

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）  
研究分担報告書

マウスモデルを使った HLA 不適合移植後の免疫寛容の誘導に関する検討

研究分担者 前田嘉信

研究要旨 同種造血幹細胞移植は、白血病などの悪性疾患に対する根治的治療として確立しているが、致死の合併症である移植片対宿主病（GVHD）は今日なお克服すべき課題である。GVHD は急性 GVHD と移植後期に発症する慢性 GVHD に大別される。急性 GVHD の基本的な発症メカニズムは次第に明らかとなってきたが、慢性 GVHD は病態の解明が遅れている。我々は、マウスモデルを用い、慢性 GVHD の発症に Th2 細胞だけでなく Th1 細胞と Th17 細胞も関与していることを明らかにしてきた。特に IL-17 と IFN- $\gamma$  を同時に産生する Th17/Th1 細胞が特異的に出現しており、Th17 細胞の亜型である alternative Th17 が慢性 GVHD に関与する可能性が示唆された。alternative Th17 および Th1 細胞の両方を抑制する目的で、IL-12/IL-23 p40 抗体の有効性を検討した。その結果、p40 抗体を投与した群では、臨床的かつ病理組織学的に慢性 GVHD が有意に軽減された。IL-17 産生細胞の T-bet 発現を検討した結果、Th17 が alternative からより免疫抑制的な classical Th17 にシフトしており、p40 抗体の慢性 GVHD 抑制のメカニズムであると考えられた。ヒトに対する p40 抗体は、Ustekinumab としてクローン病や乾癬に対する臨床試験の結果が報告されており、慢性 GVHD にも臨床応用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、白血病などの悪性疾患に対する根治的治療として確立しているが、致死の合併症である移植片対宿主病（GVHD）は今日なお克服すべき課題である。GVHD は急性 GVHD と移植後期に発症する慢性 GVHD に大別される。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。我々は、慢性 GVHD の発症に Th2 細胞だけでなく Th1 細胞と Th17 細胞も関与していることを明らかにしてきた。特に IL-17 と IFN- $\gamma$  を同時に産生する Th17/Th1 細胞（alternative Th17）が特異的に出現しており、Th17 細胞の亜型

である alternative Th17 が慢性 GVHD に関与する可能性が示唆された。alternative Th17 および Th1 細胞の両方を抑制する目的で、IL-12/IL-23 p40 抗体の有効性を検討した。

B. 研究方法

ドナーに B10.D2、ホストに BALB/c を使ったマウス慢性 GVHD モデルを作成した。骨髓幹細胞（T 細胞除去した BM  $8 \times 10^6$ ）と脾臓から採取した T 細胞（ $2 \times 10^6$ ）を 5.8Gy 照射したマウスに移植。p40 抗体は 500 $\mu$ g を day0 から投与し、慢性 GVHD 発症が抑制されるかを検討した。慢性 GVHD は皮膚所見の臨床的

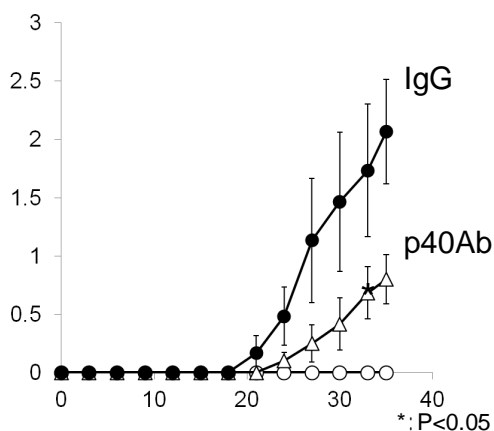
GVHD スコア、病理スコアにて評価し、Th 細胞への影響は、細胞内サイトカインを FAC にて解析した。

