

学位論文題名

Bone marrow graft-versus-host disease :
early destruction of
hematopoietic niche following MHC-mismatched
hematopoietic stem cell transplantation

(造血幹細胞ニッチをターゲットとする移植片対宿主病“骨髄GVHD”の
概念提唱とその機序に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】同種造血幹細胞移植(allo-HSCT)は、移植片対腫瘍(graft-versus-tumor: GVT)効果にもとづく強力な抗腫瘍作用により、他の治療法が奏功しない悪性・良性疾患の治療に大きな成果をあげてきた。この強力な GVT 効果には、移植片に含まれるドナーT細胞が宿主の病的な細胞に発現する組織適合抗原を異物と認識して排除応答を起こす、同種免疫反応が重要な役割を担う。しかし一方で、表裏一体をなして現れる移植片対宿主病(graft-versus-host disease: GVHD)や移植後の免疫不全に伴う感染症等の致死的合併症が足枷となり、各種難治性疾患に対する allo-HSCT の適応は制限されている。本研究では、マウス GVHD モデルの解析から、“骨髄 GVHD (骨髄造血幹細胞ニッチの障害による造血細胞の再構築抑制)”が allo-HSCT に伴う免疫不全および出血の原因となっていること、また抗 CD4 抗体治療により骨髄 GVHD を著しく軽減できることを報告し、移植予後の改善につながる有用な治療の可能性を模索する。

【材料と方法】ドナーに C57BL/6 (B6; K^bD^bI-A^bI-E^b, CD45.2⁺)マウス、レシピエントに(C57BL/6 × DBA/2) F₁ (BDF₁; H-2^{b×d}, CD45.2⁺)マウス(いずれも♀6週齢)を用い、GVHD誘導群には脾臓由来の 5 × 10⁶ T細胞及びT細胞除去した 5 × 10⁶ の骨髄細胞を、またコントロール BMT 群には、骨髄細胞のみを尾静注した(MHC 完全不適合移植モデル)。レシピエントマウスは移植前日に 11Gy の全身放射線照射を 2 分割で施行した。一部実験では、B6.*lpr* (B6^{*lpr/lpr*}; H-2^b, CD45.2⁺)マウス、および B6.*gld* (B6^{*gld/gld*}; H-2^b, CD45.2⁺)マウスを骨髄及び脾臓由来 T細胞ソースに用い、MHC classI および classII 単独不適合の実験では、レシピエントに B6.C-H2^{bm1}(bm1; K^{bm1}D^bI-A^bI-E^b, CD45.2⁺)マウスないし B6.C-H2^{bm12}(bm12; K^{bm12}D^bI-A^{bm12}I-E^b, CD45.2⁺)マウスを用いた。GVT 評価の実験では、1 × 10⁴ の P815 腫瘍細胞を移植の 2 時間前に尾静注した。組織学的、生化学的解析並びにフローサイトメトリー法、PCR、骨形態計測法の詳細については本文を参照。

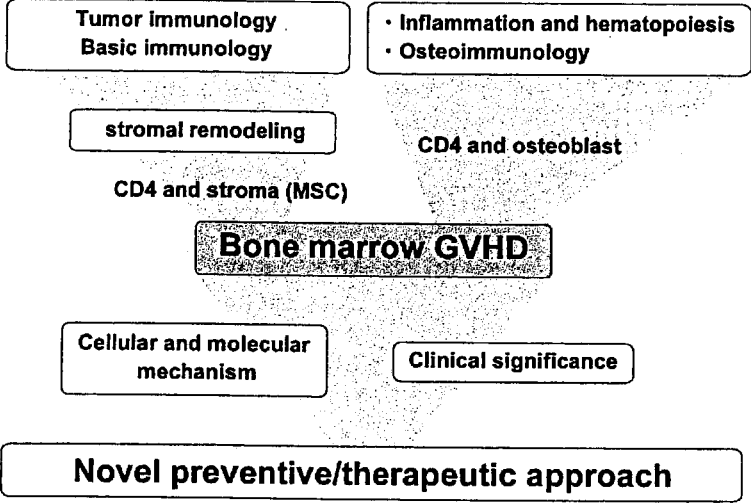
【結果】GVHD 群においては、移植後一貫して骨髄抑制(汎血球減少)、特に B リンパ球系細胞の持続的で強い抑制を認めた。MHC classII 不適合の系でその傾向は強く、抗 CD4 抗体投与の実験でこの B リンパ球系細胞の抑制は解除された。Fas ligand 欠損マウス由来 T

