

Title	大腸杯細胞は抗菌分子Lypd8依存性に同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病を抑制する
Author(s)	
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13422号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13422
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91699
Туре	theses (doctoral)
Note	配架番号:2436
File Information	Takahide_Ara.pdf



学位論文

大腸杯細胞は抗菌分子 Lypd8 依存性に 同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病を抑制する

(Intestinal goblet cells play a protective role against graft-versus-host disease via Lypd8 dependent manner after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation)

2019年3月

北海道大学

荒隆英

Takahide Ara

学位論文

大腸杯細胞は抗菌分子 Lypd8 依存性に 同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病を抑制する

(Intestinal goblet cells play a protective role against graft-versus-host disease via Lypd8 dependent manner after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation)

2019年3月

北海道大学

荒隆英

Takahide Ara

発表論	鈫	目	録	お	よ	び	学	슾	発	表	目	録	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	1	頁
要旨·	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	2	頁
略語表	₹•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	5	頁
緒言·	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	6	頁
実験大	法	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	9	頁
実験統	串果	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	1	8	頁
考察·	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	4	3	頁
総括お	らよ	U)	結	論	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	4	6	頁
謝辞·	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	4	8	頁
利益相	反	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	4	9	頁
引用文	て献	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	5	0	頁

目 次

発表論文目録および学会発表目録

本研究の成果の一部は以下の論文として投稿中である。

Takahide Ara, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Clara Noizat, Kana Matsuda, Shoko Ono, Yoshihiro Matsuno, Ko Ebata, Reiki Ogasawara, Shuichiro Takahashi, Hiroyuki Ohigashi, Emi Yokoyama, Junichi Sugita, Masahiro Onozawa, Ryu Okumura, Kiyoshi Takeda, and Takanori Teshima

Intestinal goblet cells play a protective role against GVHD via Lypd8 dependent manner after allogeneic stem cell transplantation.

雑誌名 Science Translational Medicine

本研究の一部は以下の学会に発表した。

 Takahide Ara, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Clara Noizat, Kana Matsuda, Shoko Ono, Yoshihiro Matsuno and Takanori Teshima. Degree of intestinal goblet-cell loss is associated with severity of GVHD and transplant outcome and goblet cell growth factor IL-25 mitigates GVHD.

2018 BMT Tandem Meeting. 2018 年 2 月 21 日. ソルトレイクシティ.

- 2. 荒 隆英、橋本 大吾、早瀬 英子、Clara Noizat、松田 可奈、小野 尚子、 松野 吉宏、白鳥 聡一、後藤 秀樹、中川 雅夫、遠藤 知之、豊嶋 崇徳 腸管杯細胞は移植片対宿主病のバイオマーカーであり、その増殖因子 IL-25 は移 植片対宿主病を軽減する 第80回日本血液学会学術集会(プレナリーセッション),2018 年 10 月 13 日. 大 阪.
- 3. Takahide Ara, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Clara Noizat, Ryu Okumura, Kiyoshi Takeda and Takanori Teshima. Intestinal goblet cells play a protective role against GVHD via a Lypd8dependent manner after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 2018 ASH Annual Meeting, 2018 年 12 月 1 日. サンディエゴ.

【背景と目的】同種造血幹細胞移植は血液悪性疾患や骨髄不全、先天性代謝疾患を根 治しうる治療であるが、その代表的合併症である移植片対宿主病(graft-versus host disease; GVHD)は時に致死的になりうる。近年、腸内細菌の乱れ(dysbiosis)と、GVHD および移植後の予後との関連性が指摘されている。大腸杯細胞はムチンを分泌して粘 液層を形成し、大腸上皮を層状に覆っているが、抗菌ペプチドなどの抗菌活性を有す る分子を含むことで、細菌の大腸上皮下への侵入を物理的のみならず化学的にも抑制 している。大腸杯細胞が同種移植後の消化管 GVHD で減少していることは以前より知 られていたが、その GVHD の病態生理における意義については検討されてこなかった。 そこで我々は、マウスモデルおよびヒトの大腸生検検体を用いて、同種移植後の大腸 杯細胞の変化とその意義を明らかにし、さらに大腸特異的な抗菌分子である Lypd8 に 注目して、ムチン層と抗菌分子との相互作用についても検討した。

【対象と方法】マウスの同種造血幹細胞移植モデルでは、致死量の放射線を照射した レシピエントマウスに、主要組織適合複合体不一致の同種(Allo)または同系(Syn)ド ナーから採取した 5x10⁶の骨髄細胞および 5 または 10x10⁶の脾臓細胞を移植した。リ コンビナントマウス Interleukin-25 (rmIL-25) 投与実験では rmIL-25 0.3 µg を腹腔内 に7日間投与した。ヒトでの検討は、2009 年から 2015 年に北海道大学病院血液内科 にて初回同種造血幹細胞移植を施行した 205 名のうち、移植前後に何らかの理由で大 腸生検を施行した症例から得られた 156 検体に関して大腸杯細胞数や移植予後を後方 視的に解析した。

【結果】大腸杯細胞は Syn 群に比較して Allo 群で有意に減少し、移植後後期において も遷延していた。Mucin-2 に対する蛍光免疫染色と、細菌に対する蛍光 in situ hybridization を同時に施行したところ、Allo 群では Naïve 群や Syn 群で認められる 正常のムチン2 層構造が破綻して、inner mucin layer が消失し、細菌の粘膜固有層 への侵入を認めた。Bacteria universal primer である 16S rRNA を標的とした定量リ アルタイム PCR を、大腸上皮下組織から抽出した DNA を使用して施行したところ、Allo 群で有意に細菌量が増加していた。大腸杯細胞が移植後に減少していることから、そ の増殖因子である rmIL-25 を移植前に 7 日間投与したレシピエントマウスに同種移植 を行い、GVHD が改善されるか検討した。rmIL-25 の投与により移植後の大腸杯細胞傷 害は軽減され、大腸粘膜固有層への細菌の侵入は Syn 群程度にまで抑制された。その 結果、IL-6 や IFN- y といった炎症性サイトカインの産生も抑制され、移植後 3 週間の 時点での生存率は 47%から 87%まで改善した。次に、大腸特異的な抗菌分子である Lypd8 の GVHD やムチン層との関係性について検討した。まず、Naïve マウスの大腸を用いて

蛍光免疫染色を施行したところ Lypd8 は inner mucin layer と腸上皮との境界領域に 存在していたが、移植を行なった場合は、Syn 群で Naïve 群と同様の部位に Lypd8 が 保たれる一方で、Allo 群では著明に減少していた。しかし、定量リアルタイム PCR を 用いて、粘膜上皮細胞での Lypd8 の mRNA レベルでの発現量を評価したところ Syn 群 とAllo群で差がなく同等であった。このことから、細胞レベルでのLypd8発現量が保 たれていても、腸上皮周囲に Lypd8 を保つためにはムチン層の存在が必要であること が示唆された。続いて、野生型(WT)と Lypd8 欠損型(K0) のマウスをレシピエントとし て同種移植を行い、免疫染色および 16S rRNA によって腸上皮下への細菌侵入の程度 を評価したところ、WT 群に比べて KO 群で有意に粘膜固有層への細菌侵入が増加し、 同種移植後においても残存する Lypd8 が細菌の上皮下への侵入に対して抑制的に働い ていることが示唆された。さらに細菌侵入の増悪によって、KO群で有意に IL-6や IFNγといった炎症サイトカインが増悪し、移植後生存率も悪化した。WT マウスと KO マ ウスを4週間Co-housingを行ってから移植を行なっても、同様にKO群の予後が悪化 したため、WT マウスとKO マウスの移植前の腸内細菌叢の違いが GVHD の重症度に影響 した可能性は否定的であった。移植前に IL-25 を投与しても、Lypd8 K0 レシピエント では生存率の改善が得られなかったことから、Lypd8 非存在下では IL-25 投与によっ てムチン層を維持しても bacterial translocation を防げない可能性が示唆された。 最後に、ヒト同種造血幹細胞移植前後に施行された大腸生検例156検体を解析した。 移植後の大腸杯細胞数は、病理学的に診断された消化管 GVHD 症例のみ CMV 腸炎の合 併有無にかかわらず有意に減少していた。一方、他の非特異的腸炎症例や、病理学的 所見に乏しく臨床症状のみで診断された消化管 GVHD 症例、CMV 腸炎単独例では、移植 前無症状で行われたスクリーニング症例と比較して有意な杯細胞の減少は認められな かった。大腸杯細胞の減少の程度は消化管 GVHD の重症度に有意に相関し、治療により 消化管 GVHD が寛解になった時点で杯細胞数も回復していた。また全上皮細胞に対す る大腸杯細胞数を陰窩の断面で評価し、15%以下となっている症例を、重度の杯細胞傷 害と定義をしたところ、重度に傷害を受けていた群が軽度の傷害例や大腸生検が必要 なかった症例群と比較して有意に移植後全生存率が低く、非再発死亡率が高いことが 判明し、腸杯細胞傷害の程度が、移植成績と相関することが判明した。

【考察】同種移植後に杯細胞が減少することで、大腸のムチン層が破綻して bacterial translocation を引き起こしていると考えられた。杯細胞増殖因子である IL-25 の移 植前投与により杯細胞を保護すると、同種移植後もムチン層が保たれ、bacterial translocation を抑制して GVHD を軽減することができた。抗菌分子 Lypd8 は同種移植 後においても bacterial translocation を抑制する上で重要な役割を果たしているが、 腸上皮周辺に止まってその効果を発揮するためにはムチン層が保たれている必要があ る可能性が示唆された。一方で KO マウスへの IL-25 投与移植実験からムチン層によ

る bacterial translocation の予防は Lypd8 依存性であると考えられた。同種造血幹 細胞移植後の、大腸生検検体における杯細胞数は診断・モニタリング・予後予測に有 用で簡便なバイオマーカーであると考えられた。

【結論】大腸杯細胞は Lypd8 依存性に、GVHD に対して抑制的に働く。大腸杯細胞は消化管 GVHD の標的細胞であり、GVHD によって減少するため、IL-25 のような杯細胞増殖因子を用いた杯細胞保護は、新しい GVHD の予防戦略の一つとなりうる。生検標本上の大腸杯細胞は、簡便な診断、モニタリング、かつ予後予測に有用なバイオマーカーとなりうる。今後の更なる症例蓄積を行い、内視鏡診断と組み合わせて、患者に負担の少ない消化管 GVHD 診療が可能となる可能性がある。

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。

			Leucine-rich repeat
ATP	adenosine triphosphate	LGR	containing G-protein coupled
			receptor 5
Allo	allogeneic	LP	lamina propria
BSA	bovine serum albumin	LPS	lipopolysaccharide
CMV	cytomegalovirus	Lypd8	Ly6/PLAUR domain contatinig 8
DAMPs	damage-associated molecular	NRM	Non-relapse mortality
	4',6-Diamidino-2-		pathogen-associated molecular
DAPI	phenylindole	PAMPs	patterns
DTT	dithiothreitol	PAS	periodic acid schiff
EC	epithelia cell	PBS	phosphate buffered saline
EDTA	ethylenediaminetetraacetic	PCR	polymerase chain reaction
DOO		DDA	
FCS	fetal calf serum	PFA	paraformaldehyde
FISH	fluorescent in situ hybridization	QOL	quality of life
0.T	1	DDO	regenerating islet-derived
GI	gastrointestinal	REG	Quality of life
CVIID	moft_vongua_haat diagoog	rmIL-	recombinant Mouse
GVIID	graft-versus-nost disease	25	Interleukin-25
GVL	graft versus leukemia	SCT	stem cell transplantation
HE	Hematoxylin-Eosin	SL	serosal layer
ILC	innate lymphoid cell	Syn	syngeneic
KO	knock out	WT	wild type

