

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860775

研究課題名(和文)造血幹細胞移植後の免疫病態に関する自然免疫活性化の新規メカニズム

研究課題名(英文)Innate immune signals in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

白鳥 聡一 (SHIRATORI, Souichi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：00645905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫活性化シグナルが移植片対宿主病(GVHD)に及ぼす影響を検討し、ドナーT細胞内のMyD88分子がGVHDの重症化に必要であることを突き止めた。MyD88の上流の分子を単独で欠損させてもGVHDは影響を受けないので、GVHDを予防するためにはMyD88を阻害してこれらの上流分子からのシグナルをまとめて阻害する必要がある。MyD88シグナルが欠損したT細胞は、Th1への分化能が強く障害されている事が判明した。MyD88欠損T細胞は有意な抗白血病効果を発揮できるので、MyD88阻害剤は同種造血幹細胞移植後のGVHD予防・治療に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Among several innate immune signaling molecules, MyD88 in donor T cells were critical for the maximization of graft versus host disease (GVHD) after murine allogeneic bone marrow transplantation. T cells lack of single upstream molecules of MyD88 caused equivalent GVHD compared to wild type T cells, indicating that an overall blockade of MyD88-dependent signals in T cells are required for GVHD amelioration. MyD88 deficient T cells showed severely impaired Th1 response compared to wild type T cells upon CD3/CD28 stimulation and allogeneic stimulation. MyD88 deficient donor T cells exerted significant graft versus leukemia effects, suggesting that MyD88 inhibitor is a promising therapeutic reagent against GVHD in clinical transplantation.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：造血幹細胞移植 移植片対宿主病 GVHD 移植片対白血病効果 Toll Like Receptor MyD88 白血病
T細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 自然免疫は、従来は非特異的な免疫応答と考えられていたが、Toll-like receptor (TLR) の発見以降、病原体を構成する分子の一部をパターン認識受容体が認識し、細胞内にシグナルが伝達され、抗病原体反応に関与する分子の発現が上昇し、自然免疫系が活性化される機構が明らかとなってきた。

(2) 申請者が従事してきた造血幹細胞移植における自然免疫系の関与については、TLR や Nod-like receptor の移植片対宿主病 (Graft-versus-host disease, GVHD) への関連性を中心にいくつかの報告が認められるが^{1,2,3}、詳細なメカニズムの解明には至っていない。しかしながら、申請者がこれまで研究を進めてきた種々の自然免疫活性化シグナルは、造血幹細胞移植後に発症する各種病態 (GVHD、各種感染症等) に密接に関与している可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

造血幹細胞移植後の GVHD などの免疫学的病態と、パターン認識受容体を介して活性化される自然免疫系との関連性を、自然免疫関連分子のノックアウトマウス等を用いたマウスの移植モデルで研究し、分子生物学的研究を用いた網羅的解析によってその詳細な機序を解明し、自然免疫系の制御という観点から革新的な予防・治療への開発研究へと展開する。

(1) **GVHD における自然免疫関連分子の役割の詳細な解析**: 各種 TLR やアダプター分子等のノックアウトマウスを用いてマウスの同種移植を行い、移植後の GVHD の重症度や生存を検討する。

(2) **自然免疫関連分子が T 細胞活性化に及ぼす影響を解析する**: 上記(1)の実験で、GVHD の重症度に影響を及ぼす事が判明した分子がドナー T 細胞の活性化に及ぼす影響を検討する。

(3) **自然免疫関連分子が移植後の抗白血球病効果に及ぼす影響を検討する**: 上記(1)で判明した分子のノックアウトマウスを用いて、移植後の抗白血球病効果が影響を受けるか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1) **マウスの同種骨髄移植**: レシピエントである B6D2F1 マウスに、全身放射線照射 (12Gy) で前処置を行い、ドナーマウスである C57BL/6 マウスから採取した骨髄細胞 5×10^6 個と脾細胞 5×10^6 個を輸注する。GVHD の重症度は Clinical GVHD スコア⁴ で評価し、毎日生存を確認する。マウスの白血球細胞である P815 を移植時に、10000 個輸注しマウスの生存を観察する。死亡時に解剖し、肝臓・脾臓の腫大、腫瘍性病変の有無をみて腫瘍死か否かの判定をする。

(2) **T 細胞の活性化**: マウスの T 細胞をリンパ節または脾臓から FACS ソーティングにて純化する。 1×10^5 個の細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、細胞分裂、生存細胞数、サイトカイン産生等を評価する。

(3) **移植後の T 細胞プロファイルの検討**: 移植後 7 日目に、レシピエントの脾臓から T 細胞を FACS ソーティングで純化し、PMA/Ionomycin で 6 時間刺激後に細胞内 IFN- γ 、IL17、IL4 などを染色する。また、純化した T 細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイを行って T 細胞のプロファイルを検討する。