細胞を用いた実験で、この抑制はやや改善したことから Fas-FasL pathway がこの機序に部分的に関与している可能性が示唆された。GVHD 群へ T 細胞除去骨髄細胞の再移植を行ったところ、B リンパ球系細胞の回復はほとんど認められなかった。一方、GVHD 群の骨髄をコントロールマウスへ移植した実験では、同細胞の産生を確認した。組織学的解析から、GVHD 群においては、骨芽細胞が消失していた。骨形態計測法では GVHD 群において、骨形成が著しく障害されており、RT-PCR 法において骨芽細胞分化因子である、Runx2, Twist, Msx2, Osterix, Dlx5, Osteocalcin の発現低下を認めた。ELISA 法により GVHD 群で腸管における IgA 産生および血清中の免疫グロブリン産生が極度に低下しており、それらは移植後早期の抗 CD4 抗体投与により回復した。P815 腫瘍細胞株を用いた移植実験では、BMT 群は早期に腫瘍死した一方で、GVHD 群は、腫瘍の消失を認めたものの、GVHD により死亡した。抗 CD4 抗体投与群では、GVT 効果を保持したまま、GVHD が抑制され、予後を著しく改善した。以上の結果より、ドナー CD4⁺ T 細胞がレシピエントの骨芽細胞を障害し、骨髄抑制、特に B リンパ球系細胞産生の抑制を来し、移植後の免疫学的再構築遅延につながっていることが証明された。

【考察】GVHD に伴う骨髄抑制は、同種造血幹細胞移植(allo-HSCT)後の死因の約 30%を占める感染症や出血といった合併症の原因となる。骨髄が GVHD のターゲットとなりうることは临床上は想定されていたが、その詳細なターゲットと機序についてはいままで報告されていなかった。GVHD と感染症、出血の関連性を従来考えられていた GVHD の発症機序、すなわち、同種抗原反応性ドナー T 細胞による皮膚、腸管、肝臓の上皮組織障害で説明する事は困難であったが、本研究におけるマウス GVHD モデルの解析により、ドナー T 細胞がレシピエントの骨髄間質系細胞を障害する事が、allo-HSCT 後に遷延する造血障害を引き起こし、感染症や出血の原因となる事を見出した。その原因はドナー CD4⁺ T 細胞による、骨髄造血ニッチを構成する骨芽細胞の障害であることを突き止め、さらに、抗 CD4 抗体がその障害を回復させ、GVL 効果を温存したまま GVHD を改善し、延いては生存率の向上につながることを見出した。とくに抗 CD4 抗体投与による免疫学的再構築の促進は移植後の細菌、真菌、ウイルスなどの感染症に対する免疫回復に大きく寄与するものである。GVHD の標的臓器としては、いままで皮膚・肝臓・腸管および肺が指摘されてきたが、今回我々が見出した新たな GVHD 標的である骨髄の障害は、移植後の造血機能障害やそれに伴う免疫学的再構築遅延の直接的原因と考えられるものであり、また骨芽細胞をはじめとした非上皮系の間質系細胞も GVHD の標的となりうることを示す。

【結論】マウス GVHD モデルにおいて、骨髄抑制の原因となる骨髄 GVHD とそのメカニズムについて詳細な解析を行った。臨床病態を含めたさらなる解析が骨髄 GVHD 発症分子機序を解明し、抗体療法による予防法・治療法の道を開き、移植予後を改善させる可能性が期待される。

【骨髓 GVHD 概念図】



学位論文審査の要旨

主 査	教 授	瀬 谷	司
副 査	教 授	有 賀	正
副 査	教 授	松 野	吉 宏
副 査	教 授	今 村	雅 寛

学 位 論 文 題 名

Bone marrow graft-versus-host disease : early destruction of hematopoietic niche following MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation

(造血幹細胞ニッチをターゲットとする移植片対宿主病“骨髄GVHD”の
概念提唱とその機序に関する研究)

マウス GVHD(graft-versus-host disease: GVHD)モデルにおいて、ドナーCD4⁺ T 細胞がレシピエントの骨芽細胞を障害し、骨髄抑制、特に B リンパ球系細胞産生の抑制を来し、移植後の免疫学的再構築遅延につながっていること、さらに、抗 CD4 抗体治療により、移植片対腫瘍 (graft-versus-tumor: GVT) 効果を保ったまま骨髄 GVHD を著しく軽減できることが報告された。

副査である有賀正教授から、骨芽細胞の障害と B 細胞の障害についてどのような関連があるのかとの質問があった。それに対して申請者は、B 細胞分化に必要なストローマ細胞として、骨芽細胞および CAR 細胞が報告されていること、両者の B 細胞分化への詳細な機序については不明な点が多いが、骨芽細胞をノックアウトしたマウスでは B 細胞の産生が完全に消失する報告があることを説明し、今回の研究では骨芽細胞が障害されており、CAR 細胞は障害されておらず、障害の時期や標的となる分化段階が両者で異なる可能性はあるものの、B 細胞分化障害の原因として骨芽細胞の障害を捕らえたことは合理的であると考えられるとの回答を行った。さらに有賀正教授から小児科領域における骨形成不全を伴う先天性免疫疾患についての関連・知識を問われた。これに対し申請者は具体的な疾患の詳細知識は持ち合わせていないものの、GVHD においても、骨形成障害とともに造血不全を呈しており、類似する現象をみている可能性があるとして回答した。

