

Protection from acute graft-versus-host disease by host-derived interleukin -17A

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-04-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Kuroda, Rie メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00053871

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



ホスト由来インターロイキン-17Aによる急性移植片対宿主病の制御

金沢大学医薬保健研究域医学系小児科学

(主任: 谷内江昭宏 教授)

黒 田 梨 絵

移植片対宿主病 (graft-versus-host-disease, GVHD) は造血幹細胞移植の合併症である。難治性GVHDはしばしば致死的な経過をたどるためその病態を詳細に解明し新規治療法を確立することは喫緊の課題である。インターロイキン-17A (interleukin-17A, IL-17A) は自己免疫疾患において病態により炎症促進にも抑制にも働くサイトカインとされている。急性GVHDにおけるドナー由来IL-17Aの役割についてはこれまで相反する報告がされてきた。一方、ホスト由来IL-17AによるGVHD制御に関してはほとんど知られていない。本研究の目的は、急性GVHDの炎症制御に果たすホスト由来IL-17Aの役割を明らかにすることである。IL-17A野生型 (wild type, WT) およびIL-17A欠損 (knock out, KO) BALB/cホストマウスに致死放射線照射を行い、主要組織抗原が異なるIL-17A WT C57BL/6ドナーマウスからT細胞除去骨髓と脾臓細胞を輸注し急性GVHDを誘導した。IL-17A KOマウスにおいてWTマウスより高頻度に致死急性GVHDが誘導され、IL-17A KOマウスの腸管に多量の腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 産生ホストマクロファージの浸潤を認めた。また腹腔マクロファージを用いてドナーリンパ球とリンパ球混合試験 (mixed lymphocyte reaction, MLR) を施行したところ、IL-17A KOマウスマクロファージの抗原提示能力が強いことが示された。さらに、移植前にホストマクロファージを除去することでIL-17A KOマウスにおける致死急性GVHDが改善した。以上の結果から、ホスト由来IL-17Aはホストマクロファージの異常活性化を抑制することにより急性GVHDを制御していることが示唆された。

Key words bone marrow transplantation, graft-versus-host-disease, IL-17A, macrophage, tumor necrosis factor- α

造血幹細胞移植は難治性血液腫瘍における根治治療として確立して久しいが、その治療成績を左右するのが重篤な合併症である急性移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) の制御である¹⁾²⁾。急性GVHDはドナー細胞がホスト細胞を攻撃することにより発症すると言われており、免疫抑制剤により予防および治療される³⁾⁴⁾。しかし治療抵抗性・難治性GVHDはその病態、発症機序にまだまだ不明な点が多く、有効な治療法は確立していない^{5)~7)}。時に致死となるこれらの合併症について、その発症機序を詳細に解明し、正確な病態評価とそれに基づく有効な治療介入を行うための新しい方法の開発が望まれる。

インターロイキン (interleukin, IL) -17Aは乾癬や関節リウマチなどの自己免疫疾患において、IL-6などの炎症性サイトカイン産生を誘導し病態を増悪させるサイトカインとして知られている^{8)~10)}。このような病態理解を

受けて、すでにヒト型抗IL-17A抗体が乾癬にて臨床応用され、その有効性が評価されている¹¹⁾。一方で炎症性腸疾患においてはIL-17Aは炎症抑制性に働くことが報告されている¹²⁾¹³⁾。これらの事実より、IL-17Aは疾患の病態や炎症の局在の違いによって、炎症促進にも抑制にも働く多面性を有するサイトカインであることが示唆されている¹⁴⁾。

免疫担当細胞が組織を攻撃するという意味において、GVHDは自己免疫疾患と類似の発症機序や炎症病態を有することが示唆される¹⁵⁾。自己免疫疾患におけるIL-17Aの関与に関して、これまで様々な報告がされてきた¹⁶⁾¹⁷⁾。特に強皮症や乾癬と類似の皮膚慢性GVHDにおいては、ドナー由来IL-17Aが増悪因子であるという見解が一致しており抗IL-17A抗体の臨床応用が期待されている¹⁸⁾。急性GVHDにおけるIL-17Aの役割に関してはマウスを用いた多くの研究報告がされている。しかし、用いる実験

平成30年11月5日受付, 平成30年11月30日受理

Abbreviations : BMT, bone marrow transplantation; FCM, flow cytometry; GFP, green fluorescent protein; GVHD, graft-versus-host disease; IL-17A, interleukin-17A; KO, knock out; MFI, mean fluorescence intensity; MLR, mixed lymphocyte reaction; Th, T helper; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; WT, wild type

系により相反する結果が報告されており、IL-17AがGVHDを増悪させるのか抑制するのかについて明確な結論は得られていない^{19)~21)}。一方、ヒトにおいてもIL-17A遺伝子の多型で急性GVHDの発症が異なることも報告されており、IL-17AがGVHDの病態に深く関与することが強く示唆されている²²⁾²³⁾。

これまでのマウスを用いた研究では、ドナー由来IL-17Aの役割にのみ注目した検討がなされている一方、ホスト由来IL-17Aの役割について、特に急性GVHDにおけるIL-17Aの役割についてはほとんど検討されてこなかった。IL-17AはT細胞だけでなく $\gamma\delta$ 細胞やNK細胞、自然リンパ球などの免疫細胞や上皮や腸管パネート細胞といった非免疫細胞など、免疫担当細胞のみでなく多様な細胞から産生されることが報告されている²⁴⁾。したがって、ドナー細胞が生着するまでの移植後早期には、腸管など局所組織で産生されるホスト由来IL-17Aが急性GVHDの抑制に関与する可能性が示唆される。そこで本研究は、急性GVHDにおけるホスト由来IL-17Aの炎症制御への関与について明らかにすることを目的として、IL-17欠損 (knock out, KO) マウスを用いて以下の検討を行った。

対象および方法

I. 倫理審査

すべての動物実験は金沢大学動物実験委員会の承認を受け、ガイドラインに従い実施した。(承認番号: AP-163731「IL-17によるGVHDの制御」)(遺伝子組換え実験承認番号: 金大6第1947号「ホストおよびドナー由来IL-17による移植片対宿主病 (GVHD) の制御」)。

