

## 総説 (2016年度横浜市立大学医学研究奨励賞受賞研究)

# 同種造血幹細胞移植後の急性GVHDの病態と マクロファージの活性化との関連

宮崎 拓也

横浜市立大学医学部 血液・免疫・感染症内科学

**要旨:** 同種造血幹細胞移植後に発症する移植片対宿主病 (GVHD) は, しばしば診断や治療に苦慮する移植関連の主要な合併症である. 移植後早期にみられる急性GVHDはドナー由来のT細胞が宿主を異物とみなすことによって生じるが, その他にも様々な免疫反応がGVHDの病態を形成する. 移植後のマクロファージの活性化も急性GVHDの病態形成に重要であることが示唆されるものの, そのメカニズムや臨床的意義は十分に解明されていない. そこで本総説では, まず急性GVHDの診断, 病態, そして診断・予後因子として有用な新規バイオマーカーに関するこれまでの知見を概説する. さらに, 急性GVHDの病態とマクロファージの活性化との関連に着目し, 現在我々が行っている臨床研究を紹介しつつ, 移植後のマクロファージの活性化が急性GVHDをはじめとした移植関連合併症に与える影響について考察する.

**Key words:** 急性移植片対宿主病 (acute graft-versus-host disease), 造血幹細胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation), マクロファージ (macrophage)

## 急性GVHD

移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) は, 同種造血幹細胞移植後にみられる合併症で, 重症化すれば致命的な経過を辿ることもあり, 移植後の最も重要な合併症である. 移植後早期にみられる急性GVHDは, 皮疹, 黄疸, 下痢を特徴とする症候群であり, その診断には皮膚, 肝, 消化管の少なくとも一臓器の障害が存在する. さらに, GVHDに類似する他の原因疾患を否定するためには, 病変部位の生検による病理学的診断が求められる. 急性GVHDの多くは, ドナー由来の造血細胞が生着する移植後2~4週間頃に好発する. しかし, この時期は移植前処置による臓器障害, 感染症, 血球貪食症候群, 生着前後の炎症性サイトカインの過剰な産生に起因する生着症候群など様々な移植関連合併症を呈することがあり, それらの鑑別にしばしば苦慮する. 急性GVHDの重症度として, 1994年のconsensus conferenceで提唱さ

れた分類が広く用いられているが, 皮疹の広がり, ビリルビンの上昇, 下痢の量によってその重症度が定義される<sup>1)</sup>. 移植後に免疫抑制剤を投与することによってGVHDの発症を予防するが, それにも関わらずGrade II以上の急性GVHDを発症した際には原則として治療の対象とされる. しかし, これらのGVHDの診断や重症度の判定に際し, 臨床所見では主治医や施設間での差異を認め, 病理学的診断でも非特異的な所見がしばしばみられることがあり, GVHDの診断および治療介入には, さらなる客観的かつ正確な判断材料が必要である.

## 急性GVHDのバイオマーカー

従来の臨床所見のみによって分類される急性GVHDの重症度分類は, GVHDの発症予知, 治療反応性や予後予測には反映されず, 急性GVHDの診断に有用な客観的バイオマーカーの探索が進められてきた. これまでに幾つ

