



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
Author(s)	荒, 隆英
Description	配架番号 : 2436
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13422号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13422
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91699
Type	doctoral thesis
File Information	Takahide_Ara.pdf



学 位 論 文

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

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

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	6 頁
実験方法	9 頁
実験結果	18 頁
考察	43 頁
総括および結論	46 頁
謝辞	48 頁
利益相反	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。

Takahide Ara, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Clara Noizat, Kana Matsuda, Shoko Ono, Yoshihiro Matsuno, Ko Ebata, Reiki Ogasawara, Shuichiro Takahashi, Hiroyuki Ohigashi, Emi Yokoyama, Junichi Sugita, Masahiro Onozawa, Ryu Okumura, Kiyoshi Takeda, and Takanori Teshima

Intestinal goblet cells play a protective role against GVHD via Lypd8 dependent manner after allogeneic stem cell transplantation.

雑誌名 Science Translational Medicine

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Takahide Ara, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Clara Noizat, Kana Matsuda, Shoko Ono, Yoshihiro Matsuno and Takanori Teshima.
Degree of intestinal goblet-cell loss is associated with severity of GVHD and transplant outcome and goblet cell growth factor IL-25 mitigates GVHD.
2018 BMT Tandem Meeting. 2018年2月21日. ソルトレイクシティ.
2. 荒 隆英、橋本 大吾、早瀬 英子、Clara Noizat、松田 可奈、小野 尚子、松野 吉宏、白鳥 聡一、後藤 秀樹、中川 雅夫、遠藤 知之、豊嶋 崇徳
腸管杯細胞は移植片対宿主病のバイオマーカーであり、その増殖因子 IL-25 は移植片対宿主病を軽減する
第80回日本血液学会学術集会（プレナリーセッション）、2018年10月13日. 大阪.
3. Takahide Ara, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Clara Noizat, Ryu Okumura, Kiyoshi Takeda and Takanori Teshima.
Intestinal goblet cells play a protective role against GVHD via a Lypd8-dependent manner after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.
2018 ASH Annual Meeting, 2018年12月1日. サンディエゴ.

要旨

【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、その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、致死量の放射線を照射し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 5×10^6 の骨髄細胞および 5 または 10×10^6 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 $0.3 \mu\text{g}$ を腹腔内に7日間投与した。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。

【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。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

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が、移植を行なった場合は、Syn 群で Naïve 群と同様の部位に *Lypd8* が保たれる一方で、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、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、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 を行ってから移植を行なっても、同様に KO 群の予後が悪化したため、WT マウスと KO マウスの移植前の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。移植前に IL-25 を投与しても、*Lypd8* KO レシピエントでは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。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 の重症度に有意に相関し、治療により消化管 GVHD が寛解になった時点で杯細胞数も回復していた。また全上皮細胞に対する大腸杯細胞数を陰窩の断面で評価し、15%以下となっている症例を、重度の杯細胞傷害と定義をしたところ、重度に傷害を受けていた群が軽度の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、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保護すると、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 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。

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。

ATP	adenosine triphosphate	LGR	Leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor 5
Allo	allogeneic	LP	lamina propria
BSA	bovine serum albumin	LPS	lipopolysaccharide
CMV	cytomegalovirus	Lypd8	Ly6/PLAUR domain containing 8
DAMPs	damage-associated molecular patterns	NRM	Non-relapse mortality
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole	PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
DTT	dithiothreitol	PAS	periodic acid schiff
EC	epithelia cell	PBS	phosphate buffered saline
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	PCR	polymerase chain reaction
FCS	fetal calf serum	PFA	paraformaldehyde
FISH	fluorescent in situ hybridization	QOL	quality of life
GI	gastrointestinal	REG	regenerating islet-derived Quality of life
GVHD	graft-versus-host disease	rmIL-25	recombinant Mouse Interleukin-25
GVL	graft versus leukemia	SCT	stem cell transplantation
HE	Hematoxylin-Eosin	SL	serosal layer
ILC	innate lymphoid cell	Syn	syngeneic
KO	knock out	WT	wild type

緒言

ヒトは数兆もの細菌と共生している生命体であり、その大部分は腸内細菌叢として存在している (Grogan, 2015)。消化管は飲食物や微生物など常に外界から刺激を受けている粘膜免疫の主要な部位であり、これら常在細菌叢が宿主の代謝や免疫において重要な役割を担っている (Brown et al., 2013; Qin et al., 2010)。

腸上皮は一層の腸上皮細胞で構成されている。腸上皮は管腔側に絨毛、底部に陰窩を有し、各構造を単位とした組織再生を繰り返している。この腸上皮細胞には吸収上皮細胞のほか、Paneth 細胞、杯細胞、腸内分泌細胞、Tuft 細胞などがある。これらの細胞は全て、Leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5) を発現する腸幹細胞から分化する (Barker et al., 2007; de Lau et al., 2014; Sato et al., 2009)。Lgr5 陽性の腸幹細胞は小腸では陰窩底部に Paneth 細胞に挟まれるように存在しており、細胞の供給源となって、増殖と分化のバランスによって腸管ホメオスタシスを維持している (Smith et al., 2012)。

腸上皮を構成する細胞の一つである杯細胞はムチンを管腔側に分泌して腸上皮を覆うことで細菌が上皮内へ侵入することを防いでいる。小腸では一層のムチン層が腸上皮を覆っているのに対して、大腸では二層の構造となっており、大腸上皮に近い内層 (inner mucin layer) は上皮と強く結びつき、種々の抗菌活性を有する分子を高濃度で含有して、腸上皮への細菌の接触を物理的かつ化学的に防いでいる。一方、外層 (outer mucin layer) は常在菌叢の居住空間かつ栄養源として存在し、常在細菌叢の維持を通じて病原性細菌の増加を抑制している (Cornick et al., 2015; Pelaseyed et al., 2014)。

抗菌活性分子は様々な細胞から産生されるが、小腸 Paneth 細胞が分泌する抗菌ペプチド α -defensin や regenerating islet-derived (REG) 3g は病原菌に選択的に抗菌活性を示すことが知られており (Ayabe et al., 2000; Cash et al., 2006; Ganz et al., 1990; Ivanov et al., 2009; Salzman et al., 2010)、腸内細菌叢の維持において重要な調節因子となっている (Bevins and Salzman, 2011)。これに対して大腸における抗菌分子についてはあまり報告されてこなかったが、近年になって大腸の上皮細胞が分泌する Ly6/PLAUR domain containing 8 (Lypd8) が大腸菌などの鞭毛を有する菌の鞭毛に特異的に結合して細菌の移動を抑制することで、上皮内への侵入を抑制しているということが報告された (Okumura et al., 2016)。このような大腸のバリア機構は bacterial translocation を防ぐ上では重要であり、杯細胞が重要な役割を有している。

同種造血幹細胞移植は難治性の造血器悪性疾患や骨髄不全症、先天性代謝疾患などを根治しうる治療法である (Gale and Champlin, 1984)。現在、同種造血幹細胞移植は広く用いられているが、その代表的な合併症である移植片宿主病 (graft-versus-host disease : GVHD) や感染症は患者の生存を脅かし、生活の質 (Quality of life : QOL) を低下させる重要な合併症である。近年、移植法の変化に伴い GVHD の臨床像は多様化してきており、GVHD の適切な管理には、その病態の理解が必須のものとなってきている。

マウスモデルを用いた基礎研究により、主に消化管急性 GVHD の病態の解明は飛躍的に進歩した。消化管急性 GVHD の分子病態は、移植前処置に伴う組織障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障害の 3 つのステップによって構成されている。移植前処置は主に全身放射線照射および大量抗癌剤によって施され、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する。これ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、腸内細菌の bacterial translocation 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 (Gerbitz et al., 2004)。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、組織傷害に寄与する。

この病態を鑑みるに、GVHD 増悪の起因となる、腸管の傷害を抑制し、バリア機構を維持することにより DAMPs、PAMPs の流入を防いで炎症を抑えることが、同種造血幹細胞移植の成績を改善するために重要と考えられる。

消化管 GVHD において大腸の杯細胞が減少するということは病理学の分野では以前から報告されていたが (Eigenbrodt et al., 1990; Levy and Wefald, 1986)、GVHD の病理診断は、リンパ球浸潤を伴う上皮細胞のアポトーシス像として捉えられ (Sale

et al., 1979)、杯細胞傷害の動態や意義については検討がなされていなかった。そこで我々は、大腸杯細胞の傷害が消化管 GVHD の発症・進展においてどのような意義があるかについて検討を行なった。

まず、マウスの GVHD モデルを用いて、消化管 GVHD における大腸の杯細胞の傷害が、大腸のムチン層によるバリア機構の破綻を導き、bacterial translocation を引き起こすことにより GVHD が増悪していくという機序を発見した。さらに、この病態は杯細胞の増殖因子である IL-25 を移植前に投与することで軽減されることも示した。一方、大腸特異的な抗菌活性を有する分子である Lypd8 の欠損マウスをレシピエントとして移植を行い、移植後においても Lypd8 は bacterial translocation に対して予防的に働いていることを示し、Lypd8 が欠損する環境では杯細胞の IL-25 による杯細胞保護は効果を発揮できないことを示した。移植後の Lypd8 の免疫染色では、移植後のムチン層の破綻に伴って Lypd8 も減少しており、ムチン層破壊によって Lypd8 の抗菌機能も低下していることが示唆された。このように、抗菌分子 Lypd8 と杯細胞によるムチン層形成の両者は、抗菌作用を発揮するためには双方が存在していることが重要であることが判明した。これらのことから、消化管 GVHD の標的臓器である杯細胞を保護することで GVHD を軽減させるという新しい治療戦略を提示した。

つぎに、マウスモデルで得られた知見をふまえて、ヒトにおける同種造血幹細胞移植後の消化管病理を検討したところ、病理学的に診断された消化管 GVHD 症例においてのみ、特異的に大腸杯細胞が減少することが判明した。さらに、その傷害の程度が消化管 GVHD の重症度に相関すること、消化管 GVHD の寛解により大腸杯細胞数も回復することが判明した。重度の杯細胞障害は移植後の生命予後および非再発死亡 (Non-relapse mortality : NRM) に影響を及ぼすことがわかり、消化管 GVHD の biomarker としての有用性が伺われた。

大腸杯細胞は消化管 GVHD における非常に簡便な診断・モニタリング・予後予測に有用なバイオマーカーであり、その保護が新たな GVHD 予防法の一つになりうるため、さらなる研究および臨床応用が期待される。

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}) を日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) より、BALB/c (H-2^d) を日本チャールス・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) より購入し、本学の動物実験施設にて1週間の安静期間を経た後、実験に使用した。

これに加えて、下記の遺伝子組み換えマウスを使用した。

Lypd8 欠損型マウス (B6-*Lypd8*^{-/-} mice)

