

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293113

研究課題名(和文)慢性GVHDの細胞・分子基盤

研究課題名(英文)Cellular and molecular bases for chronic GVHD

研究代表者

松島 綱治 (Matsushima, Kouji)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50222427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植後の慢性GVHDの発症・遷延には、移植片中に含まれるT細胞(gT)と造血幹細胞から新規に再構成されるT細胞(rT)の双方が関与するとされている。新規に確立したマウス慢性GVHDモデルでは、観察期間を通じてgTが数的に優位であり、また増殖能、サイトカイン産生能を保持していた。移植後にgTを除去すると、rTが増加し病態は改善しない一方、rTを除去するとgTの過剰な活性化により致死性となった。これらの結果から、gTとrTが相互に抑制関係を持ちつつ、慢性GVHDの病態に寄与していることが明らかになった。この抑制経路の分子機序解明により、慢性GVHDの治療が可能になると期待している。

研究成果の概要(英文)：Both graft-derived T cells (gT) and HSC-derived reconstituted T cells have been implicated in chronic GVHD after hematopoietic stem cell transplantation. In a newly developed mouse model of chronic GVHD, gT with the potential to proliferate and produce cytokines were predominant in the target tissues during the observation period. Depletion of gT after transplantation increased the number of rT and did not ameliorate cGVHD, whereas depletion of rT activated gT and resulted in lethal exacerbation of cGVHD. Identification of the molecular mechanisms underlying the interaction between TG and THSC is likely to lead to novel therapeutic strategies for the prevention and treatment of cGVHD.

研究分野：医歯薬学

キーワード：移植免疫 造血幹細胞移植 GVHD T細胞

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植(Allo-HSCT)は、造血器腫瘍や骨髄不全の患者を対象とした、大量化学療法と移植片対腫瘍効果による根治を狙った治療であるが、強力な治療効果と表裏一体として現れる同種免疫による合併症、移植片対宿主病 (graft-versus host disease: GVHD) の克服が大きな課題となっている。GVHD は発症時期によって急性、慢性に二分される。1980 年代に入り、組織適合抗原 (MHC) を介する非自己認識機構の発見により MHC 一致移植が定着し、また免疫抑制剤の使用法が確立することで、急性 GVHD の予防に関しては大きな進歩が得られた。加えて、急性 GVHD に対する分子標的療法も国内外で精力的に研究されており、研究代表者は、マウス allo-HSCT モデルを用いて急性 GVHD 発症過程における T 細胞動態と分子制御を解析する中で、細胞遊走制御因子ケモカインおよび接着因子の阻害が急性 GVHD の予防、治療に有効であること、また allo-HSCT 後免疫不全の要因が急性 GVHD による骨髄およびリンパ節の障害 (骨髄 GVHD, リンパ節 GVHD) に起因することを示してきた(JCI 1999, Nat Immunol 2005, J. Leuk Biol 2007, Blood 2010)。

一方で、慢性 GVHD に関してはその病態ならびに発症機序について未解明な点が多く、免疫学的、臨床的にも大きな課題が残されている。慢性 GVHD は通常移植後 100 日以降に皮膚、肝臓、肺、造血組織など多臓器に渡って自己免疫疾患に類似した病態を示し、最終的に線維化を伴う臓器障害をきたす。慢性 GVHD の発症様態は 1) 急性 GVHD に引き続いて起こるもの、2) 急性 GVHD が改善した後に発症するもの、3) 急性 GVHD を経ずに発症するもの、など多様である。

慢性 GVHD の発症機序は依然として不明な点が多いが、移植前の移植片中 T 細胞除去や、anti-thymocyte globulin および Campath-1H (anti-CD52 mAb) などによる移植後の T 細胞除去により慢性 GVHD が回避、軽減できることが臨床的に示されており、慢性 GVHD の発症には移植片に含まれる同種抗原反応性 T 細胞 (allo-T) が重要な役割を果たすと考えられている。一方で、研究代表者は、反復抗原刺激を受けた T 細胞は分裂能、サイトカイン産生能の低下など、機能的に老化すること (senescence) を明らかにしており (Int Immunol, 2007)、また持続的な抗原刺激による T 細胞の機能不全(exhaustion) など種々の末梢免疫寛容機構も知られている。これらの免疫寛容機構を回避して、移植片に含まれる allo-T 細胞が長期にわたり病態を引き起こし得るか、T 細胞生物学的にも検証が必要である (移植片由来 T 細胞の長期生存・機能維持の可能性)。また、近年、マウスモデルを用いた解析から、移植早期に放射線照射や急性 GVHD により障害を受けた胸腺において、造血幹細胞から新規に再構築

