移植片対宿主病の病態解明と新たな治療法の開発

前田 嘉信

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 血液・腫瘍・呼吸器内科学

キーワード：同種造血幹細胞移植, GVHD, GVL, 合成レチノイド, Th17細胞

Pathologic clarification of graft-versus-host disease and novel therapeutic strategies

Yoshinobu Maeda

Department of Hematology, Oncology and Respiratory Medicine, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

はじめに

造血幹細胞移植には、患者さん自身の造血幹細胞を使う自家造血幹細胞移植 autologous (hematopoietic stem cell transplantation: HSCT) と、他人の造血幹細胞を使う同種造血幹細胞移植 (allogeneic HSCT) に大別される。どちらも移植前に大量の抗癌剤や全身放射線療法を行うことにより、通常量の抗癌剤では治療しきらなかった血液悪性疾患に対し、強い腫瘍縮小効果がもたらされる。さらに allogeneic HSCT 後は、生着したドナー細胞による免疫反応が起こり、白血病などの悪性腫瘍に対する移植片対白血病効果 (graft-versus leukemia: GVL) が惹起される。Allogeneic HSCT は、この GVL 効果により白血病に治療をもたらす治療法として確立しているが、同時に発症する移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) は致死合併症として移植の成功を左右する最大要因である。

GVHD は移植後早期に発症する急性 GVHD と移植後約100日以降に自己免疫様の症状で発症する慢性

GVHD に大別される。我々は、これまで急性 GVHD の病態解明とともに、GVL 効果が低下しない GVHD 抑制方法の開発に努めてきた。また、慢性 GVHD は、基礎的研究が急性 GVHD に比べ遅れていたが、我々は、エフェクター細胞の同定と免疫寛容の破綻の観点からその病態の解明に取り組んでいる。本稿では、急性 GVHD に発症の機序とサイトカインの重要性、GVL 効果における T 細胞障害活性の役割、慢性 GVHD における Th1・Th17 細胞の重要性と合成レチノイド AM80 による慢性 GVHD に抑制効果について概説する。

急性 GVHD の病態解明

急性 GVHD はマウス実験モデルによりその病態が解明されてきている。これまでに明らかとなっている GVHD 発症のメカニズムは、

Step 1) 移植前治療によりホストの組織が障害され “danger signal” が発生

Step 2) “danger signal” によりホスト抗原提示細胞 (APC) が活性化

Step 3) APC が提示した同種抗原によりドナー T 細胞が活性化しホスト組織を障害

が基本となる3つのステップである (図1)。

Step 1 で発生する “danger signal” として炎症性サイトカインと外的要因 (微生物) 特有の分子群 PAMP

平成30年5月7日受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話：086-235-7227 FAX：086-232-8226

E-mail：yosmaeda@md.okayama-u.ac.jp

◆プロフィール◆

平成4年3月 岡山大学医学部卒業
平成4年4月 岡山大学医学部附属病院 第二内科入局
平成4年9月 神戸西市民病院 内科 医師
平成5年9月 滝宮総合病院 内科 医師
平成6年9月 国立四国がんセンター 内科 研修医
平成8年6月 岡山大学医学部附属病院 第二内科 医員
平成12年10月 愛媛県立中央病院 内科 医師
平成13年11月 米国 Michigan University, Research fellow
平成16年12月 岡山大学医学部・歯学部附属病院 血液・腫瘍内科 助手
平成19年4月 岡山大学医学部・歯学部附属病院 血液・腫瘍内科 助教
平成26年4月 岡山大学病院 血液・腫瘍内科 講師
平成29年7月 岡山大学医歯薬学総合研究科 血液・腫瘍・呼吸器内科学 教授

図1 GVHD 発症のメカニズム

移植前治療によりホストの組織が障害され“danger signal”が発生 (Step 1)。“danger signal”によりホスト抗原提示細胞 (APC) が活性化 (Step 2)。APC が提示した同種抗原によりドナーT細胞が活性化しホスト組織を障害する (Step 3)。