緒言

ヒトは数兆もの細菌と共生している生命体であり、その大部分は腸内細菌叢とし て存在している(Grogan, 2015)。消化管は飲食物や微生物など常に外界から刺激を受 けている粘膜免疫の主要な部位であり、これら常在細菌叢が宿主の代謝や免疫におい て重要な役割を担っている(Brown et al., 2013; Qin et al., 2010)。

腸上皮は一層の腸上皮細胞で構成されている。腸上皮は管腔側に絨毛、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細胞などがある。これ らの細胞は全て、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(Barker et al., 2007; de Lau et al., 2014; Sato et al., 2009)。Lgr5 陽性の腸幹細胞は小腸では陰窩底部に 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、増殖と分化のバランスによ って腸管ホメオタシスを維持している(Smith et al., 2012)。

腸上皮を構成する細胞の一つである杯細胞はムチンを管腔側に分泌して腸上皮を 覆うことで細菌が上皮内へ侵入することを防いでいる。小腸では一層のムチン層が腸 上皮を覆っているのに対して、大腸では二層の構造となっており、大腸上皮に近い内 層(inner mucin layer)は上皮と強く結びつき、種々の抗菌活性を有する分子を高濃 度で含有して、腸上皮への細菌の接触を物理的かつ化学的に防いでいる。一方、外層 (outer mucin layer)は常在菌叢の居住空間かつ栄養源として存在し、常在細菌叢の 維持を通じて病原性細菌の増加を抑制している(Cornick et al., 2015; Pelaseyed et al., 2014)。

抗菌活性分子は様々な細胞から産生されるが、小腸 Paneth 細胞が分泌する抗菌ペ プチド α -defensin や regenerating islet-derived (REG) 3g は病原菌に選択的に抗菌 活性を示すことが知られており (Ayabe et al., 2000; Cash et al., 2006; Ganz et al., 1990; Ivanov et al., 2009; Salzman et al., 2010)、腸内細菌叢の維持にお いて重要な調節因子となっている (Bevins and Salzman, 2011)。これに対して大腸に おける抗菌分子についてはあまり報告されてこなかったが、近年になって大腸の上皮 細胞が分泌する Ly6/PLAUR domain contatinig8 (Lypd8) が大腸菌などの鞭毛を有する 菌の鞭毛に特異的に結合して細菌の移動を抑制することで、上皮内への侵入を抑制し ているということが報告された (Okumura et al., 2016)。このような大腸のバリア機 構は bacterial translocation を防ぐ上では重要であり、杯細胞が重要な役割を有し ている。

6

同種造血幹細胞移植は難治性の造血器悪性疾患や骨髄不全症、先天性代謝疾患な どを根治しうる治療法である(Gale and Champlin, 1984)。現在、同種造血幹細胞移 植は広く用いられているが、その代表的な合併症である移植片宿主病(graft-versushost disease : GVHD)や感染症は患者の生存を脅かし、生活の質(Quality of life : QOL)を低下させる重要な合併症である。近年、移植法の変化に伴い GVHD の臨床像は 多様化してきており、GVHD の適切な管理には、その病態の理解が必須のものとなっ てきている。

マウスモデルを用いた基礎研究により、主に消化管急性 GVHD の病態の解明は飛躍 的に進歩した。消化管急性 GVHD の分子病態は、移植前処置に伴う組織障害と自然免 疫の活性化、ドナーT 細胞の活性化とクローン性増殖、エフェクター細胞による組織 障害の3つのステップによって構成されている。移植前処置は主に全身放射線照射お よび大量抗癌剤によって施され、残存する腫瘍細胞への殺細胞効果および移植する細 胞の生着を担保することを目的とする。これによって傷害されたレシピエントの体細 胞からは adenosine triphosphate (ATP) や尿酸などのダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs)が放出され、同時に腸管粘膜のバ リア機能の破綻によって、腸内細菌の bacterial translocation に由来する lipopolysaccharide (LPS)などの病原体関連分子パターン(pathogen-associated) molecular patterns: PAMPs)が全身循環へ流入する(Gerbitz et al., 2004)。DAMPs やPAMPs はToll-like receptor などのパターン認識受容体などを介して自然免疫系 を賦活化し、TNF αやIL-1βなどの炎症性サイトカインの産生を促すとともに、抗原 提示細胞の活性化を介してドナーT 細胞を活性化させる(Shlomchik et al., 1999; Teshima et al., 2002)。レシピエントに輸注されたドナーT細胞は脾臓やリンパ節 などの二次リンパ組織で抗原提示細胞上のアロ抗原を認識して活性化し、クローン性 に増殖しながら、IL-2やIFN - yを産生するTh1細胞やIL-17などを産生するTh17 細胞および細胞傷害性 T 細胞などに分化する。分化したドナーT 細胞はケモカインレ セプターや接着因子によって標的臓器へと遊走し、炎症性サイトカインや細胞傷害性 分子を介して組織傷害をもたらす。この際、全身循環に入った LPS などによって活性 化したマクロファージも炎症性サイトカインを産生し、組織傷害に寄与する。

この病態を鑑みるに、GVHD 増悪の起因となる、腸管の傷害を抑制し、バリア機構 を維持することにより DAMPs、PAMPs の流入を防いで炎症を抑えることが、同種造血 幹細胞移植の成績を改善するために重要と考えられる。

消化管 GVHD において大腸の杯細胞が減少するということは病理学の分野では以前 から報告されていたが(Eigenbrodt et al., 1990; Levy and Wefald, 1986)、GVHD の病理診断は、リンパ球浸潤を伴う上皮細胞のアポトーシス像として捉えられ(Sale et al., 1979)、杯細胞傷害の動態や意義については検討がなされていなかった。そこで我々は、大腸杯細胞の傷害が消化管 GVHD の発症・進展においてどのような意義があるかについて検討を行なった。

まず、マウスの GVHD モデルを用いて、消化管 GVHD における大腸の杯細胞の傷害 が、大腸のムチン層によるバリア機構の破綻を導き、bacterial translocation を引 き起こすことにより GVHD が増悪していくという機序を発見した。さらに、この病態 は杯細胞の増殖因子である IL-25 を移植前に投与することで軽減されることも示し た。一方、大腸特異的な抗菌活性を有する分子である Lypd8 の欠損マウスをレシピエ ントとして移植を行い、移植後においても Lypd8 は bacterial translocation に対し て予防的に働いていることを示し、Lypd8 が欠損する環境では杯細胞の IL-25 による 杯細胞保護は効果を発揮できないことを示した。移植後の Lypd8 の免疫染色では、移 植後のムチン層の破綻に伴って Lypd8 も減少しており、ムチン層破壊によって Lypd8 の抗菌機能も低下していることが示唆された。このように、抗菌分子 Lypd8 と杯細胞 によるムチン層形成の両者は、抗菌作用を発揮するためには双方が存在していること が重要で有ることが判明した。これらのことから、消化管 GVHD の標的臓器である杯 細胞を保護することで GVHD を軽減させるという新しい治療戦略を提示した。

つぎに、マウスモデルで得られた知見をふまえて、ヒトにおける同種造血幹細胞 移植後の消化管病理を検討したところ、病理学的に診断された消化管 GVHD 症例にお いてのみ、特異的に大腸杯細胞が減少することが判明した。さらに、その傷害の程度 が消化管 GVHD の重症度に相関すること、消化管 GVHD の寛解により大腸杯細胞数も回 復することが判明した。重度の杯細胞障害は移植後の生命予後および非再発死亡 (Non-relapse mortality: NRM)に影響を及ぼすことがわかり、消化管 GVHD の biomarker としての有用性が伺われた。

大腸杯細胞は消化管 GVHD における非常に簡便な診断・モニタリング・予後予測に 有用なバイオマーカーであり、その保護が新たな GVHD 予防法の一つになりうるた め、さらなる研究および臨床応用が期待される。

8

実験方法

1. 実験材料

1) マウス

7 週齢、雌の C57BL/6 (B6, H-2^b), B6D2F1 (BDF1, H-2^{b/d}) を日本クレア株式 会社 (Tokyo, Japan) より、BALB/c (H-2^d)を日本チャールス・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) より購入し、本学の動物実験施設にて1週間の安静期間を経 た後、実験に使用した。

これに加えて、下記の遺伝子組み換えマウスを使用した。

Lypd8 欠損型マウス (B6-*Lypd8*^{/-}mice)

B6 を背景として大腸の enterocyte から特異的に産生される抗菌分子 Lypd8 を ノックアウトしたマウスである。消化管 GVHD における Lypd8 の役割について評 価するために使用した。本マウスは大阪大学大学院医学系研究科 免疫制御学の 竹田潔教授より譲渡していただいた。

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 実験に使用した。いずれの実験においても、「北海道大学動物実験に関する規 程」および「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定」に従って、動物実 験(承認番号:17-0026)と遺伝子組換え実験(承認番号:2012-030)の承認を 得て行った。

Recombinant Mouse IL-25(rmIL-25): BioLegend 社(San Diego, CA)より購入 した。1% bovine serum albumin (BSA)を含む1x phosphate buffered saline (PBS) (-) を用いて1 µg/mL に希釈し、既報を参考にし、7 日間0.3 µg(300 µL) を腹腔内投与した。

3) 臨床検体

2009 年から 2015 年の間に北海道大学病院血液内科にて同種造血幹細胞移植を 施行された 205 名を後方視的に解析したところ、このうち 88 名が移植前後に何 らかの理由で下部消化管内視鏡を施行して大腸生検が行われていた。これらのへ

²⁾ 薬剤

マトキシリン・エオジン(IE)染色を用いて、杯細胞数と臨床経過とを比較検討した。

本研究は北海道大学病院研究倫理審査委員会の承認を得ており(016-0380)、 ヘルシンキ宣言及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成26 年文部科学省・厚生労働省告示第3号)を遵守して実施した。

- 2. 方法
 - 1) マウス同種造血幹細胞移植

移植細胞を輸注するレシピエントマウスには 8~12 週齢の雌 B6D2F1, B6, *Lypd8* 欠損型マウスを使用した。移植前処置に関しては、放射線を前処置に用いた場合、 移植日当日に放射線照射装置 MBR-1520R-4 (HITACHI, Tokyo, Japan)を用いて、 電圧 125 kV、電流 15 mA、照射距離 500 mm、遮蔽板 アルミニウム 0.5 mm + 銅 0.2 mm の条件で、総線量 11.5 ~ 12.5 Gy を 4 時間間隔の 2 分割照射で施行し た。抗癌剤を前処置に用いた場合は day -7 ~ day -4 まで 25 mg/kg のブスルフ アン(大塚、東京、日本)、day -3, -2 に 100 mg/kg のシクロフォスファミド(塩 野義、大阪、日本)をそれぞれ 1×PBS (-)200 µL になるように調整して腹腔内投 与した。

