

## 免疫細胞性組織障害の再分類と癌治療応用への試み

岡山大学病院 血液・腫瘍内科  
藤原 英晃

**背景** 高齢化に伴い様々な悪性疾患の罹患率は上昇する。抗がん剤投与に伴う副作用のため、適用困難例や副作用に伴う治療中止が起こる。近年の免疫チェックポイント阻害剤はこれまで治療が困難であった高齢者にも適用可能となっている。一方で免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) による免疫の過剰反応が組織傷害を発生させ、特に腸炎によりICIの継続が困難となり、治療中止を余儀なくされる。血液悪性疾患患者も同様に増加の一途をたどる。根治療法である同種造血幹細胞移植は、治療に伴う重篤な合併症のため、高齢患者への適応は困難であり、負担を軽減した安全な移植法の開発が望まれている。特に、主たる合併症である移植片対宿主病 (GVHD) は、同種免疫細胞による組織傷害病態であり、特に腸管GVHDは致死的となり、一旦発症すると高齢者は体力的負担が著しく回復困難となる。これら免疫反応を抑えるため免疫抑制療法が行われるが、免疫抑制による悪性腫瘍の再発並びに易染性が問題となる。このため、従来免疫細胞療法における組織傷害の原因とされる免疫細胞以外の要因である、免疫細胞により傷害される標的組織における「免疫反応への組織耐性」を中心とした研究を行ってきた。その中で、従来の細胞死の定義であるアポトーシスとネクローシスに加えて、近年新たな細胞死が免疫細胞との反応において報告されていることに着目している。

従来、細胞死は外的要因による壊死を特徴とするネクローシスと内的要因によるプログラムされたアポトーシスに分類されており、免疫細胞による標的組織傷害は、主にアポトーシスの有無で判断されていた。しかしながら、近年の研究の進歩に伴いこれまで説明不可能であった細胞死が明らかとなった。これらの新規細胞死は免疫細胞に攻撃された癌細胞でより研究されている一方で、正常細胞における新規細胞死に関しては不明である (Yu J, *Front in Oncol* 2021)。新規細胞死が免疫性細胞障害の結果として発生することは判明しているが、細胞死の直接の発生様式・機序に関しては明らかにされていない。新規細胞死は様々な抗がん剤や栄養素によって引き起こされるも、正常組織において免疫細胞による直接の発生経路は確立されていない。これまで、免疫細胞による抗腫瘍効果の病態生理として、活性化T細胞によるインターフェロングが新規細胞死を増進させ抗腫瘍効果を向上させること、ICI療法では新規細胞死誘導薬剤併用によって抗腫瘍効果の増強が得られること、CAR-T細胞療法では新規細胞死により過剰な炎症反応を惹起するサイトカイン放出症候群などの副作用が報告されている (Tang R, *J Hematol Oncol* 2020)。しかしながら現時点では免疫反応による自己正常細胞における細胞死では、アポトーシスやネクローシスと比較して新規細胞死に関しては国内外においてもほとんど明らかにされていないのが現状である。ICI療法およびGVHDにおいて腸管組織傷害は治療中止となりうる重大な合併症であり、両者に共通する要因が推測されるが未だ明らかにされていない。この新たな細胞死と免疫反応の関係を解析し、組織傷害メカニズムを解明・介入することで免疫細胞による細胞傷害への抵抗性を向上させる (図1)、つまり「免疫反応への組織寛容性」という、従来の免疫抑制療法とは異なる新規予防・治療法を確立することを目的に実験を行っている。

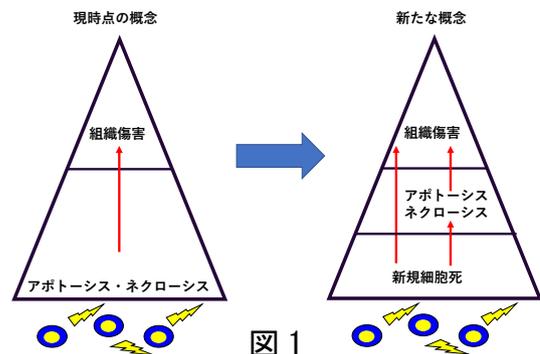


図1

上記の観点から、本研究は、免疫細胞性正常組織傷害、すなわち免疫細胞によって引き起こされる未だ未解明な細胞死の経路・機序を解明し、免疫細胞の抗腫瘍効果を維持しつつ正常組織を保護することによる、全患者に適応可能であり安全かつ効果的ながん治療・移植療法に対する社会的ニーズに答えるものである。

