



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on inhibitory interaction between graft-derived and reconstituted T cells involves murine chronic graft-versus-host disease
Author(s)	小杉, 瑞葉
Description	配架番号 : 2147
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11665号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11665
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68192
Type	doctoral thesis
File Information	Mizuha_Kosugi.pdf



学位論文

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

学位論文

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

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1
緒言	2
略語表	5
実験方法	6
実験結果	10
考察	27
総括	30
謝辞	32
引用文献	33

発表論文目録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. Mizuha Kosugi-Kanaya, Satoshi Ueha, Jun Abe, Shigeyuki Shichino, Francis HW Shand, Teppei Morikawa, Makoto Kurachi, Yusuke Shono, Naoto Sudo, Fumiko Suenaga, Akihiro Yokoyama, Wang Yong, Masahiro Imamura, Takanori Teshima and Kouji Matsushima
Inhibitory interactions between graft-derived and reconstituted T cells underlie murine chronic graft-versus-host disease
The Journal of Experimental Medicine
投稿中

本研究の一部は以下の学会に発表した。

2. 小杉 瑞葉
Characterization of donor T cells from distinct origin in chronic GVHD
40th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation
30 March – 2 April, 2014. Milan, Italy
3. 小杉 瑞葉
Reciprocal interactions between graft-derived and reconstituted T cells in chronic GVHD
日本血液学会（第76回総会）, 2014年10月31日～11月2日・大阪

緒言

同種造血幹細胞移植は、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、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、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、輸注されたドナー T 細胞が、抗原提示細胞によって提示されたレシピエントの非自己抗原を認識することによって発症する。活性化した T 細胞は、急性 GVHD では皮膚、腸管や肝臓などの標的臓器に遊走、浸潤し、炎症性サイトカインの産生や細胞傷害性 T 細胞によって組織傷害を引き起こすと考えられている。T 細胞に非自己抗原の提示を行う主要組織適合遺伝子複合体（Major histocompatibility complex: MHC）の不適合は GVHD 発症に強く関与するとされる。また、MHC 適合移植においては、MHC 以外の組織適合抗原であるマイナー組織適合抗原の一塩基多型（Single nucleotide polymorphism: SNPs）などによる相違によって GVHD を誘導しうる¹。

GVHD は発症時期によって急性、慢性に二分される。慢性 GVHD は、同種移植を施行した患者の 60-80%にみられるとされ²、以前は移植後 100 日以降に発症した GVHD と定義された。しかし、移植前処置強度や免疫抑制剤の使用方法の多様化により、急性および慢性 GVHD が必ずしも発症時期によって分類し得ない例が多く見られるようになった。この流れにもとづき、2005 年には新たに病態に基づく慢性 GVHD の定義が提唱された³。慢性 GVHD は急性 GVHD とは異なり、多臓器に渡る自己免疫疾患に類似した病態を呈し、皮膚や肝、肺や唾液腺などの複数の臓器にわたって線維化を伴う臓器障害を認める³⁻⁶。また、免疫不全や血球減少を合併することも多く見られ、患者の予後や QOL を長期にわたって悪化させる⁷。

急性 GVHD は、近年シクロスポリンやタクロリムスに代表される免疫抑制剤の使用法の確立によって、臨床的にコントロールされ長期生存患者の増加が見込めるようになった一方で、慢性 GVHD においては、その病態基盤が未だ明らかとなっておらず、診断や治療においても大きな課題が残されている⁴。慢性 GVHD が同種免疫によってどのように誘導され、また維持されるかについては、未だ不明な点が多く残されている。

慢性 GVHD の免疫学的な病態基盤の理解のためには、病原性 T 細胞の動態を理解する必要がある。移植後慢性期におけるドナー由来の同種 T 細胞は、大きく 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。通常移植された T_G は、移植後

2-3 日で速やかに抗原提示を受け増幅し、肝臓や皮膚、腸管などの標的臓器へと浸潤し、急性 GVHD を誘導する⁸。しかし、移植後約 50 日を経ると contraction を経て大幅に減少していくことが GVHD 誘導マウスにおいて示されている⁹。一方、他の同種移植マウスモデルにおいては、T_{HSC} は移植後一ヶ月を経て再構築されるが、ヒトにおける T_{HSC} の再構築は、若年であれば移植後 100 日以降で見られるものの、壮年から高齢の患者においては 1-2 年を要するともされる¹⁰⁻¹²。すなわち、これらの時期は T_G ならびに T_{HSC} の両者がレシピエント体内に共存しているといえ、T_G ならびに T_{HSC} の、慢性 GVHD の誘導や維持への相対的な関与については依然議論の余地がある。

T_{HSC} の慢性 GVHD への寄与については、いくつかのマウスモデルによって検証されている。GVHD によって障害を受けた胸腺にて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 GVHD を誘導する^{13,14}。これらの T_{HSC} が晩期に誘導される慢性 GVHD に寄与し、さらに長期に渡る遷延化した病態を形成するには、障害を受けた胸腺からの継続的な病原性 T_{HSC} の供給が必要となると考えられる。しかし、臨床的には、特に年齢を重ねるほどに胸腺機能の回復が障害され、T_{HSC} の供給が低下するとされる¹⁵。さらには GVHD の発症そのものがリンパ球分化を著しく低下させ^{16,17}、胸腺分化も障害しその供給を低下させる^{18,19}。このことは、加齢や GVHD 発症という条件によって、慢性 GVHD 誘導へ寄与するほどの T_{HSC} の供給そのものがなされない可能性を示唆する。さらに、Hossain らは慢性 GVHD 誘導マウスモデルにおいて、T_{HSC} の供給が抑制された条件下では、T_G が 100 日以降にわたって遷延化していることを示している²⁰。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、慢性期にわたって T_G が遷延化し病原性を維持している場合は、通常の T 細胞動態と逸脱した動態を示している可能性が示唆される。通常、慢性的な抗原提示によって遷延化した T 細胞は通常 T 細胞疲労 (exhaustion) や複製老化 (replicative senescence) に至り、増殖能や炎症性サイトカイン産生能は徐々に低下するとされる^{21,22}。このように、遷延化した T_G の機能低下や T_{HSC} の供給低下が考慮される環境下において、それぞれが慢性 GVHD の誘導および維持にどのように関与しているか、検証すべきである。

マウスにおける GVHD モデルには、ドナー、レシピエントマウス間の MHC 不適合移植モデル、もしくはマイナー組織適合抗原不適合モデルがある。臨床における多くの移植は HLA すなわち MHC 適合移植であり、マイナー組織適合抗原不適合移植である。我々は今回、C57BL/6 (B6, H-2b) をドナーとし、C3H.Sw (C3H, H-2b) をレシピエントとしたマイナー組織適合抗原不適合同種移植モデルを用い、さらに慢性 GVHD 誘導レシピエントにおいては慢性 GVHD の組織学的変化を満たすモデルを作製した。このモデルにおいて、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

とし、さらに T_G および T_{HSC} の選択的除去を行うことで、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。

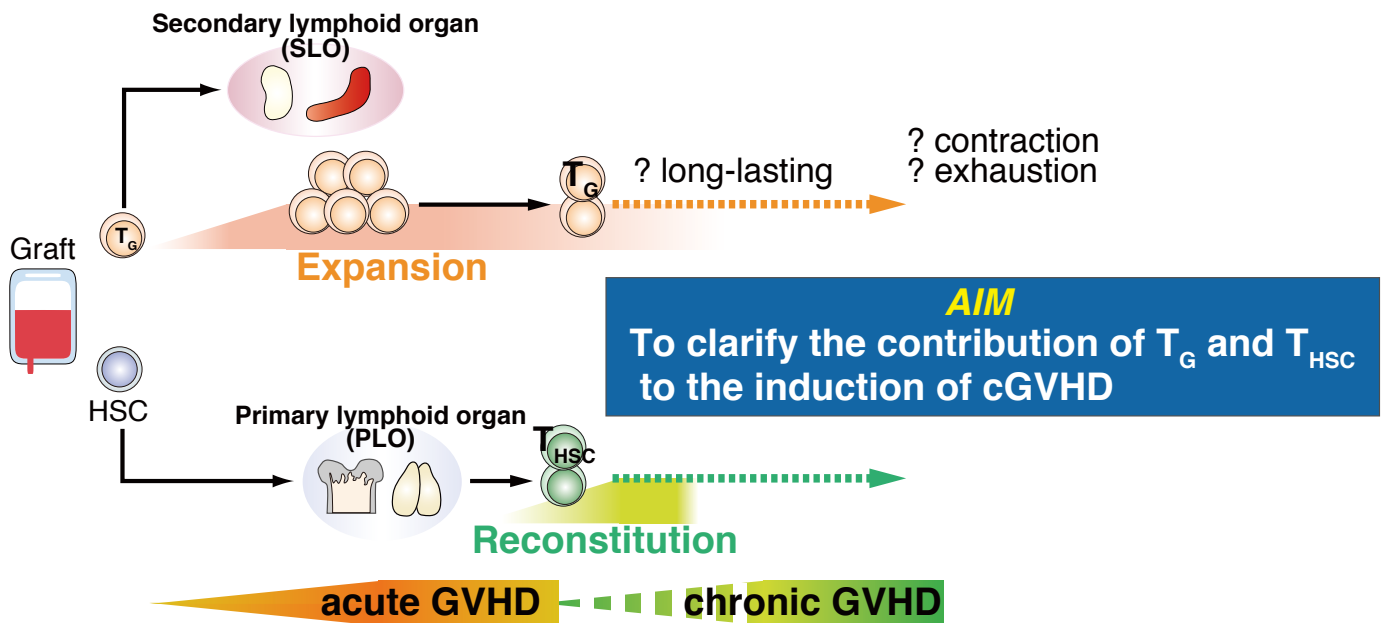


図1 T_G および T_{HSC} と慢性 GVHD の病態への寄与

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 hematopoietic stem cell transplantation
B6	C57BL/6J mouse
BrdU	Bromodeoxyuridine
BMT	Bone marrow transplantation (bone marrow transfer)
C3H.Sw	C3H.SW-H2b mouse
CLP	common lymphoid progenitor
DMSO	dimethyl sulfoxide
DP	CD4 ⁺ CD8 ⁺ double positive thymocyte
FBS	fetal bovine serum
GVHD	graft-versus-host disease
HLA	Human leukocyte antigen
HSC	Hematopoietic stem cell
MHC	Major histocompatibility complex
OCT	optimal cutting temperature
PBS	phosphate phosphate-buffered saline
PFA	paraformaldehyde
QOL	quality of life
TBI	total body irradiation
TCD BM	T cell depleted bone marrow
T _G	donor T cell derived from graft
T _{HSC}	donor T cells reconstituted from HSC
TGF-β	Transforming growth factor-β
Treg	regulatory T cells

実験方法

1. 実験材料

1.1 マウス

C57BL/6J マウス(B6; H-2^b, CD45.2⁺, Thy1.2)は 6 から 8 週齢の動物を日本 CLEA 社より購入した。C57BL/6J, SJL マウス (B6.SJL; Ptp^{ca} Pep^{cb}, CD45.1⁺, Thy1.2) , C3H.SW-H2b (C3H; H-2^b, CD45.2⁺, Thy1.2)および C57BL/6J-Igh^a-Thy1^a-Gpi^a (B6.Thy1^a; H-2^b, CD45.2⁺, Thy1.1) は Jackson 研究所より購入した。また、B6 バックグラウンドコンジェニックストレインマウスを掛けあわせ、CD45.1⁺CD45.2⁺Thy1.2⁺および CD45.1⁺CD45.2⁺Thy1.1⁺マウスを得た。これらのマウスはそれぞれ分子予防医学教室動物飼育施設内にて繁殖、飼育して用いた。全ての動物は SPF 環境下で飼育し、東京大学動物実験指針に則って実験を行った。

