



Title	カルシニューリン阻害薬はドナーT細胞疲弊抑制を介して免疫寛容導入を阻害する
Author(s)	千丈, 創
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15647号
Issue Date	2023-09-25
DOI	10.14943/doctoral.k15647
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/90972
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 :
File Information	SENJO_Hajime.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

カルシニューリン阻害薬はドナーT細胞疲弊抑制を
介して免疫寛容導入を阻害する

(Calcineurin inhibitors inhibit tolerance induction by
suppressing terminal differentiation of donor exhausted
T cells after allogeneic stem cell transplantation)

2023年 9月

北 海 道 大 学

千 丈 創

Hajime Senjo

学 位 論 文

カルシニューリン阻害薬は、ドナーT細胞疲弊抑制を
介して免疫寛容導入を阻害する

(Calcineurin inhibitors inhibit tolerance induction by
suppressing terminal differentiation of donor exhausted
T cells after allogeneic stem cell transplantation)

2 0 2 3 年 9 月

北 海 道 大 学

千 丈 創

Hajime Senjo

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	8 頁
実験方法	10 頁
結果	23 頁
考察	70 頁
総括および結論	74 頁
謝辞	75 頁
引用文献	76 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の成果の一部は以下の論文として受理された。

Hajime Senjo, Shinpei Harada, Shimpei I Kubota, Yuki Tanaka, Takahiro Tateno, Zixuan Zhang, Satomi Okada, Xuanzhong Chen, Ryo Kikuchi, Naoki Miyashita, Masahiro Onozawa, Hideki Goto, Tomoyuki Endo, Yuta Hasegawa, Hiroyuki Ohigashi, Takahide Ara, Yoshinori Hasegawa, Masaaki Murakami, Takanori Teshima, and Daigo Hashimoto.

Title: Calcineurin inhibitors inhibit tolerance induction by suppressing terminal differentiation of donor exhausted T cells after allogeneic SCT

雑誌名 Blood

本研究の成果の一部は以下の学会に発表した。

Hajime Senjo, Daigo Hashimoto, Shimpei I Kubota, Yuki Tanaka, Shinpei Harada, Kazuki Yoneda, Zixuan Zhang, Xuanzhong Chen, Ryo Kikuchi, Yuta Hasegawa, Hiroyuki Ohigashi, Takahide Ara, Yoshinori Hasegawa, Masaaki Murakami and Takanori Teshima

Title: Calcineurin inhibitors inhibit tolerance induction by suppressing terminal differentiation of donor exhausted T cells after allogeneic SCT

64th American Society of Hematology annual meeting, Dec 10th-13rd, 2022, New Orleans, LA, USA

要旨

【背景と目的】 移植片対宿主病(graft-versus-host disease: GVHD)は同種造血細胞移植(allogeneic hematopoietic cell transplantation: allo-HCT)における重要な合併症の一つである。現在、カルシニューリン阻害剤(Calcineurin inhibitor: CNI)を用いた GVHD 予防が広く用いられているが、依然として約半数の症例が慢性 GVHD を発症し、数年にわたる免疫抑制剤による治療が必要になり、患者の QOL を著しく低下させる。慢性 GVHD の病態には、T 細胞を介した胸腺障害によるネガティブセクションが障害されることや、制御性 T 細胞 (Treg) の恒常性の乱れ、ドナー B 細胞の異常な活性化、ドナー T 細胞や骨髄細胞の慢性活性化が関与することが示されている。また、CNI による GVHD 予防が失敗するメカニズムの一つとして、CNI の IL-2 シグナル遮断に伴う Treg の減少が関与すると考えられている。しかしながら、我々の研究グループでは、allo-HCT 後にドナー T 細胞が宿主非造血細胞上のアロ抗原に慢性的に曝露されると、エフェクター機能が著しく低下したドナー T 細胞疲弊が促進されることを示しており、CNI 投与中の慢性 GVHD の発症には Treg 減少だけでなく、ドナー T 細胞疲弊の抑制による慢性活性化が必要と考えられる。最近、カルシニューリン阻害剤の主要な作用である NFAT の阻害によって、慢性ウイルス感染や腫瘍モデルにおいて T 細胞疲弊が抑制されることが報告された。従って、CNI による GVHD 予防では、ドナー T 細胞疲弊が抑制されることで、逆説的にドナーの抗宿主免疫寛容の誘導に失敗してしまう可能性が考えられる。しかし、実際に CNI が allo-HCT 後のドナー T 細胞疲弊にどのような影響を与えているかは不明である。そこで、本研究では、GVHD マウスモデルと養子免疫マウスモデルを用いて、CNI が allo-HCT 後のドナー T 細胞疲弊の動態に及ぼす影響を検討した。

【材料と方法】 マウスの HCT では、前処置として 11Gy の全身放射線照射を行い、主要組織適合遺伝子複合体半合致の allo-HCT を行った。移植片として、アロ抗原を特異的に認識する 2C-TCR トランスジェニックマウス(2C)由来の純化 T 細胞 1×10^6 個と、ポリクローナル TCR を発現する Ly5a マウス(WT)由来の純化 T 細胞 1×10^6 個、および野生型 B6 マウス由来の T 細胞除去骨髄細胞 5×10^6 個を輸注した。CNI 投与実験では、シクロスポリン(Cyclosporine: CSP) 25mg/kg を移植後 day 0 から day28 まで連日投与した。抗 PD-L1 抗体 (PD-L1 mAbs)投与実験では、初回 $500 \mu\text{g}$ 、2 回目以降 $200 \mu\text{g}$ を移植後 day0 もしくは day14 から day42 まで投与した。ドナー T 細胞の疲弊観察実験では、移植後 day7、14、21、28、35 のレシピエントマウスの肝臓と脾臓の T 細胞の免疫チェックポイントや T 細胞疲弊に関わる分子発現をシングルセル RNA シーケンス法による mRNA シーケンシング法

(scRNAseq) およびフローサイトメトリー(FCM)で観察した。移植片対白血病効果 (graft-versus-leukemia: GVL)の検討実験では、上記の同種移植モデルの移植後 day7 に、ルシフェラーゼを発現させた B6 マウス由来白血病細胞である C1498-luc をレシピエントマウスに播種し、day14、21、28、35、42、49 に、生物発光イメージング (Bioluminescence imaging:BLI) を用いてマウス体内の腫瘍を検出および定量した。養子免疫実験では、前処置として 11Gy の全身放射線照射を行い、CSP を day0-14 まで投与したレシピエントマウス由来の純化 T 細胞 1×10^6 個、および野生型 B6 マウス由来の T 細胞除去骨髄細胞 5×10^6 個を輸注し、週 3 回体重および GVHD スコアを観察した。移植後 day50 に慢性 GVHD の評価として、涙液分泌試験と GVHD 標的臓器である唾液腺、肝臓、皮膚における病理学的検討を行って評価した。

【結果】 FCM により、同種 SCT 後 day14 に 2C 由来の CD8+T 細胞が PD-1 や TIGIT などの複数の免疫チェックポイント受容体を発現する terminally exhausted T cell (Tex) に分化し、PD-1 遮断に対するドナー T 細胞の反応性の低下につながったことが示された。次に、同種 SCT 後 day14 に CSP または vehicle が投与したレシピエントから採取したドナー T 細胞の scRNAseq を実施した。UMAP 解析により、CD4+ T 細胞の 4 つのクラスター (C10-C13) と CD8+ T 細胞の 9 つのクラスター (C1-C9) を同定し、それら全てが疲弊を誘導する分子である Tox を発現し、全てのドナー T 細胞が疲弊分化経路に入っていることが示唆された。CSP の投与によって、他のクラスターと比較して、Tox の発現が低く、Ly6c2 の発現が高いことを特徴とする C10 (CD4+) および C1 (CD8+) を顕著に増加させた。FCM では、CSP 投与群において day14 に 2C 由来 CD8+、WT CD8+、WT CD4+ドナー T 細胞で PD-1+TIGIT-TOX^{low} 細胞を著しく増加しており、これらの細胞は CSP 中止後少なくとも 2 週間持続していることを確認した。CSP を投与されたレシピエントマウスから純化した Ly6C+ T 細胞は、養子免疫後に Ly6C- Tex に分化し、Ly6C- T 細胞は Ly6C-にとどまったことから、CSP 誘導 Ly6C+ドナー T 細胞は Tex の前駆細胞であると考えられた。我々は、これらの細胞を、PD-1 に加えて CX3CR1 や GranzymeB が高発現であることから transitory-CNI と命名した。GVHD 予防/治療や Tex への分化を抑制することが知られている様々な薬剤の中で、CSP と ibrutinib のみが TOX^{low}PD-1+TIGIT-Ly6C+ transitory-CNI を誘導したことから、NFAT 阻害が transitory-CNI 誘導に重要であることが示唆された。重要なことに、Ly6C-細胞ではなく Ly6C+ドナー T 細胞のみが養子移入後に慢性 GVHD を誘導し、transitory-CNI が慢性 GVHD の病態生理に重要な役割を果たすことが示唆された。Day14 からの PD-L1 mAbs の投与は、ドナー T 細胞の酸化的リン酸化(oxidative phosphorylation:

OXPPOS)を増強し、CSP で治療されたレシピエントにおいてのみ宿主由来白血病細胞を根絶させた。

【考察】 本研究では、網羅的遺伝子発現解析およびマウスモデルを用いて、CNI によるドナーT細胞の疲弊抑制によって transitory-Tex と定義される Ly6C 陽性細胞集団が誘導されることが確認された。さらに Ly6C 陽性のドナー由来 T 細胞を養子免疫することで、Ly6C 陰性 terminal-Tex へと分化しながら慢性 GVHD が発症することから、CNI によってドナーT細胞の最終的な疲弊が抑制され、同時に誘導された transitory-Tex が慢性 GVHD 発症の原因となることが示された。また、本研究では CNI によって誘導された transitory-Tex が免疫チェックポイント阻害薬(immune checkpoint inhibitor: ICI)に対して強い反応性を示し、transitory-Tex が保持されたレシピエントマウスでは ICI 投与後に増殖能や殺細胞能が増強されることで、GVL 効果が増強されることが明らかになった。

【結論】 CNI の早期投与によって誘導されるドナー由来の transitory-Tex 細胞の残存は、慢性 GVHD 発症のリスクを高める。同時に、移植後の原病再発に対して ICI 投与による GVL 増強を介した治療選択肢を残すことが可能である。本研究により、同種移植において、ドナーT細胞疲弊に基づく、最適な GVHD 予防法と移植後再発の際の適切な治療の選択ができる可能性が示された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

Allo	allogeneic
AP-1	activator protein 1
BCL6	B-cell lymphoma 6
BCR	B-cell receptor
BLI	bioluminescence imaging
BTK	Bruton's tyrosine kinase
BMT	bone marrow transplantation
CNI	Calcineurin inhibitor
CSP	Cyclosporine
CX3CR1	C-X3-C motif chemokine receptor 1
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEG	differential expressed genes
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCM	flow cytometry
FCS	fetal calf serum
GVHD	graft-versus-host disease
GVL	graft-versus-leukemia
HCT	hematopoietic cell transplantation
H&E	hematoxylin and eosin
ICI	immune checkpoint inhibitor
IFN γ	interferon- γ
IL-2	interleukin-2
IRES	internal ribosome entry site
ITK	interleukin-2-inducible T-cell kinase
IVIS	in vivo imaging system
JAK	janus kinase
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
KLR	killer cell lectin-like receptor

LMCs	liver-infiltrating mononuclear cells
mAb	monoclonal antibody
MEK	MAP kinase
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
MSCV	murine stem cell virus
MT	Masson trichrome
mTOR	mammalian target of rapamycin
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
OGDH	oxoglutarate dehydrogenase
PBS	phosphate buffered saline
PCA	principal component analysis
PD-1	programmed cell death-1
PD-L1	programmed cell death ligand-1
PFA	paraformaldehyde
PSL	prednisolone
PTCy	post-transplant cyclophosphamide
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park memorial institute medium
scRNAseq	single cell RNA sequence
Syn	syngeneic
TBI	total body irradiation
TCD-BM	T-cell depleted bone marrow
TCF-1	T-cell factor 1
TCR	T-cell receptor
TIGIT	T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
Tim-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TNF α	tumor necrosis factor- α
TOX	thymocyte selection associated high mobility group box
Tpex	precursor of exhausted T-cell
Treg	regulatory T-cell
UMAP	uniform manifold approximation and projection
WT	wild type
WTA	whole transcriptome analysis

YFP yellow fluorescent protein

緒言

同種造血細胞移植(allogeneic hematopoietic cell transplantation : allo-HCT)は、様々な血液悪性腫瘍に対する根治的治療法である。移植片対宿主病(graft-versus-host disease : GVHD)はその中でも重要な合併症の一つであり、時に致死的となりうるため、免疫抑制剤を用いた GVHD の予防は allo-HCT の成功には不可欠である。標準的な GVHD 予防法としてカルシニューリン阻害剤 (calcineurin inhibitor : CNI) や代謝拮抗剤による GVHD 予防が広く普及しているが、allo-HCT で治療された患者の約 40~50%が慢性 GVHD を発症し、数年にわたる免疫抑制剤による治療が必要となり、患者の QOL が著しく低下する(Lee *et al.*, 2010; Anasetti *et al.*, 2012; Zeiser *et al.*, 2021)。慢性 GVHD の病態には、T 細胞を介した胸腺障害による胸腺ネガティブセレクションの障害、制御性 T 細胞 (Treg) の恒常性の乱れ、ドナー B 細胞の異常な活性化、ドナー T 細胞や骨髄細胞の慢性活性化が関与することが示されており(Sakoda *et al.*, 2007; Zeiser *et al.*, 2017)、CNI による GVHD 予防が失敗するメカニズムの一つとして、CNI の IL-2 シグナル遮断に伴う Treg の減少が提唱されている(Sugiyama *et al.*, 2014; Satake *et al.*, 2014)。

我々は、これまでに allo-HCT 後にドナー T 細胞を宿主非造血細胞上のアロ抗原に慢性的に曝露すると、ドナー T 細胞の疲弊が促進され、ドナー T 細胞のエフェクター機能が著しく低下することを示しており、慢性 GVHD の発症には Treg 減少だけではなくドナー T 細胞疲弊の抑制が必要と考えられる(Asakura *et al.*, 2010; Flutter *et al.*, 2010)。近年、CNI の主要な機能である NFAT 阻害が、慢性ウイルス感染や腫瘍モデルにおいて T 細胞疲弊を抑制することが報告された(Khan *et al.*, 2019; Seo *et al.*, 2019)。したがって、CNI を用いた GVHD 予防では、ドナー T 細胞疲弊が抑制されることで、逆説的にドナー細胞の免疫寛容誘導が失敗している可能性がある。しかし、実際に CNI が allo-HCT 後のドナー T 細胞疲弊に影響を与えるかどうかは、まだ明らかにされていない。

一方で、移植後再発も慢性 GVHD と共に allo-HCT 後の重要な問題の一つであり、ドナー T 細胞の疲弊は、allo-HCT 後のマウスや患者における白血病の再発と関連する。免疫チェックポイント阻害剤 (immune checkpoint inhibitor : ICI) は、古典的ホジキンリンパ腫などの血液悪性腫瘍の allo-HCT 後再発に対して投与されるが、その奏功率は限定的である(Noviello *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2018; Toffalori *et al.*, 2019)。さらに、allo-HCT 後の ICI 投与による T 細胞の活性化から生じる GVHD の増悪は、移植片対白血病(graft-versus-leukemia: GVL)効果の増強効果を相殺する可能性があり、allo-HCT 後のドナー T 細胞が疲弊に至る分子メカニズムの詳細な理解は移植後再発の治療戦略にも不可欠である(Herbaux *et al.*, 2018; Kohler *et al.*, 2021;

Blazar *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2022)。T 細胞が疲弊 T 細胞へと分化する過程は多段階であり、疲弊した T 細胞の中には、幹細胞様の性質を持つ precursor of exhausted T cells (Tpex) や、エフェクター様機能を持つ Tpex 由来の transitory T cell、そして複数の抑制受容体を発現し機能が著しく低下した terminal differentiated exhausted T cell (Tex) などの異なる特徴を持つ細胞群が含まれることが明らかとなっている (Utzschneider *et al.*, 2016; Im *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016; He *et al.*, 2016; Hudson *et al.*, 2019)。本研究では、シングルセル RNA-シーケンス (scRNAseq) とフローサイトメトリー分析を用いて、マウス同種骨髄移植 (BMT) 後のドナー T 細胞疲弊に対する CNI の影響を評価した。また、マウス BMT モデルを用いて、HCT 後の免疫寛容誘導および ICI の抗腫瘍効果に対する CNI の影響を検討し、allo-HCT において CNI がドナー T 細胞の疲弊を抑制し transitory T cell の特徴を示す Ly6C⁺T 細胞を増加させることで、慢性 GVHD 発症を誘導することを初めて報告した。また、Ly6C⁺T 細胞が ICI に対する高い反応性を示し、GVL 効果増強による再発予防効果を誘導することを示した。

実験方法

1. 実験材料

1) マウス

7週齢、雌の C57BL/6 (B6, H-2b, CD45.2+, CD8.2+)、BALB/c (H-2d, CD45.2+, CD8.2+)、B6-Ly5a (H-2b, CD45.1+, CD8.2+)、B6D2F1 (H-2b/d, CD45.2+, CD8.1+/CD8.2+) マウスを日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。B6.Cg-Tg(Tcra2C,Tcrb2C)1Dlo (2C-Tg, H-2b, CD8.1+, CD45.2+) マウスは Prof. Paul J. Martin (Fred Hutchinson Cancer Center) から提供され使用した。本マウスは理研バイオリソース研究センター (RBRC02781) に deposit されている。

遺伝子組み換えマウスに関しては下記用途に使用した。

B6.Cg-Tg(Tcra2C,Tcrb2C)1Dlo (2C-Tg)

上記マウスは、一般的にマウスにユビキタスに発現される OGDH に由来するペプチドと H-2Ld の複合体を認識する (Sha *et al.*, 1988)。移植マウスモデルにおけるアロ抗原特異的 T 細胞の profile を検証するため、ドナー T 細胞に本マウス由来の T 細胞を使用し、レシピエントマウスに B6D2F1(H-2d)を使用した。

これらのマウスは本学の動物実験施設にて繁殖飼育し、全ての実験で 8~12 週齢時に実験を行った。いずれの実験においても、「北海道大学動物実験に関する規程」および「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定」に従って、動物実験 (承認番号: 17-0026, 2022-009) と遺伝子組換え実験 (承認番号: 20176-036, 22-0013) の承認を得て行った。

2) 薬剤

抗 PD-L1 モノクローナル抗体: (PD-L1 mAbs, clone MIH5) は、理研バイオリソースセンター (Tsukuba, Japan) から得た MIH5 ハイブリドーマ細胞 (RCB2324) より調製した (Tsushima *et al.*, 2003)。マウスに PD-L1 mAb を、最初の注射は 500 μ g、その後は週 2 回 200 μ g を腹腔内注射した。

シクロスポリン: Cyclosporine (Novartis Pharma, Tokyo, Japan) は T 細胞内でシクロフィリンと複合体を形成して細胞質でカルシニューリンを阻害する薬剤

である (Qadir *et al.*, 2005)。Cyclosporine は Water(Sigma Aldrich:#W3500)に溶解し、allo-HCT 後の day 0 から day14 もしくは day28 まで 25mg/kg の用量で連日内服投与した。

イブルチニブ : Ibrutinib (LC Laboratories, Woburn, USA) は、B 細胞受容体 (BCR)および B 細胞の遊走や接着に関与するケモカイン受容体の下流に位置するシグナル分子のブルトン型チロシンキナーゼ(BTK)と、IL-2 誘導性 T 細胞キナーゼ(ITK)を阻害する薬剤である (Dubovsky *et al.*, 2014)。Ibrutinib は Water(Sigma Aldrich:#W3500)に溶解し、allo-HCT 後の day 0 から day28 まで 25mg/kg の用量で連日内服投与した。

ルキシソリチニブ : Ruxolitinib (LC Laboratories, Woburn, USA) は、JAK1 および JAK2 に高い選択性を有する JAK 阻害薬である (Takahashi *et al.*, 2018)。Ruxolitinib は、エタノールに溶解したのちに 0.1%Tween20 を含むリン酸緩衝生理食塩水で希釈し、30mg/kg の用量で 1 日 2 回、allo-HCT 後の day 0 から day28 まで連日内服投与した。

DAPT : N-[N-(3,5-difluorophen-acetyl)-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT; Sigma-Aldrich, USA) は、1 回膜貫通型受容体である Notch の γ セクレターゼによる切断を阻害することで Notch の細胞内領域の核への移行を阻害する薬剤である (Toubai *et al.*, 2011)。DAPT は PBS で希釈し、50mg/kg の用量で、allo-HCT 後の day 0 から day28 まで連日腹腔内注射によって投与した。

セルメチニブ : Selumetinib (LC Laboratories, Woburn, USA) は、細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)経路の上流調節因子である MEK1/2 を標的とした阻害剤である (Verma *et al.*, 2021)。Selumetinib は Water(Sigma Aldrich:#W3500)に溶解し、allo-HCT 後の day 0 から day28 まで 10mg/kg の用量で連日内服投与した。

シロリムス : Sirolimus (LC Laboratories, Woburn, USA) は、mTOR の活性化を阻害する薬剤である (Herrero-Sánchez *et al.*, 2016)。Sirolimus は、0.5%メチルセルローズに懸濁し、1.5mg/kg の用量で allo-HCT 後の day 0 から day28 まで連日内服投与した。

プレドニゾロン：Prednisolone (Shionogi, Osaka, Japan)は、細胞質の glucocorticoid receptor に結合し、炎症関連転写因子を抑制する薬剤である (Takahashi *et al.*, 2018)。Prednisolone は PBS で溶解し、10mg/kg の用量で allo-HCT 後の day 0 から day28 まで連日内服投与した。

低用量インターロイキン 2：IL-2 (PeproTech, NJ, USA)は、低用量で投与することで CD8⁺T 細胞や CD4⁺T 細胞を活性化することなく Treg を誘導する薬剤である (Yu *et al.*, 2006)。IL-2 は PBS に溶解し、5000IU/day の用量で allo-HCT 後の day 0 から day14 まで連日皮下注射した。

2. 方法

1) マウス同種造血細胞移植

レシピエントに B6D2F1 マウス (H-2^{b/d}) を、ドナーに主要組織適合遺伝子複合体(Major histocompatibility complex: MHC)が半合致となる B6 マウス(H-2^b)を用いて同種移植を行った。アロ抗原特異的なドナー由来 T 細胞を識別するために、移植片として、アロ抗原を特異的に認識する 2C-TCR トランスジェニックマウス(2C)由来の純化 T 細胞 1×10^6 個と、ポリクローナル TCR を発現する Ly5a マウス(WT)由来の純化 T 細胞 1×10^6 個を用いた。また、移植後の造血を担保するために野生型 B6 マウス由来の T 細胞除去骨髄細胞 5×10^6 個を用いた。

ドナーマウスをイソフルラン吸入で麻酔して安楽死させ、両側大腿骨、脛骨、骨盤骨及び脾臓を摘出した。摘出した脾臓は滅菌済みのスライドガラスですりつぶし、70 μ m セルストレイナーを通して RPMI1640 (Sigma-Aldrich) + 4% FCS (Selborne, Tasmania, Australia) を用いて細胞浮遊液にした。大腿骨・脛骨・骨盤骨は、両側先端を切断し、23 ゲージ針と 1ml シリンジを用いて RPMI1640 + 4% FCS で骨髄細胞を押し出し、70 μ m セルストレイナーを通して細胞浮遊液とした。その後、脾臓細胞、骨髄細胞浮遊液に Lysing Buffer (BD Bioscience, San Jose, CA) を用いて溶血処理を行い、トリパンプルー法により生細胞数をカウントした。細胞数カウントの後、脾臓細胞浮遊液は総細胞数： 1×10^6 個につき 4 μ l の MACS[®] Buffer(Miltenyi Biotec)でペレットを混和させ、総細胞数 1×10^6 個につき 1 μ l の MACS[®] pan-T antibody cocktail (Miltenyi Biotec) を添加した。4°C で 5 分間静置した後、総細胞数 1×10^6 個につき 3 μ l の MACS[®] Buffer で混和し、 1×10^6 個につき 2 μ l の MACS[®] anti-biotin Microbeads(Miltenyi Biotec)を加え、4°C で 10 分間静置した。10ml の MACS[®] Buffer を加え、4°C, 1500rpm, 5min で遠心分離を行い、上清を吸引し破棄した

後、再度 5ml の MACS® Buffer を加えて、autoMACS® Pro Separator を使用して、negative selection で純化 T 細胞を単離した。骨髓細胞浮遊液は総細胞数：1 x 10⁶ 個につき 9 μl の MACS® Buffer (Miltenyi Biotec) でペレットを混和させ、総細胞数 1 x 10⁶ 個につき 1 μl の MACS® anti-CD90 microbeads (Miltenyi Biotec) を添加した。4°C で 15 分間静置した後、10ml の MACS® Buffer を加え、4°C、1500rpm、5min で遠心分離を行い、上清を吸引し破棄した後、再度 5ml の MACS® Buffer を加えて、autoMACS® Pro Separator を使用して、negative selection で T 細胞除去骨髓細胞を単離した。単離後に細胞浮遊液を遠心して上清を破棄し、生細胞数をカウントした。細胞数をカウントした後に、細胞浮遊液を遠心して上清を破棄し、レシピエント 1 匹あたり、2C 由来純化 T 細胞 1 x 10⁶ 個、WT 由来純化 T 細胞 1 x 10⁶ 個、野生型 B6 マウス由来 T 細胞除去骨髓細胞 5 x 10⁶ 個を PBS 250 μl で希釈し、移植片として使用した。

移植細胞を輸注するレシピエントマウスには 8~12 週齢の雌マウスを使用した。移植前処置として、移植当日に放射線照射装置 MBR-1520R-4 (HITACHI, Tokyo, Japan) を用いて、電圧 125kV、電流 15mA、照射距離 500mm、遮蔽板 アルミニウム 0.5mm + 銅 0.2mm の条件で、総線量 11Gy を 4 時間間隔の 2 分割照射で施行した。照射 2 時間後に移植片を 1 匹あたり 250 μl ずつ静脈内投与した。

また、移植後腫瘍再発モデルとして、B6 マウス由来の腫瘍細胞である C1498 を用いるため、B6 レシピエントに、ドナーマウスとして BALB/c マウスから精製した 5 x 10⁶ 個の T 細胞除去骨髓細胞および 1 x 10⁶ 個の純化 T 細胞を移植した。移植前処置として、移植当日に放射線照射装置 MBR-1520R-4 (HITACHI, Tokyo, Japan) を用いて、電圧 125kV、電流 15mA、照射距離 500mm、遮蔽板 アルミニウム 0.5mm + 銅 0.2mm の条件で、総線量 11Gy を 4 時間間隔の 2 分割照射で施行した。照射 2 時間後に移植片を 1 匹あたり 250 μl ずつ静脈内投与した。

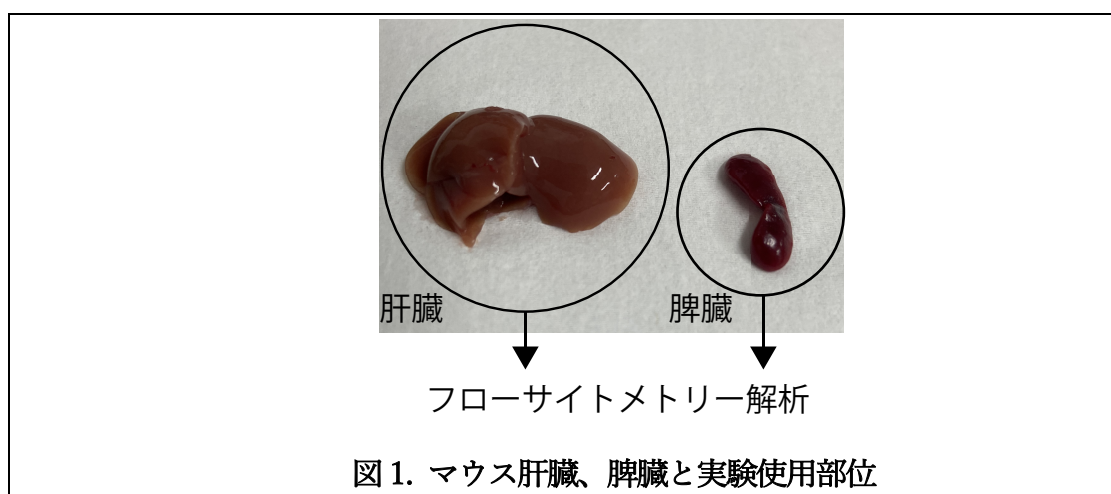
HCT 後のマウスは specific pathogen-free 環境下で、通常の餌と、液体滅菌を施し塩酸で pH 2.5 に調整した滅菌酸性水で飼育した。HCT 後のマウスの GVHD の重症度は、生存率と GVHD score で評価した。GVHD score は体重、姿勢 (posture)、活動性 (activity)、毛並み (fur texture)、脱毛 (skin integrity) の 5 項目を各項目 0~2 点で点数化し、合計したものとした (Cooke *et al.*, 1996)。(表 1)

表 1 : Assessment of Clinical GVHD in Transplanted Animals

Criteria	Grade 0	Grade 1	Grade 2
Weight loss	<10%	>10% to <25%	>25%
Posture	Normal	Hunching noted only at rest	Severe hunching impairs movement
Activity	Normal	Mild to moderately decreased	Stationary unless stimulated
Fur texture	Normal	Mild to moderately ruffling	Severe ruffling/ poor grooming
Skin integrity	Normal	Scaling of paws/tail	Obvious areas of denuded skin

2) マウス脾臓、肝臓の摘出

マウスをイソフルランの吸入によって安楽死させ、腹膜を切開し脾臓を摘出した。次に胸郭を開けて心臓を露出し、下大静脈・門脈を切断後、左心室より 10ml の PBS で還流を行った後に肝臓を摘出した。フローサイトメトリー解析には脾臓と肝臓全体を使用した(図 1)。



3) マウス脾臓からの単核細胞の単離

RPMI1640 (Sigma-Aldrich) + 4% FCS (Selborne, Tasmania, Australia) を 2ml 加えた 12-well plate に、採取した脾臓を入れて on ice で保存し、全マウスの検体が揃ったのちに滅菌済みのスライドガラスですりつぶし、70 μ m セルスト

レイナーを通して RPMI1640 + 4% FCS を用いて細胞浮遊液にした。その後、細胞浮遊液に Lysing Buffer (BD Bioscience, San Jose, CA) を用いて溶血処理を行い、トリパンブルー法により生細胞数をカウントした。

4) マウス肝臓からの肝臓浸潤単核細胞(liver-infiltrating mononuclear cells: LMCs)の単離

4 mg/ml の濃度の collagenase typeIV (Sigma-Aldrich)を含む RPMI1680 + 4% FCS を 6ml 加えた 6-well plate に、採取した肝臓を入れ、剪刀を用いて 1-2 mm 片に細かく切り刻み、37°C で 1 時間静置した。その後、細胞浮遊液を 3ml シリンジと 19 ゲージ針を用いて混和し、70 μ m のセルストレーナーを通して 50 ml チューブに回収した。回収した細胞浮遊液を 4°C、2000 回/分、5 分間で遠心し、上清を慎重に破棄して細胞ペレットを得た。得られたペレットを Water(Sigma-Aldrich)で調整した 30% パーコール液 (GE Healthcare, Tokyo Japan) 10ml でよく混和し、50ml チューブに回収した。その後、1700 回/分、30 分、室温で遠心し、上層をサクションで取り除き、沈殿した細胞液層を回収した。Lysing Buffer を用いて溶血処理を行い、トリパンブルー法により生細胞数をカウントした。

5) フローサイトメトリーによる解析

表 2 に示した抗体を使用し、細胞表面抗原の染色を行った。具体的には、各種抗体を Flow buffer (PBS + 2% FCS + 2 μ mol EDTA) で 200 倍に希釈し抗体カクテルを作成し、脾臓および肝臓から単離した細胞に抗体カクテルを加え、4°C、30 分間静置させることで反応させた。抗 CD8.1 抗体、抗 CD45.1 抗体を含んだ抗体カクテルに関しては、一次染色の後に抗 Streptavidin 抗体を Flow buffer で 200 倍に希釈し、4°C、30 分間静置させ二次染色を行った上で解析した。

