

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18358

研究課題名（和文）GVHD眼表面におけるPD-1/PD-L1経路の病態への関与

研究課題名（英文）Research of the association between the graft-versus-host disease related dry eye disease and the PD-1/PD-L1 pathway

研究代表者

林 俊介（Hayashi, Shunsuke）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：50837771

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究期間ではcGVHDモデルマウスにおける角膜及び涙腺の病理組織学的検討を行い、血管新生、細胞浸潤を見出した。また重複型GVHD患者の偽膜の病理組織像からCD4陽性T細胞優位の免疫担当細胞浸潤が認められた。GVHDモデルマウスの脾臓をFACSにて解析し、CD4陽性T細胞の80%においてPD-1の発現が認められた。次に涙腺において蛍光免疫染色を行い、PD-1陽性CD4陽性T細胞の浸潤が認められた。このことからGVHD涙腺における上皮細胞にPD-1陽性CD4陽性T細胞とCD153陽性細胞の関与の可能性が考えられた。以上の成果をもとに本疾患の新たな治療標的を探索中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性GVHDの症例には高度なドライアイや眼表面炎症が合併する。GVHD発症後には酸化ストレス増加や危険シグナル増加などの複合的要因による慢性刺激によって、非感染性の慢性炎症が惹起され遷延化すると考えられる。cGVHDに関連した眼表面のGVHDヒト涙腺においてPD-1/PD-L1経路の関与が考えられたため、PD-1分子、PD-L1分子の局在を検討することで同分子の発現の機序やGVHD病態への関わり、分子メカニズムを追求しようと着想し研究を実施した。根治的な標準治療が存在しない本疾患に対して、PD1/PDL1分子が新たな治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：During this research period, we conducted histopathological examinations of the cornea and lacrimal gland in a cGVHD mouse model, revealing neovascularization and cellular infiltration. Furthermore, immunocompetent cell infiltration, predominantly by CD4-positive T cells, was observed in pseudomembranes from patients with overlapping GVHD. Analysis of splenic tissue from GVHD model mice using FACS showed that 80% of CD4-positive T cells expressed PD-1. Subsequent fluorescent immunostaining in the lacrimal gland confirmed infiltration of PD-1-positive CD4-positive T cells. These findings suggest the potential involvement of PD-1-positive CD4-positive T cells and CD153-positive cells in epithelial cells of the GVHD lacrimal gland. Based on these results, we are currently exploring new therapeutic targets for this condition.

研究分野：GVHD

キーワード：GVHD

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性 GVHD は造血細胞移植後に発症する重篤な晩期合併症であり、慢性炎症と線維化を主体として涙腺、角結膜を含めた粘膜、外分泌腺の機能不全を引き起こす (Ogawa Y, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005; Am J Pathol, 2009)。

急性 GVHD ではドナーT細胞のレシピエント組織に対する直接的な免疫反応が主病態としてすでに示唆されているが、慢性 GVHD の病態や発症機構は多段階的、複合的であり、未だ不明である。また慢性眼 GVHD の治療は点眼療法を含めた対症療法が主であり、根本治療は未だ確立していない。涙腺および角結膜の機能不全による重篤なドライアイは眼表面の障害による高度な疼痛や著明な視力低下をきたし、GVHD 患者の QOL を著しく下げる。

慢性眼 GVHD による眼表面組織の線維化は不可逆的で重篤であるため、新治療法の確立による慢性 GVHD ドライアイ発症の予防及び発症初期の病状進行抑制は慢性眼 GVHD 患者の視力予後や QOL の向上に大きく貢献することとなる。

以前より申請者及び研究班は慢性眼 GVHD における免疫担当細胞に着目し研究してきたが、既報で GVHD 標的組織へ浸潤している免疫担当細胞が PD-1 分子、PD-L1 分子を発現しており PD-1/PD-L1 経路の関与によって GVHD における炎症を抑制させることが示唆された。(Saha A, et al. J Clin Invest. 2016 Jul 1;126(7):2642-60.)

また近年、他科領域において慢性炎症と PD-1、老化細胞および Senescent Associated Secretary Phenotype (SASP) との関連が報告されている。(Kohsuke Shirakawa, et al. J Clin Invest. 2016;126(12):4626-4639.)