B6 を背景として大腸の enterocyte から特異的に産生される抗菌分子 *Lypd8* をノックアウトしたマウスである。消化管 GVHD における *Lypd8* の役割について評価するために使用した。本マウスは大阪大学大学院医学系研究科 免疫制御学の竹田潔教授より譲渡していただいた。

これらのマウスは本学の動物実験施設にて繁殖飼育し、8週齢以上のマウスを実験に使用した。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: 2012-030) の承認を得て行った。

2) 薬剤

Recombinant Mouse IL-25 (rmIL-25): BioLegend 社 (San Diego, CA) より購入した。1% bovine serum albumin (BSA) を含む 1x phosphate buffered saline (PBS) (-) を用いて 1 µg/mL に希釈し、既報を参考にし、7日間 0.3 µg (300 µL) を腹腔内投与した。

3) 臨床検体

2009年から2015年の間に北海道大学病院血液内科にて同種造血幹細胞移植を施行された205名を後方視的に解析したところ、このうち88名が移植前後に何らかの理由で下部消化管内視鏡を施行して大腸生検が行われていた。これらのへ

マトキシリン・エオジン(HE)染色を用いて、杯細胞数と臨床経過とを比較検討した。

本研究は北海道大学病院研究倫理審査委員会の承認を得ており(016-0380)、ヘルシンキ宣言及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号)を遵守して実施した。

2. 方法

1) マウス同種造血幹細胞移植

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B6D2F1, B6, *Lypd8*欠損型マウスを使用した。移植前処置に関しては、放射線を前処置に用いた場合、移植日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 11.5 ~ 12.5 Gy を4時間間隔の2分割照射で施行した。抗癌剤を前処置に用いた場合は day -7 ~ day -4 まで 25 mg/kg のブスルファン(大塚、東京、日本)、day -3, -2 に 100 mg/kg のシクロフォスファミド(塩野義、大阪、日本)をそれぞれ1×PBS (-)200 µL になるように調整して腹腔内投与した。

ドナーとして雌 B6、B6D2F1、BALB/c マウスをイソフルラン吸入で麻酔して安楽死させ、脾臓および両側大腿骨・脛骨・骨盤骨を採取した。脾臓はスライドガラス 2 枚を使用してすりつぶし、RPMI-1640 (Sigma Aldrich) + 4% fetal calf serum (FCS)を用いて 70 µm セルストレイナーを通した上で、50 ml チューブに移して採取した。大腿骨・脛骨・骨盤骨は 23 ゲージ針と 1 mL 注射器を用いて、RPMI1640+ 4% FCS を骨髓腔内に通して骨髓を押し出し、18 ゲージ針と 10 mL 注射器で吸引・吐出を繰り返し、攪拌した後に、70 µm セルストレイナーを通して 50 mL チューブに移して採取した。これらの細胞懸濁液中の赤血球を、red blood cell lysis buffer (BD Biosciences、東京、日本) 2 mL を用いて 2 分間溶血させた後、顕微鏡にてトリパンプルー法により細胞数を計測し、実験に応じてレシピエント 1 匹あたり脾臓細胞を 5 または 10 ×10⁶ 細胞と骨髓細胞 5 × 10⁶ 細胞を 1×PBS (-) 250 µL に希釈して尾静脈より静脈内投与した。

移植後のマウスは specific pathogen-free 環境下で、通常の飼料とオートクレーブにて滅菌し、塩酸を加えて pH 2.5 に調整した塩酸水で飼育した。移植後のマウスの 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)。

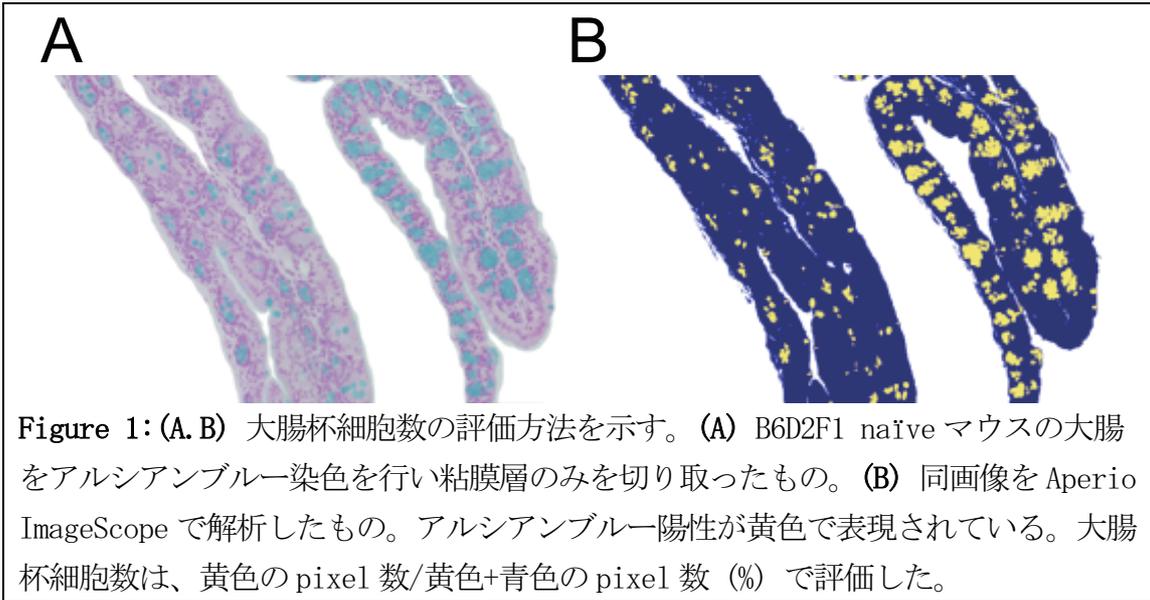
2) 大腸の組織標本作成および杯細胞の評価

大腸杯細胞数評価用の標本作成：固定液として4% paraformaldehyde (PFA) を使用した。まず4%PFAは以下の手順にて作成した。1リットルの三角フラスコに250 mlの蒸留水を入れて温め、スターラーで勢いよく混ぜつつ、20 gのPFA(104005; Merck Millipore, Darmstadt, Germany)を入れた。ここに蒸留水に溶いたNaOH溶液(蒸留水10 mL + NaOH 500 mg)を少しずつ加え白濁した溶液が透明になった時点で止め、フラスコを氷中で急冷した。Na₂HPO₄/12H₂O 14.35 gとNaH₂PO₄/2H₂O 1.49 gを250 mlの蒸留水に溶かして0.2 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)を作製し、氷で冷やした。8% PFAと0.2 Mリン酸ナトリウム緩衝液を等量ずつ混ぜ、濾紙で濾して4%PFAを作成した。

マウスをイソフルラン吸入にて安楽死させ、腸管検体は胃から大腸肛門側まで一塊にして取り出した後、結合組織や脂肪組織を外し上部・中部・下部に三分した。この場合、下三分の一が回腸から大腸肛門部までにあたる。内腔を4% PFAで洗い、縦に切開した後、口側が内側かつ内腔が外側となるように、爪楊枝に腸管を巻きつけて4% PFAで一晩固定してSwiss role標本を作成した。翌日にパラフィン包埋し、切片を作製、アルシアンブルー + periodic acid schiff (PAS)染色、アルシアンブルー染色単独を行なった。パラフィン包埋、切片作製、染色は札幌総合病理研究所に外注依頼した。

標本は光学顕微鏡(BX50; Olympus, 東京, 日本)に装着したデジタルカメラ(DP20; Olympus)、またはKeyence BZ-9000 蛍光顕微鏡(Keyence, 大阪, 日本)を用いて撮影した。

大腸杯細胞数の評価には、既報を参考にして(Alexander et al., 2014)、アルシアンブルー染色を行なった大腸標本全体をKeyence BZ-9000 蛍光顕微鏡で撮影し、Adobe Photoshop CC 2018を使用して大腸の粘膜層のみを切り取り、その画像データをAperio ImageScope software ver.12 (Aperio Technologies, Vista, CA)を用いてアルシアンブルー陽性面積を算出、粘膜層全体との面積比を算出して評価した(Figure 1A, B)。



rmIL-25 投与による大腸杯細胞の成熟度の変化については既報を参考に (Nowarski et al., 2015)、成熟杯細胞を直径が 10 μm 以上のものと定義し、アルシアンブルーおよびPASの二重染色の標本にてカウントを行い、一陰窩あたりの比率として算出し、比較した。

3) 糞便ムチン測定

糞便を個々のマウスから採取して、凍結乾燥させた後、bead beater-type homogenizer (TAITEC)を用いて粉末状にした。続いてそれぞれ50mgを測定して、サンプルとし、Fecal Mucin Assay Kit(コスモバイオ、東京、日本)を用いて糞便中のムチンを抽出、精製した。さらに同キットのプロトコールに従って蛍光強度を測定することで糞便中のムチン含量を測定した。定量には同梱されている標準液を利用して標準曲線を作成して用いた。蛍光強度測定は Spectra Max Paradigm (Molecular Device)用いて行なった。

4) 免疫染色

マウスをイソフルラン吸入にて安楽死させ、腹壁を切り開いたところで、まず大腸肛門側を細い糸で結紮して、胃から大腸肛門側まで結紮部位を含む形で一塊にして取り出した。この際、腸管に触れて腸管内の糞便の移動が起きないように注意した。その後、腸管に付着している結合組織・脂肪組織を外して、回盲部も結紮して大腸を両端が結紮された状態にして切離し、Carnoy液(和光純薬工業、大阪、日本)で2時間固定した。その後100%エタノールに置換し、翌日パラ

フィン包埋をして、切片を作製、蛍光免疫染色に使用した。パラフィン包埋と切片作製は札幌総合病理研究所に外注依頼した。

蛍光免疫組織染色には、一次抗体として rabbit anti-mucin2 (clone H-300: Sant Cruz Biotechnology) , purified mouse anti-mouse Lypd8 (BioLegend) を使用した。二次抗体は Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (A11034; Invitrogen, Carlsbad, CA), Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG (ab150110; Abcam) を使用した。

札幌総合病理研究所に外注依頼し作製した未染パラフィン切片をキシレンとエタノールを用いて脱パラフィンした後、Dako REAL 抗原賦活化用クエン酸緩衝液に切片を浸し、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、1×PBS (-) で賦活化液を洗浄して、10%ヤギ血清を含む1×PBS(-)を用いてブロッキング処理を行った。ブロッキング処理が終了したら、各種一次抗体を1:400 に希釈して各標本に加え、4°C、一晚静置した。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DAPI を1×PBS(-)で0.2 μg/ mLに希釈して用いた。染色後の画像撮影はFluoview FV1000 confocal microscopy (Olympus, Tokyo, Japan)またはKeyence BZ-X700 蛍光顕微鏡を使用し、画像処理はAdobe Photoshop CC 2018 を用いて行った。