また、脾臓および肝臓から単離した細胞の TOX、TCF-1、Foxp3、GranzymeB の発現を評価するため、細胞質内の TOX、TCF-1、Foxp3、GranzymeB を蛍光抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。具体的には、細胞表面抗原の染色後に、Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて、細胞の固定と透過処理を行い、一晩 4°C で静置した後、各抗原に対する抗体を Perm buffer で 200 倍に希釈して染色し解析を行った。

反応後は、FACS ARI III (BD Biosciences, San Jose, CA) 及び、FlowJo software (Tree Star, Inc.) を用いて解析した。

表 2. フローサイトメトリーで使用した抗体

抗原	クローン	標識	販売元	カタログ番号
Granzyme B	GB11	FITC	BioLegend	515403
Ly-6C	HK1.4	FITC	BioLegend	128006
TCRb	H57-597	FITC	BD Biosciences	553171
CD8a	53-6.7	FITC	BD Biosciences	553033
H2-Kd	SF1-1.1	FITC	BD Biosciences	553566
Foxp3	R16-715	PerCP/Cy5.5	BD Biosciences	563902
TCRb	H57-597	PerCP/Cy5.5	BD Biosciences	560657
CD4	GK1.5	PerCP/Cy5.5	BioLegend	100422
CD8a	53-6.7	PerCP/Cy5.5	BioLegend	100733
CD62L	MEL-14	PerCP/Cy5.5	BD Biosciences	560513
H2-Kb	AF6-88.5	PE	BD Biosciences	553570
Ki-67	16A8	PE	BioLegend	652404
TCF-7/TCF-1	S33-966	PE	BD Biosciences	564217
PD-1	J43	PE-CF594	BD Biosciences	562523
CD45.1	A20	PE/Cyanine7	BioLegend	110730
CD8a	53-6.7	PE/Cyanine7	BioLegend	100721
CD62L	MEL-14	PE/Cyanine7	BD Pharmigen	560516
CD4	GK1.5	PE/Cyanine7	BioLegend	100422
TOX	TXRX10	eFluor660	Thermo Fisher Scientific	50-6502-82
IFN-gamma	XMG1.2	APC	BioLegend	505810
TCRb	H57-597	APC	BD Biosciences	553174
CD90.2	53-2.1	APC	BioLegend	140312
TCF-7/TCF-1	S33-966	BV421	BD Biosciences	566692
Tim-3	RMT3-23	BV421	BioLegend	119723
CD4	GK1.5	BV480	BD Biosciences	746475
TCRb	H57-597	BV480	BD Biosciences	746385
CD44	IM7	BV510	BD Biosciences	563114
CD45.2	104	BV510	BioLegend	109827
Tim-3	5D12	BV510	BD Biosciences	747625

CD8a	53-6.7	BV605	BD Biosciences	563152
TCRb	H57-597	BV605	BioLegend	109241
Ly-108	13G3	BV711	BD Biosciences	740823
TIGIT	1G9	BV711	BD Biosciences	744214
CD8a	53-6.7	BV711	BioLegend	100759
Ly6c	HK1.4	BV785	BioLegend	128041
TIGIT	1G9	BV786	BD Biosciences	744215
CD8a	53-6.7	BV786	BioLegend	100749
CD8a(CD8.1)	49-31.1	Biotin	CEDARLANE	CL8921B
CD45.1	A20	Biotin	BioLegend	110704
Fixable Viability Stain 780		APC-Cy7	BD Horizon	565388
Streptavidin		BV421	BioLegend	405226
Streptavidin		BV605	BioLegend	405229

6) マウス養子免疫移植 (Adoptive transfer)

2-(1)の通り施行した allo-HCT のレシピエントに、移植後 day0 (移植日) から day14 まで CSP または Vehicle として Water(Sigma-Aldrich)を投与し、day14 に 2nd ドナーとして脾臓を摘出し、2-(1)と同様に純化 T 細胞を抽出した。野生型 B6 マウス由来の T 細胞除去骨髄細胞 5×10^6 個と、2nd ドナー由来の純化 T 細胞 1×10^6 個を合わせて移植片とし、CSP 治療群と Vehicle 治療群の 2 種類の移植片を作成した。移植細胞を輸注する 2nd レシピエントマウスには B6D2F1 の 8~12 週齢雌マウスを使用した。移植前処置として、移植当日に放射線照射装置 MBR-1520R-4 (HITACHI, Tokyo, Japan)を用いて、電圧 125kV、電流 15mA、照射距離 500mm、遮蔽板 アルミニウム 0.5mm + 銅 0.2mm の条件で、総線量 11Gy を 4 時間間隔の 2 分割照射で施行した。照射 2 時間後に移植片を 1 匹あたり 250 μ l ずつ静脈内投与した。

Ly6C+/-T 細胞の機能解析としての Adoptive transfer は以下の通り施行した。CSP で治療したマウスの脾臓から上記の通り T 細胞を抽出し、抗 CD90.2 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 Ly6C 抗体を抗体:MACS Buffer=1:200 で作成した抗体カクテルで染色した後、DAPI で染色し、FACS ARIAM (BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて DAPI-CD11b-CD90.2+Ly6C+T 細胞もしくは DAPI-CD11b-CD90.2+Ly6C-T 細胞を sort した。野生型 B6 マウス由来の T 細胞除去

骨髓細胞 5×10^6 個と、2nd ドナーから sort した純化 T 細胞 1×10^6 個を合わせて移植片とし、Ly6C⁺群と Ly6C⁻群の 2 種類の移植片を作成した。この検討でも移植細胞を輸注する 2nd レシピエントマウスには B6D2F1 の 8~12 週齢雌マウスを使用した。移植前処置として、移植当日に放射線照射装置 MBR-1520R-4 (HITACHI, Tokyo, Japan) を用いて、電圧 125kV、電流 15mA、照射距離 500mm、遮蔽板 アルミニウム 0.5mm + 銅 0.2mm の条件で、総線量 11Gy を 4 時間間隔の 2 分割照射で施行した。照射 2 時間後に移植片を 1 匹あたり 250 μ l ずつ静脈内投与した。

HCT 後のマウスは specific pathogen-free 環境下で、通常の餌と、液体滅菌を施し塩酸で pH 2.5 に調整した滅菌酸性水で飼育した。HCT 後のマウスの GVHD の重症度は、生存率と GVHD score で評価した。GVHD score は体重、姿勢 (posture)、活動性 (activity)、毛並み (fur texture)、脱毛 (skin integrity) の 5 項目を各項目 0~2 点で点数化し、合計したものとした (Cooke *et al.*, 1996) (表 1)。Day50 に涙液量を測定した後 sacrifice し、肝臓、唾液腺、皮膚の組織標本を作成した。

7) 涙液量の測定

移植後のマウスのドライアイを評価するために涙液量を測定した。10% ケタミン (フジタ製薬、東京、日本) と 2% キシラジン (バイエル薬品、大阪、日本) を $1 \times$ PBS (-) で希釈し、最終濃度がケタミン 20 mg/ml、キシラジン 2 mg/ml になる麻酔薬を作成し、マウス 1 匹あたり 70 μ l を腹腔内投与して鎮痛、鎮静させた。麻酔後のマウスの下眼瞼にフェノールレッド糸 (商品名: ゾーンクイック、メニコン、名古屋、日本) を 15 秒間接着させ、左右の黄色から赤色に変色した糸の長さを測定し平均を求めた (図 2)。



図 2. フェノールレッド糸での涙液量測定

8) 組織標本作製

パラフィン標本の作成：移植後のマウスから得た皮膚は短冊状にトリミングした後に、爪楊枝に巻きつけてのロール標本を作成し、4% paraformaldehyde (Merk Millipore, Billerica, MA) にて4°Cで一晩固定した(図3)。固定後の標本のパラフィン包埋から切片の作成は札幌総合病理研究所に依頼した。肝臓はマウスから摘出する前に1×PBSで灌流処理を行い、末梢血をできる限り除いた後に4% PFAで固定した。唾液腺も摘出し4%PFAで固定した(図4)。肝臓、唾液腺も同様に包埋以降の処理は札幌総合病理研究所に依頼し、hematoxylin and eosin (H&E)染色標本とマッソン・トリクローム (Masson trichrome stain, MT) 染色、未染色標本の作成を依頼した。

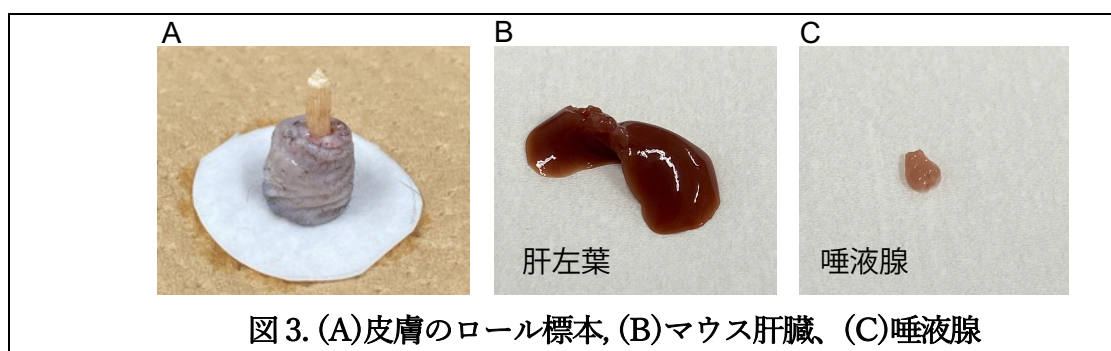
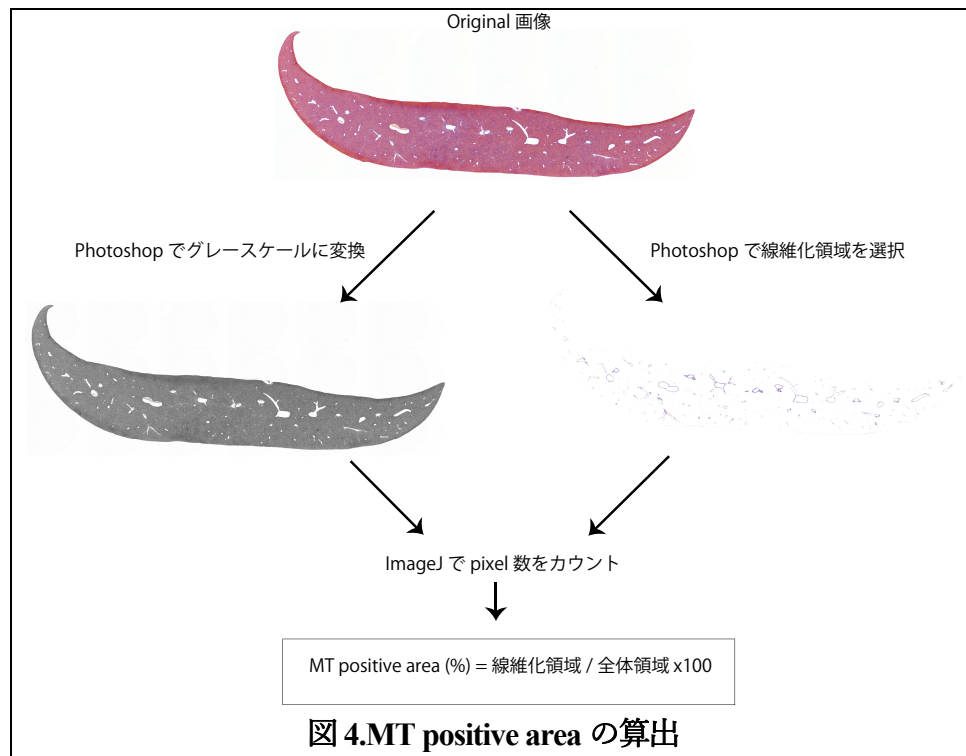


図3. (A)皮膚のロール標本、(B)マウス肝臓、(C)唾液腺

H&E 染色標本およびMT 染色標本はBZ-X700顕微鏡 (KEYENCE, Tokyo, Japan) の20×/0.75NA、または100×/1.45NAの対物レンズを用いて室温下で観察及び撮影を行った。画像解析はAdobe Photoshop (22.5.8)及びimageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>)を用いて行った。

9) MT 染色での線維化部位の定量

移植後 day 50 のMT 染色標本を臓器切片の全域が含まれるようBZ-X700顕微鏡 (KEYENCE, Tokyo, Japan) で撮影した。画像をAdobe Photoshop (22.5.8)においてグレースケール画像に変換し、次にMT 画像中の青色の線維化領域をPhotoshopの自動選択ツールで選択し、画像として書き出した。MT 染色陽性領域の算出にはImage J software (NIH, Bethesda, MD, <http://imagej.nih.gov/ij/>)を用い、全体領域と線維化領域のpixel数をカウントし、全体領域に対する線維化領域の面積比率を算出した(図4)。



10) シングルセル RNA シークエンス(scRNAseq)

scRNAseq には、BD Rhapsody Express Single-Cell Analysis system を用いた。FACSARIAIII セルソーターを用いて CD90+細胞のフローソーティングを行い、移植後 14 日目の脾臓から純化 T 細胞を抽出した。T 細胞は BD Mouse Immune Single-Cell Multiplexing Kit (BD Biosciences, #633793)を用いてラベル化した。単細胞分離及び cDNA 合成には、BD Rhapsody Single-Cell Analysis System (BD) を用いた。ライブラリーは、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) と Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。配列解析は、かずさ DNA 研究所 (Chiba, Japan) にて DNBSEQ-G400 シーケンサー(MGI Tech, Shenzhen, China)を用いて 100-bp ペアエンドリードで行った。CSP 治療群 2 匹、Vehicle 治療群 2 匹合計 4 匹のレシピエントマウスからプールされた合計 16578 個の細胞の遺伝子配列が決定された。DNBSEQ パイプラインによって生成されたペアエンド Fastq ファイル中の生リード (R1:セルバーコードリード、R2:RNA リード) をもとにクリーンリードを得るための前処理が行われ、BD Rhapsody TM WTA パイプライン v1.0 をクリーンデータで使用し、品質管理、バーコードと UMI の抽出、マウス参照ゲノム (GRCm38-PhiX-gencodevM19) へのアライメントを行い、FASTQ ファイルを経て csv ファイルに変換された。シングルセルデータのクラスタリングとアノテーションについ

て、各データセットの単一細胞のクラスタリングおよび差次的発現遺伝子解析は、SeqGeq v1.8 (BD Biosciences)(Eisenstein *et al.*, 2020)を用いて実施した。細胞の品質管理として、空のウェル、ミトコンドリア遺伝子の割合が 0.2 以上の死細胞、または細胞の Library Size と発現 Gene 数からダブレットと思われる異常値を削除し、最終的に 15985 個の細胞を解析に使用した。発現データを連結し、10,000 リードあたりのカウント数で正規化し、全マトリックスを対象として解析した。主成分分析 (PCA) では、1966 個の高分散遺伝子を選択した。また、PCA パラメータを 15 次元、分解能を 0.45 として Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)を実行し、データの可視化および探索を行った。次に、同定された各クラスターを、細胞サブセットを定義するマーカー遺伝子として以前に報告されたそのマーカー遺伝子によって手動で注釈をつけた。すべての発現差解析では、比較対象集団に対して Fold-Change > |1.5| と Bonferroni adjust q-value < 0.01 を示した遺伝子を、高発現遺伝子または低発現遺伝子と定義した。パスウェイ解析では、各クラスターの DEG で強い発現を示した遺伝子を DAVID Bioinformatics Resources (<https://david.ncifcrf.gov/>)(Huang *et al.*, 2009; Sherman *et al.*, 2022)に登録し、Mus musculus のデータリソースと照合し、各クラスターについて上位の KEGG パスウェイ項目を P 値とともに記録した。

11) 腫瘍細胞への luciferase 遺伝子の導入

ドナーT 細胞による GVL 効果を In vivo bioluminescence imaging (BLI)で評価するために、Luciferase 遺伝子を導入した白血病細胞株を作成した。ATCC (Rockville, MD, USA) から購入した B6 マウス由来急性骨髄性白血病細胞株 C1498 に、pMSCV-luc-IRES-YFP プラスミドを導入した HEK293T 細胞から生成したウイルス上清と pCL-Eco (#12371; Addgene) を、1 μ g/ml ピューロマイシン (Sigma-Aldrich) および 6 μ g/ml ポリブレン (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した RPMI 1640 培地中で培養した(Zhang *et al.*, 2022; Naviaux *et al.*, 1996)。pMSCV-luc-IRES-YFP プラスミドおよび pCL-Eco は、それぞれ Dr. Gerard Grosveld (St. Jude Children's Research Hospital) および Dr. Inder Verma (Addgene) から提供された。ウイルスを C1498 に感染させた後、限界希釈法を用いて細胞を単細胞分離し、単一の YFP 発現腫瘍細胞(C1498^{luc})を回収した。

12) 移植片対白血病 (GVL) 効果の評価

移植後腫瘍再発モデルを用いて、移植後 day0 から day14 まで、CSP または Vehicle を 25mg/kg の用量で連日経口投与した。移植後+7 に、レシピエントマ

ウスにそれぞれ 5×10^4 個の C1498^{luc} 細胞および 1×10^6 個の C1498^{luc} 細胞を静脈注射した。移植後 day14 に in vivo bioluminescence imaging (BLI) を実施し、検出された腫瘍量に基づいて群間の腫瘍量が同等となるようにマウスを PD-L1 mAbs 投与群または Vehicle 群に振り分けた。その後週 1 回 BLI で腫瘍量を測定した。BLI は、撮像の 5 分前に 500 μ g の d-ルシフェリン (Promega, Madison, USA) をマウスに皮下投与し、IVIS Imaging System ver. 4.3.1 (Perkin Elmer, Waltham, MA) を用いて施行した。発光量は photons per second per square centimeter per steradian (ph/s/cm²/sr) として算出した。

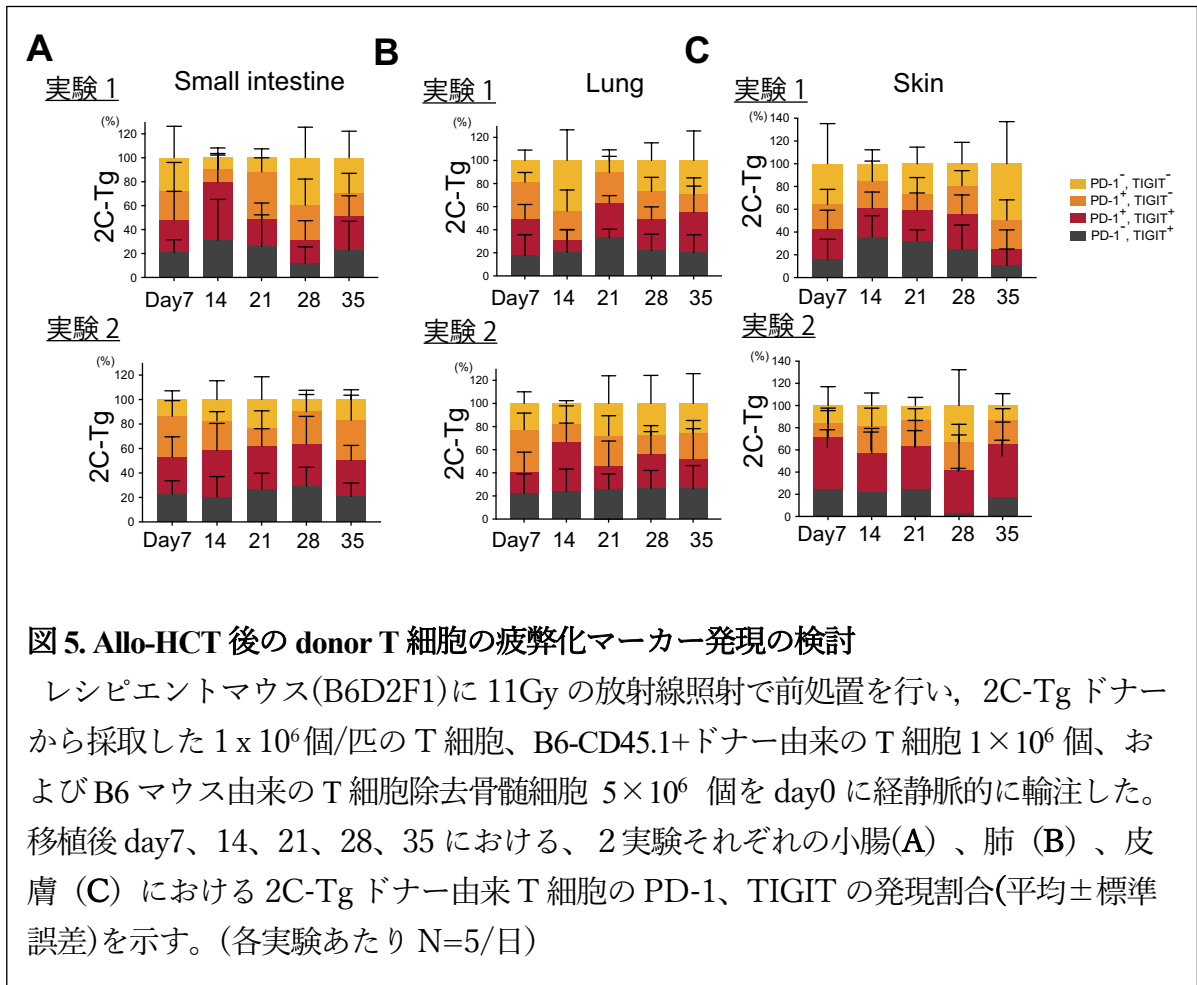
13) 統計処理

2 群比較は Mann-Whitney U test を用いて検定した。P 値 < 0.05 をもって統計学的有意差の有無を判断し、全てのデータは平均値 ± 標準誤差にて表記した。全ての統計学的検定は、GraphPad Prism 9 (La Jolla, CA) の統計プログラムを用いて行なった。

結果

1. アロ抗原特異的ドナーT 細胞疲弊のマウスモデルの作成

Allo-HCT 後のアロ抗原特異的なドナーT 細胞の疲弊状況を評価するため、致死量の放射線を照射した B6D2F1 (H-2^{b/d}) マウス 1 匹あたりに、レシピエント特異的 2C TCR トランスジェニック (2C-Tg) マウス (B6-CD8.1+background) 由来の T 細胞 1×10^6 個および B6-CD45.1+ドナー由来の T 細胞 1×10^6 個と、B6 マウス由来の TCD-BM 5×10^6 個を day0 に移植した。Allo-HCT 後 1 週間ごとに、脾臓、肝臓、腸管、肺、皮膚のドナーT 細胞における疲弊マーカーである PD-1 および TIGIT の発現を、FCM 解析により評価した。しかし、腸管、肺、皮膚由来のドナーT 細胞の PD-1 および TIGIT の発現はレシピエントマウスにおける個体差が著明であり、また実験間での差が大きく再現性に乏しかった (図 5A-C)。



一方で、脾臓と肝臓由来のドナーT細胞のPD-1およびTIGITの発現は個体差が少なく、複数回の実験で結果に再現性が得られたため、以後は脾臓と肝臓のデータのみを収集する方針とした。

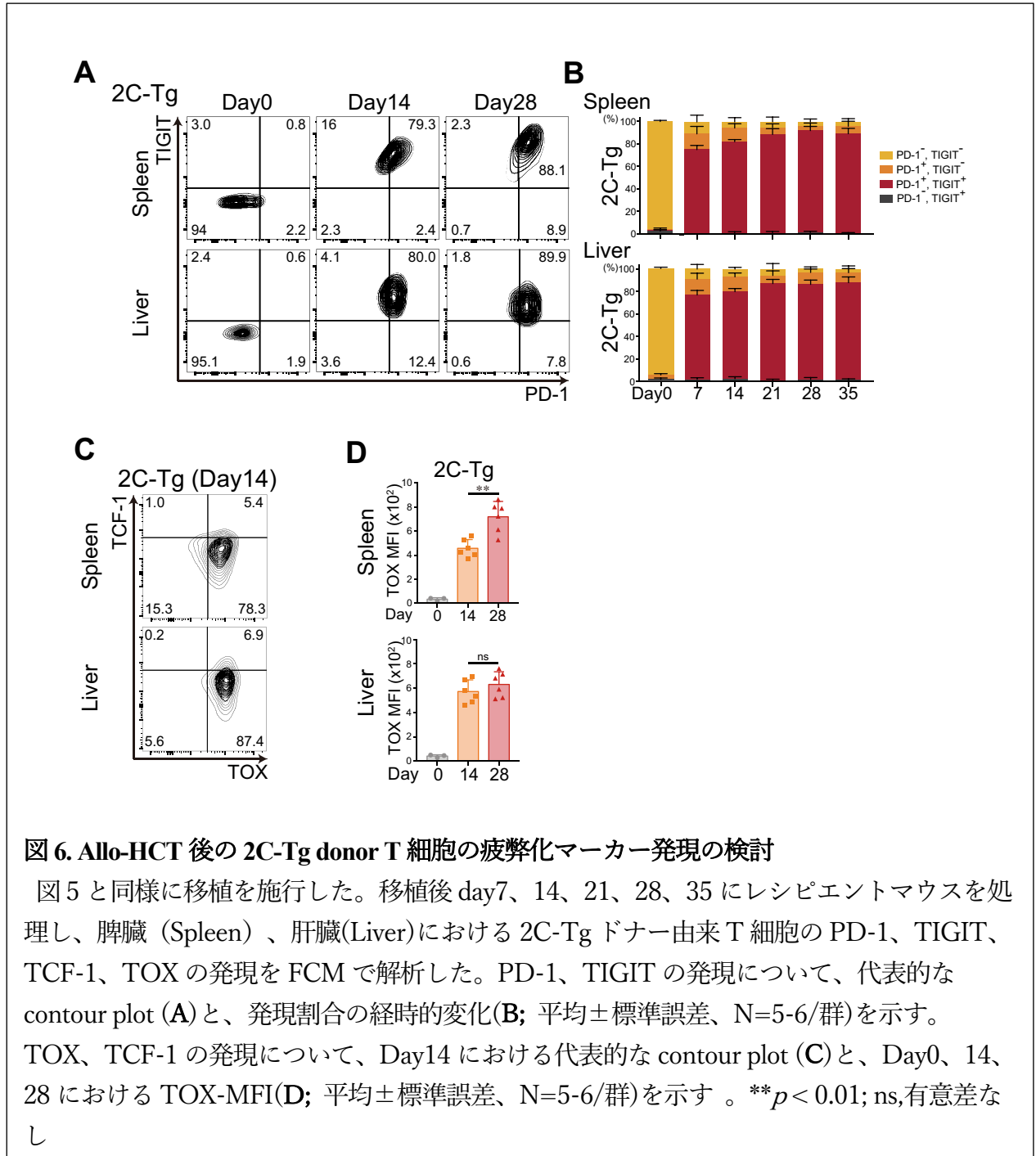
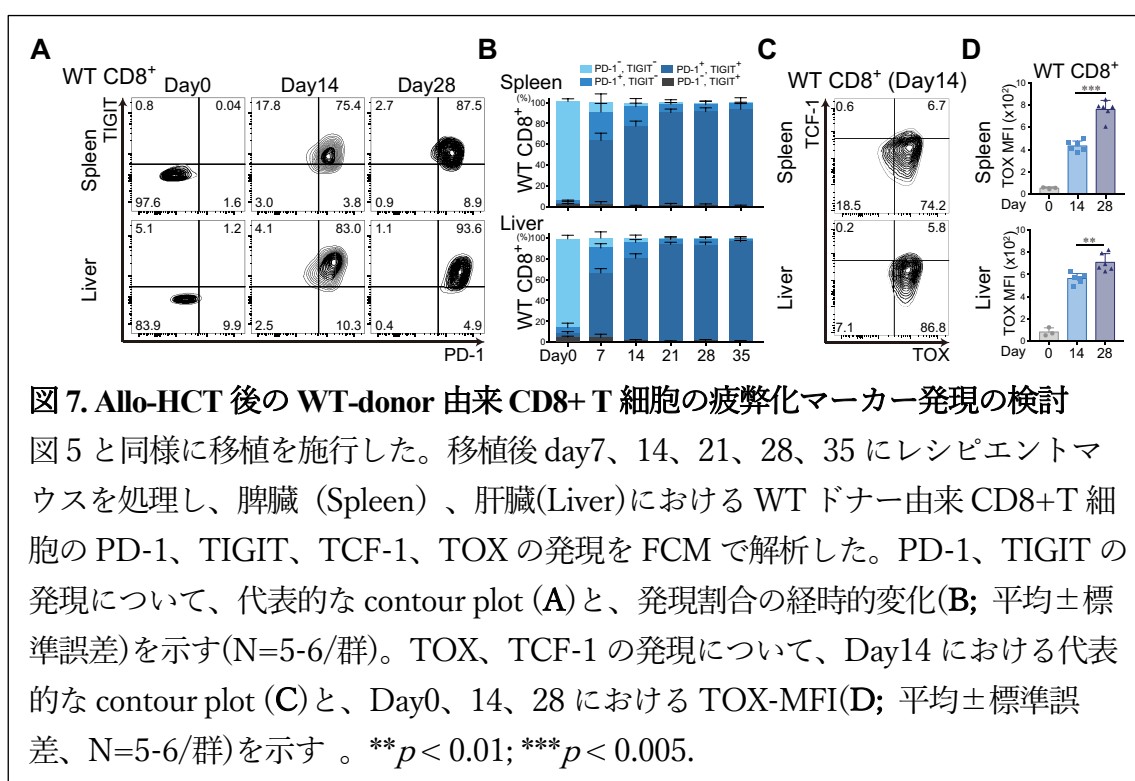


図 6. Allo-HCT 後の 2C-Tg donor T 細胞の疲弊化マーカー発現の検討

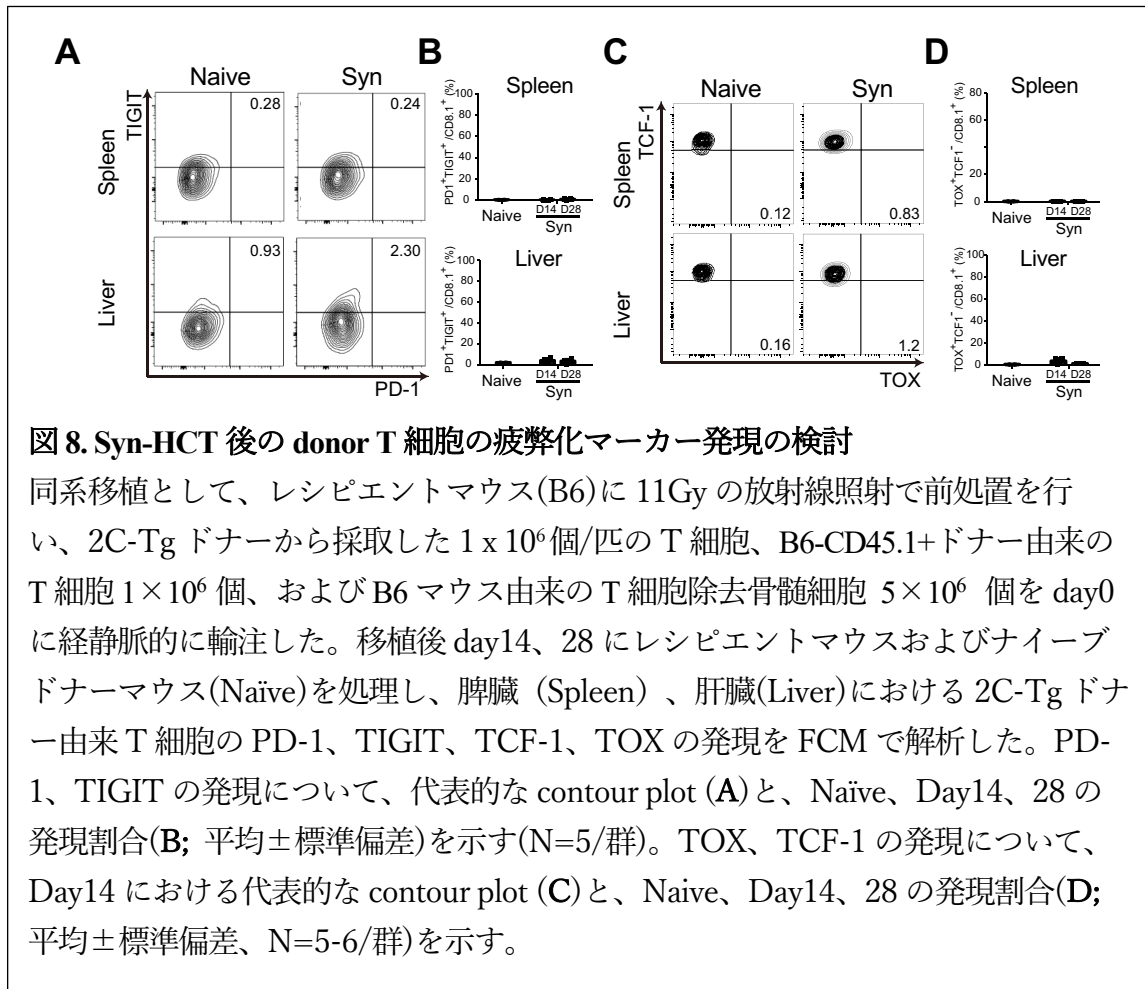
図 5 と同様に移植を施行した。移植後 day7、14、21、28、35 にレシピエントマウスを処理し、脾臓 (Spleen)、肝臓(Liver)における 2C-Tg ドナー由来 T 細胞の PD-1、TIGIT、TCF-1、TOX の発現を FCM で解析した。PD-1、TIGIT の発現について、代表的な contour plot (A) と、発現割合の経時的変化(B; 平均±標準誤差、N=5-6/群)を示す。TOX、TCF-1 の発現について、Day14 における代表的な contour plot (C) と、Day0、14、28 における TOX-MFI(D; 平均±標準誤差、N=5-6/群)を示す。** $p < 0.01$; ns,有意差なし

