

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09954

研究課題名(和文) 移植超急性期からの能動的Treg増幅を可能とする新しい免疫制御アルゴリズムの開発

研究課題名(英文) Development of a novel algorithm for immune regulation that enables the active Treg amplification soon after HSCT

研究代表者

松岡 賢市 (Matsuoka, Ken-ichi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90432640

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)：本研究では、PTCy移植後の免疫制御アルゴリズムを実験的に検討した。臨床移植をモデル化した担癌マウス実験系を用い、PTCy減量によりGVLを強化できる、PTCy減量により低下するGVHD抑制活性はNKTリガンド投与による能動的Treg増幅で補償される、ことを明らかにした。さらに細胞・遺伝子解析から、このリガンド投与は効率的に免疫寛容性NKT2型へ分化させる一方で向炎症性NK-like-NKT1型への分化を抑制し、Treg増幅を促進することが示された。これらの結果は、特に潜在的な再発リスクのある患者に対してPTCy移植を最適化するための新しい免疫アジュバント療法開発の端緒となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植後シクロフォスファミド法(PTCy法)は、HLA半合致移植においても効率的な急性GVHD予防を可能とし、今後はHLA適合移植にもその適用が拡大すると考えられる。この一方で、低い移植関連合併症に比して、特に非寛解患者における移植後再発が懸念されている。今回われわれは、特に再発リスクのある患者のPTCy移植の最適化を臨床的命題として検討し、PTCy減量およびPTCy後のアンジュバント投与によって、超急性期からのTreg増幅を基盤としてGVHD/GVLバランスを変容させ、患者個別的に調整できる可能性を実験的に示した。今後の移植適応の拡大、安全性の向上に資する基礎的知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the immune control algorithm after PTCy-based transplantation. Using a tumor-bearing murine BMT system that models clinical transplantation, we demonstrated that (1) graft-versus-leukemia effect can be enhanced by PTCy reduction, and (2) reduced GVHD suppressive activity after PTCy reduction is compensated by active Treg amplification by NKT ligand administration. Furthermore, cellular immunological and gene-expression analysis clarified that administration of the ligand efficiently promote differentiation into tolerogenic NKT2 phenotype while suppressing differentiation into proinflammatory NK-like-NKT1 phenotype, which could promote Treg amplification. These results indicate that the combination of PTCy and NKT-ligand therapy could provide a novel immunoadjuvant therapy to optimize PTCy transplantation, especially in patients at potential risk of disease relapse.

研究分野：血液内科学 造血幹細胞移植学

キーワード：造血幹細胞移植 移植片対宿主病 制御性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植(Hematopoietic stem cell transplantation: HSCT)は、血液癌の根治療法として、多くの難治疾患患者の治療に貢献している。支持療法の進歩、ドナーソースの多様化を背景に、これまで移植の適用とならなかった高齢症例や非寛解症例など、移植片対宿主病(GVHD)のリスクの高い移植が増えており、GVHDを必要十分に管理しつつ、移植片対白血病効果(GVL effect)を最大化する免疫制御が求められる。この観点において、マウス骨髄移植モデルにてGVHDを抑制しながらもGVLを減じない対象選択的な働き(Matsuoka et al, Blood 2006)が報告されている制御性T細胞(Regulatory T cell; Treg)の移植後再構築は、移植後生存のみならず、免疫合併症のない質の高い治癒を目指す上で、極めて重要なポイントである。

我々は、慢性GVHD患者の臨床検体の解析から、移植後環境下でのTregの生体内恒常性(ホメオスタシス)の異常が、慢性GVHDを発症させる要因であることを明らかにし(Matsuoka et al, JCI 2010)、さらにこの恒常性異常をインターロイキン2(IL-2)の低用量投与により可逆的に回復させることで慢性GVHDの臨床症状を改善できること示した(Koreth, Matsuoka et al, NEJM 2011、Matsuoka et al, Science TM 2013)。この一連の結果は、従来の薬物療法に不応である難治性GVHD症例には、Tregの積極的増幅により寛容導入を図るという治療戦略の妥当性が示すものである。

