

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17399

研究課題名（和文）同種造血幹細胞移植後慢性GVHDにおける臓器線維化メカニズムの解明と制御法の開発

研究課題名（英文）Development of clinical method for chronic GVHD focused on organ fibrosis

研究代表者

伊野 和子（Ino, Kazuko）

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60775568

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、線維細胞に着目し、同種移植後慢性GVHDの病態解明を行うと共に、免疫関連分子に着目し、移植後免疫病態について検討を行った。モデルマウスを用いた検討では、移植後2週時点で活性化単球の末梢血中への出現を認め、ヒト臨床検体を用いた検討でも、移植後day 30時点で同様の活性化単球の出現を認めた。これら細胞は比較的長期に末梢血中から検出が確認された。また、ヒト臨床検体を用いた検討では、移植後day 90時点で、移植後再発を認めた群において有意にPD-1、PD-L1の発現増強を認めた。これら結果は、同種移植後慢性GVHDにおける長期免疫病態関与と治療経過への影響を示唆していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は同種移植後の慢性GVHDについて、繊維芽細胞に着目した上で、慢性GVHDマウスモデルを用いた検討、ヒト臨床検体を用いた検討を行い、その病態解明を行っている。また、ヒト臨床検体を用いて、同種移植後の免疫関連分子と移植後の免疫病態、GVHD、GVL効果についても検討を行っている。この結果、慢性GVHDにおける活性化単球の長期に渡る免疫病態への影響が示唆され、また、同種移植後の免疫抑制状態が原疾患の再発に繋がることが示唆された。これら結果は、同種移植後の病態解明に繋がると共に、同種移植後治療成績の向上に結び付くことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has become the curable treatment for the patient of hematological malignancy. Graft vs host disease (GVHD) is the most important problem. In this study, we focused on the fibrocyte and analyzed the pathophysiology of chronic GVHD. Additionally, we assess the association of immunosuppressive agents with outcome. In the study of mice model, activated monocytes were appeared to peripheral blood after 2 weeks. In the study of human, activated monocytes were appeared peripheral blood about day 30 and these cells were detectable for long time. In the study of immunosuppressive agents, at the time of day 90, these agents and relapse had been related to significant difference. These data suggest that activated monocytes were appeared in early stage after HSCT and interact to immunological cells. And immunosuppressive status led to relapse after HSCT. Further experiments are needed for more detail analysis.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：同種造血幹細胞移植 慢性GVHD 臓器・組織線維化 免疫関連分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は、難治性血液疾患に対する根治的治療法であるが、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) や感染症、原病の再発など、臨床的課題が多く残されている。移植方法の多様化により患者の年齢層は拡大し、移植件数は年々増加、支持療法の進歩も加わり、移植後長期生存患者は増加を認めている。これに伴い慢性 GVHD を有する患者も増加を認め、慢性 GVHD による組織・臓器線維化が、患者の生活の質 (Quality of life; QOL) を低下させる要因となっている。急性 GVHD は、ドナー免疫応答による同種免疫反応が病態の主体であるのに対して、慢性 GVHD の病態は、免疫反応のみで説明できるものではなく、その発症機序は不明な点が多い。また、通常、組織線維化の過程においては、筋繊維芽細胞が病変部位に集積し、コラーゲン等の細胞外基質を産生することでその病態を形成している。こうした筋繊維芽細胞の前駆細胞として末梢血中の線維細胞が知られており、末梢血線維細胞は単球から分化するとの報告があるが、同種移植後の組織線維化との関連は明らかになっていない。

加えて、以前より同種移植においては、ドナー免疫細胞による移植後 GVHD と、これに伴う移植片対白血病効果 (Graft-versus-leukemia 効果; GVL 効果) が原病の制御において非常に重要であることが示されている。こうした免疫病態を負に制御する免疫関連分子についても注目されており、免疫関連分子と原病の再発についても研究が進められている。一方で、同種移植後の免疫病態と免疫関連分子の関係、原病の再発については、いまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、組織線維化に關与する筋繊維芽細胞の前駆細胞となる線維細胞、また、末梢血中の単球系細胞に注目し、慢性 GVHD 患者の QOL を低下させる同種移植後の臓器線維化のメカニズム解明を行うことを目的とした。加えて、同種移植後の免疫病態においても、経時的に免疫関連分子 (PD-1, PD-L1, CTLA-4) の測定を行うことで、同種移植後の免疫応答と免疫関連分子の関係、原病の再発について検討を行った。