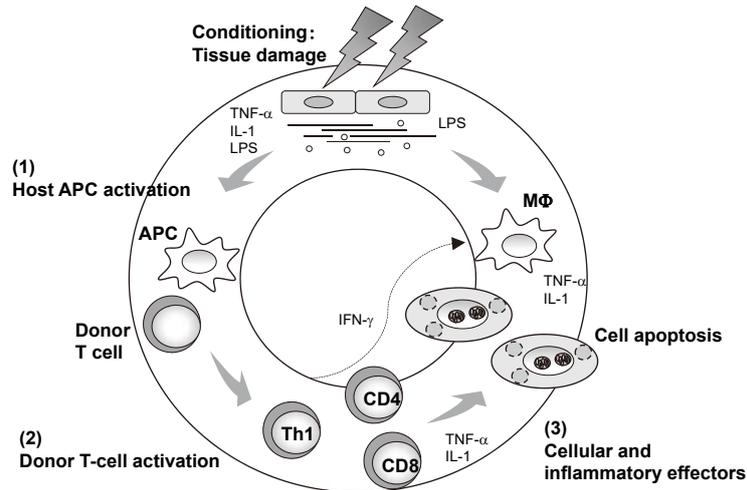


図1 急性GVHDの発症機序の三段階モデル

(1) 抗原提示細胞の活性化, (2) ドナーT細胞の活性化, (3) 臓器障害. APC: antigen presenting cell, Th1: T-helper 1 cell, MΦ: macrophage, LPS: lipopolysaccharide (文献<sup>6)</sup>より改変)

ものバイオマーカーが報告されているが、その代表的なものを挙げると、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の受容体である TNF- $\alpha$  receptor 1 が移植後に上昇するとその後のGVHDの発症予知と重症度の良い指標となること<sup>2)</sup>、T細胞の活性化により産生される可溶性 interleukin-2 receptor (sIL-2R) が急性GVHDの重症度と相関することが報告されている<sup>3)</sup>。しかし、これらはその他の移植関連合併症においても上昇することがあり、疾患特異的なマーカーとは言い難い。その中で、プロテオミクス法を用いた急性GVHDの診断・予後に関するバイオマーカーの研究が進んでいる。皮膚GVHDに特異的な elafin、腸管GVHDに特異的な regenerating islet-derived 3- $\alpha$  (REG3 $\alpha$ )、GVHD治療抵抗性のバイオマーカーとして suppression of tumorigenicity 2 (ST2) などの新規のバイオマーカーが同定されている<sup>4)</sup>。将来的には、これらのバイオマーカーによりGVHDの発症リスクや重症化リスクを予測できる可能性があり、より個別化されたGVHDへの予防・治療戦略の確立が期待されている<sup>5)</sup>。

### 急性GVHDの病態

急性GVHDは、移植片に含まれるドナー由来のT細胞が宿主を異物とみなすことによって生じる。これまでの研究により、急性GVHDの発症機序は三段階モデルとしてまとめられる(図1)<sup>6)</sup>。第一段階は大量化学療法や放射線照射などの移植前処置による組織障害の結果、IL-1やTNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインが放出され、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞(antigen presenting cell; APC)が準備状態に入る。第二段階では抗原提示細胞に反応して輸注したドナーT細胞の活性化と

増殖がみられ、第三段階では細胞障害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte; CTL)や活性化マクロファージ由来のサイトカインにより組織障害が生じる。このように急性GVHDは様々な免疫反応を介し、複雑で多彩な病態を形成する。これまでにドナーT細胞の活性化と急性GVHDの発症のメカニズムに関する知見は蓄積されつつある一方で、急性GVHDとマクロファージの活性化との関連については十分に解明されていない。そのため、急性GVHDの発症・診断、さらにはGVHDの発症リスク・重症化リスクにマクロファージの活性化が如何に影響を及ぼしているかについて解明することは意義があると言える。

### マクロファージの活性化

マクロファージは、病原微生物の感染および生体組織のシグナルや環境ストレスにより活性化し、病原微生物や死細胞の貪食作用、抗原提示、炎症性サイトカインの産生を介して、自然免疫と獲得免疫の両方に重要な役割を果たしている。近年、マクロファージには異なった機能を有する細胞集団が存在し、その活性化状態と機能によって、TNF- $\alpha$ やinterferon- $\gamma$ により活性化される古典的活性化マクロファージ(M1マクロファージ)、IL-4やIL-13により活性化される選択的活性化マクロファージ(M2マクロファージ)、創傷治癒マクロファージ、制御性マクロファージに分類され、その活性化の多様性が報告されている<sup>7)</sup>。

一方、臨床的にはマクロファージの活性化の指標となる蛋白として、従来より血清フェリチンが重要視されている。マクロファージからのフェリチン分泌と赤血球の貪食に伴うフェリチン産生がその由来となるが、マクロ