5) 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション

腸管粘膜層への細菌の侵入の有無の評価のために行った。Swiss role標本のパラフィン切片をキシレンとエタノールを用いて脱パラフィンした後、Cy5-conjugated universal bacterial probe EUB338(5' -GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') をハイブリダイゼーション溶液 (750 mM NaCl、100 mM Tris-HCl、5 mM エチレンジアミン四酢酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、BSA 0.01 %、Dextran sulfate 10 %) で5 μg/mLに希釈して標本に滴下し、16時間、40°Cで静置した。その後、Wash Buffer (50 mM NaCl、4 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.02 mM EDTA)で45°C 20分洗浄した。さらに水で洗浄液を洗い落とし、引き続いて10%ヤギ血清を含む1×PBS(-)を用いてブロッキング処理を行い、さらに蛍光免疫染色を前項に同様に行った。染色後の画像撮影はKeyence BZ-X700蛍光顕微鏡を使用し、画像処理はAdobe Photoshop CC 2018を用いて行った。

6) 腸管上皮層および粘膜固有層・漿膜層細胞との分離

マウスを安楽死させ、腹壁を切り開いて大腸を採取した。大腸のちょうど中間部付近を5mm程度切り出して、便を押し出したうえ短冊状に切り開いた。既報

に従い(Bogunovic et al., 2009)、PBS + 2% FCS 15 mL が入った 50 mL tube に大腸を入れ、よく震盪した。茶こしで大腸以外を排液し、もう一度 PBS+2% FCS 15ml が入った 50ml tube に大腸をいれ、同様に洗浄した。この操作を 2 回施行した。つづいて PBS + 2% FCS + 1mM ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) +1.3mM EDTA 25mL 中で 20 分間、37° C で震盪した。引き続いて溶液を排液し、大腸をさらに PBS+2% FCS+1.3mM EDTA 25mL に入れ、40 分間、37° C で震盪した。これにより大腸上皮細胞が剥離し、この溶液を大腸上皮細胞分離液として扱い、残り的大腸を粘膜固有層および漿膜細胞層として扱った。

7) 定量リアルタイム PCR

大腸の各細胞における *Lypd8* の発現を確認するために組織より RNA を抽出し、cDNA を作成した。前項のごとく分離した粘膜固有層および漿膜層を RNA 抽出用の ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan) の中で、Tissue Ruptor (QUIAGEN, Hilden, Germany) を用いて粉砕した。組織を粉砕したあとは ISOGEN II のプロトコールに準じて RNA の抽出を行った。また、すでに細胞分離が済んでいる大腸上皮細胞に関してはそのまま ISOGEN II のプロトコールに準じて RNA の抽出を行った。抽出した RNA をジエチルポロカーボネート処理水で溶解し、NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA 濃度を測定し、1000 ng の RNA をテンプレートとして鋳型 DNA を作成した。鋳型 DNA 作成のための逆転写反応は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO LIFE SCIENCE, Osaka, Japan) を用いて行った。

また、粘膜固有層以下への細菌の侵入を評価するために、粘膜固有層および漿膜層の DNA 抽出を行い bacterial universal primer である 16S rRNA の定量リアルタイム PCR を行った。前項のごとく分離した粘膜固有層および漿膜層から QIAamp DNA Mini Kit (QUIAGEN, 東京、日本) のプロトコールに準じて DNA を抽出した。この DNA をジエチルポロカーボネート処理水で溶解し、NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) を用いて DNA 濃度を測定して、そこから 1000ng の DNA を用いて定量リアルタイム PCR を行った。定量リアルタイム PCR に際しては Sigma-Aldrich Japan Genosis にて、各種標的遺伝子に対する primer / probe セットの作成を依頼し、作成した鋳型 DNA と TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。リアルタイム PCR は StepOne Plus real time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いて施行し、*Lypd8* に関しては 18S ribosomal RNA (18S rRNA) を内在性コントロールとして、mRNA 発現レベルを delta Ct 法にて定量的に評価した。16S rRNA に関してはそれ

ぞれの実験のコントロール(対 Naïve マウス、または対野生型マウス)との Ct 値の比をとることで評価した。使用した primer/probe の塩基配列は Table 1 に示す。

Table 1. 実験で使用した primer/probe のまとめ

遺伝子		塩基配列
<i>18S rRNA</i>	Forward	5' - GCTCTTTCTCGATTCCGTGGG-3'
	Reverse	5' - ATGCCAGAGTCTCGTTCGTTATC-3'
	Probe	FAM-CTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACC-TAMRA
<i>Lypd8</i>	Forward	5' -TGCGGAGATGGTAAATGGCTC-3'
	Reverse	5' -CAGGGGACAGGAATTGACAAGTA-3'
	Probe	FAM-ATATCAGAACAGCCCTTCAGCTCCACTCT-TAMRA
<i>16S rRNA</i>	Forward	5' -GCTCTTTCTCGATTCCGTGGG-3'
	Reverse	5' -ATGCCAGAGTCTCGTTCGTTATC-3'
	Probe	FAM-CTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACC-TAMRA

8) Cytometric beads assay (CBA)

BD CBA Flex sets (BD Pharmingen) を用いて、血漿中の IFN γ 、IL-6 濃度を定量した。マウスから採血し、遠心分離にて血漿を分離し、測定するサイトカインの capture beads を加えて反応させ、その後 PE 標識抗体を加えて反応させた後、フローサイトメトリーで解析した。サイトカインの定量は既知のサイトカイン濃度から作成された標準曲線を用いて行った。

9) 臨床情報および病理検体の分類方法

検体のうち、移植前に、消化器症状を認めず、スクリーニング目的に下部消化管内視鏡が施行されて生検が行われ、かつ病理学的にも異常を認めなかったものを Pre-SCT screening 群とした。

一方、移植後の大腸標本は以下の 5 つに分類した。①Pathologically-confirmed GI-GVHD とは消化管 GVHD に合致する臨床症状があり、かつ病理学的にも消化管 GVHD に典型的な所見(腺管の様々なアポトーシス像(Przepiorka et al., 1995; Shulman et al., 2015))を認める場合とした。②Clinical GI-GVHD は、臨床的には、下痢が遷延しており消化管 GVHD と診断されたものの、典型的な消化管 GVHD の病理所見を認めないものとした。また③CMV colitis は H&E 染色や免疫染色で大腸にサイトメガロウイルス(cytomegalovirus; CMV)の存在が確

認められたものとし、④Pathologically-confirmed GI-GVHD with CMV colitisは①と③の合併例、⑤Non-specific colitisは①～④のいずれにも該当しないものとした。

急性GVHDの診断および重症度に関しては広く用いられている基準を用い、病理診断は熟練した病理医による診断を用いた。

経過中に初回生検後、一旦下痢が寛解したものの、その後に再燃した場合には別のエピソードとして独立して評価した。また同一の下痢エピソード中に初回の病理診断(Initial biopsies)と、その後に症状が遷延したために行なった生検で病理診断名が変化した場合(Repeated biopsies with different diagnosis)の標本も、独立して評価した。また、初回病理診断がPathologically-confirmed GI-GVHDの場合で、その後の生検でGI-GVHDを疑う病理所見を認めず、下痢症状も寛解となっている場合(Follow-up biopsies)は、杯細胞数の変化について治療前後で比較検討をした。

10) 臨床検体の杯細胞の評価方法

HE染色で、杯細胞は陰窩中の淡くぬける胞体として認識されるため、既報と同様に、杯細胞数を、陰窩中の空胞数を上皮細胞数(核)の数で割ることで標準化した(Gerseman et al., 2009)。なお、少なくとも一検体で5個以上の陰窩を評価した。一回の検査で複数の部位が生検された場合、最も肛門側の標本での杯細胞数を解析に用いた。なお、GI-GVHDやCMV colitisの標本では、病理学的に所見を認める部位中で、最も肛門側の標本における杯細胞数を解析に用いた。

11) 統計処理

2群比較はMann-Whitney U testを用い、3群以上の比較はOne-way ANOVAとポストホックテストとしてTukey's testを用いて検定した。

GI GVHDの重症度と大腸杯細胞の傷害の程度との相関性についてはJonckheere-Terpstra testを用いて検定した。さらに大腸杯細胞の傷害の程度が予後に及ぼす影響に関しては、早期死亡例によるバイアスを排除するために(Anderson et al., 1983; Klein et al., 2001)、移植後100日時点で生存している症例のみを解析するランドマーク法を用いた。生存率は Kaplan-Meier法を用いて算出し、生存に関する群間比較にはlog-rank testを用いた。また、大腸杯細胞の傷害の程度が非再発死亡率に及ぼす影響に関する解析には、やはり移植後100日の時点での非再発生存例のみを用いたランドマーク法を用いて、非再発死亡の累積発生率を算出した。群間の比較にはGray testを用いた。全てP値

く 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±標準誤差にて表記した。

全ての統計学的検定は、GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA) または EZR version 3.4.1 (自治医大さいたま医療センター、埼玉、日本) の統計プログラムを用いて行なった (Kanda, 2013)。

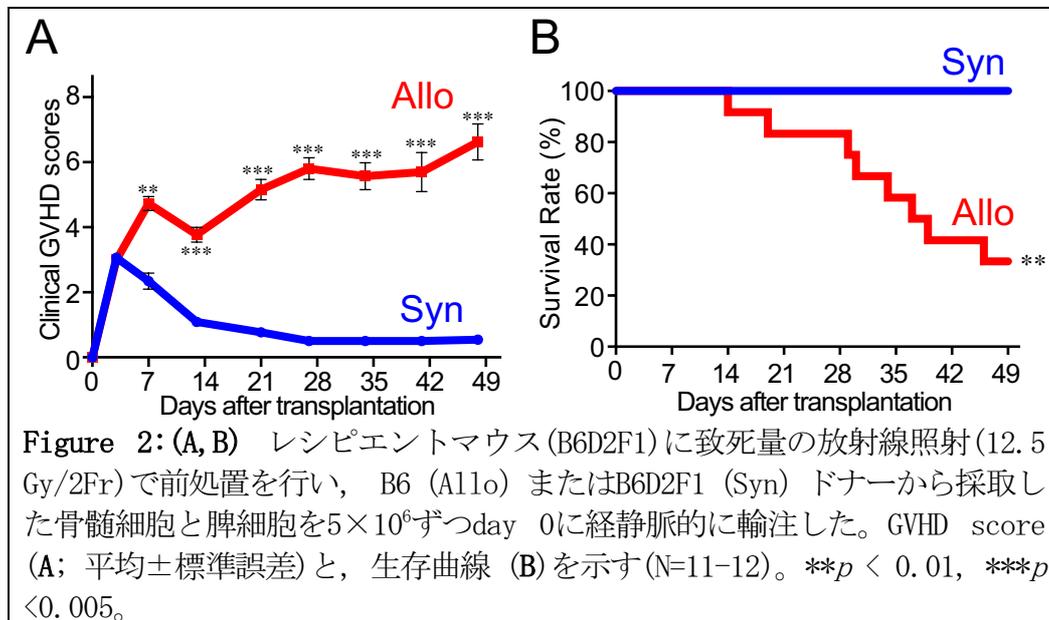
実験結果

1. マウス GVHD モデルにおける大腸杯細胞の変化とその意義についての検討

以前より動物モデルにおいて、消化管 GVHD で杯細胞が減少することが指摘されていたが、その意義については詳しい検討はなされていなかった。そこでまず、近年広く用いられているマウス急性 GVHD モデルにおいて、大腸杯細胞が減少しているかを確認し、その意義について検討した。

