薬 理工 医 慶應義塾大学小川葉子、佐藤真理、清水映輔 SFC 細胞老化・細胞老化関連分泌形質が眼慢性移植片対宿主病を促進する

Introduction

血液悪性疾患の根治療法である造血幹細胞移植において移植後に血液提供者ドナーの免疫細胞がレシピエントの全身の標的組織を攻撃する疾患である慢性移植片対 宿主病(chronic graft-versus-host disease: cGVHD)が移植の成功率を妨げ長期生存者の生活、視覚の質を妨げる要因となっている。cGVHDは眼症状として結 膜、角膜、涙腺に高度な炎症と線維化を起こし視覚障害に陥る程の重症ドライアイを引き起こす。我々はcGVHD 関連ドライアイ症例に睫毛と眉毛の白髪化が生じ ること、涙腺に浸潤するマクロファージに老化マーカー、酸化ストレスマーカーの発現、涙腺組織にリポフスチン蓄積を認めたことから病態に何らかの老化現象が 関与するのではないかという着想に至った。近年 DNA障害、p16-RB ・p53 経路の活性化と不可逆的な細胞周期停止、senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子分泌で特徴付けられる細胞老化が慢性炎症を促進することが注目されている。今回我々はcGVHDマウスモデルの主に涙腺で主要なSASP因 子の発現と細胞老化が促進されていること、cGVHDマウスモデルに老化細胞選択的除去剤(ABT-263)、SASPの一つIL-6を阻害する抗IL-6抗体(MR16-1)を投与し たところ、老化細胞・SASP因子発現抑制と眼cGVHDの病態抑制効果を認め、細胞老化・SASPが眼cGVHDの効果的な治療標的の一つであることが示唆された。



また、Foxp3+CD4+制御性T細胞保持、CD4+CD153+OPN+老化T細胞浸潤抑制 効果の観点から25mg/kgが同薬剤の至適濃度と考えられた (Figure3, d)。



(e), 抗IL-6抗体MR16-1をcGVHDマウスモデルに骨髄移植前日、骨髄移植後10, 17, 24日目に腹腔内投与した。

Results

【cGVHDマウスモデルとドナー由来のSASP因子IL-6産生マクロファージ】 GFP発現マウスをドナーとする骨髄移植を行った実験で、脾臓においてcGVHD マウスモデルではコントロールに比較し有意にIL-6+マクロファージが多く、ま たそのほとんどがドナー由来の細胞 (GFP+)であった(**Figure1, a**) 。涙腺組織 において時間経過に伴いドナー由来IL-6産生マクロファージのコントロールに 比較し有意な浸潤の増加を認めた(Figure1, b)。



【抗IL-6抗体MR16-1の眼cGVHD病態抑制効果】

SASPの一つを阻害する抗IL-6抗体MR16-1をcGVHDマウスモデルに投与し病態 抑制効果を検証した。その結果、単位面積あたりの涙腺組織で病的線維化、老化 マーカーp16・p21、SASP因子IL-6・CXCL9・OPNの発現抑制を認めた。 Caspase-1・IL-8の発現に有意な変化は認めず、IL-6はこれらより下流、 CXCL9・OPNより上流のSASP因子であることが示唆された(Figure4, a-c)。



Figure1. cGVHDマウスモデルにおけるドナー由来 (GFP+) IL-6産生マクロファージ

【cGVHDマウスモデルにおける細胞老化とSASP因子の発現】 cGVHDマウスモデルの涙腺組織でコントロールと比較し単位面積あたりの涙腺 組織でDNA障害マーカー53BP1・γ-H2A.Xの発現が有意に亢進し(**Figure2, a**)

またp16+CD68+老化マクロファージ、CD153+PD1+Osteopontin(OPN)+老化 T細胞が有意に多く浸潤していた(Figure2, b-c) 。加えてSASP因子IL-1β・ IL-6・IL-8の発現が有意に亢進し、SASP因子CXCL1、CXCL9発現マクロ ファージが有意に多く浸潤していた(Figure2, d)。脾臓においても同マウスモ デルにおいてコントロールに比較し有意に老化マーカーp16発現IL-6産生マク ロファージの増加を認めた(Figure2, e)。





