

氏名	眞島清実
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 572 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 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	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-
論文審査委員	(委員長) 教授 森本 哲 (委員) 教授 久米 晃啓 准教授 賀古 真一

## 論文内容の要旨

### 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・難治性造血器腫瘍の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

#### 1. 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かかわらず, 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 0.25mg/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0.6mg/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0.9mg/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、100mg/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100mg/kg, 200mg/kg, 400mg/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ことも関わらず、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。

## 論文審査の結果の要旨

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-

強力な抗白血病効果 (GVL 効果) を狙う場合や、ヒト白血球抗原 (HLA) 適合ドナーがない場合に、HLA 半合致移植 (ハプロ移植) が行われることが多くなってきたが、移植片対宿主病 (GVHD) が重大な問題である。現在、ハプロ移植後の GVHD 予防として、抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリン (ATG) や抗ヒト CD52 モノクローナル抗体 (アレムツズマブ)、移植後大量シクロホスファミド (PTCY) が用いられているが、GVHD 予防法は標準化されていない。GVHD を抑制すると GVL 効果が減弱する恐れがあるが、3 剤の GVL 効果に対する影響も解明されていない。本研究では、HLA 半合致移植における GVHD 予防法の最適化を目指す基礎情報を得るため、異種移植マウスモデルを用いて、これら 3 剤を比較検討した。

1) GVHD 実験: 免疫不全マウスに放射線照射後、ヒト単核球を投与した。この異種移植 GVHD モデルマウスに 3 剤を体重換算当たりの臨床投与量で投与した。ATG は GVHD を完全に抑制、PTCY は有意な抑制効果なし、アレムツズマブの抑制効果はその中間であった。各薬剤が制御性 T 細胞の挙動に与える効果は異なっていた。2) GVL 実験: マウス B リンパ球白血病株 A20 を移植した免疫不全マウスにヒト単核球を輸注した。このマウスに 3 剤を用量調整して投与し、GVHD と GVL 効果に及ぼす影響を評価した。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。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。

本研究は、GVHD を抑制し、かつ GVL を効果保つ治療法の開発を狙った意欲的なものである。異種移植を用いているため、同種移植での GVHD/GVL モデルになるかは疑問であるが、薬剤の特徴を比較するためのツールとしての有用性はあると考えられる。本論文の内容は血液領域の英文誌に現在投稿中であり、副論文も十分であり、博士 (医学) の学位に授与にふさわしいと考えられた。初めに提出された論文で修正すべきところを指摘したところ、よく修正された。改訂版を委員全員が確認し、論文審査合格とした。

## 最終試験の結果の要旨

発表は学位論文に準じて行われた。発表は明快で、大変に分かりやすく、時間もほぼ予定どおりであった。内容の骨子は「論文審査の結果」にまとめたとおりである。

申請者と審査委員の間で次のような質疑応答がなされた。

1. このモデルで、HLA 半合致同種造血幹細胞移植における GVHD と GVL についての評価がどこまで可能なのか?

⇒ 同種免疫反応を評価するモデルは困難なのでこの異種移植モデルを用いた。このモデルでは GVHD/GVL とともに異種免疫反応を見ており、同種免疫反応とは発症機序に違いがある。また、

マウスとヒトで薬剤代謝の違いがある可能性がある。しかし、GVHD/GVL に対する薬剤特性については評価がある程度可能と考える。

2. 通常、造血細胞移植後には、今回用いた 3 剤にシクロスポリンやタクロリムスを併用するが、これらを同時に用いなかったのはなぜか？

⇒ 3 剤の単独での効果をより明らかにするために今回は併用しなかった。

3. GVL 実験において、なぜ、AML 株ではなく、シクロホスファミド感受性のある ALL 株を用いたのか？

⇒ 今回用いたマウス strain に合致する適切な AML 株が得なかったため、ALL 株を用いた。

4. Clinical GVHD スコアとはどういったものか？

⇒ マウスの GVHD の指標として用いられているもので、体重減少や姿勢、毛並みなどをスコア化して評価するものである。

5. GVHD 実験において、各薬剤の Treg に対する影響についてはどのようなであったか？

⇒ 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、生存がコントロール群よりも改善していたのは、Treg の増加によるのではないかと考え Treg の解析を行った。マウス脾臓中の CD4 陽性細胞中の Treg の割合は、コントロール群に比べ ATG 群とアレムツズマブ群で有意に低かった。PTCY はヒト同種移植では Treg を増加させると言われているが、PTCY 群において Treg 増加は見られなかった。

以上からわかるように、申請者は自己の研究テーマに関して深い学識を有し、いずれの質問に対しても的確に返答している。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員全員が判断、最終試験に合格とした。