

## 論文の内容の要旨

論文題目 マウス同種造血幹細胞移植に伴う  
リンパ節障害に関する研究

氏名 末永 文子

同種造血幹細胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, allo-HSCT) は、患者 (レシピエント) の異常な造血器系を除去した後、提供者 (ドナー) の正常な造血幹細胞を移植することで、正常な造血器系を再構築する治療法である。対象疾患は造血器悪性疾患、骨髄不全、免疫代謝疾患などであり、これらの疾患に対する標準的治療法として急速に普及してきている。さらに、移植前処置の改善、HLA の適合と免疫抑制による移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 予防・治療、さらにドナーの拡大により、allo-HSCT は造血器系疾患に対する比較的安かつ強力な治療法としてだけでなく、形質細胞性腫瘍や固形腫瘍、膠原病などの造血系疾患以外の疾患への治療法としても実施件数が増加傾向にある。

しかし、allo-HSCT 後の 5 年生存率は未だ 50%程度であり、死亡例に占める再発を除く治療関連死は 60%にのぼる。なかでも治療関連死の約 30%を占める感染症に対しては、免疫グロブリン製剤や抗生剤の投与などの治療が施されるものの、複数の合併症の末に感染が生じる事例が多く、死亡例の上位を占める。したがって、allo-HSCT の更なる安全性向上ならびに適応拡大には、致死感染の克服が大きな課題となる。

allo-HSCT 後の患者は、放射線照射および大量化学療法などの移植前処置により移植前の獲得免疫を喪失しており、さらに免疫抑制剤や GVHD の影響により免疫不全状態にある。加えて、allo-HSCT 後に急性および慢性 GVHD を発症した患者では、T 細胞・B 細胞再構築が遅延することが知られている。そのため移植後の患者は易感染性であり、いかにして免疫再構築を促進し、ワク

チンの再接種による獲得免疫成立を早期に達成するかが重要となる。

所属研究室における最近の MHC クラス I/II 不一致マウス GVHD モデル (B6→BDF<sub>1</sub>) の解析により、ドナー CD4<sup>+</sup> T 細胞が骨髄造血ニッチを障害することで B 細胞分化が重度に抑制される「骨髄 GVHD」が、T 細胞・B 細胞の再構築遅延の一因であることが明らかになった。しかし、GVHD を経験した患者では、末梢における T 細胞・B 細胞数が回復した後も、易感染性やワクチンへの不応性の原因となる液性免疫不全が遷延するという報告もあり、この場合、骨髄および胸腺といった一次リンパ組織の障害による血球産生数の低下では移植後の免疫不全は説明することができない。このような血球数と獲得免疫の回復における乖離については骨髄 GVHD モデルにおいても認められており、移植後早期の抗 CD4 抗体投与により骨髄 GVHD の原因となるドナー CD4<sup>+</sup> T 細胞を除去し、レシピエントマウス体内に残留するドナー T 細胞を CD8<sup>+</sup> T 細胞のみにした場合、T 細胞・B 細胞の再構築とともに IgM 抗体の産生が回復する一方、糞便中 IgA および血清 IgG の回復が遅延する。これらクラススイッチを必要とする免疫グロブリンサブタイプの回復遅延の原因として申請者は、クラススイッチを伴う強力な獲得免疫応答誘導の場であるリンパ節が CD8<sup>+</sup> T 細胞により障害されるという可能性を考えた。

この仮説を検証するために、主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex, MHC) またはマイナー組織適合抗原 (mHA) 不一致のドナーおよびレシピエントの組み合わせで種々の allo-HSCT モデルを用いて、コントロール群 (BMT 群) および GVHD 誘導群 (GVHD 群) におけるリンパ節障害の有無を検討した。移入する T 細胞を CD4<sup>+</sup> T 細胞のみ、あるいは CD8<sup>+</sup> T 細胞のみとしてリンパ節の障害を評価したところ、CD8<sup>+</sup> T 細胞単独でリンパ節障害を発症しうること、またメジャーミスマッチの場合は CD4<sup>+</sup> T 細胞によっても軽度のリンパ節障害を発症するケースがあることが明らかになった。重度のリンパ節障害を呈した CD8<sup>+</sup> T 細胞依存的 GVHD 発症マウスでは、GVHD スコアはほとんど上昇しなかったものの、移植後 40 日目の解析では、リンパ節の著明な萎縮が肉眼

