



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	KRP203短期投与と移植後シクロフォスファミド大量療法併用による移植片対宿主病の予防
Author(s)	横山, 絵美
Description	配架番号 : 2490
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13699号
Issue Date	2019-06-28
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13699
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92952
Type	doctoral thesis
File Information	Emi_Yokoyama.pdf, この論文の全文



学 位 論 文

KRP203 短期投与と移植後シクロフォスファミド大量療法併用
による移植片対宿主病の予防

(Short-term KRP203 and posttransplant cyclophosphamide
for graft-versus-host disease prophylaxis)

2019 年 6 月

北 海 道 大 学

横 山 絵 美

Emi Yokoyama

学 位 論 文

KRP203 短期投与と移植後シクロフォスファミド大量療法併用
による移植片対宿主病の予防

(Short-term KRP203 and posttransplant cyclophosphamide
for graft-versus-host disease prophylaxis)

2019 年 6 月

北 海 道 大 学

横 山 絵 美

Emi Yokoyama

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
実験方法・	9 頁
実験結果・	15 頁
考察・	31 頁
総括および結論・	35 頁
謝辞・	37 頁
利益相反・	37 頁
引用文献・	38 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投稿中である。

Emi Yokoyama, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Takahide Ara, Reiki Ogasawara, Tomohiro Yamakawa, Shuichiro Takahashi, Hiroyuki Ohigashi, Takahiro Tatenno, Yuta Hasegawa, Xuanzhong Chen and Takanori Teshima

Short-term KRP203 and posttransplant cyclophosphamide for graft-versus-host disease prophylaxis

雑誌名 The Journal of Immunology, submitted

本研究の一部は以下の学会に発表した。

Emi Yokoyama, Daigo Hashimoto, Takahide Ara, Eiko Hayase and Takanori Teshima

Short-term KRP203 and posttransplant cyclophosphamide for graft-versus-host disease prophylaxis

45th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, 24th-27th March 2019, Frankfurt, Germany.

要旨

【背景と目的】

同種造血幹細胞移植において、移植片対宿主病 (graft-versus -host disease; GVHD) は、移植後の生存率に影響を及ぼす重大な合併症の一つである。GVHD 予防の手段として、移植後シクロフォスファミド大量療法 (posttransplant cyclophosphamide; PTCY) は、ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA) 半合致、もしくは一致の造血幹細胞移植において広く使用されるようになってきている。しかし、PTCY 単独では GVHD 抑制効果が不十分であり、カルシニューリン阻害剤 (calcineurin inhibitor; CI) などの免疫抑制剤の併用が必要であることが示されている。しかし、CI は移植後の制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) の再構築を阻害することが知られており、免疫寛容の構築に不利に働くと考えられ、また長期投与では腎機能障害などが問題となりやすく、CI を用いない GVHD 予防法の確立が望まれる。KRP203 は、スフィンゴシン-1-リン酸受容体 type1 (sphingosine-1-phosphate receptor type1; S1PR₁) の特異的アゴニストであり、GVHD 標的臓器へのリンパ球の遊走を抑止する作用を持つと考えられる。今回我々は、PTCY に短期間の KRP203 投与を併用した新しい GVHD 抑制療法について、GVHD のマウスモデルを用いて研究を行った。

【材料と方法】

B6D2F1 (H2^{b/d}) マウスをレシピエントとし、骨髄破壊的な全身放射線を照射した後に、ドナーの B6 (H2^b) マウスから抽出した骨髄細胞と脾臓細胞を輸注した。CY は 50 mg/kg を移植後 day +3 に腹腔内投与し、KRP203 は 1 mg/kg を移植日から day +4 まで連日内服させた。移植後の GVHD の程度の評価を連日行い、生存期間の観察を行った。GVHD の組織学的評価は、移植後 4 週間の時点でレシピエントマウスの GVHD 標的臓器を取り出し、病理組織標本を作成して Hematoxylin & Eosin 染色を行った。GVHD 標的臓器と 2 次リンパ組織のドナー T 細胞は、フローサイトメトリーによる解析を行ない、血清のサイトカイン濃度測定には cytometric beads array を用いた。

移植片対腫瘍 (graft versus leukemia; GVL) 効果の評価のための移植では、T 細胞を除去した骨髄細胞と、脾臓細胞から純化した T 細胞をグラフトとして用い、ルシフェラーゼを導入した P815 腫瘍細胞を移植日に同時に輸注した。生体内生物発光イメージング (Bioluminescence imaging; BLI) を用いて、移植後の腫瘍増殖の評価を 1 週間ごとに行った。

【結果】

移植後、無治療の同種移植レシピエントマウスは重症の GVHD を発症し、day +50 までに全ての個体が死亡した。CY 50 mg/kg を投与したマウスでは GVHD の改善が見

られ、30%の個体が生き延びた。KRP203 単独投与において、腸間膜リンパ節内で移植後早期にドナーT 細胞のアポトーシスが誘導され、これによるドナーT 細胞数の減少が起こっており、血清 IFN γ 濃度も低下していた。KRP203 単独投与において、無治療群と比較し GVHD が緩和され、死亡率が低下した。CY に day 0 から day +4 までの短期間の KRP203 投与を併用すると、CY 単独投与群と比較して生存率が改善し、移植後 day +14 の血清 TNF α 値が低下していた。CY+KRP203 併用群では、CY 単独群と比較して腸管の組織学的所見が改善しており、各臓器のフローサイトメトリー解析では、腸管と皮膚でドナーT 細胞の浸潤が少なかった。Treg は CY への耐性があり、PTCY では移植後 Treg が温存され回復しやすいことが示されているが、KRP203 の併用はこれを阻害することなく、むしろより多くの Treg を誘導していた。GVL 効果については、CY+KRP203 併用群では、CY 単独群と比較すると腫瘍の増殖が亢進したものの、ある程度の GVL 効果が保たれていることが示された。

【考察】

PTCY は、HLA 半合致移植における GVHD 予防法として、その安全性と有効性が示されている。移植後に活性化した同種抗原反応性 T 細胞に対する clonal destruction を起こすことがその主な作用機序だが、PTCY 単剤では GVHD 抑制効果は不十分である。今回我々は、KRP203 を併用することで CI とは異なり Treg の働きを阻害せずに GVHD を改善する効果が得られることを確認した。PTCY に KRP203 を併用した場合、PTCY 単独投与と比較して GVHD 標的臓器におけるドナーT 細胞の浸潤が有意に少なかった。移植後早期に活性化したドナーT 細胞を二次リンパ組織に隔離することで、より効率的に PTCY による clonal destruction が起こったことが考えられる。S1P アゴニストの二次リンパ組織へのリンパ球隔離効果は可逆的とされているが、KRP203 により移植後早期にドナーT 細胞球のアポトーシスが起こるために、移植後早期の短期間のみの併用でも十分に GVHD 抑制効果を示したものと考えられる。PTCY では GVL 効果が阻害されないことがこれまで示されている。PTCY 投与前の一時的なドナーT 細胞活性化が抗腫瘍効果に重要である可能性が考えられ、KRP203 を併用した場合にも移植後早期のドナーT 細胞活性化が起こるため、GVL 効果には有利に働く可能性が考えられる。先に報告された S1PR_{1,3,4,5} のアゴニストである FTY720 は、臨床的にも GVHD 抑制効果が示されているものの、心血管系への副作用が問題となった。S1PR₁ の選択的アゴニストである KRP203 は、より少ない副作用で GVHD 抑制効果が期待できる薬剤である。

【結論】

HLA 半合致の造血幹細胞移植において、短期間の KRP203 投与と PTCY の併用療法は、CI を用いない新たな優れた GVHD 抑制療法である。

略語

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ALDH	Aldehyde dehydrogenase
Allo	Allogeneic
APCs	Antigen presenting cells
BLI	Bioluminescence imaging
CI	Calcineurin inhibitor
CY	Cyclophosphamide
CSP	Cyclosporine A
GVHD	Graft-versus-host disease
GVL	Graft-versus-leukemia effect
Gy	Gray
H&E	Hematoxylin and eosin
HLA	Human leukocyte antigen
IFN γ	Interferon gamma
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
MHC	Major histocompatibility complex
PTCY	Posttransplant cyclophosphamide
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S1PR	Sphingosine-1-phosphate receptor
Syn	Syngeneic
TBI	Total body irradiation
TCD-BM	T cell depleted bone marrow cell
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
Treg	Regulatory T cell

緒言

同種造血幹細胞は、多くの造血器悪性腫瘍および非悪性疾患の唯一の根治療法である。移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) は、移植後の生存に関わる重大な合併症の一つである。GVHD は、移植片に含まれるドナーリンパ球が、ホストの二次リンパ組織において抗原提示細胞 (antigen presenting cells; APCs) からドナーとは異なるホストの組織抗原を提示されることによって活性化・増殖し、ホストの組織を傷害することで起こる (Ferrara et al., 2009; Shlomchik et al., 1999; Teshima et al., 2002)。これまでのマウス GVHD モデルを用いた研究により、移植後比較的早期に起こる急性 GVHD が、3 段階の連続的な phase によって引き起こされることが明らかとなっている (Matzinger, 2002)。まず Phase I では、移植前処置の放射線や薬剤により傷害を受けたホストの組織が、炎症性サイトカインやケモカインなどを含む danger signal を産生することで、APCs が活性化される。Phase II では、ホストの APCs から抗原提示を受けたドナー T 細胞が増殖、分化する。Phase III では、細胞傷害性 T 細胞および NK 細胞による GVHD 標的臓器の直接的な組織傷害とともに、 $\text{IFN-}\gamma$ や $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-1 といった炎症性サイトカインによって炎症が助長され組織の傷害が進行する。

ヒト白血球抗原 (Human leukocyte antigen; HLA) は、レシピエントの組織抗原として認識される最も重要なたんぱくである。レシピエントがドナーとは異なる HLA を持つ場合に重症の GVHD が起こりやすくなるため、HLA 一致の同胞間または同種の造血幹細胞移植では GVHD のリスクが低減し移植後の成績が良好であることが示されてきた (Anasetti and Hansen, 1994; Beatty et al., 1993; Crocchiolo et al., 2009)。しかし、約半数のケースで HLA 一致のドナーが得られず、代替のドナーとして HLA 不一致や半合致のドナー、あるいは臍帯血が造血幹細胞移植のソースとして用いられている。HLA 半合致のドナーの場合、親や同胞を含む親族においてドナーが存在する可能性が非常に高く、ドナーの造血幹細胞採取から移植までの期間が短縮できるというメリットがある。しかし、HLA が両方向に不一致であることから、強力な同種抗原反応が起こり、移植後の生着不全や重症 GVHD が問題となる (Anasetti et al., 1989; Anasetti et al., 1990)。これらの問題を解決するため、HLA 半合致の移植においては、骨髓抑制、免疫抑制効果を高めるため移植前処置の強度を上げる試み、体外および抗胸腺グロブリンによる体内 T 細胞除去の試みなどがなされた (Bozdech et al., 1985; Henslee-Downey et al., 1996; Reisner et al., 2011)。しかし、T 細胞を除去する移植では、再発や移植後の免疫再構築の遅延による感染症などの問題が起こりやすかった。そこで近年、HLA 半合致の移植においても T 細胞除去を行わない方法の一つとして、

移植後シクロフォスファミド大量療法 (posttransplant cyclophosphamide; PTCY)が注目されている。

1960 年から 1990 年代にかけて、動物モデルの同種移植において、移植後 1 から 4 日後に CY を投与すると、免疫寛容が誘導され組織の拒絶や骨髄の生着不全、GVHD が抑制されることが示された(Berenbaum and Brown, 1963; Eto et al., 1991; Santos and Owens, 1966)。1990 年代の野本らの基礎的研究により、PTCY は移植後早期に同種抗原に反応して増殖、活性化した同種抗原反応性 T 細胞を選択的に傷害する一方で、それ以外の T 細胞は温存されることが示された(Maeda et al., 1993; Mayumi et al., 1985)。また、造血幹細胞は CY の代謝産物を不活性型に変換する aldehyde dehydrogenase (ALDH)を高発現しているために、移植後に CY を投与しても造血幹細胞への影響は少なく生着不全などの問題は起こらないこと(Emadi et al., 2009)、制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg)も ALDH の発現が高いために PTCY 後に温存され、回復しやすく、GVHD の抑制効果に寄与することが報告されている(Ganguly et al., 2014; Kanakry et al., 2013)。臨床試験としては、Johns Hopkins Hospital において PTCY を用いた HLA 半合致骨髄移植の報告が 2002 年に初めてなされ(O'Donnell et al., 2002)、その後、PTCY の原法となる移植後 day +3 と+4 に PTCY 50 mg/kg を投与し、day +5 から他の免疫抑制剤を併用する方法が報告された(Luznik et al., 2008)。その後、世界的に PTCY による GVHD 抑制療法を用いた HLA 半合致移植の報告がなされ、その有効性と安全性が示されてきた(Bacigalupo et al., 2015; Castagna et al., 2014; Sugita et al., 2015)。近年では、PTCY を用いた HLA 半合致移植の成績は HLA 一致の移植にも劣らないという報告もなされ、その汎用性が拡大している(Bashey et al., 2016; Ciurea et al., 2015; McCurdy and Fuchs, 2015)。

歴史的には、PTCY はカルシニューリン阻害剤 (calcineurin inhibitors; CI)やミコフェノール酸モフェチル (mycophenolate mofetil; MMF)などの他の免疫抑制剤を併用して用いられてきた。近年、HLA 一致の移植において GVHD 予防に PTCY を単剤で使用する試みがなされているが、HLA 一致の移植においても PTCY 単独では完全に GVHD を抑制することができず、GVHD を発症後にステロイドや CI などの免疫抑制剤の追加が必要となっている(Kanakry et al., 2014; Luznik et al., 2010; O'Donnell et al., 2002; Ruggeri et al., 2018)。CI の長期的な投与は、持続的な T 細胞の抑制による感染症のリスクや、腎機能障害が問題となる(Hingorani, 2016)。また、移植後に GVHD 抑制効果を発揮する Treg の増殖には IL-2 の産生が重要であるが、CI の投与によって IL-2 が抑制されることにより Treg が増殖せず、GVHD が悪化することが報告されている(Sugiyama et al., 2014; Zeiser et al., 2006)。PTCY では Treg

が温存され移植後の免疫寛容に寄与するが、CI を併用することでその利点が損なわれる可能性が考えられる。そのため、CI を用いない PTCY による GVHD 抑制療法の開発が望まれる。

スフィンゴシン 1 リン酸 (Sphingosine-1-phosphate; S1P) は、生体膜を構成するスフィンゴ脂質の代謝産物である。S1P は、5 種類の G タンパク質共役型受容体、S1PR₁₋₅ を介して細胞の生存、増殖、遊走、代謝、アポトーシスといった様々なシグナル伝達に関わる脂質メディエーターである (Blaho and Hla, 2014; Rosen et al., 2009)。S1PR は生体内のあらゆる臓器や器官に発現しているが、S1P とその受容体の免疫系における役割の重要性が明らかにされている。骨髄や胸腺で新たに産生されたリンパ球は、二次リンパ組織である脾臓、リンパ節、パイエル板へと遊走する。リンパ球は二次リンパ組織から血管やリンパ管内に入り、炎症組織へ遊走し effector 細胞として機能する。S1PR_{1, 3, 4, 5} に作用するアゴニストである fingolimod (FTY720) の開発によって、リンパ球がリンパ組織から血液・リンパ流へ脱出する機序が明らかにされた。S1P の血管・リンパ管内の濃度は、リンパ組織の間質と比較して高濃度となっている。リンパ球には S1PR₁ が発現しており、S1P が低濃度であるリンパ組織内で S1PR₁ の up-regulation が起こる。S1PR₁ を高発現したリンパ球は、濃度勾配に従って、S1P 濃度の高い血管内およびリンパ管内へと出ていく。FTY720 は、S1P アゴニストとしてリンパ組織内でリンパ球の S1PR₁ に結合し S1PR₁ の down-regulation を起こさせることで、リンパ球をリンパ組織内に留めて蓄積させる作用を持つため、FTY720 の投与では血管・リンパ管内および末梢組織のリンパ球数が減少する (Brinkmann et al., 2002; Cyster and Schwab, 2012; Fujita et al., 1996)。この作用により、マウスの GVHD モデルにおいて、ドナー T 細胞をリンパ組織に隔離することで GVHD 標的臓器への浸潤を阻止し、GVHD が改善されることが示されている (Mandala et al., 2002; Matloubian et al., 2004)。また、FTY720 による GVHD 改善効果の機序として、ドナー T 細胞を隔離したリンパ組織内において、activation-induced cell death をもたらし、ドナーの T cell の数自体を減少させる効果も示されている (Hashimoto et al., 2007; Kim et al., 2003)。