II. 実験動物

C57BL/6 (H-2^b), BALB/c (H-2^d) マウスは日本チャールスリバーから購入しIL-17A野生型 (wild type, WT) として使用した。C57/BL6背景のIL-17A KOマウスは岩倉洋一郎先生 (東京理科大学) より譲渡していただき、その後BALB/cマウスと10世代戻し交配させ、BALB/c背景のIL-17A KOホストマウスとして本研究で使用した。8~12週齢のマウスを用いた。一部の実験ではドナー由来細胞とホスト由来細胞を区別するために、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) 導入C57/BL6マウスをドナーマウスとして用いた。

III. T細胞除去骨髄の調製

T細胞除去骨髄はCD4およびCD8マイクロビーズを接着させ、auto MACS system (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてT細胞を除去し作製した。T細胞除去効率の確認はフローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) 法により、残存するCD4⁺ならびにCD8⁺T細胞比率を定量して行った。いずれの細胞もその比率は0.1%未満であった。

IV. マウス GVHD モデル

主要組織抗原が異なるマウス、C57BL/6 (H-2^b) ならびにBALB/c (H-2^d) を用いて同種移植を施行した。WTおよびIL-17A KO BALB/cホストマウスに計8.5Gy (4.25Gy × 2回, 4時間間隔) の致死的全身放射線照射を施行し、WT C57/BL6ドナーマウスより採取したT細胞除去骨髄 (5x10⁶) ならびに脾臓細胞 (2x10⁶) を同時にマウス尾静脈より投与した²⁵⁾。移植したマウスは生存、体重、臨床GVHDスコアを観察した。臨床GVHDスコアの評価は過去の報告に従い移植後5日、10日ならびに15日の3回行い、5つの臨床指標 (体重減少、姿勢、活動度、毛並み、皮膚症状) の総和を示した (n=6)²⁵⁾。

V. ホスト由来マクロファージの除去

過去の文献に基づいて50 μ lのクロドロン酸リポソーム (ClodronateLiposomes, Org, Haarlem, Netherlands), および対照としてリン酸緩衝生理食塩水リポソームを移植10日前にIL-17A KO BALB/cホストマウスに腹腔内注射し、ホスト由来マクロファージを除去した²⁶⁾。マクロファージ除去効率の検定はFCM法により行った。除去後のホストマウス脾臓ならびに腸管に検出されるマクロファージは、共に全細胞中0.1%未満であった。

VI. フローサイトメトリー

以下の蛍光標識単クローン抗体、抗マウスCD45 (クローン名; 30-F11), CD4 (GK1.5), CD8a (53-6.7), F4/80 (BM8), CD69 (H1.2F3) およびTNF- α (MP6-XT22) はBioLegend (San Diego, USA) から購入した。死細胞検出のために7AAD (日本ベクトン・デッキンソン; 日本BD, 東京) を用いた。細胞質内染色の方法としては、Leukocyte Activation Cocktail, with GolgiPlugTM (日本BD) を用いて細胞を37°Cで4時間刺激した後に、推奨される定法に従いCytofix/Cytoperm (日本BD) を用いて行った。FCMのデータ収集はFACSCanto II フローサイトメーター (BD Biosciences, 東京) を用いて行い、データ解析はFlowJoソフトウェア (BD Biosciences) を用いて行った。全ての解析は製造者の説明書に基づき行った。

VII. 腸管 GVHD の病理学的評価

病理学的評価のために移植後7日目のホストマウスを頸椎脱臼法にて安楽死させ、大腸を切除し10%ホルマリン溶液にて固定後パラフィン包埋した。HE染色した標本を用いて、過去の文献に基づき病理学的GVHDスコアを算定した²⁷⁾。大腸病変組織を細切し、培養液に浮遊し酵素処理後、ナイロンメッシュにて単離された細胞のみを濾過してFCM法による解析に用いた。FCM法では7AADを指標として死細胞を解析対象から排除した後、CD45強陽性の血球系細胞に領域を設定して以下の解析を行った。大腸に浸潤するCD4⁺T細胞ならびにCD8⁺T細胞の活性化は、CD69抗原発現を指標として検討した。病変部に浸

潤する血球中のドナーならびにホスト由来マクロファージの定量は、ドナー由来細胞の指標であるGFP発現とマクロファージ抗原であるF4/80を指標にFCM法により行った。さらに、局所マクロファージによる腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor, TNF- α)産生を抗TNF- α 抗体を用いた細胞内サイトカイン染色により評価した。

VIII. リンパ球混合試験 (mixed lymphocyte reaction, MLR)

マクロファージの抗原提示能を評価するためにリンパ球混合試験を行った。15Gyの放射線照射したホスト腹腔マクロファージ (1×10^4) を、ドナー型であるC57/BL6の脾臓細胞 (1×10^5) と混合し5日間培養した。培養終了16時間前より ^3H チミジン (PerkinElmer, Waltham, USA) を添加し培養を継続した。培養終了後、液体シンチレーションカウンターを用いて、細胞内への ^3H チミジンの取り込みを計測することでドナー脾臓細胞の増殖能を評価した。

IX. 統計

統計学的解析はGraphPad Prism ver.4.0 (Graphpad software, Inc., La Jolla, USA) を用いて行った。生存曲線はカプランマイヤー曲線で示しログランク検定を用いて比較した。群間比較にはStudent's t検定およびMann-Whitney U検定を用い検討した。

成 績

I. IL-17A KO マウスならびに WT マウスにおける急性GVHD 誘導の比較

WT (n=18) およびIL-17A KO (n=18) BALB/cホストマウスに致死放射線照射 (2x4.25Gy) を施行し、WT C57BL/6マウスから採取したT細胞除去骨髓 (5×10^6) および脾臓細胞 (2×10^6) を投与しGVHDを誘導した (図1)。この実験に用いた脾臓細胞量では、15日間の観察期間中のWTホストマウスにおける急性GVHD誘導は軽度であり、死亡はわずかであった。一方、IL-17A KOホストマ