本研究は、急性及び慢性 GVHD の涙腺をはじめとした標的臓器における免疫応答及び老化への PD-1/PD-L1 経路の関与を解明し、病態解明とその制御に貢献することを目標とする。GVHD 等における臓器慢性炎症の制御法の基礎を確立し、当該疾患の予防もしくは抑制を目指すことにある。

2. 研究の目的

Programmed cell Death-1(PD-1)分子は、細胞傷害性T細胞の膜表面にある免疫チェックポイント受容体の1つである。PD-1受容体の活性化は、T細胞の活性化抑制に重要であり、異常な自己免疫を回避するための正常な免疫応答において重要な要素となる (Freeman GJ and Honjo T, J Exp Med, 2000)。

眼移植片対宿主病(GVHD)は涙腺および角結膜粘膜をはじめとした外分泌腺と粘膜の免疫応答異常による高度炎症と特殊な線維化を主体とする難治性疾患である。GVHDの標的臓器である涙腺、眼表面において多数の炎症細胞にPD-1分子が発現し自己免疫疾患様の免疫応答、また病態に関与している可能性を見出した。GVHD涙腺および角結膜に浸潤する免疫担当細胞の相互作用に関わる分子について、特にPD-1分子とそのリガンドであるPD-L1分子に焦点をあてて検証し、GVHD病態への関与のさらなる解明と新規治療薬のGVHDに対する効果の解明を目標とする。

さらにGVHDの眼表面においては老化細胞が病態に係る可能性があるため、PD-1陽性細胞と老化細胞との相互作用について検討し、病態解明と新規治療法の開発をめざした。

3. 研究の方法

全骨髄細胞移植 (ドナーB10.D2 マウス, レシピエント BALB/c マウス) を標準の移植とする (Zhang Y, et al. J Immunol, 2002)。これまでに申請者の研究室ではGVHDに酷似した経時的炎症と線維化形成の作成手技をGVHD標的臓器で確立している(Ogawa Y, et al. eLife, 2016)。

全骨髄細胞移植後のマウスモデル涙腺における病理切片を用いて、浸潤した免疫担当細胞マクロファージ、樹状細胞、NK細胞、T細胞(Th1, Th2, Th17)とPD-1分子またはPD-L1分子とを二重染色し、炎症細胞におけるPD-1分子、PD-L1分子を発現している細胞を特定する。次にGFPB10.D2ドナーマウスの骨髄細胞、脾臓細胞をBALB/cマウスに移植してGVHDを作成、GFPBALB/cドナーマウスの骨髄細胞、脾臓細胞をBALB/cマウスに移植してコントロールを作成し、ドナー細胞の浸潤経路を調べる。近年、老化マーカーCD153を発現するCD153⁺PD-1⁺CD44^{hi}CD4⁺の形質をもつT細胞の病的役割が報告されている(Shirakawa J Clin Invest, 2016)。GVHD涙腺でのPD-1陽性細胞におけるCD153の発現の有無、発現時期、他の細胞との相互作用について検討する。

4. 研究成果

本研究期間ではcGVHDモデルマウスにおける角膜及び涙腺の病理組織学的検討を行い、血管新生、細胞浸潤を見出し、学術研究雑誌Diagnosisに研究成果を報告した(Shimizu S, Hayashi S, et al. Ocul Surf. 2022)。GVHDにおける関連分子に関して同定するため"The overlap syndrome: a case report of chronic graft-versus-host disease after the development of pseudomembrane"の題名で重複型GVHDの症例報告を行った。重複型GVHDにより形成した眼球結膜上の偽膜を採取し病理検査で検討した。偽膜の病理組織像では多数のマクロファージとCD8陽性T細胞に加えCD4陽性T細胞優位の免疫担当細胞浸潤が認められた。またGVHDモデルマウスの脾臓をFACSにて解析した結果、CD4陽性T細胞の80%においてPD-1の発現が認められた。次に涙腺においてPD-1陽性CD4陽性T細胞について蛍光免疫染色を行ったところ、PD-1陽性CD4陽性T細胞の浸潤が認められ、特にCD153陽性細胞が脾臓と比較して多く浸潤していた。このことからGVHD涙腺における上皮細胞にPD-1陽性CD4陽性T細胞とCD153陽性細胞の関与の可能性が考えられた。以上の成果をもとに本疾患の新たな治療標的を探索中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayashi Shunsuke, Shimizu Eisuke, Uchino Miki, Yazu Hiroyuki, Aketa Naohiko, Tsubota Kazuo, Ogawa Yoko	4. 巻 40
2. 論文標題 The Overlap Syndrome: A Case Report of Chronic Graft-Versus-Host Disease After the Development of a Pseudomembrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 1188 ~ 1192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IC0.0000000000002593	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 林 俊介	4. 巻 37巻6号
2. 論文標題 男性Sjogren症候群の3症例にみられたドライアイの特徴の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 747-751
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 Shimizu Shota, Sato Shinri, Taniguchi Hiroko, Shimizu Eisuke, He Jingliang, Hayashi Shunsuke, Negishi Kazuno, Ogawa Yoko, Shimmura Shigeto	4. 巻 11
2. 論文標題 Observation of Chronic Graft-Versus-Host Disease Mouse Model Cornea with In Vivo Confocal Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1515 ~ 1515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics11081515	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 俊介
2. 発表標題 偽膜形成直後に発症した重症重複型眼GVHDの1例
3. 学会等名 日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020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
---------	---------