



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
Author(s)	長谷川, 祐太
Description	配架番号 : 2636
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14616号
Issue Date	2021-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14616
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90074
Type	doctoral thesis
File Information	Yuta_Hasegawa.pdf



学 位 論 文

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

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)

2021 年 6 月

北 海 道 大 学

長 谷 川 祐 太

Yuta Hasegawa

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
実験方法	9 頁
実験結果	19 頁
考察	44 頁
総括および結論	48 頁
謝辞	49 頁
引用文献	50 頁

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。

Yuta Hasegawa, Daigo Hashimoto, Ryo Kikuchi, Zixuan Zhang, Hajime Senjo,
Tomoko Sekiguchi, Eiko Hayase, Takahiro Tatenno, Emi Yokoyama, Shuichiro
Takahashi, Xuanzhong Chen, Kazuki Yoneda, Hiroyuki Ohigashi, Takahide Ara,
Takanori Teshima

Title: GVHD targets organoid-forming liver stem cells via a TGF- β -dependent
manner

雑誌名 Immunity

要旨

【背景と目的】

移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) は同種造血細胞移植 (hematopoietic cell transplantation: HCT) における重要な合併症の一つであり、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 マウスモデルを用いて、肝臓幹細胞の動態や役割について検討を行い、また肝臓幹細胞を標的とする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 Al1o 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。

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。

Allo	allogeneic
ALB	albumin
ALT	alanine transaminase
AST	aspartate aminotransferase
ATP	adenosine triphosphate
Axin2	axis inhibition protein 2
BEC	biliary epithelial cell
cCasp3	cleaved caspase-3
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CK19	cytokeratin 19
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
GVHD	graft-versus-host disease
HCT	hematopoietic cell transplantation
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
H&E	hematoxylin and eosin
IFN- γ	interferon- γ
IL-2	interleukin-2
LAP	latency-associated peptide
LCK	lymphocyte protein tyrosine kinase
Lgr5	leucine-rich repeat containing G-protein-coupled receptor 5
LMCs	liver-infiltrating mononuclear cells
LPS	lipopolysaccharide
MHC	major histocompatibility complex

MMP7	matrix metalloproteinase 7
mRNA	messenger RNA
OGM	organoid growth medium
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RFP	Red fluorescent protein
R-Spo1	recombinant human R-Spondin1
rmIFN γ	recombinant mouse interferon- γ
rmTGF β 1	recombinant mouse transforming growth factor- β 1
rmTNF α	recombinant mouse tumor necrosis factor- α
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park memorial institute medium
Syn	syngeneic
TBI	total body irradiation
T-bil	total bilirubin
TGF β	transforming growth factor- β
TNF α	tumor necrosis factor- α
w/o	with out
18S rRNA	18S ribosomal RNA

緒言

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。

これまでに、マウスモデルを用いた研究により、急性GVHDの病態が飛躍的に解明されてきた。急性GVHDの病態生理は、移植前処置に伴う組織傷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傷害の3つのステップによって構成されている(Ferrara *et al.*, 2009)。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して、主に全身放射線照射および大量化学療法が移植前処置として施行される。前処置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。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-1 β 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- γ 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、組織傷害に寄与している。

肝臓は、皮膚・腸管と共に急性GVHDの主要な標的臓器の一つである。肝臓GVHDの特徴的な組織所見は、胆管上皮(biliary epithelial cell: BEC)傷害と門脈域への炎症細胞浸潤像であり、様々な程度の肝実質病変を伴う(Akpek *et al.*, 2002)。肝細胞は高い再生能力を有するのに対して、BECの再生能力には限界があり、重度の胆管障害時に胆管消失症候群を引き起こす可能性がある(Yeh *et al.*, 1994)。

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ることが明らかになってきた(Barker *et al.*, 2007; Metcalfe *et al.*, 2014)。Leucine-rich repeat containing G-protein-coupled receptor 5 (Lgr5) 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と創傷治癒のための新しい上皮細胞を供給している(Woo and Oro, 2011)。一方、肝臓では定常時に特定の組織幹細胞を必要とせず、中心静脈周囲の axis inhibition protein 2 (Axin2) 陽性肝細胞や、肝臓全体に分布するテロメラーゼを発現する肝細胞が増殖することで、局所での肝細胞の供給源となっている (Lin *et al.*, 2018)。一方で、広範囲な肝障害時には、門脈域周囲から Lgr5 陽性細胞が出現し、肝細胞と BEC の両方に分化することが知られている(Huch *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2017)。これまで我々は腸管および皮膚の組織幹細胞が GVHD のターゲットになることを報告してきたが(Fu *et al.*, 2019; Hanash *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 2018; Takashima *et al.*, 2011)、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。

今回我々は Lgr5 レポーターマウス、及び肝臓オルガノイドを用いることで、肝臓 GVHD において肝臓幹細胞が TGF β 1 を介して傷害されることで胆管障害が引き起こされることを初めて報告した。また、SMAD2/3 阻害薬である SB-431542 及び Wnt 作動薬である R-Spo1 が肝臓 GVHD の新規治療薬となりうることを示した。

現在、GVHD に関する診断・治療モニタリング・予後予測などに用いるバイオマーカーの探索が進められているが、これまで肝臓 GVHD に対する特異的なマーカーは報告されていない(Harris *et al.*, 2012; Adom *et al.*, 2020)。今回我々は MMP7 が肝臓 GVHD において BEC 傷害を反映して発現が上昇することを示し、MMP7 が肝臓 GVHD の疾患マーカーとなりうることを示した。

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})、DBA/2 (H-2^d) マウスを日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) より、BALB/c (H-2^d) マウスを日本チャールス・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) より購入した。また、B6-Lgr5-eGFP-creER^{T2} (B6-Lgr5-eGFP) マウス、B6. Cg-Gt (ROSA)-26Sor^{tm14(CAG-tdTOMATO)Hze/J} (B6-R26^{tdTomato}) マウス、及び B6. Cg-Tg (Lck-cre) 548Jxm/J (B6-Lck-cre) マウスを Jackson laboratory (Bar Harbor, ME) より購入し使用した。

遺伝子組み換えマウスに関しては下記用途に使用した。

B6-Lgr5-enhanced green fluorescent protein (eGFP) -internal ribosome entry site (IRES)-cre-estrogen receptor^{T2} (ER^{T2}) (B6-Lgr5-eGFP-creER^{T2})

上記マウスは Lgr5 陽性細胞に eGFP とタモキシフェンのみに結合するように改変された変異型エストロゲンレセプターである ER^{T2} と Cre 遺伝子組換え酵素の融合蛋白である CreER^{T2} を発現している (Barker *et al.*, 2007)。Lgr5 を発現している細胞が eGFP で標識されるため、免疫染色にて eGFP を染色し、Lgr5 陽性細胞の局在の確認と定量の際に使用した。

BDF1-Lgr5-eGFP-creER^{T2}

B6-Lgr5-eGFP-creER^{T2} マウスと DBA/2 マウスを掛け合わせて作成した。B6-Lgr5-eGFP-creER^{T2} マウスと同様、Lgr5 陽性細胞の局在の確認と定量の際に使用した。

B6. Cg-Gt (ROSA) 26Sor^{tm14(CAG-tdTOMATO)Hze/J} (B6-R26^{tdTomato})

第6染色体に存在する ROSA26 領域の CAG プロモーターの下流に、loxP 認識配列で挟まれた STOP コドンと赤色蛍光タンパク質 (Red Fluorescent Protein: RFP) である、tandem dimeric Tomato (tdTomato) の遺伝子を導入したマウスである。Cre 遺伝子組換え酵素が作用すると loxP で挟まれた STOP 配列が消失し、tdTomato が発現する (Madisen *et al.*, 2010)。

B6. *Cg-Tg[lymphocyte protein tyrosine kinase (Lck)-cre]548Jxm/J* (B6-*Lck-cre*)

T細胞に特異的に発現している *Lck* のプロモーター領域下に *Cre* 遺伝子組換え酵素を導入したマウスである。特定の遺伝子の flox マウスと交配することで、T細胞特異的に遺伝子組換えを施すことができる (Hennet *et al.*, 1995)。

B6-*Lck-cre* × B6-*R26^{tdTomato}*

上記、B6-*Lck-cre*マウスとB6-*R26^{tdTomato}*マウスを掛け合わせて作成した。T細胞特異的にtdTomatoを発現するため、T細胞のレポーターマウスとして使用できる。このマウスをドナーとして用いて、HCT後のドナー由来のT細胞の局在を評価するために使用した。

これらのマウスは本学の動物実験施設にて繁殖飼育し、全ての実験で8~12週齢時に実験を行った。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：2017-036）の承認を得て行った。

2) 薬剤

遺伝子組換えヒト R-Spo1：ヒト R-Spo1 をコードする cDNA を含む pcDNA3.1/Intron construct を遺伝子導入した Chinese Hamster Ovary 細胞を培養し、酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) とウエスタンブロットでヒト R-Spo1 レベルを評価し、カラムを用いて純化したものを協和発酵キリン株式会社より提供を受け使用した (Kim *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007)。R-Spo1 を 10mg/ml の濃度で 1×リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline: PBS) に溶解し、HCT 後 day+14 から day+28 まで 10mg/kg で週 3 回腹腔内投与を行った。

SB-431542：SB-431542 (LC Laboratories, Woburn, MA) は TGF β の Type I レセプターの ALK5 を介した SMAD2/3 のリン酸化を選択的に阻害する薬剤である (Callahan *et al.*, 2002)。SB-431542 は PBS に混合した 1% DMSO (Sigma-Aldrich) に 0.5mg/ml の濃度で溶解し、同種 HCT 後の day+14 から day+28 まで 5mg/kg を連日腹腔内投与した。

2. 方法

1) マウス同種造血細胞移植

レシピエントに BDF1、ドナーに主要組織適合遺伝子複合体 (Major histocompatibility complex: MHC) が半合致である B6 を用いた同種移植 (Allogeneic 群: Allo 群) と、ドナーに BDF1 を用いた同系移植 (Syngeneic 群: Syn 群) を行った。

ドナーマウスをイソフルラン吸入で麻酔して安楽死させ、両側大腿骨、脛骨、骨盤骨及び脾臓を摘出した。摘出した脾臓は滅菌済みのスライドガラスですりつぶし、70 μm セルストレイナーを通して RPMI1640 (Sigma-Aldrich) + 4% FCS (Selborne, Tasmania, Australia) を用いて細胞浮遊液にした。大腿骨・脛骨・骨盤骨は、両側先端を切断し、23 ゲージ針と 1ml シリンジを用いて RPMI1640 + 4% FCS で骨髓細胞を押し出し、70 μm セルストレイナーを通して細胞浮遊液とした。その後、脾臓細胞、骨髓細胞浮遊液に Lysing Buffer (BD Bioscience, San Jose, CA) を用いて溶血処理を行い、トリパンブルー法により生細胞数をカウントした。細胞数をカウントした後に、細胞浮遊液を遠心して上清を破棄し、レシピエント 1 匹あたり、脾臓細胞 5×10^6 個と骨髓細胞 5×10^6 個を PBS 250 μl で希釈し、移植片として使用した。

移植細胞を輸注するレシピエントマウスには 8~12 週齢の雌マウスを使用した。移植前処置として、移植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 Gy を 4 時間間隔の 2 分割照射で施行した。照射 2 時間後に移植片を 1 匹あたり 250 μl ずつ静脈内投与した。

HCT 後のマウスは specific pathogen-free 環境下で、通常の餌と、高圧蒸気滅菌を施し塩酸で pH 2.5 に調整した滅菌酸性水で飼育した。HCT 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)。(表 1)

表1: Assessment of Clinical GVHD in Transplanted Animals

Criteria	Grade 0	Grade 1	Grade 2
Weight loss	<10%	>10% to <25%	>25%
Posture	Normal	Hunching noted only at rest	Severe hunching impairs movement
Activity	Normal	Mild to moderately decreased	Stationary unless stimulated
Fur texture	Normal	Mild to moderately ruffling	Severe ruffling/poor grooming
Skin integrity	Normal	Scaling of paws/tail	Obvious areas of denuded skin

2) マウス肝臓の摘出

マウスをイソフルランの吸入によって安楽死させ、胸郭を開けて心臓を露出し、下大静脈・門脈を切断後、左心室より 10ml の PBS で還流を行った後に肝臓を摘出した。摘出した肝臓のうち、右葉を肝臓オルガノイドの作成、左葉は組織標本の作成に使用した。また尾状葉の一部 (5mm 角程度) を定量リアルタイム PCR の実験に用いた。フローサイトメトリー解析には肝臓全体を使用した(図 1)。

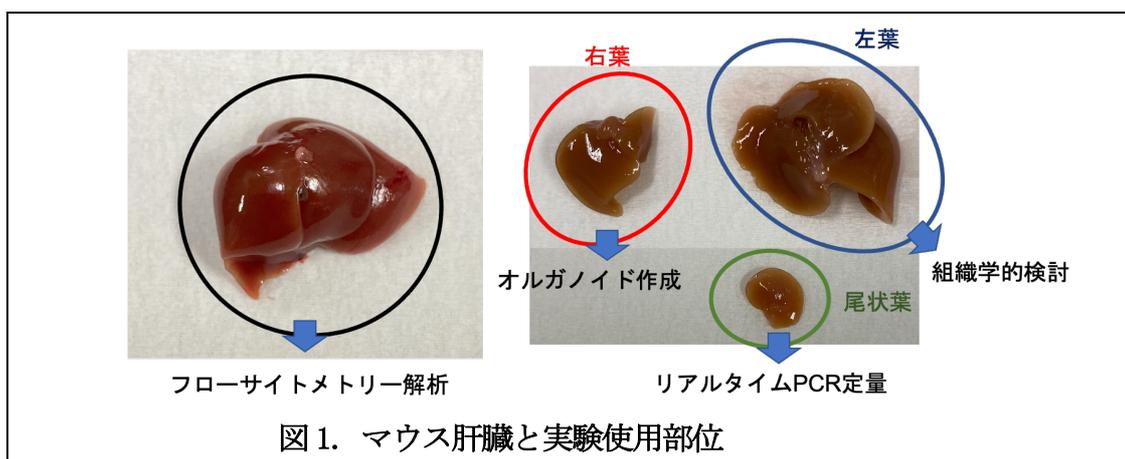
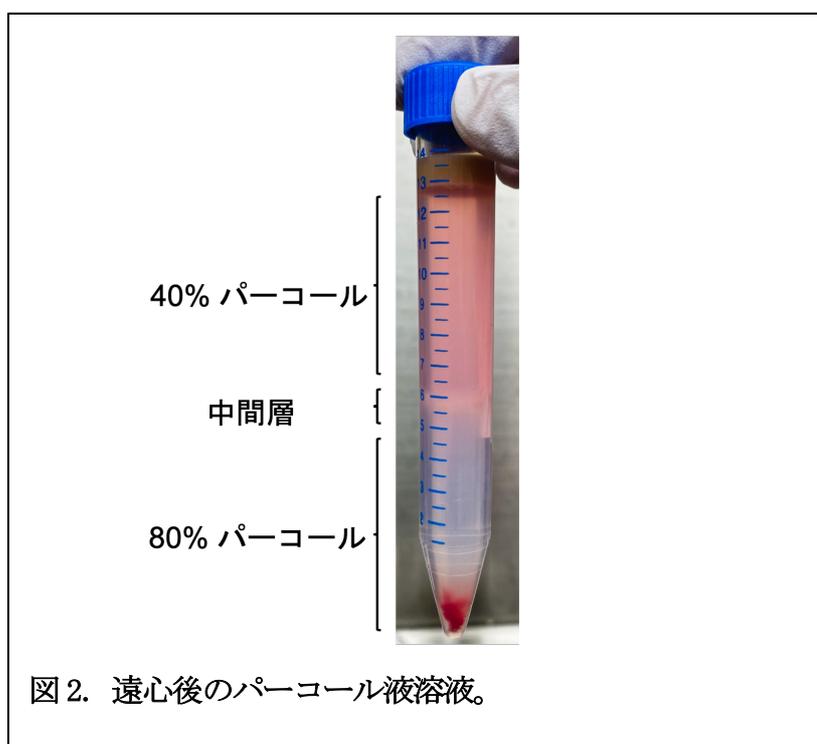


図 1. マウス肝臓と実験使用部位

3) マウス肝臓からの肝臓浸潤単核細胞(liver-infiltrating mononuclear cells: LMCs)の単離

4 mg/ml の濃度の collagenase typeIV (Sigma-Aldrich) を含む RPMI1640 + 4% FCS を 6ml 加えた 6-well plate に、採取した肝臓を入れ、剪刀を用いて 1-2 mm

片に細かく切り刻み、37°Cで1時間静置した。その後、細胞浮遊液を3ml シリンジと19ゲージ針を用いて混和し、70 μ mのセルストレーナーを通して50mlチューブに回収した。回収した細胞浮遊液を4°C、2000回/分、5分間で遠心し、上清を慎重に破棄して細胞ペレットを得た。得られたペレットをRPMI1640で調整した40%パーコール液(GE Healthcare, Tokyo Japan)8mlでよく混和し、15mlチューブに回収した。パスツールピペットを用いて、PBSで調整した80%パーコール液5mlを15mlチューブの底にゆっくりと加え2層の濃度の異なるパーコール液溶液を作成した。その後、2800回/分、20分、室温で遠心し、上層をサクションで取り除き、中間層を1mlピペットでゆっくり吸引し細胞液層を回収した(図2)。Lysing Bufferを用いて溶血処理を行い、トリパンブルー法により生細胞数をカウントした。



4) フローサイトメトリーによる解析

表2に示した抗体を使用し、細胞表面抗原の染色を行った。具体的には、各種抗体をFlow buffer (PBS + 2% FCS + 2 μ mol EDTA)で200倍に希釈し抗体カクテルを作成し、肝臓から単離した細胞に抗体カクテルを加え、4°C、30分間静置させることで反応させた。抗F4/80抗体を含んだ抗体カクテルに関しては、一次染色の後に抗Streptavidin抗体をFlow bufferで200倍に希釈し、4°C、30分間静置させ二次染色を行った上で解析した。

また、肝臓から単離した細胞のTGF β 1産生を評価するため、細胞質内のTGF β 1を蛍光抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。具体的には、細胞表面抗原の染色後に、Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて、細胞の固定と透過処理を行い、一晚4°Cで静置した後、抗TGF β 1抗体をPerm bufferで200倍に希釈して染色し解析を行った。

反応後は、FACS CantoII (BD Biosciences, San Jose, CA)もしくは、FACS ARIAIIII (BD Biosciences, San Jose, CA)及び、FlowJo software (Tree Star, Inc.)を用いて解析した。

表 2. フローサイトメトリーで使用した抗体および試薬

抗原	クローン	標識	販売元	カタログ番号
H2-Kb	AF6-88.5	FITC	BD Pharmingen	553569
Ly-6C	HK1.4	FITC	BioLegend	128006
TCRb	H57-597	FITC	BD Pharmingen	553171
CD8a	53-6.7	PE	BD Pharmingen	553033
H2-Kd	SF1-1.1	PE	BD Pharmingen	553566
Ly-6G	1A8	PE	BioLegend	127608
CD11b	M1/70	PerCP/Cy5.5	BioLegend	101228
CD4	GK1.5	PE/Cy7	BioLegend	100422
CD11c	N418	APC	BioLegend	117310
PD-1	J43	APC	BD Pharmingen	562671
TCRb	H57-597	APC	BD Pharmingen	553174
CD45	30-F11	APC-Cy7	BD Pharmingen	557659
Fixable Viability Stain 780		APC-Cy7	BD Horizon	565388
I-A/I-E	M5/114.15.2	BV510	BioLegend	107635
CD8a	53-6.7	BV510	BioLegend	100752
TGFb1	TW7-16B4	BV510	BioLegend	141408
Tru Stain FcX	2.4G	Purified	BioLegend	101320
CD45	30-F11	BV711	BD Pharmingen	563709
CD8a	53-6.7	BV711	BioLegend	100747
Streptavidin		PE/Cy7	BioLegend	405206
F4/80	BM8	Biotin	BioLegend	123106