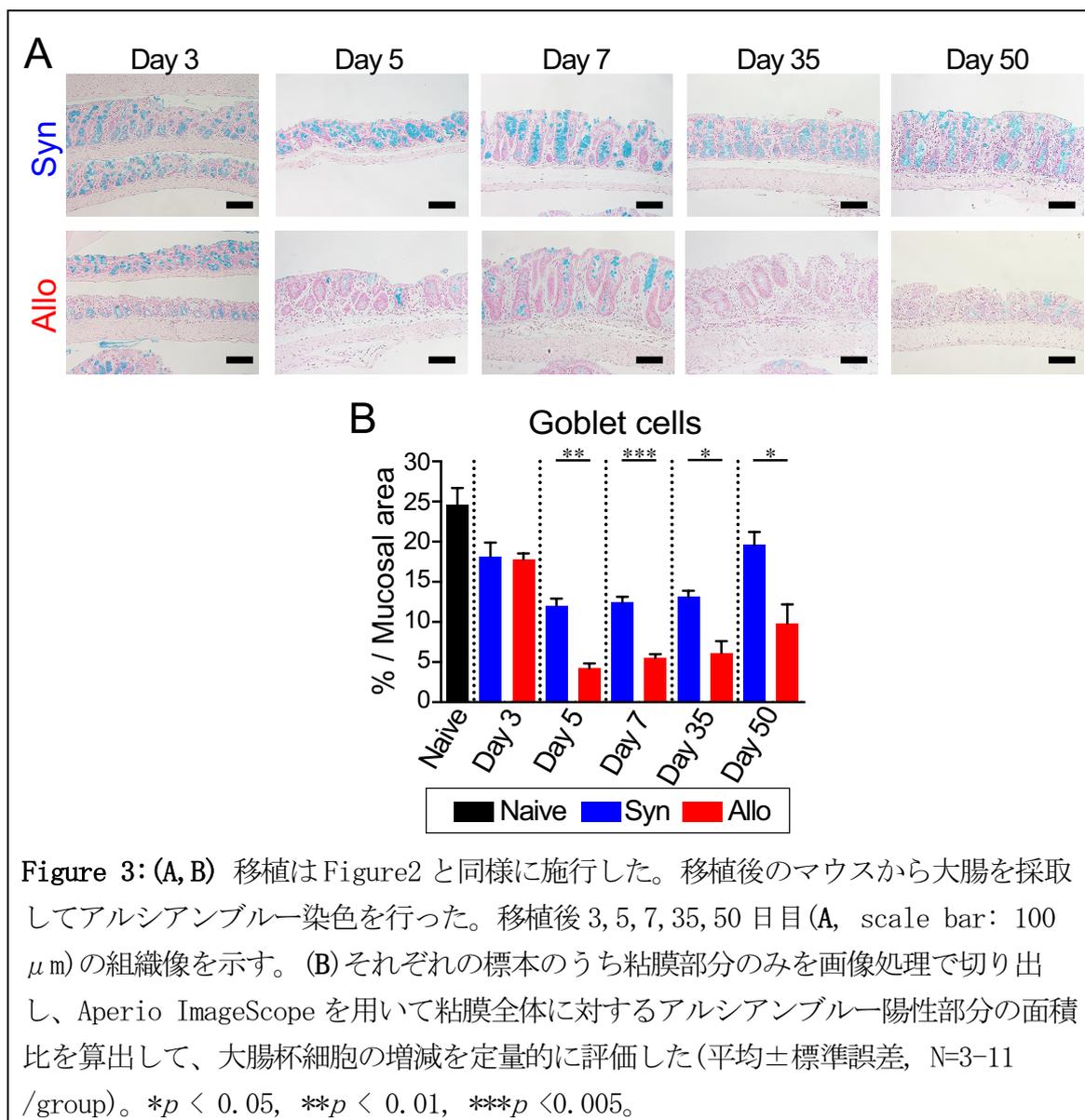
1) 放射線前処置による移植後の GVHD 重症度の推移と生存率

B6D2F1 (H-2^{b/d}) をレシピエントマウスとして、移植日当日に致死量の放射線照射 (12.5 Gy) を 2 分割して行ったのち、主要組織適合性複合体不一致の同種 (allogeneic; Allo) ドナーである B6 (H-2^b) または同系 (syngeneic; Syn) ドナーである B6D2F1 (H-2^{b/d}) から 5×10^6 の骨髄細胞および脾細胞を採取して経静脈的に投与した。GVHD が発症しない Syn 群と GVHD を発症する Allo 群とを比較すると、GVHD score は移植後 1 週間以降から有意差を持って Allo 群で高い値を示した (Figure 2A)。また、移植後 50 日での生存率は Syn 群では 100%、Allo 群では 40%であり、有意差をもって Allo 群で低下していた (Figure 2B)。



2) 放射線前処置による移植後大腸杯細胞の動態

このモデルにおける大腸杯細胞の傷害を確認するために、移植後3日、5日、7日、35日、50日の大腸のアルシアンブルー染色標本を作製し、組織学的検討および定量化を行った。移植後5日の時点でAllo群はSyn群に比較して著明に杯細胞が減少しており、その後、移植後後期になっても大腸杯細胞の傷害は遷延していた (Figure 3A,B)。



3) 抗癌剤前処置による GVHD 重症度・生存率および移植後大腸杯細胞の動態の検討
 前項の結果が、放射線による前処置特有の毒性である可能性を除外するために、抗癌剤を前処置に用いたマウス GVHD モデルにおいても同様の結果が得られるかを確認した。

抗癌剤前処置による移植モデルにおいても GVHD score は Syn 群に比べて Allo 群で有意に高く、生存率も低下することを確認した(Figure 4A, B)。このモデルを用いて、移植後 21 日目の大腸杯細胞数を検討したところ、Allo 群で Syn 群に比べて著明に大腸杯細胞は減少していた(Figure 4C, D)。

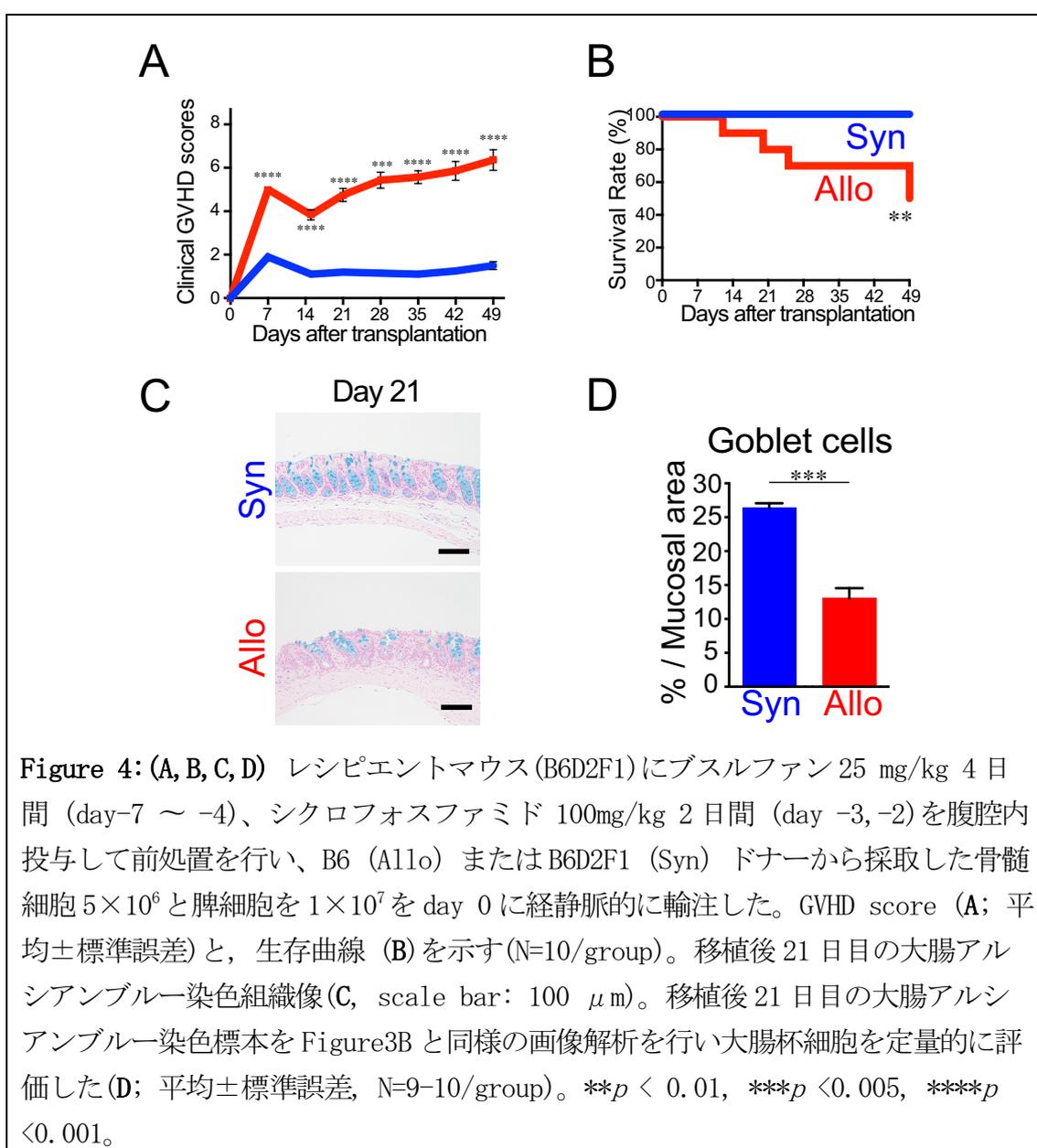
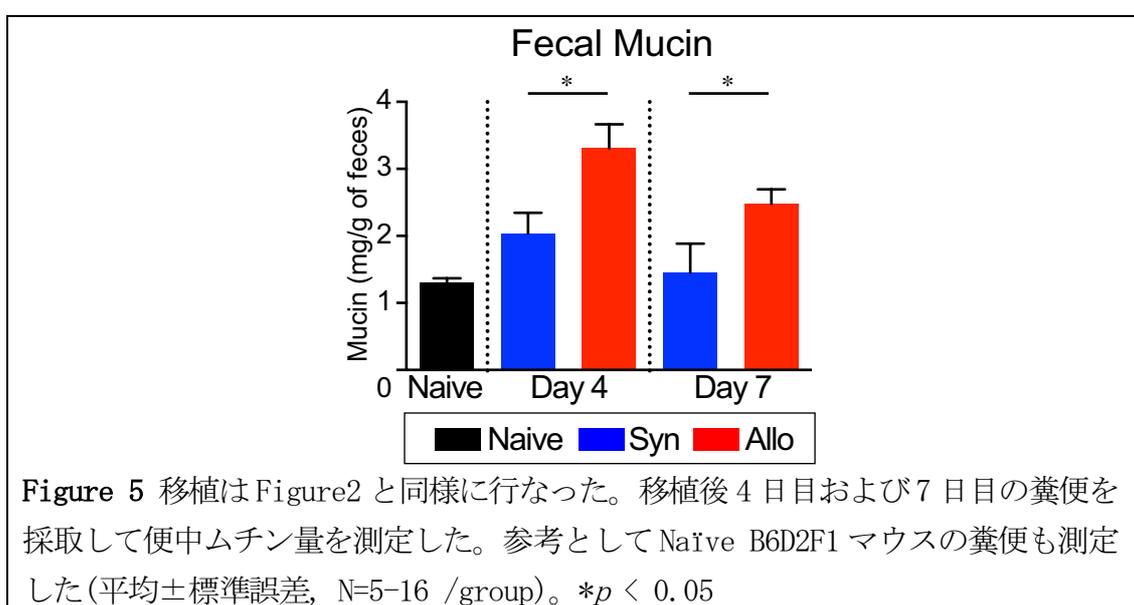


