

論 文 要 旨

GM-CSF therapy inhibits chronic graft-versus-host disease via expansion of regulatory T cells

(GM-CSF は制御性 T 細胞の増幅を介して慢性移植片対宿主病を抑制する)

関西医科大学内科学第一講座
(指導：野村昌作 教授)

堀 田 雅 章

【背景】

同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病(graft-versus-host disease; GVHD)は、治療の成否を左右する重要な合併症である。特に慢性 GVHD は、第一選択薬であるステロイドに抵抗性を示す場合、有効な二次治療は未だ確立されていない。

制御性 T 細胞(regulatory T cell; Treg)は、自己免疫寛容の維持に不可欠な細胞集団であり、GVHD に代表される同種免疫応答も抑制するとされる。Treg の維持・増殖には、IL-2 シグナルと樹状細胞(Dendritic cell; DC)上の MHC クラス II 分子からの T 細胞受容体(T cell receptor; TCR)刺激や副刺激因子シグナルが必要である。それらの因子を利用し生体内で Treg 増殖を誘導することは、GVHD に対する有用な細胞療法となりうる。

GM-CSF は、骨髄系細胞の分化に関わる造血因子であるが、DC の機能的な成熟にも関与する。GM-CSF を投与によって増加した CD8⁺DC が、Treg を選択的に誘導し、自己免疫疾患を抑制しうると報告がされており、GM-CSF もまた生体内で Treg 増殖を促す因子であると期待できる。

そこでわれわれは GM-CSF 投与による CD8⁺DCs 増幅が、Treg 増殖を介して慢性 GVHD を抑制しうるといふ仮説のもとに、慢性 GVHD の新規治療法の開発を目指し本研究を行った。

【研究方法】

慢性 GVHD マウスモデルとして、ホストに BALB/c(H-2^d)、ドナーに B10.D2(H-2^d)を用いた MHC 一致、マイナー組織抗原不一致の皮膚 GVHD モデルを使用した。

まず当モデルにおいて、GM-CSF 投与により Treg の増加と DC のサブセット変化を検証した。放射線照射を行ったホストマウスに、ドナーマウスから骨髄細胞および CD4⁺T 細胞を移植し、移植後 17 日目から治療群として GM-CSF を、コントロール群として PBS を 3 日間投与し、末梢血、末梢リンパ節での Treg 割合を、脾臓において DC 分画を解析した。

次に慢性 GVHD マウスの皮膚症状を皮膚 GVHD スコアを用いて評価し、GM-CSF 投与により症状がコントロール群に比較して抑制されるかを比較した。

また末梢リンパ節から採取したリンパ球を用いて、IFN γ 、IL-17 などのサイトカインを測定し、GM-CSF による慢性 GVHD 抑制効果の機序を検討した。

さらに、GM-CSF による GVHD 抑制効果が Treg に依存しているかを検証するため、Foxp3 に GFP を遺伝子導入したマウスの GFP⁺CD4⁺Tcell を使用することで、Treg を除去した T 細胞を用いて GVHD を誘導した。これらのマウスに GM-CSF 投与を行い、ドナー由来 Treg が存在しない状況で GM-CSF による慢性 GVHD 抑制効果を評価した。

最後に GM-CSF により増加した Treg の機能を検討するため、in vitro での Treg 抑制機能試験を行い、また Treg の機能に関わる表面マーカーの評価を行った。

【結果】

慢性 GVHD が生じている状況下においても、GM-CSF 投与により、末梢血および末梢リンパ節において、Treg 増加が確認できた。同種移植を施行したマウスでは同系移植に比較して、脾臓での CD4⁺CD8⁻DC 割合が減少していた。しかし GM-CSF 投与により同種移植下においても CD4⁺CD8⁻DC がコントロール群と比較して有意に増加し、CD8⁺DC が減少した。

コントロール群に比較して GM-CSF 投与により皮膚慢性 GVHD スコアは有意に低下し、皮膚症状の軽減を認めた。また病理学的にも GM-CSF 投与群で軽度であった。そして GM-CSF 投与群では、コントロール群に比較して、末梢リンパ節の IL-17⁺T 細胞、IFN γ ⁺IL-17⁺T 細胞の有意な減少を認めた。

またドナーTreg を除去した移植においては、皮膚 GVHD スコアに GM-CSF 群とコントロール群に有意な差は認められなかった。

in vitro での Treg 抑制機能試験において、GM-CSF 投与後マウスから採取した Treg とコントロールマウスから採取した Treg に、T 細胞の増殖を抑制する機能の差は認めなかった。また Treg の機能を反映する表面マーカーの発現度に差は認めなかった。

【考察】

GM-CSF は同種移植による DC のサブセット変化を是正し、CD4⁺CD8⁻DC を維持することで、Treg 増幅を誘導している可能性が示唆された。CD4⁺CD8⁻DC からシグナルが増強することが Treg 増殖を誘導したと予測している。

IL-17⁺Tcell、特に IFN γ ⁺IL-17⁺Tcell が皮膚慢性 GVHD の病態形成に重要であるとされる。GM-CSF により誘導された Treg がこれら細胞を抑制したことが、今回のマウスモデルにおける皮膚慢性 GVHD 軽減の機序として推測できる。

そしてドナーTreg が存在しない状態では、GM-CSF による治療効果は得られず、GM-CSF の慢性 GVHD 抑制効果は、主に移植片由来のドナーTreg に依存していると考えられた。また Treg 抑制機能試験や表面マーカーの解析から、GM-CSF により誘導された Treg は、抑制性機能の亢進、即ち質的亢進ではなく、量的な増加により GVHD を抑制したと推測できる。

今回の結果から、GM-CSF は CD4⁺CD8⁻DC の増殖を介して、Treg 増幅を誘導することで、慢性 GVHD を抑制しうるということが示された。GM-CSF を用いた生体内 Treg 増殖療法は、慢性 GVHD の新たな治療選択肢となり得る可能性があると考えられた。