ドナーとして雌 B6、B6D2F1、BALB/c マウスをイソフルラン吸入で麻酔して安 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、RPMI-1640 (Sigma Aldrich) + 4% fetal calf serum (FCS)を用いて 70 µm セルストレイナーを通した上で、50 ml チューブに 移して採取した。大腿骨・脛骨・骨盤骨は 23 ゲージ針と 1 mL 注射器を用いて、 RPMI1640+ 4% FCS を骨髄腔内に通して骨髄を押し出し、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 µm セルストレイナーを通して 50 mL チューブに移して採取した。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、実験に応じてレシ ピエント1 匹あたり脾臓細胞を5 または 10 x10⁶細胞と骨髄細胞5 x 10⁶細胞を 1×PBS (-) 250 µL に希釈して尾静脈より静脈内投与した。

移植後のマウスは specific pathogen-free 環境下で、通常の飼料とオートク レーブにて滅菌し、塩酸を加えて pH 2.5 に調整した塩酸水で飼育した。移植後 のマウスの GVHD の重症度は、生存率と GVHD score で評価した。GVHD score は 体重、姿勢 (posture)、活動性 (activity)、毛並み (fur texture)、脱毛 (skin integrity)の5項目を各項目 0~2 点で点数化し、合計したものとした (Cooke et al., 1996)。

2) 大腸の組織標本作成および杯細胞の評価

大腸杯細胞数評価用の標本作成:固定液として 4% paraformaldehyde (PFA)を 使用した。まず 4%PFA は以下の手順にて作成した。1 リットルの三角フラスコに 250 ml の蒸留水を入れて温め、スターラーで勢いよく混ぜつつ、20 g の PFA (104005; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を入れた。ここに蒸留水 に溶いた NaOH 溶液(蒸留水 10 mL + NaOH 500 mg)を少しずつ加え自濁した溶液 が透明になった時点で止め、フラスコを氷中で急冷した。Na2HPO4/12H20 14.35 g と NaH2PO4/2H20 1.49 g を 250 ml の蒸留水に溶かして 0.2 M リン酸ナトリウ ム緩衝液 (pH 7.4) を作製し、氷で冷やした。8% PFA と 0.2 M リン酸ナトリウ ム緩衝液を等量ずつ混ぜ、濾紙で濾して 4%PFA を作成した。

マウスをイソフルラン吸入にて安楽死させ、腸管検体は胃から大腸肛門側ま で一塊にして取り出した後、結合組織や脂肪組織を外し上部・中部・下部に三等 分した。この場合、下三分の一が回腸から大腸肛門部までにあたる。内腔を 4% PFA で洗い、縦に切開した後、口側が内側かつ内腔が外側となるように、爪楊枝 に腸管を巻きつけて 4% PFA で一晩固定して Swiss role 標本を作成した。翌日に パラフィン包埋し、切片を作製、アルシアンブルー + periodic acid schiff (PAS) 染色、アルシアンブルー染色単独を行なった。パラフィン包埋、切片作 製、染色は札幌総合病理研究所に外注依頼した。

標本は光学顕微鏡 (BX50; Olympus, 東京, 日本) に装着したデジタルカメラ (DP20; Olympus)、または Keyence BZ-9000 蛍光顕微鏡 (Keyence, 大阪, 日本) を用いて撮影した。

大腸杯細胞数の評価には、既報を参考にして(Alexander et al., 2014)、ア ルシアンブルー染色を行なった大腸標本全体を Keyence BZ-9000 蛍光顕微鏡で撮 影し、Adobe Photoshop CC 2018 を使用して大腸の粘膜層のみを切り取り、その 画像データを Aperio ImageScope software ver. 12 (Aperio Technologies, Vista, CA)を用いてアルシアンブルー陽性面積を算出、粘膜層全体との面積比を 算出して評価した(Figure 1A, B)。

11



rmIL-25 投与による大腸杯細胞の成熟度の変化については既報を参考に (Nowarski et al., 2015)、成熟杯細胞を直径が 10 µm 以上のものと定義し、ア ルシアンブルーおよび PAS の二重染色の標本にてカウントを行い、一陰窩あたり の比率として算出し、比較した。

3) 糞便ムチン測定

糞便を個々のマウスから採取して、凍結乾燥させた後、bead beater-type homogenizer (TAITEC)を用いて粉末状にした。続いてそれぞれ 50mg を測定し て、サンプルとし、Fecal Mucin Assay Kit(コスモバイオ、東京、日本)を用い て糞便中のムチンを抽出、精製した。さらに同キットのプロトコールに従って蛍 光強度を測定することで糞便中のムチン含量を測定した。定量には同梱されてい る標準液を利用して標準曲線を作成して用いた。蛍光強度測定は Spectra Max Paradigm (Molecular Device)用いて行なった。

4) 免疫染色

マウスをイソフルラン吸入にて安楽死させ、腹壁を切り開いたところで、ま ず大腸肛門側を細い糸で結紮して、胃から大腸肛門側まで結紮部位を含む形で一 塊にして取り出した。この際、腸管に触れて腸管内の糞便の移動が起きないよう に注意した。その後、腸管に付着している結合組織・脂肪組織を外して、回盲部 も結紮して大腸を両端が結紮された状態にして切離し、Carnoy 液(和光純薬工 業、大阪、日本)で2時間固定した。その後100%エタノールに置換し、翌日パラ フィン包埋をして、切片を作製、蛍光免疫染色に使用した。パラフィン包埋と切片作製は札幌総合病理研究所に外注依頼した。

蛍光免疫組織染色には、一次抗体として rabbit anti-mucin2 (clone H-300: Sant Cruz Biotechnology), purified mouse anti-mouse Lypd8 (BioLegend)を 使用した。二次抗体は Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Al1034; Invitrogen, Carlsbad, CA), Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG (ab150110; Abcam)を使用した。

札幌総合病理研究所に外注依頼し作製した未染パラフィン切片をキシレンと エタノールを用いて脱パラフィンした後、Dako REAL 抗原賦活化用クエン酸緩衝 液に切片を浸し、105℃、20分の設定でオートクレーブを用いた熱処理による抗 原賦活化を行った。賦活化後、1×PBS(-)で賦活化液を洗浄して、10%ヤギ血清 を含む1×PBS(-)を用いてブロッキング処理を行った。ブロッキング処理が終了 したら、各種一次抗体を1:400 に希釈して各標本に加え、4℃、一晩静置した。 一次抗体反応後に、蛍光標識された一次抗体の動物種に対する二次抗体を加え抗 体反応させた。その後、核染色としてはDAPIを1×PBS(-)で0.2 μ g/mLに希釈 して用いた。染色後の画像撮影はFluoview FV1000 confocal microscopy (01ympus, Tokyo, Japan)またはKeyence BZ-X700 蛍光顕微鏡を使用し、画像処 理は Adobe Photoshop CC 2018を用いて行った。

5) 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション

腸管粘膜層への細菌の侵入の有無の評価のために行った。Swiss role標本の パラフィン切片をキシレンとエタノールを用いて脱パラフィンした後、Cy5conjugated universal bacterial probe EUB338(5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') をハイブリダイゼーション溶液(750 mM NaC1、100 mM Tris-HC1、5 mM エチレ ンジアミン四酢酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、BSA 0.01 %、 Dextran sulfate 10 %) で5 µg/mLに希釈して標本に滴下し、16時間、40℃で静 置した。その後、Wash Buffer (50 mM NaCl, 4 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.02 mM EDTA)で45℃ 20分洗浄した。さらに水で洗浄液を洗い落とし、引き続いて10%ヤ ギ血清を含む1×PBS(-)を用いてブロッキング処理を行い、さらに蛍光免疫染色 を前項に同様に行った。染色後の画像撮影はKeyence BZ-X700蛍光顕微鏡を使用 し、画像処理はAdobe Photoshop CC 2018を用いて行った。

6) 腸管上皮層および粘膜固有層・漿膜層細胞との分離

マウスを安楽死させ、腹壁を切り開いて大腸を採取した。大腸のちょうど中 間部付近を 5mm 程度切り出して、便を押し出したうえ短冊状に切り開いた。既報 に従い(Bogunovic et al., 2009)、PBS + 2% FCS 15 mL が入った 50 mL tube に大腸を入れ、よく震盪した。茶こしで大腸以外を排液し、もう一度 PBS+2% FCS 15ml が入った 50ml tube に大腸をいれ、同様に洗浄した。この操作を 2 回施行した。つづいて PBS + 2% FCS + 1mM ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) +1.3mM EDTA 25mL 中 で 20 分間、37° C で震盪した。引き続いて溶液を排液し、大腸をさらに PBS+2% FCS+1.3mM EDTA 25mL に入れ、40 分間、37° C で震盪した。これにより大腸上 皮細胞が剥離し、この溶液を大腸上皮細胞分離液として扱い、残りの大腸を粘膜 固有層および漿膜細胞層として扱った。

7) 定量リアルタイム PCR

大腸の各細胞における Lypd8の発現を確認するために組織より RNA を抽出 し、cDNA を作成した。前項のごとく分離した粘膜固有層および漿膜層を RNA 抽 出用の ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan)の中で、Tissue Ruptor (QUIAGEN, Hilden, Germany)を用いて粉砕した。組織を粉砕したあとは ISOGEN II のプロトコールに準じて RNA の抽出を行った。また、すでに細胞分離が済んで いる大腸上皮細胞に関してはそのまま ISOGEN II のプロトコールに準じて RNA の 抽出を行った。抽出した RNA をジエチルポロカーボネート処理水で溶解し、 NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific)を用いて RNA 濃度を測定し、1000 ng の RNA をテンプレートとして鋳型 DNA を作成した。鋳型 DNA 作成のための逆 転写反応は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO LIFE SCIENCE, Osaka, Japan)を用いて行った。

また、粘膜固有層以下への細菌の侵入を評価するために、粘膜固有層および 漿膜層の DNA 抽出を行い bacterial universal primer である 16S rRNA の定量リ アルタイム PCR を行った。前項のごとく分離した粘膜固有層および漿膜層から QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN,東京、日本)のプロトコールに準じて DNA を抽出 した。この DNA をジエチルポロカーボネート処理水で溶解し、NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific)を用いて DNA 濃度を測定して、そこから 1000ng の DNA を用いて定量リアルタイム PCR を行った。定量リアルタイム PCR に際しては Sigma-Aldrich Japan Genosis にて、各種標的遺伝子に対する primer / probe セットの作成を依頼し、作成した鋳型 DNA と TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。リアルタイム PCR は StepOne Plus real time PCR system (Thermo Fisher Scientific)を用いて施行し、 *Lypd8*に関しては 18S ribosomal RNA (18S rRNA)を内在性コントロールとして、 mRNA 発現レベルを delta Ct 法にて定量的に評価した。16S rRNA に関してはそれ ぞれの実験のコントロール(対Naïveマウス、または対野生型マウス)とのCt値の比をとることで評価した。使用した primer/probeの塩基配列はTable 1に示す。

