

表 題 免疫細胞 Toll 様受容体 7 を介する同種造血幹細胞移植後フォロ
デシン投与の影響

論文の区分 博士課程

著 者 名 池田 喬司

担当指導教員氏名 神田 善伸 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学系専攻
専攻分野 血液・免疫疾患学
専攻科 血液病学

2023 年 1 月 10 日申請の学位論文

目次

要旨	2
背景	4
方法	6
結果	12
考察	27
謝辞	32
引用	33

要旨

プリンヌクレオチドホスホリラーゼ(PNP)阻害剤はデオキシグアノシン・グアノシンの代謝を阻害することで、デオキシグアノシン 3リン酸の蓄積を通じてT細胞のアポトーシスをもたらす。一方、最近の研究によるとグアノシンやその派生物質といった一部のグアニンヌクレオチドが Toll 様受容体 7(TLR7)のリガンドになることが示されている。こうした事実は PNP 阻害剤が T 細胞のアポトーシスを起こすだけでなく、細胞外に数多くのヌクレオチドを放出する移植片対宿主病(GVHD)において、グアニンヌクレオチドの蓄積を通じてTLR7の活性化をもたらす可能性を示唆している。

我々は、PNP 阻害剤であるフォロデシンが GVHD に及ぼす影響について、GVHD モデルマウスを用いて検討した。フォロデシンは異種 GVHD モデルマウスの重症度を改善し、生存延長をもたらした。通常 GVHD では組織破壊により漏出した血漿のグアニンヌクレオチドは PNP で代謝されるが、フォロデシンを投与された動物ではその代謝が阻害され、組織におけるグアニンヌクレオチドの濃度が著しく増加した。この状況を *in vitro* で再現した実験で、フォロデシンとグアニンヌクレオチドを添加することで肺胞マクロファージや骨髄由来形質細胞様樹状細胞が TLR7 を介して炎症性サイトカインを産生することを示した。ヒトリンパ球、マウス形質細胞様樹状細胞のリンパ球混合反応の解

析では、CD3 陽性 T 細胞の CD69 の発現上昇、CD8 陽性 T 細胞の増殖、培養上清の IFN γ 、IL12p40 の産生増加を示すことから、フォロデシンは抗原提示能を増強させることも示した。また、フォロデシンは CD3/28 刺激で活性化している T 細胞のインターフェロン (IFN) γ の産生を増強することを示した。

同種 GVHD モデルマウスにフォロデシンを投与すると、GVHD マウス、放射線だけのマウスと比較して TLR7 経路に合致して種々の炎症性サイトカイン、ケモカインの濃度が上昇することも明らかにした。以上まとめると、フォロデシンは GVHD 微小環境において高濃度のグアノシンを介して TLR7 発現細胞に影響を与える。これにより産生されるサイトカインの影響は多様で、T 細胞の活性化だけでなく細胞死も誘発しうる。すなわち、フォロデシンはプリンヌクレオチド代謝とサイトカイン産生誘導という複合的機序によって GVHD を抑制する可能性が示唆された。

背景

フォロデシンはプリンヌクレオチドホスホリラーゼ(PNP)阻害剤である。PNP を阻害することで細胞内に蓄積したデオキシグアノシン(dGuo)がリン酸化され、デオキシグアノシン三リン酸(dGTP)が蓄積することにより、T細胞をアポトーシスに導く。この作用により、日本では末梢性 T 細胞リンパ腫の治療薬として承認されている[1]。一方、その副作用としてリンパ球減少が全例に起きる。フォロデシンはその特性を生かして固形癌[2]、慢性リンパ性白血病[3] [4]などの悪性腫瘍、さらには移植片対宿主病(GVHD)[5]に有効でないか研究が進められている。一方、PNP が関わるグアニンヌクレオチドと自然免疫の関係が注目されている。Toll 様受容体(TLR)の一種である TLR7 は、一本鎖 RNA を認識するエンドソーム自然免疫センサーとして知られている。最近の研究によるとヒト・マウスの TLR7 は 2 つの結合部位があり、これらの結合部位にグアノシン(Guo)とその派生物質[6]、dGuo [7]が結合することが分かっている。TLR7 は形質細胞様樹状細胞、B 細胞に強く発現しており、その他、マクロファージ、ミエロイド系樹状細胞においても発現がある[8]。TLR7 はウイルスに対する免疫応答に関与する他、自己免疫疾患の原因として知られている。グアニンヌクレオチドによる TLR7 の刺激により、形質細胞様樹状細胞やマクロファージより炎症性サイトカインの産生がなされることが分かっている[6] [7]。これらの事

実から、PNP の欠損、薬理的な阻害により、グアニンヌクレオチドの蓄積がなされ、TLR7 シグナルの活性化が起きる可能性が示唆される。実際、PNP 欠損症の患者では免疫不全のほかに自己免疫疾患様の症状(甲状腺炎・全身性エリテマトーデス)を来すことが分かっている [9]。

炎症組織では、ダメージ関連分子パターンとして種々のヌクレオチドがその微小環境中に放出される。しかしながら、組織の炎症により細胞外に数多くのヌクレオチドが放出されている GVHD 環境下で PNP を阻害するとどのような影響を及ぼすかは分かっていない。そこで本研究では、GVHD モデルマウスを用いて、フォロデシンが GVHD に与える影響について検討した。

方法

試薬

フロロデシン(ムンデシン®)はムンディファーマ(Mundipharma、Tokyo、Japan)より提供を受けた。グアノシン、デオキシグアノシン、R848はシグマアルドリッチ(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)より購入した。ODN20958はミルテニーバイオテック(Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、Germany)より購入した。

細胞

ヒト末梢血単核球(PBMC)を採取するために、インフォームド・コンセントが得られた当研究室、本学の医師の健康な成人ボランティアから採血を行った。末梢血から PBMC を密度勾配遠心分離により分離した。磁気ビーズ(Miltenyi Biotec)法を用いて、ポジティブ・ネガティブセレクションによりヒト CD3 陽性 T 細胞を分離した。CD3/28 刺激ビーズ(Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA)を CD3 陽性 T 細胞 1×10^6 個あたり 25 μ l 使用して刺激を行った。マウス形質細胞様樹状細胞は、BALBc マウスの骨髄細胞を両側脛骨および大腿骨から採取し、遠心分離した後に赤血球を ACK 溶解緩衝液(Thermo Fisher Scientific)で溶解・洗浄を行い、10%ウシ胎児血清、0.1mg/ml ストレプトマイ

シン、300ng/ml/ml ヒト組み換え flt3 リガンド(PeproTech、Cranbury、USA)、100U/ml ペニシリン G(Invitrogen、Massachusetts、USA) および GlutaMAX(Thermo Fisher Scientific)を添加した Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Thermo Fisher Scientific)で7日間培養することで作成した。肺胞マクロファージは、肺組織をコラゲナーゼタイプ-1(1mg/ml、Worthington Biochemical)で溶解してできた細胞懸濁液を密度勾配法で単核球に分離を行い、磁気ビーズ(Miltenyi Biotec、CD11c 抗体)法を用いてポジティブセレクションにより単離した。マウス骨髄細胞の T 細胞除去は、磁気ビーズ(Miltenyi Biotec、CD90.2 抗体)法を用いてポジティブセレクションにより行った。

GVHD モデルマウス

雌の NOD/Shi-scid-IL2r γ^{null} (NOG)マウスを自治医科大学実験医学センターで飼育した。異種 GVHD モデルマウスを過去の報告通り作成した[10][11]。7-9週 of NOG マウスに対して移植4時間前に 250 cGy の放射線を照射し、ヒト T 細胞を移植した。同種 GVHD モデルマウスは BLABc(H2^d)マウスに 700 cGy の放射線照射をした後、C57BL/6 (B6, H2^b) の 1×10^6 の脾臓細胞と 1×10^7 の T 細胞除去した骨髄細胞を移植することで作成した。GVHD の重症度は過去に報告されているクリニカルスコアで評価した[12]。

フローサイトメトリー

細胞の染色を FACS バッファー(2% ウシ血清アルブミン、1mM EDTA、25mM HEPES を添加した HBSS)を用いて行った。使用した抗体を表 1 に記載した。(表 1)細胞内サイトカインの染色には BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit(BD Bioscience、Franklin Lakes、USA)を使用した。細胞増殖の解析には CFDA SE Cell Tracer kit(Thermo Fisher Scientific)を使用した。BD LSRFortessa(BD Biosciences)でデータを取得し、FlowJo software を用いて解析を行った。