(pathogen-associated molecular pattern), 内的要因 (細胞障害など) の分子群は DAMP (damage associated molecular pattern) と大別される。DAMP として ATP, Heparin sulphate, HSPs, Uric Acid Hyaluronan, S100 proteins, HMGB-1 など数多くの分子が GVHD 増悪因子として指摘されている¹⁾。代表的な PAMP である腸内微生物 (グラム陰性菌細胞壁外膜) の構成成分 LPS は, APC を強力に活性化させる (Step 2)。腸内細菌叢に関しては近年, 特に研究が進んでおり, 腸内細菌叢の乱れが免疫寛容機構の破綻と腸内粘膜バリアーの破綻をきたし, GVHD を悪化させる。GVHD の悪化はさらに腸内細菌叢の乱れにつながるという, 負の連鎖が指摘されている。サイトカインに関しては, IL-1 と TNF- α が重要であるが, IFN- γ や IL-18 は免疫を賦活する一方で, T細胞を activation induced cell death (AICD) させることにより GVHD 反応を終息させる役割も担っている²⁻⁴⁾。

Step 3 における抗原提示細胞として樹状細胞 (DC) が重要であること⁵⁾, さらに $\gamma\delta$ T細胞が DC を活性化させることが明らかとなっている⁶⁾。エフェクターとなったT細胞は, サイトカインあるいは perforin や FasL などの組織障害性分子により組織を障害するが^{7,8)},

perforin や FasL は同時にT細胞を AICD させることにより GVHD 反応を終息させる⁹⁾。さらに perforin や FasL をノックアウトした場合もサイトカインによる GVHD が発症することが分かっている⁹⁾。

GVHD と GVL 効果の分離

ドナーT細胞が同種抗原に反応して活性化し免疫反応が惹起されるのであれば, 攻撃対象が正常臓器か腫瘍の違いがあるだけで, GVHD と GVL は本質的に同一と考えられる。Step 3 において APC が同種抗原をドナーT細胞に提示しない場合, GVHD は発症しない。では, その状況では GVL も惹起されないのか。この疑問を解明するためにキメラマウスを作成し実験した結果, GVL は惹起されなかった¹⁰⁾。このことから GVL が惹起されるにはドナーT細胞に APC が同種抗原を提示することは必須の条件であると明らかになった。次に, 組織が障害される段階で, 組織に同種抗原が存在しなければ GVHD は発症しないのか。この疑問は, Teshima らにより, 細胞障害性T細胞の関与なしにサイトカインのみで GVHD が発症することが証明されている。では次に, がん細胞に同種抗原が存在しなければ, GVL は惹起されないのか。この疑問は, 同

様にキメラマウス使って検討した結果、GVL は惹起されなかった¹⁰⁾。つまりサイトカインだけで GVHD は発症するが、サイトカインだけで GVL は惹起されない。同種抗原を標的とした T 細胞の細胞障害活性は、GVHD 発症には必須ではないが、GVL には必須の条件であることが明らかとなった^{10,11)}。

HDAC (histone deacetylase) 阻害剤は、移植後のドナー T 細胞からのサイトカイン産生を強力に抑制する一方、細胞障害活性は抑制しないため、GVHD は抑制し GVL 効果は保たれる可能性が示唆される^{12,13)}。実際にヒトで行われた臨床試験で GVHD 抑制効果と再発率の抑制効果が同時にみられている¹⁴⁾。今後は GVHD と GVL 効果を完全ではないにしても、サイトカインと細胞障害活性の観点からある程度分離できる免疫抑制剤が出てくると期待される。

慢性 GVHD の病態解明

慢性 GVHD は急性 GVHD と発症時期が異なるだけでなく、その病態も異なると考えられている。臨床像も慢性 GVHD は、自己免疫性疾患に類似している。慢性 GVHD は、レシピエントの体内でドナー細胞による免疫が再構築される段階で、自己抗原反応性 T 細胞が出現すると考えられる。慢性 GVHD は免疫寛容の破綻¹⁵⁻¹⁷⁾ がその主たる病態と近年の研究で明らかになりつつある。

