



Title	腸管リンパ管内皮細胞はR-Spondin3を産生する
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
DOI	10.14943/doctoral.k12989
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/70987">http://hdl.handle.net/2115/70987</a>
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2368
File Information	Reiki_Ogasawara.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

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



学位論文

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

## 目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
実験方法	6 頁
実験結果	13 頁
考察	32 頁
総括および結論	36 頁
謝辞	38 頁
引用文献	39 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

Reiki Ogasawara, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Takahide Ara, Shuichiro Takahashi, Hiroyuki Ohigashi, Emi Yokoyama, Ko Ebata, Junichi Sugita, Takeshi Kondo, Masahiro Onozawa, Takanori Teshima  
Intestinal Lymphatic Endothelial Cells Produce R-Spondin3

***J Immunol*** 2017. submitted

本研究の一部は以下の学会で発表予定した。

1. Reiki Ogasawara, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Shuichiro Takahashi, Takanori Teshima  
Graft-versus-host disease targets R-Spondin3-producing lymphatic endothelial cells in the small intestine.

***2018 BMT Tandem meeting***, Feb 21st-25th, 2018, Salt Lake City Utah, USA

## 緒言

造血幹細胞移植は主に血液悪性疾患や骨髄不全症を根治させることのできる治療法である<sup>1</sup>。移植後にはさまざまな合併症が生じうるが、中でも同種造血幹細胞移植において特徴的なのは移植片対宿主病(graft-versus-host disease; GVHD)である。GVHDは、ドナー移植片中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医原性疾患であり<sup>2,3</sup>、GVHD対策の進歩により同種造血幹細胞移植の予後が改善することが示されている<sup>4</sup>。GVHDの古典的な分類としては100日以内の急性GVHDと100日以後の慢性GVHDがある。急性GVHDの好発臓器は肝臓、皮膚、腸管などであるが、特に腸管の急性GVHDは、腸管粘膜のバリア機能を障害させ、エンドトキシンなどの細菌由来成分の全身循環への流入を起し、GVHDを更に悪化させるという悪循環におちいりやすい<sup>5,6</sup>。したがって、GVHD増悪の起因となる、腸管の傷害を抑制することが、同種造血幹細胞移植の成績を改善するために重要である。しかしながら、現行のGVHD予防はカリニューリン阻害薬やステロイドホルモンなどの免疫抑制剤の全身投与が主体であり<sup>7,8</sup>、腸管傷害に対する特異的なGVHDへの介入は行われていない。免疫抑制剤やステロイドホルモンの全身投与は、広範な免疫抑制を招き、感染症の発症や移植本来の目的である抗腫瘍効果の減弱を招く可能性がある。腸管の組織障害を抑制しつつ、広範な免疫抑制を招かないGVHDの予防・治療法の開発を目指すためには、腸管の組織恒常性の維持機構を解明する必要がある。

腸上皮は一層の腸上皮細胞で構成されている。腸上皮は上部に絨毛、底部に陰窩を有し、各構造を単位とした組織再生を繰り返している。この腸上皮細胞には吸収上皮細胞のほか、Paneth細胞、杯細胞、腸内分泌細胞、Tuft細胞がある。これらの細胞はすべて、Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (LGR5)を発現する腸幹細胞から分化する<sup>9-11</sup>。LGR5陽性の腸幹細胞は陰窩底部のPaneth細胞に挟まれるように存在しており、細胞の供給源となっている。腸吸収上皮細胞のターンオーバーは3から5日と早く、腸幹細胞が傷害されると、速やかに粘膜上皮の防御機構を破綻する<sup>10,12,13</sup>。特に、腸管のGVHDでは腸幹細胞が標的とされることによって、粘膜上皮傷害の重症化や治療抵抗性が生じる<sup>12</sup>。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<sup>14,15</sup>。こうした腸幹細胞やPaneth細胞などの上皮細胞の傷害を防ぐことはGVHDを予防・治療する上で重要な意義をもつと考えられる。

R-Spondin (R-Spo)はLGR4, LGR5, LGR6, RNF43, ZNRF3などのレセプターに結合し、WNTレセプターのユビキチン化を阻害することでcanonical Wnt/ $\beta$ カテニンシグナルを増強する分泌型蛋白である<sup>16-21</sup>。R-Spo familyは発生段階に強く発現し、胚形成に不可欠である<sup>11,22,23</sup>。R-Spo1は性別決定に関与している<sup>24</sup>。R-Spo2は四肢形成と肺、卵胞の

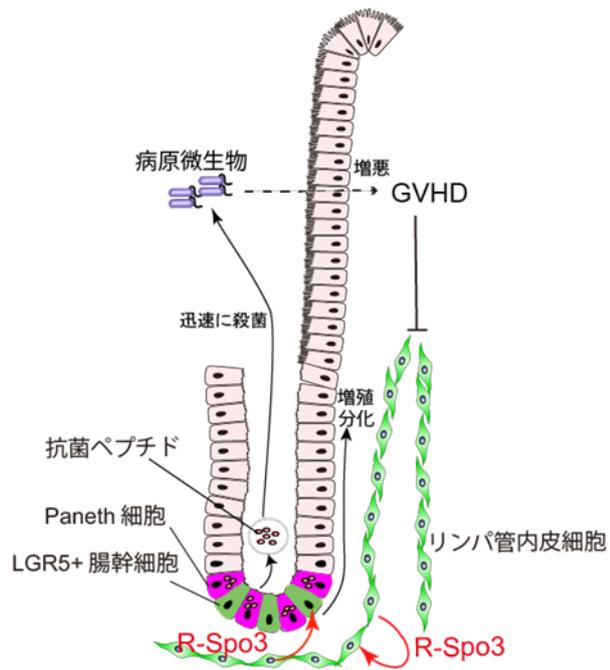
発生に大きく関与している<sup>25,26</sup>。R-Spo3 は胎盤形成にきわめて重要であり、R-Spo3 ノックアウトマウスは胎生致死に至る<sup>27,28</sup>。R-Spo4 は生理的にはより小さな役割であり、R-Spo4 の変異は爪欠損を起こすこともあるが、変異があっても健康なこともある<sup>29-31</sup>。このように、R-Spo のノックアウトはサブタイプにより表現型が異なる。しかし、いずれも高い構造相同性をもち、いずれも canonical Wnt 経路を活性化する。R-Spo2, R-Spo3 は R-Spo1 よりも強力な活性をもち、R-Spo4 は比較的不活性である<sup>32</sup>。

R-Spo は上記のように発生段階での作用から発見されてきたが、腸幹細胞が発現する LGR5 は、R-Spo のレセプターであり、R-Spo のシグナルは、WNT シグナルを増強することで腸幹細胞の増殖や分化を促進することがわかり、発生領域のほか、腸上皮の増殖シグナルとしての働きが注目されている。腸上皮は LGR5 陽性の腸幹細胞により培養することができるが、その培養系においては Wnt リガンド、R-Spo の投与が必須である<sup>9</sup>。R-Spo と WNT はともに腸幹細胞の維持に必須であるが、WNT シグナルの増強単独では腸幹細胞の自己複製や上皮傷害からの回復促進を促さない一方で、R-Spo シグナルの増強は腸幹細胞の増殖や<sup>16</sup>、組織修復を促進する。<sup>12,14,33</sup>。こうした知見から、腸管粘膜の恒常性の維持において、R-Spo が重要な役割を果たしていることが示されている。

われわれは、マウスの骨髄移植モデルで、移植時にリコンビナント R-Spo1 を投与することにより、GVHD による傷害から腸幹細胞や Paneth 細胞を保護し、それにより GVHD を軽減することを示した<sup>12,14</sup>。一方、放射線照射を行ったマウスに対する抗 R-Spo 中和抗体の投与により、内因性 R-Spo3 が腸管粘膜傷害からの回復機構で重要な役割をはたすことが示されている<sup>34</sup>。また、R-Spo は *in vitro* での腸オルガノイド培養において必須であるが<sup>35-38</sup>、そのうち、R-Spo3 は小腸での発現が高いとされる<sup>39,40</sup>。また、マウス放射線照射での腸炎モデルでは、上皮の回復に R-Spo3 が必須である<sup>34</sup>。

このように、R-Spo は腸管の恒常性維持や修復において必須の役割を担っているにも関わらず、小腸における内因性の R-Spo の産生細胞については、これまで明らかにされていない。

本研究では、腸管における R-Spo 産生細胞を解明することを目指した。本研究の成果から、マウス小腸においては R-Spo ファミリーのうち、R-Spo3 が最も多く産生されていることが判明した。また、この内因性 R-Spo3 が、粘膜固有層に存在する、リンパ管内皮細胞で産生されることを初めてつきとめた。さらに、マウス骨髄移植モデルにおいて、GVHD により小腸のリンパ管内皮細胞が減少し、それにともなって R-Spo3 の産生も減少していることを発見し、この内因性 R-Spo3 の低下により、移植後の腸上皮回復が遅れ、GVHD の悪化につながっている可能性が考えられた(Figure 1)。



**Figure 1.** リンパ管内皮細胞は R-Spo3 を産生し、腸幹細胞の増殖分化を促進する。GVHD でリンパ管内皮細胞は減少する。

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

Allo	allogeneic
BSA	bovine serum albumin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
GVHD	graft-versus-host disease
IL-22	interleukin-22
LEC	lymphatic endothelial cell
LP	lamina propria
PBS	phosphate buffered saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
R-Spo	R-Spondin
SL	serosal layer
Syn	syngeneic
TBS-T	Tris buffered saline with Tween 20
VEC	vascular endothelial cell
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 実験方法

### マウス

C57BL/6 (B6: H-2<sup>b</sup>), B6D2F1 (H-2<sup>b/d</sup>)は日本クレア (東京、日本)より購入した。

B6.129P2(SJL)-Myd88tm1.1Defr/J は B6 を背景とした MyD88 ノックアウトマウスであり、オリエンタルバイオサービス(京都、日本)より購入した。

これらのマウスは本学の動物実験施設にて繁殖飼育し 8 週齢以上のマウスを本実験に使用した。本研究のために実施した動物実験と遺伝子組換え実験については、北海道大学動物実験に関する規程と北海道大学遺伝子組換え実験の安全管理規定に従い、動物実験(承認番号: 12-01016)と遺伝子組換え実験(承認番号: 24(30))の承認の上実施した。

### GVHD マウスモデル

レシピエントとなるメス B6D2F1 マウスに day -7~day -4 まで 25 mg/kg のブスルファン(大塚、東京、日本)、day -3, -2 に 100mg/kg のシクロフォスファミドをそれぞれリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline, PBS) で 200  $\mu$ l になるように調整して腹腔内投与した。ドナーとしてメス B6 またはメス B6D2F1 マウスを麻酔後に安楽死させ、脾臓および両側大腿骨・脛骨・骨盤骨を採取した。脾臓はスライドガラス 2 枚を使用してすりつぶし、70  $\mu$ m セルストレイナーを通して上で、50 ml チューブに移して細胞を採取した。大腿骨・脛骨・骨盤骨は 23 ゲージ針と 1 ml 注射器を用いて、Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI1640 培地)+4%FCS を骨髓腔内に通して骨髓を押し出し、18 ゲージ針と 10 ml 注射器で吸引・吐出を繰り返し、攪拌した後に、70  $\mu$ m セルストレイナーを通して 50 ml チューブに細胞を採取した。これらの細胞懸濁液中の赤血球を、red blood cell lysis buffer (BD Biosciences、東京、日本) 2 ml を用いて 2 分間溶血させた後、顕微鏡にてトリパンブルー法により細胞数を計測した。レシピエント 1 匹あたり、脾臓細胞  $1 \times 10^7$  細胞と骨髓細胞  $5 \times 10^6$  細胞を、PBS 250  $\mu$ l で希釈したものを移植片として尾静脈内に注射した。ドナーを B6 とした移植を同種移植 (allogeneic) 群、B6D2F1 をドナーとして使用したものは、同系移植 (syngeneic) 群とした<sup>12</sup>。レシピエントマウスは、特定病原体未感染にて、通常の餌と、オートクレーブ滅菌後に塩酸で pH 2.5 に調整した酸性水を与えて飼育した。

### 小腸細胞分離

マウスを安楽死させ、腹壁を切り開き、小腸を採取した。PBS に浸したろ紙の上で、脂肪組織をできるだけ取り除き、パイエル板も取り除いた。小腸を 4 分割し、便を押し出したうえで腸軸方向に切り開いた。PBS+2%牛胎児血清 (Fetal calf serum, FCS) 15ml が入った 50ml tube に小腸を入れ、よく震盪した。茶こしで小腸以外を排液し、もう一度 PBS+2%FCS 15ml が入った 50ml tube に小腸をいれ、同様に洗浄した。この操作を 3 回施行した。PBS+2%FCS+1mM ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) +1.3mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) (ニッポンジーン、東京、日本) 25ml 中で 20 分間、37°C で震盪した。これにより腸粘膜層を剥離した。残りの小腸を PBS+2%FCS+1.3mM EDTA 25ml に入れ、40 分間、37°C で震盪した。これにより小腸上皮細胞が剥離し、この溶液を小腸上皮細胞分離液として扱った。残りの小腸を PBS でよくゆすぎ、RPMI 1640 培地+10% FCS + 0.3 mg/ml typeIV collagenase (Sigma-Aldrich) 6ml を入れたウェルにいれ、細かく切り刻んだ。これを 37°C、5%CO<sub>2</sub> で 1 時間反応させた。これ

を 19G 針とシリンジで均一化し、70  $\mu\text{m}$  cell strainer に通した。Flow buffer (PBS+ 0.5% 牛血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA) + 2mM EDTA 10ml) を加え、4°C、1500rpm で 5 分間遠心し、上清を破棄した。さらに flow buffer 5ml を加えて同様に遠心、上清を破棄した。ペレットを小腸非上皮細胞として扱った。

### フローサイトメリーと細胞分離

細胞分離した小腸非上皮細胞を flow buffer に suspend し、これを 4°C、1500rpm で 5 分間遠心し、上清を破棄した。一次抗体を flow buffer で 200:1 に希釈し、4°C・暗所で 30 分間反応させた。Flow buffer を加え、4°C、1500rpm で 5 分間遠心し、上清を破棄した。二次抗体がある場合にはさらに二次抗体を flow buffer で 200:1 に希釈し、暗所で 4°C、30 分間反応させた。0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) + flow buffer に suspend し、BD FACS Canto II (BD Bioscience) によりフローサイトメリーを行った。目的の細胞を純化するため BD FACS Aria II (BD Bioscience) を用いて fluorescence activated cell sorting (FACS) を行った。

抗体は以下の表 1 のものを用いた。

### サイトスピンと蛍光免疫染色

BD FACS Aria II で純化した細胞を PBS+2%FCS に  $5 \times 10^5$  cells/ml に調整した。スライドグラスにろ紙、ホルダーを固定し、Shandon Cytospin3 (Thermo Fisher scientific) に設置し、PBS 30  $\mu\text{l}$  をホルダーに入れ、550rpm で 3 分間遠心した。同様に細胞液 50  $\mu\text{l}$  をホルダーにいれ、550rpm で 3 分間遠心した。ドライヤーで数分間乾燥させた。サイトスピンを行ったスライドグラスを乾燥し、-20°C で 100%メタノール中で 10 分間固定した。-20°C のアセトンに 1 分間入れた。PBS でスライドを洗い、スライドグラスに PBS を載せ、5 分おいた。これを 3 回行った。PAP ペンで細胞を囲み、PBS+0.1%BSA 100  $\mu\text{l}$  を載せて 30 分室温に置き、ブロッキングとした。一次抗体として Rat 由来抗 R-Spo3 抗体と Rabbit 由来抗 LYVE-1 抗体を 100:1 に希釈し、これを 100  $\mu\text{l}$  スライドグラスに載せて 4°C で一晩反応させた。PBS で 5 分間、3 回洗浄した後、二次抗体として anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488, anti-Rat IgG Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific) を 400:1 に希釈し、100  $\mu\text{l}$  ずつ添加して室温、1 時間遮光して反応させた。PBS で洗浄後、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の DAPI を 100  $\mu\text{l}$  添加し、室温、15 分間、遮光して反応させた。PBS で洗浄後、フルオロゲル (VWR, Radnor, PA) 1 滴を滴下後にカバーガラスで閉じた。画像は、共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000 (Olympus, Tokyo, Japan) にて、20 $\times$  /0.75 NA もしくは 40 $\times$  /0.95 NA もしくは 60 $\times$  /1.35 NA 対物レンズを使用して撮影した。