高速液体クロマトグラフィー

血漿は 6%トリクロル酢酸で酸化し、肝臓も 6%トリクロル酢酸でホモジェナイズした。ホモジェナイズしたサンプルは 10 分氷冷し、4 度、12000g、10 分で遠心分離した。上清を 5M K_2CO_3 で中和した。試料を高速液体クロマトグラフィー(Prominence-i, LC-2030C 3D Plus, Shimadzu, Kyoto, Japan)で解析した。解析に使用したカラムは Mightysil RP-18 GP (4.6 × 250 mm, 5 μ m; Kanto Chemicals, Tokyo, Japan)であった。

リンパ球混合反応

リンパ球混合反応を丸底 96 ウェルプレートで行った。ヒト T 細胞 1×10^5 、マウス形質細胞様樹状細胞 5×10^4 を 6 日間共培養した。形質細胞様樹状細胞は反応前に 200cGy の放射線照射を行った。

サイトカイン測定

ヒト IFN- γ (Cat# 430104), マウス TNF-a (Cat# 430904), マウス IL-12/IL-23(p40) (Cat# 431604) を Biolegend より購入した。一酸化窒素は Griess reagent kit(Promega)で計測を行った。

チミジン取り込みアッセイ

PBMC 1×10^5 を 5%CO₂ インキュベーター内、37°C で 48 時間培養を行った。培養の最後の 8 時間、1mCi(3.7×10^7 Bq)の [³H]-チミジン(General Electric、Massachusetts、USA)を添加した。培養終了後、Packard FilterMate harvester (Perkin Elmer、Massachusetts、USA)を用いて細胞を回収して UniFilter プレート(Perkin Elmer)に移し、トップカウントマイクロプレートシンチレーションカウンター(Perkin Elmer)で分析した。

統計分析

Prism、EZR を用いて統計解析を行った[13]。EZR は R Commander の改訂版である。Kaplan-Meier 生存曲線を log-rank 検定により比較した。GVHD スコアおよび移植時からの体重の推移を post hoc Bonferroni 検定を用いた反復測定分散分析(repeated measures ANOVA)で分析した。

表1 フローサイトメトリー解析に使用した抗体と細胞染色試薬のリスト

Species	Antibody	Clone	Supplier	Cat Number	Fluorophore
human	CD3	UCHT1	BioLegend	300406	FITC
human	CD3	OKT3	BioLegend	317335	PerCP-5.5
human	CD3	UCHT1	BioLegend	300464	BV711
human	CD4	RPA-T4	BioLegend	300532	BV421
human	CD4	RPA-T4	BD pharmingen	555347	PE
human	CD8	OKT8	Thermo Fisher	2071329	APC
human	CD45	HI30	BioLegend	304016	PECy7
human	CD45	HI30	BioLegend	304062	APC/fire
human	CD69	FN50	BioLegend	310906	PE
human	IFN γ	4S.B3	BioLegend	502506	FITC
human	PD1	EH12.2H7	BioLegend	329920	BV421
mouse	B220	RA3-6B2	BD pharmingen	553092	APC
mouse	CD11b	M1/70	BioLegend	557396	FITC
mouse	CD11c	HL3	BD pharmingen	557401	PE
mouse	CD45	30-F11	BioLegend	103140	BV605
N/A	CFDA	N/A	Thermo Fisher	V12883	FITC
N/A	Fixable Viability Dye eFluor 660	N/A	Thermo Fisher	65-0864-14	APC
N/A	7AAD	N/A	BD Biosciences	559925	PerCP5.5

N/A	Annexin V	N/A	BD Biosciences	556421	PE
-----	-----------	-----	-------------------	--------	----

N/A: not applicable

結果

フォロデシンは異種 GVHD モデルマウスの重症度と生存を改善する

フォロデシンはヒト T 細胞内の dGTP 濃度を増加させ、T 細胞特異的にアポトーシスを起こす[14] [15]。この効果はヒト特異的であり、他の動物では起きないことが分かっている[14]。そこで我々は、*in vivo* でのフォロデシンの効果を検証するために、我々が過去に報告した異種 GVHD モデルマウスを使用し検証を行った。

NOG マウスにヒト T 細胞 1×10^6 個を移植し、フォロデシン、もしくはその溶媒を移植後 1 日目から 2 週にかけて腹腔内注射で投与を行った (図 1A)。血漿のフォロデシン濃度は腹腔内注射後 30 分にピークとなり、その後徐々に低下するが、注射後 6 時間でもリンパ球の PNP 活性を阻害する IC50 より高い濃度を維持していた[14](図 1 B)。フォロデシン投与により異種 GVHD モデルマウスの生存日数が生存中央値 17.5 vs14.0 日で有意に延長した($p=0.029$ 、図 1C)。異種 GVHD モデルマウスの体重減少率は移植後 8 日目で 10.2vs23.3%とフォロデシン投与群で有意に低かった($p=0.009$ 、図 1D)。さらに、GVHD スコアはフ

フォロデシン投与群で有意に低かった(移植後 8 日目、0.6vs4.9 点、 $p=0.001$ 、図 1E)。移植するヒト T 細胞の個数を 1×10^6 から 5×10^6 個に増加させたとしても、異種 GVHD モデルマウスの生存、体重減少率、GVHD スコアはフォロデシン投与群で改善していた($p < 0.05$ 、図 1F、図 1G、図 1H)。しかし、異種 GVHD モデルマウスの生存延長効果にも関わらず、フォロデシン投与群とコントロール群の間に肺に浸潤したヒト T 細胞の割合・数に有意差は認められなかった(図 1I)。また、肺に浸潤した T 細胞の Annexin V の発現、細胞内 IFN γ 、Ki67 に発現においても両群間に有意差はなかった(未発表)。

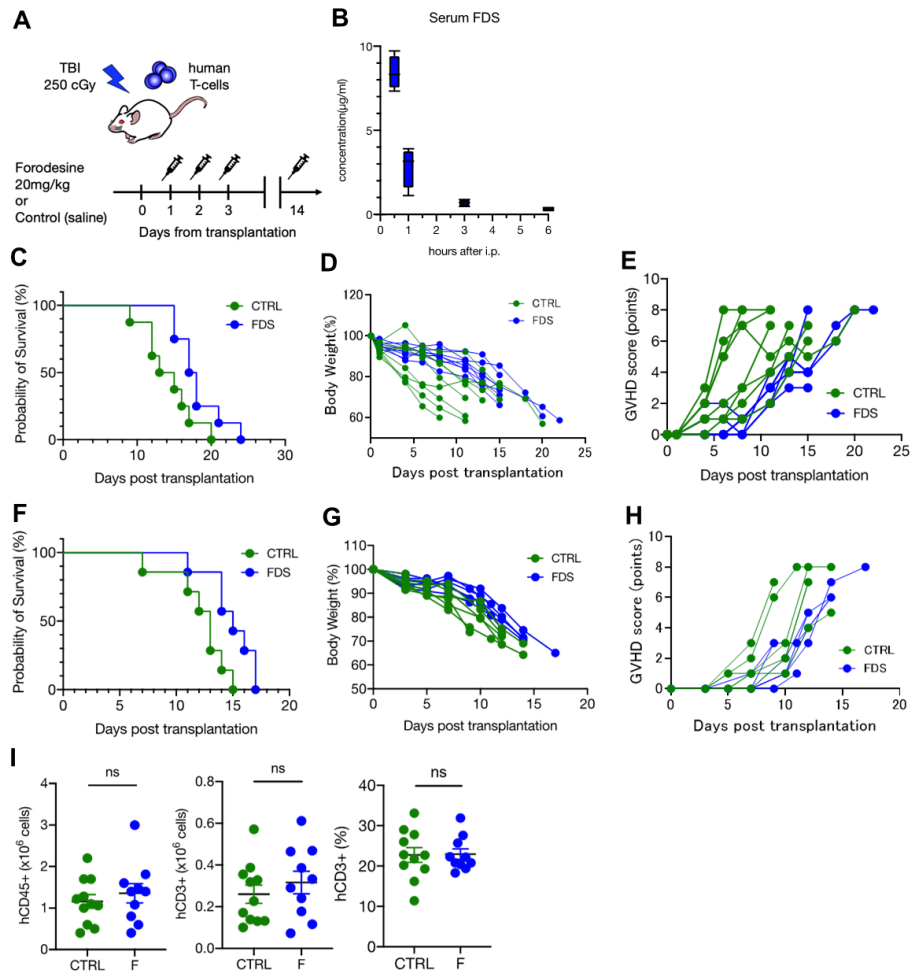


図1. フォロデシンがGVHDマウスのグアニンヌクレオチド濃度に及ぼす影響

NOGマウスに移植4時間前に250cGy放射線照射した後、ヒトT細胞を移植して異種GVHDモデルマウスを作成した

(A) 異種GVHDモデルマウスに対するフォロデシンの治療モデルの模式図。異種GVHDモデルマウスに対してフォロデシン(20mg/kg)、ないし溶媒を1日1回14日間腹腔内注射した。(各群 n=7)。CTRL: コントロール、FDS: フォロデシン。

