

9. 空間マルチオミクス解析を用いた免疫細胞性組織障害における新規細胞死に基づく免疫細胞療法の開発

岡山大学病院 血液・腫瘍内科 研究准教授 藤原 英晃

概要

近年、悪性腫瘍治療として免疫細胞療法は手術・抗がん剤・放射線療法に続く第4の治療法として確立されてきているが、治療効果低下の原因は過剰な免疫反応による主要臓器障害であり、免疫細胞療法の劇的な進歩には新たなブレイクスルーが必要である。免疫細胞療法のうち、同種造血細胞移植の最大の合併症である移植片対宿主病（GVHD）は病態生理として、ドナーT細胞を中心とした免疫担当細胞と標的細胞の変化が、さらに周囲の標的細胞に対して影響を及ぼすことでさらに組織障害が惹起されるという、「負の連鎖」を形成する(1-4)。しかしながら、GVHDの標的細胞がどのように障害を受け、周囲へ影響を及ぼすかに関してはいまだ不明な部分が多い。また、ferroptosis・pyroptosis・necroptosisといった新たな細胞死は癌細胞で認められる一方で、免疫細胞性組織障害における関与は不明である。GVHDにおいて致死性的となる腸管における免疫細胞性組織障害を解明するため、骨髄移植実験を行い移植後7日目（超急性期）と21日目（急性期）に腸管細胞のsingle cell RNA sequence（scRNAseq）を行った。腸管における各種細胞群（免疫細胞・腸管細胞）における遺伝子発現の変化を検討したところ、移植後7日目と21日目では細胞死関連遺伝子の発現が大きく異なっていた。いずれの時期でもGVHD群で発現上昇が認められたが、7日目にはアポトーシス関連遺伝子発現上昇を、21日目にはpyroptosis関連遺伝子発現上昇が認められた。腸細胞のpyroptosis関連遺伝子の上昇は腸管成熟上皮細胞で上昇していたが、幹細胞レベルでは上昇しておらず、免疫細胞側では、T細胞全般、NK細胞、B細胞ではpyroptosis関連遺伝子の上昇は認められなかった。2種類のpyroptosis阻害剤を移植後に投与したところ、GVHDの改善を認める一方で、抗腫瘍効果は維持された。Gsdmd-KOマウスをドナー、レシピエントそれぞれに用いた場合でも同様の結果が得られた。この結果から免疫細胞・組織におけるpyroptosisは組織障害低減・腫瘍効果向上に寄与することが期待される。

背景および目的

近年、悪性腫瘍治療として免疫細胞療法は手術・抗がん剤・放射線療法に続く第4の治療法として確立されてきている。免疫細胞療法として同種造血細胞移植、免疫チェックポイント阻害療法、キメラ抗原受容体T細胞療法が実臨床で使用されている。しかしながら、従来の抗がん剤治療では反応・治癒を得られなかった方への効果は最大で50%であり、長期間寛解を得られる症例は極めて限定的であることから未だ不十分デアある。治療効果低下の原因は過剰な免疫反応による主要臓器障害であり、免疫細胞療法に基づくがん治療展開は限界も見込まれており、免疫細胞療法の劇的な進歩には新たなブレイクスルーが必要である。

免疫細胞療法のうち、同種造血細胞移植の最大の合併症である移植片対宿主病（GVHD）は病態生理として、ドナーT細胞を中心とした免疫担当細胞の役割が最も解明されており、その制御に使用される免疫抑制剤は感染症の増加や悪性疾患の再発に繋がるため、限界がある。一方で、GVHDの発症・重症化と組織要因に関してはいまだ不明な部分が多い。その中で、申請者はGVHDによる腸上皮細胞内において従来の細胞死と異なるフェロトーシスや、パイロトーシス・ネクロプトーシスといった新たな細胞死の存在を認確認している。これらの新規

細胞死は癌細胞で認められる一方で、免疫細胞性組織障害における関与は不明である。免疫細胞療法と組織障害に関しては同種造血細胞移植だけでなく、他の免疫細胞療法でも強く関連しており、従来の免疫細胞療法における免疫細胞調節の概念に新たな展開をもたらしている。本研究では、従来の細胞死の概念を超えた新たな細胞死を予防・治療し、従来の免疫抑制剤と異なる新たな治療方法の確立を目的とする。

方法

腸管上皮細胞は GVHD の標的臓器の中で、同種反応性 T 細胞による攻撃により細胞死が発生し、最も致命的な組織傷害を生じる。予備実験では活躍する免疫細胞が異なる急性期及び慢性期 GVHD マウスモデルを用いて各種臓器におけるフェロトーシス、パイロトーシス、ネクロトーシスのマーカー免疫染色で検討した。急性期ではフェロトーシスが、慢性期ではパイロトーシスとネクロトーシスのマーカーが大きく変動していることが判明している。この基礎データを元に免疫性細胞障害における各種細胞死の病態生理を明らかにし治療標的として検討する。

①：GVHD 障害組織における新規細胞死の同定

GVHD 発症腸管組織検体を用いてこれまでのアポトーシスとネクローシスに加えて、フェロトーシス・パイロトーシス・ネクロプトーシスとし、それぞれの制御遺伝子を、免疫染色や単一細胞 RNA 解析を用いて評価する。急性 GVHD 発症マウスモデルとして最も頻用されている C57BL/6→Balb/c 骨髄移植モデル、慢性 GVHD 発症マウスモデルとして最も頻用されている B10.D2→Balb/c 骨髄移植を用いた。

