



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ドナーT細胞のMyD88シグナルは同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病を増悪させる
Author(s)	松岡, 里湖
Description	配架番号 : 2498
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13818号
Issue Date	2019-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13818
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/76560
Type	doctoral thesis
File Information	Satomi_Matsuoka.pdf



学位論文

ドナーT 細胞の MyD88 シグナルは
同種造血幹細胞移植後の
移植片対宿主病を増悪させる

(The MyD88 signaling in donor T cells accelerates
graft-versus-host disease after allogeneic
hematopoietic stem cell transplantation)

2019 年 12 月

北海道大学

松岡 里湖

Satomi Matsuoka

学位論文

ドナーT 細胞の MyD88 シグナルは
同種造血幹細胞移植後の
移植片対宿主病を増悪させる

(The MyD88 signaling in donor T cells accelerates
graft-versus-host disease after allogeneic
hematopoietic stem cell transplantation)

2019 年 12 月

北海道大学

松岡 里湖

Satomi Matsuoka

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	4 頁
緒言	5 頁
実験材料および方法	8 頁
実験結果	15 頁
考察	33 頁
総括および結論	37 頁
謝辞	39 頁
利益相反	40 頁
引用文献	41 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掲載された。

原著論文

Satomi Matsuoka, Daigo Hashimoto, Masanori Kadowaki, Hiroyuki Ohigashi, Eiko Hayase, Emi Yokoyama, Yuta Hasegawa, Takahiro Tateno, Xuanzhong Chen, Kazutoshi Aoyama, Hideyo Oka, Masahiro Onozawa, Kiyoshi Takeda, Koichi Akashi, and Takanori Teshima

The myeloid differentiation factor 88 signaling in donor T cells accelerates graft-versus-host disease.

雑誌名 Haematologica 2019(online)

要旨

【背景と目的】 Myeloid differentiation factor 88(MyD88)はToll-like receptor(TLR)および Interleukin-1 receptor(IL-1R) スーパーファミリーに属する各受容体からのシグナルを受け、IL-1R-associated kinase 4(IRAK4)と分子複合体を形成して、その下流の Nuclear factor kappa B(NF- κ B)経路やインフラマソームへとシグナル伝達を行うアダプター分子である。MyD88/IRAK4 シグナル経路は自然免疫のみならず、T細胞を介した獲得免疫機構においても重要な役割を担い、種々の病態に関与していると考えられている。Liらは同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病(graft-versus-host disease: GvHD)の発症にレシピエントのMyD88/IRAK4シグナル経路が関与していないことを示したが(Li et al., 2011)、ドナーT細胞のMyD88/IRAK4シグナル経路が同種造血幹細胞移植後のGvHDの発症や病態形成にどのように寄与しているかについてはいまだ明らかになっていない。我々はマウスの同種造血幹細胞移植モデルにおいて、MyD88欠損(*MyD88*^{-/-})ドナーマウスのT細胞と野生型ドナーマウスの骨髄細胞をレシピエントマウスへ移植して、ドナーT細胞のMyD88/IRAK4シグナル経路がGvHDにどのような影響を与えるか検証した。

【材料と方法】 マウスの同種造血幹細胞移植モデルでは、致死量の全身放射線照射を受けたレシピエントマウスに、主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex: MHC)半合致の*MyD88*^{-/-}およびTLR2欠損(*TLR2*^{-/-})・TLR7欠損(*TLR7*^{-/-})ドナーマウスから純化した 1×10^6 個のT細胞と、野生型ドナーマウスから採取した 5×10^6 個のT細胞除去骨髄(T cell-depleted bone marrow: TCD-BM)細胞を混合して静脈内投与した。コントロール群には野生型ドナーマウスのT細胞と骨髄細胞を移植した。移植片対白血病(graft-versus-leukemia: GvL)効果を検証する実験ではこれら移植片と同時にレシピエント由来の白血病細胞であるP815細胞(H-2^d) 1×10^3 個を静脈内投与した。MyD88/IRAK4阻害薬の投与実験ではMyD88阻害薬(NBP2-29328) 1mg/kgの腹腔内投与を、もしくはIRAK4阻害薬(PF-06650833) 12.0mg/kgの静脈内投与を連日施行した。*in vitro*の細胞培養実験では、野生型マウスおよび*MyD88*^{-/-}マウスから純化したT細胞を用いた。

【結果】 刺激を受けていない定常状態の*MyD88*^{-/-}マウスの脾臓において、T細胞の絶対数やメモリーT細胞の分画構成、制御性T細胞(regulatory T cell: Treg)への分化等は野生型マウスと同等であり、MyD88シグナル経路が定常状態のT細胞の発達に必須のものではないことが示された。全身放射線照射を用いて移植前処置を行ったマウスに野生型もしくは*MyD88*^{-/-}ドナーマウスの脾細胞と骨髄細胞を移植したところ、*MyD88*^{-/-}ドナーマウスから移植を受けたレシピエントマウスでは、野生型ドナーマウスから移植を受けたレシピエントマウスと比較して有意にGvHDが軽減した。*MyD88*^{-/-}ドナーT細胞を純化して野生型ドナーマウスのTCD-BM細胞とともに移植を受けたレシピエントマウスでも、野生型ドナーマウスのT細胞を移植したコントロール群と比較してGvHDの重症度

や死亡率が有意に改善しており、ドナーT細胞のMyD88シグナル経路がGvHDの重症化に大きく寄与していることが示された。一方、*MyD88*^{-/-}ドナーマウスのTCD-BM細胞と野生型ドナーマウスの純化したT細胞を移植したレシピエントマウスでは上記のGvHD軽減効果を確認できなかった。野生型ドナーT細胞と*MyD88*^{-/-}ドナーT細胞は移植後に同等の細胞分裂能を示したが、野生型ドナーCD8陽性T細胞に比べて*MyD88*^{-/-}ドナーCD8陽性T細胞のアポトーシスは有意に亢進していた。また、野生型ドナーT細胞に比べて*MyD88*^{-/-}ドナーT細胞はTh1・Tc1・Th17細胞への分化能が障害されており、これらの結果として*MyD88*^{-/-}ドナーT細胞を移植したレシピエントマウスではGvHDの重症度と死亡率が低下したと考えられた。このようなTh1およびTc1細胞への分化障害は、*in vitro*でT細胞を活性化させた際にも同様に観察された。刺激を受けていない定常状態のCD4およびCD8陽性T細胞にはTLR2、TLR7、IL-1R、IL-18R、IL-33Rが発現しており、*in vitro*で抗CD3/CD28抗体ビーズを用いてT細胞を刺激する際にTLR2リガンドおよびTLR7リガンドを添加して培養したところ、T細胞数が増加したためTLR2やTLR7がT細胞の生存を促進すると考えられた。しかし*TLR2*^{-/-}および*TLR7*^{-/-}ドナーT細胞を移植したレシピエントマウスのGvHD重症度と死亡率はコントロール群と同等であり、TLR/IL-1Rスーパーファミリーに属する受容体が単独で欠落してもGvHDの重症度には影響しないことが示唆された。薬剤を用いてMyD88/IRAK4シグナル経路を広範に遮断するため、野生型ドナーマウスからの同種骨髄移植後にIRAK4阻害薬(PF-06650833)を3週間連日投与したところ、GvHDの重症度と死亡率が有意に抑制された。移植片対白血病(graft-versus-leukemia: GvL)効果を検討するため、野生型もしくは*MyD88*^{-/-}ドナーT細胞を移植したレシピエントマウスに、レシピエント由来の白血病細胞を移植片と同時に投与した。*MyD88*^{-/-}ドナーT細胞を移植したレシピエントマウスではGvHDが有意に抑制されたにもかかわらず白血病による死亡率も低く、同種骨髄移植後のGvL効果はドナーT細胞のMyD88シグナルが欠損してもなお良好に保持されることが明らかとなった。

【考察】ドナーT細胞のMyD88/IRAK4シグナル経路は、同種造血幹細胞移植後のドナーT細胞の生存能やTh1・Tc1・Th17細胞への分化に重要な役割を果たし、GvHDの重症化に寄与していることが明らかとなった。TLR/IL-1Rスーパーファミリーの各々は相補的に機能を重複させていると考えられ、単独の受容体を阻害してもGvHDに影響がなかった。MyD88とIRAK4はこれら受容体の大半からシグナルを受け取って下流の炎症性シグナル経路へつなげる分子で、MyD88とIRAK4を阻害して複数のTLR/IL-1Rシグナルをまとめて抑制すると、単独のTLR/IL-1Rシグナル経路を個別に阻害するよりも効果的に炎症性シグナルを抑制できると考えられた。同種造血幹細胞移植後にIRAK4阻害薬を用いてMyD88/IRAK4経路を阻害すると、ドナーT細胞のMyD88/IRAK4経路を阻害することによりドナーT細胞の分化や生存を抑制して、GvL効果を保持しつつGvHDを軽減させることが可能となった。

【結論】ドナーT細胞のMyD88/IRAK4シグナル経路は、同種造血幹細胞移植後のGvHDの重症化に重要な役割を担い、GvHDの有望な治療標的である。

略語表

本文および図中で用いた主な略語を以下に示す。

BrdU	Bromodeoxyuridine	NF- κ B	Nuclear factor kappa B
BSA	Bovine serum albumin	PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
DAMPs	Damage-associated molecular patterns	PBS	Phosphate buffered saline
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	PCR	Polymerase chain reaction
FCS	Fetal calf serum	PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
Foxp3	Forkhead box protein P3	RPMI	Roswell park memorial institute
GvHD	Graft-versus-host disease	TBI	Total body irradiation
GvL	Graft-versus-leukemia	Tc1	T cytotoxic type 1
H&E	Hematoxylin & Eosin	TCD-BM	T cell-depleted bone marrow
IL-1R	Interleukin-1 receptor	Th1	T helper type 1
IRAK4	IL-1R-associated kinase 4	Th17	T helper type 17
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell	TLR	Toll-like receptor
MFI	Mean fluorescence intensity	TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
MHC	Major histocompatibility complex	Treg	Regulatory T cell
MyD88	Myeloid differentiation factor 88		

緒言

Toll-like receptor (TLR) は主に骨髄系細胞で発現しており、病原微生物由来の構造および産生物質である pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) や、自己組織が侵襲を受けた際に放出される damage-associated molecular patterns (DAMPs) などの danger signals を認識して自然免疫を発動させるという重要な役割を担う (Schnare et al., 2001 ; Kono et al., 2008 ; Kawai et al., 2011)。自然免疫の発動は獲得免疫の誘導と活性化へとつながるため、TLR は免疫機構全体をコントロールするという大きな役割を担っている。

自然免疫を発動させるという観点からは、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に発現している TLR がその機能に大きく寄与しており、抗原提示細胞が自身の TLR を介してそのリガンドである danger signals を認識することで活性化し、炎症性サイトカインやケモカインなどの発現を亢進させることで自然免疫機構の活性化を引き起こす一方、TLR は抗原提示細胞の共刺激分子や MHC 分子の発現を増強させ、炎症性サイトカインの産生を誘導することで T 細胞の増殖や生存、機能分化を促進して獲得免疫の活性化も惹起する (Kaisho et al., 2001)。TLR は抗原提示細胞のみならず様々な免疫担当細胞や上皮組織で発現しているが、T 細胞にも発現がみられ (Komai-Koma et al., 2004 ; Kabelitz, 2007 ; Macleod et al., 2007)、T 細胞は抗原提示細胞の介入を受けることなく直接 danger signals を認識してその機能応答に変化をもたらす可能性が示唆されている。

Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) は TLR3 を除くほぼ全ての TLR と、炎症性サイトカインである Interleukin-1 receptor (IL-1R) スーパーファミリーに属する受容体からのシグナルを受け、IL-1R-associated kinase 4 (IRAK4) を動員して下流の Nuclear factor kappa B (NF- κ B) シグナル経路やインフラマソームへとシグナル伝達を行う (Adachi et al., 1998 ; Garlanda et al., 2013 ; Kawasaki et al., 2014)。骨髄系細胞の MyD88 依存性シグナルは炎症性サイトカイン産生能あるいは抗原提示能の増強により炎症反応を促進させる一方で、制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Tregs) や myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) にはたらきかけて過剰な免疫応答を抑制することで生体の恒常性を維持する (Mortha et al., 2014 ; Lim et al., 2016)。これまでの報告から、T 細胞の MyD88 シグナルも T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) を介した T 細

胞活性化の修飾を行い、T細胞の増殖や生存、分化に重要な役割を持つことが証明されている(Jin et al., 2012 ; Rahman et al., 2009)。

同種造血幹細胞移植は難治性の造血器悪性腫瘍に対して根治を期待し得る数少ない有効な治療法の一つだが、その合併症である移植片対宿主病(graft-versus-host disease: GvHD)は移植後の非再発死亡原因の多くを占める重篤な病態である(Blazer et al., 2012 ; Holtan et al., 2014)。GvHDは移植片に含まれるドナーT細胞が、レシピエントの抗原提示細胞を介してレシピエントの同種抗原を「非自己」と認識することで活性化され、皮膚・腸管・肝臓などの標的臓器を攻撃する疾患である(Shlomchik et al., 1999 ; Duffner et al., 2004 ; Teshima et al., 2002)。その発症は、移植前処置によるレシピエントの組織や臓器の損傷あるいは炎症により上皮・粘膜バリアが破綻して(Shlomchik et al., 1999 ; Koyama et al., 2011)、Heat shock protein 70、ATP、HMBG-1、NLRP3などのDAMPs(Jarvis et al., 2003 ; Wilhelm et al., 2010 ; Jankovic, 2013)、または病原微生物が産生する lipopolysaccharide、mannan などの PAMPs(Cooke et al., 1998 ; Cooke et al., 2001 ; Uryu et al., 2015)が全身の循環へ流入して、TLRなどの受容体を介して自然免疫応答が活性化され、その結果 tumor necrosis factor(TNF)- α や IL-1 ファミリーなどの炎症性サイトカイン産生が誘導されることにより始まると考えられている(Hill et al., 1997 ; Ferrara et al., 2003)。このような移植前処置等による自然免疫応答の活性化は、ドナーT細胞のさらなる活性化を誘導し、GvHDの重症化につながると考えられる。実際に臨床の同種造血幹細胞移植で、大量化学療法や全身放射線照射を含む移植前処置の強度を減弱させることで GvHD が軽減できることが知られている(Hill et al., 1997 ; Maeda, 2013)。

上記のように GvHD の発症と重篤化にはドナーT細胞の活性化が必須であり(Ferrara et al., 2003)、T細胞の活性化をいかに制御するかが GvHD 発症および重篤化を阻止するための鍵となる。現在、GvHD の発症を予防する目的で移植後のT細胞活性化を広範に抑制する免疫抑制薬や、T細胞自体を移植片から除去するための薬剤や手技が用いられているが(Blazer et al., 2012 ; Holtan et al., 2014)、その効果に関してはまだ満足できるものではなく、過剰な免疫抑制による日和見感染症の発症や造血器悪性腫瘍の再発等をきたす可能性が危惧される。このため、T細胞の活性化を全般的に抑制するのではなく特定の炎症性反応のみを抑制することが、次世代の有効かつ安全性の高い GvHD 予防および治療法として理想的であり、MyD88/IRAK4 シグナル経路も有望な治療標的のひとつであると考えられる。これまでの研究では移植片に含まれる骨髓系細胞成分に発現している TLR/MyD88 シグナル経路と GvHD の関連性に焦点が当てられていたが(Jarvis et al., 2003 ; Wilhelm et al., 2010 ; Jankovic, 2013 ; Li et al., 2011 ; Matte et al., 2004)、T細胞の TLR/MyD88 シグナル経路が GvHD にもたらす影響は依然として研究が進められていない。

本研究ではマウスの同種骨髄移植モデルを用い、致死量の放射線照射を受けたレシピエントマウスに MyD88 欠損 (*MyD88*^{-/-}) T 細胞と野生型マウスから採取した T 細胞除去骨髄 (T cell-depleted bone marrow: TCD-BM) 細胞を移植することで、ドナー T 細胞の MyD88 シグナルが GvHD に与える影響を検討した。その結果、ドナー T 細胞の MyD88 シグナルが欠損するとドナー由来の Th1・Tc1・Th17 細胞への分化が障害され、その結果として GvHD の重症化が抑制されることが明らかとなった。また、*MyD88*^{-/-} T 細胞を移植しても移植片による抗腫瘍免疫反応である graft-versus-leukemia (GvL) 効果が観察され、ドナー T 細胞の MyD88 シグナルは GvL 効果に必要な不可欠なものではないことも証明された。さらに、同種骨髄移植後にレシピエントマウスへ IRAK4 阻害薬を投与すると GvHD の重症度と死亡率が有意に抑制されることも明らかとなり、ドナー T 細胞の MyD88/IRAK4 シグナル経路は GvL 効果を保持しつつ GvHD を抑制することが可能な、理想的な治療標的となり得ることが示唆された。

実験材料および方法

1) マウス

雌の C57BL/6 (B6, H-2^b) および B6D2F1 (BDF1, H-2^{b/d}) マウスを、日本チャールス・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) から購入した。B6 を遺伝的背景とした TLR2 欠損 (*TLR2*^{-/-}) および TLR7 欠損 (*TLR7*^{-/-})、MyD88 欠損 (*MyD88*^{-/-}) マウスは株式会社オリエンタルバイオサービス (Chiba, Japan) から購入した。