(B) フォロデシン(FDS) 20mg/kgを単回腹注したときのFDS血漿濃度の推移

(C-E) ヒトTリンパ球を 1.0×10^6 個移植した場合の(C)全生存率、(D)体重減少率、(E)GVHD score。FDS群で生存の延長、day8での体重減少率の緩和、GVHD scoreの改善を認めた。(p<0.05)

(F-H) ヒトTリンパ球を 5.0×10^6 個移植した場合の(F)全生存率、(G)体重減少率、(H)GVHD score。FDS群で生存の延長、day8での体重減少率の緩和、GVHD scoreの改善を認めた。(p<0.05)

(I) Day9の肺に浸潤したコントロール(CTRL)とフォロデシン(F)投与群のhCD45陽性、hCD3陽性細胞の細胞数・細胞割合のフローサイトメトリーによる解析。両群で有意差は認めなかった。平均値±SEMで表した。ns: not significant。

フォロデシンが GVHD マウスのグアニンヌクレオチド濃度に及ぼす影響

GVHD マウスのグアニンヌクレオチド濃度を解析するために図 2A のようにマウスを作成した。移植後 2、7 日目に血漿、肝臓の dGuo、Guo の濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定を行った。血漿の Guo 濃度はコントロールのマウス、放射線照射マウス群で検出感度以下であった(図 2C)。ヌクレオチド、その派生物質は炎症に伴う組織破壊により放出されるが[16]、血漿の Guo は GVHD を惹起したマウスでも検出はされなかった(図 2B 上、図 2C)。これは、血漿中の PNP が組織より漏出した Guo を代謝したためと考えた。その考えに合致して、移植後 2 日目のフォロデシン投与した GVHD マウスとフォロデシン投与のみを行った 2 日目のマウスで、同程度に血漿の Guo 濃度が増加していた。特に GVHD の進行に伴う組織破壊とフォロデシンによる PNP 阻害が相まって、移植後 7 日間フォロデシンを投与した GVHD マウス群で血漿 Guo 濃度が著増していた(図 2C)。フォロデシン投与されたマウスにおいて Guo の組織濃度は血漿濃度の約 10 倍程度あり(図 2D)、GVHD の微小環境において Guo 濃度は高いものと考えられた。血漿の dGuo 濃度は Guo と同様の傾向であったが(図 2E)、dGuo の肝臓の組織濃度はどのマウスにおいても検出感度以下であった(未発表)。

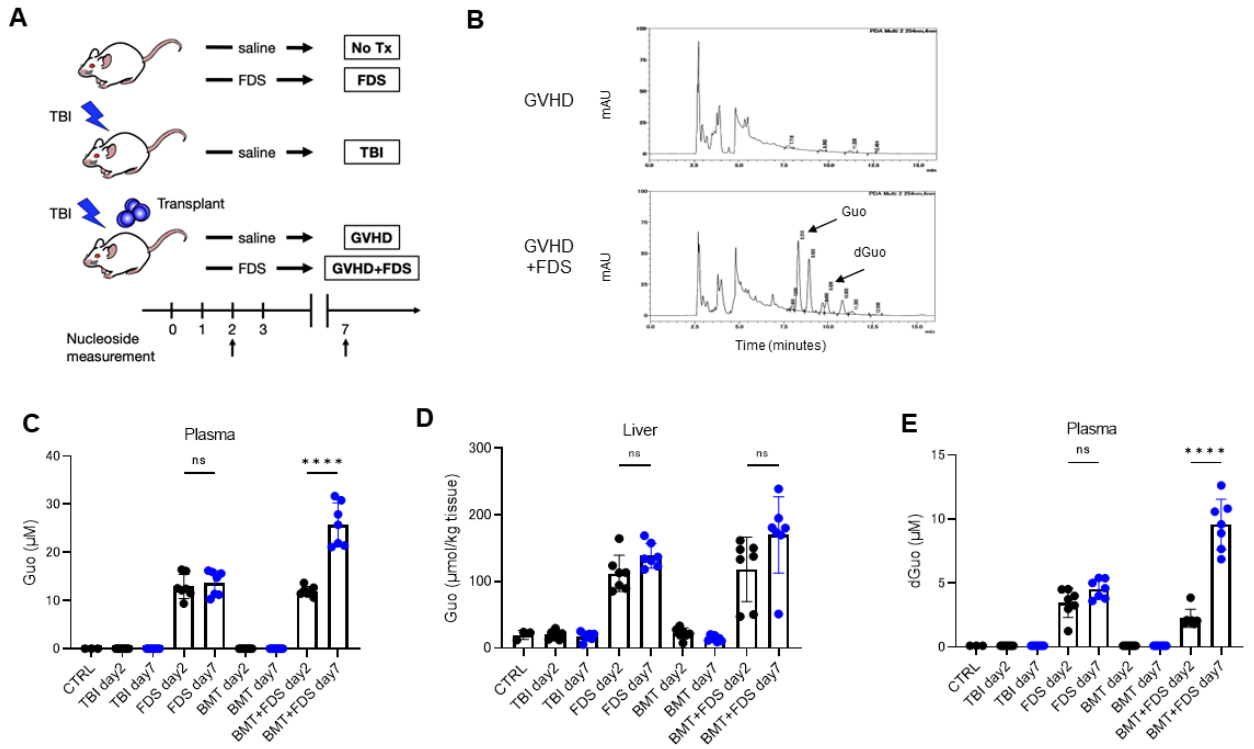


図2. フォロデシン投与 GVHD マウスの組織・血漿中のグアニンヌクレオチド蓄積

同種 GVHD モデルは BALBc マウスに 700 cGy の放射線照射を行い、B6 由来の 1×10^6 脾臓細胞と 1×10^7 T 細胞除去した骨髄細胞を移植することで作成した。フォロデシン(20mg/kg)ないし溶媒を 1 日 1 回腹注して各群に分けた。Day2、day7 に解剖し解析を行った。

(A)実験の概略図

(No Tx/CTRL:コントロール、FDS:フォロデシン治療群、TBI:放射線照射群、GVHD:骨髄移植群、GVHD+FDS:骨髄移植群+フォロデシン治療群)

(B)血漿 dGuo・Guo 濃度の高速液体クロマトグラフィーの代表的な図。フォロデシン投与 GVHD マウスで高速液体クロマトグラフィーにおいて dGuo、Guo のピークが観察された。

(上のパネル) GVHD 群、(下のパネル) GVHD+FDS 群。

(C)FDS 群で解剖日によらず Guo 血漿濃度が増加した。FDS 投与した day7 の GVHD 群で、蓄積した Guo が GVHD により組織外に漏出し、Guo 濃度が著明に増加した。(p<0.05)

(D)肝臓の Guo 組織濃度は、FDS 投与群で有意に増加した。(p<0.05)その効果は時間、GVHD の有無に影響を受けなかった。

(E)血漿 dGuo 濃度は(C)と同様の傾向を示し、FDS 投与した day7 の GVHD マウスで最も高かった。

フォロデシンは TLR7 を介して肺胞マクロファージ、形質細胞様樹状細胞から

炎症性サイトカイン産生を促す

グアニンスクレオチド及びその派生物質は TLR7 の刺激を介してヒト・マウスの免疫細胞から炎症性サイトカイン産生を促すことが分かっている[6]。フォロデシンによりグアニンスクレオチド濃度が上昇して TLR7 刺激が促されるか検討するため、肺胞マクロファージ・骨髄由来形質細胞様樹状細胞を Guo、dGuo、フォロデシン、R848(TLR7/8 アゴニスト)と 24 時間培養を行い、培養上清の TNFa の濃度を ELISA によって比較した。肺胞マクロファージに対して Guo500 μ M と共培養すると TNFa は増加したが統計学的に有意差はなかった(図 3A、 $p=0.83$)。しかし、フォロデシン 10 μ M と Guo500 μ M と同時に培養を行うと TNFa の濃度は有意に増加した(図 3A、 $p<0.0001$)。一方で、フォロデシンと dGuo500 μ M を共に培養しても TNFa の濃度は有意に増加しなかった。(図 3A、 $p>0.99$)過去の報告によると、dGuo500 μ M を骨髄由来マクロファージに添加すると TLR7 を介して炎症性サイトカインの産生が起きたが[7]、肺胞マクロファージではサイトカイン産生がなされず、同じマクロファージでもその由来によって dGuo に対する反応が変わることを示唆した。フォロデシン 10 μ M で固定した場合、TNFa の濃度は Guo 濃度依存性に増加した(図 3B)。事前に肺胞マクロファージを ODN20958(TLR7 阻害剤)2 μ M と 2 時間反応させた後、