本実験計画は岡山大学実験動物実験委員会に承認済みである。すべての実験動物は動物愛護の観点から、計画的にできるだけ少ない個体数での実験とした。

### C. 研究結果

p40 抗体を投与した群は、慢性 GVHD 発症が臨床的スコア、皮膚、唾液腺の病理スコアが有意に改善した。

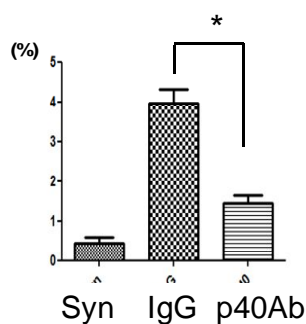
#### Clinical Score



また、移植後 28 日目のドナー T 細胞を FACS にて解析した結果、Th1 細胞の抑制とともに INF- $\gamma$ /IL-17 同時に産生細胞 (alternative Th17) が有意に減少していた。一方、IL-17 単独陽性の細胞は減少しておらず、ROR $\gamma$ t も抑制されていないが、T-bet の発現が低下しており、alternative Th17 細胞が抑制されている所見を支持する結果であった。以上から 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、移植後 15 日目の慢性 GVHD が発症する時期からの投与でも軽減させることがわかり治療としての有効性が示唆された。

#### IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup>



\*: P < 0.05

### D. 考察

p40 抗体により INF- $\gamma$ /IL-17 同時産生細胞 (alternative Th17) が有意に減少しており、IL-17 単独陽性の classical Th17 細胞は減少していないことから、全ての Th17 細胞ではなく、subset を抑制することで慢性 GVHD が制御できる可能性が示唆された。IL-12 および IL-23 を介した経路が今後、慢性 GVHD の治療標的となり得ることが明らかとなった。

### E. 結論

p40 抗体により Th1 および alternative Th17 が抑制され、慢性 GVHD が改善した。今後、慢性 GVHD の治療薬としての効果が期待される。

F. 健康危険情報  
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugiyama H, Maeda Y, Nishimori H, Yamasuji Y, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, Shinagawa K, Tanaka T, Takeuchi K, Teshima T, and Tanimoto M. mTOR inhibitors permit regulatory T cell reconstitution and inhibit chronic GVHD. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2013 (in press)
- 2) Maeda Y, Pathogenesis of graft-versus-host disease: innate immunity amplifying acute alloimmune responses. **Int J Hematol**. 2013 ;98(3):293-9.
- 3) Nishimori H, Maeda Y, Tanimoto M. Chronic graft-versus-host disease: disease biology and novel therapeutic strategies. **Acta Med Okayama**. 2013;67(1): 1-8
- 4) Nishimori H, Maeda Y, Teshima T, Sugiyama H, Kobayashi K, Yamasuji Y, Kadohisa S, Uryu H, Takeuchi K, Tanaka T, Yoshino T, Iwakura Y, and Tanimoto M. Synthetic Retinoid Am80 Ameliorates Chronic Graft-Versus-Host Disease by Downregulating Th1 and Th17 **Blood**. 119(1):285-95, 2012
- 4) Teshima T, Maeda Y, Ozaki K.

Regulatory T cells and IL-17-producing cells in acute graft-versus-host disease. **Immunotherapy**. 2011;3(7):833-52

2. 学会発表

- 1) Fujiwara H, Maeda Y, Kobayashi K, Nishimori H, Nishinohara M, Okamoto S, Matsuoka K, Kondo E, Fujii N, Shinagawa K, Tanimoto M. PD-1 pathway of donors and recipients modulate chronic graft-versus-host disease through Th1 and Th17 in mouse model. 日本造血幹細胞移植学会 2014 3/7-9 沖縄
- 2) H Fujiwara, K Kobayashi, H Nishimori, M Nishinohara, S Okamoto, K Matsuoka, E Kondo, N Fujii, K Shinagawa, M Tanimoto and Y Maeda. Contribution of the PD-1-PD-L pathway to chronic graft-versus-host disease. (BMT Tandem Meetings) 2013 2/15-18 Salt Lake
- 3) H Fujiwara, Y Maeda, K Kobayashi, H Nishimori, K Matusoka, M Azuma, Y Hideo, L Chen, and M Tanimoto. Host tissue PD-1 pathway contribute to murine chronic graft-versus-host disease via Th1+Th17+ cells. ASH 2013 12/6-10 New Orleans
- 4) Nishimori H, Maeda Y, Teshima T, Sugiyama H, Kobayashi K, Yamasuji Y, Kadohisa S, Uryu H, Takeuchi K, Tanaka T, Yoshino T, Iwakura Y, and Tanimoto M.

Donor Th17 and Th1 contribute to  
chronic graft-versus-host disease  
(BMT Tandem Meetings) 2011/2

H.知的財産権の出願・登録状況(予定  
を含む。)

1. 特許取得  
特になし。
2. 実用新案登録  
特になし。
3. その他  
特になし