

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09493

研究課題名(和文) 同種骨髄移植後の新規免疫モニタリングシステムと免疫寛容メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analyses of immune tolerance mechanism in allogeneic transplantation

研究代表者

錦井 秀和 (Nishikii, Hidekazu)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30512834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血幹細胞移植の問題点として同種免疫反応による拒絶反応と移植片対宿主病が挙げられる。本研究では両方向の免疫反応が同時に起きる複雑な免疫反応の網羅的解析と新規治療提案を目的として、急性GVHDマウスモデルにおけるDR3シグナル解析を行った。刺激型DR3抗体を投与すると活性化型制御性T細胞(Treg)が劇的に増加し、ドナーマウスに投与する事により致死的GVHD発症予防が可能である事が明らかとなった。その一方、GVHDを発症したマウスではDR3抗体はアロ抗原反応性T細胞の活性化を促しGVHDを悪化させ、相対する機能をDR3シグナルは有している事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Treg) regulate the immune system and enhance immune tolerance after transplantation. In this study, we demonstrated that a single treatment of the agonistic antibody to DR3 to donor mice resulted in the expansion of donor derived Treg and prevented acute GVHD. Further, we comprehensively analyzed the immunophenotype of Treg after DR3 signal activation, demonstrating that DR3 activated Treg had an activated/mature phenotype. However, DR3 activation in mice with ongoing GVHD further promoted donor T cell activation/proliferation. These data suggest that the function of DR3 signaling was highly dependent on the activation status of the T cells. Our data demonstrated that DR3 signaling affects the function of Treg and T cell activation after alloantigen exposure in a time-dependent manner.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄移植 制御性T細胞 移植片対宿主病

### 1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は、現在確立している唯一の幹細胞療法であり、また、造血器腫瘍に対する最も強力な治療法である。問題点として同種免疫反応による拒絶反応と移植片対宿主病が挙げられる。これらが顕在化した場合、移植片の拒絶またはレシピエントの重篤な臓器障害につながる為、適切な免疫抑制療法の併用が必要となる一方、移植片由来の免疫再構築が完成するまでの日和見感染が問題となる。また、移植片宿主病が重症化しても、致死的な経過を辿ってしまう事が避けられない。つまり、同種骨髄移植後の移植片・宿主両者の適切な免疫調節が、移植患者の長期生存の為に重要な要素の一つとなっている訳であるが、両方向の免疫反応が同時に起きる複雑な免疫反応を網羅的に解析する事は困難であった。

### 2. 研究の目的

マウス骨髄移植モデルにおける免疫学的再構築及び免疫反応を特に制御性 T 細胞 (Treg) に焦点をおいてマルチカラーサイトメトリーを用いた網羅的蛋白発現解析を行う事により、複合的な免疫反応で制御される移植片対宿主病 (GVHD) 及び移植片拒絶反応の詳細なメカニズムを解析するシステムを構築する。特に TNFRSF シグナル制御を利用した免疫寛容メカニズム及び免疫再構築過程に注目し、新規 GVHD 治療薬及び非侵襲的骨髄移植法の開発を狙う事により、将来的なヒト骨髄移植臨床へのトランスレーションを目的とする。

### 3. 研究の方法

致死量放射線を照射した BALB/c マウス (MHC:H2d) をレシピエントとし、ドナーに C57BL6 マウス (MHC:H2b, CD45.2) の大腿骨または脛骨から採取した骨髄細胞から MACS ソーティングにより T 細胞除去骨髄細胞を作成した (T Cell depleted bone marrow; TCD-BM)。これに MACS ソーティングにより採取した T 細胞 (C57BL6-CD45.1/GFP/Luc マウス由来、または C57BL6-Foxp3DTR/Luc マウス) を同時に移植した。この急性 GVHD モデルでは、T 細胞とドナー細胞のマーキング・Luciferase を用いた In vivo imaging によりドナー T 細胞または制御性 T 細胞の動態解析が可能である。このモデルを用いて、急性 GVHD 時における TNFRSF25 シグナル解析を行った。Foxp3+陽性細胞中のサブセット・NKT 細胞等の表現系解析は、マルチカラーサイトメトリーで用い、データは、数理解析を用い、客観的なデータ解析を行った。