FTY720 は、神経細胞への直接作用と免疫抑制の機序により、多発性硬化症の治療薬として既に承認されている (Kappos et al., 2006; Kappos et al., 2010)。しかし FTY720 では、血圧上昇や低下、徐脈といった心血管系の異常、肺水腫や乳頭浮腫といった血管透過性の亢進、腎機能障害などの副作用が問題となっている (Willis and Cohen, 2013)。これらの副作用は、造血幹細胞移植後の GVHD という炎症病態において大きな問題となる可能性を孕んでいる。FTY720 は、リンパ球に発現する S1PR₁

以外の受容体にも作用するため、様々な副作用をきたしやすいと考えられる。KRP203 は、S1PR₁ に特異的に作用するアゴニストとして開発され、FTY720 と比較して副作用が少ない可能性があり (Khattar et al., 2013; Shimizu et al., 2005)、PTCY に併用される CI の代わりとして有望な薬剤である。今回我々は、マウスの GVHD モデルを用いて、PTCY に短期間の KRP203 を併用した新しい GVHD 抑制療法の役割について研究を行なった。

実験方法

1) マウス

移植実験を行うため、7 週齢、雌の B6 (H-2^b, CD45.2)、Ly5a-B6 (H-2^b, CD45.1)、B6D2F1(H-2^{b/d}, CD45.2)、C3H (H-2^k, Mls-1^b, Mls-2^a, Thy-1.2)を日本クレア株式会社(東京、日本)より、7 週齢、雌の AKR (H-2^k, Mls-1^a, Mls-2^b, Thy-1.1)を日本エスエルシー(静岡、日本)より購入した。これらのマウスは本学の動物実験施設の無菌環境で飼育し、8 週齢以上 12 週未満のマウスを実験に使用した。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」に従って、動物実験(承認番号: 17-0026)の承認を得て行った。

2) マウス造血幹細胞移植

ドナーとなるマウスをイソフルラン吸入により安楽死させ、脾臓および両側大腿骨・脛骨・骨盤骨を採取した。脾臓はスライドガラスを使用してすりつぶし、70 μ m セルストレイナーを通した上で、50 ml チューブに移して細胞を採取した。大腿骨・脛骨・骨盤骨は 23 ゲージ針と 1 ml 注射器で骨髓を押しだして取り出し、18 ゲージ針と 10 ml 注射器で吸引・吐出を繰り返し、攪拌した後に、70 μ m セルストレイナーを通して 50 ml チューブに細胞を採取した。これらの細胞懸濁液中の赤血球を、red blood cell lysis buffer (BD Biosciences, 東京、日本) 2 ml を用いて 2 分間溶血処理した後、顕微鏡にてトリパンブルー法により生細胞数を計測した。レシピエント 1 匹あたり、脾臓細胞 10×10^6 細胞と骨髓細胞 5×10^6 細胞を、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline, PBS) 250 μ l で希釈し、移植片として使用した。

レシピエントとなる B6D2F1 には、移植前処置として、放射線照射装置 MBR-1520R-4(日立、東京、日本)を用いて、管電圧 125 kV、管電流 15 mA、焦点-ターゲット面距離 500 mm、フィルターはアルミニウム 0.5 mm+銅 0.2 mm の設定にて、12.5 ~14 gray (Gy) を 4 時間空けて 2 分割の全身放射線照射 (Total body irradiation; TBI)を行い、2 時間後に移植片を 1 匹あたり 250 μ l ずつ静脈内に注射した。ドナーを B6 とした移植は主要組織適合遺伝子複合体 (Major histocompatibility complex; MHC)不一致となり、同種移植群とした。B6D2F1 をドナーとして使用したものは、同系移植群とした。

同種抗原反応性 T 細胞の解析を行う実験の移植では、レシピエントマウスを C3H として、全処置は全身放射線照射 9 Gy を 2 分割で行い、ドナーとなる AKR の脾臓細胞 5×10^6 細胞と骨髓細胞 5×10^6 細胞を移植片として用いた。ドナーの AKR マウス由来の Th1.1⁺細胞のうち、V β 3⁺ T 細胞はレシピエントの C3H マウスの持つ Mls-

2a 抗原に特異的に反応性を持つため、同種抗原反応性 T 細胞として認識した。一方、 $V\beta 8^+$ T 細胞は非特異的な T 細胞として対照に用いた。

移植後のマウスは、特定病原体未感染環境下にて、通常の餌とオートクレーブ滅菌後に塩酸で pH 2.5 に調整した酸性水を与えて飼育した。

3) 薬剤の投与

CY (塩野義製薬株式会社、大阪、日本)は、5 mg/ml の濃度で PBS に溶解し、移植後 3 日目に 50mg/kg を腹腔内投与した。KRP203 (Novartis Pharma AG、Basel、Switzerland)は滅菌水に溶解して、移植日から 1~3 mg/kg を経口ゾンデを用いて連日経口投与した。Cyclosporine A (CSP) (Novartis Pharma AG、Basel、Switzerland)は oral solution を滅菌水で希釈して 50 mg/kg を経口ゾンデを用いて連日経口投与した。

4) GVHD の評価

移植後の生存を連日確認し、マウスの毛皮の質感、脱毛の程度、活動性、姿勢、体重減少の 5 つの臨床的 GVHD 評価スコアリングシステム(Cooke et al., 1996)を用いて GVHD の評価を行なった。病理組織学的な解析においては、採取した組織を 10 倍希釈したホルマリン液で固定し、パラフィン包埋を行なって切片を作成し、hematoxylin & eosin (H&E)染色を行なった。急性 GVHD の病理組織学的半定量スコアリングシステム(Teshima et al., 2002)を用いて評価を行なった。組織切片の画像は室温にて顕微鏡 (BX51; Olympus、東京、日本)に接続したデジタルカメラ (DP72; Olympus)で撮影した。

5) フローサイトメトリーによる解析

・各臓器の採取、細胞懸濁液の作成

解析日にマウスをイソフルランにて sacrifice し、目的の臓器を採取した。

腸間膜リンパ節は、採取後に 0.3 mg/ml の type IV collagenase (Sigma-Aldrich Japan, 東京、日本)を溶解した RPMI (Sigma-Aldrich Japan, 東京、日本)+ 10% FCS の培養液入りのディッシュの中に入れ 20 分間 37°C で培養した。その後シリンジを用いてホモジナイズし、70 μ m cell strainer を介して新しいチューブに移し細胞浮遊液とした。

脾臓は、採取後にスライドガラスを 2 枚用いてすりつぶし、2% FCS を含む 1×PBS(-)で洗いながら 70 μ m cell strainer を介して新しいチューブに移した。4°C、1500 回/分で、5 分間遠心し、上清を破棄して細胞をペレットにした後、BD Pharm Lyse Lysing Buffer にて溶血処理を行い細胞浮遊液とした。

大腸は、切離後に乾燥を防止し壊死細胞を減らすため、PBS を湿らせた濾紙の上で冷却しながら腸管から脂肪組織を取り除いた。大腸を 2 分割し便を押し出し、腸管を長軸方向に切り開いた。Complete medium (PBS + 2% FCS) 15 ml 入りの 50 ml チューブに入れ 15 秒間 vortex を行った。Complete medium を排液し、再度新しい complete medium 15 ml 入りのチューブに入れ 15 秒間 vortex を行った。この処理を 2 回くり返した。0.5 M DL-dithiothreitol (Sigma-Aldrich Japan, 東京、日本) 50 μ l + 5M EDTA 65 μ l + 1 M HEPES solution buffer (Nacalai tesque、京都、日本) 62.5 μ l + complete medium 25 ml に大腸を入れ、振盪しながら 20 分間 37°C で培養した。溶液を排液し、大腸を 5M EDTA 65 μ l + 1 M HEPES solution buffer 62.5 μ l + complete medium 25 ml 入りのチューブに入れた。振盪しながら 40 分間 37°C で培養した。溶液を排液し、大腸を complete medium で濯いだ後、0.3 mg/ml type IV collagenase + 培養液 (RPMI + 10% FCS) 入りのディッシュの中に入れ、できるだけ小さくなるようにハサミでサンプルを刻んだ。45 分間 37°C で培養した後、シリンジを用いてホモジナイズし、70 μ m cell strainer を介して新しいチューブに移し細胞浮遊液とした。

肝臓は、マウスを sacrifice 後に血管内の血球をなるべく除去するためシリンジで右心室から冷たい PBS をフラッシュして還流したのち、肝臓を一塊にして取り出した。0.3 mg/ml type IV collagenase + RPMI + 10% FCS の培養液入りの dish に採取した肝臓を入れ、はさみでなるべく細かく切り刻んだのち、37°C で 1 時間培養した。シリンジで細胞をホモジナイズし、70 μ m cell strainer を通して新しいチューブに移した。血球成分のみを抽出し肝細胞などを除去するため、2000 回/分、4°C で 5 分間遠心して上清を吸引破棄したのち、10ml の PBS + 30% Percoll (GE ヘルスケアジャパン、東京、日本) を加えた。1700 回転/分で 30 分間室温で遠心し、上層に分離された肝細胞などを吸引除去し、ペレットとなった血球細胞に溶血処理を行い、細胞浮遊液とした。

皮膚は、マウスの耳を用いた。マウスの耳を根本から切離し、ピンセットを用いて腹側と背側に剥離した。RPMI で 4 U/ml とした dispase II (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) に検体を入れて 37°C で 1 時間培養した。ピンセットを用いて真皮と表皮に剥離し、それぞれを 1 mg/ml type IV collagenase + RPMI + 10% FCS の培養液を入れた dish に入れ、ハサミでなるべく細かく刻んだ後に 37°C で 1 時間培養した。シリンジを用いてホモジナイズし、70 μ m cell strainer を介して新しいチューブに移し細胞浮遊液とした。

各臓器の細胞浮遊液は、顕微鏡にてトリパンブルー法により生細胞数を計測した。

・細胞表面抗原の染色

フローサイトメトリー用の各種抗体は Flow buffer (1× PBS (-) + 2% FCS + 2μmol EDTA)で 200 倍に希釈し抗体カクテルを作成した。各臓器から単離した細胞に抗体カクテルを加え、4°C、30 分間静置させることで反応させた。解析のためのモノクローナル抗体は以下のものを用いた (**Table 1**)。死細胞は DAPI (Molecular Probes Inc) の染色によって判断した。

細胞内 FoxP3 染色には、FoxP3 staining kit (eBioscience, San Diego, CA)を用いた。細胞表面マーカーの染色を行う際に Fixable Viability Dye eFluor™ 450 (Thermo Fischer Scientific)を 1000 倍希釈となるよう添加し、死細胞の判断に用いた。細胞表面マーカーの反応後、十分洗浄したのちに、Fix/Perm Bf concentrate と Fix/Perm Bf diluent を 1:3 の割合にした溶液を加え、遮光して 4°Cで一晩静置した。翌日、Perm Buffer を加えて 4°C、1500 回転/分で 5 分間遠心して上清を破棄し、これをもう一度繰り返した。Perm buffer に 400 倍希釈となるように FoxP3 抗体を添加し、これを検体に加えて遮光し、4°Cで 30 分間反応させた。

細胞の解析は、FACSCantoII (BD Bioscience, 東京、日本) と FlowJo software (Tree Star, OR)にて行なった。

Table 1. フローサイトメトリーに用いた抗体

Antigen	Clone	Manufacturer
CD4	GK1.5	BioLegend
CD8 α	53-6.7	BioLegend
CD45	30-F11	BD Pharmingen
CD45.1	A20	BD Pharmingen
CD45.2	104	BD Pharmingen
TCR β	H57-597	BD Pharmingen
H-2Kd	SF1-1.1	BD Pharmingen
Thy-1.1 (CD90.1)	OX-7	BioLegend
TCR V β 3	KJ25	BD Pharmingen
TCR V β 8.1, 8.2	MR5-2	BD Pharmingen
Annexin V		BioLegend
FoxP3	FJK-16s	eBioscience

6) サイトカイン測定

イソフルランによる軽麻酔下で、マウスの眼窩静脈叢から採血用毛細管を用いて少量の採血を行なった。血清のサイトカイン濃度測定は、Mouse Soluble Protein Flex Sets (BD Biosciences) を使用し、cytometric beads array (CBA)の方法を用いた。サ

イトカイン濃度の標準曲線を作成するため、スタンダード試薬を用いて段階希釈によって 10 段階の濃度勾配を作成した。96 well プレートにサンプルの血清を添加した後に、capture beads diluent で 50 倍に希釈した capture beads を添加し、遮光で 1 時間常温にて反応させた。次に detection beads diluent で 50 倍に希釈した PE-detection beads を添加し、再び遮光で 1 時間常温にて反応させた。各 well を wash buffer を用いて 2 回洗浄し、フローサイトメトリー用のチューブに beads を回収した。サイトカイン濃度の解析は FACSCantoII により行なった。

7) 移植片対腫瘍効果 (graft-versus-leukemia effect; GVL) の評価

レシピエントの B6D2F1 マウスに全身放射線照射を行なったのちに、ドナーの B6 マウスから採取し脾臓から純化した T 細胞と T 細胞除去した骨髓細胞 (T cell depleted bone marrow cells; TCD-BM) を輸注した。T 細胞の除去には anti-CD90-Microbeads (Miltenyi Biotec) を、T 細胞の純化には pan-T-cell Microbeads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を用いた。骨髓は、細胞浮遊液を作成後、4℃、1500 回転/分で 5 分間遠心してペレットにしたのち、細胞 1×10^6 あたり $9 \mu\text{l}$ の MACS running buffer (Miltenyi Biotec) と細胞 1×10^6 あたり $1 \mu\text{l}$ の anti-CD90-Microbeads を加えて懸濁し、4℃で 15 分間反応させた。脾臓は細胞浮遊液を作成後、4℃、1500 回転/分で 5 分間遠心してペレットにしたのち、細胞 1×10^6 あたり $4 \mu\text{l}$ の MACS running buffer (Miltenyi Biotec) と細胞 1×10^6 あたり $1 \mu\text{l}$ の pan-T-cell Microbeads を加えて懸濁し、4℃で 5 分間反応させた。さらに細胞 1×10^6 あたり $3 \mu\text{l}$ の buffer と細胞 1×10^6 あたり $2 \mu\text{l}$ の anti-biotin-Microbeads を加えて懸濁し、4℃で 10 分間反応させた。骨髓と脾臓の検体にそれぞれ 10ml の buffer を加えて洗浄し、 $10 \mu\text{m}$ のフィルターをかけて別のチューブに移した。AutoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec) により、beads が結合していない細胞のみを回収する negative selection を行なった。腫瘍は、B6D2F1 の親に当たる DBA/2 マウス由来の mastocytoma である P815 にルシフェラーゼを導入した細胞 (P815 luc+) を用いた。P815 luc+細胞は Geneticin 耐性としてあり、凍結保存した P815 細胞を RPMI+10%FCS+Geneticin (Thermo Fischer Scientific) の培養液に溶解し、37℃の CO_2 インキュベーター内で培養を開始し、3 日目に細胞が confluent となることを確認して用いた。P815 luc+細胞は移植日にグラフトと同時にレシピエントの静脈内に投与した。生体内生物発光イメージング (Bioluminescence imaging; BLI) を 1 週間ごとに施行し、移植後の腫瘍の増殖の程度を評価した。

