

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461451

研究課題名(和文) MEK阻害剤を用いた移植後GVHDの選択的抑制と感染・腫瘍免疫の温存

研究課題名(英文) MEK inhibitors selectively suppress GVHD while sparing antitumor and antiviral immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

進藤 岳郎 (Shindo, Takero)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10646706

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)：造血幹細胞移植後の移植片対宿主病(Graft-versus-Host Disease: GVHD)および抗腫瘍免疫(Graft-versus-Tumor Effects: GVT効果)の制御におけるMEK阻害剤の作用につき、マウスで検証した。複数のマウスモデルで新規MEK阻害剤トラメチニブはGVHDをよく抑制したが、GVT効果を温存することを確認した。これは既存のカルシニューリン阻害剤がGVT効果を減弱したのと対照的で、トラメチニブの優位性が証明された。この結果は2016年7月にJCI Insight誌に論文として掲載され、多くのメディアで報道された。現在はヒトでの治験に向け、準備中である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of MEK inhibitors in regulation of graft-versus-host disease (GVHD) and graft-versus-tumor (GVT) effects after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. We confirmed that a MEK inhibitor trametinib suppresses GVHD while sparing GVT effects in several different murine bone marrow transplant models. Meanwhile, the calcineurin inhibitor tacrolimus abrogated GVT effects, which confirmed the priority of trametinib. These results were published as a research article in JCI Insight in 2016 July, and were widely broadcasted. Currently, we are concentrating to design and start a clinical trial in humans with trametinib.

研究分野：血液内科学

キーワード：造血幹細胞移植 移植片対宿主病 抗腫瘍免疫 抗ウイルス免疫 MEK阻害剤 免疫抑制剤

1. 研究開始当初の背景

(1) 同種造血幹細胞移植で移植片対宿主病 (Graft-versus-host disease: GVHD) を抑制しつつ、抗腫瘍免疫 (Graft-versus-Tumor: GVT 効果) や抗ウイルス免疫を温存する戦略は未確立である。実際複数の免疫抑制剤を投与された移植患者は原疾患の再発や致死的な日和見感染症を来すことが多く、深刻なアンメットニーズとなっている。

(2) T細胞はその機能分化段階により、naïve および central memory/effector memory の3分画に分類され、ドナー由来 naïve および central memory T細胞が GVHD のトリガーとなり、effector memory T細胞が抗ウイルス免疫や GVT 効果を担う。よって naïve および central memory T細胞だけを選択的に抑制し、その一方で effector memory T細胞を温存できれば、GVHD を抑制しつつ、抗ウイルス免疫と GVT 効果を温存できる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 申請者は、MEK 阻害剤が上記の選択的免疫抑制を可能にすることを見出した (Shindo, Kim, et al. *Blood* 2013)。この発見に基づき、新規 MEK 阻害剤トラメチニブが GVHD を抑制するか、マウス骨髄移植モデルで検証した。

(2) 上記モデルにおいて、トラメチニブが GVT 効果を温存するか、合わせて検証した。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6 (B6) マウスの骨髄と T細胞を B6D2F1 (BDF1) マウスに輸注するモデルを作成した (BDF1 モデル)。Major MHC は半合致 (B6: H2^{b/b}->BDF1: H2^{b/d}) であり、BDF1 マウスは下痢や体重減少といった GVHD 徴候を発症する。本モデルにおいてトラメチニブを経口投与し、GVHD の軽減がみられるか、解析した。

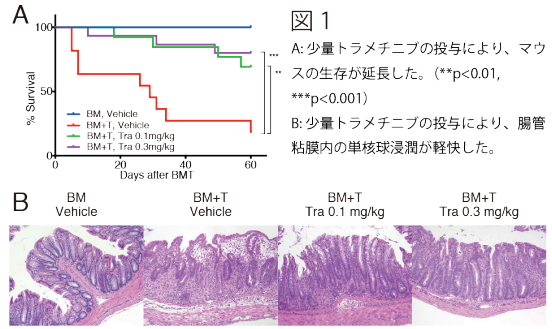
(2) B10.D2 マウスの骨髄と T細胞を Balb/c マウスに輸注するモデルを作成した。本モデルは minor MHC のミスマッチを有し、皮膚の乾燥や脱毛など、特徴的な GVHD 徴候を来す。本モデルにおいても一定期間トラメチニブを経口投与し、徴候が抑制されるか、解析した。

