



Title	腸管リンパ管内皮細胞はR-Spondin3を産生する [全文の要約]
Author(s)	小笠原, 励起
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第12989号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/70367
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号 : 2368
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Reiki_Ogasawara_summary.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文(要約)

腸管リンパ管内皮細胞は R-Spondin3 を産生する
(Intestinal Lymphatic Endothelial Cells Produce R-Spondin3)

2018 年 3 月
北海道大学
小笠原 励起

【背景と目的】同種造血幹細胞移植は主に血液悪性疾患を根治させることのできる治療法である。移植後にはさまざまな合併症が生じうるが、中でも移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) は同種造血幹細胞移植において特徴的で時に致死的な合併症である。GVHD はドナー移植片に存在するアロ反応性のドナーT 細胞がレシピエント組織のアロ抗原を認識して傷害する疾患である。急性 GVHD の標的臓器は肝臓、皮膚、腸管がある。このうち、腸管 GVHD では、腸粘膜のバリア機能の破綻により、エンドトキシンなどの細菌由来成分の流入を起し、GVHD をさらに悪化させるという悪循環に陥りやすい。したがって、腸管 GVHD の制御は同種造血幹細胞移植の成績向上のために非常に重要である。

腸上皮は腸幹細胞から分化しており、腸管 GVHD では腸幹細胞が傷害されることで腸上皮、粘膜の防御機構が破たんする (Takashima, J Exp Med 2011)。さらに、腸管の抗菌ペプチド産生細胞である Paneth 細胞が減少することによって、腸内細菌叢の異常がおこり、GVHD の悪化や感染症の発症につながる (Eriguchi, Blood 2012, Hayase, J Exp Med 2017)。R-Spondin はそのレセプターである Lgr5 に結合し、WNT/ β カテニンシグナルを強力に促進することで、腸幹細胞の自己複製と分化を促す。腸上皮は Lgr5 陽性の腸幹細胞から培養することができるが、その培養系においては Wnt ligand、R-Spondin の投与が必須である。R-Spondin ファミリーには構造相同性の高い 4 つの蛋白である R-Spondin1, 2, 3, 4 のサブタイプがある。私たちは今までに、リコンビナントヒト R-Spondin1 の投与が Lgr5 陽性の腸幹細胞と、腸幹細胞から分化し抗菌ペプチドを産生する Paneth 細胞を保護することで同種造血幹細胞移植後の GVHD を改善させることを示した (Takashima, J Exp Med 2011, Hayase, J Exp Med 2017)。このように、腸管粘膜の恒常性の維持において、R-Spondin は重要な役割を果たしている。しかしながら、腸管のどの細胞が内因性の R-Spondin を産生するのかは明らかでない。本研究では、腸管での R-Spondin の産生細胞を特定し、その細胞の造血幹細胞移植での変化を研究することを目的とした。

【材料と方法】B6D2F1 マウスの小腸から mRNA を抽出し、定量 PCR を行い、R-Spondin の 4 つのサブタイプの発現を検討した。さらに、マウス小腸の蛋白抽出液における R-Spondin 蛋白を Western blotting で確認した。さらに R-Spondin の産生細胞を特定するために、小腸から非上皮非血液細胞をフローサイトメーターで純化し、R-Spondin の発現について定量 PCR を行った。R-Spondin のうち最も高い発現を示した R-Spondin3 を産生する CD90+CD31+細胞の profile を特定するために、表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。この細胞はリンパ内皮細胞であり、マウス小腸から純化したリンパ内皮細胞で R-Spondin3 の免疫蛍光染色を行った。リンパ内皮細胞の蛋白抽出液における R-Spondin 蛋白を ELISA で確認した。リンパ内皮細胞の局在を確かめるために小腸を粘膜固有層、漿膜層に用手的に分離し、その細胞懸濁液をフローサイトメトリーで解析した。

