

論文の内容の要旨

論文題目：アレル特異的抗 HLA 抗体を用いた治療モデルの開発

氏名：中内 祐介

臍帯血やヒト白血球抗原 (HLA) 半合致ドナーを用いた同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) は、HLA 適合ドナーを見つけられない際の重要な治療選択肢であり、その数は骨髄移植を凌駕する勢いで増加している。しかし allo-HSCT 後非再発死亡の最大の原因である移植片対宿主病 (GVHD) の頻度は依然として高く、臨床において治療に難渋するケースは非常に多い。ステロイド、calcineurin inhibitor (CNI)、あるいは抗胸腺細胞グロブリン (ATG) などの免疫抑制剤は GVHD の予防薬、あるいは治療薬として臨床では長い間使用されている。しかし、抗癌剤などの治療薬と同様、ドナーやレシピエントの細胞を区別することなく血液細胞に作用するため、人体への影響は大きい。特に ATG は抗体医薬の代表的なものだが、ヒト胸腺細胞をウマやウサギに免疫することでできるポリクローナル抗体であり、GVHD の予防薬・治療薬としての効果は大きな反面、重篤なアレルギー反応や T 細胞を強く抑制することによる易感染性など、副作用も重大なものが多く、使用には十分な知識と経験を要する。また最近では抗 CD3 抗体や抗 CD52 抗体など、リンパ球表面抗原を標的としたモノクローナル抗体が登場しているが、いずれもこれまでの治療薬同様、ドナーやレシピエントの細胞を区別することなく血液細胞に作用するため、副作用の問題などで、有効な GVHD 治療薬としての普及には至っていない。

GVHD には大きく分けて急性 GVHD と慢性 GVHD がある。特に前者の病態として、レシピエント側の抗原提示細胞に反応したドナー由来のアロ反応性 T 細胞が中心的な役割をもつことが知られており、こうした移植後のレシピエントとドナー細胞の混合した複雑な状態、いわゆるキメラ状態 (キメリズム) を詳細に解析することが重要である。私が所属する研究室では、HLA

のミスマッチを逆手に取り、抗 HLA 抗体でレシピエントとドナーの細胞を染め分け、フローサイトメーターによるキメリズム解析を行っている。これは HLA ミスマッチ allo-HSCT を行う患者の病態を詳細に解析するのに極めて有効な方法であり、生着を迅速かつ正確に診断することを可能とただけではなく、白血病などの再発の早期発見にも貢献することを報告している。ただし、解析に使用する抗 HLA 抗体には市販のものも多く存在するが、抗体によっては染色が不十分になることや、一部の特殊な HLA を持つ症例では市販のものでは対応できないこともあるため、独自にアリル特異的抗 HLA モノクローナル抗体 (ASHmAb) の研究・作製を行うことで、これらの問題にも対応できるようにしている。

検査に用いる抗体として有効である一方で、抗 HLA 抗体には固形臓器移植や造血幹細胞移植後の拒絶反応や繰り返す血小板輸血における輸血不応の原因になるなどの報告があり、何らかの細胞障害作用をもつことが古くから知られている。私は、東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センターにおける初のクリニカルフェローとして、東京大学医科学研究所附属病院血液腫瘍内科の造血幹細胞移植病棟で半年間の臨床研修を行う機会を得た。主治医として多くの GVHD に苦しむ患者を診てきたことで、患者への負担が少ない、より有効な GVHD 治療法の開発に興味を持ち始めた。本研究は、抗 HLA 抗体の細胞障害作用に注目し、私が大学院在学中に作製した ASHmAb の中に細胞障害作用を持つものが存在すると仮定した上で、その細胞障害抗体による GVHD 治療モデルの開発を目標とした。

