

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21390295

研究課題名（和文） GVHD・GVLに関わる新たなドナーT細胞活性化のメカニズム

研究課題名（英文） Novel mechanisms of alloreactive T-cell activation in GVHD and GVL

研究代表者

豊嶋 崇徳 (TESHIMA TAKANORI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40284096

研究成果の概要（和文）：同種造血幹細胞移植後の GVHD と GVL に関わる新たな T 細胞活性化の二つのメカニズムを見出した。一つは、従来から知られている通常型樹状細胞以外に形質細胞様樹状細胞によって、GVHD を発症するに十分な T 細胞活性化が可能であることを見出した。これは移植前処置依存性、MHC クラス II 分子依存性であったが、Toll-like receptor (TLR) シグナル非依存性であった。二つ目として、ドナー T 細胞上の TLR がアロ応答性 T 細胞活性化の副刺激として作用し、GVHD、GVL の発症に重要な役割を果たすことが明らかにした。これは CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞両者の活性化、サイトカイン産生、キラー活性の発現に重要であり、MyD88 シグナルが重要であった。

研究成果の概要（英文）：We have identified two novel mechanisms of alloreactive T-cell activation in graft-versus-host disease (GVHD) and graft-versus-leukemia (GVL) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. First, besides conventional dendritic cells (DCs), plasmacytoid DCs can also fully activate alloreactive T cells to induce full spectrum of GVHD. This is dependent on pretransplant conditioning and MHC class II, but independent of toll-like receptor (TLR) signaling in pDCs. Second, TLR signaling in T cells are critical for activation of alloreactive T cells to induce GVHD and GVL. TLR signaling is important for activation, cytokine production, and cytolytic activity of both CD4+ and CD8+ T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2012 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：GVHD、GVL、T細胞、樹状細胞、形質細胞様樹状細胞、Toll like receptor

## 1. 研究開始当初の背景

抗原特異的 T 細胞による獲得免疫は、T 細胞と conventional DC (cDC) の相互作用によって誘導される。申請者らは一貫して GVHD・

GVL の研究を行い、造血細胞移植においても、ドナー T 細胞とレシピエント由来 cDC の相

相互作用がキーであることを示してきた。造血細胞移植では、臓器移植と異なり、移植前処置が実施される。われわれは、この移植前処置はドナーT細胞-ホストDC相互作用を増幅し、腸管傷害を惹起し、LPSなどの血中流入によってマクロファージが活性化し、サイトカイン・ストームによってGVHDが重症化することを示してきた。このような一連の研究成果を基に移植前処置がGVHD発症の第一ステップであると位置づけた3ステップメカニズムを提唱し、現在広く認められている。しかしながら、このような現象の細胞・分子学的メカニズムは明確にされておらず、これを研究する過程においてわれわれは、新たなメカニズムを示唆する知見を得た。本研究では、移植前処置の存在下でのアロ応答性T細胞の活性化の細胞・分子学的メカニズムを包括的に解明し、よりよいGVHD制御あるいはGVL増強のための基礎的情報を獲得し、将来的な移植成績の向上に寄与することを目的とした。