5) autoMACS® Pro Separator (Miltenyi Biotec, Tokyo, Japan) を用いた T 細胞の単離

単離した LMCs を 1500 回/分, 4°C で 5 分間遠心し上清を破棄した。総細胞数: 1×10^6 個につき $4 \mu\text{l}$ の MACS® Buffer (Miltenyi Biotec) でペレットを混和させ、総細胞数 1×10^6 個につき $1 \mu\text{l}$ の MACS® pan-T antibody cocktail (Miltenyi Biotec) を添加した。4°C で 5 分間静置した後、総細胞数 1×10^6 個につき $3 \mu\text{l}$ の MACS® Buffer で混和し、 1×10^6 個につき $2 \mu\text{l}$ の MACS® anti-biotin Microbeads (Miltenyi Biotec) を加え、4°C で 10 分間静置した。10ml の MACS® Buffer を加え、4°C, 1500 回/分, 5 分間遠心分離を行い、上清を吸引し破棄した後、再度 5ml の MACS® Buffer を加えて、autoMACS® Pro Separator を使用して、negative selection で T 細胞を単離した。また、positive selection された検体を non T 細胞集団として回収した。

6) 組織標本作製、蛍光免疫染色

パラフィン標本の作成: HCT 後のマウスから PBS で灌流処理を行った後に肝臓を摘出し、左葉を分離し 4% パラフォルムアルデヒドで 2~6 時間固定した。固定後は札幌総合病理研究所 (Sapporo, Japan) に依頼し、パラフィンブロックの作成及び、hematoxylin and eosin (H&E) 染色標本と未染色標本を作成した。

蛍光免疫染色: 未染色標本をキシレンとエタノールを用いて脱パラフィンした後に抗原賦活用クエン酸緩衝液 (Agilent, Santa Clara, CA) に切片を浸し、105 °C、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。賦活化後に PBS で賦活化液を洗浄し、10 %ヤギ血清 (NICHIREI BIOSCIENCE INC., Tokyo, Japan) を用いて 30 分間ブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、各種一次抗体を 1:400 に希釈して各標本に加え、4°C、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 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, Carlsbad, CA.) を PBS で $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈して用いた。使用した抗体及び試薬は表 2 に示す。

H&E 染色標本は顕微鏡用デジタルカメラ (DP20; Olympus) を搭載した、顕微鏡 (BX50; Olympus) で観察及び撮影を行った。蛍光免疫染色標本の観察と撮影は、confocal laser microscope (FV-1000D; Olympus) もしくはオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X800; Keyence) を使用した。画像解析は imageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて行った。

表 3. 免疫染色で使用した抗体及び試薬

一次抗体

抗原	クローン	販売元	カタログ番号
Active Caspase 3	polyclonal	Abcam	ab2302
Albumin	polyclonal	SIGMA-Aldrich	SAB3500217
CK19	EPNCIR127B	Abcam	ab133496
CK19	TROMA-3	SIGMA-Aldrich	MABT913
F4/80	BM8	BioLegend	123106
GFP	polyclonal	Abcam	ab13970
MMP7	polyclonal	Abcam	ab5706
RFP	polyclonal	Abcam	ab34771
SMAD2/3	D7G7	Cell signaling Technology	8685S
TGFb1	polyclonal	Abcam	ab92486

二次抗体及び試薬

抗原	標識	販売元	カタログ番号
chicken IgG	Alexa Fluor 488	Life Technologies	A-11039
rabbit IgG	Alexa Fluor 488	Life Technologies	A-11034
rabbit IgG	Alexa Fluor 555	Life Technologies	A-21428
rat IgG	Alexa Fluor 555	Life Technologies	A-21434
Streptavidin	Alexa Fluor 555	Life Technologies	S-32355
rat IgG	Alexa Fluor 647	Life Technologies	A-21247

7) 肝臓 GVHD の重症度の組織学的評価

肝臓 GVHD の重症度を定量化する目的で、既報(Ichiba *et al.*, 2003)の liver GVHD pathological score を用いて検討を行った。このスコアリングモデルでは、門脈への炎症細胞浸潤による拡大、胆管へのリンパ球浸潤、胆管上皮のアポトーシス、胆管上皮脱落、血管内皮炎、肝実質のアポトーシス、微小膿瘍、Mitosis、胆汁うっ滞、脂肪肝の 10 項目を 0~4 点で点数化し合計したものをを用いた。

8) マウス生化学検査

HCT後のマウスから採血を行い、ヘパリン 5U を加えたエッペンチューブに移し、4°C、4000 回/分、10 分で遠心し上清を回収した。回収した上清を再度 4°C、4000 回/分、10 分で遠心した後に血漿を回収した。回収した血漿は、オリエンタル酵母工業株式会社 (Shiga, Japan) に生化学検査を依頼した。

9) 定量リアルタイム PCR

HCT後のマウスの肝臓尾状葉を 5 mm 角程度に切り出し、Tissue Ruptor (QUIAGEN, Hilden, Germany) を用いて粉碎し、ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan) で RNA を抽出した。抽出した RNA は NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) で RNA 量を測定し、RNA 500ng もしくは 1,000ng を用いて各サンプルから cDNA を作製した。cDNA 作製には ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo, Osaka, Japan) を使用した。

primer / probe セットとして、*Ifng* (Mm01178820_m1)、*Tnfa* (Mm00443260_g1)、*Mmp7* (Mm01168134_m1)、*Tgfb1* (Mm01178820_m1) を使用し、TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いてリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR は StepOne Plus real time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて施行した。内在性コントロールとしての 18S ribosomal RNA (18SrRNA) primer / probe は forward primer: 5' -GCTCTTCTCGATTC CGTGGG-3'、reverse primer: 5' -ATGCCAGAGTCTCGTTTCGTTATC-3'、probe: FAM- CTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACC-TAMRA (Sigma-Aldrich) を使用した。標的遺伝子の mRNA 発現レベルは 18SrRNA をコントロールとして、delta Ct 法にて定量的に評価した。

10) 肝臓オルガノイド作製

HCT後のマウスから肝臓右葉を採取し、剪刀を用いて小片に切断した。10 ml の DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) 中に、0.125 mg/ml collagenase type IV (Sigma-Aldrich)、0.125 U/ml Dispase (STEMCELL Technologies, Cambridge, MA)、および 11.25 mM の HEPES (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含んだ分離カクテル液を作成し、肝臓右葉小片に加え 37°C で 20 分間培養した。上清を一度破棄し、再度分離カクテル液を加え、37°C で 20 分間培養した後にピペットで攪拌し、上清を回収した。分離カクテル液による培養と上清回収工程を計 4 回繰り返した。その後、回収した上清中の浮遊粒子を 70 μm のセルストレーナーを通した後、40 μm のセルストレーナーを用いて回収し、4°C、300g、

5 分間遠心しペレットにした。30 μ l の Corning Matrigel Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix, Phenol Red-free, LDEV-free (Corning Life Sciences, Pittsburgh, PA) を用いて再懸濁し、24-well plate に分注してドーム (50 μ l/well) を形成した。37°C で 10 分間培養してドームを硬化させた後、HepatiCult OGM Mouse Supplement (STEMCELL Technologies) を添加した HepatiCult™ organoid Growth Medium (STEMCELL Technologies) 750 μ l を加えた。その後、CO₂ インキュベーターで培養し、肝臓オルガノイドを作成した。

オルガノイド形成に対する IFN γ 、TNF α および TGF β 1 の影響を検討するために、Naïve BDF1 マウスの肝臓から作製したオルガノイドを、rmTNF α (R&D systems, Minneapolis, MN)、rmIFN γ (BioLegend, San Diego, CA) および rmTGF β 1 (BioLegend) の存在下または非存在下で、24-well plate 上に 200 fragments/well の濃度で播種した。rmTNF α および rmIFN γ の濃度は 1~100 ng/ml の範囲で添加し、rmTGF β 1 の濃度は 0.1~1 ng/ml の範囲で添加した。培養開始 4 日後に 200 μ m 以上のオルガノイドの形成数を定量した。

11) 肝臓オルガノイドと LMCs の共培養

オルガノイドおよび LMCs の共培養は、ALyS705 培地 w/o IL-2 (Cell Science & Technology Institute, Inc; CSTI, Sendai, Japan) と HeptiCult OGM 培地の 1:1 混合液中で行った。LMCs は、同種移植 (Allo 群) または同系移植 (Syn 群) 後 day+28 にフローサイトメトリー解析時の実験方法と同様の手順で採取し、1 x 10⁵ 細胞/well の濃度でオルガノイドと共培養した。共培養開始 4 日後に 200 μ m 以上のオルガノイドの数を定量した。

12) 統計処理

2 群比較は Mann-Whitney U test を用いて検定した。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 \pm 標準誤差にて表記した。全ての統計学的検定は、GraphPad Prism 9 (La Jolla, CA) の統計プログラムを用いて行なった。

実験結果

1. 肝臓GVHDのマウスモデルの作製

本研究では急性GVHDのマウスモデルとして確立されているB6マウス(H-2^b)をドナー、BDF1マウス(H-2^{b/d})をレシピエントとしたMHC半合致HCTモデルであるAllo群を使用した。通常、このモデルでは腸管GVHDに遅延して肝臓GVHDが発症するとされているため(Liu and Crawford, 2004)、前処置として用いる全身放射線照射(Total body irradiation: TBI)の線量を11Gyと減量して腸管GVHDによる死亡を軽減することにより、肝臓GVHDの評価を行えるように調整した。コントロールとしてGVHDの発症しないBDF1マウスからBDF1マウスへのSyn群を用いて比較検討を行った。

1) HCT後のGVHD重症度の推移と生存率

Syn群と比較して、Allo群では、HCT後day+7以降より有意差を持って、GVHD scoreが高い値を示した(図3A)。HCT後day+35時点での生存率はSyn群では100%、Allo群では87%であり、前処置を軽減したこともありAllo群でも比較的高い生存率を示した。(図3B)。

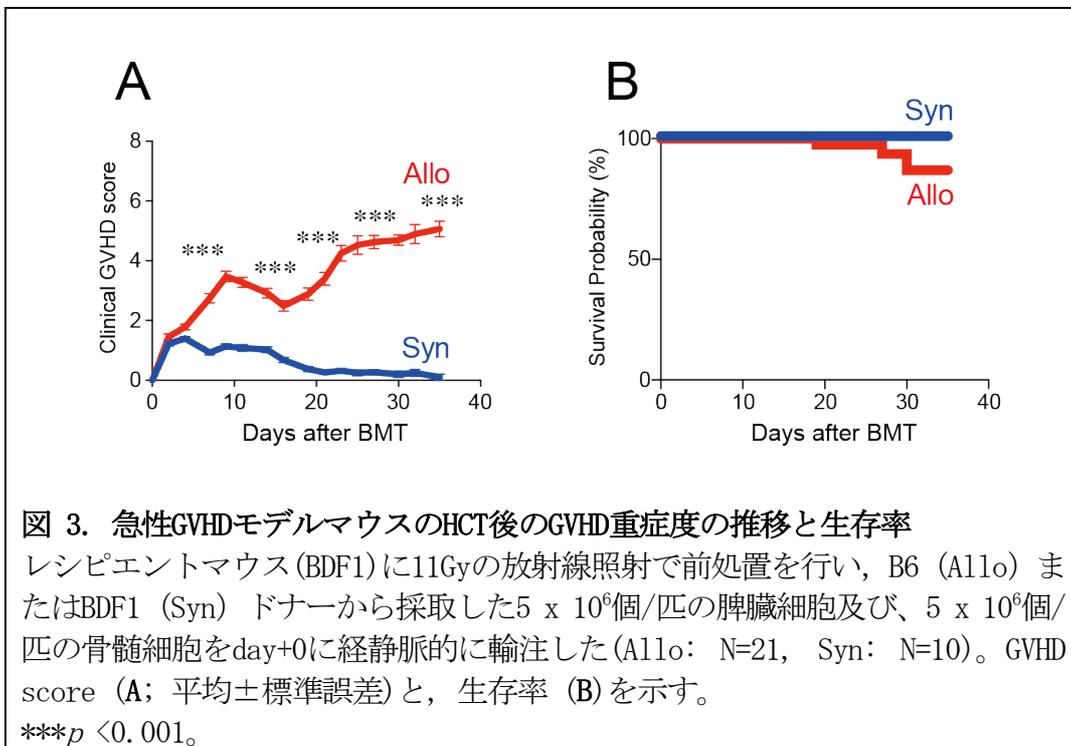


図3. 急性GVHDモデルマウスのHCT後のGVHD重症度の推移と生存率

レシピエントマウス(BDF1)に11Gyの放射線照射で前処置を行い、B6 (Allo) またはBDF1 (Syn) ドナーから採取した 5×10^6 個/匹の脾臓細胞及び、 5×10^6 個/匹の骨髄細胞をday+0に経静脈的に輸注した(Allo: N=21, Syn: N=10)。GVHD score (A; 平均±標準誤差)と、生存率 (B)を示す。

*** $p < 0.001$ 。

2) 肝臓 GVHD の組織学的検討

次に、このモデルにおける肝臓 GVHD の存在を確認するため、HCT 後 day+7、+14、+21、+28、+35 の肝臓の組織標本を作成し、H&E 染色にて組織学的検討を行った。HCT 後 day+14 以降の Allo 群の肝臓において、炎症細胞の門脈域浸潤、胆管上皮へのリンパ球浸潤、胆管上皮細胞のアポトーシス、剥離が認められたが、これらの所見は Syn 群では認められなかった (図 4A, C)。一方で、肝実質の炎症所見は経過中比較的軽度～中等度にとどまっていた。これらの組織学的所見はヒトにおける肝臓 GVHD の組織所見と類似していた。また、Liver GVHD pathological score は HCT 後 day+14 以降、いずれの時点においても Syn 群に比して Allo 群で有意に高値であり、本モデルで肝臓 GVHD が発症することが組織学的に確認された (図 4B)。

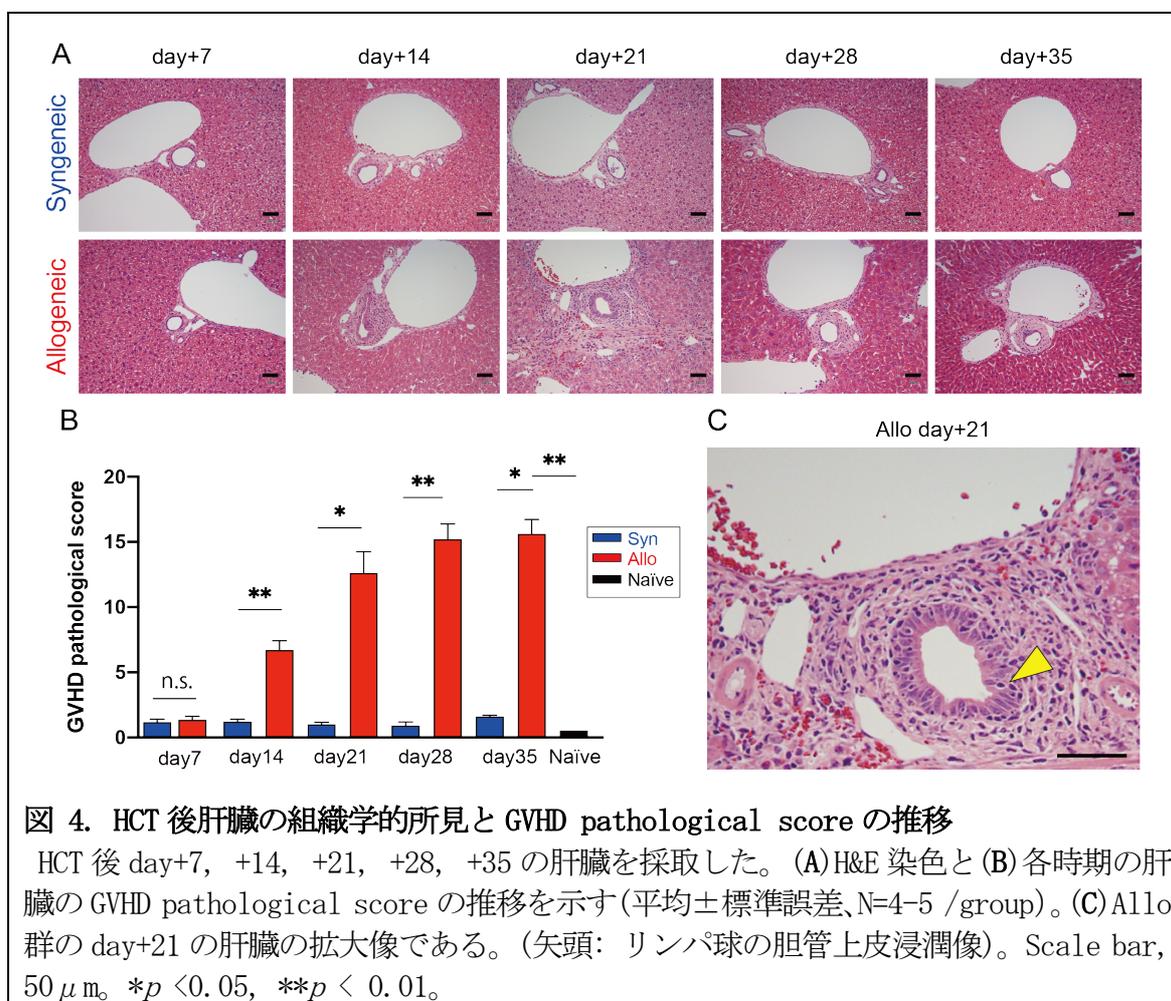
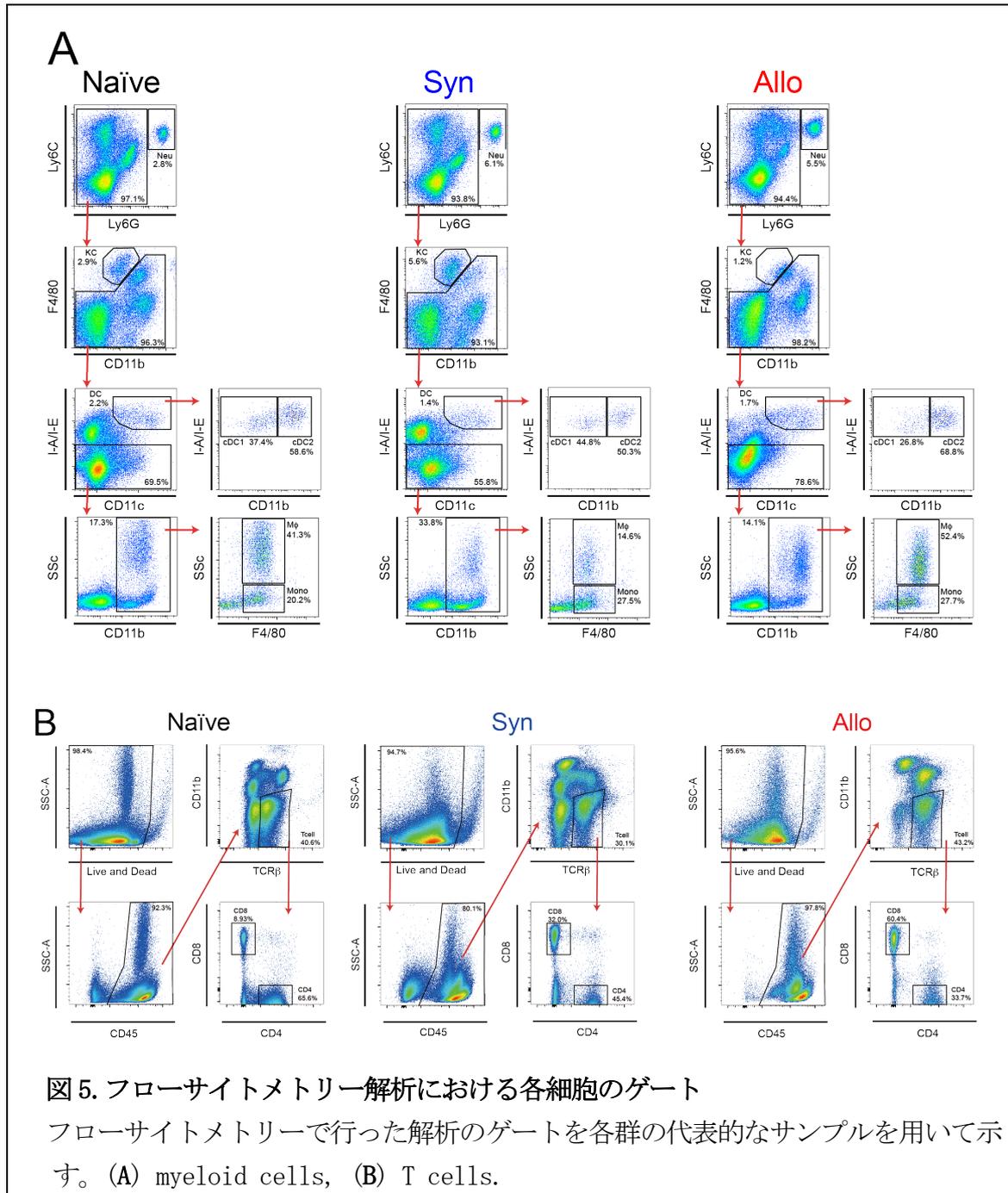


