

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08704

研究課題名(和文) The role of inflammasome in steroid refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation

研究課題名(英文) The role of inflammasome in steroid refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation

研究代表者

東梅 友美 (TOUBAI, TOMOMI)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：40802111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌由来メタボライト解析をマウスモデルで行い、コリンやトリプトファン代謝関連メタボライトの変動を認めた。ドナーT細胞活性化メカニズムではNLRP6に焦点をあて、NLRP6欠損(NLRP6<sup>-/-</sup>)T細胞を用いマウス骨髄移植モデルにて検討した結果、NLRP6<sup>-/-</sup>T細胞を輸注すると急性GVHDが増悪し、ドナーT細胞の増殖や活性化、炎症性サイトカイン産生増加が認められた。T細胞活性化機構は種々の免疫学的解析にて行い、NLRP6<sup>-/-</sup>T細胞では刺激後DNA合成及び細胞分裂が増加し、T細胞活性化経路においてNLRP6はZAP-70の上流に存在しZAP-70/Erk経路を特異的に制御することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、同種移植後には特定の腸内細菌メタボライトが著しく変動することで、標的臓器における組織修復及び恒常性の維持機構に変化をもたらしている可能性が示唆された。一方、活性化T細胞におけるNLRP6-ZAP70-Erk免疫抑制機構は、新たな免疫チェックポイントとなる可能性があることから、今後のSR-GVHD発症メカニズムの鍵となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The outcome of steroid refractory GVHD (SR-GVHD) is poor due to a lack of effective treatments. To find mechanisms of SR-GVHD, we have investigated fecal metabolome analyses using a murine bone marrow transplantation (BMT) and found several metabolites were altered in the allogeneic group. Next, we focused on the role of NLRP6 in donor T cells for the development of GVHD. To determine if NLRP6 influences donor T cell responses, we used multiple BMT models and found that the survival of allogeneic recipients of Nlrp6<sup>-/-</sup> donor T cells was significantly worse than those receiving WT-B6 T cells. To find mechanisms, we tested various T cell activation signaling pathways and found enhanced signaling, particularly for ZAP-70, in Nlrp6<sup>-/-</sup> T cells. These data suggested that NLRP6 in donor T cells may regulate allogeneic immune responses via a ZAP-70 pathway. Overall, our data suggest that controlling NLRP6 expression in T cells may be a novel way to decrease acute GVHD.

研究分野：同種造血細胞移植、移植片対宿主病、血液内科学

キーワード：移植片対宿主病 スteroid不応移植片対宿主病 NLRP6 アロ免疫 T細胞活性化シグナリング 同種造血細胞移植

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

同種造血細胞移植は血液悪性腫瘍等に対する根治療法であるが、40%の患者に重篤な合併症の一つである移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) が発症する。GVHDに対する第一選択薬は副腎皮質ステロイドホルモン (ステロイド) であるが、その効果は50%程度であり、約半数の患者は標準療法が存在しないステロイド不応・抵抗性GVHD (steroid refractory/resistant GVHD: SR-GVHD) へと移行し、その予後は極めて不良である。SR-GVHDの標準療法確立には、発症機序の解明およびその理解が不可欠である。我々はマウス骨髄移植モデルを用いた先行研究において、臨床的なSR-GVHDを再現させることに成功し、SR-GVHD発症時の免疫病態を検討した結果、GVHD標的臓器における組織修復機構と恒常性維持がSR-GVHD発症に深く関与していることを明らかにしたが、具体的なSR-GVHD発症機構は依然として不明であることから、SR-GVHDの発症メカニズム解析を計画した。

## 2. 研究の目的

- 1) SR-GVHDへの進展には組織修復機構と恒常性維持機構が重要であることから、主に腸GVHDに焦点を当て、組織修復因子に関係する腸内細菌メタボライトの同定を行う。
- 2) GVHD発症に重要な役割を持つT細胞における活性化メカニズムとして、従来知られていなかったNOD-like receptor family pyrin domain containing 6 (NLRP6)の影響を検討し、新たなT細胞活性化メカニズムを同定することで、新規治療法の開発に繋げる。

## 3. 研究の方法

- (1) 移植後腸内細菌メタボライト解析は、主要組織適合抗原(Major histocompatibility: MHC)一致多マイナー抗原不一致モデルのC3H.sw B6系において、同系及び同種移植後14日目の糞便を採取し、キャピラリー-電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) にて解析を実施した。
- (2) ドナーT細胞における活性化メカニズムの検討は、NLRP6欠損マウス(NLRP6<sup>-/-</sup>)を用いてin vitro及びin vivoの移植実験を行った。In vitroのNLRP6のドナーT細胞の活性化に与える影響については、ヘルパーT細胞への分化能、抗CD3・CD28抗体によるT cell receptor (TCR)非特異的刺激後のT細胞増殖能を検討した上で、主要組織適合抗原半合致の親子の骨髄移植モデル (B6D2F1 B6) を用いて検討し、移植後T細胞解析については、一般的に汎用されている主要組織適合抗原不一致同種骨髄移植マウスモデルのB6(H2<sup>b</sup>) BALB/c(H2<sup>d</sup>)系を用いて移植後7日目と14日目に解析を行なった。