フロロデシン、Guo と培養すると培養液上清中の TNFa の濃度は上昇しなかった (図 3C)。これはフロロデシン、Guo の作用が TLR7 を介していることを意味する。Guo を添加する 30 分前にベンゾアーゼ 250U/ml を添加しても、培養液中の TNFa の濃度は低下しなかった(図 3D)。これは培養液中に含まれる種々の核酸が肺胞マクロファージの TLR7 経路を活性化しているわけではないことを意味する。また、フロロデシン、Guo によって培養液中の一酸化窒素の濃度は増加することはなかった。これはフロロデシン、Guo が TLR4 を標的としていないことを意味した (図 3E)。

同様に、フロロデシン、Guo を骨髄由来形質細胞様樹状細胞と 24 時間培養すると、培養上清中の TNFa だけでなく、IL12p40 の濃度が上昇した(図 3F、図 3G)。dGuo 単独でも培養上清中の IL12p40 の濃度は上昇したが、Guo 単独の方が IL12p40 濃度の上昇があった。これは過去の報告通り、dGuo は TLR7 のリガンドとなりえるが[7]、Guo の方が同用量では TLR7 刺激作用が強いことを示唆する。

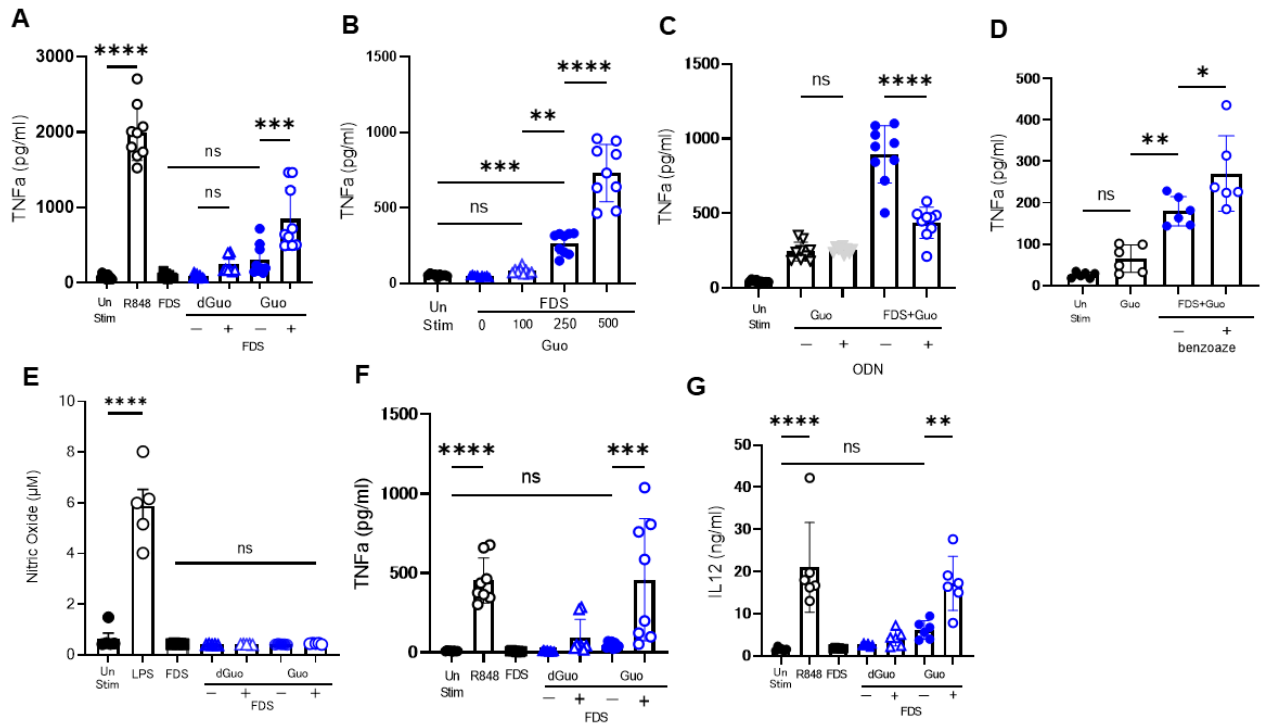


図3. フロロデシン、グアノシンがマクロファージ・形質細胞様樹状細胞のTLR7に及ぼす影響
細胞はGuo(500μM)、dGuo(500μM)、フロロデシン(FDS、10μM)、R848(TLR7/8アゴニスト、5μg/ml)で24時間培養した。TLR7阻害のためにODN20958(2μM)を刺激1時間前に添加した。ベンゾアラーゼの解析は、刺激30分前にベンゾアラーゼ(250U/ml)を添加した。(A-D、F)TNF-α、(E)一酸化窒素(NO)、(G)IL12をELISAで計測した。3回の独立した実験からの平均値±SEMを記載。Unstim:未刺激、+:添加群、-:非添加群、**p<0.01、***p=0.0001、****p<0.0001、ns: not significant。

(A-E)マクロファージの培養上清のサイトカイン。

(A) フロロデシン、グアノシン添加群で有意に培養上清のTNFα濃度が高かった。

(B) グアノシン濃度依存性に培養上清のTNFα濃度が高かった。

(C) フロロデシン、グアノシン添加に伴うTNFα濃度の増加はTLR7阻害剤により阻害された。

(D) 培養上清にヌクレアーゼ添加しても、フロロデシン・グアノシン添加群でTNFα濃度は低下しなかった。

(E) フロロデシン、グアノシン添加群でNO濃度の増加はなかった。

(F-G)形質細胞様樹状細胞の培養上清のサイトカイン

(F) フロロデシン、グアノシン添加群で有意に培養上清のTNFα濃度が高かった。

(G) フロロデシン、グアノシン添加群で有意に培養上清のIL12濃度が高かった。

フォロデシンは TLR7 刺激を介して抗原提示能を活性化する

次に我々はヒト T 細胞と骨髄由来形質細胞様樹状細胞のリンパ球混合反応にフォロデシンが与える影響について検討した。骨髄由来形質細胞様樹状細胞をフォロデシンと Guo で一晩培養を行い、リンパ球混合反応前に培養液をよく洗浄した。その後ヒト T 細胞と 6 日間共培養した。比較対象は未刺激の形質細胞様樹状細胞と R848 で刺激した形質細胞様樹状細胞とした。T 細胞の活性化マーカーである CD69 を解析すると、未刺激の形質細胞様樹状細胞と比較して、フォロデシンと Guo で刺激した形質細胞様樹状細胞と共培養したヒト T 細胞の方が CD69 の発現が有意に高かった。(図 4A)同様にフォロデシンと Guo で刺激した形質細胞様樹状細胞と共培養したヒト T 細胞においては、CD8 陽性細胞のみに細胞増殖がみられた。(図 4B)ヒト T 細胞とマウス形質細胞様樹状細胞のリンパ球混合反応した培養液で ELISA を行ったところ、フォロデシンと Guo で刺激した形質細胞様樹状細胞とヒト T 細胞と共培養した群において、ヒト IFN γ とマウス IL12p40 の培養液中濃度が高かった。(図 4C、図 4D)