### 4. 研究成果

TNFRSF25 (Death Receptor 3; DR3) は当

初、アポトーシスシグナル関連のレセプターとして同定されたが、後に制御性 T 細胞、invariant NKT 細胞を中心とした免疫細胞における免疫調節時に重要な役割を担っている事が示唆されている。研究代表者は、T 細胞採取前に TNFRSF25-agonistic 抗体を投与すると、ドナー T 細胞中の制御性 T 細胞 (CD4+Foxp3+陽性細胞) 比率が増加し、致死性 GVHD が予防される事を示した (錦井ら Blood.2015)。以前より制御性 T 細胞の免疫調節作用が致死性 GVHD の回避につながる事は示唆されてきたが、その頻度の少なから細胞治療のソースとして臨床応用には限界があった。この抗体の作用は比較的控制性 T 細胞に限定しており、T 細胞自体の抗腫瘍効果を含めた細胞障害活性には大きな変化はないと考えられた。

このモデルを用いて、Foxp3+陽性細胞中のサブセット・NKT 細胞等の表現系解析を行ったところ、DR3 シグナルにより刺激された Treg は活性化型表現系を有しており、試験管内では強いアロ抗原反応性 T 細胞活性抑制能を有していた。またレシピエントマウスに投与すると、既に GVHD を発症したマウスでは DR3 シグナルによりアロ抗原反応性 T 細胞の活性化が起き、急性 GVHD が逆に悪化するという現象が確認された。一方で Naive な状態では DR3 シグナル刺激は活性化型 Treg を劇的に増加させ、GVHD 発症を抑制することから、DR3 シグナルは GVHD においては、相反する二つの機能を持ち合わせていることが明らかとなった (錦井ら Blood.2017)。

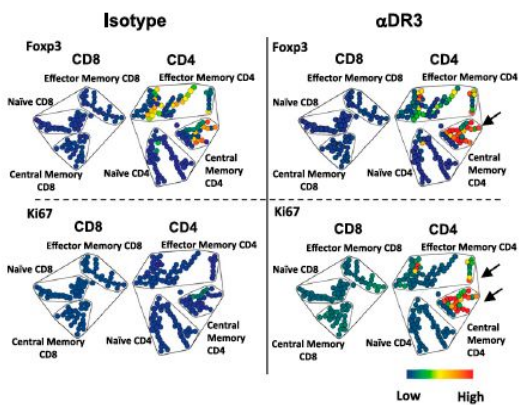


図 1. TNFRSF25 抗体投与後の T 細胞の表現系解析結果。マルチカラーフローサイトメトリーによる解析結果を SPADE 法により数理的に可視化した結果を示す。TNFRSF25 抗体により Treg が選択的に増加している。

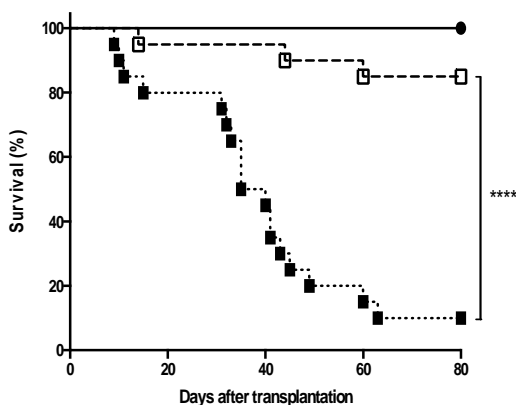
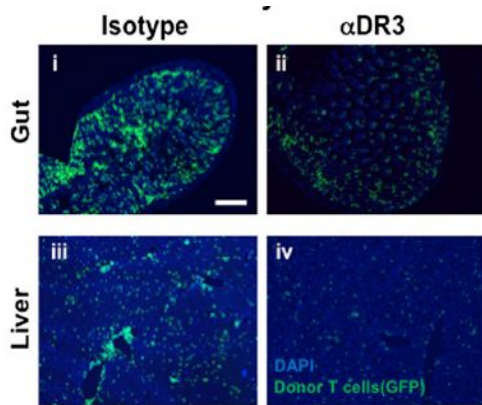