される T 細胞のクローン選択過程に障害が生じ、末梢へ自己反応性 T 細胞が出現し、自己免疫様の症状を誘導する可能性が示されているが、胸腺障害の細胞・分子機序は未解明である (造血幹細胞由来自己反応性 T 細胞の形成機序)。

研究代表者はこれまでに移植早期に allo-T が骨髄およびリンパ組織を構成する間葉系細胞や内皮を障害 (細胞傷害、増殖・分化抑制) することで、間葉系細胞の造血、免疫支持機能が失われること (Blood 2010)、特にリンパ節における早期の障害は線維化を伴う不可逆的な液性免疫不全をもたらすことを明らかにしている (J Immunol 2015)。これらの結果は、慢性 GVHD の発症が、移植早期における組織構成細胞の障害、そして病的 T 細胞存在下での異常な組織修復に起因する可能性を示している。

2. 研究の目的

同種造血幹細胞移植患者の生命予後および QOL を脅かす慢性 GVHD の細胞・分子基盤を解明することで、その新規治療、予防法開発の基礎を築く。また、慢性 GVHD の病態形成過程には“自己反応性 T 細胞の誘導と維持機構”、ならびに“炎症条件下における T 細胞の胸腺分化制御”という免疫学的重要課題が複合的に作用していると考えられる。研究代表者が有するメモリー T 細胞応答解析の研究基盤を駆使して慢性 GVHD モデルを解析することで、これらの重要課題の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、まずヒト慢性 GVHD と類似した病態を示すマウス慢性 GVHD モデルの構築を目的として、C57BL/6 → C3H.H2b minor histocompatibility antigen mismatch GVHD モデルを作成し、臨床経過ならびに組織病理を評価した。また、フローサイトメトリーにより、血液学的、免疫学的な推移を評価した。次に、CD45.1/CD45.2 および / または CD90.1/CD90.2 コンジェニック系を用いて、慢性 GVHD モデルを作成し、移植片由来 T 細胞 (Graft-T; gT) および造血幹細胞由来 T 細胞 (reconstituted T; rT) の細胞数、機能などの推移を解析した。それぞれの細胞集団を種々のタイミングに除去することで、慢性 GVHD を誘導する病的 T 細胞の由来を解析した。また、gT, rT の免疫表現型、機能、宿主抗原への反応性を解析した。

4. 研究成果

まず、ヒト慢性 GVHD と同様に、免疫再構築の進行に伴い末梢臓器へリンパ球が浸潤し、最終的に線維化・臓器不全に至る自己免疫疾患様の病態を呈するマウスモデルの確立を試みた。C57BL/6 → C3H.H2b minor histocompatibility antigen mismatch GVHD モデルにおいて、経時的にフローサイトメト

リーによる移植後の免疫再構築評価と、病理組織解析を行ったところ、同モデルでは移植後 21 日目より移植骨髄由来 T および B リンパ球の回復を認め、再構築が進行する 42 日目以降に慢性 GVHD の代表的標的臓器である唾液腺、肝臓、肺などへのリンパ球浸潤ならびに線維化の進行を認めた。標的臓器へ浸潤した T 細胞が、移植片中に混入していた成熟 T 細胞 (graft-T: gT) または骨髄前駆細胞から胸腺を経て再構築された細胞 (reconstituted-T: rT) であるかを解析したところ、移植後 63 日目においてなお gT が有意であった (図 1)。