8) BLI

マウス 1 匹あたりに $500 \mu\text{g}$ の d-luciferin (Promega, Madison, WI) を皮下注射

し、5 分後に BLI イメージングを行なった。ルシフェラーゼ陽性細胞の検出は、IVIS Imaging System ver. 4.3.1 (Perkin Elmer, Waltham, MA)を用いて行なった。発光強度は per square centimeter per steradian (ph/s/cm²/sr)の単位で示した。

9) 統計処理

2 群比較は Mann-Whitney U test を用いて検定した。データは平均値±標準誤差にて表記した。生存率の評価には Kaplan-Meier 曲線を作成し、生存曲線の比較解析には log-rank test を用いた。腫瘍死亡の累積発生率の評価には cumulative incidence 曲線を作成し、比較解析には Gray test を用いた。P 値< 0.05 をもって統計学的有意差の有無を判断した。統計学的検定は、GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA) の統計プログラムと EZR (Saitama, Japan)を用いて行なった。

実験結果

1. 短期間の KRP203 投与は、移植後早期にリンパ節内のドナーT 細胞数を縮小させ、GVHD を改善する

同種移植群では、前処置として TBI を照射した B6D2F1(H-2^{b/d}, CD45.2)マウスに、MHC が半合致となる B6(H-2^b, CD45.2)マウスの 5×10^6 の骨髄細胞と 10×10^6 の脾臓細胞を輸注した。同系移植群では、同様の前処置を施した B6 マウスに遺伝学的に同系統の B6-Ly5a(H-2^b, CD45.1)マウスのグラフトを移植した。KRP203 は移植日から 1mg/kg で連日経口投与した。移植後 day +4 と day +7 に腸間膜リンパ節におけるドナーT 細胞の増殖の程度を評価するため、フローサイトメトリーによる解析を行なった。

Day +4、day +7 いずれにおいても、同系移植に比較して同種移植ではドナーT 細胞が有意に増殖していた。Day +4 では、KRP203 を投与した群で同種移植のコントロール群と比較してドナーT 細胞の増殖が亢進している傾向があり、day +7 には KRP203 投与群では T 細胞が減少していた (Figure 1A)。また、Day +7 における血清の IFN- γ の濃度は、同種移植のコントロール群と比較して KRP203 投与群では有意に減少していた (Figure 1B)。

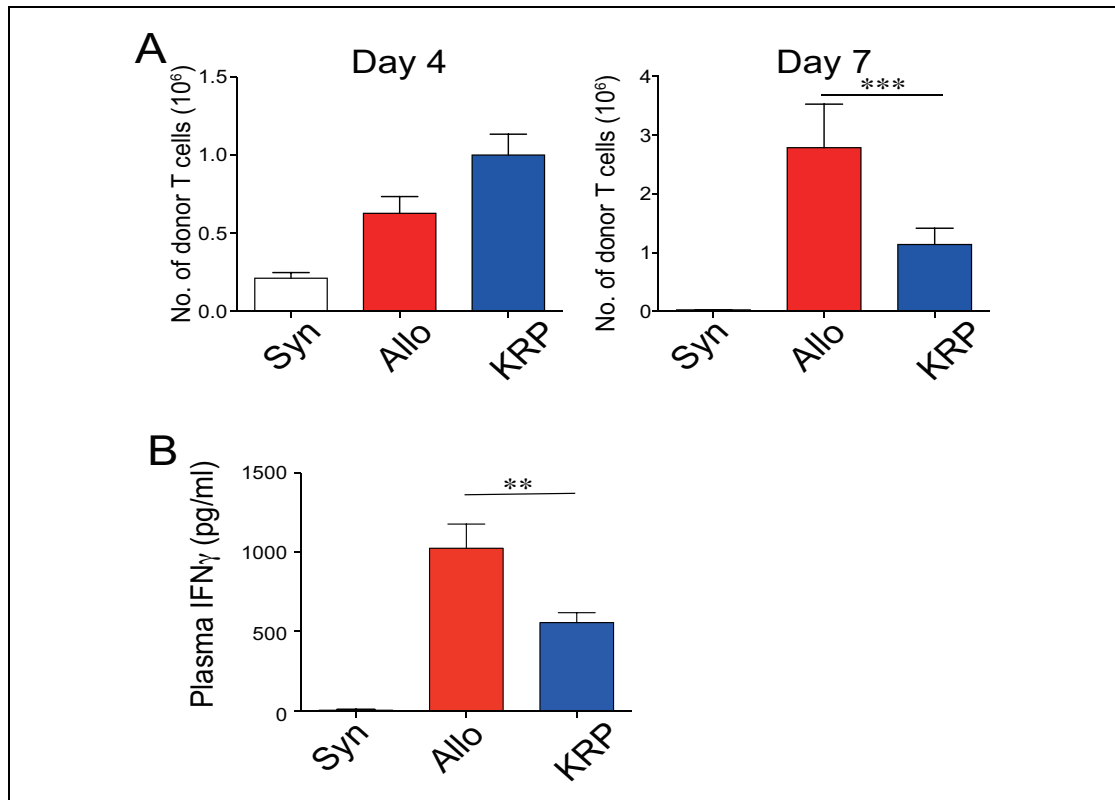
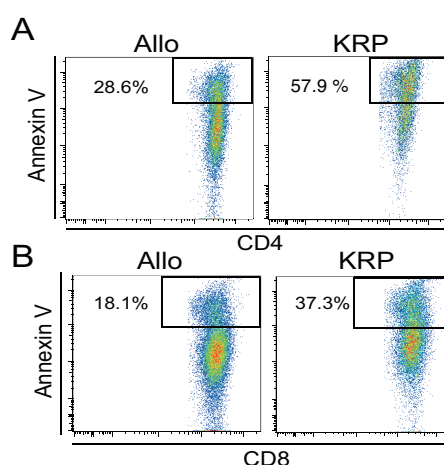


Figure 1. 移植後の腸間膜リンパ節におけるドナーT 細胞

同種移植は、レシピエントの B6D2F1 マウスに骨髄破壊的な TBI を施行した後に、MHC 半合致となるドナーの B6 マウスから採取した 10×10^6 の脾臓細胞と 5×10^6 の骨髄細胞を輸注した。KRP 1mg/kg または同種移植のコントロール群には同容量の溶媒を移植日から連日経口投与した。コントロールの同系移植は、レシピエントは B6、ドナーは B6 Ly-5a マウスを用いた (N=3/群)。(A)移植後 day+4 と day +7 の腸間膜リンパ節について、同種移植群は H-2KdTCR β^+ の、同系移植群は CD45.1+CD45.2TCR β^+ のドナーT 細胞を絶対数で示した (平均 $\pm$ 標準誤差、同系移植 N=3/群、同種移植 N=8/群)。(B)移植後 day+7 の血清 IFN γ 濃度を示す (平均値 $\pm$ 標準誤差、同系移植 N=3/群、同種移植 N=9/群、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$)。

次に、KRP203 投与による移植後 day+7 のドナーT 細胞数の縮小が、ドナーT 細胞のアポトーシスの亢進によって起きているかどうかを検証した。DAPI-かつ Annexin V⁺の分画をアポトーシス細胞とし、DAPI-かつ Annexin V⁻の分画を生存している T 細胞として評価を行なった。移植後 day +6 の腸間膜リンパ節の解析では、アポトーシス細胞は CD4、CD8 いずれのドナーT 細胞においても KRP203 投与群で同種移植コントロール群と比較して有意に増加しており (Figure 2A-D)、その結果、生存 T 細胞数が有意に減少していた (Figure 2E, F)。これらの結果は、同種移植後に腸間膜リンパ節内でドナーT 細胞が activation-induced apoptosis を起こすことを示唆し、過去に報告した multi-S1PR 阻害剤である FTY720 と同様の結果であった (Hashimoto et al., 2007)。



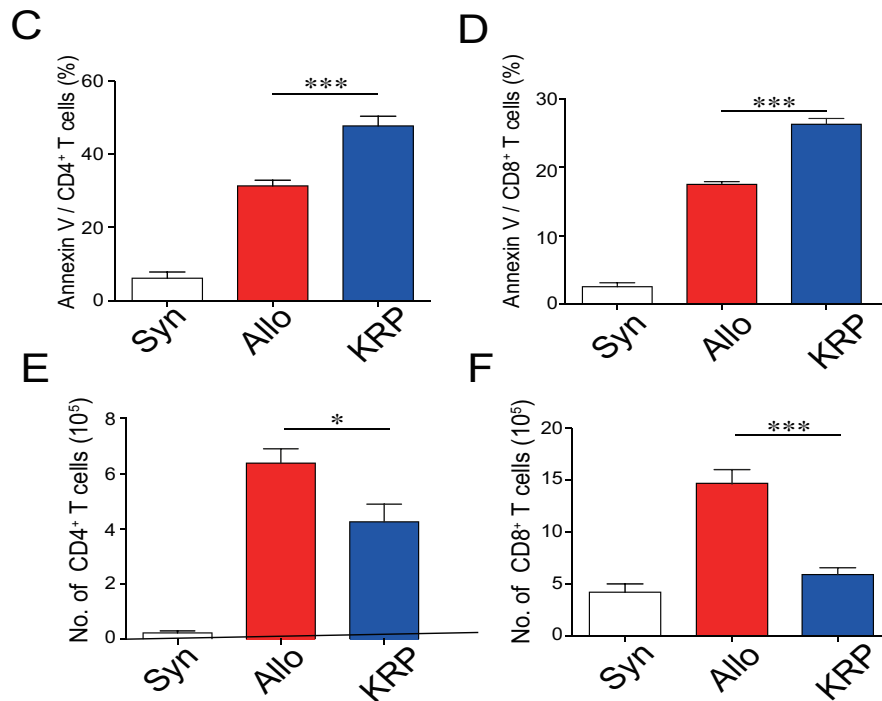
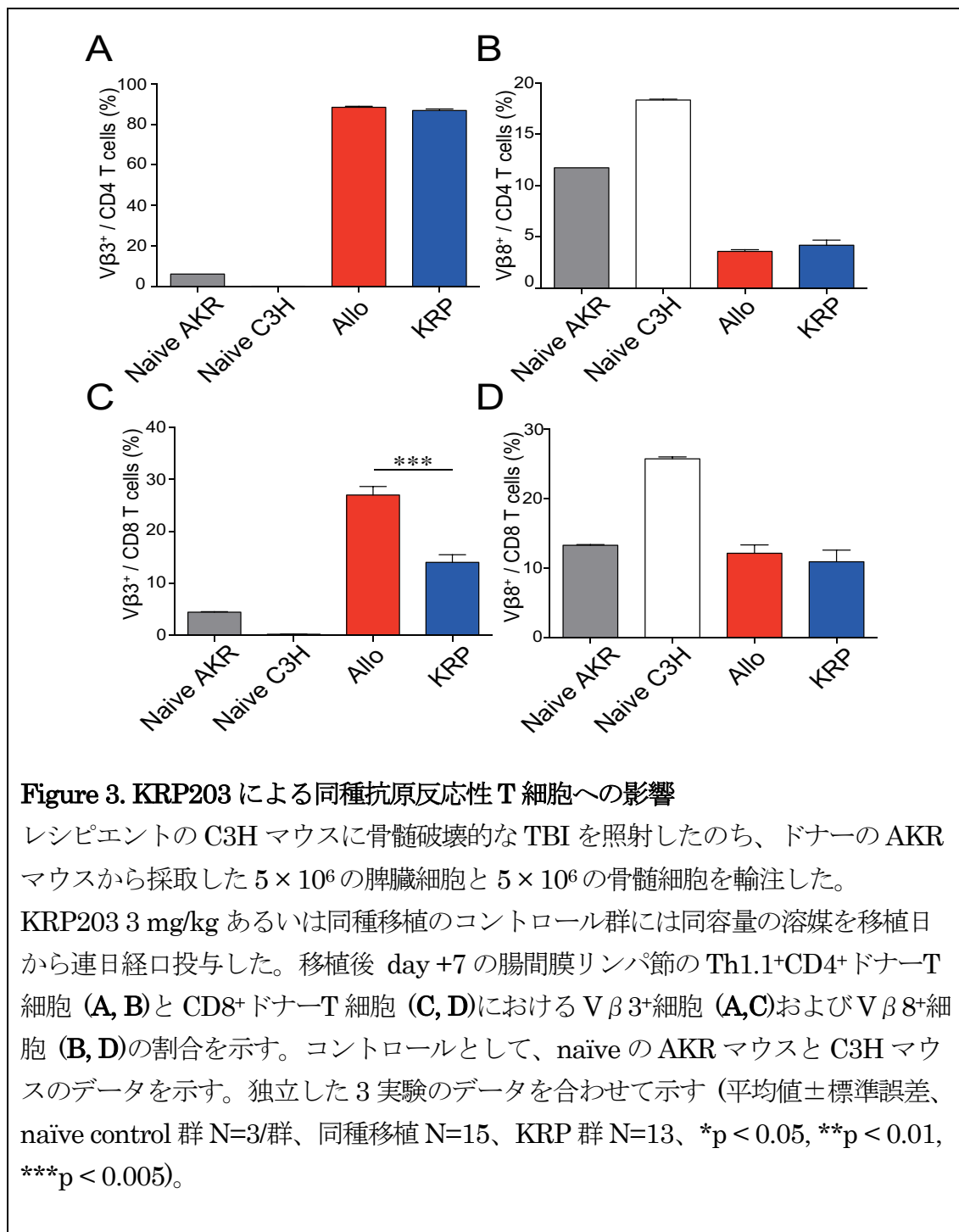


Figure 2. KRP203 は移植後ドナーT 細胞の apoptosis を亢進させる

移植と薬剤の投与は Figure 1 と同様に施行し、移植後 day +6 に腸間膜リンパ節の細胞を採取し、Annexin V の染色を行なった。CD4⁺T 細胞と CD8⁺細胞における Annexin V 染色の代表的なプロットを示す (A, B)。CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞における DAPI かつ Annexin V⁺の T 細胞の割合 (C, D)と、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞における DAPI かつ Annexin V⁻の生細胞の絶対数 (E, F)を示す。独立した 2 実験のデータを合わせて示す (平均値±標準誤差、同系移植 N=3/群、同種移植 N=10/群、*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005)。