(3) (1) の移植において、骨髄と同時に P815 細胞株 (H2^{d/d}) を輸注した。レシピエントである BDF1 マウスは P815 を拒絶できないが、ドナーである B6 由来の T細胞は P815 を傷害する。すなわち本モデルでは、GVT 効果を観察できる。本モデルでトラメチニブが GVHD のみならず GVT 効果にどう作用するか、解析した。

4. 研究成果

(1) トラメチニブは BDF1 モデルにおいて腸管 GVHD を抑制する。

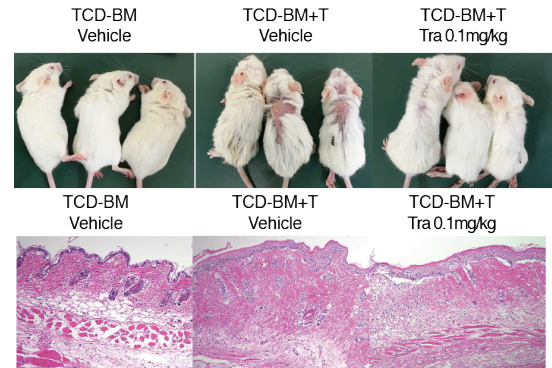
BDF1 モデルで 0.1 ないし 0.3mg/kg のトラメチニブを 30 日間にわたって経口投与したところ、下痢や体重減少が有意に軽減され、結果として生存率が向上した。末梢血中 T細胞において ERK1/2 のリン酸化レベルは抑制され、腸管粘膜における単核球浸潤や極性の乱れが軽減された (図 1)。



(2) トラメチニブは皮膚 GVHD を抑制する。

B10.D2->Balb/c モデルで 0.1 ないし 0.3mg/kg のトラメチニブを 30 日間投与すると、day 50 以降の脱毛や体重減少が軽減され、真皮における単核球浸潤も軽快した (図 2)。また興味深いことに、骨髄における B細胞の生着が促進された。

図 2: トラメチニブの投与により脱毛が軽快し、皮膚の単核球浸潤が軽快した。



(3) 高用量トラメチニブは顆粒球の生着を抑制するが、低用量トラメチニブは認容される。

BDF1 モデルで 2.0mg/kg のトラメチニブを 30 日間投与すると、顆粒球の生着遅延と myeloid suppressor cell の抑制を認め、生存率も低下したが、0.1mg/kg の投与ではこの現象はみられなかった。in vitro でトラメチニブを添加したとき、濃度依存性に顆粒球のコロニー形成が抑制されたことから、過量のトラメチニブは造血幹細胞移植で有害な作用を持つが、適量であれば認容されると考えられた。