## 4. 研究成果

- (1) CE-TOFMSによるメタボローム解析では290ピークに候補化合物が絞り込まれ、HCAヒートマップよりナイーブ群から検出されたメタボライトはCluster 3、同系群はCluster 1、同種群はCluster 2に集約された。Cluster 2の56物質のうち、Lactic acidやCholine等の8物質が同系群と比較し同種群で有意な増加を示し (p<0.05)、Kynurenine等の10物質が同種群で特異的な増加を示した。一方、同種群でQuinolinic acid等の8物質が同系群と比較して有意に減少し (p<0.05)、Methyl guanidine等の4物質が同種群で特異的に減少していた。同種群で減少したGlycocholic acidとCastanosperminはCluster 3に含まれ、その他10物質はCluster 1に属していた。Choline代謝ではSarcosine、O-Acetylcarnitine、Trimethylamine N-oxide (TMAO) が同種群でのみ検出された。一方、Tryptophan代謝ではKynurenineとPicolinic acidが同種群で特異的に検出された。
- (2) 野生型C57BL/6 (WT-B6)マウスの骨髄細胞と、WT-B6またはNLRP6<sup>-/-</sup>マウスのT細胞をドナー細胞とし、B6D2F1マウス (MHC半合致) をレシピエントとして骨髄移植を行った。レシピエントマウスへ放射線照射後にドナー細胞を輸注し、経時的な生存確認とGVHDの重症度を評価した。本モデルにおいて、NLRP6<sup>-/-</sup>T細胞を輸注した際に生存率の低下と重症度の悪化を認めたことから、ドナーT細胞におけるNLRP6の発現は、T細胞の活性化を制御している可能性が示唆された。この反応がT細胞固有のものを検討するために、前処置を行わずMHC半合致移植を行った結果、同様にNLRP6<sup>-/-</sup>細胞をドナーとした場合に生存率が低下したことから、NLRP6が直接的にT細胞活性化を制御している可能性が示唆された。
- (3) NLRP6のT細胞分化能に与える影響をTh1、Th2、Th17分化キットを用いて検討した結果、NLRP6<sup>-/-</sup>T細胞でTh1への分化誘導が増加した。
- (4) 混合リンパ球反応 (MLR) と非特異的T細胞受容体刺激を行い、細胞増殖能をKi-67を用いて比較した。その結果、双方の刺激でNLRP6<sup>-/-</sup>T細胞で有意な増殖を認めた。

- (5) 非特異的T細胞受容体刺激により活性化させたT細胞を用いてT細胞活性化に関するシグナリングを検討した結果、ZAP-70のリン酸化がNLRP6-/-T細胞において増加しており、ZAP-70の下流シグナリングではERKのリン酸化が亢進していたことから、NLRP6はZAP-70-ERKシグナリングを抑制的に制御することで、T細胞活性化を抑制している可能性が示唆された。以上から、ドナーT細胞におけるNLRP6の発現はZP-70/ERKシグナリングを介してT細胞の増殖や分化を調節することで、T細胞の活性化を制御しGVHD発症を抑制する可能性が示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 東梅友美, 鳥居由佳	4. 巻 29
2. 論文標題 同種造血幹細胞移植後のステロイド不応性GVHDのメカニズムに関する最新の知見.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 57-62
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 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 東梅友美, 鳥居由佳	4. 巻 82
2. 論文標題 ステロイド抵抗性GVHDの病態と治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 388-393
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 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 東梅友美, 鳥居由佳	4. 巻 62
2. 論文標題 ステロイド抵抗性GVHDの病態, 診断, 治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1567-1577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.62.79.	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 関口恵理華, 東梅友美, 須藤将裕, 松木絵理, 宮田匡大, 石澤 賢一	4. 巻 63
2. 論文標題 マウス骨髄移植モデルにおける糞便中メタボローム解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 37-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.63.37.	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 Tomomi Toubai	4. 巻 139
2. 論文標題 GPR109A in GVHD: friend or foe?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2271-2272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021014128	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 Toubai Tomomi、Magenau John	4. 巻 136
2. 論文標題 Immunopathology and biology-based treatment of steroid-refractory graft-versus-host disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 429 ~ 440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019000953	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 該当する