1.2 蛍光標識抗体・タンパク

<フローサイトメトリー>

未標識、ビオチン標識ないし蛍光標識抗マウス CD3 (17A2)、CD4 (RM4-5)、CD8 (53-6.7)、CD11b (M1/70)、CD16/32 (93)、CD19 (1D3)、CD34 (RAM34)、CD43 (1B11)、CD44 (IM7)、CD45.1 (A20)、CD45.2(104)、B220 (RA3-6B2)、CD48 (HM48-1)、CD62L / L-セレクチン (MEL-14)、CD69 (H1.2F3)、CD127 (B12-1)、CD150 (9D1)、CD229 (30C7)、TER-119 (TER-119) 、Ly-6C (HK1.4) 、Ly-6G/C / Gr-1 (RB-68C5) 、NK1.1 (PK136)、IgM (II/41) 、CD25 / IL-2R α 鎖 (7D4) 、TCR β (H57-597) 、Sca-1 (E13-161.7)、TNF α (MP6-XT22) 、IFN γ (XMG1.2)、Foxp3 (FJK-16S)、BrdU (3D4)、PD-1 (RMP1-30)、モノクローナル抗体およびストレプトアビジンは、BD Pharmingen 社、eBioscience 社、Biolegend 社より購入した。

<免疫染色>

ビオチン標識抗マウス Pan Endothelial (MECA-32)モノクローナル抗体、未標識抗マウス Collagen I ポリクローナル抗体、抗マウス Lyve-1 ポリクローナル抗体は R&D Systems 社、LSL 社より購入した。未標識ないしビオチン標識抗体の可視化および蛍光標識抗体のシグナル増強に用いた Alexa Fluor 標識抗ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ IgG ポリクローナル抗体、抗 fluorescein isothiocyanate (FITC) ポリクローナル抗体、ストレプトアビジンは Invitrogen 社より購入した。

2. 方法

2.1 マウス処置

2.1.1 allo-HSCT モデルマウスの作製

レシピエントマウス (C3H.Sw) に計 9 Gy の X 線を照射した。X 線照射は消化管障害を避けるために 3 時間以上の間隔を空けてそれぞれ半量の 4.5 Gy ずつを 3 時間以上の間隔を空けて 2 回に分けて全身照射し、翌日に 5×10^6 個の T 細胞除去骨髓細胞 (TCD BM) のみ、または $3-4 \times 10^6$ 個の T 細胞とともに、200 μ L の RPMI 1640 medium (Sigma 社) に懸濁し、尾静脈より移入した。

2.1.2 移植細胞の調整

TCD BM はドナーマウス的大腿骨と下腿骨より無菌的に回収した細胞懸濁液から、Percoll (Sigma 社) による密度勾配遠心により赤血球を除去した後、autoMACS (Miltenyi Biotec 社) を用いて CD90.2 陽性細胞を磁氣的に除去することで調整した。除去効率はフローサイトメトリーによって確認し、除去したい T 細胞が 1%以下であることを確認した。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、autoMACS を用いて CD11b、B220、TER-119、NK1.1、c-kit および陽性細胞を磁氣的に除去することで調製した。脾臓から精製された T 細胞が 80%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。

2.1.3 マウスの観察

臨床的 GVHD の評価方法は Cooke らより提唱されたスコアリングシステムを用い、以下の 5 項目 (体重減少、姿勢、活動性、体毛の毛羽立ち、皮膚) の指標に基づいて行い、GVHD の最重症を 10 点として計算した²³。

2.1.4 抗体投与 (depletion)

T_G および T_{HSC} の選択的な除去を目的として purified ラット IgG2b 抗マウス Thy1.2 抗体 (clone 30H12, BioXcell 社)、またはコントロール抗体としてラット IgG2b 抗体 200 μ g を 200 μ L の PBS に溶解したものを、移植後 21 日、24 日および、31 日後より 1 週おきに 63 日まで継続して腹腔内投与を行った。除去効率はフローサイトメトリーによって確認し、投与 3 日後、7 日後の脾臓、末梢血において 99%以上の標的 T 細胞が除去されていることを確認した。

2.2 フローサイトメトリー

骨髓はシリンジと針を用いて内部の細胞を回収し、また胸腺や脾臓は細胞懸濁液を 70

μm 径のセルストレーナー (BD 社) を用いて調整した。また、慢性 GVHD の標的臓器である肝臓は、200μm 径のステンレススチールメッシュを用いて調整した。また肺は小さくカットし、0.2%コラゲナーゼ (Roche 社)、2000 U/ml DNaseI (Calbiochem 社) を用い、37℃で 1 時間酵素処理を行った。これらの細胞懸濁液は 40% Percoll (GE healthcare 社) を用い、デブリスや非血液細胞を除去し、また ACK lysing バッファーを用い赤血球の除去を行った。Flow-count ビーズ (Beckman Coulter 社) を用いて細胞数を計数した後、1 検体あたり $1-3 \times 10^6$ 個の細胞を後述の染色に供した。染色後のサンプルは Gallios (Beckman Coulter 社) を用いて解析し、FlowJo (Tree Star 社) によりデータ処理を行った。また、細胞内サイトカイン染色では、 $5-10 \times 10^5$ の白血球を、ionomycin (1 μg/ml)、PMA (25 ng/ml) および Brefeldin A (10μg/ml) を加え、37℃で 4.5 時間から 5 時間刺激した。細胞表面抗原の染色の後、Cytofix/Cytoperm kit (BD Bioscience 社) を用いて細胞の固定と細胞膜浸透化を行い、細胞内サイトカインの染色を行った。また、BrdU 染色は、短時間パルス解析のため、マウス解剖の 1 時間前に BrdU (Sigma-Aldrich 社) を 1 匹あたり 1mg となるように腹腔内投与した。細胞は BrdU flow kit (BD Bioscience 社) を用い細胞表面抗原の染色の後、Cytofix/Cytoperm による細胞の固定と細胞膜浸透化を行った。細胞洗浄後、10% DMSO+90%FBS で組成される凍結溶媒中に-80℃で保存を行った。凍結融解後洗浄し、再度 Cytofix/Cytoperm による細胞の固定と細胞膜浸透化を行い、DNase 処理し BrdU エピトープの露出を行い、BrdU 染色を行った。

2.3 免疫組織学的ならびに病理学的解析

撮影した画像は Photoshop CS2 もしくは 3 (Adobe 社)を用いて処理・解析した。

2.3.1 蛍光免疫組織染色による解析

慢性 GVHD 標的臓器である肝臓、肺は、PBS による還流後に採取し、PBS 中で洗浄後、OCT Compound (Sakura Finetek 社) 中に包埋の上、液体窒素を用いて急速凍結させた。クリオスタットを用いて凍結組織ブロックより 6-8 μm 厚の薄切切片を作製し、シランコートスライドグラスアクア (Dako 社) に貼付後、室温にて 2 時間風乾したものを染色に用いた。乾燥組織切片は、冷アセトンにより 10 分間処理後、室温にて 10 分間 PBS による水和を行った。さらに 2 分間 0.05% Tween20 / PBS (PBT) により透過処理を行った後、室温にて 20 分間、Blocking One (ナカライテスク社) を用いてブロッキングを行った。ブロッキング後、1 次抗体を含む 1 次染色液を室温にて 1 時間反応させ、PBT で 3 回洗浄後、蛍光標識抗体、ストレプトアビジンを含む 2 次・3 次抗体染色液とそれぞれ 37℃にて 30 分間反応させた。反応終了後の切片を PBS で 3 回洗浄後、4% パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) / PBS で 10 分間室温にて固定し、蒸

留水で洗浄後 Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen 社) を用いて封入した。封入したスライドは室温にて一晩放置して封入剤が硬化した後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 IX70 (Olympus 社) および HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence 社) を用いて観察、撮影を行った。

2.3.2 ヘマトキシリン・エオジン染色による解析

2.3.1 と同様の方法で、全身還流後、肝臓、肺および唾液腺を摘出した。皮膚は脱毛処理を加えた後摘出した。摘出した臓器は、PBS で洗浄し水分を拭った後、一辺が 5-10 μm 以下になるようトリミングを行い、4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) / PBS 固定液に浸漬した。脱水・置換した後、パラフィン浸透させた。パラフィンを整形後、ミクロトームにて薄切切片を作成し、シランコートスライドガラスアーク (Dako 社) に貼付後、室温にて 2 時間風乾したものを染色に用いた。乾燥組織切片は、室温にて PBS により 10 分間水和処理した後、1%グルタルアルデヒド (ナカライテスク社) / PBS で 10 分間固定した。蒸留水で 2 回洗浄後、室温にて 20 分間、蒸留水にて 10%に希釈したヘマトキシリン (Wako 社) を室温にて 5 分間反応させ、流水で 5 分間穏やかに洗浄した。蒸留水に 1 分間浸した後、エオジン (ナカライテスク社) を 3 分間反応させ、100%エタノール (ナカライテスク社) にて 5 回洗浄した。室温にてキシレン (ナカライテスク社) により 5 分間透徹を行い、Entellan new (Merck Japan 株式会社) を用いて封入した。封入したスライドは室温にて一晩放置して封入剤が硬化した後、ライカ DMR 正立顕微鏡 (ライカ社) および BZ-9000 を用いて観察、撮影を行った。

2.3.3 慢性 GVHD 組織学的評価

慢性 GVHD の組織学的評価は、肝、唾液腺、皮膚、肺の病理学的スコアリングシステム²³⁻²⁶に基づき行った。肝臓は、血管周囲の血球浸潤や肥厚の程度を 0 から 4.0 までの点数をつけて評価した。唾液腺は、単核球浸潤および濾胞の破壊の程度を 1 から 4 までの点数で評価した。皮膚は、表皮の障害、真皮の障害、または炎症細胞浸潤、脂肪組織の障害または毛根の障害、それぞれについて 0 から 2 までの点数で評価した。

2.4 統計解析

2 群間の統計解析には Welch' s t-test を、3 群以上の多群解析には一元配置分散分析 (one-way analysis of variance (1-way ANOVA)) を用い Dunnett 検定により対照群とそれ以外の群の差の統計学的有意性を判定した。生存検定には Mantel-Cox log-rank test を、いずれも GraphPad Prism (GraphPad software 社) を用いて行った。全ての統計解析において、 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとみなした。

実験結果

1. マイナー組織適合抗原不適合移植マウスにおける慢性 GVHD の進展

ドナーT細胞を移植片由来T細胞(T_G)もしくは新規に再構築されたT細胞(T_{HSC})のそれぞれが慢性GVHD誘導に果たす役割を評価するため、ドナーにコンジェニックマーカーを用いて分離することが可能となる慢性GVHDマウスモデルの確立を行った。レシピエントにC3H.Sw (C3H; KbDbI-AbI-Eb, CD45.2+, CD229.1+)マウス、ドナーにC57BL/6 (B6; KbDbI-AbI-Eb, CD45.2+)を用いて移植を行った。慢性GVHD誘導群(cGVHD)には脾臓由来のT細胞およびT細胞除去した骨髄細胞を、コントロールとしてのBMT群(BMT)にはT細胞除去した骨髄細胞のみをB6ドナーから尾静注した。cGVHD群では、移植後14日頃より遷延する体重減少ならびにGVHDスコアの上昇を認めた。また、cGVHD群では、移植後35日頃より生存の低下が見られた(Fig. 1 A-C)。

