

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20928

研究課題名（和文）ITK選択的阻害による制御性T細胞増幅を通じた新しい免疫寛容導入法の開発

研究課題名（英文）Development of a new method for induction of immune tolerance through amplification of regulatory T cells by inhibition of ITK.

研究代表者

近藤 匠（Kondo, Takumi）

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90966657

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ステロイド抵抗性急性GVHDは現在も予後不良である。移植後のTregの不安定さに起因する免疫バランスの不均衡が、過剰な同種免疫反応を生む原因の一つであると考えられる。Tregを除去したDEREGマウスから移植片を作成し、骨髄破壊処置を施したB6D2F1マウスに骨髄移植を行った。有意差は見られないが、ITK阻害薬投与により生存期間の短縮がみられた。in vitroでの実験を追加したところ、同種造血幹細胞移植後早期にはITK阻害薬の効果は移植片内のTregに依存する可能性が示唆された。この結果はITK阻害薬によるGVHD抑制効果を担保する為に重要な発見であり、今後の臨床応用に向けた基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

標準的GVHD予防としてカルシニューリン阻害薬が使用されるが、GVHDによる非再発死亡やQOLの低下が一定数起こる。また、カルシニューリン阻害薬による微小血管障害など薬剤そのものの副作用が移植時に問題になることがある。このため、新たなメカニズムのGVHD予防策の開発が必要とされている。我々はITK阻害薬によるGVHD予防法の実現に取り組んでおり前臨床モデルで有望な結果を得ている。今回の研究でGVHD予防という文脈においてITK阻害薬の効果を保証するにはTregが必要である可能性が示唆された。今後の臨床応用に向けて重要な基盤となりうる成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：The steroid-resistant acute GVHD remains a poor prognosis. Immune imbalance due to Treg instability after transplantation may be one of the reasons for the excessive allogeneic immune response. Grafts were prepared from DEREG mice with Tregs removed and bone marrow transplanted into B6D2F1 mice treated with irradiated bone marrow destruction. There was a trend toward shortened survival time in the ITK inhibitor group. Additional in vitro experiments suggest that the effect of ITK inhibitors may depend on the Tregs in the graft early after allogeneic HSCT. This is an important finding for the future clinical application of ITK inhibitors to ensure their efficacy in suppressing GVHD.

研究分野：同種造血幹細胞移植

キーワード：ITK 同種造血幹細胞移植 GVHD 免疫寛容

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は、難治性血液悪性腫瘍の根治療法として多くの患者の治療に貢献している。その一方で、移植片対宿主病(GVHD)は今なお最大の合併症である。移植後早期に起こる急性 GVHD は時に致死的であり、その後慢性 GVHD の引き金ともなりうる。また、慢性 GVHD は患者の QOL を損なう。これら GVHD は移植後の免疫寛容の不安定さの表現型の一つであるが、制御性 T 細胞(Treg)が安定した免疫寛容に重要であることが近年報告されている。一方、標準的な移植後免疫抑制療法に使用されるカルシニューリン阻害薬は、IL-2 産生抑制を通じて活性化 T 細胞とともに Treg も抑制してしまう面を持ち、免疫寛容には不利と考えられる作用を持ち合わせる。上記を克服し、さらに安全な移植を実現すべく、新たなアプローチによる免疫抑制法が必要とされている。

ITK (IL-2-inducible tyrosine kinase) は T 細胞受容体の直下で T 細胞受容体シグナル伝達にかかわる細胞内キナーゼである。ITK は T 細胞分化にも深くかかわり、ITK 欠損 CD4 陽性 T 細胞は IL-2 感受性が亢進し Th17 に優先して Treg に分化することが示されている。我々は ITK 選択的阻害薬が同種免疫反応としての活性化 T 細胞を抑制し Treg が維持されることを *in vitro* で示した上で、*in vivo* として ITK 選択的阻害薬で処理した移植片を用いたマウス同種移植の系で臨床的 GVHD の改善と生存延長を示し、ITK が GVHD の治療ターゲットとなることを報告している。剤型改良によりマウスに ITK 選択的阻害薬を経口投与することが可能となり、より臨床に応用しやすい形で検証することが可能になった。

2. 研究の目的

本研究では、マウスを用いた前臨床モデルにおいて ITK 選択的阻害薬投与により移植後早期から末梢性 Treg を誘導し、移植後長期にわたり Treg 恒常性を維持し免疫寛容をもたらす手法の開発を目標とした。

3. 研究の方法

動物による検証実験として、急性 GVHD マウスモデルとしてジフテリアトキシン投与によって Treg を除去でき、かつ GFP で Treg を識別できる DEREK マウス(B6 バックグラウンド、H2k b/b)をドナー、放射線照射による骨髄破壊的前処置を施した B6D2F1(H2k b/d)をレシピエントとして用いる同種骨髄移植モデルを作製する。移植片から Treg を除去することで、移植片由来の成熟 Treg の影響を排除する実験系を確立し、ITK 選択的阻害薬を移植後 2 週間経口投与し、GVHD スコア、生存率を評価した。

細胞レベルの評価を行うため、B6 マウスから脾細胞を摘出し磁気ビーズ法で細胞分離を行い、同種抗原の存在下で ITK 選択的阻害薬を添加した培地で共培養を行った。Treg の動態をフローサイトメトリを用いた細胞解析によって評価した。また、培養液上清のサイトカイン濃度を評価した。

4. 研究成果

ドナーとなる DEREK マウスへのジフテリアトキシン投与を最適化し、Treg を除去した移植片を用いた急性 GVHD マウスモデルを確立した。この系を用いて Treg を除去された移植片を移植された B6D2F1 マウスでは、有意差は見られないものの、ITK 阻害薬投与により生存期間の短縮がみられた。これは ITK 選択的阻害薬投与によって末梢性 Treg を誘導することにより免疫寛容に導く仮説とは相反する結果であった。なぜこのようなことが起こるのか、*in vitro* での実験を追加した。B6 マウスから CD4 陽性細胞を分離し、Treg を含む分画とそれ以外の分画に分け、それぞれを ITK 阻害薬を添加した培地内で同種抗原存在下の元で培養を行った。この結果、Treg を含む分画では IFN γ 産生能が ITK 阻害薬濃度依存性に低下したが、Treg を含まない分画ではこの効果は見られなかった。以上の結果から、同種造血幹細胞移植後早期には ITK 阻害薬の効果は移植片内の Treg に依存する可能性が示唆された。この結果は ITK 選択的阻害薬による GVHD 抑制効果を担保する為に重要な発見であり、今後の臨床応用の基盤となる研究成果である。

本研究の成果は今後学会発表を予定している。また、臨床応用に向けて研究を継続して

い<。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------