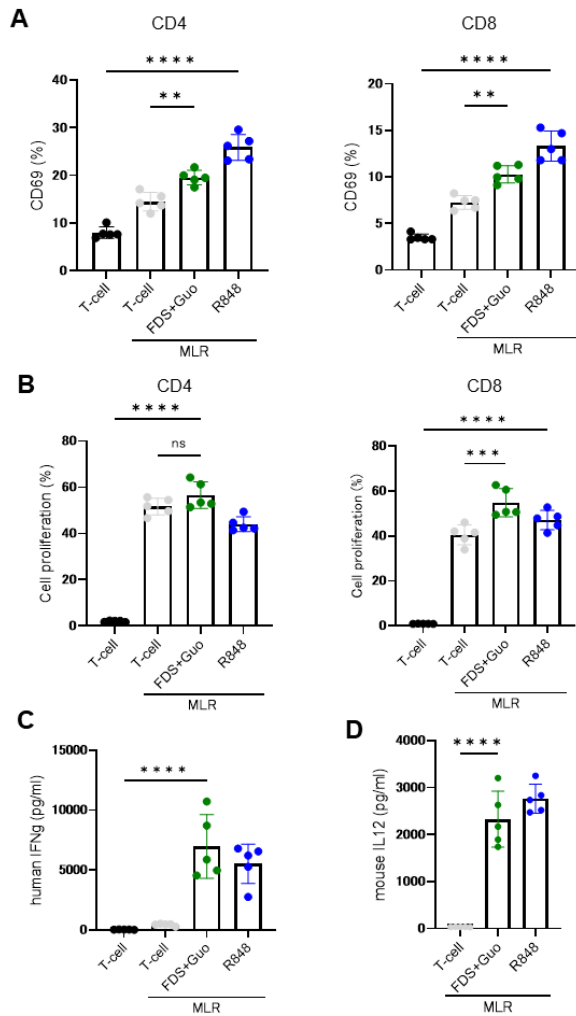


図 4. T 細胞とフロロデシン・グアノシンで刺激した形質細胞様樹状細胞とのリンパ球混合反応

リンパ球混合反応 (MLR) は反応細胞 (ヒト T 細胞 1×10^5) と刺激細胞 (マウス形質細胞様樹状細胞 5×10^4) を 6 日間共培養した。マウス形質細胞様樹状細胞はリンパ球混合反応の前に 200cGy 放射線照射を行った。形質細胞様樹状細胞の刺激はフロロデシン (10 μ M) と Guo (500 μ M) で行った。コントロールとして未刺激の形質細胞様樹状細胞の群とポジティブコントロールとして R848 (5 μ g/ml) で形質細胞様樹状細胞を刺激した群を作成した。

(A) フロロデシン・グアノシンで刺激した形質細胞様樹状細胞群が未刺激の形質細胞様樹状細胞群よりも CD4、CD8 陽性 T 細胞において CD69 の発現 (%) が高かった。

(B) フロロデシン・グアノシンで刺激した形質細胞様樹状細胞群が未刺激の形質細胞様樹状細胞群よりも CD8 陽性 T 細胞において増殖した細胞分画 (%) が高かった。

(C、D) フロロデシン・グアノシンで刺激した形質細胞様樹状細胞群で培養上清のヒト IFN γ 、マウス IL12p40 濃度は高かった。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 、ns: not significant.

One-way ANOVA 解析。3 回の独立した実験の平均値 \pm SEM。

フォロデシンは活性化した T 細胞のアポトーシスと細胞増殖抑制を行うが、細胞内 IFN γ の産生を高める

フォロデシンは dGuo の代謝を阻害し、dGuo はそれ自体が TLR7 のリガンドであることが示されている [7]。TLR7 はヒト T 細胞に発現しており、T 細胞受容体刺激と TLR7 刺激を同時に起こすことで CD8 陽性細胞のエフェクター機能を高めることが分かっている [17]。一方、フォロデシンは dGuo の代謝阻害により dGTP の T 細胞内の蓄積を起こし、細胞死を起こすことが示されている [2]。こうした報告もあることからフォロデシン、dGuo が T 細胞受容体を刺激した T 細胞にどのように影響するか検討を行った。まず、ヌクレオシド自体が活性化 T 細胞に及ぼす影響を検討した。過去の報告の通り [18] [19]、Guo と dGuo は濃度依存性に活性化 T 細胞の細胞死をもたらし、その増殖を抑制した (図 5A、5B)。この効果は dGuo、Guo の濃度が 100 μ M を超えると顕著であった。この濃度は肝臓の Guo 濃度に相当した (図 2D)。次にフォロデシンが *in vitro* の系でメディウム中にヌクレオシド濃度に及ぼす影響を検討した。dGuo 10 μ M に調整した培養液では 24 時間後では dGuo 濃度が約 50% になっていたが、フォロデシン 1 μ M 添加することで dGuo 濃度が維持された。メディウム中に含まれる PNP が 1 μ M のフォロデシンにより阻害させることにより dGuo 濃度の維持が起きたものと考えた (図 5C)。次にフォロデシン、dGuo が T 細胞の増殖と生

存に及ぼす影響を検討した。活性化 T 細胞の生存率は dGuo10 μ M、フォロデシン 1 μ M 単独では低下しなかったが、これらの併用により CD4 \cdot CD8 陽性 T 細胞の細胞死がもたらされた(図 5D)。同様にフォロデシン、dGuo を併用すると早期アポトーシスマーカーである AnnexinV の陽性率の増加、細胞の増殖の抑制がもたらされた(図 5E、図 5F)。最後に T 細胞受容体刺激と TLR7 刺激が T 細胞のエフェクター機能に及ぼす影響を検討した。dGuo10 μ M、フォロデシン 1 μ M と T 細胞受容体の刺激を行うと、CD4 \cdot CD8 陽性細胞ともに細胞内 IFN γ の産生が増加した(図 5G)。まとめると、フォロデシンは過去の報告の通り、T 細胞の増殖抑制と細胞死をもたらすが、TLR7 と T 細胞受容体を介して活性化ももたらすと考えられた。

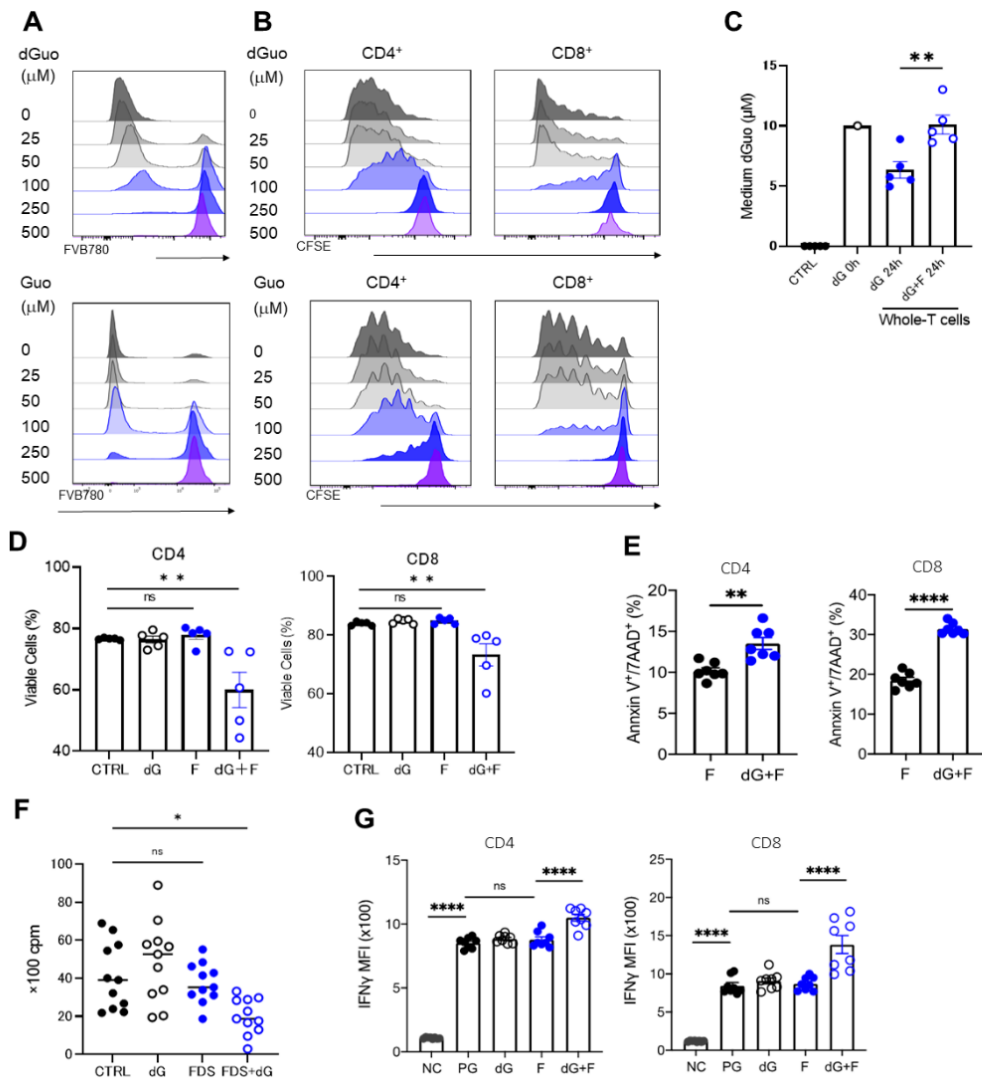


図5. フォロデシンはT細胞の細胞動態とIFN γ 産生に対するフォロデシンの影響

細胞をヒトCD3/28刺激ビーズで120時間(図5A、B、D)、もしくは48時間(図5E、F、G)刺激を行い、フォロデシンと様々な濃度のGuo、dGuo(0-500 μ M)の存在下で培養を行った。NC:CD3/28ビーズ未刺激、CTRL・PC:コントロール、dG:dGuo、FDS・F:フォロデシン。* $p < 0.05$ 、ns: not significant。

