HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肝臓GVHDは、TGFβを介してオルガノイド形成肝臓幹細胞を標的とする [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	長谷川, 祐太
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14616号
Issue Date	2021-06-30
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/82964
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号：2636
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Yuta_Hasegawa_abstract.pdf (論文内容の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　長 谷 川 祐 太

学 位 論 文 題 名

肝臓 GVHD は、TGFβを介してオルガノイド形成肝臓幹細胞を標的とする

(GVHD targets organoid-forming liver stem cells via a TGF-β-dependent manner)

【背景と目的】移植片対宿主病(graft-versus-host disease: GVHD)は同種造血細胞移植(hematopoietic cell transplantation: HCT)における重要な合併症の一つである。肝臓は、皮膚・腸管と共に急性 GVHD の主要な標的臓器である。Lgr5 (leucine-rich repeat containing G-protein-coupled receptor 5: Lgr5) 陽性腸幹細胞は腸管粘膜上皮細胞を継続的に更新し、毛包内の Lgr5 陽性皮膚幹細胞は毛周期の進展や創傷治癒のための新しい上皮細胞を供給しており、我々は、GVHD が主に腸や皮膚の組織幹細胞を標的とすることを報告してきた。肝臓においては、肝臓 GVHD における、肝臓幹細胞の動態や病態生理学的役割は不明である。そこで、本研究では、急性 GVHD マウスモデルを用いて、肝臓幹細胞の動態について検討を行い、また新規治療法の開発を行った。

【材料と方法】マウスの同種 HCT では、前処置として 11Gy の全身放射線照射を行い、主要組織適合遺伝子複合体半合致の同種移植(Allogeneic 群: Allo 群)もしくは、同系移植(Syngeneic 群: Syn 群)を行った。移植片として、ドナーの脾臓細胞 5 x 10^6 個と骨髄細胞 5 x 10^6 個を静脈内投与した。SB-431542 投与実験では、5mg/kg を同種 HCT 後 day+14 から day+28 まで投与した。リコンビナントヒト R-Spondin1(rhR-Spo1)投与実験では、10mg/kg を同種 HCT 後 day+14 から day+28 まで投与した。肝臓オルガノイド作製実験ではマウス肝臓右葉からオルガノイドを作製し、培養開始後 7 日目に定量した。また、サイトカインや細胞の添加実験では、Naïve マウスから作製した肝臓オルガノイドを、サイトカインもしくは細胞の存在下で培養し、4 日目にオルガノイドを定量した。

【結果】移植後 Allo 群で day+14 より門脈域へのマクロファージや T 細胞浸潤を認め、ヒトの肝臓 GVHD と類似していた。また胆管傷害を反映して MMP7 の発現が上昇していることが判明した。次に BDF1-Lgr5-eGFP マウスをレシピエントとして、移植後肝臓の Lgr5 陽性肝臓幹細胞の動態を検討したところ、移植後 day+21 に Allo 群でのみ出現し、その後 2 週間以内に消失した。Lgr5 陽性細胞周囲には、ドナーT 細胞及びマクロファージが近接しており、肝臓 GVHD における Lgr5 陽性細胞の減少にこれらの細胞が関与している可能性が示唆された。続いて、移植後の肝臓オルガノイドの形成能を検討したところ、Lgr5 陽性細胞の動態と一致して、移植後 day+21 に一過性に形成能が増加し、day+28 以降は急激に形成能が低下することが判明した。これらの結果から、Lgr5 陽性肝臓幹細胞をはじめとする、肝臓 GVHD では肝臓オルガノイド形成性幹細胞が傷害されていることが示唆された。IFNγや TNF

αの添加では、オルガノイド形成能は保たれていた一方、TGFβ1 はオルガノイドの形成を著明に抑制した。また、HCT 後 day+28 における肝臓の TGFβ1 の発現を、定量リアルタイム PCR を用いて検討したところ、Allo 群で Naïve や Syn 群に比して有意に上昇しており、TGFβ1 の蛍光免疫染色では門脈域に浸潤している F4/80 陽性マクロファージの多くが TGFβ1 産生性であることが示された。HCT 後 day+28 における肝臓浸潤単核球(liver-infiltrating mononuclear cells: LMCs)を単離し、肝臓オルガノイドと共培養を行ったところ、Allo 群由来の LMCs でオルガノイドの形成が有意に抑制されたが、Syn 群由来の LMCs では抑制は見られなかった。また、SMAD2/3 の阻害を介して TGFβレセプターのシグナルを阻害する SB-431542 を添加すると、Allo 群の LMCs によるオルガノイド形成抑制は解除された。さらに、同種 HCT 後 day+14 から連日 SB-431542 の投与を行ったところ、day+28 における肝臓オルガノイド形成能が有意に改善し、MMP7 の発現低下、血漿ビリルビン濃度の低下が見られた。また、Wnt シグナル増強による Lgr5 陽性幹細胞の増殖に寄与する rhR-spo1 を同種 HCT 後 day+14 から週 3 回腹腔内に投与したところ、day+28 では肝臓においても Lgr5 陽性細胞が保護され、肝臓オルガノイド形成能が有意に改善した。

【考察】GVHD では、組織幹細胞が標的となることで、組織再生が阻害されることが、腸や皮膚の GVHD では明らかになってきているが、肝臓幹細胞の移植後の動態や役割はこれまで不明であった。本研究では、Lgr5 陽性肝臓幹細胞が同種 HCT 後に一過性に出現し、その後 2 週間以内に消退することから、GVHD によって傷害されていると考えられる。これまで、腸管オルガノイドのアポトーシス誘導において、IFNγシグナル伝達が重要な役割を果たしていることが示されていたが、肝臓オルガノイドは IFNγに対して耐性があり、TGFβ1 に対して非常に感受性が高いことが明らかとなった。SMAD2/3 阻害薬である SB-431542 による TGFβシグナル阻害は、オルガノイド形成肝臓幹細胞を保護し、GVHD による黄疸を軽減させたことから、肝臓 GVHD の新たな治療戦略になりうると考えられる。また、Lgr5 リガンドかつ Wnt 作動薬である R-Spo1 は、腸や肝臓の組織幹細胞の増殖と分化を促進し、腸管 GVHD から腸幹細胞を保護し全身性に GVHD を改善することが報告されてきた。本研究では、同種移植後に R-spo1 を投与することで、移植後肝臓 GVHD による Lgr5 陽性細胞の増殖を促進し、HCT 後 day+28 日目に Lgr5 陽性肝臓幹細胞の減少を抑制し、肝臓オルガノイドの形成能が保たれることを示した。近年、肝障害時に MMP7 が肝内胆管上皮細胞(biliary epithelial cell: BEC)上で誘導され、血中に放出されることが報告された。肝臓 GVHD においても移植後 day+28 に BEC 細胞上で MMP7 の発現を認め、MMP7 の血中および局所レベルが GVHD における BEC 障害の特異的なバイオマーカーである可能性を示唆される。

【結論】肝臓 GVHD では、マクロファージなどの炎症細胞が TGFβ1 を介して、オルガノイド形成性肝臓幹細胞を傷害し、胆管障害に寄与していることが示唆された。TGFβ阻害薬及び、R-Spo1 が肝臓 GVHD の新規治療法となりうると考えられる。また、肝臓 GVHD における胆管障害を反映して MMP7 が上昇しており、疾患バイオマーカーになる可能性がある。