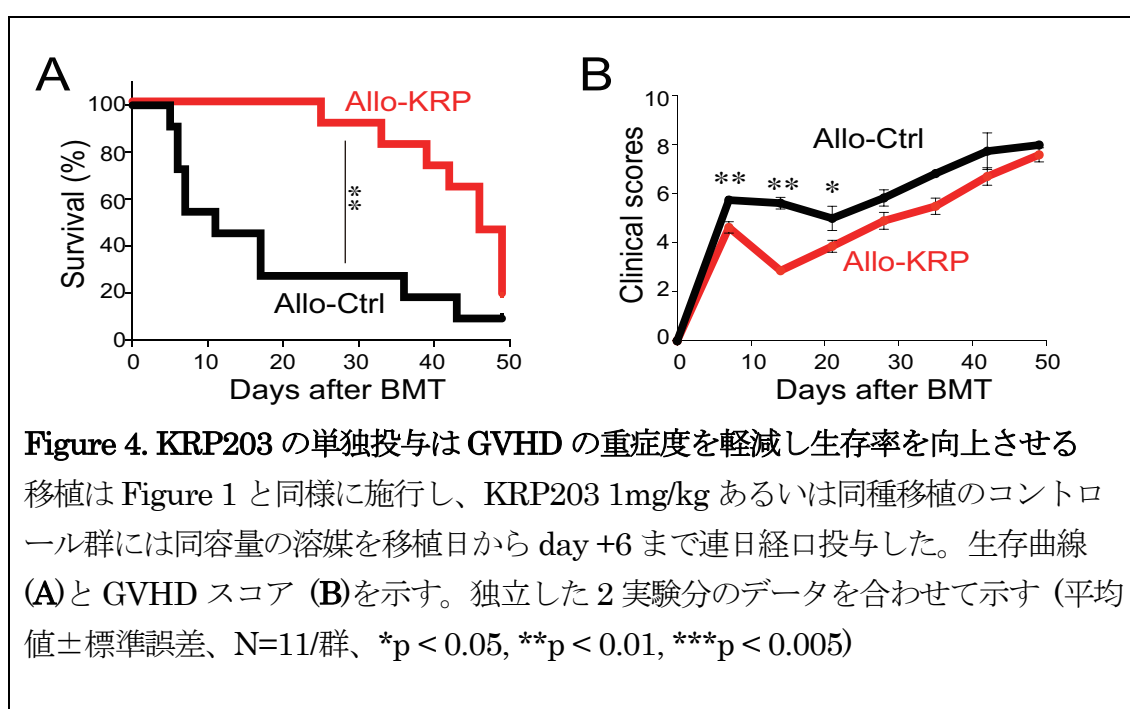
PTCY では、移植後に同種抗原特異的な T 細胞が選択的に除去され、それ以外の非特異的な T 細胞は保たれるということがマウス GVHD モデルにおいて示されている (Eto et al., 1991)。我々は、KRP203 にも同様の効果があるかどうか検証した。C3H (H-2^k, Mls-1^b, Mls-2^a, Thy-1.2)マウスをレシピエントとし、前処置として TBI 照射を行なったのちに、ドナーの AKR (H-2^k, Mls-1^a, Mls-2^b, Thy-1.1)マウスの 5×10^6 の骨髓細胞と 5×10^6 の脾臓細胞を輸注した。KRP203 を 3 mg/kg で移植日から連日経口投与した。移植後 day +7 に腸間膜リンパ節の解析を行なったところ、KRP203 投与群では同種移植コントロール群と比較して、同種抗原特異的に反応する CD4⁺T 細胞の減少は見られなかったが (Figure 3A, B)、CD8⁺T 細胞において、同種抗原反応性を示す V β 3⁺の細胞の割合が有意に低下していた (Figure 3C)。ただし、この CD8⁺T

細胞においても、非特異的な T cell を示す $V\beta 8^+$ の割合は同種移植コントロール群と差を認めなかった (Figure 3D)。



以上の結果から、KRP203 は、移植後早期にリンパ組織でドナーT 細胞のアポトーシスを誘導するが、同種抗原反応性 T 細胞への選択性は過去に報告された PTCY ほど強くはないことが示唆された。

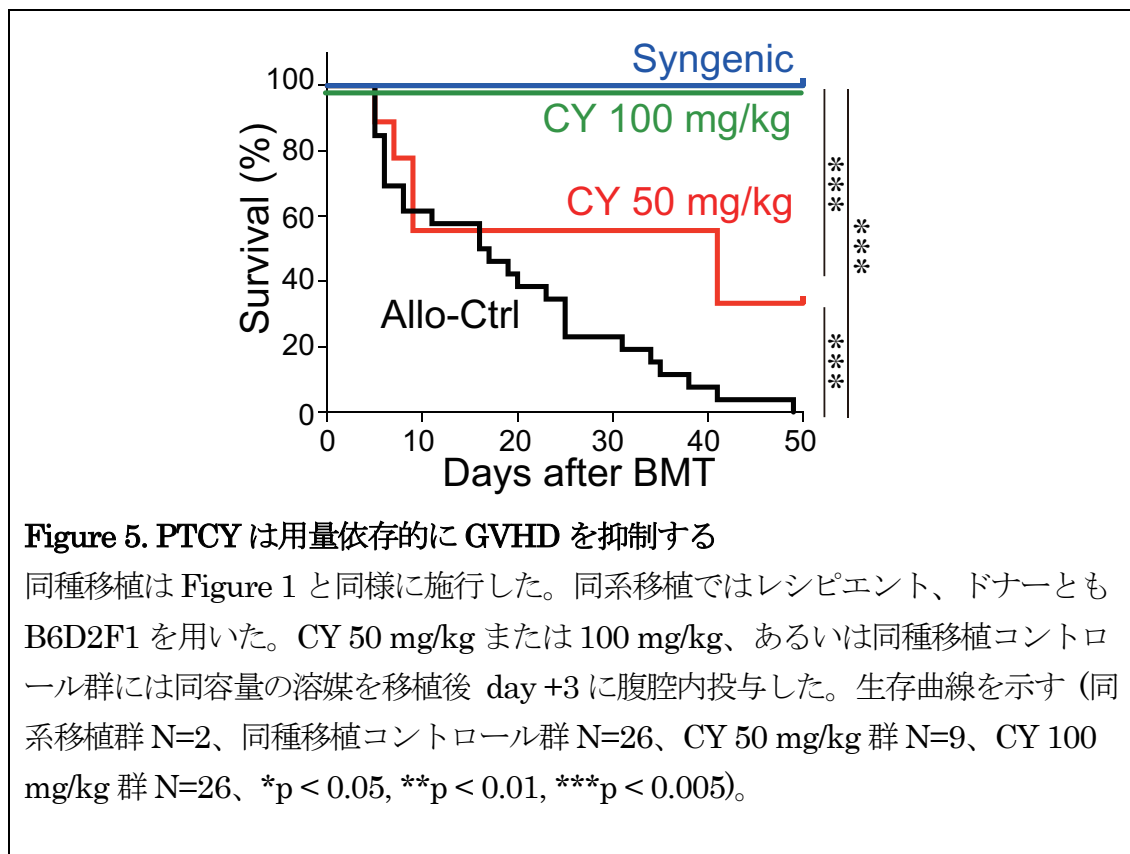
KRP203 単独投与にて GVHD 抑制効果が見られるかどうか検討するため、Figure1 と同様の手順で MHC 半合致の移植を施行し、KRP203 1 mg/kg を移植日から day +6 まで短期間投与した。KRP 投与群では、同種移植コントロール群と比較して有意に GVHD が改善し、生存率が向上した (Figure 4A, B)。



2. PTCY を用いた MHC 半合致のマウス移植モデルの確立

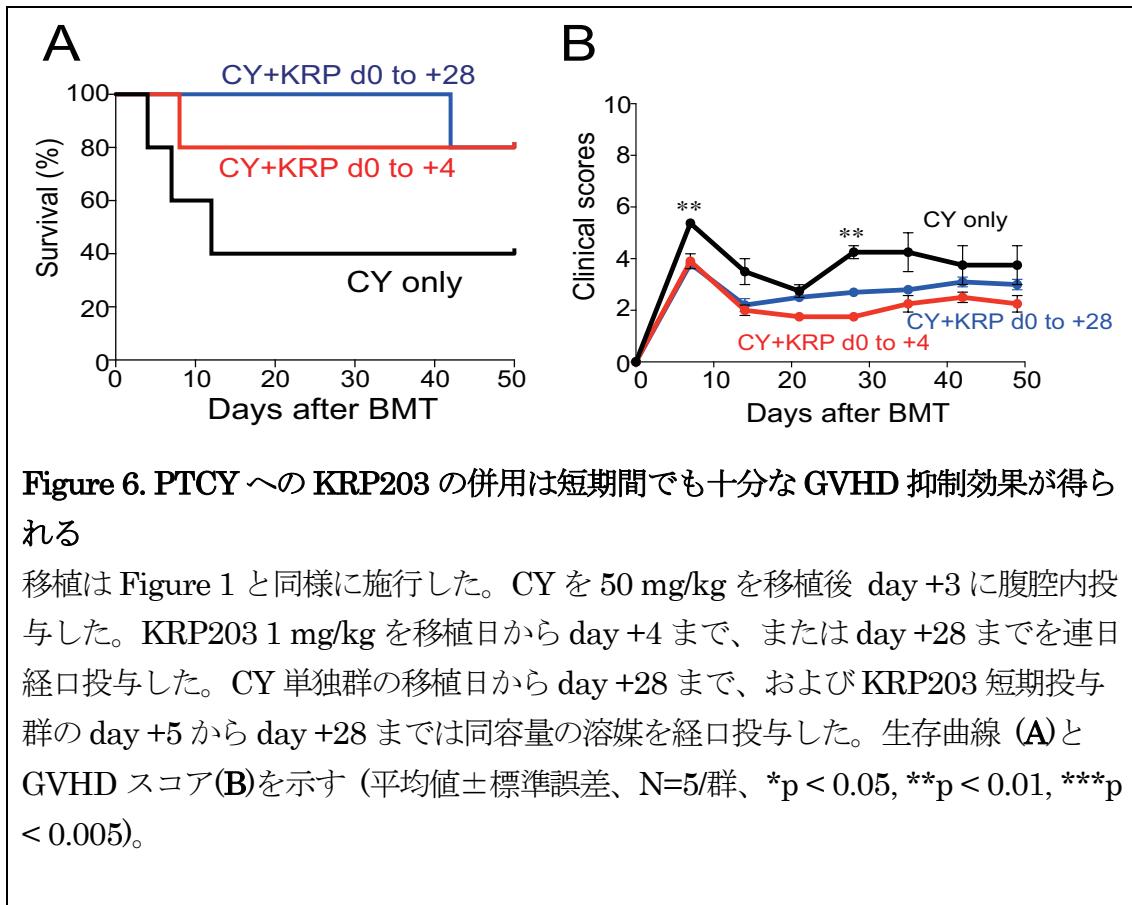
我々は、MHC 半合致の造血幹細胞移植における PTCY を用いた GVHD 予防方について、臨床に即したマウスモデルを確立するため、CY の投与量の検討を行った。B6D2F1 をレシピエントとし、TBI ののちにドナーの 5×10^6 の骨髄細胞と 510×10^6 の脾臓細胞を輸注した。同種移植ではドナーを B6 とし、同系移植ではドナーを B6D2F1 とした。移植後 day +3 に CY を 50 mg/kg または 100 mg/kg で腹腔内投与した。同系移植コントロール群では観察期間中に死亡は見られなかったが、同種移植コントロール群では重症の GVHD が見られ、すべてのマウスが day +50 までに死亡した (Figure 5)。PTCY の投与は、用量依存性に GVHD を抑制し、CY 100 mg/kg 投与群では観察期間中の生存率は 100 %であり、CY 50 mg/kg 投与群では生存率は 30%となった (Figure 5)。臨床の HLA 半合致移植に対する PTCY の GVHD 抑制効

果は単剤では不十分であることから、これを模倣するため以降の実験では PTCY を 50 mg/kg で投与することとした。



3. 短期間の KRP203 と PTCY の併用療法は、PTCY 単剤よりも GVHD 抑制効果が優れている

PTCY に対する KRP203 の GVHD 抑制の上乗せ効果について検証を行なった。まず、PTCY に対して KRP203 を短期間併用する群と長期間併用する群の GVHD の程度と生存率の比較を行なった。移植は Figure 1 と同様に行い、day +3 に 50 mg/kg の CY を腹腔内投与した。KRP203 は、短期間併用群では移植日から day +4 まで、長期間併用群では移植日から day +28 まで連日内服した。CY 単独群では観察期間中の生存率は 40%であった。実験数は少なく、CY 単独群との生存率の有意差は明らかではなかったものの、KRP203 短期間併用群と長期間併用群では GVHD が軽減し、生存率が改善する傾向が見られた。KRP203 短期間併用と長期間併用では明らかな差は見られなかった (Figure 6A, B)。そのため、PTCY に併用する KRP203 は短期間投与でも十分な GVHD 改善効果が得られる可能性が考えられた。



次に、PTCY に KRP203 を短期間投与した場合に GVHD 改善の上乗せ効果が得られるかどうかについて、移植実験を行なった。Figure 1 と同様の移植を行い、day +3 に CY 50 mg/kg を腹腔内投与し、KRP203 1 mg/kg を移植日から day +4 まで連日経口投与した。同種移植のコントロール群では重症の GVHD が見られ、移植後 day +30 までにすべてのレシピエントが死亡した (Figure 7A, B)。これに比較して CY 単独群ではやはり GVHD の重症度と死亡率が低下したが、CY に短期間の KRP203 を併用した群ではさらに GVHD の重症度と死亡率が低下した (Figure 7A, B)。

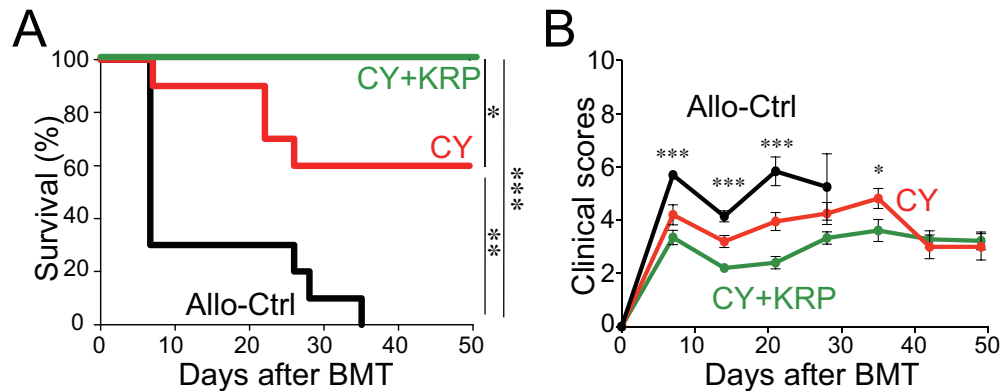


Figure 7. PTCY に KRP203 を短期間併用するとさらに GVHD の重症度が軽減し生存率が改善する

移植は Figure 1 と同様に施行した。CY 50 mg/kg あるいは同容量の溶媒を移植後 day +3 に腹腔内投与した。KRP203 1 mg/kg あるいは同容量の溶媒を移植日から day +4 まで連日経口投与した。移植後の生存曲線 (A) と GVHD スコア (B) を独立した 2 実験分のデータを合わせて示す (平均値±標準誤差、N=10/群、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$)。

我々はさらに、移植後 4 週間の時点でマウスの腸管、肝臓、皮膚の病理組織学的な GVHD の評価を行なった。同系移植のコントロール群では各臓器の傷害はほとんど見られなかった。同種移植のコントロール群では、腸管においては crypt への単核球細胞の浸潤と上皮細胞のアポトーシスが見られ、肝臓では門脈域や肝内胆管への単核球の浸潤と肝細胞の凝固壊死の所見が見られた。また、皮膚では上皮および真皮への単核球の浸潤と脂肪層の菲薄化が見られた (Figure 8A)。PTCY 単独群では、同種移植のコントロール群と比較して肝臓と皮膚では有意に病理組織学的スコアが改善していたが、腸管については有意な改善の所見が見られなかった。PTCY と KRP203 併用群では、PTCY 単独群と比較して有意に腸管の組織所見が改善していた (Figure 8B-D)。

