

主論文

PD-1 modulates regulatory T-cell homeostasis during low-dose interleukin-2 therapy
(PD-1 は低用量インターロイキン 2 療法における制御性 T 細胞のホメオスターシスを制御する)

【緒言】

同種造血幹細胞移植は造血器悪性腫瘍に対する根治的治療法である。長期生存者において慢性移植片対宿主病 (Graft versus host disease ; GVHD) は依然として重要な問題である。CD4⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞 (Regulatory T cell ; Treg) は移植後のリンパ球減少環境に駆動されて旺盛な末梢分裂を示すが、この効果は胸腺からの供出低下および抗アポトーシス活性の低下により相殺され、通常型 CD4T 細胞 (Conventional T cell ; Tcon) に対する相対的不足を引き起こし慢性 GVHD の発症へ至る。Treg の恒常性維持にはインターロイキン 2 (IL-2) が不可欠であり、低用量 IL-2 存在下では Treg 特異的な分裂・活性化をきたす。この原理を利用し、米国にてステロイド不応性慢性 GVHD 患者に連日低用量 IL-2 を投与する臨床試験が施行され、Treg 特異的な増幅とともに半数以上の症例において慢性 GVHD の改善が認められた。同試験において、IL-2 投与全期間に渡り Treg の安定的上昇が維持されており、IL-2 連続投与による Treg の恒常性を維持するメカニズムの存在が示唆された。そこで我々は共抑制性受容体の一つである Programmed death-1 (PD-1) に注目し、低用量 IL-2 療法中における Treg の恒常性維持における役割を検討した。

【材料と方法】

動物実験

8~12 週齢の C57BL/6 (B6) マウスおよび PD-1KO マウス (PD-1^{-/-}, B6 バックグラウンド) に IL-2 を 5000 単位/匹で 2~4 週間連日皮下投与した。また、抗 PD-1 抗体を用いた実験では、抗 PD-1 抗体を 250µg/匹を週 2 回、合計 4 回腹腔内投与した。

患者背景

米国ダナファーバー癌研究所にてステロイド不応性慢性 GVHD に対する低用量 IL-2 療法の Phase1 試験を受けた患者 14 名より採取した末梢血を用いた。IL-2 は 8 週間連日皮下投与された。末梢血検体は IL-2 投与前、投与 1, 2, 4, 6, 8, 12 週間目に採取した。

In vitro 抑制能試験 (マウス)

B6 もしくは PD-1^{-/-} マウス脾臓細胞より CD4⁺CD25⁺Treg および CD4⁺CD25⁻Tcon を磁気ビーズにて細胞分離し、CellTrace Violet にて染色した B6 の Tcon と CD3/28 刺激存在下で共培養した。3 日後フローサイトメーターを用いて CellTrace Violet にて染色した Tcon の分裂を計測した。

フローサイトメリー

マウス末梢血もしくは脾臓細胞および、IL-2 投与を受けた患者より採取した末梢血を表面抗体染色後、細胞固定および透過処理を行い、細胞質もしくは核内抗原を染色した。染色後フローサイトメリーを用いて解析した。

In vitro 分裂能試験 (ヒト)

低用量 IL-2 を投与中の患者より CD45RA⁺Treg および CD45RA⁺Trcon を、セルソーターを用いて分離し、それぞれを CFSE で染色したのちに、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、抗 PD-L1 抗体存在下で培養した。4 日後に細胞回収後、Annexin-V を用いて細胞死を測定した。

【結果】

低用量 IL-2 はマウスモデルにおいても Treg を選択的に活性化させる

マウスモデルにおいて、Treg 特異的な増幅を来す IL-2 の投与量を決定するため、様々な用量の IL-2 を B6 マウスに単回皮下投与した。脾臓細胞において、各 Tリンパ球サブセット(CD8T, Tcon, Treg)の細胞内 Stat5 のリン酸化を測定した。高用量 (> 20,000 IU) においては全ての Tリンパ球サブセットで Stat5 のリン酸化を認めたが、一方で低用量 (< 5,000 IU) では Treg にのみ Stat5 のリン酸化を認めた。低用量 IL-2 (5,000 IU) を 14 日間マウスへ皮下投与すると、Treg に選択的な分裂増加を伴う増幅を認めた。

低用量 IL-2 は PD-1 を高発現するセントラルメモリー型 Treg への分化を促進する

低用量 IL-2 投与は CD44^{low}CD62L^{high} ナイーブ型 Treg から CD44^{high}CD62L^{high} セントラルメモリー型 Treg への分化を促進した。増幅した CD44^{high}CD62L^{high} セントラルメモリー型 Treg は PD-1 の発現上昇を認めた。

