

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08390

研究課題名（和文）急性GVHDとサイトカイン放出症候群の免疫病態に着目した輸注リンパ球制御法の開発

研究課題名（英文）Development of methods controlling infused lymphocytes based on the immunopathology of acute GVHD and cytokine release syndrome.

研究代表者

俵 功 (Tawara, Isao)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80378380

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）：本研究は、マウス同種骨髄移植モデル、非移植（同系）・腫瘍特異的遺伝子改変リンパ球輸注療法モデル、同種移植後・腫瘍特異的細胞輸注療法モデルを作製、急性GVHD、サイトカイン放出症候群の病態を明らかにし、輸注リンパ球制御法の開発を目的として開始した。同種骨髄移植モデル実験では、GVHDの出現とともに標的臓器である腸管に浸潤したドナー細胞を検出することができた。非移植腫瘍特異的リンパ球輸注モデルでは、十分な抗腫瘍効果が得られず、同種移植後・腫瘍特異的細胞輸注療法モデルでは腫瘍退縮とともに、GVHD増悪が観察された。抗腫瘍効果の発現には、担癌から細胞輸注までの期間が影響すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗腫瘍効果が輸注リンパ球によって発揮される同種造血幹細胞移植や、腫瘍特異的遺伝子改変リンパ球輸注療法では、急性GVHDやサイトカイン放出症候群といった合併症が起こる。その詳細なメカニズムは不明であり、輸注リンパ球の制御法の開発は臨床的課題である。今後、これらの領域では細胞源（ソース）や改変（導入）遺伝子の多様化が考えられ、合併症への対応は引き続き重要な課題である。現時点では十分な結果が得られたとは言いがたいが、本研究を継続することで、輸注リンパ球が引き起こす合併症のメカニズムが明らかとなり、科学的根拠に基づいた輸注リンパ球制御法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：To develop of methods controlling infused lymphocytes based on the immunopathology of acute GVHD and cytokine release syndrome, we generated mouse models of allogeneic bone marrow transplantation, tumor-specific gene-modified lymphocyte infusion into non-transplant (syngeneic) tumor-bearers or allogeneic transplant tumor-bearers. In the allogeneic bone marrow transplantation model, mice developed acute GVHD and infiltrated donor cells could be detected in the intestinal tract. Insufficient anti-tumor effect was observed in the model of tumor-specific lymphocyte infusion into non-transplant mice. GVHD exacerbation along with tumor regression were observed in the model of tumor-specific lymphocyte infusion into post-allogeneic transplant mice. The onset of anti-tumor effect was thought to be influenced by the time from tumor challenge to specific lymphocyte infusion.

研究分野：血液・腫瘍内科学

キーワード：同種造血幹細胞移植 特異的リンパ球輸注療法 移植片対宿主病

## 1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植(同種移植)は、難治性白血病など造血器疾患に対する根治的治療法として確立されてきた。その腫瘍性疾患の根絶機序は、抗がん薬投与や放射線照射による前処置と、ドナーリンパ球による移植片対腫瘍(Graft-vs-Tumor, GVT)効果によるものと考えられており、同種移植の主な対象疾患である白血病(Leukemia)に対するGVT効果は、GVL効果と呼ばれる。GVT効果発現時にはドナーリンパ球が腫瘍特異抗原あるいは同種抗原を認識すると考えられ、同種移植はがん免疫細胞療法のひとつの形である。

同種移植後の同種免疫応答は移植片対宿主病(Graft-vs-Host Disease, GVHD)を発症させるが、GVHDには同種免疫応答が病態の主体をなす急性GVHDと、組織修復過程の異常(線維化)による慢性GVHDがある。急性GVHD病態メカニズムは前処置による組織傷害に続くレシピエントおよびドナー抗原提示細胞の活性化、ドナーT細胞の活性化と機能分化、ドナー細胞の傷害活性、炎症反応による標的細胞のアポトーシスおよび組織破壊の三相の免疫病態からなるが、メカニズムには未だ不明な点も多い。急性GVHDの予防および治療には、カルシニューリン阻害薬やステロイド薬などが投与されるが、それらによる非特異的免疫抑制はGVT効果や感染免疫も抑制する。同種移植後免疫メカニズムの解明と安全かつ効果的な制御は、学術的「問い」かつ臨床的課題となっている。