Figure 4: (A, B, C, D) レシピエントマウス (B6D2F1) にブスルファン 25 mg/kg 4 日間 (day-7 ~ -4)、シクロfosファミド 100mg/kg 2 日間 (day -3, -2) を腹腔内投与して前処置を行い、B6 (Allo) または B6D2F1 (Syn) ドナーから採取した骨髄細胞 5×10^6 と脾細胞を 1×10^7 を day 0 に経静脈的に輸注した。GVHD score (A; 平均±標準誤差) と、生存曲線 (B) を示す (N=10/group)。移植後 21 日目の大腸アルシアンブルー染色組織像 (C, scale bar: 100 μm)。移植後 21 日目の大腸アルシアンブルー染色標本を Figure 3B と同様の画像解析を行い大腸杯細胞を定量的に評価した (D; 平均±標準誤差, N=9-10/group)。** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$ 。

以上の結果から、前処置の方法に関わらず大腸杯細胞はGVHD 発症群で減少していることから大腸杯細胞は消化管GVHDの標的細胞であることが示された。

4) 大腸杯細胞の傷害により便中ムチン量が増加する

杯細胞はムチンを豊富に含有しており、GVHDによる杯細胞傷害によって消化管管腔へ分泌されるムチン、すなわち糞便中のムチンが変化している可能性が考えられたため、移植後の便中ムチン量について検討を行なった。Allo群の糞便はSyn群やNaive群に比べて有意に含有ムチンが増加していた (Figure 5)。



これまでの結果をまとめると、大腸杯細胞がGVHDによって傷害・破壊されることで、杯細胞内のムチンが消化管管腔へ放出され、結果として便中ムチン含有量が増加すると考えられた。したがって、便中ムチンが大腸杯細胞の傷害の程度を表し、ひいては消化管GVHDのサロゲートマーカーとなりうることが示唆された。

5) GVHD による大腸杯細胞の傷害は大腸のムチン層構造を破綻させ、細菌の上皮下への侵入を引き起こす

大腸では杯細胞が分泌したムチンは inner mucin layer と outer mucin layer という 2 層構造を構成することで腸上皮を病原菌から守っている。そこで我々は、GVHD による大腸杯細胞の傷害が、この粘膜防御機構にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

移植後 35 日目の大腸を採取し、細菌を検出する EUB338 probe を用いた fluorescent in situ hybridization (FISH) 法と Mucin-2 の蛍光免疫染色を組み合わせ、移植後のムチン層の変化を検討した (Figure 6)。Allo 群では Syn 群や Naïve 群に比較して inner mucin layer が狭小化・消失して、大腸上皮内への細菌の侵入を認めた (Figure 6 右列下段の白三角)。

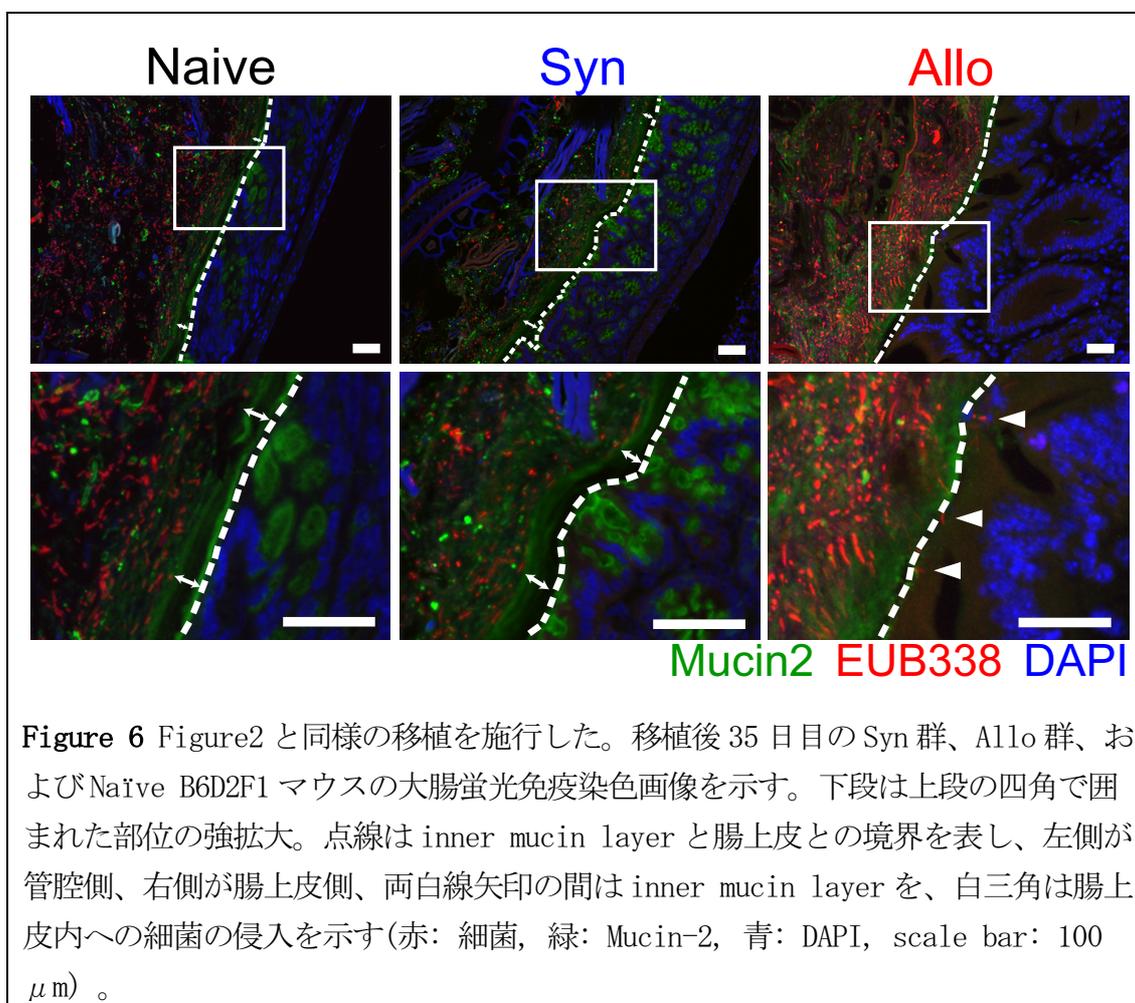
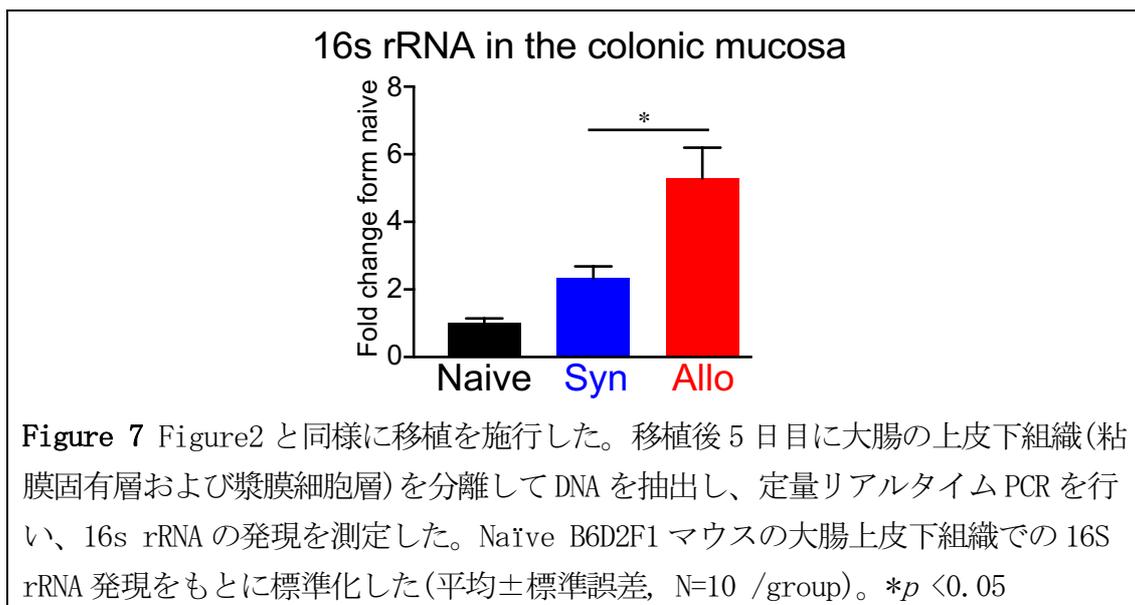


Figure 6 Figure2 と同様の移植を施行した。移植後 35 日目の Syn 群、Allo 群、および Naïve B6D2F1 マウスの大腸蛍光免疫染色画像を示す。下段は上段の四角で囲まれた部位の強拡大。点線は inner mucin layer と腸上皮との境界を表し、左側が管腔側、右側が腸上皮側、両白線矢印の間は inner mucin layer を、白三角は腸上皮内への細菌の侵入を示す(赤: 細菌, 緑: Mucin-2, 青: DAPI, scale bar: 100 μm)。