遺伝子		塩基配列
18S rRNA	Forward	5' - GCTCTTTCTCGATTCCGTGGG-3'
	Reverse	5' - ATGCCAGAGTCTCGTTCGTTATC-3'
	Probe	FAM-CTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACC-TAMRA
Lypd8	Forward	5' -TGCGGAGATGGTAAATGGCTC-3'
	Reverse	5' -CAGGGGACAGGAATTGACAAGTA-3'
	Probe	FAM-ATATCAGAACAGCCCTTCAGCTCCACTCT-TAMRA
16S rRNA	Forward	5' -GCTCTTTCTCGATTCCGTGGG-3'
	Reverse	5' -ATGCCAGAGTCTCGTTCGTTATC-3'
	Probe	FAM-CTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACC-TAMRA

Table 1. 実験で使用した primer/probe のまとめ

8) Cytometric beads assay (CBA)

BD CBA Flex sets (BD Pharmingen)を用いて、血漿中のIFN_γ, IL-6濃度を定量した。マウスから採血し、遠心分離にて血漿を分離し、測定するサイトカインのcapture beadsを加えて反応させ、その後PE標識抗体を加えて反応させた後、フローサイトメトリーで解析した。サイトカインの定量は既知のサイトカイン濃度から作成された標準曲線を用いて行った。

9) 臨床情報および病理検体の分類方法

検体のうち、移植前に、消化器症状を認めず、スクリーニング目的に下部消 化管内視鏡が施行されて生検が行われ、かつ病理学的にも異常を認めなかったも のを Pre-SCT screening 群とした。

一方、移植後の大腸標本は以下の5つに分類した。①Pathologicallyconfirmed GI-GVHD とは消化管 GVHD に合致する臨床症状があり、かつ病理学的 にも消化管 GVHD に典型的な所見(腺管の様々なアポトーシス像(Przepiorka et al., 1995; Shulman et al., 2015))を認める場合とした。②Clinical GI-GVHD は、臨床的には、下痢が遷延しており消化管 GVHD と診断されたものの、典型的 な消化管 GVHD の病理所見を認めないものとした。また③CMV colitis は H&E 染 色や免疫染色で大腸にサイトメガロウイルス(cytomegalovirus; CMV)の存在が確 認されたものとし、④Pathologically-confirmed GI-GVHD with CMV colitis は ①と③の合併例、⑤Non-specific colitis は①~④のいずれにも該当しないも のとした。

急性 GVHD の診断および重症度に関しては広く用いられている基準を用い、病 理診断は熟練した病理医による診断を用いた。

経過中に初回生検後、一旦下痢が寛解したものの、その後に再燃した場合に は別のエピソードとして独立して評価した。また同一の下痢エピソード中に初回 の病理診断(Initial biopsies)と、その後に症状が遷延したために行なった生検 で病理診断名が変化した場合(Repeated biopsies with different diagnosis)の 標本も、独立して評価した。また、初回病理診断がPathologically-confirmed GI-GVHDの場合で、その後の生検でGI-GVHDを疑う病理所見を認めず、下痢症状 も寛解となっている場合(Follow-up biopsies)は、杯細胞数の変化について治 療前後で比較検討をした。

10) 臨床検体の杯細胞の評価方法

IE 染色で、杯細胞は陰窩中の淡くぬける胞体として認識されるため、既報と 同様に、杯細胞数を、陰窩中の空胞数を上皮細胞数(核)の数で割ることで標準化 した(Gersemann et al., 2009)。なお、少なくとも一検体で5個以上の陰窩を評 価した。一回の検査で複数の部位が生検された場合、最も肛門側の標本での杯細 胞数を解析に用いた。なお、GI-GVHDやCMV colitisの標本では、病理学的に所 見を認める部位中で、最も肛門側の標本における杯細胞数を解析に用いた。

11) 統計処理

2 群比較は Mann-Whitney U test を用い、3 群以上の比較は One-way ANOVA と ポストホックテストとして Tukey's test を用いて検定した。

GI GVHD の重症度と大腸杯細胞の傷害の程度との相関性については Jonckheere-Terpstra test を用いて検定した。さらに大腸杯細胞の傷害の程度 が予後に及ぼす影響に関しては、早期死亡例によるバイアスを排除するために (Anderson et al., 1983; Klein et al., 2001)、移植後 100 日時点で生存して いる症例のみを解析するランドマーク法を用いた。生存率はカプランマイヤー法 を用いて算出し、生存に関する群間比較には log-rank test を用いた。また、大 腸杯細胞の傷害の程度が非再発死亡率に及ぼす影響に関する解析には、やはり移 植後 100 日の時点での非再発生存例のみを用いたランドマーク法を用いて、非再 発死亡の累積発生率を算出した。群間の比較には Gray test を用いた。全て P 値 < 0.05 をもって統計学的有意差の有無を判断し、全てのデータは平均値±標準 誤差にて表記した。

全ての統計学的検定は、GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA)またはEZR version 3.4.1(自治医大さいたま医療センター、埼玉、日本)の統計プログラ ムを用いて行なった(Kanda, 2013)。

実験結果

1. マウス GVHD モデルにおける大腸杯細胞の変化とその意義についての検討

以前より動物モデルにおいて、消化管 GVHD で杯細胞が減少することが指摘されていたが、その意義については詳しい検討はなされていなかった。そこでまず、近年広く用いられているマウス急性 GVHD モデルにおいて、大腸杯細胞が減少しているかを確認し、その意義について検討した。

1) 放射線前処置による移植後の GVHD 重症度の推移と生存率

B6D2F1 (H-2^{b/d})をレシピエントマウスとして、移植日当日に致死量の放射線照 射(12.5 Gy)を2分割して行ったのち、主要組織適合性複合体不一致の同種 (allogeneic; Allo)ドナーであるB6 (H-2^b)または同系(syngeneic; Syn)ドナーで あるB6D2F1(H-2^{b/d})から5 x 10⁶の骨髄細胞および脾細胞を採取して経静脈的に投 与した。GVHD が発症しないSyn 群とGVHD を発症するAllo 群とを比較すると、 GVHD score は移植後1週間以降から有意差を持ってAllo 群で高い値を示した (**Figure 2A**)。また、移植後50日での生存率はSyn 群では100%、Allo 群では 40%であり、有意差をもってAllo 群で低下していた (**Figure 2B**)。



2) 放射線前処置による移植後大腸杯細胞の動態

このモデルにおける大腸杯細胞の傷害を確認するために、移植後3日、5日、 7日、35日、50日の大腸のアルシアンブルー染色標本を作製し、組織学的検討お よび定量化を行った。移植後5日の時点でAllo群はSyn群に比較して著明に杯細 胞が減少しており、その後、移植後後期になっても大腸杯細胞の傷害は遷延して いた(Figure 3A, B)。



3) 抗癌剤前処置による GVHD 重症度・生存率および移植後大腸杯細胞の動態の検討

前項の結果が、放射線による前処置特有の毒性である可能性を除外するため に、抗癌剤を前処置に用いたマウス GVHD モデルにおいても同様の結果が得られる かを確認した。

抗癌剤前処置による移植モデルにおいても GVHD score は Syn 群に比べて Allo 群で有意に高く、生存率も低下することを確認した (Figure 4A, B)。このモデルを 用いて、移植後 21 日目の大腸杯細胞数を検討したところ、Allo 群で Syn 群に比 べて著明に大腸杯細胞は減少していた (Figure 4C, D)。



Figure 4: (**A**, **B**, **C**, **D**) レシピエントマウス(B6D2F1)にブスルファン 25 mg/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)を腹腔内 投与して前処置を行い、B6 (A11o) またはB6D2F1 (Syn) ドナーから採取した骨髄 細胞 5×10⁶ と脾細胞を 1×10⁷を day 0 に経静脈的に輸注した。GVHD score (**A**; 平 均±標準誤差)と、生存曲線 (**B**)を示す(N=10/group)。移植後 21 日目の大腸アル シアンブルー染色組織像(**C**, scale bar: 100 μ m)。移植後 21 日目の大腸アルシ アンブルー染色標本を Figure 3B と同様の画像解析を行い大腸杯細胞を定量的に評 価した (**D**; 平均±標準誤差, N=9-10/group)。***p* < 0.01, ****p* <0.005, *****p* <0.001。 以上の結果から、前処置の方法に関わらず大腸杯細胞は GVHD 発症群で減少していることから大腸杯細胞は消化管 GVHD の標的細胞であることが示された。

4) 大腸杯細胞の傷害により便中ムチン量が増加する

杯細胞はムチンを豊富に含有しており、GVHDによる杯細胞傷害によって消化管 管腔へ分泌されるムチン、すなわち糞便中のムチンが変化している可能性が考え られたため、移植後の便中ムチン量について検討を行なった。Allo 群の糞便は Syn 群やNaïve 群に比べて有意に含有ムチンが増加していた(Figure 5)。



これまでの結果をまとめると、大腸杯細胞が GVHD によって傷害・破壊される ことで、杯細胞内のムチンが消化管管腔へ放出され、結果として便中ムチン含有 量が増加すると考えられた。したがって、便中ムチンが大腸杯細胞の傷害の程度 を表し、ひいては消化管 GVHD のサロゲートマーカーとなりうることが示唆され た。 5) GVHD による大腸杯細胞の傷害は大腸のムチン層構造を破綻させ、細菌の上皮下 への侵入を引き起こす

大腸では杯細胞が分泌したムチンは inner mucin layer と outer mucin layer という2層構造を構成することで腸上皮を病原菌から守っている。そこで我々は、 GVHD による大腸杯細胞の傷害が、この粘膜防御機構にどのような影響を及ぼすか について検討した。

移植後 35 日目の大腸を採取し、細菌を検出する EUB338 probe を用いた fluorescent in situ hybridization (FISH)法とMucin-2の蛍光免疫染色を組み合 わせて移植後のムチン層の変化を検討した(Figure 6)。Allo 群では Syn 群や Naïve 群に比較して inner mucin layer が狭小化・消失して、大腸上皮内への細菌の侵入 を認めた(Figure 6 右列下段の白三角)。



Figure 6 Figure2 と同様の移植を施行した。移植後 35 日目の Syn 群、Allo 群、お よびNaïve B6D2F1マウスの大腸蛍光免疫染色画像を示す。下段は上段の四角で囲 まれた部位の強拡大。点線は inner mucin layer と腸上皮との境界を表し、左側が 管腔側、右側が腸上皮側、両白線矢印の間は inner mucin laver を、白三角は腸上 皮内への細菌の侵入を示す(赤: 細菌, 緑: Mucin-2, 青: DAPI, scale bar: 100 μ m) $_{\circ}$

大腸上皮下への細菌の侵入を定量化するために、粘膜上皮を除去後、粘膜固有 層および漿膜細胞層を含む大腸上皮下組織を分離し、bacterial universal primer である 16S rRNA を標的とした定量リアルタイム PCR を行なったところ、 Allo 群では Naïve 群および Syn 群と比較して、より多くの細菌が侵入していた (Figure 7)。