【老化マクロファージとT細胞との相互作用】

マクロファージの細胞老化とSASP因子IL-6分泌メカニズム追及のためcGVHDマ ウスモデル・コントロールマウスのマクロファージと種々のT細胞の共培養を行 なった。その結果、cGVHDマウスモデルのマクロファージとT細胞の組み合わせ で(Figure5, b)、次いでレシピエント由来(野生型BALB/cマウス)のT細胞との組 み合わせでp16+IL-6+マクロファージが増加した(Figure5, f)。これまでの結果 から、細胞老化・SASPがcGVHDの病態を促進するメカニズムの仮説図を作成し た(Figure5, g)。cGVHDの病態形成に細胞老化・SASPが関与しそのメカニズム としてドナー由来のマクロファージがレシピエント由来T細胞と相互作用を持つ ことで細胞老化・SASP因子IL-6の分泌が促進されることが考えられた。マクロ ファージがストレス誘導性に細胞老化をきたし各種SASP因子を分泌、そのうち のIL-6がオートクライン的に細胞老化をさらに促進することが示唆された。 CXCL9がT細胞の遊走を促進し、OPN+老化T細胞が組織の病的な線維化に寄与す ることが報告されている。





【老化細胞選択的除去剤ABT-263の眼cGVHD病態抑制効果】

Bcl-2/Bax/Bak経路に作用する老化細胞選択的除去剤ABT-263をcGVHDマウス モデルに投与し病態抑制効果を検証した。ABT-263投与群において涙腺組織で |有意な活性化Baxの発現上昇を認めた(Figure3, a)。骨髄移植後27日目におい てVehicle投与群と比較し涙液分泌量が有意に保たれ(Figure3,b)、加えて同薬 |剤濃度依存的に涙腺の病的線維化の抑制を認めた(**Figure3,c**)。ABT-263投与 |群の涙腺組織でVehicle投与群と比較し老化マーカー(p16・p21)、SASP因子| (IL-1β・IL-8・IL-6・CXCL9)の発現抑制、OPN+CD4+CD153+老化T細胞・ CD68+マクロファージ・CD4+T細胞の浸潤抑制を認めた(**Figure3, d**)。

Image: Second and Second a

Conclusion

【細胞老化・SASPが眼cGVHDの病態を促進する】 cGVHDマウスモデルの主に涙腺組織で細胞老化とSASP因子の発現が亢進してい た。老化細胞選択的除去剤ABT-263とSASP因子IL-6阻害剤MR16-1が眼cGVHD の病態を抑制した。以上より細胞老化・SASPが眼cGVHDの病態形成に寄与し、 また有効な治療ターゲットであることが示唆された。今後、眼以外の全身への効 果を検証するとともに、細胞種特異的に細胞老化とSASP因子の発現を解析しより 詳細なメカニズムを追及し、臨床応用への手がかりとする。

慶應義塾大学 研究連携推進本部 Mail : toiawasesaki-ipc@adst.keio.ac.jp

Copyright[©] Keio University All Rights Reserved.



Yoko Ogawa, Mari Sato, Eisuke Shimizu

Med



SFC

Senescence-associated secretory phenotype promotes chronic ocular graft-vs-host disease

Introduction

Chronic graft-vs-host disease (cGVHD) is a multifactorial inflammatory disease that affects patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Multiple organs, including the lacrimal glands (LGs) are negatively affected by cGVHD and lose function due to the resultant fibrosis. Age-related changes, including the development of eyebrow and eyelash poliosis or skin wrinkles, can progress rapidly in patients with severe cGVHD. Based on these findings, we hypothesized that chronic ocular GVHD is related to senescence. Our findings suggest a potential association between ocular cGVHD pathogenesis and stress-induced cellular senescence through the senescence-associated secretory phenotype (SASP). Indeed, senescent cell accumulation and SASP were presumably associated with cGVHD development in LGs, as evidenced by the improvement in LGs after the selective elimination of senescent cells (senolysis) with ABT-263 and anti-mouse IL-6R mAb MR16-1 in the sclerodermatous cGVHD mouse model. Taken together, our results indicate a potential association between the SASP and cGVHD development in LGs and suggest that targeted senolytic treatment may be a new therapeutic option for this disease.



accumulated in a time-dependent manner in cGVHD-affected LGs (Figure1, b).