ウスでは強い急性GVHDが誘導され、高率で致死的な経過をたどった (図1A, $p < 0.05$)。IL-17A KOホストマウスでは、WTホストマウスに比べて顕著な下痢により有意な体重減少を認めた (図1B, $p < 0.05$)。臨床GVHDスコアの比較では、移植後day5においてIL-17A KOマウスはWTマウスに比べて有意な高値を示した (図1C, $p < 0.05$)。

II. 腸管 GVHD の病理学的検討

移植後7日目の大腸の病理評価ではIL-17A KOホストマウスで病理学的GVHDスコアが有意に高く、腸管GVHDが顕著であることが示唆された (図2A)。さらに、腸管組織において、CD69抗原の発現を活性化指標にしてGFP陽性ドナー由来CD4⁺T細胞ならびにCD8⁺T細胞の浸潤を比較した。IL-17A KOマウスにおいてWTマウスと比較して、有意に多数のCD69⁺活性化ドナーリンパ球の浸潤を認めた (図2B)。全ての移植マウスは完全ドナー型の血液細胞になっており、生着不全による死亡ではなく、GVHDによる死亡と考えられた。

III. 大腸浸潤マクロファージの由来の検討

GVHDの大腸病変形成におけるマクロファージの関与を検討した。最初に大腸組織の病理像をHE染色により比較検討した。ホストマウス大腸粘膜固有層にはいずれも細胞浸潤が観察されたが、WTマウスに比較して、IL-17A KOマウスでは粘膜固有層により多くの巨細胞(マクロファージ)の浸潤を認めた (図3A)。このマクロファージの由来を確認するために、GFP導入C57/BL6マウスをドナーとして用いて移植を行い、移植後7日目の腸管から細胞を分離しFCM法により解析した。いずれのホストマウスにおいても、大腸組織にはGFP陽性のドナー由来血球細胞が多く認められた。しかし、F4/80陽性マクロファージはIL-17A KOマウスで明らかに多く認められ、そのほとんどはGFP陰性であり、ホスト由来であることが示唆された (図3B, C)。

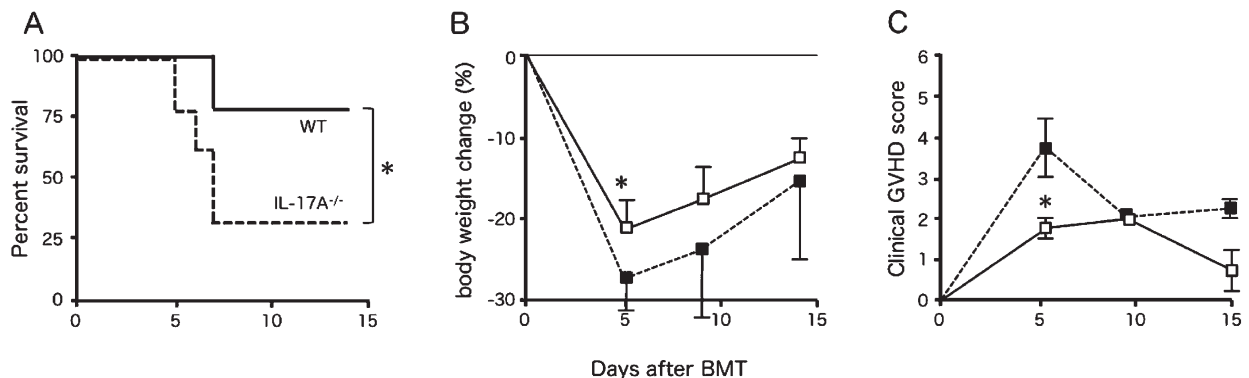


Fig. 1. Comparison of acute GVHD between WT and IL-17A KO mice.

Survival of wild type (WT, bold line, n=18) and IL-17A KO (IL-17A^{-/-}, dotted line, n=18) host mice were compared after allogeneic bone marrow transplantation (Fig. 1A). Severity of GVHD was compared between WT (□) and IL-17A KO (■) host mice by body weight change (Fig. 1B) and clinical GVHD scores (Fig. 1C). The figures show the means \pm 2SD of 3 independent experiments. * $p < 0.05$.

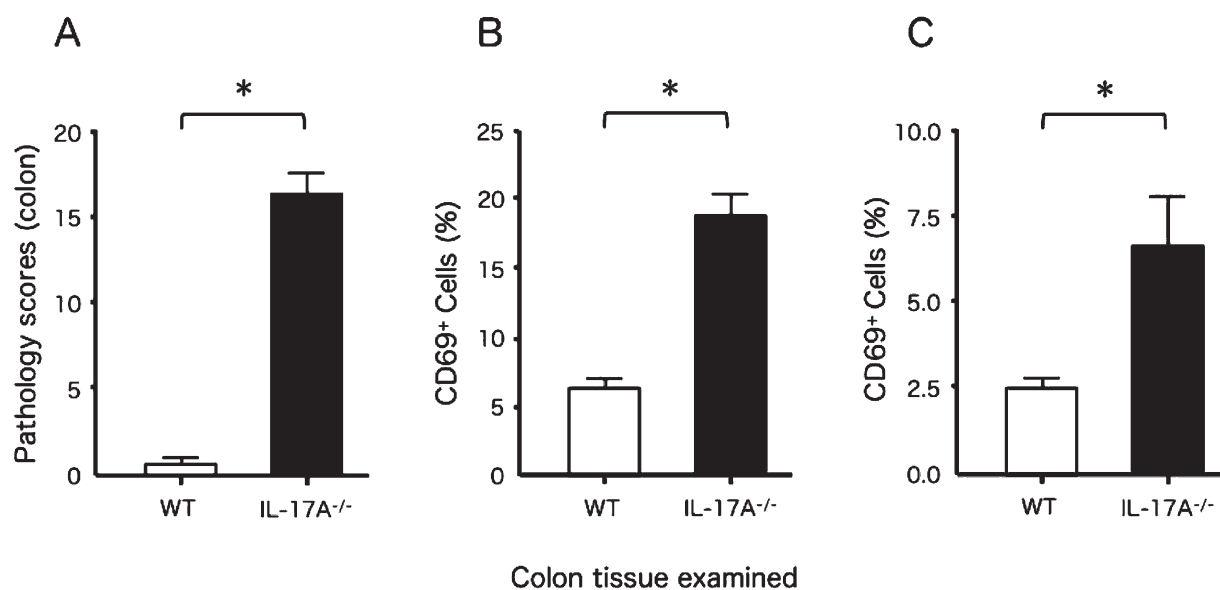


Fig. 2. Pathological evaluation of the large intestine.