### 腸組織標本と蛍光免疫染色

マウスを安楽死させ、マウス小腸を取り出した。小腸を 3 等分し、ゾンデを用いて 4%パラホルムアルデヒドで内腔の便を押し出した。長軸方向に小腸を切り開き、爪楊枝で上皮側が内側になるように口側から巻き取った。ろ紙上にロールした小腸を載せ、ゼラチンで固定した。これを 4%パラホルムアルデヒドにいれ、固定した。札幌総合病理研究所 (日本) にパラフィン包埋と、薄切、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, H&E) 染色を依頼した。パラフィン切片を、100%キシレンに 5 分間を 3 回、100%エタノールに 3 分間を 3 回、95% エタノールに 3 分間、80%エタノールに 3 分間、70%エタノールに 3 分間、精製

水に3分間を2回、PBSに3分間それぞれ浸し、脱パラフィンした。10倍 Target Retrieval Solution, Citrate pH6 (DAKO、東京、日本) 20 ml と脱イオン水 180 ml をビーカーに入れた。その中に、脱パラフィンしたスライドガラスを入れ、105°C、20分間で抗原不活化を行った。PBS+0.1%BSAにて室温30分間静置してブロッキングを行った。PBSにて洗浄後、一次抗体反応を行った。一次抗体は、抗LYVE-1抗体 (Angiobio)を50:1に希釈したものを100 µl ずつ添加し、湿潤箱の中で4°C、一晚反応させた。PBSで洗浄後、二次抗体反応を行った。2次抗体は、anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) を400:1に希釈し、100 µl ずつ添加して室温、1時間、遮光して反応させた。PBSで洗浄後、1 µg/mLのDAPIを100 µl 添加し、室温、15分間、遮光して反応させた。PBSで洗浄後、フルオロゲル(VWR, Radnor, USA)1滴を滴下後にカバーガラスで閉じた。画像は、共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000 (Olympus) にて、20×/0.75 NA もしくは 40×/1.30 NA 対物レンズを使用して撮影した。

HE 標本を用いて評価した腸 GVHD の病理スコアは、びらん、潰瘍、上皮のアポトーシス像、リンパ球浸潤、好中球浸潤、浮腫に関して、各項目ごとに軽度0.5,中等度1, 重度は2としてスコアリングし、その合計を算出した。

## 定量 PCR

まず、cDNAの作成を行った。ISOGEN II (ニッポンジーン) 500 µl に細胞をフローサイトメトリーで直接純化した。小腸組織の場合は ISOGEN II 500 µl に小腸5mmほどをいれて、TissueRuptor (QIAGEN, Hulsterweg, Holand) を用いてホモジナイズした後、1.5 ml チューブに移した。入った細胞もしくは小腸組織を1.5 ml チューブに移した。RNase-free water を200 µl 加えて攪拌し、室温で5分間静置させた。4°C、12000 G で15分間遠心分離を行い、分離した上清 500 µl を新しいチューブに移した。2 µl のエタ沈メイト (ニッポンジーン) と500 µl の2-プロパノール (WAKO) を添加し、vortex でよく混合させた後、室温で10分間静置した。4°C、12000 G で15分間遠心分離を行い、上清を破棄した。1 ml の75%エタノールを添加し、攪拌せず4°C、12,000 G で15分間遠心分離をした。これを2回繰り返した後、真空アスピレーターを用いてペレットを乾燥させ、RNase-free water を加え、60°Cで15分間温めた。NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) を用いてRNA量を測定した。RNA 1000 ng を用いて各サンプルから cDNA を作製した。cDNA 作製には ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo、大阪、日本) を使用した。作製方法は、まず RNA 1000 ng を RNase-free water を用いて 12 µl に調整し、4 × DN Master Mix (Toyobo) 4 µl を加えて 37°C で 5 分間インキュベートしゲノム DNA 除去反応を行った。次に 5 × RT Master Mix II (Toyobo) を 4 µl 加え、37°C で 15 分間、50°C で 5 分間、98°C で 5 分間インキュベートし、サーマルサイクラー T100™ (Bio-Rad、東京、日本) を使用して逆転写反応を行った。反応終了後は-20°C で保存した。

18SrRNA と R-Spo1, R-Spo2, R-Spo3, R-Spo4 に対するプライマー・プローブセットを、シグマアルドリッチジャパンに作成を依頼し、TaqMan Universal PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) と Step One Plus (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量リアルタイム PCR を行った。使用したプライマーとプローブの配列は、以下である。

Mouse 18S rRNA:

forward primer	5'-GCTCTTTCTCGATTCCGTGGG-3'
reverse primer	5'-ATGCCAGAGTCTCGTTTCGTTATC-3'
probe	FAM-CTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACC-TAMRA
<b>Mouse <i>R-Spo1</i></b>	
forward primer	5'-CGCAACCCCGACATGAACA-3'
reverse primer	5'-GACACTTGGTGCAGAAGTTGTG-3'
probe	FAM-CCTCACAGTGCTCGATCTTGCATT-TAMRA
<b>Mouse <i>R-Spo2</i></b>	
forward primer	5'-GCCGCTGCTTTGATGAATGTCC-3'
reverse primer	5'-CTCCAATGACCAACTTCACAACCTT-3'
probe	FAM-ACACATTCCATAGTCTCATCTAACGGTGCA-TAMRA
<b>Mouse <i>R-Spo3</i></b>	
forward primer	5'-AACGCCTCCCGAGGAAGG-3'
reverse primer	5'-ACAGCCCATTGTAATCTGAACACG-3'
probe	FAM-GCCTCCTTGGCAGCCTTGACTGACA-TAMRA
<b>Mouse <i>R-Spo4</i></b>	
forward primer	5'-TTGCCGAGTGTTATCTGAGTCC-3'
reverse primer	5'-CGCCGATCCTTCCTGTTCTTC-3'
probe	FAM-ACTCTGCCAGGAGAAAGAAATCCCAGG-TAMRA

定量 PCR の手順は次のように行った。2 × Master Mix 20  $\mu$ l、20 × DNA プライマー 2  $\mu$ l、DEPC 処理水 16  $\mu$ l、cDNA 2  $\mu$ l を混合し、計 40  $\mu$ l とした。MicroAmp®Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific) に、3 ウェルに 10  $\mu$ l ずつ複製して添加した後シールし、StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific) にて、94°C・30 秒間、55°C・30 秒間、72°C・1 分間を 1 サイクルとし、50 サイクルの定量リアルタイム PCR を行った。各検体の *R-Spo* の発現量は、*18S rRNA* の発現によって標準化し、 $\Delta$ CT 法を用いて算出した。

### Western blotting

B6D2F1 の小腸を 20mg ほど切り取り、500  $\mu$ l の RIPA バッファーに入れた。それを Tissue Ruptor で均一化し、tube に移した。15000rpm、4°C で 20 分間遠心し、上清 350  $\mu$ l を新しい tube に移した。SmartSpec (Bio-Rad) にて Bradford 法にてこの蛋白濃度を測定した。10  $\mu$ g/10  $\mu$ l になるように RIPA バッファーで調整した。2  $\mu$ l の 6×SDS サンプルバッファーを加え、100°C で 5 分間反応させた。氷上に移動させた。12% の Tris-glycine SDS-Polyacrylamide ゲルをゲル泳動槽に設置し、SDS-PAGE Running Buffer で満たした。ゲルのウェルにサンプルを 10  $\mu$ l ずつ入れ、60V で電気泳動を行った。10 分後に 130V に電圧を上げ、ゲルの真ん中あたりまでバンドが移動したところで 200V にアップした。ゲルの下部までバンドが到達したところで電気泳動を終了した。ゲルを Transfer Buffer に浸し、5 分間震盪させた。Transfer Buffer に浸した濾紙 3 枚を Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell に載せ、その上にニトロセルロース膜を載せた。ニトロセルロース膜の上にゲルを重ね、さらに Transfer Buffer に浸した濾紙 3 枚をゲルの上に重ねた。気泡を除去し、15V で 45 分間

Transferを行った。Transferが終了したら、ニトロセルロース膜をPonceau 3R染色液で浸し、脱イオン水で3回洗浄した。バンドを確認し、さらに脱イオン水で洗浄した。Blocking bufferとして5%スキムミルク+(Tris Buffered Saline with Tween 20, TBS-T)を用いた。ニトロセルロース膜をBlocking bufferで浸し、60分間震盪した。TBS-Tで一度洗浄し、ニトロセルロース膜をハイブリダイゼーションバッグにいれ、シーリングした。バッグ内にBlocking bufferで1:200に希釈した一次抗体を200 µl入れた。気泡をいれずにシーリングし、4°Cで一晩ローターにかけた。膜をTBS-Tで洗浄し、さらにTBS-Tで8分間震盪した。これを3回繰り返して洗浄した。Blocking bufferで1:3000に希釈した二次抗体に膜を浸し、2時間室温で震盪した。TBS-Tで8分間震盪した。これを3回繰り返して洗浄した。ECL Prime Western Blot Detection Reagent (GEヘルスケア・ジャパン, 東京, 日本)を膜にのせ、ImageQuant LAS4000mini (GEヘルスケア・ジャパン)で撮像した。

## 抗体

表 1. フローサイトメリー、免疫染色、Western blotting には以下の抗体を用いた。

抗原	Clone	標識	購入元	Catalog#
<b>フローサイトメリー</b>				
CD45	30-F11	APC-Cy7	BD Bioscience	557659
CD90.2	53-2.1	PerCP/Cy5.5	Biolegend	140322
CD31	390	PE-Cy7	eBioscience	25-0311-82
I-A/I-E	M5/114.15.2	FITC	Biolegend	107606
CD4	GK1.5	PE	BD Pharmingen	553730
CD8	53-6.7	PE	BD Bioscience	553033
F4/80	BM8	FITC	Biolegend	123108
CD11b	M1/70	FITC	BD Pharmingen	01714D
CD11c	HL3	FITC	BD Pharmingen	553801
CD103	2E7	PE	BioLegend	121406
Ly6C/Ly6G	RB6-8C5	FITC	BD Bioscience	553127
E-Cadherin	DECMA-1	PE	BioLegend	147304
Tie2	TEK4	Biotin	BioLegend	124006
LYVE-1	polyclonal	purified	AngioBio	11-034
Podoplanin	8.1.1	PE	BioLegend	127408
<b>免疫染色</b>				
LYVE-1	polyclonal	purified	AngioBio	11-034
R-Spo3	# 400403	purified	R&D systems	MAB41201
<b>Western blotting</b>				
R-Spo1	polyclonal	purified	abcam	ab106556
R-Spo2	polyclonal	purified	abcam	ab73761

R-Spo3	polyclonal	purified	abcam	ab171010
$\beta$ -actin	AC1-20.4.2	purified	Sigma-Aldrich	A9357

### 小腸血液細胞、小腸血管内皮細胞、小腸リンパ内皮細胞の ELISA

上記のように B6D2F1 マウスから分離した小腸非上皮細胞を flow buffer に suspend した。以下のように EasySep Biotin Selection Kit (STEMCELL technologies, Vancouver, BC) を用いて細胞を純化した。10  $\mu$  l/ml の FcR blocking 抗体と biotin 標識抗 CD31 抗体 (Biolegend, San Diego, CA) 2.5  $\mu$ g/ml を添加し、室温で 15 分反応させた。Biotin Selection Cocktail を 100  $\mu$ l/ml 添加し、さらに室温で 15 分反応させた。Magnetic nanoparticles を 50  $\mu$  l/ml 添加し、室温で 10 分反応させた。マグネットにチューブをセットし、10 分間 particles を吸着させた。マグネットにいたまま排液し、flow buffer を入れてマグネットにセットした。これを 3 回行い、洗浄した。FITC 標識抗 CD90.2 抗体、APC-Cy7 標識抗 CD45 抗体を 1:200 で反応させ、biotin の二次抗体には PE-Cy7 標識 Streptavidin を反応させた。Flow buffer で洗浄ののち、0.2  $\mu$ g/ml DAPI+ flow buffer に suspend し、BD FACS Aria II (BD Bioscience) で細胞純化を行った。CD45<sup>+</sup> 細胞を血球細胞、CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD90<sup>-</sup> 細胞を血管内皮細胞、CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> 細胞をリンパ内皮細胞として扱った。細胞を 30000 cells ずつ純化した。PBS で洗浄し、1500rpm, 4°C, 5 分遠心し、ペレットとし、RIPA buffer 50  $\mu$ l に細胞を溶解した。ELISA は Mouse R-Spo3 DuoSet ELISA kit (R&D systems) を使用して以下のようにおこなった。

Capture Antibody 400 ng/ml を 100  $\mu$ l ずつ well にまいて一晩反応させた。Wash buffer を well にまいて破棄し洗浄した。これを 3 回行った。Blocking buffer (PBS+1%BSA) を 300  $\mu$ l ずつ well にまいて一時間室温で反応させた。Wash buffer で洗浄した。上記で作成した細胞溶解液を 50  $\mu$ g ずつ well にまいた。また、Standard 用として 4.69 から 300 pg/ml の R-Spo3 を作成し、well にまいた。2 時間室温で反応させた。Wash buffer で洗浄した。Detection Antibody 200 ng/ml を 100  $\mu$ l ずつ well にまいた。2 時間室温で反応させた。Wash buffer で洗浄した。Streptavidin-HRP を 100  $\mu$ l ずつ well にまいて 20 分間反応させた。Wash buffer で洗浄した。Substrate solution を 100  $\mu$ l ずつ well にまいた。30 分反応させて、stop solution を 50  $\mu$ l ずつ添加した。吸光度を GloMax multi detection system (Promega, Tokyo, Japan) にて測定した。

### SAR131675 の投与

SAR131675 (MedChem Express, Monmouth Junction, NJ) を 0.5%カルボキシメチルセルロース+0.5% Tween80 に溶解し、100 mg/kg を 200  $\mu$ l になるように調整し、ゾンデでマウスに経口投与した。

### Microarray

小腸のリンパ内皮細胞と血管内皮細胞をフローサイトメーターで純化し、Trizol (Thermo Fisher Scientific) に溶解した。QIAshredder column (QIAGEN) を使用して、totalRNA を抽出した。0.1  $\mu$ l の total RNA を用いて、Cyamin-3 をラベルした相補的 RNA が Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent) にて作成された。それを SurePrint G3 mouse GE 8 $\times$ 60K Ver2.0

(Agilent)に 65°Cで 17 時間 hybridize された。Hybridize されたスライドを洗浄ののちに直ちに SureScan Microarray Scanner (G2600)にて読み込んだ。データは Gene Spring GX (Agilent)s にて標準化やさらなる解析を施行した。Pathway 解析には Wikipathway (wikipathways.org) version20171010 の生物種 Mus musculus を用いた<sup>41</sup>。

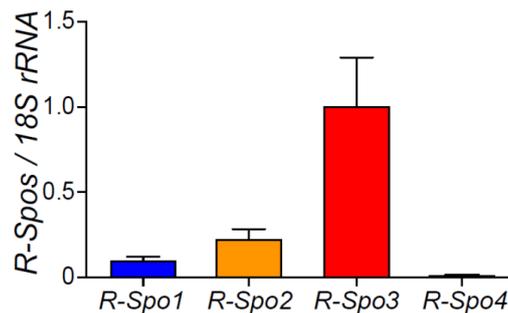
### 統計解析

データ比較には、Mann-Whitney U test を用いた。生存率解析では、Kaplan-Meier method を用いてプロットし、log-rank test にて比較した。解析には、Prism software version 6 (GraphPad, La Holla, USA) を使用した。P 値は、\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001 と定義した。

## 結果

### R-Spo3 は小腸にて産生される主要な R-Spo である

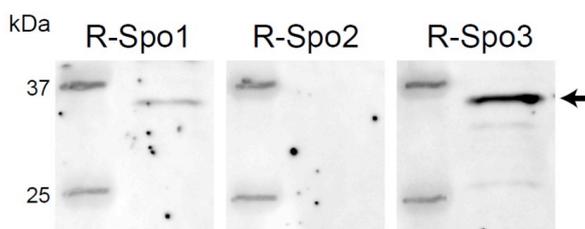
R-Spo には R-Spo1 から R-Spo4 までの 4 つのサブタイプが知られているが、いずれのサブタイプが腸管において産生されているかを調べるため、naïve B6D2F1 マウスの小腸から mRNA を抽出し、定量 PCR によりそれぞれの R-Spo の mRNA 量を定量した。小腸では R-Spo3 がもっとも優位に発現していた。R-Spo1 と R-Spo2 はわずかに発現を認めたが、R-Spo4 は発現を認めなかった(Figure 2)。



**Figure 2.** 小腸における R-Spos の発現

Naïve B6D2F1 マウスの小腸から抽出した mRNA を用いて、定量 PCR を行い、R-Spo1~R-Spo4 の発現を測定し、18S rRNA の発現をもとに標準化した。データは、同様の結果の 2 実験のうちの一つを、R-Spo3 の発現量を 1 とした比の平均値と標準誤差で示した (n=6/group)。

