

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 705 号	学位申請者	山筋 好子
審査委員	主査	岡本 康裕	学位
	副査	石塚 賢治	副査
	副査	井上 博雅	副査
			博士 (医学)
			山下 勝
			吉満 誠

主査および副査の5名は、令和5年5月26日、学位申請者 山筋 好子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) マウスモデルのMHCは？(回答) 急性GVHD MHC 半合致 IPS モデル、慢性GVHD MHC 不一致 BO モデル、IVIS 実験モデルは急性GVHD モデル MHC 不一致である。

質問2) マウスモデルはMHCクラスII一致のモデルか？B細胞の影響はないモデルか？(回答) クラスI, II も異なるモデルであった。B細胞の影響は否定できないため、ドナーB細胞も肺へ浸潤している影響をFig. 1Eで確認した。

質問3) HLAの完全不一致の慢性GVHD BO モデルは急性GVHD が起こる気がするが、起こさない工夫はあるか？(回答) 移植前のシクロフォスファミド腹腔内投与、致死量ではない放射線照射、レシピエントマウスからの移植細胞数の違い(特に脾臓細胞数=T細胞数) (B6→BDF-1: 骨髄細胞  $1 \times 10^7$  cells, 脾臓細胞  $5 \times 10^4$  cells) が異なる点が、工夫・違いと考える。

質問4) このモデルを使って慢性GVHDの解析日が56日目であるが、マウスでいう慢性GVHDという時期をみたのか？(回答) 多くの慢性GVHDモデルで解析されている日数を参考に56日目に解析を行った。

質問5) 急性GVHDモデルでは皮膚病変に差があったか？(回答) 同種(以下Allo)では移植経路の違いにより、肉眼的に脱毛、毛並みの点で差があった。骨髄内移植群(以下IBM-SCT群)は脾臓内移植群(以下IV-SCT群)に比べ、皮膚変化は軽度であった。

質問6) Fig. 1E Allo群の細胞数のほうが、自家(以下Syn)の細胞よりも肺に集まっているようにみえるが、検定ではどうか？(回答) 移植後早期(1時間)の時点で、Allo群への移植細胞数が多いのは、早期の時点で移植された細胞とアロ反応などが起こっている可能性を考える。検定では、IV-SCT群では有意差があったが( $p=0.03$ )、IBM-SCT群では有意差がなかった( $p=0.36$ )。移植細胞数に比べ肺内ドナー細胞数が少ないが、IVIS実験で特にIV群では肺以外に腸・リンパ節・脾臓と思われる部位への集積も認めており、肺のみに細胞が集まるわけではないが肺へも集積をしていることをとらえている。

質問7) Fig. 1F MCP-1のmRNAが高いのは、単に細胞数が多いことを反映しているのか？たくさん集まっている細胞のmRNAをみているのか？発現しているmRNAの由来細胞は肺からか？(回答) 細胞数の増加を反映している可能性はあるが、GAPDH比での発現を測定しているため、同じ細胞数として考えた時の差としてのデータとなる。由来細胞については、レシピエントに残存したマクロファージや肺上皮細胞からが主であるが、ドナーリンパ球も関与している可能性はある。しかしノックアウトマウスをドナーとした実験は行っていないため、ドナー/レシピエント由来かをこの実験系で区別できていない。実験では肺組織をホモジナイズしている。

質問8) IBM-SCTとIV-SCTでは肺に到達するT細胞の量が重要で、移植後早期も晩期も肺の合併症に関与している。将来的に臨床に応用するときは、T細胞量を調整することで回避できるか？(回答) 骨髄腔内に直接入れることで幹細胞の造血能回復が早いと考える。一方、T細胞除去移植は移植後感染症の頻度が増加するために積極的に行われていない現状がある。しかし、抗胸腺グロブリンによる*in vivo* depletionは、HLA不一致移植においてGVHDをコントロールできる手段として確立しつつある。

質問9) ヒトへIBMを行う際の投与経路は？(回答) 通常の骨髄検査同様に後腸骨稜への穿刺・投与となる。

質問10) 移植骨髄細胞採取の手技は？移植細胞をコラーゲンゲルにサスペンションする理由は？(回答) 安楽死後、大腿骨、脛骨を取り出し、骨髄をwash outして、移植骨髄細胞を採取した。既報告でマウスIBM-SCTの際、コラーゲンゲル使用群の生着がスムーズであったため、今回、私たちは骨髄腔外への漏れを最小限にしたい点もあり、コラーゲンゲルを使用した。強い粘稠度はなく、移植時の抵抗もなく、スムーズに注入が可能であった。