Pathological changes of the large intestine was examined 7 days after BMT, between wild type (WT, □, n=9) and IL-17A KO (IL-17A^{-/-}, ■, n=9) host mice. Pathology score (Fig. 2A) and activation of both CD4⁺ T cells (Fig. 2B) and CD8⁺ T cells (Fig. 2C) infiltrating the colon were used as the parameters of inflammation. T cell activation was evaluated by the expression of CD69 antigens on the cell surface. The figures show the means ± 2SD of 3 independent experiments. * *p* < 0.05.

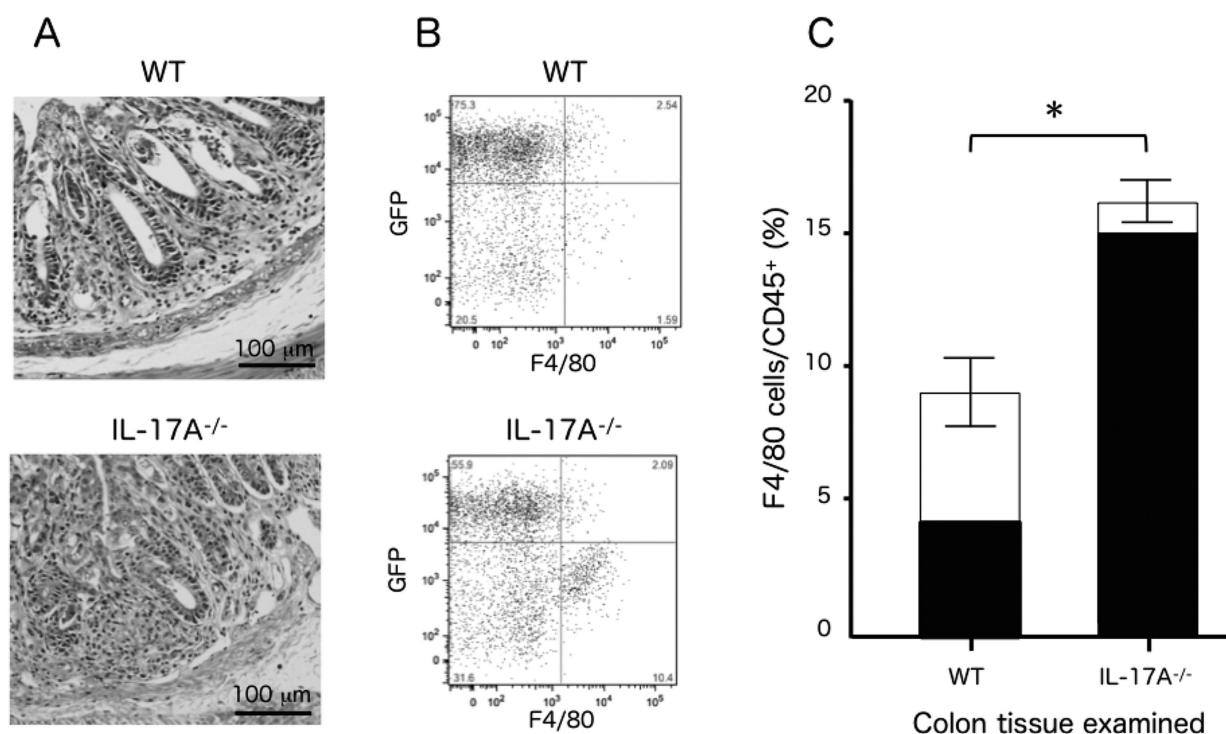


Fig. 3. Characterization of macrophages infiltrating the colon.

Origins of the colon-infiltrating macrophages were examined and compared between wild type (WT, □, n=9) and IL-17A KO (IL-17A^{-/-}, ■, n=9) host mice (day7 after BMT). Microscopic appearances of colon specimens were compared with HE staining between WT and IL-17A KO host mice (Fig. 3A). Origins of the macrophages were identified by donor-derived GFP expression within F4/80⁺ macrophage populations (Fig. 3B). Frequencies of macrophages among CD45^{high} hematopoietic cells and fractions of GFP negative host-derived macrophages were compared between WT and IL-17A KO host mice (Fig. 3C). The Fig. 3C shows the means ± 2SD of 3 independent experiments. * *p* < 0.05.

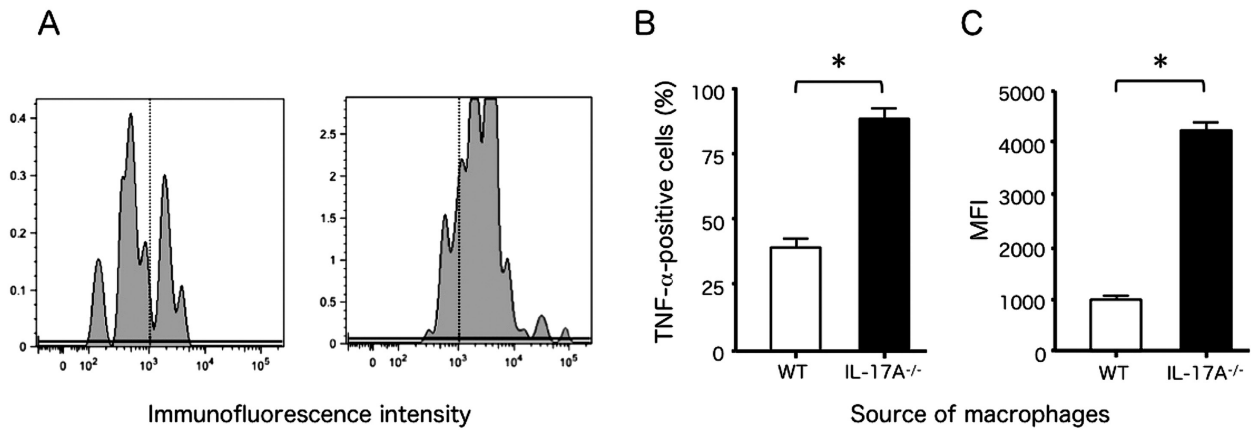


Fig. 4. TNF- α production by infiltrating macrophages.