次に、小腸における R-Spo1~3 のタンパク量を測定した。Naïve B6D2F1 マウスの小腸から蛋白を抽出し、Western blotting 法で R-Spo1, R-Spo2, R-Spo3 のタンパク量を検討した。R-Spo1, R-Spo2, R-Spo3 の蛋白分子量はそれぞれ 29 kDa, 28 kDa, 31 kDa である。R-Spo3 のタンパク量は多く、R-Spo1 はわずかに存在するのみで、R-Spo2 は存在しなかった(Figure 3)。これらの結果から、R-Spo3 が、マウスの腸管で産生される主要な R-Spo であることが確認された。

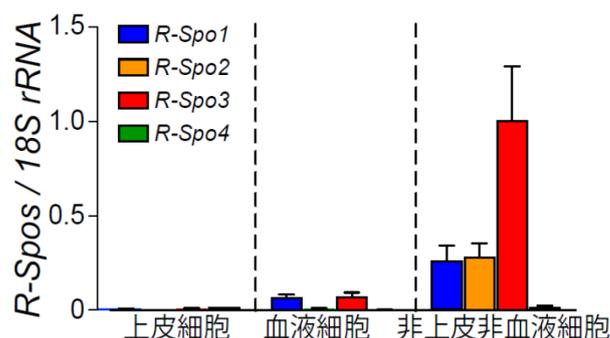


**Figure 3.** 小腸における R-Spo 蛋白

マウス小腸での R-Spo1, R-Spo2, R-Spo3 の Western blotting assay。Naïve B6D2F1 マウスの小腸からの蛋白抽出液を 10  $\mu$ g / 10  $\mu$ l に調整し、これを用いて Western blotting を行った。矢印は R-Spo3 のバンドを示している。

### R-Spo3 は小腸において非上皮非血液細胞に産生されている

腸管における R-Spo3 の産生細胞を探求した。まず、小腸から上皮細胞を EDTA を用いて剥離し、回収した。残りの小腸組織をコラゲナーゼを使用して細胞懸濁液とし、FACS で血液細胞と非血液細胞に純化した。CD45<sup>+</sup>細胞を血液細胞とし、CD45<sup>-</sup>細胞を非上皮非血液細胞とした。この上皮細胞、血液細胞、非上皮非血液細胞において R-Spo の発現を定量 PCR を用いてした。R-Spo4 を除くいずれの R-Spos も非上皮非血液細胞で発現しており、R-Spo3 がもっとも高い発現を認めた (Figure 4)。

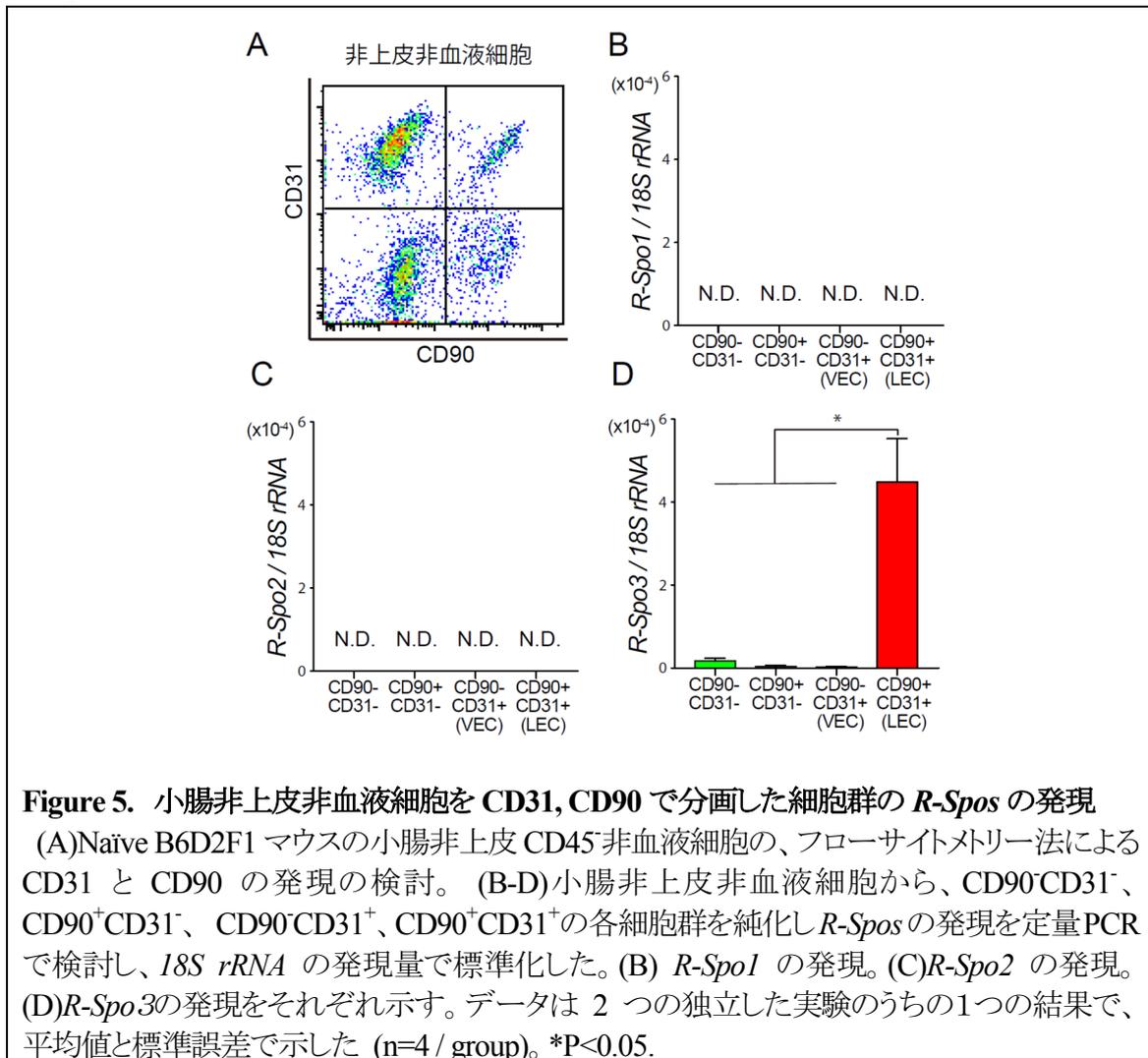


**Figure 4** 小腸上皮細胞、血液細胞、非上皮非血液細胞における R-Spos の発現

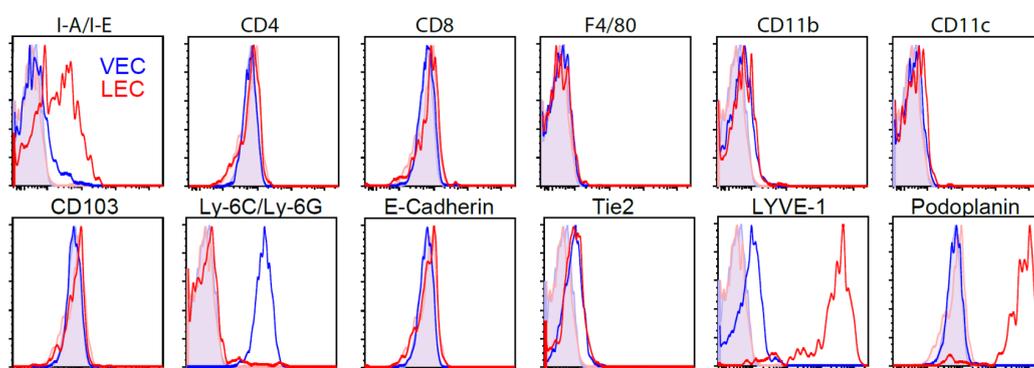
Naïve B6D2F1 マウスの小腸から上皮細胞を回収し、残りの小腸をフローサイトメトリーで血液細胞と非血液細胞に純化した。これらの細胞から抽出した RNA を用いて R-Spos の発現を 18S rRNA の発現で標準化し、非上皮非血液細胞の R-Spo3 の発現に対する fold change で示した。データは 2 つの独立した実験を統合して、非上皮非血液細胞の R-Spo3 の発現量を 1 とした比の、平均値と標準誤差で示した (n=12 / group)。

### R-Spo3 は小腸の CD45<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>リンパ管内皮細胞で産生されている

さらに、R-Spo3 産生細胞の詳細な検討を行った。非上皮非血液細胞のうちどの細胞分画が R-Spo を産生しているのかを探求した。小腸の非上皮非血液細胞には粘膜固有筋や線維芽細胞などの CD90 陽性間葉系細胞分画や、CD90 陽性内皮細胞を含んでいる。まず、これらの分子の、小腸の非上皮非血液細胞での発現を検討した。小腸の非上皮非血液細胞分画を抗 CD31 抗体と抗 CD90 抗体を用いたフローサイトメトリー法で検討したところ、CD90<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>、CD90<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>、CD90<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>の 4 つの細胞分画に分類された (Figure 5A)。これらの細胞を FACS を用いてそれぞれ純化して、R-Spo の発現を定量 PCR 法で検討したところ、R-Spo1 と R-Spo2 についてはどの細胞群においても低発現しか認めなかったが、R-Spo3 は CD90<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>の細胞群で明らかに優位な発現を認めた (Figure 5B, 5C, 5D)。これらの結果より、CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD91<sup>+</sup>の非上皮非血液細胞が腸管における R-Spo3 産生細胞であることが判明した。

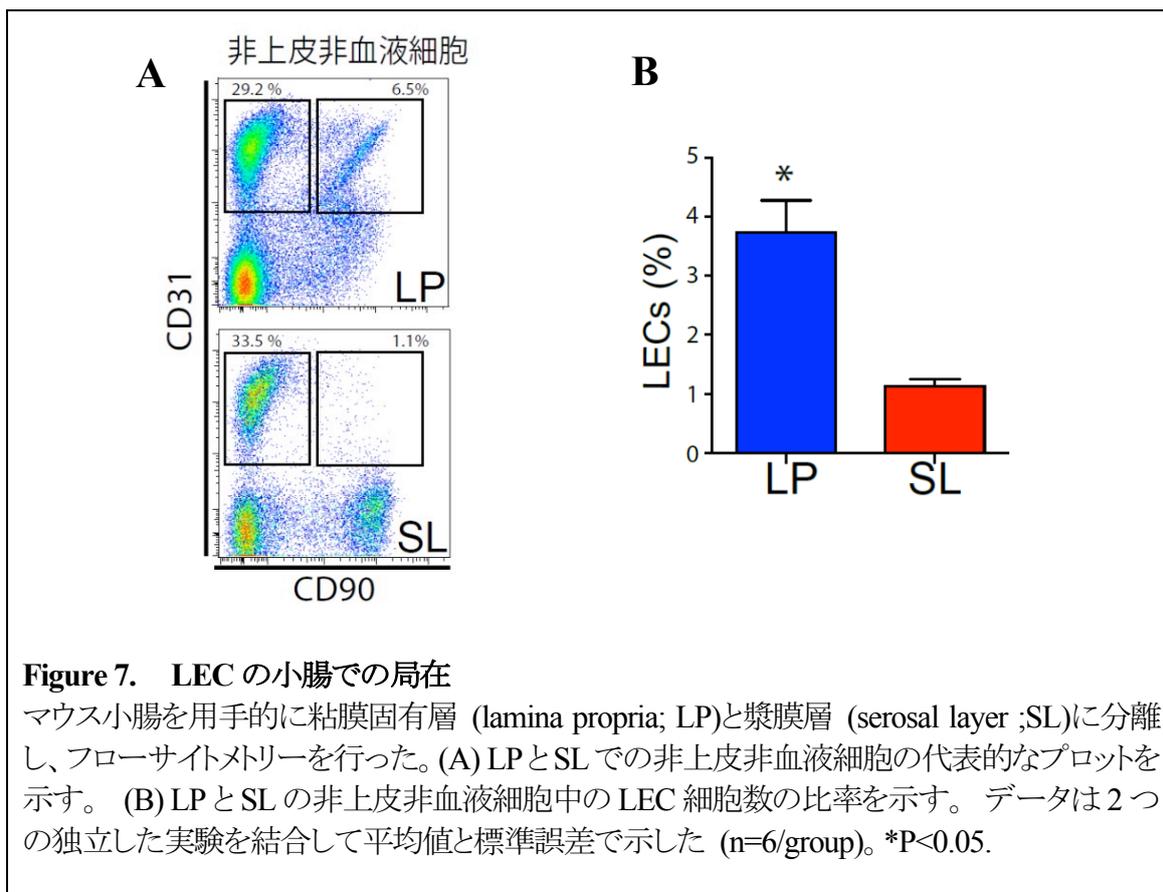


以上のように R-Spo3 は  $CD45^-CD90^+CD31^+$ 非上皮非血液細胞 で発現すると考えられたが、この細胞群の細胞起源を探求するため、フローサイトメトリーを用いてこの細胞分画で発現される、各種表面抗原を評価した。コントロールとして  $CD90^+CD31^-$  血管内皮細胞 (Vascular endothelial cells ; VEC)を染色した。その結果、 $CD90^+CD31^+$ 細胞は LYVE-1, Podoplanin を発現しており、これらはリンパ内皮細胞 (Lymphatic endothelial cells ; LEC)であると考えられた (Figure 6) <sup>42,43</sup>。  $CD90^+CD31^+$ の VEC は LYVE-1 や Podoplanin の発現に乏しく、Ly-6C/Ly-6G の発現をみとめ <sup>44</sup>、VEC の表面形質であることが確認された。

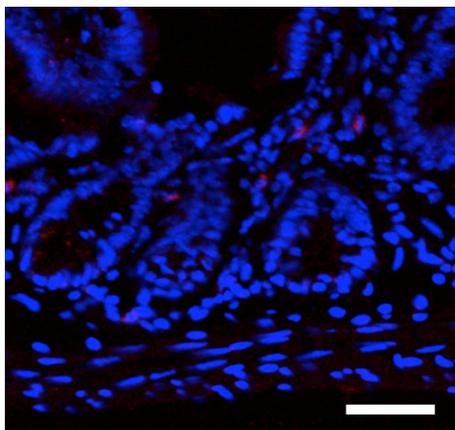


**Figure 6.** 小腸非上皮非血液  $CD90^+CD31^+$ 細胞、 $CD90^+CD31^+$ 細胞の表面マーカー発現  
 フローサイトメトリー法を用いて、マウス小腸から採取した非上皮非血液細胞中の  
 $CD90^+CD31^+$ 細胞(LEC, 赤線)と  $CD90^+CD31^+$ 細胞(VEC, 青線)上の表面マーカーの解析  
 を行った。影のヒストグラムはそれぞれの非染色コントロールである。

CD45<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>LEC の存在部位を突き止めるため、小腸を粘膜固有層 (lamina propria; LP)と漿膜層 (serosal layer ;SL)に用手的に分離し、細胞懸濁液とした。フローサイトメトリーでこれらの細胞を解析したところ、LEC は LP に豊富に存在し、固有筋層を含めた漿膜層には存在しないことが判明した (Figure 7, A and B)。これはLPに存在する、LECからR-Spo3 が産生され、近隣の細胞である上皮の腸幹細胞を刺激している可能性があることを示唆する結果である。



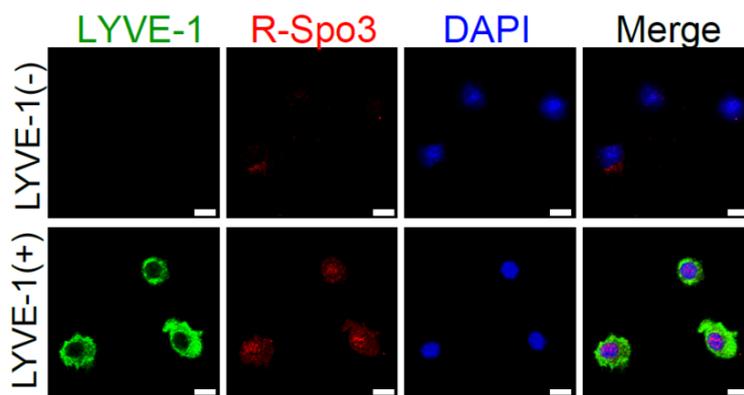
さらに LEC が蛋白レベルで R-Spo3 を発現するかを確認した。まず、小腸のパラフィン切片で R-Spo3 の蛍光免疫染色を試みたが、R-Spo3 の染色ははっきりとしなかった (Figure 8)。これは R-Spo3 産生細胞の頻度が低いために、組織切片上でははっきりと検出できないためと判断した。



**Figure 8 小腸の R-Spo3 免疫染色**

マウス小腸をパラフィン切片で R-Spo3 の蛍光免疫染色を行った。青は DAPI による核染色、赤は R-Spo3 の信号を示す。Scale Bar は 50  $\mu\text{m}$ 。