質問11) 実験でのマウスの数は？(回答) 基本的には1回の実験あたりIBM・IV群(合計4群)Syn群4~5匹、Allo群7~8匹である。*In vivo* imagingマウスの実験は1回の実験は各群4~5匹、ルシフェリンIP後から撮影までの時間を同じ設定とした実験を繰り返し、データを合計した。

質問12) 肺の評価の際は、血液を環流しているか？(回答) PBSで環流している。

質問13) ルシフェラーゼの実験で、4日目Allo群が死亡している理由は？(回答) FVB/N→Balb/cが激しい急性GVHDモデルであるため移植後早期にAllo群の死亡がみられたと考える。

質問14) 肺機能評価では、絶対値で書いているので、いわゆる正常コントロールマウスが必要だったのではないかと？(回答) コントロールマウスは行っていないが、放射線前処置は行っているが、Syn群がほぼコントロールに近いと考えている。

質問15) エラスタシスは高いほうがよいように思うが、低いほうがよいのか？(回答) エラスタシスは肺胞の縮まろうとする力、弾性抵抗であり、数値としては低いほうがよいと理解している。

## 最終試験の結果の要旨

(705)

- 質問 16) 肺の病理評価の方法は？ (回答) マウス左葉から作成した組織標本 2-4 枚からマッソン・トリクローム染色で青く染まる線維化領域面積/気管支基底膜長から算出した。
- 質問 17) ルシフェリンの腹腔内 (以下 IP) への投与、発光は？ (回答) ルシフェリン IP 後ピークが 15 分、wash out は 30 分といわれている。IP 後 5 分を目安に IVIS で撮影を行った。
- 質問 18) 骨髄移植と聞くと、全身に細胞が回るほうがよいと思う面もある。骨髄腔内に留まったほうがよい理由は？ (回答) 移植片対白血病 (GVL) 効果の観点からは、再発のリスクが高くなる懸念はあり、今回のモデルで GVL 効果についての実験は行っていない。非感染性移植後肺合併症はしばしば致死的となることが多く、IRM-SCT によるこの予防効果は重要であると考ええる。
- 質問 19) Fig. 1E 急性 GVHD モデルでドナー肺内細胞数の分布は？ Total は何を表しているか？ (回答) Cell Trace キットにて標識したドナー細胞を用いて IBM、IV を施行しており、移植したドナー細胞がレシピエント肺に発現していることをみている。
- 質問 20) CD11b が上昇する理由は？ (回答) 移植したドナー細胞数は骨髄細胞の割合が多く、このため、骨髄球系の細胞 CD11b が上昇していると考えられる。
- 質問 21) MCP-1 がメッセンジャー RNA レベルのみでしか差が出なかった理由は？ (回答) 使用したマウスモデルは、IPS モデルとして実験を行った。全身における aGVHD は強く発現するものの、肺合併症の発現が軽度であった影響を考えている。
- 質問 22) 移植後 B0 モデルで生理パラメータと組織像が解離している理由は？レジスタンスの変化がなくて、エラストランスとコンプライアンスの変化があるのは、B0 よりも間質性肺炎病変を示唆しているのではないか？ (回答) このパラメータと線維化像から B0 モデルと言われている。
- 質問 23) 肺への集積が 2 相性になったメカニズムは？ (回答) IV-SCT 後の細胞がそのままトラップされて 1 相目のピークがおこった後、肺からある程度 wash out され、そして 2 相目として wash out された細胞が循環にのりまた肺へ集積する点、それに加えて特に Allo 群で多くの細胞が集積するメカニズムとして、アロ反応によるドナー細胞の更なる増殖が合わさることが想定される。
- 質問 24) Fig. 3C, 3D Allo・Syn 群の細胞の浸潤数の違い、2 相性となった違いは？ (回答) Fig. 3C, 3D は、total Flux photons の数値をみると、All 群は 10、Syn 群は 5 であり、Syn 群のドナー細胞の発現は低い。予備実験では、5 日目の *ex vivo* の実験で Syn IV-SCT 群は Allo IV-SCT 群に比べ 1/10 程度の集積であった。移植後早期は Allo、Syn の違いではなく IV-SCT か IBM-SCT かの移植手技の違い、移植後後期 (5 日目) では、Allo 群、Syn 群ではドナー細胞の集積に差があった。この現象のメカニズムは解明できていないが、アロ抗原反応が関与しているのではないかと考えている。
