

主論文の要旨

Quantitative assessment of T cell clonotypes in human acute graft-versus-host disease tissues

〔 ヒト急性移植片対宿主病組織における
T細胞クロナイプの定量的評価 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 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)

小山 大輔

【背景】

急性移植片対宿主病 (GVHD) は同種造血幹細胞移植後の主要な合併症であり、時として患者を死に至らしめる。マウス移植モデルを用いた研究により、急性 GVHD の病態は主として標的臓器に浸潤したドナー由来のアロ反応性 T 細胞による組織傷害であることが示されている。しかし、ヒトの組織生検検体からの T 細胞分離は困難であり、ヒト急性 GVHD における組織浸潤 T 細胞に関する解析は十分でない。T 細胞受容体 (TCR) レパトア解析は、組織からの T 細胞分離を行うことなく組織浸潤 T 細胞の全体像を観察できる点で有用である。次世代シーケンサーを用いることにより、組織や末梢血中に存在する多数の TCR クロノタイプを網羅的かつ定量的に解析することが可能となった。一方、TCR レパトア解析からは T 細胞の機能に関する情報は得られない。本研究では、ヒト急性 GVHD 組織浸潤 T 細胞のレパトアを明らかにするとともに、ヒト急性 GVHD 組織浸潤 T 細胞の機能についても検討した。

【方法】

急性GVHD発症後かつ治療開始前のGVHD組織生検検体および同時期の末梢血CD3陽性T細胞からRNAを抽出した。TCR-β鎖の相補性決定領域 (CDR) 3を5'RACE-PCR法により増幅し、次世代シーケンサーを用いたTarget deep sequenceを行った。得られた塩基配列をTCR解析ソフトウェアにより解析した。それぞれの検体に含まれるクロノタイプの多様性の指標として、inverse Simpson's diversity index (1/Ds) を算出した。組織生検検体の一部を細断し、コラゲナーゼ処理の後に培養し、組織浸潤T細胞を得た。得られた組織浸潤T細胞を限界希釈法によりクローン化し、Rapid expansion法により増幅した。得られた組織浸潤T細胞クローンの細胞傷害活性をクロム放出試験にて評価した。組織浸潤T細胞クローンからRNAを抽出し、TCR-β鎖CDR3領域を5'RACE-PCR法により増幅し、direct sequence法にて塩基配列を決定した。本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を受けて行われた。患者からは文書による同意を得た。

【結果】

急性GVHDを発症した患者8例より、GVHD組織生検12検体および末梢血8検体を得た (Table 1)。症例1において、末梢血における1/Dsは22.0であった一方、皮膚組織における1/Dsは1.6と極めて低かった (Figure 1A)。皮膚組織において最も高頻度に存在したクロノタイプの割合は75.6%、2番目に高頻度に存在したクロノタイプの割合は23.0%と、わずか2つのクロノタイプが組織浸潤T細胞全体の約98%を占めた (Figure 1A、矢印)。全8例において、GVHD組織における1/Dsは末梢血の1/Dsと比較して有意に低く、急性GVHD組織浸潤T細胞のレパトアが高度にskewingしていることが明らかとなった (Figure 1B)。組織検体10検体より組織浸潤T細胞クローンの分離を試みたところ、症例1の皮膚から機能解析が可能なまでに増幅可能な2つのクローンを得た。これら2つの組織浸潤T細胞クローンは、クロム放出試験において患者由来の末梢血単核球を傷害する一方でドナー由来のEBV-lymphoblastoid cell lineは傷害せず、アロ反応性を有

していることが確認された (Figure 2)。また、それらのTCR- β 鎖の塩基配列を決定したところ、クローンNo.1は症例1の皮膚組織において最も高頻度 (75.6%) だったクロノタイプと、クローンNo.2は2番目に高頻度 (23.0%) だったクロノタイプと同一であることが判明した。症例4からは皮膚、胃および大腸の組織検体を得た。症例1と同様、いずれの組織においても1つないしは2つのクロノタイプが組織浸潤T細胞全体の約99%を占めるという組織浸潤T細胞レパトアの高度なskewingが観察された (Figure 3、矢印)。また、それら5つのクロノタイプは全て異なっていた。そこで複数の組織検体を得ることができた3例 (症例2、4、6) について、GVHD組織中で高頻度 ($\geq 5\%$) に存在したクロノタイプの比較を行った (Table 2)。それぞれの患者において、高頻度となるクロノタイプは組織ごとに異なっていた。次に、異なる患者7例から得られた皮膚組織7検体において、高頻度 ($\geq 5\%$) に存在したクロノタイプを比較した (Table 3)。その結果、複数の患者に共通して高頻度に存在したクロノタイプは存在しなかった。すなわち、同じ皮膚組織であっても、組織中で高頻度に存在するクロノタイプは患者ごとに異なっていた。最後に、GVHD組織中に高頻度で存在したクロノタイプの末梢血における存在頻度を検討した。組織中に高頻度で存在したクロノタイプのほとんどが末梢血中では極めて低頻度あるいは検出限界以下であり、それぞれのクロノタイプの組織中の存在頻度と末梢血中の存在頻度の間には相関を認めなかった (Figure 4)。

【考察】

Target deep sequenceによるTCRレパトア解析により、急性GVHD組織浸潤T細胞のレパトアが高度にskewingしていること、すなわち、急性GVHD組織においてはわずかな種類のT細胞クローンが高度に増大していることが明らかとなった。本研究の新規性は、同時に組織浸潤T細胞の機能をクローンレベルで解析したことにある。症例1の皮膚GVHDにおいて、組織浸潤T細胞の約98%を占めた2つのT細胞クローンのアロ反応性を確認したことから、ヒト急性GVHDが極めて限られたアロ反応性T細胞クローンにより発症しうることが示唆された。同一患者における異なる急性GVHD組織において、高頻度となるクロノタイプが組織ごとに異なることから、急性GVHD発症に関与するアロ抗原が組織ごとにそれぞれ異なる可能性が示された。一方、異なる患者由来の同一組織において、高頻度となるクロノタイプが患者ごとに異なることから、急性GVHD発症に関与するアロ反応性T細胞がそれぞれの患者特異的である可能性が示された。急性GVHD組織中に高頻度で存在したクロノタイプの末梢血中における存在頻度は概して低く、末梢血のTCRレパトアは急性GVHD標的臓器におけるTCRレパトアを反映しないものと考えられた。急性GVHDの病態解明のためには、標的組織を解析することが重要である可能性が示唆された。

【結論】

ヒト急性GVHDは、組織ごと且つ患者ごとに異なるわずかな種類のアロ反応性T細胞クローンにより発症する可能性がある。