



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肝臓GVHDは、TGF β を介してオルガノイド形成肝臓幹細胞を標的とする [全文の要約]
Author(s)	長谷川, 祐太
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：2636 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14616号
Issue Date	2021-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82965
Type	doctoral thesis
File Information	Yuta_Hasegawa_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

肝臓 GVHD は、TGF β 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)

2 0 2 1 年 6 月

北 海 道 大 学

長 谷 川 祐 太

Yuta Hasegawa

学 位 論 文 (要約)

肝臓 GVHD は、TGF β 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)

2 0 2 1 年 6 月

北 海 道 大 学

長 谷 川 祐 太

Yuta Hasegawa

【背景と目的】

同種造血細胞移植(hematopoietic cell transplantation : HCT)は、血液悪性疾患、骨髄不全症候群、遺伝性免疫不全症、先天性代謝異常症に対する根治的治療法であるが、治療に関連した様々な合併症が問題となる。移植片対宿主病(graft-versus-host disease : GVHD)はその中でも重要な合併症の一つであり、時に致死的となりうるため、病態の解明や新規治療法の開発が急務である。肝臓は、皮膚・腸管と共に急性GVHDの主要な標的臓器である。肝臓GVHDの特徴的な組織所見は、門脈域への炎症細胞浸潤と胆管上皮傷害であり、様々な程度の肝実質病変を伴う。肝細胞は高い再生能力を有するのに対して、胆管上皮細胞(biliary epithelial cell: BEC)の再生能力には限界があり、胆管上皮傷害が遷延すると胆管消失症候群を引き起こす可能性がある。近年、組織特異的な組織幹細胞からの再生によって組織恒常性が保たれていることが明らかになっている。Lgr5 (leucine-rich repeat containing G-protein-coupled receptor 5) 陽性腸幹細胞は腸管粘膜上皮細胞を継続的に更新しており、毛包内のLgr5⁺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いる。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、肝障害時に門脈域周囲から肝細胞とBECの両者への分化能を持つLgr5陽性細胞が出現するが、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マウスモデルと肝臓オルガノイド培養系を用いて、肝臓における組織幹細胞の動態と役割について検討を行い、肝臓幹細胞を標的とした新規治療法の検討を行った。

【材料と方法】

マウスの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 5×10^6 個と骨髄細胞 5×10^6 個を輸注した。SMAD2/3の阻害を介してTGF β レセプターのシグナルを阻害するSB-431542投与実験では、5mg/kgをHCT後day+14からday+28まで投与した。Lgr5リガンドかつWnt作動薬であるリコンビナントヒトR-Spondin1 (R-Spo1)投与実験では、10mg/kgを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小断片化した上で200 fragment/wellで播種し、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】

HCT後Allo群でday+7より門脈域へのマクロファージやT細胞の浸潤を認め、cleaved Caspase3陽性BECが有意に増加し、アポトーシスに陥っていた。また胆管

障害を反映して BEC での MMP7 の発現が上昇し、血漿ビリルビン濃度の上昇を認めた。HCT 後 day+70 には肝細胞マーカー及び BEC マーカーの両方を有する BEC が出現しており、胆管上皮再生に際し、多分化能を有する肝臓幹細胞の出現が示唆された。BDF1-Lgr5-eGFP マウスをレシピエントとして、HCT 後肝臓の Lgr5⁺肝臓幹細胞の動態を検討したところ、HCT 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、HCT 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、HCT 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、肝臓 GVHD では Lgr5⁺肝臓幹細胞をはじめとする、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。肝臓オルガノイド形成に対するサイトカインの影響を検討したところ、IFN γ や TNF α を添加ではオルガノイド形成能は保たれていた一方、TGF β 1 は肝臓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 TGF β 1 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、TGF β 1 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 TGF β 1 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 群から LMCs では抑制は見られなかった。また、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、HCT 後 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 シグナル増強によって Lgr5⁺幹細胞の増殖に寄与する R-Spo1 を同種 HCT 後に投与したところ、day+28 に残存する Lgr5⁺肝臓幹細胞が保護され、肝臓オルガノイド形成能が有意に改善した。

【考察】

GVHD では、成熟した上皮細胞だけでなく組織幹細胞も標的となることで、組織の恒常性が損なわれて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 HCT 後の動態や役割はこれまで不明であった。本研究では、Lgr5⁺肝臓幹細胞が 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が判明した。これは、GVHD によって引き起こされた損傷を修復するために Lgr5⁺組織幹細胞が誘導されるものの、その後 GVHD によって破壊されていると考えられる。

これまで様々な肝臓幹細胞が報告されており、EpCAM、TROP2、SOX9、Lgr4 などのマーカーを用いて同定されてきた。しかしながらこうしたマーカーは、成熟胆管上皮

や中心静脈周囲の肝細胞などでも発現しており、マーカーを用いた肝臓幹細胞の定量は困難であった。そこで、我々は、HCT 後の肝臓幹細胞の動態を評価するために肝臓オルガノイド培養系を利用した。Lgr5⁺肝臓幹細胞の動態と一致するように、オルガノイド形成能はHCT 後に一過性に増加し、その後消退した。

我々はこれまでに、GVHD における腸幹細胞の消失や腸管オルガノイドのアポトーシス誘導において、IFN γ シグナル伝達が重要な役割を果たしており、ルキシソリチニブは IFN γ を介した腸管幹細胞およびオルガノイドの形成能を維持することが示された。同様に皮膚 GVHD による皮膚幹細胞の傷害も、ルキシソリチニブによって抑制されることも報告している。本研究では、肝臓オルガノイドは IFN γ に対して耐性があり、TGF β 1 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 TGF β 1 シグナル阻害は、オルガノイド形成性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することが知られている。我々はマウス腸管 GVHD において、R-Spo1 投与で Lgr5⁺腸幹細胞の増殖を促進し、GVHD を改善することを報告している。本研究では、同種 HCT 後に R-Spo1 を投与することで、肝臓 Lgr5 陽性細胞の増殖を促進し、HCT 後 day+28 に Lgr5⁺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。

MMP7 は、定常状態では肝外胆管と胆嚢上皮細胞で発現し、肝内 BEC では発現していない。近年、胆管障害時に MMP7 が肝内 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 BEC 傷害を反映して、HCT 後 day+28 に Allo 群で有意に MMP7 の発現が亢進していることから、MMP7 の血中および局所レベルが GVHD における BEC 傷害の特異的なバイオマーカーである可能性が示唆される。

【結論】

肝臓 GVHD では、マクロファージなどの炎症細胞が TGF β 1 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。TGF β 阻害剤及び、R-Spo1 は肝臓幹細胞を標的とする、新たな肝臓 GVHD 治療薬となりうる。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。