

主 論 文

Programmed Death-1 Pathway in Host Tissues Ameliorates Th17/Th1- Mediated Experimental Chronic Graft-versus-Host Disease

(宿主における Programmed Death-1 経路は Th17/Th1 細胞による実験的慢性移植片対宿主病を改善する)

【緒言】

同種反応性 T 細胞の活性化, 増殖, サイトカイン分泌, エフェクター機能には 2 つのシグナルが必要である。①抗原提示細胞上の抗原ペプチド-腫瘍組織適合遺伝子複合体と T 細胞受容体相互作用②抗原非依存性共刺激分子である。共刺激分子の中には負の信号による免疫寛容を促すものがあり, Programmed death-1 (PD-1)は B7 ファミリー受容体に属し PD-L1 と PD-L2 リガンドとの結合により免疫調節に関わる。PD-1 は活性化 T 細胞、B 細胞や骨髄細胞上に発現し、PD-L1 は IFN- γ により樹状細胞, 単球, B 細胞や血管内皮, 膵島, ケラチノサイト等の非リンパ系組織に発現することが報告されている。同種造血細胞移植後急性 graft-versus-host disease (GVHD) においては PD-1 経路がその調整に関わっていることが報告されているが, 同種造血細胞移植後の慢性期の死亡原因の主因である慢性 GVHD に関しては不明であり, 慢性 GVHD における PD-1 経路の関与についてマウス慢性 GVHD モデルを使用し検討した。

【材料と方法】

マウスと骨髄移植

8-12 週齢のメス B10.D2 マウス (野生型と PD-1 欠損型) をドナー, 8-12 週齢のメス BALB/c マウス (野生型と PD-L1 欠損型) を宿主として用いた。宿主 BALB/c マウスは 5.8Gy の全身放射線照射後尾静脈より移植片として B10.D2 マウスもしくは BALB/c マウスの T 細胞除去骨髄細胞を 8×10^6 個, 脾臓 T 細胞を 2×10^6 個輸注した。移植後 3 日毎に体重及び皮膚脱毛の範囲で定められる慢性 GVHD スコア (0-3.9) を測定した。

組織病理学的検討

移植後宿主マウスの皮膚、肝臓、唾液腺を採取しホルマリン固定後 H&E 染色を行い病理学的スコアを確認した。皮膚の繊維化評価目的に Masson trichrome 染色を行った。病理学的スコアは皮膚 (0-10) , 肝臓 (0-8) , 唾液腺 (0-6) とし病理医により評価した。凍結皮膚切片を用い PD-L1 に対する酵素免疫組織化学検査を行った。抗 PD-L1 一次抗体を一晩反応させた後ポリマー法を使用して染色を行った。

Flowcytometry

宿主マウスの脾臓・末梢リンパ節から細胞を単離し PD-1 , PD-L1 , PD-L2 , CD4, CD8, CD11c, CD25, Foxp3 抗体及び 7-AAD を用い細胞表面染色を行った。細胞内染色として 1×10^6 個/ml の細胞あたり 50ng/ml の PMA と 100ng/ml の ionomycin を加え 37°C 3 時間刺激後 GolgiPlug を加え 2 時間培養した。その後 IL-17A, IFN- γ 抗体により細胞内染色を行い解析した。

抗体投与方法及び Am80 投与方法

マウス PD-1, PD-L1 と PD-L2 に対する中和抗体を骨髄移植後宿主マウスに 250 μ g/匹を移植後 14 日目から週 3 回計 6 回腹腔内投与した。マウス PD-1 アゴニスト抗体は 200ug/匹を移植後 14 日目から週 2 回計 5 回静脈内投与した。Am80 は 1mg/kg/body として移植後 0 日目から連日経口投与を行った。

Real-time PCR 法

凍結皮膚検体から TRIzol reagent を用いて total RNA を採取した後逆転写を行い相補的 DNA を作製し, TaqMan 法を用いて PD-L1 の real-time PCR を行い house keeping gene として GAPDH を用いた。

[結果]

標的細胞における PD-L1 発現は移植後後期に低下する

慢性 GVHD と PD-1 経路の関連を調べるために、皮膚、唾液腺、肝臓に慢性 GVHD を発症するマウスモデルを使用した。同種移植群は有意な体重減少、臨床的及び病理学的 GVHD を発症することを確認した後 (Fig 1A-C) , 末梢リンパ節 (pLNs) を移植後 28 日目に採取した。同系移植群と比較し慢性 GVHD に関連する IL-17+IFN- γ ⁻及び IL-17+IFN- γ ⁺T 細胞の増加を認め Th17/Th1 細胞の関与が考えられた (Fig 1D)。一方で GVHD の発症抑制・改善に関与する制御性 T 細胞 (Treg) は同種移植群で一貫して減少していた (Fig 1E)。

次に移植後の移植片 T 細胞上の PD-1 発現を pLNs と脾臓で確認した。同系移植群では移植後早期 (14 日) をピークに低下していった。同種移植群では移植後持続的に PD-1 の発現は上昇していた (Fig 2 A-B)。既では実質臓器の PD-L1 の発現は IFN- γ により促進されることが示されており、同種移植群では移植後 14-28 日目において IFN- γ 産生が増加していることを確認していた (Fig 1D)。このため標的細胞である皮膚 PD-L1 発現を免疫組織化学及び Real-time PCR 法を用いて確認した。いずれの検査においても移植後 14-28 日の早期では PD-L1 発現が上昇、28 日以降の後期では同系移植と同程度に低下していた (Fig 2C-D)。