1. Th17・Th1 細胞は慢性 GVHD のエフェクター細胞である

T 細胞の性状に関しては急性 GVHD ではドナー T 細胞の Th1 細胞への偏向が見られるのに対し、慢性 GVHD では自己抗体がみられることから Th2 細胞への偏向が従来から想定されてきたが、Th2 細胞では病態が十分に説明できなかった。Th17 細胞は好中球遊走、抗菌ペプチドの産生、組織修復などに関わる IL-17, IL-21, IL-22 などのサイトカインを放出するのを特徴とし、自己免疫疾患との関連が指摘されている。我々は、慢性 GVHD が自己免疫疾患に類似する病態を示すことから、慢性 GVHD において Th17 が関与しているとの仮説をたてた。

ヒトの慢性 GVHD の病理をよく反映している慢性 GVHD マウスモデルを用いて、まず、移植後の Th1/Th2/Th17 の動態を確認した。慢性 GVHD 発症時のリンパ球は、Th2 サイトカインである IL-13⁺ 細胞に加え、Th1 サイトカイン IFN- γ が陽性 (IFN- γ ⁺) 細胞

と Th17 サイトカイン IL-17⁺ 細胞、また、2 つのサイトカインを同時に発現する IFN- γ ⁺IL-17⁺ double positive 細胞が増加していた¹⁸⁾。これらの細胞は移植後の慢性 GVHD 病変組織 (肺, 肝臓) においても同様に増加していた (図 2)。

次に、慢性 GVHD における Th17 と Th1 細胞の関与を明らかにするために、それぞれ IL-17 ノックアウト (IL-17^{-/-}) マウスと IFN- γ ノックアウト (IFN- γ ^{-/-}) マウスを使って検討した¹⁸⁾。結果、IL-17^{-/-} あるいは IFN- γ ^{-/-} マウスをドナーにして骨髄移植を施行すると、野生型のコントロール群に比べて有意に慢性 GVHD が改善し、組織学的にも慢性 GVHD 所見の軽減が認められた。以上から Th1 と Th17 細胞のいずれもが慢性 GVHD 発症に関与することが明らかとなった。また、ヒトの慢性 GVHD 発症患者の組織からも IFN- γ あるいは IL-17 陽性細胞の浸潤が確認されている。

2. 免疫寛容機構の破綻

慢性 GVHD において Th17 と Th1 細胞が活性化していることが明らかとなったが¹⁸⁻²⁰⁾、同種移植ではドナー T 細胞にとってアロ抗原は常に体内に存在し続ける状態にある。そこで T 細胞が疲弊し免疫寛容が誘導されている否かを、免疫チェックポイントの点から検討した¹⁶⁾。移植後、ドナー T 細胞は速やかに活性化し、連動して PD-1 が強く発現した。Syngeneic 後の T 細胞の PD-1 発現は一時的であり速やかに定常状態に戻るが、allogeneic 後は高いレベルで PD-1 が発現し続けることが明らかとなった。一方、allogeneic 後の組織 PD-L1 の発現を調べた結果、PD-L1 は移植後早期

図2 移植後の Th1/Th17 の動態
移植後早期は Th1 細胞が allogeneic 群で特に有意に増加するが、慢性 GVHD 発症時には Th17 細胞が増加していた。

には発現が上昇するがその後は低下し定常状態に低下した。PD-1 アドニストを投与することによる慢性 GVHD が改善、PD-1 抗体あるいは PD-L1 抗体によって PD-1/PD-L1 経路をブロックすると慢性 GVHD が悪化することから、慢性 GVHD における PD-1/PD-L1 経路の関与があきらかとなった。また、PD-1 アドニストによる慢性 GVHD 治療薬としての可能性が示唆された。