購入したマウスは本学の動物実験施設で安静期間として 1 週間飼育した後、8-10 週齢のマウスを実験に使用した。また、これらのマウスは本学の動物実験施設で繁殖飼育を行い、過去に記載された論文の方法に従って種の保持に努めた (Yamamoto et al, 2003)。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」に従い、動物実験 (承認番号: 12-0106 および 17-0026) の承認を得て行った。

2) マウスの同種骨髄移植

過去に発表された論文と同様の方法を用いて、マウスへ同種骨髄移植を施行した (Uryu et al., 2015)。概略を以下に示す。

放射線照射装置 MBR-1520R-4 (HITACHI, Tokyo, Japan) を用い、移植当日 (day 0) にレシピエントの BDF1 マウスへ致死量となる総線量 12Gy の全身放射線照射 (total body irradiation: TBI) を、3 時間間隔で 2 分割して行った。

ドナーとなる B6 野生型および *TLR2*^{-/-}・*TLR7*^{-/-}・*MyD88*^{-/-} マウスにイソフルラン吸入麻酔を用い安楽死させた後、それぞれから脾臓と両大腿骨・脛骨・骨盤骨を採取した。脾臓はスライドガラス 2 枚を用いてすりつぶし、RPMI-1640 (Sigma Aldrich) + 4% fetal calf serum (FCS) (Sigma Aldrich) で希釈して細胞懸濁液とした後、70 μ m セルストレイナー (BD Biosciences, Tokyo, Japan) を通して 50mL チューブへと移した。大腿骨・脛骨・骨盤骨は、23 ゲージ注射針と 1mL 注射器を用いて骨髓腔内に RPMI-1640 + 4%FCS を注入することで骨髓液を髄外へ出し、18 ゲージ注射針と 10mL 注射器を用い吸引・吐出を繰り返して攪拌し細胞懸濁液とした後、70 μ m セルストレイナーを通して 50mL チューブへと移した。これら細胞懸濁液に含まれる赤血球を、2mL の red blood cell lysis buffer (BD Biosciences) で 2 分間溶血させた後、トリパンブルー法で染色して顕微鏡を用い細胞数を計測した。

それぞれの実験に応じて、レシピエントマウス 1 匹あたり 5×10^6 個の脾細胞と 5×10^6 個の骨髓細胞、もしくは 1×10^6 個の T 細胞と 5×10^6 個の T 細胞除去骨髓 (T cell-depleted bone marrow: TCD-BM) 細胞を、250 μ L の 1 $\times$ phosphate buffered saline (PBS) (-) (Sigma Aldrich) に混合希釈して眼窩静脈叢から静脈内投与した。T 細胞と TCD-BM 細胞の調整はそれぞれ Pan T cell Isolation kit II および anti-CD90-MicroBeads を用い、T 細胞以外の細胞または T 細胞を磁気ビーズで標識した後、autoMACS Pro system (Miltenyi Biotec,

Bergisch Gladbach, Germany) を用い同製品の取扱説明書に記載されたプロトコルどおりの方法で各細胞を分離した。

GvL 効果を評価する実験では、day 0 に上述の同種骨髄移植のレシピエントマウスへ移植片と同時に、レシピエント由来の白血病細胞である P815 細胞 (H-2^d) 1×10^3 個を眼窩静脈叢から静脈内投与した。

いずれの移植実験も同種骨髄移植後のレシピエントマウスは specific pathogen-free (SPF) 環境下で、空気清浄装置付きの清潔なケージと通常の飼料を用い個別に飼育した。骨髄移植後 3 週間は、高圧蒸気滅菌処理され塩酸で pH 2.5 に調整された酸性飲料水を、その後の期間はフィルター処理された飲料水を与えた。

3) GvHD および GvL 効果の評価

同種骨髄移植後のレシピエントマウスを連日観察して、生存率と clinical GvHD score を用い GvHD の重症度を評価した。Clinical 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)。

GvL 実験では、同種骨髄移植後のレシピエントマウスが死亡した際に死後解剖を行い、その結果得られた所見から死因を同定した。腫瘍 (白血病) 死は肉眼的に肝および脾の腫瘍結節や肝脾腫を確認した場合、もしくは生前に後足の麻痺を認めた場合と定義した。また GvHD による死亡は、上記の腫瘍 (白血病) 死の所見が認められないことに加え、clinical GvHD score の評価項目として挙げられた GvHD 徴候がみられることと定義した。

4) GvHD の病理組織学的評価

同種骨髄移植後のレシピエントマウスをイソフルラン吸入麻酔で安楽死させた後、腹壁を正中切開して肝臓および腸管を採取した。腸管検体は胃から直腸まで一塊にして腹腔内から取り出し、結合組織や脂肪組織を外して上・中・下部に三等分した。この場合、上部が胃から十二指腸、中部が空腸から回腸末端、下部が回盲部から直腸に相当する。腸管内腔にホルマリンを注入して糞便を洗浄した後、縦に切開して口側が内側かつ腸管内腔が外側となるよう、爪楊枝に腸管を巻きつけて Swiss role 標本を作成した。各検体はホルマリンで一晩固定した後、100%エタノールに置換してパラフィン包埋、切片作製、ヘマトキシリン-エオジン (hematoxylin and eosin: H&E) 染色を行った。このうちパラフィン包埋、切片作製、H&E 染色は札幌総合病理研究所へ外注依頼した。

組織標本切片の画像は室温環境下で、光学顕微鏡 (BX50; Olympus, Tokyo, Japan) に装着したデジタルカメラ (DP20; Olympus) を用い撮影した。画像は $10 \times / 0.40$ 開口数 (numeric aperture: NA) もしくは $40 \times / 0.90$ NA で、適切な倍率に合わせて撮影した。

GvHD の病理組織学的評価には、過去に発表された論文と同様の pathological GvHD score を用いた (Cooke et al., 1996)。

5) フローサイトメトリーを用いた解析

過去に発表された論文と同様の方法を用い、マウスの脾臓もしくは胸腺から分離した細胞をフローサイトメトリーで解析した(Uryu et al., 2015)。概略を以下に示す。

サンプルを 4℃で 1500rpm、5 分間遠心分離した後、上清を破棄して 1× PBS(-) + 0.5% bovine serum albumin(BSA) (Sigma Aldrich) + 0.5M EDTA(Promega, Madison, Wisconsin, US)を用い細胞懸濁液とした。**Table 1** にリストアップした抗体のうち各々の実験に必要なものを細胞懸濁液へ添加したうえで、4℃で 30 分間暗所に静置して染色した。

細胞内サイトカイン染色を行う際は、細胞懸濁液に Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)および Ionomycin、BD GolgiPlug(BD Biosciences, San Jose, CA)を添加して、37℃で 4 時間暗所に静置した。その後 BD CytoFix/CytoPerm solution(BD Biosciences) 100μL を 30 分間反応させて細胞に透過処理を施し、**Table 1** にリストアップした細胞内サイトカインに対するモノクローナル抗体で染色した。

Table 1. フローサイトメトリーで用いた一次抗体

Target Ag	Clone	Fluorochrome	Supplier	Catalog#
TCRβ	H57-597	FITC	BD Biosciences	553171
TCRβ	H57-597	APC	BD Biosciences	554413
H-2Kd	SF1-1.1	FITC	BD Biosciences	553565
H-2Kd	SF1-1.1	Biotin	BD Biosciences	553564
CD4	GK1.5	PE-Cy7	BioLegend	100422
CD8a	53-6.7	BV510	BioLegend	100752
CD11b	M1/70	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	561114
CD44	PE	IM7	BD Biosciences	561860
CD62L	FITC	MEL-14	BD Biosciences	553150
TLR1	eBioTR23	PE	eBioscience	12-9011-80
TLR2	T2.5	PE	eBioscience	12-9024-80
TLR6	418601	PE	R&D Systems	FAB1533P
TLR7	polyclonal	PE	Imgenex	IMG-665D
IFN-γ	XMG1.2	APC	BioLegend	505810
IL-4	11B11	Alexa Fluor 647	BioLegend	504110
IL-17A	TC11-18H10	PE	BD Biosciences	559502
BrdU	Bu20a	APC	BioLegend	339808
Foxp3	FJK-16s	PE	eBioscience	12-5773-82

Treg を評価するための Foxp3 染色は Foxp3 transcription factor staining buffer set (eBioscience, San Diego, CA) を用い、同製品の取扱説明書に記載されたプロトコルどおりの方法で細胞に透過処理を施した後、PE 標識抗 Foxp3 モノクローナル抗体 (eBioscience) を添加して 4°C で一晩暗所に静置して染色した。

死細胞の同定には 4' 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes, Eugene, OR) もしくは LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Strain Sampler Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用い、解析から除外した。また細胞のアポトーシスを評価するために施行した Annexin-V 染色は、Annexin-V binding buffer (BioLegend, San Diego, CA) と FITC 標識 Annexin-V を用い、同製品の取扱説明書に記載されたプロトコルどおりの方法で行った。

これらの染色を施して細胞を解析する際は、全ての実験で FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) を用いた。また細胞をソーティングする際は FACSARIA II cell sorter (BD Biosciences) を用いた。フローサイトメトリーで得られたデータは FlowJo v9.0 software (Tree Star, San Diego, CA) を用いて解析した。

6) RNA の抽出・定量リアルタイム PCR

マウスの脾臓から CD4 もしくは CD8 陽性 T 細胞を、また腹水から腹腔内マクロファージをソーティングして純化した後、ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて同製品の取扱説明書に記載されたプロトコルどおりの方法で RNA を抽出した。

抽出した RNA を滅菌水で溶解して、NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) を用い RNA 濃度を測定した後、300 ng の RNA をテンプレートとして相補的 DNA (complementary DNA: cDNA) を作成した。cDNA を作成する際は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo life science, Osaka, Japan) を用い、同製品の取扱説明書に記載されたプロトコルどおりの方法で逆転写反応を行った。

定量リアルタイム PCR を行う際は各標的遺伝子に対する特異的プライマー・標識プローブセットの作成を Sigma-Aldrich Japan Genosis へ依頼して、これらと上記の cDNA を用い TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を同製品の取扱説明書に記載されたプロトコルに基づき、96-well プレートに 1 個のプライマーあたり 3well ずつ反応させた。リアルタイム PCR は ABI StepOne Plus real time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いて行い、18S ribosomal RNA (18S rRNA) を内在性コントロールとして、mRNA の発現レベルを delta Ct 法で relative expression として定量的に評価した。使用した各標的遺伝子のプライマー・標識プローブ塩基配列を **Table 2** に示す。

Table 2. 定量リアルタイム PCR で用いたプライマーとプローブの塩基配列

Gene	Sequence	
<i>18S rRNA</i>	Forward	5' - GCTCTTCTCGATTCCGTGGG-3'
	Reverse	5' -ATGCCAGAGTCTCGTTCGTTATC-3'
	Probe	5' -CTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACC-3'
<i>Tlr2</i>	Forward	5' - GCTTCACTTCTCTGCTTTTCGTTTC-3'
	Reverse	5' - CATCCTCTGAGATTTGACGCTTTG-3'
	Probe	5' - TCTCTGGAGCATCCGAATTGCATCACCG-3'
<i>Tlr4</i>	Forward	5' - ATGGCACTGTTCTTCTCCTGC-3'
	Reverse	5' - CTGAGTTTCTGATCCATGCATTGG-3'
	Probe	5' - TGACACCAGGAAGCTTGAATCCCTGCAT-3'
<i>Tlr5</i>	Forward	5' - CGAGTGAGGTCAGTCCTGGA-3'
	Reverse	5' - GTCTGGAGAGGCTCATGCTAAG-3'
	Probe	5' - CGGCAAGCATTGTTCTCCCAAGCGG-3'
<i>Tlr7</i>	Forward	5' - CTGTCTCAGAGGACTCCATCTATAG-3'
	Reverse	5' - GTCAGAGATAGGCCAGGATCATC-3'
	Probe	5' - TGCCTTCAAGAAAGATGTCCTTGGCTCC-3'
<i>Tlr9</i>	Forward	5' - CTCTGAGAGACCCTGGTGTGG-3'
	Reverse	5' - GTCCTTCGACGAGAACCATG-3'
	Probe	5' - ACATATTCTCTGCCGCCAGTTTGTCA-3'
<i>IL-1R1</i>	Forward	5' - AGGGACAGACCTGTTATCCTGAG-3'
	Reverse	5' - GACGTTGCAGATCAGTTGTATCATT-3'
	Probe	5' - CTGGGTCAGCTTCGATCGTCTCATTCCG-3'
<i>IL-18R1</i>	Forward	5' - GCCAACGAAGAAGCCATAGACA-3'
	Reverse	5' - GAGGCGAGAACAAGCACAGT-3'
	Probe	5' - ACTCCTCCTGTAAAGACATGGCCTGGGA-3'
<i>IL-33R</i>	Forward	5' - CCAAGAGCAAGACCAGGTGC-3'
	Reverse	5' - GACTCATGTTCAACCATCAGCTTC-3'
	Probe	5' - ATCCACACCGTCGCCTGATTGACTTGC-3'

7) 細胞の培養

過去に発表された論文と同様の方法を用いて、マウスの脾臓から分離および純化した T 細胞の培養実験を行った (Uryu et al., 2015)。

RPMI-1640 (Sigma Aldrich) + 2% penicillin/streptomycin (PS) (Sigma Aldrich) + 4% FCS (Sigma Aldrich) + 0.1mM 2-mercaptoethanol (2ME) を細胞培地として用い、96-well プレートに T 細胞 (5×10^4 個/well) を播種して、DynaBeads Mouse T-Activator CD3/CD28 for T-Cell Expansion and

Activation(Thermo Fisher Scientific)を 5×10^4 個/well ずつ添加した。さらに各種の TLR リガンドを添加して(もしくはコントロールとして TLR リガンドを添加しない状態で)、37℃の CO2 インキュベーターで最長 96 時間刺激した。使用した TLR リガンドを **Table 3** に示す。

Table 3. 細胞培養実験で用いた合成 TLR リガンド

TLR ligands	Corresponding TLR	Final concentration	Supplier	Catalog#
Pam3CSK4	TLR1/2	1 μ g/ml	InvivoGen	tlrl-kitlmw
LPS	TLR4	1 μ g/ml	InvivoGen	tlrl-kitlmw
Flagellin	TLR5	1 μ g/ml	InvivoGen	tlrl-kitlmw
ssRNA40	TLR7	5 μ g/ml	InvivoGen	tlrl-kitlmw
R848	TLR7/8	2 μ g/ml	InvivoGen	tlrl-r848-5
ODN1826	TLR9	5 μ M	InvivoGen	tlrl-kitlmw

8) T 細胞の増殖

マウスの脾臓から純化した T 細胞の細胞分裂能を評価するため、CellTrace Violet Cell Proliferation Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いた。野生型 B6 および *MyD88*^{-/-} ドナーマウスの脾臓から純化した T 細胞を上記の CellTrace Violet で製品の取扱説明書に記載されたプロトコールに準拠して標識した後、実験方法 2) に記載した手順で同種骨髄移植を施行した。移植後のレシピエントマウスをイソフルラン吸入麻酔で安楽死させ、脾臓を採取して T 細胞を分離した後、細胞内の CellTrace Violet の希釈度をフローサイトメトリーで解析した。

また、T 細胞の細胞分裂および増殖能を観察するほかの方法として T 細胞内への BrdU の取り込みを評価した。同種骨髄移植のレシピエントマウスに 1mg の BrdU を腹腔内投与した後、2 時間空けてイソフルラン吸入で安楽死させ脾臓を採取して、T 細胞を分離した。Foxp3 transcription factor staining buffer set(eBioscience)を用いて、同製品の取扱説明書に記載されたプロトコールどおりの方法で細胞に透過処理を施し、細胞懸濁液に DNase を添加して 37℃で 1 時間暗所に静置した。その後 APC 標識 BrdU モノクローナル抗体を反応させてフローサイトメトリーを用い解析した。

9) 統計学的解析

細胞数やサイトカイン産生細胞分画、GvHD スコアの二群比較の方法として Mann-Whitney U test を用いた。レシピエントマウスの生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて作成し、またその生存曲線の群間比較に log-rank test を用いた。P 値 < 0.05 の場合を統計学的有意差ありと定義して、全てのデータを平均値±標準誤差で記載した。

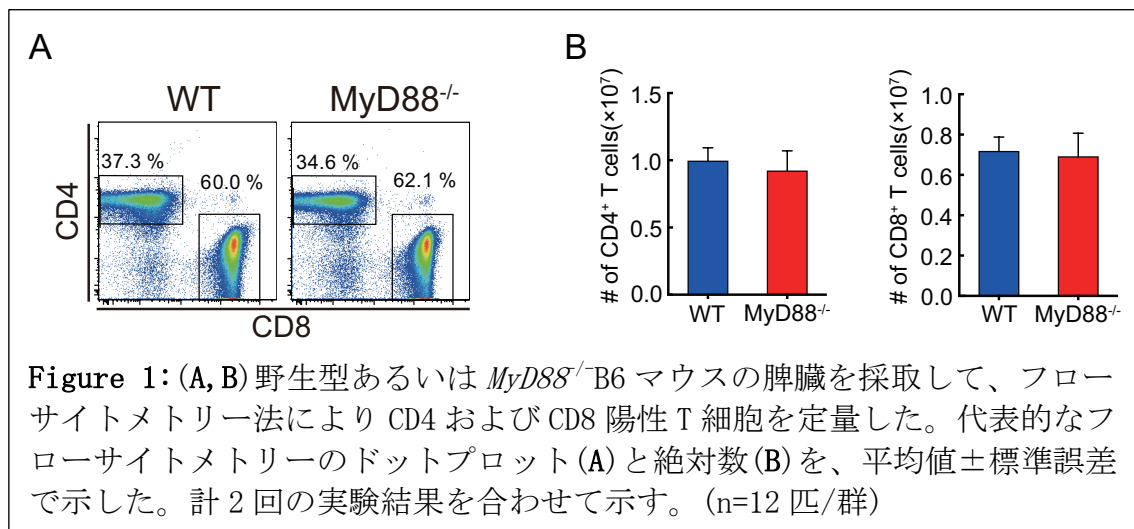
これらの統計学的検定には GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA) の統計プログラムを用いた。

