HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	腸管リンパ管内皮細胞はR-Spondin3を産生する［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	小笠原, 励起
Description	配架番号：2368
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12989号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70365
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Reiki_Ogasawara_abstract.pdf, 論文内容の要旨

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　小笠原　励起

学 位 論 文 題 名

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)

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

腸上皮は腸幹細胞から分化しており、腸管GVHDでは腸幹細胞が傷害されることで腸上皮、粘膜の防御機構が破たんする(Takashima, J Exp Med 2011)。さらに、腸管の抗菌ペプチド産生細胞であるPaneth細胞が減少することによって、腸内細菌叢の異常がおこり、GVHDの悪化や感染症の発症につながる(Eriguchi, Blood 2012, Hayase, J Exp Med 2017)。R-Spondinそのレセプターであるlgr5に結合し、WNT/βカテニンシグナルを強力に促進することで、腸幹細胞の自己複製と分化を促す。R-Spondinファミリーには構造相同性の高い4つの蛋白であるR-Spondin1, 2, 3, 4のサブタイプがある。私たちは今までに、リコンビナントヒトR-Spondin1の投与がLgr5陽性の腸幹細胞と、腸幹細胞から分化し抗菌ペプチドを産生するPaneth細胞を保護することで同種造血幹細胞移植後のGVHDを改善させることを示した(Takashima, J Exp Med 2011, Hayase, J Exp Med 2017)。しかしながら、腸管のどの細胞が内因性のR-Spondinを産生するのかは明らかでない。本研究では、腸管でのR-Spondinの産生細胞を特定し、その細胞の造血幹細胞移植での変化を研究することを目的とした。

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

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

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

【結果】マウス小腸から抽出したmRNAで定量PCRを行い、R-Spondinのうち、R-Spondin3の発現が最も高く、小腸蛋白抽出液のWestern blottingでもR-Spondin3蛋白を検出した。小腸の上皮細胞、血液細胞、非上皮非血液細胞を純化し、定量PCRで解析すると、小腸非上皮非血液細胞でR-Spondin3が発現していた。

非上皮非血液細胞を上皮細胞マーカーである CD31 と間葉系細胞マーカーである CD90 によりさらに分け、それぞれの細胞群について定量 PCR を行ったところ、CD90+CD31+細胞群が最も高く R-Spondin3 を発現していた。この非上皮非血液 CD90+CD31+細胞は podoplanin や LYVE-1 のリンパ内皮のマーカーを発現しており、リンパ内皮細胞であると同定した。純化したリンパ内皮細胞の免疫蛍光染色と ELISA により、この細胞が蛋白レベルで R-Spondin3 を産生していることを確認した。小腸の固有粘膜層、漿膜層に分離し、フローサイトメトリーで解析したところ、リンパ内皮細胞は固有粘膜層に優位に存在していた。

さらに、マウス造血幹細胞移植モデルにおいては、同種移植群で naïve 群もしくは同系移植群よりも小腸リンパ内皮細胞が減少していた。小腸蛋白抽出液の Western blotting において、R-Spondin3 蛋白は同系移植群と比べ、同種移植群で減少していた。小腸リンパ内皮細胞の R-Spondin3 の発現は同系移植群と同種移植群で差を認めなかった。

【結論】本研究の成果から、 マウス小腸においては R-Spondin ファミリーのうち、R-Spondin3 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-Spondin3 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つきとめた。 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-Spondin3 の産生も減少していることを発見し、この内因性 R-Spondin3 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