的に観察でき、移植後 200 日以降もこの状態が持続することを確認した。さらに H&E 染色において、リンパ節の委縮、細胞数低減、実質領域減少を認めた (図 1)。この時、骨髄 B 細胞・胸腺細胞の数はいずれも BMT 群と GVHD 群は同等もしくは軽度の減少であったのに対し、GVHD 群のリンパ節総細胞数は BMT 群の 1 / 50~1 / 100 ほどと極めて少なくなっていた。これらの結果から、CD8<sup>+</sup> T 細胞依存的な GVHD を発症したマウスでは、不可逆的なリンパ節障害が起きることが明らかとなった。

移植後 40 日目のリンパ節を蛍光免疫組織染色によりさらに解析したところ、BMT 群では明瞭な T 細胞・B 細胞領域、髄質領域を認めるなど正常なリンパ節構築を呈しており、血流からのリンパ



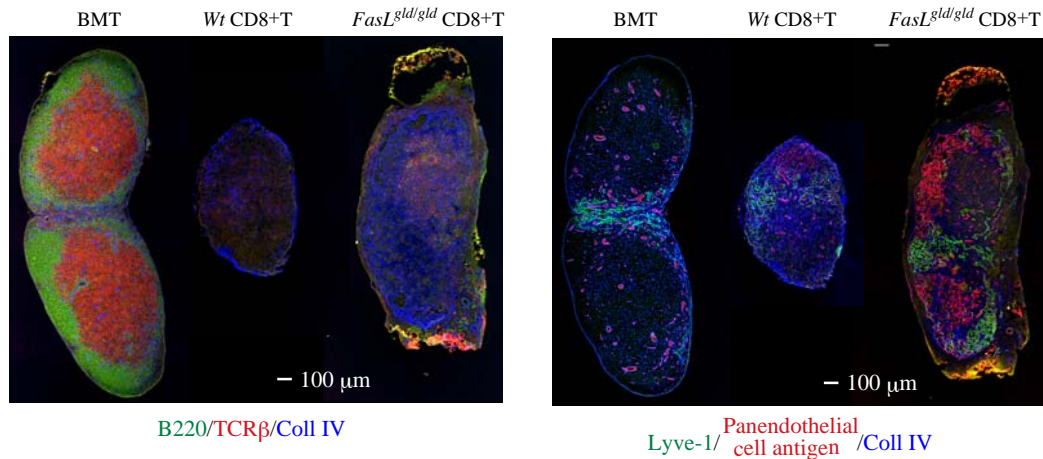
球の入り口である高内皮細静脈 (High endothelial venule, HEV)、HEV および T 細胞領域ストローマ細胞が産生するケモカイン CCL21 の発現の回復も認めた。しかしながら、GVHD 群では細胞密度が疎であり、正常なリンパ節構築、HEV は認めず、CCL21 の発現も不均一かつ低レベルであった。

さらに電子顕微鏡により HEV を解析したところ、GVHD 群では正常な HEV を認めず、組織内には細胞の残骸と思われる細胞内小器官などを多数認め、全領域にわたって細胞密度は疎であった。以上の結果から CD8<sup>+</sup> T 細胞依存的な GVHD を発症したレシピエントでは、獲得免疫の誘導に必要なリンパ節の機能的構造、すなわち T 細胞への抗原提示の場である T 細胞・B 細胞領域への抗原提示ならびに増殖・分化の場である濾胞領域、T-B 間相互作用の場である T-B 境界領域が失われること、またリンパ節への血行性細胞流入に必須である HEV が重度の障害を受けることが明らかになった。