次に、慢性期としての移植後63日における標的臓器(唾液腺、皮膚、肝臓、肺)の病理像を評価した。ヒトにおけるNIHクライテリア⁵を元に、慢性GVHDに特徴的な組織学的変化をきたしているかどうかを検討した。BMT群ではほぼ正常組織であるのに対し、cGVHD群の唾液腺において導管周囲に炎症細胞浸潤や線維化を認め、また腺房の破壊が見られた(Fig. 1 D)。cGVHD群の皮膚では、脂肪組織の線維化と表皮の肥厚がみられ(Fig. 1 D)、さらに肝臓では門脈周囲の炎症細胞浸潤に伴う線維化(Fig. 1 D,E)を、また肺では気管周囲の炎症細胞浸潤および血管周囲の線維化を認めた(Fig. 1 D,E)。さらに、病理学的スコアリングシステム²²⁻²⁵に基づいて評価を行い、標的臓器すべてにおいてcGVHD群で高い傾向を認め、特に唾液腺、肝臓では有意に高値であった(Fig. 1 F)。以上より、B6ドナーより移植したC3H.Swレシピエントにおいては、ヒトの慢性GVHDに類似した病態が誘導されることが示された。

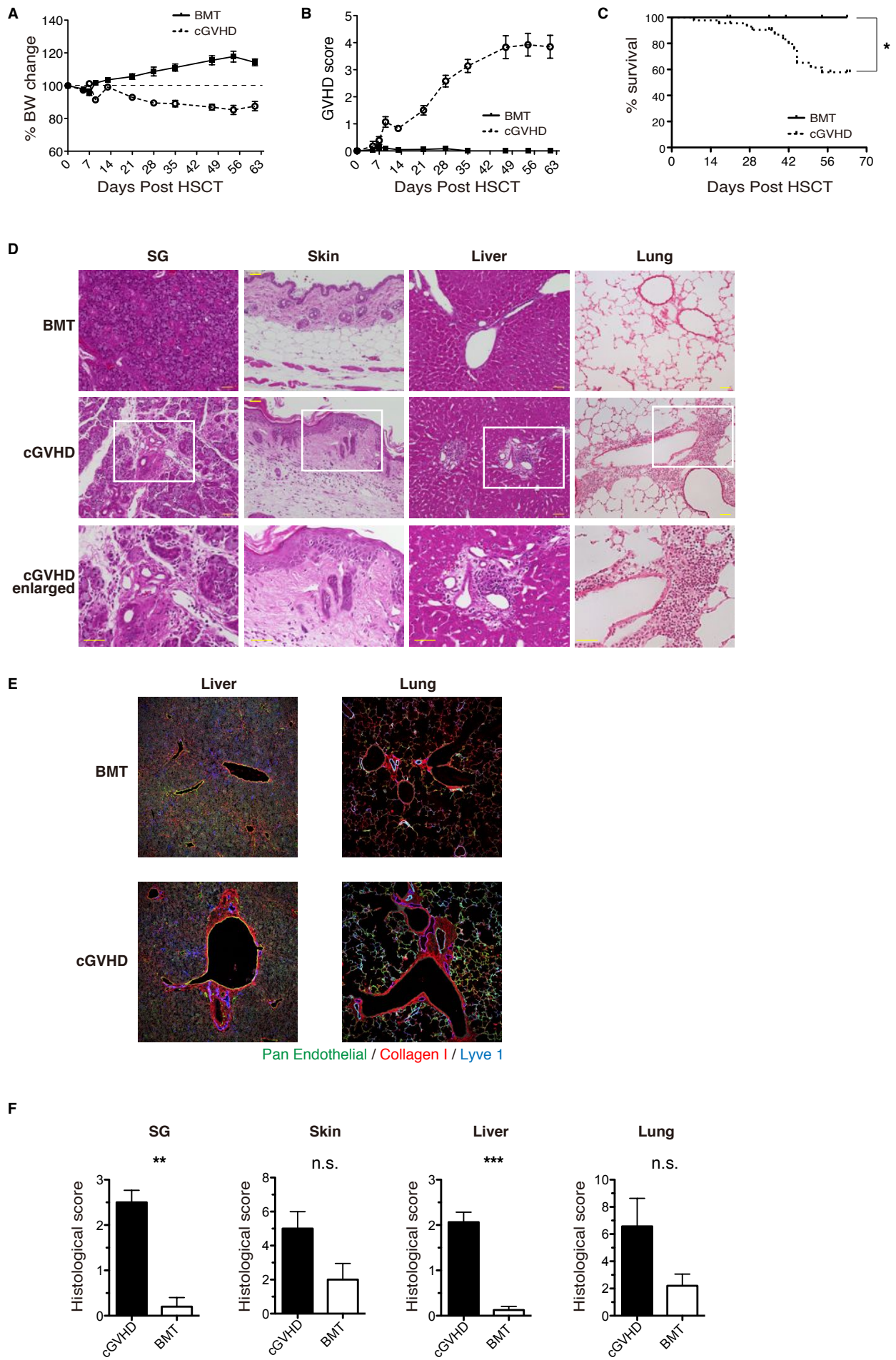


Figure. 1 [B6->C3H.Sw]モデルにおける慢性 GVHD の進展

Figure. 1 [B6->C3H.Sw]モデルにおける慢性 GVHD の進展

C3H.SW マウスに 9Gy の全身放射線照射を施行し、B6 マウスからの T 細胞を除去した骨髄細胞のみを移植 (BMT 群)、もしくは T 細胞除去骨髄細胞に脾臓由来 T 細胞 ($3-4 \times 10^6$) を加えて移植 (cGVHD 誘導群) を施行した。移植後 63 日にわたるまで (A) 体重、(B) GVHD スコア、さらに (C) 生存をそれぞれ評価した。唾液腺、皮膚、肝臓および肺における HE 染色像 (Scale bar 50 μ m) (D)、ならびに肝臓と肺における免疫蛍光染色 (E) を示した (緑, pan-endothelial, 赤, collagen1, 青, lyve-1)。唾液腺、皮膚、肝臓および肺における組織学的スコアリングを (F) に示す。 (n.s., not significant; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; (cGVHD 誘導群 vs. BMT 群))

2. 慢性 GVHD における HSC 由来 T 細胞再構築の評価

慢性 GVHD の病態形成には HSC 由来 T 細胞 (T_{HSC}) の関与が示唆されている一方で、多くの臨床および基礎研究報告より、急性ならびに慢性 GVHD 環境下においては T_{HSC} の再構築が著しく障害されていることが示唆されている^{3,18,27}。このような再構築障害が見られる環境下における T_{HSC} の病態形成への関与を評価するために、我々はドナーにコンジェニックマウスを用い、 T_{HSC} および T_G を分離する方法を用いた。T 細胞除去骨髄ドナーに $CD45.1^+ CD45.2^+$ マウスを用い、脾臓ドナーに $CD45.1^+ CD45.2^-$ を用いることで、それぞれ T_{HSC} 、 T_G の分離を可能とし、さらにレシピエント由来 T 細胞との分離も可能とした (Fig. 2 A)。

次に、慢性 GVHD 誘導下での T_{HSC} 再構築を評価するため、胸腺における $CD4^+ CD8^+$ (DP) 胸腺細胞数の時間的推移を検討した (Fig. 2 B)。移植 14 日目より BMT 群では DP 細胞の著明な回復を認めるのに対し、cGVHD 群では DP 細胞数の著しい低下が見られた。cGVHD 群では移植後 35 日頃に遅れて回復傾向が見られるものの、その後においても BMT 群と比べ、少なくとも 10 分の 1 と大幅な減少が認められた。以上より、慢性 GVHD 誘導下では、 T_{HSC} 再構築の遅延と障害が生じることが示唆された。

3. T_{HSC} および T_G の慢性 GVHD 標的臓器への浸潤と病態への関与

次にドナー T 細胞の慢性 GVHD 標的臓器への浸潤を評価した。標的臓器として肝臓および肺を用い、また二次リンパ組織として脾臓を用い、移植後 63 日における $CD3^+$ T 細胞数を検討した。cGVHD 群では、肝臓、肺で BMT 群と比べ明らかに多くの T 細胞浸潤を慢性期まで長期にわたって認めるのに対し、脾臓では cGVHD 誘導群では BMT 群と比べ明らかに T 細胞数の低下が見られた (Fig. 2 C)。以上より、cGVHD 誘導下では、T 細胞は標的臓器により多く浸潤し、集積することが示された。

次に、標的臓器およびリンパ組織における $CD4^+$ および $CD8^+$ T 細胞の由来を、先述したコンジェニックシステムを用いて検討した。肝臓および肺、さらに脾臓での T_G および T_{HSC} の時間推移を追った (Fig. 2 D)。まず $CD4^+$ T 細胞、 $CD8^+$ T 細胞両者において T_G が移植後 21 日以降も遷延して肝臓、肺、脾臓に集積し、一方 T_{HSC} は時間経過に伴い集積していく傾向が見られた。 T_{HSC} の供給が認められるのにもかかわらず、 T_G は一貫して T_{HSC} より優位であり、特に $CD8^+$ T 細胞では移植後 63 日においても約 10 倍と著明な差が見られた。

以上より、慢性 GVHD 誘導マウスでは、標的臓器への T 細胞の浸潤が遷延して認められ、さらに由来毎の評価により慢性期に渡るまで T_G が優位であることが示された。また、このことは、 T_G が慢性 GVHD 病態誘導に強く寄与している可能性を示唆する。