**方法** マウス骨髄移植GVHDモデルとして確立されている、C57BL/6マウス→BALB/cマウスを用いた骨髄移植を行った。移植前処置として致死量の全身放射線照射を行ったレシピエントBALB/cマウスにドナー由来T細胞除去骨髄細胞と脾臓純化T細胞を尾静脈から投与した。BALB/cマウスドナー由来骨髄細胞とT細胞投与群を

syngeneic群 (GVHD非発症群)、C57BL/6マウスドナー由来骨髄細胞とT細胞投与群をallogeneic群 (GVHD発症群) とした。これらマウスを用いて以下の検討を行った。

①GVHDによる傷害腸管組織における新規細胞死関連遺伝子発現の検討：GVHDモデルにおける傷害腸管組織における新規細胞死関連遺伝子発現を検討するため、syngeneic群及びallogeneic群から、移植後早期の7日目と後期の21日目に採取した腸管を用いて単一細胞RNAシーケンス (scRNA-seq) を行い、関連遺伝子発現の組織的・時間的検討を行う。

②GVHDによる傷害腸管組織における新規細胞死関連蛋白発現の検討：①で得られた結果を元にGVHD病理標本組織に対して免疫染色を用いて新規細胞死関連蛋白発現を検討し、①の結果との相関性・妥当性を検証する。

③Chemical 及びgeneticモデルを用いたpreclinical解析：①と②で得られた結果を元に新規細胞死における鍵となる遺伝子欠損および遺伝子を過剰発現したマウスを購入もしくはCRISPR を用いて作成し、GVHD モデルに用いる。ただし、遺伝子改変マウスは胎性致死となりうるため新規細胞死を誘導もしくは阻害する薬剤を複数種用いてpreclinical モデルにおいて治療標的として検証する。

**結果**腸管上皮細胞はGVHD 標的臓器の中で、同種反応性T細胞による攻撃により細胞死が発生し、最も致死的な組織傷害を生じる。先行研究では、GVHD によるミトコンドリア傷害がエネルギー不足による腸上皮細胞のアポトーシス・ネクローシスを引き起こすことを明らかにしている (図 2, Fujiwara H, Nat Immunol 2021)。また、傷害されたミトコンドリアには金属と思われる沈着物による構造変化をきたしており、通常の細胞死とは異なる状態が疑われる。特に、鉄分は体内に豊富な金属であり、新規細胞死の発症に関連していることが報告されていることからGVHDにおける腸管傷害に対する新規細胞死の関与が考えられる。

腸上皮細胞内ミトコンドリア(電子顕微鏡像)

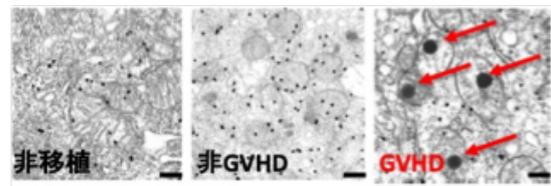


図 2

①GVHDによる傷害腸管組織における新規細胞死関連遺伝子発現の検討

移植後早期の7日目と後期の21日目において、GVHDモデルマウスのSyngeneic群及びallogeneic群それぞれから腸管組織を採取し、scRNA-seqを行った。得られたデータを用いて最初に、従来まで検討されているGVHDを惹起する免疫細胞と標的細胞である腸管上皮細胞とに分離した。そこから腸管上皮細胞を幹細胞と成熟上皮細胞に分離し、その上で発現遺伝子の特徴を時間的・細胞的に比較検討を行った。免疫細胞ではこれまで報告されているように活性化マーカーや細胞遊走能、炎症性サイトカイン産生に関する遺伝子発現の著名な上昇を、allogeneic群の21日目において確認しており、従来の報告と同様であった。標的細胞である腸幹細胞と成熟上皮細胞においてはCluster profileを行いbiological response、molecular function、cellular componentに分けてsyngeneic群・allogeneic群の7日目・21日目における特徴を検討した。腸幹細胞・上皮細胞ともにGVHD発症のallogeneic群では非GVHD発症のsyngeneic群と比較して大きく異なった遺伝子発現プロフィールを認めた (図3)。

