

学 位 論 文 題 名

An irradiation-free nonmyeloablative bone marrow
transplantation model: Importance of the balance between
donor T-cell number and the intensity of conditioning

(ミニ移植モデルの確立：ドナー T細胞数と
コンディショニングのバランスの重要性)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

従来の骨髄移植が様々な血液疾患において有効であることは広く知られてはいるが、それにはレジメン毒性、感染、そして移植片対宿主病 (GVHD) といった問題がある。最近それにとって代わるものとして骨髄非破壊的幹細胞 (骨髄) 移植 (ミニ移植) が行われるようになり、従来の骨髄移植の問題点が改善され、適応患者および適応疾患の拡大についても報告されつつある。これまでのミニ移植モデルでは、MHC バリアー (HVGR) を乗り越えてドナー細胞生着を得るために免疫抑制剤に加えて放射線照射や T 細胞に対する抗体が用いられてきた。その HVGR 抑制に対して Fludarabine (Flu) と Cyclophosphamide (CPA) の組み合わせによる投与が有効であるとの報告もこれまでになされている。

前臨床および臨床データでは、移植骨髄細胞中から T 細胞除去 (TDBMC) する事は GVHD 発症予防に効果的であるが、移植片拒絶、白血病再発、免疫再構築の遅延の頻度が増加する事が示されている。以上の事から筆者らはドナー細胞生着を促進するのに必要なドナー T 細胞数は conditioning (Flu と CPA の投与量) に依存すると仮定した。そしてこの両者のバランスが生着において重要な要因と考え、検討を加えた。

【実験方法】

ドナーとして C57BL/6N (B6; H-2^b)、レシピアントとして DBA/2N (DBA/2; H-2^d) マウスを用いた。フローサイトメトリーを目的に FITC 標識抗 CD3, CD4, CD8, B220, Mac-1, Gr-1 および H-2K^d 抗体, PE 標識抗 H-2K^b 抗体を、また T 細胞除去のための抗 CD4, CD8, Thy1.2 抗体を用いた。Conditioning には Flu, CPA, Cyclosporine (CyA) を用いた。前処置として移植 8 日前 (Day-8) より Flu の投与 (100, 150, 200mg/kg) を開始し、3 日前 (Day-3) まで連日腹腔内投与した。また、6 日前・5 日前 (Day-6 および Day-5) に CPA の投与 (75, 100, 150mg/kg) を行った。Day0 にドナー由来の 2×10^7 個の骨髄細胞あるいは T 細胞除去骨髄細胞と 5×10^7 個の脾細胞あるいは enrich した T 細胞を 2×10^5 から 4×10^7 個の範囲でレシピアントに尾静注することにより移植を行った。全てのレシピアントに対して Day-2 から Day18 の間、2 日ごとに CyA の腹腔内投与 (10mg/kg/day) を行った。キメリ

ズム解析は脾細胞ならびに骨髓細胞を調整して抗H-2K^b およびH-2K^d 抗体で二重染色した後にフローサイトメトリーによって行った。

【結果】

- ① 適切な投与量でのFlu, CPAによる骨髓非破壊的前処置 (Flu=150 (mg/kg/day×6days), CPA=150 (mg/kg/day×2days)) を行うと過度の薬物毒性なく (移植前死亡率: 0/12), 全てのマウスでドナー細胞生着が見られ (9/9), 骨髓球系, リンパ球系ともに完全ドナーキメラズムを達成していたことからこの投与量が最も適切であると考えられた。また, 筆者らの用いた骨髓非破壊的レジメンにおいては, Flu と CPA がともに必須である事が分かった。
- ② ドナー細胞生着においては, 骨髓細胞ではなく, ドナーT細胞が重要な役割を果たした。
- ③ この研究における骨髓非破壊的条件下においては, ドナーT細胞数と前処置薬投与量との間に微妙なバランスが存在し, ドナー細胞生着促進のためにそれらが互いに相補的な役割を演じていることが分かった。