肝臓と脾臓において、allo-specific 2C-Tg T 細胞は、allo-HCT 後 7 日目までに PD-1 と TIGIT を高発現し、2C-Tg T 細胞の約 80% が PD-1 と TIGIT が両方陽性だった (図 6B)。2C-Tg T 細胞では、T 細胞疲弊の master regulator である TOX

が upregulate され、同時に TCF-1 の発現が down-regulate しており、T 細胞が terminal-*Tex* へ経時的に分化した (図 6C,D)。同様に、CD45.1+ WT CD8+T 細胞の大部分は terminal-*Tex* に分化していた (図 7A-D)。以上の結果から、allo-HCT 後にはモノクローナルおよびポリクローナルのアロ抗原反応性 CD8+T 細胞が terminal-*Tex* に分化することが示された。



次に、ドナーT細胞の terminal-*Tex* への分化が、移植それ自体ではなく allo-HCT によって誘導されたかどうかを検証するために、同系移植を施行した。B6 由来のドナーT細胞を、B6 マウスをレシピエントとして注入すると、PD-1-TOX-TCF-1+表現型のままで疲弊化に至っていないことから、ドナーT細胞の疲弊化は、allo-HCT によって誘導されたことが確認された (図 8A-D)。



CD8+T 細胞だけでなく、CD4+T 細胞の all-HCT 後の疲弊状況も評価した。ドナー-WT CD4+T 細胞もまたドナー-CD8+T 細胞同様に、allo-HCT 後に PD-1 と TOX を高発現した (図 9A,B)。ドナーの WT CD8+T 細胞、WT CD4+T 細胞における IFN γ 、TNF α の発現は著明に減少した(図 10A-D)。

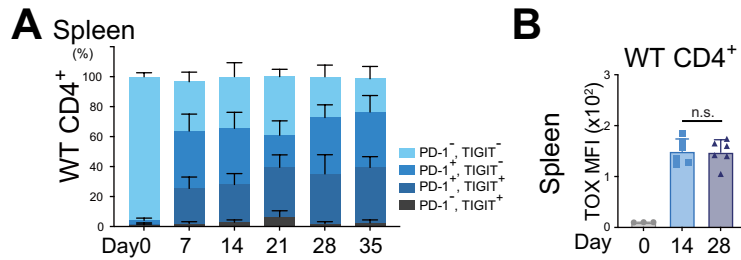


図 9. Allo-HCT 後の donor CD4+ T 細胞の疲弊化マーカー発現の検討

図 5 と同様に移植を施行した。移植後 day7、14、21、28、35 にレシピエントマウスおよびナイーブドナーマウス(naïve)を処理し、脾臓 (Spleen)、肝臓(Liver) における WT ドナー由来 CD4+T 細胞の PD-1、TIGIT、TCF-1、TOX の発現を FCM で解析した。PD-1、TIGIT の発現について、経時的な発現割合の変化(A; 平均±標準誤差)を示す(N=5-6/群)。TOX の発現について、Day0 (Naïve)、Day14、28 における TOX-MFI(B; 平均±標準誤差、N=5-6/群)を示す。n.s. 有意差なし。

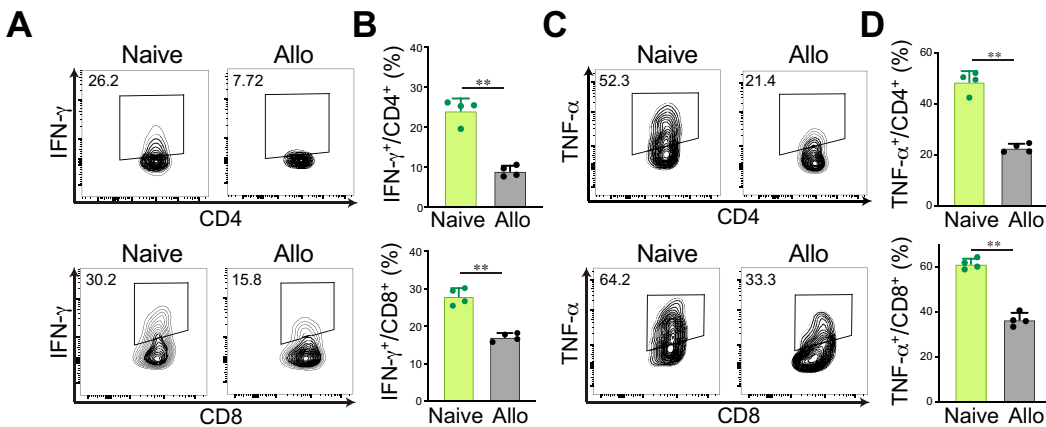
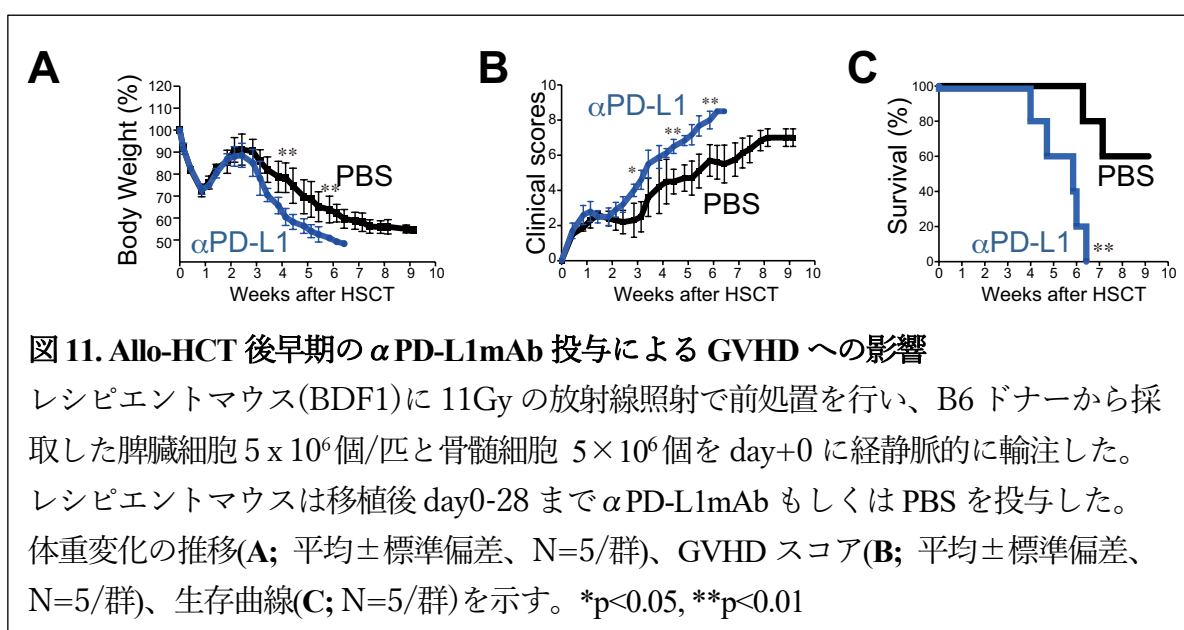


図 10. Allo-HCT 後の donor T 細胞のサイトカイン産生能の検討

図 5 と同様に移植を施行した。移植後 day14 にレシピエントマウスおよびナイーブドナーマウス(naïve)を処理し、脾臓 (Spleen) における WT ドナー由来 CD8+、CD4+T 細胞の IFN- γ 、TNF- α の発現を FCM で解析した。代表的な contour plot (A,C)と、Naïve、Day14 の IFN- γ 陽性細胞(B; 平均±標準誤差、N=4/群)、TNF- α 陽性細胞(D; 平均±標準誤差、N=4/群)の割合を示す。** $p < 0.01$

これまでの結果から、allo-HCT 後のドナー由来 T 細胞において速やかに疲弊が進行し、移植後 day14-day21 に疲弊状態が最大化することが明らかになった。疲弊が進行した T 細胞では PD-1 遮断に対する反応性が低下し、免疫賦活化が起こりにくくなることが報告されている(Hudson *et al.*, 2019; Sade-Feldman *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2020; Burger *et al.*, 2021)。そこで、allo-HCT 後の PD-1 遮断の開始時期を変えることによって、ドナー T 細胞の免疫賦活化の程度に差が生じ、レシピエントマウスの急性 GVHD 増悪の程度に差が生じるかを検討した。Allo-HCT の 0 日目に開始した α PD-L1mAb の投与による PD-1 遮断は、既報と同様に (Blazar *et al.*, 2003)、急性 GVHD を有意に増悪させた (図 11A-C)。



一方、移植後 14 日目から α PD-L1 mAb の投与を開始した場合は GVHD は悪化せず (図 12A-C)、ドナー T 細胞の増殖を誘導しなかった (図 13A-C)。このことから、allo-HCT 直後に疲弊が進行していないドナー T 細胞は PD-1 遮断に反応するのに対し、allo-HCT 後 14 日目に terminal-Tex まで分化したドナー T 細胞は PD-1 遮断への反応性が低下しており、急性 GVHD 増悪を引き起こさないことが確認された。

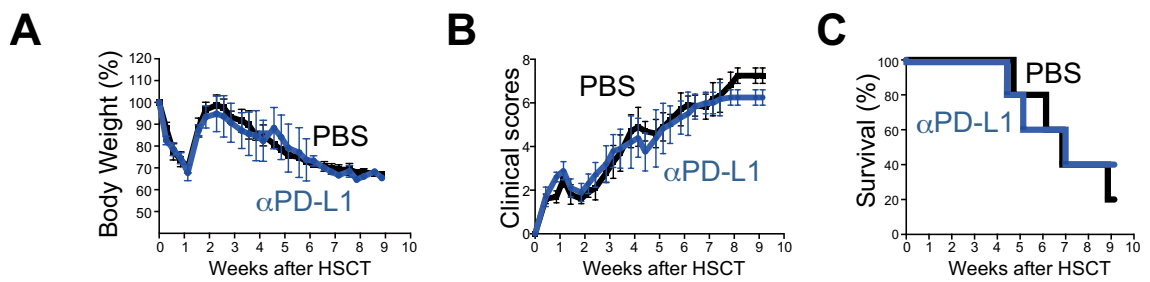


図 12. Allo-HCT 後 2 週間後からの α PD-L1mAb 投与による GVHD への影響

図 11 と同様の移植を行い、レシピエントマウスに移植後 day14-42 まで α PD-L1mAb もしくは PBS を投与した。体重変化の推移(A; 平均±標準偏差、N=5/群)、GVHD スコア (B; 平均±標準偏差、N=5/群)、生存曲線(C; N=5/群)を示す。

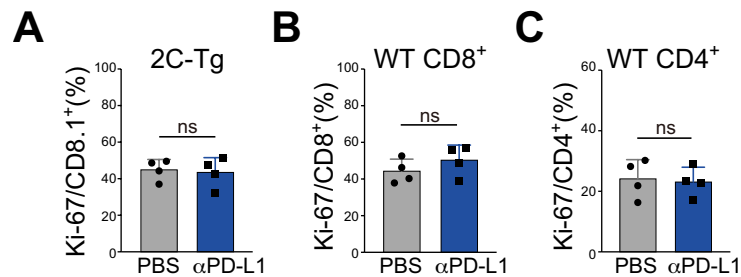


図 13. Allo-HCT 後 2 週間後の α PD-L1mAb 投与による donor T 細胞への影響

図 5 と同様に移植を施行した。レシピエントマウスに移植後 day14 に α PD-L1mAb もしくは PBS を投与した。移植後 day16 にレシピエントマウスを処理し、脾臓における 2C-Tg(A)、WT CD8+T 細胞(B)、WT CD4+T 細胞(C)の Ki-67 の発現を FCM で解析した。Ki-67 陽性細胞割合(平均±標準誤差)を示す(N=5/群)。ns; 有意差なし。

2. CNI 投与によるドナーT細胞の遺伝子発現に対する影響の網羅的解析

Allo-HCT 後の T 細胞疲弊に対する CNI の影響を評価するために、ドナーT細胞の scRNA-seq 解析を行った。Allo-HCT 後 14 日目にシクロスポリン (CSP) 投与または Vehicle を投与したマウスの脾臓から T 細胞を抽出した (図 14)。

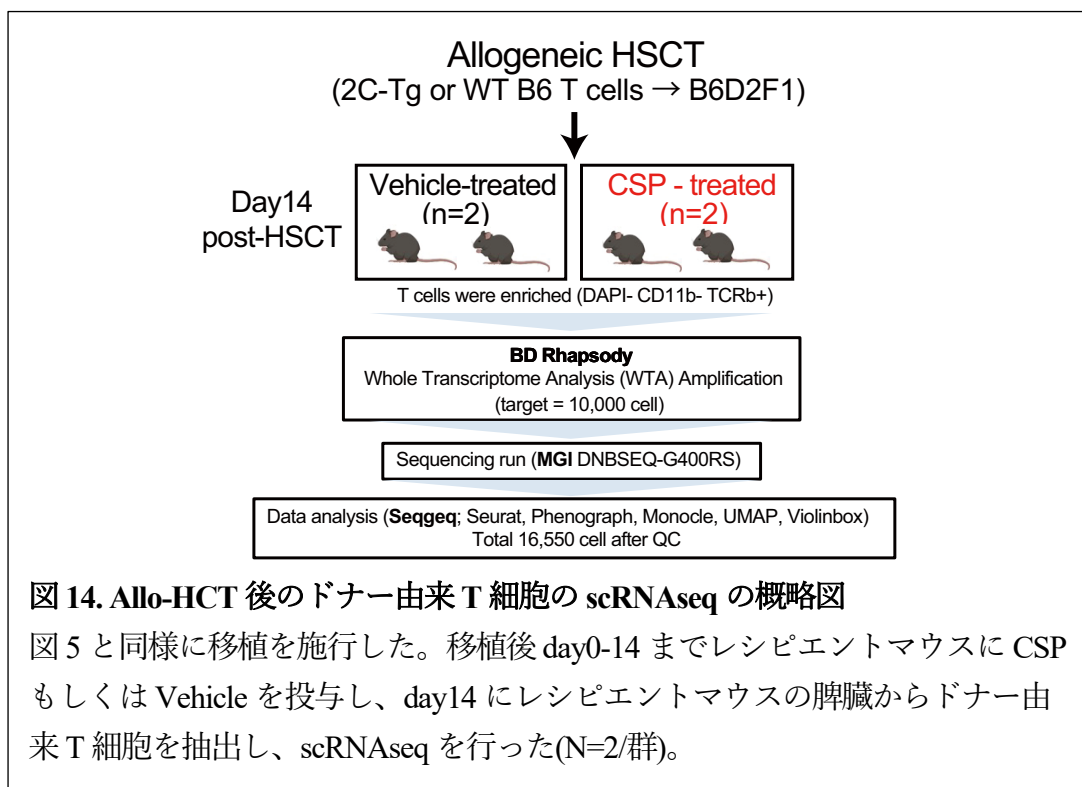


図 14. Allo-HCT 後のドナー由来 T 細胞の scRNAseq の概略図

図 5 と同様に移植を施行した。移植後 day0-14 までレシピエントマウスに CSP もしくは Vehicle を投与し、day14 にレシピエントマウスの脾臓からドナー由来 T 細胞を抽出し、scRNAseq を行った(N=2/群)。

scRNA-seq データの Unsupervised-clustering により、CD4+ T 細胞の 4 つのクラスター (C10-13) および CD8+ T 細胞の 9 つのクラスター (C1-9) が特定された (図 15A)。C10 および C1 が、CSP を投与されたレシピエント由来のドナーT細胞における CD4+ および CD8+ T 細胞全体のうち、それぞれ 50% を超えていた (図 15B,C)。これらのクラスターはすべて *Tox* と *Pcdcl* を発現し、T 細胞疲弊化への移行を示した (図 16)。

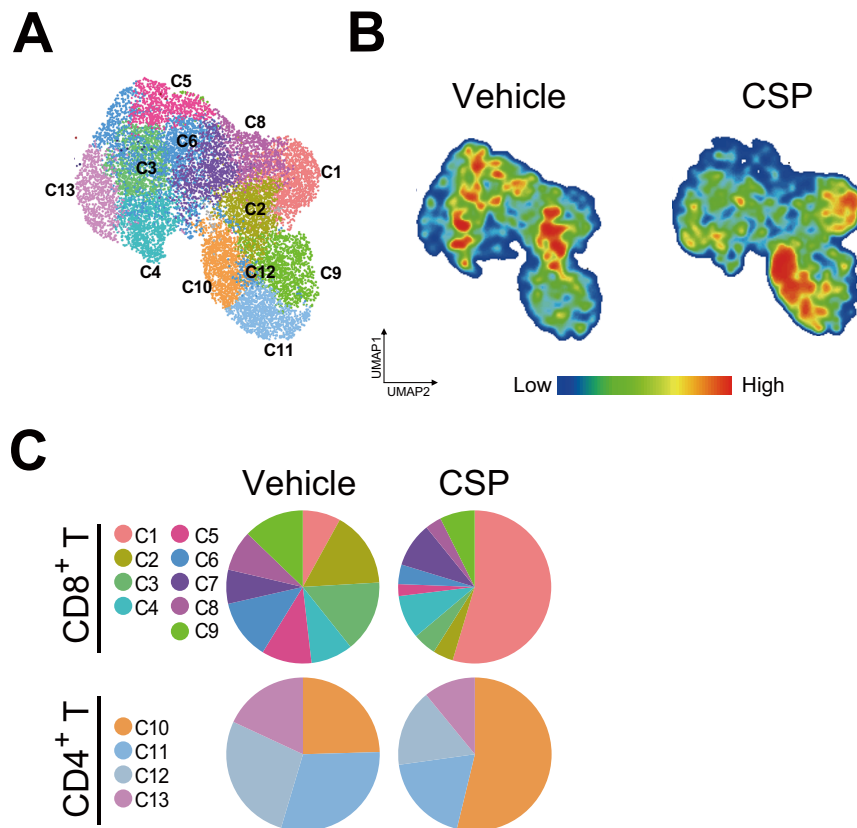


図 15. scRNAseq におけるクラスタリングと各クラスターにおける治療群の割合
 (A)R および Seurat,Phenograph を用いて同定した Unsupervised-clustering によるクラスタリングと各クラスターの名称を示す。(B)Vehicle 投与群と CSP 投与群別の T 細胞分布を可視化した Pseudocolor plots を示す。(C)解析した全 16,500 の T 細胞について、各クラスターに分布する Vehicle 投与群または CSP 投与群の T 細胞の割合をパイチャートで示す。

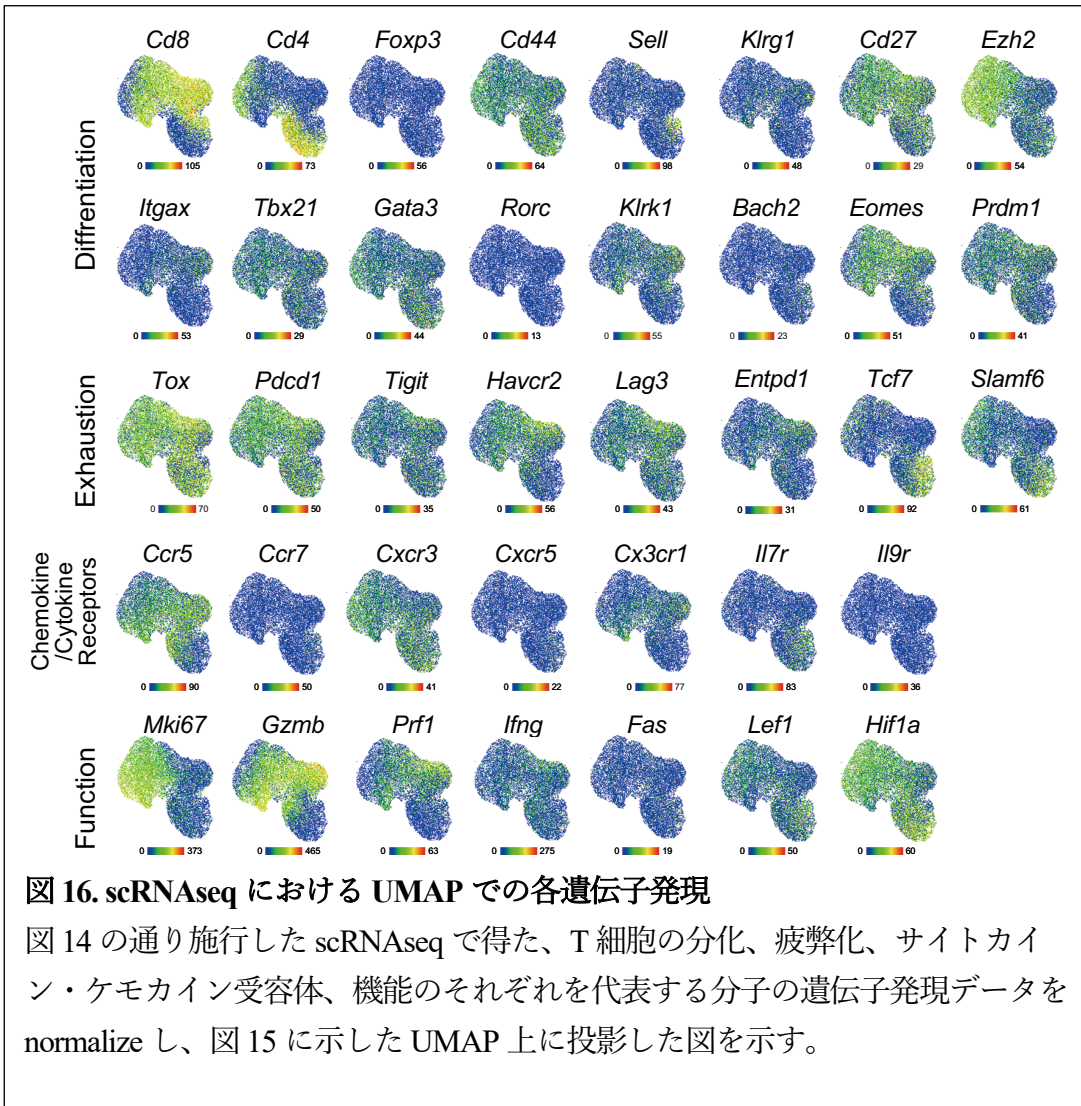


図 16. scRNAseq における UMAP での各遺伝子発現

図 14 の通り施行した scRNAseq で得た、T 細胞の分化、疲弊化、サイトカイン・ケモカイン受容体、機能のそれぞれを代表する分子の遺伝子発現データを normalize し、図 15 に示した UMAP 上に投影した図を示す。

CD8+T 細胞において、C9 クラスタは *Tox* と *Pdccl1* の発現とともに *Tcf7* と *Slamf6* の高発現を特徴とし、C8 は *Tox*、*Pdccl1*、*Tigit*、*Havcr2*、*Entpd1*、*Lag3* の発現と *Tcf7* 低発現を特徴としたことから、C9 と C8 はそれぞれ、Tpex と terminal-Tex であると考えられた (図 16、図 17、図 18A-G)。C1 は、*Havcr2*、*Entpd1*、*Lag3* などの抑制性受容体の発現が高く、*Tox*、*Pdccl1*、*Tigit* が C8、C9 より低く、*Slamf6*、*Tcf7* が発現していないことが特徴であった (図 16、図 17、図 18A-G)。

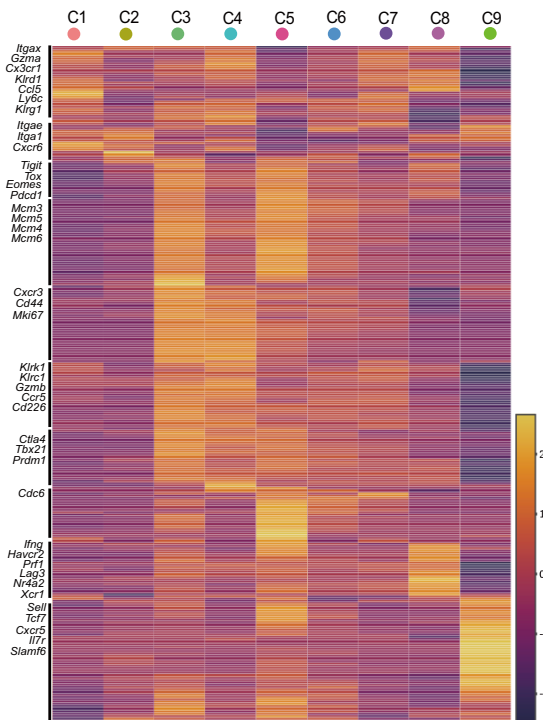


図 17. CD8+T 細胞におけるクラスター別の遺伝子発現の Heatmap

図 14 の通り施行した scRNAseq で得た、CD8+T 細胞のクラスターについて、各遺伝子発現の上位 283 の DEG を heatmap に示す。各クラスターで upregulate された特徴的な分子を heatmap の左に示す。

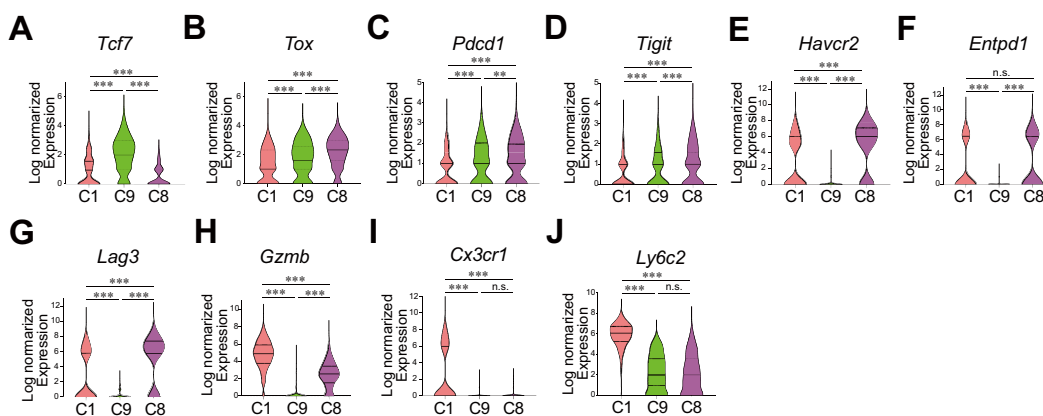


図 18. C1、C8、C9 における代表的な分子の遺伝子発現の violin plots

図 14 の通り施行した scRNAseq で得た C1,C8,C9 における代表的な遺伝子発現の violin plots を *Tcf7*(A)、*Tox*(B)、*Pdc1*(C)、*Tigit*(D)、*Havcr2*(E)、*Entpd1*(F)、*Lag3*(G)、*Gzmb*(H)、*Cx3cr1*(I)、*Ly6c2*(J)の順に示す。

*** $p < 0.005$; n.s, 有意差なし

さらに、C1 は *Cx3cr1* や、NK 細胞媒介性細胞傷害経路に属する遺伝子とともに *Gzmb* や *Prfl* といった細胞傷害性分子を高発現していた (図 16、図 17、図 18H、図 19)。このように、C1 はエフェクター様の transitory-*Tex* として報告されている表現型(Hudson *et al.*, 2019)に類似していた。また、*Ly6c2* は、CD8+T 細胞の他のクラスターと区別する C1 特有のマーカーであった (図 18J)。C1 クラスターが CSP 投与によって増加し、かつ transitory-*Tex* の表現型を示したことから(図 15B,C)、我々は C1 クラスターを CNI 誘導性 transitory-*Tex* (transitory-*Tex*-CNI) と命名した (図 20)。

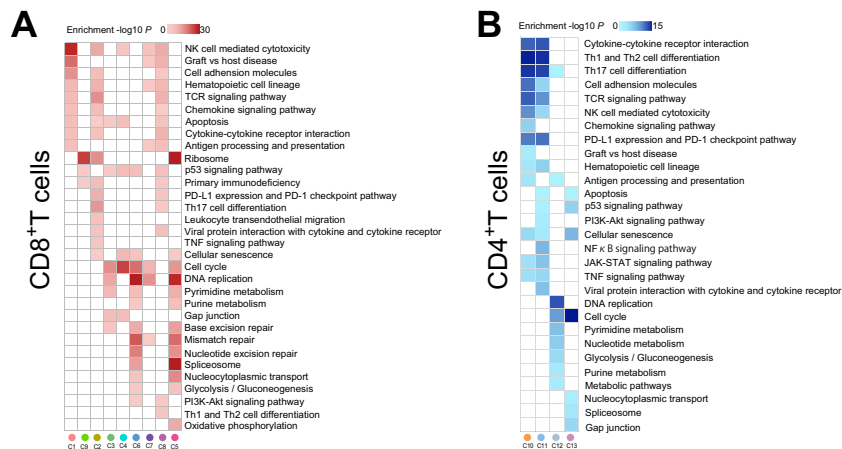


図 19. CD4+T 細胞、CD8+T 細胞由来のクラスター毎のパスウェイ解析

図 14 の通り施行した scRNAseq で得た各クラスターにおける遺伝子発現データを元に、KEGG database に基づいたパスウェイ解析を施行した。CD8+T 細胞(A)、CD4+T 細胞(B)由来のクラスターで濃縮された KEGG pathway を heatmap で示した。

