

(甲種)

論 文 要 旨

学 位 論 文(要約)

表 題 HLA 半合致造血幹細胞移植に最適な免疫抑制療法の研究開発  
—ヒト化マウス GVHD モデルを用いた解析—

申 請 者 氏 名 真島 清実

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  
地域医療学系  
血液・免疫疾患学  
血液病学

使用文字数 3199 字

## 論 文 要 旨

氏名 真島 清実

表題

### HLA 半合致造血幹細胞移植に最適な免疫抑制療法の研究開発 ーヒト化マウス GVHD モデルを用いた解析ー

#### 1 研究目的

分子標的療法をはじめとした新規治療法が開発された現在においても、再発・難治性造血器腫瘍に唯一根治が期待できる治療は同種造血幹細胞移植療法である。合併症を減らし安全に移植を行うためには HLA 完全一致のドナーが最も適しているが、HLA8/8 一致の適合ドナーが得られない患者も多数存在する。従って、代替ドナーを用いた HLA 非適合移植が注目されている。ハプロ移植をはじめとした HLA 非適合移植では、拒絶方向と移植片対宿主病 (GVHD) 方向の双方に強い免疫反応を起こすため、それらを防ぐ強力な免疫抑制療法が必要となる。現在、抗ヒト CD52 モノクローナル抗体であるアレムツズマブ、抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンである ATG、移植後大量シクロホスファミド (PTCY) など様々な免疫抑制療法が開発されているが、標準療法はなくその優劣は分かっていない。しかし、ヒトでそれらの治療効果を移植時に直接比較するのは、侵襲性の高い医療行為のため困難である。

アレムツズマブと ATG は、ヒト抗原に対する分子標的薬であるため、既存のマウス対マウスの従来の GVHD モデルでは検証困難である。そこで、ヒト単核球を高度免疫不全マウスに移植した異種間 GVHD モデルを用いた研究を着想した。本研究では、異種移植マウス GVHD モデルを用いて、ATG、アレムツズマブ、PTCY の免疫抑制効果の直接比較を行う。さらに、白血病モデルマウスを用いて、GVL 効果に及ぼす影響についても検討する。

#### 2 研究方法

##### I. GVHD 実験

免疫不全である NOD/Shi-scid-IL2rynull (NOG) マウスに放射線照射した後、健常人ボランティアから採取したヒト単核球を投与すると、2 週間程度で GVHD 様の病態を呈しマウスが死亡する。これを異種移植 GVHD モデルマウスとした。このモデルマウスに対して、ヒトの治療や臨床研究で用いられている投与量と日程を参考に、ATG (5 mg/kg, 移植前 3 と 4 日)、アレムツズマブ (0.25 mg/kg, 移植前 3 と 4 日)、PTCY (50 mg/kg, 移植後 3 と 4 日)を投与し、それらの効果を比較した。

##### II. 移植片対白血病 (GVL) 実験

ATG、アレムツズマブ、PTCY を用いた免疫抑制療法が GVL 効果に及ぼす影響を評価するため、NOG マウスに白血病を発症させヒト単核球で治療を行う、GVL モデルマウスを作製した。これは、ルシフェラーゼ標識したマウス B リンパ球性白血病株 A20 (BALB/c 系統由来) を NOG マウス (BALB/c 系統由来) に移植して白血病モデルマウスを作製した。このマウスにヒト単核球で治療を行い、ルシフェラーゼ活性を測定することで治療効果を可視化するシステムを構築した。

このモデルでは、一定数のヒト単核球を移植すると白血病の発症は完全に抑制されるものの、GVHDを発症し、マウスは早期に死亡する。そこで、GVHDを予防する3剤を投与し、GVL効果に及ぼす影響を評価した。

### 3 研究成果

#### I. GVHD 実験

ヒト単核球投与マウスの無治療GVHD群は25日以内に全例死亡したが、ATG群では30日経過しても100%の生存率であった。一方、アレムツズマブ群とPTCY群は無治療GVHD群と比較して生存を有意に延長したが、両群の生存率に有意な差は認めなかった。また、このマウスモデルでは、脾臓にヒト細胞の浸潤を認めたが、骨髄にはほとんど浸潤していなかった。

ATG 10 mg/kg 群では、生存が延長し、脾臓に浸潤しているヒト単核球がほとんどないというのにGVHD徴候も認めなかった。一方、アレムツズマブ 0.5 mg/kg では、GVHD群に比べて有意に生存を延長したにも関わらず、脾臓に多数のヒト単核球の浸潤を認めた。

無治療GVHD群に比べてATG群では、T細胞とB細胞の浸潤は抑制されていたが、アレムツズマブ群とPTCY群ではそれら細胞の浸潤抑制の程度は軽度であった。また、モデルマウスの血漿中のヒトIFN- $\gamma$ は、アレムツズマブ治療では、生存は延長していたにもかかわらず、IFN- $\gamma$ は高値であったが、ATG群とPTCY群において、GVHD群に比して有意に減少していた。また、CD4陽性T細胞の中で、CD25/ Foxp3両陽性の制御性T細胞(Treg)の割合は、無治療GVHD群に比べ、アレムツズマブ群とATG群では有意に低く、PTCY群では変化がなかった

