HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	KRP203短期投与と移植後シクロフォスファミド大量療法併用による移植片対宿主病の予防 [全文の要約]
Author(s)	横山, 絵美
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13699号
Issue Date	2019-06-28
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/74988
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号：2490
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Emi_Yokoyama_summary.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文
(要　約)

KRP203 短期投与と移植後シクロフォスファミド
大量療法併用による移植片対宿主病の予防

(Short-term KRP203 and posttransplant cyclophosphamide

for graft-versus-host disease prophylaxis)

２０１９ 年　６ 月

北　海　道　大　学

横 山 絵 美

学　位　論　文
(要　約)

KRP203 短期投与と移植後シクロフォスファミド
大量療法併用による移植片対宿主病の予防

(Short-term KRP203 and posttransplant cyclophosphamide

for graft-versus-host disease prophylaxis)

２０１９ 年　６ 月

北　海　道　大　学

横 山 絵 美

【緒言】

同種造血幹細胞移植において、移植片対宿主病 (graft-versus -host disease; GVHD) は、移植後の生存率に影響を及ぼす重大な合併症の一つである。レシピエントがドナーとは異なるヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA) を持つ場合に重症の GVHD が起こりやすくなるため、HLA 一致の同胞間または同種の造血幹細胞移植の成績が良好であることが示されてきたが、約半数のケースで HLA 一致のドナーが得られない。HLA 半合致のドナーの場合、親や同胞を含む親族においてドナーが存在する可能性が非常に高い。しかし、HLA の不一致から強力な同種抗原反応が起こり、重症の GVHD が起こりやすくなる。

GVHD 予防の手段として、移植後シクロフォスファミド大量療法 (posttransplant cyclophosphamide; PTCY) は、HLA 半合致の移植において広く使用されるようになってきている。PTCY は同種抗原反応性 T 細胞を選択的に傷害する一方で、造血幹細胞や制御性 T 細胞 (regulatory T cells; Treg) は CY の代謝産物を不活性型に変換する aldehyde dehydrogenase (ALDH)を高発現しているために、CY 投与後も温存されることが示されている。しかし、PTCY 単独では GVHD 抑制効果が不十分であり、カルシニューリン阻害剤 (calcineurin inhibitor; CI) などの免疫抑制剤の併用が必要であることが示されている。しかし、CI は移植後の Treg の再構築を阻害することが知られており、免疫寛容の構築に不利に働くと考えられ、また長期投与では腎機能障害などが問題となりやすく、CI を用いない GVHD 予防法の確立が望まれている。

FTY720 はスフィンゴシン-1-リン酸受容体 (sphingosine-1-phosphate receptor; S1PR) type 1,3,4,5 のアゴニストであり、ドナーリンパ球をリンパ節内に隔離することで GVHD 標的臓器へのリンパ球の遊走を抑止する作用を持つ。KRP203 は、S1PR type 1 の特異的アゴニストであり、FTY720 と比較して心血管系への副作用が少なく安全性が高いと考えられる。今回我々は、PTCY に短期間の KRP203 投与を併用した新しい GVHD 抑制療法について、GVHD のマウスモデルを用いて研究を行った。

【実験方法】

B6D2F1 ($H2^{b/d}$) マウスをレシピエントとし、骨髄破壊的な全身放射線を照射した後に、ドナーの B6 ($H2^{b}$) マウスから抽出した骨髄細胞と脾臓細胞を輸注した。CY は 50 mg/kg を移植後 day +3 に腹腔内投与し、KRP203 は 1 mg/kg を移植日から day +4 まで経口ゾンデを用いて連日内服させた。同種抗原反応性 T 細胞の解析を行う実験の移植では、レシピエントマウスの C3H に骨髄破壊的な全身放射線を照射した後に、ドナーとなる AKR の脾臓細胞と骨髄細胞を輸注した。ドナーの AKR マウス由来の $Th1.1^{+}$ 細胞のうち、$V\beta3^{+}$ T 細胞はレシピエントの C3H マウスの持つ Mls-2a 抗原に特異的