図 2. マウス同種移植モデルにおける TNFRSF25 抗体の効果(アロ抗原反応性 T 細胞の組織浸潤度の評価と生存曲線) 移植マウスの腸管及び肝臓の組織像(GFP ; ドナーT細胞、上写真) 非GVHD群(T細胞除去移植群), GVHD群(Isotype抗体+T細胞投与群), TNFRSF25抗体+T細胞投与群(下図)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)\*全て査読あり

1. Ronald JA, Nishikii H, Gambhir SS 他. A PET Imaging Strategy to Visualize Activated T Cells in Acute Graft-versus-Host Disease Elicited by Allogenic Hematopoietic Cell Transplant. *Cancer Res.* 2017, 1;77(11):2893-2902. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2953.

2. Pierini A, Nishikii H\*, Chiba S, Negrin RS

他. Foxp3+ regulatory T cells maintain the bone marrow microenvironment for B cell lymphopoiesis.

*Nature Communications.* 2017,9(8):15068. (\*equally contribution) doi: 10.1038/ncomms15068.

3. Nishikii H\*, Kim BS\*, Yokoyama Y, Chiba S, Negrin RS 他. DR3 signaling modulates the function of Foxp3+regulatory T cells and the severity of acute graft versus host disease. *Blood.* 2016. 128(24):2846-2858. doi.org/10.1182/blood-2016-06-723783

4. Pierini A, Nishikii H, Negrin RS 他. TNF $\alpha$  priming enhances CD4+Foxp3+regulatory T cell suppressive function in murine GVHD prevention and treatment. *Blood.* 2016. 128(6):866-71. doi: 10.1182/blood-2016-04-711275.

5. Chopra A, Nishikii H, Beilhack A. 他. Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD by induction of host Treg expansion. *J. Exp Med.* 2016.213(9):1881-900. doi: 10.1084/jem.20151563.

6. Pierini A\*, Schneidawind D\*, Nishikii H\*, Negrin RS. Regulatory T cell Immunotherapy in Immune-Mediated Disease. *Curr Stem Cell Rep.* 2015(1);177-186 (\*equally contribution) doi: 10.4049/jimmunol.1402861.

7. Kim BS\*, Nishikii H\*, Negrin RS 他. Treatment with agonistic DR3 antibody results in expansion of donor Tregs and reduced graft-versus-hostdisease. *Blood.*2015;126(4):546-57

(\*equally contribution)

doi: 10.1182/blood-2015-04-637587.

8. Pierini A, **Nishikii H**, Negrin RS 他. Donor requirements for regulatory T cell suppression of murine graft-versus-host disease.

J Immunol. 2015;195(1):347-55

doi: 10.4049/jimmunol.1402861.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. **Nishikii H**, Pierini A, Yokoyama Y, Kimura T Negrin RS and **Chiba S**.

Foxp3+regulatory T cells maintain bone marrow environment for B cell differentiation from hematopoietic stem cells.

39 th annual meeting of Japanese society of Hematopoietic Cell Transplantation, 2017 (Matsue, Japan).

2. **Nishikii H**, Pierini A, Yokoyama Y, Kimura T, Negrin RS and **Chiba S**.

Foxp3+regulatory T cells maintain bone marrow environment for B cell differentiation from hematopoietic stem cells.

39 th annual meeting of Japanese society of Hematology, 2016 (Yokohama Japan).

3. **Nishikii H**, Pierini A, Yokoyama Y, Kimura T, Negrin RS and **Chiba S**.

Foxp3+regulatory T cells maintain bone marrow environment for B cell differentiation from hematopoietic stem cells. Blood

(ASH Annual Meeting Abstracts), 2016

#### **4. Nishikii H**

Foxp3+regulatory T cells maintain bone marrow environment for B cell differentiation from hematopoietic stem cells.

Hematopoietic Stem Cell Researchers symposium at IMS, 2016 (Japan, Invited speaker)

〔その他〕

ホームページ等

プレスリリース(2017年5月9日)

<http://ura.sec.tsukuba.ac.jp/archives/11809>

6. 研究組織

(1)研究代表者

錦井 秀和 (NISHIKII, Hidekazu)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30512834

(2)研究分担者

千葉 滋 (CHIBA, Shigeru)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60212049