Figure 7 Figure2 と同様に移植を施行した。移植後5日目に大腸の上皮下組織(粘膜固有層および漿膜細胞層)を分離して DNA を抽出し、定量リアルタイム PCR を行い、16s rRNA の発現を測定した。Naïve B6D2F1 マウスの大腸上皮下組織での 16S rRNA 発現をもとに標準化した(平均±標準誤差, N=10 /group)。*p <0.05

これらの結果から、マウス GVHD モデルにおいて、大腸杯細胞が消化管 GVHD の 標的細胞であり、その傷害による大腸の inner mucin layer の消失というバリア 機構破綻によって、細菌の大腸上皮下への侵入を引き起こしていると考えられ た。

2. 杯細胞増殖因子 IL-25 の移植前投与の GVHD に及ぼす影響についての検討

前章では、マウス GVHD モデルにおいて、消化管 GVHD によって大腸杯細胞が傷害 されることで、大腸のムチン層によるバリア機構が破綻し、腸上皮下への細菌の侵 入が引き起こされることを示した。腸管粘膜のバリア機構の障害はエンドトキシン などの細菌由来成分の全身循環への流入を起こし、GVHD を更に悪化させるという悪 循環に陥りやすい(Hill and Ferrara, 2000)。従って杯細胞を保護することにより 腸管粘膜のバリア機能を保護することは、新たな GVHD 予防・治療の選択肢の一つ になりうる。

近年 IL-17 サイトカインファミリーの一つである IL-25 が type 2 innate lymphoid cell (ILC2)を介して杯細胞を増加させることが報告された(Gerbe et

al., 2016; von Moltke et al., 2016)。そこで我々は IL-25 投与による腸管杯細 胞の増殖・保護が GVHD を軽減させることが可能か検討を行った。

1) IL-25 投与により大腸杯細胞を増殖し、かつその成熟も促される

まず、既報の効果確認のために、Naïve B6D2F1 マウスに7日間 rmIL-25 0.3 µg を腹腔内投与し、8日目に大腸を採取して組織学的評価を行ったところ、既報 と同様に rmIL-25 の投与によって大腸杯細胞数は増加した(**Figure 8A, B**)。

さらに興味深いことに、既報に従って、杯細胞の長径 10 µm 以上の大きいもの を成熟杯細胞と定義し、陰窩あたりの成熟杯細胞と未成熟杯細胞の比を算出した ところ、rmIL-25 投与群で有意に成熟細胞の比率が増加していた(Figure 8C)。



Figure 8: (A, B, C, D) Naïve B6D2F1 マウスに7日間 0.3 μg/body rmIL-25 または 1x PBS(-) 300 μLを腹腔内投与したのち、8日目に大腸を採取してアルシアンブ ルー染色単独およびアルシアンブルー+PAS 二重染色を施行した。PAS+アルシアン ブルー二重染色病理像を示す(A, scale bar: 100 μm)。大腸アルシアンブルー染 色標本を用いてFigure3Bと同様の画像解析を行い大腸杯細胞を定量的に評価した (B; 平均±標準誤差) N=7/group)。アルシアンブルー染色+PAS 二重染色大腸標本 を用いて長径10 μm 以上の杯細胞を成熟細胞として、それ以下のサイズの未成熟 細胞との比を各陰窩毎に算出した(C; 平均±標準誤差, N=8/group)。*p <0.05, *****p <0.001 この結果から IL-25 は単に杯細胞の増殖を促すだけではなく、その成熟にも寄 与していると考えられた。

2)移植前 IL-25 投与による大腸杯細胞の増殖・保護により、GVHD は軽減する

次に我々は、移植前の IL-25 投与による大腸杯細胞の増殖・保護が消化管 GVHD を軽減させるか検討した。

まず、レシピエントマウス(B6D2F1)に対して移植前7日間(day -7 ~ 0) rmIL-25 0.3 µg/body または1xPBS(-) 300 µL を腹腔内投与した後、移植日当日 に致死量の放射線照射(11.5 ~ 12.0 Gy/2Fr)で前処置を行い, B6 (Allo) また はB6D2F1 (Syn) ドナーから採取した骨髄細胞 5×10^6 と脾細胞を 1×10^7 ずつ経静 脈的に輸注した。

移植後5日目の大腸アルシアンブルー染色標本では、PBS 投与 Allo 群に比べて rmIL-25 投与 Allo 群で有意に多くの杯細胞が残存しており(Figure 9A, B)、大腸 上皮下組織への細菌の侵入も IL-25 投与群で有意に減少して、Syn 群と遜色ない 水準に抑えられていた(Figure 9C)。



Figure9: (A, B, C) B6D2F1 マウスに 0.3 µg/body rmIL-25 または 1xPBS(-) 300 µL を腹腔内投与した後(day -7~day0)、致死量の放射線照射(11.5 ~ 12.0 Gy/2Fr) で前処置を行い, B6 (A11o) または B6D2F1 (Syn) ドナーから採取した骨髄細胞 5×10^6 と脾細胞を 1×10^7 ずつ経静脈的に輸注した。移植後 5 日目の大腸アルシア ンブルー染色病理像を示す(A, scale bar: 100μ m)。これらを用いて Figure3B と 同様の画像解析を行い大腸杯細胞を定量的に評価した(B; 平均±標準誤差, N=6-9/group)。Figure7 同様に移植後 5 日目に大腸の上皮下組織から DNA を抽出し、定 量リアルタイム PCR を行い、16S rRNA の発現を測定した。Syn 群の大腸上皮下組 織での 16s rRNA 発現をもとに標準化した(平均±標準誤差, N=6-9/group)。*p <0.05, ***p <0.005

さらに、移植前 IL-25 投与による粘膜保護が GVHD にどのような影響を及ぼす か検討した。rmIL-25 投与 Allo 群では血漿 IFN-γおよび IL-6 といった炎症性サ イトカインが抑制されていた (Figure 10A, B)。その結果として、rmIL-25 投与 Allo 群で生存率が改善し (Figure 10C)、移植後 14 日目の GVHD スコアにおいても 改善を認めた (Figure 10D)。



Figure 10: (A, B, C, D) Figure9 と同様に移植を施行した。移植後5日目の血液を採取し、血漿を分離してBD CBA Flex setsを用いて IFN-γ(A)とIL-6(B)を測定した(平均±標準誤差, N=12-19/group)。またこの系における生存率(C)および移植後14日目の GVHD 重症度(D)を示す(N=6-15/group)。*p <0.05, **p <0.01, ***p <0.005

以上の結果から移植前短期間のIL-25 投与による大腸杯細胞の増殖・保護によって、GVHDによる大腸杯細胞の傷害が軽減されて、バリア機能が保たれることで 細菌の腸上皮下への侵入が抑制され、GVHDに伴う炎症性反応増悪が抑えられて、 結果的にGVHD が軽減するという機序が考えられた。

3. 抗菌分子 Lypd8 の消化管 GVHD への影響と大腸ムチン層との相互作用に関する検討

以前より我々や他のグループから、マウス GVHD モデルにおいて同種移植後に 大腸菌が増加することが報告され(Eriguchi et al., 2012; Heimesaat et al., 2010)、ヒトにおいても移植後の腸管 dysbiosis が移植成績に影響を及ぼすことが 報告されている(Taur et al., 2014)。

小腸では、Paneth 細胞が分泌する抗菌ペプチド α-defensin が病原菌に選択的 に抗菌活性を示すことでが知られており(Masuda et al., 2011)、腸内細菌叢の維 持において重要な調節因子となっているが、大腸特有の抗菌活性を有する分子に 関しては今まで報告がなかった。

奥村らは、大腸上皮細胞(enterocyte)が産生する Lypd8 が大腸菌などの鞭毛 を有する細菌の鞭毛部に作用して、その活動性を低下させることで腸上皮下への 細菌侵入を抑制していることを報告した(0kumura et al., 2016)。そこで、我々 は Lypd8 が消化管 GVHD にどのような影響を及ぼしているかについて検討した。 1) 抗菌分子 Lypd8 は inner mucin layer と腸上皮細胞の境界領域に存在し、同種移 植後に減少する

まず、Lypd8の局在について野生型 B6 マウス(WT) と *Lypd8* 欠損型マウス(KO)の 大腸蛍光免疫染色を行い組織学的に評価した(Figure 11A)。既報と同様に、Lypd8 は定常状態では inner mucin layer と大腸上皮細胞との境界に集中して存在して いた。一方で、移植後7日目の大腸蛍光免疫染色では Lypd8 が Syn 群では同部位 に比較的残存しているのに対して、Allo 群では減少していることがわかった (Figure 11B)。



しかし、移植後7日目の細胞レベルでの *Lypd8*の mRNA 発現量を定量リアルタ イム PCR を用いて評価したところ、既報の通り、腸上皮細胞(Epithelial cell (EC))が上皮下の細胞(Lamina propria (LP)Serosal Layer (SL)に比べてより強く 発現していたものの、Syn 群と Allo 群の間で、EC 間での発現量に差を認めなかっ た (Figure 12)。



以上から、細胞あたりの *Lypd8* の発現は GVHD 発症には影響を受けないが、ム チン層が破綻することで、本来 Lypd8 が高濃度で存在すべき inner mucin layer と腸上皮細胞との境界領域に維持できなくなっていると考えられた。

2) Lypd8 は同種移植後においても大腸上皮下への細菌侵入に対して抑制的に働き、 GVHD の増悪を抑制する

さらに、我々はLypd8が同種移植後においても大腸上皮下への細菌侵入に対して抑制的に働いているか検討を行った。

WT または KO をレシピエントとして移植日当日に致死量の放射線照射(11.5 Gy/2Fr)で前処置を行い, BALBc (H-2^d) (Allo 群) または B6 (H-2^b) (Syn 群) ド ナーから採取した骨髄細胞 5×10^6 と脾細胞を 1×10^7 ずつ経静脈的に輸注した。移 植後 7 日目の大腸を採取し、EUB338 を用いた細菌 FIHS 法と Mucin-2 の蛍光免疫 染色を施行したところ、KO 群で大腸上皮内への細菌の侵入をより多く認めた (Figure 13A)。また、大腸上皮下組織に対する 16S rRNA を標的とした定量リアル タイム PCR 法を行い、KO 群で WT 群に比べてより大腸上皮下へ細菌が侵入してい ることを確認した(Figure 13B)。



このことから Lypd8 が移植後 Allo 群においても大腸上皮下への細菌侵入に対して抑制的に働いていることが示唆された。

また、この細菌侵入の結果として、KO 群では WT 群に比べて IL-6 や IFN-γ と いった炎症性サイトカインがより強く上昇した(Figure 14)。



このモデルでは、WT をレシピエントとして Allo 移植を行った場合に、移植後 70 日までに約 60%程度が死亡するが、KO をレシピエントとして用いた場合、より 強い GVHD を認めて、同じ期間に全てのマウスが死亡した(Figure 15A)。

この結果に、WTとKOの腸内細菌叢の違いが影響を及ぼしている可能性を排除 するため、両者を同一ケージで4週間飼育(Co-housing)した後に、同様の移植を 施行しても、KO群の生存率は有意に悪かった(Figure 15B)。



このモデルにおいても移植前の rmIL-25 投与が GVHD を軽減するか検討を行った。WT においては移植後 50 日の時点で PBS 投与群でマウスが全て死亡したのに対して rmIL-25 投与群は 50%が生存(3/6) しており (Figure 16A)、rmIL-25 により