さらに小腸リンパ内皮細胞の性質を探求するために小腸リンパ内皮細胞と血管内皮細胞を純化し、microarray を行った。

小腸 B6D2F1 マウスに 25 mg/kg のブスルファンを 4 日間と 100 mg/kg のシクロフォスファミドを 2 日間投与し、同種の C57BL/6 マウスもしくは同系の B6D2F1 マウスから採取した 1×10^7 の脾細胞と 5×10^6 の骨髓細胞を尻静脈から移植した。同種移植群で腸管 GVHD が起きていることを組織学的に確認した。このマウスモデルでリンパ内皮細胞の変化についてフローサイトメトリーや定量 PCR を用いて検討した。GVHD での小腸の R-Spondin3 蛋白を Western blotting で検討した。

【結果】 マウス小腸から抽出した mRNA で定量 PCR を行い、R-Spondin のうち、R-Spondin3 の発現が最も高く、小腸蛋白抽出液の Western blotting でも R-Spondin3 蛋白を検出した。小腸の上皮細胞、血液細胞、非上皮非血液細胞を純化し、定量 PCR で解析すると、小腸非上皮非血液細胞で R-Spondin3 が発現していた。非上皮非血液細胞を上皮細胞マーカーである CD31 と間葉系細胞マーカーである CD90 によりさらに分け、それぞれの細胞群について定量 PCR を行ったところ、CD90+CD31+ 細胞群が最も高く R-Spondin3 を発現していた。間葉系細胞を含む CD90+CD31- 細胞群では発現はごく低値であった。この非上皮非血液 CD90+CD31+ 細胞は podoplanin や LYVE-1 のリンパ内皮のマーカーを発現しており、リンパ内皮細胞であると同定した。純化したリンパ内皮細胞の免疫蛍光染色と ELISA により、この細胞が蛋白レベルで R-Spondin3 を産生していることを確認した。小腸の固有粘膜層、漿膜層に分離し、フローサイトメトリーで解析したところ、リンパ内皮細胞は固有粘膜層に優位に存在していた。

小腸リンパ内皮細胞の microarray 解析では Lgr5 の高発現を認めており、R-Spondin3 は autocrine の様式でリンパ内皮細胞の機能を制御している可能性が示唆された。」

さらに、マウス造血幹細胞移植モデルにおいては、同種移植群で naïve 群もしくは同系移植群よりも小腸リンパ内皮細胞が減少していた。GVHD が小腸リンパ内皮細胞を標的のと考えられる。小腸蛋白抽出液の Western blotting において、R-Spondin3 蛋白は同系移植群と比べ、同種移植群で減少していた。小腸リンパ内皮細胞の R-Spondin3 の発現は同系移植群と同種移植群で差を認めなかったことから、GVHD での R-Spondin3 の低下は小腸リンパ内皮細胞数の低下によるものと考えられた。

【結論】 腸幹細胞の増殖に必須である R-Spondin のうち、生理的に分泌されているのは R-Spondin3 であり、これが小腸においてはリンパ内皮細胞から分泌されていることを初めて証明した。また、この腸リンパ内皮細胞は Wnt リガンドの受容体である Lgr5 を高発現しており、LEC の産生する R-Spondin は Lgr5 を介して autocrine 様式でリンパ内皮細胞の機能を制御している可能性が示唆された。

さらに、このリンパ内皮細胞が GVHD で減少し、腸管 GVHD において傷害された腸上皮の修復が遅延し、さらに GVHD を悪化させている可能性がある。そのため、GVHD においてはリンパ内皮細胞に対する刺激と R-Spondin3 の産生促進が治療戦略となりうると考えられた。また、リンパ内皮細胞が減少するクローン病などの炎症性腸疾患に対しても同様にリンパ内皮細胞や R-Spondin3 が治療のターゲットとなることを示唆する。この新規治療戦略は腸管 GVHD やクローン病などの炎症性腸疾患に対し用いられる免疫抑制剤による治療とは一線を画し、免疫抑制剤で起こる易感染性や抗腫瘍効果の減弱などを起こさずに、より生理的な腸管修復過程を促進できるものであると考える。