

論文の内容の要旨

論文題目

ケモカイン・接着因子を標的とした GVHD の回避と選択的 GVT 誘導法の開発

指導教官 松島 綱治教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

社会医学専攻

氏名 上羽 悟史

研究の背景および目的

同種造血幹細胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation) は様々な造血系腫瘍に対する最も効果的な治療法であり、時には化学療法単独では治癒が得られないような状態の疾患に対しても根治をもたらすことに成功している。同種造血幹細胞移植による腫瘍治癒には、移植骨髄または末梢血幹細胞に混入するドナー T 細胞が宿主型組織適合抗原を発現する腫瘍細胞に対して細胞傷害性を発揮する GVT (graft-versus-tumor) / GVL (graft-versus-leukemia) 効果が重要な役割を担う。一方でドナー T 細胞が正常臓器を傷害する致死的併発疾患である、急性 GVHD (graft-versus-host disease) を否めないのが現状である。同種造血幹細胞移植における最大の問題は GVT 効果と GVHD、双方においてドナー由来 anti-tumor/host CTL すなわちエフェクタードナー CD8 T 細胞が中心的な役割を果たすため、一般的には GVT 効果と GVHD の差別化が困難な事にある。急性 GVHD では標的臓器が腸管、肝臓、皮膚に限定されており、その選択性を規定するものとしてエフェクタードナー CD8 T 細胞が標的臓器へ選択的に浸潤し、臓器傷害を引き起こすことが考えられる。急性 GVHD における臓器傷害の中でも腸管 GVHD は、下痢による脱水や、傷害を受けた腸管上皮から消化管内細菌が生体内に転移し、全身性の炎症を誘導する等、GVHD の重症化に関与している。本研究において私は、腸管 GVHD の発症機序およ

び GVT 効果をエフェクタードナーCD8 T 細胞の臓器浸潤の観点から詳細に解析し、細胞遊走関連分子を標的として GVT 効果を損なうことなく選択的に腸管 GVHD を抑制する新規な治療法の可能性を検討した。

方法と結果

1) 腸管 GVHD におけるドナーCD8 T 細胞の動態

まず C57BL/6 (B6)マウスの脾細胞を C57BL/6xDBA/2 F1(BDF1)マウスに移入する急性 GVHD モデルを用いて、エフェクタードナーCD8 T 細胞誘導の場である2次リンパ組織、および GVHD の標的臓器である腸管におけるドナーCD8 T 細胞の動態を解析した。フローサイトメリー解析により、腸管膜リンパ節および脾臓においてドナーCD8 T 細胞数は移入後2日目より増加を始め、10日目にピークを迎え、その後急速に減少する事が明らかとなった。腸管では移入後8日目までは少数のドナーCD8 T 細胞を認めるのみであったが、その後 GVHD の極期である14日目にかけて急速に増加するという、2次リンパ組織とは異なった動態を示した。腸管組織の免疫蛍光染色により、ドナーCD8 T 細胞は主に腸管陰窩部から浸潤を始めることが明らかとなった。また HE 染色およびTUNEL法により、ドナーCD8 T細胞の腸管浸潤に伴って腸管陰窩部におけるアポトーシス細胞の増加、さらには破壊を伴う過形成といった腸管 GVHD に特有の症状が認められた。これらの結果から GVHD 早期に2次リンパ組織で増殖、分化したエフェクタードナーCD8 T 細胞が、GVHD 後期に2次リンパ組織から腸管等の末梢組織へ再分布するという、きわめてダイナミックなドナーCD8 T 細胞の動態が明らかとなり、またドナーCD8 T細胞の腸管浸潤が腸管 GVHD の発症に深く関与していることが示唆された。

2) GVHD 誘導マウスにおける遊走関連分子の解析

GVHD 後期におけるエフェクタードナーCD8 T 細胞の浸潤腸管に関与する遊走関連分子の発現を、フローサイトメリーおよび定量 PCR により解析した。ドナーCD8 T 細胞は血行性に2次リンパ組織から腸管へ遊走する。GVHD 誘導後5日目までの末梢血を循環するドナーCD8 T 細胞は、80%以上が接着因子 CD62L を高発現するリンパ組織指向性細胞であり、腸管指向性ホーミングレセプター $\alpha 4\beta 7$ を発現する細胞はほとんど認められなかった。GVHD 誘導後5日目から9日目にかけて、末梢血における CD62L 高発現ドナーCD8 T細胞は減少し、同時に $\alpha 4\beta 7$ を発現する細胞が増加した。10日目に腸管へ浸潤したドナーCD8 T細胞は多くが CD62L 陰性、 $\alpha 4\beta 7$ 陽性であり、