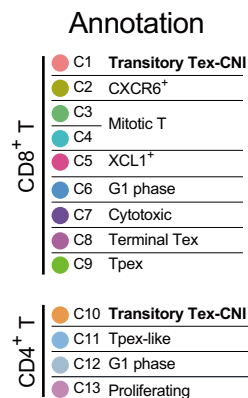
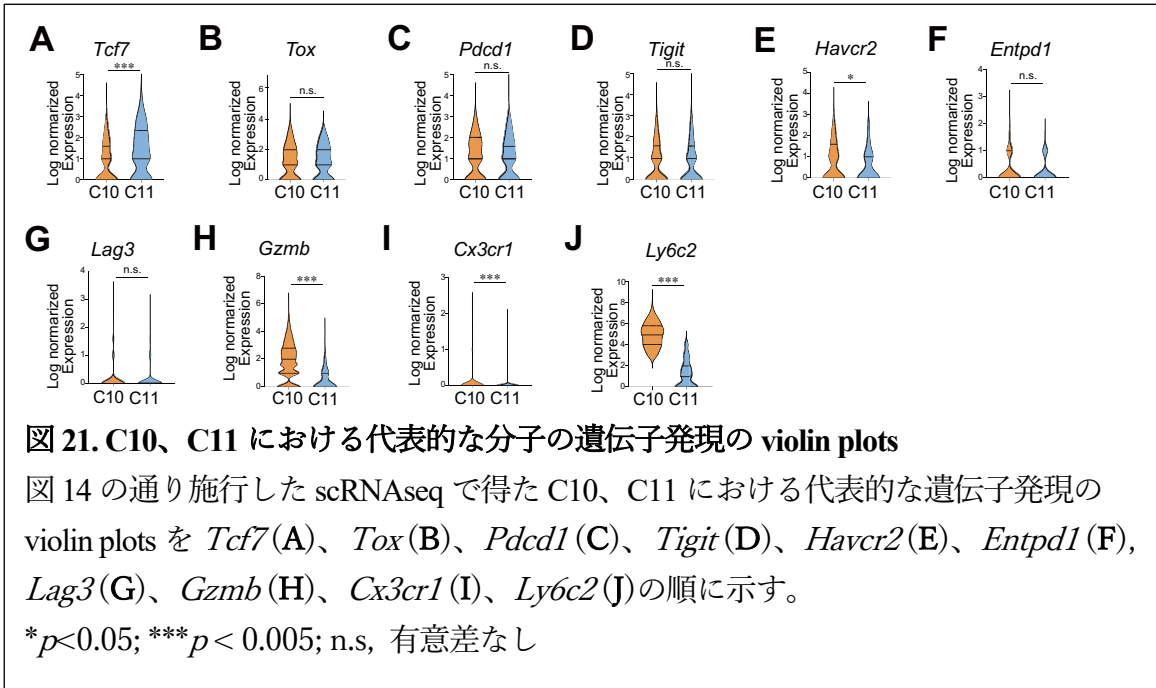


図 20. scRNAseq で得た各クラスターの annotation

図 14 の通り施行した scRNAseq で得た各クラスターにおける遺伝子発現データに基づいた各クラスターの annotation を示す。

CD4+T 細胞(C10-C13)において、C11 クラスターは、*Tox* と *Pdcd1* をわずかに発現し、*Tcf7* を高いレベルで発現したことから、C11 が Tpex の CD4+カウンターパートを表すことが示唆された (図 16, 図 17, 図 21A-G)。C10 は、C11 と比較して、*Tcf7* の発現が低い一方で、*Havcr2* を除く抑制性受容体は同程度の発現を示した (図 21A-G)。



CD8+T 細胞の transitory-*Tex*-CNI (C1) と類似して、C10 は *Gzmb*、*Cx3cr1*、*Ly6c2* がアップレギュレートされ、NK 細胞媒介性細胞傷害経路に属する遺伝子を高発現しており、C10 が transitory-*Tex*-CNI の CD4+ における counter part であることが示唆された (図 21H-J、図 19B)。さらに、C10 と C1 の上位 10 個の DEG のうち、*Ccl5*、*Gzmb*、*Ccr2*、*Ly6c2*、*Fgl2* の 5 つの遺伝子が共通であり、C10 と C1 のトランスクリプトームの類似性がさらに確認された (図 22A、B)。

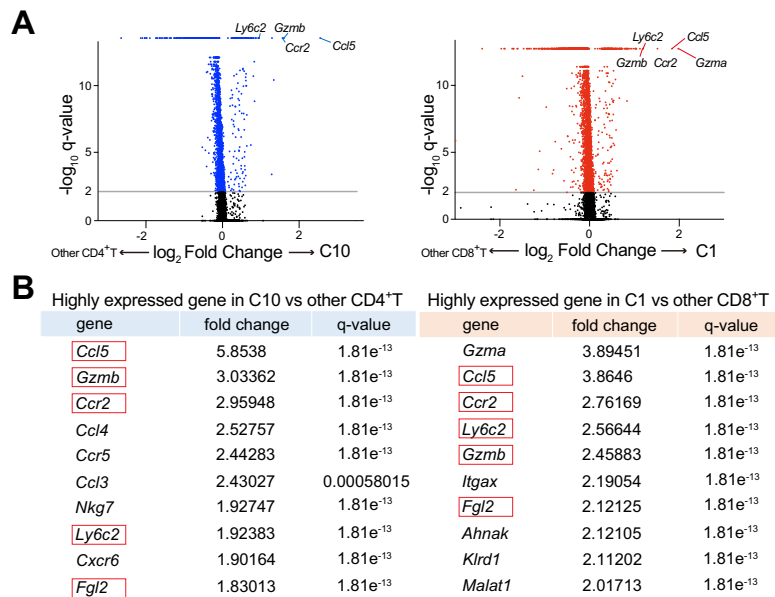


図 22. C10、C1 の遺伝子発現の volcano plots および高発現の DEG リスト

図 14 の通り施行した scRNAseq で得たデータ解析に基づいた、C10 クラスタと他の CD4⁺T 細胞由来のクラスタ、および C1 クラスタと他の CD8⁺T 細胞由来のクラスタにおける各遺伝子発現の有意性(q-value)と fold change を比較した volcano plots(A)を示す。C10 および C1 における高発現遺伝子 top10 を fold change の順にリストとして示す。C10 と C1 の間で共有される DEG を赤い長方形で示す。

以上の結果より、allo-HCT 後の CSP 投与によって、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の双方において、T 細胞疲弊関連分子とエフェクター関連分子を同時に発現する transitory-Tex-CNI が生成され、ドナー T 細胞の terminal-Tex への分化が阻害されていることが示された。

3. CNI 投与による transitory-*Tex* 細胞の誘導能の検討

scRNAseq で得られたデータから、transitory-*Tex* (C1) は terminal-*Tex* (C8) と比較して、*Pdcd1*、*Tigit*、*Tox* の発現が低いことが示されたが、これらの分子プロファイルを細胞表面蛋白レベルで確認するため、FCM 解析を行った。scRNAseq と同様に、CSP の投与により脾臓と肝臓の両方で PD-1+TIGIT- 2C-Tg T 細胞の割合と絶対数が有意に増加し、PD-1+TIGIT+ 2C-Tg T 細胞が減少した (図 23A-H)。

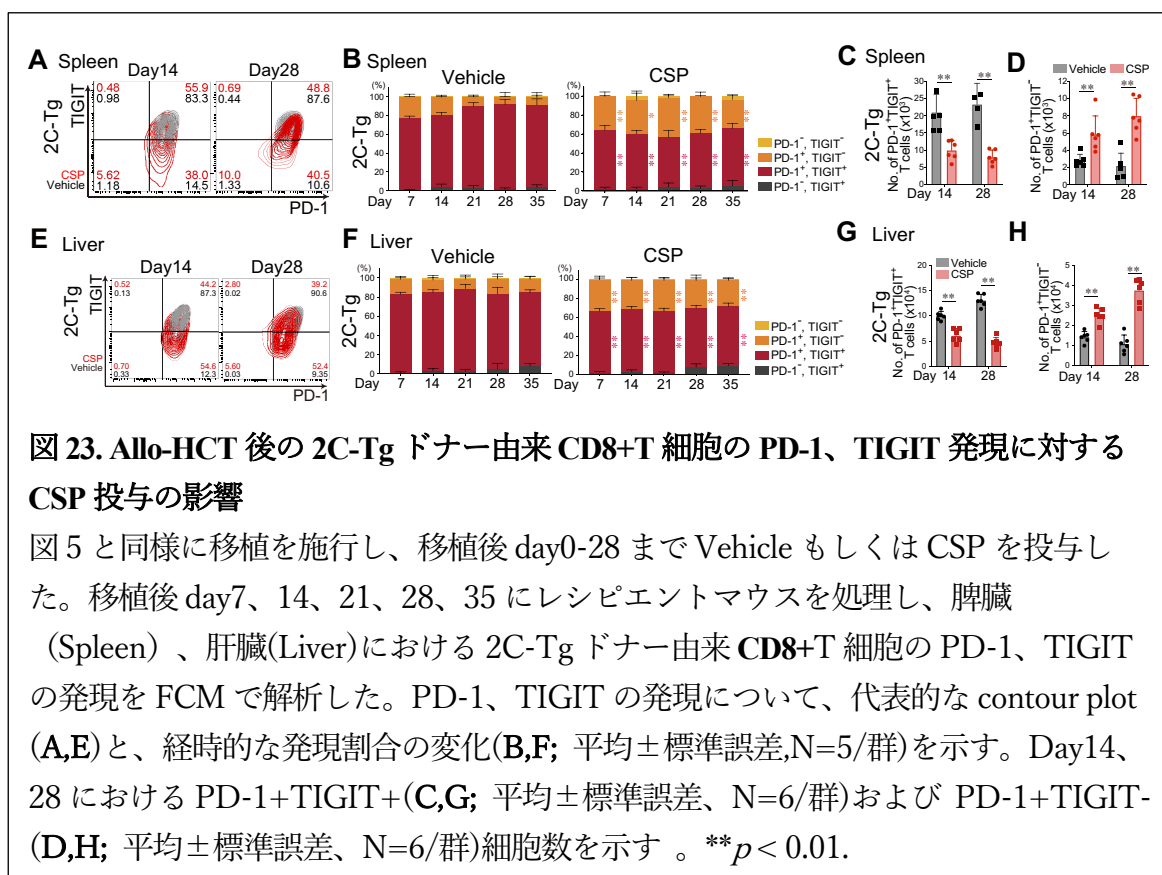


図 23. Allo-HCT 後の 2C-Tg ドナー由来 CD8+T 細胞の PD-1、TIGIT 発現に対する CSP 投与の影響

図 5 と同様に移植を施行し、移植後 day0-28 まで Vehicle もしくは CSP を投与した。移植後 day7、14、21、28、35 にレシピエントマウスを処理し、脾臓 (Spleen)、肝臓(Liver)における 2C-Tg ドナー由来 CD8+T 細胞の PD-1、TIGIT の発現を FCM で解析した。PD-1、TIGIT の発現について、代表的な contour plot (A,E) と、経時的な発現割合の変化(B,F; 平均±標準誤差,N=5/群)を示す。Day14、28 における PD-1+TIGIT+(C,G; 平均±標準誤差、N=6/群)および PD-1+TIGIT- (D,H; 平均±標準誤差、N=6/群)細胞数を示す。 ** $p < 0.01$ 。

PD-1+TIGIT- 2C-Tg T 細胞は、PD-1+TIGIT+ 2C-Tg T 細胞よりも有意に高いレベルの Granzyme B (GZMB) を発現し、PD-1+TIGIT-の細胞集団が scRNAseq によって定義された transitory-*Tex*-CNI を表していることが確認された (図 24)。

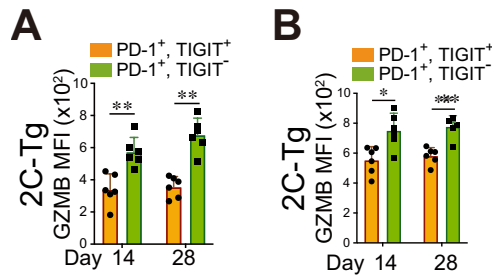


図 24. Allo-HCT 後 2C-Tg ドナー由来 T 細胞における PD-1+TIGIT+細胞と PD-1+TIGIT-細胞での GZMB 発現の比較

図 5 と同様に移植を施行し、移植後 day0-28 まで Vehicle もしくは CSP を投与した。移植後 day14、28 にレシピエントマウスを処理し、脾臓 (Spleen)、肝臓 (Liver) における 2C-Tg ドナー由来 T 細胞の PD-1、TIGIT、GZMB の発現を FCM で解析した。Day14、28 それぞれの脾臓(A)もしくは肝臓(B)由来の PD-1+TIGIT+細胞と PD-1+TIGIT-細胞における GZMB-MFI を示す (平均±標準誤差、N=6/群)。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ 。

さらに、CSP は TOX の発現を有意に抑制し、脾臓および肝臓における TOX^{low}TCF-1- 2C-Tg T 細胞の絶対数を増加させた (図 25A-E)。

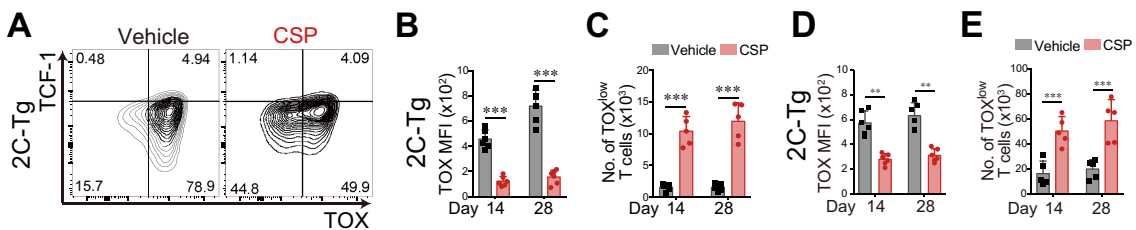


図 25. Allo-HCT 後 2C-Tg ドナー由来 T 細胞における TOX,TCF-1 発現に対する CSP 投与の影響

図 5 と同様に移植を施行し、移植後 day0-28 まで Vehicle もしくは CSP を投与した。移植後 day14,28 にレシピエントマウスを処理し、脾臓と肝臓における 2C-Tg ドナー由来 T 細胞の TOX、TCF-1 の発現を FCM で解析した。脾臓の解析における代表的な contour plots (A)、TOX-MFI(B)、TOX^{low}細胞数(C)、および肝臓の解析における TOX-MFI(D)、TOX^{low}細胞数(E)を示す (平均±標準誤差、N=6/群)。** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ 。

同様の結果が、CD45.1+ WT CD8+T 細胞の解析でも得られた (図 26A-O)。

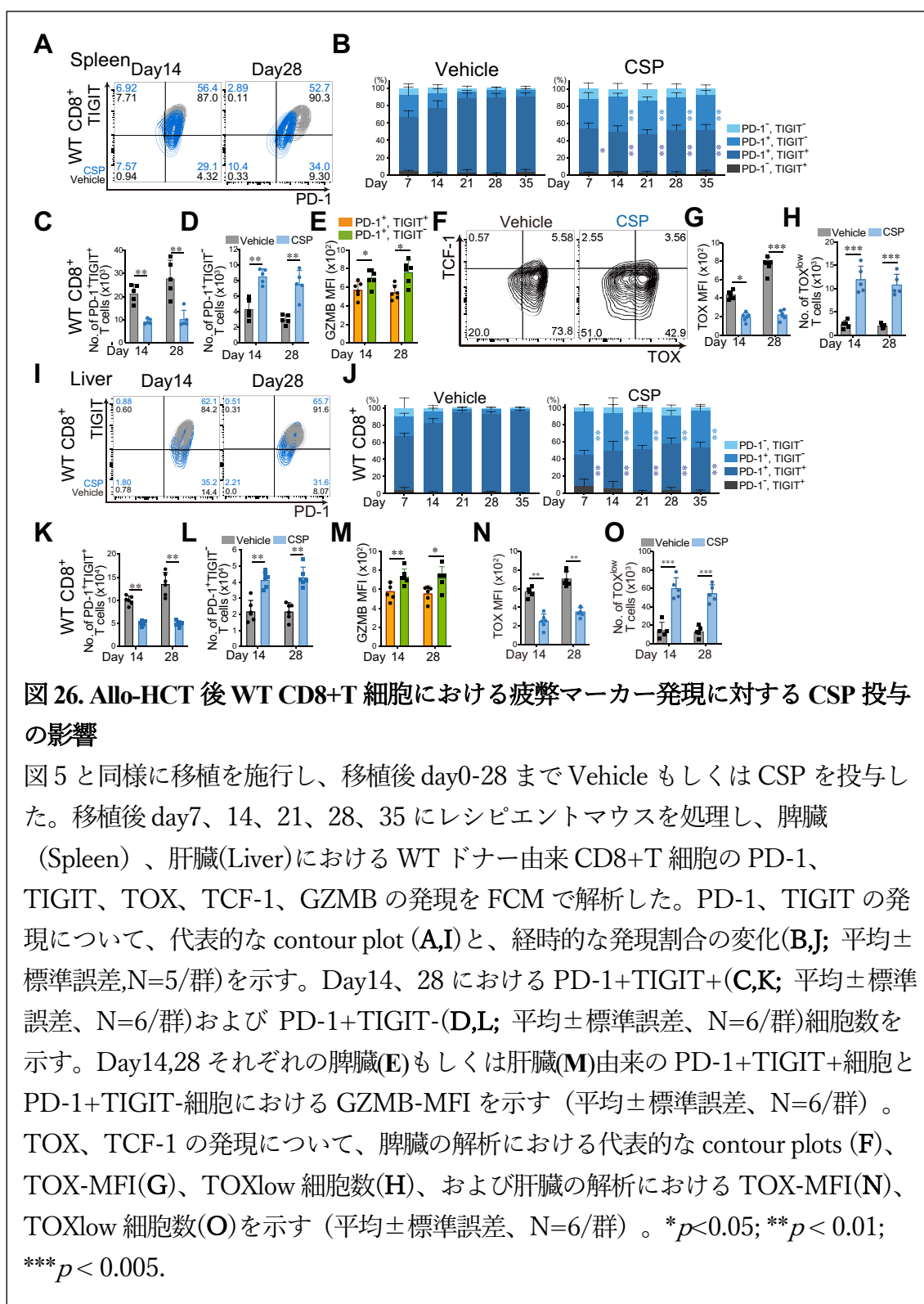


図 26. Allo-HCT 後 WT CD8+T 細胞における疲弊マーカー発現に対する CSP 投与の影響

図 5 と同様に移植を施行し、移植後 day0-28 まで Vehicle もしくは CSP を投与した。移植後 day7、14、21、28、35 にレシピエントマウスを処理し、脾臓 (Spleen)、肝臓(Liver)における WT ドナー由来 CD8+T 細胞の PD-1、TIGIT、TOX、TCF-1、GZMB の発現を FCM で解析した。PD-1、TIGIT の発現について、代表的な contour plot (A,I)と、経時的な発現割合の変化(B,J; 平均±標準誤差,N=5/群)を示す。Day14、28 における PD-1+TIGIT+(C,K; 平均±標準誤差、N=6/群)および PD-1+TIGIT-(D,L; 平均±標準誤差、N=6/群)細胞数を示す。Day14,28 それぞれの脾臓(E)もしくは肝臓(M)由来の PD-1+TIGIT+細胞と PD-1+TIGIT-細胞における GZMB-MFI を示す (平均±標準誤差、N=6/群)。TOX、TCF-1 の発現について、脾臓の解析における代表的な contour plots (F)、TOX-MFI(G)、TOX^{low} 細胞数(H)、および肝臓の解析における TOX-MFI(N)、TOX^{low} 細胞数(O)を示す (平均±標準誤差、N=6/群)。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ 。

一方で、CSP はドナーCD4+ T 細胞上の PD-1 または TIGIT の発現を有意に変化させなかった (図 27)。CD4+ドナーT 細胞においても、CNI 非投与下では allo-HCT 後の機能的な疲弊が観察されたため、CD4+transitory-Tex-CNI と CD4+terminal-Tex を識別するためには TIGIT 以外のマーカーの探索が必要であった (図 10A-D、図 13C)。

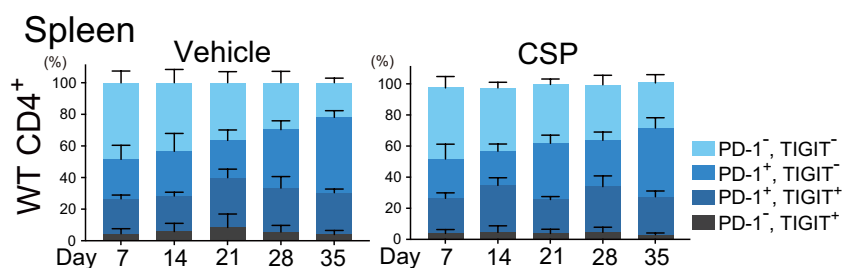
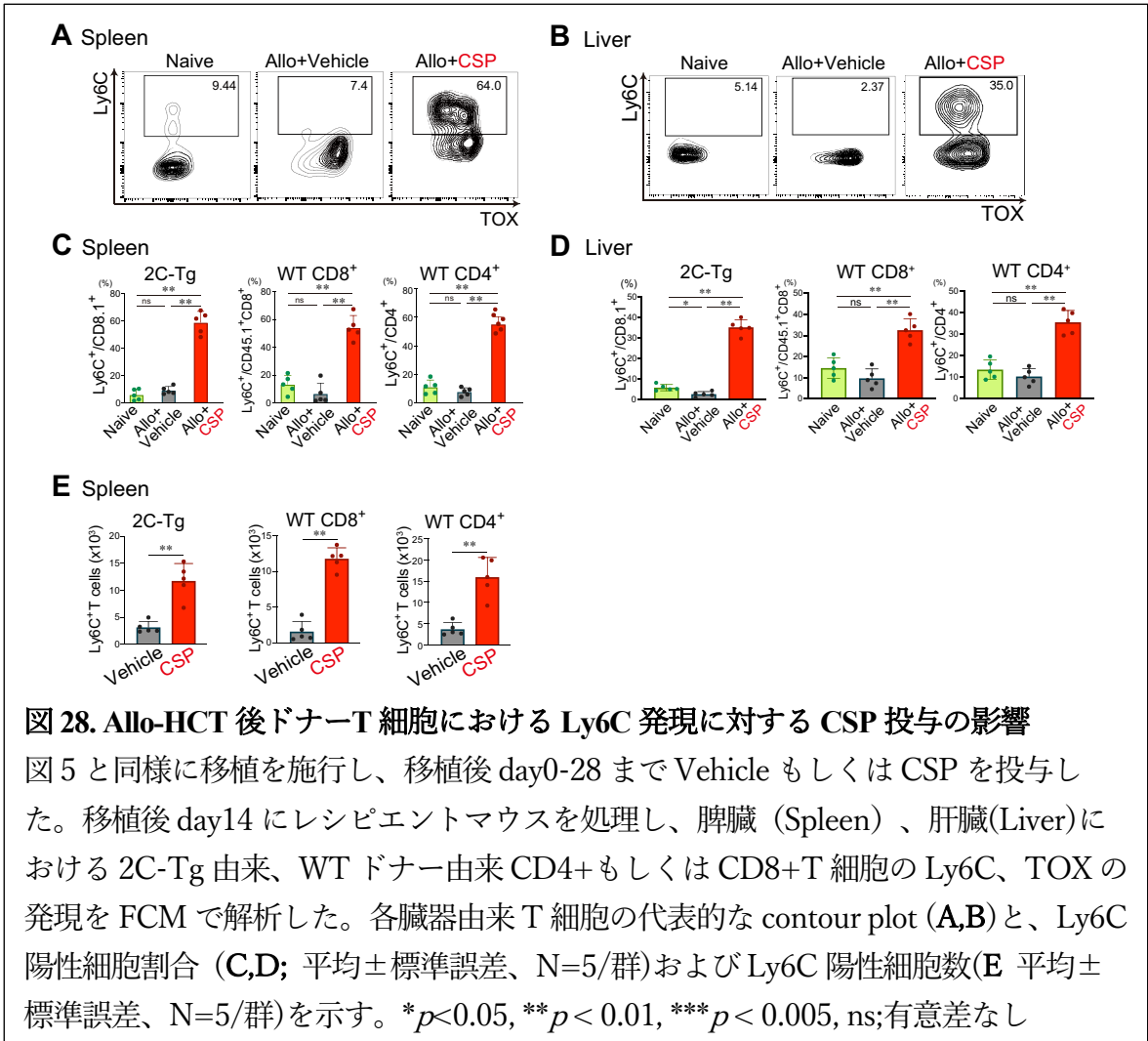


図 27. Allo-HCT 後 WT CD4+T 細胞における疲弊マーカー発現に対する CSP 投与の影響

図 5 と同様に移植を施行し、移植後 day0-28 まで Vehicle もしくは CSP を投与した。移植後 day7、14、21、28、35 にレシピエントマウスを処理し、脾臓における WT ドナー由来 CD4+T 細胞の PD-1、TIGIT の発現を FCM で解析した。PD-1、TIGIT の経時的な発現割合の変化(平均±標準誤差,N=5/群)を示す。

scRNAseq では、他の T 細胞集団と比較して、CD4+および CD8+の transitory-Tex-CNI の両方において *Ly6c2* が高発現していた (図 22B)。FCM 解析により、CSP 投与によって脾臓および肝臓のドナーT 細胞上の *Ly6C* が高発現し、これらの細胞の絶対数が増加することを確認した (図 28A-E)。



Ly6C⁺ 2C-Tg ドナーT 細胞は、Ly6C⁻細胞と比較して、PD-1、TIGIT、TOX の発現レベルが有意に低く、Ki-67 と GZMB の発現レベルが高く、TCF-1 の発現レベルは同程度であった (図 29)。

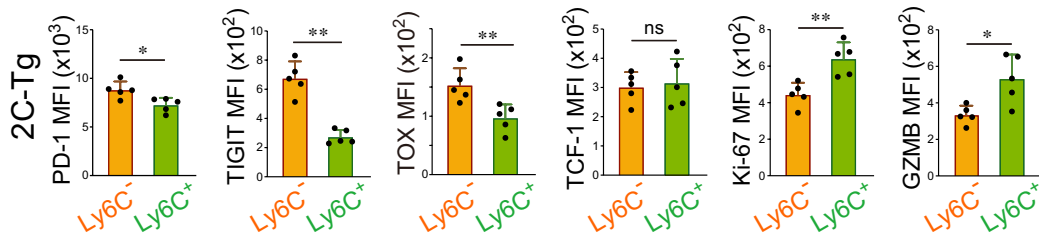


図 29. Allo-HCT 後ドナー由来 Ly6C⁺T 細胞と Ly6C⁻T 細胞における、疲弊マーカーおよび Ki-67,GZMB 発現の比較

図 28 と同様の移植、投薬、FCM 解析を施行した。CSP 投与群レシピエントマウスについて、Day14 の脾臓における 2C-Tg ドナー由来 T 細胞を FCM で解析し、Ly6C⁺T 細胞と Ly6C⁻T 細胞それぞれの PD-1、TIGIT、TOX、TCF-1、Ki-67、GZMB の MFI を示す。(平均±標準誤差、N=5/群)を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns;有意差なし

また、Ly6C⁺ WT CD4⁺ドナーT 細胞は Ly6C⁻細胞と比較して有意に高いレベルの Ki-67 と GZMB を発現し、Ly6C が高い増殖能とエフェクター機能を持つ CD4⁺/CD8⁺ transitory-Tex-CNI の共通のマーカーであることが示された (図 30A-B)。以下、移植後 CSP 投与後のレシピエントでのドナーT 細胞について、FCM で Ly6C 陽性で示される細胞群を CD4/8-transitory-Tex-CNI として扱うこととした。

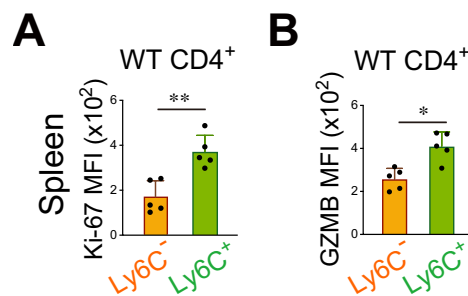
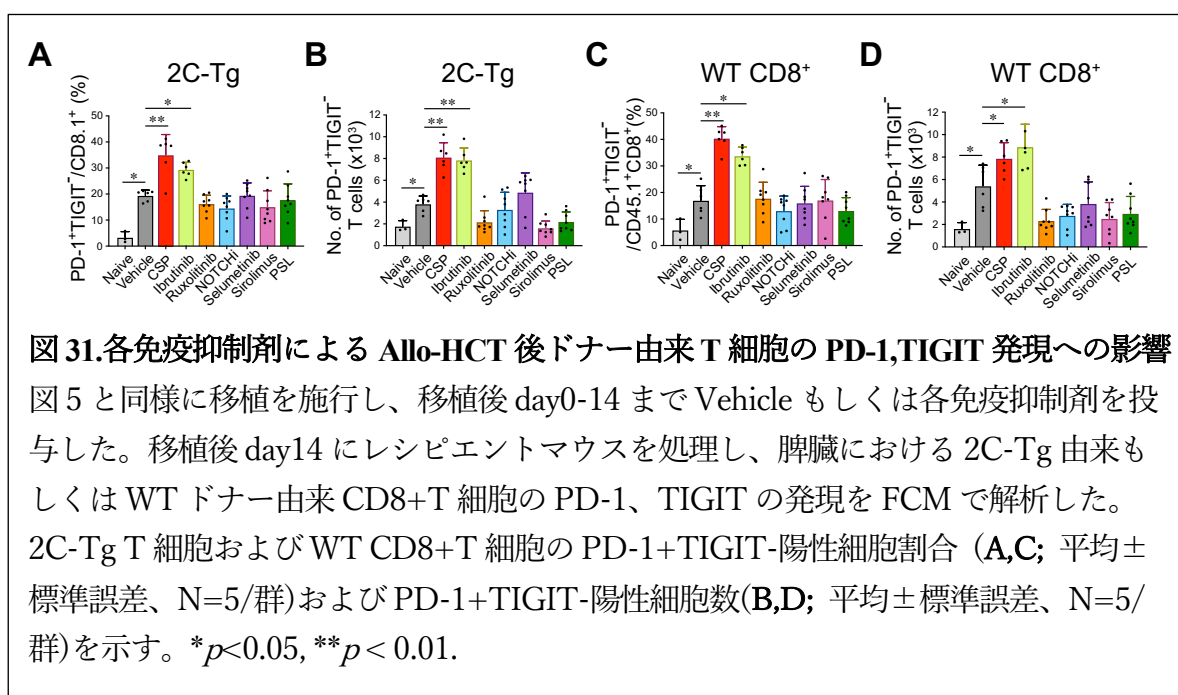


図 30. Allo-HCT 後 WT ドナー由来 CD4⁺T 細胞における Ly6C⁺細胞と Ly6C⁻細胞での Ki-67,GZMB 発現の比較

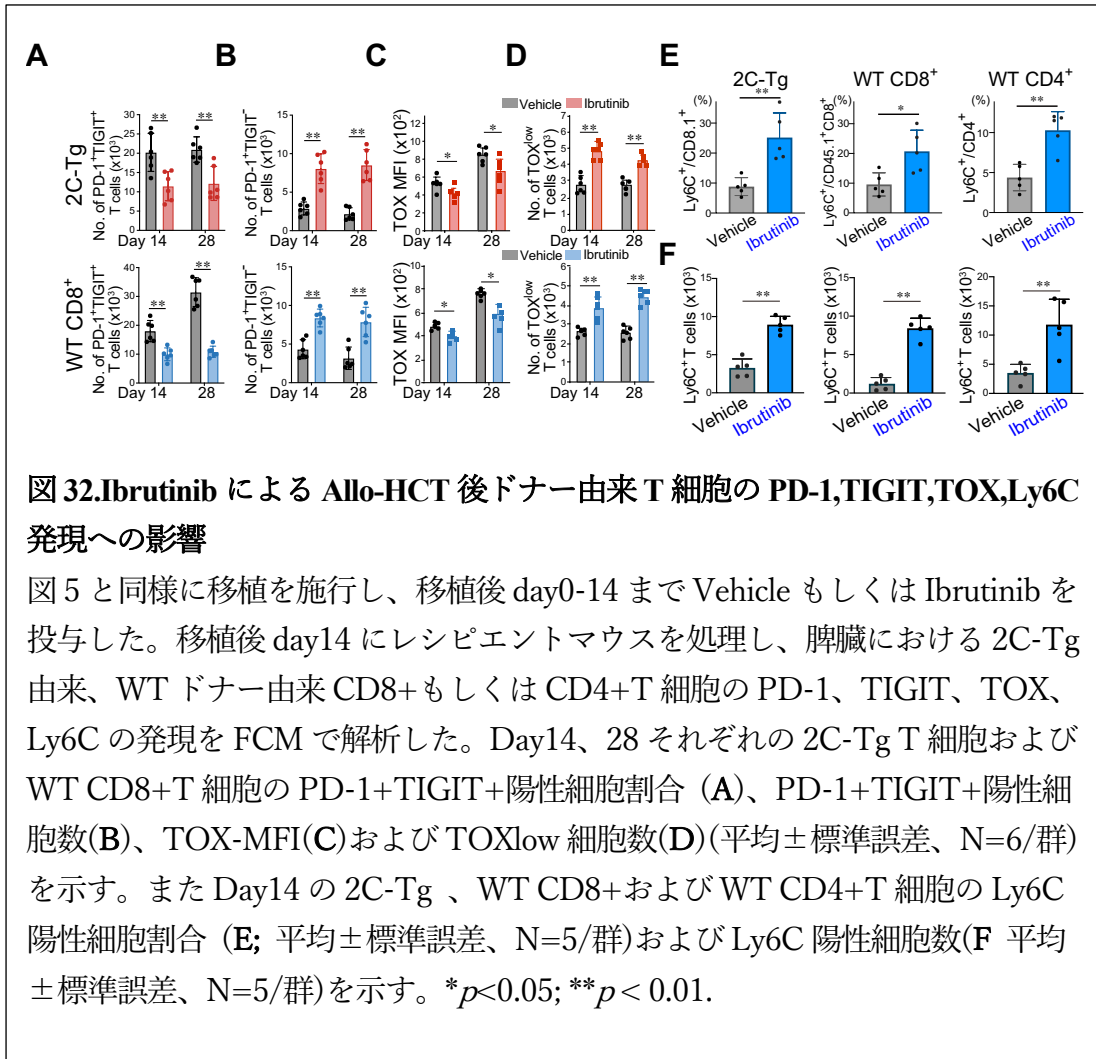
図 28 と同様の移植、投薬、FCM 解析を施行した。CSP 投与群レシピエントマウスについて、Day14 の脾臓における WT ドナー由来 CD4⁺T 細胞を FCM で解析し、Ly6C⁺T 細胞と Ly6C⁻T 細胞それぞれの Ki-67、GZMB の MFI を示す。(平均±標準誤差、N=5/群)を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4. 他の免疫抑制剤による transitory-*Tex* 細胞の誘導能の検討