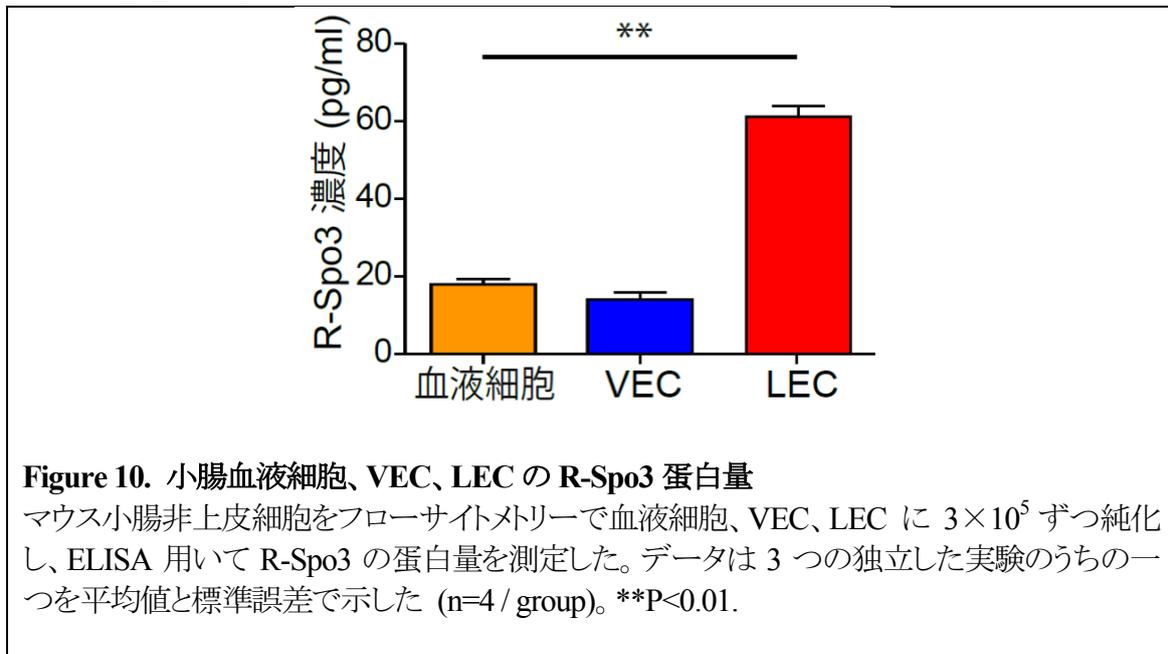
次に FACS を用いて小腸の非上皮非血液細胞を、LYVE-1<sup>+</sup>LEC と LYVE-1 陰性のその他の細胞に純化した。これらの細胞を用いてサイトスピン標本を作成し、免疫染色を施行した。LYVE-1 陽性の LEC のみで、R-Spo3 の信号を認め、LEC による R-Spo3 の産生を蛋白レベルで確認できた (Figure 9)。



**Figure 9. 小腸リンパ内皮細胞の R-Spo3 免疫染色**

マウス小腸非上皮非血球細胞をフローサイトメリーで LYVE-1 陽性細胞 (LEC) と LYVE-1 陰性細胞に純化し、LYVE-1 (緑) と R-Spo3 (赤) の蛍光免疫染色を施行した。青は DAPI による核染色。Scale Bar は 10  $\mu\text{m}$ 。

さらに、ELISA による LEC 中の R-Spo3 蛋白の検出を試みた。FACS によって、VEC、LEC、CD45<sup>+</sup>血液細胞を純化し、それぞれの細胞から蛋白を抽出し、ELISA を用いて蛋白抽出液中の R-Spo3 濃度の測定を行った。その結果、LEC で高濃度の R-Spo3 蛋白を検出した (Figure 10)。



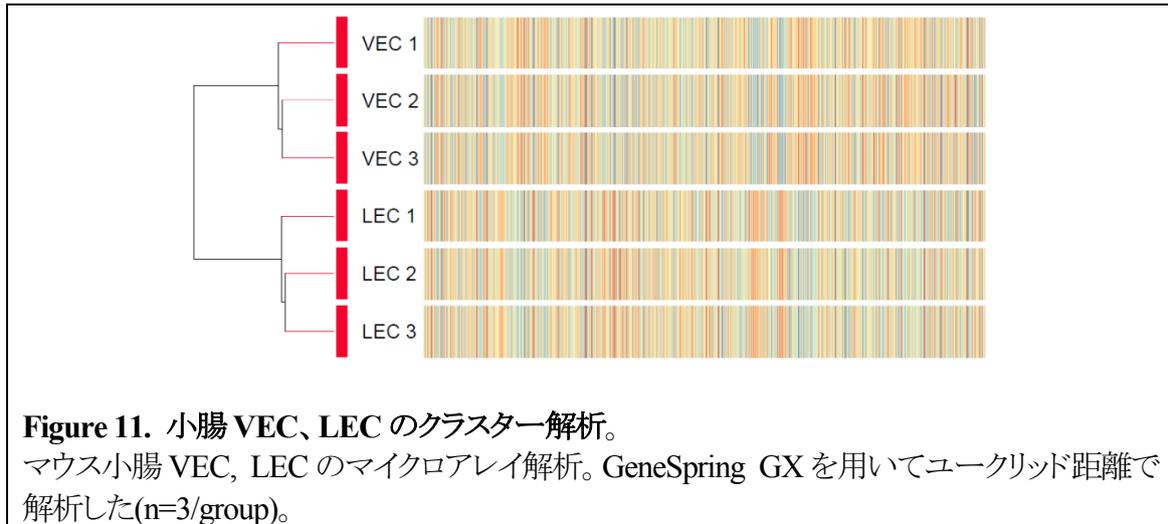
**Figure 10. 小腸血液細胞、VEC、LEC の R-Spo3 蛋白量**

マウス小腸非上皮細胞をフローサイトメリーで血液細胞、VEC、LEC に  $3 \times 10^5$  ずつ純化し、ELISA 用いて R-Spo3 の蛋白量を測定した。データは 3 つの独立した実験のうちの一つを平均値と標準誤差で示した (n=4 / group)。\*\*P<0.01.

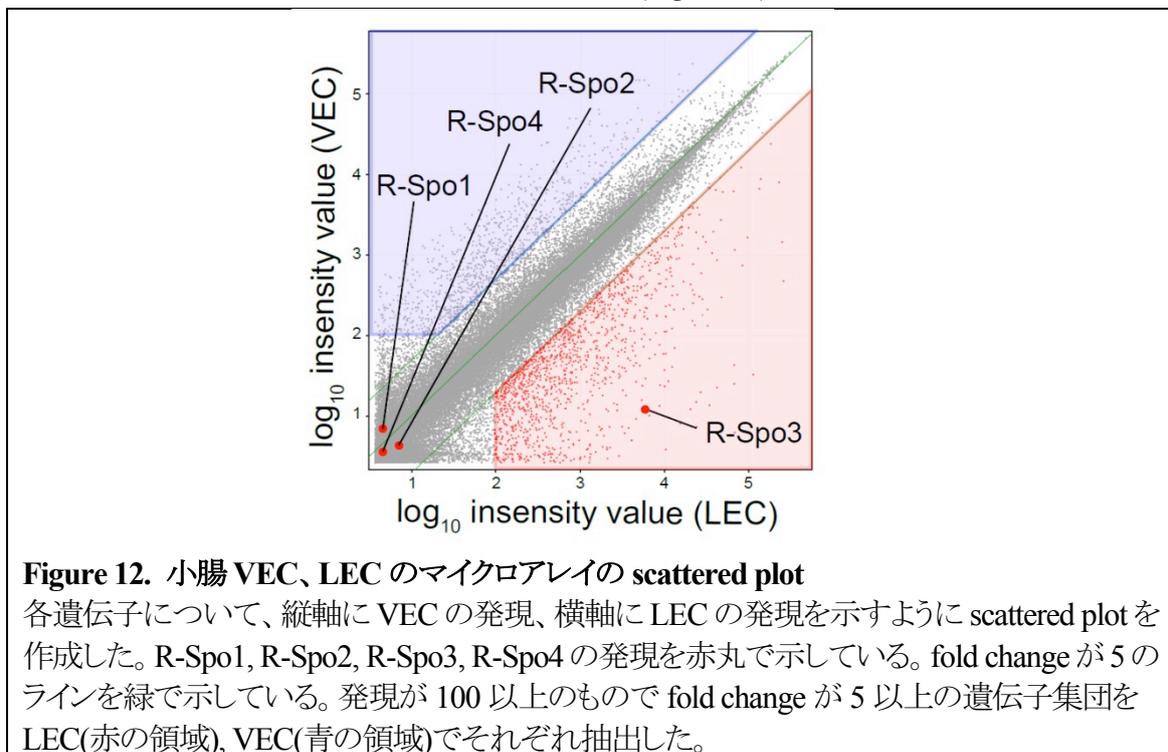
上記から小腸において R-Spo3 はリンパ管内皮細胞で産生されていることが示された。

### 小腸 LEC の Transcriptome 解析

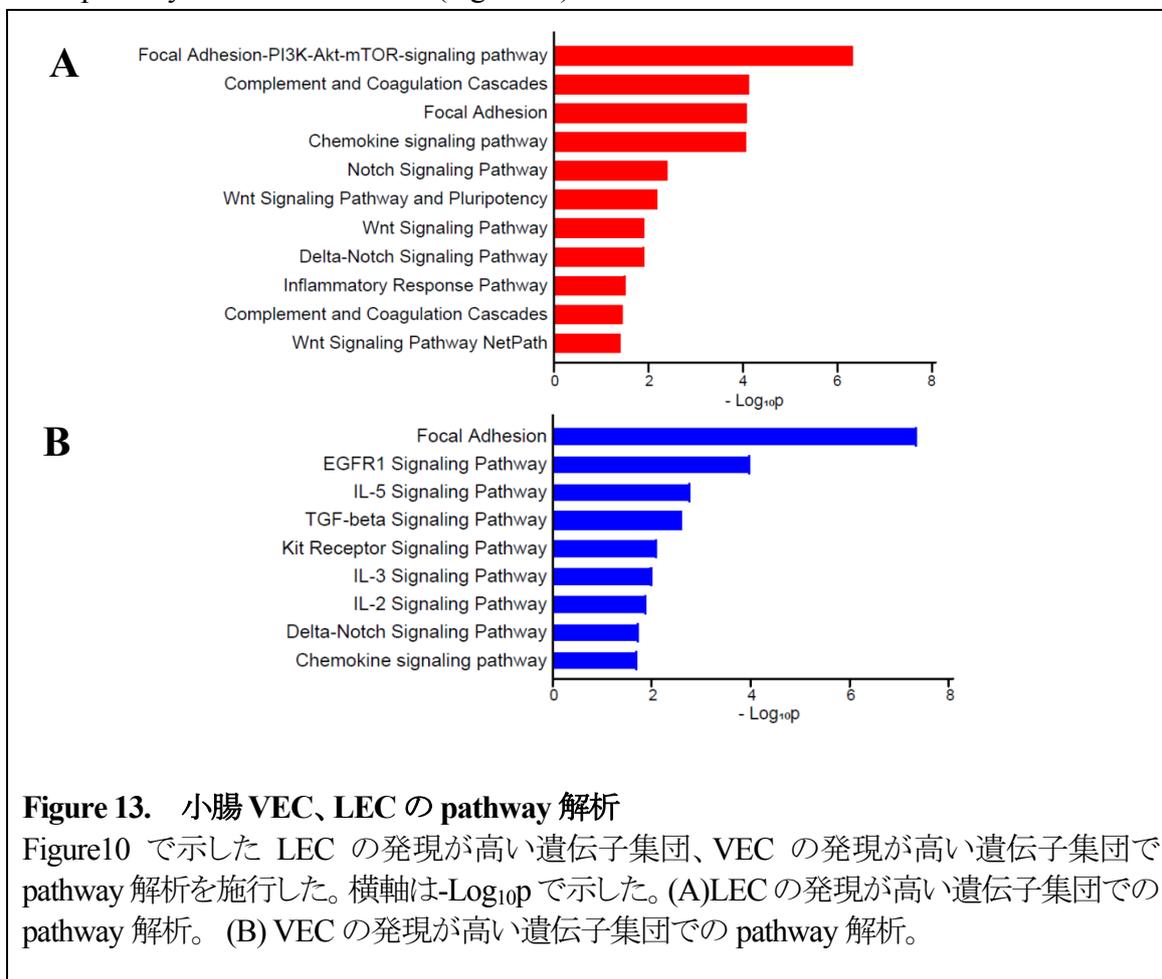
小腸の LEC の特性を探索するために、小腸の LEC を純化し、total RNA を抽出し、microarray を行った。系統に近い VEC でそれぞれ 3 検体ずつ解析を施行した。まず、ユークリッド距離によるクラスター解析を施行したところ、LECとVECで異なる遺伝子発現パターンを確認できた (Figure 11)。



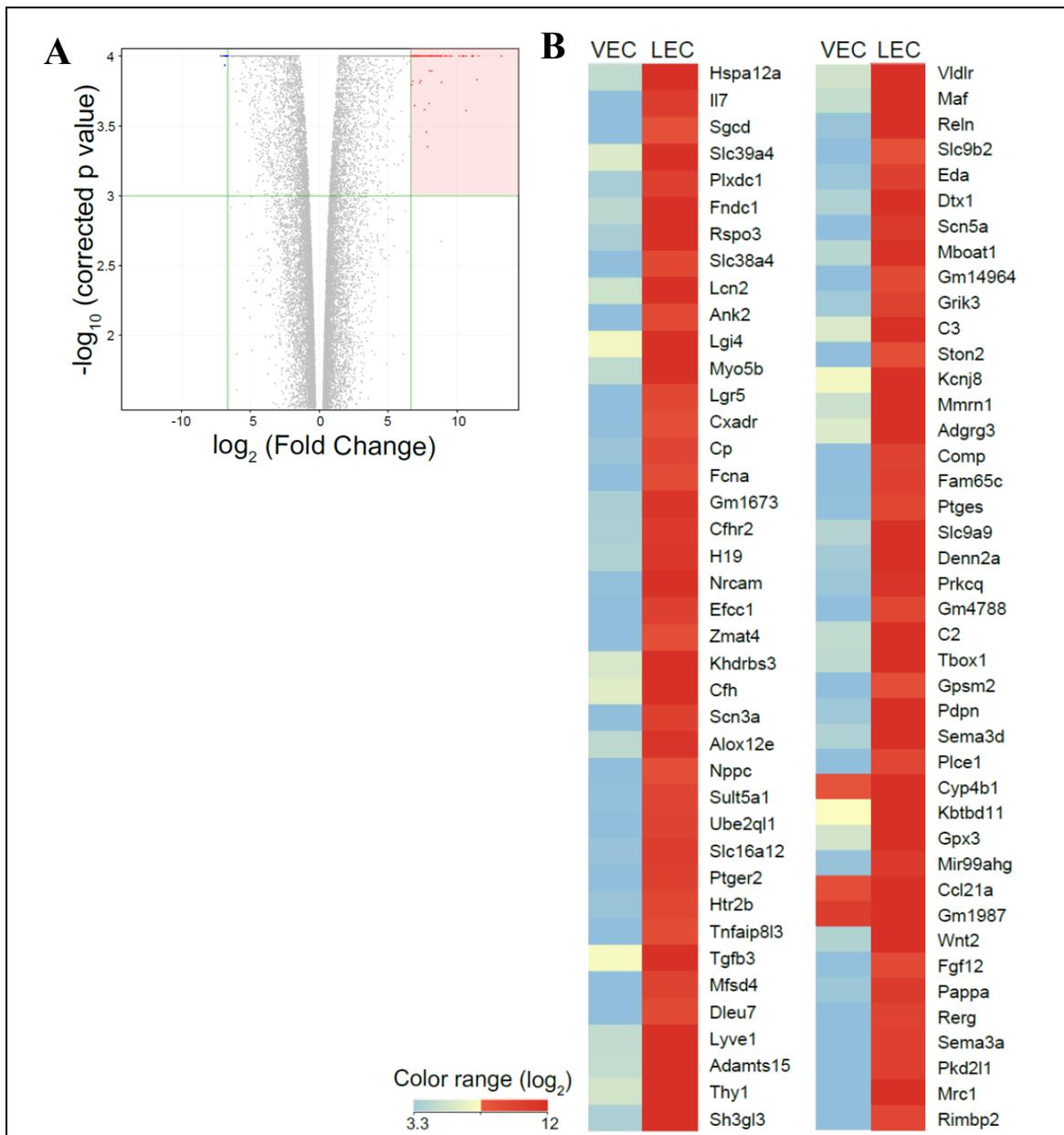
次に、VEC と LEC の発現強度で scattered plot を作成した。R-Spo3 は LEC で高い発現を認めた。これは先述の定量 PCR の結果と一致する。R-Spo1、R-Spo2、R-Spo4 についてはいずれも VEC でも LEC でも低い発現であった (Figure 12)。



次に Figure 12 で抽出した LEC で発現が高い遺伝子集団 1226 個、VEC で発現が高い遺伝子集団 975 個に対してそれぞれ pathway 解析を行った。LEC の発現が高い集団で Wnt pathway が複数抽出された (Figure 13)。