3. 研究の方法

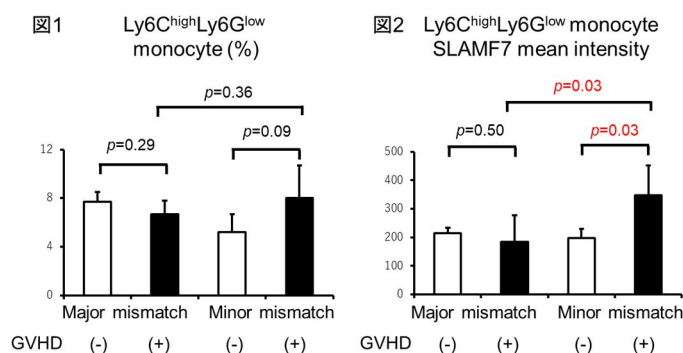
ヒト慢性 GVHD に類似したマウスモデル、および同種移植後のヒト末梢血検体を用いて、末梢血中の単球および線維細胞に着目し、その動態と線維化、慢性 GVHD との関連について検討を行った。また、同様に同種移植後のヒト末梢血検体を用いて、免疫関連分子 (PD-1, PD-L1, CTLA-4) の測定を行い、同種移植後、急性・慢性 GVHD と GVL 効果、また、これによる原病の再発について検討を行った。

(1) ヒト慢性 GVHD に類似したマウスモデルを用いた検討では、レシピエントマウスに全身放射線照射を施行した後、異なる系統のマウスより T 細胞除去骨髄および脾臓由来の (末梢血成熟) T 細胞を移植し GVHD モデルマウスを作成した。対照群には、同線量の全身放射線照射を行ったレシピエントへ T 細胞除去骨髄のみ移植を行った。この際、主要組織適合抗原 (Major Histocompatibility Complex) 不一致、マイナー組織適合抗原 (Minor Histocompatibility Complex) 不一致、両者のマウスモデルを作製し検討を行った。以後、ドナー特異的マーカーを認識する抗体を使用したフローサイトメトリー法により、末梢血のドナー由来単球及び線維細胞の数、また、リンパ球、NK 細胞などの免疫担当細胞について経過を確認した。移植後 2 週から 6 週にかけて、それぞれの群におけるマウスの末梢血検体を採取し経時的に検討を行った。

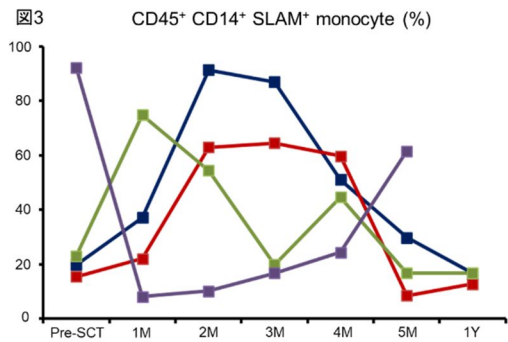
(2) 同種移植後ヒト末梢血検体を用いた検討では、三重大学倫理審査委員会の承認後より、当院で同種移植施行予定の患者に対して説明を行い、同意を頂いた上で、経時的に末梢血検体を採取し、フローサイトメトリー法を用いて、末梢血中の単球と前駆細胞について経時的に検討を行った。また、同様に同意を頂いた同種移植施行予定の患者より、末梢血検体を採取し、血漿中の免疫関連分子 (PD-1, PD-L1, CTLA-4) について経時的に検討を行った。

4. 研究成果

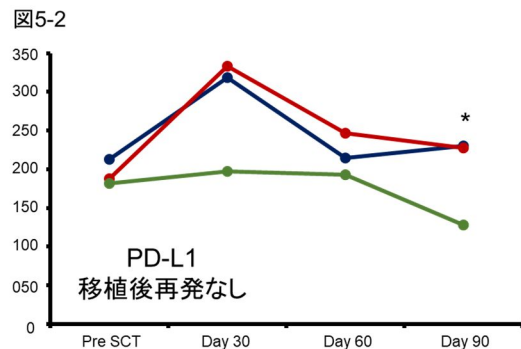
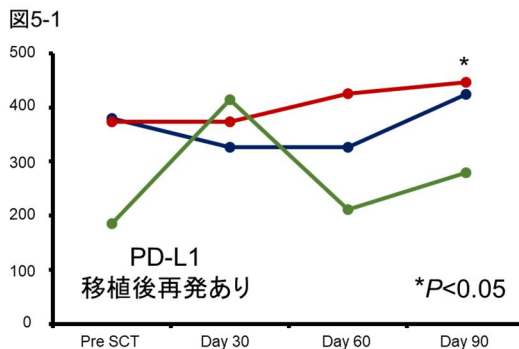
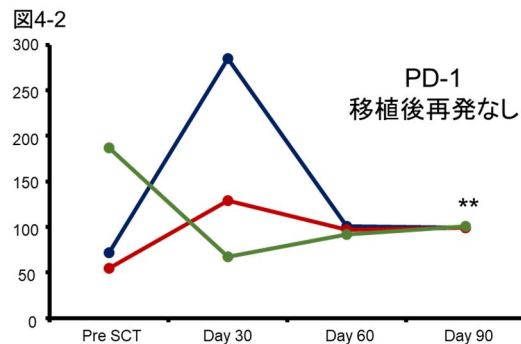
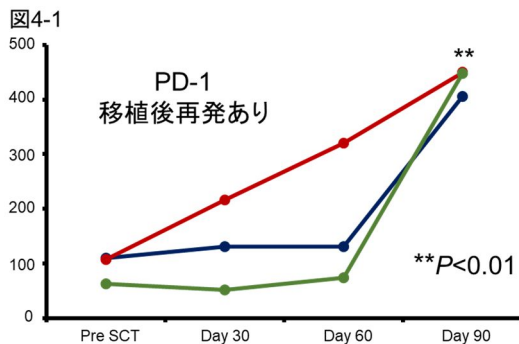
(1) GVHD マウスモデルを用いた検討では、移植後 2 週間を経過した比較的早期の段階から、末梢血中に $Ly6C^{high}Ly6G^{low}$ の活性化単球の出現を認めた。これらの出現頻度については、GVHD を生じた群と生じなかった群において有意差は認められなかった (図 1)。一方で、同様に移植後 2 週間の比較的早期の段階において認められる $Ly6C^{high}Ly6G^{low}$ 活性化単球は、Minor Histocompatibility complex 不一致の移植群において、有意に SLAMF7 発現強度の増強を認めた (図 2)。