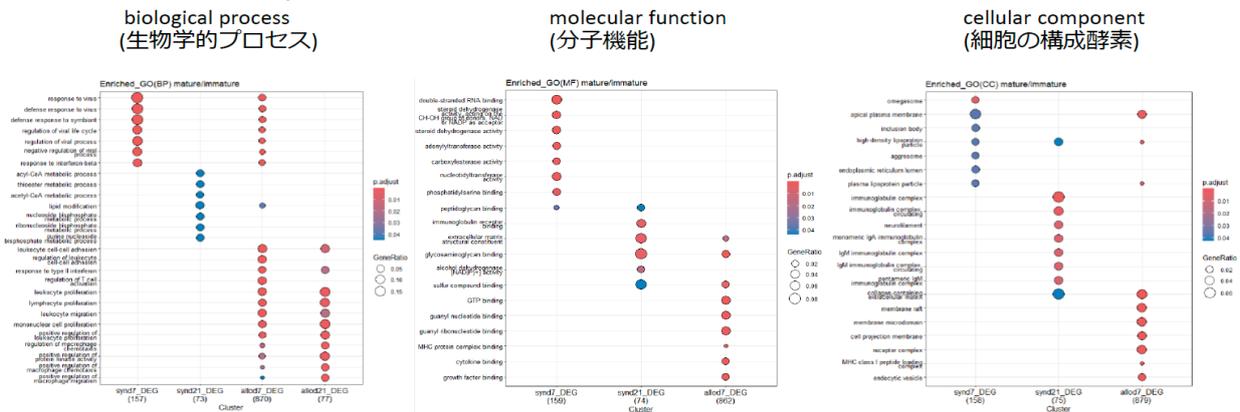


図 3

この中で、移植7日目、21日目の各時点における遺伝子発現変動解析を行ったところ、新規細胞死に関連する遺伝子発現の上昇がallogeneic群において複数認められた (図4)。新規細胞死A (フェルトーシス) 遺伝子の発現は幹細胞と成熟上皮細胞の両者において移植後早期に上昇を認め後期では発現の低下を認めた。新規細胞死B (ネクロプトーシス) 遺伝子の発現は移植後早期では幹細胞において上昇を認め、後期では成熟上皮細胞において発現の上昇を認めた。新規細胞死C (パイロプトーシス) 遺伝子発現は成熟上皮細胞でのみ移植後早期から徐々に上昇し後期にかけて発現上昇が継続していた。これらの結果から新規細胞死は、時間的・組

織的に大きく異なることが判明した。

## ②GVHDによる傷害腸管組織における新規細胞死関連蛋白発現の検討

①で得られた結果を元に傷害腸管病理標本を用いて各新規細胞死関連蛋白質に対する免疫染色を行い時間的・組織的検討を行った。新規細胞死A関連タンパク質は①で得られた遺伝子発現パターンと一致して、幹細胞と成熟上皮細胞の両者において移植後早期に上昇を認め後期では発現の低下を認めた。新規細胞死B関連タンパク質は①で得られた遺伝子発現パターンと一致して、移植後早期では幹細胞において上昇を認め、後期では成熟上皮細胞において発現の上昇を認めた。新規細胞死C関連タンパク質は得られた遺伝子発現パターンと一致して、成熟上皮細胞でのみ移植後早期から徐々に上昇し後期にかけて発現