PD-1 経路遮断により慢性 GVHD は増悪する

PD-1 欠損もしくは野生型マウス細胞を移植片として野生型マウスに移植したところ GVHD の増悪のため半数以上が 1 週以内に死亡した (Fig 3A)。このため抗 PD-1, PD-L1, PD-L2 抗体を用いて慢性 GVHD の出現する 14 日目から投与を行った。抗 PD-1, PD-L1, PD-L2 抗体群の順に生存及び GVHD スコアが増悪し病理学的にも増悪を確認した (Fig 3B-F)。

PD-L1 欠損により IL-17+IFN- γ +T 細胞の増加を伴い慢性 GVHD が増悪する

PD-L1 抗体は移植片及び宿主細胞両者を遮断するため、宿主側の PD-L1 の影響確認目的に野生型マウスを移植片に、PD-L1 欠損もしくは野生型マウスを宿主として移植を行った。PD-L1 欠損群では有意な生存率の低下、臨床的病理学的 GVHD の増悪を認めた (Fig 4A-D)。慢性 GVHD に関連する T 細胞を pLNs で確認したところ野生型対照群と比較し PD-L1 欠損群では IL-17-IFN- γ +細胞は同程度であったが、IL-17+IFN- γ -及び IL-17+IFN- γ +T 細胞の有意な増加を認める一方で、Treg 細胞は早期から低下していた (Fig 4E-H)。このことから宿主 PD-L1 の欠損により Th17/Th1 細胞の関与した慢性 GVHD が増悪することが示唆された。

宿主組織の PD-L1 発現が慢性 GVHD に関与する

PD-L1 は抗原提示細胞と組織に発現しているため、いずれの影響かを確認するために血液系細胞のみもしくは組織のみ PD-L1 欠損したキメラマウスを作製した。野生型マウスの移植片をこのキメラマウスを宿主として移植を行ったところ組織 PD-L1 欠損マウスにおいて臨床的病理学的 GVHD の増悪を認めた (Fig 5A-C)。慢性 GVHD に関連する T 細胞を pLNs で確認したところ組織 PD-L1 欠損群では IL-17-IFN- γ +細胞は同程度であったが、IL-17+IFN- γ -及び IL-17+IFN- γ +T 細胞の有意な増加を認めた (Fig 5E-F)。Treg 細胞は

血液系 PD-L1 欠損群で早期のみ低下していた (Fig 5D)。このことから宿主組織 PD-L1 が Th17/Th1 細胞の関与した慢性 GVHD を調節し、宿主血液系細胞 PD-L1 早期の Treg に関与することが示された。

Am80 は PD-L1 発現に関わらず Th17/Th1 細胞調整し慢性 GVHD を改善する

我々は既報で合成レチノイドである Am80 が Th1, Th17 の分化を抑制し慢性 GVHD を改善することを報告している。宿主野生型および PD-L1 欠損型移植群に移植後連日 Am80 投与を行ったところ Am80 投与群で PD-L1 の発現に関わらず臨床的病理学的慢性 GVHD の改善を認めた (Fig 6A-C)。PD-L1 発現に関わらず Am80 投与群では Treg, IL-17-IFN- γ ⁺, IL-17-IFN- γ ⁻ 及び IL-17-IFN- γ ⁺T 細胞は減少しており、慢性 GVHD の改善に寄与していることが示唆された (Fig 6D)。

PD-1 アゴニスト抗体の投与により慢性 GVHD は改善する

移植片 PD-1 発現上昇及び宿主 PD-L1 発現上昇にもかかわらず慢性 GVHD が発症していることからさらに PD-1 経路を刺激して免疫寛容を介した GVHD 改善を目的に、同種移植群に PD-1 アゴニスト抗体を移植後 14 日目から投与を行ったところ臨床的及び病理学的に慢性 GVHD の開演を認め、PD-1 経路が慢性 GVHD 発症に寄与しており PD-1 経路により慢性 GVHD の改善が得られる可能性が示唆された (Fig 7A-C)。

[考察]

PD-1 経路は Th1 細胞及び CD8 細胞を介して急性 GVHD に関連していることは既報されている。今回用いた慢性 GVHD モデルでは CD8 細胞の影響はわずかであり調節的な影響は少なかった。一方で、慢性 GVHD は主に CD4 細胞が影響しており急性 GVHD とは異なっている。移植片 PD-1 欠損は致死的 GVHD を起こしたが、PD-1 経路に対する抗体投与は慢性 GVHD の増悪を引き起こすことが判明した。宿主組織 PD-L1 の発現は他の臓器移植モデルにおいて保護的な作用を示すことが報告されており急性 GVHD モデルでも重要であることが報告されている。移植後の移植片における PD-1 の発現上昇及び宿主組織 PD-L1 の発現上昇にも関わらず慢性 GVHD は発症しており組織 PD-L1 の重要性は不明であった。PD-L1 欠損キメラマウスを用いた実験において組織 PD-L1 が慢性 GVHD の強く影響を与えており組織 PD-L1 発現が慢性 GVHD の調節に重要であることを示した。既報では慢性 GVHD には Treg, Th1, Th17 細胞の関与が報告されているが我々は血液系細胞 PD-L1 の欠損は Treg 減少に、組織 PD-L1 欠損は Th17/Th1 細胞増加に影響していることを確認した。

既報による PD-L1 の欠損に伴う Th17 細胞の増加, 我々の PD-1 アゴニスト投与実験により慢性 GVHD の改善を認めたことから PD-1/Th17 系は慢性 GVHD の今後の標的になりうると考えられる。

【結論】

PD-1 経路は移植片 Th17/Th 1 増加を介した慢性 GVHD の発症増悪に関与しており、今後の慢性 GVHD の予防・治療の標的となりうると考える。