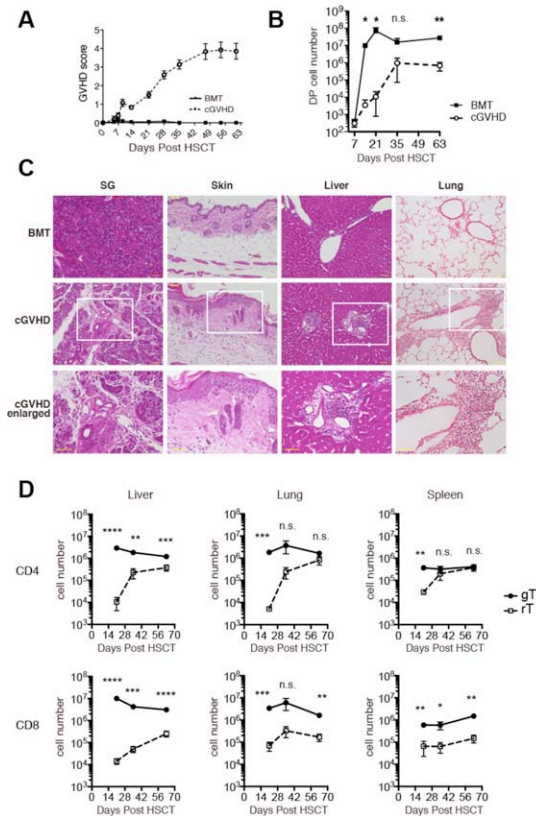


図 1 C57BL/6→C3H.H2b GVHD モデル (A) GVHD スコアの推移、(B) CD4⁺ CD8⁺ 胸腺細胞数の推移、(C) 移植後 63 日目の唾液腺 (SG)、皮膚、肝臓、肺の病理像、(D) 末梢組織における gT, rT の推移

さらに、両 T 細胞群の免疫表現系ならびに機能評価を行ったところ、gT には増殖能、サイトカイン産生等を保持した機能的な T 細胞集団が一定の割合で含まれていることが明らかになった。gT と rT の宿主抗原に対する反応特性を解析した。移植後 40 日目の慢性 GVHD 発症マウスから gT および rT を調整し、未処置 C3H.H2b マウスまたは T 細胞除去 B6 骨髄で再構築した C3H.H2b マウス (B6→C3H.H2b) から調整した T 細胞除去脾臓細胞または肺非血球細胞と共培養し、増殖応答を解析した。gT は、未処置 C3H.H2b と B6→C3H.H2b から調

整した T 細胞除去脾臓細胞いずれに対しても増殖応答を示したのに対し、rT は主に B6→C3H.H2b から調整した T 細胞除去脾臓細胞に反応性を示した。また、gT, rT いずれも非血球系細胞に対する増殖応答は認めなかった。これらの結果から、移植後 40 日目の gT は、宿主抗原を直接および間接の 2 つの抗原提示経路で認識するが、rT は間接経路のみで宿主抗原を認識すること、またいずれも非血球系細胞を認識しないことが示唆された。

gT と rT がそれぞれ cGVHD の病態形成にどのような役割を果たすかについて検討した。末梢における rT の再構築は、移植後 21 日目

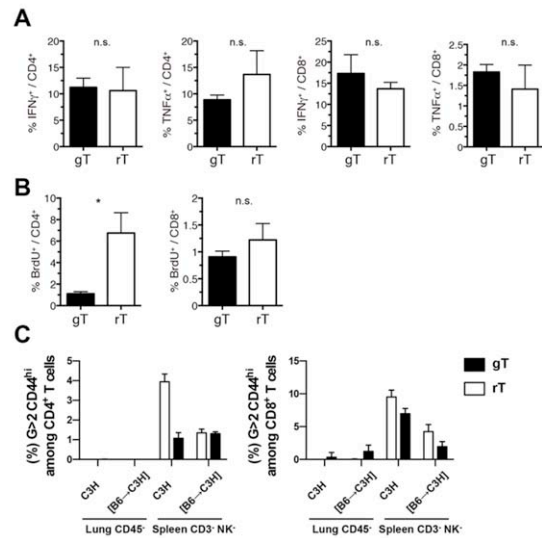


図 2 gT, rT の機能と反応性 (A) 再刺激時の IFN γ 産生能、(B) In vivo での増殖能、(C) 直接または間接宿主抗原提示への反応性

以降から始まり、一方 gT は移植後 14 日目以降、徐々に減少する。移植後 21 日目から持続的に rT を除去する抗体をレシピエントに投与すると、投与開始早期から体重減少などの GVHD 症状の増悪を認め、2 週間以内に全個体死亡した。この際、標的組織に浸潤した gT におけるサイトカイン産生の亢進を認め、rT が gT の活性化を抑制することで、GVHD 症状の増悪を抑制していることが示唆された。一方、同様のアプローチで gT を除去すると、臨床症状および移植後 63 日目の標的臓器におけるリンパ球浸潤像に顕著な変化を認めなかった。この際、標的臓器に浸潤した rT の細胞数は、未処置 cGVHD マウスの移植後 63 日目と比較し、著明に増加していたことから、gT が rT の再構築および末梢組織への浸潤に抑制的に働いていることが示唆された (図 3)。これらの結果は、cGVHD の標的臓器において rT および gT がお互いの質・量を制御しつつ、病態形成に寄与している可能性を示唆するものである。