②：動物モデルを用いた新規細胞死特異的な予防・治療法の開発

①で得られたパイロトーシス蛋白に対する阻害剤を用いて、GVHD の改善及び抗腫瘍効果の維持を確認する。germline 上でパイロトーシス欠損マウスおよび腸管特異的パイロトーシス欠損マウスに骨髄移植を行い GVHD の改善及び抗腫瘍効果の維持を確認する。

③：ヒト検体におけるマルチオミクス解析による細胞死の同定・再定義

①-②で得られたデータを元にヒト腸管 GVHD 検体を用いて、三次元単一細胞マルチオミクス解析を行い、ヒトにおける GVHD 組織における新規細胞死の特徴（領域や周辺の免疫細胞の同定）の検証を行う。

結果および考察

①：GVHD 障害組織における新規細胞死の同定

急性 GVHD 発症マウスモデルとして最も頻用されている C57BL/6→Balb/c 骨髄移植モデルを用いた。移植後 7 日目、21 日目に Syngeneic レシピエント（GVHD 発症なし）、Allogeneic レシピエント（GVHD 発症あり）マウスから腸上皮細胞を採取し、単一細胞 RNA 解析（scRNAseq）を行い、細胞死関連遺伝子発現を検討した。様々なパイロトーシス遺伝子が腸管上皮組織特異的な変化を認めたが、ネクロプトーシスおよびフェロトーシス関連遺伝子の変動は認められなかった。興味深い点として、骨髄移植後早期の腸管組織障害に関してはアポトーシスが、中期以降の免疫細胞性腸管組織障害としてパイロトーシスがメインとなっており、調節因子の存在が伺われる。また、パイロトーシスは免疫細胞ではほとんど遺伝子発現が認められず、腸管上皮細胞特異的に発現上昇が認められた。一方で、免疫染色を用いた各新規細胞死関連蛋白を確認したところ、フェロトーシスおよびパイロトーシス関連蛋白の発現上昇が認められたが、ネクロプトーシス関連蛋白の変動は認められなかった。本解析により、GVHD が発症している組織、特に腸管、においてパイロトーシス関連遺伝子発現の変化が明らかとなった。

②：動物モデルを用いた新規細胞死特異的な予防・治療法の開発（図）

①で得られたパイロトーシス蛋白に対する阻害剤を用いたところ生存率の改善並びに GVHD の改善が得られた。また、germline 上でパイロトーシス欠損マウスおよび腸管特異的パイロトーシス欠損マウスに骨髄移植を行った場合でも生存率の改善を認めており、パイロトーシス阻害剤による組織障害の改善が認められた。

③：ヒト検体におけるマルチオミクス解析による細胞死の同定・再定義

①-②で得られたデータを元にヒト腸管 GVHD 検体を用いて、三次元単一細胞マルチオミクス解析を行い、ヒト GVHD 組織における新規細胞死の特徴（領域や周辺の免疫細胞の同定）の検証を現在行っている。

上記の結果から免疫細胞及び臓器におけるパイロトーシスの関与が認められた。さらにパイロトーシスの阻害による組織障害の軽減と抗腫瘍効果の維持が認められた。今後はパイロトーシス阻害による組織障害軽減機序及び抗腫瘍効果維持機序の解明を行う。一方で、ネクロトーシスやフェロトーシスの関与に関しては他の方法を用いた検討が必要であり、今後更なる検討を行う予定としている。従来、細胞死は外的要因による壊死を特徴とするネクローシスと内的要因によるプログラムされたアポトーシスに分類されており、免疫細胞による標的組織障害は、主にアポトーシスの有無で判断されていた。しかしながら、近年の研究の進歩に伴いこれまで説明不可能であった細胞死が明らかとなった。これらの新規細胞死は免疫細胞に攻撃された癌細胞でより研究されている一方で、正常細胞における新規細胞死に関しては不明である。ICI 療法をはじめとする近年の免疫療法の進歩により、これまで治療困難であった担癌高齢者や合併症患者も治療を受けることが可能な方が増えている。ICI 療法は従来の抗がん剤とは異なる機序であることや高リスクの方への適用が増加することで、ICI 療法に関連した正常組織の障害が認められるようになってきている。同様に、免疫性細胞性組織障害である GVHD に関する研究も多数なされているが、新規細胞死に関するものは少ない。ICI 療法および GVHD において腸管組織障害は治療中止となりうる重大な合併症であり、両者に共通する要因が推測されるが未だ明らかにされていない。免疫細胞による細胞死の詳細な機序を明らかにし、「組織脆弱性」対して予防・治療介入を試みる知見は、①GVHD や、②ICI 療法や CAR-T 療法の作用・副作用機序の解明ならびに治療抵抗・難治例に対する有効性の向上につながる。臨床的にも、免疫反応性を最大限にしつつ周辺組織障害を最小限にする治療は合理性があり、免疫学のみならずがん個別化医療の展開においても新たなブレークスルーをもたらさう。

(完)

引用文献

- 1) DOI: 10.1038/s41467-018-06048-w, 2018
- 2) DOI: 10.1038/s41564-019-0373-1. 2019
- 3) DOI: 10.1038/s41590-021-01048-3. 2021
- 4) DOI: 10.1016/j.immuni.2023.01.007. 2023