

活性化 T 細胞に発現する NLRP6 の意義と GVHD/GVT に与える影響

東梅友美

山形大学大学院医学系研究科 内科学第三講座 血液・細胞治療内科学分野

【研究の背景】

同種造血幹細胞移植療法は急性白血病などの血液悪性腫瘍をはじめ、種々の血液・免疫疾患の根治療法として本邦では 2016 年現在で年間 3500 例余の件数が報告されている。本療法ではドナーの T 細胞等がレシピエントの残存腫瘍細胞を攻撃し死滅させる graft-versus-tumor (GVT) 効果が期待できる一方、重篤な合併症の一つである急性移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) を発症することも多い。一般的に急性 GVHD 予防として、免疫抑制剤(カルシニューリンインヒビターなど)投与が行われるが、30-80%の患者に本合併症が発症することから、急性 GVHD の新規予防及び治療法の開発が不可欠である。

急性 GVHD の発症機序は 1) 前処置による組織障害及び炎症性サイトカインの遊離によるドナー及びレシピエント由来の抗原提示細胞活性化^{1,2)}、2) 活性化抗原提示細胞によるドナー T 細胞刺激・増殖とエフェクター T 細胞への分化^{3,4)}、3) エフェクター T 細胞の GVHD 標的臓器への浸潤と組織破壊が考えられている。従って、前処置に伴う組織障害保護並びに炎症反応抑制、活性化抗原提示細胞やドナー T 細胞の効果的な制御法の開発が急性 GVHD 予防及び治療において極めて重要であると考えられる。

インフラマソームの一種である NOD-like receptor family pyrin domain containing 6 (NLRP6) は主に消化管上皮や樹状細胞などに発現しており⁵⁾、正常腸内細菌叢⁶⁾や恒常性の維持⁷⁾等に重要な役割を果たしているが、我々は腸管上皮における NLRP6 の発現が腸内細菌叢非依存的に急性 GVHD の増悪要因であることを発見し(Toubai, et al. Nat Microbiology accepted)、NLRP6 が多様な機能を持っている可能性を明らかにした。しかし、NLRP6 発現 T 細胞についてはこれまで報告されていない。

【目 的】

本研究では NLRP6 の T 細胞における機能を解析し、急性 GVHD との関連性を明らかにすることで、将来的に新規治療法開発の基礎的データを得ることを目的とする。

【方 法】

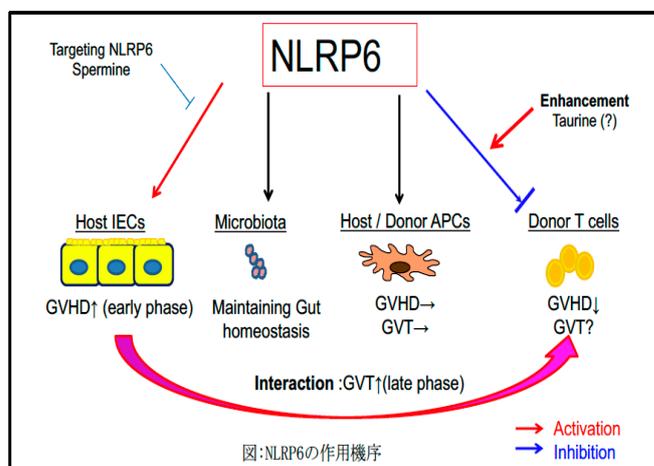
活性化 T 細胞における NLRP6 の発現は、野生型 (WT) マウスの脾臓由来 T 細胞を magnetic activated cell sorting (MACS) にて分離した後、抗 CD3・CD28 抗体を用いて T cell receptor (TCR) 非特異的刺激を *in vitro* で行い、継時的に回収した T 細胞のメッセンジャー RNA を測定して行った。NLRP6 の T 細胞分化及び活性化に与える影響は、NLRP6 欠損 (KO) と WT マウスの脾臓由来 T 細胞の亜分画や活性化マーカーの発現を Fluorescence-activated cell sorting (FACS) にて検討した。また、抗 CD3・CD28 抗体による T cell receptor (TCR) 非特異的刺激と BALB/c マウス由来照射脾臓細胞との混合リンパ球培養反応 (mixed lymphocyte reaction) を ³H-thymidine 取り込み試験及び carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) 染色を用いて行なった。NLRP6 発現 T 細胞の GVHD に与える影響については、一般的に汎用されている、主要組織適合抗原不一致同種骨髄移植 マウスモデルの B6 (H2^b) → BALB/c (H2^d) 系を用いて生存率及び GVHD 重症度を比較検討した。