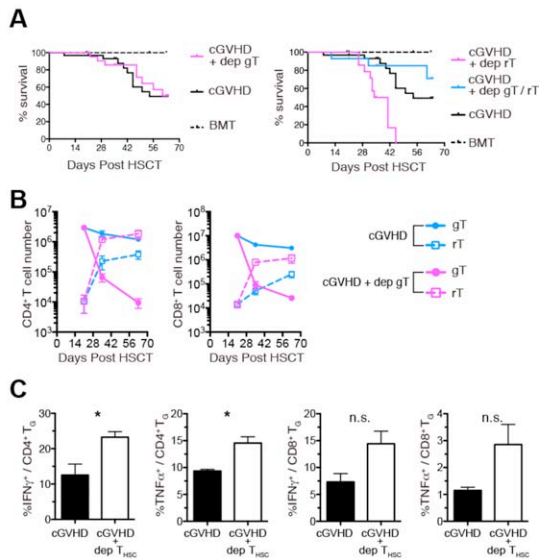


図3 gT, rT の cGVHD 病態への関与と細胞集団間相互作用
GVHD を誘導後、21 日目よりコンジェニックマーカーを標的とした除去抗体を投与し、gT または rT を除去した。(A) 生存曲線、(B) 肝臓における gT, rT の推移 (C) rT 除去後の gT のサイトカイン産生能

今後 gT と rT の間のネガティブフィードバックの細胞・分子機序を検証する予定である。

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 14 件)

- ① Hashimoto S, Ogoshi K, Sasaki A, Abe J, Qu W, Nakatani Y, Ahsan B, Oshima K, Shand FH, Ametani A, Suzuki Y, Kaneko S, Wada T, Hattori M, Sugano S, Morishita S, and Matsushima K. Coordinated changes in DNA methylation in antigen-specific memory CD4 T cells, *Journal of immunology*. 査読有, 190(8), 2013, pp. 4076-4091, 10.4049/jimmunol.1202267
- ② Abe J, Shichino S, Ueha S, Hashimoto S, Tomura M, Inagaki Y, Stein JV, and Matsushima K. Lymph node stromal cells negatively regulate antigen-specific CD4+ T cell responses, *Journal of immunology*. 査読有, 193(4), 2014, pp. 1636-1644, 10.4049/jimmunol.1302946
- ③ Shand FH, Ueha S, Otsuji M, Koid SS, Shichino S, Tsukui T, Kosugi-Kanaya M, Abe J, Tomura M, Ziogas J, and Matsushima K. Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes, *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America. 査読有, 111(21), 2014, pp. 7771-7776, 10.1073/pnas.1402914111

- ④ Shono Y, Shiratori S, Kosugi-Kanaya M, Ueha S, Sugita J, Shigematsu A, Kondo T, Hashimoto D, Fujimoto K, Endo T, Nishio M, Hashino S, Matsuno Y, Matsushima K, Tanaka J, Imamura M, and Teshima T. Bone marrow graft-versus-host disease: evaluation of its clinical impact on disrupted hematopoiesis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 査読有, 20(4), 2014, pp. 495-500, 10.1016/j.bbmt.2013.12.568
- ⑤ Tomura M, Hata A, Matsuoka S, Shand FH, Nakanishi Y, Ikebuchi R, Ueha S, Tsutsui H, Inaba K, Matsushima K, Miyawaki A, Kabashima K, Watanabe T, and Kanagawa O. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes, *Scientific reports*. 査読有, 4(2014), pp. 6030, 10.1038/srep06030
- ⑥ Shichino S, Abe J, Ueha S, Otsuji M, Tsukui T, Kosugi-Kanaya M, Shand FH, Hashimoto S, Suzuki HI, Morikawa T, Inagaki Y, and Matsushima K. Reduced supply of monocyte-derived macrophages leads to a transition from nodular to diffuse lesions and tissue cell activation in silica-induced pulmonary fibrosis in mice, *The American journal of pathology*. 査読有, 185(11), 2015, pp. 2923-2938, 10.1016/j.ajpath.2015.07.013
- ⑦ Suenaga F, Ueha S, Abe J, Kosugi-Kanaya M, Wang Y, Yokoyama A, Shono Y, Shand FH, Morishita Y, Kunisawa J, Sato S, Kiyono H, and Matsushima K. Loss of lymph node fibroblastic reticular cells and high endothelial cells is associated with humoral immunodeficiency in mouse graft-versus-host disease, *Journal of immunology*. 査読有, 194(1), 2015, pp. 398-406, 10.4049/jimmunol.1401022
- ⑧ Tsukui T, Ueha S, Shichino S, Inagaki Y, and Matsushima K. Intratracheal cell transfer demonstrates the profibrotic potential of resident fibroblasts in pulmonary fibrosis, *The American journal of pathology*. 査