大腸上皮下への細菌の侵入を定量化するために、粘膜上皮を除去後、粘膜固有層および漿膜細胞層を含む大腸上皮下組織を分離し、bacterial universal primer である 16S rRNA を標的とした定量リアルタイム PCR を行なったところ、Allo 群では Naïve 群および Syn 群と比較して、より多くの細菌が侵入していた (Figure 7)。



これらの結果から、マウス GVHD モデルにおいて、大腸杯細胞が消化管 GVHD の標的細胞であり、その傷害による大腸の inner mucin layer の消失というバリア機構破綻によって、細菌の大腸上皮下への侵入を引き起こしていると考えられた。

2. 杯細胞増殖因子 IL-25 の移植前投与の GVHD に及ぼす影響についての検討

前章では、マウス GVHD モデルにおいて、消化管 GVHD によって大腸杯細胞が傷害されることで、大腸のムチン層によるバリア機構が破綻し、腸上皮下への細菌の侵入が引き起こされることを示した。腸管粘膜のバリア機構の障害はエンドトキシンなどの細菌由来成分の全身循環への流入を起し、GVHD を更に悪化させるという悪循環に陥りやすい(Hill and Ferrara, 2000)。従って杯細胞を保護することにより腸管粘膜のバリア機能を保護することは、新たな GVHD 予防・治療の選択肢の一つになりうる。

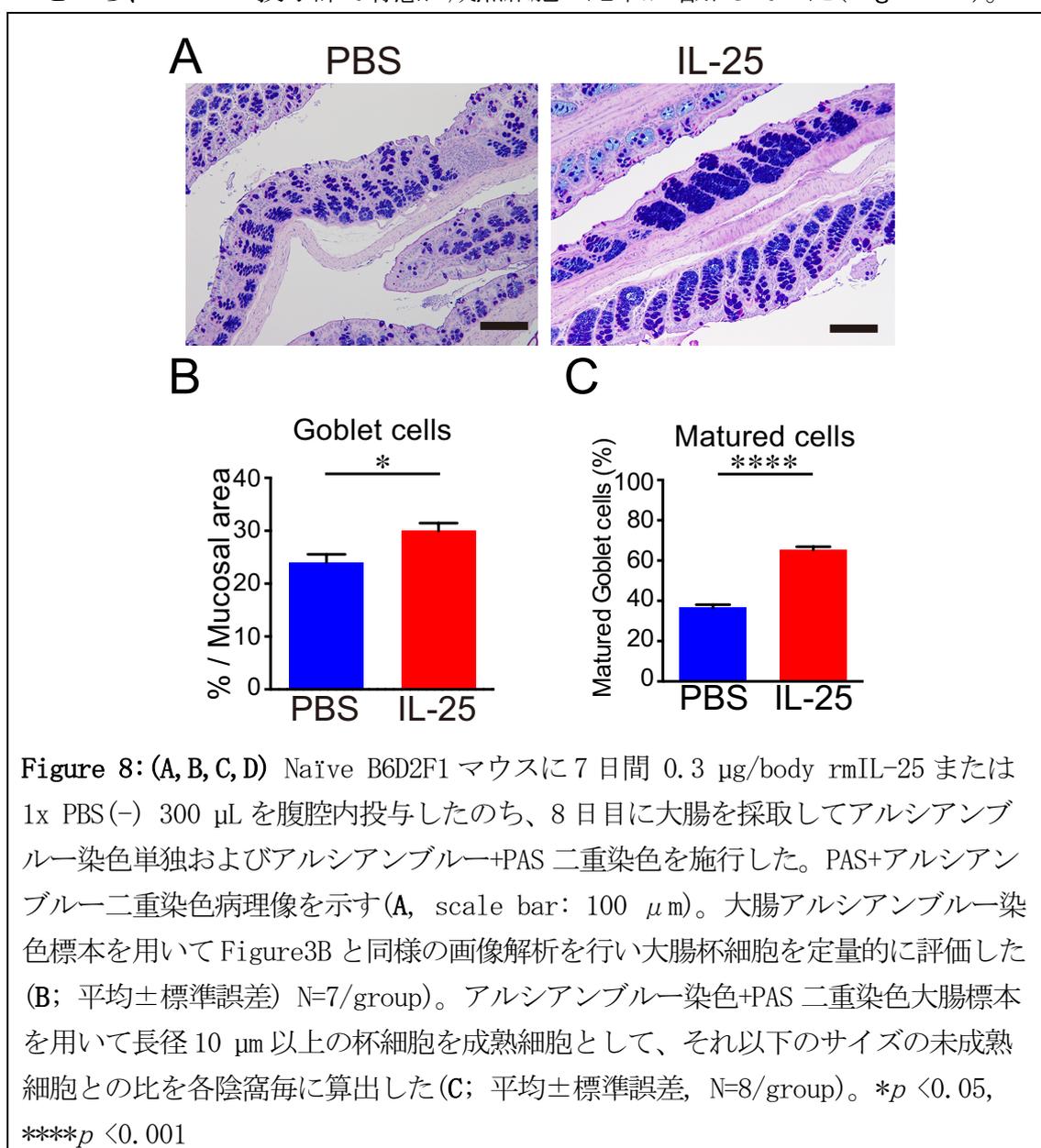
近年 IL-17 サイトカインファミリーの一つである IL-25 が type 2 innate lymphoid cell (ILC2) を介して杯細胞を増加させることが報告された(Gerbe et

al., 2016; von Moltke et al., 2016)。そこで我々は IL-25 投与による腸管杯細胞の増殖・保護が GVHD を軽減させることが可能か検討を行った。

1) IL-25 投与により大腸杯細胞を増殖し、かつその成熟も促される

まず、既報の効果確認のために、Naïve B6D2F1 マウスに 7 日間 rmIL-25 0.3 μg を腹腔内投与し、8 日目に大腸を採取して組織学的評価を行ったところ、既報と同様に rmIL-25 の投与によって大腸杯細胞数は増加した (Figure 8A, B)。

さらに興味深いことに、既報に従って、杯細胞の長径 10 μm 以上の大きいものを成熟杯細胞と定義し、陰窩あたりの成熟杯細胞と未成熟杯細胞の比を算出したところ、rmIL-25 投与群で有意に成熟細胞の比率が増加していた (Figure 8C)。



この結果から IL-25 は単に杯細胞の増殖を促すだけではなく、その成熟にも寄与していると考えられた。

2) 移植前 IL-25 投与による大腸杯細胞の増殖・保護により、GVHD は軽減する

次に我々は、移植前の IL-25 投与による大腸杯細胞の増殖・保護が消化管 GVHD を軽減させるか検討した。

まず、レシピエントマウス (B6D2F1) に対して移植前 7 日間 (day -7 ~ 0) rmIL-25 0.3 $\mu\text{g}/\text{body}$ または 1xPBS(-) 300 μL を腹腔内投与した後、移植日当日に致死量の放射線照射 (11.5 ~ 12.0 Gy/2Fr) で前処置を行い、B6 (Allo) または B6D2F1 (Syn) ドナーから採取した骨髄細胞 5×10^6 と脾細胞を 1×10^7 ずつ経静脈的に輸注した。

移植後 5 日目の大腸アルシアンブルー染色標本では、PBS 投与 Allo 群に比べて rmIL-25 投与 Allo 群で有意に多くの杯細胞が残存しており (Figure 9A, B)、大腸上皮組織への細菌の侵入も IL-25 投与群で有意に減少して、Syn 群と遜色ない水準に抑えられていた (Figure 9C)。

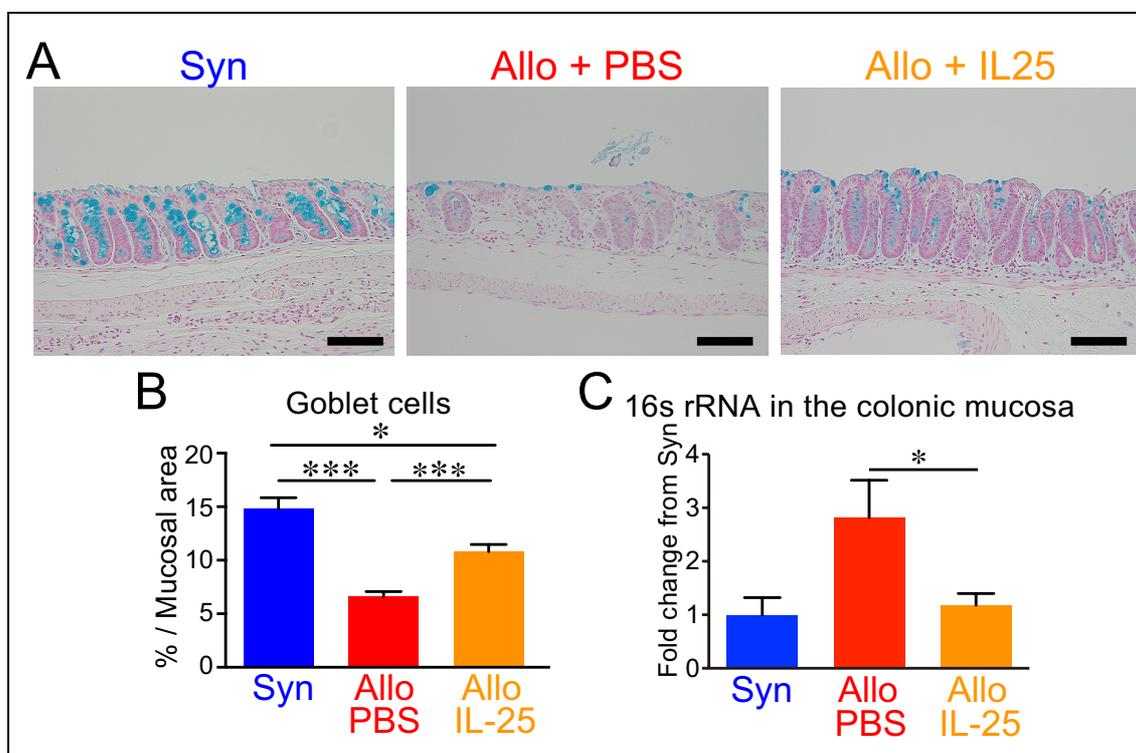


Figure9 : (A, B, C) B6D2F1 マウスに 0.3 $\mu\text{g}/\text{body}$ rmIL-25 または 1xPBS (-) 300 μL を腹腔内投与した後 (day -7 ~ day0)、致死量の放射線照射 (11.5 ~ 12.0 Gy/2Fr) で前処置を行い、B6 (Allo) または B6D2F1 (Syn) ドナーから採取した骨髄細胞 5×10^6 と脾細胞を 1×10^7 ずつ経静脈的に輸注した。移植後 5 日目の大腸アルシアンブルー染色病理像を示す (A, scale bar: 100 μm)。これらを用いて Figure3B と同様の画像解析を行い大腸杯細胞を定量的に評価した (B; 平均 \pm 標準誤差, N=6-9/group)。Figure7 同様に移植後 5 日目に大腸の上皮下組織から DNA を抽出し、定量リアルタイム PCR を行い、16S rRNA の発現を測定した。Syn 群の大腸上皮下組織での 16s rRNA 発現をもとに標準化した (平均 \pm 標準誤差, N=6-9 /group)。* p < 0.05, *** p < 0.005