【考案】

本研究は, 免疫抑制剤のみを用いた前処置でMHC完全不一致のドナーレシピアントコンビネーションにおけるミニ移植 (骨髓非破壊的骨髓移植) を安定して成し得たモデルの初めての報告である。Flu と CPA のみを前処置薬として用いた過去のミニ移植モデルの報告では, 混合キメラズムを伴った高いドナー細胞生着率 (70-90%) を示しているが, 完全ドナーキメラズム, 100%のドナー細胞生着率ではなかった。また, 過去のTDBMCの移植による移植片拒絶増加の報告に基づき, 申請者らはFluを用いた前処置強度とドナーT細胞の役割について特に焦点を当てた。

骨髓非破壊的レジメンにおいて, Fluはいわゆるkey drugと考えられる。CPAのような他の免疫抑制剤とは違い, 分裂期およびG0-G1期にあるリンパ球, 特にT細胞に作用してそのアポトーシスを誘導すると言われている。したがって, Fluはより免疫抑制的に働き, レシピアント由来T細胞によるHVGRを抑制するのに非常に有効と思われる。申請者らはCPAとの組み合わせで様々な投与量での前処置を試み, Fluのわずかな投与量の変化 (100-200mg/kg/day) がドナー細胞生着率に大きな変化を及ぼすことを示した。筆者らの結果は, 放射線や抗体を用いない同種ミニ移植下で安定したドナー細胞生着を得るためには, Flu, CPAはともに適切量でありながら十分量用いる必要があることを示している。

申請者らはまた, 骨髓細胞とともに脾細胞あるいはenrichしたT細胞を移植することにより, ドナーT細胞が骨髓非破壊的同種骨髓移植後の重要なドナー細胞生着規定因子であることを示すと同時にこれまでの実験を通じてドナーT細胞数と前処置薬投与量のバランスが重要であるということをミニ移植モデルによって初めて定量的に示した。いくつかのグループから, 放射線や抗体を使用せずにFluを用いた骨髓非破壊的レジメンがF1からそのparentへの移植系において報告されているが, それらの系ではHVG反応のみしか観察されないのに対し, 今回のモデルはGVH, HVG反応共に観察され, かつドナーT細胞と前処置強度の微妙なバランスの上に完全ドナーキメラズムが成り立って

いるため、ドナーキメリズムに影響を与える因子（例えばドナーT細胞，同種反応性NK細胞，制御性T細胞あるいはNKT細胞などのGVH，HVG反応に影響する因子）の解析モデルとして有用であると思われる。

【結論】

この骨髄非破壊的骨髄移植モデルの確立を通じて，MHC 完全不→致のバリアーを乗り越えるためには必ずしも放射線照射や抗体投与が必要ではないことが示された。同時に，今回のモデルはドナー細胞生着および完全ドナーキメリズムが微妙なバランスの上に成り立っているため，HVG/GVH反応に関わる様々な因子の解析に非常に有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

An irradiation-free nonmyeloablative bone marrow transplantation model: Importance of the balance between donor T-cell number and the intensity of conditioning

(ミニ移植モデルの確立：ドナー T 細胞数と
コンディショニングのバランスの重要性)

レジメン毒性、感染といった問題を抱える従来の骨髄破壊的前処置による造血幹細胞移植に取って代わり、最近骨髄非破壊的前処置による造血幹細胞移植（ミニ移植）が広く行われるようになりつつある。これまでのミニ移植モデルでは、MHC バリヤーを乗り越えてドナー細胞生着を得るために免疫抑制剤に加えて抗癌剤、放射線照射や T 細胞に対する抗体が用いられてきた。過去の報告では、移植骨髄細胞中から T 細胞除去（TDBMC）する事は GVHD 発症予防に効果的であるが、移植片拒絶、白血病再発、免疫再構築の遅延の頻度が増加することが示されている。以上のことから、申請者はドナー細胞生着を促進するのに必要なドナー T 細胞数は前処置の強度に依存すると仮定し、この両者のバランスが生着において重要な要因と考え、検討を加えた。