GVHD が軽減された。これに対して KO においては生存率の改善は得られなかった (Figure 16B)。



以上の結果から、マウス GVHD モデルにおいて、大腸杯細胞は GVHD の標的細胞であり、抗菌分子 Lypd8 依存性に細菌の大腸上皮下への侵入を抑制して、GVHD の進展に対して抑制的に働いていると考えられた。

4. ヒト造血幹細胞移植における大腸杯細胞の傷害に関する検討

これまでのマウス GVHD モデルから得られた知見をふまえて、ヒト同種造血幹 細胞移植後の消化管 GVHD においても、マウスモデルと同様に大腸杯細胞が傷害を 受けているか検討を行った。

1) 対象患者とその生検のカテゴリー分け

北海道大学病院血液内科にて、2009 年から 2015 年の間に初回同種造血幹細胞 移植を受けた 205 名の患者を対象とした。このうち 200 名で好中球生着が得られ た。そのうちの 88 名 (全体の 42.9%)で、移植前後に何らかの理由により、計 156 回の生検を施行されていた。

Table 2 に患者背景を生検未施行群および施行群に分けて示した。両群間で年齢、性別、基礎疾患、移植ソース、HLA 一致・不一致、前処置強度、放射線照射の有無に差は認めなかったが、生検施行群で GVHD grade および消化管 GVHD のstage が高く、重症の GVHD を多く認めた。

	Total	Post SCT Biopsy (-)	Post SCT Biopsy (+)	
Variable	Population	Population	Population	
	n=205	n=130	n=75	Р
Age (median), y				0.987
	17-67 (48)	17-67 (48)	18-67 (48)	
Sex, n (%)				0.711
male	117 (57)	73 (56)	44 (59)	
female	88 (43)	57 (44)	31 (41)	
Underlying Disease, n (%)				0.711
AML	76 (37)	58 (45)	18 (24)	
ALL	37 (18)	23 (18)	14 (19)	
ML	48 (23)	24 (18)	24 (32)	
MDS	23 (11)	13 (10)	10 (13)	
CML	6 (3)	4 (3)	2 (3)	
AA	6 (3)	2 (2)	4 (5)	
MM	2 (1)	0 (0)	2 (3)	
Others	7 (3)	6 (5)	1 (1)	

Table 2-1. 全体の患者背景(1)

Table 2-2. 全体の患者背景

	Total	Post SCT Biopsy (-)) Post SCT Biopsy (+)	
Variable	Population	Population	Population	
	n=205	n=130	n=75	Р
Disease Risk Index, n (%)				0.110
Low	25 (12)	13 (10)	12 (16)	
Intermediate	114 (56)	80 (62)	34 (45)	
High	53 (26)	31 (24)	22 (29)	
Very High	13 (6)	6 (5)	7 (9)	
Donor Source, n (%)				0.278
BMT	112 (55)	66 (51)	46 (61)	
PBSCT	53 (26)	38 (29)	15 (20)	
CBT	40 (20)	26 (20)	14 (19)	
HLA match, n (%)				1
Yes	102 (50)	65 (50)	37 (49)	
No	103 (50)	65 (50)	38 (51)	
Conditioning, n (%)				0.057
MAC	117 (57)	81 (62)	36 (48)	
RIC	88 (43)	49 (38)	39 (52)	
TBI, n (%)				0.212
Yes	187 (91)	116 (89)	71 (95)	
No	18 (9)	14 (11)	4 (5)	
GVHD grade, n (%)	n=200	n=125	n=75	<0.001
0-2	175 (88)	122 (98)	53 (71)	
3-4	25 (13)	3 (2)	22 (29)	
GI GVHD stage, n (%)	n=200	n=125	n=75	<0.001
0	147 (74)	122 (98)	25 (33)	
1-2	40 (20)	3 (2)	37 (49)	
3-4	13 (7)	0 (0)	13 (17)	

Abbreviations; AML; acute myeloid leukemia ALL; acute lymphoblastic leukemia ML; malignant lymphoma. MDS; myelodysplastic syndrome, CML; Chronic myeloid leukemia, AA; aplastic anemia MM; multiple myeloma, BMT; bone marrow transplantation, PBSCT; peripheral blood stem cell transplantation, CBT; cord blood transplantation, MAC; myeloablative conditioning, RIC; reduced intensity conditioning, TBI; total body irradiation

生検検体を生検時期とその診断内容に応じて以下の通りに分類した(Figure 17)。27 検体(24 人)が移植前に生検されたものだったが、このうち22 検体(21 人)は、下痢などの消化器症状のない患者で移植前スクリーニング目的に生検されたもので、これらを「pre-SCT screening」と分類した。

 129 検体(75 人)が移植後に生検されたものであったが、このうち7 検体(2 人)が Adult T cell lymphoma / leukemia (ATLL)の腸管病変もしくは移植後リン パ増殖性疾患(PTLD)であり、解析から除外した。

109 検体(73 人)が下痢などの消化器症状が出現した際に診断目的に生検され ており、これらを「initial biopsies」と分類した。そのうち7 検体(6 人)で下 痢が遷延したために再度生検が行われ、診断が initial biopsies のものと変わっ ており、これらを「Repeated biopsies with different diagnosis」と分類して 独立した検体として扱った。その他、6 名の患者では治療により消化管 GVHD が寛 解した状態で生検が採取されており、「follow-up biopsies」と分類し、GVHD 治 療効果と大腸杯細胞数の比較検討に用いた。

「initial biopsies」には「pathologically confirmed GI-GVHD without CMV colitis」が38 検体(33 人)、「pathologically confirmed GI-GVHD with CMV colitis」が6 検体(6 人)、「clinical GVHD」(病理学的にGVHD 所見が確認できないもの)が14 検体(12 人)、「CMV colitis」単独が9 検体(8 人)と、それ以外の「non-specific colitis」が42 検体(34 人)が含まれていた。

「Repeated biopsies with different diagnosis」にはpathologically confirmed GI-GVHD without CMV colitis、pathologically confirmed GI-GVHD with CMV colitisが1 検体ずつ、CMV colitis 単独が2 検体(2 人)、nonspecific colitisが3 検体(2 人)が含まれていた。

「follow-up biopsies」は全例が non-specific colitis という診断であった。



2) 大腸杯細胞は消化管 GVHD において特異的に減少し、消化管 GVHD の重症度および 治療反応性に相関する

各カテゴリーにおける大腸 IE 染色の代表的なものを示した(Figure18 A, B, C, D)。大腸杯細胞は IE 染色ではムチンが明るく抜けた胞体を有するように見 えるが、大腸杯細胞は「pathologically confirmed GI-GVHD」のみで減少してい た。



続いて、これら各検体の大腸杯細胞の多寡を、杯細胞数を陰窩を構成する上皮細胞数との比率で定量化して評価した (Figure 19)。

「pathologically confirmed GI-GVHD without CMV colitis」(20.0 ± 1.8%)と「pathologically confirmed GI-GVHD with CMV colitis」(17.0 ± 3.0%)では、他のカテゴリーと比較して有意に大腸杯細胞が減少していたが、 clinical GI-GVHD, CMV colitis, non-specific colitisでは、移植前スクリー ニング時と同等の杯細胞が残存しており、杯細胞の減少は無しと判断された (「pre-SCT screening」(37.2 ± 1.2%),「non-specific colitis」(36.0 ± 1.2%),「clinical GI GVHD」(37.5 ± 2.0%),「CMV colitis」(30.3% ± 5.0%))。



さらに大腸杯細胞の傷害の程度は臨床症状で分類される消化管 GVHD の重症度と相関していた(Figure 20)。



とも判明した(Figure 21)。



以上のことからて腸外細胞か消化官 GVHD 冶療によける診断・重症度分類 療モニタリングの指標となりうることが示された。 5. ヒト同種造血幹細胞移植における大腸杯細胞の傷害と移植成績との関連性

最後に大腸杯細胞の傷害の程度が移植成績と関連するかの検討を行った。
 検討に際して、経過中に一度でも大腸杯細胞数が15%以下となったものを
 Severe Goblet Loss 群(№ 8)とし、反対に常に15%以上であったものを Mild
 Goblet Loss (№ 65)群と定義した。

Severe Goblet Loss 群と Mild Goblet Loss 群の患者背景を Table 3 にまとめた。両群間で年齢、性別、基礎疾患、移植ソース、HLA 一致・不一致、前処置強度、放射線照射の有無には差がなかったが、Severe Goblet Loss 群で GVHD の grade および消化管 GVHD の stage が高く重症 GVHD を多く認めた。

	Severe Goblet Loss	Mild Goblet Loss	
Variable	Population	Population	
	n=8	n=65	Р
Age (median), y			0.81
	18-63 (49)	18-67 (47)	
Sex, n (%)			0.272
male	3 (38)	39 (60)	
female	5 (63)	26 (40)	
Underlying Disease, n (%)			0.59
AML	1 (13)	17 (26)	
ALL	1 (13)	12 (18)	
ML	4 (50)	19 (29)	
MDS	1 (13)	9 (14)	
CML	0 (0)	2 (3)	
AA	0 (0)	4 (6)	
MM	0 (0)	1 (2)	
Others	1 (13)	1 (2)	
Disease Risk Index, n (%)			0.2430
Low	0 (0)	12 (18)	
Intermediate	6 (75)	27 (42)	
High	1 (13)	20 (31)	
Very High	1 (13)	6 (9)	

Table 3-1. 杯細胞の傷害の程度で分けた患者背景(1)

	Severe Goblet Loss	Mild Goblet Loss	
Variable	Population	Population	
	n=8	n=65	Р
Donor Source, n (%)			0.5000
BMT	4 (50)	40 (62)	
PBSCT	1 (13)	14 (22)	
CBT	3 (38)	11 (17)	
HLA match, n (%)			0.2640
Yes	2 (25)	33 (51)	
No	6 (75)	32 (49)	
Conditioning, n (%)			0.4600
MAC	5 (63)	29 (45)	
RIC	3 (38)	36 (55)	
TBI, n (%)			0.0569
Yes	6 (75)	63 (97)	
No	2 (25)	2 (3)	
GVHD grade, n (%)			0.0078
0-2	2 (25)	49 (75)	
3-4	6 (75)	16 (25)	
GI GVHD stage, n (%)			0.0571
0	0 (0)	23 (35)	
1-2	5 (63)	32 (49)	
3-4	3 (38)	10 (15)	

Table 3-2 杯細胞の傷害の程度で分けた患者背景(2)

Abbreviations; AML; acute myeloid leukemia ALL; acute lymphoblastic leukemia ML; malignant lymphoma. MDS; myelodysplastic syndrome, CML; Chronic myeloid leukemia, AA; aplastic anemia MM; multiple myeloma, BMT; bone marrow transplantation, PBSCT; peripheral blood stem cell transplantation, CBT; cord blood transplantation, MAC; myeloablative conditioning, RIC; reduced intensity conditioning, TBI; total body irradiation Severe Goblet Loss 群と Mild Goblet Loss 群に、さらに残りの経過中に大腸 生検を行わなかった群(No indication for Biopsy)を加えた3群で、移植後100 日を landmark とした全生存率および非再発死亡率を比較検討した。