図 4. HCT 後肝臓の組織学的所見と GVHD pathological score の推移

HCT 後 day+7、+14、+21、+28、+35 の肝臓を採取した。(A) H&E 染色と (B) 各時期の肝臓の GVHD pathological score の推移を示す (平均±標準誤差、N=4-5 / group)。(C) Allo 群の day+21 の肝臓の拡大像である。(矢頭: リンパ球の胆管上皮浸潤像)。Scale bar, 50 μ m。* p < 0.05, ** p < 0.01。

2. 肝臓 GVHD における肝臓浸潤単核細胞の評価

1) HCT 後肝臓浸潤単核細胞(liver-infiltrating mononuclear cells: LMCs)の推移
 このモデルを用いて、HCT 後の各時期における LMCs を、フローサイトメトリーを用いて評価した。フローサイトメトリー解析における各細胞のゲートは図5のように行った。



HCT 後 1 週間ではほぼ全ての LMCs はドナー由来細胞に置き換わっていた (図 6A-C)。また、Allo 群で同時期からドナー由来の T 細胞が肝臓に浸潤し、その後、ドナー由来の単球が浸潤することが確認された (図 6D~G)。SSC^{high} F4/80^{ve} CD11b^{high} 細胞として同定された単球由来の炎症性マクロファージは、HCT 後の 3 週目に拡大し、その後も持続したが、F4/80^{ve} CD11b^{low} 細胞として同定される肝臓クッパー細胞は、Syn 群と比較して有意な増加は見られなかった (図 6G および H)。

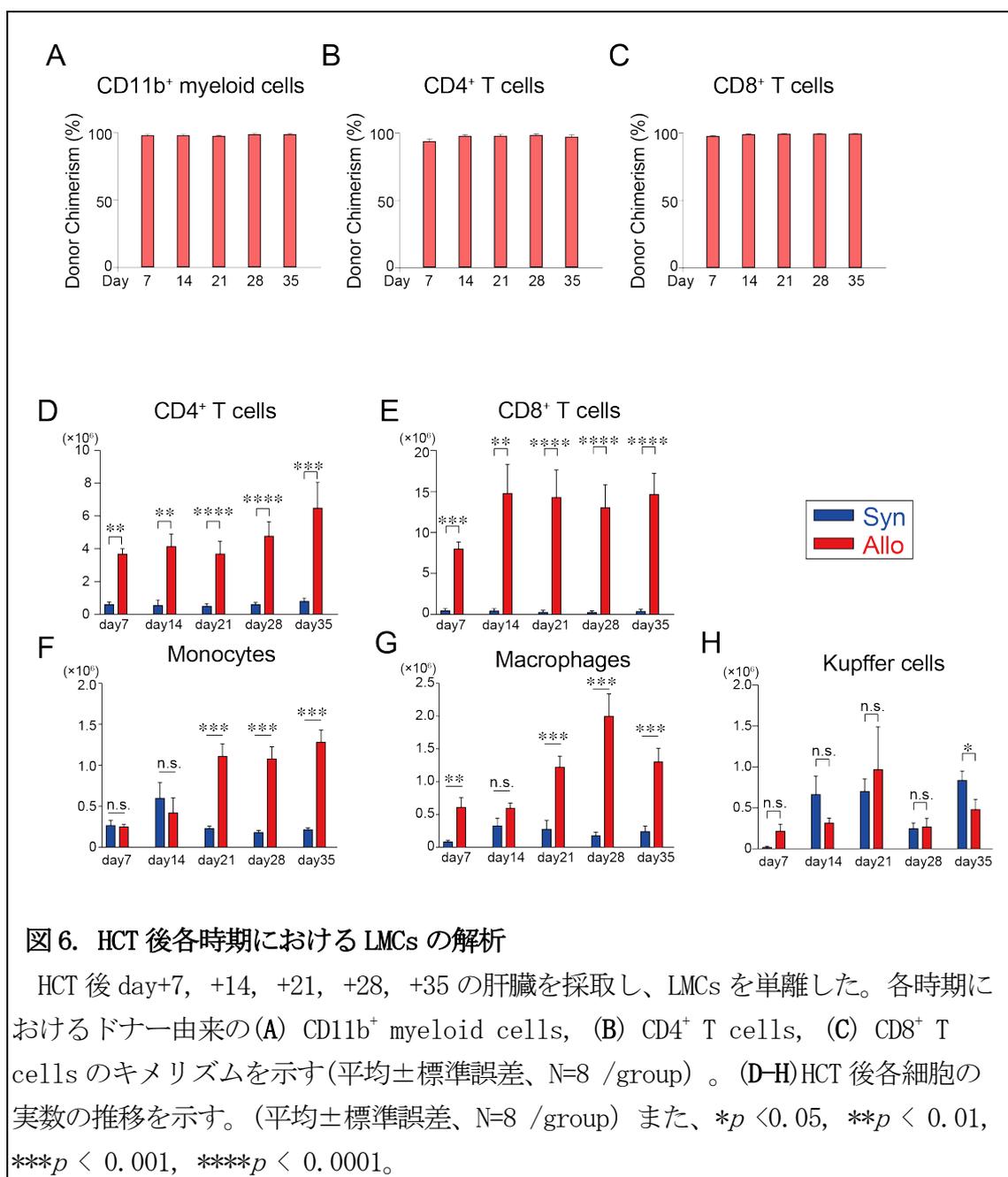


図 6. HCT 後各時期における LMCs の解析

HCT 後 day+7, +14, +21, +28, +35 の肝臓を採取し、LMCs を単離した。各時期におけるドナー由来の (A) CD11b⁺ myeloid cells, (B) CD4⁺ T cells, (C) CD8⁺ T cells のキメリズムを示す (平均±標準誤差、N=8 /group)。 (D-H) HCT 後各細胞の実数の推移を示す。(平均±標準誤差、N=8 /group) また、**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001。

2) 肝臓浸潤ドナーT細胞及びマクロファージの局在の検討

B6-Lck-cre×R26^{tdTomato} マウスをドナーとし、肝臓に浸潤するドナーT細胞とマクロファージの局在を評価した。その結果、Lck^{tdTomato} 陽性ドナーT細胞及び、F4/80 陽性マクロファージの両者は門脈域のサイトケラチン 19 (Cytokeratin 19: CK19) 陽性胆管上皮周辺に浸潤していることが判明した (図 7A, B)。また Allo 群における門脈域浸潤性マクロファージは、Allo 群および Syn 群の両群の類洞周囲に観察されるクッパー細胞とは異なる局在を示していた (図 7B)。

以上のことから、Allo 群で HCT 後ドナー由来の T 細胞、単球、マクロファージが門脈域を中心に浸潤しており、これらの細胞が肝臓 GVHD の発症に寄与している可能性が示唆された。

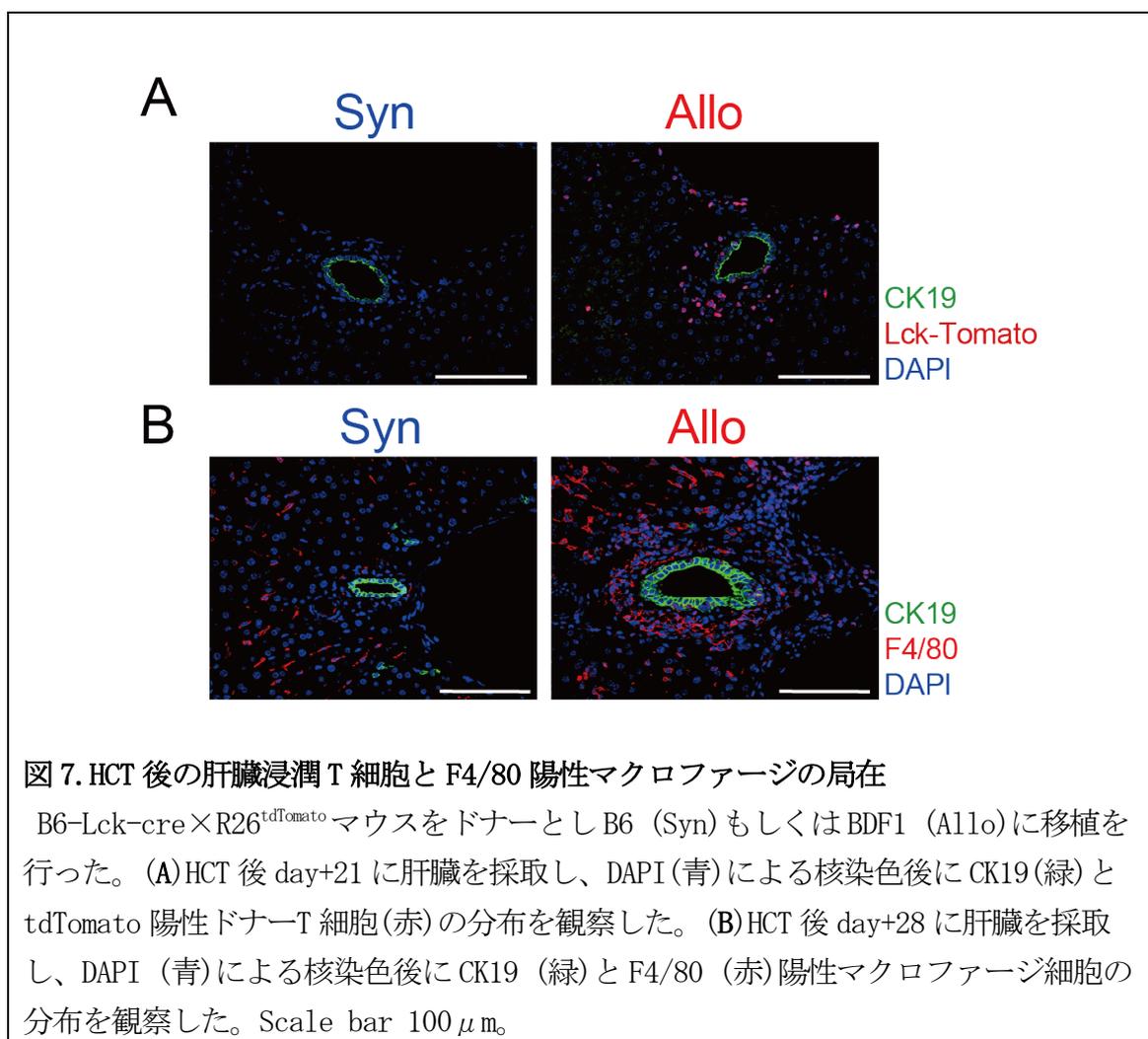


図 7. HCT 後の肝臓浸潤 T 細胞と F4/80 陽性マクロファージの局在

B6-Lck-cre×R26^{tdTomato} マウスをドナーとし B6 (Syn) もしくは BDF1 (Allo) に移植を行った。(A) HCT 後 day+21 に肝臓を採取し、DAPI (青) による核染色後に CK19 (緑) と tdTomato 陽性ドナー T 細胞 (赤) の分布を観察した。(B) HCT 後 day+28 に肝臓を採取し、DAPI (青) による核染色後に CK19 (緑) と F4/80 (赤) 陽性マクロファージ細胞の分布を観察した。Scale bar 100 μ m。

3. 肝臓GVHDによる胆管機能障害の検討

本研究で用いた肝臓GVHDモデルでは、ヒトと同様に門脈周囲を主体とした炎症性細胞浸潤像を呈しており、胆管上皮傷害が病態の主座であると考えられた。そこで胆管機能の検討を行うこととした。

1) BECのアポトーシス誘導の検討

まず、BECの傷害を定量的に評価するために、アポトーシスのマーカーであるcleaved caspase-3 (cCasp3)の蛍光免疫染色を施行し、HCT後のBECにおけるcCasp3の発現の検討を行った。その結果、HCT後day+28において、cCasp3を発現するBECは、Syn群やNaïve群と比較してAllo群において有意に増加しており、肝臓GVHDに伴いBECがアポトーシスに陥っていることが判明した(図8A, B)。

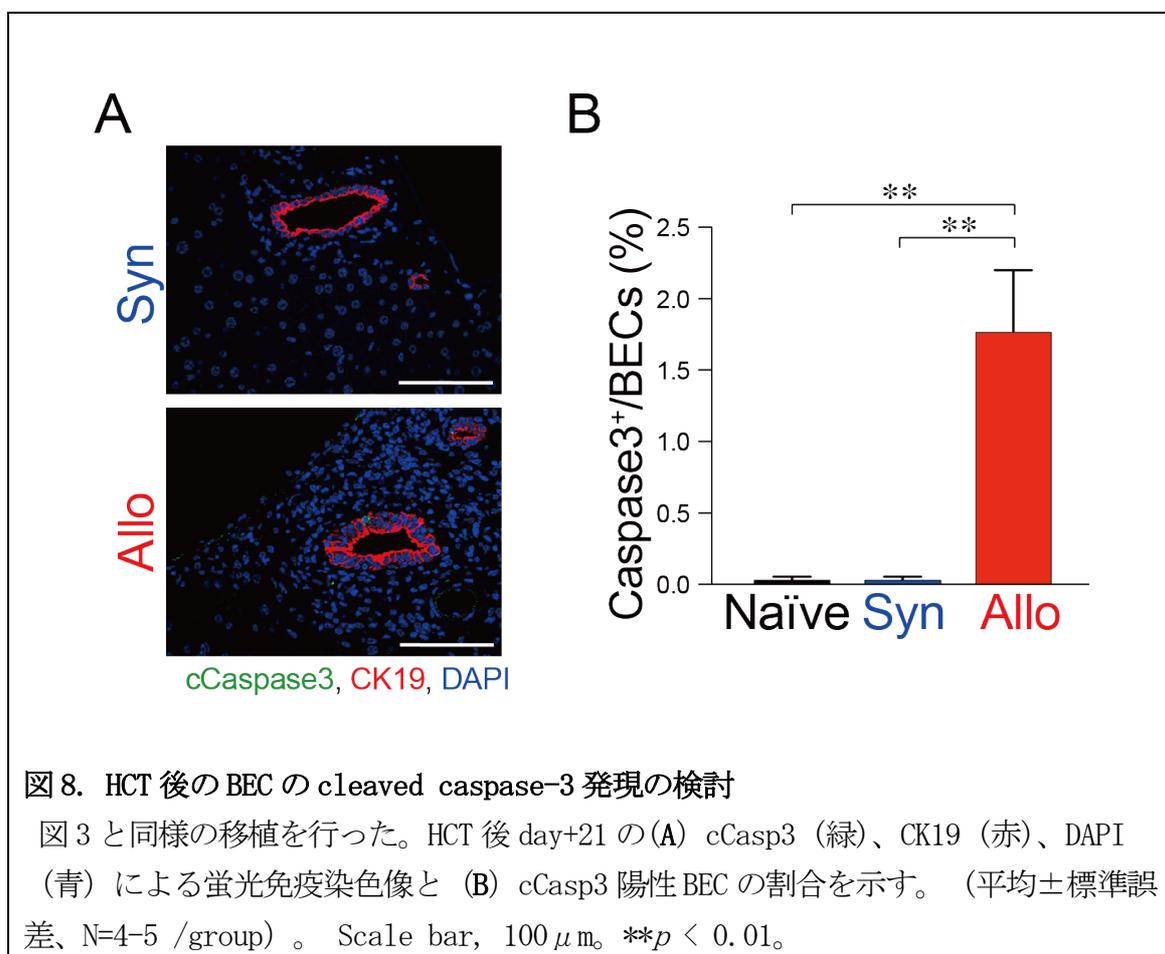


図8. HCT後のBECのcleaved caspase-3発現の検討

図3と同様の移植を行った。HCT後day+21の(A) cCasp3 (緑)、CK19 (赤)、DAPI (青)による蛍光免疫染色像と(B) cCasp3陽性BECの割合を示す。(平均±標準誤差、N=4-5/group)。Scale bar, 100 μ m. ** $p < 0.01$ 。

2) 胆管上皮傷害マーカーとしての MMP7 の発現の検討

MMP7 (Matrix Metalloproteinase7) は、細胞外マトリックスのリモデリングおよび細胞傷害に反応した炎症性細胞のリクルートに重要な酵素である (Parks *et al.*, 2004)。肝臓において、肝内 BEC は定常時に MMP7 は発現しないものの、BEC の傷害を反映して、MMP7 を発現し、肝臓の線維化に寄与しているとされる (Lertudomphonwanit *et al.*, 2017)。肝臓 GVHD においても、BEC 傷害を反映して MMP7 の発現が亢進するか否かを検討した。HCT 後 day+28 の Allo 群において、蛍光免疫染色で CK19 陽性 BEC に一致して、MMP7 の発現を認めた (図 9A)。また、同時期における肝臓から採取した total RNA を用いて qPCR を行い *Mmp7* の発現が Naïve 群、Syn 群に比して Allo 群で上昇していることが確認された (図 9B)。このことから、肝臓 GVHD において BEC 傷害を反映して MMP7 の発現が亢進することが示された。