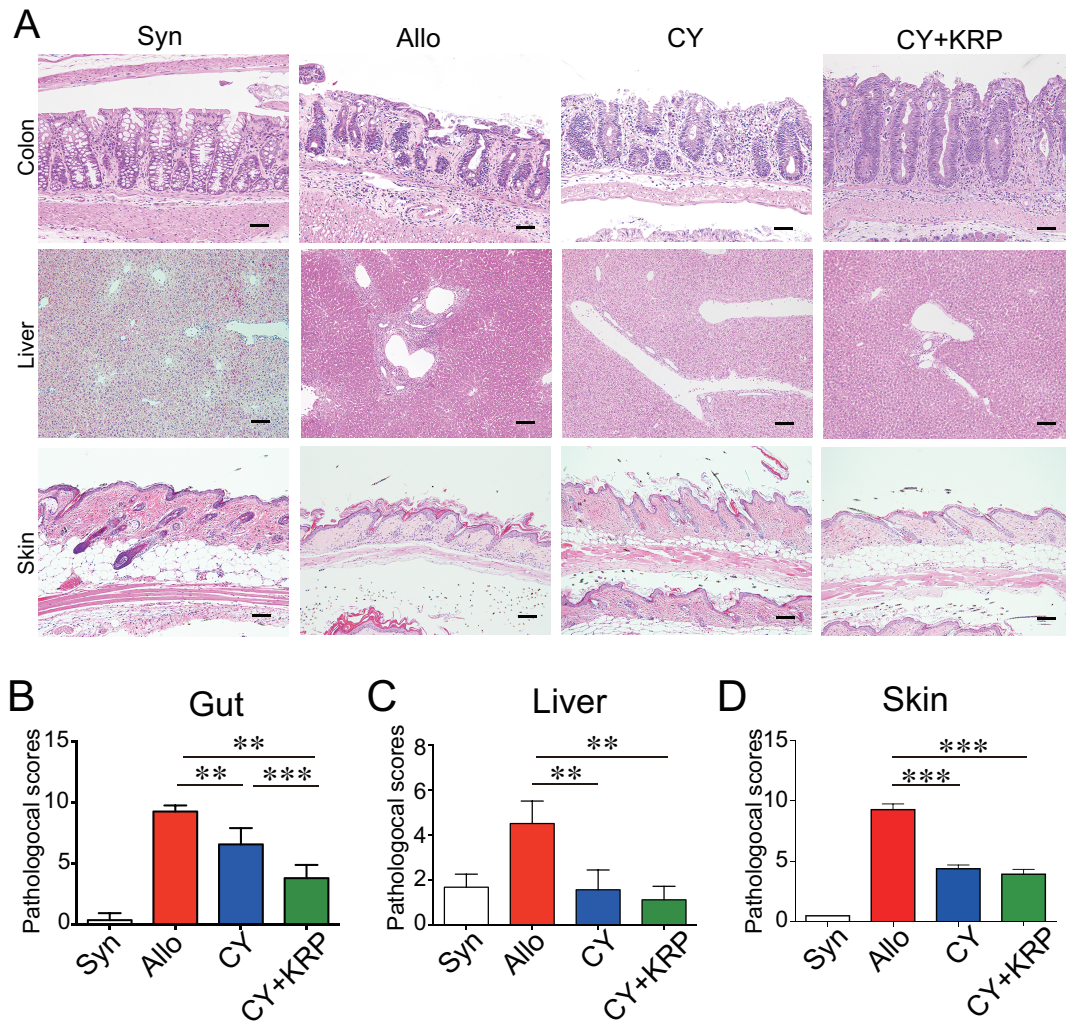
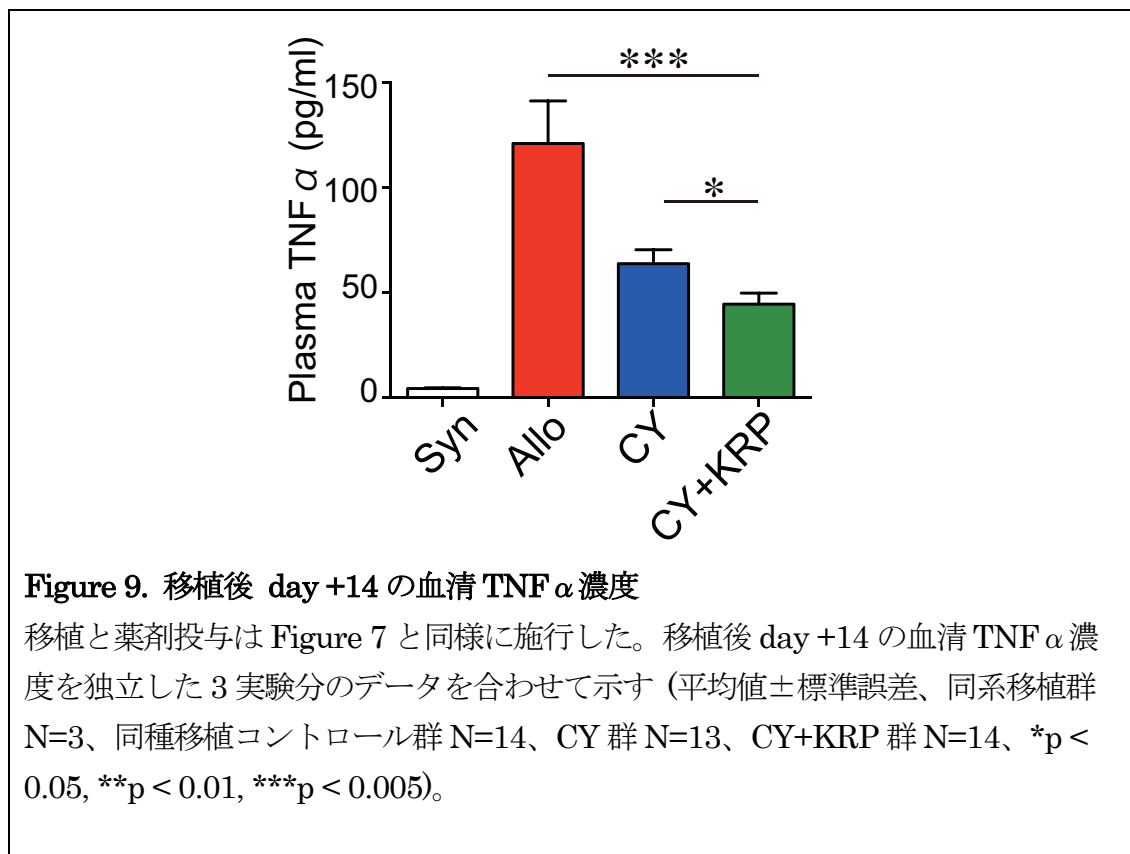


Figure 8. PTCY に短期間の KRP203 を併用すると腸管の病理組織学的な GVHD 所見がさらに改善する

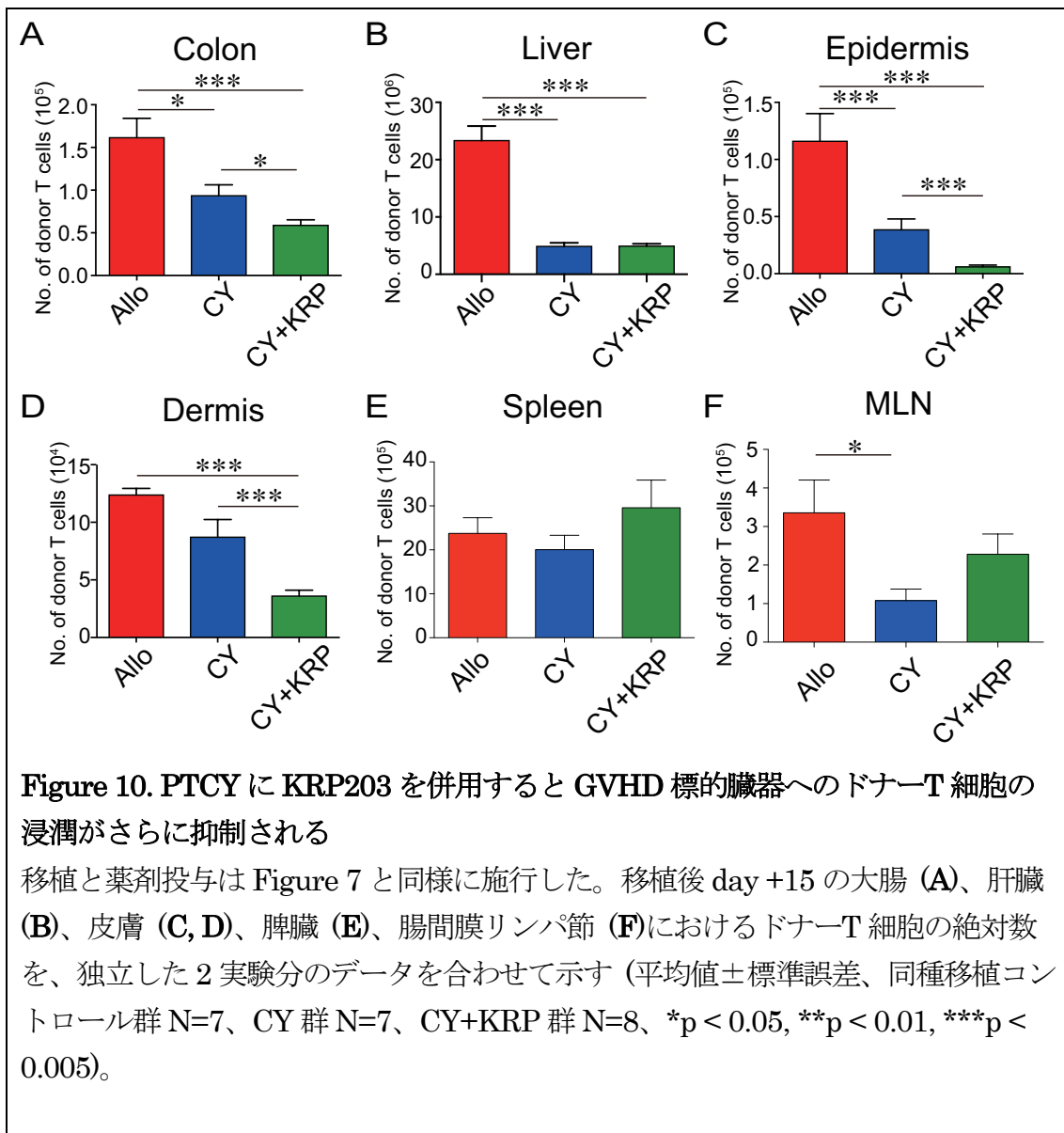
移植と薬剤投与は Figure 7 と同様に施行した。移植後 4 週間目における大腸、肝臓、皮膚の代表的な病理組織像を H&E 像にて示す (A) (Scale bars; 大腸 50 μ m、肝臓、皮膚 100 μ m)。病理組織スコアを腸管 (B)、肝臓 (C)、皮膚 (D) の順に独立した 2 実験分のデータを合わせて示す (平均値 $\pm$ 標準誤差、同系移植群 N=3、同種移植コントロール群 N=4、CY 群 N=9、CY+KRP 群 N=9、* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005)。

移植後 day +14 において、CY と KRP203 併用群では CY 単独群と比較して血清の TNF α の濃度が有意に低下していた (Figure 9)。



4. KRP203 を PTCY に併用すると GVHD 標的臓器へのドナーT 細胞の浸潤はより強く抑制される

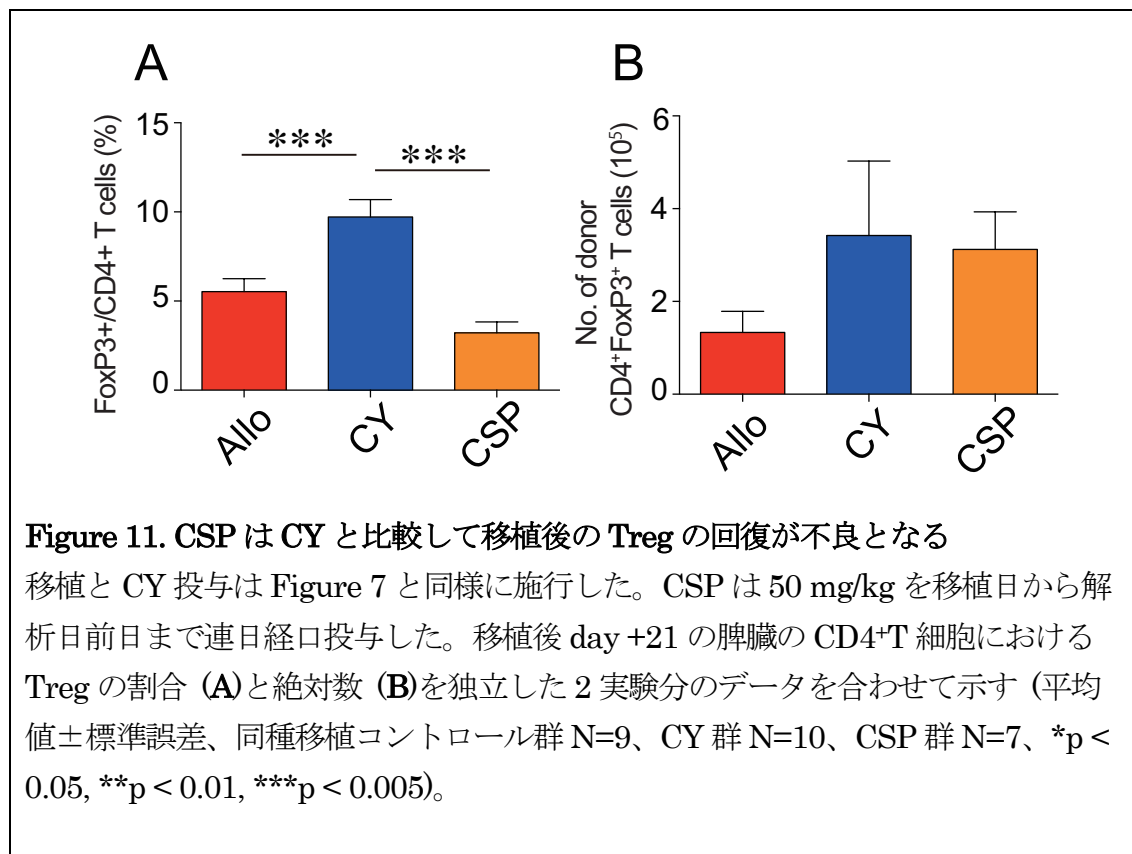
次に、移植後の GVHD 標的臓器におけるドナーT 細胞の浸潤の程度をフローサイトメトリー解析により評価した。移植後 day +15 にレシピエントマウスから大腸、肝臓、皮膚を採取し、各臓器のドナーT 細胞の数を評価した。同種移植のコントロール群と比較して、PTCY 投与群では大腸、肝臓、皮膚のドナーT 細胞浸潤が抑制されていた (Figure 10, A-D)。PTCY に KRP203 を併用した群では、大腸と皮膚においてさらにドナーT 細胞の浸潤が抑制されており、KRP203 によりリンパ節へのドナーT 細胞の隔離が起りやすくなったためと考えられた (Figure 10, A-D)。二次リンパ組織に関しては、PTCY 単独群は同種移植のコントロール群と比較して腸間膜リンパ節のドナーT 細胞が減少していたが、KRP203 の併用による影響は脾臓でも腸間膜リンパ節でも見られなかった (Figure 10E, F)。