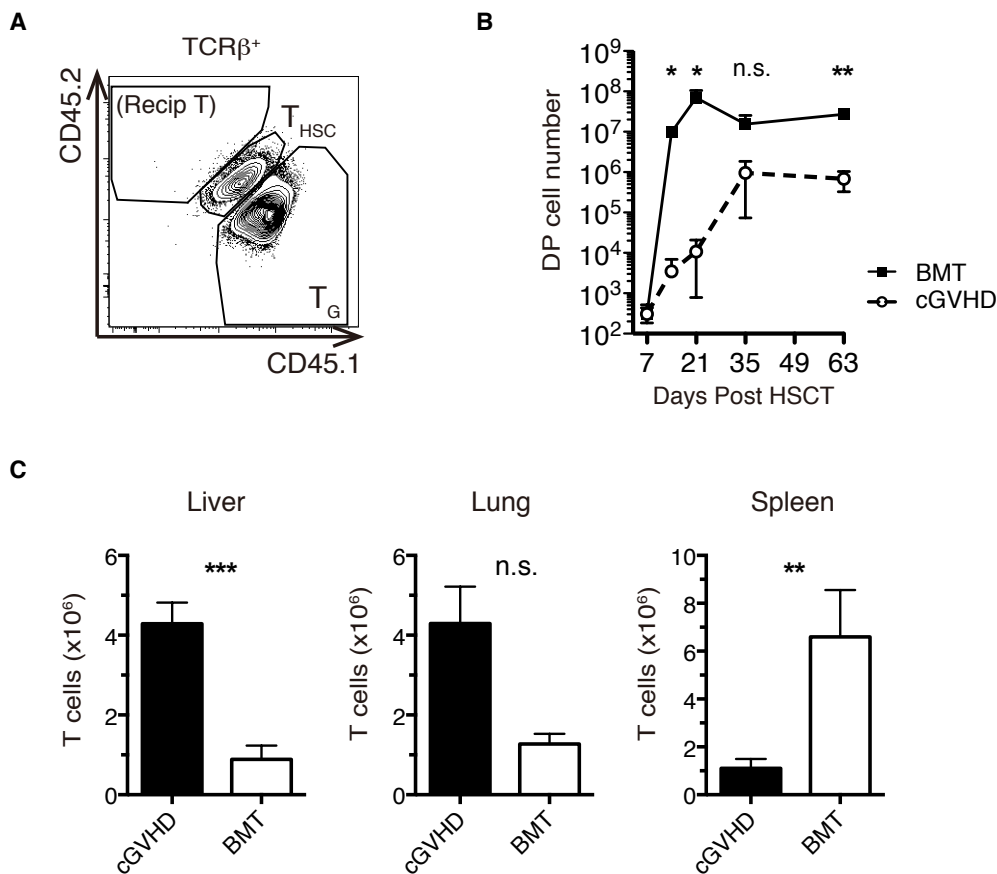


Figure 2.1 慢性 GVHD における HSC 由来 T 細胞再構築の評価

CD45.1⁺ CD45.2⁺ T 細胞除去骨髄、CD45.1⁺ CD45.2⁻脾臓由来 T 細胞を用いて、T_Gおよび T_{HSC}を分離し解析を行った。(A)はフローサイトメトリのプロットを示す。(B)胸腺における T 細胞再構築を、HSC 由来 CD4⁺ CD8⁺ double positive (DP) 胸腺細胞の時間的推移にて評価した。(C)移植後 63 日における慢性 GVHD 標的臓器である肝臓、肺と、脾臓における T 細胞の分布を示した。(n.s., not significant; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; (cGVHD 誘導群 vs. BMT 群 [B, C])

D

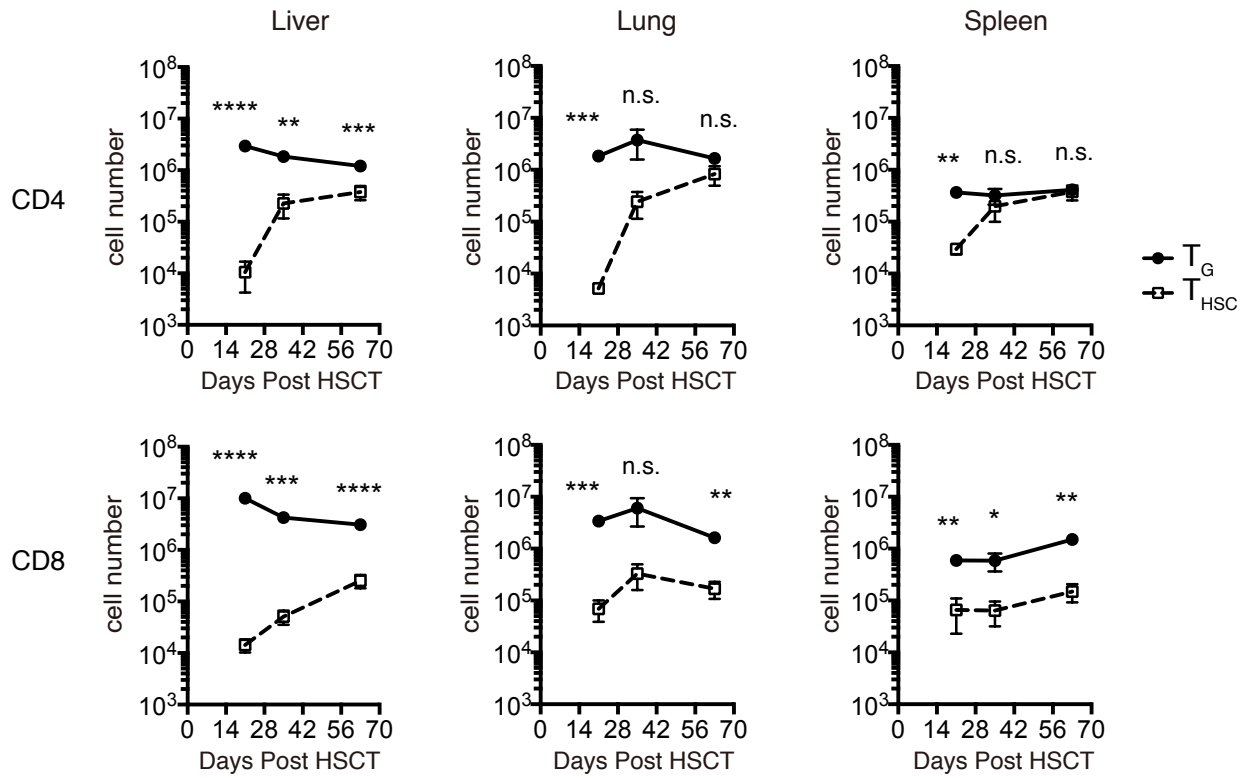


Figure 2.2 T_G の慢性 GVHD 標的臓器への浸潤と数的優位性

(D) 肝臓、肺、さらに脾臓における T_G (実線) と T_{HSC} (点線) 細胞数の時間的推移を評価した。(n.s., not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ (T_G vs. T_{HSC} [D]))

4. 慢性 GVHD の標的臓器に浸潤する T_G の機能評価

次に我々は、慢性 GVHD 標的臓器に遷延して存在する T_G が慢性期にわたるまで機能を維持しているかどうか評価を行った。CD8⁺ T 細胞は慢性感染²⁸や担癌状態^{29,30}、さらに GVHD²¹などの抗原暴露が遷延した環境では、exhaustion や senescence に至るとされる。我々は、T_G, T_{HSC} それぞれにおいて exhaustion マーカーである PD-1 ならびに LAG-3 の発現や senescence / terminal differentiation マーカーである KLRG-1 の発現を評価した (Fig. 3 A)。T_{HSC} と比べ T_G では PD-1、LAG-3 さらに KLRG-1 いずれの発現も高く認められた。また、T_G は CD44⁺ CD62L⁻ で示される effector フェノタイプであり、さらに naïve, central memory マーカーである IL-7Rα の発現は、T_G で明らかに T_{HSC} より低下が認められた (Fig. 3 B)。さらに early activation マーカーである CD69 の発現は、T_G と T_{HSC} では同等の発現であった (Fig. 3 C)。さらに、PD-1⁺ 細胞は、CD8⁺ T_G において移植後時間経過とともに減少傾向が見られ、移植後 63 日では約 40% が陰性であることが示された。同時に、高い細胞傷害性を有する PD-1^{low} KLRG-1^{high} CD8⁺ T 細胞は、T_{HSC} では移植後 63 日でほとんど認められないのに対し、T_G では移植後 21 日から 63 日にかけて時間経過とともに増加が見られた (Fig. 3 D)³¹。一方で、T_{HSC} では、PD-1^{low} KLRG-1^{low} が大部分を占めていた。一方、CD4⁺ T 細胞においては、T_G と T_{HSC} 前述の表面マーカーの発現に差を認めなかった (Fig. 3 E)。

さらに移植後 63 日において標的臓器に浸潤する T 細胞のサイトカイン産生能を調べた。PMA および ionomycin による ex vivo での刺激による IFNγ および TNFα 産生細胞の割合は、CD4⁺ T_G および CD8⁺ T_G いずれも T_{HSC} と比べ同等であった (Fig. 3 F)。一方、標的臓器への浸潤は細胞数において T_G が T_{HSC} を優位に上回っていることから、炎症性サイトカインを産生する T 細胞の大部分が T_G であると言える。また、我々はさらに T_G および T_{HSC} の局所での増殖能を in vivo での BrdU 標識によって検討した。移植後 63 日において cGVHD 誘導マウスに BrdU を腹腔内投与し、1 時間の標識の後、解析を行うことで局所での増殖能を評価した (Fig. 3 G)。標的臓器における BrdU⁺ で示される増殖細胞の割合をみると、CD4⁺ T_{HSC} が CD4⁺ T_G より有意に増殖能が高かったのに対し、CD8 においては T_G と T_{HSC} で同等であった。さらに標的臓器に浸潤する BrdU⁺ CD4⁺ T 細胞数は T_G と T_{HSC} の間で移植後 63 日では同等であるのに対し、BrdU⁺ CD8⁺ T 細胞では移植後 63 日において T_G が有意に T_{HSC} より多く認められた。

以上より、標的臓器内の T_G は、慢性期に渡って炎症性サイトカイン産生能や増殖能を維持し、さらに遷延化した T_G は、新規に供給された T_{HSC} に比べ、標的臓器内における effector CD4⁺ T および CD8⁺ T 細胞の供給源として優位であることが示された。