次に、volcano plot を作成し、 $p=0.001$ , fold change=100 を cut-off として LEC で特に発現が高い集団を抽出し、その heat map を作成した (Figure 14)。LEC のマーカーとしてよく知られている *Il7*, *Pdpr*, *Thy1*, *Reln* などが抽出されていた<sup>45-48</sup>。さらに、R-Spo3 をはじめ、*Wnt2*, *Fgf12* といった増殖因子も抽出されており<sup>49,50</sup>、興味深いことに R-Spos のレセプターである *Lgr5* も認められた<sup>51</sup>。Pathway 解析において Wnt シグナルが抽出されていたこともあり、LEC から産生された R-Spo3 は、autocrine 様式で LEC 自体に機能している可能性も考えられる。

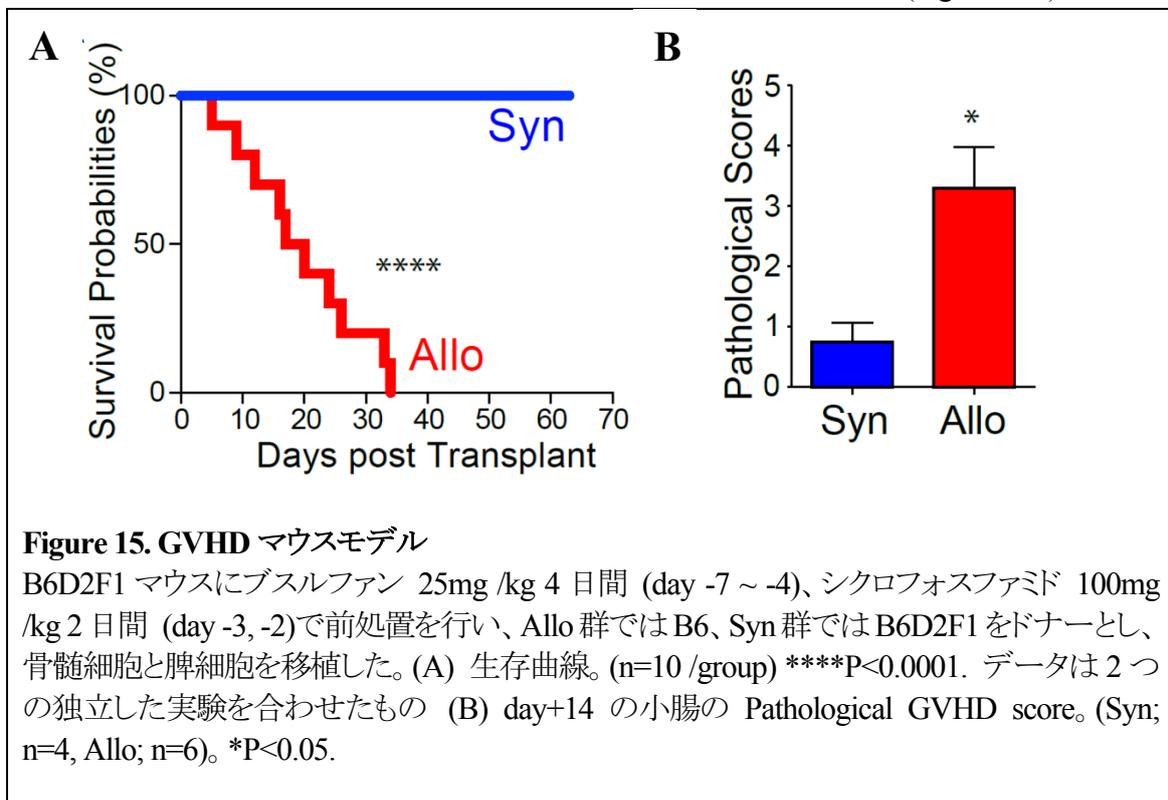


**Figure 14. 小腸 LEC において高発現している遺伝子**

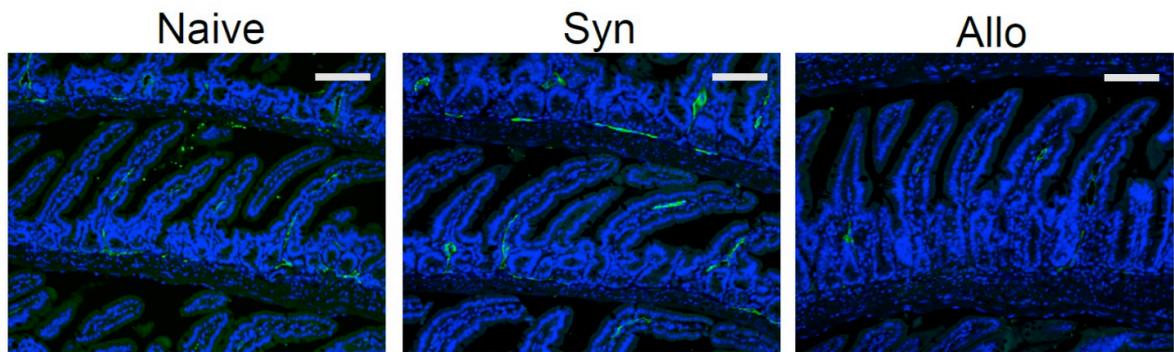
(A)各遺伝子の発現の volcano plot。FC 100, p 0.001 を cut-off として LEC で有意に発現が高いものを抽出した(赤の領域)。 (B)LEC で特に発現が高い遺伝子の heat map。

### 小腸の LEC は急性 GVHD で減少する

同種造血幹細胞移植後には、移植前処置や GVHD によって腸管の粘膜上皮が障害される。こうした傷害の回復には内因性の R-Spo3 が必要とされる<sup>34</sup>。そこで、同種造血幹細胞移植後の、LEC の動態を検討することとした。B6D2F1 マウスにブスルファンとシクロfosファミドによる化学療法で前処置を施行した後、ドナーマウスから採取した、骨髄細胞と脾細胞を移植した。同種移植 (allogeneic transplantation; Allo) 群では主要組織適合性抗原が不一致である B6 マウスを、対照群である同系移植 (syngeneic transplantation; Syn) 群では B6D2F1 マウスをドナーとした。Allo 群では、重症の GVHD が発症し、すべてのレシピエントが移植後 day +35 までに死亡したが、Syn 群ではすべてのレシピエントが生存した (Figure 15A)。Allo 群の小腸組織切片の H&E 染色標本を作成し、GVHD 病理スコアを検討したところ、Allo 群で有意に重症の GVHD の病理所見が得られた (Figure 15B)。



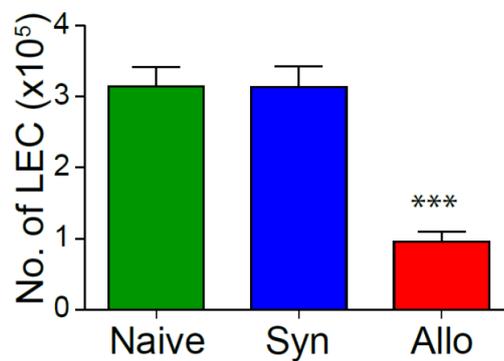
上記のマウスモデルにて小腸のリンパ管を LYVE-1 の蛍光免疫染色で検討した。Naïve と Syn ではリンパ管量は変わらないが、Allo 群では明らかにリンパ管が減少していた (Figure 16)。



**Figure 16. GVHD での小腸 LEC の免疫染色**

移植 day+14 でのマウス小腸の免疫染色。緑:LYVE-1, 青:DAPI。Scale Bar: 100  $\mu$ m

さらに、より定量的にリンパ管量を検討するために、小腸細胞 LEC をフローサイトメトリー法で定量したところ、Allo 群では LEC 数が有意に減少していた (Figure 17)。



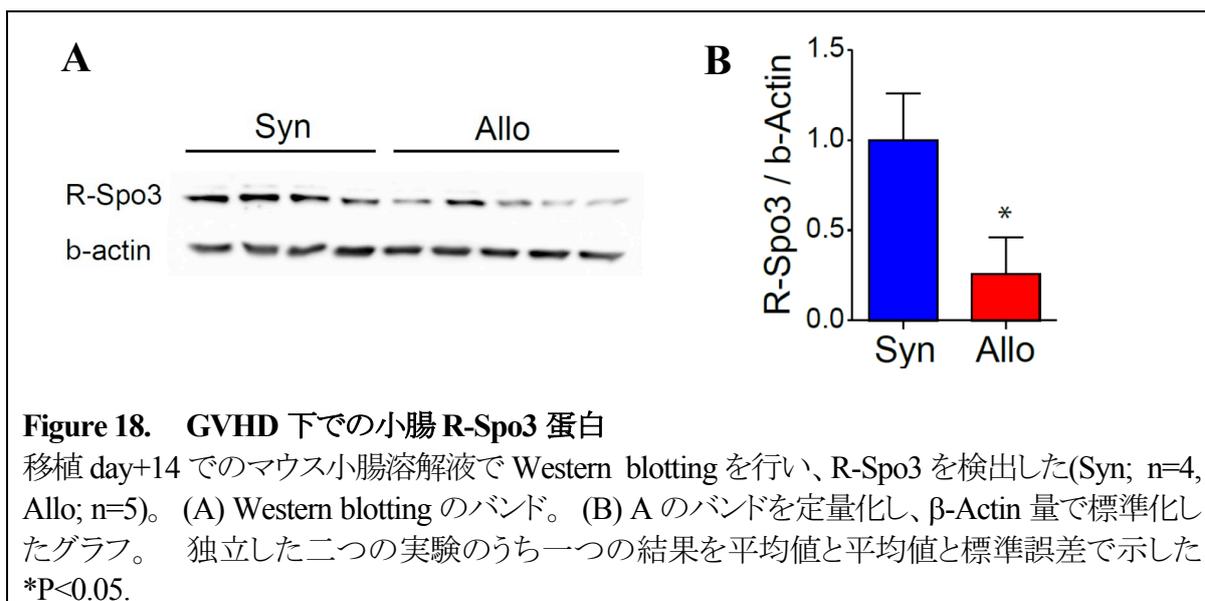
**Figure 17. GVHD での小腸 LEC 数**

移植 day+14 でのマウス小腸 LEC をフローサイトメトリーで解析した (Naive; n=10, Syn; n=12, Allo; n=13). \*\*\*P<0.001. 独立した二つの実験のうち一つの結果を平均値と平均値と標準誤差で示した

以上より、骨髄移植マウスモデルにおいて GVHD によって小腸 LEC やリンパ管が減少することが示された。

### 急性 GVHD で小腸の R-Spo3 産生量は減少する

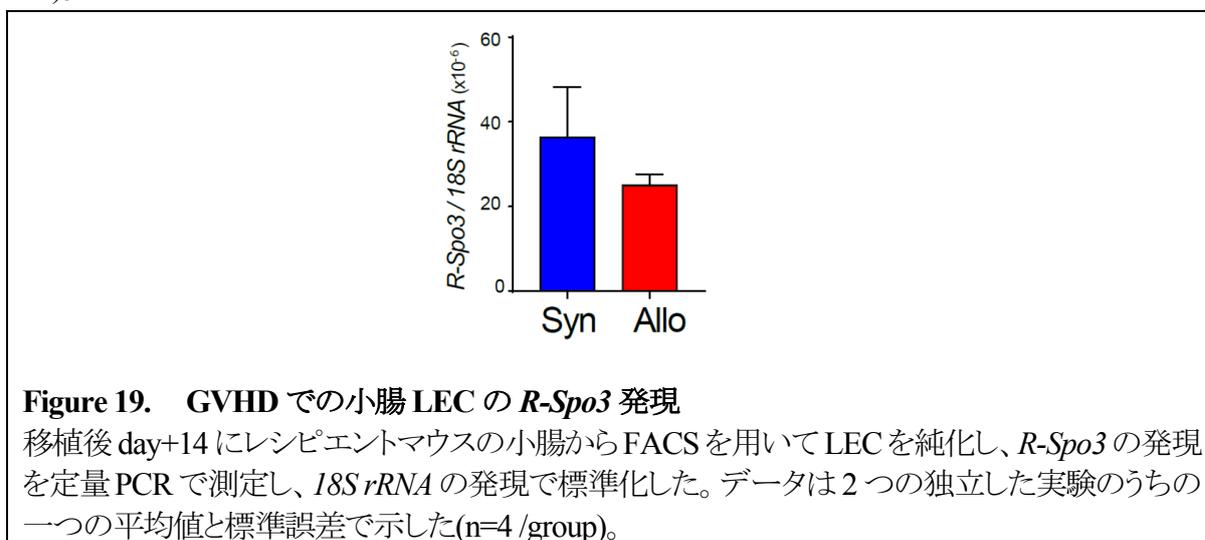
GVHD による LEC の傷害による、腸管における R-Spo3 産生量の変化を検討した。移植後 14 日目にレシピエント小腸から蛋白を抽出し、Western blotting 法を用いて R-Spo3 蛋白を検出した結果、Syn 群に比べ、Allo 群で R-Spo3 産生の低下を認めた (Figure 18A)。b-actin 量で標準化して、R-Spo3 量を定量したところ、Allo 群での R-Spo3 タンパク量が有意に低下していることが示された (Figure 18B)。



### Figure 18. GVHD 下での小腸 R-Spo3 蛋白

移植 day+14 でのマウス小腸溶解液で Western blotting を行い、R-Spo3 を検出した(Syn; n=4, Allo; n=5)。 (A) Western blotting のバンド。 (B) A のバンドを定量化し、 $\beta$ -Actin 量で標準化したグラフ。 独立した二つの実験のうち一つの結果を平均値と平均値と標準誤差で示した \* $P < 0.05$ 。

次に Allo 群で残存している LEC での、R-Spo3 の発現が Syn 群と比較して減少しているか否かを検討した。移植したマウスの小腸 LEC を FACS で純化して、定量 PCR 法を用いて、R-Spo3 の発現を解析したが、R-Spo3 の発現量は Syn 群と Allo 群で同等であった (Figure 19)。



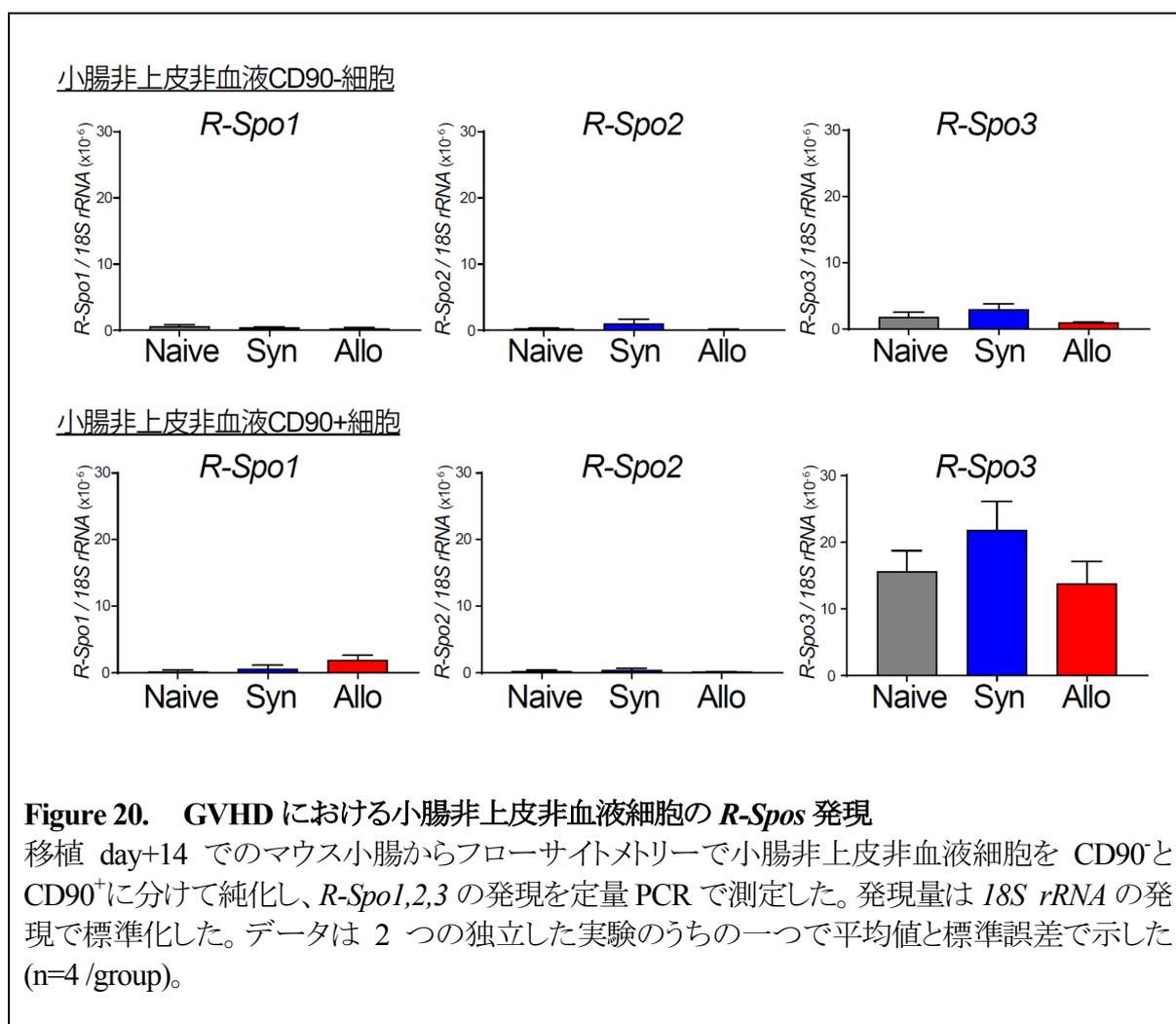
### Figure 19. GVHD での小腸 LEC の R-Spo3 発現