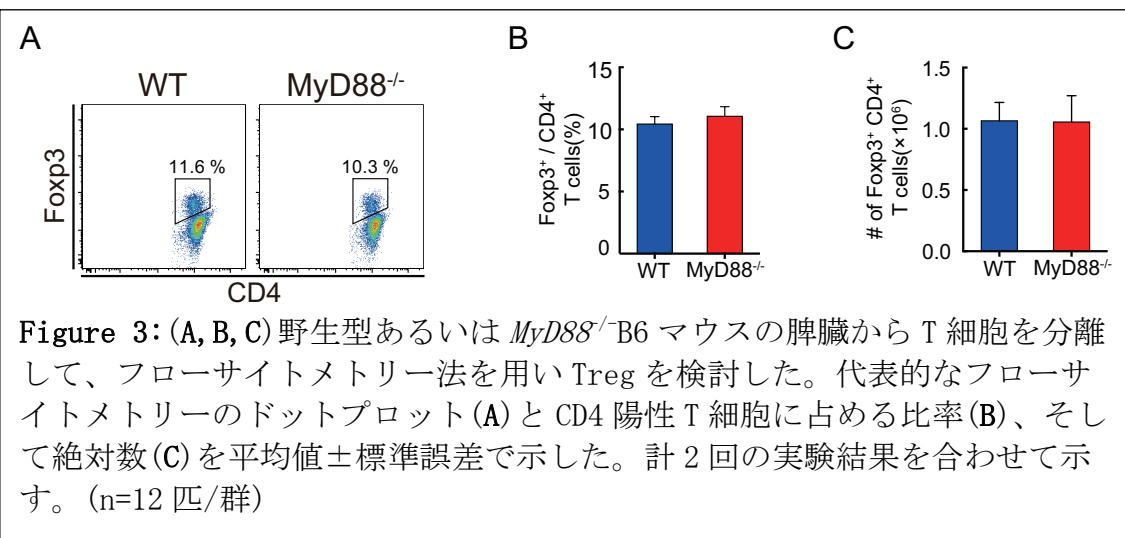
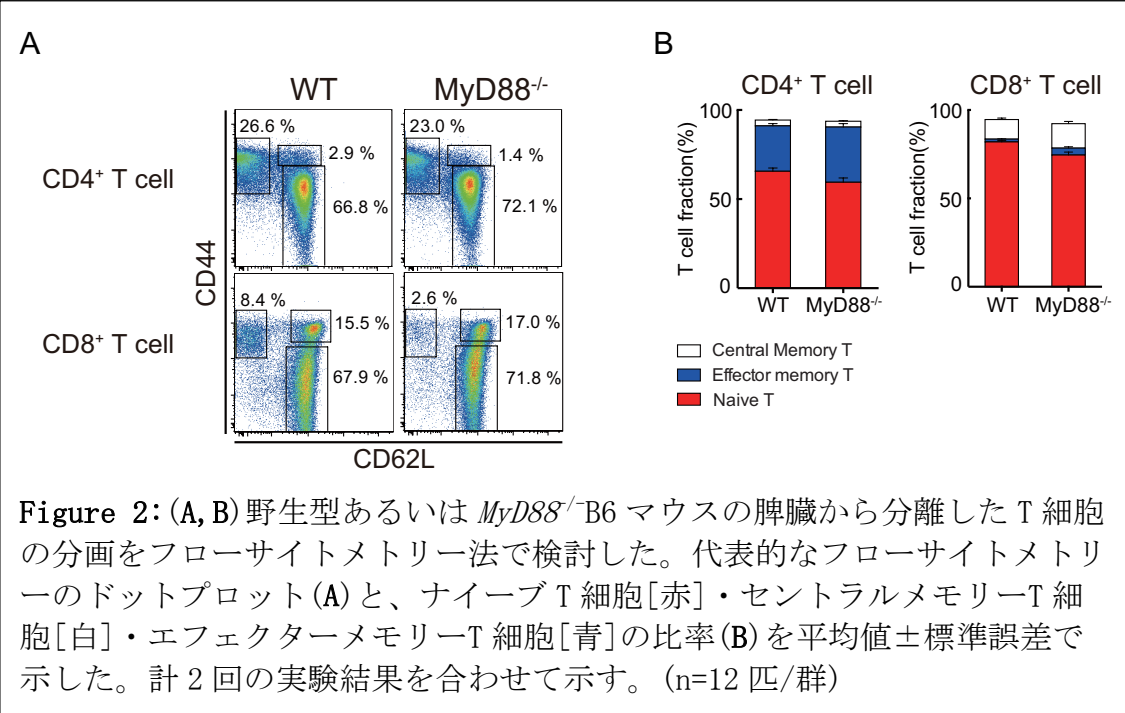
実験結果

1. MyD88 シグナルは、定常状態の T 細胞の発生や分化に必須のものではない

はじめに、T 細胞の MyD88 シグナル経路が欠損することで、定常状態にある T 細胞の分画構成や分化・発達段階にどのような変化がもたらされるか検証した。生後 8 週齢の野生型および *MyD88*^{-/-} B6 マウス各々の脾臓を採取して、CD4 および CD8 陽性 T 細胞 (Figure 1A, B)、メモリー T 細胞分画 (Figure 2A, B)、FoxP3 陽性 Treg の絶対数と CD4 陽性 T 細胞に占める比率 (Figure 3A-C) を検討した。その結果、CD4 陽性 T 細胞数と CD8 陽性 T 細胞数、CD62L 陽性 CD44 陽性 セントラルメモリー T 細胞比率と CD62L 陰性 CD44 陽性エフェクターメモリー T 細胞比率および CD62L 陽性 CD44 陰性ナイーブ T 細胞比率、Treg の絶対数および CD4 陽性 T 細胞に占める割合の全てが、野生型 B6 マウスと *MyD88*^{-/-} B6 マウスで同等であった。

以上の結果より、MyD88 シグナルは定常状態において T 細胞の発生や分化に必須のものではないことが判明した。





2. ドナーT細胞の MyD88 シグナル経路は、GvHD の重症化に必要である

マウスの MHC 半合致骨髄移植モデルを用い、ドナー細胞の MyD88 シグナルが欠損することで GvHD にどのような影響をもたらすか検証した。はじめに、移植片となるドナー細胞全般で MyD88 シグナル経路が担う役割を検討するため、致死量の放射線照射を受けたレシピエントの BDF1 マウスに、野生型 B6 もしくは *MyD88*^{-/-} B6 ドナーマウスから採取した 5×10^6 個の骨髄細胞と 5×10^6 個の脾細胞を経静脈的に投与した。野生型 B6 ドナー細胞を移植された MHC 半合致骨髄移植のコントロール群では重症の GvHD がみられ、移植後 50 日までの死亡率が 80% だったのに対して、*MyD88*^{-/-} B6 ドナー細胞を移植されたレシピエントマウス群は同時期の死亡率が 23% であり、有意に生存率が改善した (Figure 4A)。GvHD スコアも同様の傾向を示し、*MyD88*^{-/-} B6 ドナー細胞を移植されたレシピエントマウスの方が野生型 B6 ドナー細胞を移植されたレシピエントマウスよりも有意に低かった (Figure 4B)。

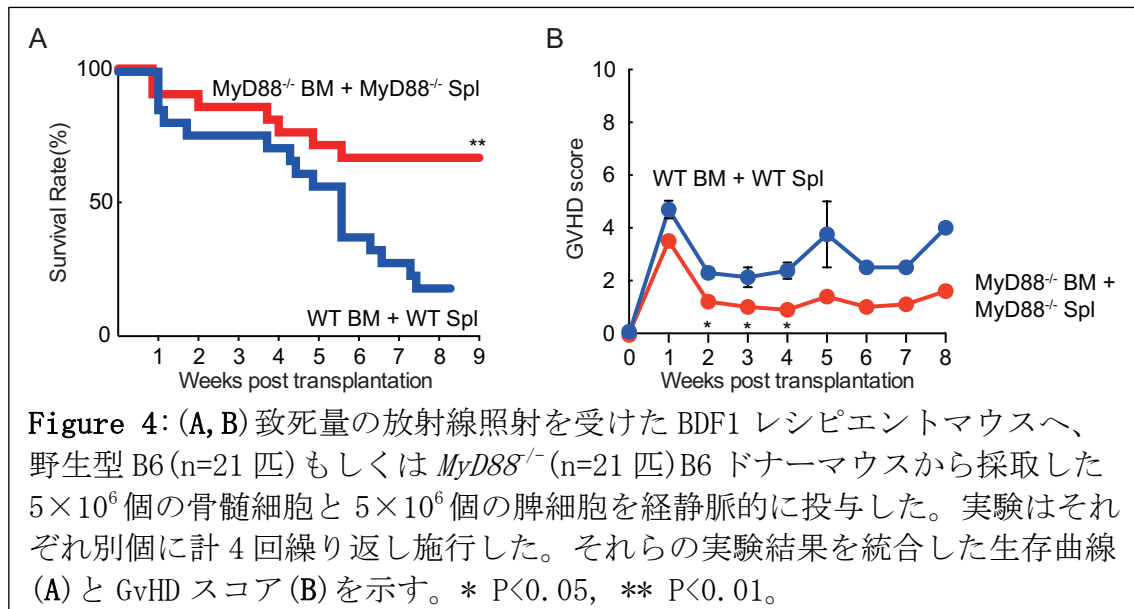
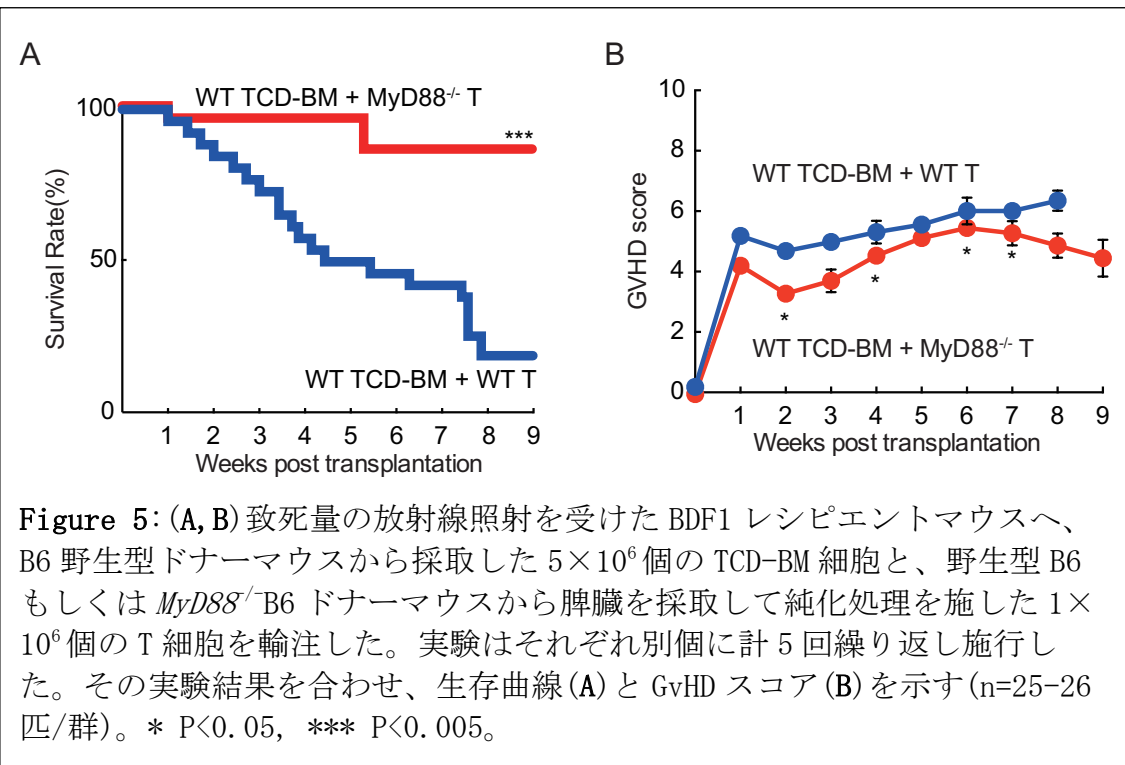
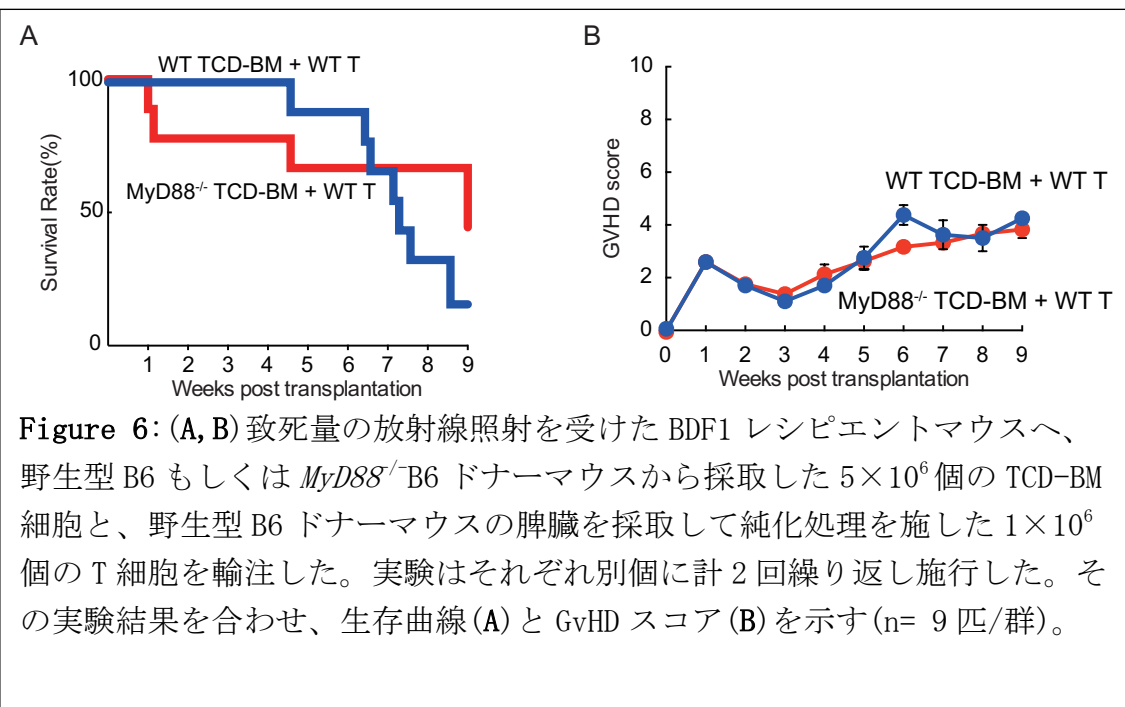


Figure 4: (A, B) 致死量の放射線照射を受けた BDF1 レシピエントマウスへ、野生型 B6 (n=21 匹) もしくは *MyD88*^{-/-} (n=21 匹) B6 ドナーマウスから採取した 5×10^6 個の骨髄細胞と 5×10^6 個の脾細胞を経静脈的に投与した。実験はそれぞれ別個に計 4 回繰り返し施行した。それらの実験結果を統合した生存曲線 (A) と GvHD スコア (B) を示す。* P<0.05, ** P<0.01。