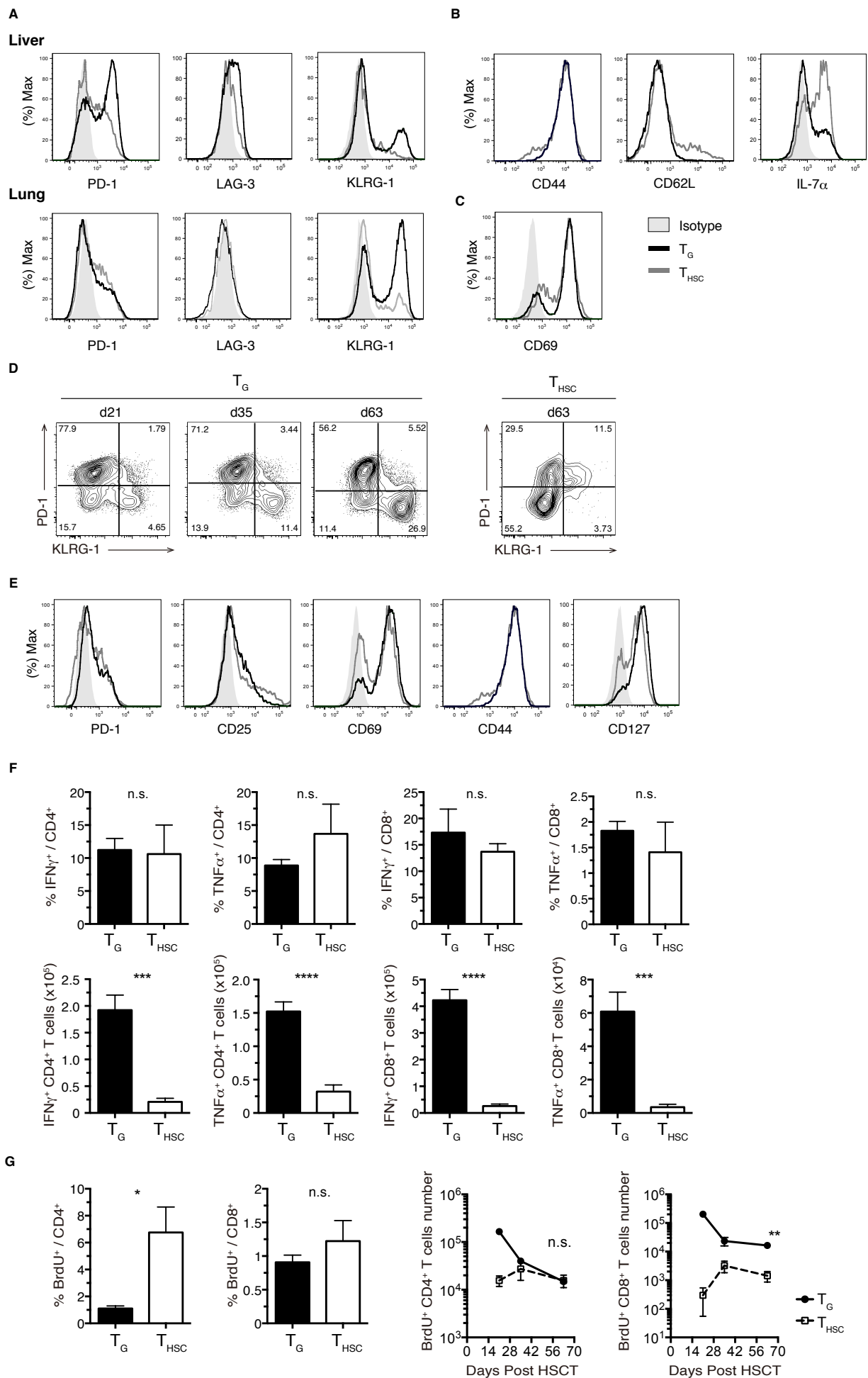


Figure. 3 慢性 GVHD の標的臓器に浸潤する T_G の機能評価

Figure. 3 慢性 GVHD の標的臓器に浸潤する T_G の機能評価

(A-D) 慢性 GVHD 標的臓器内（肝臓、肺）における CD8⁺ T_G および T_{HSC} における exhaustion および replicative senescence マーカー、もしくは活性化マーカーをフローサイトメトリーにて解析した。(A) 移植後 63 日における肝臓と肺、(B, C) 移植後 63 日における肝臓、(D) 肝臓における KLRG-1 および PD-1 のプロットの時間的推移を示した。(E) 移植後 63 日の肝臓における CD4⁺ T_G および T_{HSC} の exhaustion および senescence マーカー、活性化マーカー発現を評価した。

(F) 移植後 63 日の肝臓における CD4⁺ または CD8⁺ における T_G ならびに T_{HSC} の IFN γ および TNF α 産生能を細胞内染色によって評価した。上段は IFN γ ⁺ および TNF α ⁺ 細胞の割合を、下段は IFN γ ⁺ および TNF α ⁺ 細胞数を示した。

(G) BrdU をレシピエントの腹腔内より投与し、1 時間後の肝臓における BrdU 標識細胞を評価した。上段は BrdU 標識細胞の割合を、下段は BrdU 標識細胞数を示した。

(n.s., not significant; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001 (T_G vs. T_{HSC}))

5. T_G および T_{HSC} の慢性 GVHD 病態形成への寄与の評価

遷延した T_G および新規に供給された T_{HSC} の慢性 GVHD 病態形成への寄与を評価するため、Thy1.1/1.2 コンジェニックスシステムならびに抗マウス Thy1.2 抗体を用いて、選択的な T_G または T_{HSC} の除去を行った。選択的に T_G を除去した群を cGVHD + dep T_G 群、選択的に T_{HSC} を除去した群を cGVHD + dep T_{HSC} 群、さらには、T_G、T_{HSC} を共に除去した群を cGVHD + dep T_G / T_{HSC} 群とした。cGVHD 誘導マウスは移植後 21 日および 24 日に抗マウス Thy1.2 抗体を腹腔内投与し、さらにそこから毎週の投与を移植後 63 日にかけて継続して施行した (Fig. 4 A)。この手法により、Thy1.2⁺細胞は 99%以上の除去効率が得られている。

T_G は数的、機能的に優位であるにも関わらず、cGVHD + dep T_G 群では生存の改善効果を認めず、cGVHD 誘導群と同等であった (Fig. 4 B)。さらに移植後 63 日における組織学的評価においても、標的臓器における線維化や炎症細胞浸潤の改善を認めず、cGVHD 群と同等であった (Fig. 4 C)。このことは、T_G が慢性期まで炎症誘導作用を保持し多数を占めているのにも関わらず、T_G の選択的除去を開始した慢性期以降においては、T_G が直接的に関与せずとも慢性 GVHD が進展していく可能性を示唆している。

次に T_{HSC} の慢性 GVHD への寄与を、T_{HSC} の選択的除去によって評価した。すると驚くべきことに、cGVHD + dep T_{HSC} 群では除去開始より速やかに生存の低下を認め、投与 3 週間以内には全例の死亡を認めた (Fig. 4 D)。ここで、cGVHD + dep T_{HSC} 群で見られた急激な致死的な悪化が、骨髄由来細胞の T 細胞以外の分画への抗マウス Thy1.2 抗体投与の影響ではないことを確認するため、Thy1 を発現する HSC の数を評価した (Fig. 4 D)。移植後 28 日 (1 回目の抗マウス Thy1.2 抗体投与後 7 日後) の骨髄における CD48⁻CD150⁺Lineage⁻Sca-1⁺Kit⁺で示される long-term HSC の細胞数は、cGVHD + dep T_{HSC} 群と cGVHD 群で有意な差は認められなかった (Fig. 4 E)。さらに、Foxp3⁺ Treg の CD4⁺T 細胞における比率においても cGVHD + dep T_{HSC} 群と cGVHD 群で有意な差は認められず、この致死的な悪化が Treg の関与によらないことが示された (Fig. 4 F)。さらには、T_G および T_{HSC} 両者を除去した cGVHD + dep T_G/T_{HSC} 群においては、この致死的な悪化が認められず cGVHD + dep T_{HSC} 群より生存の改善が見られる (Fig. 4 D)。このことは T_{HSC} の除去により T_G のみが残存することが致死的事であることを示しており、慢性 GVHD が惹起される時期において、数的には少ない T_{HSC} が T_G の致死的な障害活性の発現を防ぐのに重要な役割をしている可能性を示唆している。

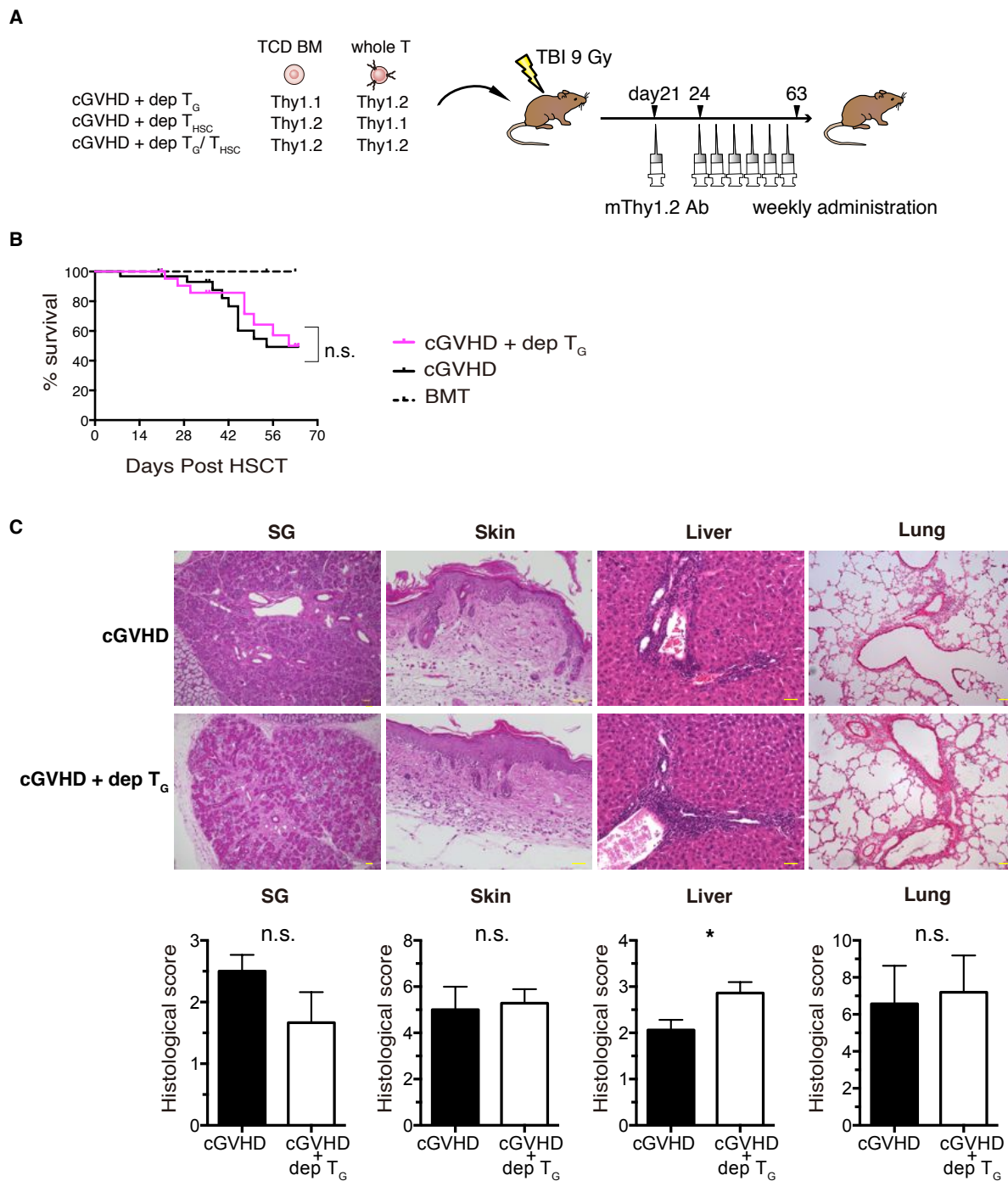


Figure. 4.1 選択的 T_G 除去による慢性 GVHD 病態形成への寄与の評価

(A) Thy1.1/1.2 コンジェニックシステムを用い、さらに移植後 21、24 日さらに以降毎週の抗マウス Thy1.2 抗体を投与し、選択的な T_G または T_{HSC} の除去を行った。選択的に T_G を除去した群を cGVHD + dep T_G 群、選択的に T_{HSC} を除去した群を cGVHD + dep T_{HSC} 群、さらには、T_G、T_{HSC} を共に除去した群を cGVHD + dep T_G / T_{HSC} 群とした。

(B) cGVHD + dep T_G 群および cGVHD 群における生存を移植後 63 日にわたって評価した。(C) 移植後 63 日における (上段) 唾液腺、皮膚、肝臓および肺における HE 染色像 (Scale bar 50μm)、(下段) 組織学的スコアリングを示した。(n.s., not significant; *P < 0.05)