はじめに、当研究室ですでに確立された方法を用いて、ASHmAb を作製することにした。HLA トランスジェニックマウス (HLA-A2 と HLA-A24 をそれぞれ発現) に、サイトメガロウイルス PP65 抗原をペプチドとして結合した HLA-A*24:02 と HLA-A*02:01 テトラマーを免疫原として、それぞれ免疫した。この方法で作製されたハイブリドマのうち、*in vitro* で補体依存的に HLA-A*02:01、-A*02:01/-A*03:01、あるいは-A*23:01/-A*24:02 を認識し、細胞を傷害する抗体

の樹立に成功した。これらの抗体を killing ASHmAb (kASHmAb) と命名した。以後、HLA-A*02:01 のみを認識する細胞障害抗体を A*02:01-kASHmAb とする。

次に、*in vivo* における A*02:01-kASHmAb の細胞障害作用と特異性について、異種 GVHD モデルマウスを用いて検討した。致死性 GVHD を引き起こすモデルとして、過去の知見をもとに、非放射線照射の NOG (NOD/Shi-scid/IL-2R γ^{null}) マウスに HLA-A2 あるいは HLA-A26 陽性の健常人末梢血単核球細胞 1×10^7 個/匹をそれぞれ尾静脈あるいは眼窩静脈より移植した (HLA-A2 マウスと HLA-A26 マウス)。この異種 GVHD モデルでは無治療のマウスは全て 2 ヶ月以内に死亡することを確認している。このマウスに、臨床で使用する allo-HSCT 後の急性 GVHD に対する ATG の投与量を参考に、A*02:01-kASHmAb (60 $\mu\text{g}/\text{日} \times 2$ 日間) を投与したところ、HLA-A2 マウスは平均で 3 ヶ月以上生存したが、A*02:01-kASHmAb に反応しない HLA を移植された HLA-A26 マウスは 2 ヶ月以内に全匹死亡した ($p < 0.0001$)。この結果から、kASHmAb は *in vivo* においても正確に HLA を区別し、特定の細胞のみを傷害することで、異種 GVHD モデルマウスを治療できることが示された。

以上の実験結果では、kASHmAb はレシピエント細胞ではなく、移植したドナー細胞 (ヒト血液細胞) のみを傷害することで GVHD モデルマウスを治癒した。しかし臨床応用を考慮した際、kASHmAb がドナー細胞を傷害するという事は、移植片を傷害することであり、それにより拒絶・生着不全の可能性が高まることを意味する。この問題を検証するため、1.5 Gy の放射線を照射した NOG マウスに HLA-A2 陽性の臍帯血由来 CD34 陽性造血幹・前駆細胞 (2.0×10^5 個/匹) を移植し、ヒト・マウス骨髄キメラマウスを作製した。このマウスに kASHmAb を投与することで、造血細胞の傷害の程度を調べることができると考えた。その結果、A*02:01-kASHmAb (60 $\mu\text{g}/\text{日} \times 2$ 日間) を投与したマウスでは、末梢血中のヒト血液細胞は一旦大幅に減少するものの、数週間経過すると再びヒト血液細胞の割合が増加してくることがフローサイトメーターによる

解析で判明し、骨髄中の造血幹・前駆細胞は末梢血中の細胞と比べ、抗体によるダメージを受けにくい可能性が示唆された（造血幹細胞が骨髄中のニッチで冬眠していて、アポトーシスなどに対しても耐性であることが報告されている）。このことから、kASHmAb の投与量を調整することで、造血細胞には大きな傷害を与えずに、末梢血中のヒト血液細胞を一時的に傷害することが可能であると考えられた。実際の臨床において患者に大きな負担となる拒絶・生着不全、そして再移植のリスクを下げる手段として、このことは極めて重要なことといえる。

ASHmAb を用いた GVHD 治療モデルの開発は過去に例がなく、この研究が世界で最初の報告となる。臨床で古くから使用されるステロイド、CNI、ATG などの免疫抑制剤と違い、kASHmAb はドナーの血液細胞のみを特異的に傷害することで GVHD を治癒する可能性を秘めた抗体である。今後、より多くの異なるアレルに対する細胞障害抗体の樹立が可能となれば、新しい作用機序の GVHD 治療薬として、その臨床応用が十分可能であると考ええる。