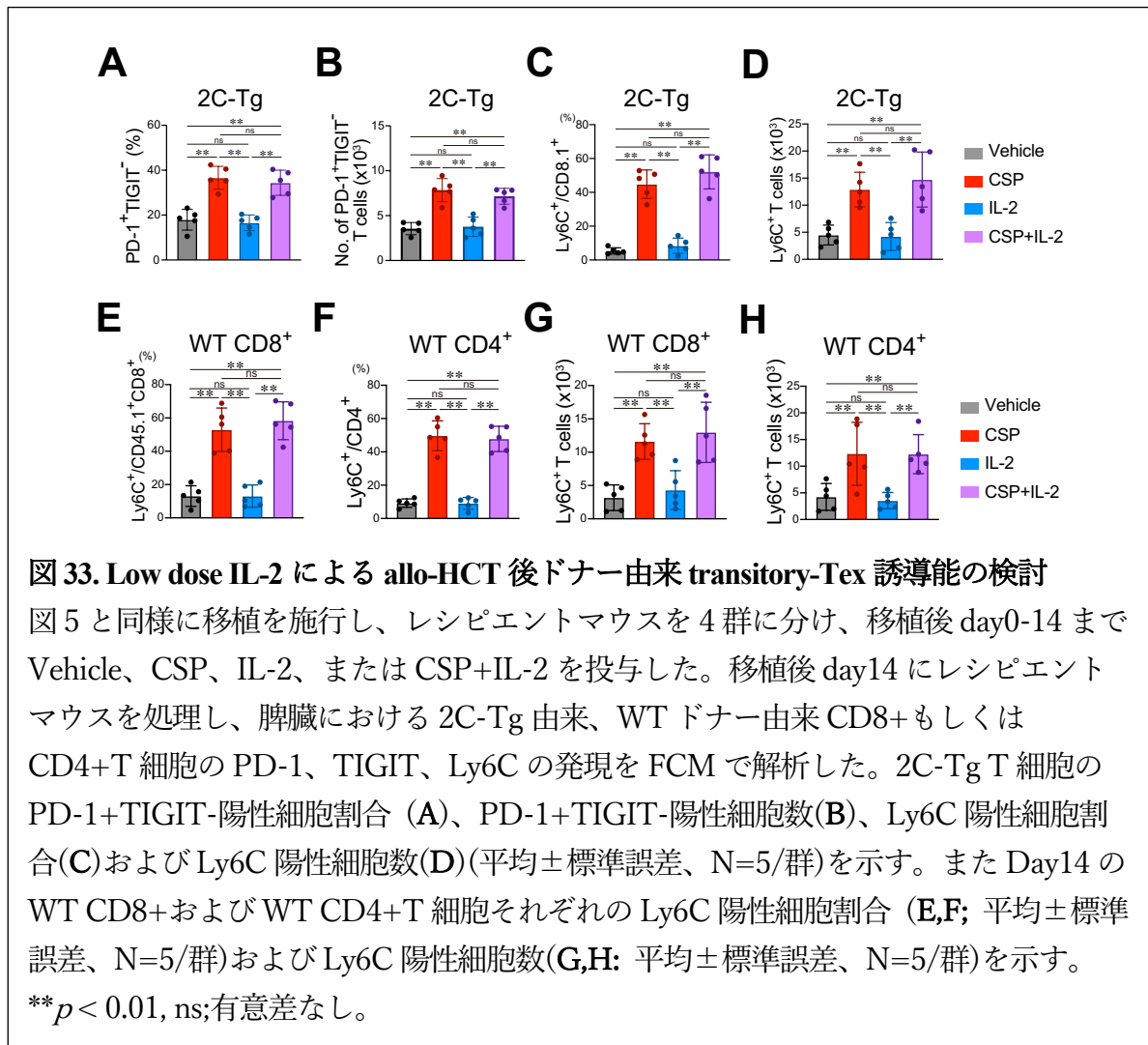
CNI は、活性化 T 細胞核因子 (Nuclear factor of activated T cells; NFAT) を阻害し、慢性ウイルス感染症や腫瘍モデルにおいて T 細胞疲弊を抑制することが報告されている (Khan *et al.*, 2019; Seo *et al.*, 2019)。そこで、他の作用機序を有する免疫抑制剤による T 細胞機能の抑制によって、CSP 投与で誘導された transitory-*Tex*-CNI と同様の細胞集団が誘導されるかどうかを検討した。CSP での検討と同様の移植モデルを用いて、これまで GVHD を改善することが報告されているイブルチニブ、ルキソリチニブ (JAK1/2 阻害剤)、DAPT (NOTCH 阻害剤)、セルメチニブ (MEK 阻害剤)、シロリムス (mTOR 阻害剤)、プレドニゾロンをレシピエントマウスに投与した。Allo-HCT14 日目の FCM 解析では、CSP とイブルチニブのみが PD-1+TIGIT- 2C-Tg および WT CD8+T 細胞を有意に増加させたが、他の免疫抑制剤の投与は PD-1+TIGIT-T 細胞の増加を認めなかった (図 31A-D)。



イブルチニブは、transitory-Tex、TOX^{low} T 細胞、および Ly6C⁺ transitory-Tex を増加させる一方で、terminal-Tex の数と TOX の発現レベルを有意に減少させた (図 32A-F)。イブルチニブは CSP と同様に NFAT 阻害効果を有することから、NFAT 阻害が transitory-Tex の誘導に必要であることが示唆された (Schutt *et al.*, 2015; Dubovsky *et al.*, 2014)。



次に、低用量 IL-2 投与は CNI による IL-2 減少を抑制し、T 細胞の疲弊を改善する可能性があることが報告されていることから(Hermann-Kleiter *et al.*, 2010; Blattman *et al.*, 2003; West *et al.*, 2013)、我々は低用量 IL-2 の投与が CNI を投与したレシピエントマウスにおける transitory-Tex の誘導に影響を与えるかどうかを検証した。同様の移植モデルによる検討で、CNI または vehicle を投与されたレシピエントのいずれにおいても、低用量 IL-2 は transitory-Tex の誘導に影響を及ぼさなかった (図 33A-H)。



以上のことから、活性化 NFAT の下流で起こる IL-2 発現誘導を抑制する機序ではなく、NFAT-Tox-axis 自体の抑制が、CNI による transitory-Tex の誘導に重要な役割を果している可能性が示唆された。

5. transitory-*Tex* による慢性 GVHD 誘導能の評価

慢性 GVHD の病態生理における transitory-*Tex* CNI の役割を評価するために、養子免疫移植を実施した。まず、Allo-HCT 後に Day0-14 まで2週間 Vehicle または CSP を投与した 1st レシピエントマウスから Day14 にそれぞれ T 細胞を採取し 2nd ドナー T 細胞とした。2nd レシピエントマウス 1 匹あたり、 1×10^6 個の 2nd ドナー T 細胞を、 5×10^6 個野生型 B6 マウスの TCD-BM と組み合わせ、致死的な放射線照射した 2nd レシピエントマウス(B6D2F1)に養子免疫移植を実施した (図 34)。その結果、CSP の投与の有無にかかわらず、2nd ドナー T 細胞にはごく少数のドナー Treg が含まれていたが、その数は CSP 投与の有無では差を認めなかった (図 35A-B)。

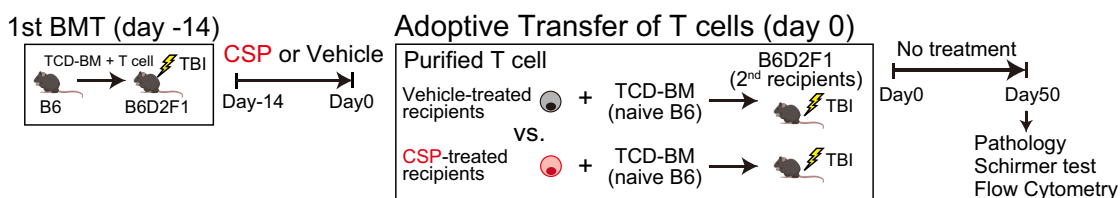


図 34. CSP 投与後のドナー T 細胞による養子免疫移植の概略図

図 5 と同様に移植を施行し、移植後 Day0-14 まで Vehicle または CSP を投与した 1st レシピエントマウスから、Day14 にそれぞれ T 細胞を採取し 2nd ドナー T 細胞とした。2nd レシピエントマウス 1 匹あたり、 1×10^6 個の 2nd ドナー T 細胞を、 5×10^6 個野生型 B6 マウスの TCD-BM と組み合わせ、致死的な放射線を照射した 2nd レシピエントマウス(B6D2F1)に養子免疫移植を実施した。2nd 移植後 50 日目に Schirmer 実験を施行した後マウスを処理し、病理学的標本作成および FCM 解析を施行した。

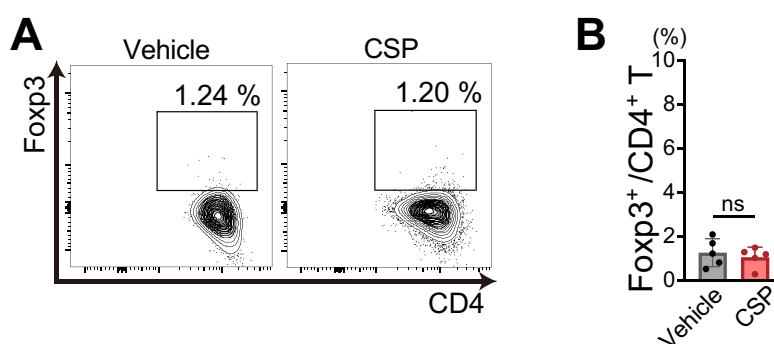


図 35. 養子免疫移植での 2nd ドナー T 細胞における Treg の解析

図 34 と同様に移植を施行し、初回移植の day14 において、Vehicle または CSP を投与したマウスそれぞれに由来する 2nd ドナー T 細胞での CD4、Foxp3 発現を FCM で解析した。代表的な contour plots (A)、および Foxp3 陽性 CD4⁺ T 細胞割合 (B) を示す。(平均 ± 標準誤差、N=5/群) を示す。ns; 有意差なし。

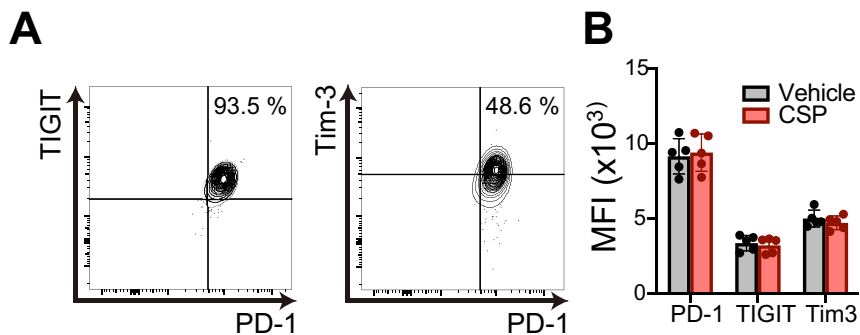


図 36. Treg における疲弊マーカー発現の検討

図 35 と同様の実験系において、Treg の PD-1、TIGIT、Tim3 の発現を FCM で解析した。CSP 投与群の代表的な contour plot (A)、PD-1、TIGIT、Tim3 それぞれの MFI (B; 平均±標準誤差、N=5/群) を示す。

さらに、Treg 上の疲弊関連マーカーである PD-1、Tim-3、TIGIT の発現も CSP の投与の有無で変化はなかったことから、CSP はこの養子免疫モデルにおいて Treg の量や機能に影響を与えないことが示された (図 36A-B)。CSP 投与群から採取された 2nd ドナー T 細胞の移植では、Vehicle 群に比べて 2nd レシピエントマウスの著しい体重減少を認め (図 37)、皮下脂肪の減少、皮膚、唾液腺および肝臓の線維化、涙液分泌量の減少といった慢性 GVHD の典型的な病理的特徴を認めた (図 38A-D)。

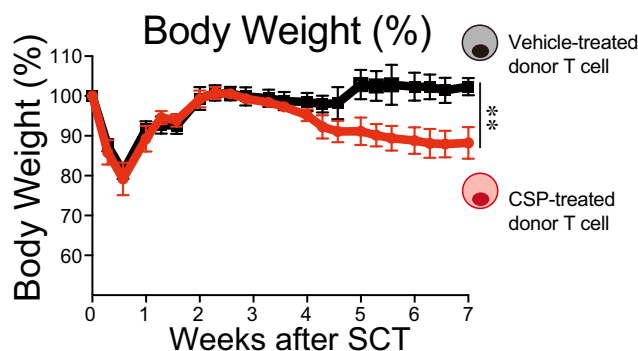
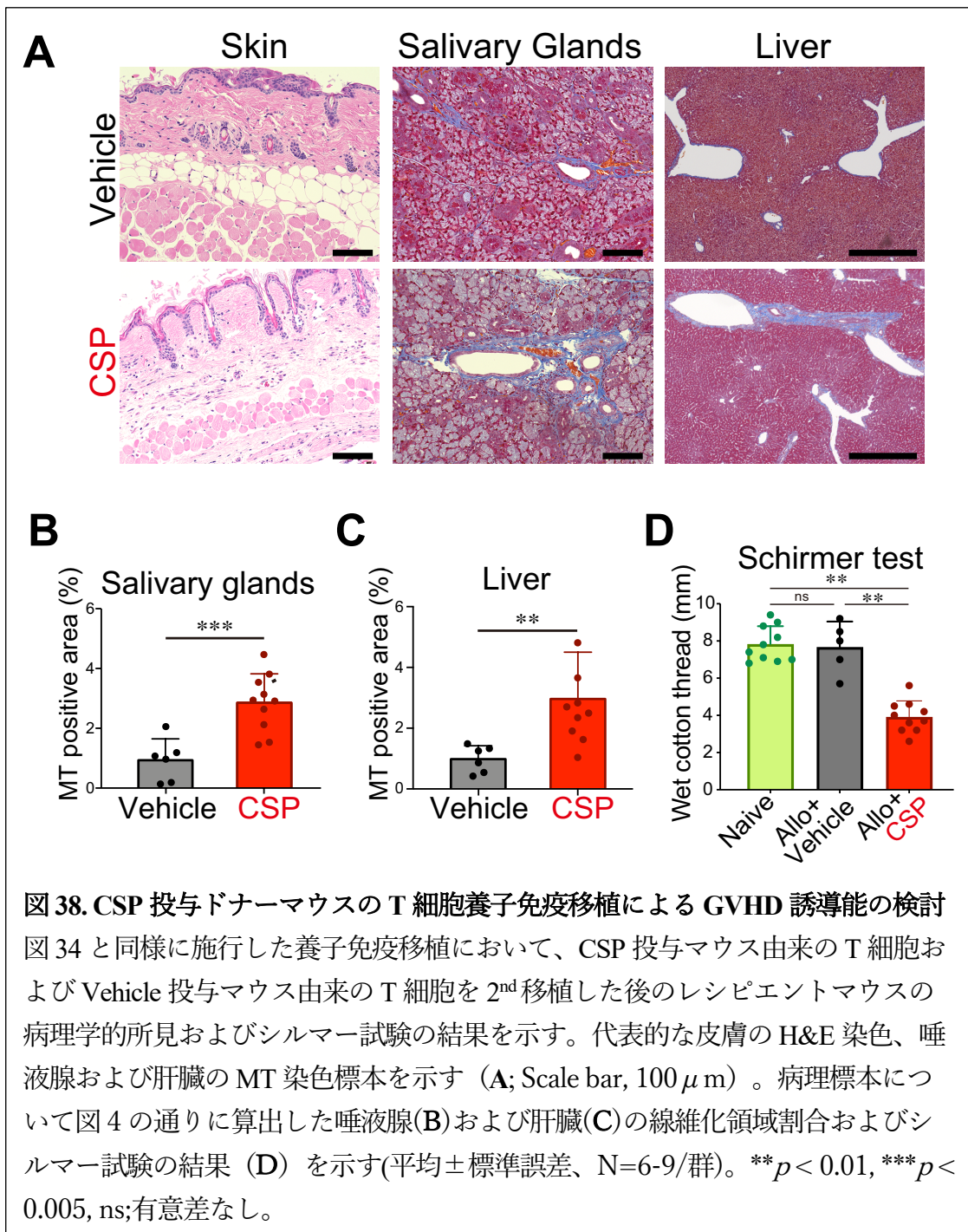


図 37. CSP 投与ドナーマウスの T 細胞養子免疫移植による GVHD 誘導能の検討

図 34 と同様に施行した養子免疫移植において、CSP 投与マウス由来の T 細胞および Vehicle 投与マウス由来の T 細胞を 2nd 移植した後のレシピエントマウスの体重推移を示す。(平均±標準誤差、N=5/群)



以上のことから、allo-SCT 後に CNI を投与されていたマウスの T 細胞ではアロ反応性が保持されて、慢性 GVHD の発症を誘導することが示された。

続いて、この慢性 GVHD の発症を誘導する T 細胞が transitory-*Tex*-CNI であるかどうか確認するための養子免疫実験を行った。Allo-HCT 後に Day0-14 まで 2 週間 CSP を投与した 1st レシピエントマウスから、Day14 に CD90+Ly6C+ transitory-*Tex*-CNI または CD90+Ly6C- terminal-*Tex* を採取し、2nd ドナー T 細胞とした。2nd レシピエントマウス 1 匹あたり、 1×10^6 個の 2nd ドナー T 細胞を、 5×10^6 個野生型 B6 マウスの TCD-BM と組み合わせ、致死的な放射線を照射した 2nd レシピエントマウス(B6D2F1)に養子免疫した(図 39)。Ly6C+T 細胞は、2nd allo-HCT 後 50 日を経過しても transitory-*Tex*-CNI の表現型を維持していた(図 40)。また、Cell Trace Violet にて標識した transitory-*Tex* の多くが養子移入後早期に数回分裂することが確認され、これらの細胞が活発に増殖していることが示唆された(図 41A-B)。

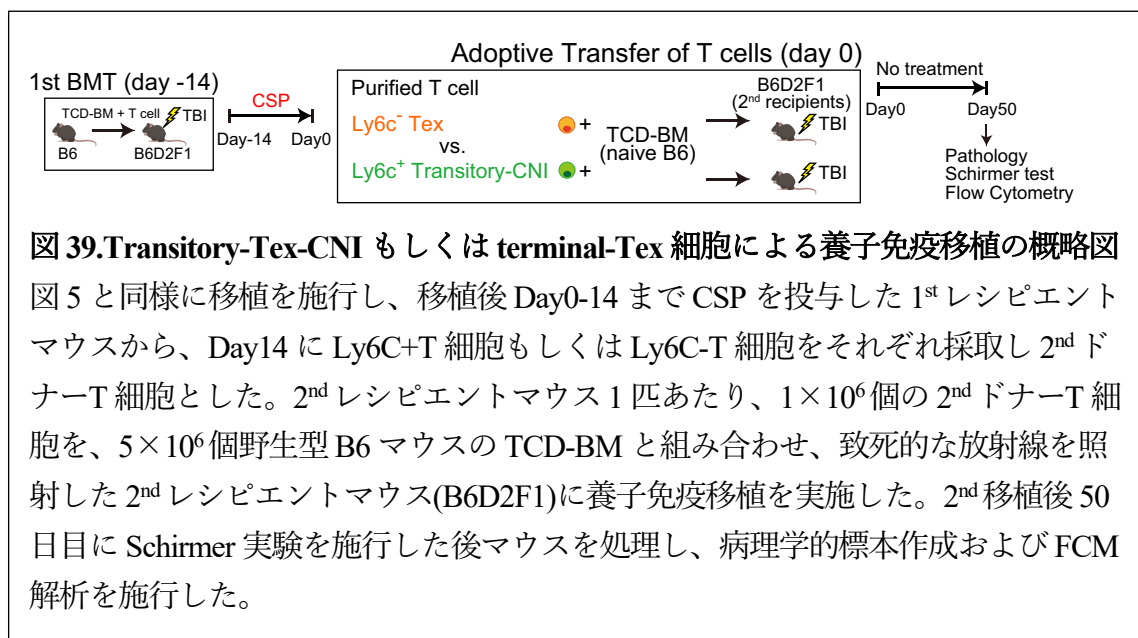


図 39. Transitory-*Tex*-CNI もしくは terminal-*Tex* 細胞による養子免疫移植の概略図
 図 5 と同様に移植を施行し、移植後 Day0-14 まで CSP を投与した 1st レシピエントマウスから、Day14 に Ly6C+T 細胞もしくは Ly6C-T 細胞をそれぞれ採取し 2nd ドナー T 細胞とした。2nd レシピエントマウス 1 匹あたり、 1×10^6 個の 2nd ドナー T 細胞を、 5×10^6 個野生型 B6 マウスの TCD-BM と組み合わせ、致死的な放射線を照射した 2nd レシピエントマウス(B6D2F1)に養子免疫移植を実施した。2nd 移植後 50 日目に Schirmer 実験を施行した後マウスを処理し、病理学的標本作成および FCM 解析を施行した。

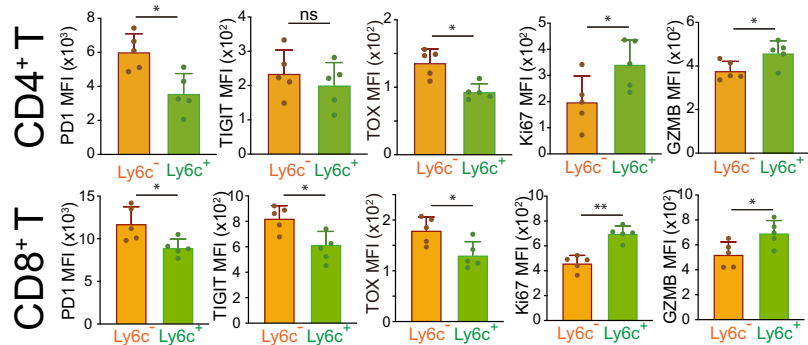


図 40. Transitory-Tex-CNI、terminal-Tex 細胞の養子免疫移植後の疲弊化マーカーおよび増殖能・殺細胞能の検討

図 39 の通りに実施した養子免疫移植において、移植後 50 日目の脾臓での CD4+(上段)および CD8+(下段)T 細胞における Ly6c+および Ly6c-細胞それぞれの PD1、TIGIT、TOX、Ki-67、GZMB の MFI を示す (平均±標準誤差、N=5/群)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns; 有意差なし

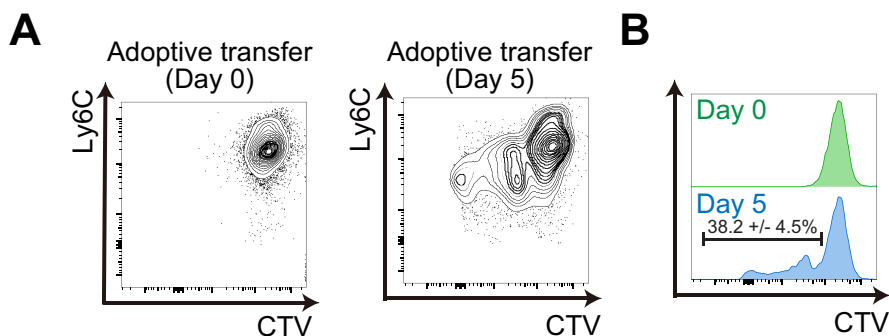
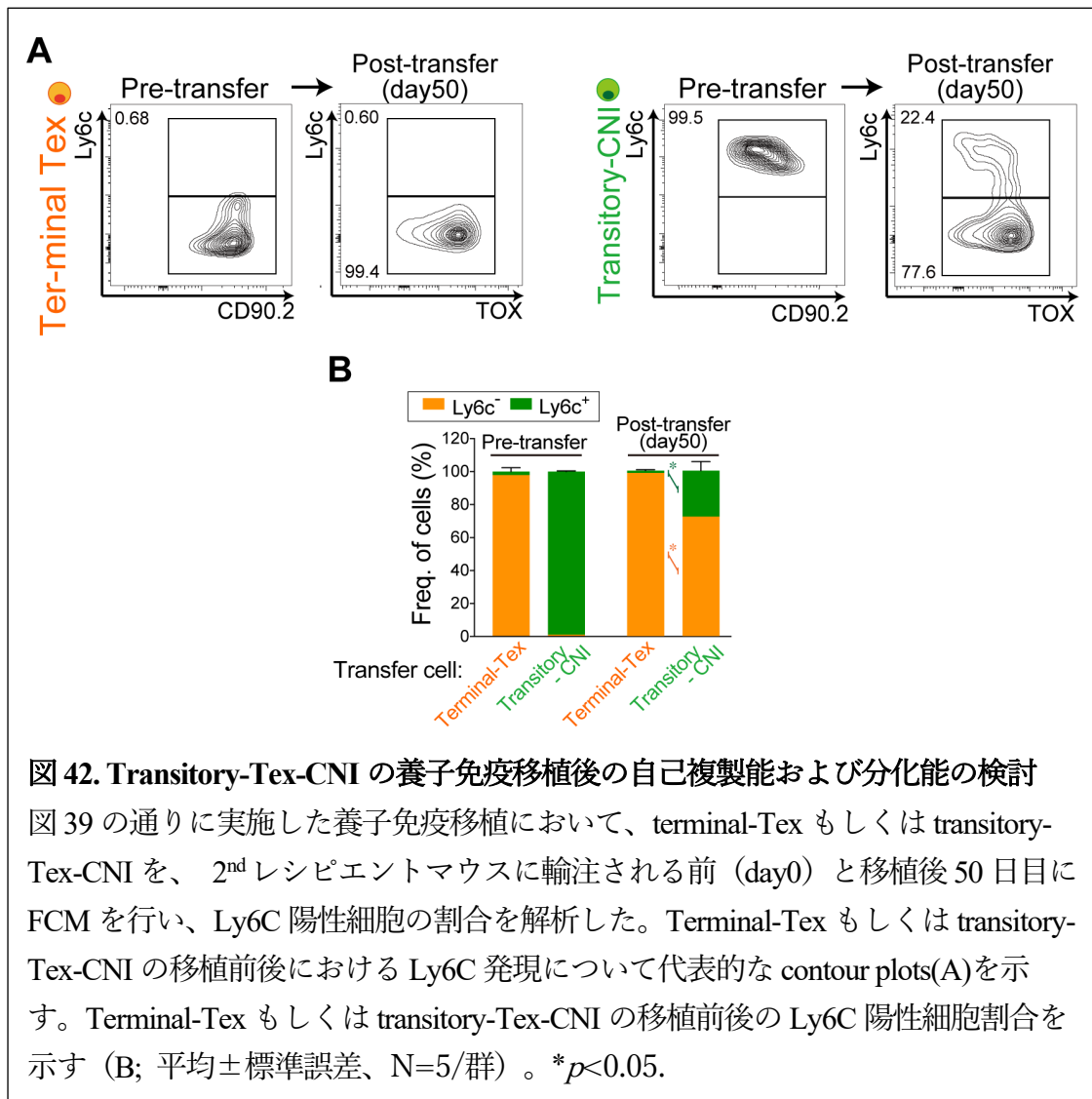
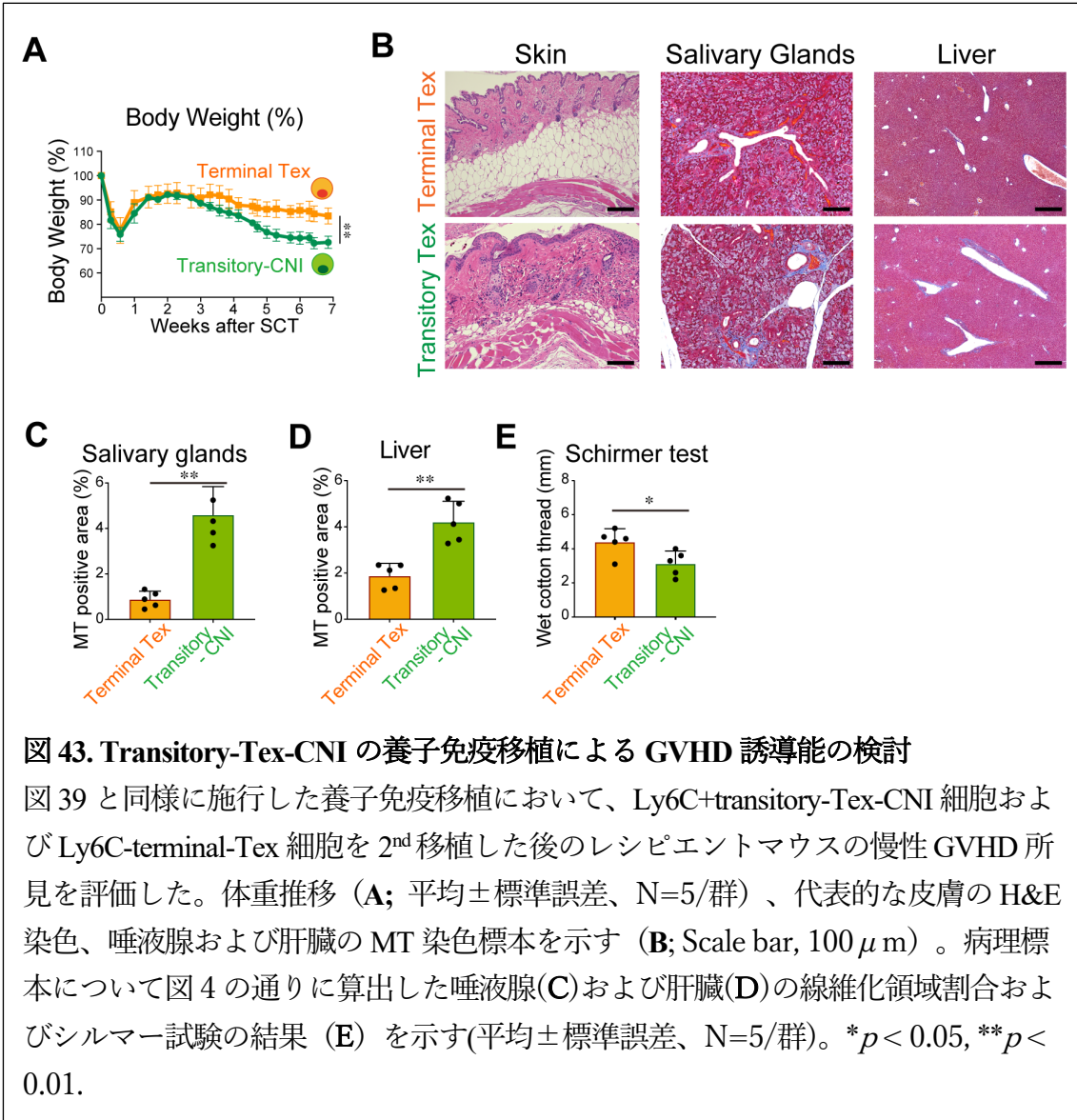