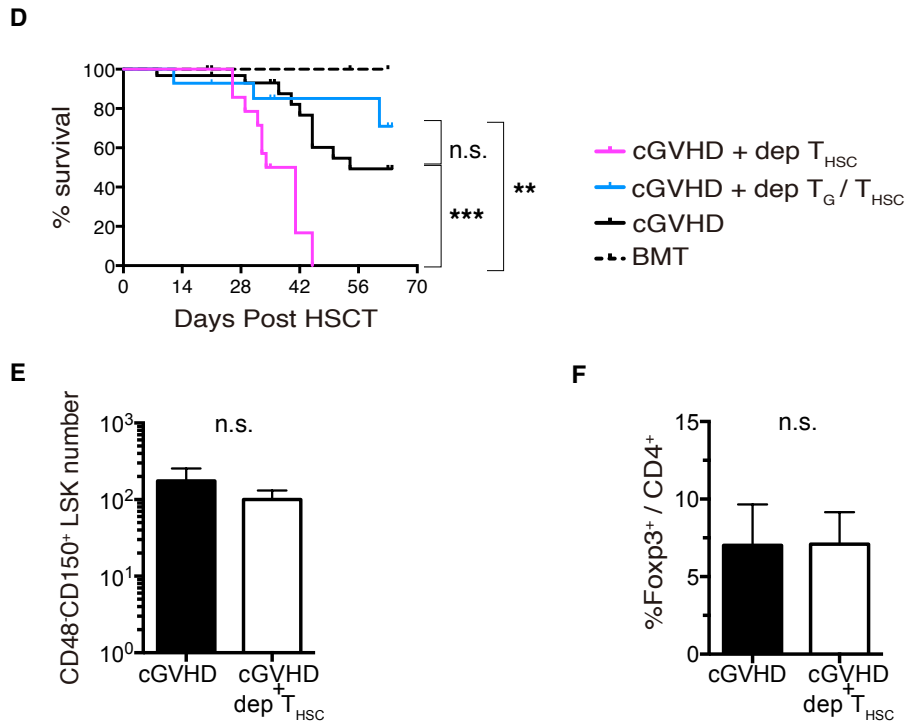


Figure. 4.2 選択的 T_{HSC} 除去による慢性 GVHD 病態形成への寄与の評価

(D) cGVHD + dep T_{HSC} 群、cGVHD + dep T_G / T_{HSC} 群および cGVHD 群における生存を移植後 63 日にわたって評価した。(E) 移植後 28 日 (選択的 T_{HSC} 除去開始から 7 日後) における骨髄中の HSC 数を評価した。(F) 移植後 28 日における肝臓での Foxp3⁺ CD4⁺ 細胞の割合を評価した。(n.s., not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

6. T_G による T_{HSC} の標的臓器内での集積の抑制効果

T_G および T_{HSC} の選択的除去によって、両者はいずれも病原性を有し慢性 GVHD 誘導に関わることが示唆された。さらには、一方の選択的除去により誘導される病態が異なるということは、 T_G および T_{HSC} 両者が異なる性質を有しており、さらに相互に作用しあっている可能性が示唆される。この相互作用を評価すべく、選択的 T_G 除去における T_{HSC} の数的、機能的評価を行い、また逆も同様に施行した。

cGVHD 標的臓器である肝臓、肺および脾臓での選択的 T_G 除去における $CD4^+$ T および $CD8^+$ T 細胞の時間経過的推移をみると、cGVHD + dep T_G 群では抗マウス Thy1.2 抗体投与後より T_G が速やかに減少しているが、その代わりに、移植後 35 日から 63 日にかけて T_{HSC} が cGVHD 群と比べ約 10 倍増加していた (Fig. 5 A)。また T_{HSC} の増加の推移は、cGVHD 群においてもともと見られた T_G と T_{HSC} の数的レベルまで代償するようであり、この代償的な増加は、二次リンパ組織である脾臓に比べ標的臓器である肝臓と肺で顕著に見られる傾向であった。この数的代償が、局所における T_{HSC} の増殖で支持されているかどうかを検証すべく、移植後 63 日での BrdU 標識細胞の割合を評価した (Fig. 5 B)。 $CD4^+$ T および $CD8^+$ T 細胞両者において、cGVHD + dep T_G 群では $BrdU^+$ T_{HSC} が cGVHD 群での $BrdU^+$ T_G および $BrdU^+$ T_{HSC} を合わせた分より上回っており、 T_{HSC} の代償的な増加が、局所での増殖によって補完されたことを示唆する。また、肝臓での $CD8^+$ T 細胞は、cGVHD + dep T_G 群では cGVHD 群と比べほとんどが $CD44^{high}$ のエフェクター細胞となっており、さらに活性化マーカーである $CD69$ および $CD25$ の発現も高くなっている (Fig. 5 D)。また、 $IFN\gamma$ および $TNF\alpha$ 産生細胞の割合は、 $CD4^+$ T および $CD8^+$ T 細胞いずれにおいても、cGVHD + dep T_G 群と cGVHD 群で差がないものの、その内訳は、cGVHD + dep T_G 群では T_G ではなく T_{HSC} が優位となっていた。

以上より、選択的 T_G 除去により、 T_{HSC} は標的臓器内にて T_G の欠失分を数的、機能的に補うことで病態形成に寄与していることが示された。

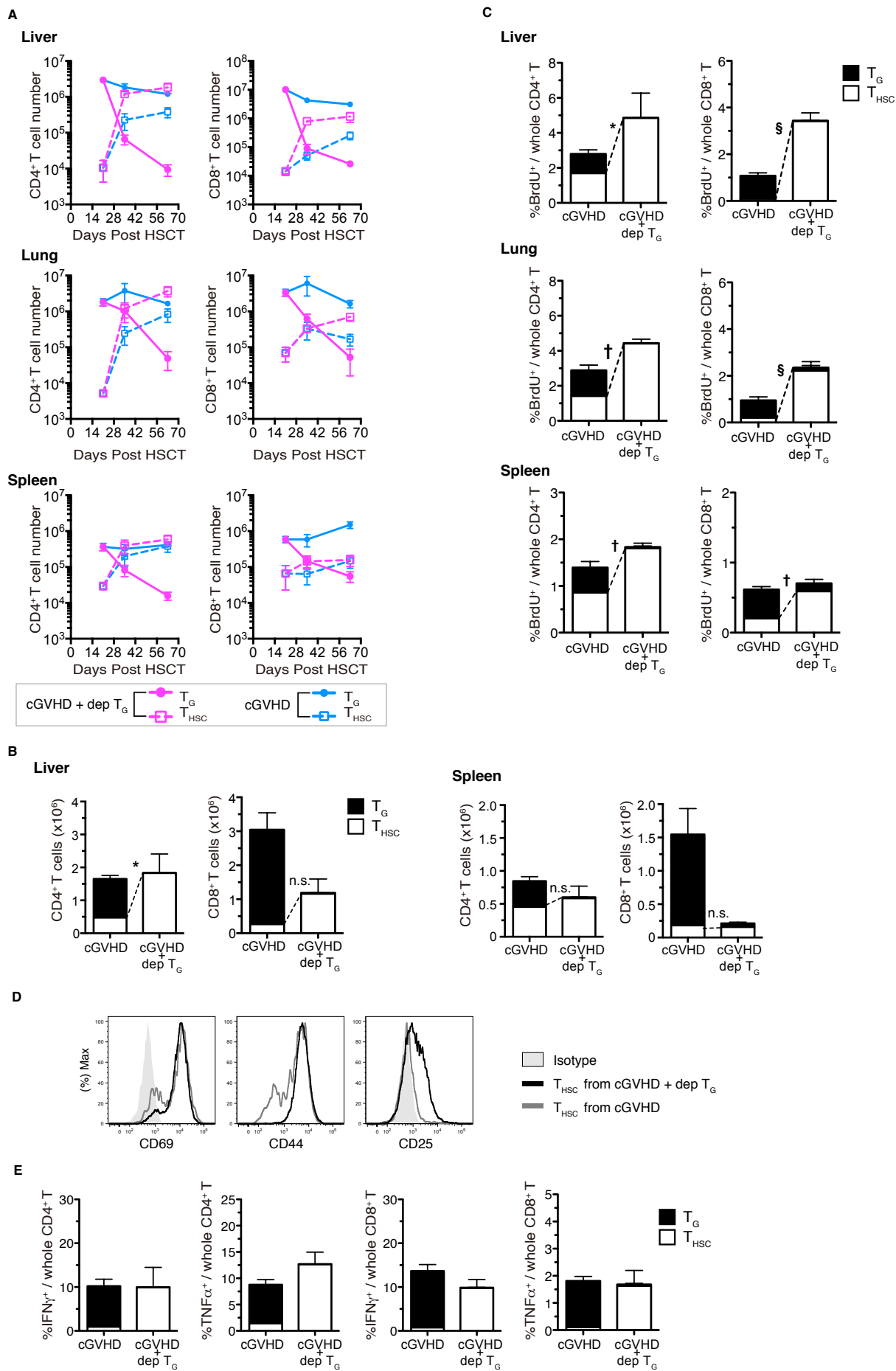


Figure. 5 T_G による T_{HSC} の標的臓器内での集積の抑制効果

Figure. 5 T_G による T_{HSC} の標的臓器内での集積の抑制効果

(A) 肝臓、肺または脾臓における cGVHD + dep T_G 群における $CD4^+$ および $CD8^+$ T_G (マゼンタ、実線)、 T_{HSC} (マゼンタ、点線) および cGVHD 群における $CD4^+$ および $CD8^+$ T_G (ブルー、実線)、 T_{HSC} (ブルー、点線) の時間的推移を比較した。(B) 移植後 63 日における $CD4^+$ および $CD8^+$ T_G (黒)、 T_{HSC} (白) 数を評価した。(n.s., not significant; * $P < 0.05$ (cGVHD 群における T_{HSC} vs. cGVHD + dep T_G 群における T_{HSC}))

(C) 移植後 63 日の肝臓、肺または脾臓における 1 時間パルスでの BrdU 標識細胞の割合を示した。(* $P < 0.05$; † $P < 0.01$; § $P < 0.001$ (cGVHD 群における T_{HSC} vs. cGVHD + dep T_G 群における T_{HSC})) (D) 移植後 63 日の肝臓より、cGVHD 群における $CD8^+$ T_{HSC} と cGVHD + dep T_G 群における $CD8^+$ T_{HSC} の活性化マーカー発現をフローサイトメトリーにて解析した。(E) 移植後 63 日の肝臓における $CD4^+$ または $CD8^+$ における T_G ならびに T_{HSC} の $IFN\gamma$ および $TNF\alpha$ 産生能を細胞内染色によって評価した。 $IFN\gamma^+$ および $TNF\alpha^+$ 細胞の割合を、cGVHD 群と cGVHD + dep T_G 群で比較した。

7. T_{HSC}による T_Gの標的臓器内での活性化の抑制効果

最後に、選択的 T_{HSC} 除去による T_G の数的、機能的変化を検証した。cGVHD + dep T_{HSC} 群では、抗マウス Thy1.2 抗体投与開始後 3 週間で全てのマウスが死亡するという急速かつ致死的な経過をたどるため、抗体投与後 7 日後の移植後 28 日に解析を施行した。

cGVHD + dep T_G 群でみられた T_{HSC} の上昇とは異なり、cGVHD + dep T_{HSC} 群では、肝臓、肺ならびに脾臓においても T_G の代償的増加は認められず、cGVHD 群と同数であった (Fig. 6 A)。さらに、T_G における BrdU⁺ 標識細胞の割合 (Fig. 6 B) や、CD44、CD25、CD69 の発現においても cGVHD + dep T_{HSC} 群と cGVHD 群で差が見られなかった (Fig. 6 C)。一方で、IFN γ および TNF α 産生細胞の割合は、CD4⁺ T 細胞で cGVHD + dep T_{HSC} 群が有意に高く、また CD8⁺ T 細胞では cGVHD + dep T_{HSC} 群で高い傾向が見られた (Fig. 6 D)。

以上より、慢性 GVHD の標的臓器において、T_G の 1-10%しか満たない T_{HSC} が T_G の有する細胞傷害活性を抑制的にコントロールしており、致死的な悪化を防ぐのに重要な役割を果たしていることが示された。

