

氏名	池田 喬 司
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 674 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(委員長) 教授 久米 晃 啓 (委員) 教授 古川 雄 祐 教授 賀古 真 一

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

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 阻害によりデオキシグアノシン・グアノシンの代謝が阻害され、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。その T 細胞に対する効果によりフォロデシンは移植片対宿主病 (GVHD) に対する応用が研究されている。一方で、最近の研究においてデオキシグアノシン、グアノシン・その派生物質のヌクレオチドは、それ自身が Toll 様受容体 7 (TLR7) のリガンドになることが分かった。TLR7 は形質細胞様樹状細胞、マクロファージ、B 細胞に発現し、その刺激により炎症性サイトカインの産生がおこる。PNP 阻害により、蓄積したデオキシグアノシン・グアノシンが TLR7 シグナルを活性化するのではないかと仮説を立てた。実際、GVHD といった炎症組織では組織破壊によって多数のヌクレオチド、デオキシヌクレオチドが漏出しており、PNP 阻害によりこれらのプリンヌクレオチドの代謝を阻害し、TLR7 の活性化が起こるのではないかと考えた。そこで我々は GVHD モデルマウスを用いて、フォロデシンが GVHD モデルマウスに及ぼす影響を検討した。

### 2 研究方法

フォロデシンの *in vivo* での影響を調べるために、ヒト異種 GVHD モデルマウス、同種 GVHD モデルマウス (B6→BALBc) を作成した。ヒト T 細胞、マウスマクロファージは磁気ビーズを用いて細胞単離を行い、マウス形質細胞様樹状細胞は *flt3* リガンドを用いて分化誘導をして作成した。フローサイトメトリーで細胞表面抗原、細胞内サイトカイン、細胞増殖を評価した。グアニンヌクレオチドを定量するために、高速液体クロマトグラフィーを行った。サイトカイン定量に ELISA を行った。

### 3 研究成果

異種 GVHD モデルマウスに対してフォロデシン (20mg/kg/day) を 14 日間投与したところ、生存・体重減少、GVHD スコアがフォロデシン投与により改善した。その生存延長効果は軽度で、肺に浸潤したヒト T 細胞数、死細胞数、細胞内サイトカインの割合は有意差なかった。コントロ

ールマウス、放射線照射マウス、同種 GVHD マウスにフォロデシン(20mg/kg)、ないし溶媒を投与し、移植後 2,7 日目に血漿・肝組織のグアニンヌクレオチドの濃度を計測した。フォロデシン投与群では移植後 2・7 日目で肝臓のグアノシン組織濃度が著明に増加した。グアノシン血漿濃度は移植後 7 日目のフォロデシン投与同種 GVHD モデルマウスで他の群と比較して有意に高かった。溶媒投与群では組織・血漿ともにグアニンヌクレオチドは検出感度以下であった。In vitro の解析でフォロデシン+グアノシンとマクロファージ、形質細胞様樹状細胞を培養すると、培養上清の TNF $\alpha$ 、IL12 の濃度が上昇した。TLR7 阻害剤をこれに使用すると、培養上清の TNF $\alpha$  の濃度が著明に減少した。ヒト T 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、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と共培養した群で、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 $\gamma$ 、IL12p40 の産生増加を示した。In vitro でフォロデシンもしくはデオキシグアノシンをヒト T 細胞と培養すると、過去の報告通りコントロール、フォロデシン、デオキシグアノシン単独と比較してフォロデシン+デオキシグアノシン添加群で T 細胞の増殖抑制と細胞死がもたらされた。フォロデシン、デオキシグアノシンをともに添加した群で、T 細胞内の IFN $\gamma$  は有意に高かった。移植後 7 日目の同種 GVHD モデルマウス、フォロデシン投与同種 GVHD モデルマウス、放射線照射マウス、フォロデシン投与マウスでサイトカイン、ケモカイン濃度を比較したところ、IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL6、CXCL1、CCL5 が有意にフォロデシン投与同種 GVHD モデルマウス群で高かった。