慢性 GVHD に対する新規治療の開発

1. AM80による慢性 GVHD 予防・治療効果

AM80は、首篠らによって本邦で合成されたレチノ安息香酸に属するレチノイドである。AM80は、レチノイン酸レセプターに特異的な合成レチノイドあり、このレセプターに結合する生物学的活性は all-trans retinoic acid (ATRA) の約10倍である。ATRA と AM80は、ともに急性前骨髄性白血病 (APL) の治療薬として広く使用されているが、AM80には皮膚に分布するレチノイン酸レセプターに親和性がないので、皮膚粘膜障害等の副作用が ATRA に比べ軽いことが推測されるなど効果・副作用両面で ATRA よりも優れていると考えられる。AM80には、APL 治療薬としての作用以外に免疫学的には Th1, Th17を抑制する作用が報告されている。そこでマウスモデルを使い、レチノイン酸による慢性 GVHD に対する効果を検討した¹⁸⁾。移植日より連日 AM80を投与したところ、AM80は Th1, Th17サイトカイン産生を抑制し、コントロール投与群に比べ明らかな慢性 GVHD 抑制作用が認められた。さらに、慢性 GVHD を発症しはじめの移植後21日目から、連日 AM80を投与開始してもコントロール投与群に比べ有意に慢性 GVHD を改善し、治療薬としての可能性が示唆された。

AM80は白血病患者に対して多くの使用実績があり副作用もすでに明らかとなっている。そこで慢性 GVHD に対する治療効果を確かめる医師主導臨床Ⅱ相試験を実施した²¹⁾。対象はステロイド治療抵抗性慢性 GVHD の患者で、AM80を経口で24週間投与する。AM80投与開始24週時点での failure-free survival (FFS) かつ奏効率を主要評価項目として、目標18例の実施が終了し解析中である。有効性を認める症例がある一方、深部静脈血栓を呈する症例があり注意を要する。今後、慢性 GVHD 治療薬としての適応拡大にむけて検討、準備中である。

2. 抗 p40抗体による慢性 GVHD 予防・治療効果

Th17細胞のなかでも IFN- γ を産生する double positive 細胞 (alternative Th17) は、IFN- γ を産生しない Th17細胞に比べより病原性が強い可能性が示唆されている。慢性 GVHD 発症モデルマウスにおける研究で、IL-17⁺ IFN- γ ⁺ の double positive 細胞は慢性 GVHD 発症群のみに認められたため、alternative Th17 および Th1 を抑制する目的で、それぞれの分化に必須な IL-12と IL-23を同時に抑制できる抗 p40抗体が有効であると仮説した。実際にマウス慢性 GVHD モデルを使い抗 p40抗体を投与した結果、慢性 GVHD 発症が臨床的スコアと病理スコアが有意に改善された²²⁾。ドナー T細胞を解析したところ、Th1 細胞の抑制とともに alternative Th17が有意に減少しており、抗 p40抗体により IL-12および IL-23を介した経路を遮断することにより慢性 GVHD が抑制されることが示唆された。また、慢性 GVHD が発症する時期からの投与でも軽減させたため治療薬としての有効性が示唆された。抗 p40抗体による GVHD 改善効果の検証試験が現在、米国で進んでいる。

おわりに

マウスモデルを中心に GVHD 研究が進み、病態が次第に明らかとなってきた。GVHD と GVL の分離は困難な課題であるが、まったく分離できないわけではなく、その病態の違いが明らかになるにつれ GVL 効果を保持した GVHD 抑制剤が開発されつつある。また、慢性 GVHD 発症における新たなメカニズムの解明とともに、これまでステロイド以外に有効な治療法がなかった慢性 GVHD に対し、AM80は全く新たな作用機序をもつ薬剤として臨床応用される道が開かれた。現在、我々はトランスレーショナルリサーチとして、再発難治性慢性 GVHD に対する AM80治療を医師主導臨床Ⅱ相試験で実施し、適応拡大にむけて検討、準備中である。マウスモデルから得られた知見により、今後も GVHD の病態解明と新規治療薬の開発が期待される。

文 献

- 1) Maeda Y : Pathogenesis of graft-versus-host disease : innate immunity amplifying acute alloimmune responses. Int J Hematol (2013) 98, 293-299.
- 2) Reddy P, Teshima T, Hildebrandt G, Duffner U, Maeda Y, et al : Interleukin 18 preserves a perforin-dependent graft-