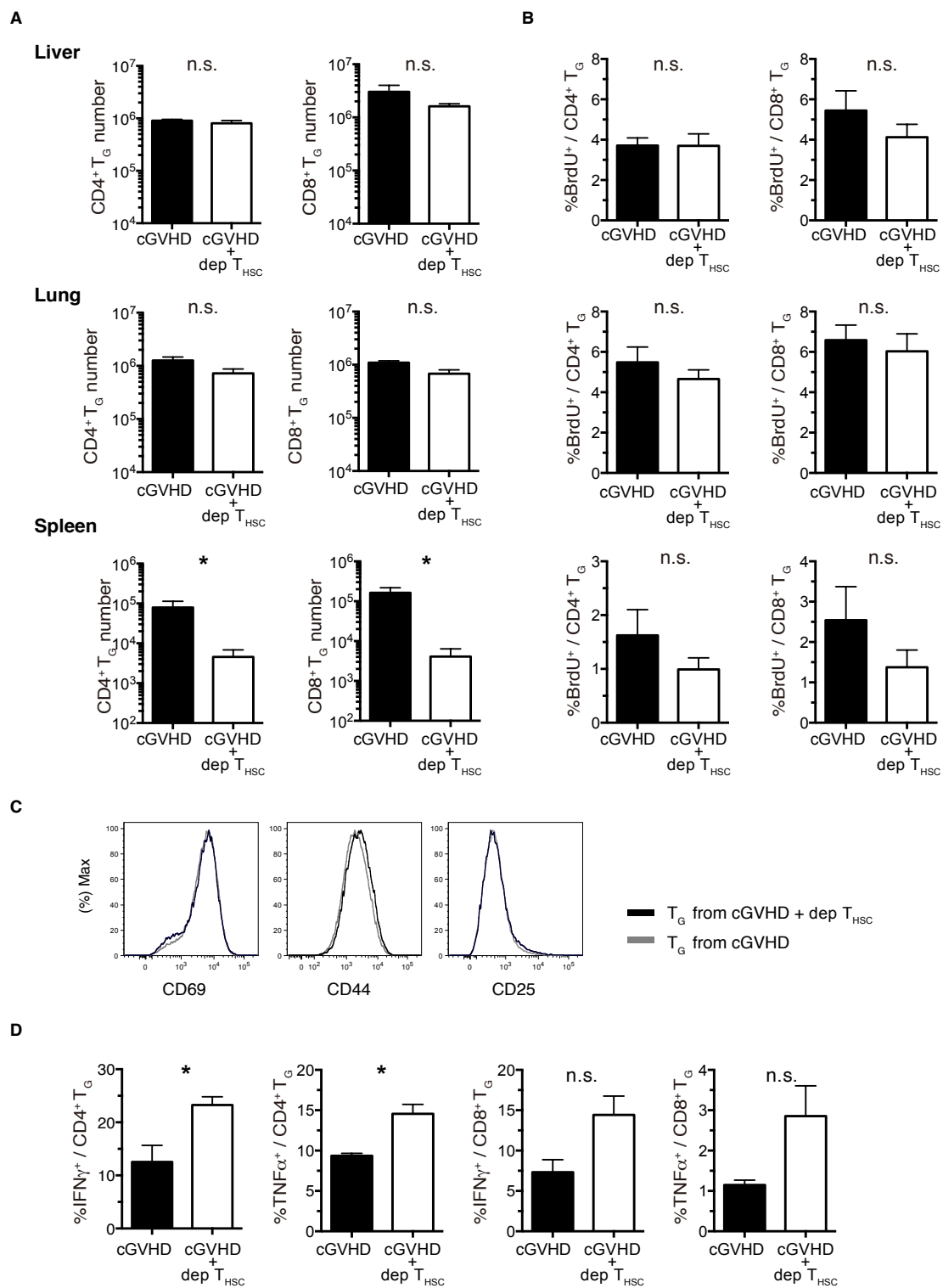


Figure. 6 T_{HSC}によるT_Gの標的臓器内での活性化の抑制効果

移植後 28 日（選択的 T_{HSC} 除去初日から 7 日後）の肝臓、肺および脾臓での cGVHD 群ならびに cGVHD + dep T_{HSC} 群における CD4⁺ および CD8⁺ T_G 数 (A) および 1 時間パルスでの BrdU 標識細胞の割合 (B) を評価した。移植後 28 日の肝臓での cGVHD 群ならびに cGVHD + dep T_{HSC} 群における CD8⁺ T_G の活性化マーカー発現 (C) と CD4⁺ および CD8⁺ T_G における IFNγ⁺ および TNFα⁺ 細胞の割合 (D) を評価した。(n.s., not significant; *P < 0.05)

考察

移植後慢性期には T_G 、 T_{HSC} と両者が存在しており、両者の慢性 GVHD への病態形成への関与を評価することが重要であったが、両者に対し選択的に介入しうるマウスモデルが今まで欠如しており、その評価が困難であった。今回我々は、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、さらに病原性を有した T_G が T_{HSC} より優位に長期間にわたって標的臓器に浸潤していることを示した。さらに各々の T 細胞の選択的除去により、 T_G と T_{HSC} 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し、一方 T_{HSC} は T_G の活性化を抑制し急激な悪化を抑制していることが示唆された。

急性 GVHD マウスモデルは、MHC 不適合、マイナー組織適合抗原不適合いずれのモデルにおいても臨床病態の再現性が高いが、慢性 GVHD モデルにおいては、その臨床経過および病態の複雑性から、再現が困難であるとされる。例えば、慢性 GVHD の最大のリスク因子は急性 GVHD であり、多くは急性 GVHD の経過を経て誘導される。さらに、臨床病態としては、皮膚や唾液腺、肺や肝臓など、多臓器に渡り、その多くは線維化とそれに伴う臓器機能障害を認めるとされる。これらの発症様式や病態を再現しうる至適なマウスモデルの不足が障壁となっている。近年、移植前処置にシクロフォスファミドを用い、閉塞性気管支炎を再現する[B6->B10.DR]モデルが慢性 GVHD を再現しうるモデルとして報告されている^{32,33}。これは、先行する急性 GVHD を経ることなく発症するモデルである。一方、今回我々が示したマイナー組織適合抗原不適合[B6->C3H.Sw]モデルは、肺において気管ならびに血管周囲の炎症細胞浸潤とコラーゲン沈着を認め、さらに肝臓、皮膚および唾液腺など多臓器に線維化を伴う炎症細胞浸潤を認め、[B6->B10.DR]モデルと同様臨床における慢性 GVHD を再現しうるモデルである。また、これらの病理学的変化は一過性の経過ではなく、治療介入がなければ不可逆的であり、これらの経過もヒトの経過を再現しうる。さらに、このモデルにおいては急性 GVHD を経てから、継続的に進展しうる慢性 GVHD モデルであり、臨床的に多く認める先行する急性 GVHD を経て発症する慢性 GVHD³⁴の時間的経過の再現も可能としている。

我々の慢性 GVHD モデルにおいては、大多数の T_G が移植後 63 日まで標的臓器内に遷延して浸潤している。一方、再構築された T_{HSC} を末梢で認めるようになるのは、移植後 4-5 週後であり、その後徐々に増加傾向となる。その結果、移植後後期には、慢性 GVHD 標的臓器への T_G および T_{HSC} 両者の浸潤が認められるが、特に T_G が大多数を占める。急性 GVHD マウスモデルにおいては、 $CD44^{low}CD62L^{high}IL-7a^{high}CD8^{+}$ memory stem cell³⁵ が移植後長期にわたって維持されることを Zhang らが示している。

一方で、我々の慢性 GVHD マウスモデルでは、標的臓器内に遷延化する大多数の T_G は、 $CD44^{high}CD62L^{low}IL-7a^{low}$ で示される effector フェノタイプを示す細胞であり、前述のメモリー細胞とは異なるフェノタイプである。さらに、 $CD8^+ T_G$ では $PD-1^+$ や $KLRG-1^+$ 陽性細胞を多く含み、細胞形質的に exhausted もしくは replicative senescent な集団であることが示唆されるにも関わらず、局所における炎症性サイトカイン産生能や増殖能は T_{HSC} と同等であった。Masopust らは、 $KLRG-1^+PD-1^-$ で示される replicative senescent な細胞集団はプライムブースト異種ワクチン投与によって強力な細胞傷害活性を有することを示しており³⁶、このことは細胞傷害活性を維持する $KLRG-1^+PD-1^-CD8^+ T_G$ が、慢性 GVHD 誘導における細胞免疫を基盤とした機序に寄与する可能性を示唆する。

一方、 $CD4$ に関しては、 T_{HSC} の方が T_G と比べ高い増殖能を維持していた。これは、 $CD4^+ T_G$ はレシピエント由来抗原提示細胞を直接認識することによって活性化しうる¹ が、一方でドナー由来抗原提示細胞には反応し得ない。これに対し、胸腺分化を経てドナー由来抗原提示細胞を認識しうる機会を経た $CD4^+ T_{HSC}$ は、ドナー由来樹状細胞による direct および indirect presentation によって活性化しうる。そのため、ドナー由来樹状細胞が抗原提示を行う慢性期では、 $CD4^+ T_{HSC}$ が優位に増殖するものと考えられる。慢性 GVHD の誘導には、胚中心での抗体産生が重要な役割を果たすとの報告もあり³²、ドナー由来抗原提示細胞と $CD4^+ T_{HSC}$ の相互作用は、慢性 GVHD 誘導における液性免疫を基盤とした機序に寄与しうる可能性を示唆する。

T_G は移植後 63 日を経た時点でも標的臓器内での増殖能を有しており、増殖と細胞死によって維持されていることを示唆する。これは、メモリーT細胞が cognate 抗原によってではなく、IL-7 や IL-15 などのホメオスタシスを維持するサイトカインによって維持されていることとは異なる機序で維持されている可能性も示唆しうる。興味深いことに、 $CD8^+ T_G$ にみられる $KLRG-1^+ PD-1^-$ で示される細胞傷害活性を有する集団は、時間を経ることにそのポピュレーションが増加し、その一方で $KLRG-1^- PD-1^+$ で示される集団が減少傾向であることから、慢性期になるにつれて $KLRG-1^- PD-1^+$ から $KLRG-1^+ PD-1^-$ への移行していることが示唆される。これらの増殖を支持する同種抗原やサイトカインがどのように周囲の微小環境から供給されるかについては、未だ明らかとなっていない。

慢性 GVHD の制御には Treg による末梢性免疫寛容が重要な役割を果たすとされる。Treg は TGF- β や IL-10 などの抑制性サイトカインを介して自己抗原に対する免疫反応を制御する³⁷。臨床的には、移植経過の中で Treg 数や Treg とリンパ球比率が減少している症例では慢性 GVHD の発症が多く認められる³⁸。これらの観察より、我々の T_{HSC} 選択的除去による急激な GVHD の悪化の機序として T_{HSC} 由来 Treg の除去による影響がまず考慮された。しかし、 T_{HSC} の選択的除去群と非除去群との間で、Treg/ $CD4^+$