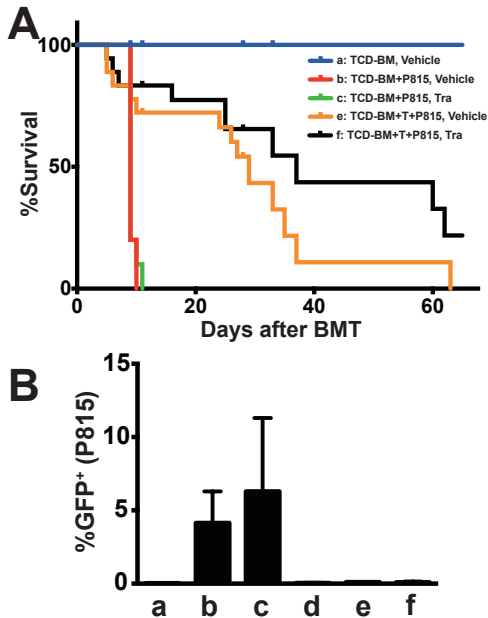
(4) トラメチニブは制御性 T細胞を枯渇させない。

BDF1 モデルでは GVHD の発症時に制御性 T細胞の比率が低下するが、トラメチニブの投与時にその比率は維持された。すなわちトラ

メチニブは制御性T細胞の枯渇を促進することはなく、そのことは移植において有利であると考えられた。

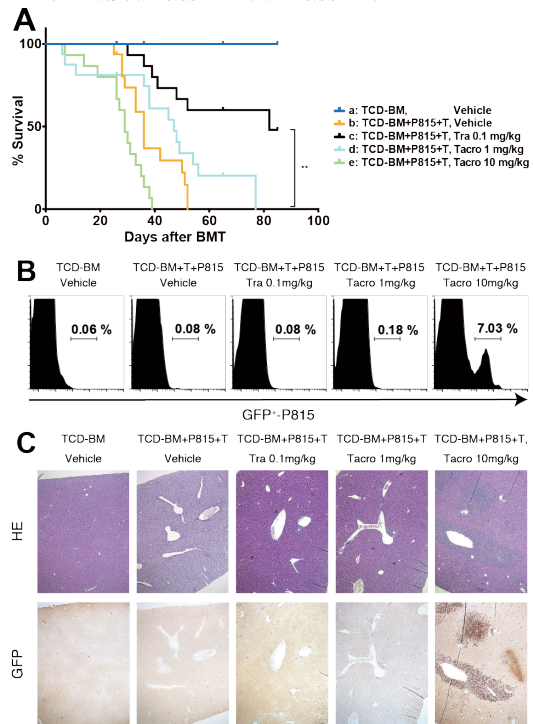
(5) トラメチニブはGVT効果を温存する。P815を輸注したBDF1モデルで、30日間にわたってトラメチニブを投与した。B6由来の骨髓細胞のみを輸注したマウスはP815の増殖により早期に腫瘍死するが、B6由来のT細胞を同時に輸注するとGVT効果により生存の延長をみる。ここにトラメチニブを投与したとき、生存はむしろさらに延長し、GVHD徴候も軽減した。トラメチニブを投与したマウスの肝臓や脾臓でP815細胞株は検出されなかったことから、トラメチニブはGVT効果を温存しつつ、GVHDを軽減すると考えられた(図3)。

図3: BDF1モデルでGFP陽性P815細胞株を輸注してトラメチニブを投与したとき、P815細胞の増殖はみられず、マウスの生存は延長する。A: 生存率、B: 脾臓内GFP陽性細胞



(6) 高用量タクロリムスはGVT効果を減弱するが、低用量トラメチニブは温存する。最後に、トラメチニブの効果を既存のカルシニューリン阻害剤であるタクロリムスと比較した。(5)と同じモデルで、低用量および高用量タクロリムスと低用量トラメチニブを30日間投与した。対照群に比して低用量トラメチニブの投与はわずかにGVHD徴候を軽減したが、生存延長効果は明らかではなかった。次に高用量タクロリムスはむしろ生存を短縮し、肝脾にP815細胞の増殖を認めたことから、高用量タクロリムスはGVT効果を減弱すると考えられた。一方低用量トラメチニブを投与されたマウスではP815細胞の増殖を認めず、GVHD徴候も軽減されたことから、トラメチニブはGVHDの選択的抑制とGVT効果の温存を可能にすると考えられた(図4)。

図4: BDF1モデルでP815細胞株を輸注して高用量タクロリムス(Tac)を投与すると、GFP陽性P815細胞の増殖によりレシビエントマウスは早期に死亡する。一方低用量トラメチニブの投与時にP815の増殖はみられず、GVHD徴候も抑制される。A: 生存率、B: 脾臓内GFP染色、C: 肝臓GFP染色



総じて本研究により、新規MEK阻害剤トラメチニブがマウスモデルでGVHDをよく抑制する一方、GVT効果を温存することが示された。この効果は既存のカルシニューリン阻害剤タクロリムスでは得られないもので、ヒトの造血幹細胞移植でGVHD抑制のためにトラメチニブを投与するrationaleが得られたと考えている。

[引用文献]

