HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	急性移植片対宿主病における免疫活性化受容体DNAM-1とCD155の相互作用に関する研究［全文の要約］
Author(s)	金谷, 穣
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：2200 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12096号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61769
Type	doctoral thesis
File Information	Minoru_Kanaya_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

急性移植片対宿主病における免疫活性化受容体 DNAM-1 と CD155 の相互作用に関する研究

(Studies on interaction between immune activating receptor DNAM-1 and CD155 in the development of acute graft-versus-host disease)

2016 年 3 月

北海道大学

金谷穣

目次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・1頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9頁

第一章

可溶型DNAM-1は急性GVHD発症予測バイオマーカーである

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19頁

第二章

レシピエントのCD155はT細胞を制御することで急性GVHDを抑制する

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・21頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・24頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25頁

総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・28頁

発表論文および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表し、現在投稿中である。

1. Minoru Kanaya, Kazuko Shibuya, Rei Hirochika, Yukiko Cho, Hiroshi Kojima, Yoko Asai, Masafumi Okada, Yukiko Wagatsuma, Takanori Teshima, Masahiro Imamura, Hisashi Sakamaki and Akira Shibuya

   Soluble DNAM-1 as a predictive acute GVHD biomarker

   Bone Marrow Transplantation

   投稿中

本研究の一部は以下の学会に発表した。

2. 金谷　穣、渋谷和子、阿部史枝、豊嶋崇徳、渋谷彰

   CD155 regulates regulatory T cell population and attenuates acute graft-versus-host disease.

   日本血液学会（第76回総会）, 2014年10月31日～11月2日・大阪

3. Minoru Kanaya, Kazuko Shibuya, Fumie Abe, Takanori Teshima, Akira Shibuya

   CD155 regulates regulatory T cell population and attenuates acute graft-versus-host disease.

   2015 BMT Tandem Meetings

   11-15 February, 2015. San Diego, USA

緒言

同種造血幹細胞移植は（allogeneic hemetopoietic stem cell transplantation: Allo-HSCT）は、急性白血病に代表される高リスク造血器疾患に対する根治療法である[1, 2, 3]。Allo-HSCT は大量抗癌剤ならびに全身放射線照射をはじめとした移植前処置による抗腫瘍効果を狙うと同時に、移植片による同種免疫（移植片対白血病効果: graft-versus-leukemia effect, GVL）を利用することで、造血器悪性疾患の治癒を可能とする治療法であり、免疫療法の一つとして捉えることも可能である[1,2,3]。歴史的には、1979 年に非一卵性双生児の HLA 一致同胞をドナーとした同種移植は、一卵性双生児間移植と比較して、再発率が低いことが示され、GVL 存在が認められるようになった[4]。それと同時に、GVL 効果には組織適合性の相違が重要であることが示された[4]。また、T 細胞除去移植において、白血病再発率が高いことが確認され、GVL 効果は T 細胞依存的な反応であることが明らかになった[5]。このように、Allo-HSCT は、組織適合性の違いならびに T 細胞性免疫を利用した免疫を用いたがん治療の先駆け的な存在といえる。一方で、Allo-HSCT は、多くの合併症を伴うことも事実である。Allo-HSCT に伴う合併症のうち、急性移植片対宿主病（graft-versus-host disease: GVHD）は、最も重要な合併症の一つである[6]。急性 GVHD の病態生理においては、移植前処置による全身性の組織炎症により活性化した放射線抵抗性のレシピエント由来抗原提示細胞がドナーT 細胞へ allo 抗原を提示が重要であると考えられている[7]。活性化したドナーT 細胞は、細胞傷害性 T 細胞依存的な組織障害を起こすとともに、炎症性サイトカインを大量に産生することで、allo 反応の活性化が引き起こされる[8,9,10]。これらの反応は、allo-HSCT を行う上で、完全に避けることはできず、理論的にはかなり多くの症例で急性 GVHD が発症することが推測される。そのような背景から、急性 GVHD に対する予防法の開発が進められてきたが、現在の標準的予防法は、カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリン（cyclosporine A, CyA）またはタクロリムス（taclorimus, TAC）とメトトレキセート（methotrexate, MTX）の 2 剤併用療法である。なお、血縁者間および非血縁者間移植における CyA+MTX と、TAC+MTX の比較試験では、TAC 群で急性 GVHD の発症率は低下するものの、慢性 GVHD や生存率では有意差を認めないとされており、海外のみならず日本国内の臨床試験でも示されている[11,12,13.14]。このような予防を行ってもなお、急性 GVHD の発症率は 50-70%とする報告もあり[15]、その予防は十分とは言えない。また、急性 GVHD 全体のうち、grade III-IV の重症急性 GVHD の発症率は、10%弱であり、grade III-IV の急性 GVHD を発症した場合、非再発移植関連死亡をきたす確率は 50%程度とされ、非常に高率である[15]。急性 GVHD に対する治療の第 1 選択は、ステロイドであるが[16, 17]、ステロイド抵抗性の急性 GVHD に対する 2 次治療には定まったものがない[18]。2 次治療として、ステロイドパルス療法[16, 19]、抗胸腺グロブ

リン（anti-thymocyte globulin: ATG）[19]、ミコフェノール酸モフェチル（mycophenolate mofetil: MMF）[20,21]、抗腫瘍壊死因子（tumor necrosis factor: TNF）抗体である infliximab, etanercept[22,23]などがあるものの、いずれの治療法も確固たる位置づけには至っていないのが現状である。以上より、ステロイド抵抗性の急性GVHDを発症した患者の予後は不良といえる[15,24,25]。

急性GVHDの発症リスクには前述した急性GVHD予防法に加えて、ドナー因子、つまりドナーHLA適合度[26,27,28]、マイナー抗原の関与[29]、ABO血液型不適合[30,31]、末梢血幹細胞の使用[32]などが関与する。また、移植前処置[2]などがある。しかし、その発症をあらかじめ予測することは困難である。急性GVHD発症前にその発症リスクや発症した場合の重症度、治療効果を予測できれば、腸管保護をあらかじめ行う[33,34]、先制攻撃的な免疫抑制剤の強化する、などの対応が可能となるかもしれない。そのような背景から、急性GVHDの発症、重症度、治療効果を予測する血清バイオマーカーが見いだされてきた[35]。米国ミシガン大学のグループを中心に、抗体マイクロアレイ法や、液体クロマトグラフィー質量分析法（liquid chromatography-mass spectrometry/ mass spectrometry：LC-MS/MS）により重症急性GVHDや臓器特異的急性GVHDの発症と関連するバイオマーカーの探索が行われ、代表的なバイオマーカーとして、可溶型 ST2 (suppression of tumorgenecity 2)[36]、可溶型TNFR1(tumor necrosis factor receptor 1)[37]、TIM3（T cell immunoglobulin and mucin domain 3）[38]、REG3α（regenerating islet-derived 3-alpha）[39]、Elafin[40]などが見いだされた。特に可溶型ST2は、優れた急性GVHDバイオマーカーであるとされ、急性GVHDに対するステロイド治療前の可溶型ST2が高い症例は、有意に非再発移植関連死亡が高いとする報告がある[36]。また、これらのバイオマーカーと従来の急性GVHDの重症度分類[41]を組み合わせることで、より正確な急性GVHD発症後の予後予測を行える可能性が示された[42]。