PD-1 経路の阻害は低用量 IL-2 による安定的な Treg 増幅を阻害する

低用量 IL-2 による Treg 上の PD-1 発現上昇の意義を検討するため、低用量 IL-2 に抗 PD-1 抗体(週 2 回, 計 4 回腹腔内投与)を併用し PD-1 経路を阻害した。末梢血を用いた解析では、併用群において 7 日目に IL-2 単独群と比較して Treg の強い分裂増加および増幅を認めたが、14 日目においてこの効果は消失した。一方 IL-2 単独投与群では 14 日間にわたり安定的な Treg 増幅を認めた。

PD-1 はエフェクターメモリー型 Treg への過剰な分化を制御し Treg のアポトーシスを抑制する

PD-1^{-/-}マウスに低用量 IL-2 を 4 週間投与すると、脾臓細胞を用いた解析では、抗体併用実験と同様に低用量 IL-2 投与野生型マウスと比較して、投与 1 週目に強い活性化と分裂増加を伴う Treg 増幅を認めたが、2 週目以降その増幅効果は消失した。一方、低用量 IL-2 投与野生型マウスでは 4 週間にわたり安定的な Treg 増幅を認めた。増幅効果の消失した投与 2 週目の解析では、低用量 IL-2 投与野生型マウスの Treg が CD44^{high}CD62L^{high} セントラルメモリー型主体であったのに対して、低用量 IL-2 投与 PD-1^{-/-}マウスの Treg は Annexin-V 強陽性を示す CD44^{high}CD62L^{low} エフェクターメモリー型が主体であった。さらに、低用量 IL-2 投与 PD-1^{-/-}マウスの Treg は Bcl2 の発現低下および Fas の発現上昇を認め強いアポトーシス傾向を示した。

PD-1 は慢性 GVHD 患者に対する低用量 IL-2 療法中の長期的 Treg ホメオスタシスを制御する

慢性 GVHD に対する低用量 IL-2 療法施行例の臨床検体解析では、低用量 IL-2 により、CD45RA 陰性活性化 Treg 上の PD-1 発現は、4 週目をピークに投与全期間にわたり上昇を認めた。また、CD45RA 陽性ナイーブ Treg は In vitro において、抗 CD3/CD28 抗体に加え抗 PD-L1 抗体存在下で非常に強い分裂およびそれに引き続くアポトーシスの増加を認めた。さらに、臨床効果発現例(6 例)では効果非発現例(5 例)と比較して投与 2 週目の Treg および Tcon の PD-1 発現比が投与前と比較して有意に上昇を認めた。

【考察】

Treg は高親和性 IL-2 レセプターが持続的に発現することで、低用量 IL-2 に適切に反応することが可能である。しかし、Treg の IL-2 への反応を制御するメカニズムは不明であった。また、PD-1 は B7:CD28 ファミリーに属する共抑制受容体であり、T 細胞の活性化を負に制御する。しかし、Treg 上の PD-1 発現の意義については不明な点が多く残されていた。

生体内における Treg 上に発現する PD-1 の役割を検討するため我々は低用量 IL-2 マウスモデルを作成した。このマウスモデルでは、慢性 GVHD 患者に対する低用量 IL-2 療法と同様に、低用量 IL-2 により Treg 特異的な増加を認め、特に PD-1 を高発現したセントラルメモリー型 Treg の増加を認めた。低用量 IL-2 に抗 PD-1 抗体を併用すると、初期には IL-2 単独群と比較して強い分裂および Treg 増加を認めたが、増加効果は維持されずまもなく減少へと転じた。PD-1^{-/-}マウスを用いた実験でも同様の結果であった。低用量 IL-2 により増加した PD-1^{-/-}マウスの Treg はエフェクターメモリー型主体であり、Bcl-2 の低下、Fas の上昇を伴う高いアポトーシス活性を示した。これらの結果より、PD-1 が活性化 Treg の末梢における分化およびアポトーシスの制御において重要な役割を果たしていることが示された。

慢性 GVHD に対する低用量 IL-2 療法における臨床効果との相関の検討では、Treg 上の PD-1 上昇が強い症例において慢性 GVHD の高い改善傾向を示した。本解析は少数例での解析であり、Treg 上の PD-1 発現と臨床効果との相関検討にはより多数例での解析が必要である。しかし、Treg 上の PD-1 は、同種造血幹細胞移植後の Treg のホメオスターシス制御による慢性 GVHD 予防ならびに治療の新規バイオマーカーとしての可能性が示された。

低用量 IL-2 療法中における Treg 上の PD-1 発現を制御するメカニズムは本研究では明らかにされていない。自己免疫疾患では Treg における PD-1 の機能低下または SNPs が病態と関与していると報告されている。IL-2 投与患者における PD-1 のさらなる機能および遺伝子学的解析により、Treg における PD-1 発現制御および、PD-1 を用いた臨床効果予測のメカニズム解明へとつながると考えられる。

【結論】

低用量 IL-2 療法中に Treg 上に発現する PD-1 は IL-2 による過剰な分化・活性化を制御し、アポトーシスの増加を防ぐことで、Treg の恒常性維持における重要な役割を果たしている。