



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on inhibitory interaction between graft-derived and reconstituted T cells involves murine chronic graft-versus-host disease [an abstract of entire text]
Author(s)	小杉, 瑞葉
Description	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：2147 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11665号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59096
Type	doctoral thesis
File Information	Mizuha_Kosugi_summary.pdf



学位論文（要約）

Studies on inhibitory interaction between graft-derived
and reconstituted T cells involves murine chronic
graft-versus-host disease

（慢性移植片対宿主病における移植片由来および再構築由来
T細胞の相互作用に関する研究）

2015 年 3 月

北海道大学

小杉 瑞葉

【緒言】

造血幹細胞移植は造血器腫瘍や骨髄不全の患者において治癒を望める治療法であり、近年移植施行数は増加傾向にある。同種造血幹細胞移植は、大量化学療法による残存病変の根絶および同種免疫による抗腫瘍効果を狙った治療であるが、これらの効果と表裏一体として現れる同種免疫による合併症である、移植片対宿主病 (graft-versus host disease: GVHD) の克服が大きな課題となっている。GVHD は発症時期によって急性、慢性に二分される。

慢性 GVHD は、多臓器に渡る自己免疫疾患に類似した病態を見せるが、その病態は未だ不明な点が多い。慢性 GVHD の免疫学的病態基盤において、病原性 T 細胞の動態の理解が必要である。移植後慢性期におけるドナー由来同種 T 細胞は 2 種類に大別される。ひとつは、移植片に含まれる成熟 T 細胞 (T_G) と、移植された造血幹細胞が胸腺で新規に再構築された T 細胞 (T_{HSC}) がある。複数のマウスモデルによって、 T_{HSC} の慢性 GVHD への寄与が示されている。急性 GVHD によって障害を受けた胸腺でネガティブセレクションを経た T_{HSC} が病原性を有し、慢性期における病態形成に関与すると考えられている。しかし、臨床的には加齢とともに胸腺機能の回復が障害され、 T_{HSC} の供給が低下、遅延するとされる。さらに、慢性 GVHD 誘導マウスモデルにおいては T_{HSC} の供給が抑制された条件下では、 T_G が慢性期以降にわたって遷延化していることが示されている。このことは慢性 GVHD の病態形成に T_{HSC} のみならず T_G の寄与も考慮すべきであることを示している。しかし、慢性 GVHD においては、通常の T 細胞動態と逸脱した動態を呈している可能性が示唆されており、遷延化した T_G における exhaustion や replicative senescence などの機能低下や、胸腺機能障害による T_{HSC} の供給低下が考慮される。本研究では、慢性 GVHD の組織学的変化を満たすマウスモデルの解析から、慢性期における遷延化した T_G および T_{HSC} の詳細な特性を明らかにし、さらに T_G および T_{HSC} の選択的除去によって遷延化した T_G が T_{HSC} の増殖を抑制し、さらには T_G の致死的な悪化を T_{HSC} が抑制しているという相互的な病態への関与を示した。

【実験方法】

ドナーに C57BL/6 (B6; K^bD^bI-AbI-Eb, CD45.2⁺) マウス、レシピエントに C3H.Sw (C3H; K^bD^bI-AbI-Eb, CD45.2⁺) マウス (週数は 6~12 週齢の範囲でドナー、レシピエント間で一致) を用い、GVHD 誘導群には脾臓由来の $3-4 \times 10^6$ T 細胞および T 細胞除去した 5×10^6 の骨髓細胞を、コントロールとしての BMT 群には T 細胞除去した骨髓細胞のみを尾静注し、minor 抗原不適合移植モデルとして使用した。レシピエントマウスは移植前日に 9Gy の全身放射線照射を 2 分割で施行した。また、 T_G 、 T_{HSC} 選択的除去は、抗マウス Thy1.2 抗体を移植後 21 日、24 日ならびに 31 日後より 1 週おきに 63 日後まで継続して腹腔内投与を行い、99% 以上の標的 T 細胞除去効率を確認している。慢性 GVHD 標的臓器である肝臓、肺、唾液腺は還流後に、また皮膚は脱毛処理を加えた後に摘出した。摘出臓器は 4% パラホルムアルデヒドで固定の後、パラフィンを浸透した。薄切切片とし、ヘマトキシリンエオシン染色を施行し、観察を行った。また、フローサイトメトリーを用いた細胞学的解析では、骨髓細胞を大腿骨よりシリンジで回収し、脾臓や胸腺はストレーナーを用いて細胞懸濁液として回収した。また標的臓器である肝臓はステンレススチールメッシュを用いて回収し、肺は 0.2% コラゲナーゼおよび DNase を用いて細胞懸濁液を回収した。これらは、40% Percoll を用いて死細胞や非血液細胞を除去した後 ACK lysing バッファーを用いて赤血球を除去し、フローサイトメトリーによる解析を行った。