免疫系は、急性GVHDの病態形成そのものに関わるシステムであるが、その活性化と抑制の制御することによってバランスをとっていると考えられている。この活性化と抑制の制御の一つには、免疫細胞上に発現している受容体が関与している。抑制的に働く受容体には、免疫グロブリンスーパーファミリーに所属し、細胞内に immuno receptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)を有するものがある。ITIM は、アミノ酸配列でI/ V/ L/ S-x-Y-x-x-L/ V(I：イソロイシン、V：バリン、L:ロイシン、S：セリン、Y：チロシンの各残基、X は任意のアミノ酸残基、「/」はそのいずれか一つであることを示す)で示されるモチーフで、そのチロシン残基がリン酸化を受けると、SHP-1、SHP-2、SHIPなどの脱リン酸化酵素と会合し、抑制性シグナルが伝達される[43]。抑制性Ly49Aは、NK細胞で自己のMHCクラスⅠ分子を認識する抑制性受容体として初めて同定された[44]。一方で、活性化型レセプターは、細胞内領域が短く、シグナル伝達に関わるモチーフを有さないが、元来荷電をもたない疎水性アミノ

酸残基で構成されるべき膜貫通領域中に、正に荷電したリジン（K)、アルギニン（R)などのアミノ酸残基を有する。そして、CD3z 、DAP10、DAP12、高親和性Fce レセプター複合体のｇ鎖（FceRIg、FcRgchain）などのアダプター分子を通じて、細胞内に活性化シグナルを伝達する[45, 46]。これらのアダプター分子は細胞外構造が短く、膜貫通部に負に荷電したアスパラギン酸残基（D）をもち、電気的に活性型レセプターと会合、複合体を形成する。細胞内には、immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)、つまりYxxI/Lx(6-8)YxxI/L(I：イソロイシン、V：バリン、L：ロイシン、S：セリン、Y：チロシンの各残基、xは任意のアミノ酸残基)を有しており、リガンドとの結合や､抗体を用いたレセプター/アダプター分子複合体のクラスタリングによってITAMのチロシンがリン酸化され､そこにSykやZAP70などが会合することによって活性化シグナルが伝わる[47, 48, 49]。

リンパ球上に発現するDNAX accessory molucule-1（DNAM-1, CD226）は、免疫グロブリンスーパーファミリーに所属し、ITAMを有する活性化受容体であり、1996年に同定された[50]。DNAM-1は、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞ならびにNK細胞に恒常的に発現しており、そのリガンドは、CD155（necl-5）とCD112（nectin-2）である[51, 52]。CD155とCD112は造血系細胞、上皮系細胞、内皮系細胞に広範に発現している分子である[51, 52]。CD8陽性T細胞上のDNAM-1やNK細胞は、標的細胞上のCD155やCD112を介して標的細胞へ、細胞傷害活性を与えることが知られている[50]。また、CD4陽性T細胞上のDNAM-1は、ヘルパーT細胞への分化に重要な役割を果たしていること[53]、NK細胞が免疫記憶を獲得する上でDNAM-1が重要な役割を果たしていること[54]が明らかになっている。また、臨床的な役割として、腫瘍に対する免疫監視機構に関わっていること[55]、自己免疫疾患への関わりが示唆されている[56]。急性GVHDの病態においても、CD8陽性T細胞上のDNAM-1がマウスモデルにおいて急性GVHDの増悪に関与していること[57]､Foxp3陽性制御性T細胞上のDNAM-1がやはりマウスモデルにおいて､急性GVHDの増悪に関わること[58]が近年明らかになった。

また、DNAM-1とリガンドを共有する新規の分子として2009年にTIGIT（T cell immunoglobulin and ITIM domain）が同定された[59]。DNAM-1とTIGITは、相同性の高い細胞外ドメインを有するペア受容体であり､DNAM-1は活性化シグナル伝達モチーフであるITAMを持ち、TIGITは抑制性シグナルを伝達するモチーフであるITIMを持っている[50, 60]。TIGITもDNAM-1同様にT細胞やNK細胞上に発現している。T細胞上のTIGITは当初、樹状細胞上のCD155を介して、抗原提示細胞からのIL-10の産生を促し、免疫応答を抑制すると報告された[59]。その後TIGITが、CD4陽性Foxp3陽性制御性T細胞上に高発現していることが明らかになり、続けて制御性T細胞の機能を増強し、免疫応答を負に制御する重要な受容体の一つであることが近年明らかになりつつある[60, 61]。しかしながら、DNAM-1とTIGITが、生体内でどのようにリガンドを共有し

ているのか、ペア受容体としてどのように免疫応答を調整しているのかについてはまだ不明な点が多い。

このように、DNAM-1、TIGIT ならびにそのリガンドである CD155、CD112 分子らの複雑な相互作用は、免疫応答において重要な役割を果たしていると考えられ、それらを明らかにすることは、急性 GVHD の免疫病態の解明の一助となり、免疫応答の調節のメカニズムを解明する一助にもなると考えられた。

上記を背景とし、今回我々は、2 つの観点で検討を行った。一つは、これまで存在が知られていなかったヒト可溶型 DNAM-1 の同定と、それが同種移植の症例において果たす役割について検討を行った（第 1 章、可溶型 DNAM-1 は急性 GVHD 予測バイオマーカーである）。2 つめは、DNAM-1 と TIGIT の共通リガンドである CD155 分子に着目し、マウス GVHD モデルにおいてレシピエント側の CD155 がどのような役割を果たしているのかについて検討を行った（第 2 章、レシピエントの CD155 は制御性 T 細胞を制御することで GVHD を抑制する）。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ACK	ammonium chloride lysis
Allo-HSCT	allogeneic hematopietic stem cell transplantation
AUC	area under the curve
aGVHD	acute graft-versus-host disease
B6	C57BL/6N
BMT	Bone marrow transplantation
BrdU	Bromodeoxyuridine
CB6F1	BALB/c - C57BL/6N F1
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNAM-1	DNAX accessory molecule-1
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	fetal bovine serum
GVHD	graft-versus-host disease
GVL	graft-versus-host leukemia
HLA	Human leukocyte antigen
IL-2	Interleukin-2
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
LC-MS/MS	liquid chromatography-mass spectrometry
MAC	Myelloablative conditioning
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matrix metalloproteinase
MTX	methotrexate
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate phosphate-buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PMA	Phorbol 12-Myristate 13- Acetate
QOL	quality of life
RIC	Reduced intensity conditining
ROC	Receiver operating characteristic
sDNAM-1	soluble DNAM-1

ST2	suppression of tumorgenecity 2
TBI	total body irradiation
TCD BM	T cell depleted bone marrow
TIGIT	T cell immunoglobulin and ITIM domain
T_{reg}	regulatory T cell
TMA	thrombotic microangiopathy
VOD	veno-occlusive disease

第 1 章

可溶型 DNAM-1 は

急性 GVHD 発症予測バイオマーカーである

緒言

我々はヒト血清中に抗 DNAM-1 抗体を用いた ELISA 法での測定が可能なタンパク、つまり可溶型 DNAM-1 が存在している可能性を明らかにした。それに伴い、可溶型 DNAM-1 がどのような濃度でヒト血清中に存在しているか、分子量や産生機序を明らかにしたいと考えた。また、マウス急性 GVHD の実験系において、DNAM-1 が重要な役割を果たしていることが明らかになっていることから、可溶型 DNAM-1 もまた、急性 GVHD に関与しているのではないか、特に急性 GVHD のバイオマーカーの一つなのではないかという仮説のもと、実験を開始することとした。

実験方法

1. 実験材料

1.1 細胞

完全型ヒトDNAM-1トランスフェクタント(human DNAM-1/BW5147：DT266)は当研究室で樹立したものを用いた。ヒト単核球は、Lymphoprep™(AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norway)を用いて末梢血より分離した。

1.2 培地

各DNAM-1トランスフェクタント､BW5147の培養に用いた完全RPMI培地はRPMI1640培地（Sigma, St. Louis MO, USA）にサプリメント（0.1 mM MEM Non-Essential Amino Acid Solution (GIBCO, Gran Island, NY, USA)、100 mM HEPES Buffer Solution (GIBCO)、1 mM Sodium Pyruvate (GIBCO)、2 mM L-Glutamine Penicillin Streptomycin Solution (Sigma)、0.0035 nM 2-Mercaptoethanol (Sigma)、10 % Fetal Bovine Serum (NICHIREI BIOSIENCES Inc. Produces, Tokyo, Japan)を添加したものを使用した。

