

論文の内容の要旨

論文題目 制御性樹状細胞による CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞の誘導を介した皮膚慢性移植片対宿主病に対する防御効果

指導教官 山下 直秀 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学
医学博士課程
内科学専攻

藤田 成晴

[序論]

同種異系骨髄移植(allogeneic bone marrow transplantation; alloBMT)は白血病や遺伝性疾患の有効な治療法であるが、合併症として移植片対宿主病(graft-versus-host disease; GVHD)が問題となっている。GVHD は急性GVHD(acute GVHD; aGVHD)と移植後 100 日以降に発症する慢性 GVHD(chronic GVHD; cGVHD)に分けられる。GVHD はドナー骨髄移植片中の同種異系反応性 T 細胞の活性化がその主たる原因となり、aGVHD ではドナー由来 CD8⁺T 細胞とレシピエント残存抗原提示細胞(antigen-presenting cells; APCs)が、cGVHD ではドナー由来 CD4⁺T 細胞とドナー由来 APCs 及びレシピエント残存 APCs が発症に関与していることが報告されている。また、cGVHD では aGVHD と比較して有効な治療の開発が遅れているのが現状である。

樹状突起を有する白血球である樹状細胞(dendritic cells; DCs)は、分化系列と成熟段階の異なる多様なサブセットから構成され、生体においてリンパ組織や末梢組織に広く存在している。未熟樹状細胞(immature DCs; iDCs)は侵襲してきた病原体をパターン認識受容体(pattern-recognition receptors; PRRs)

を介して細胞内に取り込み抗原処理を行う。さらに、病原体侵襲により惹起された炎症環境下で主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex; MHC) 分子と共刺激分子・共刺激分子リガンドの発現増加を伴って成熟樹状細胞 (mature DCs; mDCs) となり、二次リンパ組織に移行して抗原をナイーブ T 細胞に提示し、エフェクター T 細胞を分化誘導する。このように、DCs は最も強力な APCs として自然免疫系と獲得免疫系を繋ぐ重要な役割を担っている。

免疫寛容は免疫学的恒常性の維持に必須であり、中枢性免疫寛容 (central tolerance) と末梢性免疫寛容 (peripheral tolerance) に分けられる。中枢性免疫寛容には胸腺での負の選択による自己反応性 T 細胞のクローン除去 (clonal deletion) が関与する。一方、末梢性免疫寛容にはクローン除去と不活性化 (アナジー ; anergy) とともに、胸腺由来 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 内在性制御性 T (naturally occurring regulatory T; nT_R) 細胞や環境条件によって $CD4^+$ ナイーブ T 細胞から誘導されるインターロイキン-10 (interleukin-10; IL-10) 産生 1 型制御性 T (T regulatory type 1; $Tr1$) 細胞等を介した能動的抑制が関わっている。これまでに、*in vivo* の定常状態 (非炎症環境下) において iDCs が末梢性免疫寛容の誘導に関与することが示唆されている。さらに、様々な免疫抑制分子で処理した iDC は免疫寛容誘導性樹状細胞 (tolerogenic DCs) として、アナジー T 細胞や IL-10 産生 $Tr1$ 細胞の誘導、 $CD4^+CD25^+Foxp3^+nT_R$ 細胞の増幅を行うことが報告されている。一方、佐藤らはヒトとマウスにおいて従来の tolerogenic DCs よりも強力な T 細胞制御能 (アナジー T 細胞・ $Tr1$ 細胞・ $CD4^+CD25^+T_R$ 細胞誘導能等) を示す制御性樹状細胞 (regulatory DCs; DC_{regs}) を報告している。

[目的]

本研究では、alloBMT 後の治療困難な合併症として問題となっている cGVHD に対して、ヒト cGVHD と類似の臨床症状を呈するマウス MHC 一致・マイナー組織適合抗原 (minor histocompatibility antigen; miHAg) 不一致 allo BMT での cGVHD モデルを用いて DC_{regs} による新規免疫細胞療法についての検討を行った。