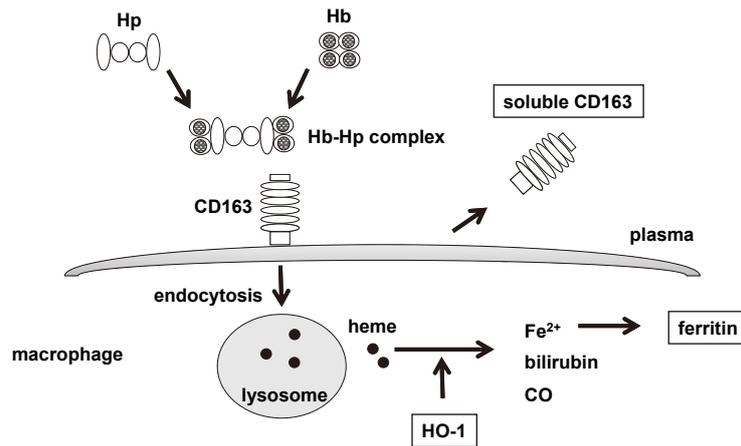


図2 マクロファージにおけるヘム代謝経路 (CD163-HO-1-フェリチン産生経路)  
Hp: haptoglobin, Hb: hemoglobin, CO: carbon monoxide

ファージの異常活性化が病態である血球貪食症候群や成人Still病において血清フェリチンが異常高値を示し、臨床的に有用なバイオマーカーとして用いられている。しかし、血清フェリチンは肝機能障害、輸血後鉄過剰症、悪性腫瘍などでも高値を示すためマクロファージに特異的なマーカーとは言い難い。ここで、将来的に新規のマクロファージの活性化の指標となり得る蛋白として、酸化ストレス応答蛋白であるヘムオキシゲナーゼ1 (heme oxygenase-1; HO-1) とヘモグロビンスカベンジャー受容体であるCD163を紹介する。これらは、いずれもマクロファージにおけるヘム鉄の代謝に重要な蛋白であり、血清中のHO-1や可溶化したCD163 (soluble CD163; sCD163) の発現レベルが臨床的にマクロファージの活性化の指標となるバイオマーカーの候補である。

### HO-1とCD163の機能

赤血球の崩壊によって遊離するヘモグロビン、およびその構成成分ヘムは細胞毒性が極めて強く、生体内で速やかに代謝される。ヘモグロビンはハプトグロビンと結合し、この複合体がマクロファージ細胞表面に存在する高親和性スカベンジャー受容体であるCD163に結合し、細胞内に取り込まれる。取り込まれたヘムはHO-1により遊離鉄、ビリルジン、一酸化炭素となる。遊離鉄はフェリチン産生を誘導し、再利用サイクルに入る(図2)。

HO-1はヘム代謝に関わる酵素であると同時に、酸化ストレスや活性化刺激によりその産生が強く誘導されるが、特に単球や臓器局在マクロファージにおいて強く誘導される。この単球/マクロファージによるHO-1産生が酸化ストレスからの細胞保護や炎症制御に重要な役割を果たすことが知られているが、細胞毒であるヘムを分解することで細胞障害を防ぎ、ヘム代謝産物であるビリル

ビンや一酸化炭素が細胞保護作用を担うと考えられている<sup>8)</sup>。これまでに当教室では、マクロファージの異常活性化が病態となる血球貪食症候群や成人Still病において血清HO-1が上昇し、疾患の診断やその病勢のバイオマーカーとなることを報告した<sup>9)</sup>。

一方、CD163は単球/マクロファージに発現し、遊離ヘモグロビンを処理する役割を有するが、それ以外にもHO-1のように急性期応答蛋白として、炎症の制御に関わる。Lipopolysaccharide (LPS) やTNF- $\alpha$ などの炎症性刺激によってマクロファージが活性化すると血清中にsCD163の放出が誘導される。このsCD163の機能は明らかになっていないが、LPSで刺激されたマクロファージから放出されるsCD163がT細胞機能を抑制することが報告されている<sup>10)</sup>。