Itamura H, **Shindo T***, Tawara I, Kubota Y, Kariya R, Okada S, Komanduri KV, **Kimura S**. “The MEK inhibitor trametinib separates murine Graft-versus-Host Disease from Graft-versus-Tumor Effects.” *JCI Insight* 1(10); e86331: 2016 (*corresponding author)

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17件)

- ① Itamura H, **Kubota Y**, **Shindo T**, Ando T, Kojima K, **Kimura S**. “Elderly patients with chronic myeloid leukemia benefit from a dasatinib dose as low as 20 mg.” *Clin Lymph Myeloma Leuk*, in press

- ② Akutagawa T, **Shindo T***, Yamanouchi K, Hayakawa M, Ureshino H, Tsuruoka N, Sakata Y, Shimoda R, Noguchi R, Furukawa K, Morita S, Iwakiri R, **Kimura S**, Matsumoto M, Fujimoto K. “Persistent Gastrointestinal Angiodysplasia in Heyde’s syndrome after aortic valve replacement.” *Intern Med*, in press
- ③ Ureshino H, **Shindo T**, Tanaka H, **Kimura S**. “Chronic myelogenous leukemia and NK cell immunity.” *Rinsho Ketsueki*, in press
- ④ Fuji S[#], **Shindo T[#]**. “Friend or foe? Mogamulizumab in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult T-cell leukemia.” *Stem Cell Investig* 3; 70: 2016 ([#]equally contributed)
- ⑤ Itamura H, **Shindo T***, Tawara I, **Kubota Y**, Kariya R, Okada S, Komanduri KV, **Kimura S**. “The MEK inhibitor trametinib separates murine Graft-versus-Host Disease from Graft-versus-Tumor Effects.” *JCI Insight* 1(10); e86331: 2016
- ⑥ Ureshino H, **Shindo T***, Nishikawa H, Watanabe N, Watanabe E, Satoh N, Kitaura K, Kitamura H, Doi K, Nagase K, Kimura H, Samukawa M, Kusunoki S, Miyahara M, Shin-I T, Suzuki R, Sakaguchi S, **Kimura S**. “Effector regulatory T cells reflect the equilibrium between antitumor immunity and autoimmunity in adult T cell leukemia.” *Cancer Immunol Res* 4(8); 644-9: 2016
- ⑦ Kitamura H, **Shindo T***, Yakushiji Y, Yoshihara M, Eriguchi M, **Kubota Y**, Noguchi T, **Kimura S**. “Domino-style cerebral bleeding in a patient with immune thrombocytopenic purpura.” *JAMA Neurology* 73(4); 474-5: 2016
- ⑧ Ureshino H, Nishioka A, Kojima K, Kizuka H, Sano H, **Shindo T**, **Kubota Y**, Ando T, **Kimura S**. “Subdural hematoma associated with dasatinib and intrathecal methotrexate treatment in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia” *Intern Med*, 55(18); 2703-6: 2016
- ⑨ Ureshino H, Nishioka A, Kojima K, Suzuki M, Kizuka H, Sano H, **Shindo T**, **Kubota Y**, Ando T, **Kimura S**. “Rituximab-induced acute thrombocytopenia in high tumor burden follicular lymphoma.” *Intern Med* 55(15); 2061-4: 2016
- ⑩ **Shindo T**, **Kimura S**. “Immune defects in multiple myeloma.” *Nippon Rinsho* 73(1); 52-56: 2015
- ⑪ Kamachi K, Fukushima N, Ando T, Sato K, Ohshima K, Yokoo M, **Shindo T**, **Kubota Y**, Kojima K, **Kimura S**. “Coexistence of ALK- anaplastic large cell lymphoma and CD4⁺ T cell large granular lymphocytic leukemia.” *Ann Hematol* 94(3); 539-540: 2015
- ⑫ Yoshihara M, Itamura H, Fukushima N, Itoh M, Furukawa D, Nagatomo D, Kamachi K, Kitamura H, **Shindo T**, **Kubota Y**, Sueoka E, Morita S, Ichinohe T, **Kimura S**. “Therapeutic management in cardiac lymphoma.” *Leuk Lymphoma* 55(5); 1215-7: 2014