#### 4 考察

我々は同種造血幹細胞移植後のフォロデシンの及ぼす影響について検討した。既知の dGTP 蓄積による T 細胞への効果に加えて、フォロデシンがグアノシンの代謝を阻害し、TLR7 を介して免疫細胞に影響を与えることを示した。フォロデシンはヒト T 細胞の増殖抑制と細胞死をもたらす、ヒト異種 GVHD モデルマウスの生存を延長した。ヒトとマウスのヌクレオチドの組成は異なっており、マウスではデオキシシチジンがデオキシグアノシンよりも多く、デオキシグアノシンよりもデオキシシチジンが優先的にリン酸化されることが分かっている。異種 GVHD モデルマウスにおいてはヒト T 細胞内の dGTP の蓄積が十分に起きないことが示唆され、実際ヒトでは dGTP の蓄積により高度な免疫抑制が起きることが示唆された。また、同種 GVHD モデルマウスの組織・血漿のグアノシン濃度上昇をもたらす、TLR7 を介して抗原提示細胞のサイトカイン産生を促した。哺乳類においてグアノシンを直接リン酸化される酵素はなく、PNP 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 リン酸が作られる。PNP 阻害により組織グアノシン濃度が著増し、GVHD マウスにおいて、その組織破壊によりグアノシンが循環し、TLR7 を発現する抗原提示細胞からのサイトカイン産生を促したものと考えた。こうしたフォロデシンの T 細胞、抗原提示細胞に対する作用は、GVHD 微小環境の免疫細胞のネットワークの破綻を起こすことを示唆した。TLR7 刺激と GVHD の関係はまだ明らかになっていないが、GVHD を改善するという報告もある。こうしたフォロデシンの TLR7 刺激作用を通じて、フォロデシンは GVHD を抑制しうるということが考えられた。

#### 5 結論

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作用し、GVHD に良い

影響を与える可能性がある。フォロデシンは種々の免疫細胞に多様な影響を与えており、さらなる検討が必要である。

## 論文審査の結果の要旨

本研究において申請者らは、造血幹細胞移植の副作用として重要な課題である移植片宿主病 (GVHD) に対するプリンヌクレオチドホスホリラーゼ (PNP) 阻害剤フォロデシンの影響について検討した。

フォロデシンは異種 GVHD モデルマウスの疾患重症度を改善し、生存を延長させた。その組織では PNP 阻害効果によるグアニンヌクレオチド濃度上昇が認められた。これを *in vitro* で再現した実験にて、肺胞マクロファージや形質細胞様樹状細胞の炎症性サイトカイン産生が認められたが、これは Toll 様受容体 7 (TLR7) を介する反応と考えられた。フォロデシンとグアニンヌクレオチドを添加した形質細胞様樹状細胞と T リンパ球の混合培養にて CD8 陽性 T 細胞の増殖や炎症性サイトカインの産生増加が、フォロデシン投与同種 GVHD マウスでも同様のサイトカイン上昇が認められ、TLR7 経路が活性化していることが示唆された。

本研究は、抗がん剤として承認されているフォロデシンが GVHD の治療薬にもなる可能性を示したものである。しかしながら、その機序は複雑であり、科学論文としてまとめるためには、本研究で得られた結果とこれまで知られている科学的知見を整理して筋道を立てる必要があると思われた。以上をまとめ、審査員から以下の指摘がなされた。

- 1) 表題の「フォロデシンはグアノシンを介した TLR7 活性化により免疫反応を増強し、移植片対宿主病を予防する」は内容を反映しているとは言い難いので、より適切なものに変更すること。
- 2) 実験結果とこれまでの知見を整理して、主張したいことが理解されるように考察を構築し直すこと。
- 3) 図表は標準的な科学論文の作法に従い、文章も繋がりを明らかにして論理構築を明確にする必要があるため、審査委員が直接加筆することとした。

## 最終試験の結果の要旨

申請者はほぼ学位論文のとおりにより発表を行った。多くの実験を行い内容も豊富だったが、時間は厳守された。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。

審査委員からは以下のような質問があったが、申請者はほぼ的確に返答し、有意義なディスカッションが行われた。

- 1) 異種 GVHD モデルでは、症状の軽減や生存延長が認められているが、GVHD にて宿主を攻撃する主役であるリンパ球浸潤は減っていない。これをどう説明するか？
- 2) 核酸代謝における種差が本研究で用いた疾患モデルにどう影響したか、どの様に評価しているか？
- 3) サイトカインによる T 細胞刺激で増殖や分化が促される一方で、むしろ細胞死が誘導される場合もあると報告されている。これらを踏まえ、フォロデシンの効果の多面性やタイミングが

及ぼす影響をどう考えるか？

発表および質疑応答から、申請者が研究者として十分な資質・能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査委員全員が判断し、最終試験に合格とした。