今後、さらに長期的にQOLの保持された治癒を目指すためには、移植後急性期からTreg回復を強く駆動させる免疫管理が必要である。しかしながら、サイトカインストームが遷延し活性化T細胞の残存が多い移植後超急性期においてはIL-2単独によるTreg選択的刺激は困難であり、新たな免疫戦術の考案が求められる。豊嶋らはマウスモデルでNKT細胞のリガンドである $\alpha$ -GalCerの移植直後単回投与はホストNKT細胞を介して急性GVHDを抑制することを示した(図1.Hashimoto et al, JI 2005)。この免疫寛容効果はドナーTregの効率的な急性期増幅を基礎としていることが明らかとなり(Pillai et al. Blood 2009, Duramad et al. BBMT 2011)。 $\alpha$ -GalCerは、急性期における新たなTregホメオスタシス制御法として期待が持たれる。

これらの基礎データを基に、石井らは $\alpha$ -GalCerの免疫抑制効果をより強化することを可能とするリポゾーマル化 $\alpha$ -GalCer(以下、Lipo-GC)を開発し、米国においてLipo-GCの移植後単回投与療法の第I/IIa相臨床試験を実施した(NCT01379209)。この試験では、Lipo-GCの高い安全性と忍容性が確認されるとともに、急性GVHD発症抑制とTreg増幅に関連性が見出だされており、これまでの実験的移植からの知見が臨床移植においても再現しうることを示す、今後に期待が持たれる結果となった(Yi-Bin Chen et al. EBMT 2016)。

一方、本臨床試験において、大きなTreg増幅が見られたのは、Lipo-GCがSirolimusとともに投与された症例に限定的である、という大変興味深い結果が明らかになった(図2)。IL-2産生阻害を機序とするカルシニューリン阻害剤(CI)は活性化T細胞を効率的に抑制するが、一方でTreg恒常性を疲弊させる。これに対し、Sirolimusは内因性IL-2の産生を阻害しないため、Tregの回復には有利とされる。今回の臨床試験で明らかとなったLipo-GCとSirolimusの相乗によるTreg増幅効果の機序が明らかになれば、さらに効率的なLipo-GCによる免疫寛容導入が可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

上記のように、研究開始当初は、 $\alpha$ -GalCerと組み合わせる免疫抑制療法としてSirolimusを想定した。しかしながら、同時期より本邦では、移植後シクロフォスファミド法(PTCy法)によるHLA半合致移植が急速に普及した。PTCy法は、HLA半合致移植においても効率的な急性GVHD予防を可能とし、今後はHLA適合移植にもその適用が拡大すると考えられる。このPTCyは、Sirolimusと同様に、Tregの回復を妨げないという特徴を有する。このため、われわれは、 $\alpha$ -GalCerと組み合わせる免疫抑制療法としてPTCy法を検討することが、臨床的要請にも適うと判断し、 $\alpha$ -GalCerを免疫アジュバントとして用いるPTCy法を実験的に検証することを目的とした。

PTCy移植では、低い移植関連合併症に比して、特に非寛解患者における移植後再発が懸念されている。特に再発リスクのある患者のPTCy移植の最適化を臨床的命題として検討した。

## 3. 研究の方法

B6マウスをドナー、B6D2F1マウスをレシピエントとし、致死放射線照射後に、脾臓細胞10 million、骨髄細胞5 million、さらにP815腫瘍細胞を移植した。移植後3日目にシクロフォスファミドの投与を行った。シクロフォスファミドは完全にGVHDの出現を抑制できる用量(Full-PTCy)と、その半量(Reduced-PTCy)を設定した。さらにシクロフォスファミド投与後に $\alpha$ -GalCerを投与するグループと投与しないグループに分けた。GVL効果は、ルシフェラーゼを導入した腫瘍細胞株P815を用いて、これをin vivo imagingにて評価する系を準備した。これらの移植設定におけるGVHDとGVL効果を、生存率、臨床的スコア、免疫細胞解析、遺伝子発現解析、腫瘍生体モニタリングなどにより解析を行った。リガンド投与により増加す