に反応性を持つため、同種抗原反応性 T 細胞として認識した。一方、Vβ8+ T 細胞は非特異的な T 細胞として対照においた。

移植後のマウスの毛皮の質感、脱毛の程度、活動性、姿勢、体重減少の 5 つの臨床的 GVHD 評価スコアリングシステムを用いて GVHD の評価を行ない、生存期間の観察を行った。GVHD の組織学的評価のため、移植後 4 週間の時点でレシピエントマウスの GVHD 標的臓器を取り出した。病理組織標本を作成して Hematoxylin & Eosin 染色を行い、急性 GVHD の病理組織学的半定量スコアリングシステムを用いて評価を行なった。GVHD 標的臓器と 2 次リンパ組織のドナーT 細胞の解析のため、各臓器を採取後に処理して細胞懸濁液としてから染色を行い、フローサイトメトリーを用いた解析を行なった。血清のサイトカイン濃度測定には cytometric beads array を用いた。

移植片対腫瘍 (graft versus leukemia; GVL) 効果の評価のための移植では、microbeads を用いて AutoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec) による negative selection を行い、T 細胞を除去した骨髄細胞と、脾臓細胞から純化した T 細胞をグラフトとして用い、ルシフェラーゼを導入した P815 腫瘍細胞を移植日に同時に輸注した。生体内生物発光イメージング (Bioluminescence imaging; BLI) を用いて、移植後の腫瘍増殖の評価を 1 週間ごとに行った。

【結果】

まず、KRP203 単独での GVHD 抑制効果について検討した。同種移植において、移植後 day +7 には腸間膜リンパ節のドナーT 細胞の増殖が見られるが、KRP203 1mg/kg を移植日から連日投与すると、day +7 のリンパ節内のドナーリンパ球数は有意に減少し、血清 IFNγ濃度も低下していた。Annexin V の染色を用いると、KPP203 投与群ではドナーリンパ球のアポトーシスが亢進していた。この機序により、KRP203 単独投与にて移植後の GVHD の重症度と死亡率は低下した。ドナーT 細胞のアポトーシスが同種抗原反応性 T 細胞に選択的に起きているのかを検討するため、ドナーに AKR マウスを、レシピエントに C3H マウスを用いた同種移植を施行し、レシピエント抗原に特異的に反応する Vβ3+T 細胞の割合を見ると、KRP203 投与群では CD8+細胞における Vβ3+T 細胞の割合が低下する傾向が見られたが、非特異的な Vβ8+T 細胞も全般に減少しており、PTCY で報告されているような同種抗原反応性 T 細胞への選択性は見られなかった。

次に、PTCY のマウスモデルを作成するため、同種移植後 day +3 に CY を 50 mg/kg または 100 mg/kg の投与量で腹腔内投与した。無治療の同種移植レシピエントマウスは重症の GVHD を発症し、day +50 までに全ての個体が死亡した。CY 100 mg/kg を投与したマウスでは GVHD が改善し観察期間内にマウスの死亡は見られ

ず、CY 50 mg/kg を投与したマウスでは 30 %の個体が生き延びた。このことから、臨床に即したモデルとして CY は 50 mg/kg を至適用量として用いることとした。

CY に day 0 から day +4 までの短期間の KRP203 投与を併用すると、CY 単独投与群と比較して生存率が改善し、移植後 day +14 の血清 TNF α 値が低下していた。KRP203 の投与期間を day 0 から day +28 まで延長しても移植後の成績に差は見られず、CY に併用する KRP203 は短期間でも十分であると判断した。GVHD 標的臓器の病理組織学的な評価においては、CY 単独投与でも同種移植のコントロール群と比較して腸管、肝臓、皮膚の GVHD 所見は有意に改善していたが、CY+KRP203 併用群では、CY 単独群と比較して腸管の組織学的所見がより改善していた。各臓器のフローサイトメトリー解析では、CY+KRP203 併用群において CY 単独群と比較して腸管と皮膚でドナーT 細胞の浸潤が少なかった。Treg は CY への耐性があり、PTCY では移植後 Treg が温存され回復しやすいことが示されているが、KRP203 の併用はこれを阻害することなく、移植後の脾臓においてむしろより多くの Treg を誘導していた。