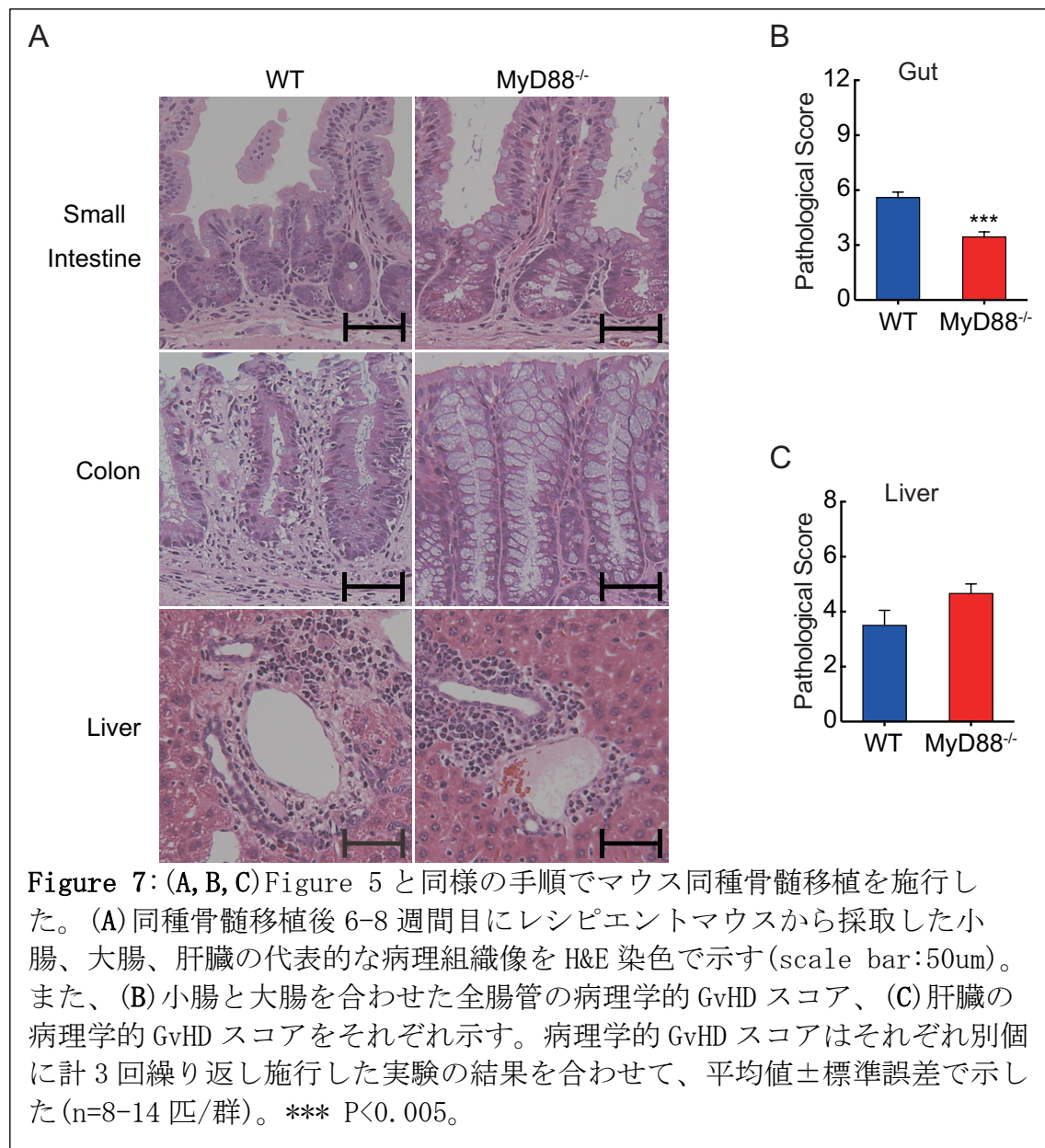
続いて、ドナー細胞の MyD88 シグナルが欠損することで生じた上記の GvHD 抑制効果が、移植片を構成する細胞分画のうち T 細胞の MyD88 シグナルに由来するものかどうかを検証した。致死量の放射線照射を受けたレシピエントの B6D2F1 マウスに、野生型 B6 ドナーマウスから採取した 5×10^6 個の TCD-BM 細胞と、野生型もしくは *MyD88*^{-/-} B6 ドナーマウスの脾臓を採取して純化した 1×10^6 個の T 細胞を経静脈的に投与した。ドナー T 細胞のみ MyD88 シグナルが欠損している場合も、GvHD による死亡率と重症度が有意に抑制された (Figure 5A, B)。



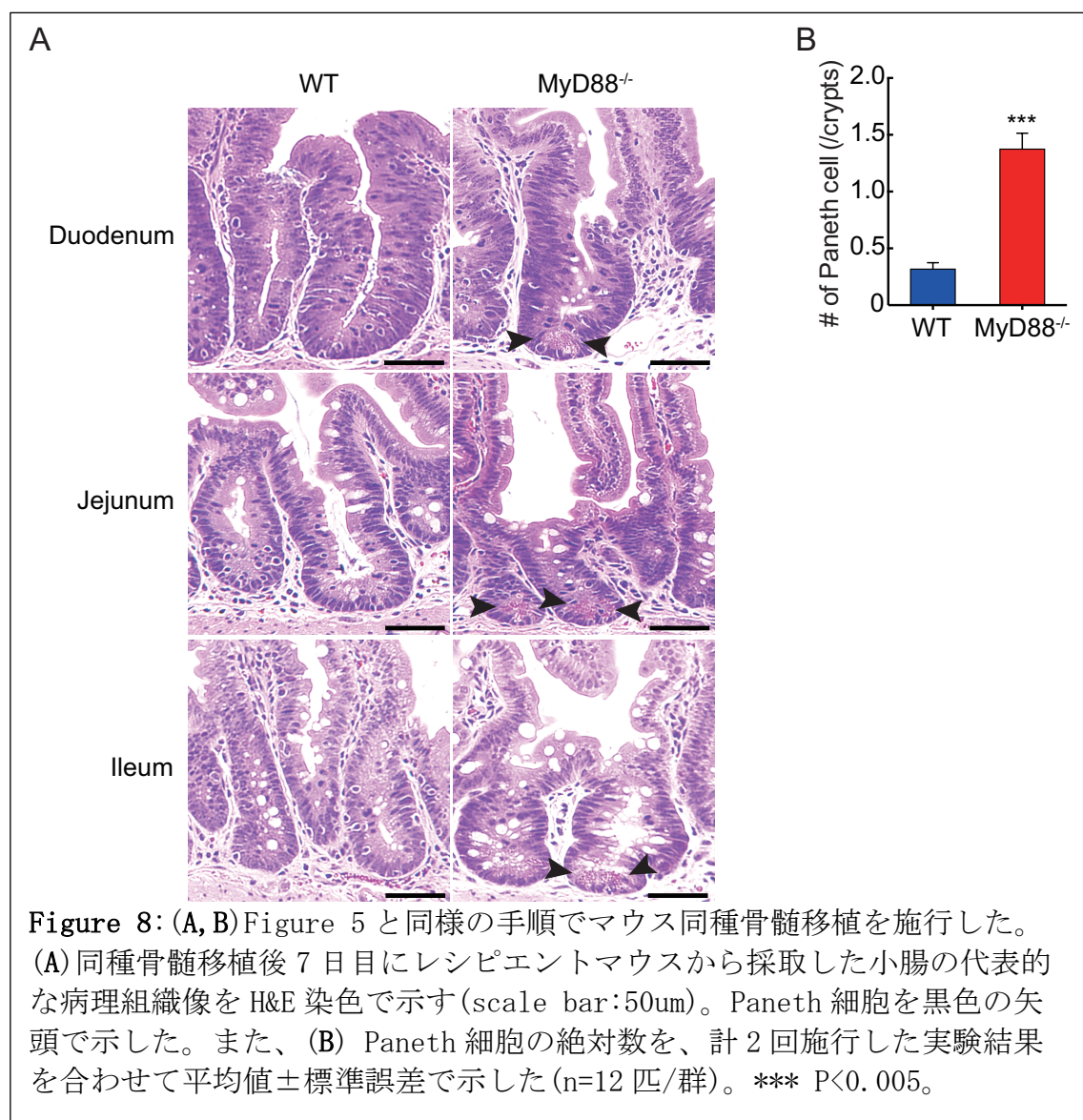
一方、ドナーTCD-BM 細胞の MyD88 シグナルが欠落しても、GVHD による死亡率と重症度は変化しなかった (Figure 6A, B)。



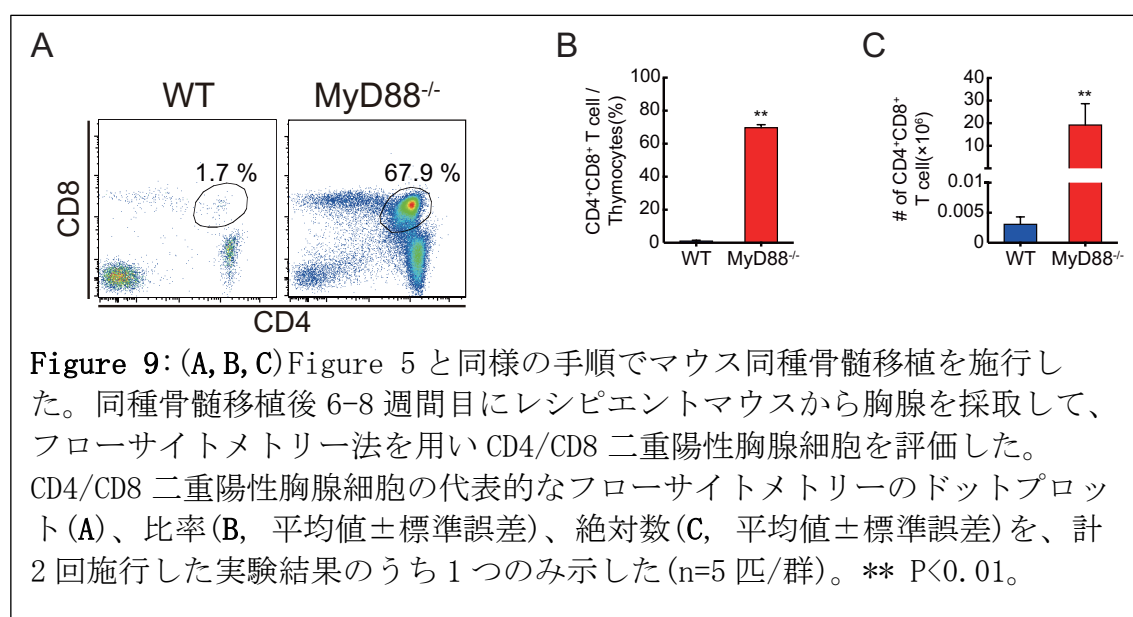
さらに、ドナーT細胞のみ MyD88 シグナルが欠落する前述の移植モデルを用い、同種骨髄移植を施行した 6-8 週間後にレシピエントマウスの腸管を病理組織学的に評価した。腸管 GvHD では病理組織学的に腸管粘膜への炎症細胞の浸潤や絨毛の平坦化、腸上皮細胞のアポトーシス、Paneth 細胞の脱落などの所見を認めるが、*MyD88*^{-/-} B6 ドナーT細胞のレシピエントマウスはこれらの病理組織学的所見が有意に軽減しており、病理組織学的 GvHD スコアも有意に低下していた (Figure 7A, B)。一方、肝臓 GvHD に関しては野生型 B6 ドナーマウスの T 細胞を移植されたコントロール群と *MyD88*^{-/-} B6 ドナーT細胞のレシピエントマウスで有意差を認めなかった (Figure 7A, C)。



また、同様の移植モデルを用いて同種骨髄移植後早期のレシピエントマウスの腸管も病理組織学的に評価した。Paneth 細胞は小腸の陰窩底で胞体に好酸性の粗大な顆粒を有する細胞として認められるが、野生型 B6 ドナーT 細胞を移植したレシピエントマウスでは Paneth 細胞が有意に減少していた。一方、*MyD88*^{-/-} B6 ドナーT 細胞のレシピエントマウスではこれら Paneth 細胞が有意に多く保持されていた (**Figure 8A, B**)。我々は Paneth 細胞が抗菌ペプチドを産生して腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) を防ぎ、GvHD の重症化を抑制していることを示しており (Hayase et al., 2017)、ドナーT 細胞の *MyD88* シグナルが欠落すると Paneth 細胞の障害が軽減され、連続する GvHD の重症化を抑制していると考えられた。



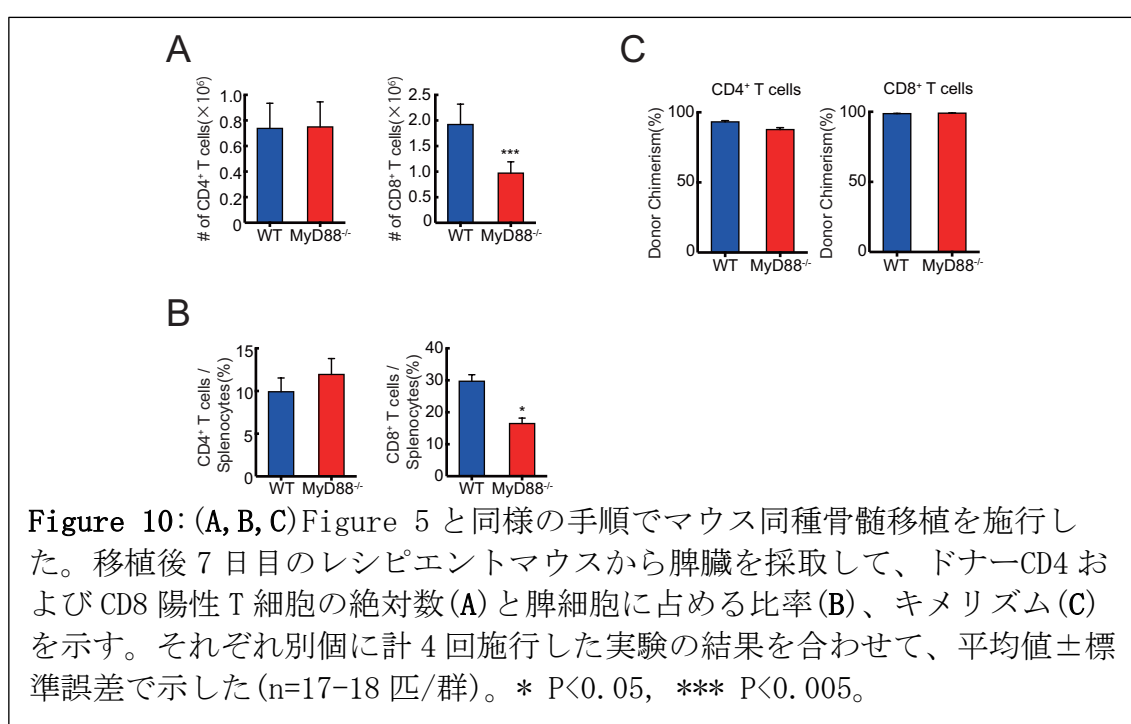
胸腺は GvHD による障害を受けやすい臓器のひとつであり、胸腺 GvHD は CD4 陽性かつ CD8 陽性の二重陽性胸腺細胞が消失するという特徴を持つ (Krenger et al, 2000 ; Krenger et al, 2008)。同種骨髄細胞移植後のレシピエントマウスで上記の二重陽性胸腺細胞を評価したところ、これら細胞の絶対数と胸腺細胞に占める比率ともに、コントロール群と比較して *MyD88*^{-/-} B6 ドナー T 細胞のレシピエントマウスで有意に保持されていた。この結果も、ドナー T 細胞の MyD88 シグナル経路が欠落すると GvHD が軽減することを示す傍証となっている (Figure 9A-C)。



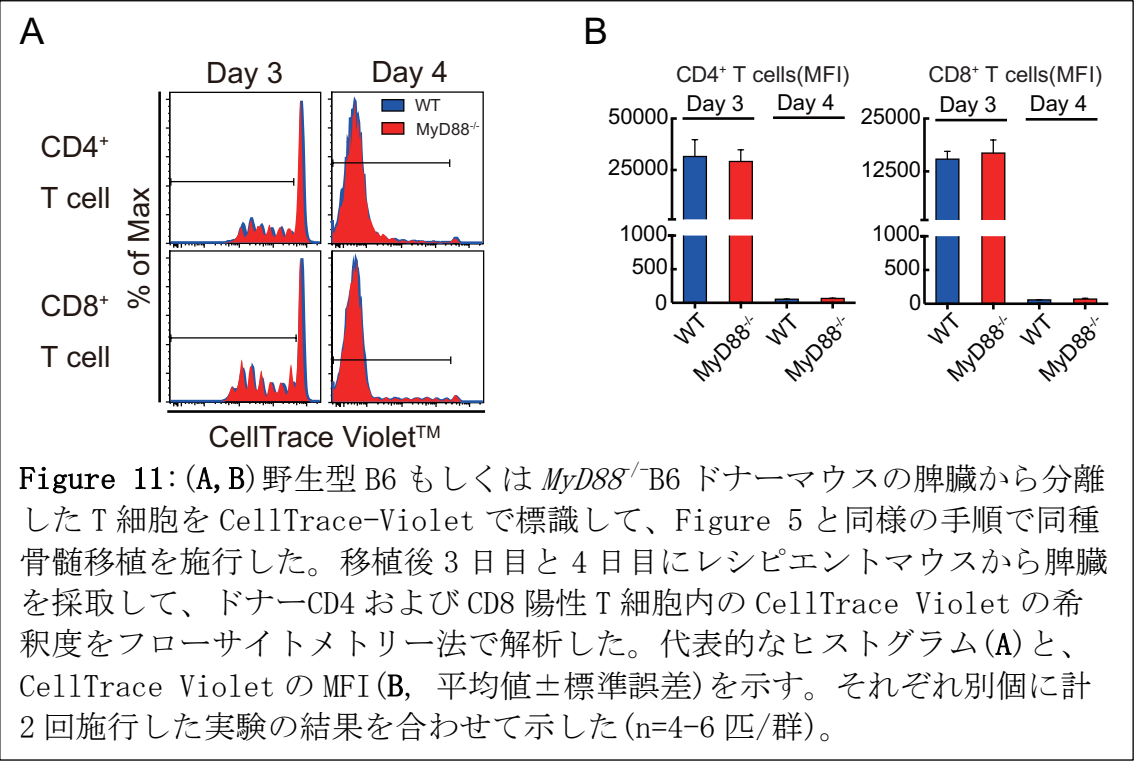
以上の結果より、ドナー T 細胞の MyD88 シグナル経路は GvHD の重症化に大きな役割を担うが、その一方でドナー骨髄細胞の MyD88 シグナル経路は GvHD の重症度に関連しないことが示された。