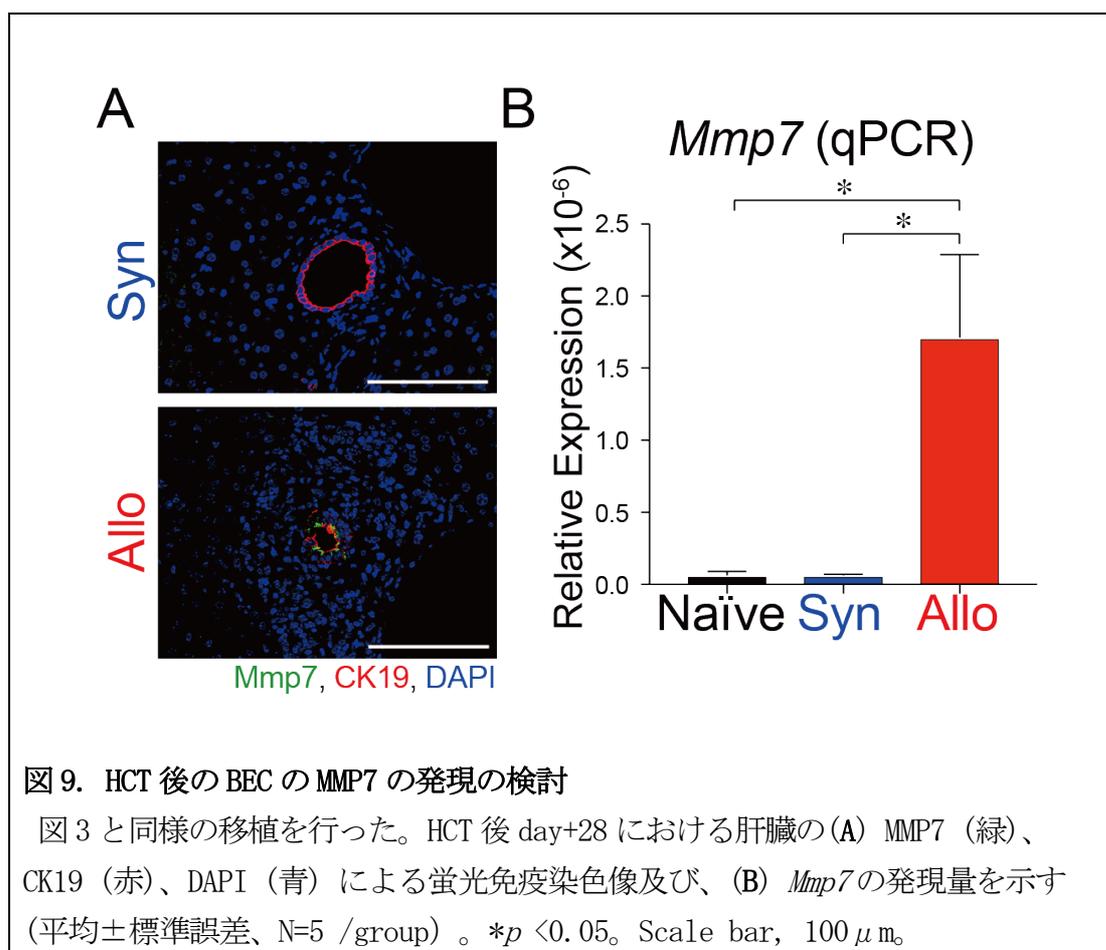


図 9. HCT 後の BEC の MMP7 の発現の検討

図 3 と同様の移植を行った。HCT 後 day+28 における肝臓の (A) MMP7 (緑)、CK19 (赤)、DAPI (青) による蛍光免疫染色像及び、(B) *Mmp7* の発現量を示す (平均±標準誤差、N=5 /group)。* $p < 0.05$ 。Scale bar, 100 μ m。

3) HCT 後の BEC 面積推移の検討

種々の肝障害時には、反応性に小胆管が門脈から肝実質にかけて一過性に増大する、細胆管反応という現象が知られている (Ko *et al.*, 2020)。通常、肝障害・胆管障害時には、細胆管反応が亢進することが知られているが、肝臓 GVHD では、細胆管反応は顕著にはならないとされる (Matsukuma *et al.*, 2016; Stueck *et al.*, 2018)。そこで、本移植モデルを用いて、肝臓切片中の CK19 陽性 BEC の肝臓に占める面積比を測定することで定量化を行った。Syn 群では HCT 後、CK19 陽性 BEC の明らかな増生を認めなかった。一方で Allo 群では、HCT 後 day+21 において、CK19 陽性 BEC の面積比が Naïve 群、Syn 群に比して上昇しており、細胆管反応を示す所見を認めた (図 10A, B)。しかし、HCT 後 day+35 においては、HCT 後 day+21 に比して、反応性胆管は減少しており、細胆管反応に関与する肝臓幹細胞が GVHD で損傷している可能性が示唆された (図 10A, B)。

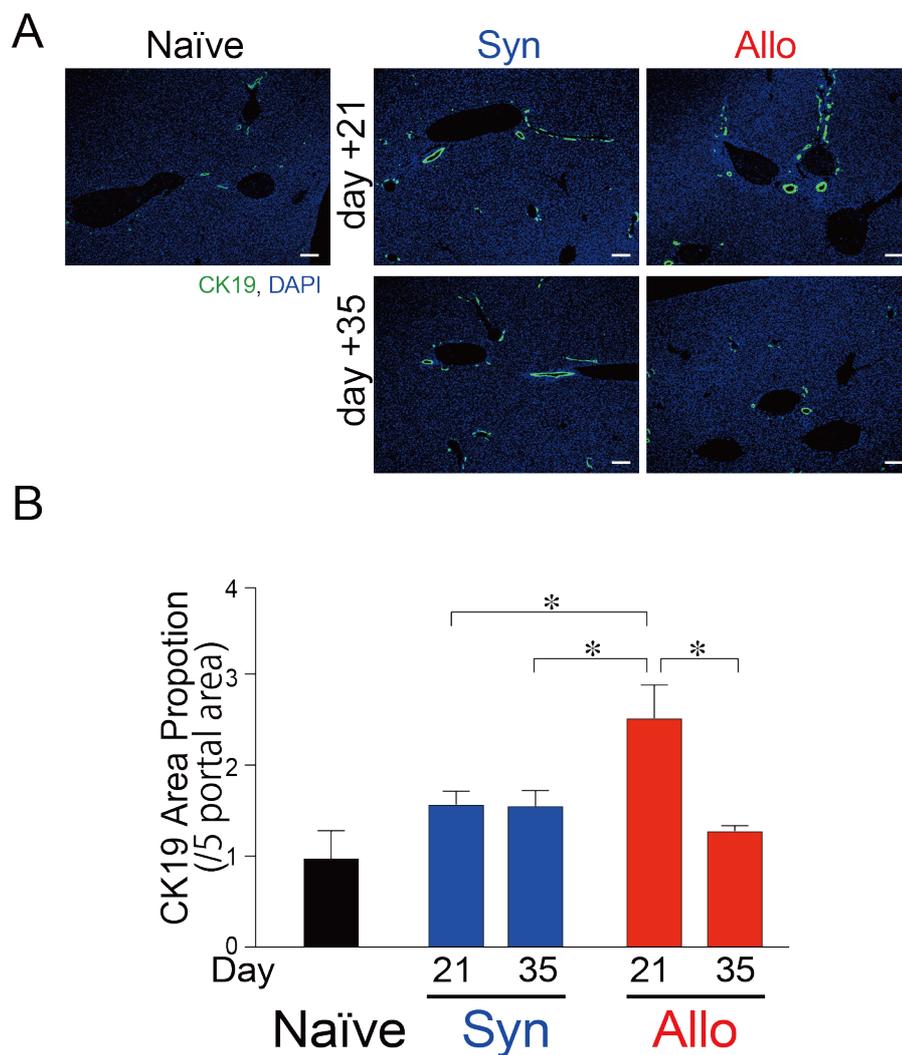


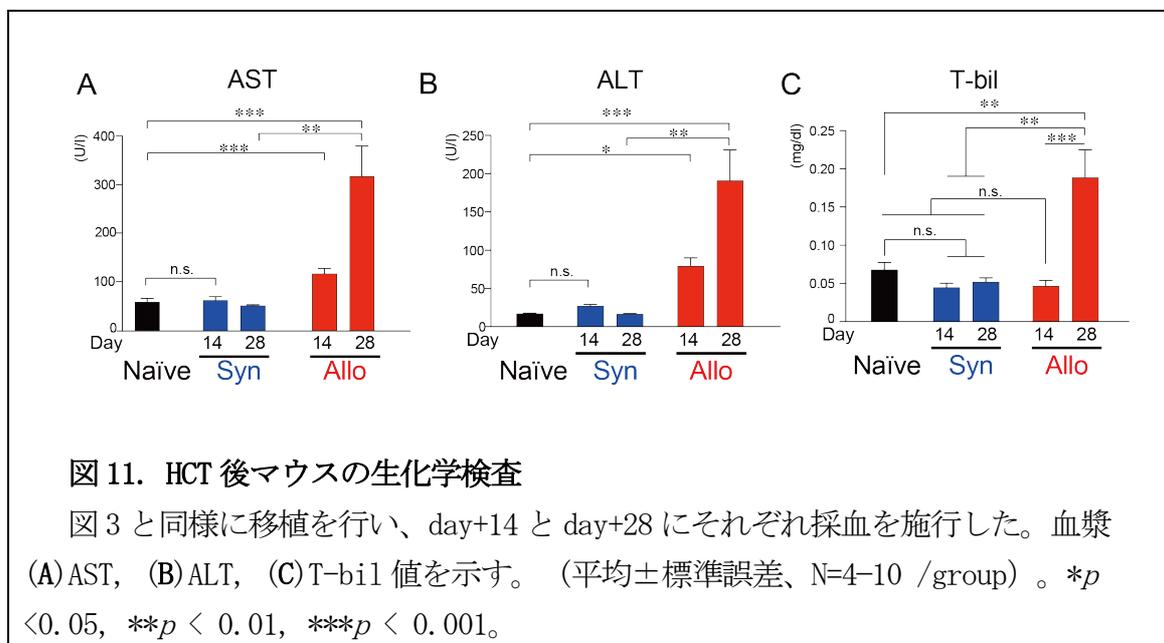
図 10. HCT 後の BEC の蛍光免疫染色と CK19 陽性領域の割合

図 3 と同様の移植を行った。(A) Naive BDF1 及び HCT 後 day+21, +35 の Syn, Allo での CK19 (緑), DAPI (青) による蛍光免疫染色像を示す。また、(B) 各検体中の門脈域を 5 箇所ずつランダムに撮影し、CK19 陽性 BEC の占める割合を算出した。(平均±標準誤差、N=5 /group) 。* $p < 0.05$ 。Scale bar, 100 μm 。

4) HCT 後の生化学検査の検討

続いて HCT 後のマウスから採血を施行し、生化学的検査による肝胆道系障害を検討した。HCT 後 day+28 では、Allo 群において血漿アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase: AST) 値、血漿アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine transaminase: ALT) 値、血漿総ビリルビン (total bilirubin:

T-bil)値の有意な上昇を認めた(図 11A~C)。HCT 後 day+14 では、T-bil の有意な上昇が観察されなかったことから、BEC の組織学的な不顕性変化が clinical 肝臓 GVHD に先行していることが確認された (図 11C)。



5) HCT 後後期の BEC の評価

HCT 後長期経過した時点での BEC の状態を観察するため、HCT 後 day+70 の肝臓を組織学的に検討した。Allo 群において、胆管上皮マーカーである CK19 と肝細胞マーカーであるアルブミンの両方を発現する中間的な表現型を持つ BEC を認めた (図 12)。

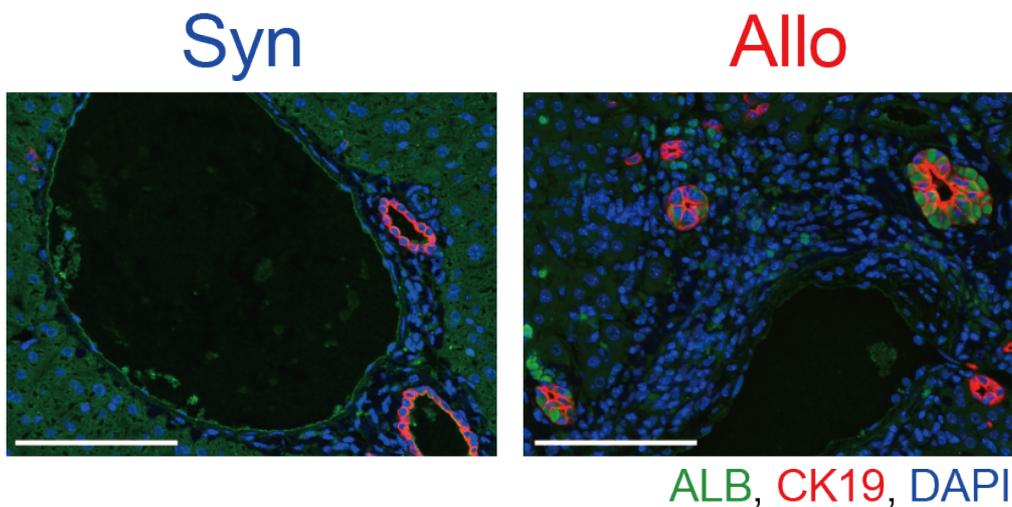


図 12. HCT 後 day+70 における肝臓の蛍光免疫染色

図 3 と同様の移植を施行し、HCT 後 day+70 に肝臓を採取した。ALB (緑), CK19 (赤) による蛍光免疫染色と DAPI (青) による核染色を行い、ALB と CK19 の分布を観察した。Scale bar, 100 μ m。

以上のことから、肝臓 GVHD では胆管障害を反映して、胆管上皮がアポトーシスに陥っていること、T-bil などの血清マーカーが上昇していることが示された。また、これらのマーカーと相関して、胆管上皮における MMP7 の発現が上昇しており、肝臓 GVHD の疾患マーカーとなりうる可能性が示唆された。HCT 後長期間が経過すると、BEC、肝細胞の両系統の表現型を有する BEC の出現が確認された。

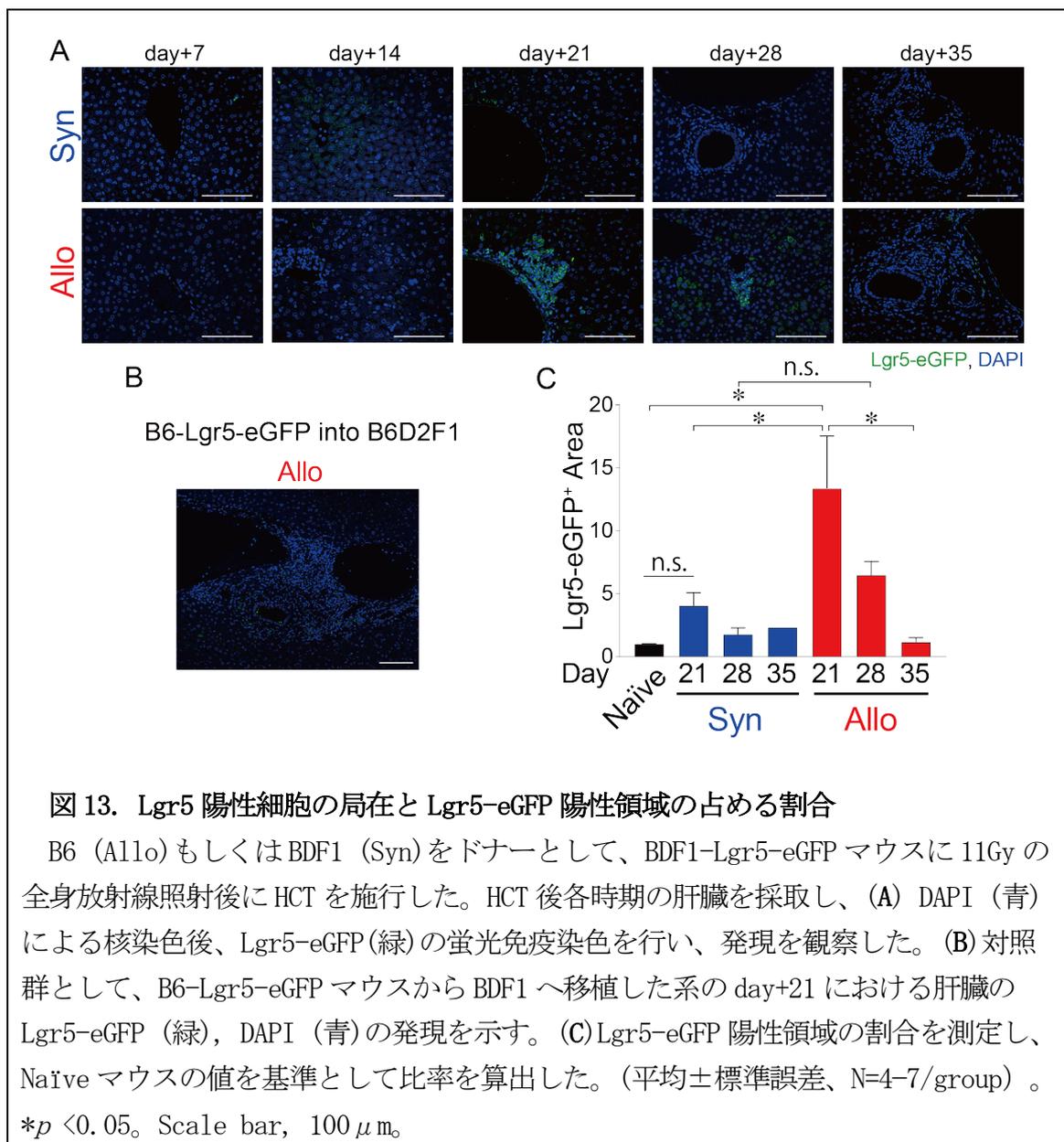
3. 肝臓 GVHD における Lgr5⁺肝臓幹細胞の動態及び局在の検討

1) HCT 後肝臓 Lgr5⁺幹細胞の動態

これまで、腸管及び皮膚において、Lgr5⁺幹細胞が GVHD の標的となっていることが示されている (Hanash *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2018; Takashima *et al.*, 2011)。肝臓においては恒常時に Lgr5 陽性細胞は出現しないものの、CCl₄ 誘導性の肝障害時に門脈域に Lgr5⁺肝臓幹細胞が誘導され、肝細胞及び BEC の再生に寄与していることが知られている (Huch *et al.*, 2013)。そこで、BDF1-Lgr5-eGFP マウスをレシピエントとして、HCT 後の Lgr5 陽性細胞の動態を評価するために蛍光免疫染色を用いて検討を行った。その結果、Allo 群で HCT 後 day+21 に Lgr5 陽性細胞の出現を認めた。Syn 群では Lgr5 陽性細胞の有意な発現は認めなかった。(図 13A, C)。CCl₄ 誘発性の慢性肝障害モデルなどでは、Lgr5 陽性細胞が長期間存在していることが示

されているが(Lin *et al.*, 2017)、肝臓GVHDでは、BEC傷害が持続しているのにも関わらず、Lgr5陽性細胞はHCT後day+28に減少し、HCT後day+35に消失していた。