[方法]

全身放射線照射 (total body irradiation; TBI) を行った BALB/c マウスに対して、MHC 一致 ($H-2^d$)・miHAg 不一致の B10. D2 マウスより得られた T 細胞除去骨髄細胞と $CD4^+CD25^-T$ 細胞を用いて alloBMT を行った (未処置群)。実験群では移

植後に免疫抑制剤であるラパマイシン (rapamycin; RAPA) あるいはレシピエントタイプ mDCs または DC_{regs} を投与した。移植後、皮膚 cGVHD として脱毛病変面積に基づくモニタリングを行い、発症率及び重症度を計測した (図 1A-D)。次に、DC_{regs} の cGVHD 制御効果の作用機序を明らかにするために、移植レシピエントマウスよりドナー由来 CD4⁺T 細胞を分離して免疫学的解析を行った。また、移植レシピエントマウスにおけるドナー由来 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の誘導についてフローサイトメトリー法にて検討した。さらに、DC_{regs} の cGVHD 制御効果における CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の関与を明らかにするために、抗 CD25 抗体を用いた in vivo 阻害実験を行った。最後に、レシピエントタイプ DC_{regs} によるドナー由来同種異系反応性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞誘導機構の解明を目的として、卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) 特異的 T 細胞受容体 (KJ1-26 clonotype) を有し、かつ CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺nT_R 細胞を欠損する *Rag2*^{-/-} DO11.10 BALB/c トランスジェニックマウスの T 細胞を用いて移入実験を行った。

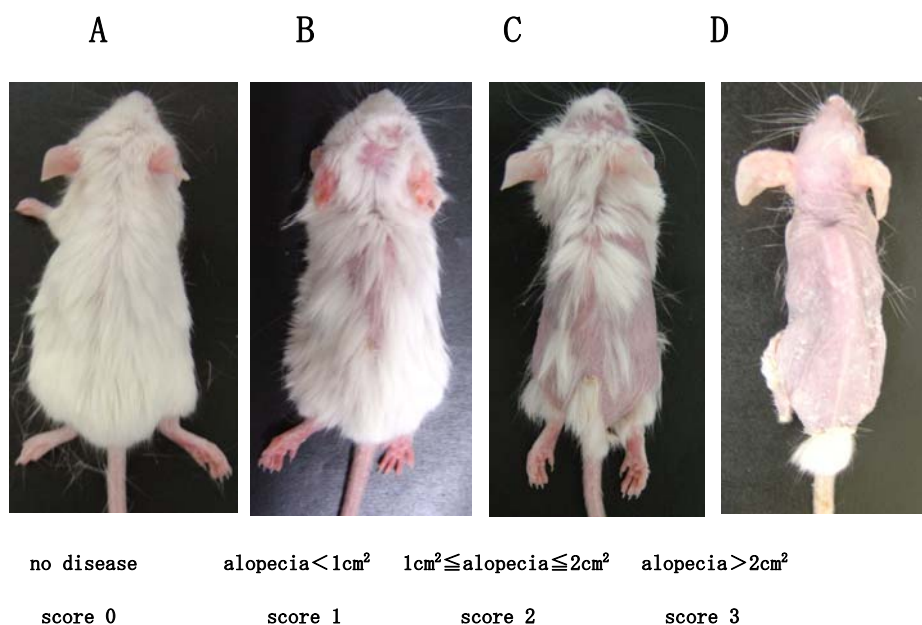


図 1 マウス皮膚 cGVHD の症状とスコアリング

[結果]

未処置群ではほぼ全てのレシピエントマウスで移植後 45 日目までに皮膚 cGVHD の発症が認められたが、レシピエントタイプ mDCs 投与群では皮膚 cGVHD の増悪が認められた。一方、RAPA 投与群では皮膚 cGVHD に対して殆ど防御効果が認められなかったが、レシピエントタイプ DC_{regs} 投与群では皮膚 cGVHD の発症