移植後 day+14 にレシピエントマウスの小腸から FACS を用いて LEC を純化し、R-Spo3 の発現を定量 PCR で測定し、18S rRNA の発現で標準化した。データは 2 つの独立した実験のうち一つの平均値と標準誤差で示した(n=4 /group)。

以上より、GVHDを発症したAllo群でのR-Spo3量の減少は、細胞あたりのR-Spo3産生量の低下を伴わず、単にLECの数的減少を反映していることが判明した。

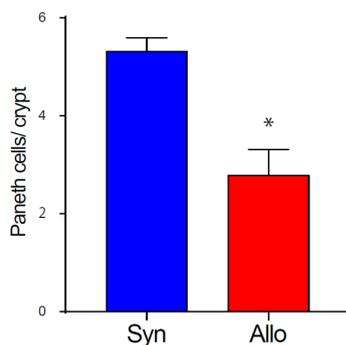
### GVHDを発症した小腸でも、R-Spo3が選択的に産生されている

GVHDにおいてR-Spo3の産生量が減少することを示したが、R-Spo3以外のR-Spoの発現が代償的に上昇しないかどうかを検討した。移植後の小腸の非上皮非血液細胞からLECを含むCD90<sup>+</sup>分画と、LECを含まないCD90<sup>-</sup>分画を純化して、R-Spo1~3の発現を定量PCR法で検討した。対照群としてNaïveマウスとSyn群のレシピエントから純化した細胞を使用した。Naïve, Syn, Allo群の全てにおいて、CD90<sup>+</sup>細胞群がR-Spo3を高発現しており、R-Spo1やR-Spo2の発現亢進は見られなかった (Figure 20)。以上のことから、GVHDなど炎症環境下でも、腸管で産生されるR-SpoはR-Spo3が主要なものであり、LECが主要な産生細胞であることが確認された。



### GVHD において小腸の Paneth 細胞は減少している

小腸における R-Spo3 の減少が腸幹細胞の増殖と Paneth 細胞の分化に負の効果を与えていると考えられる。そこで本研究における GVHD マウスモデルで Paneth 細胞の減少が認められるかを確認した(Figure 21)。これにより小腸 R-Spo3 の減少が Paneth 細胞の減少をもたらし、抗菌ペプチドが減少することで腸内細菌叢が破綻する可能性が示唆される。

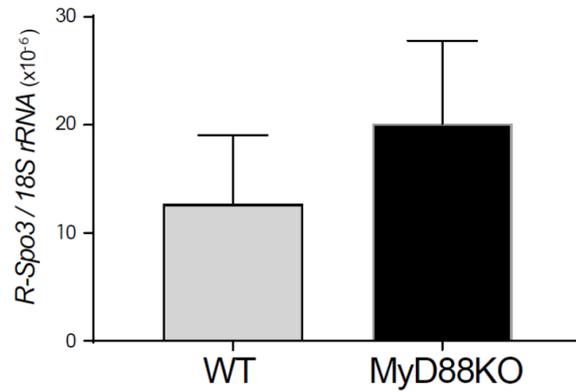


**Figure 21. GVHD での小腸 Paneth 細胞数**

移植 day+14 でのマウス小腸 HE 染色で Paneth 細胞をカウントした。Paneth 細胞は回腸末端から 10crypts を選び、それらの平均でカウントした。データは平均値と標準誤差で示した(n=5/group)。\*P<0.05。

### 定常状態では MyD88 は R-Spo3 発現に影響を与えない

LEC を刺激して R-Spo3 の産生量を増加させることができれば、GVHD などの炎症環境下で、腸管粘膜再生を促進できる可能性がある。その為、LEC の R-Spo3 産生を促進する因子の探索を行うこととした。腸管内は常に細菌にさらされており、細菌や炎症などからの Danger signal はパターン認識レセプターである Toll-like-receptor を介して細胞内にシグナル伝達される。MyD88 は Toll-like receptor4 などのアダプター蛋白である<sup>52,53</sup>。この MyD88 が小腸 LEC の R-Spo3 産生に関与しているかを検討するために、小腸非上皮非血液 CD90<sup>+</sup>細胞の R-Spo3 発現を MyD88 ノックアウトマウス (MyD88KO) と野生型マウス (WT) とで比較した。Naïve MyD88KO マウスと WT マウスでは明らかな R-Spo3 の発現の差を認めず、腸内細菌などからの MyD88 を介した信号が、R-Spo3 の発現を促進していることは否定された (Figure 22)。

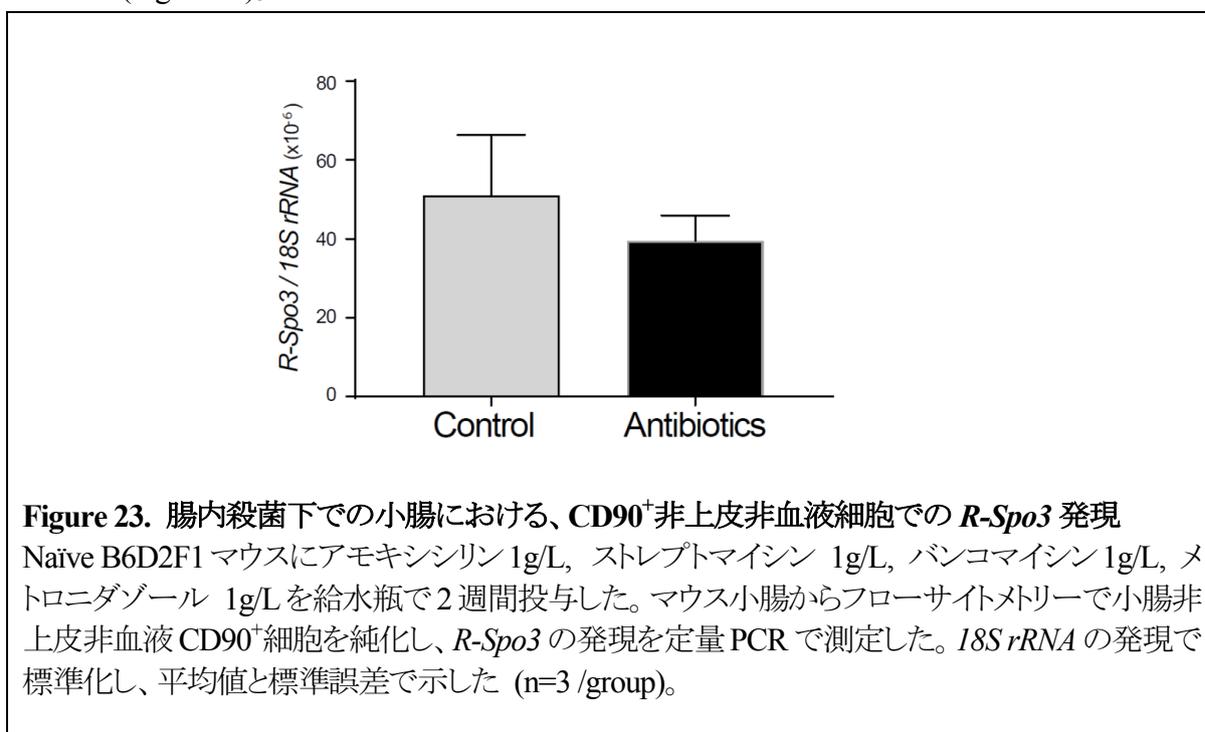


**Figure 22. MyD88KO マウス小腸における、CD90<sup>+</sup>非上皮非血液細胞での *R-Spo3* 発現**

WT B6 マウスと MyD88KO B6 マウスの小腸から FACS を用いて、CD90<sup>+</sup>非上皮非血液細胞を純化し、*R-Spo3* の発現を定量 PCR で測定した。*18S rRNA* の発現で標準化し、平均値と標準誤差で示した (n=3 /group)。

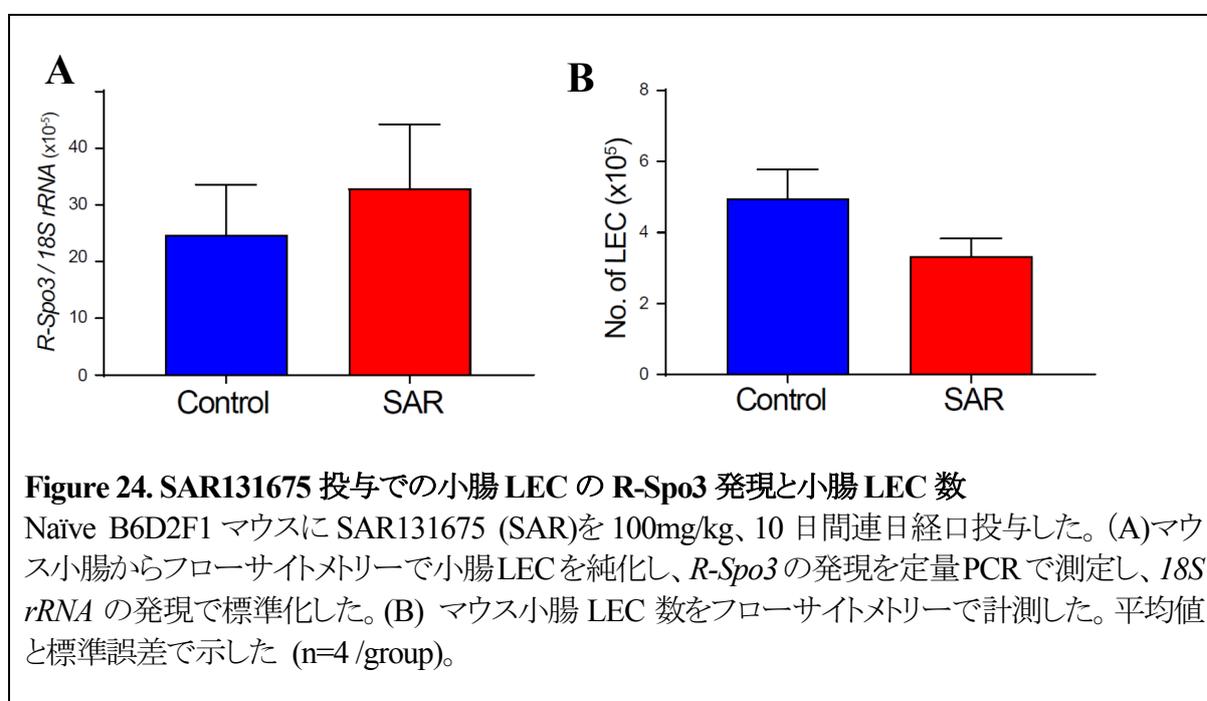
### マウスの腸管殺菌は LEC の *R-Spo3* 発現に影響を与えない

さらにマウスの腸内細菌叢からのシグナルが *R-Spo3* 産生に与える影響を検討するため、細菌によるシグナルが関与しているかを検討するため、マウスの腸管殺菌による LEC の *R-Spo3* の発現の変化を検討した。Naïve B6D2F1 マウスにアモキシシリン 1g/L, ストレプトマイシン 1g/L, バンコマイシン 1g/L, メトロニダゾール 1g/L を給水瓶で投与した群 (Antibiotics 群)としていない群 (Control 群)の小腸から、CD90<sup>+</sup>非上皮非血液細胞を純化し、定量 PCR で *R-Spo3* の発現を検討したが、*R-Spo3* の発現は腸内殺菌による影響を受けなかった (Figure 23)。



### VEGFR-3 チロシンキナーゼインヒビターである SAR131675 は LEC の R-Spo3 発現に影響を与えない

血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF)は VEGF レセプター (VEGFR)に結合して、内皮細胞に増殖などのシグナルを伝達する<sup>54</sup>。VEGFR のうち、VEGFR-3 は LEC に発現しており、このシグナルは発生段階においてリンパ管形成に必須である<sup>55</sup>。そのリガンドである VEGF-C の結合によりそのチロシンキナーゼ活性が起きるが<sup>56</sup>、SAR131675 は VEGFR-3 の特異的なチロシンキナーゼインヒビターである<sup>57-59</sup>。B6D2F1 マウスに SAR131675 を連日 100 mg/kg、10 日間経口投与し、LEC の R-Spo3 の発現、小腸の LEC 数の変化を検討したが、SAR131675 の投与で、LEC の R-Spo3 発現量の変化や小腸の LEC の有意な減少は見られなかった (Figure 24)。

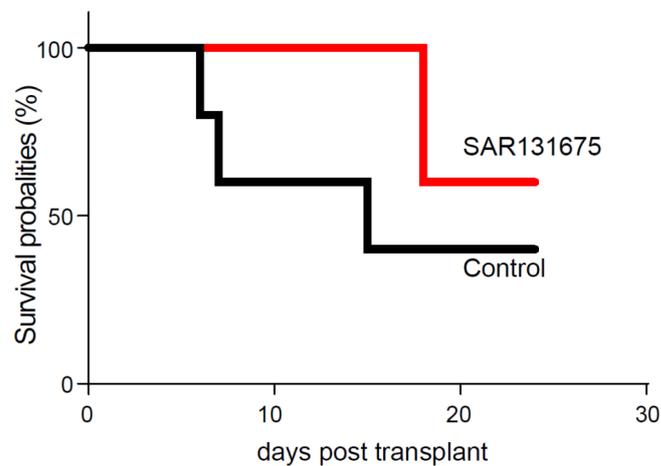


**Figure 24. SAR131675 投与での小腸 LEC の R-Spo3 発現と小腸 LEC 数**

Naïve B6D2F1 マウスに SAR131675 (SAR)を 100mg/kg、10 日間連日経口投与した。(A)マウス小腸からフローサイトメトリーで小腸 LEC を純化し、R-Spo3 の発現を定量 PCR で測定し、18S rRNA の発現で標準化した。(B) マウス小腸 LEC 数をフローサイトメトリーで計測した。平均値と標準誤差で示した (n=4 /group)。

### VEGFR-3 チロシンキナーゼインヒビターである SAR131675 は GVHD を悪化させない

VEGFR-3 チロシンキナーゼインヒビターである SAR131675 を投与することで LEC の減少がさらに起こり、GVHD が悪化する可能性を考えた。GVHD マウスモデルでレシピエントマウスに移植 day1～day10 まで SAR131675 を連日 100 mg/kg、経口投与し生存率を確認した (Figure 25)。しかしながら SAR131675 投与群で生存率の低下は認められなかった。



**Figure 25. GVHD マウスモデルに対する SAR131675 投与の生存率**

B6D2F1 マウスにブスルファン 25mg/kg 4 日間 (day -7 ~ -4)、シクロフォスファミド 100mg/kg 2 日間 (day -3, -2) で前処置を行い、B6 をドナーとし、骨髄細胞と脾細胞を移植した。Control 群には PBS を、SAR131675 100mg/kg を day1 ~ day10 まで経口投与した。n=5/group。

以上の結果から、腸内細菌叢からのシグナルは、LECからのR-Spo3産生量を変化させず、また VEGFR-3 のシグナルも R-Spo3 の産生に必須では無い可能性が示唆された。ただし、VEGFR-3 チロシンキナーゼインヒビターの経口投与が作用していない可能性はある。LEC による R-Spo3 産生の制御機構は、今後の研究が待たれる。

## 考察

R-Spo ファミリーには R-Spo1、R-Spo2、R-Spo3、R-Spo4 の構造の似た 4 つのサブタイプがある<sup>49,60</sup>。R-Spo のサブタイプの機能の相同性は高く、その機能的な差異は明らかでは無いことが多いが、それぞれのサブタイプが異なった臓器で発現して、機能を発揮しているものと考えられる。また、R-Spo2、R-Spo3 は R-Spo1 よりも強力な活性をもち、R-Spo4 は比較的不活性であり<sup>32</sup>、本研究の結果と矛盾しない。