[Treatment with anti-mouse IL-6R mAb MR16-1]

To confirm that SASP exacerbates cGVHD, we performed an inhibition experiment using the anti-mouse IL-6R mAb MR16-1. Notably, histological analysis revealed a significant reduction in excessive fibrosis in the LGs of MR16-1-treated mice compared to vehicle-treated mice (**Figure4**, **a**). The number of cells/field expressing senescence biomarker (p16, p21), SASP factors (IL-6, CXCL9, OPN), and fibrosis marker (a-SMA) in cGVHD LGs was significantly lower in the MR16-1-treated mice than in the control mice (Figure4, c). MR16-1 treatment did not suppress the induction of upstream SASP-related molecule expression (Caspase-1, IL-8) in cGVHD LGs suggesting that IL-6 is downstream of caspase-1 and IL-8.



damage response (53BP1, γ -H2A.X)(**Figure2, a**), senescent macrophages (p16+CD68+) (**Figure1**, **b**), and senescent T cells (PD-1+Osteopontin(OPN)+CD153+) (**Figure2**, **c**) than those in sygeneic control mice. The number of cells/field expressing SASP factors (IL-1 $\beta \cdot$ IL-8) (**Figure2, d right**) and macrophages expressing major SASP components (CXCL1+CD68+, CXCL9+CD68+) (**Figure1, d left**) was higher for cGVHD LGs than conrol LGs. We further confirmed a significantly higher percentage of p16⁺ and p16⁺IL⁻ 6⁺ double positive macrophages in cGVHD spleen than that of syngeneic controls (Figure2, e).









[Treatment with senolytic agent ABT-263]

To further confirm the association between cellular senescence and cGVHD, we used senolytic agent ABT-263 that inhibit the anti-apoptotic activity of Bcl-2/Bax/Bak pathway and eliminate senescent cells. ABT-263 increased the number of activated Bax⁺ cells in cGVHD LGs (**Figure3**, **a**). The tear secretion volume was significantly higher in 4 weeks after BMT in ABT-263-treated mice than in vehicle-treated mice (Figure3, b) and ABT-263 dose-dependently suppress the abnormal fibrosis in cGVHD LGs (Figure3, c). The number of cells expressing the senescence marker (p16, p21) and SASP factors (IL-1β, IL-8, IL-6, CXCL9, Osteopontin(OPN)), inflammatory cells (macrophages and CD4 T cells) and CD4+CD153+OPN+ senescent T cells in the LGs was significantly lower in the ABT-263-treated mice than in the vehicle-treated mice (Figure3, d). We propose that 25 mg/kg ABT-263 is the ideal dose based on the maintenance of LG structures, depletion of CD4+CD153+OPN+ senescent T cells, and preservation of CD4+Foxp3+ regulatory T cells (**Figure3, d**).

The Figure 5. Cocultures of macrophages and T cells from various spleen sources Conclusion

[SASP factors promote ocular cGVHD]

Our results indicate a potential association between the SASP and cGVHD development in LGs. Inhibiting the SASP evoked by senescent cells may be a new clinically translatable strategy for attenuating the effects of cGVHD in LGs and other target organs. In the future, we would like to pursue the detailed mechanism of relationship between cellular senescence and cGVHD by observing SASP-related molecules on each specific immune cells such as T cells, macrophages, and fibroblasts respectively.

Keio University Headquarters for Research Coordination & Administration Mail to: toiawasesaki-ipc@adst.keio.ac.jp

Copyright[©] Keio University All Rights Reserved.





* * * * * Title * * * *

Keio University Headquarters for Research Coordination & Administration Mail to: toiawasesaki-ipc@adst.keio.ac.jp

Copyright[©] Keio University All Rights Reserved.