3. MyD88 シグナル経路はドナーT 細胞の Th1/Tc1/Th17 への分化に必須である

GvHD の発症は、主としてレシピエント固有のアロ抗原に反応を示すドナーT 細胞により誘導される (Shlomchik et al., 1999)。MyD88 シグナル経路が同種造血幹細胞移植後早期のドナーT 細胞の活性化や増殖に及ぼす影響を *in vivo* で検討した。同種骨髄移植後 7 日目の CD8 陽性 T 細胞の絶対数は野生型 B6 ドナーマウスの T 細胞を移植されたコントロール群に比べて、*MyD88*^{-/-} B6 ドナーT 細胞のレシピエントマウスで有意に減少していた。ただし両群とも T 細胞のキメリズムは完全なドナータイプであり、ドナーT 細胞の絶対数が減少した原因として混合キメリズムは関与しないと考えられた (Figure 10A-C)。



ドナーT 細胞の絶対数が減少した原因を検証するため、CellTrace-Violet で T 細胞を標識してマウス同種骨髄移植を行い、移植後早期のドナーT 細胞の分裂能を解析した。同種骨髄移植後 3 日目、4 日目ともに、野生型 B6 および *MyD88*^{-/-} B6 ドナーT 細胞の細胞分裂能は同等だった (Figure 11A, B)。



また BrdU を用いて同種骨髄移植後 6 日目のドナー T 細胞の増殖能を解析したが、やはり上記の両群で同等であり (Figure 12A-C)、移植後早期に *MyD88*^{-/-} B6 ドナー T 細胞の絶対数が減少した原因としてドナー T 細胞の増殖不良も関与していないと考えられた。

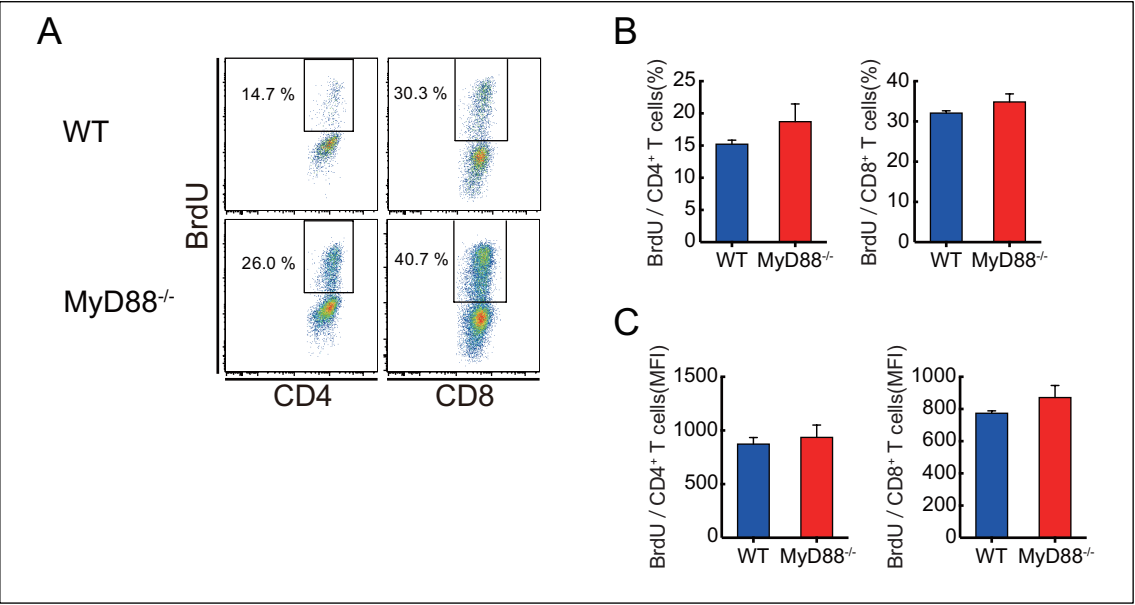


Figure 12: (A, B, C) Figure 5 と同様の手順でマウス同種骨髄移植を施行して、移植後 6 日目にレシピエントマウスへ 1mg の BrdU を腹腔内投与した。その 2 時間後にレシピエントマウスから脾臓を採取して、ドナー T 細胞の DNA に取り込まれた BrdU をフローサイトメトリー法で解析した。BrdU 陽性細胞の代表的なドットプロット (A)、またドナー T 細胞に占める比率 (B, 平均値±標準誤差) と MFI (C, 平均値±標準誤差) を示す。計 2 回施行した実験結果を合わせて示した (n=10 匹/群)。

一方、同種骨髄移植後 6 日目に生存能の指標としてアポトーシスを解析した結果、CD4 陽性 T 細胞では野生型 B6 および *MyD88*^{-/-} B6 ドナー T 細胞の生存能が同等だったが、CD8 陽性 T 細胞では *MyD88*^{-/-} B6 ドナー T 細胞の Annexin-V 陽性率が有意に上昇しており、アポトーシスが亢進していた (Figure 13A-C)。このため、MyD88 は同種骨髄移植後のドナー T 細胞において細胞分裂能には関与しないが、生存能を増強する機能を有することが示唆された。

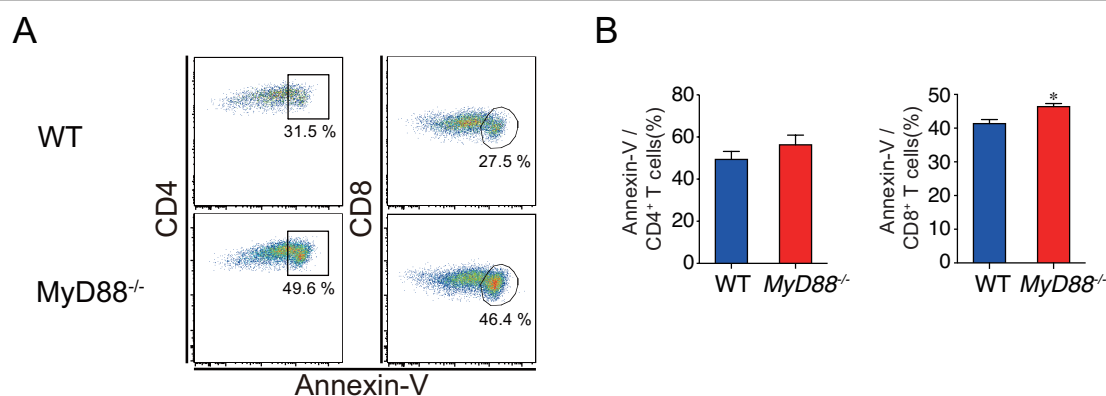


Figure 13: (A, B) Figure 5 と同様の手順でマウスに同種骨髄移植を施行した。移植後 6 日目にレシピエントマウスから脾臓を採取して、T 細胞を分離した。ドナー T 細胞をフローサイトメトリーで解析した際の、Annexin-V 陽性細胞の代表的なフローサイトメトリーのドットプロット (A)、またドナー T 細胞に占める比率 (B, 平均値±標準誤差) を示す。計 2 回施行した実験結果を合わせて示した (n=9-11 匹/群)。* P<0.05。

続いて、同種骨髄移植後のドナー T 細胞の分化へ MyD88 がどのように関与しているかを評価するため、同種骨髄移植後 7 日目にレシピエントマウスの脾臓を用いてドナー T 細胞のサイトカイン産生を解析した。*MyD88*^{-/-} B6 ドナーの CD4 陽性 T 細胞では IFN- γ と IL-17 の産生が、また *MyD88*^{-/-} B6 ドナーの CD8 陽性 T 細胞では IFN- γ の産生が野生型 B6 ドナー T 細胞に比べて有意に低下しており、MyD88 シグナル経路がドナー T 細胞の Th1 や Th17、Tc1 への分化に重要な因子であることが示唆された (Figure 14A-F)。

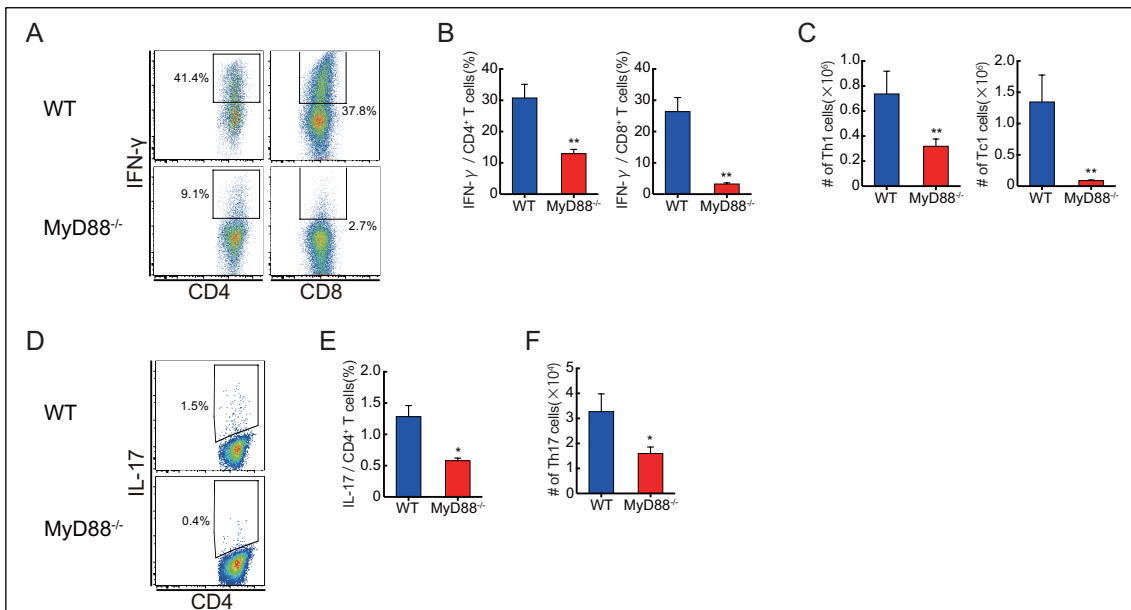


Figure 14: (A, B, C, D, E, F) Figure 5 と同様の手順でマウス同種骨髄移植を施行した。同種骨髄移植後 7 日目にレシピエントマウスから脾臓を採取して T 細胞を分離した後、PMA/ionomycin を用い T 細胞を刺激してドナー T 細胞の細胞内 IFN- γ (A-C)、細胞内 IL-17 (D-F) をそれぞれフローサイトメトリー法で解析した。代表的なドットプロット (A, D) と、ドナー T 細胞に占める各細胞内サイトカイン陽性細胞の比率 (B, E, 平均値 $\pm$ 標準誤差)、そしてその絶対数 (C, F, 平均値 $\pm$ 標準誤差) を示す。計 2 回繰り返し施行した実験結果を合わせて示した (n=10 匹/群)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ 。

これに対して、*MyD88*^{-/-} B6 ドナーの CD4 陽性 T 細胞では IL-4 の産生が野生型 B6 ドナーの CD4 陽性 T 細胞に比べて多い傾向にあり (Figure 15A-C)、MyD88 シグナル経路はドナー T 細胞の Th2 への分化に必須のものではないことが示唆された。

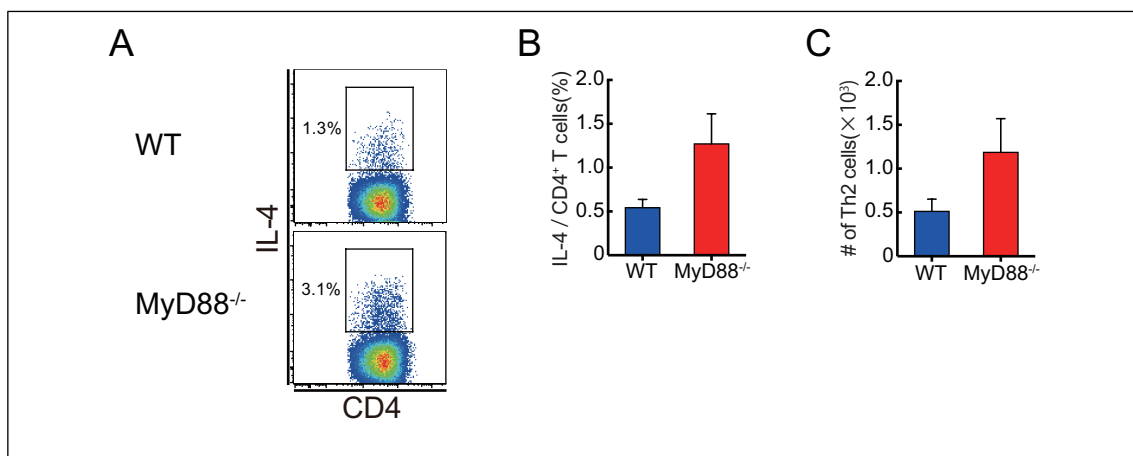


Figure 15: (A, B, C) Figure 5 と同様の手順でマウス同種骨髄移植を施行した。同種骨髄移植後 7 日目にレシピエントマウスから脾臓を採取して T 細胞を分離した後、PMA/ionomycin を用い T 細胞を刺激してドナー T 細胞の細胞内 IL-4 をフローサイトメトリー法で解析した。代表的なドットプロット (A) と、ドナー T 細胞に占める細胞内 IL-4 陽性細胞の比率 (B, 平均値±標準誤差)、そしてその絶対数 (C, 平均値±標準誤差) を示す。計 2 回繰り返し施行した実験結果を合わせて示した (n=10 匹/群)。

上記に示した *MyD88*^{-/-} T 細胞の Th1 および Tc1 への分化障害が *in vitro* でも観察されるかどうかを検証するため、定常状態の *MyD88*^{-/-} B6 マウスと野生型 B6 マウスの脾臓から純化した T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体でコーティングしたビーズを用いて刺激した。*MyD88*^{-/-} T 細胞の Th1 および Tc1 への分化障害は *in vitro* でも確認され、また同種骨髄移植後と同様に Th2 への分化には影響がなかった (Figure 16A-E)。以上の結果から、*MyD88*^{-/-} T 細胞の分化障害は T 細胞自身の内因性の MyD88 シグナル経路の欠落によって生じるものであり、抗原提示細胞との関連性はないと考えられた。

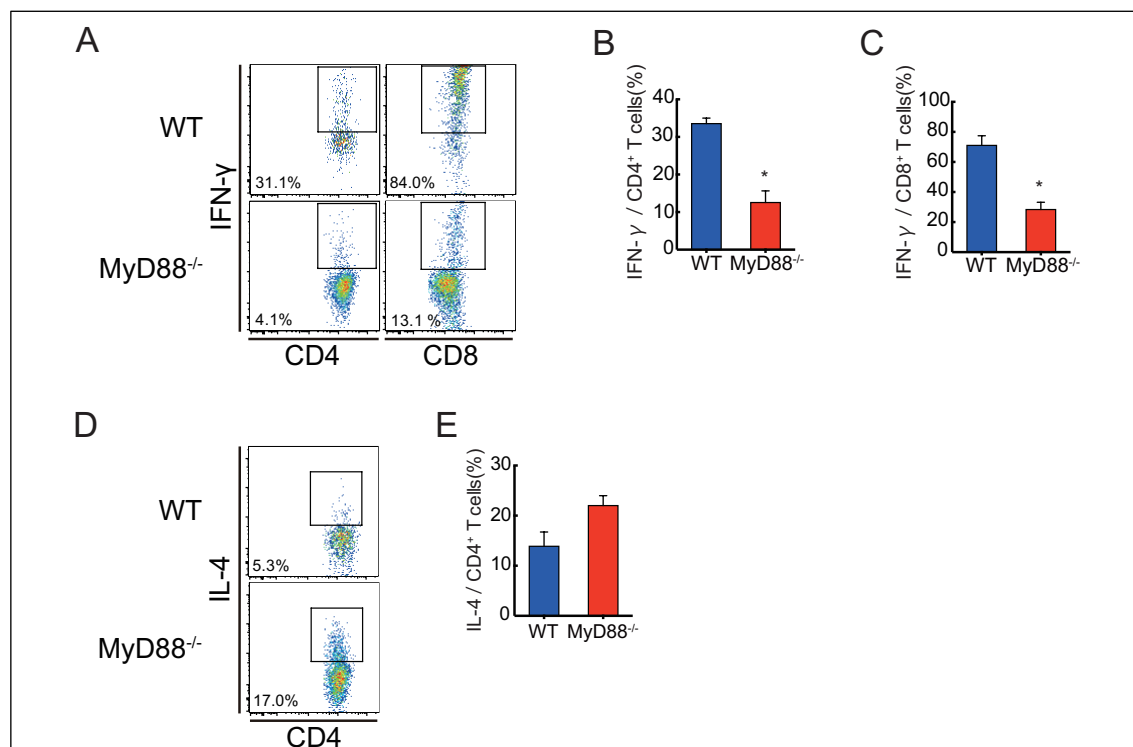
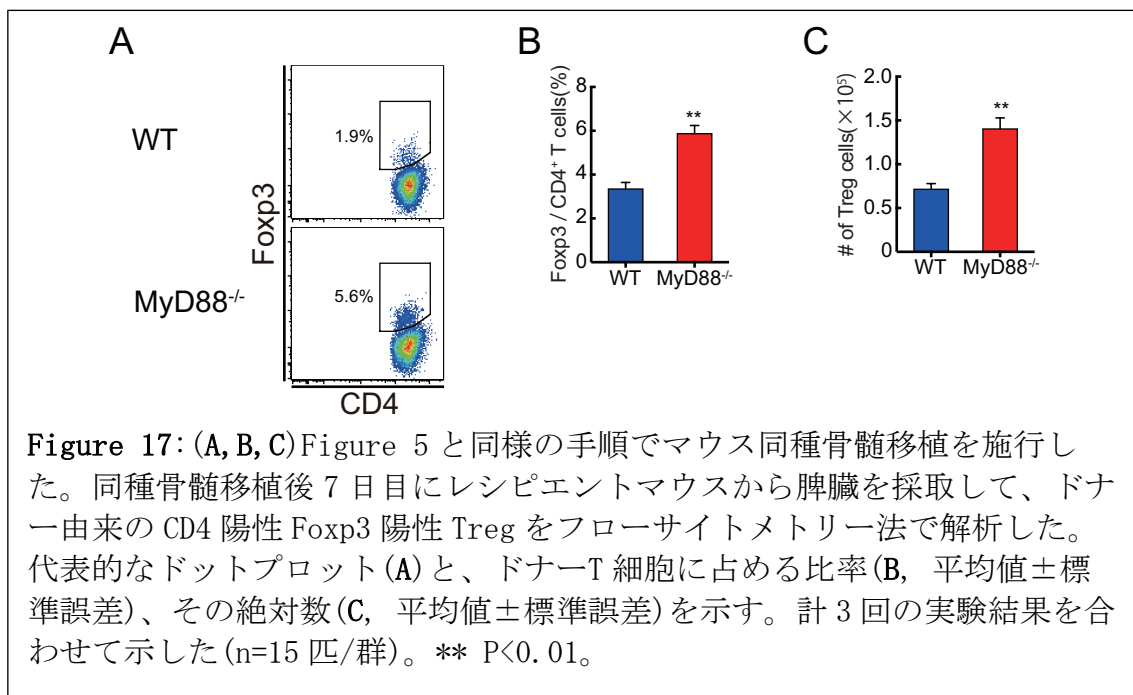