全生存率の解析では、下痢がなく大腸内視鏡検査および生検が必要なかった群 が、下痢症状があり大腸生検を要した症例に比べて有意に予後良好であった一方 で、重度に杯細胞傷害を受けた(=Severe Goblet Loss)群は軽度の杯細胞傷害に止 まった(=Mild Goblet Loss)群よりも移植後の全生存率が有意に低く(Figure 22A)、非再発死亡率も高率だった(Figure22B)。



このことから大腸杯細胞の受傷の程度は全生存や非再発死亡などの移植成績に 影響を及ぼすと考えられた。

以上の結果から、ヒト同種造血幹細胞移植において、大腸杯細胞数は消化管 GVHDの診断およびモニタリングに加えて、予後予測にも有用なバイオマーカーで あると考えられた。

考察

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組織傷害を引き起こす医原性疾患である(Teshima et al., 2002)。GVHD の主な標的臓器である消化管では成熟した上皮細胞や腸幹細胞などの前 駆細胞がその標的となる(Takashima et al., 2011; Teshima et al., 2011)。

近年の研究により GVHD や graft versus leukemia (GVL) 効果という観点から腸内 細菌叢が造血幹細胞移植の予後に影響を及ぼすということが報告されている (Eriguchi et al., 2012; Jenq et al., 2012; Peled et al., 2017)。例えば酪酸を 産生する常在性嫌気性菌は直接腸管上皮を保護すると同時に(Mathewson et al., 2016)、制御性 T 細胞性を誘導することが知られており(Furusawa et al., 2013)、 GVHD 症例では病原性細菌の増加および酪酸産生菌の減少によって移植成績が悪化す るという報告がある(Atarashi et al., 2013; Taur et al., 2014)。

腸管粘膜は、細菌の体内への侵入を防ぐ障壁として重要であり、その腸管粘膜を 覆うように存在している粘液層もまた、細菌に対する物理的かつ化学的な障壁として 非常に重要である。同種移植後は腸内細菌叢に乱れが生じるため、腸管粘液層の機能 が維持されることは同種移植の成績を左右する要素となりうる。

抗菌ペプチドを始めとする抗菌分子は腸内細菌を維持することや、直接的に上皮 に対して保護的に働くことで腸内の恒常性を保つために非常に重要である(Eriguchi et al., 2012; Hayase et al., 2017; Zhao et al., 2018)。

特に、小腸のPaneth 細胞が産生する抗菌ペプチドである α-defensin は病原性細 菌に対する選択的な抗菌活性を有する一方で、常在細菌叢には保護的に働くことが報 告されており、正常の常在細菌叢を維持するのに重要な役割を果たしていると考えら れる。我々は以前にマウスの GVHD モデルを用いて、Lgr5 陽性腸幹細胞とそのニッチ である Paneth 細胞が、GVHD の標的細胞となっており、その傷害による組織修復機転 の破綻と抗菌ペプチドの分泌不全による腸内細菌叢の異常(dysbiosis)が GVHD の増悪 をもたらすことを示した(Masuda et al., 2011)。

今回、我々は大腸杯細胞も Paneth 細胞と同様に GVHD の標的細胞となり、その傷 害によってムチン層が破綻をきたし、bacterial translocation が引き起こされるこ とを示した。

43

様々な抗菌活性を有する物質が腸管上皮細胞で産生された後、ムチン層を介して 消化管管腔へと放出される。このためムチン層は高濃度の抗菌分子を保持しており、 細菌に対する腸上皮の化学的なバリアとしての機能を有している。

実際、いくつかの抗菌活性を有する分子は、主にムチン層に止まって機能していることが報告されている。Vaishnavaらは抗菌ペプチドである REGIII y が細菌刺激に反応して腸上皮細胞で産生・分泌され、ムチン層で殺菌作用を示すと報告している (Vaishnava et al., 2011)。また奥村らは大腸の腸上皮細胞が産生する Lypd8 がムチン層において細菌の活動性を抑えることにより、bacterial translocation を抑える ことを報告している (Okumura et al., 2016)。これらの抗菌分子がムチン層で主に作用しているという事実からは、杯細胞によって形成されるムチン層が、抗菌分子が十分に効果を発現するために必須な存在である可能性がある。また、庄野らは、マウスモデルにおいてムチン分解菌の一種である Akkermansia muciniphila の腸管内での増 殖が GVHD を増悪させると報告しており (Shono et al., 2016)、消化管 GVHD における 大腸杯細胞およびムチン層の重要性を示唆する知見の一つと言えるだろう。

我々は、マウスモデルにおいて、腸管上皮増殖因子である R-Spondin 1 が Paneth 細胞を保護し、 α -defensin の産生を維持することにより腸管 dysbiosis を抑制して GVHD を軽減させることを報告した(Hayase et al., 2017)。さらにマウス α defensin である cryptdin-4 を内服することでも腸管 dysbiosis を抑制して GVHD も 軽減することを示した。その際、R-Spondin1 投与による GVHD 抑制効果は、抗菌ペプ チド投与による GVHD 抑制に比較して、強力であった。R-spondin 1 は Paneth 細胞だ けでなく杯細胞も増殖させるため、R-spondin 1 の投与がムチン層の破綻を抑制して α -defensin の抗菌活性を増強させている可能性もある。一方、dysbiosis に対する 治療および GVHD 予防目的として cryptdin-4 などの抗菌分子を投与する際における、 ムチン層の役割とそのサポートの必要性については更なる検討が必要と考える。

我々は移植前に IL-25 を投与して成熟杯細胞を増殖させることで、移植後にもそのバリア機能を維持させて、bacterial translocation と炎症性サイトカインの産生を抑制し GVHD を軽減しうることを発見した。

IL-25 は腸管の Tuft cell で産生され、ILC2 を介して杯細胞を増殖させる(Gerbe et al., 2016; von Moltke et al., 2016)。ILC は GVHD に関して保護的に働くこと がわかってきている。Hanash らは放射線耐性である ILC3 が GVHD によって傷害を受けることで腸管上皮増殖因子である IL-22 の産生が低下してバリア機構が破綻することを報告している(Hanash et al., 2012)。ILC2 は ILC3 と異なり、GVHD の有無とは 関係なく、移植前処置後に激減して長期間回復しない。Bruce ら IL-25 を投与して別

個に採取しておいた ILC2 を、移植時に輸注することで Myeloid-derived suppressor cells を誘導して GVHD を軽減させるという方法を報告しているが、この研究では ILC2 投与後の腸杯細胞については検討していない(Bruce et al., 2017)。今回、 我々は同種移植後の ILC2 の動態についての評価は行なっていないが、移植前に投与 していた IL-25 によって増殖した ILC2 が、前処置後には減少していることが予測さ れる。

ヒトにおいても末梢血中に活性化した ILC2 と ILC3 を認めた場合に GVHD の発症率 が低下するという報告があるが (Munneke et al., 2014)、これらの患者で実際に杯細 胞の増加や成熟が認めるかについては不明である。更なる検討が必要である。

我々はヒトにおいて他の下痢をきたす移植後の合併症と比較して、消化管 GVHD でのみ大腸杯細胞が減少することを発見した。Levine らは十二指腸の Paneth 細胞数が 消化管 GVHD の重症度に相関すると報告している(Levine et al., 2013)。大腸杯細胞 も、十二指腸の Paneth 細胞と同様に、簡便な診断的かつ経過観察に有用なバイオマ ーカーになりうる。

今回の検討では、非特異的な下痢やCMV 腸炎においては大腸杯細胞が減少しない ことは判明したが、今後は血栓性微小血管障害症やEpstein-Barr ウイルス関連腸炎 などの他の移植後消化管合併症における大腸杯細胞数に関しても比較検討が必要と考 える。

近年では、共焦点レーザー内視鏡の開発により、消化管生検を行わずに大腸杯細胞を評価することも可能となってきた(Arya and Yan, 2012)。

内視鏡や組織学的による大腸杯細胞の評価が、簡便な診断的かつ、経過観察可能 で、予後予測可能な消化管バイオマーカーとして用いられるかもしれない。

また、杯細胞を保護することで抗菌分子を保持した状態のムチン層を維持し、 bacterial translocationを防ぎ、移植成績を改善させるという新たな治療戦略も考 えられ、今後の更なる基礎および臨床研究が望まれる。

総括および結論

本研究にて以下の知見が得られた。

- 消化管 GVHD によって大腸杯細胞は傷害を受ける
- 大腸杯細胞の傷害は大腸のムチン層構造を破綻させ、細菌の腸管粘膜内への侵入 (bacterial translocation)を引き起こす
- 杯細胞増殖因子である IL-25 は、移植による杯細胞傷害に対して保護的に働き、 bacterial translocation と炎症性サイトカイン産生を抑制することで GVHD を 軽減させる
- 杯細胞から産生されるムチンによる細菌に対するバリア機構は、抗菌分子 Lypd8 依存性である
- ヒト造血幹細胞移植において、大腸杯細胞は消化管 GVHD に特異的に傷害をうけ、その重症度・治療反応性・移植成績と相関する
- 2. 新知見の意義

消化管 GVHD における大腸杯細胞の傷害の意義についてはこれまで検討がなされて こなかった。GVHD による杯細胞の傷害によって、大腸のムチン層が破綻して細菌の 腸上皮下への侵入が引き起こり、炎症の増悪によって更に GVHD が悪化するというメ カニズムを示した。rmIL-25 の投与によって杯細胞を増殖させて保護することで GVHD が軽減することから、杯細胞の保護による GVHD 予防・治療という新たな予防戦略の 可能性が示された。一方で、ムチン層は Lypd8 のような抗菌分子と協調的に作用する ため、両者を保つことが、腸管粘膜のバリア機構を保持して GVHD を予防するために は重要であり、このような予防戦略の可能性も示唆された。

また、ヒト造血幹細胞移植において、消化管 GVHD において特異的に杯細胞は減少 し、その重症度と治療反応性、移植成績と相関することから、簡便な消化管 GVHD の バイオマーカーとなりうることが予想される。近年では内視鏡観察のみでも杯細胞や 陰窩の配列など、病理学的所見に準ずるような情報把握が可能となっており、今回得 た知見と組み合わせることでより患者への負担の少ない消化管 GVHD 診療を実現する ことができるかもしれない。 3. 今後の研究展開

今回の検討では、IL-25 が ILC2 を介して杯細胞の増殖を導いて保護することで、 GVHD を軽減させるというメカニズムを示したが、IL-25 が他の経路を介して GVHD を 軽減させている可能性は完全には否定できていない。これに関して検証するために IL-25 のレセプターである IL-17RB のノックアウトマウスを用いた移植を行い、作用 メカニズムの詳細について検討していく。

また、IL-25 投与および移植後の ILC2 について経時的に観察していくことで ILC2 の傷害のメカニズムおよびその保護が可能か検討していく。

ムチン層と抗菌分子は互いに相補的に腸管バリア機構の維持に携わっている。そこでrmIL-25と cryptdin-4を組み合わせて、双方の効果を増強させてより強力に腸管 dysbiosisを抑制することが可能かを検討する。

ヒト同種造血幹細胞移植において、前向き研究または多施設共同研究を行い、大 腸杯細胞と消化管 GVHD との関係性や、他の移植合併症疾患との鑑別方法について、 より症例を集積して検討したい。またその際に、共焦点レーザー内視鏡による観察と 病理標本における杯細胞の傷害の程度とを比較検討して、より簡便な消化管 GVHD の 診断および経過観察方法を構築していく。 北海道大学大学院 医学研究院内科学系部門内科学分野 血液内科教室 豊嶋崇徳教授、橋本大吾准教授、小野澤真弘助教、杉田純一講師、早瀬英子先生 高橋秀一郎助教、Dr. Clara Noizat, 松岡里湖先生、 江端浩先生、小笠原励起先 生、山川知宏先生、大東寛幸先生、横山絵美先生、立野貴大先生、長谷川裕太先生

大阪大学大学院医学研究科 免疫制御学 竹田 潔教授、奥村 龍助教

利益相反

開示すべき利益相反状態はない

引用文献

Alexander, K.A., Flynn, R., Lineburg, K.E., Kuns, R.D., Teal, B.E., Olver, S.D., Lor, M., Raffelt, N.C., Koyama, M., Leveque, L., *et al.* (2014). CSF-1-dependant donorderived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. J. Clin. Invest. *124*, 4266-4280.