- 読有, 185(11), 2015, pp. 2939-2948, 10.1016/j.ajpath.2015.07.022
- ⑨ Ueha S, Yokochi S, Ishiwata Y, Ogiwara H, Chand K, Nakajima T, Hachiga K, Shichino S, Terashima Y, Toda E, Shand FH, Kakimi K, Ito S, and Matsushima K. Robust Antitumor Effects of Combined Anti-CD4-Depleting Antibody and Anti-PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Antibody Treatment in Mice, *Cancer immunology research*. 査読有, 3(6), 2015, pp. 631-640, 10.1158/2326-6066.CIR-14-0190
- ⑩ Matsuo Y, Mizoguchi F, Saito T, Kawahata K, Ueha S, Matsushima K, Inagaki Y, Miyasaka N, and Kohsaka H. Local fibroblast proliferation but not influx is responsible for synovial hyperplasia in a murine model of rheumatoid arthritis, *Biochemical and biophysical research communications*. 査読有, 470(3), 2016, pp. 504-509, 10.1016/j.bbrc.2016.01.121
- ⑪ Moro T, Nakao S, Sumiyoshi H, Ishii T, Miyazawa M, Ishii N, Sato T, Iida Y, Okada Y, Tanaka M, Hayashi H, Ueha S, Matsushima K, and Inagaki Y. A Combination of Mitochondrial Oxidative Stress and Excess Fat/Calorie Intake Accelerates Steatohepatitis by Enhancing Hepatic CC Chemokine Production in Mice, *PLoS one*. 査読有, 11(1), 2016, pp. e0146592, 10.1371/journal.pone.0146592
- ⑫ Park AM, Kanai K, Itoh T, Sato T, Tsukui T, Inagaki Y, Selman M, Matsushima K, and Yoshie O. Heat Shock Protein 27 Plays a Pivotal Role in Myofibroblast Differentiation and in the Development of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis, *PLoS one*. 査読有, 11(2), 2016, pp. e0148998, 10.1371/journal.pone.0148998
- ⑬ Ueha R, Ueha S, Kondo K, Sakamoto T, Kikuta S, Kanaya K, Nishijima H, Matsushima K, and Yamasoba T. Damage to Olfactory Progenitor Cells Is Involved in Cigarette Smoke-Induced Olfactory Dysfunction in Mice, *The American journal of pathology*. 査読有, 186(3), 2016, pp. 579-586, 10.1016/j.ajpath.2015.11.009
- ⑭ Ueha R, Ueha S, Sakamoto T, Kanaya K, Suzukawa K, Nishijima H, Kikuta S, Kondo K, Matsushima K, and Yamasoba T. Cigarette Smoke Delays Regeneration of the Olfactory Epithelium in Mice, *Neurotoxicity research*. 査読有, 2016, pp., 10.1007/s12640-016-9617-5
- [学会発表] (計 16 件)
- ① Kouji Matsushima, Delayed and aberrant immunological reconstitution in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, 11th World Congress on Inflammation, 2013 年 09 月 21 日 Natal, Brazil
- ② Kouji Matsushima, Molecular and cellular bases for chronic inflammation-associated organ fibrosis, 11th World Congress on Inflammation, 2013 年 09 月 21 日, Natal, Brazil
- ③ 上羽悟史, 松島綱治, 他 4 名, 骨髄 GVHD における間葉系細胞障害の細胞・分子機序, 第 34 回日本炎症・再生医学会, 2013 年 05 月 12 日, 京都
- ④ 上羽悟史, 松島綱治, 他 4 名. 担癌マウスにおける腫瘍浸潤マクロファージの起源: 脾臓および骨髄由来単球の動態. 第 35 回日本炎症・再生医学会. 2014 年 07 月 01 日, 万国津梁館 (沖縄県、名護市)
- ⑤ Satoshi Ueha, Kouji Matsushima, 他 7 名. Loss of lymph node fibroblastic reticular cells and high endothelial cells underlies humoral immunodeficiency in mouse GVHD. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014 年 12 月 10 日, 国立京都国際会館 (京都府、京都市)
- ⑥ Satoshi Ueha, Kouji Matsushima, 他 7 名. Tracking of inter-tissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes. The 22th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. 2014 年 06 月 02 日, 神戸商工会議所 (兵庫県、神戸市)
- ⑦ 上羽悟史、松島綱治, 他 3 名. 慢性移植片対宿主病が骨髄造血微小環境に及ぼす影響. 第 1 回日本骨免疫学会. 2015 年 06 月 30 日, ホテルブリーズベイマリーナ (宮古島、沖縄)
- ⑧ Shigeyuki Shichino, Satoshi Ueha, Shinichi Hashimoto, and Kouji Matsushima, 他 2 名, Global transcriptome analysis reveals the expression signatures of cell surface receptors in the lung tissue cell subsets in mice. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages (国際学会). 2015 年 07 月 09 日, Ion International Research center, Tokyo, Japan