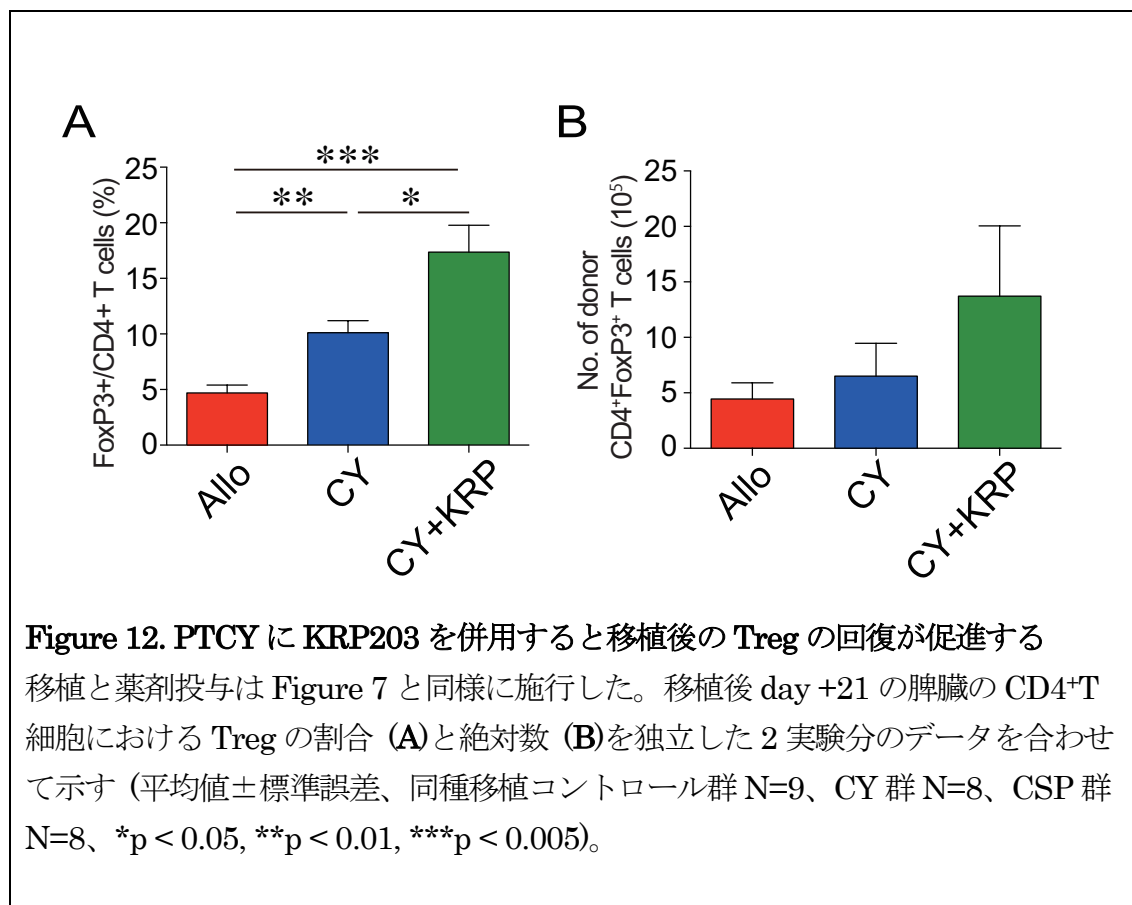
5. PTCY に短期間の KRP203 を併用すると移植後の Treg の再構築が改善される

PTCY を用いた同種造血幹細胞移植後に Treg が温存され、GVHD の抑制に重要な役割を果たすことが示されている(Ganguly et al., 2014; Kanakry et al., 2013)。一方で、カルシニューリンインヒビターは IL-2 の抑制作用を介して Treg の維持や回復を阻害することが知られている(Sugiyama et al., 2014; Zeiser et al., 2006)。移植後 day +21 にレシピエントの脾臓の Treg を解析すると、既報と同様に CY 投与群では同種移植のコントロール群と比較して有意に CD4+T 細胞における FoxP3+ の Treg の割合が多かった (Figure 11A, B)。過去の報告でマウスの GVHD モデルに用いられている投与量に従い(Fidler et al., 2002; Zeiser et al., 2006)、CSP 50 mg/kg を移植日から連日経口投与すると、同種移植のコントロール群と比較した場合には有意な差は

見られないものの、CY 投与群と比較して有意に Treg の割合が少なかった (Figure 11A, B)。



次に、MHC 半合致の移植において PTCY に対して KRP203 を併用した際の Treg への影響について検討を行なった。移植後 day +21 に脾臓の解析を行うと、CY 単独投与においても CD4⁺T 細胞における Treg の割合が多くなったが、KRP203 を短期間併用すると、さらに Treg の回復が促進されていた (Figure 12A, B)。



PTCY に短期間の KRP203 を併用しても GVL 効果は保たれる

続いて我々は、MHC 半合致移植後にホスト型の白血病細胞に対して働く GVL 効果について、PTCY に KRP203 を併用した場合の影響を、BLI を用いて評価した。まず、KRP203 を単独で長期間投与した際の GVL 効果について、CSP 単独投与の効果と比較した。レシピエントの B6D2F1 マウスに対して骨髄破壊的な TBI を照射したのち、ドナーの B6 マウスから採取し抽出した 4×10^6 の T 細胞除去骨髄細胞と 2×10^6 の純化された T 細胞を輸注した。コントロールとして、T 細胞除去骨髄細胞のみを輸注した群を設定した。 5×10^4 の P815 luc⁺細胞を移植日にグラフトと同時に輸注した。KRP203 は 3 mg/kg を移植日から day +28 まで連日経口投与した。CSP は 50 mg/kg を移植日から連日経口投与した。T 細胞除去骨髄細胞のみを移植した群では P815 luc⁺細胞の著明な増殖によって全てのマウスが移植後 2 週間以内に死亡した

(Figure 13A-C). T 細胞除去骨髓細胞と純化した T 細胞を移植したコントロール群では GVL 効果が見られたものの、重症の GVHD を発症しすべてのマウスが観察期間中に死亡した (Figure 13A-C)。CSP 投与群では GVL 効果がほとんど見られず、すべてのマウスが著明な腫瘍増殖によって早期に死亡したのに対し、KRP203 長期投与群では、コントロール群と比較して GVHD が抑制されるとともに GVL 効果もある程度保たれ、生存期間が延長した (Figure 13A-C)。

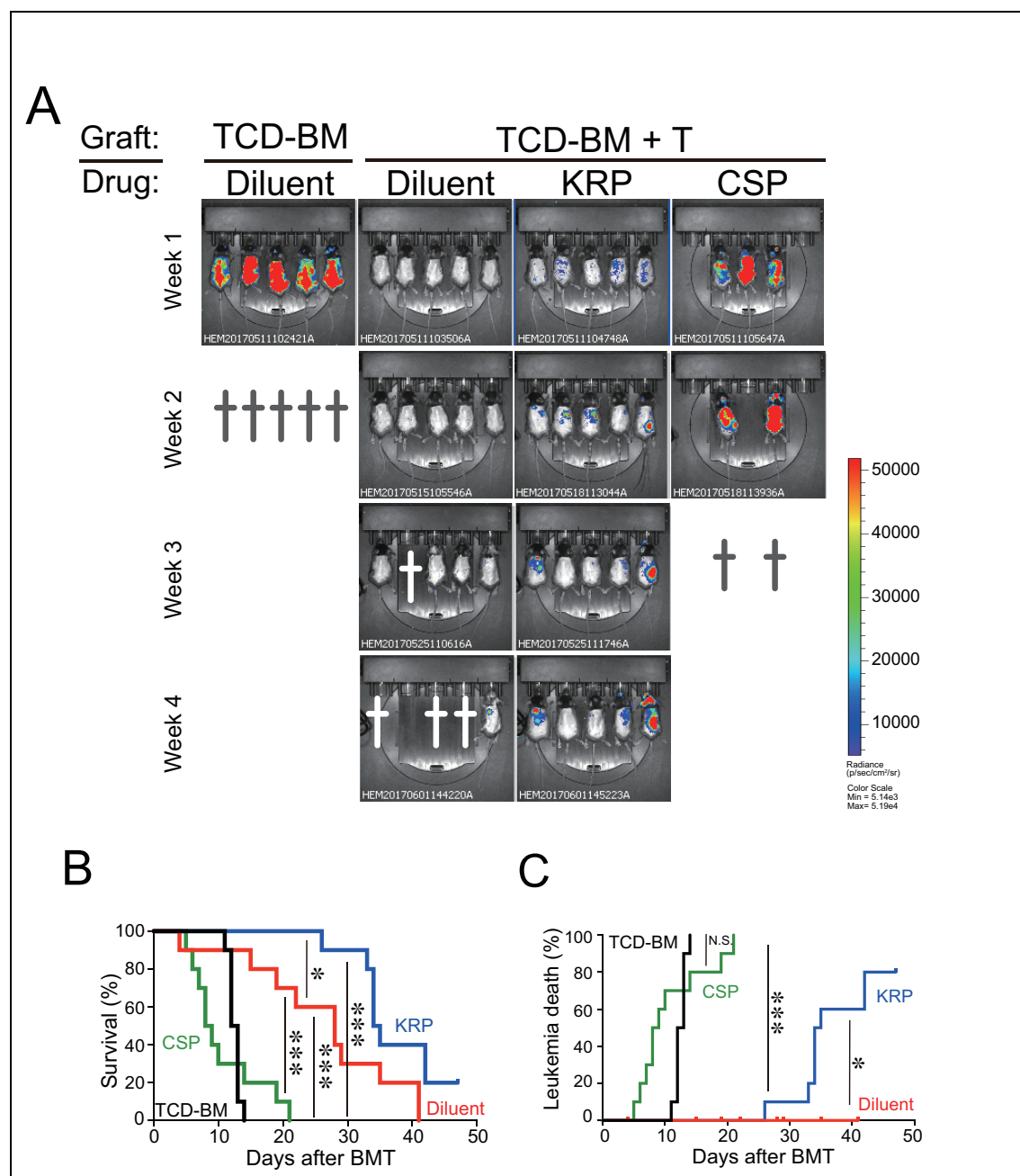
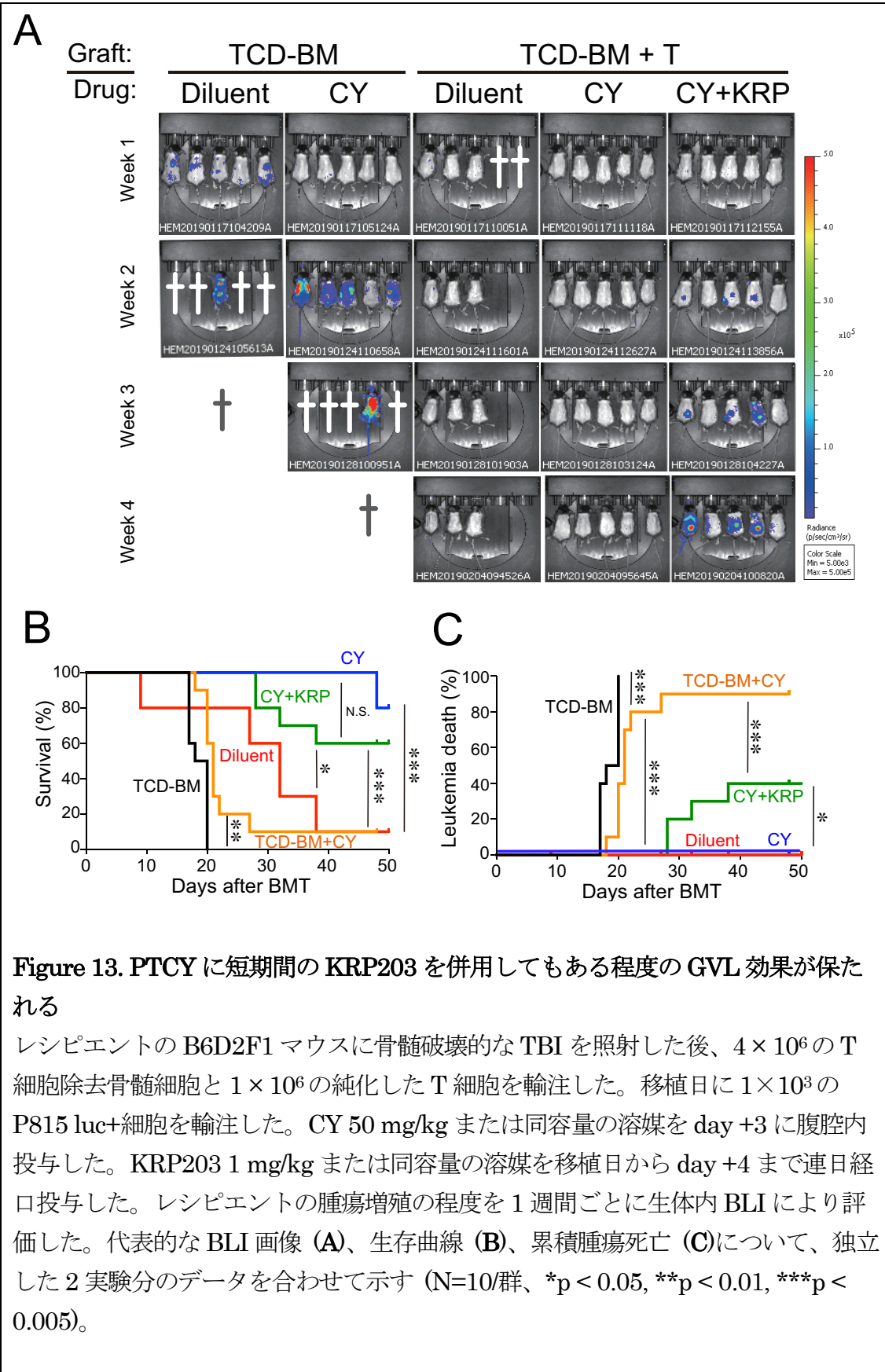


Figure 12. KRP203 長期投与ではある程度の GVL 効果が保たれる

レシピエントの B6D2F1 マウスに骨髄破壊的な TBI を照射した後、 4×10^6 の T 細胞除去骨髄細胞と 2×10^6 の純化した T 細胞を輸注した。移植日に 5×10^4 の P815 luc+細胞を輸注した。KRP203 3 mg/kg または CSP 50 mg/kg、あるいは同種移植コントロール群には同容量の溶媒を移植日から day +28 まで連日経口投与した。レシピエントの腫瘍増殖の程度を 1 週間ごとに生体内 BLI により評価した。代表的な BLI 画像 (A)、生存曲線 (B)、累積腫瘍死亡 (C)について、独立した 2 実験分のデータを合わせて示す (N=10/群、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$)。

上記の結果に基づいて、PTCY に短期間の KRP203 を併用した場合の GVL 効果について検討を行なった。レシピエントの B6D2F1 マウスに骨髄破壊的な TBI 照射を行なったのちに、ドナーの B6 マウスから抽出した 4×10^6 の T 細胞除去骨髄細胞と 1×10^6 の純化された T 細胞を輸注した。コントロールとして、T 細胞除去骨髄細胞のみを輸注した群を設定するとともに、PTCY によって輸注した腫瘍が消失してしまう可能性を除外するために、T 細胞除去骨髄細胞のみを輸注し、かつ移植後 day +3 に CY 50 mg/kg を投与する群を設定した。 1×10^3 の P815 luc+細胞を移植日にグラフトと同時に輸注した。KRP203 は 1 mg/kg を移植日から day +4 まで連日経口投与した。T 細胞除去骨髄細胞のみを輸注した場合、CY を投与した群においても腫瘍の増殖によりすべてのマウスが死亡したため、CY による抗腫瘍効果ではこの腫瘍量の P815 luc+細胞を消失させることはないことを確認した (Figure 13A-C)。T 細胞除去骨髄細胞と純化 T 細胞を輸注したコントロール群では、GVL 効果により腫瘍の増殖は見られず、GVHD によってマウスが死亡した (Figure 13A-C)。PTCY 単独群では腫瘍増殖は見られず、GVL 効果が保たれていた (Figure 13A-C)。PTCY に短期間の KRP203 を併用した群では、day50 までに約半数のマウスが腫瘍死したが、T 細胞除去骨髄細胞のみを移植したコントロール群と比較すると腫瘍の増殖は緩徐であった (Figure 13A-C)。