1.3 抗体

可溶型DNAM-1産生刺激に用いた抗ヒトCD3抗体、抗ヒトCD28抗体、抗ヒトLFA-1抗体、リコンビナントヒトIL-2はBD Biosciencで購入した。単核球刺激後の培養に用いたGIT培地はWako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan)から購入した。

ウェスタンブロットに用いたTXのアイソタイプコントロールであるマウスIgG1精製抗体はBDより購入した。

1.4 阻害剤、BrdUによる細胞増殖の評価

Matrix metalloproteinase(MMP)阻害剤であるGM6001ならびにTAPI-1は、Merk Calbiochemより購入した。細胞増殖は、細胞増殖ELISA、BrdU化学発光キット（Roche社）を用いた。

2. 方法

2.1 可溶型DNAM-1産生刺激

ヒトの末梢血からLymphoprep™を用いて単核球を分離し、(1)IL-2 (2)IL-2＋PMA(Phorbol 12-Myristate 13- Acetate) (3)IL-2＋抗CD3抗体＋抗CD28抗体 (4)IL-2＋抗CD3抗体＋抗LFA-1抗体 (5)IL-2＋抗CD3抗体＋TX25の5種類の刺激を与えた。

単核球は各2×10^5細胞ずつ96ウェルプレート(Corning Incorporated, New York, NY,

USA)に播き、7 日後の培養上清を回収した。抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、抗 LFA-1 抗体、TX25 は 10μg/ml、PMA は 50ng/ml、 IL-2 は 20ng/ml 使用した。

2.2 ELISA 法による可溶型 DNAM-1 検出

回収した培養上清中の可溶型 DNAM-1 産生量は TX25 と Bio-抗 DNAM-1 ポリクローナル抗体によるサンドウィッチ ELISA 法により測定し、比較検討した。TX25 を 8 μg/ml で固相化し、培養上清を添加し、さらに Bio-抗 DNAM-1 ポリクローナル抗体を 0.6 μg/ml で添加した。これを Extra-avidin Peroxidase (Sigma)で標識し、o-phenylendiamine (SIGMAFAST oPD, Sigma)基質を用いて 490 nm における吸光度を測定した。

2.3 MMP 阻害剤による可溶型 DNAM-1 産生阻害実験

2.1 に示したようにヒト単核球を、IL-2＋抗 CD3 抗体＋TX25 で 72 時間刺激した後に、MMP 阻害剤である GM6001 または TAPI-1 を添加した。GM6001 は、濃度を 100μM から、50μM、25μM、12μM、6μM、3μM、1.5μM まで段階希釈を行った。TAPI-1 を 50μM の濃度で添加した。阻害剤添加 72 時間後に培養上清を回収し、2.2 で示した ELISA 法で可溶型 DNAM-1 濃度を測定した。

阻害剤添加後に PBMC 中の CD4 陽性 T 細胞ならびに CD8 陽性 T 細胞の細胞増殖ならびに活性が低下していないことを確認するために、MMP 阻害剤を添加しない細胞と添加した細胞の比較を行った。ウェル中の細胞数ならびに T 細胞上の CD25 の発現をフローサイトメトリーで解析し、比較を行った。また、単核球刺激から 72 時間後に BrdU を添加し、MMP 阻害剤あり、なしで増殖を評価した。

2.4 ウェスタンブロッティング法による可溶型 DNAM-1 の検出

血清中可溶型 DNAM-1 の検出には、ベノジェクトⅡ真空採血管(Terumo Medical Corporation, Elkton, MD, USA)を用いた採血を行い、分離した血清を使用した。また単核球培養上清中の可溶型 DNAM-1 の検出には、末梢血から分離した単核球に IL-2＋抗 CD3 抗体＋TX25 で刺激を与えた後 7 日目の培養上清を使用した。コントロールとしておいた DT266 (humanDNAM-1/BW)細胞は、細胞溶解バッファー (1%NP-40, タンパク分解酵素阻害剤添加 (Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF), Sigma)(Aprotinin, Sigma)) を用いて 4℃、15 時間で溶解した細胞溶解液を用いた。

血清中、単核球培養上清中可溶型 DNAM-1 の検出には、以下の方法を用いた。TX25 あるいはコントロール抗体(マウス IgG1 精製抗体)と細胞分離用磁気ビーズ(Dynabeads M-280 Tosylactivated, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)との複合体を作製し、血清中あるいは PBMC 由来の可溶型 DNAM-1 との免疫沈降を行った。その後、同量の溶離バッファー(Protein A MAPS Ⅱ Elution Buffer (pH3.0), Bio-Rad

Laboratories, California, USA)と氷上で 30 分間反応させて抗体、可溶型 DNAM-1、Dynabeads とを溶離させた。得られたサンプルは 2-Mercaptoethanol(2ME)を用いた還元条件下で Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)にて分離した。その後 PVDF メンブレン (Pore size 0.2μm, Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) に転写バッファー (25 mM Tris, 195 mM glycine, 20% methanol)中で 85 V, 2 時間で転写した。メンブレンは 3%牛血清アルブミン (BSA) を含む TBST (10 mM Tris-buffered saline に 0.5% Tween 20, 0.5 g/L $MgCl_2$ を添加した溶液(pH8.0))でブロッキングをした後、TX25、抗マウス IgG-HRP 抗体を添加した。さらに基質(Super-Signal CL-HRP substrate, Pierce Chemical Co. Rockford, IL, USA) と反応させ、化学発光を LAS-3000 mini (FUJIFILM, Tokyo, Japan) で検出し解析した。

3. 対象患者

3.1 患者血清

2009 年 3 月から 2011 年 11 月にかけてがん・感染症センター都立駒込病院で同種移植が施行された症例のうち、移植前 7 日から移植後 28 日目の間で、保存されていた血清サンプルを用いて可溶型 DNAM-1 の測定を行った。患者に対しては、ヘルシンキ宣言にのっとった形で、適切にインフォームドコンセントが行われ、了承が得られた。本臨床研究は、筑波大学ならびにがん・感染症センター駒込病院の倫理審査委員会で承認を得た上で、施行された。また、患者データに関する個人情報は、筑波大学次世代医療研究開発・教育統合センターで匿名化されたものを解析した。

患者血清は、ベノジェクトⅡ真空採血管(Terumo Medical Corporation, Elkton, MD, USA)を用いて採血が行われた。血清分離が行われた後に、-80℃で凍結したものを用いて測定を行った。

3.2 同種移植方法

骨髄破壊的前処置は、シタラビン併用もしくは非併用、大量シクロホスファミド療法に 12Gy の全身放射線照射またはブスルファンを投与したものと定義した[62]。前処置軽減移植は、フルダラビンにブスルファンもしくはメルファランを投与した上で、2-4Gy の全身放射線を追加したものと定義した[63]。前処置に抗胸腺グロブリンは使用しなかった。急性 GVHD 予防として、シクロスポリンもしくはタクロリムスの持続静注を行い、それに短期メソトレキセートの静脈注射を移植後 1 日目(10mg/m^2)、3 日目(7mg/m^2)、6 日目(7mg/m^2)、11 日目(7mg/m^2)を追加した[64]。急性 GVHD は、過去に示された方法で評価を行った[65]。細菌感染予防はフルオロキノロンの内服で行い、真菌感染予防はフルコナゾールまたはイトラコナゾールで行った。ニューモシスチス肺炎予防は ST 合剤で行った。

