



Title	カルシニューリン阻害薬はドナーT細胞疲弊抑制を介して免疫寛容導入を阻害する〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	千丈, 創
Description	配架番号 : 2807
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15647号
Issue Date	2023-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90959
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SENJO_Hajime_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 千 丈 創

学 位 論 文 題 名

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

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

【背景と目的】 移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) は同種造血細胞移植 (hematopoietic cell transplantation: HCT) における重要な合併症の一つである。カルシニューリン阻害剤 (Calcineurin inhibitor: CNI) に基づく GVHD 予防が広く用いられているが、依然として約半数の症例が慢性 GVHD を発症し、患者の QOL を著しく低下させる。慢性 GVHD の病態には、制御性 T 細胞 (Treg) の恒常性の乱れ、ドナー B 細胞の異常な活性化などが関与することが示されており、CNI による GVHD 予防が失敗するメカニズムの一つとして、CNI の IL-2 シグナル遮断に伴う Treg の減少が関与すると考えられている。我々はこれまでに、同種 HCT 後にドナー T 細胞の疲弊が促進されることを示しており、CNI 投与中の慢性 GVHD の発症には Treg 減少だけでは不十分であり、ドナー T 細胞の疲弊抑制が必要と考えられる。最近、CNI の主要な機能である NFAT 阻害が、慢性ウイルス感染や腫瘍モデルにおいて T 細胞の疲弊を抑制することが報告された。しかし、CNI が同種 HCT 後のドナー T 細胞の疲弊に影響を与えるかどうかは不明である。そこで、本研究では、急性 GVHD マウスモデルと養子免疫マウスモデルを用いて、ドナー T 細胞疲弊の動態に CNI が及ぼす影響を検討した。

【材料と方法】 マウスの HCT では、前処置として 11Gy の全身放射線照射を行い、主要組織適合遺伝子複合体半合致の同種移植を行った。移植片として、アロ抗原を特異的に認識する 2C-TCR トランスジェニックマウス (2C) 由来の純化 T 細胞 1×10^6 個と、ポリクローナル TCR を発現する Ly5a マウス (WT) 由来の純化 T 細胞 1×10^6 個、および野生型 B6 マウス由来の T 細胞除去骨髓細胞 5×10^6 個を輸注した。CNI 投与実験では、シクロスポリン (Cyclosporine; CSP) 25mg/kg を HCT 後 day 0 から day+28 まで投与した。抗 PD-L1 抗体 (PD-L1 mAbs) 投与実験では、初回 500 μ g、2 回目以降 200 μ g を HCT 後 day0 もしくは day+14 から day+42 まで投与した。ドナー T 細胞の観察実験では、移植後 day7, 14, 21, 28, 35 のレシピエントマウスの肝臓と脾臓の T 細胞の免疫チェックポイントや疲弊に関わる分子発現をシングルセル RNA シーケンス法による mRNA シーケンシング法 (scRNAseq) およびフローサイトメトリー (FCM) で観察した。GVL の検討実験では、上記の同種移植モデルの移植後 day7 に、ルシフェラーゼを発現させた B6 マウス由来白血病細胞である C1498-luc をレシピエントマウスに播種し、day14, 21, 28, 35, 42, 49 に、生物発光イメージング (Bioluminescence imaging ; BLI) を用いてマウス体内の腫瘍を検出および定量した。養子免

疫実験では、前処置として全身放射線照射を行い、CSP を day0 から day+14 まで投与したレシピエントマウス由来の純化 T 細胞 1×10^6 個、および野生型 B6 マウス由来の T 細胞除去骨髄細胞 5×10^6 個を輸注し、週 3 回体重および GVHD スコアを観察した。移植後 day+50 に慢性 GVHD の評価として、涙液分泌試験を施行し、標的臓器である唾液腺、肝臓、皮膚における GVHD 所見の有無を病理学的に評価した。

【結果】FCM により、同種 SCT 後 day+14 に 2C 由来の CD8+T 細胞が PD-1 や TIGIT などの複数の免疫チェックポイント受容体を発現する terminally exhausted T cell (Tex) に分化し、PD-1 遮断に対するドナー T 細胞の無応答性につながったことが示された。次に、同種 SCT 後 day+14 に CSP または vehicle が投与したレシピエントから採取したドナー T 細胞の scRNAseq を実施した。UMAP 解析により、CD4+ T 細胞の 4 つのクラスター (C10-C13) と CD8+ T 細胞の 9 つのクラスター (C1-C9) を同定した。CSP は、他のクラスターと比較して、Tox の発現が低く、Ly6c2 の発現が高いことを特徴とする C10 (CD4+) および C1 (CD8+) を顕著に増加させた。FCM では、CSP 投与群において day+14 に 2C 由来 CD8+、WT CD8+、WT CD4+ ドナー T 細胞で PD-1+TIGIT-TOX^{low} 細胞を著しく増加していることを確認した。我々は、これらの細胞を、CX3CR1 高発現であることから transitory-CNI と命名した。GVHD や Tex の分化を抑制することが知られている様々な薬剤の中で、CSP と ibrutinib のみが TOX^{low}PD-1+TIGIT-Ly6C+ transitory-CNI を誘導したことから、NFAT 阻害が transitory-CNI 誘導に重要であることが示唆された。重要なことに、Ly6C-細胞ではなく Ly6C+ドナー T 細胞のみが養子移入後に cGVHD を誘導し、transitory-CNI が cGVHD の病態生理に重要な役割を果たすことが示唆された。Day+14 からの PD-L1 mAbs の投与は、CSP で治療されたレシピエントにおいてのみ宿主由来白血病細胞を根絶させた。

【考察】近年、同種移植後の環境において、持続的な抗原曝露によってドナー由来の同種反応性 T 細胞の疲弊が誘導されることが報告されており、ドナー T 細胞のエフェクター機能が失われ、GVHD や GVL 効果が弱まることが明らかになっている。CNI は Tex の分化に重要な転写因子である NFAT を主に阻害することが明らかになっているが、CNI によるドナー T 細胞に対する影響は不明であった。そこで、我々はドナー T 細胞の疲弊に対する同種 SCT 後の CNI 投与の効果を明らかにするために包括的な分析を行った。その結果、CNI によるドナー T 細胞疲弊の抑制は、transitory-Tex と定義される細胞集団の増加を誘導し、この細胞集団には Ly6C が高発現することが確認された。Ly6c 陽性のドナー由来 T 細胞を養子免疫することで、Ly6C 陰性 terminal-Tex へと分化しながら慢性 GVHD が発症することから、CNI によってドナー T 細胞の最終的な疲弊が抑制され、同時に誘導された transitory-Tex が慢性 GVHD 発症の原因となることが示された。また、本研究では CNI によって誘導された transitory-Tex が免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) に対して強い反応性を示し、transitory-Tex が保持されたレシピエントマウスでは ICI 投与後に増殖能や殺細胞能が増強されることで GVL 効果が増強されることが明らかになった。

【結論】CNI の早期投与によって誘導されるドナー由来の transitory-Tex 細胞の残存は、慢性 GVHD 発症のリスクを高める。本研究により、同種移植時にドナー T 細胞疲弊に基づく最適な GVHD 予防法が選択できる可能性が示された。