る NKT 細胞の解析には、NKT 細胞をソーティングし、RNAseq にて網羅的遺伝子発現解析をおこなった。

#### 4 . 研究成果

PTCy 移植後の免疫制御アルゴリズムを実験的に検討した。臨床移植をモデル化した担癌マウス実験系を用い、PTCy 減量により GVL を強化できる、PTCy 減量により低下する GVHD 抑制活性は NKT リガンド投与による能動的 Treg 増幅で補償される、ことを明らかにした。さらに細胞免疫学的・遺伝子発現学的解析から、このリガンド投与は効率的に免疫寛容性 NKT2 型へ分化させる一方で向炎症性 NK-like-NKT1 型への分化を抑制し、その結果 Treg 増幅を移植後超級世紀より能動的に促進させることが示された。これらの結果は、特に潜在的な再発リスクのある患者に対して PTCy 移植を最適化するための新しい免疫アジュバント療法開発の端緒となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 中村真、松岡賢市	4. 巻 8巻1号
2. 論文標題 iNKT細胞と同種造血幹細胞移植	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 造血細胞移植学会雑誌	6. 最初と最後の頁 28-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ikegawa S, Meguri Y, Kondo T, Sugiura H, Sando Y, Nakamura M, Iwamoto M, Maeda Y, Matsuoka KI	4. 巻 10;3(23)
2. 論文標題 PTCy ameliorates GVHD by restoring regulatory and effector T-cell homeostasis in recipients with PD-1 blockade.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 4081-4094.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2019000134.	査読の有無 無
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 Sugiura H, Matsuoka KI, Sando Y, Meguri Y, Ikegawa S, Nakamura M, Iwamoto M, Yoshioka T, Asano T, Kondo E, Fujii K, Fujii N, Maeda Y.	4. 巻 110(2)
2. 論文標題 Plasma exchange eliminates residual mogamulizumab but does not warrant prompt recovery of peripheral Treg levels.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transfus Apher Sci	6. 最初と最後の頁 260-262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-019-02659-1.	査読の有無 無
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 Sugiura H, Matsuoka KI, Matsuda M, Ikegawa S, Inomata T, Kuroi T, Asano T, Yoshida S, Nishimori H, Fujii K, Fujii N, Maeda Y.	4. 巻 110(2):
2. 論文標題 Macrophage elimination in bone marrow by dexamethasone palmitate is associated with successful engraftment in patients with hemophagocytic syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 260-262.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-019-02659-1.	査読の有無 無
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 Ken-ichi Matsuoka	4. 巻 59(8):
2. 論文標題 Impact of peri-SCT immune modulation on Treg homeostasis and GVHD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki.	6. 最初と最後の頁 1095-1100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.59.1095.	査読の有無 無
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 Ikegawa S, Fujii N, Tadokoro K, Sato K, Iwamoto M, Matsuda M, Inomata T, Sugiura H, Asano T, Yoshida S, Nishimori H, Matsuoka KI, Maeda Y.	4. 巻 20(2)
2. 論文標題 Progressive multifocal leukoencephalopathy after T-cell replete HLA-haploidentical transplantation with post-transplantation cyclophosphamide graft-versus-host disease prophylaxis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transpl Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 e12850.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tid.12850.	査読の有無 無
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 Matsuoka KI	4. 巻 107(2)
2. 論文標題 Low-dose interleukin-2 as a modulator of Treg homeostasis after HSCT: current understanding and future perspectives.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 130-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2386-y.	査読の有無 無
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 Asano T, Meguri Y, Yoshioka T, Kishi Y, Iwamoto M, Nakamura M, Sando Y, Yagita H, Koreth J, Kim HT, Alyea EP, Armand P, Cutler CS, Ho VT, Antin JH, Soiffer RJ, Maeda Y, Tanimoto M, Ritz J, Matsuoka KI.	4. 巻 129(15)
2. 論文標題 PD-1 modulates regulatory T-cell homeostasis during low-dose interleukin-2 therapy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2186-2197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2016-09-741629.	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Makoto Nakamura, Ken-ichi Matsuoka, Yusuke Meguri, Shuntaro Ikegawa, Hiroyuki Sugiura, Yasuhisa Sando, Miki Iwamoto, Takeru Asano, Yasuyuki Ishii and Yoshinobu Maeda
2. 発表標題 Liposomal Alpha-Galactosylceramide Ameliorates GVHD with Remaining Intensified GVL Gained by Dose-Reduction of Posttransplant Cyclophosphamide after Haploidentical BMT
3. 学会等名 ASH annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ken-ichi Matsuoka
2. 発表標題 NKT and Tolerance, Revisited; Liposomal $\alpha$ -GalCer as an Immune Modulator after Reduced-Dose PTCy
3. 学会等名 JSHCT annual meeting (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ハプロ移植増強剤	発明者 松岡賢市、中村真、 前田嘉信、石井保之、 秋元秀俊、川口	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-228443	出願年 2017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
---------------------------	-----------------------	----