(A-B)dGuo、Guoはその濃度依存性に(A)T細胞の死細胞割合を増加させ、(B)CD4、CD8陽性T細胞の増殖を妨げた。

(C)フォロデシンはメディウム中のdGuoがPNPより代謝されるのを阻害した。

(D、E)T細胞をdG(10 μ M)、F(1 μ M)、もしくはdG+Fで培養したところ、dG+F群でCD4+、CD8+分画ともに(D)生細胞割合の割合が低下し、(E)後期アポトーシス細胞割合が増した。(各群 n=5)(D)one-way ANOVA解析。(E) Student's t-test。

(F) dG+F群で刺激した末梢血単核球細胞のチミジンの取り込みが有意に低下した。

(G)dG+F群で刺激したT細胞のCD4+、CD8+分画ともに細胞内IFN γ の平均蛍光強度が有意に増加した。

フォロデシン治療は GVHD マウスにおいて血漿のサイトカイン、ケモカインの

増加をもたらす

最後に、GVHD マウスにおけるフォロデシンの影響を調べるために、図 2A に示した実験の7日目のマウスで血漿のサイトカイン、ケモカインを計測した。フォロデシン投与により肝臓・血漿の Guo 濃度は上昇したが(図 2)、サイトカイン、ケモカインの濃度上昇はなかった。(図 6A) 多くのサイトカイン・ケモカインは放射線群と比較して GVHD 群で増加傾向であったが、有意差がついたのが IFN γ と CXCL1 のみであった($p=0.003$ 、 $p=0.002$ 、図 6B、図 6E)。 *In vitro* の実験結果に合致して、GVHD マウスにフォロデシン投与したところ、フォロデシン非投与 GVHD マウスと比較して IFN γ 、TNF- α 、IL-6 の増加を認めた(図 6B-D)。CXCL1 や CCL5 もまたフォロデシン投与した GVHD マウス群で有意に増加した(図 6E、図 6F)。これは TLR7 シグナルを活性化していることが示唆された。

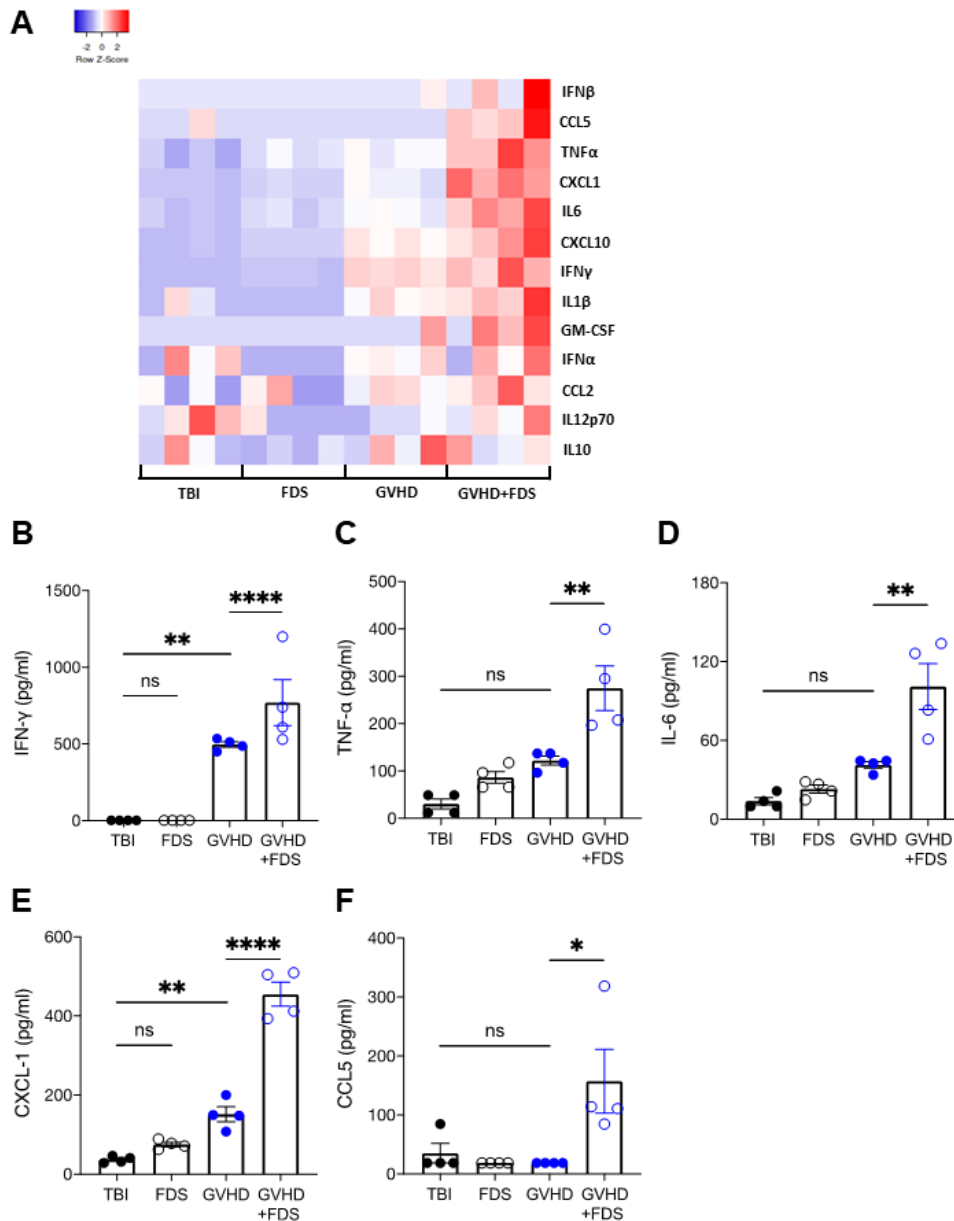


図6. フォロデシン投与 GVHD マウスの血漿サイトカイン・ケモカイン

BALB/c を 4 群に分けた。(各群 n=4)：TBI、放射線照射マウス(700cGy)；GVHD、骨髄移植マウス(B6→BALB/c)；FDS、フォロデシン治療マウス；GVHD+FDS、骨髄移植+フォロデシン治療マウス。7 日目の血漿を解析した。サイトカインとケモカインは LEGENDplex mouse anti-virus response panel(Biolegend、#760624)で解析を行った。

(A)各群のサイトカイン・ケモカインのヒートマップ(各群 n=4)

(B-F)フォロデシン投与 GVHD マウス群で各種サイトカイン・ケモカインが増加した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、**** $p < 0.0001$ 、ns: not significant、one-way ANOVA、平均値 \pm SEM で表した。

考察

本研究において我々は同種造血幹細胞移植後の免疫応答に対するフォロデシンの影響を検討した。フォロデシンにはヒト T 細胞の増殖抑制と細胞死をもたらす効果があり、ヒト異種 GVHD モデルマウスの生存を延長した。また、フォロデシンは同種 GVHD モデルマウスのグアノシン濃度を増加させ、TLR7 を介して免疫細胞のサイトカイン産生を促した。これらのフォロデシンによる T 細胞への影響は正負二面性があることが示唆された。

我々は、フォロデシンによる GVHD マウスの生存延長には、2つの機序が働いていると考えた。一つは PNP 阻害により T 細胞内に蓄積した dGTP がアポトーシスを引き起こす効果、二つ目は高濃度のグアノシンによる TLR7 刺激で免疫細胞から産生されるサイトカインにより T 細胞の活性化誘導細胞死が引き起こされる可能性である。

PNP 欠損症、フォロデシンの臨床試験に入った症例において T 細胞内の dGTP 蓄積により高度なリンパ球減少と免疫抑制が起きたと考えられる[2]。本研究では、フォロデシンは活性化ヒト T 細胞の増殖抑制と細胞死を起こし、ヒト異種 GVHD モデルマウスの生存延長をもたらしたが、ヒトで報告されているような高度な免疫抑制は起きなかった。最近の研究によると、マウスではヒトと比べて dC が多く、dGuo がリン酸化されるよりも dC が優先的にリン酸化され