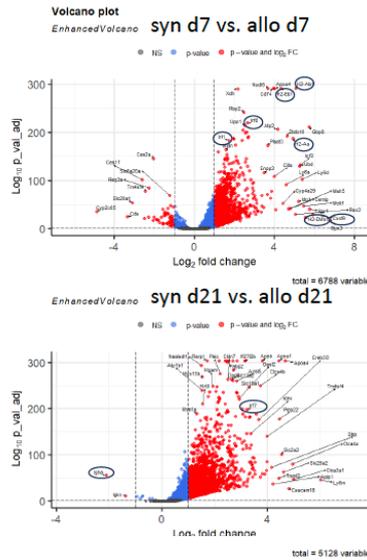


図 4

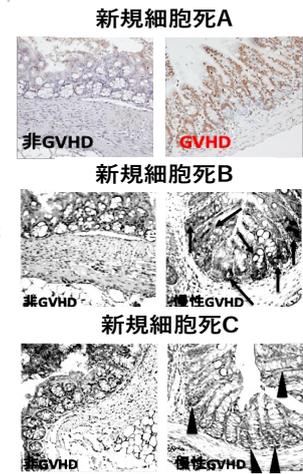


図 5

上昇が継続していた (図5)。これらの結果から①の結果と蛋白発現には相関があることが考えられた。これら新規細胞死は、時間的・組織的に大きく異なるが、組織傷害へ関与している可能性を検討する。

## ③Chemical 及びgeneticモデルを用いたpreclinical解析：

①と②で得られた結果を元にGVHDマウスモデルを用いて新規細胞死を標的とした治療介入効果を検討した。野生型マウスに対して新規細胞死A阻害剤と誘導剤を移植後に投与したところ、非投与群と比較して阻害剤投与群ではGVHDによる生存率の改善を、誘導剤投与群ではGVHDの悪化による生存率の低下を認めた (図6)。薬剤による全身投与のため、免疫細胞に対する影響が考えられたため、GVHDに寄与する炎症性免疫細胞であるTh1細胞、Th2細胞、CTL細胞、制御性T細胞の数・機能を確認するも非投与群と比較して同様であった。さらに組織病理からは組織障害の改善・悪化を確認した。これらの結果から新規細胞死Aは免疫細胞性組織傷害に関与しておりその阻害は免疫細胞に関連せず組織傷害を低減する可能性が示された。同様に、新規細胞死B、Cでも非投与群と比較して阻害剤投与群ではGVHDによる生存率の改善を、誘導剤投与群ではGVHDの悪化による生存率の低下を認めており、こちらも免疫細胞との関連性を含め今後検討する予定としている。新規細胞死における鍵となる遺伝子欠損および遺伝子を過剰発現したマウスに関しては現在開発中であり、確立され次第検討を行い検証する予定としている。

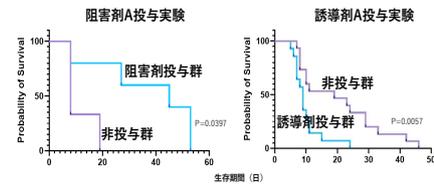


図 6

**考察** 本研究では複数の新規細胞死が腸管組織傷害に関与していることが遺伝子レベル、蛋白レベルで明らかとなった。これら新規細胞死それぞれが腸管内の細胞群において発現時期・細胞種類が異なることも明らかとなった。GVHDマウスモデルを用いた実験からは、これらの新規細胞死の促進・阻害により組織傷害レベルが大きく影響されることが検証されており、GVHDという免疫反応における重要性が確認できた。今後は皮膚や肝臓といったその他のGVHD標的臓器における新規細胞死の関与の検討、ヒト病理検体における証明並びに新規細胞死を引き起こす免疫細胞との関連性並びに組織傷害発症予測マーカーの検討を行う予定にしている。さらには、本研究で得られている知見を基に、ICI療法における腸管傷害組織を中心に新規細胞死の関与・病態生理を明らかにしICI療法の安全性・有効性に寄与できるかを、検討している。GVHDやICIによる免疫性細胞障害において、標的細胞の新規細胞死が「組織脆弱性」を引き起こすこと、新規細胞死を阻害することで細胞・組織が免疫性細胞障害抵抗性を獲得し、従来の免疫療法の安全性有効性を向上させる治療となりうる。免疫細胞による新規細胞死発症機序の解明は、血液悪性腫瘍のみならず今後の治療応用が期待される固形腫瘍に対するキメラ抗原受容体T細胞 (CAR-T) 療法においても副作用の低減及び治療効果の向上にもつながることが期待され、複数の分野に貢献することができるのではないかと考える。

## 謝辞

本研究をご支援頂きました公益財団法人アステラス病態代謝研究会及び審査の労をお取りくださった先生方に深く感謝申し上げます。