また、B6-Lgr5-eGFPマウスから野生型BDF1マウスを移植した系では、肝臓にLgr5-eGFP陽性細胞は観察されず、HCT後に出現するLgr5陽性細胞がレシピエント由来の細胞であることが確認された(図13B)。

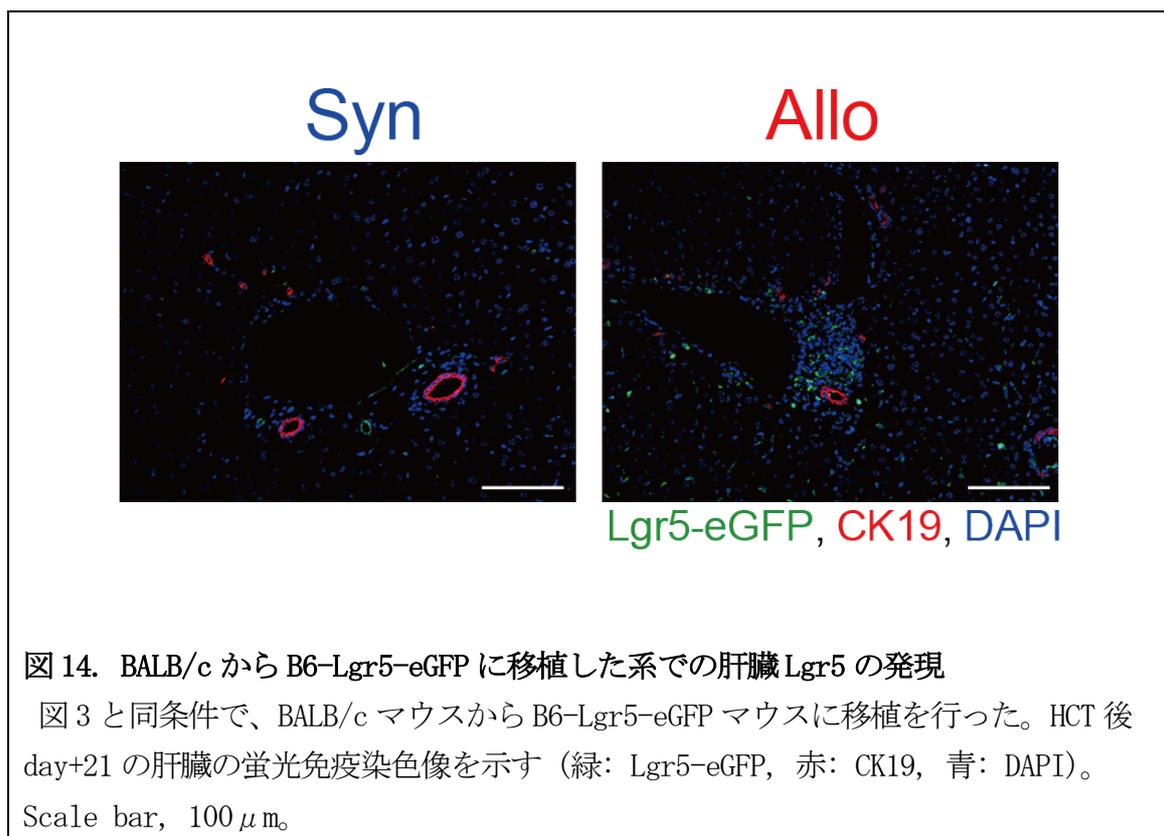


また、肝臓Lgr5陽性細胞の出現を、別の移植系でも検討した。

BALB/c (Allo 群) マウスもしくは B6 (Syn 群) をドナーとして、MHC 不一致の B6-Lgr5-eGFP マウスをレシピエントとして HCT を施行した。HCT 後 day+21 の Lgr5 の発現を解

析したところ、B6 マウスから BDF1-Lgr5-eGFP マウスへの移植系と同様に、Allo 群で Lgr5 陽性細胞の出現を認めた。これまでの報告 (Huch *et al.*, 2013) と同様、Lgr5 陽性細胞は門脈域の CK19 陽性 BEC 近傍に発現し、同部位に局在していた (図 14)。

以上から、複数の移植系で肝臓 GVHD において、門脈域の胆管周囲に Lgr5⁺肝臓幹細胞が誘導されることを確認した。



2) Lgr5⁺肝臓幹細胞とドナーT 細胞及びマクロファージの局在

さらに、Lgr5⁺肝臓幹細胞と LMCs の局在を検討するため、Lck-cre \times R26^{tdTomato} ドナーから BDF1-Lgr5-eGFP に移植した系で、蛍光免疫染色を行った。HCT 後の肝臓の門脈域に浸潤したドナーT 細胞や F4/80 陽性マクロファージは Lgr5 陽性細胞に近接しており、GVHD における Lgr5⁺肝臓幹細胞の減少には、ドナーT 細胞やマクロファージが関与していることが示唆された (図 15 A-B)。

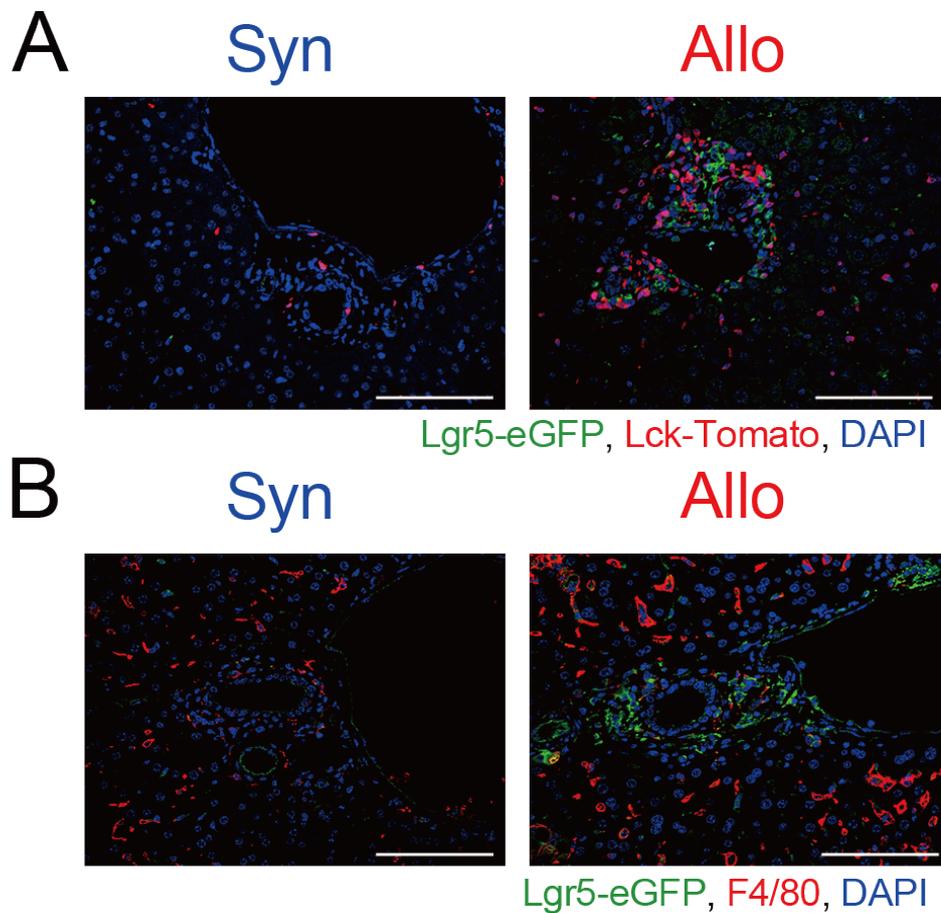


図 15. Lgr5 陽性細胞とドナーT 細胞及びマクロファージの局在

B6 Lck-cre×R26^{tdTomato} ドナーから B6-Lgr5-eGFP (Syn) または BDF1-Lgr5-eGFP (Allo) マウスに移植を施行した。HCT 後 day+21 に肝臓を摘出し、(A) Lgr5-eGFP (緑)、tdTomato (赤)、DAPI (青) 及び、(B) Lgr5-eGFP (緑)、F4/80 (赤)、DAPI (青) を用いて免疫蛍光染色を行いその分布を観察した。Scale bar, 100 μ m。

4. GVHD は TGF β 1 を介してオルガノイド形成性肝臓幹細胞を標的とする

1) HCT 後肝臓オルガノイド形成能の検討

腸管 GVHD における組織幹細胞の減少は、腸管オルガノイド形成効率の低下をもたらすことが示されている (Takashima *et al.*, 2019)。肝臓においては、CCl₄ 誘発性肝障害時に発現する Lgr5⁺ 肝臓幹細胞を単離し、培養することでオルガノイドが形成されることが報告されている (Huch *et al.*, 2013)。そこで我々は、HCT 後の肝臓から肝臓オルガノイドを作製し、オルガノイドの作製効率が HCT 後の Lgr5⁺ 肝臓幹細胞の出現・消退と関連しているかどうかを検討した。Allo 群の肝臓右葉から形

成された肝臓オルガノイド数は、Lgr5⁺肝臓幹細胞の増加がピークに達した HCT 後 day+21 に、Naïve および Syn 群と比較して有意に増加していた (図 16A, B)。一方で、Allo 群のオルガノイドの形成能は、Lgr5 陽性細胞の発現と同様に HCT 後 day+28 以降は著しく低下していた。Allo 群とは対照的に、Syn 群では、オルガノイドの形成数は、実験期間中、有意な変化は見られなかった。以上のことから、Allo 群において、肝臓 GVHD が肝臓オルガノイド形成性の肝臓幹細胞を標的にしていること、また、肝臓オルガノイドを用いることで、GVHD が肝臓幹細胞を標的とするメカニズムの検討が可能であることが示唆された。

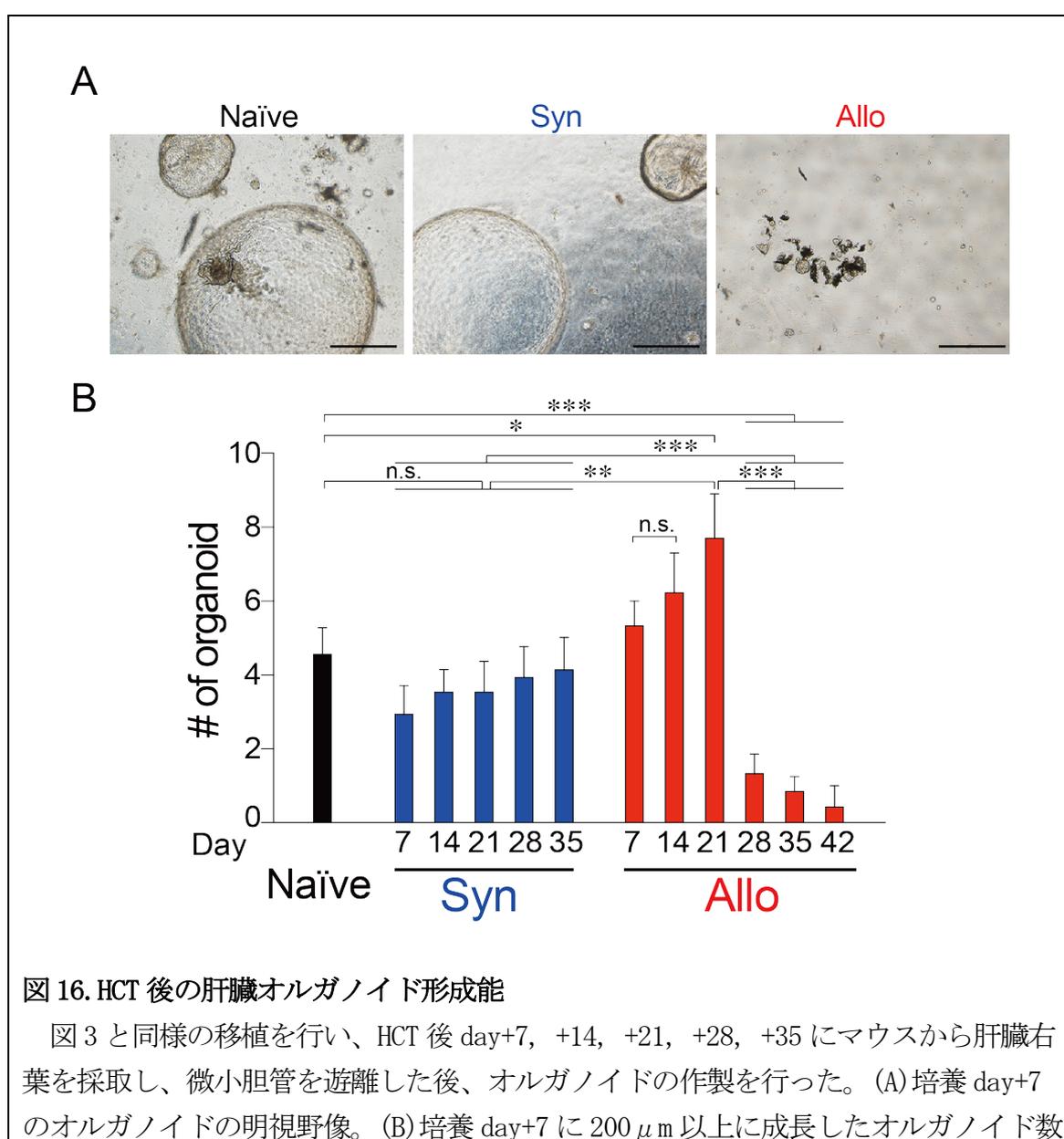


図 16. HCT 後の肝臓オルガノイド形成能

図 3 と同様の移植を行い、HCT 後 day+7, +14, +21, +28, +35 にマウスから肝臓右葉を採取し、微小胆管を遊離した後、オルガノイドの作製を行った。(A) 培養 day+7 のオルガノイドの明視野像。(B) 培養 day+7 に 200 μ m 以上に成長したオルガノイド数

を算出した。(平均±標準誤差、N=5-15/group)。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。Scale bar, $500 \mu\text{m}$ 。

2) サイトカインが肝臓オルガノイドに与える影響の検討

腸管オルガノイドにおいては、 $\text{IFN}\gamma$ や $\text{TNF}\alpha$ などの炎症性サイトカインが、アポトーシスを誘導することが知られている。(Eriguchi *et al.*, 2018; Matsuzawa-Ishimoto *et al.*, 2020; Takashima *et al.*, 2019)。HCT後 day+28 に肝臓から抽出した total RNA を用いた qPCR を施行したところ、Allo 群では $\text{IFN}\gamma$ と $\text{TNF}\alpha$ の両方の発現が有意に上昇していたが、Syn 群では上昇していなかった (図 17A, B)。そこで、naïve BDF1 マウス由来の肝臓オルガノイドを用いて、これらの炎症性サイトカインがオルガノイド形成能に与える影響を検討した。Naïve BDF1 由来の肝臓オルガノイドを作製・継代し、継代初日を day0 として、day0 に $\text{IFN}\gamma$ もしくは $\text{TNF}\alpha$ をそれぞれ 0, 1, 10, 100ng/ml の濃度で培養液に添加して day4 におけるオルガノイド形成能を評価した。これらのサイトカインのいずれも、高濃度であっても、肝臓オルガノイドの形成に影響を与えなかった (図 17C, D)。