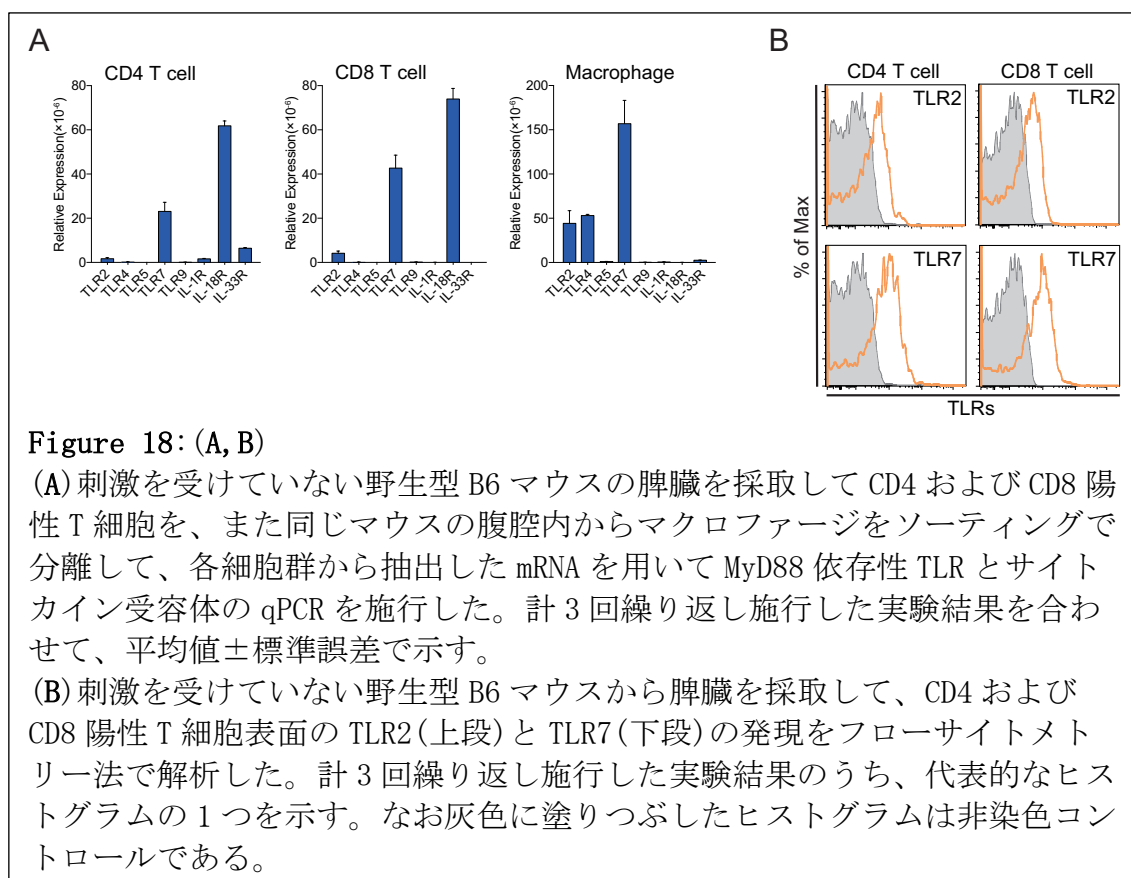
Figure 16: (A, B, C, D, E) 野生型 B6 および *MyD88*^{-/-} B6 マウスの脾臓から純化した 5×10^4 個の T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体ビーズで 96 時間刺激した後、その細胞内 IFN- γ (A, B, C) と細胞内 IL-4 (D, E) をフローサイトメトリー法で解析した。代表的なドットプロット (A, D) と各々のサイトカイン陽性細胞が T 細胞に占める比率 (B, C, E, 平均値±標準誤差) を示す。計 2 回施行した実験結果を合わせて示した (n=6 個/群)。* $P < 0.05$ 。

さらに、同種骨髄移植後 7 日目にレシピエントマウスの脾臓を採取してドナー T 細胞のフローサイトメトリー解析を行ったところ、*MyD88*^{-/-} B6 ドナー T 細胞のレシピエントマウスは野生型 B6 ドナーの T 細胞を移植されたコントロール群に比べて、CD4 陽性 Foxp3 陽性を示すドナー Treg の絶対数と、ドナー CD4 陽性 T 細胞に占める Treg の比率が有意に多かった (**Figure 17A-C**)。これらの結果をまとめると、同種造血幹細胞移植後にドナー T 細胞が Th1・Th17・Tc1 へと分化する際には MyD88 シグナル経路が必要となるものの、Th2 や Treg への分化に必須のものではなく、むしろ Treg に関してはその分化を抑制している可能性が示唆された。



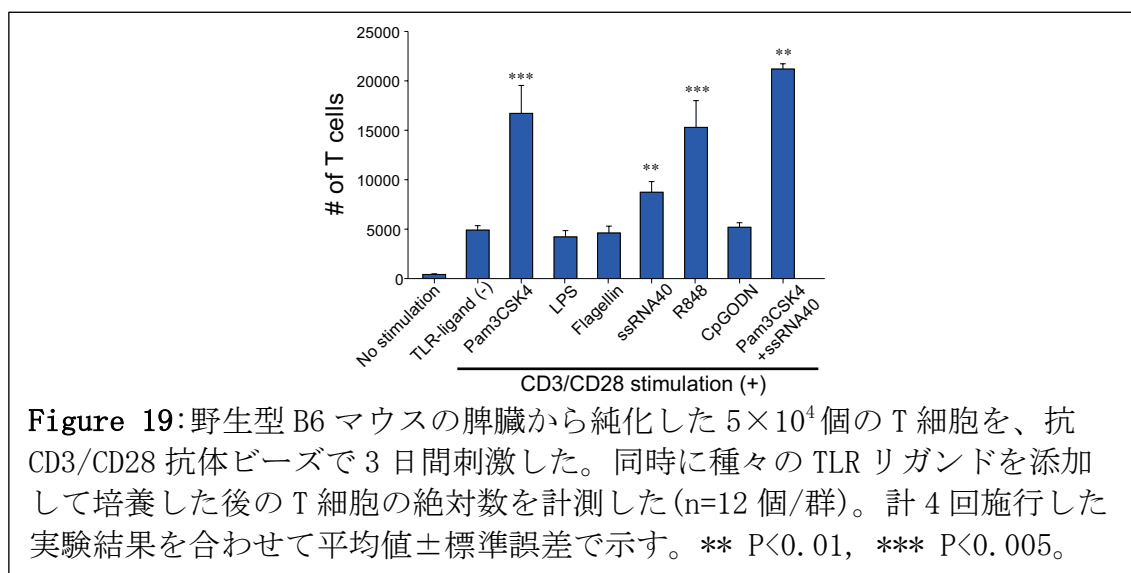
4. ドナーT 細胞の TLR が単独で欠落しても重症 GvHD の発症は抑制されない

MyD88 は TLR の大部分と、IL-1 や IL-18・IL-33 など IL-1 ファミリーに属するサイトカインからのシグナルを伝達する。上記のサイトカインが GvHD に果たす役割を検討した研究は過去にいくつも発表されているが、T 細胞に発現している TLR に関してはまだ明らかにされていない。そこで最初に、MyD88 依存性の TLR と IL-1 ファミリーに属するサイトカインの受容体が CD4 および CD8 陽性 T 細胞に発現しているかどうかを解析した。qPCR では刺激を受けていない CD4 および CD8 陽性 T 細胞に、マクロファージほど高発現ではないものの TLR2 と TLR7 が発現していることが明らかとなり (Figure 18A)、フローサイトメトリーでも CD4 および CD8 陽性 T 細胞に TLR2 と TLR7 が発現していることを確認した (Figure 18B)。また、CD4 陽性 T 細胞には IL-1R と IL-18R、IL-33R が、CD8 陽性 T 細胞には IL-18R が発現していた (Figure 18A)。



これらの T 細胞に発現している TLR2 や TLR7 が実際に機能しているかどうかを検証するため、*in vitro* で抗 CD3/CD28 抗体ビーズを用いて T 細胞を刺激した際、TLR2 のリガンドである Pam3CSK4 や TLR7 のリガンドである ssRNA40 および R848 を添加した。その結果、培養 3 日目の T 細胞数はこれらリガンドの添加により有意に増加を示し、T 細胞に発現している TLR2 および TLR7 は T 細胞の増殖応答もしくは生存を共刺激因子として促進することが示唆された

(Figure 19)。なお TLR4・TLR5・TLR9 のリガンドである lipopolysaccharide や flagellin、CpG-ODN を添加しても T 細胞の増殖能は増強されなかった。



続いて、ドナーT細胞に発現している TLR2 と TLR7 が GvHD に及ぼす影響を評価するため、*TLR2*^{-/-}あるいは *TLR7*^{-/-} B6 ドナーT細胞と野生型 B6 ドナーマウスの TCD-BM 細胞をレシピエントマウスへ移植した。*TLR2*^{-/-}もしくは *TLR7*^{-/-} B6 ドナーT細胞を移植されたレシピエントマウスの死亡率と GvHD 重症度は、野生型 B6 ドナーT細胞を移植されたレシピエントマウスと同等で、TLR2 や TLR7 のシグナル経路が単独で欠落しても GvHD の軽減に結びつかないと考えられた (Figure 20A, B)。上記の結果や、ドナーT細胞の MyD88 シグナル経路が GvHD の重症化に必要であることを総合して考えると、複数の TLR シグナル経路や IL-1R・IL-18R・IL-33R などのサイトカインシグナル経路が相補的に働いて GvHD の重症化に寄与している可能性が示唆される。よって、GvHD を軽減させるためにはこれらのシグナルを同時に遮断する必要があると考えられる。

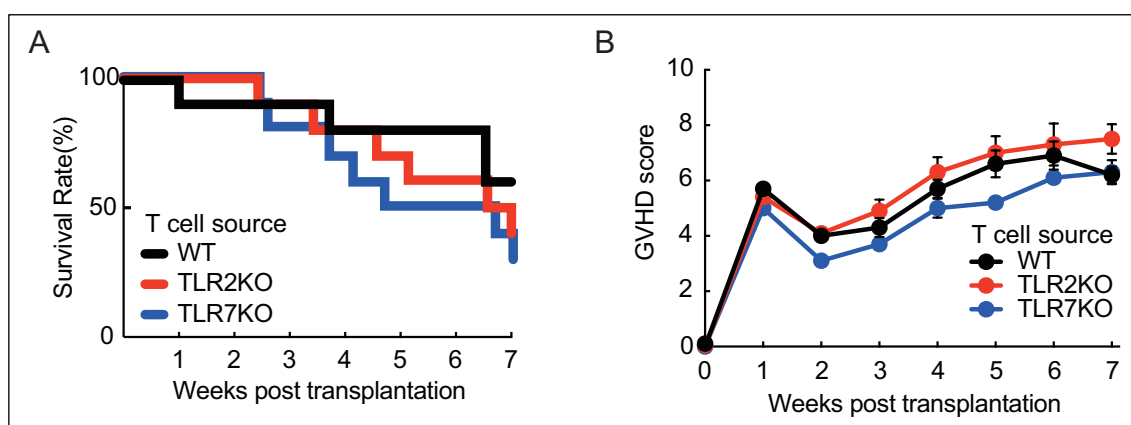
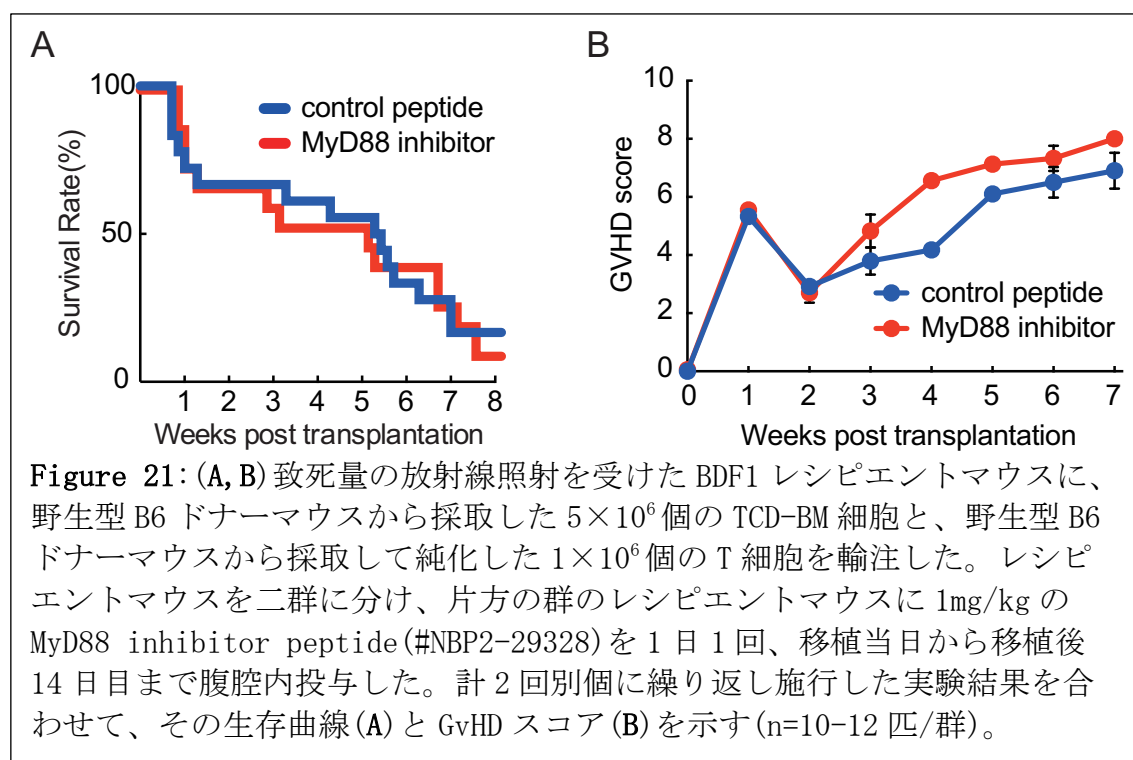


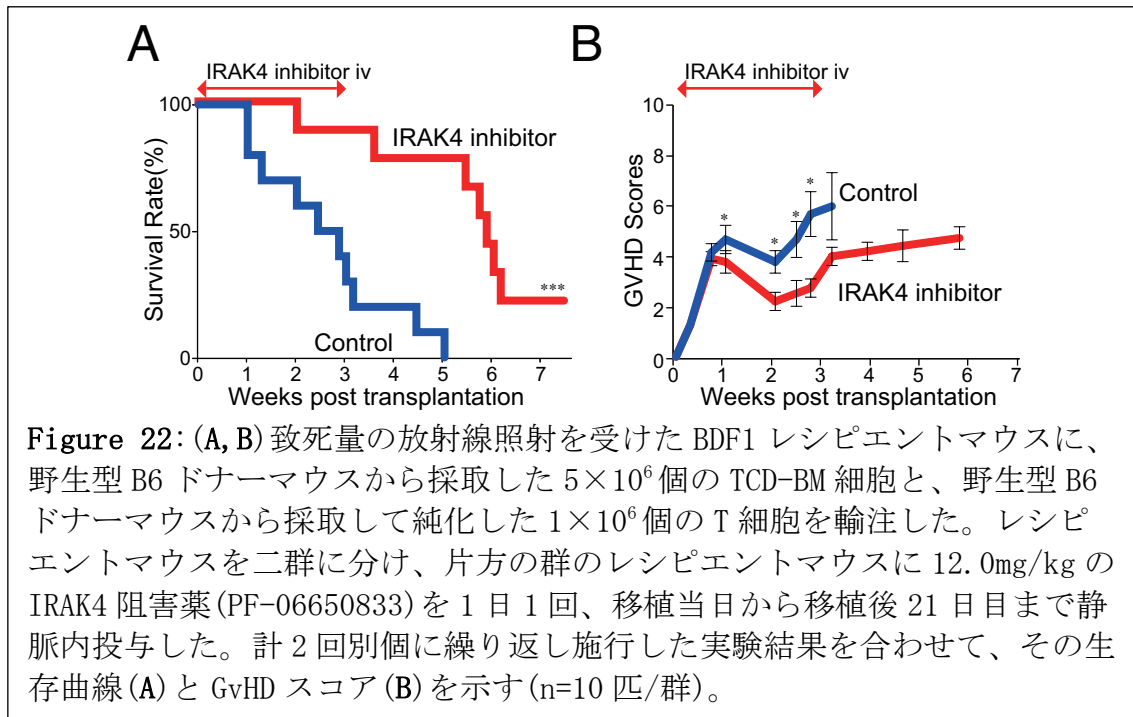
Figure 20: (A, B) 致死量の放射線照射を受けた BDF1 レシピエントマウスに、野生型 B6 ドナーマウスから採取した 5×10^6 個の TCD-BM 細胞と、野生型 B6 $\cdot$ $TLR2^{-/-}$ もしくは $TLR7^{-/-}$ B6 ドナーマウスから採取して純化した 1×10^6 個の T 細胞を輸注した。計 2 回別個に繰り返し施行した実験結果を合わせて、その生存曲線 (A) と GvHD スコア (B) を示す (n=10 匹/群)。