腸において、R-Spos は WNTリガンドと協調して組織恒常性に重要な役割をもつ。しかしながら、WNTとR-Sposの機能は同じではない<sup>16</sup>。WNTの過剰発現のみでは腸幹細胞の自己複製を誘導することはできず、腸管傷害ののちに組織修復を促すことはできない。一方で、WNTリガンドのシグナルは LGR5、RNF43、ZNRF3 といった腸幹細胞上の R-Spo レセプターを維持するのに必要不可欠である<sup>61,62</sup>。また、R-Spos は Frizzled レセプターや LPR6 といった WNT レセプターのターンオーバーを抑制することで WNT のシグナルを増強する。R-Spo1、R-Spo2、R-Spo3 いずれも腸オルガノイドの培養に寄与し<sup>35-38</sup>、いずれも腸幹細胞への作用はあると *in vitro* でも示されている。

いくつかの研究で、小腸においては間質系の細胞が R-Spo2 や R-Spo3 の産生細胞であるとされ、オルガノイドの培養系でその機能を確認している<sup>35-37</sup>。しかしながら、その細胞の詳細についてははっきりとしていない。今回の研究では、小腸の間質系細胞を間葉系マーカーである CD90 と内皮系マーカーである CD31 で分類することで、その両方を発現する LEC が R-Spo3 の産生細胞であることを突き止めた。今回の研究では、筋線維芽細胞を含む CD90<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>細胞では R-Spo2 や R-Spo3 の発現は認めなかった。新生児期マウスの筋線維芽細胞が R-Spo2 を産生し、それが腸管オルガノイド培養を支持するとの報告もある<sup>35,36</sup>。新生児期マウスの線維芽細胞は成人マウスとは性質が異なり、R-Spo2 を産生する可能性がある。また、胃においては CD45<sup>-</sup>MYH11<sup>+</sup>α-SMA<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>の筋線維芽細胞が R-Spo3 を産生するという報告がある<sup>63</sup>。ほかには、心臓の内皮細胞が R-Spo3 を産生するという報告もある<sup>39</sup>が、これはリンパ内皮細胞を含むのかは不明である。R-Spos を産生する細胞は臓器ごとに異なる可能性がある。また、R-Spos は発生段階で重要な役割を担っており、各臓器の成熟段階でも発現が異なる可能性がある。今後は小児や成人などで R-Spos の発現を検討し、その kinetics を検討する必要がある。

Wnt リガンドの疎水性は強いいため、その反応する細胞は近隣にある必要がある。胃において R-Spo3 は上皮の下層にある間葉系細胞から産生されており、近傍に存在する胃粘膜上皮の組織幹細胞の増殖を促進していることが示されており<sup>63</sup>、WNT だけでなく、

R-Spo も局所での分泌によって、近傍の細胞に機能している可能性が高いと考えられる。腸管の R-Spo3 は粘膜固有層に存在するリンパ管内皮から産生されており、比較的近傍にある腸幹細胞に作用していると考えられる。

LECは腸において恒常性を維持するために非常に重要な役割を担っている。腸の LEC にのみジフテリア毒素レセプターを発現する、トランスジェニックマウスにジフテリア毒素を投与すると、腸の LEC が特異的に消失する。このマウスはジフテリアトキシンの投与後、敗血症の状態となり、致命的になり、これは LEC が腸粘膜バリア機能において極めて重要であることを示している<sup>64</sup>。また、LECの増殖シグナルである VEGF-C を組み込んだアデノウイルスを投与することで LEC へ刺激を与え、炎症性腸疾患を改善させたことがマウスの実験で示されている<sup>65</sup>。クローン病においてもリンパ管の閉塞などの傷害が病態を悪化させているとされる<sup>66</sup>。VEGF-C のレセプターである VEGFR3 抗体を投与することで、炎症性腸疾患マウスモデルにおいて腸炎が悪化するとされる<sup>67</sup>。また、血管新生とリンパ管新生にかかわる *angiopoietin-2* ノックアウトマウスは腸炎を悪化させる<sup>68</sup>。ヒトのクローン病においてはリンパ内皮の減少は再燃するリスクが高いとするものもある<sup>69</sup>。これらは炎症性腸疾患において LEC は腸粘膜バリアにおいて重要であることが示唆している。今回、GVHD において LEC が有意に減少していたが、これ自体も腸炎の悪化に関与している可能性がある。

今回の研究で、GVHD により小腸の LEC 数のみならず、そこから産生される R-Spo3 が有意に減少することを示した。R-Spo が小腸の再生を促し、腸上皮傷害からの回復と Paneth 細胞の増加をもたらすが、この作用は Wnt リガンドには無いことが知られている<sup>12,14,16</sup>。したがって、LEC の減少とそれによる R-Spo3 の減少は GVHD の悪化の重要な原因となりうる。しかしながら、今回の研究は、最近他グループから発表された、GVHD により腸の LEC が増え、VEGFR3 のアンタゴニストはリンパ管新生を抑制することで GVHD を改善させるとする報告と全く異なる結果となっている<sup>70</sup>。今回の研究では LEC の細胞数はフローサイトメトリーで測定しており、前記の研究では組織学的な解析のみを用いている。こうした解析法の違いにより、われわれの研究の方が LEC の絶対数を正確に測定できている可能性がある。また、R-Spo3 を産生する CD90<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>細胞は減っているが、CD90 陰性のリンパ管上皮のような、異常な形質を有する細胞が GVHD の腸管で増えている可能性がある。また、マウスモデルにおいて使用しているマウスの系統が異なっていることも原因かもしれない。GVHD におけるリンパ管、LEC の増減については、ヒト検体なども用いて、さらに詳細な研究が必要である。

LEC への刺激で R-Spo3 の産生を促進することができれば、腸管上皮の修復を促すことができ、腸管上皮修復の新たな戦略となりうると思う。しかし、LEC の R-Spo3 産

生調節機構については、いまだ不明である。今回我々は、同じ内皮系細胞である小腸 VEC と LEC の microarray を行うことで、R-Spo3 の産生調節について検討した。VEC, LEC ともに R-Spo1,2,4 の発現は低く、R-Spo3 は LEC で優位に高かった。これは定量 PCR と合致するものであった。非常に興味深いことに、LEC では R-Spo3 の受容体である LGR5 の発現も高かった。また、LEC で発現が高い遺伝子集団の pathway 解析を行うと、WNT pathway が有意に抽出された。これらのことから、LEC から分泌される R-Spo3 は腸幹細胞に作用しているだけでなく、autocrine 様式で LEC 自体へも作用している可能性がある。腸管は常に腸内細菌にさらされており、細菌からの Danger signal が LEC へ作用し、R-Spo3 の産生を調節している可能性を考えた。Danger signal はパターン認識レセプターである Toll-like-receptor を介して細胞内にシグナル伝達される<sup>71</sup>。MyD88 は Toll-like receptor4 などのアダプター蛋白である<sup>72</sup>。そこで、MyD88 ノックアウトマウスにおいて LEC の R-Spo3 発現が低下していないかを検討した。しかしながら MyD88 ノックアウトマウスは WT と比べ、R-Spo3 の発現は変化がなかった。また腸管殺菌を行うことで細菌からの LEC への刺激が低下し、R-Spo3 の発現が低下するのではないかと考えた。しかしながら腸管殺菌を行ったマウスでは LEC の R-Spo3 発現は変化がなかった。これらから、腸内細菌からの LEC の刺激による R-Spo3 の調整機構の存在は否定的であると考えた。また、LEC 増殖因子である VEGF-C のレセプターである VEGFR3<sup>73</sup> のチロシンキナーゼインヒビターが LEC の R-Spo3 発現を調節している可能性を考え、naïve マウスに VEGFR3 チロシンキナーゼインヒビターを投与し、LEC の R-Spo3 発現を検討した。しかしながら、VEGFR3 チロシンキナーゼインヒビターでは LEC の R-Spo3 発現に変化はなかった。本薬剤では腸管のリンパ管内皮の VEGFR3 のシグナルを阻害できていない可能性がある。今後さらに、有効な VEGFR3 阻害剤での検討が望ましい。

私たちはこれまでに、GVHD が Paneth 細胞をターゲットとし、それから分泌される  $\alpha$ ディフェンシンなどの抗菌ペプチドが減少することを示した<sup>14</sup>。抗菌ペプチドの減少は腸内細菌叢の乱れを起し、正常細菌叢の減少と病原細菌の増加をもたらす。これがさらに GVHD を悪化させる。われわれは、リコンビナントヒト R-Spo1 の投与により、腸幹細胞と Paneth 細胞を GVHD から保護し、抗菌ペプチドの減少を抑制できることを報告した<sup>14</sup>。R-Spo ではない別の腸上皮増殖因子として、インターロイキン-22 (Interleukin-22, IL-22)がある。しかしながら、IL-22 は Paneth 細胞の増殖させない<sup>74</sup>。IL-22 は type3 innate lymphoid cell (ILC3)から分泌されており、LGR5 陽性の腸幹細胞や腸幹細胞から分化した前駆細胞の IL-22 レセプターに作用し、腸上皮の増殖を促す<sup>13,74</sup>。IL-22 を産生する ILC3 も R-Spo3 を産生する LEC も GVHD では減少していることから、IL-22 とともに R-Spo3 の投与を行うのが GVHD の予防的治療として最適な戦略であると考えられる。

今回の研究で、腸管の LEC が R-Spo3 の産生細胞であり、これが GVHD で減少することを世界で初めて示した。このことは R-Spo3 産生性の LEC の保護や、LEC への刺激で R-Spo3 を産生させることが、GVHD をはじめとする炎症性腸疾患の治療戦略となりうることを示している。

## 総括および結論

### 1. 本研究から得られた新知見

- ・小腸 R-Spos のうち、R-Spo3 が優位に発現している。
- ・小腸 R-Spo3 は粘膜固有層の LEC によって産生されている。
- ・小腸 LEC はそれ自体が LGR5 の発現をしており、R-Spo3 は autocrine 様式で、LEC の機能を制御している可能性がある。
- ・GVHD において小腸 LEC は減少する。
- ・GVHD において小腸 LEC の細胞あたりの R-Spo3 産生は変わらない。
- ・GVHD において小腸 LEC の減少を反映して R-Spo3 蛋白産生量は減少する。
- ・GVHD において R-Spo3 以外のサブタイプの発現が相補的に高くなることはない。

### 2. 上記の新知見の意義

腸幹細胞の増殖に必須である R-Spo のうち、生理的に分泌されているのは R-Spo3 であり、これが LEC から分泌されていることを初めて証明した。また、この腸 LEC 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 LEC の機能を制御している可能性が示唆された。

さらに、この LEC 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 LEC に対する刺激と R-Spo3 の産生促進が治療戦略となりうると考えられた。また、LEC 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-Spo3 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。

### 3. 今後の課題

LEC の R-Spo3 産生メカニズムについては、詳細な検討ができていない。産生メカニズムやシグナルを特定することで、リンパ内皮細胞の R-Spo3 産生促進へのアプローチができる可能性がある。

LEC が腸幹細胞のニッチとして機能しているかを検討する。具体的には腸幹細胞と LEC の局在を見て近接しているかどうかを確認する。

LEC は microarray では LGR5 を高く発現しており、細胞表面での Lgr5 蛋白の発現や、そのリガンドである R-Spo の LEC に対する効果も検討する。具体的には、まず、**B6-Lgr5-EGFP-creER<sup>T2</sup>**(LGR5-GFP)マウスを用いることで、これらに対する免疫染色やフローサイトメトリー法によって、腸管の LEC が全て LGR5 陽性なのか一部が陽性なのかを確認する。一部であれば LGR5<sup>+</sup> LEC を純化してその機能を検討する。さらに、リコンビナント R-Spo の投与に寄って、LGR5<sup>+</sup>LEC を刺激して、その機能の変化を検討する。また、LGR5-GFP マウスにジフテリアトキシンレセプターの conditional transgenic マウスを掛け合わせることで、LGR5<sup>+</sup>細胞に特異的にジフテリアトキシンを発現させることができ、このマウスにジフテリアトキシンを投与することで腸 LEC の傷害が起きることで R-Spo3 の低下や、腸の恒常性が破たんすることを確認する。

GVHD において LEC が減少するメカニズムは特定できていない。アロ反応性 T 細胞がリンパ内皮細胞を攻撃する可能性や、サイトカインによる変化の可能性もある。特定のサイトカインの減少などのメカニズムが明らかになれば、その制御により、病態を改善させることができる可能性がある。

本研究はマウスを用いた研究であり、ヒトも同様にリンパ内皮細胞が R-Spo3 を産生しているのか、これらが GVHD で減少するのかは検討されていない。今後ヒト検体でも LEC からの R-Spo3 の産生や、GVHD での LEC の動態などを検討する必要がある。

## 謝辞

北海道大学大学院 医学研究院 内科系部門 内科学分野 血液内科学教室  
豊嶋崇徳教授、近藤健診療准教授、橋本大吾講師、早瀬英子助教  
高橋秀一郎、山川知宏、江端浩、横山絵美、荒隆英、大東寛幸、立野貴大

## 引用文献

- 1 Gale, R. P. & Champlin, R. E. How does bone-marrow transplantation cure leukaemia? *Lancet (London, England)* **2**, 28-30 (1984).
- 2 Teshima, T., Ordemann, R., Reddy, P., Gagin, S., Liu, C., Cooke, K. R. & Ferrara, J. L. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med.* **8**, 575-581 (2002).
- 3 Teshima, T., Maeda, Y. & Ozaki, K. Regulatory T cells and IL-17-producing cells in graft-versus-host disease. *Immunotherapy* **3**, 833-852 (2011).
- 4 Gooley, T. A., Chien, J. W., Pergam, S. A., Hingorani, S., Sorrow, M. L., Boeckh, M., Martin, P. J., Sandmaier, B. M., Marr, K. A., Appelbaum, F. R., Storb, R. & McDonald, G. B. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* **363**, 2091-2101 (2010).
- 5 Hill, G. R. & Ferrara, J. L. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **95**, 2754-2759 (2000).
- 6 Teshima, T. & Ferrara, J. L. M. Pathogenesis and prevention of graft-versus-host disease. *Curr Opin Organ Transplant.* **6**, 265-271 (2001).
- 7 McDonald, G. B. How I treat acute graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract and the liver. *Blood* **127**, 1544-1550 (2016).
- 8 Cutler, C., Logan, B., Nakamura, R., Johnston, L., Choi, S., Porter, D., Hogan, W. J., Pasquini, M., MacMillan, M. L., Hsu, J. W., Waller, E. K., Grupp, S., McCarthy, P., Wu, J., Hu, Z. H., Carter, S. L., Horowitz, M. M. & Antin, J. H. Tacrolimus/sirolimus vs tacrolimus/methotrexate as GVHD prophylaxis after matched, related donor allogeneic HCT. *Blood* **124**, 1372-1377 (2014).
- 9 Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J. & Clevers, H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262-265 (2009).
- 10 Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegerbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J. & Clevers, H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003-1007 (2007).

