

[ 別紙 1 ]

## 論文内容の要旨

論文題目 副刺激分子阻害による移植片対宿主反応抑制後の抗腫瘍効果と  
免疫エフェクター細胞機能の解析

指導教官 浅野 茂隆

東京大学大学院医学系研究科 平成 8 年 4 月入学  
医学博士課程 内科学専攻

氏名 大畑 順子

T 細胞の活性化には T 細胞抗原受容体を介した刺激とともに副刺激 (costimulation) と呼ばれる第 2 の刺激が重要な役割を果たしている。抗原提示細胞 (antigen-presenting cell; APC) 上に発現される CD80 および CD86 (CD80/86) の T 細胞上に発現する CD28 への結合による CD80/86-CD28 シグナルは T 細胞の活性化に重要な副刺激である。一方、活性化された T 細胞上に発現する CD154 (CD40 Ligand) と APC 上に恒常的に発現している CD40 を介する CD154-CD40 経路は、CD80/86-CD28 経路とは異なり、T 細胞から APC 方向への副刺激経路であり、APC の活性化を誘導する。CD28 あるいは CD40 副刺激経路を阻害することで、実験的臓器移植モデルにおける移植片長期生着が、またマウス同種骨髄移植においては急性移植片対宿主病 (Graft versus Host Diseases; GVHD) の抑制が報告されてきた。しかし、実際の白血病治療を目的とした造血幹細胞移植では大量化学療法、放射線療法による前処置後のドナー由来細胞による造血の再構築に加え、移植片対白血病 (Graft versus Leukemia ; GVL) 効果を得ることが重要な目的である。臨床的にドナー骨髄細胞からの T 細胞除去は同種造血幹細胞移植後の GVHD 予防に有効な反面、GVL 効果が抑制されることが知られており、ドナー由来 T 細胞が GVHD と GVL 効果の両者に関与していることが示唆される。その一方で、マウス骨髄移植モデルでは、GVL 効果を保持したまま GVHD の抑制が得られた事例が報告され、GVH 反応と GVL 効果に関与するエフェクター細胞および機能分子は必ずしも同一ではないことが推察される。

本研究では、同種骨髄移植と同時に白血病細胞を宿主に移入して、CD28 あるいは CD40 副

刺激経路障害による GVHD の予防を試み、その後の GVL 効果と宿主の免疫エフェクター細胞の機能について比較検討を行った。

## 方法および結果

### 1. 親→F1 骨髄移植モデルにおける CD28 あるいは CD154 欠損ドナー T 細胞移入による致死急性 GVHD の回避

放射線照射 (10 Gy) を行った CBF1 を宿主マウスとし、野生型 B6 マウスの T 細胞除去骨髄細胞とともに、野生型 B6、CD28 欠損 B6 あるいは CD154 欠損 B6 マウスの脾細胞を尾静脈より同時移入し GVHD を誘導した。CD28 欠損、あるいは CD154 欠損ドナー脾細胞を移入したマウスでは、野生型 B6 ドナー脾細胞を移入した対照マウスに比較して、GVHD の指標である生存率、体重減少が明らかに改善され、これらの分子が GVHD の発症に重要な役割を果たしていることが示された。

### 2. 完全同種骨髄移植モデルにおける抗 CD154 抗体あるいは抗 CD80 および CD86 (CD80/86) 抗体投与の GVHD に及ぼす影響

これらの副刺激経路障害による GVHD 予防後の GVL 効果を、BALB/c 由来 B リンパ球性白血病細胞株である BCL1 を用いて検討するために、BALB/c を宿主とし、放射線照射量を 650Gy に減じて GVHD 陽性対照群が骨髄移植後第 28 日までに 70%が生存可能である急性 GVHD モデルを確立した。副刺激障害は抗 CD80/86 抗体あるいは抗 CD154 抗体投与によって行った。このモデルにおいて、抗 CD80/86 抗体あるいは抗 CD154 抗体投与マウスでは、対照抗体投与マウスに比較して、生存率、体重減少、リンパ球再構築を指標とする GVHD が明らかに改善された。