T細胞比率に差を認めなかった。

T_{HSC}の再構築は、GVHD環境下では著しく障害される。急性GVHDによってCD4⁺T_Gによって骨髄内のnicheが障害され、CLP (common lymphoid progenitor) の誘導が障害される¹⁶。また、T_Gは胸腺上皮細胞を傷害することで、胸腺分化を障害する³⁹。このように、T_GによってT_{HSC}の再構築が障害を受ける。今回我々は、T_Gの選択的除去によって、慢性GVHD標的臓器におけるT_{HSC}の速やかな増加を認め、さらにその増殖はT_Gの減少を代償するように増加がみられた。このことは、T_GおよびT_{HSC}の数的維持を担う抗原刺激や生存を担う因子、例えばホメオスターシスを維持するサイトカインなどを供給するPathogenic T cell nicheが存在し、病原性の誘導に寄与している可能性を示唆する。T_G、T_{HSC}は、このnicheが持つキャパシティに応じて供給される因子や場所を競合しながら、慢性GVHDの病態形成に寄与しているものと考えられる。

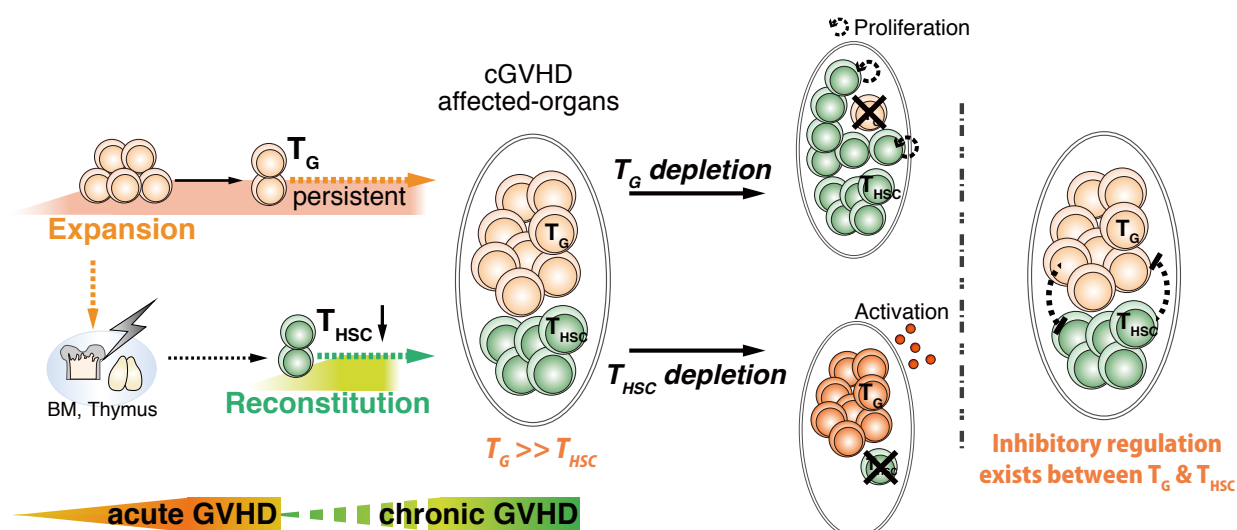
少数を占めるT_{HSC}の選択的除去が、標的臓器におけるT_Gに数的な影響を与えなかったことは、T_Gがsenescentな集団であること、さらにはPathogenic T cell nicheのキャパシティに許容スペースに限りがあった可能性を示唆する。その一方で、T_{HSC}の選択的除去はT_Gによる炎症性サイトカイン産生の増強を誘導し、致死的な悪化を起こしうる。これは、再構築されたT_{HSC}はT_Gの過剰な活性化を抑制し、急性から慢性GVHDへの移行を抑制しうることを示唆する。免疫再構築が遅延する場合には、T_{HSC}によるT_Gの抑制が機能しないため、GVHDの悪化がみられることが示唆される。T_{HSC}がT_Gを抑制する分子、細胞学的メカニズムについては、今後明らかにすべき課題である。

今回我々は、臨床における慢性GVHDの病態を再現しうるマウスモデルにおいて、慢性GVHDの誘導、維持に関わる細胞学的メカニズムを明らかにした。T_GおよびT_{HSC}両者は、慢性GVHD標的臓器内で増殖及び炎症性サイトカインを産生するポテンシャルを維持している。しかし、Pathogenic T cell pool内でのT_G、T_{HSC}の数的バランスや活性バランスが、両者の相互的な抑制機構によって調整されている。このT_GおよびT_{HSC}の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の予防および治療の新規標的が明らかとなり得ると考えられる。

総括

本研究において、以下の知見が得られた。

1. 慢性 GVHD の発症様式や病態を再現するマイナー組織適合抗原不適合マウスモデルを確立した
2. 慢性 GVHD 標的臓器において、長期にわたり T_G は T_{HSC} より優位に、かつ遷延して存在する
3. 慢性 GVHD 標的臓器において、遷延化した T_G は増殖能や炎症性サイトカイン産生能を維持している
4. 慢性期での由来別 T 細胞の選択的除去により、 T_G および T_{HSC} 間の相互的な抑制作用が明らかとなった
 - T_G は Pathogenic T cell pool 内で T_{HSC} の増殖や集積を抑制する
 - T_{HSC} は Pathogenic T cell pool 内での T_G の活性化を抑制し、致死的な GVHD の悪化を防いでいる



今まで、慢性 GVHD を誘導する T 細胞は主に T_{HSC} が主体となって病態を引き起こすと考えられてきたが、本研究では、 T_G および T_{HSC} それぞれが慢性 GVHD の誘導に果たす役割を示した。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 cell pool 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 cell pool 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 cell pool 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、T cell pool のキャパシティに応じて、数的もしくは機能的にバランスを取っていることが示された。

このことは、慢性 GVHD を誘導する病原性が、 T_G によって形成された T cell pool そのもののキャパシティに依存することを示唆しており、この T cell pool 形成を阻害することが慢性 GVHD の予防もしくは治療標的の一つとなり得る可能性を示唆する。今後の発展としては、この T cell pool がどのように形成されるか、その構成成分、さらには病原性 T 細胞の相互作用を調整する分子学的、細胞学的メカニズムについて明らかにしていく必要があると考えられる。

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りました、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室、上羽悟史講師に深く感謝致します。

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、御助言を頂きました、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室、松島綱治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、今村雅寛前教授に深く感謝致します。

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、東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の皆様には厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1 Shlomchik, W. D. Graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 340-352 (2007).
- 2 Higman, M. A. & Vogelsang, G. B. Chronic graft versus host disease. *Br. J. Haematol.* **125**, 435-454 (2004).
- 3 Filipovich, A. H. *et al.* National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **11**, 945-956 (2005).
- 4 Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet* **373**, 1550-1561 (2009).
- 5 Shulman, H. M. *et al.* Histopathologic Diagnosis of Chronic Graft-versus-Host Disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology Working Group Report. *Biol. Blood and Marrow Transplant.* **12**, 31-47 (2006).
- 6 Holland, H. K. *et al.* Bronchiolitis obliterans in bone marrow transplantation and its relationship to chronic graft-v-host disease and low serum IgG. *Blood* **72**, 621-627 (1988).
- 7 Lee, S. J. *et al.* Quality of life associated with acute and chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* **38**, 305-310 (2006).
- 8 Panoskaltsis-Mortari, A. *et al.* Acceleration of idiopathic pneumonia syndrome (IPS) in the absence of donor MIP-1 α (CCL3) after allogeneic BMT in mice. *Blood* **101**, 3714-3721 (2003).
- 9 Beilhack, A. *et al.* In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood* **106**, 1113-1122 (2005).
- 10 Castermans, E. *et al.* Thymic recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation with non-myeloablative conditioning is limited to patients younger than 60 years of age. *Haematologica* **96**, 298-306 (2011).
- 11 Krenger, W., Blazar, B. R. & Hollander, G. A. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, **117**, 6768-6776 (2011).
- 12 Weinberg, K. *et al.* Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **97**, 1458-1466 (2001).
- 13 Zhang, Y., Hexner, E., Frank, D. & Emerson, S. G. CD4⁺ T cells generated de novo from donor hemopoietic stem cells mediate the evolution from acute to chronic graft-versus-host disease. *J. Immunol.* **179**, 3305-3314 (2007).

- 14 Sakoda, Y. *et al.* Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* **109**, 1756-1764 (2007).
- 15 Castermans, E. *et al.* Thymic recovery after allogeneic hematopoietic cell transplantation with non-myeloablative conditioning is limited to patients younger than 60 years of age. *Haematologica* **96**, 298-306 (2011).
- 16 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).
- 17 Shono, Y. *et al.* Bone marrow graft-versus-host disease: evaluation of its clinical impact on disrupted hematopoiesis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **20**, 495-500 (2014).
- 18 Haddad, E. *et al.* Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a European retrospective study of 116 patients. *Blood* **91**, 3646-3653 (1998).
- 19 Clave, E. *et al.* Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **113**, 6477-6484 (2009).
- 20 Hossain, M. S. *et al.* Chronic GvHD decreases antiviral immune responses in allogeneic BMT. *Blood* **109**, 4548-4556 (2007).
- 21 Asakura, S. *et al.* Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces graft-versus-leukemia effects in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 2370-2378 (2010).
- 22 Wherry, E. J. *et al.* Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **27**, 670-684 (2007).
- 23 Cooke, K. *et al.* An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* **88**, 3230-3239 (1996).
- 24 Blazar, B. R. *et al.* Engraftment of severe combined immune deficient mice receiving allogeneic bone marrow via In utero or postnatal transfer. *Blood* **92**, 3949-3959 (1998).
- 25 Kaplan, D. H. *et al.* Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype. *J. Immunol.* **173**, 5467-5475 (2004).
- 26 Zhao, D. *et al.* Alloimmune response results in expansion of autoreactive donor CD4+ T Cells in transplants that can mediate chronic graft-versus-host disease. *J. Immunol.* **186**, 856-868 (2011).

- 27 Graze, P. R. & Gale, R. P. Chronic graft versus host disease: a syndrome of disordered immunity. *Am. J. Med.* **66**, 611-620 (1979).
- 28 Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682-687 (2006).
- 29 Ahmadzadeh, M. *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* **114**, 1537-1544 (2009).
- 30 Mumprecht, S. *et al.* Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* **114**, 1528-1536 (2009).
- 31 Puliaeva, I. *et al.* Enhancement of suboptimal CD8 cytotoxic T cell effector function in vivo using antigen-specific CD80 defective T cells. *J. Immunol.* **186**, 291-304 (2011).
- 32 Srinivasan, M. *et al.* Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood* **119**, 1570-1580 (2012).
- 33 Flynn, R. *et al.* Increased T follicular helper cells and germinal center B cells are required for cGVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood* **123**, 3988-3998 (2014).
- 34 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).
- 35 Zhang, Y. *et al.* Host-reactive CD8⁺ memory stem cells in graft-versus-host disease. *Nat. Med.* **11**, 1299-1305 (2005).
- 36 Masopust, D., Ha, S. J., Vezys, V. & Ahmed, R. Stimulation history dictates memory CD8 T cell phenotype: implications for prime-boost vaccination. *J. Immunol.* **177**, 831-839 (2006).
- 37 Nguyen VH. *et al.* In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* **109**, 2649-2656 (2007).
- 38 Zorn, E. *et al.* Reduced frequency of FOXP3⁺ CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* **106**, 2903-2911 (2005).
- 39 Na, I.-K. *et al.* The cytolytic molecules Fas ligand and TRAIL are required for murine thymic graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* **120**, 343-356 (2010).