急性GVHD病態にはインターロイキン6(IL-6)が関与しており、研究開始当初はIL-6受容体(IL-6R)に対する抗体投与による急性GVHDの軽減効果が報告されていた(Kennedy GA et al, Lancet Oncol. 2014;15:1451-1459)。

難治性造血器腫瘍の治療手段として免疫受容体遺伝子導入リンパ球輸注療法(特異的リンパ球輸注療法)が、本邦でも臨床現場に導入されつつある。特異的リンパ球にはT細胞受容体(TCR)遺伝子導入Tリンパ球:TCR-T、キメラ抗原受容体(CAR)遺伝子導入Tリンパ球:CAR-Tがあり、製造不良や輸注後のサイトカイン放出症候群(Cytokine Release Syndrome, CRS)などの課題がある。CRSはリンパ球輸注後の過剰な免疫応答と考えられ、治療には抗ヒトIL-6R抗体(トシリズマブ)が使用されるが、その効果が不十分な場合はステロイド剤が投与される。

特異的リンパ球は自家細胞を用いて製造されているが、同種移植後再発症例ではドナー由来、あるいは第三者由来のオンデマンド(Off the shelf)リンパ球の使用も想定されており、その際には同種免疫応答によるGVHD発症リスクを考慮する必要がある。

このように、同種移植後(GVHD)、特異的リンパ球輸注療法後(CRS)の合併症制御には類似した方法が有効であることより、両者の病態には類似したメカニズムがあることが考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は輸注リンパ球による免疫病態(GVHD、CRS)のメカニズムの解明と、その安全かつ効果的な制御法を開発し、がん免疫細胞療法の治療成績向上の基盤作りを目的としたものである。

臨床病態メカニズムの解明、治療法の開発において、ヒトと類似した病態・症状を呈し、臓器・細胞・分子レベルでの解析が可能な動物モデルは有用である。急性GVHDとCRS病態の研究にも適切なモデルが必要となるが、我々の研究室では臨床的なHLA適合移植に相当するMHC一致マウス急性GVHDモデルを有しており、抗IL-6R抗体によるGVHD制御、ステロイド薬(デキサメサゾン)によるGVHD制御、コンジェニックマウスを用いたGVHD標的臓器におけるドナー細胞の追跡が可能である。また、腫瘍特異的リンパ球輸注による同系腫瘍退縮モデル、同種移植後担がん個体(移植後再発)への移植ドナー由来特異的リンパ球輸注モデルを有している。

本研究は、研究代表者のこれまでの研究成果に基づき三重大学独自のモデルを用いて解明し、安全で効果的ながん免疫細胞療法の開発を目的とするものである。

## 3. 研究の方法

本研究では研究期間内に以下の課題( )について、コンジェニックマウスを用いて継続的にフローサイトメトリー、血清および組織中の免疫パラメーター(サイトカイン等)測定、病理組織学的検討を行い、合併症制御・抗腫瘍効果発揮に重要な細胞・免疫パラメーターを探索し、輸注リンパ球制御モデルを開発する。具体的には、抗腫瘍効果発揮に重要な細胞やサイトカイン等の、タイミングを考慮した輸注・投与、あるいはモノクローナル抗体による除去・中和により、合併症を制御し抗腫瘍効果を増強させる方法を検討し、安全かつ効果的な輸注リンパ球制御モデルを開発する。