- ⑬ Fuji S, **Shindo T**. “T-cell characterization using multicolor flow cytometry after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation.” *J Clin Oncol* 32(17); 1859-1860: 2014
- ⑭ **Shindo T**, Kim TK, Benjamin CL, Wieder ED, Levy RB, Komanduri KV. “MEK inhibitors selectively suppress alloreactivity and graft-versus-host disease in a memory stage-dependent manner.” *Blood* 121(23); 4617-26: 2013 (Plenary paper with associated editorial)
- ⑮ Zhang J, Ramadan AM, Griesenauer B, Li W, Tumer MJ, Liu C, Kapur R, Hanenberg H, Blazar BR, **Tawara I**, Paczesny S. “ST2 blockade reduces sST2-producing T cells while maintaining protective mST2-expressing T cells during graft-versus-host disease.” *Sci Transl Med* 7; 308a160: 2015
- ⑯ Choi SW, Gatz E, Hou G, Sun Y, Whitfield J, Song Y, Oravec-Wilson K, **Tawara I**, Dinarello CA, Reddy P. “Histone deacetylase inhibition regulates inflammation and enhances Tregs after allogeneic hematopoietic cell transplantation in humans.” *Blood* 125; 815-9: 2015
- ⑰ Choi SW, Braun T, Chang L, Ferrara JL, Pawarode A, Magenau JM, Hou G, Beumer JH, Levine JE, Goldstein S, Couriel DR, Stockerl-Goldstein K, Krijanovski OI, Kitko C, Yanik GA, Lehmann MH, **Tawara I**, Sun Y, Paczesny S, Mapara MY, Dinarello CA, DiPersio JF, Reddy P. “Vorinostat plus tacrolimus and mycophenolate to prevent graft-versus-host disease after

related-donor reduced-intensity conditioning allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 trial.” *Lancet Oncol* 15; 87-95: 2014

[学会発表 (国際学会に限る)] (計 4 件)

- ① **Shindo T**, Kusunoki Y, Kitaura K, Nishikawa H, Watanabe N, Ureshino H, Miyahara M, Watanabe T, Sueoka E, Espinoza LJ, Takami A, Ichinohe T, Suzuki R, Tanaka H, Saji H, **Kimura S**. “TCR Repertoire, Effector Regulatory T cells and KIR Genotyping Uncover Immunological Dynamics in Mogamulizumab-treated ATL” The 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses (2017 March, Tokyo)
- ② **Shindo T**. “The MEK inhibitor trametinib selectively suppresses GVHD, while sparing GVT and antiviral immunity.” **Invited talk at the 7th Japanese Society of Hematology (JSH) International Symposium (Plenary Session)**; Awajishima Yumebutai on May 14, 2016
- ③ Itamura H, **Shindo T**, **Tawara I**, Kariya R, **Okada S**, Komanduri KV, **Kimura S**. “The MEK inhibitor trametinib selectively suppresses GVHD, while sparing GVT effects.” *Biol Blood Marrow Transplant* 21(2); S333-334: 2015 (American Society of Bone Marrow Transplantation (ASBMT), 2015 Feb, San Diego, USA)
- ④ Wieder ED, Kolonias D, Benjamin CL, **Shindo T**, Kim TK, Levy RB, Komanduri KV. “Trametinib selectively inhibits alloreactivity while sparing virus-specific T cells.” *Biol Blood*

Marrow Transplant 20(2); S283: 2014
(American Society of Bone Marrow
Transplantation (ASBMT), 2014 Feb,
Grapevine, 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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
佐賀大学血液・呼吸器・腫瘍内科ウェブサイト
<http://www.saga-hor.jp/main/171.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

進藤 岳郎 (SHINDO, Takero)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：10646706

(2) 研究分担者

木村 晋也 (KIMURA, Shinya)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：80359794

(3) 連携研究者

岡田 誠治 (OKADA, Seiji)
熊本大学・医学研究科・教授
研究者番号：50282455

(4) 連携研究者

久保田 寧 (KUBOTA, Yasushi)
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号：60570413

(5) 連携研究者

俵 功 (TAWARA, Isao)
三重大学・医学部・助教
研究者番号：80378380