【結 果】

- 1) 活性化 T 細胞における NLRP6 の発現: WT マウス由来 T 細胞を抗 CD3・CD28 抗体を用いて刺激したところ、刺激後 3-6 時間後に発現の上昇を認め、24 時間後には定常状態に回復した。
- 2) NLRP6 発現の T 細胞亜分画及び非刺激時の活性化マーカーに与える影響: NLRP6KO と WT マウスから脾臓を抽出し、naïve (CD44-CD62L+)、effector (CD44+CD62L-)、central memory (CD44+CD62L+)、regulatory T cell (CD4+CD25+Foxp3+) の亜分画を FACS にて検討したが明らかな有意差は認めなかった。また、CD69 や CD25 などの活性化マーカー及び PD-1 などの疲弊マーカーも検討したが明らかな有意差は認められなかった。
- 3) 非特異的 TCR 刺激: NLRP6KO と WT マウスの脾臓から MACS で T 細胞を分離し、抗 CD3 抗体 (2 μ g/ml) と抗 CD28 抗体 (2 μ g/ml) の刺激を加えたところ、刺激 48 時間及び 72 時間後の 3 H-thymidine 取り込み試験において、NLRP6KO T 細胞にて有意な増殖を認めた。同様に CFSE 法にて CFSE 陰性増殖細胞を検討したところ、刺激 48 時間及び 72 時間後では NLRP6 KO T 細胞では有意な増加を認めた。
- 4) 混合リンパ球培養 (MLR): NLRP6KO と WT マウスの脾臓から MACS で T 細胞を分離し、これを反応細胞として、BALB/c 由来の照射 (30Gy) 脾細胞を刺激細胞として、96 well にて 72-120 時間の共培養を実施したところ、NLRP6 T 細胞では 3 H-thymidine 取り込み試験にて有意な増殖を認めた。また、CFSE にて CFSE 陰性増殖細胞を検討したところ、 3 H-thymidine 取り込み試験同様に NLRP6 KO T 細胞での有意な増加を認めた。
- 5) マウス GVHD モデル: レシピエントとして BALB/c マウスを用い、移植前日に前処置として 8Gy の照射を施行後、移植当日 (day 0) に同系コントロールとして BALB/c マウスの骨髄細胞 (5×10^6) 及び脾臓由来 T 細胞 (1×10^6) を、同種移植として WT 由来の骨髄細胞 (5×10^6) 及び WT または NLRP6 KO マウスの脾臓由来 T 細胞 (1×10^6) を尾静脈から輸注し生存率及び GVHD 重症度を観察した。NLRP6 KO マウス由来 T 細胞輸注群では WT T 細胞を輸注群に比較して、有意に生存率の低下を認め、GVHD 臨床スコアでも有意に悪化していた。

【考 察】

今回の検討では、T 細胞にも NLRP6 が発現しており、特に非特異的 TCR 刺激後早期に発現上昇が認められたことから、T 細胞活性化への影響が示唆された。一方、定常状態では NLRP6 KO 由来 T 細胞における亜分画や活性化・疲弊マーカーの発現は WT T 細胞とほぼ同様であることから、NLRP6 の発現は非刺激時には T 細胞機能にほぼ影響を与えていないと考えられた。非特異的 TCR 刺激並びに MLR で NLRP6 KO T 細胞の有意な増殖を認めることから、活性化 T 細胞において NLRP6 はより抑制的に作用している可能性が示唆された。また、同種骨髄移植マウスモデルにおいて GVHD の発現及び重症度を検討した結果、NLRP6 KO T 細胞を輸注されたマウスでは有意に GVHD 関連死亡及び重症度が増悪していることから、T 細胞における NLRP6 は GVHD の制御に極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。この結果は、レシピエントの腸管上皮細胞における NLRP6 の機能とは全く異なっており、移植後、多角的に NLRP6 の機能を調節することで、GVHD 発症を制御できる可能性が示唆された (図)。



【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、同種造血幹細胞移植時のドナー T 細胞では NLRP6 が活性化を制御している可能性が示唆され、効果的な NLRP6 発現の制御法を開発することで、急性 GVHD の予防及び治療法の新規開発に寄与し、同移植を安全に施行し、より一層の生存率と移植患者様の Quality of life の向上に貢献できるものと思われる。また、他の T 細胞関連自己免疫疾患

及び癌免疫療法における T 細胞修飾法の開発においても重要な意義があると考えられる。

【参考・引用文献】

1. Reddy, P. *et al.* A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med* **11**, 1244-1249 (2005).
2. Toubai, T. *et al.* Siglec-G-CD24 axis controls the severity of graft-versus-host disease in mice. *Blood* **123**, 3512-3523 (2014).
3. Toubai, T. *et al.* Induction of acute GVHD by sex-mismatched H-Y antigens in the absence of functional radiosensitive host hematopoietic-derived antigen-presenting cells. *Blood* **119**, 3844-3853 (2012).
4. Toubai, T. *et al.* Ikaros-Notch axis in host hematopoietic cells regulates experimental graft-versus-host disease. *Blood* **118**, 192-204 (2011).
5. Levy, M. *et al.* Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* **163**, 1428-1443 (2015).
6. Elinav, E. *et al.* NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* **145**, 745-757 (2011).
7. Wlodarska, M. *et al.* NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell* **156**, 1045-1059 (2014).