MHC一致同種移植モデル(BALB/c CD2F1)における急性GVHDとドナー細胞の体内動態  
BALB/c CD2F1同種移植モデルにおける抗IL-6R抗体、ステロイド剤の急性GVHDおよびドナー細胞の体内動態、免疫パラメーターへの影響  
非移植担がん・リンパ球輸注療法モデルにおける抗IL-6R抗体、ステロイド剤の腫瘍増殖

および輸注リンパ球の体内動態、免疫パラメーターへの影響

同種移植後担がん・リンパ球輸注療法モデルにおける抗 IL-6R 抗体、ステロイド剤の腫瘍増殖、GVHD (増悪) および輸注リンパ球の体内動態、免疫パラメーターへの影響

課題 1 では BALB/c 肉腫 CMS5 腫瘍特異的 TCR トランスジェニックマウス DUC18 由来リンパ球を、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を用いて活性化した後 IL-2 により増殖させ、担がん (CMS5a) 個体へ輸注する

#### 4. 研究成果

本研究では、上記 1 ~ 3 の課題について、適宜コンジェニックマウスを用いて作製し、ドナー由来細胞の体内動態を、骨髄 (造血幹細胞) およびグラフト由来に分けて観察し、免疫病態を細胞・分子レベルで解明することを目標に掲げ、実験を行った。具体的には、BALB/c-CD45.1 を (成熟 T 細胞除去) 骨髄、BALB/c-CD90.1 を T 細胞ドナーに用い、レシピエントである BALB/c および CD2F1 (両系統はともに CD45.1-、CD90.1-) マウスに輸注することで、ドナー由来細胞の追跡を試みた。

課題 1 の MHC 一致同種骨髄移植モデル (BALB/c CD2F1) では、BALB/c-CD45.1 の T 細胞除去骨髄細胞および BALB/c-CD90.1 脾臓由来 T 細胞を、レシピエントである CD2F1 マウス (移植前日に 10Gy の全身 X 線照射を実施) に経静脈的に輸注し、急性 GVHD 様の症状を呈することを確認した。これらの移植マウスを用いて、移植後 2 週、4 週、6 週目に GVHD の標的臓器の一つである腸管 (大腸) を採取し、酵素処理、比重遠心法により血球系細胞を採取し、フローサイトメトリー法により解析した。その結果、大腸に浸潤したドナー細胞を検出することができた。

課題 2 では BALB/c マウスに CMS5a を担癌し、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体により活性化、IL-2 により拡大した DUC18-CD90.1 T 細胞を、担癌 7 日目に輸注し腫瘍増殖を観察したところ、一時的な腫瘍増殖の鈍化は見られたが、拒絶には至らなかった。

課題 3 では、まず MHC 一致同種骨髄移植マウス (BALB/c CD2F1) を通常 BALB/c ドナーを用いて作製し、(微小残存病変モデルとして) CMS5a の担癌 3 日後に、課題 1 で行ったように活性化・拡大した DUC18-CD90.1 T 細胞を輸注した。この同種移植後・腫瘍特異的細胞輸注療法モデルでは、腫瘍退縮とともに GVHD 増悪が観察された。

課題 4 の結果より、抗腫瘍効果の発現には、担癌から細胞輸注までの期間が影響すると考えられた。また GVHD が存在する個体へは、腫瘍特異的リンパ球であっても併存する同種反応性に注意を要すると考えられた。

抗 IL-6R 抗体、ステロイド薬投与実験は、コンジェニックマウスの繁殖不良のため十分な検討ができていないが、今後も継続して GVHD、腫瘍特異的リンパ球輸注モデルへの影響を検討してゆく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 塩谷拓也、加藤ななみ、王碩林、加島江美子、西村廣明、伊野和子、大石晃嗣、榊屋正浩、俵功
2. 発表標題 マウス同系移植モデルにおけるCD25陽性細胞除去T細胞輸注による腫瘍抑制効果の検討
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術総会
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
---------	---------