3.3 疾患リスクの定義ならびに感染症の定義

急性白血病の第一寛解期と第二寛解期、慢性骨髄性白血病の第一慢性期、第二慢性期、骨髄異形成症候群ならびに骨髄増殖性疾患のうち、芽球の増生を認めない病期を標準リスクと定義した。それ以外の疾患、病期は高リスクと定義した[66]。これらの定義は、以前日本のグループから出された論文での記載に基づいている。顕在化された感染症とは、微生物学的、臨床的、画像的に感染症が確認されたものと定義した。

4 統計解析

可溶型 DNAM-1 測定データのうち、2 群間の検定は、Mann-Whitney U 検定で行った。両側検定を行い P 値は 0.05 未満で設定した。対象患者の層別比較は、χ^2 検定を行った。急性 GVHD の累積発症率は、log rank 検定を用いた。多変量解析は、Cox 比例ハザードモデルを用いた。全ての統計解析は、IBM SPSS Statistics version21 (IBM 社) で行った。臨床データの解析は、統計解析の専門家の助言を受けて行った。

実験結果

1. 可溶型 DNAM-1 の同定

ヒト血清中に可溶型 DNAM-1 が実際に存在するかどうかについて、検討するため、我々はサンドイッチ ELISA の系を立ち上げ、38 名の健常人の血清可溶型 DNAM-1 の測定を行った。血清可溶型 DNAM-1 の血中濃度の平均値は、67.5 pM（±88.9）であり、中央値は 30.0 pM であった。生化学的評価を行うために、健常人血清を抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体による免疫沈降、ウェスタンブロットを行った。その結果、可溶型 DNAM-1 はおよそ 45 kDa の分子量であることが明らかになった。この分子量は、ちょうど DNAM-1 の細胞外ドメインの分子量に一致することから、可溶型 DNAM-1 は ectodomain shedding、つまり DNAM-1 の細胞外領域が切り出されることで、産生される可能性が示唆された。また、ヒト DNAM-1 の mRNA（*CD226* mRNA）は splicing insoform が存在しないことも、可溶型 DNAM-1 が ectodomain shedding により産生されている可能性を支持している。

次に、可溶型 DNAM-1 の産生機構を調べるために、健常人の末梢血から単核球を分離し、その後各種刺激を加え、培養上清中の可溶型 DNAM-1 を測定する実験を行った。末梢血単核球に IL-2 を添加した上で、PMA 刺激または、抗 CD3 抗体ならびに抗 CD28 抗体の刺激または、抗 CD3 抗体ならびに抗 CD18 抗体の刺激を行いながら、細胞培養を行い、その後培養上清中の可溶型 DNAM-1 を ELISA 法で測定したが、いずれの刺激においても細胞培養上清中の可溶型 DNAM-1 の増加を認めなかった。しかし、IL-2 添加の上、単核球を抗 CD3 抗体と抗 DNAM-1 抗体で刺激を加えたところ、有意に可溶型 DNAM－1 の産生が亢進した。これは、DNAM-1 への刺激そのものが、可溶型 DNAM-1 の産生を促すことを示唆する結果である。次に、可溶型 DNAM-1 の産生が、shedding によって産生されるか否かを検証するために、Matrix metalloproteinase（MMP）の阻害剤である GM6001 や TAPI-1 を培養液中に加えて検証を行った。MMP 阻害剤の添加により、可溶型 DNAM-1 の産生は有意かつ濃度依存性に抑制された。また、これらの MMP 阻害剤は細胞の増殖や活性には影響を与えないことを確認しており可溶型 DNAM-1 は、膜型 DNAM-1 の細胞外領域から MMP により切り出されることで産生されている可能性が示唆された。

2. 可溶型 DNAM-1 は、急性 GVHD の症例において上昇している。

DNAM-1 は、マウスモデルにおいて急性 GVHD の増悪に関与していることが既に示されており [57,58]、我々は急性 GVHD 発症患者において、血清中の可溶型 DNAM-1 が上昇しているという仮説を立てた。

そこで、我々はがん・感染症センター都立駒込病院血液内科において、造血器悪性腫瘍に対する同種移植が施行された、79 名の保存血清サンプル中の可溶型 DNAM-1 の測定を行った。対象とした 79 症例のうち、8 症例は生着不全をきたしたため、不適と判断し、解析を行わなかった。血清サンプルは、同種移植前 day -7 から、移植後 day 28 にかけて採取された保存血清を用いた。血清可溶型 DNAM-1 の測定値が複数ある場合は、最大値を代表値とし、それぞれ day -7 から day 28、day -7 から day 0、day 1 から day 28 の 3 つの期間で代表値を設定し、解析を行った。それぞれの期間の可溶型 DNAM-1 の最大値を、急性 GVHD 発症例（n=48）と急性 GVHD 非発症例（n=23）を比較すると、急性 GVHD 発症例で有意に高いことが明らかとなった。また、Grade II-IV 急性 GVHD 発症例（n=27）はいずれも急性 GVHD 非発症例（n=23）と比較して、可溶型 DNAM-1 は有意に高値であった。また、皮膚急性 GVHD 発症例（n=43）、腸管急性 GVHD（n=14）発症例は、急性 GVHD 非発症例（n=23）に比して、有意に可溶型 DNAM-1 値が高値であった。れらの結果は可溶型 DNAM-1 値が、急性 GVHD の発症と関連していることを示している。

3. 可溶型 DNAM-1 が 30 pM 以上の症例は有意に急性 GVHD を発症した。

次に、day -7 から day 28、day -7 から day 0、day 1 から day 28 の 3 期間における可溶型 DNAM-1 値と急性 GVHD の発症に関して、ROC 解析を行った。Day -7 から day 28 の AUC は 0.710 であり、day -7 から day 0 の AUC は 0.668 であり、day 1 から day 28 の AUC は、0.681 であった。以上の結果より、血清可溶型 DNAM-1 は急性 GVHD の診断における優れたバイオマーカーであることが明らかになった。

ROC 解析の結果から、day -7 から day 28 での可溶型 DNAM-1 のカットオフ値を 30 pM に設定すると、感度が 69.5%、特異度が 75.0%と比較的優れていることが明らかになった。また、30 pM のカットオフ値は、day -7 から day 0、day 1 から day 28 の期間でも、比較的優れた感度と特異度を持つことが示された。また、可溶型 DNAM-1 の値が 30 pM 以上の症例で有意に Grade II-IV 急性 GVHD、皮膚急性 GVHD、腸管急性 GVHD の発症が多いことが明らかになった。なお、30 pM は、健常人の血清可溶型 DNAM-1 値の中央値に一致しており、カットオフ値として適切な値であると考えられた。次に、対象症例 71 例を可溶型 DNAM-1 値が 30 pM 以上の群と、30 pM 未満の群に分けた場合、GradeII-IV の重症急性 GVHD 発症率が、有意に低下することが明らかになった。また、

30 pM をカットオフ値とした場合、3 期間のうちいずれの期間においても、30 pM 以上の症例で有意に重症急性 GVHD を発症していることが示された。

4. 可溶型 DNAM-1 は急性 GVHD の発症を予測するバイオマーカーである

ここまでの知見より、可溶型 DNAM-1 は急性 GVHD の発症と関連する因子であることが明らかになった。我々は移植前の day -7 から day 0 における血清可溶型 DNAM-1 と急性 GVHD の発症が関連することに関心を抱いた。多変量解析を行っても、移植前の可溶型 DNAM-1 が 30 pM 以上の症例は有意に重症急性 GVHD を発症している。最後に、移植前の可溶型 DNAM-1 が急性 GVHD 以外の急性期の移植関連合併症の発症に関わるかどうかについて、単変量解析を施行した。静脈閉塞性肝疾患（SOS）ならびに血栓性微小血管障害の発症ならびに感染症の発症と、移植前の可溶型 DNAM-1 の値に関連は認めないことが明らかになった。以上より、移植前の可溶型 DNAM-1 は、急性 GVHD の発症を特異的に予測するバイオマーカーであることが明らかになった。