図 41. Transitory-Tex-CNI の養子免疫移植後の自己複製能の検討

図 39 の通りに実施した養子免疫移植において、1st移植後 14 日目に CSP 治療されたレシピエントマウスから抽出した Ly6C⁺ transitory-Tex-CNI を cell trace violet (CTV) で標識し、2nd レシピエントマウスに輸注した。養子免疫移植前 (0 日目) および移植 5 日後の脾臓のドナー-CD8⁺T 細胞における CTV シグナルの代表的な contour plots (A) およびヒストグラム (B; 中央値±標準誤差) を示す。



移植された transitory-Tex-CNI の大部分は、allo-HCT 後 50 日までに Ly6C-terminal-Tex に分化したが、これらの細胞の約 25%は Ly6C+のままであった (図 42A-B)。一方、移植された Ly6C-terminal-Tex は Ly6C-terminal-Tex の表現型を維持したままであった (図 42A-B)。Transitory-Tex-CNI は、2nd レシピエントマウスの著しい体重減少を誘導し (図 37)、皮下脂肪の減少、皮膚、唾液腺および肝臓の線維化、涙液分泌量の減少といった cGVHD の典型的な病理的特徴を誘導した (図 43A-E)。これらのデータから、transitory-Tex-CNI 細胞が自己複製能および terminal-Tex への分化能を発揮しながら慢性 GVHD を引き起こすことが確認された。



6. Transitory-Tex-CNI の免疫チェックポイント阻害薬に対する反応性の評価

腫瘍および慢性感染モデルにおいて、Tpex および transitory-Tex が PD-1 blockade に反応して活性化し増殖する一方で、terminal-Tex は PD-1 blockade に対する反応性が乏しく活性化しないことが報告されている(Hudson *et al.*, 2019; Sade-Feldman *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2020; Burger *et al.*, 2021)。我々は、今回 CSP で誘導された transitory-Tex-CNI が、allo-HCT 後の PD-1 blockade によって活性化して GVL 効果の増強に寄与するのかを検討した。Allo-HCT 後のレシピエントマウスに Day0-14 まで2週間 Vehicle または CSP を投与し、allo-HCT 14 日目に PD-L1 mAbs を腹腔内注射により投与し、Allo-HCT16 日目に脾臓由来のドナーT細胞を FCM によって解析した (図 44)。

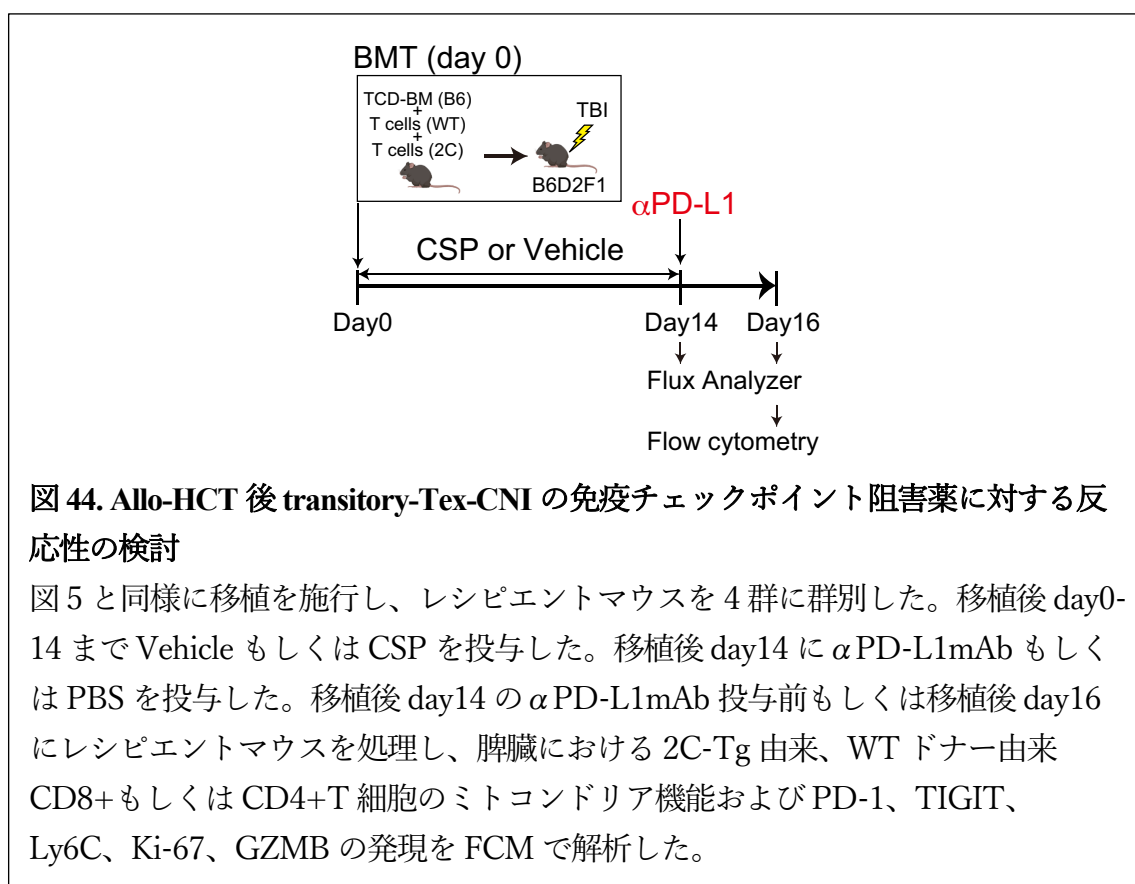


図 44. Allo-HCT 後 transitory-Tex-CNI の免疫チェックポイント阻害薬に対する反応性の検討

図 5 と同様に移植を施行し、レシピエントマウスを 4 群に群別した。移植後 day0-14 まで Vehicle もしくは CSP を投与した。移植後 day14 に α PD-L1mAb もしくは PBS を投与した。移植後 day14 の α PD-L1mAb 投与前もしくは移植後 day16 にレシピエントマウスを処理し、脾臓における 2C-Tg 由来、WT ドナー由来 CD8+ もしくは CD4+T 細胞のミトコンドリア機能および PD-1、TIGIT、Ly6C、Ki-67、GZMB の発現を FCM で解析した。

Vehicle を投与されたマウスでは、PD-L1 mAbs を投与しても 2C-Tg ドナーT細胞の Ki-67 発現は増強されず、GZMB の発現増強も最小限であった (図 45A-D)。一方、CSP を投与されたマウスでは、PD-L1 mAbs 投与によって、2C-Tg ドナーT細胞で Ki-67 発現と GZMB 発現の著しい上昇を認めた。さらに、PD-L1 mAbs 投与により、PD-1+TIGIT-細胞のわずかな増加と PD-1+TIGIT+terminal-Tex

の著しい増加を認めた。以上から PD-L1 mAbs を投与することで transitory-*Tex*-CNI が自己複製と同時に terminal-*Tex* への分化も促進されたことが示された (図 46A-B)。

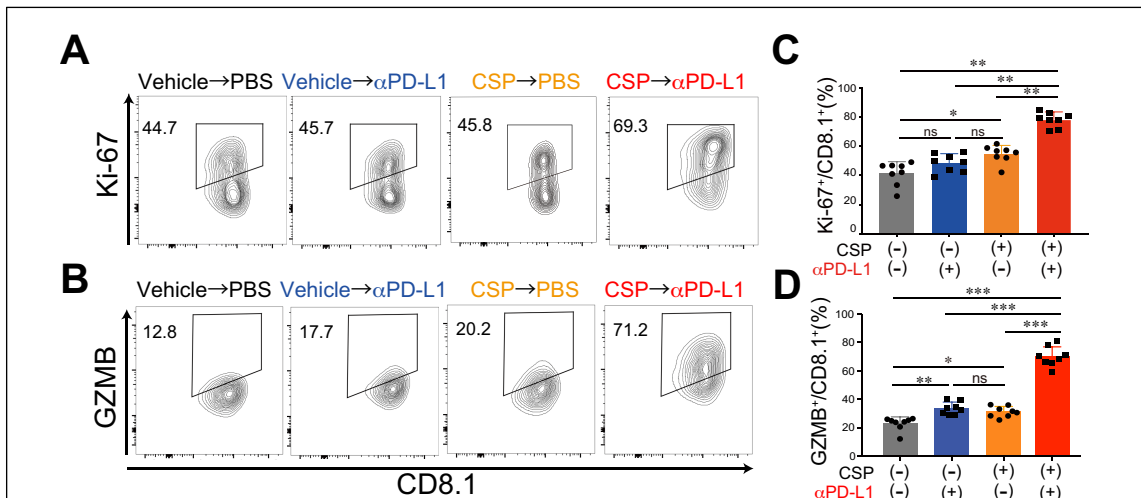


図 45. Allo-HCT 後の 2C-Tg 由来 T 細胞の免疫チェックポイント阻害薬に対する反応性の検討

図 44 の通りに移植・薬剤投与・FCM を施行した。各治療群における移植後 day16 における 2C-Tg ドナー T 細胞の Ki-67、GZMB 発現のデータを示す。各群における Ki-67 発現(A)、GZMB 発現(B)の代表的な contour plots、および Ki-67 陽性細胞割合(C)、GZMB 陽性細胞割合(D) (平均±標準誤差、N=8/群) を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, ns;有意差なし。

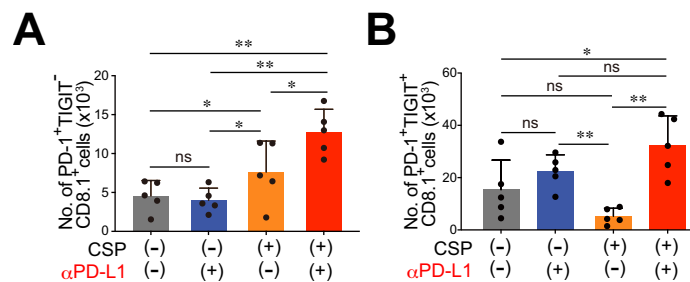
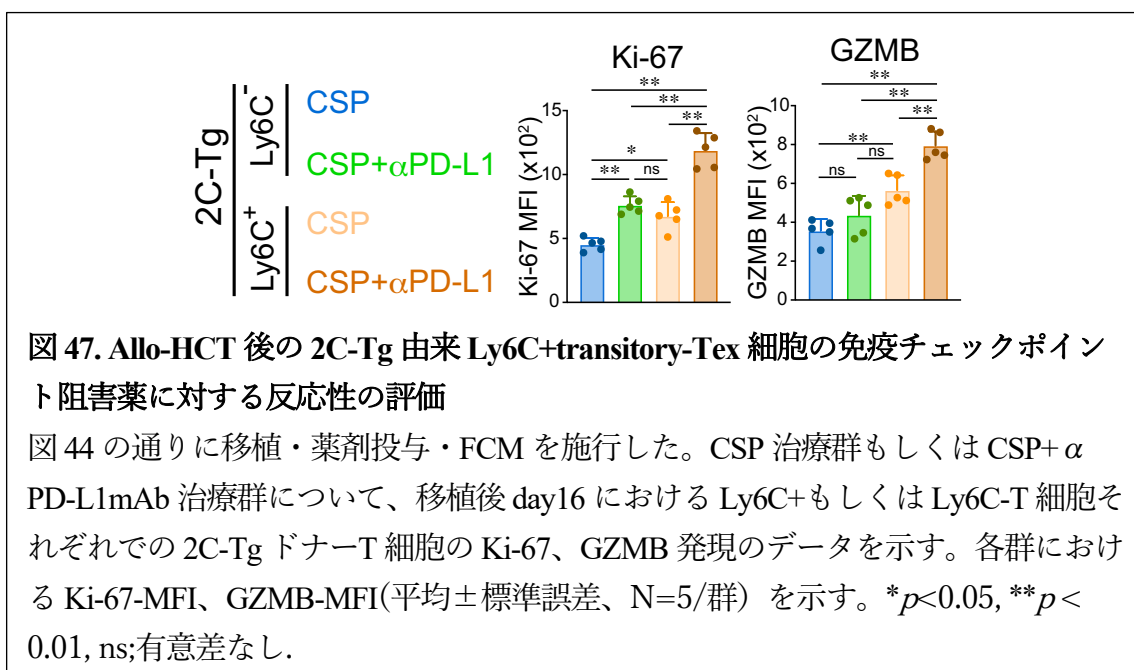


図 46. Allo-HCT 後の 2C-Tg 由来 T 細胞の免疫チェックポイント阻害薬による terminal-*Tex* への分化の評価

図 44 の通りに移植・薬剤投与・FCM を施行した。各治療群における移植後 day16 における 2C-Tg ドナー T 細胞の PD-1、TIGIT 発現のデータを示す。各群における PD-1+TIGIT⁻細胞数(A)、PD-1+TIGIT⁺細胞数(B) (平均±標準誤差、N=8/群) を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns;有意差なし。

また、CSP 投与後に検出された Ly6C 陽性細胞と Ly6C 陰性細胞について、PD-L1 mAbs 投与による両者の Ki-67 および GZMB 発現の程度を比較した。その結果、Ly6C 陽性細胞は、Ly6C 陰性細胞と比較して有意に高く、CSP 投与に続く PD-L1 mAbs 投与に反応して増殖能および殺細胞能が増強した (図 47)。この結果から、Ly6C が ICI に反応する transitory-*Tex*-CNI のマーカーになりうると考えられた。



WT CD8⁺ドナー T 細胞においても 2C-Tg ドナー T 細胞と同様に、PD-L1 mAbs 投与によって、CSP を投与されたマウスでは、PD-L1 mAbs 投与によって、ドナー T 細胞の著しい増殖反応と GZMB 発現の著しい上昇が誘導され、Vehicle を投与されたマウスでは誘導されなかった (図 48A-B)。

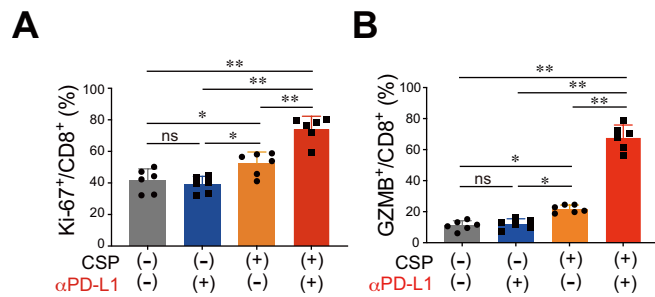


図 48. Allo-HCT 後の WT ドナー由来 CD8⁺T 細胞の免疫チェックポイント阻害薬に対する反応性の検討

図 44 の通りに移植・薬剤投与・FCM を施行した。各治療群における移植後 day16 における WT ドナー CD8⁺T 細胞の Ki-67、GZMB 発現のデータを示す。各群における Ki-67 陽性細胞割合(A)、GZMB 陽性細胞割合(B) (平均±標準誤差、N=8/群) を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, ns;有意差なし。

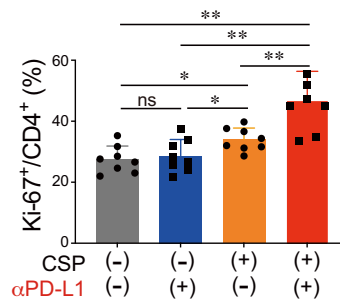


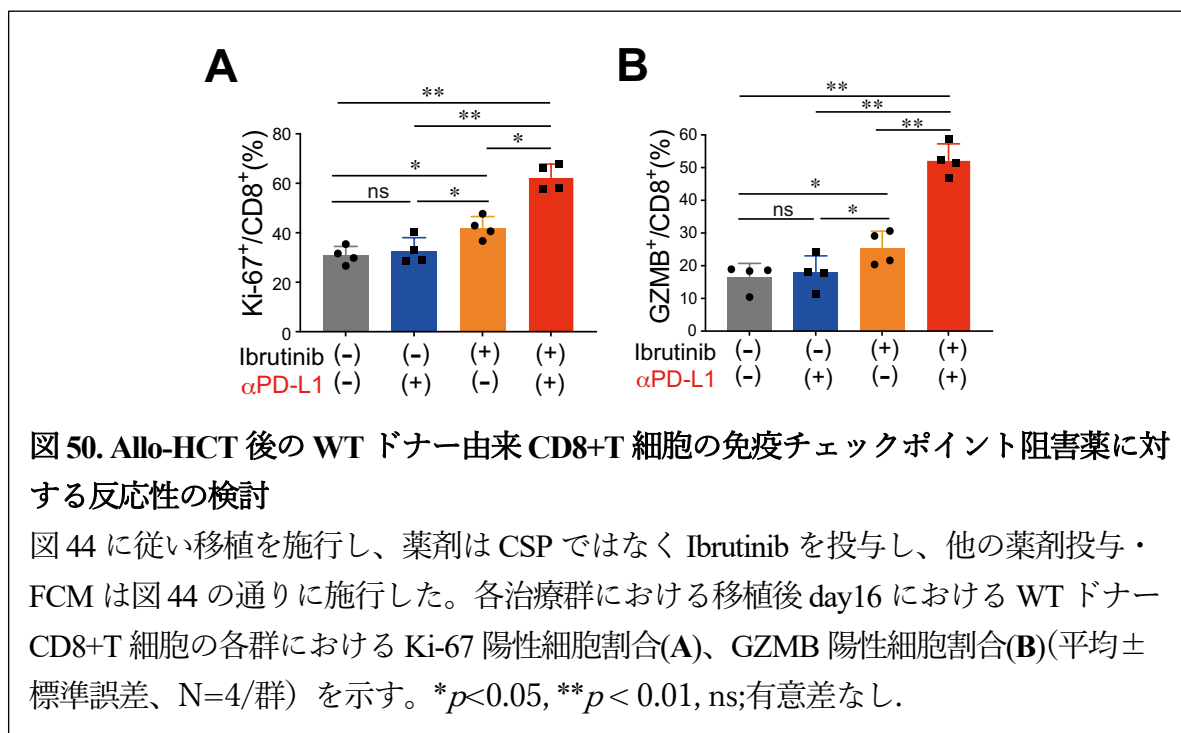
図 49. Allo-HCT 後の WT ドナー由来 CD4⁺T 細胞の免疫チェックポイント阻害薬に対する反応性の検討

図 44 の通りに移植・薬剤投与・FCM を施行した。各治療群における移植後 day16 における WT ドナー CD4⁺T 細胞の各群における Ki-67 陽性細胞割合(平均±標準誤差、N=8/群) を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns;有意差なし。

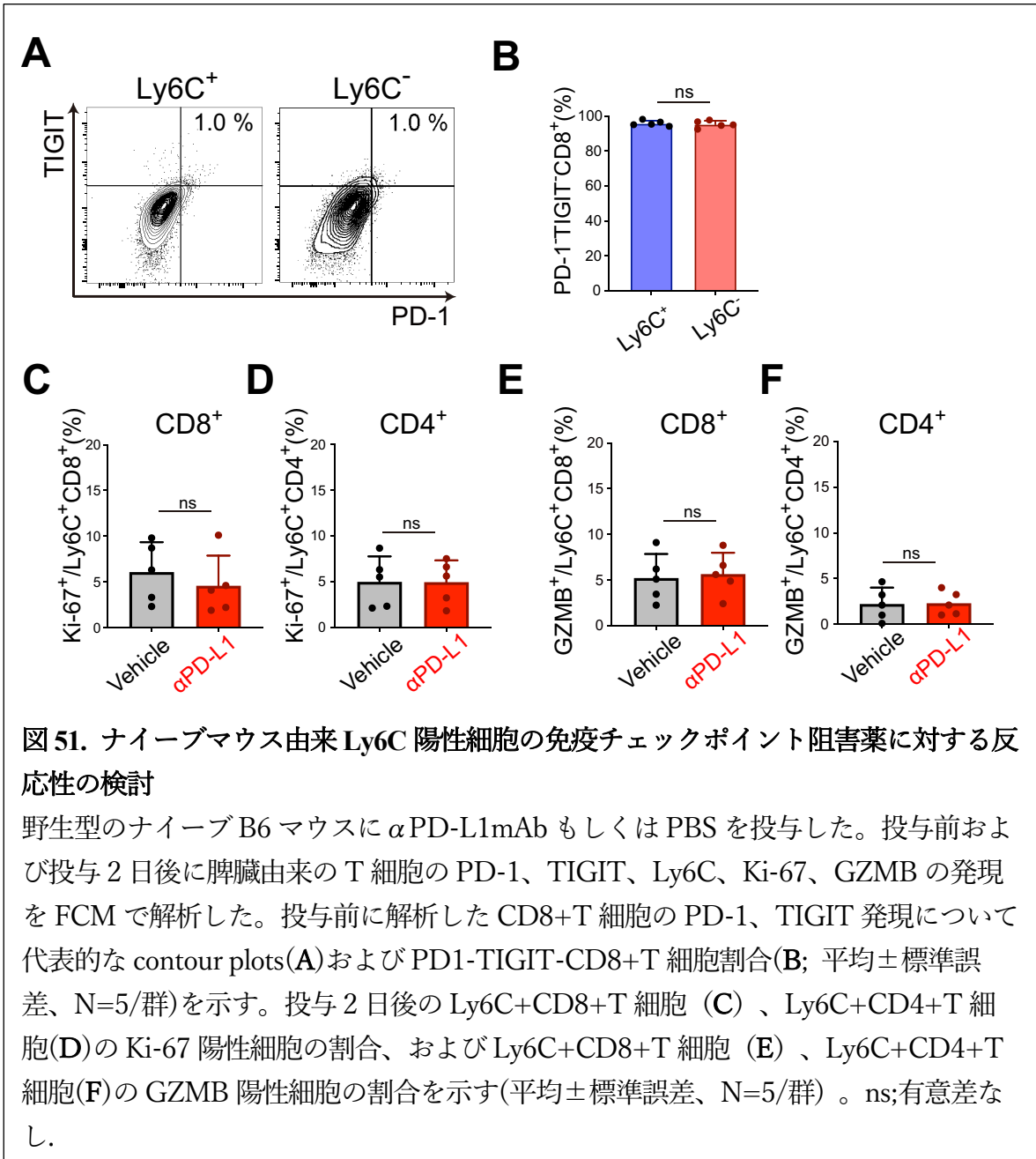
WT CD4⁺ ドナー T 細胞においても、PD-L1 mAbs 投与によって、CSP を投与されたマウスではドナー T 細胞の著しい増殖反応が誘導され、Vehicle を投与されたマウスでは誘導されなかった。(図 49)。

続いて、イブルチニブが CSP 以外の免疫抑制剤の中で有意に Ly6C⁺ transitory-Tex を増加させたことから (図 32A-F)、イブルチニブによって誘導された transitory-Tex の PD-1 blockade に対する反応性を検討した。そこでレシピエントマウスにおいて CSP の代わりにイブルチニブを投与したところ、イブルチニブ

によって誘導された transitory-Tex は CSP によって誘導された transitory-Tex-CNI と同様に、PD-1 blockade に対する高い反応性を示した (図 50A-B)。



続いて、ナイーブ野生型由来の Ly6C⁺T 細胞と、allo-HCT 後の CSP によって誘導された Ly6C⁺transitory-Tex-CNI が異なる細胞集団かどうかを検討するために、ナイーブ野生型 B6 マウス由来の Ly6C⁺T 細胞の PD-1 blockade に対する反応性を評価した。その結果、ナイーブマウスでは PD-L1mAbs の投与によって、Ly6C⁺T 細胞も Ly6C⁻T 細胞も PD-1 や TIGIT を発現せず (図 51A、B)、Ly6C⁺CD4⁺および CD8⁺T 細胞上の Ki-67 および GZMB の発現も変化しなかった (図 51C-F)。このことから、PD-1 blockade に対する反応性は、allo-HCT 後に CSP を投与されたレシピエントマウスにおいて誘導されるドナー由来の transitory-Tex-CNI に特有の反応であることが示された。



T 細胞疲弊の最終分化段階である terminal-*Tex* においては、ミトコンドリア機能が低下していることが報告されている(Hudson *et al.*, 2019; Scharping *et al.*, 2016; Bengsch *et al.*, 2016; Vaeth *et al.*, 2017)。そこで我々は、同様のマウス移植モデルを用いて、allo-HCT 後のレシピエントマウスに Day0-14 まで 2 週間 Vehicle または CSP を投与し、PD-L1 mAbs 投与前 (14 日目) もしくは投与後 (16 日目) にレシピエントマウスからドナー T 細胞を抽出し、ドナー T 細胞のミトコンドリア機

能として酸化的リン酸化 (OXPHOS) を評価した。その結果、Vehicle を投与したレシピエントマウスから抽出されたドナーT細胞は、低いミトコンドリア予備呼吸能を示し、PD-L1 mAbs 投与は基礎呼吸能または予備呼吸能に影響しなかったことから、allo-HCT 後に terminal-*Tex* に分化したドナーT細胞においては、ミトコンドリア機能が著しく低下していることが示された (図 52A-D)。一方で、CSP を投与したレシピエントマウスから抽出されたドナーT細胞では、以前に CNI の一種であるタクロリムスで処理された T細胞で報告されていたもの (Vaeth *et al.*, 2017)と同様、PD-L1mAbs 投与前のドナーT細胞の基礎呼吸能が著しく抑制されていた (図 52A-D) もの、PD-L1 mAbs 投与後には予備呼吸能が劇的に増強されたことから、CSP 投与によって、ドナーT細胞の α PD-L1 投与に反応しうるミトコンドリア予備呼吸能が保持されることが示された (図 52A,B,D)。

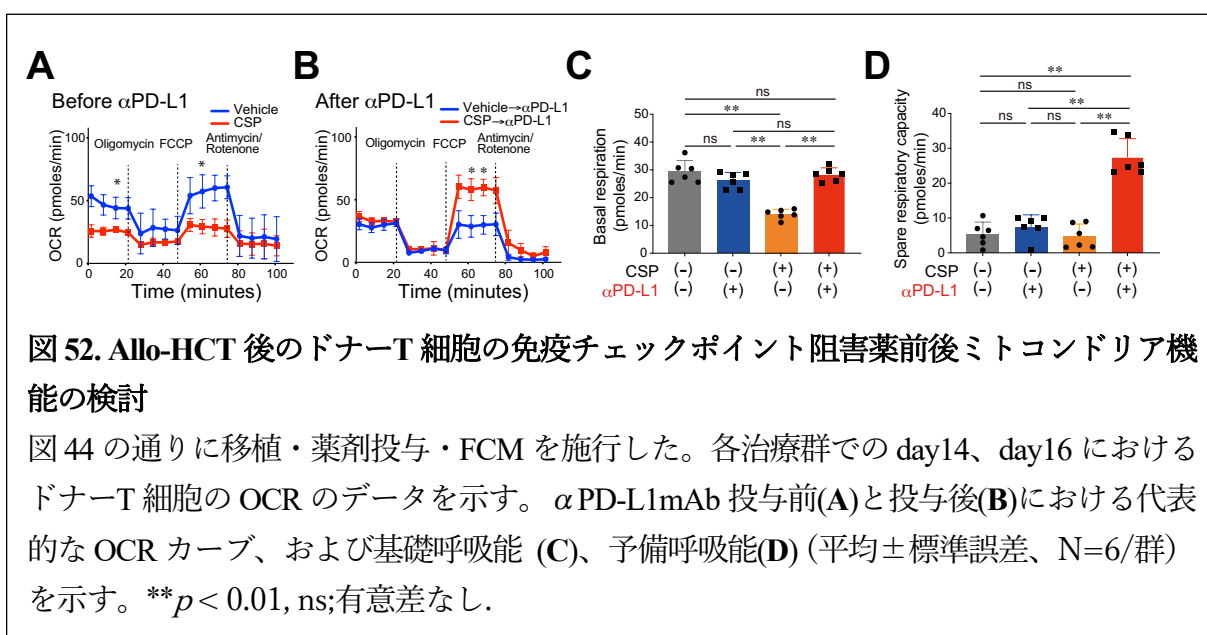


図 52. Allo-HCT 後のドナーT細胞の免疫チェックポイント阻害薬前後ミトコンドリア機能の検討

図 44 の通りに移植・薬剤投与・FCM を施行した。各治療群での day14、day16 におけるドナーT細胞の OCR のデータを示す。 α PD-L1mAb 投与前(A)と投与後(B)における代表的な OCR カーブ、および基礎呼吸能 (C)、予備呼吸能(D) (平均 \pm 標準誤差、N=6/群)を示す。** $p < 0.01$, ns;有意差なし。

次に、我々は CSP 投与期間が transitory-*Tex*-CNI 誘導能へ及ぼす影響および CSP 投与中止後の transitory-*Tex*-CNI の持続性について検討した。Allo-HCT 後のレシピエントマウスに Day0-28 まで 4 週間 Vehicle または CSP を延長して投与した後、28 日目に PD-L1 mAbs を投与したところ、PD-1 + TIGIT- 2C-Tg T細胞が維持され、PD-1 blockade に反応して増殖、活性化し、PD-1 + TIGIT+ 2C-Tg T細胞への分化が誘導されることが示された (図 53A-E)。