ることが示されている[20]。これらを勘案すると、ヒト異種 GVHD モデルマウスでは、dGTP がヒトドナーT 細胞から相対的に濃度の低い組織に漏出し、ヒトで観察されるような高度の免疫抑制が起こらなかったと考えた。

また、我々はフォロデシン、グアノシンが TLR7 を介して抗原提示細胞の炎症性サイトカイン産生を促すことを示した。マウスへのフォロデシン投与によりグアノシンの肝組織濃度が約 200nmol/g tissue と著明に増加したが、これは *in vitro* の解析で使用したグアノシン濃度に相当し、実験系で観察された事象が生体内でも起こりうることを示している。マウス及びヒトでは、グアノシンを直接リン酸化する酵素はなく、グアノシンはプリンヌクレオチドホスホリラーゼによりグアニンに代謝され、サルベージ経路を介してグアノシン 1 リン酸、グアノシン 3 リン酸に代謝される[21]。我々が観察したフォロデシン投与時のグアノシン濃度の著明増加は、グアノシンからグアニンへの代謝阻害によるものと説明できる。この様な状況で起こる GVHD 微小環境下では、高濃度のグアノシンの漏出があり、そのグアノシンもグアニンに代謝されないため、組織のグアノシン濃度は高いままであろうと推測される。したがって、同種 GVHD マウスにフォロデシンを投与すると種々のサイトカイン・ケモカイン(TNF α 、IL6、IFN γ 、CXCL1、CXCL10、CCL5)が増加することを示しており、同種移植後にフォロデシン投与することでグアノシンに由来する TLR7 刺激が免疫細胞に起

きたものと考えた。炎症性サイトカインにより T 細胞のアポトーシスが起きることが知られている。IFN γ に伴う活性化誘導細胞死[22]や TNF α に伴う TNF レセプター経路を介した細胞死である[23]。同種移植後にフォロデシンを使用することで、炎症性サイトカインが増加しており、こうしたサイトカインに伴う T 細胞死が起きたものと考えた。

我々は、GVHD 微小環境において、フォロデシンにより蓄積した高濃度のグアノシンが漏出していることを示した。その高濃度のヌクレオシド自体が T 細胞の増殖抑制と細胞死をもたらすことを示した。また、dGTP の蓄積に伴う細胞死を起こすことも示した。その一方で、フォロデシン・グアノシンで刺激した形質細胞様樹状細胞は T 細胞への抗原提示能を増強することも示した。このようにフォロデシンは PNP 阻害を通して T 細胞に対して種々の影響を与える。こうした事実は同種移植後のフォロデシン使用により GVHD 微小環境において、T 細胞の増殖・分化・ネットワーク構築が破綻することを示唆している。

本研究では同種移植後のフォロデシンの TLR7 に及ぼす影響について検討したが、GVHD に TLR7 刺激が及ぼす影響はまだ結論がついていないことが知られている。GVHD マウスに対する TLR7 刺激は、その刺激の種類、刺激のタイミングによって、起こる結果は変わることが分かっている。TLR7 のリガンドが GVHD で増加して、治療標的になるという報告がある。例えば、エキソソーム

の miR-29a は TLR7/8 を介して樹状細胞を活性化させる。miR-29a を阻害することで、GVHD モデルマウスのドナー T 細胞の増殖を抑制し、サイトカイン産生を抑制し、生存の延長をもたらすことが分かっている [24]。また、TLR7 のリガンドである R848 をドナーマウスに移植前 48、24 時間に投与したところ、マウスの GVHD の表現型を改善したという報告がある [25]。この効果は R848 のドナーマウスへの投与が移植前 144、120 時間前になることで GVHD の改善効果は減弱した。TLR リガンドは、どのタイミングで働くかによって全く異なる効果を発揮するという報告は他にもあり、TLR7/8 のリガンドである 3M-011 は移植後に投与すると GVHD を悪化させ、死亡率を上げる一方で、移植前に投与すると臓器障害を減らし、むしろ生存を延長することが示されている [26][27]。以上より、同種移植後の PNP 阻害剤の使用による TLR7 の刺激は同種移植前後の使用のタイミングでおきる結果が変わると考えられる。状況やタイミングによっては、フォロデシンが GVHD 抑制に役立つ可能性があると考ええる。

我々は、同種移植後のフォロデシンの使用により、TLR7 を発現する免疫細胞に影響を与え、GVHD を抑制する可能性があることを図 7 に示した。ヌクレオチド、TLR7 刺激により多様な現象が起きており、さらなる検討が必要と考える。

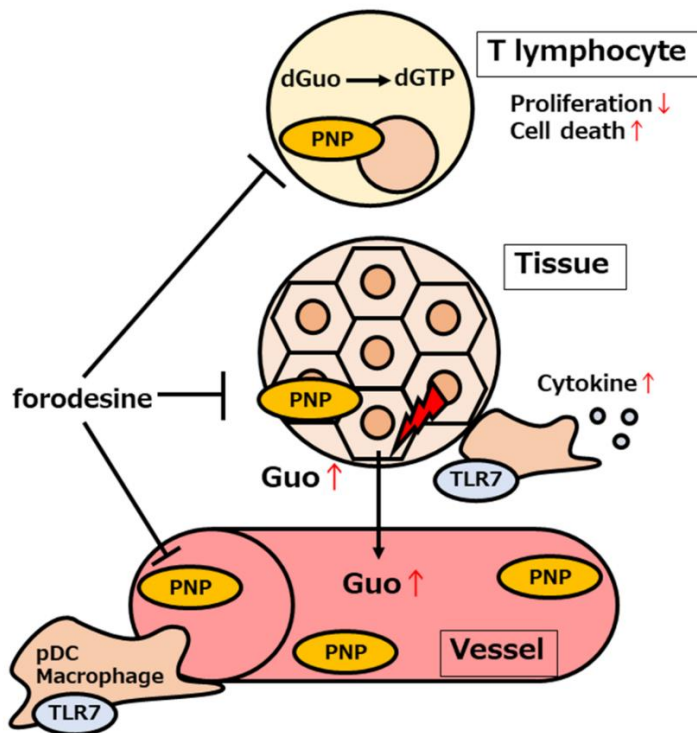


図7. 推定されるフォロデシンの免疫細胞に与える作用機序の概略図

- (1) フォロデシンはヒト T 細胞内に dGTP を蓄積させ T 細胞の増殖抑制と細胞死をもたらす
- (2) PNP 阻害により組織内の Guo の蓄積がおきる
- (3) GVHD では組織破壊により組織内に蓄積した Guo が漏出し、特に肝臓では微小環境において高濃度の Guo が漏出する。高濃度の Guo はフォロデシンとともに TLR7 を介して抗原提示細胞細胞から炎症性サイトカインやケモカインの産生を促す
- (4) GVHD により Guo が全身の組織から漏出し、PNP 阻害と相まって血漿 Guo 濃度は上昇する

謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導いただいた佐藤一也博士、神田善伸博士に感謝いたします。また、グアノシン、デオキシグアノシン、フォロデシンの定量にあたりご協力いただいた牛島健太郎博士(山口東京理科大学 薬学部)、松元加奈博士(同志社女子大学 薬学部)に感謝いたします。この研究の実施にあたっては、財団法人 JKA による「競輪公益補助事業」の補助金をうけて整備した研究機材を用いて研究を行いました。

引用

1. Maruyama, D., Tsukasaki, K., Uchida, T., Maeda, Y., Shibayama, H., Nagai, H., Kurosawa, M., Suehiro, Y., Hatake, K., Ando, K., Yoshida, I., Hidaka, M., Murayama, T., Okitsu, Y., Tsukamoto, N., Taniwaki, M., Suzumiya, J., Tamura, K., Yamauchi, T., Ueda, R., Tobinai, K., Multicenter phase 1/2 study of forodesine in patients with relapsed peripheral T cell lymphoma. *Ann Hematol*, 98(1): p. 131-142, 2019.
2. Kicska, G.A., Long, L., Hörig, H., Fairchild, C., Tyler, P. C., Furneaux, R. H., Schramm, V. L., Kaufman, H. L., Immucillin H, a powerful transition-state analog inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, selectively inhibits human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8): p. 4593-8, 2001.
3. Balakrishnan, K., Nimmanapalli, R., Ravandi, F., Keating, M. J., Gandhi, V., Forodesine, an inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 108(7): p. 2392-8, 2006.
4. Alonso, R., López-Guerra, M., Upshaw, R., Bantia, S., Smal, C., Bontemps, F., Manz, C., Mehrling, T., Villamor, N., et al., Campo, E., Montserrat, E.,