## 2. 研究の目的

ドナーT細胞とホスト由来のcDCの相互作用には、主刺激(MHC-TCR)と副刺激(CD28-CD80/86など)が必要である。しかし、移植前処置後の強い炎症下でのドナーT細胞活性化がおこる造血細胞移植においては、他にも重要なメカニズムが存在することは想像に難くない。移植前処置がGVHDを増幅する機序として、自然免疫系やDCの活性化による、間接的なドナーT細胞の活性化が考えられてきた。われわれはこのメカニズムの本質は、TLRを介するシグナル伝達であるとの仮説をたてた。すなわち、移植前処置は内因性および外因性の“danger signal”を誘導し、TLRを介したシグナルによってDCを活性化し、GVHDの重症化に関与するものと考えた。TLRシグナルはMyD88依存性経路、非依存性TRIF経路によって伝達され、TRIF/MyD88-/-マウスはTLRシグナルをほぼ完全に欠如する。上記の仮説を検証するため、予備実験として、ホストDCがTRIF/MyD88-/-マウス由来のキメラマウスを作成し、骨髄移植を行ったところ、予想に反してGVHDの軽減がみられなかった。逆に、ドナーT細胞がTRIF/MyD88-/-マウス由来の場合、GVHDの劇的な軽減がみられた。この結果から、TLRを介するDC非依存性のドナーT細胞の直接的活性化の経路の存在が示唆され、従来の概念を覆す新たな知見であると期待される。今後、この仮説をより詳細に確認し、さらに移植前処置で活性化されるTLRの種類、そのリガンドについて標的を絞り込んでいき、新たなGVHD予防法への開発へと展開したい。この経路は移植前処置の強度に依存すると考えられ、その関連性

を検証していく。さらに、制御性T細胞(Treg)上のTLRの意義についても検討を行うことで、将来的なTreg療法の展開のための重要な情報がえられるものと期待される。また、B10.D2→BALB/cの慢性GVHDモデル系においてドナーT細胞のTh応答性についても検討した。

形質細胞様樹状細胞(pDC)は臓器移植においては寛容成立に関与するとされ、造血細胞移植でもpDCがGVHD抑制的に作用する可能性を示唆する臨床的観察が報告されている。われわれはこれを明らかにするため、マウスモデルを用いて検討を行う。これら一連の研究によってGVHD・GVLの理解を深めていく。

## 3. 研究の方法

MyD88-/-マウスとTRIF-/-マウスを交配し、TRIF/MyD88-/-マウスを作成した。これらをドナーあるいはレシピエントとして骨髄移植実験を行った。移植後の生存率、GVHDスコアによってGVHD重症度を判定した。また、移植後の野生型T細胞における各種TLRの発現をフローサイトメトリー法で検討した。また野生型、ノックアウトマウスからの移植後早期のリンパ節よりドナーT細胞を分離し、その活性化・増殖・サイトカイン産生能などを比較した。また白血病マウスモデルを用いることでドナーT細胞のTLRがGVLに及ぼす影響を検討した。

われわれは、抗原提示細胞のGVHD惹起能をin vivoで検討できる系を開発した。この系を用い、pDCのアロ抗原提示能、ドナーT細胞活性化能をin vivoで検討した。

## 4. 研究成果

野生型T細胞、TRIF-/-T細胞の移植では同等に重症なGVHDが発症したのに対し、MyD88-/-、MyD88/TRIF-/-T細胞の移植ではGVHDが有意に軽症であった。CD4+、CD8+T細胞におけるTLRの発現の両者ともにGVHDの重症化に関与することが明らかとなった。この結果はT細胞におけるMyD88シグナルがT細胞活性化に重要な役割をしている可能性を示唆している。

次に、APC-freeの培養系を用い、野生型、TRIF/MyD88-/-マウスよりFACS SortしたCD4+T細胞を抗CD3抗体と抗CD28抗体の存在下に、PamCSK (TLR2), PolyI:C (TLR3), LPS (TLR4)を加えて培養し、T細胞活性化の程度をみた。TRIF/MyD88-/-マウスのT細胞はこれらTLR ligandsの刺激に反応せず、T細胞におけるTLRの発現は機能的であることが確認された。またTLR2の細胞表面への発現はCD4+およびCD8+T細胞において、同種骨髄移植後早期に発現亢進しており、in vivoにおいてもTLRシグナルに対する感受性が亢