考察

これまで急性GVHDバイオマーカーとして、ST2、HGF、Rag3α、IL-6、TIM3、sTNFR1など様々なものが報告されてきた[67]。これらはいずれも、急性GVHDの診断に関わるものや大量ステロイド療法施行時の治療反応性を予測するバイオマーカーである。今回、我々が行った単施設での検討で、血清中の可溶型DNAM-1濃度が急性GVHDの発症に関与していること、特に重症急性GVHDや皮膚GVHDならびに腸管GVHDに関わっていることが初めて明らかとなった。これまで報告されてきたバイオマーカーとは異なり、移植前の可溶型 DNAM-1 値が急性 GVHD の発症と関わっていることから、可溶型 DNAM-1 は急性GVHDの発症を予測するバイオマーカーである可能性が示唆された。また、可溶型DNAM-1は急性GVHD以外の移植関連合併症とは関連しておらず、急性GVHDに対して特異的といえる。従って、移植前の可溶型DNAM-1値が30 pM以上で高値を示した症例は、あらかじめ免疫抑制を強めにするなどの工夫が可能になるかもしれない。

また今回我々は、ヒトにおける可溶型DNAM-1の臨床的意義を初めて見いだした。健常人において可溶型DNAM-1値は幅広い値をとるが、このように可溶型DNAM-1値の個人差が大きい原因は、今の所明らかではない。可溶型DNAM-1はMMPによって細胞外領域が切り出されることで産生される可能性が高い。IL-6受容体やFcγRIIIなどの免疫受容体は、可溶型DNAM-1と同様にsheddingにより産生されることが知られており[68, 69]、MMPが急性GVHDの増悪に関わっているとする報告がある[70]。可溶型DNAM-1値が高い健常人は、MMP活性が全般に高く、免疫学的に急性GVHDを発症しやすい背景を持っているのかもしれない。

一方で、本研究にはいくつかの限界がある。まず本研究が単施設の後方視的研究であることが挙げられる。多変量解析において可溶型DNAM-1が独立した急性GVHD発症予測因子であったが、同時に一般的にはリスクとは考えられていない女性レシピエントも予測因子として抽出された。この結果は、症例背景に何らかのバイアスがかかっている可能性を示唆している。本研究の再現性を検討するためには、新規で前向き多施設研究を行う必要性があると考えられる。

次に、可溶型DNAM-1の生理的意義が未だ明らかでないことが問題点として挙げられる。可溶型DNAM-1は健常人においても、移植患者においても検出される。膜型のDNAM-1は悪性腫瘍や自己免疫疾患にも関わっていることが知られている[71, 72, 73]。従って、可溶型DNAM-1が、悪性腫瘍や自己免疫疾患に関わっている可能性も十分にあると推測される。最後に、ヒト抗DNAM-1抗体のクローンの問題が挙げられる。残念ながら、可溶型DNAM-1と膜型DNAM-1を区別できる抗体は、今のところ得られていない。従って、

可溶型 DNAM-1 を特異的に認識できる抗体がないのが現状である。

我々は今回、同種移植患者の血清中に可溶型 DNAM-1 が存在していることを見いだし、血清可溶型 DNAM-1 値が急性 GVHD の発症に関与していることを明らかにした。また、移植前の可溶型 DNAM-1 が高値の症例は、有意に急性 GVHD を発症しやすいことも明らかとなり、可溶型 DNAM-1 が急性 GVHD の発症を予期するバイオマーカーである可能性を示唆した。今後、可溶型 DNAM-1 の生理的意義ならびに病理的な意義を探索することで、急性 GVHD の更なる病態解明に繋がるものと考えている。

第 2 章

レシピエントの CD155 は T 細胞を制御することで急性 GVHD を抑制する

緒言

ドナーT 細胞上の DNAM-1 が GVHD において重要な役割を果たしていることが明らかになった[57, 58]が、次に DNAM-1 リガンドは、GVHD においてどのような役割を果たしているのか、という単純な疑問を明らかにするために、DNAM-1 リガンドである CD155 遺伝子を欠損したマウスをレシピエントとした実験を行うこととした。CD155 側からみると、DNAM-1 のみならず、ペアレセプターである TIGIT もリガンドとなる。CD155 遺伝子欠損マウスをレシピエントとすることで、DNAM-1 と TIGIT の相互作用についても明らかにしていきたいと考え、実験を行うこととした。

実験方法

1. 実験材料

1.1 マウス

野生型 C57BL/6N マウス（$H\text{-}2^b$, $CD45.2^+$）、BALB/c マウス（$H\text{-}2^d$）は日本クレア株式会社（東京都目黒区）から購入した。野生型 CB6F1 マウスは、野生型 C57BL/6N マウスと野生型 BALB/c マウスを交配し得た。C57BL/6-Ly5a マウス（C57BL/6-CD45.1, $H\text{-}2^b$, CD45.1）は、Jackson 研究所より購入した。C57BL/6N バックグラウンドならびに BALB/c バックグラウンドのマウス CD155 遺伝子欠損マウス（$Pvr^{-/-}$）は、G. Bernhardt 研究室より譲渡を受けた[74]。実験に用いた 8-12 週齢のマウスは筑波大学生命科学動物資源センター内にて特定病原体未感染（Specific Pathogen- Free; SPF）環境下で飼育した。全ての動物実験は「国立大学法人筑波大学動物実験取扱規程」に従い行った。

1.2 蛍光標識抗体・タンパク・フローサイトメトリー

蛍光標識抗マウス TCR-β（H57-597）、CD3（500A2）、CD4（L3T4）、CD8a（53.6.7）、CD11c（HL3）、CD25（PC61.5）、CD45.1（A20）、CD45.2（104）、H-2Kb（AF6-120.1）、H-2Kd（39-10-8）抗体は、BD Bioscience 社より購入した。Alexa-Fluor 647 蛍光標識抗マウス TIGIT 抗体（GIGD7）[75, 76]は、ならびに蛍光標識抗マウス Foxp3 抗体（NRRF-30）[77]は eBiosciences 社から購入した。抗 DNAM-1（TX42）[78, 79]ならびに抗 CD155（TX56）[80, 81]、CD112（TX24）[82]は当研究室で作成されたものを用いた。

細胞内染色には、Foxp3 Staining Buffer set （eBiosciences）を用いた。Fc 受容体の拮抗には、抗マウス CD16/32（2.4G2）精製抗体を用いた。フローサイトメトリー解析は、LSR Fortessa（Becton Dickinson 社）を用いた。

2. 方法

2.1 マウス骨髄移植

過去の文献に従って移植を行った[83, 84, 85]。レシピエントマウスに全身放射線として、致死量の X 線照射を行った。C57BL/6 マウスに対しては、計 9 Gy の照射を行い、BALB/c マウスには、計 7.5 Gy の照射を行った。CBF1 マウスに対しては、計 10 Gy の照射を行った。X 線照射は消化管障害を軽減させるために、4 時間以上の間隔を空けてそれぞれ半量ずつ 2 回にわけて全身照射を行った。全身照射翌日に、5×10^6 個の T 細胞除去骨髄細胞のみ、または 2×10^6 個の T 細胞とともに、200μl の PBS に懸濁し、静注した。