さらに、移植前 IL-25 投与による粘膜保護が GVHD にどのような影響を及ぼすか検討した。rmIL-25 投与 Allo 群では血漿 IFN- γ および IL-6 といった炎症性サイトカインが抑制されていた (Figure 10A, B)。その結果として、rmIL-25 投与 Allo 群で生存率が改善し (Figure 10C)、移植後 14 日目の GVHD スコアにおいても改善を認めた (Figure 10D)。

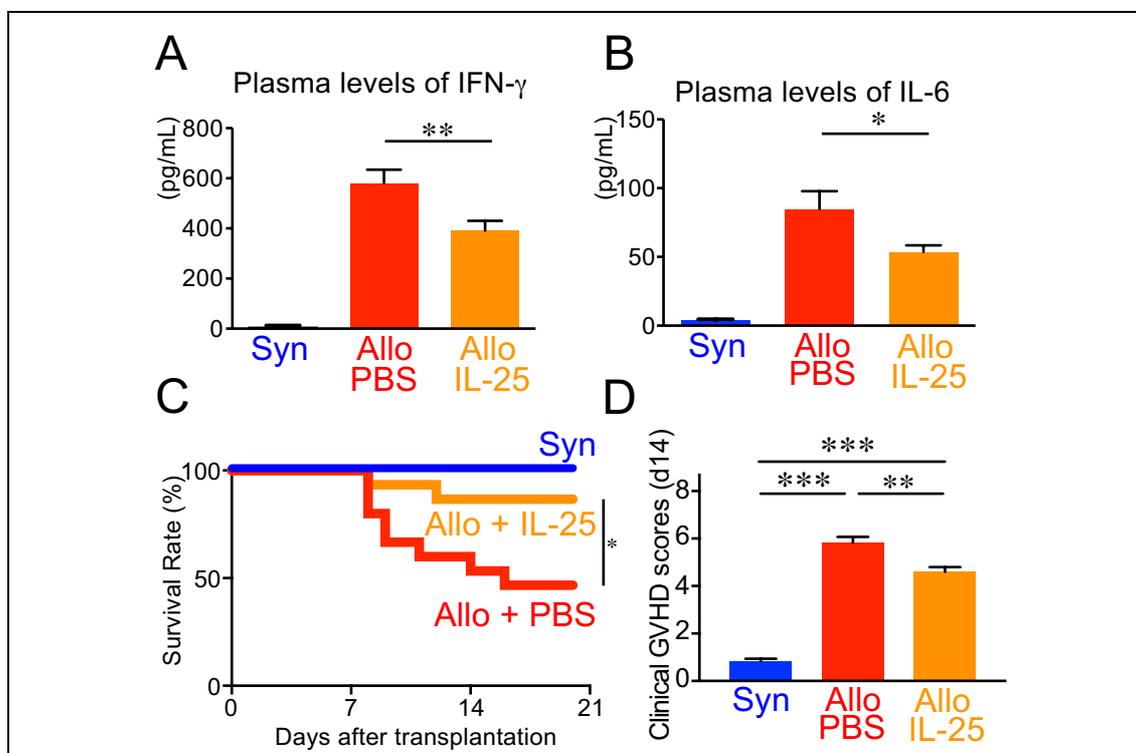


Figure 10: (A, B, C, D) Figure9 と同様に移植を施行した。移植後 5 日目の血液を採取し、血漿を分離して BD CBA Flex sets を用いて IFN- γ (A) と IL-6 (B) を測定した(平均±標準誤差, N=12-19/group)。またこの系における生存率(C)および移植後 14 日目の GVHD 重症度(D)を示す(N=6-15/group)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

以上の結果から移植前短期間の IL-25 投与による大腸杯細胞の増殖・保護によって、GVHD による大腸杯細胞の傷害が軽減されて、バリア機能が保たれることで細菌の腸上皮への侵入が抑制され、GVHD に伴う炎症性反応増悪が抑えられて、結果的に GVHD が軽減するという機序が考えられた。

3. 抗菌分子 Lypd8 の消化管 GVHD への影響と大腸ムチン層との相互作用に関する検討

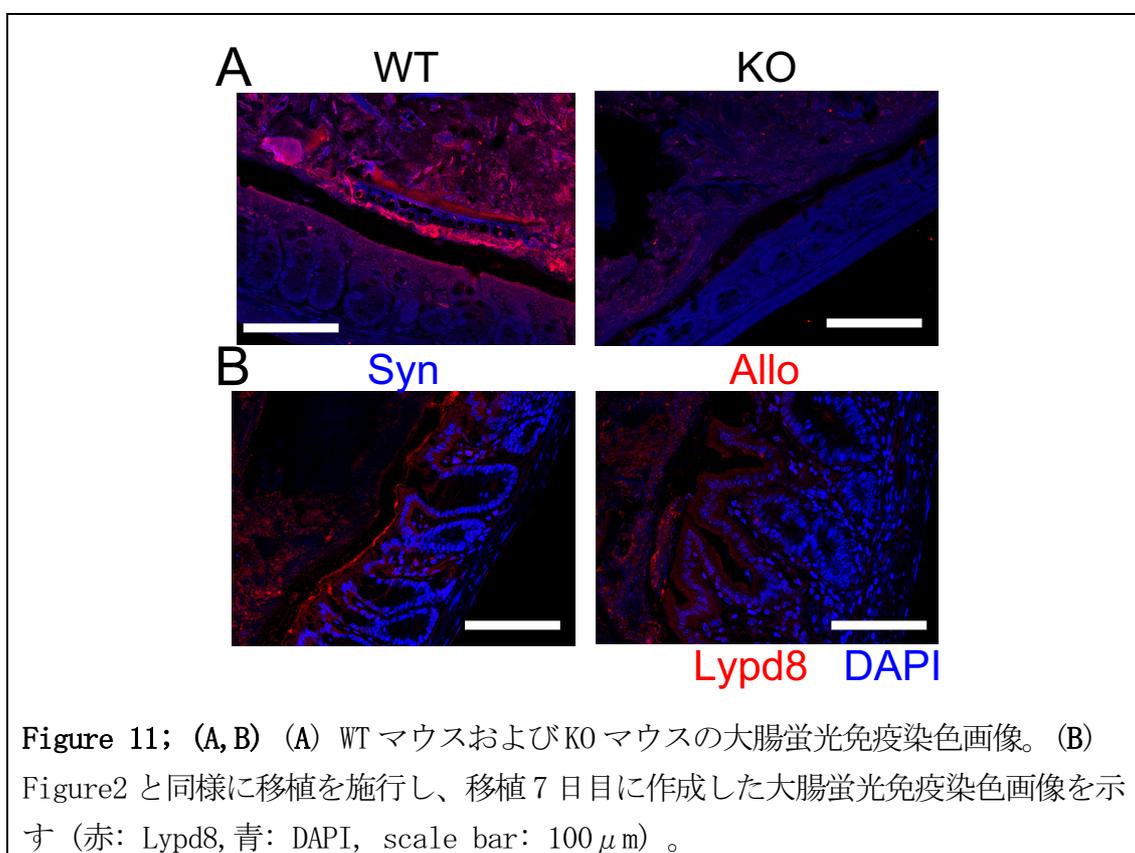
以前より我々や他のグループから、マウス GVHD モデルにおいて同種移植後に大腸菌が増加することが報告され(Eriguchi et al., 2012; Heimesaat et al., 2010)、ヒトにおいても移植後の腸管 dysbiosis が移植成績に影響を及ぼすことが報告されている(Taur et al., 2014)。

小腸では、Paneth 細胞が分泌する抗菌ペプチド α -defensin が病原菌に選択的に抗菌活性を示すことが知られており(Masuda et al., 2011)、腸内細菌叢の維持において重要な調節因子となっているが、大腸特有の抗菌活性を有する分子に関しては今まで報告がなかった。

奥村らは、大腸上皮細胞 (enterocyte) が産生する Lypd8 が大腸菌などの鞭毛を有する細菌の鞭毛部に作用して、その活動性を低下させることで腸上皮への細菌侵入を抑制していることを報告した(Okumura et al., 2016)。そこで、我々は Lypd8 が消化管 GVHD にどのような影響を及ぼしているかについて検討した。

1) 抗菌分子 Lypd8 は inner mucin layer と腸上皮細胞の境界領域に存在し、同種移植後に減少する

まず、Lypd8 の局在について野生型 B6 マウス (WT) と *Lypd8* 欠損型マウス (KO) の大腸蛍光免疫染色を行い組織学的に評価した (Figure 11A)。既報と同様に、Lypd8 は定常状態では inner mucin layer と大腸上皮細胞との境界に集中して存在していた。一方で、移植後 7 日目の大腸蛍光免疫染色では Lypd8 が Syn 群では同部位に比較的残存しているのに対して、Allo 群では減少していることがわかった (Figure 11B)。



しかし、移植後 7 日目の細胞レベルでの *Lypd8* の mRNA 発現量を定量リアルタイム PCR を用いて評価したところ、既報の通り、腸上皮細胞 (Epithelial cell (EC)) が上皮下の細胞 (Lamina propria (LP) Serosal Layer (SL)) に比べてより強く発現していたものの、Syn 群と Allo 群の間で、EC 間での発現量に差を認めなかった (Figure 12)。

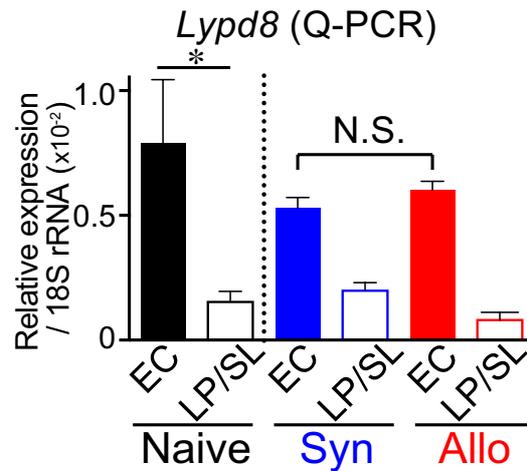


Figure 12 Figure2 と同様の移植を行い、移植7日目に大腸の上皮細胞(EC)および上皮細胞(LP/SL)をそれぞれ分離して、*Lypd8* の mRNA 発現レベルを定量リアルタイム PCR にて評価した。内因性コントロールとして 18S rRNA を用いた。比較として Naive B6D2F1 マウスでも同様に評価した(平均±標準誤差, N=4-5 /group)。

* $p < 0.05$.