### 移植後のフェリチン、HO-1、sCD163の動態と急性GVHDとの関連

今回、マクロファージの活性化の指標となり得るフェリチン、HO-1、sCD163に着目し、急性GVHDをはじめとした移植関連合併症との関連を検討するため、移植患者血清におけるフェリチン、HO-1、sCD163の動態を解析した。2014年4月から2015年12月にかけて、横浜市立大学附属病院および横浜市立大学附属市民総合医療センターにおいて同種造血幹細胞移植を施行した血液疾患患者32例(急性骨髄性白血病18例、急性リンパ性白血病4例、骨髄異形成症候群4例、悪性リンパ腫4例、多発性骨髄腫1例、再生不良性貧血1例)を対象として、前処置前 (pre-conditioning; pre)、移植日 (day 0)、移植後14日 (day14)、21日 (day21)、28日 (day28) の各ポイントにおいて血清中のフェリチン、HO-1、sCD163を測定した。HO-1とsCD163はELISAを用いて測定した (HO-1

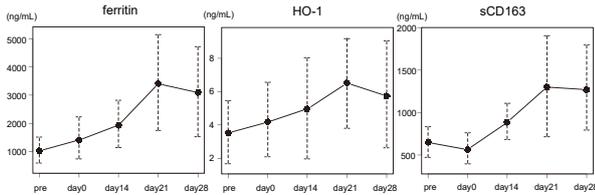


図3 移植後の血清フェリチン，HO-1，sCD163の経時的変化

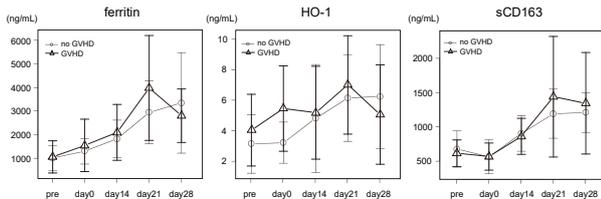


図4 移植後急性GVHD発症例と未発症例における血清フェリチン，HO-1，sCD163の経時的変化

ELISA Kit, Enzo Life Sciences, CD163 Human ELISA Kit, R&D Systems). 本研究は当院の臨床倫理委員会の承認を受け、患者より同意を取得した。

移植前後のフェリチン，HO-1，sCD163の経時的な変化を図3に示す。測定ポイント毎のフェリチン平均値は、pre 1082 ng/mL (± 677), day 0 1601 (± 1356), day14 1967 (± 995), day21 3340 (± 1791), day28 3057 (± 1734), HO-1平均値は、pre 3.74 ng/mL (± 2.44), day 0 4.52 (± 2.70), day14 5.17 (± 3.33), day21 6.37 (± 3.05), day28 5.66 (± 3.31), sCD163平均値は、pre 653 ng/mL (± 246), day 0 568 (± 240), day14 878 (± 442), day21 1294 (± 627), day28 1244 (± 534)であった。いずれのマーカーも移植後経時的に上昇し、day21でピークとなり、day28にピークアウトした。マーカーの相関関係の解析では、フェリチンとHO-1の相関係数 $r=0.503$  ( $p<0.0001$ )、フェリチンとsCD163  $r=0.619$  ( $p<0.0001$ )、HO-1とsCD163  $r=0.300$  ( $p<0.001$ )を示し、フェリチンとHO-1、また、フェリチンとsCD163に相関を認めた。

次に、急性GVHDの発症の有無と各マーカーの経時的変化を検討した(図4)。いずれのマーカーも急性GVHD発症群においてday21の値が高値を示す傾向にあったが、いずれも有意差を認めなかった(no GVHD vs. GVHD: フェリチン 2879 vs. 3977 ng/mL,  $p=0.0923$ , HO-1 5.91 vs. 7.01 ng/mL,  $p=0.332$ , sCD163 1189 vs. 1439 ng/mL,  $p=0.281$ )。さらに、詳細なデータは割愛するが、全32症例中4例において移植後に非再発死亡を認めた。この4例においてもday21の各マーカー値が高値を示す傾向があり、それぞれのマーカーは急性GVHD以外の移植関連合併症にも影響することが示唆された。