### 3. 抗 CD154 抗体あるいは抗 CD80/86 抗体投与の同種骨髄移植後の BCL1 増殖に及ぼす影響

上記完全同種骨髄移植モデルを用いて骨髄移植と同時に BCL1 を移入し、骨髄移植後第 28 日に宿主マウスの脾臓重量測定を行ったところ、抗 CD80/86 抗体投与群では対照抗体投与群と同様の脾臓の萎縮がみられたのに対し、抗 CD154 抗体投与群で約半数に腫瘍性脾腫を認め、CD40 経路障害によって明らかに GVL 効果が抑制されることが示された。

### 4. 副刺激分子障害の T 細胞機能への影響

抗 CD154 抗体投与では GVL 効果が顕著に抑制された一方で、抗 CD80/86 抗体投与では GVL 効果が保持された理由を明らかにするために、両者の T 細胞機能を比較した。骨髄移植後第 14 日の GVHD 誘導宿主マウスの脾細胞において、ドナー由来細胞は 99%以上を占めていた。骨髄移植後第 14 日の宿主脾 T 細胞の IFN $\gamma$ の発現および宿主同種抗原に対する細胞障害活性を調べた。各副刺激障害群は、対照抗体投与群と比較して明らかに CD4<sup>+</sup>T 細胞の IFN $\gamma$ の発現が抑制されていたが、各副刺激障害群の間に有意な差はなかった。CD8<sup>+</sup>T 細胞の IFN $\gamma$ の発現にはいずれのマウス群間にも有意差はなかった。BCL1、宿主アロ抗原を保持する A20 細胞および BALB/c 脾細胞の PHA 芽球に対する細胞障害活性は、いずれ

の群にも明らかな差は認められなかった。脾細胞中の CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、および CD8<sup>+</sup> T 細胞比率は、各副刺激阻害群で同等に抑制され、有意な差はなかった。これらの結果より各副刺激阻害群間に T 細胞エフェクター機能の明らかな差異は認められなかった。

#### 5. ドナー asialo GM1<sup>+</sup>細胞の BCL1 増殖に及ぼす影響

BCL1 は asialo GM1<sup>+</sup>細胞に感受性であることが報告されているので、asialo GM1<sup>+</sup>細胞の各副刺激分子への依存性の違いが BCL1 の増殖に影響を及ぼしているかを検討するために、ドナー脾細胞から asialo GM1<sup>+</sup>細胞を除去し、骨髄移植および抗体投与後の BCL1 の増殖を比較した。骨髄移植後第 28 日の脾臓重量を測定したところ、asialo GM1<sup>+</sup>細胞の除去によって、対照抗体投与群における脾臓重量は顕著に増大した。各副刺激阻害群においても asialo GM1<sup>+</sup>細胞の除去によって、さらに脾臓重量は増大し、抗 CD154 抗体投与群では、対照抗体投与群および抗 CD80/86 投与群に対して優位の脾臓の増大が認められた。3 群間における asialoGM1<sup>+</sup>細胞除去による変化は 2 元配置分散分析法により同等であった。これらの結果から、ドナー asialo GM1<sup>+</sup>細胞は BCL1 に対する抗腫瘍免疫反応に重要な役割を果たしていることが明らかになったが、各副刺激阻害による BCL1 増殖の違いには、関与していないことがわかった。抗 CD154 抗体投与は、asialo GM1<sup>+</sup>細胞非依存性の抗腫瘍免疫反応を強く抑制していることが推測された。

#### 6. 抗 CD154 抗体投与による IL-12 発現抑制

抗 CD154 抗体投与が GVL 効果を強く減弱させる理由をさらに検討するために、抗原刺激直後の APC 機能について検討した。同種脾細胞移入直後の IL-12 p40 mRNA の発現を半定量的 RT-PCR 法にて検討した。B6 マウスに、放射線照射 BALB/c マウス脾細胞を尾静脈より移入し、同時に各種抗体投与を行ない、B6 マウス脾細胞の IL-12 p40 の経時的発現を調べた。対照抗体投与マウス脾細胞の IL-12 P40 は、6-12 時間をピークに発現が認められたので、6 時間後の発現を各群間で比較した。IL-12 p40 発現は、各副刺激阻害群において対照抗体投与群より抑制されていたが、抗 CD154 抗体投与群において、抗 CD80/86 抗体投与群と比較して有意に強く阻害されていた。

