

厚生労働省科学研究委託費（難治性疾患等実用化研究事業
（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 移植医療技術開発研究分野））

委託業務成果報告（業務項目）

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

担当責任者 前田 嘉信 岡山大学病院 血液・腫瘍内科 講師

研究要旨 悪性疾患に対する根治的治療として同種造血幹細胞移植が行われているが、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の発症時にIL-17とIFN- γ を同時に産生するTh17/Th1細胞が特異的に出現することを明らかにし、Th17細胞の亜型であるalternative Th17が慢性GVHDに関与している可能性が示唆された。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いるが、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。p40抗体を投与した群では、IL-17とIFN- γ を同時に産生するTh17/Th1細胞が減少、さらにIL-17産生細胞におけるT-betの発現は低下していたが、ROR- γ tの発現はむしろ増加傾向にあった。p40抗体は、Th17がalternativeからより免疫抑制的なclassical Th17にシフトさせることにより慢性GVHDを軽減させることが示唆された。

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- γ 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。また、その効果のメカニズムについても検討した。

B. 研究方法

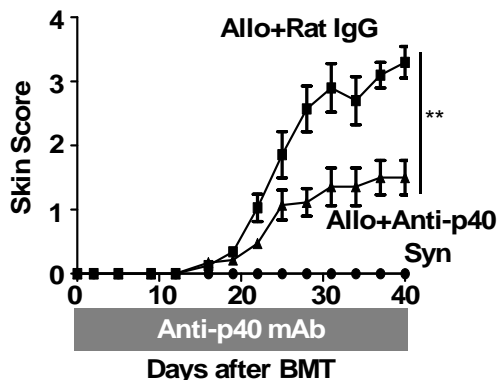
ドナーにB10.D2、ホストにBALB/cを使ったマウス慢性GVHDモデルを作成した。骨髓幹

細胞 (T 細胞除去した BM 8×10^6) と 脾臓から採取した T 細胞 (2×10^6) を 5.8Gy 照射したマウスに移植。p40 抗体は 500 μ 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、および T-bet と ROR γ t の発現を FACS 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。

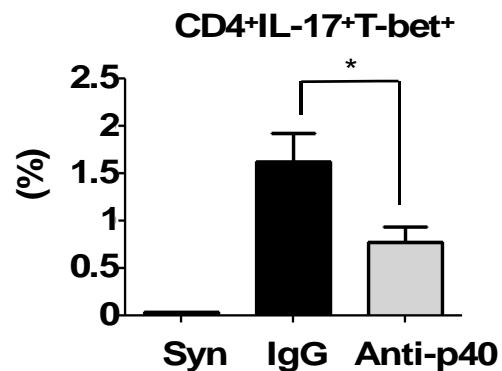
C. 研究結果

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。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。



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- γ /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 γ t も抑制されていなかった。一方、T-bet の発現は低



下、皮膚浸潤しているドナー細胞も IFN- γ の産生が低下しており、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。

D. 考察

p40 抗体により INF- γ /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) Okamoto S, Fujiwara H, Nishimori H, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, Tanaka T, Yoshimura A, Tanimoto M, Maeda Y. Anti-IL-12/23 p40 antibody attenuates experimental chronic graft versus host disease via suppression of IFN- γ /IL-17-producing cells. **J Immunol**. 2015 in press
- 2) 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**. 2014;20(2):183-91.
- 3) Maeda Y, Pathogenesis of graft-versus-host disease: innate immunity amplifying acute alloimmune responses. **Int J Hematol**. 2013 ;98(3):293-9.

- 4) 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
 - 5) 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
- ### 2. 学会発表
- 1) Taiga Kuroi, Sachiyo Okamoto, Kyosuke Saeki, Yujin Kobayashi, Hisakazu Nishimori, Hideaki Fujiwara, Ken-ichi Matsuoka, Nobuharu Fujii, Eisei Kondo, Mitsune Tanimoto, Yoshinobu Maeda Anti-IL-12/23 p40 Antibody Attenuates Chronic Graft Versus Host Disease Via Suppression of IFN- γ /IL-17-Producing Cells American Society of Hematology 56th Annual Meeting, San Francisco December 5, 2014
 - 2) 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

3) 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

4) 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

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