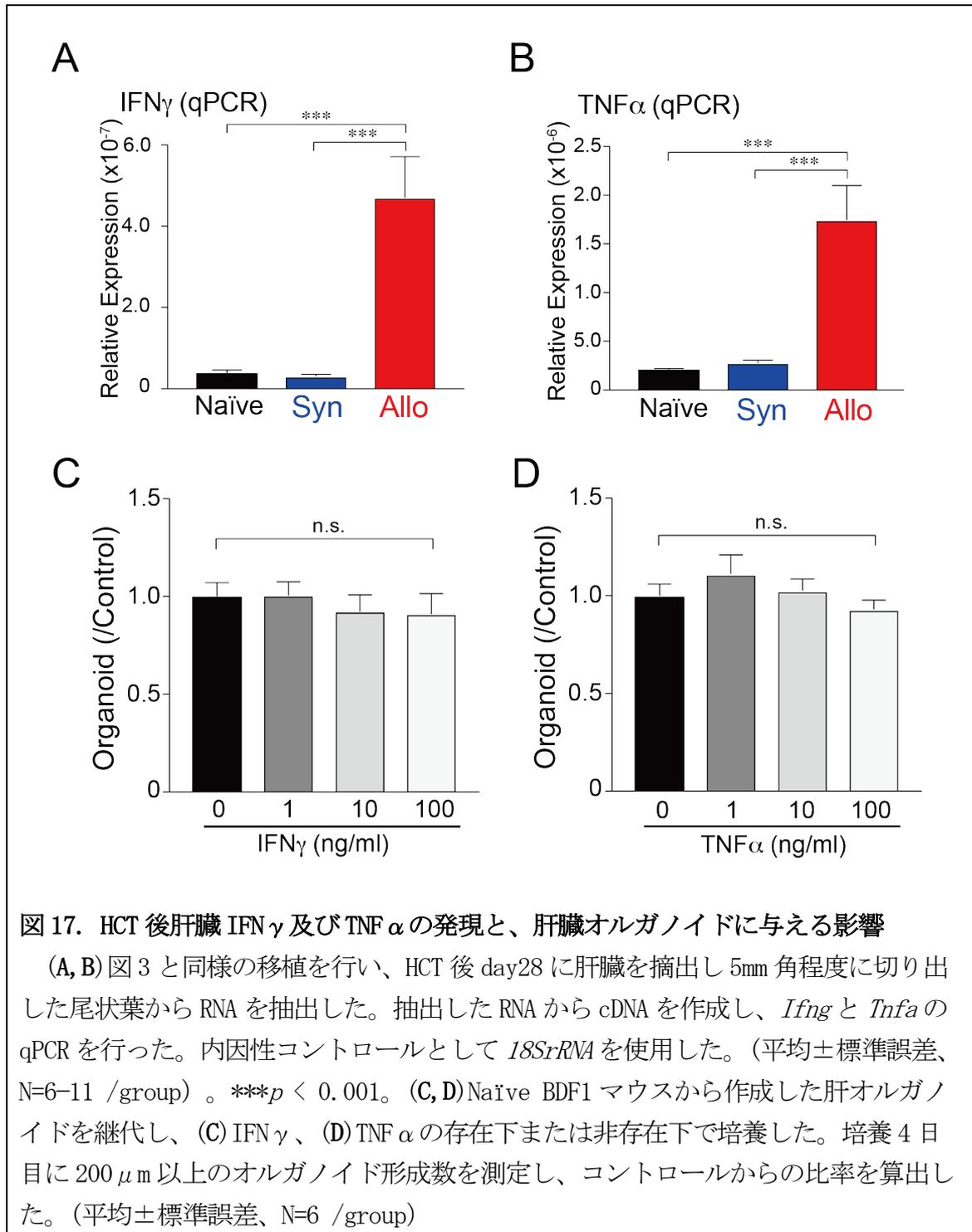


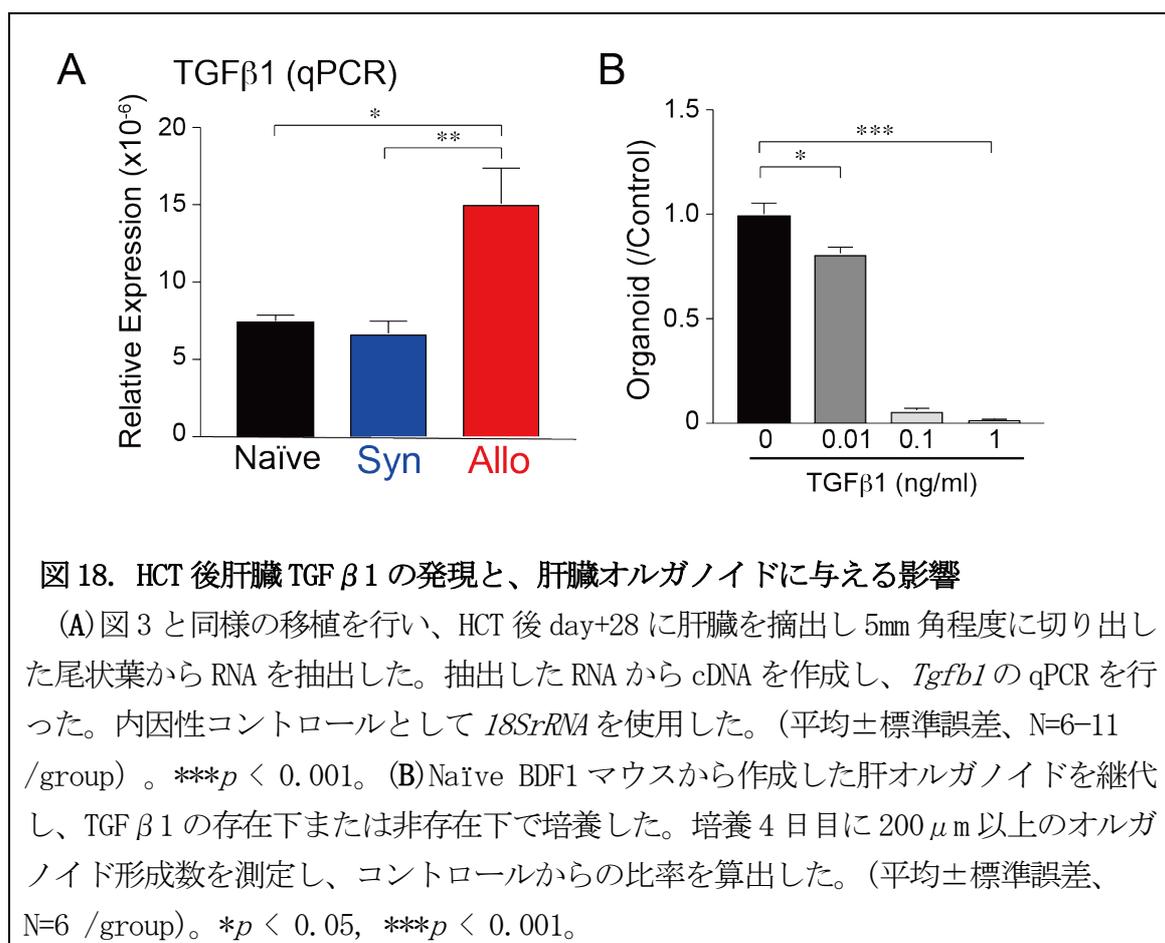
図 17. HCT 後肝臓 IFN γ 及び TNF α の発現と、肝臓オルガノイドに与える影響

(A, B) 図 3 と同様の移植を行い、HCT 後 day28 に肝臓を摘出し 5mm 角程度に切り出した尾状葉から RNA を抽出した。抽出した RNA から cDNA を作成し、*Ifng* と *Tnfa* の qPCR を行った。内因性コントロールとして *18SrRNA* を使用した。(平均±標準誤差、N=6-11 /group)。*** $p < 0.001$ 。(C, D) Naive BDF1 マウスから作成した肝臓オルガノイドを継代し、(C) IFN γ 、(D) TNF α の存在下または非存在下で培養した。培養 4 日目に 200 μ m 以上のオルガノイド形成数を測定し、コントロールからの比率を算出した。(平均±標準誤差、N=6 /group)

次に、これまでに BEC の傷害因子として報告されたサイトカインである TGF β 1 の肝臓オルガノイドの形成に及ぼす影響について検討した(Yokomuro *et al.*, 2000)。Allo 群における HCT 後 day+28 の肝臓における TGF β 1 の発現レベルは、naive および Syn 群と比較して、有意に上昇していた(図 18A)。Naive BDF1 由来

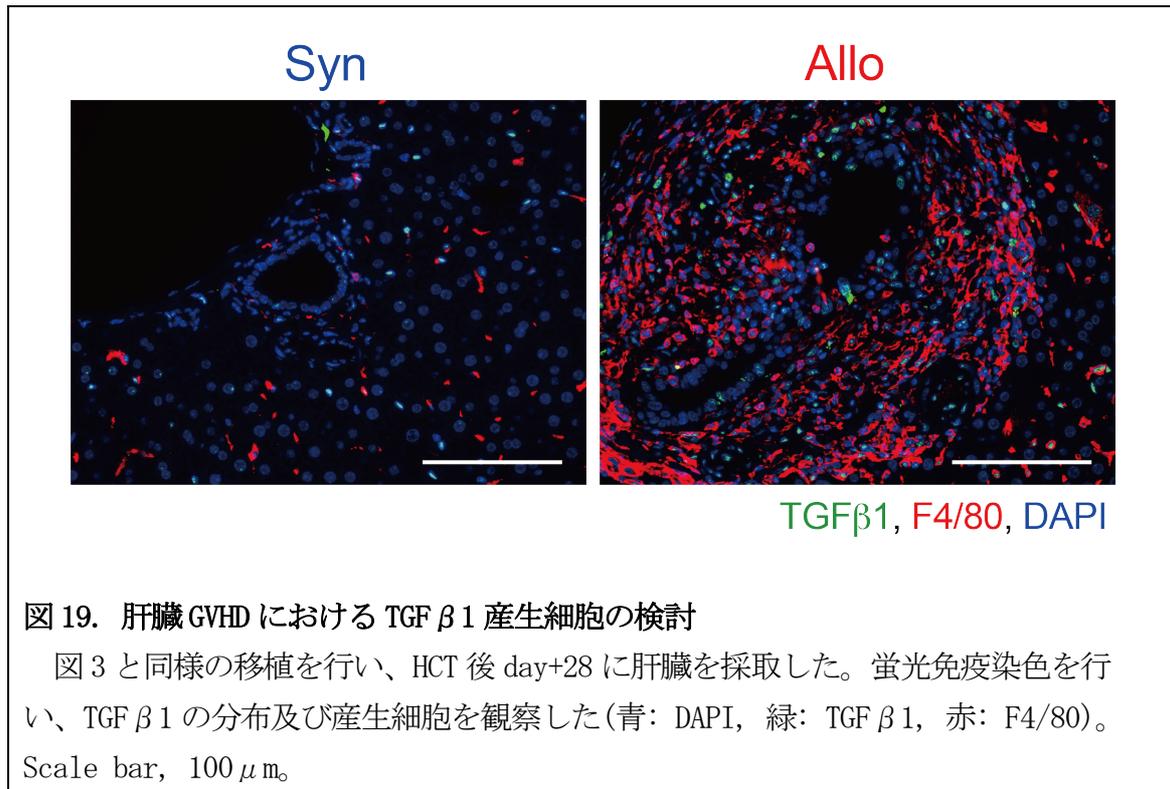
の肝臓オルガノイドの継代 day0 の培養液に TGF β 1 を 0, 0.01, 0.1, 1ng/ml の濃度で添加すると、用量依存的にオルガノイドの形成を阻害した (図 18B)。

以上のことから、HCT 後 Allogeneic 群の肝臓では、IFN γ , TNF α , TGF β 1 のいずれも HCT 後 day+28 に高発現をしているが、腸管とは異なり IFN γ , TNF α は肝臓幹細胞に影響は与えず、TGF β 1 が肝臓幹細胞の傷害に寄与していることが示唆された。



3) 肝臓 GVHD 時における TGF β 1 産生細胞の検討

我々や他のグループは、これまでに皮膚慢性 GVHD において、マクロファージが TGF β 1 の主要な産生細胞であることを示した (Alexander *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2017; Yamakawa *et al.*, 2018)。肝臓 GVHD において TGF β 1 産生細胞を同定するために、HCT 後 day+28 の肝臓の蛍光免疫染色を施行した。F4/80 と TGF β 1 の蛍光免疫染色所見では、TGF β 1 陽性細胞の 83.0 \pm 3.2 % が、F4/80 陽性であった (図 19)。



続いて、TGF β 1 産生細胞を系統的に解析する目的で、HCT 後 day+28 の LMCs を単離し、フローサイトメトリーを用いて、クッパー細胞及びマクロファージの TGF β 1 の発現を解析した。解析の結果、同種移植レシピエントの肝臓では、Syn 群に比して Allo 群で TGF β 1 を発現した単球由来マクロファージが上昇していた (図 20)。

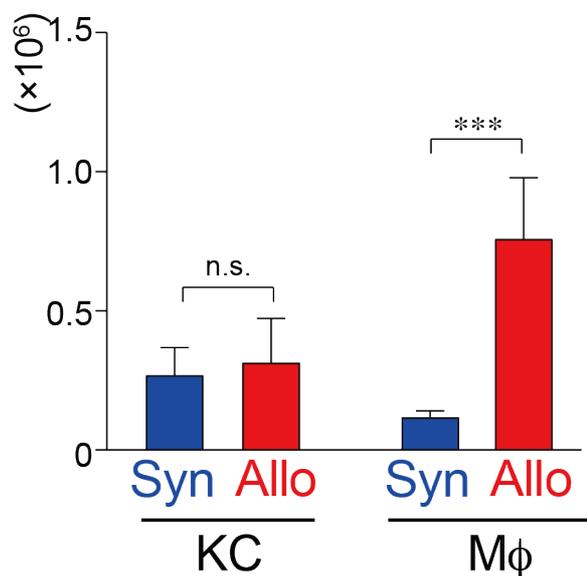


図 20. 肝臓浸潤細胞の TGF β 1 の発現

図 3 と同様の移植を行い、HCT 後 day+28 の肝臓から LMCs を単離した。FCM で kupffer cell (KC) と macrophage (M ϕ) の TGF β 1 陽性細胞数を実数で示す。(平均±標準誤差、N=8 /group)。*** p < 0.001。

4) HCT 後肝臓浸潤細胞が肝臓オルガノイド形成数に与える影響の検討

続いて、HCT 後に LMCs が肝臓オルガノイドの形成に与える影響について検討を行った。HCT 後 day+28 の Allo または Syn 群の肝臓から LMCs を単離し、 1×10^5 個/well ずつ、Naïve BDF1 由来のオルガノイドと ALyS705 培地と HeptiCult OGM 培地の 1:1 混合液中で共培養を施行した。共培養開始 4 日後のオルガノイド形成能を検討した結果、Allo 群で有意に発育が抑制された。Syn 群では対照群に比してオルガノイド数に有意差は認められなかった (図 21A)。

また、LMCs から T 細胞もしくは non T 細胞集団を分離し、肝臓オルガノイドの形成に影響を与えるか検討したところ、T 細胞は肝臓オルガノイド形成抑制効果が認められなかった。一方で、non T 細胞集団は T 細胞、コントロール群と比較して有意に肝臓オルガノイドの形成を抑制した (図 21B)。

以上のことから、肝臓 GVHD において主に門脈域に浸潤したマクロファージが TGF β 1 を産生し、オルガノイド形成性幹細胞の傷害に寄与していることが示唆された。

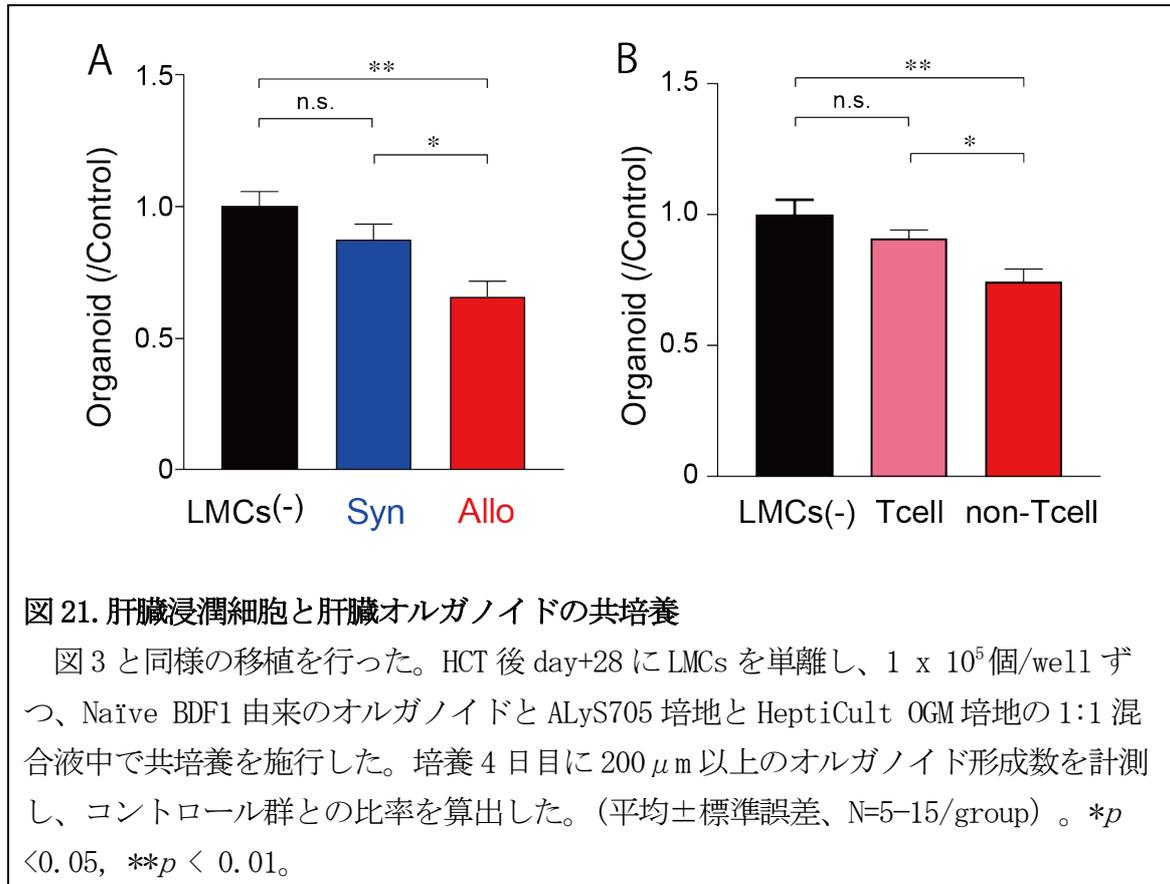


図 21. 肝臓浸潤細胞と肝臓オルガノイドの共培養

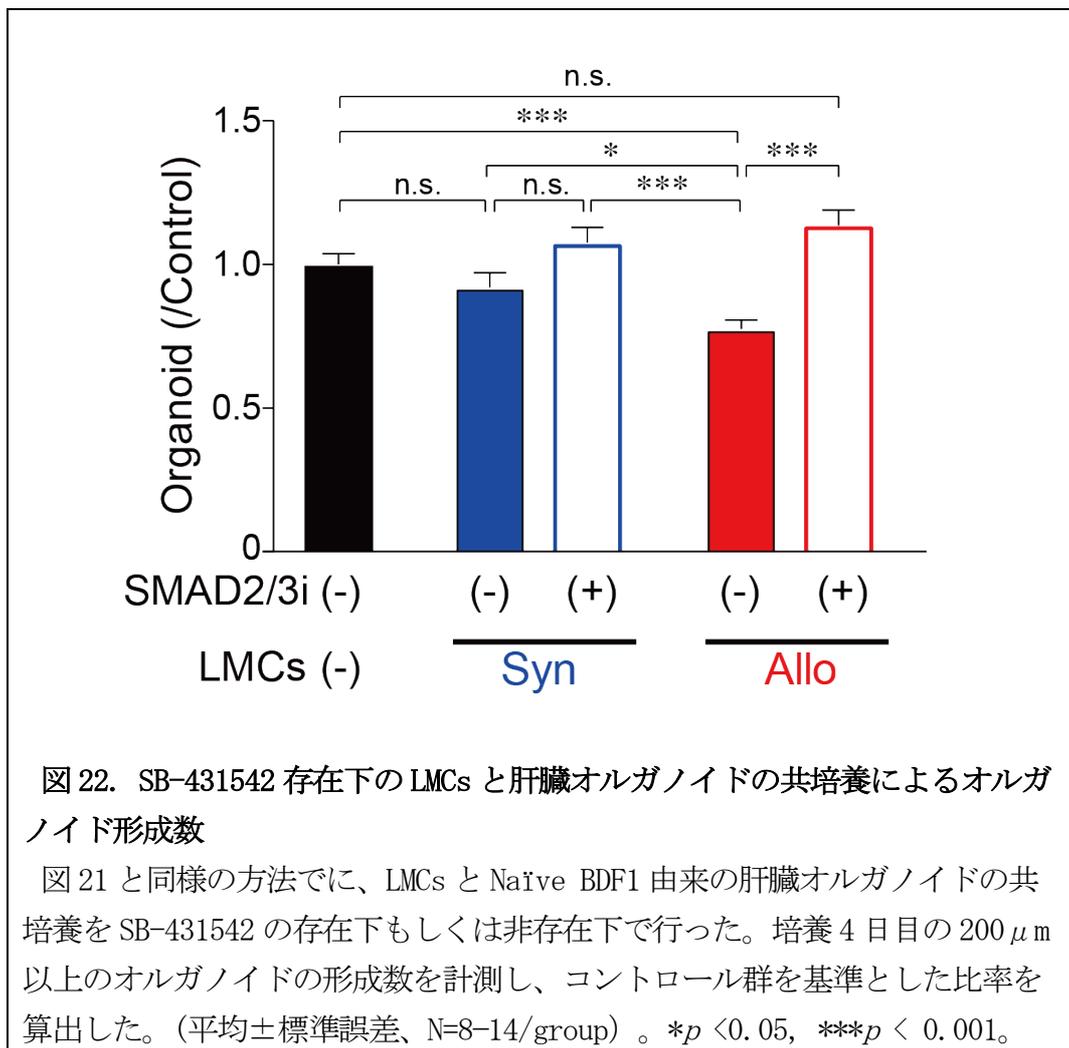
図 3 と同様の移植を行った。HCT 後 day+28 に LMCs を単離し、 1×10^5 個/well ずつ、Naïve BDF1 由来のオルガノイドと ALyS705 培地と HeptiCult OGM 培地の 1:1 混合液中で共培養を施行した。培養 4 日目に $200 \mu\text{m}$ 以上のオルガノイド形成数を計測し、コントロール群との比率を算出した。(平均±標準誤差、N=5-15/group) 。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

5. 肝臓幹細胞の保護・増殖による肝臓 GVHD の新規治療法の検討

1) SMAD2/3 阻害剤の肝臓 GVHD に与える影響の検討

TGF β 1 は TGF β type1 受容体に結合すると SMAD2/3 がリン酸化され、SMAD4 と複合体を形成し、核内へ移行することで種々の転写を調節している (Massague J., 2000; Chen *et al.*, 1995; Derynck *et al.*, 1997)。SB-431542 は TGF β type1 受容体である ALK5 の阻害を介して SMAD2/3 のリン酸化を抑制する薬剤である (Callahan *et al.*, 2002)。