#### II. GVL 実験

ATGは、10 mg/kgの投与でGVHD実験の際にヒト単核球を完全に除去していたため、本実験では、5 mg/kg, 2.5 mg/kg, 1.25 mg/kg 投与量を用いた。GVLモデルマウスにATGを投与し、無治療GVHD、無治療GVL、白血病マウスモデルとともに生存を観察した。ATG 5 mg/kg 群では、ヒトCD3陽性細胞は完全に除去されていたが、ATG 2.5 mg/kg 群ではヒトCD3陽性細胞の残存は認めるものの83%は白血病を発症し、GVL効果は不十分であった。したがって、最適なATGの投与量は、1.25 mg/kg と 2.5 mg/kg の間の可能性が考えられ、次に1.5 mg/kg, 1.75 mg/kg, 2.0 mg/kg を投与し同様の実験を行った。その結果、ATG 1.5 – 2.0 mg/kg の投与量の範囲では生存及びGVHDスコアに有意差を認めなかった。

アレムツズマブは、0.5 mg/kg の投与量では、GVHD実験で移植後28日時点の生存率は50%であったが、さらに低濃度または高濃度でのGVHD及びGVLに与える影響が予想できなかったため、投与量1.0 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.25 mg/kg の3群を比較した。アレムツズマブ 0.25 mg/kg 投与群ではGVHD予防効果が弱く、無治療GVHD・GVL群と生存はほぼ同等であった。また、0.5 mg/kg 投与群で白血病の発症がなく、すべてがGVHDで死亡した。1.0 mg/kg 投与群ではGVHDの発症は抑制したが、すべてが白血病により死亡した。以上のことから、GVL効果を減弱せずGVHDを予防する投与量は0.5 mg/kg と 1.0 mg/kg の間であると考え、次に0.6 mg/kg, 0.75 mg/kg, 0.9 mg/kg 投与群量で生存を比較した。その結果、0.6 mg/kg から0.9 mg/kg の間では生存及びGVHDスコアに有意差を認めなかった。

PTCYは、100 mg/kg の投与量でGVHD実験において無治療GVHD群に比べて生存を有意に延長しなかった。そこで、GVLモデルではPTCYの投与量を100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg 投与群で比較した。その結果、すべてのPTCY投与群で白血病は発症しなかったが、100 mg/kg

(甲種)

群の 83%と、200 mg/kg 群の 67%は 50 日以内に GVHD により死亡した。一方、400 mg/kg 投与群は、GVHD も白血病も発症しなかった。

#### 4 考察

GVHD モデルマウスを用いた実験では、アレムツズマブ、ATG、PTCY の臨床的に用いられる投与量では生存率に大きな差があり、また浸潤したヒト細胞数にも差が出た。そのため、臨床的に用いられる薬剤量はこのマウスモデルでは適切でないと考えられた。さらに、このマウスモデルをもちいて GVL 効果を保ちながら GVHD 予防に最適な薬剤の投与量を検討した。その結果、このマウスモデルでは、アレムツズマブ 0.6 - 0.9 mg/kg、ATG 1.5 - 2.0 mg/kg の投与量が GVL 効果を可能な限り保ちつつ GVHD を抑制して最も生存を延長した。また、PTCY 400mg/kg では、GVHD も白血病も発症せず、このマウスモデルに対する至適投与量と考えられた。

本研究でアレムツズマブ群にてマウスの臓器へ浸潤したヒト細胞量が多いにも関わらず、生存が無治療 GVHD 群よりも改善していたのは、Treg の増加による可能性を考えた。既存の報告によると、マウスモデルでは、GVL 効果を減弱せずに GVHD を抑えると報告されており、ATG や CD52 モノクローナル抗体で Treg を誘導するという報告もある。また、ATG や CD52 モノクローナル抗体は Treg を誘導する報告もある。しかし、本研究では、アレムツズマブでの Treg 誘導は観察されず、むしろ減少していた。これらの差異は、同種免疫反応と異種免疫反応における Treg の動態に違いがある可能性が考えられた。

シクロホスファミドは移植後の投与であり、投与前に GVL 効果にて A20 細胞がすでにかなり減少している可能性に加えて、本剤が A20 細胞を傷害する可能性があり、GVL 効果に及ぼす作用を正確に評価できないと考えられた。

#### 5 結論

本モデルマウスでは、アレムツズマブと ATG は GVL 効果を減弱せずに GVHD を予防する至適な投与量の範囲が非常に狭いと推測された。また、PTCY は、腫瘍細胞を直接傷害している可能性があるが、GVHD だけを抑制して GVL 効果を保つ至適な投与量がある可能性が示された。

異種移植モデルを用いて GVHD 抑制と GVL 効果温存を両立させる免疫抑制剤の至適投与量を決定することは困難であるが、それぞれの薬剤の特徴を精密に比較するためのツールとして本モデルは有用と考えられる。