Mononuclear cells were isolated from the colon tissue at day7 after BMT by dispersion and filtration through nylon mesh. Representative profiles of TNF- α expression by wild type host mice (left) and IL-17A KO mice (right) are shown in Fig. 4A. Fig. 4B and Fig. 4C show the percentages of TNF- α positive cells and mean fluorescence intensity (MFI) of TNF- α production by wild type (WT, \square , n=9) and IL-17A KO (IL-17A^{-/-}, \blacksquare , n=9), respectively.

IV. 大腸に残存するホストマクロファージによる TNF- α 産生

さらにこれらの大腸に残存するホストマクロファージによる TNF- α 産生を細胞質内染色により比較検討した. WTマウスに比べて IL-17A KOマウスでは, 有意に TNF- α 陽性細胞比率が高値を示した (図4A, B). さらに産生される TNF- α の量を反映する平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) も IL-17A KOマウス由来のマクロファージが明らかに高値を示した (図4A, C). これらの結果からは, IL-17A KOホストマウスの腸管に認められたホスト由来マクロファージは TNF- α を強く産生する活性化細胞傷害性マクロファージであることがわかった.

V. マクロファージ抗原提示能の比較

次に WT および IL-17A KO ホストマウスにおける残存ホストマクロファージの抗原提示能力について比較した. 大腸組織に浸潤するホスト由来マクロファージのみをきれいに分けることが困難であったため, 腹腔マクロファージを用いて検討した. 移植後7日目に採取した腹腔マクロファージは WT および IL-17A KO ホストどちらも 100% ホストタイプであった. 15Gy 照射した腹腔マクロファージ (1×10^4) を C57/BL6 脾臓細胞 (1×10^5) と混合培養し MLR を行った. 図5に示すように WT ホストマウスの腹腔マクロファージに比べて, IL-17A KO ホストマウスの腹腔マクロファージは有意にドナー型脾臓細胞を増殖させ ($p < 0.05$), 抗原提示能力が高いことが示唆された.

VI. マクロファージ除去と移植後生存率

最後にホスト由来マクロファージの活性化が, IL-17A KO ホストマウスにおける致死的急性腸管 GVHD の誘導に関与するかどうかを検討した. クロドロン酸リポソームによりマクロファージを除去した IL-17A KO ホストマ

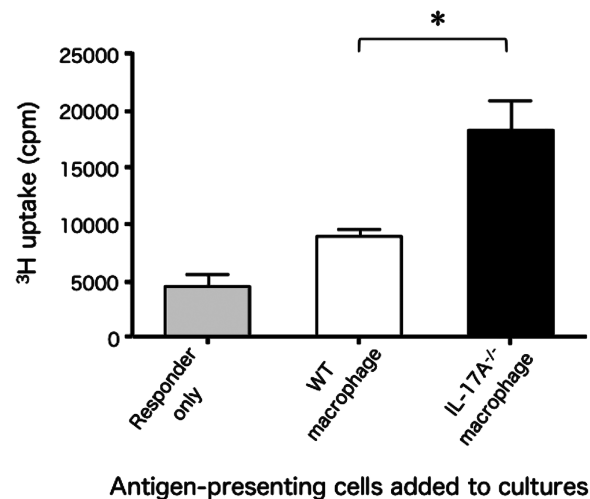


Fig. 5. Comparison of antigen-presenting capacities of peritoneal macrophages.

Mixed lymphocyte reactions (MLRs) were performed by mixing donor splenocytes with host peritoneal macrophages. Cultures from splenocytes only (\blacksquare , n=12), splenocytes mixed with WT macrophages (\square , n=12), or with IL-17A KO macrophages (\blacksquare , n=12) were compared. The data show the means \pm 2SD of ³H-uptake from 3 independent experiments. * $p < 0.05$.

ウスを用いて検討した. クロドロン酸リポソームはマクロファージだけでなく樹状細胞も除去してしまうが, 過去の報告から²⁸⁾ 移植10日前にクロドロン酸リポソームを腹腔内投与すると, 移植日には樹状細胞は回復し, マクロファージ除去のみが持続することが知られている. 今回の研究では, 予備的検討により同様の状態であることを確認の上, IL-17A KO ホストマウスをマクロファージ除去した群と除去していない2群に分けて移植を行った. 2回の実験の合算した生存曲線を示す (図6). IL-17A KO ホストマウスにおいてマクロファージ除去群では有

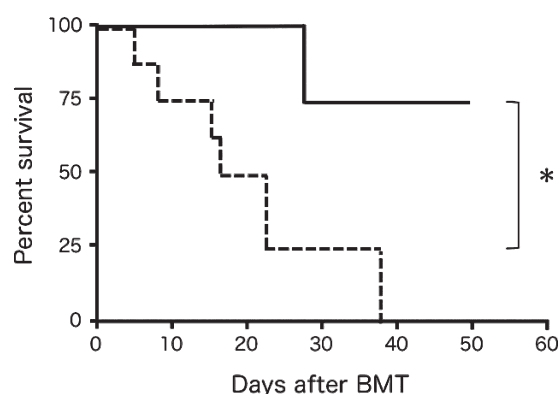


Fig. 6. Effect of macrophage depletion on post-BMT survival. BMT was performed in control IL-17A KO mice and macrophage-depleted IL-17A KO mice. Survival of IL-17A KO mice with prior depletion of macrophages (solid line, n=12) were compared with that of control IL-17A KO mice (dotted line, n=12). Means of two independent experiments are shown. * $p < 0.05$.

