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［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

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文（要約）

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)

２０２１ 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、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)

２０２１ 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 x 10^{6} 個と骨髄細胞 5 x 10^{6} 個を輸注した。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 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、IFNγやTNFαを添加ではオルガノイド形成能は保たれていた一方、TGFβ1は肝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、IFNγシグナル伝達が重要な役割を果たしており、ルキソリチニブは IFNγ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 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 TGFβ1 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 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。TGFβ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。