率及び重症度に対する著しい防御効果が認められ、移植後 120 日を超える長期間においても症状が殆ど観察されなかった(図 2A, B)。

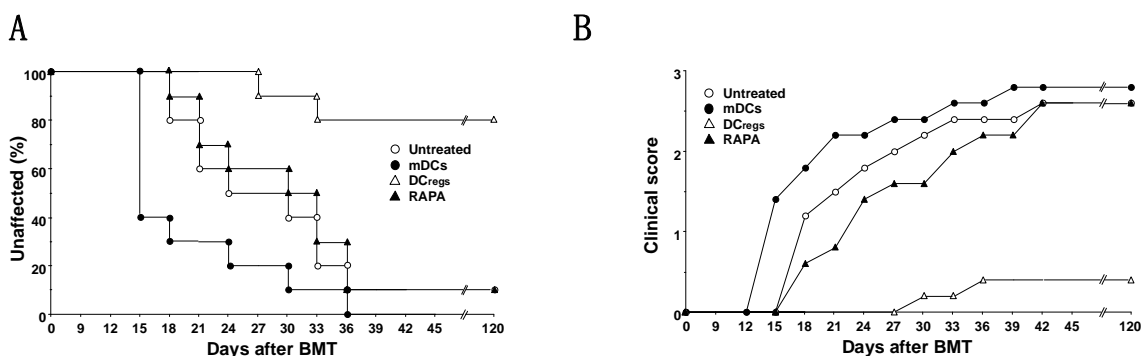


図 2 DC_{regs} のマウス皮膚 cGVHD の発症率及び重症度に対する防御効果

未処置群より得られたドナー由来 CD4⁺T 細胞と比較すると、レシピエントタイプ mDCs 投与群より得られたドナー由来 CD4⁺T 細胞は同種異系抗原刺激に対して高反応性を示したが、レシピエントタイプ DC_{regs} 投与群より得られたドナー由来 CD4⁺T 細胞は著しい低反応性を示した(図は論文中に掲載)。未処置群及びレシピエントタイプ mDCs 投与群より得られたドナー由来 CD4⁺T 細胞では CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻エフェクターT 細胞数の増加が認められたのに対して、レシピエントタイプ DC_{regs} 投与群より得られたドナー由来 CD4⁺T 細胞では CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞数の顕著な増加が認められた(図 3A, B)。