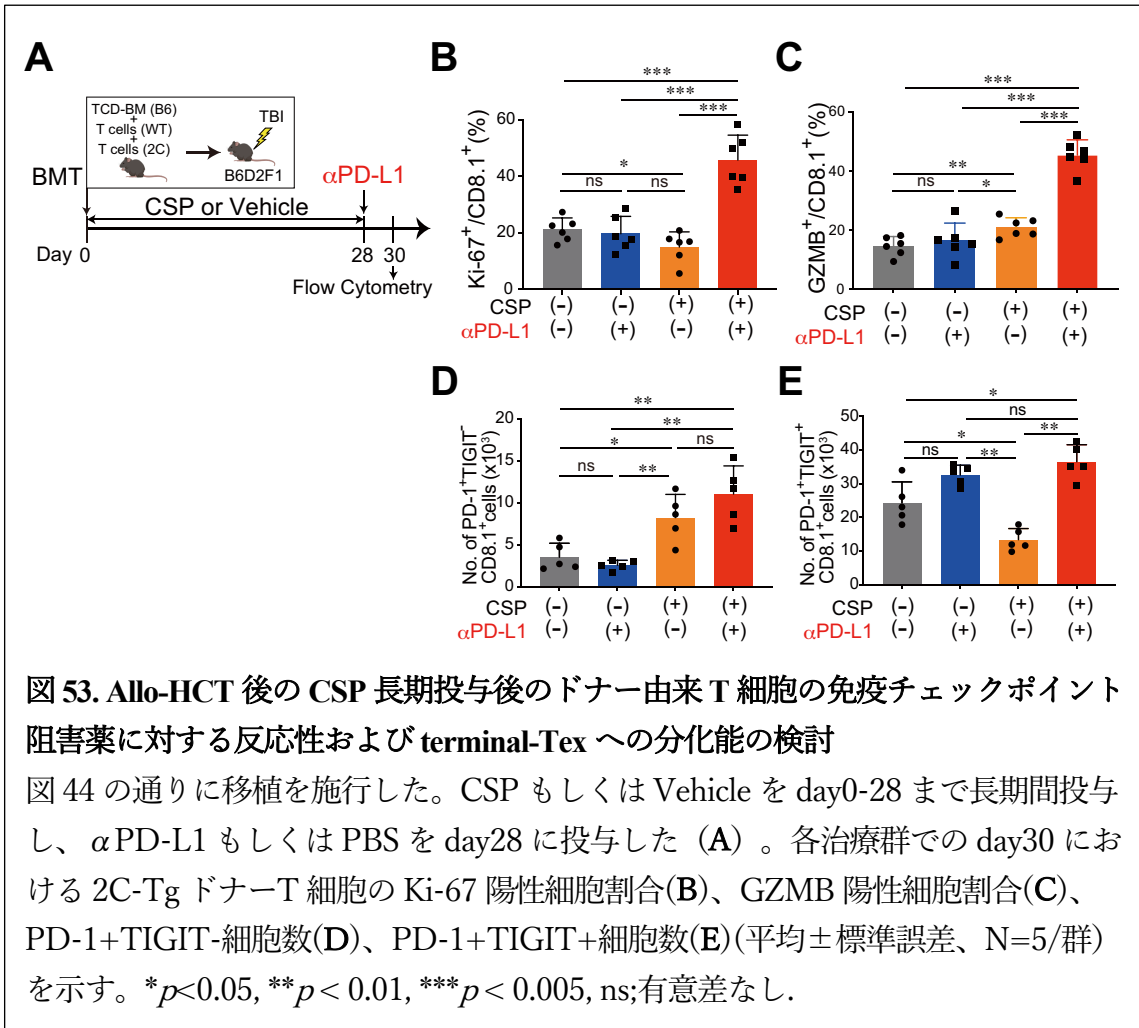
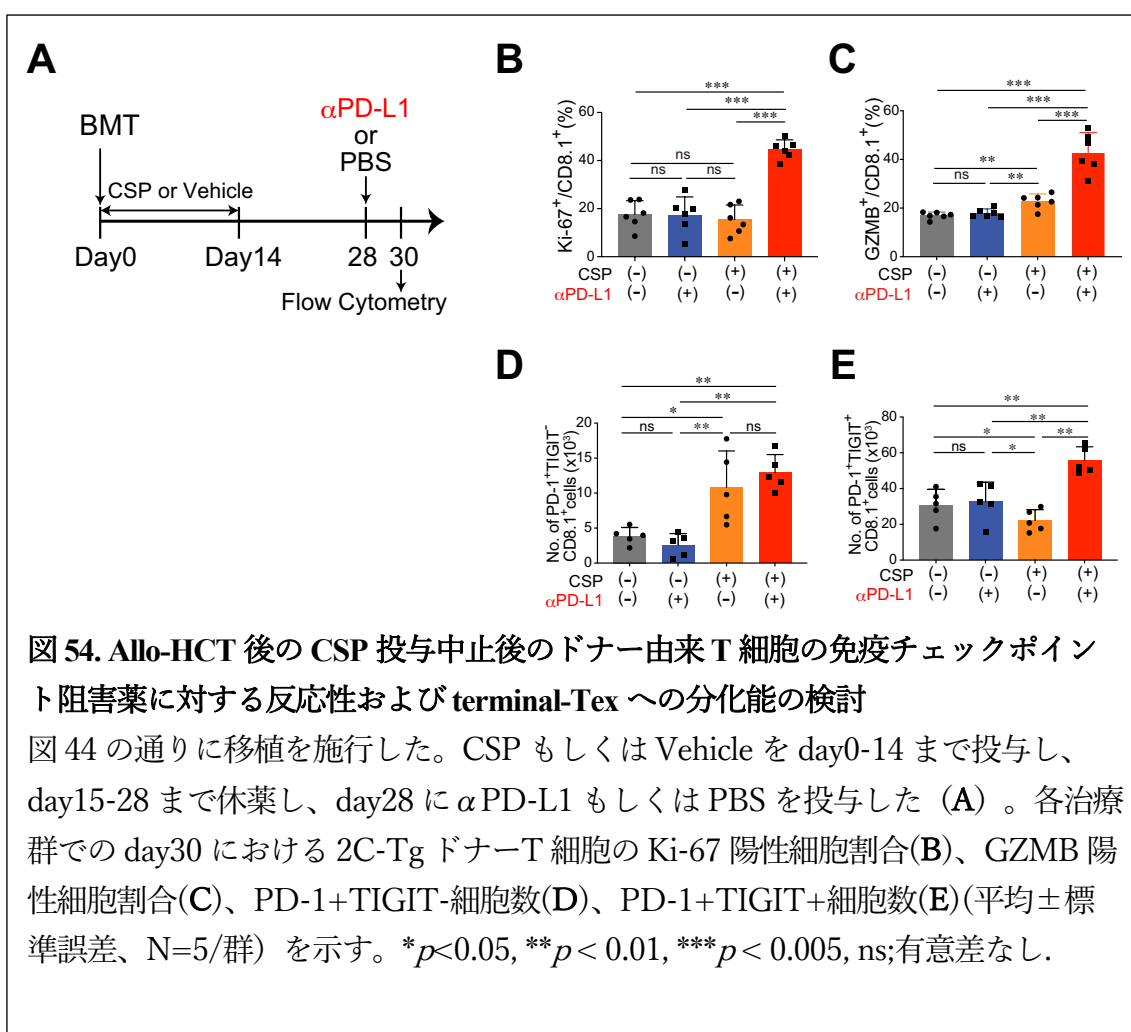


図 53. Allo-HCT 後の CSP 長期投与後のドナー由来 T 細胞の免疫チェックポイント阻害薬に対する反応性および terminal-Tex への分化能の検討

図 44 の通りに移植を施行した。CSP もしくは Vehicle を day0-28 まで長期間投与し、αPD-L1 もしくは PBS を day28 に投与した (A)。各治療群での day30 における 2C-Tg ドナー T 細胞の Ki-67 陽性細胞割合(B)、GZMB 陽性細胞割合(C)、PD-1+TIGIT-細胞数(D)、PD-1+TIGIT+細胞数(E)(平均±標準誤差、N=5/群)を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, ns;有意差なし。

また、allo-HCT 後のレシピエントマウスに Day0-14 まで 2 週間 Vehicle または CSP を投与してから Day15-28 まで CSP 投与を中止し、Allo-HCT 後 28 日目に PD-L1 mAbs を投与したところ、CSP 中止後も PD-1+TIGIT- 2C-Tg T 細胞は維持され、PD-1 blockade に反応して増殖、活性化し、PD-1+TIGIT+ 2C-Tg T 細胞への分化が誘導されることが示された (図 54A-E)。

さらに、より長期での CSP 中止後の transitory-*Tex*-CNI の持続性を検討するために allo-HCT 後のレシピエントマウスに Day0-28 まで 4 週間 Vehicle または CSP を投与し、Day29 以降は投与を中止し、allo-HCT 後 160 日目に脾臓由来ドナー T 細胞を FCM 解析したところ、PD-1+TIGIT-および Ly6C+ の transitory-*Tex* が持続して存在することが確認された (図 55A-D)。以上のことから、移植後早期の CSP 治療により誘導された transitory-*Tex*-CNI は、CSP 治療中止後も少なくとも 4 ヶ月間は持続することが確認された。



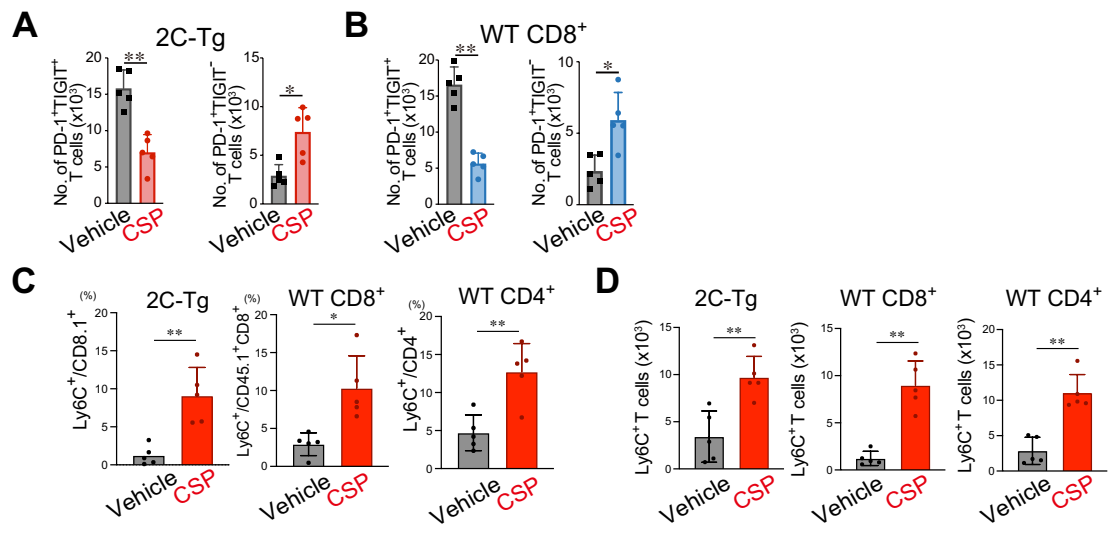
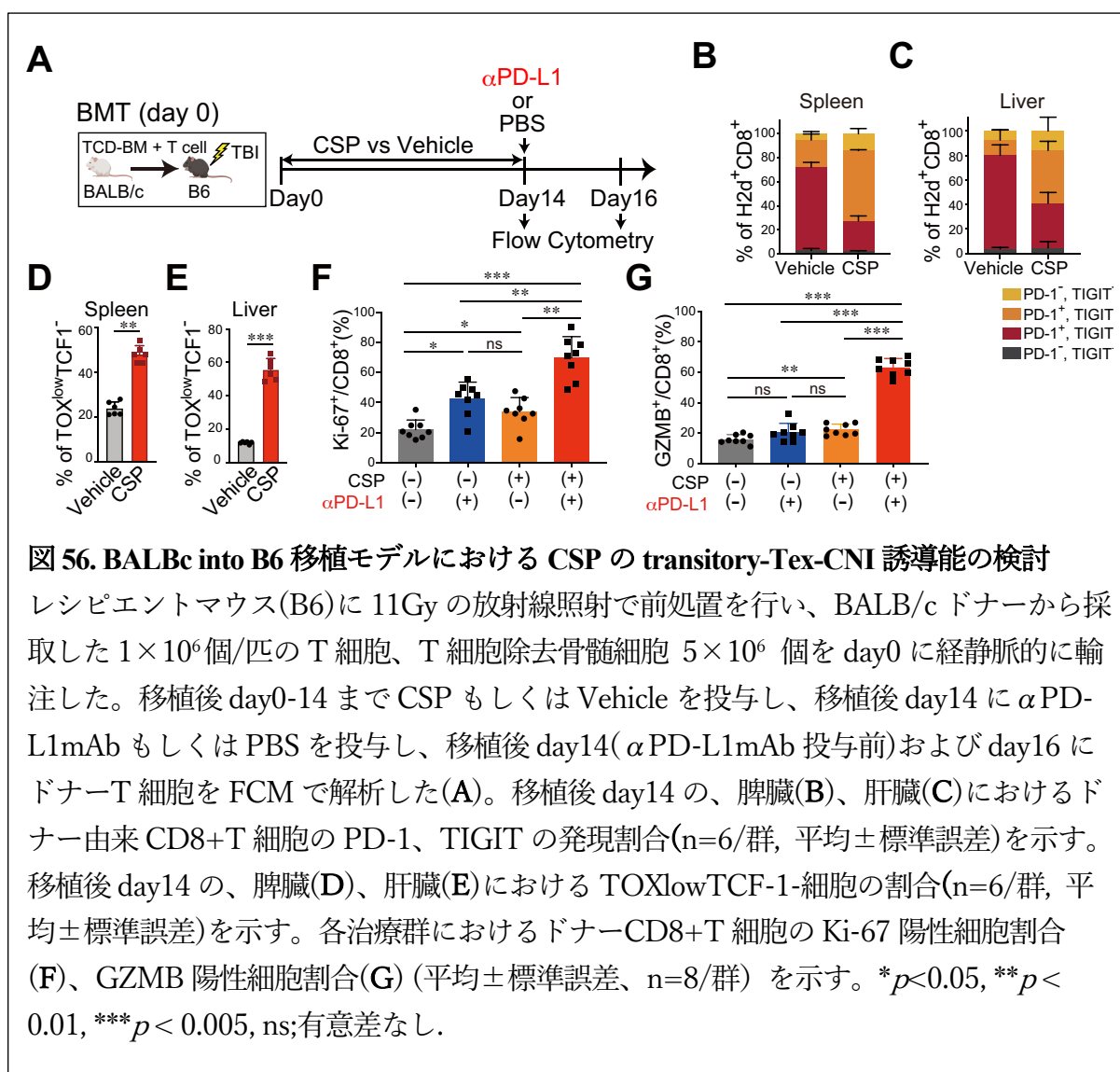


図 55. Allo-HCT 後の CSP 投与後長期間中止後の transitory-Tex-CNI の維持能の検討

図 44 の通りに移植を施行した。CSP もしくは Vehicle を day0-28 まで投与し、day29-160 まで休薬し、day160 にレシピエントマウスを処理し、脾臓のドナー由来 T 細胞を FCM 解析した。Vehicle 群および CSP 投与群での 2C-Tg ドナー T 細胞(A)、WT CD8⁺ T 細胞(B)の PD-1⁺TIGIT⁺細胞数、PD-1⁺TIGIT⁻細胞数を示す。2C-Tg、WT CD8⁺、WT CD4⁺細胞における Ly6C 陽性細胞の割合(C)、Ly6C 陽性細胞数(D)を示す。(平均±標準誤差、N=5/群) **p*<0.05, ***p*< 0.01.

7. 免疫チェックポイント阻害薬による transitory-*Tex*-CNI の活性化を介した GVL 増強効果の検討

最後に、transitory-*Tex*-CNI が α PD-L1mAbs によって誘導される GVL 効果を増強しうるかについて検討を行った。B6 由来の luciferase 発現 C1498 骨髄性白血病細胞株 (C1498^{luc}) を用いるため、BALB/c マウスをドナー、B6 マウスをレシピエントとした移植モデルを用いた。まず、この移植モデルにおいてもこれまでの移植モデルと同様に、CSP 投与によってドナーCD8⁺T 細胞において PD-1⁺TIGIT⁻および TOX^{low} TCF-1⁻の transitory-*Tex*-CNI が誘導されることを確認した (図 56A-G)。



次に、レシピエントマウスに allo-HCT 後 0 日目から 14 日目まで Vehicle または CSP を投与した上で、allo-HCT 後 7 日目に C1498^{luc} を播種し、allo-HCT 後 14 日目から 42 日目まで、PD-L1 mAbs もしくは PBS を週 3 回腹腔内注射で投与した (図 57)。

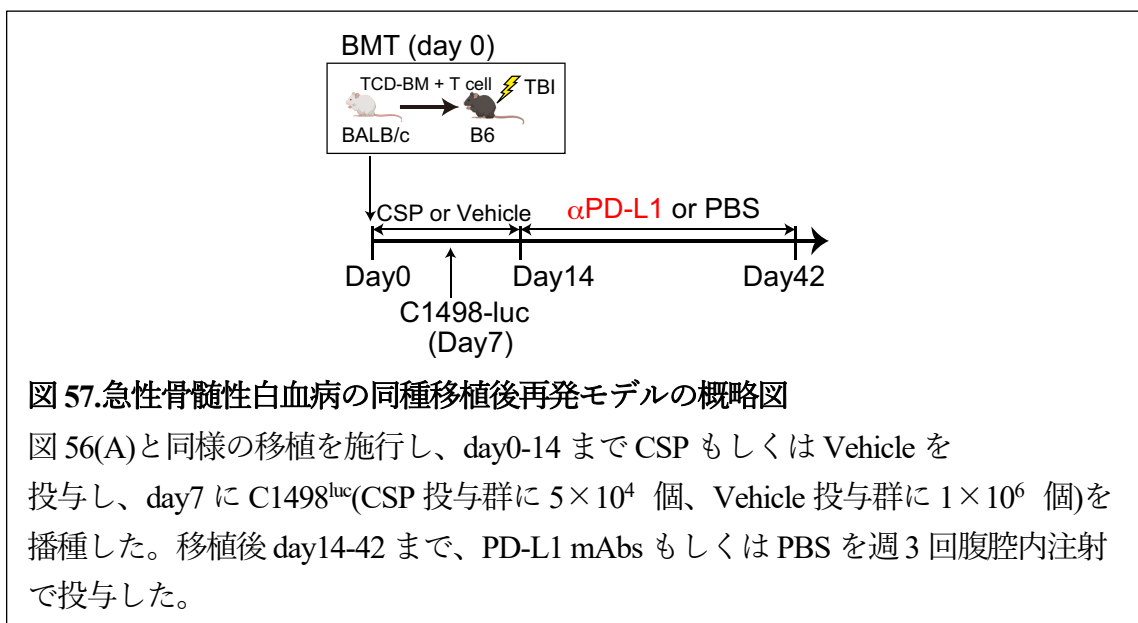


図 57.急性骨髄性白血病の同種移植後再発モデルの概略図

図 56(A)と同様の移植を施行し、day0-14 まで CSP もしくは Vehicle を投与し、day7 に C1498^{luc}(CSP 投与群に 5×10^4 個、Vehicle 投与群に 1×10^6 個)を播種した。移植後 day14-42 まで、PD-L1 mAbs もしくは PBS を週 3 回腹腔内注射で投与した。

バイオルミネッセンスイメージング(BLI)を用いて白血病細胞の増殖を評価したところ、Vehicle を投与されたマウスでは、PD-L1 mAbs 投与の有無に関わらず、白血病細胞が増加して allo-HCT 後 5 週目までにすべてのマウスが死亡した (図 58A-B)。その一方で、CSP を投与されたマウスのうち αPD-L1mAbs が投与されたマウスでは 70%において C1498^{luc} 細胞が根絶したことから、この群で GVL 効果が著明に増強されたことが示唆された。

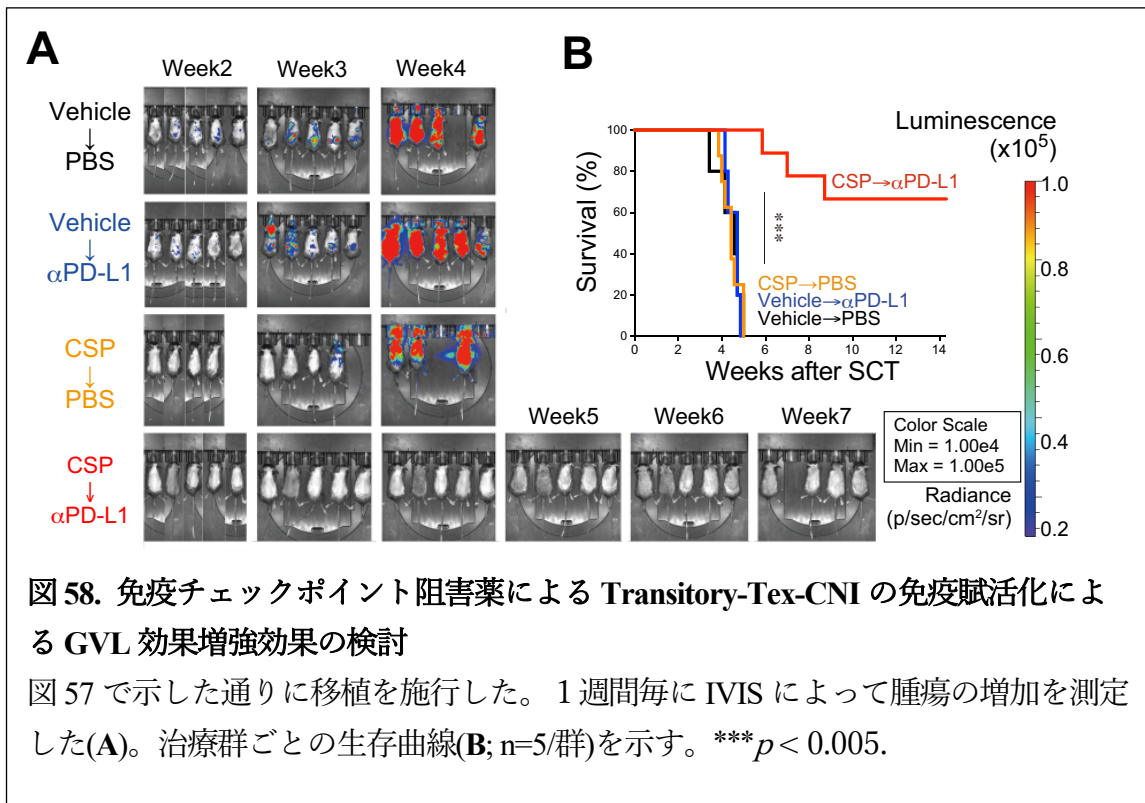
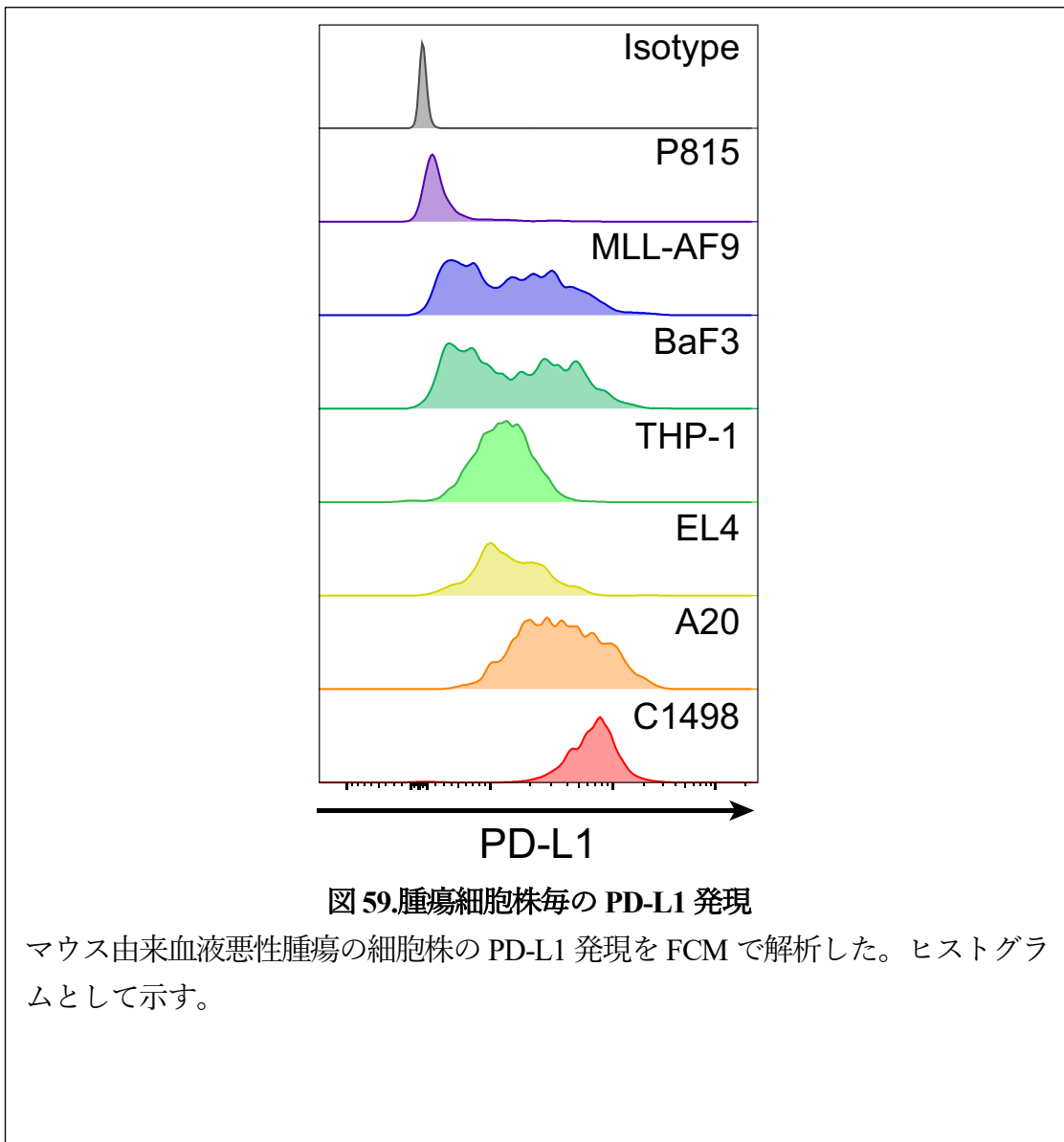


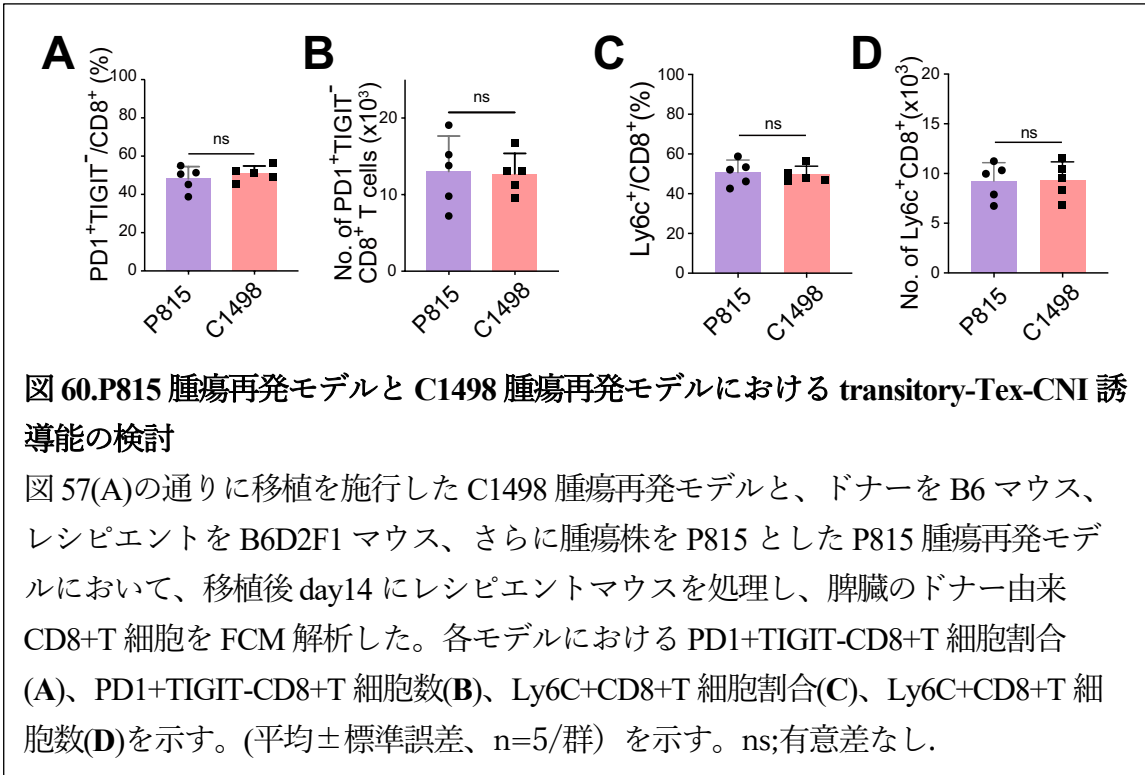
図 58. 免疫チェックポイント阻害薬による Transitory-Tex-CNI の免疫賦活化による GVL 効果増強効果の検討

図 57 で示した通りに移植を施行した。1 週間毎に IVIS によって腫瘍の増加を測定した(A)。治療群ごとの生存曲線(B; n=5/群)を示す。*** $p < 0.005$ 。

C1498 細胞株はもともと PD-L1 を強発現していることから、白血病細胞株の PD-L1 発現の程度が、allo-HCT 後の transitory-Tex 誘導に影響するかどうかを検討した。7 種類のマウス白血病細胞株について、PD-L1 の発現を FCM で評価した結果、C1498 細胞株がこれらの細胞株の中で最も高い PD-L1 発現を示したのに対し、B6D2F1 マウス由来の P815 細胞は PD-L1 の発現が最低であった (図 59)。



そこで、B6 マウスをドナー、B6D2F1 マウスをレシピエントとし、さらに P815 細胞株をレシピエントマウスに播種する allo-HCT 後腫瘍再発モデルを用いて検討したところ、C1498 細胞株を用いたモデルと同様に、このモデルにおいても CSP 投与によって transitory-Tex が誘導された (図 60A-D)。



さらに、この transitory-Tex は PD-1 遮断により、C1498 細胞株を用いたモデルと同程度に活性化されたことから、白血病細胞上の PD-L1 発現の程度は、allo-HCT 後の CSP による transitory-Tex-CNI の誘導に関与していないことが示された (図 61A-D)。

以上の結果から、PD-1 blockade によって誘導される GVL 効果の増強において、transitory-Tex-CNI が重要な役割を果たしていることが示唆された。

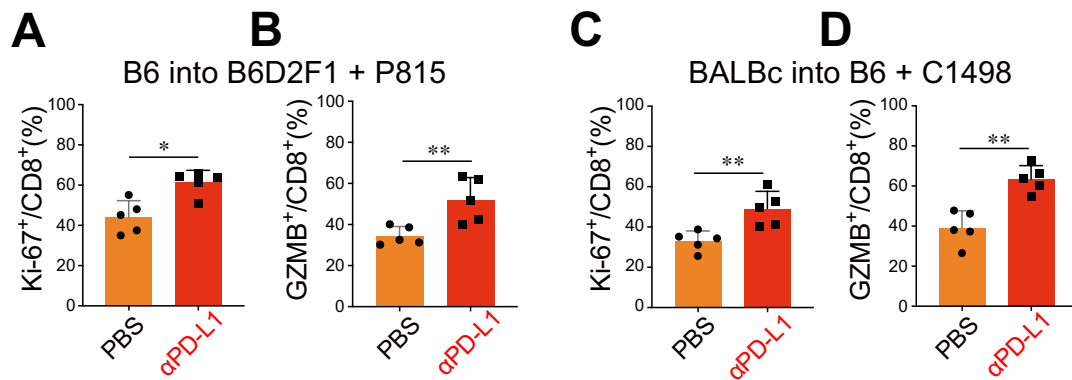


図 61. P815 腫瘍再発モデルと C1498 腫瘍再発モデルにおける transitory-Tex-CNI の免疫チェックポイント阻害薬に対する反応性の検討

図 57(A)の通りに移植を施行した C1498 腫瘍再発モデルと、ドナーを B6 マウス、レシピエントを B6D2F1 マウス、さらに腫瘍株を P815 とした P815 腫瘍再発モデルにおいて、移植後 day14 に α PD-L1 もしくは PBS を投与し、day16 にレシピエントマウスを処理し、脾臓のドナー由来 CD8⁺T 細胞を FCM 解析した。P815 モデルにおける Ki-67⁺CD8⁺T 細胞割合(A)、GZMB⁺CD8⁺T 細胞割合(B)、C1498 モデルにおける Ki-67⁺CD8⁺T 細胞割合(C)、GZMB⁺CD8⁺T 細胞割合(D)を示す。(平均±標準誤差、n=5/群)を示す。* p <0.05; ** p < 0.01.