初めに、SMAD2/3 阻害薬である SB-431542 が、Allo 群由来の LMCs によるオルガノイド形成抑制を軽減できるかどうかを検討した。Naïve マウスから作製したオルガノイドを、Syn 群からの LMCs もしくは Allo 群由来の LMCs と共培養し、それぞれに SB-431542 を加えたところ、Allo 群由来の LMCs を添加するとオルガノイド形成は有意に抑制されるが、SB-431542 によって LMCs を添加しないコントロール群と同程度まで改善することが示された。一方、Syn 群由来の LMCs を添加してもオルガノイド形成は抑制されず、また、SB-431542 の添加の有無に有意な変化は認めなかった (図 22)。以上の結果から、Allo 群の肝臓に浸潤する炎症細胞は、TGF β 1 を介してオルガノイド形成を抑制することが示された。



続いて TGF β 1 経路の阻害が肝臓 GVHD における肝臓幹細胞の傷害を改善させるかどうかを *in vivo* で検討した。同種 HCT 後、SB-431542 を day+14 から+28 まで連日腹腔内投与を行い、day+28 における肝臓オルガノイド形成能を検討した。SB-431542 投与群は、非投与群と比較して、オルガノイド形成数が有意に増加し、TGF β 1 経路の阻害はオルガノイド形成性肝臓幹細胞を GVHD から保護していることが示唆された (図 23A, B)。

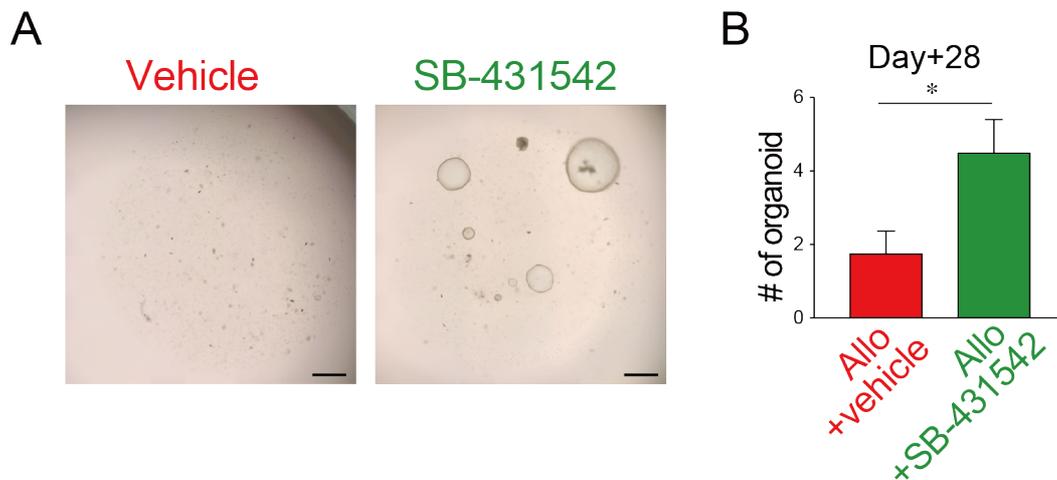


図 23. SB-431542 が HCT 後肝臓オルガノイドの形成能に与える影響の検討

図 3 と同様の条件で B6 をドナーとして、BDF1 に移植を行った。HCT 後 day+14 から day+28 まで、SB-431542 を 5mg/kg、連日腹腔内投与した。Day+28 に肝臓を摘出し、右葉からオルガノイドを作製し、培養 7 日目に 200 μ m 以上のオルガノイド数を測定した。(A) 培養 7 日目のオルガノイド。(B) 培養 7 日目のオルガノイド形成数(平均±標準誤差、N=8-10/group)。Scale bar, 500 μ m。* p < 0.05

さらに、胆管機能障害に関する検討を行ったところ、SB-431542 は、同種 HCT 後の BEC のアポトーシス、*Mmp7* 発現および血漿 T-bil を有意に減少させ、TGF β 1 阻害によるオルガノイド形成性肝臓幹細胞の保護が GVHD における胆管機能障害の緩和につながったことを示唆した (図 24A-C)。

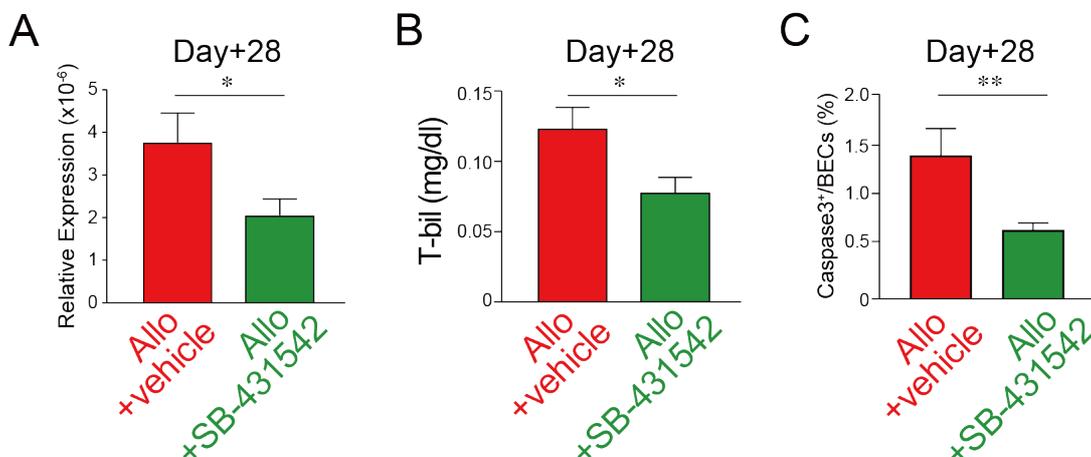


図 24. SB-431542 投与後の胆管機能障害の検討

図 23 と同様の移植を行い、HCT 後 day+28 における胆管障害のマーカーを測定した。(A) *MMP7* の発現量 (平均±標準誤差、N=13-15/group)、(B) 血漿 T-bil 値 (平均±標準誤差、N=12-13/group) (C) cCasp3 陽性 BEC の割合。(平均±標準誤差、N=7-8/group)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

2) R-Spo1 の肝臓 GVHD に与える影響の検討

R-Spo1 は組織幹細胞上の Lgr5 に結合し、Wnt シグナル伝達を増強することで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 (Lin *et al.*, 2017)。

本研究では、R-Spo1 が肝臓 GVHD に伴って増加する Lgr5⁺肝臓幹細胞、オルガノイド形成性肝臓幹細胞の増殖を促進させるか検討を行った。BDF1-Lgr5-eGFP マウスをレシピエントにした Allogeneic 移植を行い、HCT 後 day+14 から day+28 まで R-Spo1 を週 3 回腹腔内投与した。HCT 後 day+28 に肝臓を採取し、蛍光免疫染色で Lgr5⁺肝臓幹細胞を定量したところ、R-Spo1 投与群では非投与群に比較して Lgr5⁺肝臓幹細胞が有意に増加していた (図 25A, B)。

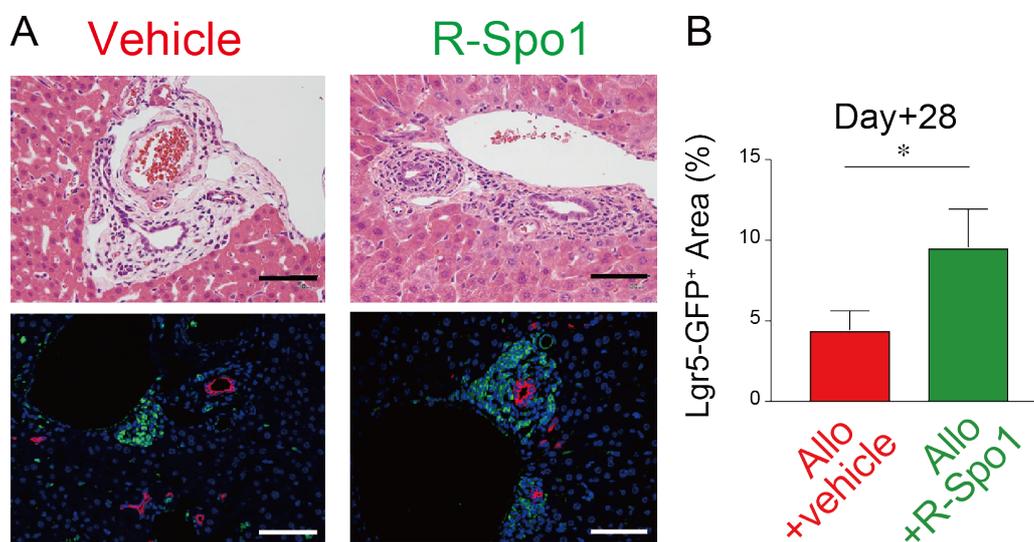


図 25. R-Spo1 投与による HCT 後肝臓 Lgr5 陽性細胞の動態

図 3 と同様の条件で、B6 マウスから Lgr5-eGFP-BDF1 マウスに移植を行った。HCT 後 day+14 から週 3 回 R-Spo1 を 10mg/kg で腹腔内投与した。(A) HCT 後 day+28 における門脈域の H&E 所見 (上段) と蛍光免疫所見 (下段) を示す (赤: CK19、緑: Lgr5-

eGFP)。 (B) HCT 後 day+28 における Lgr5-eGFP 陽性領域の割合を算出した。(平均±標準誤差、N=4-7/group)。 Scale Bar, 50 μ m。 * p < 0.05

また HCT 後 day+28 に肝臓を採取し、右葉から肝臓オルガノイドを作成し、その形成数を比較した。R-Spo1 投与群では、オルガノイド形成数が有意に多く保たれていた (図 26A, B)。

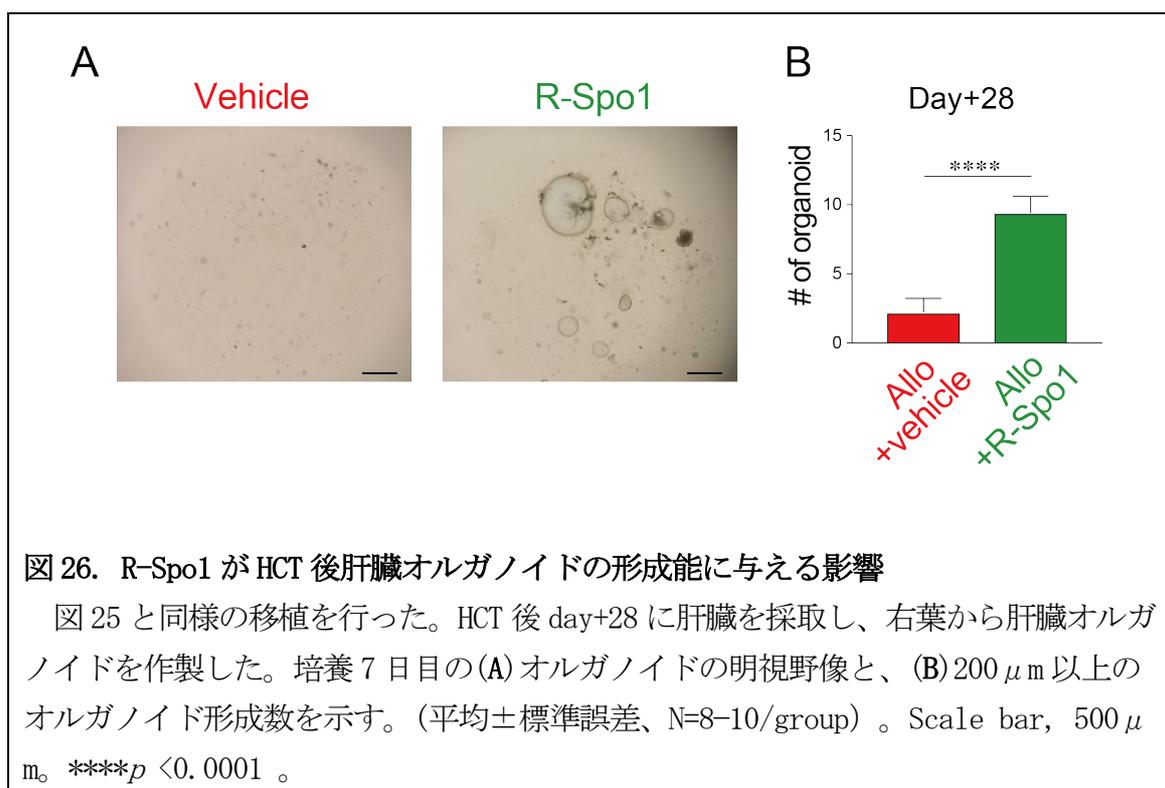


図 26. R-Spo1 が HCT 後肝臓オルガノイドの形成能に与える影響

図 25 と同様の移植を行った。HCT 後 day+28 に肝臓を採取し、右葉から肝臓オルガノイドを作製した。培養 7 日目の (A) オルガノイドの明視野像と、 (B) 200 μ m 以上のオルガノイド形成数を示す。(平均±標準誤差、N=8-10/group)。 Scale bar, 500 μ m。 **** p < 0.0001。

以上のことから、SB-431542 は肝臓 GVHD における TGF β シグナルを阻害することで、オルガノイド形成性肝臓幹細胞を保護し、胆管障害を軽減することが示された。また、R-Spo1 は、Lgr5⁺肝臓幹細胞の増殖を促進させることで、肝臓 GVHD による肝臓幹細胞の減少を抑制することが示された。これらの薬剤が肝臓 GVHD に対する新規治療薬となりうることが示唆された。

考察

GVHD は成熟した上皮細胞だけでなく組織幹細胞も標的とすることで、組織の恒常性が損なわれ、腸や皮膚などの GVHD 標的臓器の再生が阻害されることが明らかになってきている (Hanash *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2018; Takashima *et al.*, 2011)。肝細胞は高い再生能力を有しており (Ko *et al.*, 2020)、肝臓内にランダムに分布し、テロメラーゼ逆転写酵素を発現する成熟肝細胞が、恒常時には多能性幹細胞を介さずに局所肝細胞の供給を担っていることが示されている (Lin *et al.*, 2018)。そのため、肝臓幹細胞は、主に肝障害後の組織恒常性の維持に寄与していると考えられる。これまでに種々の肝障害後の再生過程に寄与する肝臓内の複数の肝臓幹細胞集団が報告されてきたが、本研究では初めて肝臓 GVHD における肝臓幹細胞の動態と役割についての検討を行った。

種々の肝障害の後に、門脈から反応性 BEC が拡大して腔状構造を形成することが知られており、細胆管反応と呼ばれている (Farber, 1956; Ko *et al.*, 2020)。細胆管反応は、胆管あるいはヘリング管に存在する幹細胞が活性化されて生じる反応と考えられている (Ko *et al.*, 2020)。最近では、細胆管反応は胆管障害時の胆汁排泄機能を補い、胆管構造の再構築に重要な役割を果たしていることが示されている (Kamimoto *et al.*, 2020)。また、YAP および mTORC シグナル伝達に依存する細胆管反応を担う幹細胞とは別に、Lgr5⁺肝臓幹細胞も肝障害後に門脈領域に出現し、周囲の実質に拡大し、損傷を受けた組織の修復に貢献することが報告されてきた (Huch *et al.*, 2013; Planas-Paz *et al.*, 2019)。Lgr5⁺肝臓幹細胞は胆管上皮に特異的なマーカーを発現しているため、BEC 起源の可能性も示唆されていたが、現在では、幹細胞のポテンシャルを有する門脈域周囲の肝細胞や線維芽細胞由来として認識されている (Planas-Paz *et al.*, 2019)。本研究では、反応性胆管および Lgr5 陽性細胞の両方が 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から、両プロセスが GVHD によって引き起こされた損傷を修復するために活性化されるものの、最終的には GVHD によって破壊されてしまうことを示唆している。我々の結果と一致するように、細胆管反応が乏しい所見は、ヒトにおける肝臓 GVHD の診断を支持する病理学的特徴の一つである (Matsukuma *et al.*, 2016; Stueck *et al.*, 2018)。細胆管反応の抑制と Lgr5 陽性細胞の消退は、慢性 GVHD における胆管消失症候群の原因となっている可能性がある。

肝臓幹細胞の同定には、EpCAM、TROP2、SOX9、Lgr4 など、Lgr5 以外にもいくつかのマーカーが報告されているが、これらのマーカーは成熟 BEC や中心静脈周囲の肝細

胞などの他の細胞集団でも発現しており、また肝臓には複数の幹細胞集団が存在するため、表現型マーカーを用いて全ての肝臓幹細胞を定量することは困難である (Aizarani *et al.*, 2019; Okabe *et al.*, 2009; Planas-Paz *et al.*, 2016)。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 陽性細胞の動態と一致するように、肝臓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。Lgr5 陽性細胞がほとんど存在しない naïve マウスの肝臓においても相当数のオルガノイド形成能が認められており、これは Lgr5⁺肝臓幹細胞群以外にもオルガノイドを形成する肝臓幹細胞群が存在することを示唆している。肝臓オルガノイドは、培養条件を変更することで BEC と肝細胞の両方に分化することができ、多分化能を有していることが報告されている (Cao *et al.*, 2017; Huch *et al.*, 2013)。我々は、HCT 後後期に胆管上皮と肝細胞の中間的な表現型を持つ BEC が出現していることを発見し、胆管に存在する幹細胞が多能性を有することが示唆された。また、肝臓 GVHD からの BEC の再生に際し、慢性炎症などの影響で異常な分化をすることが示唆された。ヒトにおける慢性肝障害においても中間的な表現型を有する細胞集団が観察されることが報告されている (Deng *et al.*, 2018)。今後、肝臓 GVHD における複数の肝臓幹細胞集団の動態と役割の評価をより詳細に追求するために、各肝臓幹細胞集団の特異的マーカーの探求が必要である。

我々はこれまで、GVHD における腸幹細胞の枯渇とドナー T 細胞による腸内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、JAK1 及び 2 の選択的阻害薬であるルキソリチニブは IFN γ を介した腸管幹細胞およびオルガノイドの消退を改善することを示した (Eriguchi *et al.*, 2018; Takashima *et al.*, 2019)。また、ルキソリチニブが皮膚および腸幹細胞を GVHD から保護することも報告している (Eriguchi *et al.*, 2018; Takahashi *et al.*, 2018)。腸管オルガノイドとは異なり、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判明した。

TGF β 1 は TGF β type1 受容体に結合すると、下流の SMAD2/3 がリン酸化され、SMAD4 と複合体を形成し、核内へ移行することで種々の転写を調節している (Massague J., 2000; Chen *et al.*, 1995; Derynck *et al.*, 1997)。SB-431542 は TGF β type1 受容体である ALK5 の阻害を介して SMAD2/3 のリン酸化を抑制する薬剤である (Callahan *et al.*, 2002)。これまで、薬剤性慢性肝障害に伴う肝臓の線維化モデルや、肺線維化モデルにおいて線維化を改善すると報告されている。 (Gouville A. *et al.*, 2005; Bonniaud P. *et al.*, 2005) また、TGF β 阻害薬である Pirfenidone がマクロファージを介した炎症と TGF β 1 産生を阻害することで慢性 GVHD が改善したとの報告もある (Du J. *et al.*, 2017)。