進している可能性が示唆された。一方、自己骨髄移植後にはこの発現亢進は見られず、アロ免疫応答に関連した発現上昇と考えられた。

B10. D2→BALB/c の慢性 GVHD モデル系においてドナーT 細胞のサイトカイン産生パターンを検討したところ、移植後早期の Th1, Th2 応答性に引き続く Th17 応答性がみられ、とくに肝臓、肺への Th17 細胞浸潤が顕著であった。IFN- $\gamma$ -/-, IL-17-/-マウスから分離した T 細胞を投与したところ、皮膚、唾液腺の病変の軽減がみられた。合成レンチノイドである Am80 は Th1, Th17 応答性を抑制することが知られている。Am80 の投与で慢性 GVHD 病変の抑制が可能であった。以上の結果から、Th1, Th17 応答性は慢性 GVHD の病態形成に関与していることが示唆された。

pDC は、cDC 非依存性に単独でドナー T 細胞活性化を誘導し、GVHD が発症することが示された。この GVHD は臨床的、病理学的に、cDC によって誘導される GVHD と全く同様であった。pDC による GVHD 誘導効果の発現には、移植前処置による pDC の活性化が必須で、MHC クラス II 分子依存性であったが、TLR シグナル非依存性であった。

#### 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 30 件)

- ① Kuriyama T, Takenaka K 他 12 名 13 番目、Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis, *Blood*, 査読有、120 巻、2012、4058-4067、10.1182/blood-2012-02-408864
- ② Eriguchi Y, Takashima S 他 10 名 12 番目、Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of  $\alpha$ -defensins, *Blood*, 査読有、120 巻、2012、223-231、10.1182/blood-2011-12-401166
- ③ Takenaka K, Nagafuji K 他 11 名 12 番目、Initial low-dose valganciclovir as a preemptive therapy is effective for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients, *Int J Hematol*, 査読有、96 巻、2012、94-100、10.1007/s12185-012-1087-9
- ④ Teshima T, GVHD-associated immunosuppression: soil or seed?, *Blood*, 査読有、119 巻、2012、5618-5619、10.1182/blood-2012-04-418616
- ⑤ Harris AC, Ferrara JL 計 11 名 5 番目、Plasma biomarker of loser gastrointestinal and liver acute graft-versus-host disease, *Blood*, 査読有、119 巻、2012、2960-2963、10.1182/blood-2011-10-387357
- ⑥ Mori Y, Miyamoto T 他 12 名 13 番目、Different risk factors related to adenovirus- or BK virus-associated hemorrhagic cystitis following allogeneic stem cell transplantation, *Blood Marrow Transplant*, 査読有、18 巻、2012、458-465、10.1016/j.bbmt.2011.07.025
- ⑦ Nishimori H, Maeda Y 他 11 名 3 番目、Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by downregulating Th1 and Th17, *Blood*, 査読有、119 巻、2012、285-295、10.1182/blood-2011-01-332478
- ⑧ Mori Y, Teshima T 他 8 名、Validation of pretransplantation assessment of mortality risk score in the outcome of hematopoietic stem cell transplantation in non-Caucasians, *Bone Marrow Transplant*, 査読有、47 巻、2012、1075-1081、10.1038/bmt.2011.229
- ⑨ Ferrara JL, Harris AC 他 15 名 6 番目、Regenerating islet-derived 3 alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease, *Blood*, 査読有、118 巻、2011、6702-6708、10.1182/blood-2011-08-375006
- ⑩ Mori Y, Miyawaki K 他 7 名 9 番目、Diagnostic value of serum procalcitonin and C-reactive protein for infections after allogeneic stem cell transplantation versus nontransplant setting, *Intern Med*, 査読有、50 巻、2011、6702-6708、10.2169/internalmedicine.50.5798
- ⑪ Hashimoto D, Chow A 他 14 名 12 番目、Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *J Exp Med*, 査読有、208 巻、2011、1069-1082、10.1084/jem.20101709
- ⑫ Tsukamoto H, Nagafuji K 他 11 名 11 番目、Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells, *Rheumatology*, 査読有、50 巻、2011、944-952、<http://rheumatology.oxfordjournals.o>

