

主論文の要旨

**Correlations of programmed death 1 expression
and serum IL-6 level with exhaustion of
cytomegalovirus-specific T cells after allogeneic
hematopoietic stem cell transplantation**

〔 同種造血幹細胞移植後のサイトメガロウイルス抗原特異的
T細胞の機能低下へのPD-1と血清IL-6の関与 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

加藤 智則

【緒言】

サイトメガロウイルス (CMV) は、同種造血幹細胞移植後等の免疫抑制状態では、多彩な臨床症状を呈し致死的な感染症を引き起こす。近年 CMV アンチゲネミア等によるモニタリングや抗ウイルス剤の早期投与により CMV 感染症の頻度は減少しているが、薬剤耐性化や副作用の為に抗ウイルス剤が投与困難になり CMV 感染が長期間持続することが経験される。CMV 感染のコントロールには、CMV 抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の構築が重要である。Programmed death 1 (PD-1) や cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) は T 細胞活性化を抑制する分子 (免疫抑制受容体) として知られ、マウスの lymphocytic choriomeningitis virus 慢性感染時の T 細胞疲弊化では PD-1 が特に重要であると報告されている (Nature. 2006; 439: 682-687)。ヒトでは HIV 感染等で PD-1 高発現と T 細胞機能低下との関連が報告されているが (Nature. 2006; 443: 350-354)、CMV 感染についての詳細な検討は行われていない。我々は、同種造血幹細胞移植後に CMV 持続感染を合併した患者の末梢血単核球 (PBMC) を用いて、CMV 抗原特異的 T 細胞の機能低下と PD-1 の関連、さらに PD-1 発現を調節する因子について検討した。

【対象及び方法】

- 1) 患者：悪性リンパ腫再発期に HLA 遺伝子学的 8 座一致非血縁ドナーより同種骨髄移植を実施し、CMV 感染が 1 年以上持続した HLA-A*24:02 陽性患者。
- 2) CMV 抗原特異的 T 細胞の誘導：患者と健常人から PBMC を分離した。IL-2 存在下で HLA-A*24:02 拘束性 CMV pp65 由来ペプチド QYDPVAALF で PBMC を刺激した。CMV 抗原特異的 T 細胞の頻度をテトラマーアッセイ法、IFN γ 産生能をサイトカイン分泌アッセイ法にて解析した。PD-1 の細胞表面上での発現はフローサイトメトリー法で解析した。また、PD-1 や IL-6 の影響を検討する為に、抗 PD-L1 抗体、抗 PD-L2 抗体や抗 IL-6 レセプター抗体を加え誘導した。接着細胞との共培養では、接着細胞との接触を阻害するために cell-culture insert 上で誘導した。
- 3) サイトカイン濃度測定：血清及び培養上清中のサイトカイン (IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12p70、IL-17A、IL-21、TNF、IFN γ 、TGF- β) 濃度は、サイトメトリックビーズアレイ法を用いて解析した。同種造血幹細胞移植後の一時的 CMV 感染患者 (n=4) と持続的 CMV 感染患者 (n=3) および健常人 (n=5) の血清を用いた。

【結果】

患者 PBMC 中には CMV pp65 由来ペプチドを認識し IFN γ を産生する T 細胞の頻度は健常人 PBMC より少なかった (図 1)。エピトープペプチド QYDPVAALF にて患者 PBMC を刺激して 14 日間培養すると、CMV 抗原特異的 T 細胞の増殖は不良でその細胞表面上の PD-1 の発現は高かった。抗 PD-L1 抗体で PD-1 とそのリガンドとの相互作用を阻害すると、CMV 抗原特異的 T 細胞増殖能が改善した (図 2)。以上より、PD-1 と PD-L1 の相互作用が CMV 抗原特異的 T 細胞増殖能低下に関与していることが示された。