またケモカインレセプターCXCR6 および CX₃CR1 の遺伝子発現が上昇していることが明らかとなった。定量 PCR, および免疫組織染色により, それぞれのリガンドである MAdCAM-1, CXCL16 および fractalkine の腸管組織における恒常的な発現を認め, さらにドナーCD8 T 細胞が MAdCAM-1 陽性血管内皮周辺から腸管浸潤を始めることが明らかとなった。これらの結果から $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM-1, CXCR6-CXCL16 および CX₃CR1-fractalkine の相互作用がエフェクタードナーCD8 T 細胞の腸管浸潤および腸管 GVHD の発症に重要な役割を果たしていると考え, 中和抗体を用いたブロッキング実験によりこれらの分子の関与を検討した。抗 MAdCAM-1 抗体または抗 fractalkine 抗体を GVHD 後期に投与する事により, ドナーCD8 T 細胞の腸管浸潤および腸管陰窩部上皮におけるアポトーシスが有意に抑制され, 一方で脾臓, リンパ節, 肝臓におけるドナーCD8 T 細胞数および肝傷害の指標とした血清 ALT レベルに有意な差を認めなかった事から, 抗 fractalkine 抗体および抗 MAdCAM-1 抗体が腸管 GVHD を選択的に軽減する事が明らかとなった。また, 抗 CXCL16 抗体投与群では GVHD の病態に有意な差を認めなかった。

3) 抗 MAdCAM-1 抗体および抗 fractalkine 抗体投与が GVT 効果に及ぼす影響
抗 MAdCAM-1 抗体および抗 fractalkine 抗体投与が肝浸潤ドナーCD8 T 細胞の anti-tumor/host CTL 活性に与える影響を検討した。GVHD 誘導 14 日目に肝臓へ浸潤したドナーCD8 T 細胞が宿主型腫瘍細胞 P815 (H-2^d) に対して CTL 活性を示し, さらに抗 MAdCAM-1 抗体および抗 fractalkine 抗体投与群がコントロール抗体投与群と同等の CTL 活性を示したことから, 抗 MAdCAM-1 抗体および抗 fractalkine 抗体投与によりドナーCD8 T 細胞に由来する anti-tumor/host CTL 活性の誘導が阻害されないことが明らかとなった。P815 は経静脈投与により肝臓に腫瘍を形成する。P815 を GVHD 誘導 2 日前に経静脈的に移入する GVT モデルにおいて, コントロール抗体投与群では GVHD 誘導後 10 日目の肝臓腫瘍局所に大量のドナーCD8 T 細胞の浸潤, および腫瘍局所におけるアポトーシスの誘導が認められた。抗 MAdCAM-1 抗体および抗 fractalkine 抗体投与群においてもコントロール抗体投与群と同等のドナーCD8 T 細胞の浸潤を腫瘍局所に認めたことから, 抗 MAdCAM-1 抗体および抗 fractalkine 抗体投与がドナーCD8 T 細胞の腫瘍局所への浸潤を阻害しないことが明らかとなった。最後に抗 MAdCAM-1 抗体および抗 fractalkine 抗体投与が GVT 効果による生存延長に与える影響を検討した。同系コントロールとした BDF1 マウス脾臓細胞移入群がドナー細胞移入後 14-17 日 (median survival = 15.2) で P815 の肝浸潤に

より死亡したのに対し、B6 脾臓細胞移入-コントロール抗体投与群では 25-46 日 (median survival = 37.1)と GVT 効果による有意な生存延長($p < .001$)が認められた。GVT 効果による生存延長は抗 MAdCAM-1 抗体投与群 (median survival = 34.0) および抗 fractalkine 抗体投与群 (median survival = 34.8) においても保存されていたことから、抗 MAdCAM-1 抗体および抗 fractalkine 抗体投与は GVT 効果に影響を与えないことが明らかとなった。

考察

同種造血幹細胞移植では組織適合抗原を標的とする大量のドナー由来 anti-tumor/host エフェクターCD8 T 細胞が誘導されるため、他の癌免疫療法に比較し非常に高い抗腫瘍効果が得られる。一方で免疫療法に共通する問題点であるエフェクターCD8 T 細胞による正常臓器の傷害が GVHD という形で最も重篤に現れるため、免疫抑制剤により正常臓器傷害と共に抗腫瘍効果を抑制しているのが現状である。本研究を通じて私は GVHD におけるドナーCD8 T 細胞の生体内動態を解析し、 $\alpha 4\beta 7$ -MAdCAM-1 および CX_3CR1 -fractalkine の相互作用がエフェクタードナーCD8 T 細胞の腸管浸潤に重要な役割を果たすこと、またこれを阻害することによりドナー由来 anti-tumor/host エフェクターCD8 T 細胞の活性を損なうことなく選択的に腸管 GVHD を軽減できることを明らかにした。今後 MAdCAM-1 および fractalkine を標的とした分子標的療法が確立し、同種造血幹細胞移植がより安全且つ効果的な癌免疫療法として発展することを期待したい。