これら複数の TLR/IL-1R スーパーファミリーに属する受容体のシグナル経路を同時に薬剤で遮断することで、MyD88 シグナル経路が実臨床で GvHD の治療標的となり得るか評価するため、最初に MyD88 阻害薬 (NBP2-29328) を用いた。同種骨髄移植後にレシピエントマウスへ 1mg/kg の NBP2-29328 を 2 週間にわたり連日腹腔内投与したが、死亡率や GvHD の重症度はコントロール群と変わらなかった (Figure 21)。ドナー T 細胞の MyD88 シグナル経路が欠落することで重症 GvHD を抑制したことを鑑みると、NBP2-29328 は *in vivo* での薬剤の吸収や分布、そして効果発現に何らかの問題があると考えられた。



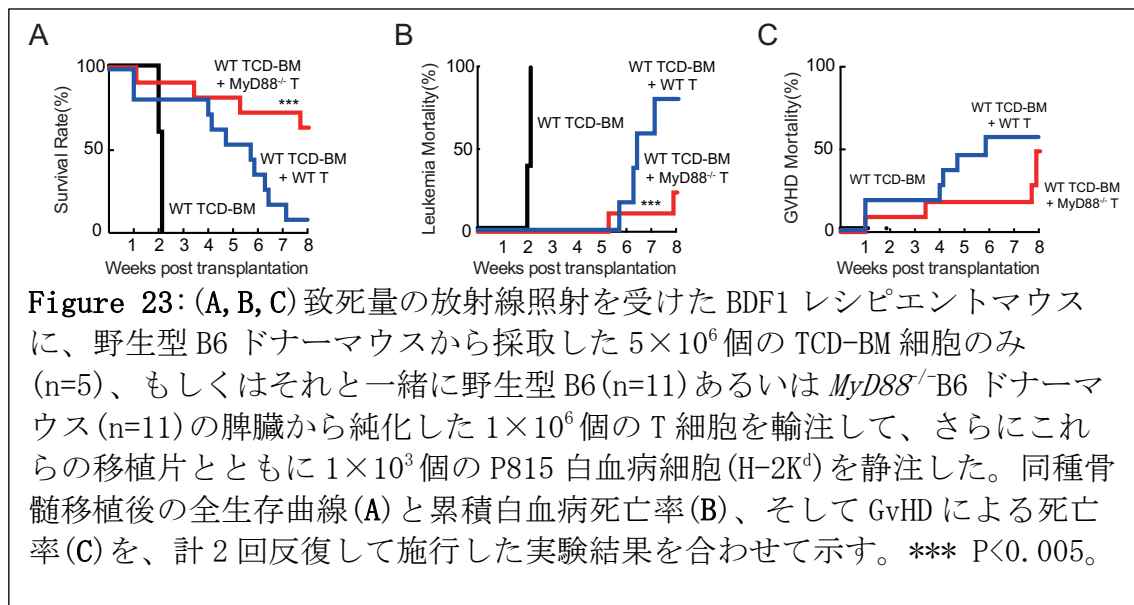
IRAK4 は MyD88 からのシグナルをさらに下流の炎症性シグナル経路へと伝えるアダプター分子であり、IRAK4 阻害薬を用いることで MyD88 シグナル経路を遮断することが可能と考えられる。Pfizer 社が開発している IRAK4 阻害薬 PF-06650833 は膠原病関連疾患に対する治験が進行中であり、今後の早期の臨床応用が期待されている薬剤である。この PF-06650833 を同種造血幹細胞移植後に投与することで、MyD88/IRAK4 シグナル経路が GvHD の治療標的となり得るか評価した。同種骨髄移植後のレシピエントマウスへ 12.0mg/kg の PF-06650833 を

移植当日から3週間連日静脈内投与したところ、GvHDの重症度と死亡率が有意に抑制され、PF-06650833はGvHD予防薬として有望であることが示された (Figure 22A, B)。



5. MyD88 シグナルはドナーT 細胞の GvL 活性に必須のものではない

最後に、ドナーT 細胞から MyD88 シグナルが欠落することで GvHD が有意に抑制されたことを踏まえ、ドナーT 細胞の MyD88 シグナルが同種骨髄移植後の GvL 効果に必要なものであるかどうかを検証した。致死量の放射線照射を受けたレシピエントの BDF1 マウスに、移植片として野生型 B6 ドナーマウスから採取した 5×10^6 個の TCD-BM 細胞と、野生型 B6 もしくは *MyD88*^{-/-} B6 ドナーマウスから採取した 1×10^6 個の T 細胞を静注して、同時にドナーと同系由来の P815 白血病細胞 1×10^3 個を投与した。野生型 B6 ドナーマウスの TCD-BM 細胞のみ移植されたレシピエントマウスはすべて同種骨髄移植後 2 週間以内に白血病が原因で死亡したが、一方で TCD-BM 細胞と同時に野生型 B6 もしくは *MyD88*^{-/-} B6 ドナーT 細胞を移植されたレシピエントマウスでは白血病による死亡率が有意に抑制された。*MyD88*^{-/-} B6 ドナーT 細胞を移植されたレシピエントマウスでは白血病による死亡率が抑制され、かつ GvHD による死亡率も抑制される傾向にあったため、同群の全生存率が有意に延長した。このため、ドナーT 細胞の MyD88 シグナルは GvL 効果に必須のものではないことと、ドナーT 細胞の MyD88 シグナル経路を阻害することで同種造血幹細胞移植後の GvL 効果を減弱させることなく GvHD の重症化を抑制する、理想的な治療標的となる可能性があることが示唆された(Figure 23A-C)。



考察

IL-1R/TLR スーパーファミリーは IL-1R、IL-18R、IL-33R と 10 種類以上の TLR から構成される。TLR は主にマクロファージや樹状細胞などの骨髄系細胞に発現しているが、最近の知見から T 細胞にも TLR が発現していることが明らかになった (Gelman et al., 2004)。TLR2、TLR5、TLR7/8、TLR9 からのシグナルは T 細胞の活性化にそれぞれ共刺激因子としてはたらき、T 細胞の増殖能や生存能の増強、また Th1 や Th17 への分化を誘導する (Imanishi et al., 2007 ; Komai-Koma et al., 2004 ; Caron et al., 2005 ; Heimesaat et al., 2010)。IL-1R、IL-18R、IL-33R を含む IL-1R ファミリーもまた T 細胞の表面に発現しており、T 細胞の種々の機能を調整している。T 細胞の IL-1R および IL-18R シグナルは Th1 や Th17、また抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の免疫応答に重要である (Schenten et al., 2014 ; O'Donnell et al., 2014)。本研究では刺激を受けていない T 細胞に TLR2、TLR7、IL-1R、IL-18R、IL-33R の発現を確認したものの、TLR4 や TLR5、TLR9 の発現を検出できなかった。上記のようにこれまでの研究からは TLR4、TLR5、TLR9 も含め、T 細胞に広範囲かつ多彩な組み合わせの TLR/IL-1R スーパーファミリーに属する受容体が発現していることが報告されており、このことは T 細胞に発現している TLR/IL-1R スーパーファミリーに属する受容体が T 細胞自身の活性化状態やサブタイプ、また炎症や細菌叢などの微小環境に依存することを示唆している。

本研究では *in vitro* で TLR2 と TLR7 からのシグナルが T 細胞の活性化に対し共刺激因子となり得ることを示したが、ドナー T 細胞から TLR2 または TLR7 をそれぞれ単独で欠落させても同種骨髄移植後の GvHD の重症度は変わらなかった。これらの実験結果は、ドナー細胞の TLR2 もしくは TLR7 が欠落していても GvHD による死亡率や発症率、重症度を変化させなかったという過去の研究と合致するものであり (Heimesaat et al., 2010 ; Lee et al., 2015)、同種造血幹細胞移植後の GvHD の病態形成において各々の TLR が互いに相補的に機能するか、あるいは機能を重複させている可能性を示唆する。ドナー T 細胞の IL-18R もしくは IL-33R シグナルもまた GvHD の病態形成において各研究で多種多様な結果が示されており、実験モデルや薬剤の投与スケジュールによって結果が異なる可能性がある (Reddy et al., 2001 ; Okamoto et al., 2000 ; Min et al., 2004 ; Matta et al., 2016)。T 細胞において TLR/IL-1R スーパーファミリーに属する受容体の各々が互いに相補的に機能するか、あるいは機能を重複させている可能性があるという事実を踏まえて、本研究では TLR/IL-1R スーパーファミリーに属する受容体からのシグナルの大半をブロックすることが可能な MyD88 が欠落している T 細胞を研究に用いた。本研究で、*MyD88*^{-/-}ドナー T 細胞が同種造血幹細胞移植後に Th1、Tc1、Th17 への分化能を障害される一方で、増殖能および Foxp3 陽性 Treg への分化能は保持され、その結果として重症 GvHD の軽減に結びつくことを発見した。上記のような *MyD88*^{-/-}ドナー T 細胞

の機能障害は *in vitro* の細胞培養実験でも証明することができた。過去の研究でも T 細胞の Th1、Tc1、Th17 への分化を阻害すると重症 GvHD が抑制されることが報告されており、MyD88 シグナル経路の阻害は T 細胞の Th1・Tc1・Th17 への分化を全てブロックできる強力な GvHD 抑制療法となり得る (Yu et al., 2011)。しかしその一方で、Lim らが発表した研究では本研究で用いたものと類似したマウスの同種骨髄移植モデルで、ドナー T 細胞の MyD88 が欠落するとドナー T 細胞の Th1 への分化が障害されるにもかかわらず、GvHD は抑制されることなく GvL 効果が減弱することを指摘している (Lim et al., 2015)。ただし彼らの実験では同種骨髄移植のコントロール群で GvHD による死亡率が 30% だったのに対して、本研究では GvHD による死亡率が 80% とより重症であることに注意すべきであり、彼らの実験では同種骨髄移植の条件として治療強度が弱いために *MyD88*^{-/-} ドナー T 細胞の GvHD 抑制効果がマスクされた可能性がある。このことから、MyD88 シグナルは GvHD の発症や重症化に関与していると考えられる。また本研究では GvHD の標的臓器として主に腸管を評価したが、腸管は移植前処置や danger signal の影響を受けやすい臓器のひとつであり、腸管幹細胞や Paneth 細胞はドナー T 細胞が産生する IFN- γ によりアポトーシスに陥ることが示されている (Eriguchi et al., 2018)。ドナー T 細胞の MyD88 シグナルが欠損すると IFN- γ の発現が著しく低下することで、腸管幹細胞や Paneth 細胞が保持されて dysbiosis が軽減され、結果として GvHD の軽減につながると考えられる。

TLR/IL-1R スーパーファミリーに属する受容体のシグナル阻害薬を用いた GvHD の制御はこれまでも研究されており、IL-1/IL-1R もしくは IL-33/IL-33R に対する阻害薬を用いると動物実験レベルで GvHD の抑制効果が認められる (Zhang et al., 2015 ; Jankovic et al., 2013)。しかし、実臨床では同種造血幹細胞移植後の GvHD 発症例に対して IL-1R 阻害薬 Anakinra を投与しても、GvHD の有意な抑制および軽減・保護効果をランダム化試験で示すことができず (Antin et al., 2002)、やはり単独の受容体および標的分子の阻害薬では強力な GvHD 抑制効果を得ることができないと考えられる。MyD88 は IRAK4 を動員して、IL-1R/TLR スーパーファミリーに属する受容体の大半からのシグナルを下流の炎症性シグナル経路へとつなげる重要なアダプター分子である (Hultmark, 1994)。TLR/IL-1R スーパーファミリーに属する受容体の各々が互いに相補的に機能するか、あるいは機能を重複させている可能性を考慮すると、MyD88 もしくはその下流の IRAK4 をブロックすることで複数の TLR/IL-1R シグナルを一括して阻害することは、単独の TLR/IL-1R シグナル経路を個別に阻害するよりも効果的と考えられる。本研究では MyD88 阻害薬 (NBP2-29328) を用いても同種造血幹細胞移植後の重症 GvHD を抑制することができなかった。この原因として本薬剤の至適な投与量や投薬期間、投与経路、また薬剤の吸収・分布・代謝などといったプロファイルが明らかになっておらず、本研究でのプロトコールが適切でなかった可能性が考えられ、今後は至適な投与方法の確認や、本薬剤以外の MyD88 阻害薬での再検討も必要と思われる。一方、IRAK4 阻害薬 (PF-06650833) は膠原病症例に対する臨床試験が現在進行中で、その治療効果や投

与方法の解明がより進んでいる薬剤である(Wu et al., 2015 ; Lee et al., 2017)。ただし、IRAK4 は TLR/IL-1R シグナル経路を構成する各成分のうち MyD88 の下流にあるアダプター分子であり、実際には IRAK4 の阻害が MyD88 を阻害するよりも効果的に TLR/IL-1R シグナル経路を遮断して、同種造血幹細胞移植後の重症 GvHD を抑制した可能性がある。マウスの同種皮膚移植モデルにおいて T 細胞の IRAK4 シグナルが欠損すると皮膚移植片の拒絶が遅延することが証明されており(Suzuki et al., 2006)、今後は *MyD88*^{-/-} と IRAK4 欠損 (*IRAK4*^{-/-}) ドナーマウスを用いて T 細胞活性化や機能分化への影響を比較検討することが望ましい。

本研究ではドナーT細胞の MyD88 シグナルが欠失しても GvL 効果が保持され、むしろ同種骨髄移植後のレシピエントマウスの白血病腫瘍死が有意に抑制される結果となったが、そのメカニズムに関しては十分に検討できていない。MyD88 シグナルが欠損することで GvHD を誘導する IFN- γ 産生 Th1 細胞への分化が阻害されて GvHD 抑制にはたらく一方で、GvL 効果を担っていると思われる細胞傷害性 T 細胞(cytotoxic T cell: CTL)の機能に正の影響を及ぼしている可能性があり、CTL 活性の評価等を行い詳細に検討する必要がある。

本研究において、ドナーT細胞固有の MyD88 シグナルが GvHD の発症や重症化へ重要な役割を担うことを動物実験レベルで明らかにした。また、ドナーT細胞の MyD88 シグナルが欠失しても GvL 効果が保持されることを証明した。さらに、MyD88 シグナルをブロックするため同種骨髄移植後に IRAK4 阻害薬を投与することで、GvHD を軽減させることが可能であることを示した。これらの結果から、IRAK4 阻害薬がドナーT細胞の MyD88/IRAK4 シグナル経路を遮断することで同種造血幹細胞移植後の GvL 効果を損ねることなく GvHD を抑制する可能性が示唆された。IRAK4 阻害薬は膠原病関連疾患のみならず MyD88 遺伝子変異を有する B 細胞性悪性腫瘍や T 細胞性悪性腫瘍、急性白血病などの造血器悪性腫瘍に対する治療薬としても臨床試験が進められている薬剤である(Li et al., 2015)。同種造血幹細胞移植後に GvHD の予防もしくは治療のため IRAK4 阻害薬を投与すると、これらの造血器悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果も発揮して、抗 GvHD 作用と抗腫瘍効果の双方を期待できる可能性が示唆される(Kelly et al., 2015)。本研究では IRAK4 阻害薬が GvHD 予防薬として有用であることを示したが、既に発症した GvHD に対する治療薬として有効かどうかを今後検討する必要がある。また実臨床で IRAK4 阻害薬を用いた際、同種造血幹細胞移植の重篤な合併症のひとつである易感染性を悪化させるかどうかに関しても検討が必要である。

MyD88 と同様に、JAK2 に代表されるサイトカインや成長因子など複数の受容体からのシグナルを統合する種々のアダプター分子が GvHD の治療標的として有望であることが示され、今後の研究や臨床応用へつながると考えられる(Teshima et al., 2016 ; Zeiser et al., 2017)。今後、TLR/IL-1R スーパーファミリーに属する受容体の大半からのシグナルを遮断する MyD88 もしくは

IRAK4 阻害薬は、GvHD に対する発症予防および治療効果を中心とした臨床応用に向けてより詳細な研究を行うべき薬剤と考えられる (McDonald et al., 2010)。