患者血清を加えた培養液中で PBMC を QYDPVAALF で刺激すると、健常人血清に比べ

て CMV 抗原特異的 T 細胞の増殖が不良で PD-1 の発現も高く、患者血清中に抑制性の因子及び PD-1 の発現を調節する因子が存在する可能性が示唆された。患者血清中の IL-6 は健常人と比較して高濃度(表 1)であった為、IL-6 と CMV 抗原特異的 T 細胞増殖能低下との関係を検討した。PBMC と血清を、健常人または患者で組み合わせ CMV 抗原特異的 T 細胞を培養すると、共に健常人では非常に増殖が良いが共に患者では増殖が不良であった。CMV 抗原特異的 T 細胞増殖能が低下すると、培養上清中の IL-6 濃度は高くなり PD-1 の発現も高くなった(図 3)。以上より、IL-6 が PD-1 の発現を調節し CMV 抗原特異的 T 細胞増殖能低下に関与している可能性が示唆された。抗 IL-6 レセプター抗体で IL-6 と受容体の伝達経路を阻害すると CMV 抗原特異的 T 細胞の増殖が有意に改善したことから、IL-6 が CMV 抗原特異的 T 細胞増殖能低下に関与していることが示された。他の持続的 CMV 感染患者で血清 IL-6 濃度は、一時的 CMV 感染患者や健常人と比較して有意に高かった(図 4)。

IL-6 による CMV 抗原特異的 T 細胞の増殖抑制のメカニズムを調べる為に、CMV 抗原特異的 T 細胞誘導中に増えることがある接着細胞の関与を検討した。IL-6 は接着細胞と共培養すると多く産生された。CMV 抗原特異的 T 細胞は、接着細胞と接触すると増殖は抑制され PD-1 の発現も高いが、cell-culture insert を用いて接着細胞との接触を阻害すると増殖や PD-1 の発現に変化はなかった(図 5)。接着細胞の形質は、CD33⁺、CD11b⁺、PD-L1⁺、arginase-1⁺、iNOS⁺で、CD33 陽性細胞を分離して CMV 抗原特異的 T 細胞と共培養すると増殖が抑制され、PD-1 の発現も高くなり、IL-6 濃度も高くなった(図 6)。

【考察】

同種造血幹細胞移植後 CMV 持続感染患者から得られた CMV 抗原特異的 T 細胞は、CMV pp65 ペプチド抗原刺激に対する反応が悪く PD-1 が高発現しており、PD-1 と PD-L1 の相互作用が CMV 抗原特異的 T 細胞増殖能低下に関与していることが示された。また、IL-6 が CMV 抗原特異的 T 細胞増殖能低下に関与していることが示され、CMV 持続感染患者の血清 IL-6 濃度は一時的 CMV 感染患者や健常人よりも明らかに高かった。

接着細胞の形質は、CD33⁺、CD11b⁺、arginase-1⁺、iNOS⁺で、骨髓球系由来抑制性細胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC)に相当すると考えられた。MDSC は、癌や感染症等で IL-6/STAT3 経路を介して増加し T 細胞の機能を抑制する(Nat Rev Immunol. 2009; 9: 162-74)。CMV 持続感染患者では、CD33 陽性接着細胞が IL-6 を産生し、autocrine による IL-6 刺激で接着細胞が増え、CMV 抗原特異的 T 細胞と接着細胞との接触により、PD-1/PD-L1 を介して CMV 抗原特異的 T 細胞の機能を低下させている可能性が示唆された。MDSC に対する IL-6/IL-6R の相互作用を阻害することで、疲弊した T 細胞の機能を改善させ、CMV 抗原に限らず他のウイルス抗原や腫瘍抗原に対する細胞療法に寄与する可能性がある。更なる多数例における CMV 感染と IL-6 の関係の検討が必要だが、IL-6 は同種造血幹細胞移植後 CMV 持続感染の有用なバイオマーカーとなり得る可能性がある。

【結語】

同種造血幹細胞移植後 CMV 持続感染において、CMV 抗原特異的 T 細胞の機能は低下しており、その機能低下への PD-1/PD-L1 の相互作用の関与が明らかとなった。IL-6 が CMV 抗原特異的 T 細胞における PD-1 発現や T 細胞機能の調節に関与している可能性が示唆された。IL-6 は同種造血幹細胞移植後 CMV 持続感染の有用なバイオマーカーとなり得る可能性がある。