- 11 de Lau, W., Peng, W. C., Gros, P. & Clevers, H. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes & development* **28**, 305-316 (2014).
- 12 Takashima, S., Kadowaki, M., Aoyama, K., Koyama, M., Oshima, T., Tomizuka, K., Akashi, K. & Teshima, T. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 285-294 (2011).
- 13 Hanash, A. M., Dudakov, J. A., Hua, G., O'Connor, M. H., Young, L. F., Singer, N. V., West, M. L., Jenq, R. R., Holland, A. M., Kappel, L. W., Ghosh, A., Tsai, J. J., Rao, U. K., Yim, N. L., Smith, O. M., Velardi, E., Hawryluk, E. B., Murphy, G. F., Liu, C., Fouser, L. A., Kolesnick, R., Blazar, B. R. & van den Brink, M. R. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* **37**, 339-350 (2012).
- 14 Hayase, E., Hashimoto, D., Nakamura, K., Noizat, C., Ogasawara, R., Takahashi, S., Ohigashi, H., Yokoi, Y., Sugimoto, R., Matsuoka, S., Ara, T., Yokoyama, E., Yamakawa, T., Ebata, K., Kondo, T., Hiramane, R., Aizawa, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Mori, H., Kurokawa, K., Tomizuka, K., Ayabe, T. & Teshima, T. R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. *J Exp Med.* **214**, 3507-3518 (2017).
- 15 Eriguchi, Y., Takashima, S., Oka, H., Shimoji, S., Nakamura, K., Uryu, H., Shimoda, S., Iwasaki, H., Shiono, N., Ayabe, T., Akashi, K. & Teshima, T. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins. *Blood* **120**, 223-231 (2012).
- 16 Yan, K. S., Janda, C. Y., Chang, J., Zheng, G. X. Y., Larkin, K. A., Luca, V. C., Chia, L. A., Mah, A. T., Han, A., Terry, J. M., Ootani, A., Roelf, K., Lee, M., Yuan, J., Li, X., Bolen, C. R., Wilhelmy, J., Davies, P. S., Ueno, H., von Furstenberg, R. J., Belgrader, P., Ziraldo, S. B., Ordonez, H., Henning, S. J., Wong, M. H., Snyder, M. P., Weissman, I. L., Hsueh, A. J., Mikkelsen, T. S., Garcia, K. C. & Kuo, C. J. Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5<sup>+</sup> intestinal stem-cell self-renewal. *Nature* **545**, 238-242 (2017).
- 17 Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y. L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., Boutros, M., Cruciat, C. M. & Niehrs, C. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO reports* **12**, 1055-1061 (2011).
- 18 Wang, D., Huang, B., Zhang, S., Yu, X., Wu, W. & Wang, X. Structural basis for R-spondin recognition by LGR4/5/6 receptors. *Genes & development* **27**, 1339-1344

- (2013).
- 19 Chen, P. H., Chen, X., Lin, Z., Fang, D. & He, X. The structural basis of R-spondin recognition by LGR5 and RNF43. *Genes & development* **27**, 1345-1350 (2013).
  - 20 Ruffner, H., Sprunger, J., Charlat, O., Leighton-Davies, J., Grosshans, B., Salathe, A., Zietzling, S., Beck, V., Therier, M., Isken, A., Xie, Y., Zhang, Y., Hao, H., Shi, X., Liu, D., Song, Q., Clay, I., Hintzen, G., Tchorz, J., Bouchez, L. C., Michaud, G., Finan, P., Myer, V. E., Bouwmeester, T., Porter, J., Hild, M., Bassilana, F., Parker, C. N. & Cong, F. R-Spondin potentiates Wnt/beta-catenin signaling through orphan receptors LGR4 and LGR5. *PloS one* **7**, e40976 (2012).
  - 21 Zebisch, M., Xu, Y., Krastev, C., MacDonald, B. T., Chen, M., Gilbert, R. J., He, X. & Jones, E. Y. Structural and molecular basis of ZNRF3/RNF43 transmembrane ubiquitin ligase inhibition by the Wnt agonist R-spondin. *Nature communications* **4**, 2787 (2013).
  - 22 Nusse, R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell research* **15**, 28-32 (2005).
  - 23 Nam, J. S., Turcotte, T. J. & Yoon, J. K. Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene expression patterns : GEP* **7**, 306-312 (2007).
  - 24 Tomizuka, K., Horikoshi, K., Kitada, R., Sugawara, Y., Iba, Y., Kojima, A., Yoshitome, A., Yamawaki, K., Amagai, M., Inoue, A., Oshima, T. & Kakitani, M. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Human molecular genetics* **17**, 1278-1291 (2008).
  - 25 Bell, S. M., Schreiner, C. M., Wert, S. E., Mucenski, M. L., Scott, W. J. & Whitsett, J. A. R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. *Development (Cambridge, England)* **135**, 1049-1058 (2008).
  - 26 Nam, J. S., Park, E., Turcotte, T. J., Palencia, S., Zhan, X., Lee, J., Yun, K., Funk, W. D. & Yoon, J. K. Mouse R-spondin2 is required for apical ectodermal ridge maintenance in the hindlimb. *Developmental biology* **311**, 124-135 (2007).
  - 27 Aoki, M., Mieda, M., Ikeda, T., Hamada, Y., Nakamura, H. & Okamoto, H. R-spondin3 is required for mouse placental development. *Developmental biology* **301**, 218-226 (2007).
  - 28 Kazanskaya, O., Ohkawara, B., Heroult, M., Wu, W., Maltry, N., Augustin, H. G. & Niehrs, C. The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. *Development (Cambridge, England)* **135**, 3655-3664 (2008).
  - 29 Ishii, Y., Wajid, M., Bazzi, H., Fantauzzo, K. A., Barber, A. G., Blaydon, D. C., Nam, J. S., Yoon, J. K., Kelsell, D. P. & Christiano, A. M. Mutations in R-spondin 4 (RSPO4) underlie inherited anonychia. *The Journal of investigative dermatology* **128**, 867-870 (2008).

- 30 Bruchle, N. O., Frank, J., Frank, V., Senderek, J., Akar, A., Koc, E., Rigopoulos, D., van Steensel, M., Zerres, K. & Bergmann, C. RSPO4 is the major gene in autosomal-recessive anonychia and mutations cluster in the furin-like cysteine-rich domains of the Wnt signaling ligand R-spondin 4. *The Journal of investigative dermatology* **128**, 791-796 (2008).
- 31 Bergmann, C., Senderek, J., Anhof, D., Thiel, C. T., Ekici, A. B., Poblete-Gutierrez, P., van Steensel, M., Seelow, D., Nurnberg, G., Schild, H. H., Nurnberg, P., Reis, A., Frank, J. & Zerres, K. Mutations in the gene encoding the Wnt-signaling component R-spondin 4 (RSPO4) cause autosomal recessive anonychia. *American journal of human genetics* **79**, 1105-1109 (2006).
- 32 Kim, K. A., Wagle, M., Tran, K., Zhan, X., Dixon, M. A., Liu, S., Gros, D., Korver, W., Yonkovich, S., Tomasevic, N., Binnerts, M. & Abo, A. R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Molecular biology of the cell* **19**, 2588-2596 (2008).
- 33 Kim, K. A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., Funk, W. D. & Tomizuka, K. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* **309**, 1256-1259 (2005).
- 34 Storm, E. E., Durinck, S., de Sousa e Melo, F., Tremayne, J., Kljavin, N., Tan, C., Ye, X., Chiu, C., Pham, T., Hongo, J. A., Bainbridge, T., Firestein, R., Blackwood, E., Metcalfe, C., Stawiski, E. W., Yauch, R. L., Wu, Y. & de Sauvage, F. J. Targeting PTPRK-RSPO3 colon tumours promotes differentiation and loss of stem-cell function. *Nature* **529**, 97-100 (2016).
- 35 Lahar, N., Lei, N. Y., Wang, J., Jabaji, Z., Tung, S. C., Joshi, V., Lewis, M., Stelzner, M., Martin, M. G. & Dunn, J. C. Intestinal subepithelial myofibroblasts support in vitro and in vivo growth of human small intestinal epithelium. *PloS one* **6**, e26898 (2011).
- 36 Lei, N. Y., Jabaji, Z., Wang, J., Joshi, V. S., Brinkley, G. J., Khalil, H., Wang, F., Jaroszewicz, A., Pellegrini, M., Li, L., Lewis, M., Stelzner, M., Dunn, J. C. & Martin, M. G. Intestinal subepithelial myofibroblasts support the growth of intestinal epithelial stem cells. *PloS one* **9**, e84651 (2014).
- 37 Kabiri, Z., Greicius, G., Madan, B., Biechele, S., Zhong, Z., Zaribafzadeh, H., Edison, Aliyev, J., Wu, Y., Bunte, R., Williams, B. O., Rossant, J. & Virshup, D. M. Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development (Cambridge, England)* **141**, 2206-2215 (2014).
- 38 Miyoshi, H. & Stappenbeck, T. S. In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture. *Nat Protoc.* **8**, 2471-2482 (2013).

- 39 Kannan, L., Kis-Toth, K., Yoshiya, K., Thai, T. H., Sehrawat, S., Mayadas, T. N., Dalle Lucca, J. J. & Tsokos, G. C. R-spondin3 prevents mesenteric ischemia/reperfusion-induced tissue damage by tightening endothelium and preventing vascular leakage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 14348-14353 (2013).
- 40 Kang, E., Yousefi, M. & Gruenheid, S. R-Spondins Are Expressed by the Intestinal Stroma and are Differentially Regulated during Citrobacter rodentium- and DSS-Induced Colitis in Mice. *PLoS one* **11**, e0152859 (2016).
- 41 Kelder, T., van Iersel, M. P., Hanspers, K., Kutmon, M., Conklin, B. R., Evelo, C. T. & Pico, A. R. WikiPathways: building research communities on biological pathways. *Nucleic Acids Res.* **40**, D1301-1307 (2012).
- 42 Jurisic, G., Iolyeva, M., Proulx, S. T., Halin, C. & Detmar, M. Thymus cell antigen 1 (Thy1, CD90) is expressed by lymphatic vessels and mediates cell adhesion to lymphatic endothelium. *Exp Cell Res.* **316**, 2982-2992 (2010).
- 43 Pinchuk, I. V., Mifflin, R. C., Saada, J. I. & Powell, D. W. Intestinal mesenchymal cells. *Curr Gastroenterol Rep.* **12**, 310-318 (2010).
- 44 Jutila, M. A., Kroese, F. G., Jutila, K. L., Stall, A. M., Fiering, S., Herzenberg, L. A., Berg, E. L. & Butcher, E. C. Ly-6C is a monocyte/macrophage and endothelial cell differentiation antigen regulated by interferon-gamma. *Eur J Immunol.* **18**, 1819-1826 (1988).
- 45 Iolyeva, M., Aebischer, D., Proulx, S. T., Willrodt, A. H., Ecoiffier, T., Haner, S., Bouchaud, G., Krieg, C., Onder, L., Ludewig, B., Santambrogio, L., Boyman, O., Chen, L., Finke, D. & Halin, C. Interleukin-7 is produced by afferent lymphatic vessels and supports lymphatic drainage. *Blood* **122**, 2271-2281 (2013).
- 46 Pan, Y., Yago, T., Fu, J., Herzog, B., McDaniel, J. M., Mehta-D'Souza, P., Cai, X., Ruan, C., McEver, R. P., West, C., Dai, K., Chen, H. & Xia, L. Podoplanin requires sialylated O-glycans for stable expression on lymphatic endothelial cells and for interaction with platelets. *Blood* **124**, 3656-3665 (2014).
- 47 Kretschmer, S., Dethlefsen, I., Hagner-Benes, S., Marsh, L. M., Garn, H. & Konig, P. Visualization of intrapulmonary lymph vessels in healthy and inflamed murine lung using CD90/Thy-1 as a marker. *PLoS one* **8**, e55201 (2013).
- 48 Lutter, S., Xie, S., Tatin, F. & Makinen, T. Smooth muscle-endothelial cell communication activates Reelin signaling and regulates lymphatic vessel formation. *J Cell Biol.* **197**, 837-849 (2012).
- 49 Niehrs, C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**,

- 767-779 (2012).
- 50 Nakayama, F., Yasuda, T., Umeda, S., Asada, M., Imamura, T., Meineke, V. & Akashi, M. Fibroblast growth factor-12 (FGF12) translocation into intestinal epithelial cells is dependent on a novel cell-penetrating peptide domain: involvement of internalization in the in vivo role of exogenous FGF12. *J Biol Chem.* **286**, 25823-25834 (2011).
- 51 Koo, B. K. & Clevers, H. Stem cells marked by the R-spondin receptor LGR5. *Gastroenterology* **147**, 289-302 (2014).
- 52 Kaisho, T. & Akira, S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol.* **22**, 78-83 (2001).
- 53 Hou, B., Reizis, B. & DeFranco, A. L. Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms. *Immunity* **29**, 272-282 (2008).
- 54 Shibuya, M. VEGF-VEGFR System as a Target for Suppressing Inflammation and other Diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **15**, 135-144 (2015).
- 55 Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V. W., Fang, G. H., Dumont, D., Breitman, M. & Alitalo, K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 3566-3570 (1995).
- 56 Roberts, N., Kloos, B., Cassella, M., Podgrabinska, S., Persaud, K., Wu, Y., Pytowski, B. & Skobe, M. Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res.* **66**, 2650-2657 (2006).
- 57 Alam, A., Blanc, I., Gueguen-Dorbes, G., Duclos, O., Bonnin, J., Barron, P., Laplace, M. C., Morin, G., Gaujarengues, F., Dol, F., Herault, J. P., Schaeffer, P., Savi, P. & Bono, F. SAR131675, a potent and selective VEGFR-3-TK inhibitor with antilymphangiogenic, antitumoral, and antimetastatic activities. *Mol Cancer Ther.* **11**, 1637-1649 (2012).
- 58 Nihei, M., Okazaki, T., Ebihara, S., Kobayashi, M., Niu, K., Gui, P., Tamai, T., Nukiwa, T., Yamaya, M., Kikuchi, T., Nagatomi, R., Ebihara, T. & Ichinose, M. Chronic inflammation, lymphangiogenesis, and effect of an anti-VEGFR therapy in a mouse model and in human patients with aspiration pneumonia. *J Pathol.* **235**, 632-645 (2015).
- 59 Espagnolle, N., Barron, P., Mandron, M., Blanc, I., Bonnin, J., Agnel, M., Kerbelec, E., Herault, J. P., Savi, P., Bono, F. & Alam, A. Specific Inhibition of the VEGFR-3 Tyrosine Kinase by SAR131675 Reduces Peripheral and Tumor Associated Immunosuppressive Myeloid Cells. *Cancers (Basel)* **6**, 472-490 (2014).

- 60 de Lau, W. B., Snel, B. & Clevers, H. C. The R-spondin protein family. *Genome Biol.* **13**, 242 (2012).
- 61 Tsukiyama, T., Fukui, A., Terai, S., Fujioka, Y., Shinada, K., Takahashi, H., Yamaguchi, T. P., Ohba, Y. & Hatakeyama, S. Molecular Role of RNF43 in Canonical and Noncanonical Wnt Signaling. *Molecular and cellular biology* **35**, 2007-2023 (2015).
- 62 Hao, H. X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., Mao, X., Ma, Q., Zamponi, R., Bouwmeester, T., Finan, P. M., Kirschner, M. W., Porter, J. A., Serluca, F. C. & Cong, F. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature* **485**, 195-200 (2012).
- 63 Sigal, M., Logan, C. Y., Kapalczynska, M., Mollenkopf, H. J., Berger, H., Wiedenmann, B., Nusse, R., Amieva, M. R. & Meyer, T. F. Stromal R-spondin orchestrates gastric epithelial stem cells and gland homeostasis. *Nature* **548**, 451-455 (2017).
- 64 Jang, J. Y., Koh, Y. J., Lee, S. H., Lee, J., Kim, K. H., Kim, D., Koh, G. Y. & Yoo, O. J. Conditional ablation of LYVE-1+ cells unveils defensive roles of lymphatic vessels in intestine and lymph nodes. *Blood* **122**, 2151-2161 (2013).
- 65 D'Alessio, S., Correale, C., Tacconi, C., Gandelli, A., Pietrogrande, G., Vetrano, S., Genua, M., Arena, V., Spinelli, A., Peyrin-Biroulet, L., Fiocchi, C. & Danese, S. VEGF-C-dependent stimulation of lymphatic function ameliorates experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* **124**, 3863-3878 (2014).
- 66 Li, Y., Zhu, W., Zuo, L. & Shen, B. The Role of the Mesentery in Crohn's Disease: The Contributions of Nerves, Vessels, Lymphatics, and Fat to the Pathogenesis and Disease Course. *Inflamm Bowel Dis.* **22**, 1483-1495 (2016).
- 67 Jurisic, G., Sundberg, J. P. & Detmar, M. Blockade of VEGF receptor-3 aggravates inflammatory bowel disease and lymphatic vessel enlargement. *Inflamm Bowel Dis.* **19**, 1983-1989 (2013).
- 68 Ganta, V. C., Cromer, W., Mills, G. L., Traylor, J., Jennings, M., Daley, S., Clark, B., Mathis, J. M., Bernas, M., Boktor, M., Jordan, P., Witte, M. & Alexander, J. S. Angiopoietin-2 in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis.* **16**, 1029-1039 (2010).
- 69 Rahier, J. F., Dubuquoy, L., Colombel, J. F., Jouret-Mourin, A., Delos, M., Ferrante, M., Sokol, H., Hertogh, G. D., Salleron, J., Geboes, K. & Desreumaux, P. Decreased lymphatic vessel density is associated with postoperative endoscopic recurrence in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* **19**, 2084-2090 (2013).
- 70 Mertlitz, S., Shi, Y., Kalupa, M., Grotzinger, C., Mengwasser, J., Riesner, K., Cordes, S., Elezkurtaj, S. & Penack, O. Lymphangiogenesis is a feature of acute GVHD, and VEGFR-3 inhibition protects against experimental GVHD. *Blood* **129**, 1865-1875

- (2017).
- 71 Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
- 72 Kawai, T. & Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nature immunology* **7**, 131-137 (2006).
- 73 Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V. & Alitalo, K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development (Cambridge, England)* **122**, 3829-3837 (1996).
- 74 Lindemans, C. A., Calafiore, M., Mertelsmann, A. M., O'Connor, M. H., Dudakov, J. A., Jenq, R. R., Velardi, E., Young, L. F., Smith, O. M., Lawrence, G., Ivanov, J. A., Fu, Y. Y., Takashima, S., Hua, G., Martin, M. L., O'Rourke, K. P., Lo, Y. H., Mokry, M., Romera-Hernandez, M., Cupedo, T., Dow, L. E., Nieuwenhuis, E. E., Shroyer, N. F., Liu, C., Kolesnick, R., van den Brink, M. R. & Hanash, A. M. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* **528**, 560-564 (2015).