4. 研究成果

(1) **ドナー T 細胞内の MyD88 分子が GVHD の重症化に必要である**: 申請書で述べた通り、TRIF/MyD88^{-/-} T 細胞を移植すると、GVHD が重症化しないという結果に基づき、さらにメカニズムの追求を行った。まず、T 細胞の TRIF と MyD88 のどちらが GVHD の重症化に関与するのかを解明するため、TRIF または MyD88 を単独欠損する T 細胞を野生型の骨髄細胞とともに移植したところ、MyD88 単独欠損の T 細胞を移植したマウスのみ GVHD が重症化しなかった (図 1)。これによって、T 細胞中の TRIF ではなく MyD88 が GVHD の重症化に必要である事が世界で初めて証明された事になる。さらに T 細胞中の MyD88 の重要性を確認するため、野生型の T 細胞とともに MyD88 を欠損する骨髄細胞を移植したところ、GVHD は野生型の骨髄および T 細胞を移植したコントロール群と同等に重症化した。これにより、骨髄細胞ではなく T 細胞中の MyD88 分子が GVHD の重症化に必要である事が示された。現在、MyD88 の阻害剤の開発がすすめられているが、本研究結果は臨床の移植後の GVHD 予防に MyD88 阻害剤が有望である事を示している。

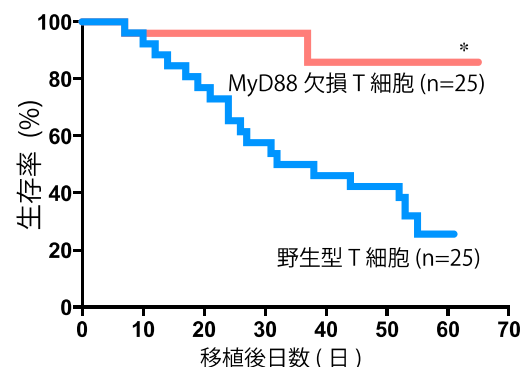


図 1. ドナー T 細胞内の MyD88 は GVHD の重症化に必要である

(2) **T 細胞は TLR2, 7, 9 等を発現しているが、これらの分子の単独欠損では GVHD の重症度は変化しない**: 純化した T 細胞から抽出した mRNA を用いて、MyD88 に関連する TLR やサイトカインレセプターの発現を検討したところ、T 細胞は TLR2, TLR7, IL-1 β レセプター、IL-18レセプターを発現していた。また TLR9 もわずかに

発現していた。T細胞上のIL-18レセプターの欠損ではGVHDは軽快せず、IL-1βレセプターの欠損では、わずかにGVHDが軽症化する事が分かっているが⁵、各TLRがGVHDに及ぼす影響についてはこれまで検討されていない。まずTLR2, TLR7, TLR9のリガンドを用いて、in vitroでT細胞を活性化させるとTLR2とTLR7では軽度の活性化増強効果が見られた。そこで、TLR2およびTLR7の単独欠損T細胞を純化して、野生型の骨髄細胞とともに移植したところ、GVHDは野生型の骨髄およびT細胞を移植したコントロールマウスと同等に重症化した。本実験により単独のTLRやサイトカインのシグナル阻害ではGVHDを軽症化させる事は不可能であり、それらをまとめて欠損させる事ができるMyD88シグナルの阻害によってのみGVHDの予防効果が得られる事が判明した。これらの結果は、自然免疫関連分子の阻害によるGVHD予防を考える上で、非常に重要な知見である。

(3) ドナーT細胞内のMyD88が欠損すると、ドナーTh1およびTh17細胞の分化が阻害され、制御性T細胞が増加する: MyD88を欠損するT細胞を純化し、in vitroでCD3/CD28抗体を用いて刺激したところ、Th1細胞の分化が有意に障害されていた。移植後7日目に、レシピエントの脾細胞からドナーT細胞を純化して、再刺激したところ、MyD88欠損ドナーT細胞を移植したマウスでは、野生型のT細胞を移植したマウスと比較して、やはりTh1の分化が非常に強く障害されていることが判明した。また、同時にTh17の分化も障害されており、制御性T細胞が有意に増加していた。これらの変化がおこるメカニズムを解明するため、移植後7日目にレシピエントから純化したドナーT細胞のRNAを抽出してマイクロアレイを行った。野生型のドナーT細胞とMyD88欠損T細胞を比較したところ、いくつかのpathwayに大きな変化が生じている事が判明した。これらの結果は、自然免疫とT細胞活性化をつなぐ重要なメカニズムを示唆しているものであるが、論文発表前に詳しく述べる事はできない。