病理学的解析により示されたリンパ節の機能的構造障害が、実際にリンパ節機能にどれほどの障

害を与えているかを、移植後 40 日目の BMT 群および GVHD 群における T 細胞依存的なモデル抗原 NP-OVA の皮下免疫またはコレラ毒素の経口免疫に対する抗体産生応答の評価、ならびにサルモネラ経口感染モデルにおける生存率を指標に解析したところ、GVHD 群において抗体産生応答および感染防御が著しく減弱化していた。これらの結果から、CD8<sup>+</sup> T 細胞依存的な GVHD を発症したマウスのリンパ節は、機能的にも十分な IgA/IgG 抗体応答および所属リンパ節におけるフィルタリング機能に依存する感染防御を担保出来ないことが明らかとなった。

最後に、発症機序に基づく予防法について検討を行った。GVHD によるリンパ節障害は CD8<sup>+</sup> T 細胞依存的に起こると考えられたため、移植後 2 日目からの抗 CD8 抗体投与による CD8<sup>+</sup> T 細胞の除去を試みたが、予防効果は見られなかった。そこで、GVHD による組織障害に重要な役割を果たすことが報告されている、移植前処置として行う X 線照射や Fas ligand (FasL) -Fas 細胞傷害経路の関与を検証するため、X 線非照射 GVHD モデルおよび FasL 変異 (*FasL<sup>gld</sup>*) マウス由来 CD8<sup>+</sup> T 細胞を用いた GVHD モデルにおけるリンパ節障害の有無を解析したところ、X 線非照射 GVHD モデルではリンパ節障害を認める一方、*FasL<sup>gld</sup>* CD8<sup>+</sup> T 細胞を移入した群ではリンパ球数低下の軽減と T 細胞領域における T 細胞の集積を認めた (図 2)。以上の結果より、CD8<sup>+</sup> T 細胞依存的な GVHD における不可逆的なリンパ節障害は、X 線照射非依存的であり、ドナー CD8<sup>+</sup> T 細胞による FasL-Fas 細胞傷害経路が関与していることが明らかとなった。さらに、移植後の抗体投与による CD8<sup>+</sup> T 細胞の除去ではリンパ節障害の予防・治療は困難であるが、ドナー CD8<sup>+</sup> T 細胞上の FasL を阻害することで、リンパ節障害を軽減できる可能性が示唆された。



**図 2 *FasL<sup>gld</sup>CD8<sup>+</sup>* T 細胞依存的 GVHD を発症したマウスにおけるリンパ節障害** B6 *FasL<sup>gld</sup>CD8<sup>+</sup>* →BDF<sub>1</sub> GVHD モデルマウスの移植後 40 日目の鼠径リンパ節を(左)B220/TCRβ/IV 型コラーゲン、(右)Lyve-1 (緑; リンパ管内皮細胞) / Panendothelial cell antibody (赤; 内皮細胞) / IV 型コラーゲンに対する抗体で蛍光免疫染色した。*FasL<sup>gld</sup>CD8<sup>+</sup>* T 細胞移入群は *Wt CD8<sup>+</sup>* T 細胞移入群よりも萎縮、T 細胞領域喪失、リンパ管障害が軽度で、部分的な T 細胞の集積および T-B 境界の回復が認められた。髄質領域が右側になるよう各図を示す。

本研究結果から、ドナーCD8<sup>+</sup> T 細胞によって引き起こされる GVHD によって、リンパ節が不可逆的な機能障害を被ることが明らかとなった。このようなリンパ節障害が誘導されたマウス個体では、液性免疫応答の誘導ならびに感染防御に重度の不全を認めたことから、GVHD によるリンパ節障害が、allo-HSCT 患者においてリンパ球回復後も年単位で持続するワクチン不応答性、易感染性を説明する重要な機序となっていることが強く示唆される。また、マウス allo-HSCT モデルでは、GVHD スコアが軽度の症例においても線維化を伴う重度のリンパ節障害が認められたことから、明確な GVHD 症状を認めない患者においてもリンパ節障害が発症している可能性がある。これらを踏まえて、今後、allo-HSCT 患者に対して抗腫瘍効果を残した状態での FasL 阻害による、あるいは、より効果的な予防標的の探索により、重度なリンパ節障害の予防と、X 線体軸断層撮影装置などの画像診断を駆使してリンパ節萎縮を非侵襲的かつ早期に評価することで、患者のリンパ節障害に合わせたより有効なワクチン接種および感染リスクへの対処が実現されることを期待している。