【実験結果】

cGVHD 誘導マウスでは、移植後 63 日にて唾液腺、皮膚、肝臓および肺において、線維化を

中心とする病理学的変化を認め、ヒトの cGVHD に類似した病態が再現されたことを確認した。移植後 63 日の標的臓器において、cGVHD 誘導マウスでは BMT 群と比べ、著明なドナー T 細胞浸潤と集積を認めた。次に、CD45.1/CD45.2 コンジェニックマウスをドナーに用いて T_{HSC} 再構築を評価したところ、cGVHD 誘導マウスでは BMT 群に比べ、胸腺における $CD4^+CD8^+$ double positive 細胞数の著明な減少と、再構築の遅延を認めた。さらに標的臓器およびリンパ組織における T_G および T_{HSC} の浸潤を時間推移に基づき評価したところ、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 細胞いずれにおいても一貫して T_G が優位であり、さらにその差は $CD8^+$ T 細胞で顕著であることから、 T_G の cGVHD 病態誘導への関与が強く示唆された。これは、 T_G によって標的臓器内への T 細胞浸潤が形成され、そこへ再構築された T_{HSC} が徐々に浸潤し長期に渡る T 細胞プールを形成していることを示している。また、慢性期まで遷延化した T_G の機能を評価したところ、 $CD8^+$ T_G は、exhaustion を示す PD-1⁺ 集団や terminal differentiation を示す KLRG-1⁺ 集団を多数が占めているのにも関わらず、 T_G は T_{HSC} に比べ、BrdU 標識増殖細胞や IFN γ および TNF α 産生細胞が有意に多くみられた。 T_G は慢性期にわたって炎症性サイトカイン産生能や増殖能を維持し、また、遷延化した T_G は T_{HSC} に比べ標的臓器におけるエフェクター T 細胞の供給源として優位であることが示された。遷延化した T_G および新規に供給された T_{HSC} の cGVHD 病態形成への寄与を評価するため、抗 Thy1.2 抗体を用いて各々の選択的除去を行った。選択的 T_G 除去では、生存および組織学的変化のいずれにおいても cGVHD の誘導を防げなかった。標的臓器では T_{HSC} の増加を認め、その増加は T_G の除去分の補完的な増殖と活性化により支持されていた。一方、選択的 T_{HSC} 除去では、 T_G の増殖による数的補完は見られないものの除去後に急激な GVHD の悪化を認め全例早期に死亡した。この現象は、 T_G および T_{HSC} の両者を除去した群では認められないため、 T_{HSC} の除去により T_G が残存することが致死性であり、数的に少数である T_{HSC} が T_G の傷害活性の発現を防ぐのに重要な役割を果たしていることが示唆された。 T_G 、 T_{HSC} 各々の選択的除去より、標的臓器内の T 細胞プールにおいて、相互的な抑制機構があることが示された。

【考察】

移植後慢性期には T_G 、 T_{HSC} の両者が存在しており、両者の慢性 GVHD への病態形成の寄与の評価が重要であったが、両者に対し選択的に介入しうるマウスモデルの不足から、その評価が困難であった。我々は、ヒトにおける慢性 GVHD の病態および発展様式に類似したマウスモデルを確立し、病原性を維持した T_G が T_{HSC} より数的、質的に優位に長期間に渡り標的臓器に浸潤していることを示した。 T_G は、KLRG-1⁺PD-1⁺で示される細胞傷害活性を保持していることが示唆された。さらに、各々の T 細胞の選択的除去により、 T_G と T_{HSC} の間の相互的な制御作用、すなわち T_G は標的臓器内で T_{HSC} の増殖と集積を抑制する一方で、 T_{HSC} は強い障害活性を有する T_G の活性化を抑制し GVHD の悪化を抑制していることが示された。さらに、これらの T_G および T_{HSC} における補完的な相互作用は、病原性 T 細胞の数的維持を担う抗原刺激や生存を担う因子を供給する pathogenic T cell niche を形成し、niche 内での総合的な競合によって、病態形成に寄与していることが示唆される。この T_G 、 T_{HSC} 間で見られる相互的な抑制機構を支持する分子学的メカニズムを明らかにしていくことで、慢性 GVHD の予防、治療の新規標的が明らかになり得る可能性が期待される。

【総括】

慢性 GVHD への病態形成の理解のためには T_G 、 T_{HSC} 両者の評価が重要と考えられたが、両 T 細胞への選択的な介入はなされてこなかった。我々は、慢性 GVHD の病態や発展様式に類似するマウスモデルを用い、慢性 GVHD の標的臓器において T_G が T_{HSC} が遷延して浸潤していることを示した。また、慢性期においても病原性を維持した T_G が T_{HSC} より数的、質的に優

位であることが示された。 T_G , T_{HSC} の選択的除去により、標的臓器内での相互的な制御作用、すなわち T_G は T_{HSC} の増殖と集積を抑制する一方で、 T_{HSC} は強い傷害活性を有する T_G の活性化を抑制することが示された。移植後慢性期にわたる長期間の間、 T_G は数的かつ機能的に維持されており、標的臓器内における T 細胞プールの形成に寄与していることを明らかにした。さらに、 T_G によって長期にわたって維持された T 細胞プール内には、徐々に再構築された T_{HSC} の集積を認めた。標的臓器内に形成された T 細胞プール内では浸潤した T_G および T_{HSC} それぞれの間での抑制的な相互作用がみられ、数的もしくは機能的にバランスを取りながら病態の維持に関与していることが示された。