1. 著者名 Aizawa Keiko、Peltier Daniel、Matsuki Eri、Toubai Tomomi	4. 巻 61
2. 論文標題 How does transfusion-associated graft-versus-host disease compare to hematopoietic cell transplantation-associated graft-versus-host disease?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transfusion and Apheresis Science	6. 最初と最後の頁 103405 ~ 103405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transci.2022.103405	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 該当する

1. 著者名 Czech Marie、Zeiser Robert、Toubai Tomomi	4. 巻 13
2. 論文標題 Editorial on Translational Research in Graft-Versus-Host Disease (GVHD) and Graft-Versus-Tumor (GVT) Effect After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 948720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.948720	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 該当する

1. 著者名 Yuka Hosokawa, Tomomi Toubai, Rintaro Ohe, Masashi Hosokawa, Ryo Sato, Akane Yamada, Keiko Aizawa, Masahito Himuro, Satoshi Ito, Masakazu Yamamoto, Daniel Peltier, Kenichi Ishizawa	4. 巻 5
2. 論文標題 Successful treatment of acute pancreatitis associated with late-onset acute liver GVHD after second allogeneic hematopoietic cell transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BLOOD CELL THERAPY / The official journal of APBMT	6. 最初と最後の頁 79-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31547/bct-2021-023	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 該当する

[学会発表] 計11件(うち招待講演 2件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 関口恵理華, 東梅友美, 須藤将裕, 松木絵里, 宮田匡大, 市川翼, 佐藤諒, 細川雅司, 柳谷稜, 山田茜, 相澤桂子, 氷室真仁, 伊藤巧, 山本雅一, 石澤賢一
2. 発表標題 マウス骨髄移植モデルにおける糞便中メタボライト解析
3. 学会等名 第131回日本血液学会東北地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須藤将裕, 松木絵理, 宮田匡大, 関口恵理華, 石澤賢一, 東梅友美
2. 発表標題 NLRP6-deficient T cells exacerbate GVHD
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suto M, Matsuki E, Miyata M, Sekiguchi E, Tamaki H, Tawara I, Peltier D, Chen G, Ishizawa K, Reddy P, Toubai T.
2. 発表標題 The Absence of NLRP6 in Donor T Cells Exacerbates Gvhd
3. 学会等名 63rd Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suto M, Matsuki E, Miyata M, Sekiguchi E, Tamaki H, Tawara I, Peltier D, Chen G, Ishizawa K, Reddy P, Toubai T.
2. 発表標題 NLRP6 Regulates Allogeneic Donor T Cells.
3. 学会等名 2022 Transplantation & Cellular Therapy Meetings (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomomi Toubai
2. 発表標題 Recent advances of pathophysiology of acute graft-versus-host disease-2022
3. 学会等名 KSEH spring E-symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomomi Toubai
2. 発表標題 Biology based novel treatment approaches of GVHD.
3. 学会等名 The International Congress of BMT 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsuki E, Suto M, Miyata M, Hosokawa Y, Tamaki H, Tawara I, Peltier D, Chen G, Ishizawa K, Reddy P, Toubai T.
2. 発表標題 NLRP6-ZAP-70 pathway regulates Donor T cell activation in GVHD.
3. 学会等名 2023 Transplantation & Cellular Therapy Meetings (国際学会)
4. 発表年 2023年



1. 発表者名	松木絵理, 須藤将裕, 宮田匡大, 関口恵理華, 玉置広哉, 依功, Daniel Peltier, Grace Chen, 石澤賢一, 東梅友美, Pavan Reddy
2. 発表標題	NLRP6はドナーT細胞の活性化を制御する
3. 学会等名	第44回日本造血・免疫細胞療法学会総会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	松木絵理, 須藤将裕, 宮田匡大, 関口恵理華, 玉置広哉, 依功, Daniel Peltier, Grace Chen, 石澤賢一, Pavan Reddy, 東梅友美
2. 発表標題	NLRP6 regulates allogeneic donor T cell responses
3. 学会等名	第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	松木絵理, 須藤将裕, 宮田匡大, 細川由佳, 玉置広哉, 依功, Daniel Peltier, Grace Chen, 石澤賢一, Pavan Reddy, 東梅友美
2. 発表標題	NLRP6-ZAP70 pathway regulates donor T cell activation in GVHD
3. 学会等名	第45回日本造血・免疫細胞療法学会総会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	細川由佳, 東梅友美, 大谷幸一, 石澤悠樹, 長野裕祐, 高橋諒, 佐藤諒, 細川雅司, 渡邊正太郎, 山田茜, 鈴木琢磨, 相澤桂子, 伊藤巧, 石澤賢一
2. 発表標題	当院における初回同種造血幹細胞移植症例のEASIXを用いた 予後予測の後方視解析
3. 学会等名	第45回日本造血・免疫細胞療法学会総会
4. 発表年	2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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		
米国	ミシガン大学	インディアナ大学	