2.2 移植細胞の調製

T 細胞除去骨髄は、ドナーマウスの左右両大腿骨と左右両下腿骨より無菌的に回収

した細胞懸濁液を ACK バッファーで赤血球を除去した後、Dynabeads MyONE streptavidin (Invitrogen 社)と抗 Thy1.2 (53-2.1)ビオチン化抗体を用いて、Thy1.2 陽性細胞を除去することで調製した。T 細胞はドナーマウスの脾臓より無菌的に細胞懸濁液を調製し、ACK バッファーで赤血球を除去した後、Dynabeads MyONE streptavidin (Invitrogen 社)と抗 CD45R/B220 (RA3-6B2)、抗 CD11b (M1/70)、抗 CD11c (HL3)、Ly-6G and Ly-6C (RB6-8C5)、抗 CD49b/Pan-NK cells (DX5)ビオチン化抗体を用いて、CD45R/B220、CD11b、CD11c、Ly-6G and Ly-6C、CD49b/Pan-NK cells 陽性細胞を磁気的に除去することで調製した[57]。脾臓から精製された T 細胞が 95%以上含まれていることをフローサイトメトリーで確認した。制御性 T 細胞の除去は、上記ビオチン化抗体に、ビオチン化マウス抗 CD25 抗体 (PC61.5) を加えることで、精製を行った。精製後、フローサイトメトリーを用いて CD25 陰性 T 細胞の純度が 95%以上であることを確認した。

2.3 マウスの観察

臨床的な GVHD 評価を目的として、マウスの観察は連日行い、体重測定と生存確認を行った[86]。

2.4 フローサイトメトリー解析

脾臓の細胞懸濁液を 70mm のセルストレイナー (BD 社) も用いて調整した。細胞懸濁液は、ACK lysing バッファーを用いて赤血球の除去を行った後に、各種蛍光抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行った。データ処理は、Flow Jo (Tree Star 社)により行った。

2.5 統計解析

2 群間の検定は、Mann-Whitney U 検定で行った。両側検定を行い P 値は 0.05 未満で設定した。マウスの累積死亡率は、カプランマイヤー法を用い、log rank 検定を行った。全ての統計解析は、Graph Pad prism 5 (GraphPad software 社) で行った。

実験結果

1. レシピエント側の CD155 分子の欠損が急性 GVHD を増悪させる。

まず、急性 GVHD において、レシピエント側の DNAM-1 リガンドである CD155 の機能を明らかにするために、CD155 遺伝子欠損マウスをレシピエントとした移植実験を行った。致死量の全身放射線照射を行った野生型 CB6F1 または CD155 欠損 CBF1 に対して、C57BL/6 由来の 5×10^6 個の骨髄細胞ならびに 2×10^6 個の T 細胞を輸注した C57BL/6 由来骨髄細胞を野生型 CB6F1 に輸注する実験を行い、GVHD を発症させないコントロールとした。GVHD を発症させた CD155 遺伝子欠損 CB6F1 は、GVHD を発症させた野生型 CB6F1 に比べて、有意に体重が減少することが明らかとなった。また、CD155 遺伝子欠損 CBF1 は、野生型 CBF1 と比較して、有意に生存期間が短縮すること、病理学的にも急性 GVHD の程度が強いことが明らかになった。以上より、レシピエント側の DNAM-1 リガンドである CD155 を欠損させると、急性 GVHD が増悪することが明らかになった。

2. レシピエントの CD155 分子は、ドナーT 細胞の増殖を抑制している。

次に、レシピエントの CD155 がドナーT 細胞に与える影響についての検討を行った。ドナーを C57BL/6（ただし Ly5.1）とし、レシピエントを野生型 CBF1 または CD155 遺伝子欠損 CBF1 として移植実験を行った。すると、移植 5 日目の段階で、脾臓におけるドナー由来 T 細胞数（CD45.1 陽性かつ CD45.2 陰性）は、CD155 遺伝子欠損レシピエントは野生型に比べて、有意に増加していることがわかった。従ってレシピエントの CD155 がドナーT 細胞の増殖全体を抑制している可能性を示唆している。

考察

鍋倉ら、小山らにより、DNAM-1 が GVHD に関わっていることが示されたが、2 つの主

張は微妙に異なっている。鍋倉らは、ドナーCD8 陽性 T 細胞上の DNAM-1 が細胞傷害活性を増強させることで、GVHD を増悪させていることを示した[57, 58]。一方で、小山らはドナーCD8 陽性 T 細胞ではなく、ドナーの CD4 陽性 Foxp3 陽性制御性 T 細胞上の DNAM-1 が制御性 T 細胞の抑制能を減弱させていることを示した。この結論の相違は、実験系の違いによるものである可能性も考慮されるが、一方で DNAM-1 とそのペア受容体である TIGIT、そしてそれらのリガンドである CD155 と CD112 の複雑な関係性を示した結果でもあると考えられる。今回、我々はレシピエント側の CD155 がドナーの T 細胞を抑制することで、急性 GVHD を抑制していることを示した。これは、小山らの見解に類似した結論であるが、DNAM-1、TIGIT、CD155、CD112 の複雑な関係を解き明かしたことにはなっていない。少なくとも今回の実験においては、CD155 遺伝子単独欠損マウスを使用しており、GVHD における CD112 の機能については全く明らかにできていない。これは、CD112 遺伝子欠損マウスが胎生致死であることに起因する[87]。しかしながら、特に NK 細胞において DNAM-1、TIGIT と CD112 の相互作用が明らかとなってきており[88, 89]、今後の更なる検討が必要である。また、近年これまで注目されてこなかった、CD155 から見た DNAM-1 以外のリガンドである CD96 の知見が明らかになりつつある[90, 91, 92]。特に NK 細胞においては、CD96 が CD155 と DNAM-1 の相互作用を妨げることで、DNAM-1 の細胞傷害活性を制御しているという報告がなされ[93]、注目を集めている。

2014 年に TIGIT が Foxp3 陽性制御性 T 細胞において重要な役割を果たしていることが報告されて以来[60]、その重要性を支持する報告が多数見られるようになった[61, 94, 95, 96, 97]。今回の我々のリガンド側の CD155 に着目した研究が示すのは、恐らく制御性 T 細胞上の TIGIT と抗原提示細胞側の CD155 の相互作用の重要性である。即ち、抗原提示細胞側の CD155 と制御性 T 細胞上の TIGIT の相互作用が、急性 GVHD の抑制に重要であるという仮説を立てることが可能である。CD155 欠損により DNAM-1 へのシグナルも減弱することが理論的に考えられるが、TIGIT のクローニングペーパーによると、CD155 と TIGIT の親和性は、CD155 と DNAM-1 のそれの 30 倍以上であるとされており[59]、CD155 欠損の表現形は、DNAM-1 側よりもむしろ TIGIT の機能を反映した形で現れると考えられる。

発展的な研究として、GVL 効果において、DNAM-1 と TIGIT からみた CD112 の意義、CD155 からみた CD96 の意義[98, 99, 100]についても、今後検討していくことで、臨床への応用の可能性が見えてくるかもしれない。

総括

本研究において以下の知見が得られた。

1. 健常人血清中には可溶型 DNAM-1 が存在している。(第一章)

2. 同種移植患者血清中にも可溶型 DNAM-1 が同定される。可溶型 DNAM-1 と急性 GVHD の発症は有意に関連する。(第一章)

3. 移植前の血清可溶型 DNAM-1 高値（30 pM 以上）の症例は、有意に重症急性 GVHD を発症した。(第一章)

4. マウス GVHD モデルにおけるレシピエント側の CD155 分子の欠損は、GVHD を増悪させる。(第二章)

5. マウス GVHD モデルにおいて、レシピエントの CD155 分子は、ドナーの T 細胞の機能を抑制することで、GVHD を抑制している。(第二章)

第一章において、血清可溶型 DNAM-1 が急性 GVHD のバイオマーカーとして有用である可能性を示した。第二章において DNAM-1 のリガンドである CD155 が急性 GVHD において果たす役割について検討を行い、レシピエント側の CD155 分子がドナーの T 細胞を制御する、という重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

これらの知見は、DNAM-1、TIGIT と CD155、CD112 の相互作用が GVHD をはじめ、免疫応答の制御に重要な役割を果たしていることの一端を示していると考えられる。

謝辞

本研究の遂行において、終始適切な御指導、御討論を賜り、本論文作成にあたって惜しみないご助力を下さいました、筑波大学医学医療系免疫制御医学、鍋倉宰助教、澁谷和子准教授に深く感謝致します。