本研究は、Fludarabine (Flu) と Cyclophosphamide (CPA) のみを用いた前処置で MHC 完全不一致のドナー/レシピアントコンビネーションにおけるミニ移植を安定して成し得たモデルの初めての報告である。骨髄非破壊的レジメンにおいて重要と考えられる Flu は、レシピアント由来 T 細胞による Host-versus-graft (HVG) 反応を抑制するのに非常に有効と思われる。申請者は CPA との組み合わせで様々な投与量での前処置を試み、Flu の僅かな投与量の変化がドナー細胞生着率に大きな変化を及ぼすことを示した。すなわち、放射線や抗体を用いない同種ミニ移植下で安定したドナー細胞生着を得るためには、Flu と CPA はともに適切かつ十分量用いる必要があることを示した。

さらに、骨髄細胞とともに脾細胞あるいは T 細胞を移植することにより、ドナー T 細胞がミニ移植後の重要なドナー細胞生着規定因子であることを示し、ドナー T 細胞数と前処置薬投与量のバランスが重要であるということを初めて定量的に示した。いくつかのグループから、放射線や抗体を使用せずに Flu を用いた骨髄非破壊的レジメンが F1 からその

parent への移植系において報告されているが、それらの系では HVG 反応のみしか観察されないのに対し、今回のモデルは GVH、HVG 反応共に観察され、かつドナー T 細胞と前処置強度の微妙なバランスの上に完全ドナーキメラが成り立っているため、ドナーキメラに影響を与える因子（例えばドナー T 細胞、同種反応性 NK 細胞、制御性 T 細胞あるいは NKT 細胞など）の解析モデルとして有用であると思われる。

口頭発表に際し、副査の小野江和則教授よりドナー/レシピエントのコンビネーションの決定法、ドナー T 細胞の活性化マーカーの変化、GOT・GPT 上昇と GVHD の重症度判定の妥当性についての質問があった。これに対して、申請者は様々なドナー/レシピエントの組み合わせで網羅的に移植を行い見出したこと、ドナー T 細胞の活性化マーカーについては未検討であること、GOT・GPT の上昇度も含め検討した結果、GVHD の発症に関しては期待されたような改善が認められなかったと回答した。次いで、副査の浅香正博教授より、今回の前処置薬に用いた Flu と通常の骨髄移植でよく用いられている Busulfan との差異、固形癌に対する移植応用の可能性について質問があった。これに対して、申請者は文献を引用し、Flu は分裂期および G₀-G₁ 期にあるリンパ球、特に T 細胞に作用してそのアポトーシスを誘導し、したがってより免疫抑制的に働くこと、固形腫瘍への応用に当たっては NKT 細胞の輸注の併用が有効である可能性を推察として回答した。最後に、主査の今村雅寛教授より、Flu の投与量がヒトと比較してかなりの高用量である理由、前処置に放射線を用いないモデルを作成した理由、GVHD を抑制しつつ GVT/GVL 効果を引き出すことができる細胞の存在の可能性についての質問がなされた。これに対して、申請者はマウスの Flu の代謝能力がヒトの 10~20 倍であるとの報告があること、放射線照射による *in vivo* でのサイトカインストームの影響を除外し、より簡便なモデル作成を目的としたこと、文献と自らの実験結果から抗腫瘍効果と GVHD 抑制効果の両面が期待される NKT 細胞が有望であろうとの回答をした。

本研究は、免疫抑制剤のみで安定したドナー細胞生着と完全ドナーキメラを達成した初めてのモデルであり、ドナー T 細胞数と前処置の強度のバランスの重要性を定量的に示したことで高く評価された。この研究を基により安全で確実な移植療法の開発、新たな移植免疫療法への応用が期待された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。