最後に、ルシフェラーゼを導入した P815 腫瘍細胞を移植日に輸注し、その増殖の程度によって GVL 効果を評価した。まず、KRP203 3mg/kg 単独投与とシクロスポリン 50 mg/kg の単独投与における GVL 効果を比較すると、KRP203 投与群ではある程度の GVL 効果が保たれていたのに対し、シクロスポリン投与群では早期に腫瘍が増殖し、マウスが腫瘍死した。次に、CY＋KRP203 併用による GVL 効果の評価を行った。CY 単独投与では腫瘍増殖が見られず GVL 効果は保たれていた。これに KRP203 を併用すると、ある程度の腫瘍増殖が見られたが、T 細胞除去骨髄のみを移植した対照群と比較すると、腫瘍増殖は遅延し生存期間が延長していたため、ある程度の GVL 効果は保たれていると考えられた。

【考察】

PTCY は、HLA 半合致移植における GVHD 予防法として、その安全性と有効性が示されている。移植後に活性化した同種抗原反応性 T 細胞に対する clonal destruction を起こすことがその主な作用機序であるが、PTCY 単剤では GVHD 抑制効果は不十分である。高度な炎症病態である GVHD においては、二次リンパ組織で抗原提示を受けたドナーT 細胞が GVHD 標的臓器へと遊走し、さらに標的臓器において高度な増殖、活性化をきたすが、KRP203 は移植後早期にドナーT 細胞をリンパ節内に隔離して GVHD 標的臓器への遊走を阻止するため、GVHD が発症し増悪する始めの段階を抑制すると考えられる。PTCY に KRP203 を併用した場合、PTCY 単独投与と比較して GVHD 標的臓器におけるドナーT 細胞の浸潤が有意に少なかった。移植後早期に活性化したドナーT 細胞を二次リンパ組織に隔離することで、より効率的に PTCY によ

る clonal destruction が起こったことが考えられる。S1PR アゴニストの二次リンパ組織へのリンパ球隔離効果は可逆的とされているが、KRP203 によって移植後早期にドナーT 細胞球のアポトーシスが起こるために、移植後早期の短期間のみの併用でも十分に GVHD 抑制効果を示したものと考えられる。S1PR type 1 のシグナルは Treg の分化、増殖、維持に関与しており、FTY720 の投与が Treg の機能を高め炎症を抑制することが報告されている。今回の研究において、KRP203 は PTCY 後に残存した Treg を阻害することなく、むしろ $CD4^+$T 細胞における $FoxP3^+$の細胞の割合が増加していたことから、FTY720 と同様に Treg の分化、増殖を誘導し、GVHD のさらなる改善をもたらしたことが考えられる。臨床において PTCY に併用されている CI は、高度な T 細胞抑制効果によって PTCY への相加効果を示していると考えられるが、Treg に対しては抑制的に作用するため、Treg による生体内での安定した免疫寛容の獲得には不利に働く可能性がある。一方で、KRP203 は PTCY 後の Treg の機能回復を促進し、より早期に長期的な免疫寛容の獲得に寄与する可能性があり、PTCY に併用する薬剤として望ましいと考えられる。

PTCY では GVL 効果が阻害されないことが既報で示されている。移植後に PTCY を投与する前に起こる同種抗原反応性 T 細胞の高度な活性化が、GVL 効果に重要な役割を果たしている可能性も考えられる。S1PR 作動薬は、移植後早期に同種抗原反応性 T 細胞の活性化を促進する作用を持つため、PTCY に KRP203 を併用することは GVL 効果についても有利に働く可能性がある。

先に報告された S1PR type 1,3,4,5 のアゴニストである FTY720 は、GVHD 抑制効果が示されているものの、心血管系への副作用が問題となった。S1PR type 1 の選択的なアゴニストである KRP203 は、FTY720 よりも副作用が少なく、かつ良好な GVHD 抑制効果が期待できる薬剤である。今後、KRP203 の臨床的な安全性と有効性が臨床試験によって検証されることが望ましい。

【結論】

HLA 半合致の造血幹細胞移植において、短期間の KRP203 投与と PTCY の併用療法は、CI を用いない新たな優れた GVHD 抑制療法である。