意に生存期間の延長を認め、IL-17A KO ホストマウスにおける致死的急性GVHDの誘導には、ホスト由来マクロファージが関与していることが示唆された。

考 察

本研究では急性GVHDにおけるホスト由来IL-17Aの役割について明らかにするために、まずIL-17Aを欠損するIL-17A KOマウスをホストとして用いて移植後早期の変化について検討が行われた。その結果、WTホストマウスに比べてIL-17A KOホストマウスにおいて、明らかに生命予後が悪いことが示された(図1A)。さらに移植後早期の体重変化や臨床的GVHDスコアの比較データからは、このような生命予後の顕著な違いが早期GVHDの程度の差を反映していることが強く示唆された(図1B, C)。一方、体重変化やGVHDスコアの差は移植後10日以降では顕著ではなく、ホストIL-17A欠損の直接の影響は移植後早期の一過性のものである可能性も示唆された。

これまでIL-17A欠損マウスを用いてGVHDにおけるIL-17Aの役割に関する多くの報告が相次いでいる^{19)~21), 29)~33)}。これらの報告では慢性GVHDにおけるドナー由来IL-17Aの役割については増悪因子であるとの一定の見解が得られており、抗IL-17A抗体の臨床応用が期待されている³²⁾³³⁾。一方で急性GVHDにおけるドナー由来IL-17Aの役割には増悪因子とする報告と抑制因子とする報告があり結論は出ていない^{19)~21)}。移植モデルによる差などが考察にあげられているが、IL-17AはT細胞だけでなく、パネート細胞などの非免疫性細胞からの産生も報告されている²⁴⁾。したがって、移植後早期に残存しているホスト由来IL-17Aの急性GVHDへの関与を検討することが重要と考えられ、本研究が施行された。本研究の結果は、ホスト由来IL-17Aが明らかに急性GVHD抑制に重要な役割を果たすことを示している。さらにYi

ら¹⁹⁾はIL-17A KOマウスをドナーとして用いた研究で、ドナーT細胞のTh1の分化とインターフェロン γ 産生が亢進し、急性GVHDが増悪することを報告している。この研究では、リコンビナントIL-17A投与により急性GVHDが緩和されることも示しており、IL-17Aがホスト樹状細胞を介してドナーT細胞分化を抑制する可能性があるとしている。Yiらの研究ならびに著者らの研究の結果は、急性GVHDにおけるIL-17Aによる抑制機序の存在を強く示唆している。

一般的に急性GVHDはTh1細胞、慢性GVHDはTh2細胞がその発症に中心的な役割を果たすといわれてきた。いずれも、ステロイド投与を主体とした炎症制御がその治療の基本となる³⁴⁾。しかし、GVHDの中には一般的な抗炎症薬であるステロイド治療に抵抗性の症例が存在し、その背景にはTh1細胞やTh2細胞によって惹起される炎症とは異なる発症機序があることが想定されている³⁵⁾。このようなTh1/Th2細胞以外の関与や自然免疫の関与、ドナーT細胞とホスト抗原提示細胞以外の免疫細胞の役割、血管や上皮系細胞など非免疫細胞の重要性など、様々な可能性が検討されてきた⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾。本研究では、急性GVHDにおける腸管炎症に関わる細胞を明らかにする目的で、大腸における病理学的検討を行った。

マウス大腸の病理学的検討からは、腸管炎症の程度の差がWTとIL-17A KOホストマウスにおける予後の顕著な差を惹起していること、腸管炎症が局所に浸潤するCD4⁺T細胞ならびにCD8⁺T細胞などのドナー由来のエフェクター細胞の活性化の程度を直接反映していることが示された(図2)。さらに、IL-17A KOホストマウスにおけるこれらドナー由来エフェクター細胞(effector cell)の活性化は、ホスト由来マクロファージの活性化と増殖により惹起されていることが、GFP標識ドナー細胞を用いた検討から示された(図3)。IL-17A KOホストマウスではこのようなマクロファージの活性化と増殖が認められた(図3)。さらに、IL-17A KOホストマウスの炎症局所に浸潤するマクロファージは、対照に比べて明らかにTNF- α の産生が亢進していた(図4)。これらの結果からは、腸管局所におけるIL-17A産生がマクロファージの活性化と、それにより惹起される腸管炎症の抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。

腸管局所におけるホスト由来マクロファージの重要性はさらに、MLR反応における抗原提示能の比較により明らかに示された(図5)。対照に比べIL-17A KOホストマウス由来のマクロファージは、明らかに強いドナーT細胞の増殖を誘導した。この結果は、腸管局所における強い細胞浸潤とT細胞活性化に一致する。さらに、マクロファージを除去したIL-17A KOホストマウスでは骨髄移植後の生存率が顕著に改善しており、IL-17A KOホストマウスにおいてホスト由来のマクロファージが急性GVHDの発症、特に腸管病変の惹起に深く関与していることが示された(図6)。

Vareliasら³⁷⁾はIL-17Aレセプター欠損宿主マウスを用いて宿主由来IL-17Aが超急性GVHDに関して抑制性に働くことを報告している。IL-17A欠損宿主マウスを用いた我々の結果と矛盾しない結果であるが、その機序として宿主マクロファージを介する炎症制御に関して検討したのは、本研究が初めてである。本研究のマウスモデルでは、IL-17A KO宿主マウスにおける宿主由来マクロファージが直接および間接的にGVHDの増悪に寄与していることが示唆された。難治性GVHDにおけるマクロファージの役割は臨床的にも報告されており、今回の検討は臨床病態に即した検討と言える³⁸⁾³⁹⁾。

本研究からは、宿主由来のIL-17Aが急性GVHD抑制に重要な役割を果たすことが示された。したがって、骨髄移植後の一定期間、少なくとも腸管局所では十分な量のIL-17Aが産生されることで、急性GVHD特に腸管GVHDを抑制し予後を著しく改善できる可能性が示されたが、ドナー細胞由来のIL-17Aがどの時点から慢性GVHDの増悪因子となるかは今後の研究課題である(図7)。また、本研究では宿主由来のIL-17A産生細胞の同