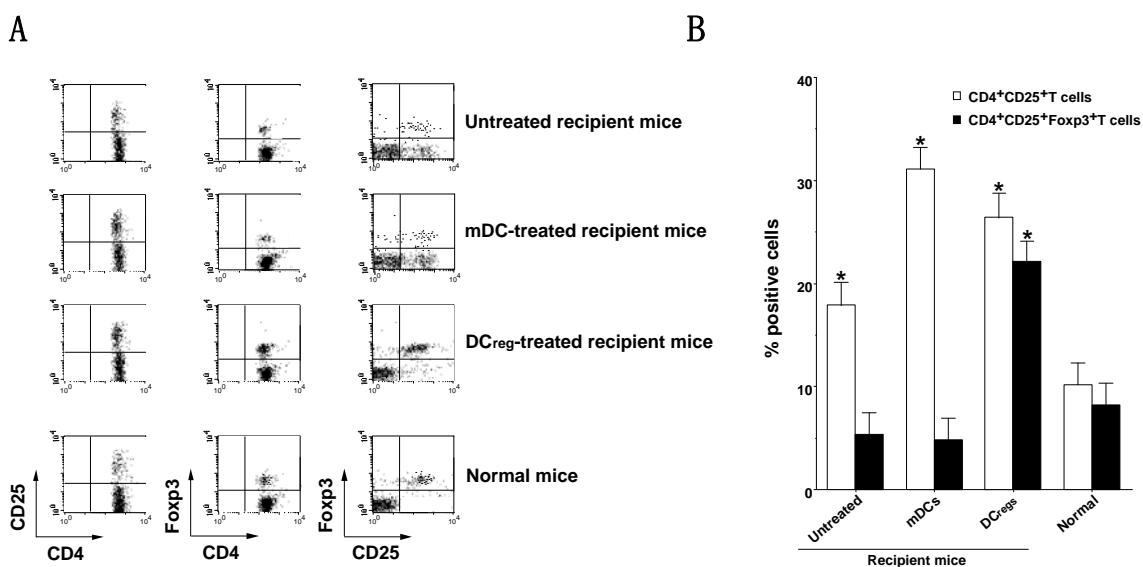


図 3 移植レシピエントマウスにおける DC_{regs} によるドナー由来 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の誘導

また、レシピエントタイプ DC_{regs} 投与群への抗 CD25 抗体投与による CD4⁺CD25⁺T 細胞の除去では、レシピエントタイプ DC_{regs} の皮膚 cGVHD に対する防御効果が著しく阻害された(図 4A, B)。

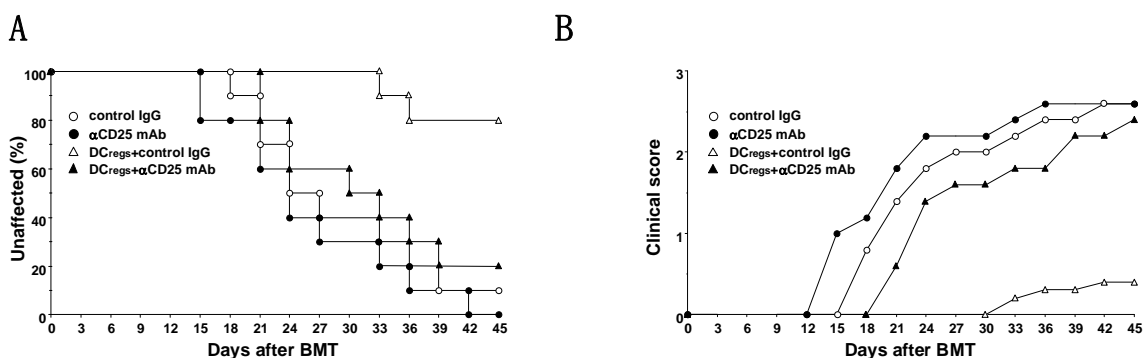


図 4 DC_{regs} のマウス皮膚 cGVHD の防御効果に対する抗 CD25 抗体を用いた in vivo 阻害実験

さらに、*Rag2*^{-/-}D011.10 BALB/c トランスジェニックマウスの T 細胞を用いた移入実験の結果、BALB/c マウスへの *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺CD25⁻Foxp3⁻T 細胞と OVA ペプチドパルス DC_{regs} の共移入では *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞が著しく誘導された。また、誘導された *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞は抗原刺激に対してアナジーを示すとともに *Rag2*^{-/-}KJ1-26⁺CD25⁻Foxp3⁻T 細胞の抗原特異的活性化に対して制御能を示した(図は論文中に掲載)。

[考察]

レシピエントタイプ DC_{regs} の投与ではマウス alloBMT 後の皮膚 cGVHD に対して著しい防御効果が認められた。レシピエントタイプ DC_{regs} は同種異系反応性 CD4⁺T 細胞に対し抗原特異的アナジーを誘導することが考えられた。また、レシピエントタイプ DC_{regs} によってレシピエントマウスにおいてドナー由来同種異系反応性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞が誘導され、DC_{regs} の皮膚 cGVHD に対する防御効果に関与していることが考えられた。また移入実験より、DC_{regs} は CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻T 細胞から CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞を抗原特異的に末梢誘導することが考えられた。

[結語]

本研究ではレシピエントタイプ DC_{regs} はマウス MHC 一致・miHAg 不一致 alloBMT による皮膚 cGVHD に対して防御効果を示し、その作用機序にはドナー由来同種

異系反応性 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T_R 細胞の抗原特異的な末梢誘導が関与することが明らかとなった。