- ⑨ Satoshi Ueha, Kouji Matsushima, 他6名, Robust anti-tumor CD8+ T cell responses elicited by the anti-CD4 depleting antibody therapy. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages (国際学会). 2015年07月09日, Ion International Research center, Tokyo, Japan
- ⑩ Satoshi Ueha, Kouji Matsushima, 他5名. Robust anti-tumor effects of combined anti-CD4 depleting antibody and anti-PD-L1 antibody treatment in mice. 第74回日本癌学会学術総会. 2015年10月05日, 名古屋国際会議場(名古屋、愛知)
- ⑪ Ueha S, Matsushima K, 他3名, Lineage tracing of resident fibroblasts by the intratracheal cell transfer elucidates the cellular origin of activated fibroblasts in pulmonary fibrosis. 12th World Congress on Inflammation (国際学会). 2015年08月10日, Boston, MA, USA.
- ⑫ Satoshi Ueha, Kouji Matsushima, 他5名, Anti-CD4 depleting mAb improves costimulatory signals and cytokine microenvironments in the tumor draining lymph node. 第44回 日本免疫学会学術集会. 2015年11月18日, 札幌コンベンションセンター(札幌、北海道)
- ⑬ Shigeyuki Shichino, Satoshi Ueha, Shinichi Hashimoto, and Kouji Matsushima, 他2名, Global transcriptome analysis reveals the expression signatures of cell surface receptors in the lung tissue cell subsets. 第44回日本免疫学会学術集会. 2015年11月18日, 札幌コンベンションセンター
- ⑭ Tsukui T, Ueha S, Matsushima K, 他2名, Intratracheal cell transfer demonstrates the profibrotic potential of resident fibroblasts in pulmonary fibrosis. 第44回日本免疫学会学術集会. 2015年11月18日, 札幌コンベンションセンター
- ⑮ Shigeyuki Shichino, Satoshi Ueha, Shinichi Hashimoto, Kouji Matsushima, 他4名, Reduced Supply of Monocyte-derived Macrophages Leads to a Transition from Nodular to Diffuse Lesions and Tissue Cell Activation in Silica-induced Pulmonary Fibrosis in Mice. Keystone symposia, Fibrosis: From Basic Mechanisms to Targeted Therapies (Q3) (国際学会). 2016年02月10日, Keystone Resort. Colorado, USA

- ⑯ Tsukui T, Ueha S, Matsushima K, 他2名, Intratracheal cell transfer demonstrates the profibrotic potential of resident fibroblasts in pulmonary fibrosis. Keystone symposia, Fibrosis: From Basic Mechanisms to Targeted Therapies (Q3) (国際学会). 2016年02月09日, Keystone Resort. Colorado,

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称 : Immunological reconstitution promoter or prophylactic agent for infections each of which maintains graft-versus-tumor effect
 発明者 : K. Matsushima, S. Ueha, Y. Shno,
 権利者 : The University of Tokyo
 種類 : 特許
 番号 : PCT/JP2009/068805
 取得年月日 : Oct. 13, 2015
 国内外の別 : 国外

[その他]

東京大学・大学院医学系研究科・分子予防医学教室ホームページ
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/prevent/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 綱治 (MATSUSHIMA Kouji)
 東京大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号 : 50222427

(2) 研究分担者

橋本 真一 (HASHIMOTO Shinichi)
 金沢大学・医学系・教授
 研究者番号 : 00313099

上羽 悟史 (UEHA Satoshi)
 東京大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号 : 00447385

島岡 猛士 (SHIMAOKA Takeshi)
 東京大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号 : 90422279

(3) 連携研究者

該当無し