定や産生機序については解明できておらず、どのような治療介入が、最も有効に局所IL-17A産生を誘導するかについてはさらなる検討が必要である。

今後、GVHDにおける抗IL-17A抗体の臨床応用が考慮される場合、移植時期や病態によっては抗IL-17A抗体が症状増悪をもたらす危険性を含んでいることが示唆された(図7)。抗体製剤や生物学的製剤によるGVHD抑制を目指す際には、どのような時期にどの薬剤を用いるかについて精緻な設計が必要である。また一方、適切な治療計画が実行される場合には、GVHDの発症を有効に抑制することにより、現在よりはるかに優れた、患者に優しい造血幹細胞移植が可能となることが期待される。

結 論

IL-17A欠損宿主マウスを用いた今回の実験から、宿主由来IL-17Aは宿主マクロファージの異常活性化の制御および急性GVHDの制御に関与していることが示唆された。将来的に抗IL-17A抗体をGVHDの治療薬として検討する際には逆に腸管GVHDを増悪させる危険性もあり、使用に際して使用時期など慎重な検討が必要と考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師谷内江昭宏教授に深甚の謝意を捧げるとともに、終始直接の御助言と多大なる御指導をいただきました西村良成先生に深謝いたします。さらに本研究の遂行に際し、多大なるご協力と御助言を頂きました金沢医科大学病理学 佐藤勝明先生およびマウスを譲渡していただきました東京理科大学教授 岩倉洋一郎先生に深く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Ferrara, JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 373: 1550-1561, 2009
- 2) Zhang L, Chu J, Yu J, Wei W. Cellular and molecular mechanisms in graft-versus-host disease. *J Leukoc Biol* 99: 279-287, 2016
- 3) Antin JH. T-cell depletion in GVHD: less is more? *Blood* 117: 6061-6062, 2011.
- 4) Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 12: 443-458, 2012
- 5) Mielcarek M, Furlong T, O'Donnell PV, Storer BE, McCune JS, Storb R, Carpenter PA, Flowers ME, Appelbaum FR, Martin PJ. Posttransplantation cyclophosphamide for prevention of graft-versus-host disease after HLA-matched mobilized blood cell transplantation. *Blood* 127: 1502-1508, 2016
- 6) Shin HJ, Baker J, Leveson-Gower DB, Smith AT, Segal EI, Negrin RS. Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Blood* 118: 2342-2350, 2011
- 7) Miyamoto T, Takashima S, Kato K, Takase K, Yoshimoto G, Yoshida S, Henzan H, Osaki K, Kamimura T, Iwasaki H, Eto T, Teshima T, Nagafuji K, Akashi K. Comparison of cyclosporine and

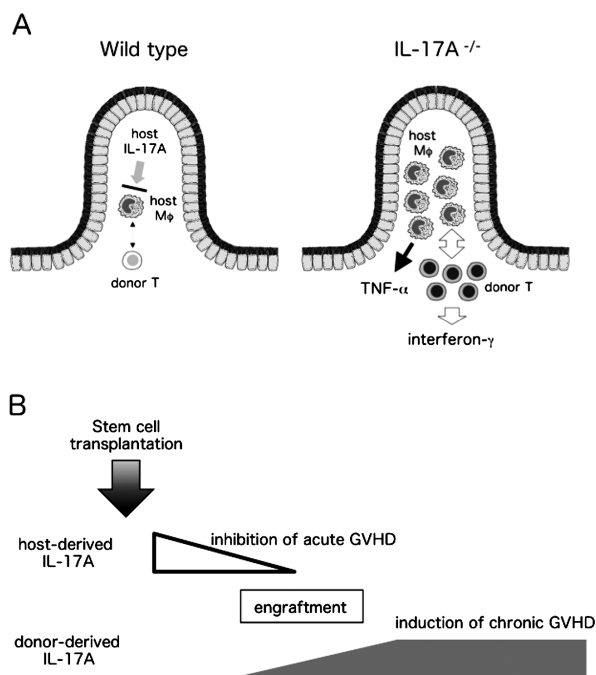


Fig. 7. Clinical course after bone marrow transplantation and roles of IL-17A.

In the presence IL-17A, host intestinal tract is protected from acute GVHD. Host-derived IL-17A inhibits macrophage activation with little allostimulation of donor T cells (A, left). In the absence of IL-17A, macrophage activation will result in significant TNF- α production. Furthermore, these macrophages induce intense donor T cell activation and production of inflammatory cytokines, such as interferon γ (A, right). Previous reports and the current study suggest that host-derived IL-17A plays inhibitory role in acute GVHD, whereas donor-derived IL-17A may promote chronic GVHD that occurs after engraftment of the donor cells (B).

tacrolimus combined with mycophenolate mofetil in prophylaxis for graft-versus-host disease after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation. *Int J Hematol* 105: 92-99, 2017

8) Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821-852, 2007

9) Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-1141, 2005

10) Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, Iwakura Y, Sakaguchi N, Sakaguchi S. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17⁺ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J Exp Med* 204: 41-47, 2007

11) Lee EB, Amin M, Bhutani T, Wu JJ. Emerging therapies in psoriasis: a systemic review. *Cutis* 101: 5-9 (3S), 2018

12) Ogawa A, Andoh A, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Neutralization of interleukin-17 aggravate dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol* 110: 55-62, 2004

13) Reich K, Leonardi C, Langley RG, Warren RB, Bachelez H, Romiti R, Ohtsuki M, Xu W, Acharya N, Solotkin K, Colombel JF, Hardin DS. Inflammatory bowel disease among patients with psoriasis treated with ixekizumab: A presentation of adjudicated data from an integrated database of 7 randomized controlled and uncontrolled trials. *J Am Acad Dermatol* 76: 441-448, 2017

14) Amaty N, Garg AV, Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol* 38: 310-322, 2017

15) Tyndall A, Dazzi F. Chronic GVHD as an autoimmune disease. *Best Pract Res Clin Hematol* 21: 281-289, 2008

16) Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177: 566-573, 2006

17) Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, Fossiez F, Ryffel B, Schnyder B. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 203: 2715-2725, 2006