次いで副査である松野吉宏教授から、示された実験系で、臨床例のように皮膚・肝臓・腸管といった上皮系がターゲットとなる GVHD が実際に起きているのかとの質問があった。これに対し申請者は、マウスにおいては、皮膚・毛並み・体重・活動性等で GVHD 評価を行っているが、そのいずれの GVHD スコアも上昇を示したこと、肝機能障害については血清を用いた生化学的な肝機能評価で障害を認めたと回答した。さらに松野吉宏教授より、人

間とマウスで GVHD の違うものを見ている可能性はないか、CD4⁺T 細胞のターゲットが、骨芽細胞であることの必然性についてはどう考えられるのか、という質問があった。これに対し申請者は、人間と今回のマウス GVHD モデルでは、免疫抑制剤の使用有無や、MHC ミスマッチにおいて違いがあるため、今回の結果が、系に特異的な部分がある可能性については否定できないが、複数のマウス移植系での解析で、同様の結果を得ていること、および移植後の血球減少は、臨床例でよく見られるが、この経過がマウスの系でも相同に認められたことから、今後の臨床研究で人間でも検討することにより、同じ現象を証明できる可能性があると考えていること、さらに、骨芽細胞が特異的に障害される事実については、血管内皮細胞や、線維芽細胞等の回復経過を詳細に検討すると、その障害機序が、分化の上流の MSC の障害ではなく、骨芽細胞に特異的であるのは間違いないが、その詳細な分化段階や CD4⁺T 細胞の具体的な障害機序(直接障害か間接的な障害か)に関しては、今後の興味深い研究課題であり、継続して解析を行う予定であると回答した。

次いで主査である瀬谷司教授から、GVHD では CD4⁺T 細胞が主要なエフェクターとなっているといままで報告されているのか、という質問があった。これに対し申請者は、旧来の報告では、上皮系の障害に関しては CD8⁺T 細胞の直接障害が主に報告されていること、マウス実験系での報告では CD4 および CD8⁺T 細胞両者の障害の報告がなされていると回答した。さらに瀬谷司教授より、癌センター等でミニ移植も施行されており、HLA が異なっていた方が、移植成績が良いという報告もみられるが、今回の研究成果を臨床に生かす戦略についてどのように考えているか、という質問があった。これに対し申請者は、血液内科医の最大のテーマとして、有益な GVT 効果を保存したまま有害な GVHD を極限に抑制することを希求していることを前置きした上で、今回の研究で抗 CD4 抗体を用いた治療実験で、抗 CD4 抗体治療群は P815 細胞接種後も GVT 効果を発揮しながら、GVHD は抑制され、有害事象無く生存率の向上につながったことを示し、臨床においても当該抗体を用いた治療がひとつの有益な選択肢となり、移植後の血球回復、免疫学的再構築促進の手立てとなる可能性があるかと回答した。

次いで副査である今村雅寛教授から、人間では CD8⁺T 細胞が GVHD に主に関与していると言われているが、この研究でみつかった結果が人間でも同様に当てはまる可能性をどのように考えているのか、という質問があった。これに対し申請者は、人間では、免疫抑制剤を使用すること、また、マイナー抗原不一致症例での移植が多いことを挙げ、今回の研究結果をそのまま当てはめることが出来るか未解明の部分も多いが、今後マウスモデルで、マイナー抗原不一致の系での実験を予定しており、また、臨床治験を通して、さらなる病態解明を行っていくと回答した。また、今村雅寛教授から、再移植実験の系で一過性に幹細胞回復障害があったがこれはどのようなことを意味するか、また、骨形成自体も障害されるならば、骨 GVHD という概念に広げることができるのではないかと、という質問があった。これに対し申請者は、一時的な強い造血障害の後に、寧ろ造血能が亢進して回復していることを示し、定常状態の造血再構築には時間がかかることから、長期(5 週間)での評価で完全に回復している事実が重要であり、GVHD での直接の幹細胞障害が本研究の GVHD による造血障害に寄与しているわけではないこと、また、骨 GVHD に関してはまさにその通りであり、骨免疫学という分野で一括して、骨形成及び造血を解析する新たな研究の枠組みに本研究も当てはまるもので、今後、臨床例を含めたさらなる解析が期待される、と回答した。

この論文は、移植後の造血機能障害やそれに伴う免疫学的再構築遅延の直接的原因として、GVHD による骨芽細胞の障害を明確に示した。GVHD においては非上皮系の間質系細胞も標的となりうることを、また抗 CD4 抗体治療により骨髓 GVHD を著しく軽減できることを報告したことが高く評価された。今後は臨床病態を含めたさらなる解析が骨髓 GVHD 発症分子機序を解明し、抗体療法による予防・治療法の道を開き、移植予後を改善させる可能性が期待される。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)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。