総括および結論

本研究により、以下の知見が得られた。

- 刺激を受けていない定常状態の CD4 および CD8T 細胞には TLR2、TLR7、IL-1R、IL-18R、IL-33R が発現している
- *in vitro* で TLR2 リガンドおよび TLR7 リガンドは共刺激因子として T 細胞の増殖もしくは生存応答を増強する
- ドナーT細胞の MyD88 シグナル経路は同種造血幹細胞移植後のマウスの GvHD 発症とその重症化に寄与する
- MyD88 シグナル経路を持たないドナーT細胞は Th1 および Tc1、Th17 への分化に障害を受けるが、Th2 や Treg への分化能は保持される
- ドナーT細胞の MyD88 シグナル経路が欠落しても、同種造血幹細胞移植後のマウスに対する GvL 効果は保持される
- 同種造血幹細胞移植後に IRAK4 阻害薬を投与すると、GvHD が抑制される

1. 新たに得られた知見の意義

獲得免疫を司る T 細胞に、自然免疫の主なシグナル伝達経路である TLR/IL-1R スーパーファミリーに属する受容体が発現しており、実際に共刺激因子として機能していることはこれまでの知見より明らかであったが、同種造血幹細胞移植後の GvHD において T 細胞の MyD88 シグナル経路がその発症や重篤化にもたらす影響は詳細な検討がされていなかった。本研究で、ドナーT細胞の MyD88 が欠落することによりエフェクターT細胞への分化能が障害を受け、その結果として GvHD の発症抑制と軽減に寄与することが明らかとなった。またドナーT細胞の MyD88 が欠落しても同種造血幹細胞移植後の GvL 効果には影響を及ぼさないことも明らかとなり、MyD88/IRAK4 シグナル経路を遮断することで同種造血幹細胞移植後の GvL 効果を損ねることなく重症 GvHD の発症を抑制する可能性があることを発見した。MyD88/IRAK4 シグナル経路を標的とした新規の GvHD 予防および治療薬は、現在臨床で用いられている免疫抑制薬と比べて、同種造血幹細胞移植後の造血器悪性腫瘍の再発を増やさない GvHD 治療法となり得るため、多くの患者に利益をもたらすものと考えられる。

2. 今後の研究の展開

本研究では MyD88 阻害薬として合成ペプチドを用い、同種造血幹細胞移植後の GvHD を評価したが、MyD88 阻害薬による GvHD 発症抑制効果を示すことができなかった。投与量や投与期間、投与経路など MyD88 阻害薬としての治療プロトコルを再評価する必要性と同時に、ST2825 などに代表されるほかの MyD88 阻害薬の検討も必要と考えられる。また IRAK4 阻害薬に関してはその臨床応用に向けて、有効性のみならず安全性も評価するために前臨床試験を進めてゆく必要があるが、GvHD の発症抑制のみならず既に発症した GvHD に対する治療標的となり得るか、さらに治療関連有害事象としての易感染性についても評価が必要と考えられる。

謝辞

北海道大学大学院医学研究科内科学分野専攻血液内科教室の豊嶋崇徳教授、ならびに橋本大吾准教授には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始ご指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。また大阪大学大学院医学研究科免疫制御学教室の竹田潔教授が確立されたMyD88 遺伝子ノックアウトマウスを用いて各実験を遂行し、同時に同氏から有益なご助言を戴きました。ここに深謝の意を表します。

本教室の早瀬英子先生、高橋秀一郎先生、江端浩先生、小笠原励起先生、山川知宏先生、大東寛幸先生、荒隆英先生、横山絵美先生、立野貴大先生、長谷川裕太先生には実験遂行にあたり日々ご協力戴き、また有益なご討論やご助言を戴きました。ここに感謝の意を表します。

九州大学医学部第一内科教室病態修復内科学分野の岡英世先生、青山一利先生、門脇賢典先生には本研究の細部にわたりご指導とご助言を戴きました。ここに感謝の意を表します。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費(21390295, 17H04206, 17K09945)の助成を受けたものです。また、日本血液学会研究助成、JST センター・オブ・イノベーション(COI)プログラム、持田記念医学薬学振興財団研究助成金の助成を受けています。

利益相反

開示すべき利益相反状態はありません。

引用文献

- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. *9*. 143-150.
- Antin, J.H., Weisdorf, D., Neuberg, D., Nicklow, R., Clouthier, S., Lee, S.J., Alyea, E., McGarigle, C., Blazar, B.R., Sonis, S., et al. (2002) Interleukin-1 blockade does not prevent acute graft-versus-host disease: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interleukin-1 receptor antagonist in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. *100*. 3479-3482.
- Blazer, B.R., Murphy, W.J., and Abedi, M. (2012) Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat. Rev. Immunol.* *12*. 443-458.
- Caron, G., Duluc, D., Fremaux, I., Jeannin, P., David, C., Gascan, H., and Delneste, Y. (2005) Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN- γ production by memory CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* *175*. 1551-1557.
- Cooke, K.R., Kobzik, L., Martin, T.R., Brewer, J., Delmonte, J.Jr., Crawford, J.M., and Ferrara, J.L.M. (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.
- Cooke, K.R., Hill, G.R., Crawford, J.M., Bungard, D., Brinson, Y.S., Delmonte, J.Jr., and Ferrara, J.L.M. (1998) Tumor necrosis factor- α production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* *102*. 1882-1891.
- Cooke, K.R., Gerbitz, A., Crawford, J.M., Teshima, T., Hill, G.R., Tesolin, A., Rossignal, D.P., and Ferrara, J.L.M. (2001) LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* *107*. 1581-1589.
- Duffner, U.A., Maeda, Y., Cooke, K.R., Reddy, P., Ordemann, R., Liu, C., Ferrara, J.L.M., and Teshima, T. (2004) Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J. Immunol.* *172*. 7393-7398.
- Eriguchi, Y., Nakamura, K., Yokoi, Y., Sugimoto, R., Takahashi, S.,

Hashimoto, D., Teshima, T., Ayabe, T., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2018) Essential role of IFN- γ in T cell-associated intestinal inflammation. *JCI Insight*. *3*. e121886.

Ferrara, J.L.M., Cooke, K.R., and Teshima, T. (2003) The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int. J. Hematol.* *78*. 181-187.

Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013) The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. *39*. 1003-1018.

Gelman, A.E., Zhang, J., Choi, Y., and Turka, L.A. (2004) Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4⁺ T cell survival. *J. Immunol.* *172*. 6065-6073.

Hayase, E., Hashimoto, D., Nakamura, K., Noizat, C., Ogasawara, R., Takahashi, S., Ohigashi, H., Yokoi, Y., Sugimoto, R., Matsuoka, S., et al. (2017) R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* *214*. 3507-3518.

Heimesaat, M.M., Nogai, A., Bereswill, S., Plickert, R., Fischer, A., Loddenkemper, C., Steinhoff, U., Tchaptchet, S., Thiel, E., Freudenberg, M.A., et al. (2010) MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease. *Gut*. *59*. 1079-1087.

Hill, G.R., Crawford, J.M., Cooke, K.R., Brinson, Y.S., Pan, L., and Ferrara, J.L.M. (1997) Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood*. *90*. 3204-3213.

Holtan, S.G., Pasquini, M., and Weisdorf, D.J. (2014) Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. *Blood*. *124*. 363-373.

Hultmark, D. (1994) Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *199*. 144-146.

Imanishi, T., Hara, H., Suzuki, S., Suzuki, N., Akira, S., and Saito T. (2007) Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J. Immunol.* *178*. 6715-6719.

Jankovic, D., Ganesan, J., Bscheider, M., Stickel, N., Weber, F.C., Guarda, G., Follo, M., Preifer, D., Tardivel, A., Ludigs, K., et al. (2013) The Nlrp3 inflammasome regulates acute graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* *210*. 1899-1910.

Jarvis, M., Marzolini, M., Wang, X.N., Jackson, G., Sviland, L., and Dickinson, A.M. (2003) Heat shock protein 70: correlation of expression with degree of graft-versus-host response and clinical graft-versus-host disease. *Transplantation*. *76*. 849-853.

Jin, B., Sun, T., Yu, X.H., Yang, Y.X., and Yeo, A.E.T. (2012) The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*. 836485.

Kabelitz, D. (2007) Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* *19*. 39-45.

Kaisho, T., and Akira, S. (2001) Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends. Immunol.* *22*. 78-83.

Kawai, T., and Akira, S. (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* *34*. 637-650.

Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014) Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* *5*. 1-8.

Kelly, P.N., Romero, D.L., Yang, Y., Shaffer, A.L.3rd, Chaudhary, D., Robinson, S., Miao, W., Rui, L., Westlin, W.F., Kapeller, R. et al. (2015) Selective interleukin-1 receptor-associated kinase 4 inhibitors for the treatment of autoimmune disorders and lymphoid malignancy. *J. Exp. Med.* *212*. 2189-2201.

Komai-Koma, M., Jones, L., Ogg, G.S., Xu, D., and Liew, F.Y. (2004) TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*. 3029-3034.

Kono, H., and Rock, K.L. (2008) How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* *8*. 279-289.

Koyama, M., Kuns, R.D., Olver, S.D., Raffelt, N.C., Wilson, Y.A., Don, A.L., Lineburg, K.E., Cheong, M., Robb, R.J., Markey, K.A., et al. (2011) Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat. Med.* *18*. 135-142.

Krenger, W., Rossi, S., Piali, L., and Hollander, G.A. (2000) Thymic atrophy in murine acute graft-versus-host disease is effected by impaired cell cycle progression of host pro-T and pre-T cells. *Blood.* *96*. 347-354.

Krenger, W., and Hollander, G.A. (2008) The immunopathology of thymic GVHD. *Semin. Immunopathol.* *30*. 439-456.

Lee, K.L., Ambler, C.M., Anderson, D.R., Boscoe, B.P., Bree, A.G., Brodfuehrer, J.I., Chang, J.S., Choi, C., Chung, S., Curran, K.J., et al. (2017) Discovery of Clinical Candidate 1-[(2S,3S,4S)-3-Ethyl-4-fluoro-5-oxopyrrolidin-2-yl]methoxy}-7-methoxyisoquinoline-6-carboxamide (PF-06650833), a Potent, Selective Inhibitor of Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 4 (IRAK4), by Fragment-Based Drug Design. *J. Med. Chem.* *60*. 5521-5542.

Lee, W.S., Kim, J.Y., Won, H.J., Lee, S.M., Suh, Y.S., Joo, Y.D., Lee, J.Y., Jang, W.H., Kang, S.W., Kang, M.S., et al. (2015) Effect of

upregulated TLR2 expression from G-CSF-mobilized donor grafts on acute graft-versus-host disease. *Int. Immunopharmacol.* **29**. 488-493.

Li, H., Matte-Martone, C., Tan, H.S., Venkatesan, S., McNiff, J., Demetris, A.J., Jain, D., Lakkis, F., Rothstein, D., and Shlomchik, W.D. (2011) Graft-versus-host disease is independent of innate signaling pathways triggered by pathogens in host hematopoietic cells. *J. Immunol.* **186**. 230-241.

Li, Z., Younger, K., Gartenhaus, R., Joseph, A.M., Hu, F., Baer, M.R., Brown, P., and Davila, E. (2015) Inhibition of IRAK1/4 sensitizes T cell acute lymphoblastic leukemia to chemotherapies. *J. Clin. Invest.* **125**. 1081-1097.

Lim, J.Y., Lee, Y.K., Lee, S.E., Ju, J.M., Eom, K.S., Kim, Y.J., Chung, N.G., Jeong, D.C., Park, G., Choi, E.Y., et al. (2016) MyD88 in donor bone marrow cells is critical for protection from acute intestinal graft-vs.-host disease. *Mucosal. Immunol.* **9**. 730-743.

Lim, J.Y., Ryu, D.B., Lee, S.E., Park, G., Choi, E.Y., and Min, C.K. (2015) Differential Effect of MyD88 Signal in Donor T Cells on Graft-versus-Leukemia Effect and Graft-versus-Host Disease after Experimental Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Mol. Cells.* **38**. 966-974.

Macleod, H., and Wetzler, L.M. (2007) T cell activation by TLRs: a role for TLRs in the adaptive immune response. *Sci. STKE.* **402**. pe48.

Maeda, Y. (2013) Pathogenesis of graft-versus-host disease: innate immunity amplifying acute alloimmune responses. *Int. J. Hematol.* **98**. 293-299.

Matta, B.M., Reichenbach, D.K., Zhang, X., Mathews, L., Koehn, B.H., Dwyer, G.K., Lott, J.M., Uhl, F.M., Pfeifer, D., Feser, C.J., et al. (2016) Peri-alloHCT IL-33 administration expands recipient T-regulatory cells that protect mice against acute GVHD. *Blood.* **128**. 427-439.

Matte, C.C., Liu, J., Cormier, J., Anderson, B.E., Athanasiadis, I., Jain, D., McNiff, J. and Shlomchik, W.D. (2004) Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat. Med.* **10**. 987-992.

McDonald, D.R., Goldman, F., Gomez-Duarte, O.D., Issekutz, A.C., Kumararatne, D.S., Doffinger, R., and Geha, R.S. (2010) Impaired T-cell receptor activation in IL-1 receptor-associated kinase-4-deficient patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**. 332-337, e2.

Min, C.K., Maeda, Y., Lowler, K., Liu, C., Clouthier, S., Lofthus, D., Weisiger, E., Ferrara, J.L.M., and Reddy P. (2004) Paradoxical effects of interleukin-18 on the severity of acute graft-versus-host disease mediated by CD4+ and CD8+ T-cell subsets after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* **104**. 3393-3399.

Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S.P., Belkaid, Y., and Merad, M. (2014) Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science*. 343. 1249288.

O'Donnell, H., Pham, O.H., Li, L.X., Atif, S.M., Lee, S.J., Ravesloot, M.M., Stolfi, J.L., Nuccio, S.P., Broz, P., Monack, D.M., et al. (2014) Toll-like receptor and inflammasome signals converge to amplify the innate bactericidal capacity of T helper 1 cells. *Immunity*. 40. 213-224.

Okamoto, I., Kohno, K., Tanimoto, T., Iwaki, K., Ishihara, T., Akamatsu, S., Ikegami, H., and Kurimoto, M. (2000) IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice. *J. Immunol*. 164. 6067-6074.

Rahman, A.H., Taylor, D.K., and Turka, L.A. (2009) The contribution of direct TLR signaling to T cell responses. *Immunol. Res*. 45. 25-36.

Reddy, P., Teshima, T., Kukuruga, M., Ordemann, R., Liu, C., Lowler, K., and Ferrara, J.L.M. (2001) Interleukin-18 regulates acute graft-versus-host disease by enhancing Fas-mediated donor T cell apoptosis. *J. Exp. Med*. 194. 1433-1440.

Schenten, D., Nish, S.A., Yu, S., Yan, X., Lee, H.K., Brodsky, I., Pasman, L., Yordy, B., Wunderlich, F.T., Bruning, J.C., et al. (2014) Signaling through the adaptor molecule MyD88 in CD4+ T cells is required to overcome suppression by regulatory T cells. *Immunity*. 40. 78-90.

Schnare, M., Barton, G.M., Holt, A.C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol*. 2. 947-950.

Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., McNiff, J., Robert, M.E., Liu, J., Shlomchik, M.J., and Emerson, S.G. (1999) Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. 285. 412-415.

Suzuki, N., Suzuki, S., Millar, D.G., Unno, M., Hara, H., Calzascia, T., Yamasaki, S., Yokosuka, T., Chen, N.J., Elford, A.R., et al. (2006) A critical role for the innate immune signaling molecule IRAK-4 in T cell activation. *Science*. 311. 1927-1932.

Teshima, T., Ordemann, R., Reddy, P., Gagin, S., Liu, C., Cooke, K.R., and Ferrara, J.L.M. (2002) Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat. Med*. 8. 575-581.

Teshima, T., Reddy, P., and Zeiser, R. (2016) Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 22. 11-16.

Uryu, H., Hashimoto, D., Kato, K., Hayase, E., Matsuoka, S., Ogasawara, R., Takahashi, S., Maeda, Y., Iwasaki, H., Miyamoto, T., et al. (2015)

alpha-Mannan induces Th17-mediated pulmonary graft-versus-host disease in mice. *Blood*. *125*. 3014-3023.

Wilhelm, K., Ganesan, J., Muller, T., Durr, C., Grimm, M., Beilhack, A., Krempf, C.D., Sorichter, S., Gerlach, U.V., Juttner, E., et al. (2010) Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat. Med.* *16*. 1434-1438.

Wu, Y.W., Tang, W., and Zuo, J.P. (2015) Toll-like receptors: potential targets for lupus treatment. *Acta Pharmacol. Sin.* *36*. 1395-1407.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., et al. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. *301*. 640-643.

Yu, Y., Wang, D., Liu, C., Kaosaard, K., Semple, K., Anasetti, C., and Yu, X.Z. (2011) Prevention of GVHD while sparing GVL by targeting Th1 and Th17 transcription factor T-bet and ROR γ t in mice. *Blood*. *118*. 4765-4767.

Zeiser, R., and Blazar, B.R. (2017) Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N. Engl. J. Med.* *377*. 2167-2179.

Zhang, J., Ramadan, A.M., Griesenauer, B., Li, W., Turner, M.J., Liu, C., Kapur, R., Hanenberg, H., Blazar, B.R., Tawara, I., et al. (2015) ST2 blockade reduces sST2-producing T cells while maintaining protective mST2-expressing T cells during graft-versus-host disease. *Sci. Transl. Med.* *7*. 308ra160.