(4) MyD88欠損T細胞は移植後の抗白血病効果を発揮する事が可能である: 白血病に対する同種骨髄移植の主たる目的は、ドナーT細胞による白血病細胞の駆逐である。MyD88欠損T細胞は、GVHDを重症化しなかったが、もし抗白血病効果を発揮できないのであれば、MyD88の阻害剤は、白血病に対する臨床の移植では使用しにくい。MyD88欠損T細胞と野生型骨髄細胞に加えて、レシピエント由来の白血病細胞を少数接種してみた。本実験では、抗白血病効果を発揮しないコントロールとして、野生型骨髄細胞のみを移植してT細胞を移植しない群を作製した。予想通りこの骨髄移植のみの群では、白血病によって全てのマウスが早期に死亡した。興味深い事に、MyD88欠損T細胞と野生型骨髄細胞を移植したマウスでは、野生型のT細胞および骨髄細胞を移植した群よりは弱いものの

有意な抗白血病効果をしめした。GVHDが軽症化したため、総合的にみるとMyD88欠損T細胞を移植したマウスの方が、野生型T細胞を移植したマウスと比較して生存率が改善していた。これらの結果は、臨床の移植後にMyD88阻害剤でGVHD予防をしても抗白血病効果が発揮される事をしめしており、MyD88阻害剤の臨床応用を考えるうえで、非常に重要な結果である。

[引用文献]

1. Elmaagacli, A. H. *et al.* Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. *Transplantation* 2006, 81, 247-254.
2. Morecki, S. & Slavin, S. Immunoregulation of GVHD by triggering the innate immune system with CpG. *Expert Rev Hematol.* 2009, 2, 443-453.
3. Penack, O., Holler, E. & van den Brink, M. R. M. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood* 2010, 115, 1865-1872.
4. Cooke, K. R. *et al.* An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 1996, 88, 3230-3239.
5. Jankovic, D. *et al.* The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2013, 210, 1899-1910.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 7 件)

1. Shiratori S (他 15 人, 最初). Ultra-high level of serum soluble interleukin-2 receptor at diagnosis predicts poor outcome for angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015 online. 査読有. doi: 10.3109/10428194.2014.1001985.
2. Tsutsumi Y, Shiratori Y (他 4 人, 5 番目). Analysis of the influence of dabigatran on coagulation factors and inhibitors. *Int J Lab Hematol.* 2015, 37(2): 225-30. 査読有, doi: 10.1111/ijlh.12270.

3. Yutaka T, Souichi S (他 5 人, 6 番目). Sustained CD4 and CD8 lymphopenia after rituximab maintenance therapy following bendamustine and rituximab combination therapy for lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015 online. 査読有, doi: 10.3109/10428194.2015.1026818.

4. Shiratori S (他 15 人, 最初). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation following reduced-intensity conditioning for mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Hematol Oncol*. 2014 online. 査読有, doi: 10.1002/hon.2162.

5. Shono Y, Shiratori S, (他 15 人, 2 人目). Bone marrow graft-versus-host disease: evaluation of its clinical impact on disrupted hematopoiesis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014, 20(4): 495-500. 査読有. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.12.568.

6. Shiratori S. (他 12 人, 最初). Stenotrophomonas maltophilia infection during allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience. *Clin Transplant*. 2014, 28(6): 656-61. 査読有. doi: 10.1111/ctr.12356.

7. Shiratori S (他 11 人, 最初). Successful engraftment in HLA-mismatched bone marrow transplantation despite the persistence of high-level donor-specific anti-HLA-DR antibody. *Transplantation*. 2013, 96(5): e34-44. 査読有. doi: 10.1097/TP.0b013e31829f7595.

【学会発表】(計 5 件)

1. 大東寛幸, 白鳥聡一 (他 2 人, 2 人目). タクロリムス徐放剤を用いた GVHD 予防法による造血幹細胞移植の成績. 第 37 回日本造血細胞移植学会総会, 2015/3/5-7, 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市).

2. 白鳥聡一. A retrospective analysis of AITL in Hokkaido: Clinical impact of sIL-2R as a prognosis factor. 第 76 回日本血液学会学術集会, 2014/10/31-11/2, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市).

3. 白鳥聡一. 菌状息肉症に対する同種造血幹細胞移植の後方視的解析 –更なる移植成績の向上に向けて-. 第 36 回日本造血細胞移植学会総会, 2014/3/7-9, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県・沖縄市).

4. 白鳥聡一. TPO 受容体作動薬エルトロンボパグにより生じた骨髄線維症の病態 –ITP 症例における解析-. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013/10/11-13, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館 (北海道・札幌市).

5. Shiratoti S. Stenotrophomonas maltophilia infection during allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 第 18 回欧州血液学会, 2013/6/13-16, ストックホルム (スウェーデン).

【その他】

ホームページ (研究成果)

<http://www.hokudai-hematology.jp/medical/result/s/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

白鳥 聡一 (SHIRATORI, Souichi)

北海道大学大学院医学研究科・特任助教

研究者番号: 00645905