients. Stimulation of the PD-1 pathway with an agonistic anti PD-1 mAb alleviated chronic GVHD, suggesting a new target for the prevention or treatment of chronic GVHD.

研究分野：移植免疫

キーワード：GVHD

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は、移植片対白血病効果 (GVL) により白血病に治癒をもたらす治療法として確立しているが、致死の合併症である移植片対宿主病 (GVHD) は今日なお克服すべき課題である。近年、移植前治療として行われる大量抗癌剤や放射線を減量することによって、従来では不可能であった高齢者への移植が可能となっている。加えて、HLA 不一致移植の普及に伴い移植件数は年々増加しており、GVHD 制御の重要性はさらに高まっている。

Programmed cell death1 (PD-1) は T 細胞などの免疫担当細胞に発現し、その ligand (PD-L1, PD-L2) によって抑制性のシグナルを細胞に伝えることが知られている。PD-L2 が樹状細胞、マクロファージになどの細胞にその発現が限られているのに対し、PD-L1 は血液細胞および血管内皮細胞、上皮系の細胞に広く分布し、自己免疫疾患においては血液細胞よりも非血液細胞における PD-L1 の発現が重要とされている。同種移植後の免疫寛容成立への PD-L1 の関与はいまだ不明である。我々はドナー T 細胞の上皮系細胞への障害が、PD-L1 の発現不良と、それに続く免疫寛容がうまく成立しないために慢性 GVHD が発症すると仮説した。

2. 研究の目的

慢性 GVHD を発症するマウス同種骨髄幹細胞移植モデルを使い、PD-1 抗体、PD-L1 抗体、PD-L2 抗体により PD-1 経路を blocking することにより慢性 GVHD への影響を検討する。また、本研究においては、マウス慢性 GVHD モデルで皮膚上皮細胞の PD-L1 の低下を明らかにしさらに PD1 による刺激が慢性 GVHD 治療となることを明らかにするのが目的である。

3. 研究の方法

マウス慢性 GVHD モデルには、最も汎用さ

れるドナーに B10.D2、ホストに BALB/c を使ったマイナー抗原不一致移植マウスモデルを用いる。慢性 GVHD が発症した皮膚上皮細胞から mRNA を抽出し RT-PCR にて発現を検討する。次に PD-1 抗体、PD-L1 抗体、PD-L2 抗体のいずれの抗体でも in vivo において PD-1 経路を blocking することにより慢性 GVHD が増悪するかと検討する。さらに PD-L1 欠損マウスを使い、PD-L1 が GVHD の病態に関与していることを明らかにするが、さらに血液系細胞か上皮系細胞に発現している PD-L1 のどちらが重要であるかは、キメラマウスを作製することによって検討する。つまり T 細胞を除去した骨髄のみを移植し 2 月間経過したマウスは、血液系細胞はドナーに、上皮系細胞はホスト由来のキメラとなる。このキメラマウスをレシピエントに使用することにより、両者の役割を明確にする。最後に PD1 のアゴニストにより慢性 GVHD が軽快することを明らかにする。

4. 研究成果

B10.D2 の大腿骨から採取した骨髄細胞から T 細胞 (CD90+) を autoMACS によって除き T 細胞除去骨髄幹細胞 (TCD BM 5x10e6) を用意。B10.D2 マウスの脾臓から T 細胞 (1x10e6) を採取し、レシピエント BALB/c に致死放射線 11Gy で前処置し、ドナー骨髄幹細胞および T 細胞を移植した。その結果慢性 GVHD が発生することを組織学的にも確認し、慢性 GVHD が発症した皮膚上皮細胞から mRNA を抽出し RT-PCR にて発現を検討した。PD-L1 発現、移植直後が最も強くその後慢性 GVHD が発症する時期に低下傾向であることが明らかとなった。次に PD-L1 抗体を投与することにより慢性 GVHD が悪化すること、さらに PD-L1 ノックアウトマウスをレシピエントにして移植することによりコントロール群と比べ有意に慢性 GVHD が増悪することが明らかとなっ

た。さらに血液系細胞か上皮系細胞に発現している PD-L1 のどちらが重要であるかは、キメラマウスを作製することによって検討した。つまり T 細胞を除去した骨髓のみを移植し 2 月間経過したマウスは、血液系細胞はドナーに、上皮系細胞はホスト由来のキメラとなる。このキメラマウスをレシピエントに使用することにより、上皮系細胞に発現している PD-L1 が重要であることを明らかにした。また、リンパ節と脾臓の細胞を解析した結果、慢性 GVHD の悪化には Th17 と Th1 細胞が関与していることを明らかにし、レチノイン酸 AM80 を投与することにより慢性 GVHD を抑制できることも明らかにした。最後に agonistic PD-1 抗体を使用して検討した結果、慢性 GVHD が抑制できることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1) Okamoto S, Fujiwara H, Nishimori H, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, Tanaka T, Yoshimura A, Tanimoto M, Maeda Y. Anti-IL-12/23 p40 antibody attenuates experimental chronic graft versus host disease via suppression of IFN- γ /IL-17-producing cells. *J Immunol*. 査読有 194: 2015, 1357–1363.

doi: 10.4049/jimmunol.1400973.

2) Fujiwara H, Maeda Y, Kobayashi K, Nishimori H, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, Tanaka T, Chen L, Azuma M, Yagita H, Tanimoto M. Programmed Death-1 Pathway in Host Tissues Ameliorates Th17/Th1-Mediated Experimental Chronic Graft-versus-Host Disease. *J Immunol*. 査読有 193(5): 2014 ;2565-73

doi: 10.4049/jimmunol.1400954

〔学会発表〕(計 4 件)

1) Taiga Kuroi, Sachiyo Okamoto, Kyosuke Saeki, Yujin Kobayashi, Hisakazu Nishimori, Hideaki Fujiwara, Ken-ichi Matsuoka, Nobuharu Fujii, Eisei Kondo, Mitsune Tanimoto, Yoshinobu Maeda. Anti-IL-12/23 p40 Antibody Attenuates Chronic Graft Versus Host Disease Via Suppression of IFN- γ /IL-17 -Producing Cells. American Society of Hematology 56th Annual Meeting, San Francisco USA. December 5, 2014

2) Fujiwara H, Maeda Y, Kobayashi K, Nishimori H, Nishinohara M, Okamoto S, Matsuoka K, Kondo E, Fujii N, Shinagawa K, Tanimoto M. PD-1 pathway of donors and recipients modulate chronic graft-versus-host disease through Th1 and Th17 in mouse model. 日本造血幹細胞移植学会 2014 3/7-9 沖縄

3) H Fujiwara, K Kobayashi, H Nishimori, M Nishinohara, S Okamoto, K Matsuoka, E Kondo, N Fujii, K Shinagawa, M Tanimoto and Y Maeda. Contribution of the PD-1-PD-L pathway to chronic graft-versus-host disease. (BMT Tandem Meetings) 2013 2/15-18 Salt Lake USA.

4) H Fujiwara, Y Maeda, K Kobayashi, H Nishimori, K Matusoka, M Azuma, Y Hideo, L Chen, and M Tanimoto. Host tissue PD-1 pathway contribute to murine chronic graft-versus-host disease via Th1+Th17+ cells. ASH 2013 12/6-10 New Orleans USA.

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 光音 (TANIMOTO Mitsune)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10240805

(2) 研究分担者

前田 嘉信 (MAEDA, Yoshinobu)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：60403474

(3) 連携研究者

()

研究者番号：