本研究では、肝臓 GVHD における肝臓幹細胞保護目的に同種 HCT 後に SMAD2/3 阻害薬である SB-431542 を投与し、検討を行った。TGF β シグナル阻害は、オルガノイド形成性肝臓幹細胞の維持に貢献し、GVHD による BEC のアポトーシスならびに、黄疸を軽減した。SMAD2/3 阻害薬である SB-431542 は、肝臓幹細胞保護作用によって肝臓 GVHD の治療薬として有望であると考えられる。一方、肝臓の NOTCH シグナルをノックダウンした胆管欠損マウスにおいては、肝細胞が TGF β 依存性に BEC に分化誘導されることが報告されている (Schaub *et al.*, 2018)。この矛盾は、BEC 分化における TGF β シグナル伝達の役割が、肝発生時と炎症性肝障害という環境の違いや NOTCH シグナルの有無など、状況によって変化しうることを示唆している。

R-Spo1 は組織幹細胞上の Lgr5 に結合し、Wnt シグナル伝達を増強することで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 (Lin *et al.*, 2017)。我々はこれまで、R-Spo1 を投与することで Lgr5 を介して腸幹細胞の増殖を促進し、マウスの腸管 GVHD から腸幹細胞を保護し GVHD を改善できることを報告している (Takashima *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2013)。肝臓においても、CCl₄ 誘導性の慢性肝障害モデルマウスにおいて、R-Spo1 と HGF を投与することにより、Lgr5 陽性細胞を誘導し、組織修復及び肝線維化の改善を認めた報告がある (Lin *et al.*, 2017)。本研究では、同種 HCT 後に R-Spo1 を投与することで、肝臓 GVHD によって出現した Lgr5⁺肝臓幹細胞の増殖を促進し、HCT 後 day+28 における肝臓 GVHD による Lgr5⁺肝臓幹細胞の減少を改善させ、肝臓オルガノイドの形成能が保たれることを示した。

MMP7 は主に肝外胆管と胆嚢上皮細胞で発現し、肝内 BEC では恒常時に発現しない。近年、MMP7 が損傷した肝内 BEC 上で誘導され、血中に放出されることが報告された (Kerola *et al.*, 2016; Lam *et al.*, 2020; Lertudomphonwanit *et al.*, 2017)。また、BEC 上の MMP7 発現は、サイトカインおよびケモカインの発現を誘導することにより組織傷害を増強し、MMP7 阻害剤は、マウスにおける胆道閉鎖症の表現型を改善することが示された。 (Lertudomphonwanit *et al.*, 2017)。最近では、先天性胆道閉鎖症患者において血清中の MMP7 が有意に上昇しており、臨床でも胆管障害の特異的マーカーとして注目されている (Lam *et al.*, 2020; Lertudomphonwanit *et al.*, 2017)。我々は今回、HCT 後の胆管上皮の MMP7 の発現を、蛍光免疫染色及び、qPCR を用いて検討した結果、HCT 後、Allo 群で胆管上皮傷害を反映して、MMP7 の発現が亢進することを、示した。これらのデータは、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され、MMP7 は肝臓 GVHD の治療標的になる可能性も示唆される。

全体として本研究では、肝臓 GVHD では、TGF β 1 依存性にオルガノイド形成性肝臓幹細胞が傷害され、肝臓 GVHD による BEC 傷害が悪化することが示された。MMP7 が肝臓 GVHD の疾患マーカーとなる可能性が示唆され、TGF β 阻害剤や R-Spo1 などはオルガノイド形成性肝臓幹細胞を標的とした、新しい肝臓 GVHD 治療薬となる可能性があることを示した。

総括および結論

1. 本研究にて以下の知見が得られた。

- 肝臓の Lgr5⁺肝臓幹細胞を含むオルガノイド形成性肝臓幹細胞が肝臓急性 GVHD の標的となる。
- 肝臓 GVHD において胆管障害を反映して MMP7 の発現が亢進する
- オルガノイド形成性肝臓幹細胞は肝臓 GVHD において TGF β 1 を介して、傷害される。
- SMAD2/3 阻害薬である SB-431542 や Wnt 作動薬である R-Spo1 は肝臓 GVHD の新規治療薬となりうる。

2. 新知見の意義

急性 GVHD の標的臓器である腸管、皮膚においては組織幹細胞が GVHD の標的になることが報告されていたが、同じ急性 GVHD の標的臓器である肝臓に関しては不明であった。今回我々は Lgr5 レポーターマウス、及び肝臓オルガノイドを用いることで、肝臓 GVHD において肝臓幹細胞が TGF β 1 を介して傷害されることで胆管上皮傷害が引き起こされる可能性があることを初めて報告した。また、SMAD2/3 阻害薬である SB-431542 及び Wnt 作動薬である R-Spo1 が肝臓 GVHD の新規治療薬となりうることを示した。さらに、これまで肝臓 GVHD に対する特異的なバイオマーカーは報告されておらず、今回我々は MMP7 が肝臓 GVHD において胆管障害を反映して発現が上昇することを示し、MMP7 が肝臓 GVHD 診断のバイオマーカーとなりうることを示した。

3. 今後の研究展開

今回我々は肝臓幹細胞マーカーとして Lgr5 陽性細胞ならびに肝臓オルガノイド形成能に着目した。しかし、肝臓には種々の肝臓幹細胞の存在が報告されており、その他の幹細胞の肝臓 GVHD の動態や役割についても、検討が必要である。

また我々は、肝臓 GVHD において TGF β 1 を介して肝臓幹細胞傷害が生じることを示したが、TGF β 1 を豊富に産生するマクロファージの詳細な役割については、マクロファージ除去やケモカインノックアウトマウス等を用いて、今後の検討が必要である。

MMP7 が肝臓 GVHD 時において胆管障害を反映して発現が亢進していることを示した。今後、血清中の MMP7 値が肝臓 GVHD 時に上昇するかをマウスおよびヒトの肝臓 GVHD で検討したい。肝臓以外の GVHD での血清 MMP7 値や、GVHD 以外の肝障害時の血清 MMP7 と比較し肝臓 GVHD の特異的マーカーとなりうるかを検討する。

謝辞

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、

荒隆英助教、大東寛幸先生、菊池遼先生、千丈創先生、米田和樹先生、陳炫仲先生、
張紫璇先生、早瀬英子先生、高橋秀一郎先生、横山絵美先生、立野貴大先生

協和発酵キリン株式会社

利益相反

R-Spo1 製剤は協和発酵キリン株式会社より提供いただいた。

引用文献

- Adom, D., Rowan, C., Adeniyani, T., Yang, J., and Paczesny, S. (2020). Biomarkers for Allogeneic HCT Outcomes. *Front. Immunol.* *673*, 1–13.
- Aizarani, N., Saviano, A., Sagar, Mailly, L., Durand, S., Herman, J.S., Pessaux, P., Baumert, T.F., and Grun, D. (2019). A human liver cell atlas reveals heterogeneity and epithelial progenitors. *Nature* *572*, 199–204.
- Akpek, G., Boitnott, J.K., Lee, L.A., Hallick, J.P., Torbenson, M., Jacobsohn, D.A., Arai, S., Anders, V., and Vogelsang, G.B. (2002). Hepatitic variant of graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusion. *Blood* *100*, 3903–3907.
- Alexander, K.A., Flynn, R., Lineburg, K.E., Kuns, R.D., Teal, B.E., Olver, S.D., Lor, M., Raffelt, N.C., Koyama, MLeveque, L., *et al.* (2014). CSF-1-dependant donor-derived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* *124*, 4266–4280.
- Ara, T., Hashimoto, D., Hayase, E., Noizat, C., Kikuchi, R., Hasegawa, Y., Matsuda, K., Ono, S., Matsuno, Y., Ebata, K., *et al.* (2020). Intestinal goblet cells protect against GVHD after allogeneic stem cell transplantation via Lypd8. *Sci. Transl. Med.* *12*.1–12.
- 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., and Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* *449*, 1003–1007.
- Callahan, F., Burgess, L.J., Fornwald, A.J., Gaster, L., Harling, J., Harrington, F., Heer, J., Kwon, C., Lehr, R., Mathur, A., *et al.* (2002). Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5). *J. Med. Chem.* *45*, 999–1001
- Cao, W., Chen, K., Bolkestein, M., Yin, Y., Verstegen, M.M.A., Bijvelds, M.J.C., Wang, W., Tuysuz, N., Ten Berge, D., Sprengers, D., *et al.* (2017).

Dynamics of Proliferative and Quiescent Stem Cells in Liver Homeostasis and Injury. *Gastroenterology* *153*, 1133-1147.

Chen, H.R., Moses, L.H., Maruoka, M.E., Derynck, R., and Kawabata, M. (1995). Phosphorylation-dependent interaction of the cytoplasmic domains of the type I and type II transforming growth factor-beta receptors. *J. Biol. Chem.* *270*, 12235-12241

Cooke, K. R., Kobzik, L., Martin, T. R., Brewer, J., Delmonte, J., Crawford, J. M. & 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.

Deng, X., Zhang, X., Li, W., Feng, R.X., Li, L., Yi, G.R., Zhang, X.N., Yin, C., Yu, H.Y., Zhang, J.P., *et al.* (2018). Chronic Liver Injury Induces Conversion of Biliary Epithelial Cells into Hepatocytes. *Cell Stem Cell* *23*, 114-122 e113.

Derynck, R., and Feng, H.X. (1997). TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys. Acta.* *1333*, F105-150

Du, J., Paz, K., Flynn, R., Vulic, A., Robinson, T.M Lineburg, K.E., Alexander, K.A., Meng, J., Roy, S., Panoskaltsis-Mortari, A., *et al.* (2017). Pirfenidone ameliorates murine chronic GVHD through inhibition of macrophage infiltration and TGF-beta production. *Blood* *129*, 2570-2580.

Du, J., Wu, Y., Ai, Z., Shi, X., Chen, L., and Guo, Z. (2014). Mechanism of SB431542 in inhibiting mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell Signal* *26*, 2107-2116.

Eriguchi, Y., Nakamura, K., Yokoi, Y., Sugimoto, R., Takahashi, S., Hashimoto, D., Teshima, T., Ayabe, T., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2018). Essential role of IFN-gamma in T cell-associated intestinal inflammation. *JCI Insight* *3*, 1-18.

Farber, E. (1956). Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylamino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* *16*, 142-148.

Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P. and Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *Lancet* *373*, 1550–1561

Fu, Y.Y., Egorova, A., Sobieski, C., Kuttiyara, J., Calafiore, M., Takashima, S., Clevers, H., and Hanash, A.M. (2019). T Cell Recruitment to the Intestinal Stem Cell Compartment Drives Immune-Mediated Intestinal Damage after Allogeneic Transplantation. *Immunity* *51*, 90–103 e103.

Gouville, A., Boullay, V., Krysa, G., Pilot, J., Brusq, J., Loriolle, F., Gauthier, J., Papworth, S., Laroze, A., Gellibert, F., *et al.* (2005). Inhibition of TGF-beta signaling by an ALK5 inhibitor protects rat from dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis. *Br. J. Pharmacol.* *145*, 166–177.

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.

Harris, A., Ferrara, J., Braun, T., Holler, E., Teshima, T., Levine, J., Choi, S., Landfried, K., Akashi, K., Lugt, M., *et al.* (2012). Plasma biomarkers of lower gastrointestinal and liver acute GVHD. *Blood* *119*, 2960–2963.

Hennet, T., Hagen, F. K., Tabak, L. A. & Marth, J. D. (1995). T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *92*, 12070–12074.

Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., Li, V.S., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., *et al.* (2013). In vitro expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* *494*, 247–250.

Ichiba, T., Teshima, T., Kuick, R., Misek, E.D., Liu, C., Takada, Y., Maeda, Y., Reddy, P., Williams, L.D., Hanash, M.S., *et al.* (2003). Early changes in gene expression profiles of hepatic GVHD uncovered by oligonucleotide microarrays. *Blood* *102*, 763–771.

Kamimoto, K., Nakano, Y., Kaneko, K., Miyajima, A., and Itoh, T. (2020).

Multidimensional imaging of liver injury repair in mice reveals fundamental role of the ductular reaction. *Commun. Biol.* *3*, 289.

Kerola, A., Lampela, H., Lohi, J., Heikkila, P., Mutanen, A., Hagstrom, J., Tervahartiala, T., Sorsa, T., Haglund, C., Jalanko, H., and Pakarinen, M.P. (2016). Increased MMP-7 expression in biliary epithelium and serum underpins native liver fibrosis after successful portoenterostomy in biliary atresia. *J. Pathol. Clin. Res.* *2*, 187-198.

Kim, K. A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., *et al.* (2005). Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* *309*, 1256-1259.

Ko, S., Russell, J.O., Molina, L.M., and Monga, S.P. (2020). Liver Progenitors and Adult Cell Plasticity in Hepatic Injury and Repair: Knowns and Unknowns. *Annu. Rev. Pathol.* *15*, 23-50.

Lam, S., Singh, R., Dillman, J.R., Trout, A.T., Serai, S.D., Sharma, D., Sheridan, R., Su, W., Fei, L., Karns, R., *et al.* (2020). Serum Matrix Metalloproteinase 7 Is a Diagnostic Biomarker of Biliary Injury and Fibrosis in Pediatric Autoimmune Liver Disease. *Hepatol. Commun.* *4*, 1680-1693.

Lertudomphonwanit, C., Mourya, R., Fei, L., Zhang, Y., Gutta, S., Yang, L., Bove, K.E., Shivakumar, P., and Bezerra, J.A. (2017). Large-scale proteomics identifies MMP-7 as a sentinel of epithelial injury and of biliary atresia. *Sci. Transl. Med.* *9*.

Lin, S., Nascimento, E.M., Gajera, C.R., Chen, L., Neuhofer, P., Garbuzov, A., Wang, S., and Artandi, S.E. (2018). Distributed hepatocytes expressing telomerase repopulate the liver in homeostasis and injury. *Nature* *556*, 244-248.

Lin, Y., Fang, Z.P., Liu, H.J., Wang, L.J., Cheng, Z., Tang, N., Li, T., Liu, T., Han, H.X., Cao, G., *et al.* (2017). HGF/R-spondin1 rescues liver dysfunction through the induction of Lgr5(+) liver stem cells. *Nat. Commun.* *8*, 1175.

Liu, C., and Crawford, J.M. (2004). Graft-vs.-host disease of the liver. In

Graft vs. Host Disease, F. J.L., J.H. Deeg, and K.R. Cooke, eds. (United States: CRC Press), pp. 257-278.

Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S. & Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* 13, 133-140.

Massague, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1, 169-178.

Matsukuma, K.E., Wei, D., Sun, K., Ramsamooj, R., and Chen, M. (2016). Diagnosis and differential diagnosis of hepatic graft versus host disease (GVHD). *J. Gastrointest. Oncol.* 7, S21-31.

Matsuzawa-Ishimoto, Y., Hine, A., Shono, Y., Rudensky, E., Lazrak, A., Yeung, F., Neil, J.A., Yao, X., Chen, Y.H., Heaney, T., *et al.* (2020). An intestinal organoid-based platform that recreates susceptibility to T-cell-mediated tissue injury. *Blood* 135, 2388-2401.

Metcalfe, C., Kljavin, N.M., Ybarra, R., and de Sauvage, F.J. (2014). Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration. *Cell Stem Cell* 14, 149-159.

Murphy, G.F., Lavker, R.M., Whitaker, D., and Korngold, R. (1991). Cytotoxic folliculitis in GvHD. Evidence of follicular stem cell injury and recovery. *J. Cutan. Pathol.* 18, 309-314.

Okabe, M., Tsukahara, Y., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, S., Kamiya, Y., Tsujimura, T., Nakamura, K., and Miyajima, A. (2009). Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development* 136, 1951-1960.

Parks, W., Wilson, C., and Lopez-Boado, Y. (2004). Matrix *met* metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 617-629.

Peng, W.C., Lau, W., Forneris, F., Granneman, J., Huch, M., Clevers, H., and Gros, P. (2013). Structure of stem cell growth factor R-spondin 1 in complex with the ectodomain of its receptor LGR5. *Cell Rep.* *3*, 1885–1892.

Philippe, B., Margetts, P., Kolb, M., Schroeder, J., Kapoun, A., Damm, D., Murphy, A., Chakravarty, S., Dugar, S., Higgins, L., *et al.* (2005). Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *171*, 889–898.

Planas-Paz, L., Orsini, V., Boulter, L., Calabrese, D., Pikiolak, M., Nigsch, F., Xie, Y., Roma, G., Donovan, A., Marti, P., *et al.* (2016). The RSP0-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module controls liver zonation and size. *Nat. Cell Biol.* *18*, 467–479.

Planas-Paz, L., Sun, T., Pikiolak, M., Cochran, N.R., Bergling, S., Orsini, V., Yang, Z., Sigoillot, F., Jetzer, J., Syed, M., *et al.* (2019). YAP, but Not RSP0-LGR4/5, Signaling in Biliary Epithelial Cells Promotes a Ductular Reaction in Response to Liver Injury. *Cell Stem Cell* *25*, 39–53 e10.

Schaub, J.R., Huppert, K.A., Kurial, S.N.T., Hsu, B.Y., Cast, A.E., Donnelly, B., Karns, R.A., Chen, F., Rezvani, M., Luu, H.Y., *et al.* (2018). De novo formation of the biliary system by TGFbeta-mediated hepatocyte transdifferentiation. *Nature* *557*, 247–251.

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

Stueck, A.E., Schiano, T.D., and Fiel, M.I. (2018). Development of a novel histologic diagnostic algorithm for hepatic graft-versus-host disease. *Mod. Pathol.* *31*, 442–451.

Takahashi, S., Hashimoto, D., Hayase, E., Ogasawara, R., Ohigashi, H., Ara, T., Yokoyama, E., Ebata, K., Matsuoka, S., Hill, G.R., *et al.* (2018). Ruxolitinib protects skin stem cells and maintains skin homeostasis in murine

graft-versus-host disease. *Blood* *131*, 2074–2085.

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.

Takashima, S., Martin, M.L., Jansen, S.A., Fu, Y., Bos, J., Chandra, D., O'Connor, M.H., Mertelsmann, A.M., Vinci, P., Kuttiyara, J., *et al.* (2019). T cell-derived interferon-gamma programs stem cell death in immune-mediated intestinal damage. *Sci. Immunol.* *4*.

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.

Woo, W.M., and Oro, A.E. (2011). SnapShot: hair follicle stem cells. *Cell* *146*, 334–334 e332.

Yamakawa, T., Ohigashi, H., Hashimoto, D., Hayase, E., Takahashi, S., Miyazaki, M., Minomi, K., Onozawa, M., Niitsu, Y., and Teshima, T. (2018). Vitamin A-coupled liposomes containing siRNA against HSP47 ameliorate skin fibrosis in chronic graft-versus-host disease. *Blood* *131*, 1476–1485.

Yeh, K.H., Hsieh, H.C., Tang, J.L., Lin, M.T., Yang, C.H., and Chen, Y.C. (1994). Severe isolated acute hepatic graft-versus-host disease with vanishing bile duct syndrome. *Bone Marrow Transplant.* *14*, 319–321.

Yokomuro, S., Tsuji, H., Lutz, J.G., 3rd, Sakamoto, T., Ezure, T., Murase, N., and Demetris, A.J. (2000). Growth control of human biliary epithelial cells by interleukin 6, hepatocyte growth factor, transforming growth factor beta1, and activin A: comparison of a cholangiocarcinoma cell line with primary cultures of non-neoplastic biliary epithelial cells. *Hepatology* *32*, 26–35.

Zhao, J. *et al.* (2007). R-spondin1, a novel intestinotrophic mitogen, ameliorates experimental colitis in mice. *Gastroenterology* *132*, 1331–1343.