Anderson, J.R., Cain, K.C., and Gelber, R.D. (1983). Analysis of survival by tumor response. J. Clin. Oncol. *1*, 710-719.

Arya, A.V., and Yan, B.M. (2012). Ultra high magnification endoscopy: Is seeing really believing? World J. Gastrointest. Endosc. *4*, 462-471.

Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., *et al.* (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. Nature *500*, 232-236.

Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2000). Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. Nat. Immunol. *1*, 113-118.

Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., *et al.* (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature *449*, 1003-1007. Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. Nat. Rev. Microbiol. *9*, 356-368.

Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., *et al.* (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. Immunity *31*, 513-525.

Brown, E.M., Sadarangani, M., and Finlay, B.B. (2013). The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. Nat. Immunol. *14*, 660-667.

Bruce, D.W., Stefanski, H.E., Vincent, B.G., Dant, T.A., Reisdorf, S., Bommiasamy, H., Serody, D.A., Wilson, J.E., McKinnon, K.P., Shlomchik, W.D., *et al.* (2017). Type 2 innate lymphoid cells treat and prevent acute gastrointestinal graft-versus-host

disease. J. Clin. Invest. 127, 1813-1825.

Cash, H.L., Whitham, C.V., Behrendt, C.L., and Hooper, L.V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. Science *313*, 1126-1130. Cooke, K.R., Kobzik, L., Martin, T.R., Brewer, J., Delmonte, J., Crawford, J.M., and Ferrara, J.L. (1996). An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. Blood *88*, 3230-3239.

Cornick, S., Tawiah, A., and Chadee, K. (2015). Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. Tissue Barriers *3*, e982426.

de Lau, W., Peng, W.C., Gros, P., and Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. Genes. Dev. *28*, 305-316.

Eigenbrodt, M.L., Eigenbrodt, E.H., and Thiele, D.L. (1990). Histologic similarity of murine colonic graft-versus-host disease (GVHD) to human colonic GVHD and inflammatory bowel disease. Am. J. Pathol. *137*, 1065-1076.

Eriguchi, Y., Takashima, S., Oka, H., Shimoji, S., Nakamura, K., Uryu, H., Shimoda, S., Iwasaki, H., Shimono, N., Ayabe, T., *et al.* (2012). Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α-defensins. Blood *120*, 223-231.

Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., *et al.* (2013). Commensal microbederived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. Nature *504*, 446-450.

Gale, R.P., and Champlin, R.E. (1984). How does bone-marrow transplantation cure leukaemia? Lancet *2*, 28-30.

Ganz, T., Selsted, M.E., and Lehrer, R.I. (1990). Defensins. Eur J Haematol *44*, 1-8. Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., *et al.* (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. Nature *529*, 226-230.

Gerbitz, A., Schultz, M., Wilke, A., Linde, H.J., Schölmerich, J., Andreesen, R., and Holler, E. (2004). Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. Blood *103*, 4365-4367.

Gersemann, M., Becker, S., Kübler, I., Koslowski, M., Wang, G., Herrlinger, K.R., Griger, J., Fritz, P., Fellermann, K., Schwab, M., *et al.* (2009). Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. Differentiation *77*, 84-94.

Grogan, D. (2015). The microbes within. Nature 518, S2.

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., *et al.* (2012). Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. Immunity *37*, 339-350.

Hayase, E., Hashimoto, D., Nakamura, K., Noizat, C., Ogasawara, R., Takahashi, S., Ohigashi, H., Yokoi, Y., Sugimoto, R., Matsuoka, S., *et al.* (2017). R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. J. Exp. Med. *214*, 3507-3518.

Heimesaat, M.M., Nogai, A., Bereswill, S., Plickert, R., Fischer, A., Loddenkemper,
C., Steinhoff, U., Tchaptchet, S., Thiel, E., Freudenberg, M.A., *et al.* (2010).
MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease. Gut *59*, 1079-1087.

Hill, G.R., and Ferrara, J.L. (2000). 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.

Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., *et al.* (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell *139*, 485-498.

Jenq, R.R., Ubeda, C., Taur, Y., Menezes, C.C., Khanin, R., Dudakov, J.A., Liu, C., West, M.L., Singer, N.V., Equinda, M.J., *et al.* (2012). Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. J. Exp. Med. *209*, 903-911.

Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. Bone Marrow Transplant. *48*, 452-458.

Klein, J.P., Rizzo, J.D., Zhang, M.J., and Keiding, N. (2001). Statistical methods for the analysis and presentation of the results of bone marrow transplants. Part 2: Regression modeling. Bone Marrow Transplant. *28*, 1001-1011.

Levine, J.E., Huber, E., Hammer, S.T., Harris, A.C., Greenson, J.K., Braun, T.M., Ferrara, J.L., and Holler, E. (2013). Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality. Blood *122*, 1505-1509.

Levy, D.A., and Wefald, A. (1986). Gut mucosal mast cells and goblet cells during acute graft-versus-host disease in rats. Ann. Inst. Pasteur. Immunol. *137D*, 281-288. Masuda, K., Sakai, N., Nakamura, K., Yoshioka, S., and Ayabe, T. (2011).

Bactericidal activity of mouse α -defensin cryptdin-4 predominantly affects noncommensal bacteria. J. Innate Immun. *3*, 315-326.

Mathewson, N.D., Jenq, R., Mathew, A.V., Koenigsknecht, M., Hanash, A., Toubai, T., Oravecz-Wilson, K., Wu, S.R., Sun, Y., Rossi, C., *et al.* (2016). Gut microbiomederived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graftversus-host disease. Nat. Immunol. *17*, 505-513.

Munneke, J.M., Björklund, A.T., Mjösberg, J.M., Garming-Legert, K., Bernink, J.H., Blom, B., Huisman, C., van Oers, M.H., Spits, H., Malmberg, K.J., *et al.* (2014). Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft-versus-host disease. Blood *124*, 812-821.

Nowarski, R., Jackson, R., Gagliani, N., de Zoete, M.R., Palm, N.W., Bailis, W., Low, J.S., Harman, C.C., Graham, M., Elinav, E., *et al.* (2015). Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. Cell *163*, 1444-1456.

Okumura, R., Kurakawa, T., Nakano, T., Kayama, H., Kinoshita, M., Motooka, D., Gotoh, K., Kimura, T., Kamiyama, N., Kusu, T., *et al.* (2016). Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. Nature *532*, 117-121.

Pelaseyed, T., Bergström, J.H., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Birchenough, G.M., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Nyström, E.E., *et al.* (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. Immunol. Rev. *260*, 8-20.

Peled, J.U., Devlin, S.M., Staffas, A., Lumish, M., Khanin, R., Littmann, E.R., Ling, L., Kosuri, S., Maloy, M., Slingerland, J.B., *et al.* (2017). Intestinal Microbiota and Relapse After Hematopoietic-Cell Transplantation. J. Clin. Oncol. *35*, 1650-1659.

Przepiorka, D., Weisdorf, D., Martin, P., Klingemann, H.G., Beatty, P., Hows, J., and Thomas, E.D. (1995). 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone Marrow Transplant. *15*, 825-828.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., *et al.* (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature *464*, 59-65.

Sale, G.E., Shulman, H.M., McDonald, G.B., and Thomas, E.D. (1979). Gastrointestinal graft-versus-host disease in man. A clinicopathologic study of the rectal biopsy. Am. J. Surg. Pathol. *3*, 291-299.

Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., Teggatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., *et al.* (2010). Enteric defensions

are essential regulators of intestinal microbial ecology. Nat. Immunol. 11, 76-83.

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., *et al.* (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature *459*, 262-265.

Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., McNiff, J., Robert, M.E., Liu, J., Shlomchik, M.J., and Emerson, S.G. (1999). Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. Science *285*, 412-415.

Shono, Y., Docampo, M.D., Peled, J.U., Perobelli, S.M., Velardi, E., Tsai, J.J., Slingerland, A.E., Smith, O.M., Young, L.F., Gupta, J., *et al.* (2016). Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. Sci. Transl. Med. *8*, 339ra371.

Shulman, H.M., Cardona, D.M., Greenson, J.K., Hingorani, S., Horn, T., Huber, E., Kreft, A., Longerich, T., Morton, T., Myerson, D., *et al.* (2015). NIH Consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. The 2014 Pathology Working Group Report. Biol. Blood Marrow Transplant. *21*, 589-603.

Smith, N.R., Davies, P.S., Silk, A.D., and Wong, M.H. (2012). Epithelial and mesenchymal contribution to the niche: a safeguard for intestinal stem cell homeostasis. Gastroenterology *143*, 1426-1430.

Takashima, S., Kadowaki, M., Aoyama, K., Koyama, M., Oshima, T., Tomizuka, K., Akashi, K., and Teshima, T. (2011). The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. J. Exp. Med. *208*, 285-294.

Taur, Y., Jenq, R.R., Perales, M.A., Littmann, E.R., Morjaria, S., Ling, L., No, D., Gobourne, A., Viale, A., Dahi, P.B., *et al.* (2014). The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood *124*, 1174-1182.

Teshima, T., Maeda, Y., and Ozaki, K. (2011). Regulatory T cells and IL-17producing cells in graft-versus-host disease. Immunotherapy *3*, 833-852.

Teshima, T., Ordemann, R., Reddy, P., Gagin, S., Liu, C., Cooke, K.R., and Ferrara, J.L. (2002). Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. Nat. Med. *8*, 575-581.

Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K.M., Ruhn, K.A., Yu, X., Koren, O., Ley,

R., Wakeland, E.K., and Hooper, L.V. (2011). The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. Science *334*, 255-258.

von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.E., and Locksley, R.M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. Nature *529*, 221-225. Zhao, D., Kim, Y.H., Jeong, S., Greenson, J.K., Chaudhry, M.S., Hoepting, M., Anderson, E.R., van den Brink, M.R., Peled, J.U., Gomes, A.L., *et al.* (2018).

Survival signal REG3a prevents crypt apoptosis to control acute gastrointestinal graft-versus-host disease. J. Clin. Invest. *128*, 4970-4979.