## おわりに

急性GVHDは克服すべき移植関連合併症であるにもかかわらず、診断や治療に苦慮することをしばしば経験する。その病態の一因となるマクロファージの活性化のメカニズムや臨床的意義に着目し、現在進行中の臨床研究の一部を紹介した。移植後においてマクロファージが活性化する病態は多様であり、急性GVHD以外にも種々の移植後関連の合併症においてマクロファージの活性化が影響することが想定される。今後は、急性GVHDに対する詳細な解析に加えて、移植後の生着反応あるいは種々の移植関連合併症との関連についても解析し、移植後早期のマクロファージの活性化の臨床的意義について検討する予定である。将来的に、急性GVHDやその他の移植関連合併症に関する研究が進歩することで、これら合併症の正確な評価や重症化症例の予測による合併症の予防や早期の治療介入が可能となり、最終的に移植患者の予後が改善されることを期待したい。

## 謝 辞

今回の受賞にあたり横浜市立大学医学会賞・医学研究奨励賞選考委員の諸先生方に心より御礼申し上げます。また、日頃よりご指導いただいている血液・免疫・感染症内科学教室の中島秀明教授ならびに医局員の先生方に重ねて御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al: 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone Marrow Transplant, **15**: 825–828, 1995.
- 2) Choi SW, Kitko CL, Braun T, et al: Change in plasma tumor necrosis factor receptor 1 levels in the first week after myeloablative allogeneic transplantation correlates with severity and incidence of GVHD and survival. Blood, **112**: 1539–1542, 2008.
- 3) Miyamoto T, Akashi K, Hayashi S, et al: Serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor for monitoring acute graft-versus-host disease. Bone Marrow Transplant, **17**: 185–190, 1996.
- 4) Vander Lugt MT, Braun TM, Hanash S, et al: ST 2 as a marker for risk of therapy-resistant graft-versus-host disease and death. N Engl J Med, **369**: 529–539, 2013.
- 5) Levine JE, Braun TM, Harris AC, et al: A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study. Lancet Haematol, **2**: e21–29, 2015.
- 6) Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E: Graft-versus-

- host disease. *Lancet*, **373**: 1550 – 1561, 2009.
- 7) Mosser DM, Edwards JP: Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, **8** : 958 – 969, 2008.
- 8) Yachie A: Heme oxygenase and its role in defense system; paradigm shift of anti-inflammatory therapy. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, **30**: 11 – 21, 2007.
- 9) Miyazaki T, Kirino Y, Takeno M, et al: Serum HO-1 is useful to make differential diagnosis of secondary hemophagocytic syndrome from other similar hematological conditions. *Int J Hematol*, **91**: 229 – 237, 2010.
- 10) Baeten D, Møller HJ, Delanghe J, Veys EM, Moestrup SK, De Keyser F: Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis Rheum*, **50**: 1611 – 1623, 2004.

### Abstract

#### ASSOCIATION BETWEEN ACUTE GVHD AND MACROPHAGE ACTIVATION IN ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Takuya MIYAZAKI

*Department of Hematology and Clinical Immunology,  
Yokohama City University Graduate School of Medicine*

Graft-versus-host disease (GVHD) is the major transplant-related complication after hematopoietic stem cell transplantation, but reaching a definite diagnosis or obtaining good treatment response for GVHD are often difficult. Acute GVHD, seen in the early phase of transplantation, is initiated by host-reactive donor T cells, but a variety of immune reactions are associated with the pathogenesis. Although macrophage activation after transplantation has been suggested to play an important role in the pathogenesis of acute GVHD, the mechanisms and clinical implications remain unclear. Herein, I summarize previous advances in GVHD diagnosis, pathogenesis, and biomarkers for the diagnosis and prognosis of acute GVHD. Furthermore, I focus on the association between acute GVHD and macrophage activation in transplantation and introduce our ongoing clinical study. Finally, I discuss the clinical impact of macrophage activation on transplant-related complications, including acute GVHD.