- 質問 25) MCP-1 だけをみた理由は？ (回答) 全身 GVHD、IPS をみた既報告で上昇がみられた MIP-1 $\alpha$  (CCL3)、RANTES (CCL5)、MCP-2 (CCL8) を測定したが、再現性が得られず、今回、MCP-1 の mRNA レベルのみ再現性かつ有意差があったため、MCP-1 の結果を報告した。MCP-1 発現に関してはヒト GVHD 臨床データで BAL 中に MCP-1 が発現しているとの報告もあり、重要な位置づけにあるケモカインだと思われる。
- 質問 26) 急性 GVHD スコアは肺だけの観察ではない。IBM-SCT 群は骨髄の立ち上がり早く、GVHD スコアが軽いのではないか？ 生着期間は？ (回答) マウスモデルでの生着の定義は難しいが、フルドナーキメラになることは予備実験で確認している。一般的に GVHD を強く起こすマウスは骨髄の立ち上がりも早い傾向だが、IBM-SCT 群は GVHD はおこり起こった GVHD は軽減していた。各モデルマウスにおいて、Allo 群では IBM-SCT は IV-SCT に比べ全身性 GVHD は軽減している。これらの GVHD スコアは肺 GVHD を直接反映しないスコアシステムである。生着の速さは GVHD の増悪に関連する可能性はあり、予備実験でキメラにて生着をそれぞれを確認している。
- 質問 27) 同じ細胞数を移植している。IBM-SCT の生着までの期間が早いならば、体重なども回復も早いので GVHD のスコアに影響があるのでは、生着までの期間は関与しないのか？ (回答) ドナーキメラが早くても、GVHD によって体重減少が遷延するのが一般的である。Syn 群マウスはドナーキメラが Allo 群よりも遅いが、GVHD を発症しないため、体重は回復していく。ヒトの生着の定義にマウスの生着定義があてはまるのかの確認のため、眼動脈採血も試み、白血球を確認する実験も行った。
- 質問 28) 急性 GVHD は肺以外、他の臓器はみているか？ (回答) 予備実験で IVIS で移植後早期に肺以外で肺・腸管・脾臓へ集積し、後期 *ex vivo* では Allo・Syn 群ともに脾臓>>肺=腸管>肝臓に集積した現象をとらえた。皮膚についても aGVHD スコアで観察した。今回の実験は肺にスポットを当てており、再現性の確認はできていない。
- 質問 29) 静脈から注射をした方がメリットがあるのではないか？ (回答) 村田らの報告では (Murata M, et al. *cancer Sci.* 2017 ;108:1634-1639)、国内第 2 相試験で IV-SCT に比べて IBM-SCT で好中球の生着が早く、急性 GVHD の発症は同等であった。骨髄内移植の手技自体は煩雑ではあるが、非感染性肺合併症を含めた GVHD を軽減し、生着にも有利であれば、メリットが大きいのと考える。今後の更なる検討が必要である。
- 質問 30) 慢性 GVHD スコアが 40 日目から上昇しているが、体重が早くから変化している、理由は何か？ (回答) 慢性 GVHD スコア項目は皮膚症状と脱毛であり、体重が含まれていないため、体重変化と GVHD スコア上昇が相関していない。
- 質問 31) Fig. 3C day2 で細胞の差が出はじめています。day3 で IV 群ドナー細胞が増えているが、肺にトラップされて、そこで増殖したのか？ 骨髄に入ったものが肺に戻って増殖してから肺にきたのか？ (回答) 肺でトラップした細胞→アロ抗原反応惹起されたものと全身に回ったドナー細胞がアロ反応を起こしながら循環にのり肺へ戻り増殖するという両方の影響で、移植後 day3 時点で増殖がみられると考えている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。