- rg/content/50/5/944.full
- ⑬ Takashima S, Kadowaki M他6名8番目、The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells、J Exp Med、査読有、208巻、2011、285-294、10.1084/jem.20101559
- ⑭ Kamimura T, Miyamoto T他14名12番目、Role of autotransplantation in the treatment of acute promyelocytic leukemia patients in remission: fukuoka BMT group observations and a literature review、Bone Marrow Transplant、査読有、46巻、2011、820-826、10.1038/bmt.2010.207
- ⑮ Tanimoto T, Uchida N他3名、4番目、Safety of workers at the Fukushima Daiichi nuclear power plant、Lancet、査読有、377巻、2011、1489-1490、10.1016/S0140-6736(11)60519-9
- ⑯ Kikushige Y, Shima T他7名7番目、TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells、Cell Stem Cell、査読有、7巻、2010、708-717、10.1016/j.stem.2010.11.014
- ⑰ Mori Y, Miyamoto T他11名12番目、High incidence of human herpes virus 6-associated encephalitis/myelitis following a second unrelated cord blood transplantation、Biol Blood Marrow Transplant、査読有、16巻、2010、1596-1602、10.1016/j.bbmt.2010.05.009
- ⑱ Oh I, Ozaki K他12名12番目、Altered effector CD4<sup>+</sup> T cell function in IL-21R<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cell-mediated graft-versus-host disease、J Immunol、査読有、185巻、2010、1441-1444、10.4049/jimmunol.0902217
- ⑲ Nagafuji K, Matsuo K他20名3番目、Peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors in patients with leukemia: a propensity score-based comparison from the Japan Society for Hematopoietic Stem Cell Transplantation registry、Int J Hematol、査読有、91巻、2010、855-864、10.1007/s12185-010-0581-1
- ⑳ Asakura S, Hashimoto D他6名8番目、Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces graft-versus-leukemia effects in mice、J Clin Invest、査読有、120巻、2010、2370-2378、10.1172/JCI39165
- ㉑ Mori Y, Nagasaki Y他9名11番目、High incidence of false-positive Aspergillus galactomannan test in multiple myeloma、Am J Hematol、査読有、85巻、2010、449-451、10.1002/ajh.21697
- ㉒ Numata A, Miyamoto T他15名14番目、Long-term outcomes of autologous PBSCT for peripheral T-cell lymphoma: retrospective analysis of the experience of the Fukuoka BMT group、Bone Marrow Transplant、査読有、45巻、2010、311-316、10.1038/bmt.2009.165
- ㉓ Yamauchi T, Mori Y他10名11番目、Second unrelated cord blood transplantation using a reduced conditioning regimen combined with gemtuzumab and ogamycin in patients with relapsed acute myelogenous leukemia、Int J Hematol、査読有、90巻、2009、416-420、10.1007/s12185-009-0405-3
- ㉔ Abe Y, Ito T他9名9番目、Nonmyeloblastic allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as immunotherapy for pancreatic cancer、Pancreas、査読有、38巻、2009、815-819、10.1097/MPA.0b013e3181b576ee
- ㉕ Teshima T, Nagafuji K他8名、Rituximab for the treatment of corticosteroid-refractory chronic graft-versus-host disease、Int J Hematol、査読有、90巻、2009、253-260、10.1007/s12185-009-0370-x
- ㉖ Kohno K, Nagafuji K他11名11番目、Infectious complications in patients receiving autologous CD34-selected hematopoietic stem cell transplantation for severe autoimmune disease、Transpl Infect Dis、査読有、11巻、2009、318-323、10.1111/j.1399-3062.2009.00401.x
- ㉗ Takenaka K, Eto T他12名14番目、Oral valganciclovir as preemptive therapy is effective for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation、Int J Hematol、査読有、89巻、2009、231-237、10.1007/s12185-008-0249-2
- ㉘ Aoyama K, Koyama M他7名9番目、Improved outcome of allogeneic bone marrow transplantation due to breast-feeding-induced tolerance to maternal antigens、Blood、査読有、113巻、2009、2088-2095、10.1182/blood-2009-03-213561
- ㉙ Koyama M, Hashimoto D他8名10番目、Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells

enting cells, Blood, 113 卷、2009、2088-2095、10.1182/blood-2008-07-168609

- ⑩ Hamaguchi M, Eto M 他 8 名 10 番目、Allogeneic cell therapy from immunized donors with tumor antigen peptide enhances the antitumor effect after cyclophosphamide-using non-myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation, Cancer Sci、査読有、100 卷、2009、138-143、10.1111/j.1349-7006.2008.01014.x

〔学会発表〕(計 9 件)

- ① Teshima T, Separation of GVL from GVHD by targeting leukemic stem cells while preserving normal tissue stem cells and their niche, Shanghai Workshop for Hematopoietic Stem Cell Transplantation 2012、2012.7.27-28、Shanghai Hospital(China)
- ② Teshima T, Intestinal stem cells and their niche are targeted in GVHD, Seminar at Memorial Sloan Kettering Cancer Center、2012.12.6、Memorial Sloan Kettering Cancer Center(USA)
- ③ 豊嶋崇徳、造血幹細胞移植：急性および慢性 GVHD 対策、第 74 回日本血液学会総会、2012.10.21、国立京都国際会館(京都)
- ④ Teshima T, Current status of the graft processing in Japan, The 1<sup>th</sup> International Workshop on Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Emerging countries、2011.11.11-12、Vietnam National University(Vietnam)
- ⑤ Teshima T, Intestinal homeostasis and graft-versus-host disease, The 16<sup>th</sup> Annual Meeting of the Asian-Pacific Blood and Marrow Transplantation、2011.10.30-11.2、Sydney Convention & Exhibition Centre(Australia)
- ⑥ Teshima T, A novel strategy to improve outcome of allogeneic stem cell transplantation, The 16<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation、2011.08.19-20、Busan Exhibition & Convention Center(Korea)
- ⑦ Teshima T, Crosstalk between graft-versus-host disease and intestinal ecology, Shanghai Workshop for Hematopoietic Stem Cell Transplantation 2010、2010.10.15-17、Shanghai Hospital(China)
- ⑧ Teshima T, Current status and future prospects of hematopoietic stem cell transplantation in Japan, Chinese Ma

row Donor Program Transplant Hospital Technical Conference、2010.5.20-21、East Lake Hotel-Wuhan(China)

- ⑨ Teshima T, Pathophysiologic mechanisms of GVHD, New Perspectives in Cancer Research、2009.11.14、Hotel Hyundai Ulsan(Korea)

〔図書〕(計 7 件)

- ① 神田善伸編、医薬ジャーナル社、造血幹細胞移植の基礎と臨床(改訂版)、2012、77-82
- ② 大野竜三編、最新医学社、新しい診断と治療の ABC 36/血液4 急性白血病(改訂第 2 版)、2012、163-172
- ③ 日本臨床腫瘍学会編集、南江堂、新臨床腫瘍学(改訂第 3 版)、2012、210-214
- ④ 谷口修一編、医薬ジャーナル社、やさしい GVHD 外来治療の自己管理、2011、12-21
- ⑤ 山口徹 北原光夫 福井次矢編集、医学書院、今日の治療指針 2010、2010、526-527
- ⑥ 日本臨床腫瘍学会編集、南江堂、新臨床腫瘍学(改訂第 2 版)、2009、258-265
- ⑦ 豊嶋崇徳編、医薬ジャーナル社、ガイドラインパースペクティブ造血幹細胞移植、2009、71-83

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊嶋 崇徳 (TESHIMA TAKANORI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：40284096

### (2) 研究分担者

高嶋 秀一郎 (TAKASHIMA SHUICHIROU)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：70622116

### (3) 連携研究者

なし