考察

T細胞の疲弊については、慢性感染症や固形腫瘍モデルにおいて活発に報告されている。T細胞の疲弊は、Tpex、transitory-*Tex*、terminal-*Tex*を含む多段階の分化過程であることが示されている(Belk *et al.*, 2022)。TpexはTCF-1+であり、TOXとPD-1の発現レベルがterminal-*Tex*より低く、エフェクター分子や、Tim-3、TIGIT、CD39などの他の阻害性受容体を欠いている(Utzschneider *et al.*, 2020)。またTpexは自己複製細胞であり、PD-1阻害はTpexの増殖とtransitory-*Tex*への分化、さらにterminal-*Tex*への分化を誘導することが報告されている(Utzschneider *et al.*, 2016; Im *et al.*, 2016; Siddiqui *et al.*, 2019)。対照的に、terminal-*Tex*はエピジェネティック構造が非常に安定しているため、PD-1阻害によるterminal-*Tex*の再活性化は起こりにくいことが報告されている(Beltra *et al.*, 2020; Zehn *et al.*, 2022; Pauken *et al.*, 2016)。

現在、同種造血幹細胞移植(allo-HCT)の進歩によって、早期死亡率が低下し、長期生存者が経時的に増加している。慢性GVHDは同種移植患者の生活の質を極端に低下しうる主たる晩期合併症であり、その病態生理を研究することの重要性が増している(Wingard *et al.*, 2011)。CNIを用いたGVHD予防によって、重症急性GVHDの発症が抑制される一方で、CNI単独では慢性GVHDを十分に予防することはできないことが知られている(Sorrer *et al.*, 2005; Carpenter *et al.*, 2018)。

CNI投与にも関わらず慢性GVHDを発症する原因の一つとして、CNIがTregの移植後再構築を阻害することで末梢性免疫寛容を阻害する可能性が報告されているが、allo-HCT後のアロ特異的T細胞の疲弊に対するCNIの影響については、十分に解明されておらず(Sugiyama *et al.*, 2014; Whitehouse *et al.*, 2017)、臨床現場でGVHD予防の標準治療として広く用いられているCNIが、allo-HCT後のドナー*Tex*の分化に与える影響は不明であった(Zhou *et al.*, 2020)。

GVHDを含めた免疫関連疾患における、T細胞の疲弊に関する報告は限られているが、allo-HCT後にレシピエントのアロ環境は永続的に存在することから、ドナーT細胞の多くは永続的なT細胞刺激により、T細胞疲弊すなわち*Tex*の分化が誘導されると予想され、GVHDにおいても*Tex*の誘導が移植後の免疫寛容に重要な役割を果たすと考えられる。最近、Khanらにより、CNIが*Tex*の分化を抑制することが報告されたことから(Khan *et al.*, 2019)、我々は今回、CNIがallo-HCT後のドナーT細胞の疲弊を抑制することで慢性GVHDの発症に関与している可能性を検討した。

本研究では、CNI の一種である CSP の投与によりドナーT細胞における TOX の発現が抑制され、MHC 不一致 HCT 後のドナーT細胞の terminal-*Tex* 分化が抑制されることが観察された。MHC 一致 HCT 後に CD40 アゴニスト抗体の投与が *Tpex* から terminal-*Tex* への分化を促進したと報告されているが(Zhou *et al.*, 2020)、我々の用いた MHC 不一致 HCT のモデルにおいては、*Tpex* はマイナーな細胞集団に過ぎず、大多数のドナーT細胞は MHC 不一致 HCT 後、早期に terminal *Tex* に分化しており、このモデルにおいてはより強力な TCR シグナルが、迅速かつ強固な terminal-*Tex* 分化の誘導に関与していると考えられる。TCR シグナルは、カルシニューリン依存的に NFAT の脱リン酸化による活性化を誘導し、活性化した NFAT は核内に移行して AP-1 と協調して T 細胞活性化に関わる遺伝子を誘導する(Clipstone *et al.*, 1992; Macian 2005)。長期間 TCR シグナルが持続すると、活性化 NFAT が核内で持続的に増加する一方で AP-1 が枯渇し、協調する AP-1 が欠落した NFAT が疲弊関連分子を誘導することで *Tex* への分化が促進される(Khan *et al.*, 2019; Martinez *et al.*, 2015; Sen *et al.*, 2016)。

CNI は主に NFAT の核内移行を阻害することから、ドナーT細胞の活性化と疲弊の両方を抑制することが示唆されていた(Flanagan *et al.*, 1991; Wherry *et al.*, 2015)。我々の検討において、allo-HCT 後の CNI 投与下ではドナーT細胞が terminal-*Tex* への分化が抑制されると同時に、Ly6C+CX3CR1+*Tex* への分化が促進されることが示された。CX3CR1+ *Tex* は慢性感染モデルで報告されており、intermediate (transitory) *Tex* とキラー細胞レクチン様受容体発現型 *Tex* (*TexKLR*) の2つの異なるサブセットによって構成される(Daniel *et al.*, 2022)。*TexKLR* は terminal-*Tex* とは異なる *Tex* 分化のもう一つの終点であり、intermediate (transitory) *Tex* は、terminal-*Tex* と *TexKLR* の前駆体であることが trajectory analysis により示されている(Daniel *et al.*, 2022)。今回、我々の検討では、CNI 投与によって誘導された Ly6C+CX3CR1+ドナーT細胞は Ly6C-CX3CR1^{low}TOX^{high} terminal-*Tex* への分化能を示し、かつこれらの細胞が養子免疫後に自己複製したことから、Ly6C+CX3CR1+T細胞は最終的な分化細胞ではなく、分化の過程にある細胞であることが示された。従って、我々はこれらの細胞を transitory-*Tex*-CNI と命名した。Transitory-*Tex*-CNI は、養子免疫モデルにおいて慢性 GVHD を誘導し、また移植再発モデルにおいて PD-1 阻害に反応して GVL 効果を増強した。これらの結果は、CNI によって慢性 GVHD が抑制できない原因の一つを明らかにするとともに、allo-HCT 後の免疫チェックポイント阻害薬による GVL 効果の増強を安全かつ効率的に行う可能性を示唆するものである。過去には、MHC 一致 HCT 後に出現したドナー由来の CD44^{low}CD62L^{high}T細胞が、mSca-1 や CD122 などの stem cell marker を発現し、養子免疫後に 2ndレシピエントマウスにおいて急性 GVHD 様の病態を呈す

ることが示されている (Zhang *et al*, 2005)。今回我々が発見した transitory-*Tex*-CNI は CD44^{high}CD62L^{low} で stem cell marker を発現せず、また養子免疫後に急性 GVHD ではなく慢性 GVHD を誘導したことから、stem cell-like memory T 細胞とは異なる表現型と機能を示す、CNI 投与によって誘導された特異的な細胞集団であることが考えられた。

CNI 投与による transitory-*Tex*-CNI の誘導が、NFAT 阻害によって引き起こされるかどうかを検討するために、他の免疫抑制剤を用いた検討を行なったところ、イブルチニブのみがイブルチニブが CSP と同様に allo-HCT 後に transitory-*Tex*-CNI を誘導した。イブルチニブは BTK 阻害と同時に ITK 阻害作用が報告されており、さらに ITK 阻害は TCR 刺激後の NFAT 核内移行を抑制することが知られている。今回、CSP とイブルチニブのみが transitory-*Tex*-CNI を誘導したことから、transitory-*Tex*-CNI の分化における NFAT 阻害の重要性がさらに確認された (Vaeth *et al*, 2015; Sieber *et al*, 2009; Gallagher *et al*, 2021)。

T 細胞の疲弊の分子および細胞メカニズムは主に CD8⁺ T 細胞で研究されてきたが、CD4⁺T 細胞に関しても慢性抗原刺激によって機能的に疲弊した CD4⁺PD-1⁺TOX⁺TCF1⁺ T 細胞が誘導されることを示す報告がある (Crawford *et al*, 2014; Sekine *et al*, 2020; Tracy *et al*, 2022)。最近の研究では、ナイーブ CD4 T 細胞が、ウイルス慢性感染モデルにおいて PD-1⁺TCF1⁺BCL6⁺前駆 CD4⁺ T 細胞に分化し、これらの前駆 CD4⁺ T 細胞は自己複製能をもち、さらに TCF-1-BCL6-エフェクター T 細胞と PD-1⁺TCF1⁺BCL6⁺濾胞性ヘルパー T 細胞といった二つの特徴ある細胞集団に最終的に分化することが示された (Xia *et al*, 2022)。Allo-HCT 後に機能的に疲弊したドナー CD4⁺T 細胞が存在するかどうかは不明であるが、我々の研究では、CD4⁺ T 細胞が PD-1 阻害に反応して増殖能の増強を示したことから、ドナー CD4⁺T 細胞も allo-HCT 後に疲弊に陥っていることが示唆された。

臨床において、transitory-*Tex* は有望な治療ターゲットであり、同種移植後の慢性 GVHD の発症、白血病の再発、免疫療法の有効性を予測するバイオマーカーとして機能する可能性がある。通常、allo-HCT においては CNI はドナー細胞の輸注時点から投与を開始するが、近年急速に広まりつつある移植後シクロホスファミド (PTCy) を用いた同種移植では、CNI の投与開始時期は医師または施設の方針によって異なって様々であること (Raiola *et al*, 2022; Luznik *et al*, 2008) から、CNI の投与開始タイミングと移植後の transitory-*Tex* の分化との関連性については今後の検討が望まれる。具体的には PTCy 移植においては CNI の開始が早ければ早いほど、

transitory-*Tex* が誘発され、慢性 GVHD の発症と関連する可能性がある。最近の報告で、PTCy が terminal-*Tex* を枯渇させるが、Tpex は温存させることが示されている (Minnie *et al.*, 2022)。CNI と PTCy と併用による腫瘍細胞存在下での T 細胞疲弊に与える影響については、今後の研究課題である。

全体として本研究では、allo-HCT 後の CNI 投与によってドナー T 細胞の terminal *Tex* への分化が阻害され、transitory-*Tex* が誘導されることで、免疫寛容誘導が阻害され慢性 GVHD の原因となることを示した。また、transitory-*Tex* が免疫チェックポイント阻害薬に対する高い反応性を保持することで GVL 効果の増強につながることから、移植後腫瘍再発に対する新たな治療戦略となる可能性がある。

総括および結論

1. 本研究にて以下の知見が得られた。

- ・同種造血幹細胞移植後の CNI 投与により、ドナーT 細胞の terminal-*Tex* への分化が抑制され、transitory-*Tex* への分化が誘導された。
- ・Transitory-*Tex* は養子免疫においてレシピエントに慢性 GVHD を誘導した。
- ・Transitory-*Tex* は PD-1 阻害に対する反応性を示し、増殖能および殺細胞能を増強することで GVL 効果を増強させた。

2. 新知見の意義

CNI は急性 GVHD の発症予防には有効であるが、慢性 GVHD の発症予防効果は不十分であり、その機序は不明であった。今回我々は 2C-TCR-Tg マウス、および scRNAseq を用いることで、CNI 投与によって同種造血幹細胞移植後のドナーT 細胞の terminal-*Tex* への分化が阻害され、transitory-*Tex* への分化が誘導されることを初めて報告した。また、Transitory-*Tex* が養子免疫によって慢性 GVHD を誘導することを示し、CNI による慢性 GVHD の予防効果が限定的である機序の一つを明らかにした。さらに、transitory-*Tex* が、同種造血幹細胞移植後の免疫チェックポイント阻害薬による GVL 効果の増強に重要な役割を果たしていることを示し、移植後再発に対する有効かつ安全な治療戦略となりうることを示した。

CNI が T 細胞疲弊を抑制することは報告されていたが、CNI が transitory-*Tex* を誘導するというのは全く新しい知見であり、免疫学的にも重要な発見である。こうした知見は、造血幹細胞移植領域以外にも、臓器移植や自己免疫性疾患における CNI の免疫学的な影響を検討する上でも重要なものである。

3. 今後の研究展開

今回我々は CNI を含める複数の免疫抑制剤についてドナーT 細胞疲弊に対する影響を検討し、CNI とイブルチニブが transitory-*Tex* を誘導することを示したが、近年新たな GVHD 予防法である移植後シクロフォスファミド(PTCy)の有効性が報告されており、PTCy と CNI を組み合わせた GVHD 予防によるドナーT 細胞疲弊に対する影響についても、検討が必要である。

また今回の検討はマウス同種移植モデルで行ったが、今回の結果をもとに、同種移植を施行された患者検体を用いて、免疫抑制剤とドナーT 細胞疲弊の関連を評価することで、慢性 GVHD の発症リスクや、免疫チェックポイント阻害薬による GVL 増強効果を予測するためのバイオマーカーとなりうるかを検討する。

謝辞

北海道大学大学院 医学研究院内科学系部門内科学分野 血液内科教室
豊嶋崇徳教授、橋本大吾准教授、荒隆英助教、大東寛幸助教、長谷川祐太特任助教、
菊池遼先生、原田晋平先生、岡田怜先生、陳炫仲先生、張紫璇先生

北海道大学大学院医学院 遺伝子病制御研究所 分子神経免疫学分野
村上正晃先生、久保田晋平先生、田中勇希先生

公益財団法人かずさ DNA 研究所 ゲノム事業推進部
長谷川嘉則先生

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Anasetti, C., Logan, B.R., Lee, S.J., Waller, E.K., Weisdorf, D.J., Wingard, J.R., Cutler, C.S., Westervelt, P., Woolfrey, A., Couban, S., et al. (2012). Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *The New England journal of medicine* *367*, 1487-1496.

Asakura, S., Hashimoto, D., Takashima, S., Sugiyama, H., Maeda, Y., Akashi, K., Tanimoto, M., and Teshima, T. (2010). Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces graft-versus-leukemia effects in mice. *The Journal of clinical investigation* *120*, 2370-2378.

Belk, J.A., Daniel, B., and Satpathy, A.T. (2022). Epigenetic regulation of T cell exhaustion. *Nature immunology* *23*, 848-860.

Beltra, J.C., Manne, S., Abdel-Hakeem, M.S., Kurachi, M., Giles, J.R., Chen, Z., Casella, V., Ngiow, S.F., Khan, O., Huang, Y.J., et al. (2020). Developmental Relationships of Four Exhausted CD8(+) T Cell Subsets Reveals Underlying Transcriptional and Epigenetic Landscape Control Mechanisms. *Immunity* *52*, 825-841.

Bengsch, B., Johnson, A.L., Kurachi, M., Odorizzi, P.M., Pauken, K.E., Attanasio, J., Stelekati, E., McLane, L.M., Paley, M.A., Delgoffe, G.M., and Wherry, E.J. (2016). Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity* *45*, 358-373.

Blattman JN, Grayson JM, Wherry EJ, Kaech SM, Smith KA, Ahmed R. (2003). Therapeutic use of IL-2 to enhance antiviral T-cell responses in vivo. *Nat Med.* *9*, 540-7.

Blazar, B.R., Carreno, B.M., Panoskaltis-Mortari, A., Carter, L., Iwai, Y., Yagita, H., Nishimura, H., and Taylor, P.A. (2003). Blockade of programmed death-1 engagement

accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-gamma-dependent mechanism. *Journal of immunology* *171*, 1272-1277.

Burger, M.L., Cruz, A.M., Crossland, G.E., Gaglia, G., Ritch, C.C., Blatt, S.E., Bhutkar, A., Canner, D., Kienka, T., Tavana, S.Z., et al. (2021). Antigen dominance hierarchies shape TCF1(+) progenitor CD8 T cell phenotypes in tumors. *Cell* *184*, 4996-5014.

Carpenter, P.A., Logan, B.R., Lee, S.J., Weisdorf, D.J., Johnston, L., Costa, L.J., Kitko, C.L., Bolanos-Meade, J., Sarantopoulos, S., Alousi, A.M., et al. (2018). A phase II/III randomized, multicenter trial of prednisone/sirolimus versus prednisone/sirolimus/calcineurin inhibitor for the treatment of chronic graft-versus-host disease: BMT CTN 0801. *Haematologica* *103*, 1915-1924.

Clipstone, N.A., and Crabtree, G.R. (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* *357*, 695-697.

Cooke, K.R., Kobzik, L., Martin, T.R., Brewer, J., Delmonte, J., Jr., Crawford, J.M., and Ferrara, J.L. (1996). An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* *88*, 3230-3239.

Crawford, A., Angelosanto, J.M., Kao, C., Doering, T.A., Odorizzi, P.M., Barnett, B.E., and Wherry, E.J. (2014). Molecular and transcriptional basis of CD4(+) T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* *40*, 289-302.

Daniel, B., Yost, K.E., Hsiung, S., Sandor, K., Xia, Y., Qi, Y., Hiam-Galvez, K.J., Black, M., C, J.R., Shi, Q., et al. (2022). Divergent clonal differentiation trajectories of T cell exhaustion. *Nature immunology* *23*, 1614-1627.

Dubovsky, J.A., Flynn, R., Du, J., Harrington, B.K., Zhong, Y., Kaffenberger, B., Yang, C., Towns, W.H., Lehman, A., Johnson, A.J., et al. (2014). Ibrutinib treatment ameliorates murine chronic graft-versus-host disease. *The Journal of clinical investigation* *124*, 4867-4876.

Eisenstein, M. (2020). Single-cell RNA-seq analysis software providers scramble to offer solutions. *Nature biotechnology* *38*, 254-257.

Flanagan, W.M., Corthesy, B., Bram, R.J., and Crabtree, G.R. (1991). Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* *352*, 803-807.

Flutter, B., Edwards, N., Fallah-Arani, F., Henderson, S., Chai, J.G., Sivakumaran, S., Ghorashian, S., Bennett, C.L., Freeman, G.J., Sykes, M., and Chakraverty, R. (2010). Nonhematopoietic antigen blocks memory programming of alloreactive CD8+ T cells and drives their eventual exhaustion in mouse models of bone marrow transplantation. *The Journal of clinical investigation* *120*, 3855-3868.

Gallagher, M.P., Conley, J.M., Vangala, P., Garber, M., Reboldi, A., and Berg, L.J. (2021). Hierarchy of signaling thresholds downstream of the T cell receptor and the Tec kinase ITK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *118*, e2025826118.

He R, Hou S, Liu C, Zhang A, Bai Q, Han M, Yang Y, Wei G, Shen T, Yang X, Xu L, Chen X, Hao Y, Wang P, Zhu C, Ou J, Liang H, Ni T, Zhang X, Zhou X, Deng K, Chen Y, Luo Y, Xu J, Qi H, Wu Y, Ye L. (2016). Follicular CXCR5- expressing CD8(+) T cells curtail chronic viral infection. *Nature* *537*, 412-428.

Herbaux, C., Merryman, R., Devine, S., Armand, P., Houot, R., Morschhauser, F., and Haverkos, B. (2018). Recommendations for managing PD-1 blockade in the context of allogeneic HCT in Hodgkin lymphoma: taming a necessary evil. *Blood* *132*, 9-16.

Hermann-Kleiter N, Baier G. (2010). NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions. *Blood* *115*, 2989-97.

Herrero-Sánchez MC, Rodríguez-Serrano C, Almeida J, San Segundo L, Inogés S, Santos-Briz Á, García-Briñón J, Corchete LA, San Miguel JF, Del Cañizo C, Blanco B. (2016). Targeting of PI3K/AKT/mTOR pathway to inhibit T cell activation and prevent graft-versus-host disease development. *J Hematol Oncol.* *9*, 113.

Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44-57.

Hudson, W.H., Gensheimer, J., Hashimoto, M., Wieland, A., Valanparambil, R.M., Li, P., Lin, J.X., Konieczny, B.T., Im, S.J., Freeman, G.J., et al. (2019). Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1(+) Stem-like CD8(+) T Cells during Chronic Infection. *Immunity* 51, 1043-1058.

Im, S.J., Hashimoto, M., Gerner, M.Y., Lee, J., Kissick, H.T., Burger, M.C., Shan, Q., Hale, J.S., Lee, J., Nasti, T.H., et al. (2016). Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature* 537, 417-421.

Ito, A., Kim, S.W., and Fukuda, T. (2022). Anti-programmed cell death-1 monoclonal antibody therapy before or after allogeneic hematopoietic cell transplantation for classic Hodgkin lymphoma: a literature review. *International journal of hematology* 116, 309-314.

Khan, O., Giles, J.R., McDonald, S., Manne, S., Ngiow, S.F., Patel, K.P., Werner, M.T., Huang, A.C., Alexander, K.A., Wu, J.E., et al. (2019). TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8(+) T cell exhaustion. *Nature* 571, 211-218.

Kohler, N., Ruess, D.A., Kesselring, R., and Zeiser, R. (2021). The Role of Immune Checkpoint Molecules for Relapse After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol* 12, 634435.

Lee, S.J. (2010). Have we made progress in the management of chronic graft-vs-host disease? *Best Pract Res Clin Haematol* 23, 529-535.

Liu, L., Chang, Y.J., Xu, L.P., Zhang, X.H., Wang, Y., Liu, K.Y., and Huang, X.J. (2018). T cell exhaustion characterized by compromised MHC class I and II restricted cytotoxic activity associates with acute B lymphoblastic leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol* 190, 32-40.

Luznik, L., O'Donnell, P.V., Symons, H.J., Chen, A.R., Leffell, M.S., Zahurak, M., Gooley, T.A., Piantadosi, S., Kaup, M., Ambinder, R.F., et al. (2008). HLA-

haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* *14*, 641-650.

Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol.* *5*, 472-484.

Martinez, G.J., Pereira, R.M., Aijo, T., Kim, E.Y., Marangoni, F., Pipkin, M.E., Togher, S., Heissmeyer, V., Zhang, Y.C., Crotty, S., et al. (2015). The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells. *Immunity* *42*, 265-278.

Minnie SA, Waltner OG, Ensbey KS, Nemychenkov NS, Schmidt CR, Bhise SS, Legg SRW, Campoy G, Samson LD, Kuns RD, Zhou T, Huck JD, Vuckovic S, Zamora D, Yeh A, Spencer A, Koyama M, Markey KA, Lane SW, Boeckh M, Ring AM, Furlan SN, Hill GR. (2022). Depletion of exhausted alloreactive T cells enables targeting of stem-like memory T cells to generate tumor-specific immunity. *Sci Immunol.* *7*, e3420.

Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M., and Verma, I.M. (1996). The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* *70*, 5701-5705.

Noviello, M., Manfredi, F., Ruggiero, E., Perini, T., Oliveira, G., Cortesi, F., De Simone, P., Toffalori, C., Gambacorta, V., Greco, R., et al. (2019). Bone marrow central memory and memory stem T-cell exhaustion in AML patients relapsing after HSCT. *Nat Commun* *10*, 1065.

Otsuka, S., Melis, N., Gaida, M.M., Dutta, D., Weigert, R., and Ashwell, J.D. (2021). Calcineurin inhibitors suppress acute graft-versus-host disease via NFAT-independent inhibition of T cell receptor signaling. *The Journal of clinical investigation* *131*, e147683.

Pauken, K.E., Sammons, M.A., Odorizzi, P.M., Manne, S., Godec, J., Khan, O., Drake, A.M., Chen, Z., Sen, D.R., Kurachi, M., et al. (2016). Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* *354*, 1160-1165.

Qadir M, O'Loughlin KL, Fricke SM, Williamson NA, Greco WR, Minderman H, Baer MR. (2005). Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. *Clin Cancer Res.*11, 2320-6.

Raiola AM, Angelucci E, Sica S, Bacigalupo A.(2022). Haploidentical bone marrow transplants with posttransplant cyclophosphamide on day + 3 + 5: The Genova protocol. *Blood Rev.* 101031.

Sade-Feldman, M., Yizhak, K., Bjorgaard, S.L., Ray, J.P., de Boer, C.G., Jenkins, R.W., Lieb, D.J., Chen, J.H., Frederick, D.T., Barzily-Rokni, M., et al. (2018). Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell* 175, 998-1013.

Sakoda, Y., Hashimoto, D., Asakura, S., Takeuchi, K., Harada, M., Tanimoto, M., and Teshima, T. (2007). Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* 109, 1756-1764.

Satake, A., Schmidt, A.M., Nomura, S., and Kambayashi, T. (2014). Inhibition of Calcineurin Abrogates While Inhibition of mTOR Promotes Regulatory T Cell Expansion and Graft-Versus-Host Disease Protection by IL-2 in Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *PloS one* 9, e92888.

Scharping, N.E., Menk, A.V., Moreci, R.S., Whetstone, R.D., Dadey, R.E., Watkins, S.C., Ferris, R.L., and Delgoffe, G.M. (2016). The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity* 45, 374-388.

Schutt, S.D., Fu, J., Nguyen, H., Bastian, D., Heinrichs, J., Wu, Y., Liu, C., McDonald, D.G., Pidala, J., and Yu, X.Z. (2015). Inhibition of BTK and ITK with Ibrutinib Is Effective in the Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease in Mice. *PloS one* 10, e0137641.

Sekine, T., Perez-Potti, A., Nguyen, S., Gorin, J.B., Wu, V.H., Gostick, E., Llewellyn-Lacey, S., Hammer, Q., Falck-Jones, S., Vangeti, S., et al. (2020). TOX is expressed by

exhausted and polyfunctional human effector memory CD8(+) T cells. *Sci Immunol.* *5*, eaba7918.

Sen, D.R., Kaminski, J., Barnitz, R.A., Kurachi, M., Gerdemann, U., Yates, K.B., Tsao, H.W., Godec, J., LaFleur, M.W., Brown, F.D., et al. (2016). The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science* *354*, 1165-1169.

Seo, H., Chen, J., Gonzalez-Avalos, E., Samaniego-Castruita, D., Das, A., Wang, Y.H., Lopez-Moyado, I.F., Georges, R.O., Zhang, W., Onodera, A., et al. (2019). TOX and TOX2 transcription factors cooperate with NR4A transcription factors to impose CD8(+) T cell exhaustion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *116*, 12410-12415.

Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY. (1988). Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature.* *335*, 271-4.

Sherman, B.T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M.W., Lane, H.C., Imamichi, T., and Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res.* *50*, W216-W221.

Siddiqui, I., Schaeuble, K., Chennupati, V., Fuertes Marraco, S.A., Calderon-Copete, S., Pais Ferreira, D., Carmona, S.J., Scarpellino, L., Gfeller, D., Pradervand, S., et al. (2019). Intratumoral Tcf1(+)PD-1(+)CD8(+) T Cells with Stem-like Properties Promote Tumor Control in Response to Vaccination and Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Immunity* *50*, 195-211.

Sieber, M., and Baumgrass, R. (2009). Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506? *Cell Commun Signal.* *7*, 25.

Sorrer, M.L., Leisenring, W., Deeg, H.J., Martin, P.J., and Storb, R. (2005). Twenty-year follow-up of a controlled trial comparing a combination of methotrexate plus cyclosporine with cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients administered HLA-identical marrow grafts for leukemia. *Biology of blood and*

marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation 11, 814-815.

Sugiyama, H., Maeda, Y., Nishimori, H., Yamasuji, Y., Matsuoka, K., Fujii, N., Kondo, E., Shinagawa, K., Tanaka, T., Takeuchi, K., et al. (2014). Mammalian target of rapamycin inhibitors permit regulatory T cell reconstitution and inhibit experimental chronic graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 20, 183-191.

Takahashi, S., Hashimoto, D., Hayase, E., Ogasawara, R., Ohigashi, H., Ara, T., Yokoyama, E., Ebata, K., Matsuoka, S., Hill, G.R., et al. (2018). Ruxolitinib protects skin stem cells and maintains skin homeostasis in murine graft-versus-host disease. *Blood* 131, 2074-2085.

Toffalori, C., Zito, L., Gambacorta, V., Riba, M., Oliveira, G., Bucci, G., Barcella, M., Spinelli, O., Greco, R., Crucitti, L., et al. (2019). Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation. *Nature medicine* 25, 603-611.

Toubai, T., Sun, Y., Tawara, I., Friedman, A., Liu, C., Evers, R., Nieves, E., Malter, C., Chockley, P., Maillard, I., et al. (2011). Ikaros-Notch axis in host hematopoietic cells regulates experimental graft-versus-host disease. *Blood* 118, 192-204.

Tracy, S.I., Venkatesh, H., Hekim, C., Heltemes-Harris, L.M., Knutson, T.P., Bachanova, V., and Farrar, M.A. (2022). Combining nilotinib and PD-L1 blockade reverses CD4+ T-cell dysfunction and prevents relapse in acute B-cell leukemia. *Blood* 140, 335-348.

Tsushima, F., Iwai, H., Otsuki, N., Abe, M., Hirose, S., Yamazaki, T., Akiba, H., Yagita, H., Takahashi, Y., Omura, K., et al. (2003). Preferential contribution of B7-H1 to programmed death-1-mediated regulation of hapten-specific allergic inflammatory responses. *Eur J Immunol* 33, 2773-2782.

Utzschneider, D.T., Charmoy, M., Chennupati, V., Pousse, L., Ferreira, D.P., Calderon-Copete, S., Danilo, M., Alfei, F., Hofmann, M., Wieland, D., et al. (2016). T

Cell Factor 1-Expressing Memory-like CD8(+) T Cells Sustain the Immune Response to Chronic Viral Infections. *Immunity* *45*, 415-427.

Utzschneider, D.T., Gabriel, S.S., Chisanga, D., Gloury, R., Gubser, P.M., Vasanthakumar, A., Shi, W., and Kallies, A. (2020). Early precursor T cells establish and propagate T cell exhaustion in chronic infection. *Nature immunology* *21*, 1256-1266.

Vaeth, M., Bauerlein, C.A., Pusch, T., Findeis, J., Chopra, M., Mottok, A., Rosenwald, A., Beilhack, A., and Berberich-Siebelt, F. (2015). Selective NFAT targeting in T cells ameliorates GvHD while maintaining antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, 1125-1130.

Vaeth, M., Maus, M., Klein-Hessling, S., Freinkman, E., Yang, J., Eckstein, M., Cameron, S., Turvey, S.E., Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., et al. (2017). Store-Operated Ca(2+) Entry Controls Clonal Expansion of T Cells through Metabolic Reprogramming. *Immunity* *47*, 664-679.

Verma, V., Jafarzadeh, N., Boi, S., Kundu, S., Jiang, Z., Fan, Y., Lopez, J., Nandre, R., Zeng, P., Alolaqi, F., et al. (2021). MEK inhibition reprograms CD8(+) T lymphocytes into memory stem cells with potent antitumor effects. *Nature immunology* *22*, 53-66.

West EE, Jin HT, Rasheed AU, Penalzoza-Macmaster P, Ha SJ, Tan WG, Youngblood B, Freeman GJ, Smith KA, Ahmed R. (2013). PD-L1 blockade synergizes with IL-2 therapy in reinvigorating exhausted T cells. *J Clin Invest.* *123*, 2604-15.

Wherry, E.J., and Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* *15*, 486-499.

Whitehouse, G., Gray, E., Mastoridis, S., Merritt, E., Kodela, E., Yang, J.H.M., Danger, R., Mairal, M., Christakoudi, S., Lozano, J.J., et al. (2017). IL-2 therapy restores regulatory T-cell dysfunction induced by calcineurin inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *114*, 7083-7088.

Wingard, J.R., Majhail, N.S., Brazauskas, R., Wang, Z., Sobocinski, K.A., Jacobsohn, D., Sorrow, M.L., Horowitz, M.M., Bolwell, B., Rizzo, J.D., and Socie, G. (2011). Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* *29*, 2230-2239.

Wu, T., Ji, Y., Moseman, E.A., Xu, H.C., Manglani, M., Kirby, M., Anderson, S.M., Handon, R., Kenyon, E., Elkahlon, A., et al. (2016). The TCF1-Bcl6 axis counteracts type I interferon to repress exhaustion and maintain T cell stemness. *Sci Immunol* *1*, eaai8593.

Wu TD, Madireddi S, de Almeida PE, et al. (2020). Peripheral T cell expansion predicts tumour infiltration and clinical response. *Nature* *579*, 274-278.

Xia, Y., Sandor, K., Pai, J.A., Daniel, B., Raju, S., Wu, R., Hsiung, S., Qi, Y., Yangdon, T., Okamoto, M., et al. (2022). BCL6-dependent TCF-1(+) progenitor cells maintain effector and helper CD4(+) T cell responses to persistent antigen. *Immunity* *55*, 1200-1215.

Yu A, Malek TR. (2006). Selective availability of IL-2 is a major determinant controlling the production of CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* *177*, 5115-5121.

Zeiser, R., and Blazar, B.R. (2017). Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *N Engl J Med* *377*, 2565-2579.

Zeiser, R., Polverelli, N., Ram, R., Hashmi, S.K., Chakraverty, R., Middeke, J.M., Musso, M., Giebel, S., Uzay, A., Langmuir, P., et al. (2021). Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Chronic Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med* *385*, 228-238.

Zehn, D., Thimme, R., Lugli, E., de Almeida, G.P., and Oxenius, A. (2022). 'Stem-like' precursors are the fount to sustain persistent CD8(+) T cell responses. *Nature immunology* *23*, 836-847.

Zhang Y, Joe G, Hexner E, Zhu J, Emerson SG.(2005). Host-reactive CD8+ memory stem cells in graft-versus-host disease. *Nat Med* *11*, 1299-305.

Zhang, Z., Hasegawa, Y., Hashimoto, D., Senjo, H., Kikuchi, R., Chen, X., Yoneda, K., Sekiguchi, T., Kawase, T., Tsuzuki, H., et al. (2022). Gilteritinib enhances graft-versus-leukemia effects against FLT3-ITD mutant leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* *57*, 775-780.

Zhou, M., Sacirbegovic, F., Zhao, K., Rosenberger, S., and Shlomchik, W.D. (2020). T cell exhaustion and a failure in antigen presentation drive resistance to the graft-versus-leukemia effect. *Nat Commun* *11*, 4227.