考察

近年、HLA 半合致の造血幹細胞移植において、PTCY による GVHD 予防法の安全性と有効性が多く報告されている(Bacigalupo et al., 2015; Castagna et al., 2014; Kasamon et al., 2017; Sugita et al., 2015)。PTCY の作用機序である同種抗原反応性 T 細胞の clonal destruction は、移植後に高度に活性化、増殖する同種抗原反応性 T 細胞が PTCY によるアポトーシスの誘導を受けやすいことに起因する。そのため、移植後早期の短い期間の CY 投与のみで、その後の長期的な GVHD 抑制効果が得られることが、動物実験モデルにより示されてきた(Mayumi, 1996)。しかし臨床においては、PTCY 単独では HLA 一致の移植においても十分な GVHD 抑制効果は得られない。これは、CY のみでは同種抗原反応性 T 細胞の clonal destruction が不十分であるためと考えられる。そのため、PTCY による GVHD 抑制療法には、CI などの他の免疫抑制剤が併用されることが一般的である(Alousi et al., 2015; Ruggeri et al., 2018)。CI を長期投与した場合、T 細胞の活性が高度に抑制され、GVL 効果が乏しくなることで移植後の原病再発のリスクが高まることや、同種抗原反応性 T 細胞以外の T 細胞の広汎な抑制により免疫再構築が阻害され易感染の状態が長引くという問題点がある。同種造血幹細胞後に、ドナーのグラフト由来の Treg では ALDH2 の発現が高まるため、Treg は PTCY がもたらすアポトーシスへの耐性を持つことが報告されている(Ganguly et al., 2014; Kanakry et al., 2013)。Treg の活性化、増殖、機能維持には IL-2 のシグナルが必要であるが、CI は IL-2 シグナルの抑制作用を介して Treg の機能に抑制的に働くため、PTCY に CI を併用することで移植後の免疫寛容の獲得に不利に作用する可能性がある。このような CI による弊害を避けるため、CI を用いない PTCY 療法として、sirolimus や bortezomib を併用する方法が開発されている(Al-Homsi et al., 2017; Cieri et al., 2015)。今回我々は、PTCY に短期間の KRP203 を併用する GVHD 抑制療法が、移植後の Treg の再構築を妨げることなく良好な GVHD 抑制効果を持つことを示した。

S1PR 作動薬は、新しい作用機序を持つ免疫抑制剤である。始めに開発された FTY720 は、S1PR_{1,3,4,5} の複数の受容体に強い親和性を持つアゴニストであり、多発性硬化症の治療薬として米食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) に既に承認されている(Cohen et al., 2016; Cyster and Schwab, 2012)。FTY720 は、主に T 細胞をリンパ組織内に隔離する機序によって、有害な免疫反応を緩和する作用を持つ(Mandala et al., 2002)。我々やその他の研究チームは、FTY720 が Treg の機能を保ちながら、ドナー T 細胞をリンパ節内に隔離しアポトーシスを誘導することで、GVHD の抑制効果を持つことをこれまでに報告している(Hashimoto et al., 2007; Kim et al., 2003; Lee et al., 2003; Taylor et al., 2007)。今回我々は、S1PR₁ の選択的

なアゴニストである KRP203 が、FTY720 と同様にドナーT 細胞をリンパ節内に隔離する作用があることを示した。また、PTCY で報告されているほどの同種抗原反応性 T 細胞への選択性は見られないものの、KRP203 がリンパ節内で活性化 T 細胞のアポトーシスを誘導することを示した。このように、KRP203 が移植後早期に活性化ドナーT 細胞を減少させる効果を持つことから、PTCY に KRP203 を併用することで、より効率的に同種抗原反応性のドナーT 細胞を除去する効果が期待できると考えた。移植後の二次リンパ組織におけるドナーT 細胞数は、PTCY 単独群と PTCTY に KRP203 を併用した群で差が見られなかったものの、GVHD 標的臓器におけるドナーT 細胞の数は、PTCTY に KRP203 を併用した群で有意に減少していた。KRP203 投与によって GVHD 標的臓器のドナーT 細胞が減少する機序についてはさらなる検討が必要である。高度な炎症病態である GVHD においては、二次リンパ組織で抗原提示を受けたドナーT 細胞が GVHD 標的臓器へと遊走し、さらに標的臓器において高度な増殖、活性化をきたすが(Koyama et al., 2011)、KRP203 は移植後早期にドナーT 細胞をリンパ節内に隔離して GVHD 標的臓器への遊走を阻止するため、GVHD が発症し増悪する始めの段階を抑制すると考えられる。また、KRP203 がドナーT 細胞を抗原提示の場となるリンパ節内に隔離することで、同種抗原反応性T 細胞の活性化が促進され、PTCTY による傷害をより受けやすい状態にする可能性が考えられる。片岡らは、移植日から FTY720 を投与した場合には GVHD が抑制されたのに対して、FTY720 を day +2 から投与した場合には GVHD 抑制効果が見られなかったことを報告しており(Kataoka et al., 2005)、S1PR 作動薬を用いて GVHD を予防するためには、移植直後のドナーT 細胞の二次リンパ組織への隔離が重要であることが示唆された。S1PR のアゴニストによるリンパ球の二次リンパ組織内への隔離効果は可逆的であり、アゴニストの投与を中止するとリンパ球が再び血流およびリンパ流の循環に戻り、末梢のリンパ球が増加することが示されている(Pinschewer et al., 2000)。今回の研究では、KRP203 は移植日から day +4 までの短期間投与でも十分な GVHD 抑制効果を示したことから、PTCTY との併用による相乗効果の機序は、ドナーT 細胞のリンパ節内への隔離だけでは説明できない。

PTCTY による GVHD 予防法では、Treg が ALDH2 の発現により CY に対して耐性を持つために CY 投与後も保たれ、長期的な免疫寛容の維持に重要な役割を果たしている。マウスの GVHD モデルでは、PTCTY を用いた移植において Treg を除去すると、PTCTY による GVHD 抑制効果が消失することが報告されている(Ganguly et al., 2014)。S1PR₁ のシグナルは Treg の分化、増殖、維持に関与しており、FTY720 の投与が Treg の機能を高め炎症を抑制することが報告されている(Daniel et al., 2007; Sawicka et al., 2005; Sehrawat and Rouse, 2008; Zhou et al., 2009)。今回の研究において、KRP203 は PTCTY 後に残存した Treg を阻害することなく、むしろ CD4⁺T

細胞における FoxP3⁺の細胞の割合が増加していたことから、FTY720 と同様に Treg の分化、増殖を誘導し、GVHD のさらなる改善をもたらしたことが考えられる。臨床において PTCY に併用されている CI は、高度な T 細胞抑制効果によって PTCY への相加効果を示していると考えられるが、Treg に対しては抑制的に作用するため、Treg による生体内での安定した免疫寛容の獲得には不利に働く可能性がある。一方で、KRP203 は PTCY 後の Treg の機能回復を促進し、より早期に長期的な免疫寛容の獲得に寄与する可能性があり、PTCY に併用する薬剤として望ましいと考えられる。

GVL 効果については、CSP 投与では高度に GVL 効果が減弱したのに対し、KRP203 ではある程度の GVL 効果が保たれていた。これらの結果は、FTY720 の長期投与は GVHD を改善する一方で、GVL 効果はある程度減弱しながらも保たれるという既報と同様であった(Kim et al., 2003; Taylor et al., 2007)。S1PR₁ 作動薬による T 細胞アポトーシスの作用が比較的緩徐であることが、GVL の著しい減弱をきたさなかった要因と考えられる。今回我々は、同種移植後の PTCY は GVL 効果を阻害しないという結果を示したが、臨床においても、PTCY を用いた移植では原病の再発率は増加しないことが報告されている(Di Stasi et al., 2014; Wang et al., 2015)。今回の研究では、T 細胞除去骨髓細胞のみを移植したマウスに PTCY を投与しても、腫瘍細胞が消失せずマウスが腫瘍死したことから、PTCY を用いた移植においても、腫瘍の根絶にはドナー T 細胞による GVL 効果が重要であることが示された。移植後に PTCY を投与する前に起こる同種抗原反応性 T 細胞の高度な活性化が、GVL 効果に重要な役割を果たしている可能性も考えられる。また、PTCY が移植直後に高度に活性化する同種抗原反応性 T 細胞を効率的に除去する作用を持つ一方で、それ以外の GVL に寄与する T 細胞や NK 細胞は温存し GVL 効果が保たれる可能性も考えられる。S1PR 作動薬は、移植後早期に同種抗原反応性 T 細胞の活性化を促進する作用を持つため、PTCY に KRP203 を併用することは GVL 効果についても有利に働く可能性がある。

T 細胞は主に S1PR₁ を発現しているため、T 細胞の遊走を抑制する目的では S1PR₁ に選択的なアゴニストを用いることが望ましい。FTY720 は S1PR_{1,2,3,5} の複数の受容体に作用するが、KRP203 は S1PR₁ に選択的に作用するアゴニストである。FTY720 の投与では、血管平滑筋に発現する S1PR₃ のシグナルによって血管収縮が亢進し、高血圧や頭痛、可逆性後頭葉白質脳症といった副作用が出現することが報告されている(Calabresi et al., 2014; Kappos et al., 2006; Kappos et al., 2010)。FTY720 は造血幹細胞移植後の GVHD 予防法として臨床試験が行われたが、有害事象の問題により FDA は FTY720 を GVHD 予防薬として承認しなかった。しかし、臨床試験において FTY720 は GVHD に有効性を示す報告もあり (Gauthier et al., 2018)、S1PR₁ 選択的なアゴニストである KRP203 は、FTY720 よりも副作用が少なく、かつ良好な

GVHD 抑制効果が期待できる薬剤である。今後、KRP203 の臨床的な安全性と有効性について、臨床試験によって検証されることが望ましい。

総括および結論

本研究全体から得られた新知見

- ・ S1PR₁ の選択的なアゴニストである KRP203 は、S1PR_{1,3,4,5} のアゴニストである FTY720 と同様に、造血幹細胞移植後早期にドナーT 細胞をリンパ節内に隔離し、アポトーシスを起こさせる機序によって、ドナーT 細胞を減少させる効果を持つ。
- ・ PTCY に移植日から day +4 までの短期間の KRP203 を併用することにより、GVHD 標的臓器へのドナーT 細胞の浸潤が抑制され、GVHD 抑制の相加効果を示す。
- ・ PTCY に KRP203 を併用すると、造血幹細胞移植後の Treg の回復が促進される。
- ・ PTCY に KRP203 を併用しても、一定の GVL 効果が保たれる。

新知見の意義

PTCY を用いた GVHD 予防法は、HLA 不一致の有無に関わらず良好な治療成績を示しており、ドナーの確保が困難であった多くの血液疾患のレシピエントにとって造血幹細胞移植の選択肢を拡大している。しかし、PTCY 単独では十分な GVHD 抑制効果を得ることは難しく、他の免疫抑制剤の併用が必要となっている。最も一般的に用いられるカルシニューリン阻害剤は強力な T 細胞抑制作用によって良好な GVHD 抑制効果を示しているものの、感染症や原病の再発、Treg の抑制作用といった問題点があり、PTCY を用いた移植の治療成績をより向上させるためには、新規の免疫抑制剤を併用した新しい GVHD 予防法の開発が求められている。新規の免疫抑制剤として開発された FTY720 は、主に T 細胞の体内動態を制御することによって Treg を保ちながら良好な GVHD 抑制効果を示す薬剤である。今回我々は、S1PR₁ の選択的なアゴニストである KRP203 を PTCY に併用することで、CI の欠点を克服し、FTY720 よりも安全性が高く、良好な GVHD 抑制効果を示す新たな治療方法を提示した。

今後の課題

今回我々は、PTCY に KRP203 を併用する GVHD 予防法についてマウスの GVHD モデルを用いてその有効性を示したが、今後、KRP203 がヒトでの臨床試験によって検証されることが望ましい。PTCY 療法では、CY による同種抗原反応性 T 細胞の除去が効率的に行われるためには、移植直後に同種抗原反応性 T 細胞を十分に活性化させることが重要であり、併用されるカルシニューリン阻害剤は CY 投与終了後から開始され、その後ある程度長期間の投与が継続されている。今回の研究では、

KRP203 は移植直後から短期間の併用で十分な効果を示しており、実臨床でも短期間投与が可能となればその有用性は高いが、その適切な投与時期、期間についてはさらなる検討が必要である。FTY720 を GVHD 予防法としてヒトの臨床試験に用いた際には、心血管系の副作用が問題となった。今回我々が用いた KRP203 は S1PR₁ に選択的に作用することから、FTY720 で見られるような副作用が軽減することが期待されるが、その安全性について確認する必要がある。

謝辞

北海道大学大学院 医学研究院内科学系部門内科学分野 血液内科教室
豊嶋崇徳教授、橋本大吾准教授、早瀬英子先生、高橋秀一郎先生、荒隆英先生、小笠
原励起先生、江端浩先生、大東寛幸先生、立野貴大先生、長谷川裕太先生

利益相反

KRP203 はノバルティスファーマ株式会社 (Basel, Switzerland) より無償で提供いた
だいた。

引用文献

Al-Homsi, A.S., Cole, K., Muilenburg, M., Goodyke, A., Abidi, M., Duffner, U., Williams, S., Parker, J., and Abdel-Mageed, A. (2017). Calcineurin and mTOR Inhibitor-Free Post-Transplantation Cyclophosphamide and Bortezomib Combination for Graft-versus-Host Disease Prevention after Peripheral Blood Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Phase I/II Study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *23*, 1651-1657.

Alousi, A.M., Brammer, J.E., Saliba, R.M., Andersson, B., Popat, U., Hosing, C., Jones, R., Shpall, E.J., Khouri, I., Qazilbash, M., *et al.* (2015). Phase II Trial of Graft-versus-Host Disease Prophylaxis with Post-Transplantation Cyclophosphamide after Reduced-Intensity Busulfan/Fludarabine Conditioning for Hematological Malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *21*, 906-912.

Anasetti, C., Amos, D., Beatty, P.G., Appelbaum, F.R., Bensinger, W., Buckner, C.D., Clift, R., Doney, K., Martin, P.J., Mickelson, E., *et al.* (1989). Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N. Engl. J. Med.* *320*, 197-204.

Anasetti, C., Beatty, P.G., Storb, R., Martin, P.J., Mori, M., Sanders, J.E., Thomas, E.D., and Hansen, J.A. (1990). Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Hum. Immunol.* *29*, 79-91.

Anasetti, C., and Hansen, J.A. (1994). Effect of HLA incompatibility in marrow transplantation from unrelated and HLA-mismatched related donors. *Transfus. Sci.* *15*, 221-230.

Bacigalupo, A., Dominietto, A., Ghiso, A., Di Grazia, C., Lamparelli, T., Gualandi,

F., Bregante, S., Van Lint, M.T., Geroldi, S., Luchetti, S., *et al.* (2015). Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and post-transplant cyclophosphamide for hematologic malignancies following a myeloablative conditioning: an update. *Bone Marrow Transplant.* *50 Suppl 2*, S37-39.

Bashey, A., Zhang, X., Jackson, K., Brown, S., Ridgeway, M., Solh, M., Morris, L.E., Holland, H.K., and Solomon, S.R. (2016). Comparison of Outcomes of Hematopoietic Cell Transplants from T-Replete Haploidentical Donors Using Post-Transplantation Cyclophosphamide with 10 of 10 HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 Allele-Matched Unrelated Donors and HLA-Identical Sibling Donors: A Multivariable Analysis Including Disease Risk Index. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *22*, 125-133.

