HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	荒, 隆英
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2436 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13422号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74305
Type	doctoral thesis
File Information	Takahide_Ara_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　(要　約)

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　(要　約)

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

【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、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病態生理における意義を明らかにし、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消化管 GVHD 防御に関する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、致死量の放射線照射または抗癌剤投与を前処置として行なっ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 $5x10^6$ の骨髄細胞および5または $10x10^6$ 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。マウスにおける大腸杯細胞の多寡は、アルシアンブルー染色切片を用いて、全粘膜に対する杯細胞の面積比で数値化して評価した。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。ヒトにおける大腸杯細胞の多寡についてはヘマトキシリン・エオジン染色切片を用いて、陰窩の断面における全上皮細胞数に対する大腸杯細胞数の比で数値化して評価した。

【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。この現象は前処置が放射線・化学療法いずれにおいても認められ、大腸杯細胞の傷害は消化管 GVHD 特有の現象であることが示唆された。また、移植後の便中 Mucin 量を測定したところ、Allo 群で有意に上昇しており、GVHD による大腸杯細胞の傷害を反映していると考えられた。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-γ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 Lypd8 の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。その一方で移植を行なった場合の免疫染色では、Syn 群で Naïve 群と同様の部位に Lypd8 が保たれるのに対して、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 を用いて大腸粘膜上皮細胞での *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(KO)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ており、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 IFN-γ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 してから移植を行なっても、同様に KO 群の予後は WT 群に比較して不良であり、両者の移植前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。一方、移植前に *Lypd8* KO レシピエントに IL-25 を投与しても、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。生検施行群と未施行群で患者背景に大きな差はみられなかったが、GVHD grade と消化管 GVHD stage は生検施行群で高く、より重症な GVHD 合併を認めた。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 の重症度に負の相関を示し、治療によって消化管 GVHD が寛解になった際には杯細胞数も回復していた。また、重度に大腸杯細胞が傷害を受けていた群は軽度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、大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増殖させると、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 *Lypd8*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。