18) Gartlan KH, Bommiasamy H, Paz K, Wilkinson AN, Owen M, Reichenbach DK, Banovic T, Wehner K, Buchanan F, Varelias A, Kuns RD, Chang K, Fedoriv Y, Shea T, Coghill J, Zaiken M, Plank MW, Foster PS, Clouston AD, Blazar BR, Serody JS, Hill GR. A critical role for donor-derived IL-22 in cutaneous chronic GVHD. *Am J Transplant* 18: 810-820, 2018

19) Yi T, Zhao D, Lin CL, Zhang C, Chen Y, Todorov I, LeBon T, Kandeel F, Forman S, Zeng D. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* 112: 2101-2110, 2008

20) Kappel LW, Goldberg GL, King CG, Suh DY, Smith OM, Ligh C, Holland AM, Grubin J, Mark NM, Liu C, Iwakura Y, Heller G, van den Brink MR. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood* 113: 945-952, 2009

21) Carlson MJ, West ML, Coghill JM, Panoskaltis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. In vitro-differentiated TH17 cells with

severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* 113: 1365-1374, 2009

22) Karimi MH, Salek S, Yaghobi R, Ramzi M, Geramizadeh B, Hejr S. Association of IL-17 gene polymorphisms and serum level with graft versus host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cytokine* 69: 120-124, 2014

23) Espinoza JL, Takami A, Nakata K, Onizuka M, Kawase T, Akiyama H, Miyamura K, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation. *PLoS One* 6: e26229, 2011

24) Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17 producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 479-489, 2010

25) Cooke KR, Hill GR, Crawford JM, Bungard D, Brinson YS, Delmonte J Jr, Ferrara JL. Tumor necrosis factor- α production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 102: 1882-1891, 1998

26) Moreno SG. Depleting macrophages in vivo with clodronate-liposomes. *Methods Mol Biol* 1784:259-262, 2018

27) Hill GR, Cooke KR, Teshima T, Crawford JM, Keith JC Jr, Brinson YS, Bungard D, Ferrara JL. Interleukin-11 promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 102: 115-123, 1998

28) Hashimoto D, Chow A, Greter M. Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Exp Med* 208:1069-1082, 2011

29) Iclozan C, Yu Y, Liu C. T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 170-178, 2010

30) Fulton LM, Carlson MJ, Coghill JM. Attenuation of acute graft-versus-host disease in the absence of the transcription factor ROR γ t. *J Immunol* 189: 1765-1772, 2012

31) Wu Y, Yu XZ. IL-17A \neq Th17 in GVHD. *Cell Mol Immunol* 15: 282-283, 2018

32) Hill GR, Olver SD, Kuns RD. Stem cell mobilization with G-CSF induces type 17 differentiation and promotes scleroderma. *Blood* 116: 819-828, 2010

33) Nishimori H, Maeda Y, Teshima T. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood* 119: 285-295, 2012

34) Nishimori H, Maeda Y, Tanimoto M. Chronic graft-versus-host disease: disease biology and novel therapeutic strategies. *Acta Med Okayama* 67: 1-8, 2013

35) Magenau J, Runaas L, Reddy P. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 173:190-205, 2016

36) Luft T, Dietrich S, Falk C. Steroid refractory GVHD: T-cell attack within a vulnerable endothelial system. *Blood* 118:1685-1692, 2011

37) Varellias A, Ormerod KL, Bunting MD, Koyama M, Gartlan

KH, Kuns RD, Lachner N, Locke KR, Lim CY, Henden AS, Zhang P, Clouston AD, Hasnain SZ, McGuckin MA, Blazar BR, MacDonald KP, Hugerholtz, P, Hill GR. Acute graft-versus-host disease is regulated by an IL-17-sensitive microbiome. *Blood* 129: 2172-2185, 2017

38) Inamoto Y, Martin PJ, Paczesny S, Tabellini L, Momin AA, Mumaw CL, Flowers MED, Lee SJ, Carpenter PA, Storer BE,

Hanash S, Hansen JA. Association of Plasma CD163 Concentration with De Novo-Onset Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 23: 1250-1256, 2017

39) Facon T, Jouet JP, Noel-Walter MP, Bloget F, Bauters F, Janin A. Involvement of TNF-alpha secreting macrophages in lethal forms of human graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 20: 511-515, 1997

Protection from acute graft-versus-host disease by host-derived interleukin -17A Rie Kuroda, Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University, Kanazawa 920-8641, Pediatrics. *Juzen Med. Soc.*, **127**, 84 – 92 (2018)

Key words bone marrow transplantation, graft-versus-host-disease, IL-17A, macrophage, tumor necrosis factor- α

Abstract

Graft-versus-host disease (GVHD) is a serious complication of hematopoietic stem cell transplantation. Severe GVHD often results in fatal outcomes. Therefore, understanding of its precise pathogenesis and the development of novel therapeutic interventions are of urgent necessity. Interleukin 17A (IL-17A) is a cytokine that is known to promote or inhibit inflammation depending on the type of the autoimmune disease. Conflicting results have been reported in the literature regarding the role of donor-derived IL-17A in the pathogenesis of acute GVHD. However, little is known about the regulatory role of host-derived IL-17A. The purpose of the present study was to determine the inhibitory function of host-derived IL-17A in acute GVHD. Bone marrow cells and splenic cells from C57/BL6 donor mice were transplanted into wild type (WT) and IL-17A knockout (KO) major histocompatibility complex- mismatched Balb/c host mice after lethal irradiation to induce acute GVHD. Acute GVHD occurred significantly more frequently in the IL-17A KO mice than in the WT mice. A large number of tumor necrosis factor α -producing macrophages were detected within the colon of the IL-17A KO mice. A mixed lymphocyte reaction was performed using donor splenic cells and host peritoneal macrophages. Macrophages from the IL-17A KO mice showed a significantly higher antigen-presenting capacity than those from the WT mice in this experiment. Depletion of macrophages in the IL-17A KO mice significantly improved post-transplantation survival, suggesting that macrophage depletion can inhibit acute GVHD. These results indicate that host-derived IL-17A plays a significant role in the regulation of acute GVHD through the inhibition of macrophage activation.