私を特別研究学生として受け入れて下さり、3 年間の研究生活の間、終始有益な御指導と御助言を賜りました、筑波大学医学医療系免疫制御医学、澁谷彰教授に深く感謝致します。

また、本研究の遂行において、終始有意義な御意見、御討論を賜りました、北海道大学大学院医学研究科血液内科、豊嶋崇徳教授、今村雅寛名誉教授に深く感謝致します。

臨床検体のご提供を頂きました、がん・感染症センター駒込病院血液内科の皆様と臨床検体ならびに臨床データの管理を行って頂きました、CREIL センターの皆様に厚く御礼申し上げます。

特別研究学生としての 3 年間の研究生活を、あらゆる面でサポート頂きました、筑波大学医学医療系免疫制御医学の研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Appelbaum, F. R. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature.* 385, 385-389 (2001).
2. Jenq, R. R. & van den Brink, M. R. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* 10, 213-221 (2010) .
3. Li, H. W. & Sykes, M. M. Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. *Nat Rev Immunol.* 12, 403-416 (2012).
4. Weiden, P. L. *et al.* Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med.* 300, 1068-1073 (1979).
5. Horowitz, M. *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 75, 555-562 (1990) .
6. Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 373, 1550-1561 (2009).
7. Sholmchik, W. D. *et al.* Prevention of graft versus host disease by interaction of host antigen-presenting cells. *Science.* 285, 412-415 (1999).
8. Teshima, T. *et al.* Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expres.sion on host epithelium. *Nat Med.* 8, 575-581 (2002).
9. Sholmchik, W. D. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* 7, 340-352 (2007).
10. Blazer, B. R., Murphy W. J, Abedi, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol.* 12, 443-458 (2012).
11. Nash, R.A., *et al.* Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood.* 96, 2062-2068 (2000).
12. Ratanatharathorn, V. *et al.* Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 92, 2303-2314 (1998).
13. Hiraoka, A. *et al.* Phase III study comparing tacrolimus (FK506) with cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone

marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 28, 181-185 (2001).
14. Yanada, M. *et al*. Tacrolimus instead of cyclosporine used for prophylaxis against graft-versus-host disease improves outcome after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors but not from HLA-identical sibling donors: a nationwide survey conducted in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 34, 331-337 (2004).
15. Gooley, T. A. *et al.* Reduced mortality after allogeneic hematopietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 363, 2091-2101 (2010).
16. Van Lint, M. T. *et al.* Early treatment of acute graft-versus-host disease with high- or low-dose 6-methylprednisolone : a multicenter randomized trial from the Italian Group of Bone Marrow Transplantation. *Blood.* 92, 2288-2293 (1998).
17. Mielcarek, M. *et al*. Initial therapy of acute graft-versus-host disease with low-dose predonisone does not compromise patient outcomes. *Blood.* 113, 2888-2894 (2009).
18. Martinez, C. *et al*. Graft-versus-host disease therapy: something else beyond glucocorticoids. *Haematologica.* 96, 1249-1251 (2011).
19. Van Lint, M. T. *et al*. Treatment of acute graft-versus-host disease with predonisolone : significant survival advantage for day +5 responders and no advantage for nonresponders receiving anti-thymocyte globlin. *Blood.* 107, 4177-4181 (2006).
20. Alousi, A. M. *et al.* Etanercept, mycophenolate, denileukin, or pentostatin plus corticosteroids for acute graft-versus-host disease : a randomized phase 2 trial from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. *Blood.* 114, 511-517 (2009).
21. Takami, A. *et al*. Mycophenolate mofetil is effective and well tolerated in the treatment of refractory acute and chronic graft-versus-host disease. *Int J Hemaol*. 83, 80-85 (2006).
22. Patriarca, F. *et al*. Infliximab treatment for steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Haematologica.* 89, 1352-1359 (2004).
23. Busca, A. *et al*. Recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein as treatment for steroid refractory graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantaion. *Am J Hematol* 82, 45-52 (2007).
24. Martin, P. J. *et al*. A retrospective analysis of therapy for acute

graft-versus-host disease : initial treatment. *Blood.* 76, 1464-1472 (1990).
25. Martin, P. J. *et al.* First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease : recommendation of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 18, 1150-1163 (2012).
26. Flowers, M. E. *et al.* Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood* 117, 3214-3219 (2011).
27. Morishima, Y. *et al.* Effects of HLA allele and killer immunoglobulin-like receptor ligand matching on clinical outcome in leukemia patients undergoing transplantation with T-cell-replete marrow from an unrelated donor. *Biol Blood Marrow Transplant.* 13, 315-328 (2007).
28. Morishima, Y. *et al.* The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood.* 99, 4200-4206 (2002).
29. Oh, H. *et al.* Comparison of graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling bone marrow transplantation in ethnic populations. *Blood.* 105, 1408-1416 (2005).
30. Seebach, J. D. *et al.* ABO blood group barrier in allogeneic bone marrow transplantation revisited. *Biol Blood Marrow Transplant.* 11, 1006-1013 (2005).
31. Kimura, F. *et al.* Impact of ABO-blood group incompatibility on the outcome of recipients of bone marrow transplants from unrelated donors in the Japan Marrow Donor Program. *Haematologica.* 93, 1686-1693 (2008).
32. Nagafuji, K. *et al.* Peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors in patients with leukemia : a propensity score based comparison from the Japan Society for Hematopoietic Stem cell Transplantation registry. *Int J Hematol.* 91, 855-844 (2010).
33. Takashima, S. *et al.* The Wnt agnonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. Blood. 208, 285-294 (2011).
34. Eriguchi, Y. *et al.* Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α-defensins. Blood. 120,

223-231 (2012).
35. Paczesney, S. Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers. *Blood* 585, 585-594 (2013).
36. Vander Lugt, M. T. *et al.* ST2 as a marker for risk of therapy-resistant graft-versus-host disease and death. *N Engl J Med.* 369, 529-539 (2013).
37. Paczesney, S. *et al.* A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood* 113, 273-278 (2009).
38. McDonald, G. B. *et al.* Plasma biomarkers of acute GVHD and nonrelapse mortality: predictive value of measurements before GVHD onset and treatment. *Blood* 126, 113-120 (2015).
39. Ferrara, J. L. *et al.* Regenerating islet-derived 3 alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 118, 6702-6708 (2011).
40. Paczesney, S. *et al.* Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin. *Sci Transl Med.* 2, 13ra12 (2010).
41. Przepiorka, D. *et al.* 1994 consensus conference on acute GVHD grading. *Bone marrow Transplant.* 15, 825-828 (1995).
42. Levine, J. E. *et al.* A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicenter study. *Lancet Haematol.* 2, e21-e29 (2015).
43. Ravetch, J. V. & Lanier, L. L. Immune inhibitory receptors. *Science.* 290, 84-89 (2000).
44. Karlhofer, F. M., Ribaudo, R. K. & Yokoyama, W. M. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2 activated narural killer cells. Nature. 358, 66-70 (1992).
45. Clark, G. J., Green, B. J. & Hart, D. N. The CMRF-35H gene structure predicts for an independently expressed member of an ITIM/ ITAM pair of molecules localized to human chromosome 17. *Tissue Antigens.* 55, 101-109 (2000).
46. Wilson, M. J., Lindquist J. A. & Trowsdale, J. DAP12 and KAP10 (DAP10)-novel transmembrane adapter proteins of the CD3zeta family. *Immunol Res.* 22, 21-42 (2000).
47. Lanier, L. L. & Bakker, A.B. The ITAM-bearing transmembrane adaptor DAP12 in lymphoid and myeloid cell function. *Immunol Today.* 21, 611- 614 (2000).
48. Nakajima, H. *et al.* Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J Immunol.* 162, 5-8 (1999).