Beatty, P.G., Anasetti, C., Hansen, J.A., Longton, G.M., Sanders, J.E., Martin, P.J., Mickelson, E.M., Choo, S.Y., Petersdorf, E.W., Pepe, M.S., *et al.* (1993). Marrow transplantation from unrelated donors for treatment of hematologic malignancies: effect of mismatching for one HLA locus. *Blood* *81*, 249-253.

Berenbaum, M.C., and Brown, I.N. (1963). Prolongation of Homograft Survival in Mice with Single Doses of Cyclophosphamide. *Nature* *200*, 84.

Blaho, V.A., and Hla, T. (2014). An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Lipid Res.* *55*, 1596-1608.

Bozdech, M.J., Sondel, P.M., Trigg, M.E., Longo, W., Kohler, P.C., Flynn, B., Billing, R., Anderson, S.A., Hank, J.A., and Hong, R. (1985). Transplantation of HLA-haploidentical T-cell-depleted marrow for leukemia: addition of cytosine arabinoside to the pretransplant conditioning prevents rejection. *Exp. Hematol.* *13*, 1201-1210.

Brinkmann, V., Davis, M.D., Heise, C.E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., *et al.* (2002). The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* *277*, 21453-21457.

Calabresi, P.A., Radue, E.W., Goodin, D., Jeffery, D., Rammohan, K.W., Reder, A.T., Vollmer, T., Agius, M.A., Kappos, L., Stites, T., *et al.* (2014). Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* *13*, 545-556.

Castagna, L., Crocchiolo, R., Furst, S., Bramanti, S., El Cheikh, J., Sarina, B., Granata, A., Mauro, E., Faucher, C., Mohty, B., *et al.* (2014). Bone marrow compared with peripheral blood stem cells for haploidentical transplantation with a nonmyeloablative conditioning regimen and post-transplantation cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *20*, 724-729.

Cieri, N., Greco, R., Crucitti, L., Morelli, M., Giglio, F., Levati, G., Assanelli, A., Carrabba, M.G., Bellio, L., Milani, R., *et al.* (2015). Post-transplantation Cyclophosphamide and Sirolimus after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation Using a Treosulfan-based Myeloablative Conditioning and Peripheral Blood Stem Cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *21*, 1506-1514.

Ciurea, S.O., Zhang, M.J., Bacigalupo, A.A., Bashey, A., Appelbaum, F.R., Aljitawi, O.S., Armand, P., Antin, J.H., Chen, J., Devine, S.M., *et al.* (2015). Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood* *126*, 1033-1040.

Cohen, J.A., Khatri, B., Barkhof, F., Comi, G., Hartung, H.P., Montalban, X., Pelletier, J., Stites, T., Ritter, S., von Rosenstiel, P., *et al.* (2016). Long-term (up to

4.5 years) treatment with fingolimod in multiple sclerosis: results from the extension of the randomised TRANSFORMS study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *87*, 468-475.

Cooke, K.R., Kobzik, L., Martin, T.R., Brewer, J., Delmonte, J., Jr., Crawford, J.M., and Ferrara, J.L. (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.

Crocchiolo, R., Ciceri, F., Fleischhauer, K., Oneto, R., Bruno, B., Pollichieni, S., Sacchi, N., Sormani, M.P., Fanin, R., Bandini, G., *et al.* (2009). HLA matching affects clinical outcome of adult patients undergoing haematopoietic SCT from unrelated donors: a study from the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo and Italian Bone Marrow Donor Registry. *Bone Marrow Transplant.* *44*, 571-577.

Cyster, J.G., and Schwab, S.R. (2012). Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 69-94.

Daniel, C., Sartory, N., Zahn, N., Geisslinger, G., Radeke, H.H., and Stein, J.M. (2007). FTY720 ameliorates Th1-mediated colitis in mice by directly affecting the functional activity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* *178*, 2458-2468.

Di Stasi, A., Milton, D.R., Poon, L.M., Hamdi, A., Rondon, G., Chen, J., Pingali, S.R., Konopleva, M., Kongtim, P., Alousi, A., *et al.* (2014). Similar transplantation outcomes for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome patients with haploidentical versus 10/10 human leukocyte antigen-matched unrelated and related donors. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *20*, 1975-1981.

Emadi, A., Jones, R.J., and Brodsky, R.A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *6*, 638-647.

Eto, M., Mayumi, H., Tomita, Y., Yoshikai, Y., Nishimura, Y., Maeda, T., Ando, T., and Nomoto, K. (1991). Specific destruction of host-reactive mature T cells of donor origin prevents graft-versus-host disease in cyclophosphamide-induced tolerant mice. *J. Immunol.* *146*, 1402-1409.

Ferrara, J.L., Levine, J.E., Reddy, P., and Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *Lancet* *373*, 1550-1561.

Fidler, J.M., Ku, G.Y., Piazza, D., Xu, R., Jin, R., and Chen, Z. (2002). Immunosuppressive activity of the Chinese medicinal plant *Tripterygium wilfordii*. III. Suppression of graft-versus-host disease in murine allogeneic bone marrow transplantation by the PG27 extract. *Transplantation* *74*, 445-457.

Fujita, T., Hirose, R., Yoneta, M., Sasaki, S., Inoue, K., Kiuchi, M., Hirase, S., Chiba, K., Sakamoto, H., and Arita, M. (1996). Potent immunosuppressants, 2-alkyl-2-aminopropane-1,3-diols. *J. Med. Chem.* *39*, 4451-4459.

Ganguly, S., Ross, D.B., Panoskaltsis-Mortari, A., Kanakry, C.G., Blazar, B.R., Levy, R.B., and Luznik, L. (2014). Donor CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells are necessary for posttransplantation cyclophosphamide-mediated protection against GVHD in mice. *Blood* *124*, 2131-2141.

Gauthier, J., Vermersch, P., Chauvet, P., Varlet, P., Coiteux, V., Magro, L., and Yakoub-Agha, I. (2018). Successful treatment with fingolimod of graft-versus-host disease of the central nervous system. *Blood Adv.* *2*, 10-13.

Hashimoto, D., Asakura, S., Matsuoka, K., Sakoda, Y., Koyama, M., Aoyama, K., Tanimoto, M., and Teshima, T. (2007). FTY720 enhances the activation-induced apoptosis of donor T cells and modulates graft-versus-host disease. *Eur. J. Immunol.*

37, 271-281.

Henslee-Downey, P.J., Parrish, R.S., MacDonald, J.S., Romond, E.H., Marciniak, E., Coffey, C., Ciocchi, G., and Thompson, J.S. (1996). Combined in vitro and in vivo T lymphocyte depletion for the control of graft-versus-host disease following haploidentical marrow transplant. *Transplantation* 61, 738-745.

Hingorani, S. (2016). Renal Complications of Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 374, 2256-2267.

Kanakry, C.G., Ganguly, S., Zahurak, M., Bolanos-Meade, J., Thoburn, C., Perkins, B., Fuchs, E.J., Jones, R.J., Hess, A.D., and Luznik, L. (2013). Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Sci. Transl. Med.* 5, 211ra157.

Kanakry, C.G., Tsai, H.L., Bolanos-Meade, J., Smith, B.D., Gojo, I., Kanakry, J.A., Kasamon, Y.L., Gladstone, D.E., Matsui, W., Borrello, I., *et al.* (2014). Single-agent GVHD prophylaxis with posttransplantation cyclophosphamide after myeloablative, HLA-matched BMT for AML, ALL, and MDS. *Blood* 124, 3817-3827.

Kappos, L., Antel, J., Comi, G., Montalban, X., O'Connor, P., Polman, C.H., Haas, T., Korn, A.A., Karlsson, G., Radue, E.W., *et al.* (2006). Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 355, 1124-1140.

Kappos, L., Radue, E.W., O'Connor, P., Polman, C., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Agoropoulou, C., Leyk, M., Zhang-Auberson, L., *et al.* (2010). A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 362, 387-401.

Kasamon, Y.L., Ambinder, R.F., Fuchs, E.J., Zahurak, M., Rosner, G.L., Bolanos-

Meade, J., Levis, M.J., Gladstone, D.E., Huff, C.A., Swinnen, L.J., *et al.* (2017). Prospective study of nonmyeloablative, HLA-mismatched unrelated BMT with high-dose posttransplantation cyclophosphamide. *Blood Adv.* *1*, 288-292.

Kataoka, H., Ohtsuki, M., Shimano, K., Mochizuki, S., Oshita, K., Murata, M., Sugahara, K., Sato, N., Hoshino, Y., and Chiba, K. (2005). Immunosuppressive activity of FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor agonist: II. Effect of FTY720 and FTY720-phosphate on host-versus-graft and graft-versus-host reaction in mice. *Transplant. Proc.* *37*, 107-109.

Khattar, M., Deng, R., Kahan, B.D., Schroder, P.M., Phan, T., Rutzky, L.P., and Stepkowski, S.M. (2013). Novel sphingosine-1-phosphate receptor modulator KRP203 combined with locally delivered regulatory T cells induces permanent acceptance of pancreatic islet allografts. *Transplantation* *95*, 919-927.

Kim, Y.M., Sachs, T., Asavaroengchai, W., Bronson, R., and Sykes, M. (2003). Graft-versus-host disease can be separated from graft-versus-lymphoma effects by control of lymphocyte trafficking with FTY720. *J. Clin. Invest.* *111*, 659-669.

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.

Lee, R.S., Kuhr, C.S., Sale, G.E., Zellmer, E., Hogan, W.J., Storb, R., and Little, M.T. (2003). FTY720 does not abrogate acute graft-versus-host disease in the dog leukocyte antigen-nonidentical unrelated canine model. *Transplantation* *76*, 1155-1158.

Luznik, L., Bolanos-Meade, J., Zahurak, M., Chen, A.R., Smith, B.D., Brodsky, R.,

Huff, C.A., Borrello, I., Matsui, W., Powell, J.D., *et al.* (2010). High-dose cyclophosphamide as single-agent, short-course prophylaxis of graft-versus-host disease. *Blood* *115*, 3224-3230.

Luznik, L., O'Donnell, P.V., Symons, H.J., Chen, A.R., Leffell, M.S., Zahurak, M., Gooley, T.A., Piantadosi, S., Kaup, M., Ambinder, R.F., *et al.* (2008). HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *14*, 641-650.

Maeda, T., Eto, M., Nishimura, Y., Nomoto, K., Kong, Y.Y., and Nomoto, K. (1993). Direct evidence for clonal destruction of allo-reactive T cells in the mice treated with cyclophosphamide after allo-priming. *Immunology* *78*, 113-121.

Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G.J., Card, D., Keohane, C., *et al.* (2002). Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* *296*, 346-349.

Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* *427*, 355-360.

Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* *296*, 301-305.

Mayumi, H. (1996). [Cyclophosphamide-induced immunological tolerance: an overview]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi* *97*, 1097-1108.

Mayumi, H., Himeno, K., Shin, T., and Nomoto, K. (1985). Drug-induced tolerance to allografts in mice. VI. Tolerance induction in H-2-haplotype-identical strain combinations in mice. *Transplantation* *40*, 188-194.

McCurdy, S.R., and Fuchs, E.J. (2015). Comparable Outcomes for Hematologic Malignancies after HLA-Haploidentical Transplantation with Posttransplantation Cyclophosphamide and HLA-Matched Transplantation. *Adv. Hematol.* *2015*, 431923.

O'Donnell, P.V., Luznik, L., Jones, R.J., Vogelsang, G.B., Leffell, M.S., Phelps, M., Rhubart, P., Cowan, K., Piantados, S., and Fuchs, E.J. (2002). Nonmyeloablative bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched related donors using posttransplantation cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *8*, 377-386.

Pinschewer, D.D., Ochsenbein, A.F., Odermatt, B., Brinkmann, V., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. *J. Immunol.* *164*, 5761-5770.

Reisner, Y., Hagin, D., and Martelli, M.F. (2011). Haploidentical hematopoietic transplantation: current status and future perspectives. *Blood* *118*, 6006-6017.

Rosen, H., Gonzalez-Cabrera, P.J., Sanna, M.G., and Brown, S. (2009). Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 743-768.

Ruggeri, A., Labopin, M., Bacigalupo, A., Afanasyev, B., Cornelissen, J.J., Elmaagacli, A., Itala-Remes, M., Blaise, D., Meijer, E., Koc, Y., *et al.* (2018). Post-transplant cyclophosphamide for graft-versus-host disease prophylaxis in HLA matched sibling or matched unrelated donor transplant for patients with acute leukemia, on behalf of ALWP-EBMT. *J. Hematol. Oncol.* *11*, 40.

Santos, G.W., and Owens, A.H. (1966). Production of graft-versus-host disease in the rat and its treatment with cytotoxic agents. *Nature* *210*, 139-140.

Sawicka, E., Dubois, G., Jarai, G., Edwards, M., Thomas, M., Nicholls, A., Albert, R., Newson, C., Brinkmann, V., and Walker, C. (2005). The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 differentially affects the sequestration of CD4+/CD25+ T-regulatory cells and enhances their functional activity. *J. Immunol.* *175*, 7973-7980.

Sehrawat, S., and Rouse, B.T. (2008). Anti-inflammatory effects of FTY720 against viral-induced immunopathology: role of drug-induced conversion of T cells to become Foxp3+ regulators. *J. Immunol.* *180*, 7636-7647.

Shimizu, H., Takahashi, M., Kaneko, T., Murakami, T., Hakamata, Y., Kudou, S., Kishi, T., Fukuchi, K., Iwanami, S., Kuriyama, K., *et al.* (2005). KRP-203, a novel synthetic immunosuppressant, prolongs graft survival and attenuates chronic rejection in rat skin and heart allografts. *Circulation* *111*, 222-229.

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.

Sugita, J., Kawashima, N., Fujisaki, T., Kakihana, K., Ota, S., Matsuo, K., Miyamoto, T., Akashi, K., Taniguchi, S., Harada, M., *et al.* (2015). HLA-Haploidentical Peripheral Blood Stem Cell Transplantation with Post-Transplant Cyclophosphamide after Busulfan-Containing Reduced-Intensity Conditioning. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *21*, 1646-1652.

Sugiyama, H., Maeda, Y., Nishimori, H., Yamasuji, Y., Matsuoka, K., Fujii, N., Kondo, E., Shinagawa, K., Tanaka, T., Takeuchi, K., *et al.* (2014). Mammalian

target of rapamycin inhibitors permit regulatory T cell reconstitution and inhibit experimental chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *20*, 183-191.

Taylor, P.A., Ehrhardt, M.J., Lees, C.J., Tolar, J., Weigel, B.J., Panoskaltsis-Mortari, A., Serody, J.S., Brinkmann, V., and Blazar, B.R. (2007). Insights into the mechanism of FTY720 and compatibility with regulatory T cells for the inhibition of graft-versus-host disease (GVHD). *Blood* *110*, 3480-3488.

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

Wang, Y., Liu, Q.F., Xu, L.P., Liu, K.Y., Zhang, X.H., Ma, X., Fan, Z.P., Wu, D.P., and Huang, X.J. (2015). Haploidentical vs identical-sibling transplant for AML in remission: a multicenter, prospective study. *Blood* *125*, 3956-3962.

Willis, M.A., and Cohen, J.A. (2013). Fingolimod therapy for multiple sclerosis. *Semin. Neurol.* *33*, 37-44.

Zeiser, R., Nguyen, V.H., Beilhack, A., Buess, M., Schulz, S., Baker, J., Contag, C.H., and Negrin, R.S. (2006). Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* *108*, 390-399.

Zhou, P.J., Wang, H., Shi, G.H., Wang, X.H., Shen, Z.J., and Xu, D. (2009). Immunomodulatory drug FTY720 induces regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* *157*, 40-47.