- Colomer, D., Forodesine has high antitumor activity in chronic lymphocytic leukemia and activates p53-independent mitochondrial apoptosis by induction of p73 and BIM. *Blood*, 114(8): p. 1563-75, 2009.
5. Banti, S., Miller, P. J., Parker, C. D., Ananth, S. L., Horn, L. L., Babu, Y. S., Sandhu, J. S., Comparison of in vivo efficacy of BCX-1777 and cyclosporin in xenogeneic graft-vs.-host disease: the role of dGTP in antiproliferative action of BCX-1777. *Int Immunopharmacol*, 2(7): p. 913-23, 2002.
 6. Shibata, T., Ohto, U., Nomura, S., Kibata, K., Motoi, Y., Zhang, Y., Murakami, Y., Fukui, R., Ishimoto, T., Sano, S., Ito, T., Shimizu, T., Miyake, K., Guanosine and its modified derivatives are endogenous ligands for TLR7. *Int Immunol*, 28(5): p. 211-22, 2016.
 7. Davenne, T., Bridgeman, A., Rigby, R. E., Rehwinkel, J., Deoxyguanosine is a TLR7 agonist. *Eur J Immunol*, 50(1): p. 56-62, 2020.
 8. Petes, C., Odoardi, N., Gee, K., The Toll for Trafficking: Toll-Like Receptor 7 Delivery to the Endosome. *Front Immunol*, 8: p. 1075, 2017.
 9. Al-Saud, B., Al Alawi, Z., Hussain, F. B., Hershfield, M., Alkuraya, F. S., Al-Mayouf, S. M., A Case with Purine Nucleoside Phosphorylase

- Deficiency Suffering from Late-Onset Systemic Lupus Erythematosus and Lymphoma. *J Clin Immunol*, 40(6): p. 833-839, 2020.
10. Kawasaki, Y., Sato, K., Hayakawa, H., Takayama, N., Nakano, H., Ito, R., Mashima, K., Oh, I., Minakata, D., Yamasaki, R., Morita, K., Ashizawa, M., Yamamoto, C., Hatano, K., Fujiwara, S. I., Ohmine, K., Muroi, K., Kanda, Y., Comprehensive Analysis of the Activation and Proliferation Kinetics and Effector Functions of Human Lymphocytes, and Antigen Presentation Capacity of Antigen-Presenting Cells in Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 24(8): p. 1563-1574, 2018.
 11. Kawasaki, Y., Sato, K., Nakano, H., Hayakawa, H., Izawa, J., Takayama, N., Mashima, K., Oh, I., Minakata, D., Yamasaki, R., Morita, K., Ashizawa, M., Yamamoto, C., Hatano, K., Fujiwara, S. I., Ohmine, K., Muroi, K., Ito, R., Hayakawa, M., Ohmori, T., Kanda, Y., Alloreactive T Cells Display a Distinct Chemokine Profile in Response to Conditioning in Xenogeneic GVHD Models. *Transplantation*, 103(9): p. 1834-1843, 2019.
 12. Cooke, K.R., Kobzik, L., Martin, T. R., Brewer, J., Delmonte, J., Jr., Crawford, J. M., Ferrara, J. L., An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of

- minor H antigens and endotoxin. *Blood*, 88(8): p. 3230-9, 1996.
13. Kanda, Y., Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*, 48(3): p. 452-8, 2013.
 14. Bantia, S., Miller, P. J., Parker, C. D., Ananth, S. L., Horn, L. L., Kilpatrick, J. M., Morris, P. E., Hutchison, T. L., Montgomery, J. A., Sandhu, J. S., Purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-1777 (Immucillin-H)--a novel potent and orally active immunosuppressive agent. *Int Immunopharmacol*, 1(6): p. 1199-210, 2001.
 15. Davenne, T., et al., Klintman, J., Sharma, S., Rigby, R. E., Blest, H. T. W., Cursi, C., Bridgeman, A., Dadonaite, B., De Keersmaecker, K., Hillmen, P., Chabes, A., Schuh, A., Rehwinkel, J., SAMHD1 Limits the Efficacy of Forodesine in Leukemia by Protecting Cells against the Cytotoxicity of dGTP. *Cell Rep*, 31(6): p. 107640, 2020.
 16. Wilhelm, K., Ganesan, J., Müller, T., Dürr, C., Grimm, M., Beilhack, A., Krempl, C. D., Sorichter, S., Gerlach, U. V., Jüttner, E., Zerweck, A., Gärtner, F., Pellegatti, P., Di Virgilio, F., Ferrari, D., Kambham, N., Fisch, P., Finke, J., Idzko, M., Zeiser, R., Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med*, 16(12): p. 1434-8, 2010.

17. Li, Q., Yan, Y., Liu, J., Huang, X., Zhang, X., Kirschning, C., Xu, H. C., Lang, P. A., Dittmer, U., Zhang, E., Lu, M., Toll-Like Receptor 7 Activation Enhances CD8⁺ T Cell Effector Functions by Promoting Cellular Glycolysis. *Front Immunol*, 10: p. 2191, 2019.
18. Weiler, M., Schmetzer, H., Braeu, M., Buhmann, R., Inhibitory effect of extracellular purine nucleotide and nucleoside concentrations on T cell proliferation. *Exp Cell Res*, 349(1): p. 1-14, 2016.
19. Shinohara, Y., Tsukimoto, M., Guanine and inosine nucleotides/nucleosides suppress murine T cell activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 498(4): p. 764-768, 2018.
20. Abt, E.R., Rashid, K., Le, T. M., Li, S., Lee, H. R., Lok, V., Li, L., Creech, A. L., Labora, A. N., Mandl, H. K., Lam, A. K., Cho, A., Rezek, V., Wu, N., Abril-Rodriguez, G., Rosser, E. W., Mittelman, S. D., Hugo, W., Mehrling, T., Bantia, S., Ribas, A., Donahue, T. R., Crooks, G. M., Wu, T. T., Radu, C. G., Purine nucleoside phosphorylase enables dual metabolic checkpoints that prevent T cell immunodeficiency and TLR7-associated autoimmunity. *J Clin Invest*, 132(16), 2022.
21. Wang, H., He, X., Li, Z., Jin, H., Wang, X., Li, L., Guanosine primes acute

- myeloid leukemia for differentiation via guanine nucleotide salvage synthesis. *Am J Cancer Res*, 12(1): p. 427-444, 2022.
22. Refaeli Y, Van Parijs L, Alexander SI, Abbas AK., Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med*, 196(7): p. 999–1005, 2002.
23. Mehta AK, Gracias DT, Croft M., TNF activity and T cells. *Cytokine*, 101: p. 14-18, 2018.
24. Ranganathan, P., Ngankeu, A., Zitzer, N. C., Leoncini, P., Yu, X., Casadei, L., Challagundla, K., Reichenbach, D. K., Garman, S., Ruppert, A. S., Volinia, S., Hofstetter, J., Efebera, Y. A., Devine, S. M., Blazar, B. R., Fabbri, M., Garzon, R., Serum miR-29a Is Upregulated in Acute Graft-versus-Host Disease and Activates Dendritic Cells through TLR Binding. *J Immunol*, 198(6): p. 2500-2512, 2017.
25. Gaignage, M., Marillier, R. G., Cochez, P. M., Dumoutier, L., Uyttenhove, C., Coutelier, J. P., Van Snick, J., The TLR7 ligand R848 prevents mouse graft-versus-host disease and cooperates with anti-interleukin-27 antibody for maximal protection and regulatory T-cell upregulation. *Haematologica*, 104(2): p. 392-402, 2019.

26. Jaspersen, L.K., Bucher, C., Panoskaltsis-Mortari, A., Mellor, A. L., Munn, D. H., Blazar, B. R., Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. *Blood*, 114(24): p. 5062-70, 2009.
27. Taylor, P.A., Ehrhardt, M. J., Lees, C. J., Panoskaltsis-Mortari, A., Krieg, A. M., Sharpe, A. H., Murphy, W. J., Serody, J. S., Hemmi, H., Akira, S., Levy, R. B., Blazar, B. R., TLR agonists regulate alloresponses and uncover a critical role for donor APCs in allogeneic bone marrow rejection. *Blood*, 112(8): p. 3508-16, 2008.