- versus-leukemia effect after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* (2002) 100, 3429-3431.
- 3) Ichiba T, Teshima T, Kuick R, Misek DE, Liu C, et al. : Early changes in gene expression profiles of hepatic GVHD uncovered by oligonucleotide microarrays. *Blood* (2003) 102, 763-771.
 - 4) Min CK, Maeda Y, Lowler K, Liu C, Clouthier S, et al. : Paradoxical effects of interleukin-18 on the severity of acute graft-versus-host disease mediated by CD4+ and CD8+ T-cell subsets after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* (2004) 104, 3393-3399.
 - 5) Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, Reddy P, Ordemann R, et al. : Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol* (2004) 172, 7393-7398.
 - 6) Maeda Y, Levy RB, Reddy P, Liu C, Clouthier SG, et al. : Both perforin and Fas ligand are required for the regulation of alloreactive CD8+ T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood* (2005) 105, 2023-2027.
 - 7) Maeda Y, Tawara I, Teshima T, Liu C, Hashimoto D, et al. : Lymphopenia-induced proliferation of donor T cells reduces their capacity for causing acute graft-versus-host disease. *Exp Hematol* (2007) 35, 274-286.
 - 8) Tawara I, Maeda Y, Sun Y, Lowler KP, Liu C, et al. : Combined Th2 cytokine deficiency in donor T cells aggravates experimental acute graft-vs-host disease. *Exp Hematol* (2008) 36, 988-996.
 - 9) Maeda Y, Reddy P, Lowler KP, Liu C, Bishop DK, et al. : Critical role of host gammadelta T cells in experimental acute graft-versus-host disease. *Blood* (2005) 106, 749-755.
 - 10) Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, et al. : A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med* (2005) 11, 1244-1249.
 - 11) Asakura S, Hashimoto D, Takashima S, Sugiyama H, Maeda Y, et al. : Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces graft-versus-leukemia effects in mice. *J Clin Invest* (2010) 120, 2370-2378.
 - 12) Reddy P, Sun Y, Toubai T, Duran-Struuck R, Clouthier SG, et al. : Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. *J Clin Invest* (2008) 118, 2562-2573.
 - 13) Reddy P, Maeda Y, Hotary K, Liu C, Reznikov LL, et al. : Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101, 3921-3926.
 - 14) Choi SW, Braun T, Chang L, Ferrara JL, Pawarode A, et al. : Vorinostat plus tacrolimus and mycophenolate to prevent graft-versus-host disease after related-donor reduced-intensity conditioning allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation : a phase 1/2 trial. *Lancet Oncol* (2014) 15, 87-95.
 - 15) Sugiyama H, Maeda Y, Nishimori H, Yamasuji Y, Matsuoka K, et al. : Mammalian target of rapamycin inhibitors permit regulatory T cell reconstitution and inhibit experimental chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* (2014) 20, 183-191.
 - 16) Fujiwara H, Maeda Y, Kobayashi K, Nishimori H, Matsuoka K, et al. : Programmed death-1 pathway in host tissues ameliorates Th17/Th1-mediated experimental chronic graft-versus-host disease. *J Immunol* (2014) 193, 2565-2573.
 - 17) Asano T, Meguri Y, Yoshioka T, Kishi Y, Iwamoto M, et al. : PD-1 modulates regulatory T-cell homeostasis during low-dose interleukin-2 therapy. *Blood* (2017) 129, 2186-2197.
 - 18) Nishimori H, Maeda Y, Teshima T, Sugiyama H, Kobayashi K, et al. : Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood* (2012) 119, 285-295.
 - 19) Uryu H, Hashimoto D, Kato K, Hayase E, Matsuoka S, et al. : alpha-Mannan induces Th17-mediated pulmonary graft-versus-host disease in mice. *Blood* (2015) 125, 3014-3023.
 - 20) Nishimori H, Maeda Y, Tanimoto M : Chronic graft-versus-host disease : disease biology and novel therapeutic strategies. *Acta Med Okayama* (2013) 67, 1-8.
 - 21) Maeda Y, Nishimori H, Inamoto Y, Nakamae H, Sawa M, et al. : An Open-labeled, Multicenter Phase II Study of Tamibarotene in Patients with Steroid-refractory Chronic Graft-versus-Host Disease. *Acta Med Okayama* (2016) 70, 409-412.
 - 22) Okamoto S, Fujiwara H, Nishimori H, Matsuoka K, Fujii N, et al. : Anti-IL-12/23 p40 antibody attenuates experimental chronic graft-versus-host disease via suppression of IFN-gamma/IL-17-producing cells. *J Immunol* (2015) 194, 1357-1363.