49. Takai, T. & Ono, M. Activating and inhibitory nature of the murine paird immunoglobulin-like receptor family. *Immunol Rev*. 181, 215-222 (2001).
50. Shibuya, A. *et al.* DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 4, 573-581 (1996).
51. Tahara-Hanaoka, S. *et al.* Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/ CD112). *Int Immunol* 16, 533-538 (2004).
52. Bottino, C. *et al.* Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*. 198, 557-567 (2003).
53. Shibuya, K. *et al.* CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naïve T cell differentiation and proliferation. *J Exp Med*. 198, 1829-1839 (2003).
54. Nabekura, T. *et al*. Costimulatory molecule DNAM-1 is essential for optimal differentiation of memory natural killer cells during mouse cytomegalovirus infection. *Immunity* 40, 225-234 (2014) .
55. Iguchi-Manaka, A. *et al.* Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J Exp Med* 205, 2959-2964 (2008).
56. Ayano, M. *et al*. Increased CD226 expression on CD8+ T cells is associated with upregulated cytokine production and endothelial cell injury in patients with systemic sclerosis. *J Immunol* 195, 892-900 (2015).
57. Nabekura, T. *et al*. Critical role of DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of acute graft-versus-host disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18593-18598 (2010).
58. Koyama, M. *et al.* Promoting regulation via the inhibition of DNAM-1 after transplantation. *Blood* 121, 3511-3520 (2013).
59. Yu, X. *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 48-57 (2009).
60. Joller, N. *et al.* T reg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinhibitory proinflamatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity* 40, 569-581 (2014).
61. Kurtulus, S. *et al.* TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J Clin Invest* 2015 sep28 pii: 81187. Doi: 10. 1172/JCI81187.

62. Mohty, M. *et al.* High-dose total body irradiation and myeloablative conditioning before allogeneic cell transplantation: time to rethink? *Biol Blood Marrow Transplant*. 21, 620-624 (2015).
63. Ando, M. *et al.* A comparative assessment of the RIFLE, AKIN and conventional criteria for acute kidney injury after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 45, 1427-1434 (2010).
64. Sato, M. *et al.* Prediction of transplant-related complication by C-reactive protein levels before hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 48, 698-702 (2013).
65. Przepiorka, D. *et al.* 1994 consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant*. 15, 825-828 (1995).
66. Nakai, K. *et al.* Value of chemotherapy before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor for myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. 19, 396-401 (2005).
67. MacDonald, G. B. *et al.* Plasma biomarker of cute GVHD and nonrelapse mortality: predictive value of measurements before GVHD onset and treatment. *Blood* 126, 113-120 (2015).
68. Briso, E. M. *et al.* Soluble IL-6R is produced by IL-6R ectodomain shedding in activated CD4 T cells. *J Immunol* 180, 7102-7106 (2008)
69. Harrison, D. *et al.* Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II). *J Immnol* 147, 3459-3465 (1991)
70. Hattori, K. *et al.* A metalloproteinase inhibitor prevents lethal acute graft-versus-host disease in mice. *Blood* 90, 542-548 (1997).
71. Vo, A. V., Takenaka, E., Shibuya, A. & Shibuya, K. Expression of DNAM-1 (CD226) on inflammatory monocytes. *Mol Immunol* 69, 70-76 (2015).
72. Guillerey, C. *et al.* Y. Immunosurveillance and therapy of multiple myeloma are CD226 dependent. *J Clin Invest* 125, 2077-2089 (2015).
73. Bozzano, F, *et al.* `Emergency exit` of bone-marrow-resident CD34(+)DNAM-1(bright)CXCR4(+)-committed lymphoid precursors during chronic infection and inflammation. *Nat commun* 6, 8109 (2015).
74. Nagumo, Y. *et al.* Increased CD112 expression in methylcholanthrene-induced tumors in CD155-deficient mice. *PLoS One*. 9, e112425 (2014).
75. Stanietsky, N. *et al.* The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 17858-17563 (2009).

76. Seth, S. *et al.* Abundance of follicular helper T cells in Peyer`s patches is modulated by CD155. *Eur J Immunol.* 39, 3160-3170 (2009).
77. O`Gorman, W. E. *et al.* The initial phase of an immune response functions to activate regulatory T cells. *J Immunol.* 183, 332-339 (2009).
78. Yamashita, Y. *et al.* Establishment and characterizataion of a novel anti-DNAM-1 monoclonal antibody. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 32, 60-64 (2013).
79. Kanaya, M. *et al.* Critial role of activating immune receptor DNAM-1 in the development of acute GVHD. Rinsho Ketsueki. 53, 497-503 (2012).
80. Yamashita-Kanemaru, Y. *et al.* CD155 (PVR/ Necl5) mediates a costimulatory signal in CD4+ T cells and regulates allergic inflammation. *J Immunol.* 194, 5644-5653 (2015).
81. Mishra, R. *et al.* Inflammatory cytokine-mediated evasion of virus-induced tumors from NK cell control. *J Immunol.* 191, 961-970 (2013).
82. Tahara-Hanaoka, S. *et al.* Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. *Blood.* 107, 1491-1496 (2008).
83. Shono, Y. *et al.* Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 115, 5401-5411 (2010).
84. Hashimoto, D. *et al.* Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophage and ameliorate GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med.* 208, 1069-1082 (2011).
85. Koyama, M. *et al.* Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med.* 18, 135-142 (2011).
86. Cooke, K. R. *et al.* An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation; I the role of minor H antigens and endoxin. *Blood.* 88, 3230-3239 (1996).
87. Levin, S. D. *et al.* Vatm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *Eur J Immunol.* 41, 902-915 (2011).
88. Grauwet, K. *et al.* Modulation of CD112 by the alphaherpesvirus gD protein suppresses DNAM-1 dependent NK cell-mediated lysis of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, 16118-16123 (2014).
89. Liu, J. *et al.* Crystal structure of cell adhesion molecule nectin-2/ CD112 and its binding to immune receptor DNAM-1/ CD226. *J Immunol.* 188, 5511-5520

(2012).
90. Minton, K. Natural killer cells: a TACTILE resistant. *Nat Rev Immunol.* 285, 10 (2014).
91. Martinet, L & Smyth, M. J. Balancing natural killer cell activation through parid receptors. *Nat Rev Immunol.* 15, 243-254 (2015).
92. Bemhardt, G. TACTILE becomes tangible: CD96 discloses its inhibitory peculiarties. *Nat Immunol.* 15, 406-408 (2014).
93. Chan, C. J. *et al.* The receptor CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol.* 15, 431-438 (2014).
94. Dhuban, K. B. *et al.* Coepression of TIGIT and FCRL3 identities Helios human memory regulatory T cells. *J Immunol* 194, 3687-3696 (2015).
95. Fuhrman, C. A. *et al.* Divergent phenotypes of human regulatory T cells expressing the receptors TIGIT and CD226. *J Immunol* 195, 145-155 (2015).
96. Zhang, Y. *et al.* Genome-wide DNA methylation analysis identifies hypomethylated genes regulated by FOXP3 in human regulatory T cells. *Blood.* 122, 2823-2836 (2013).
97. Chruscinski, A. *et al.* Role of regulatory T cells (Treg) and the Treg effector molecule fibrinogen-like protein 2 in alloimmunity and autoimmunity. *Rambam Maimonides Med J,* 6, 10 (2015).
98. Pende, D. *et al.* Analysis of the receptor-ligand interaction in the natural killer-mediated lysis isolated myeloid or lymphoblastic leukemia: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood.* 105, 2066-2073 (2005).
99. Johnston, R. J. *et al.* The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell.* 26, 923-937 (2014).
100. Le Mercier, I., Lines, J. L. & Noelle, R. J. Beyond CTLA-4 and PD-1, the Generation Z of negative checkpoint regulators. *Front Immunol.* 418, 418 (2015).