### 考察

本研究では、CD40 阻害、CD28 阻害とも同種骨髄移植後の急性 GVHD を効果的に抑制し致死性を回避するが、CD40 阻害では、in vivo における GVL 効果も著しく減弱させることを、BCL1 白血病モデルにおいて明らかにした。

本研究において asialoGM1<sup>+</sup>細胞除去によって BCL1 の増殖は顕著に促進され、asialoGM1<sup>+</sup>細胞は GVL 効果のエフェクターであると考えられた。asialoGM1<sup>+</sup>細胞除去前後の解析では、NK 細胞、NKT 細胞および CD8<sup>+</sup> T 細胞の一部が除去されていたことから、これらの複数の細胞分画の除去が骨髄移植後の顕著な BCL1 の増殖を促進したと考えられた。しかし、asialo GM1<sup>+</sup>細胞の抗 BCL1 反応はこれらの副刺激経路阻害による明らかな影響を受けていず、asialo GM1<sup>+</sup>細胞除去後の GVL 効果は、CD40 阻害によりさらに抑制されたことから asialo GM1<sup>+</sup>細胞非依存

性の GVL 機序が存在することが示唆された。

骨髄移植後第 14 日の T 細胞機能解析の結果では、T 細胞機能は、各副刺激阻害群において GVHD 陽性対照群に比べ抑制されていたが、各副刺激阻害群間の明らかな差異は認められなかったのに対して、APC 機能解析の結果では、同種細胞移入直後の IL-12 mRNA 発現が、CD40 阻害群で CD28 阻害群に比べ有意に低下していた。このことから、移植後初期の IL-12 の発現の違いが、IL-12 を介する抗腫瘍エフェクター機能に影響を与え、BCL1 に対する免疫応答の違いをもたらした可能性が考えられた。

CD28 と CD40 阻害による T 細胞免疫寛容誘導には異なる機序が存在することが明らかにされつつある。本研究では *in vitro* での各副刺激阻害群間での T 細胞機能の差異を検出できなかったが、*in vivo* においては CD40 経路阻害にみられる免疫寛容誘導機序により、白血病細胞に対する免疫反応が強く抑制された可能性も考えられた。

骨髄移植後第 28 日の脾細胞数は、CD40 阻害群においてやや多い傾向がみられた。BCL1 の生着増殖に移入後早期に脾臓が存在する必要があることが報告されているが、本 GVHD モデルでは骨髄移植後第 14 日において、脾臓の萎縮を肉眼的にも、全脾細胞数の評価からも認めなかったため、GVHD による脾臓の萎縮が BCL1 増殖に与える影響は少ないものと考えられた。

一方、CD28 経路阻害は CD40 阻害と異なり APC の活性化を直接抑制しないため、CD40 刺激を介して活性化された APC は、CD80/86-CD28 以外の副刺激経路を介して CTL を誘導できる可能性がある。また、CD4 T 細胞と比較し、ナイーブ CD8 T 細胞における CD28 刺激の依存性が低いことが報告されている。さらに、CD8<sup>+</sup>T 細胞には CD28 分画が存在し、高い細胞障害活性を保持していることなども報告された。これらより、ナイーブ CD8<sup>+</sup>T 細胞はある条件下では CD28 阻害では寛容誘導されにくい可能性が考えられ、このことが本研究において CD28 阻害を行っても GVL 効果が維持されていた理由の一つであるのかもしれない。

本研究結果は、白血病治療のための造血幹細胞移植治療法において、免疫抑制療法としての副刺激阻害抗体療法の導入に対する警鐘を促す重要な結果と考えられた。