(2)同種移植後ヒト末梢血検体を用いた検討においては、移植後 day 30-60 の比較的血球が安定した頃を目安に、多くの症例において、CD45⁺CD14⁺SLAMF7 陽性単球の著明な増加を認めた。また、こうした CD45⁺CD14⁺SLAMF7 陽性単球は、移植後の経過と共に経時的に低下を認め、これら活性化単球における SLAMF7 発現強度についても、移植後の経過と共に経時的に低下を認めた。一方で、こうした CD45⁺CD14⁺SLAMF7 陽性単球は、移植後 5 か月経過、また移植後 1 年経過した時点においても、移植患者の末梢血中から検出され、比較的長期に渡り存在することが確認された(図 3)。



(3)同種移植後ヒト末梢血検体を用いた検討においては、免疫関連分子(PD-1, PD-L1, CTLA-4)について経時的に測定を行った結果、同種移植後再発を認めた群において、特に day 90 時点で有意に PD-1、PD-L1 の発現増加を認めた。これは、こうした免疫関連分子の発現による全身の免疫抑制状態が、同種移植後の再発に繋がることを反映していると考えられた(図 4, 5)。一方で、今回の患者群においては、同種移植後 GVHD の発現と免疫関連分子との間に有意差は確認されなかった。また、CTLA-4 については、原病の再発、GVHD いずれにおいても有意差は確認されなかった。



ヒト慢性 GVHD に類似したマウスモデルを用いた検討、また、同種移植後のヒト末梢血検体を用いた検討、いずれにおいても、移植後比較的早期から、活性化単球の末梢血中への出現を認めた。また、こうした活性化単球は、移植後比較的長期に渡り末梢血中に認められることが確認された。加えて、同様の GVHD マウスモデルを用いた検討では、移植後 4 週にかけて CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の回復を認め、移植後 6 週にかけて、CD220 陽性 B 細胞、NK1.1 陽性 NK 細胞といった免疫担当細胞の回復を認めており、移植後早期にみられる活性化単球の増加とあわせて、こうした免疫担当細胞との相互作用により、以後の慢性 GVHD 病態に関連することが考えられた。また、同種移植後のヒト末梢血検体を用いた検討では、day 90 時点において、移植後再発を認めた群に有意差をもって PD-1、PD-L1 発現の増強を認めた。これは、こうした免疫抑制状態によるドナー由来細胞からの GVL 効果の減弱が原病の再発に繋がることを示唆していると考えられた。一方で、今回の解析においては、同種移植後 GVHD と免疫関連分子の関係については、明らかな有意差は認められなかった。

現時点での解析においては、GVHD マウスモデルを用いた検討、同種移植後のヒト末梢血検体を用いた検討、いずれも比較的少数となっており、今後、さらに件数を増やして解析を行うことで、同種移植後の慢性 GVHD における臓器線維化メカニズム、また、原病の再発を含めた病態解明に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西村廣明、伊野和子、松本剛史、大石晃嗣、俵功
2. 発表標題 ステロイド抵抗性GVHDに対する間葉系幹細胞の使用経験
3. 学会等名 第44回 日本造血・免疫細胞療法学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前山桂子、伊野和子、藤枝敦史、大石晃嗣、俵功
2. 発表標題 同種造血幹細胞移植後生着不全に対して臍帯血移植を施行した3例
3. 学会等名 第45回 日本造血・免疫細胞療法学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊野和子、前山桂子、王碩林、鈴木和貴、松本剛史、俵功
2. 発表標題 骨髄異形成症候群に対する臍帯血移植施行後の亜急性甲状腺炎
3. 学会等名 第84回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊野和子、岡田真名人、松本剛史、俵功
2. 発表標題 重症型再生不良性貧血に対する臍帯血移植の経験
3. 学会等名 第83回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------