以上から、細胞あたりの *Lypd8* の発現は GVHD 発症には影響を受けないが、ムチン層が破綻することで、本来 *Lypd8* が高濃度で存在すべき inner mucin layer と腸上皮細胞との境界領域に維持できなくなっていると考えられた。

2) *Lypd8* は同種移植後においても大腸上皮下への細菌侵入に対して抑制的に働き、GVHD の増悪を抑制する

さらに、我々は *Lypd8* が同種移植後においても大腸上皮下への細菌侵入に対して抑制的に働いているか検討を行った。

WT または KO をレシピエントとして移植日当日に致死量の放射線照射(11.5 Gy/2Fr)で前処置を行い、BALBc (H-2^d) (Allo 群) または B6 (H-2^b) (Syn 群) ドナーから採取した骨髄細胞 5×10^6 と脾細胞を 1×10^7 ずつ経静脈的に輸注した。移植後7日目の大腸を採取し、EUB338 を用いた細菌 FIHS 法と Mucin-2 の蛍光免疫染色を施行したところ、KO 群で大腸上皮内への細菌の侵入をより多く認めた (Figure 13A)。また、大腸上皮下組織に対する 16S rRNA を標的とした定量リアルタイム PCR 法を行い、KO 群で WT 群に比べてより大腸上皮下へ細菌が侵入していることを確認した (Figure 13B)。

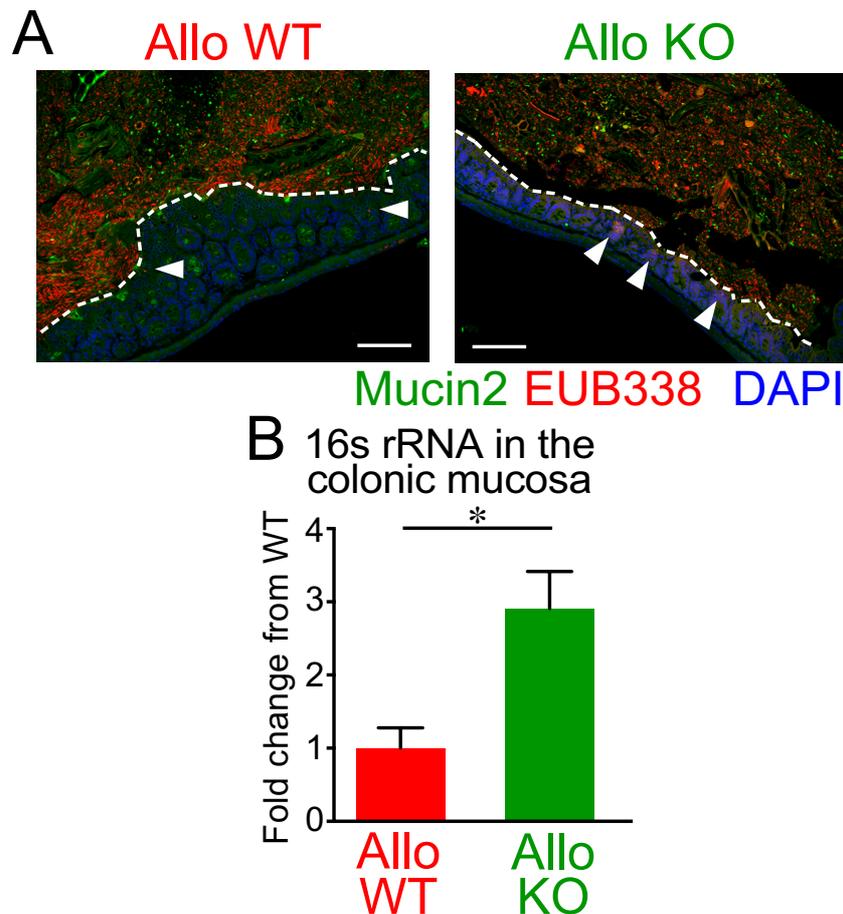


Figure 13: (A, B) WT または KO をレシピエントマウスに、致死量の放射線照射 (11.5 Gy/2Fr) で前処置を行い、BALB/c ドナーから採取した骨髄細胞 5×10^6 と脾細胞を 1×10^7 を経静脈的に輸注した。移植後 7 日目の大腸蛍光免疫染色画像 (A; 赤: 細菌, 緑: Mucin-2, 青: DAPI, scale bar: $100 \mu\text{m}$) を示す。白三角は腸上皮内への細菌侵入を示す。(B) Figure7 同様に移植後 7 日目に大腸の上皮下組織から DNA を抽出し、定量リアルタイム PCR を行い、16S rRNA の発現を測定した。AlloWT 群の大腸上皮下組織での 16S rRNA 発現をもとに標準化した (平均 \pm 標準誤差, $N=4-5$ /group)。* $p < 0.05$

このことから Lypd8 が移植後 Allo 群においても大腸上皮内への細菌侵入に対して抑制的に働いていることが示唆された。

また、この細菌侵入の結果として、KO 群では WT 群に比べて IL-6 や IFN- γ といった炎症性サイトカインがより強く上昇した (Figure 14)。

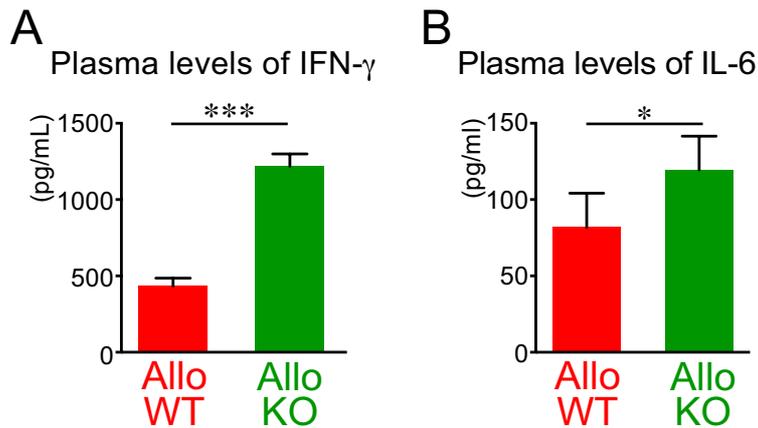


Figure 14 : (A, B) Figure13 と同様に移植を行い、移植後 5 日目の血液を採取し、血漿を分離して BD CBA Flex sets を用いて IFN- γ (A) と IL-6 (B) を測定した (平均 \pm 標準誤差, N=10-13/group)。* p < 0.05, *** p < 0.005

このモデルでは、WT をレシピエントとして Allo 移植を行った場合に、移植後 70 日までに約 60% 程度が死亡するが、KO をレシピエントとして用いた場合、より強い GVHD を認めて、同じ期間に全てのマウスが死亡した (Figure 15A)。

この結果に、WT と KO の腸内細菌叢の違いが影響を及ぼしている可能性を排除するため、両者を同一ケージで 4 週間飼育 (Co-housing) した後に、同様の移植を施行しても、KO 群の生存率は有意に悪かった (Figure 15B)。

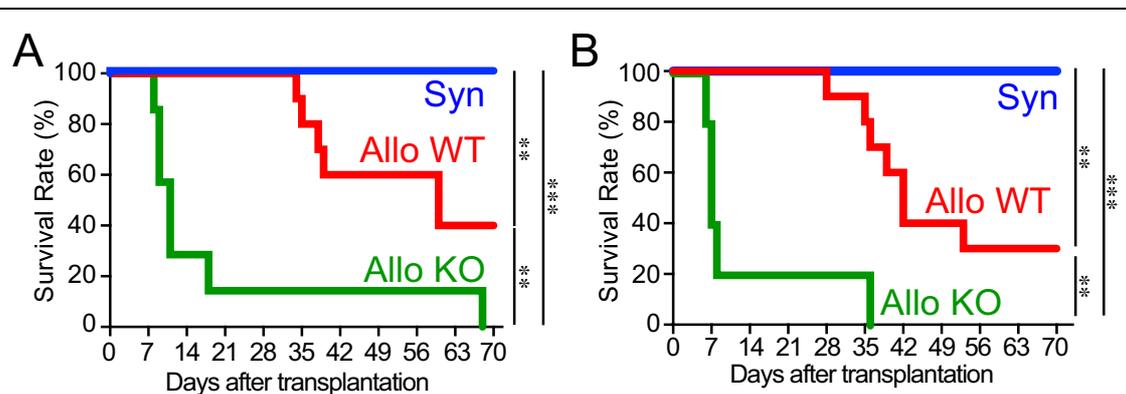
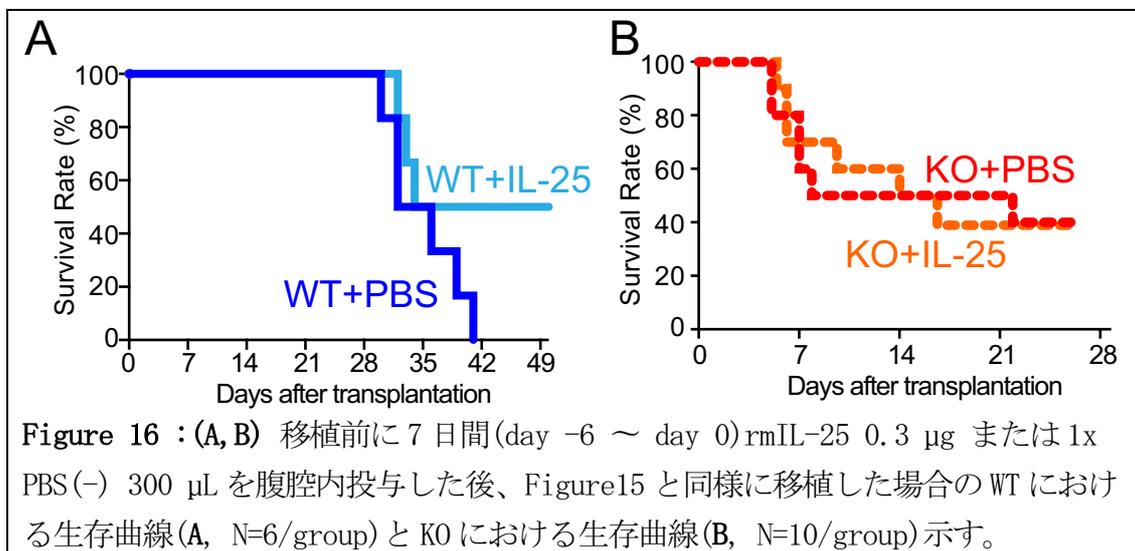


Figure15 : (A, B) Figure13 と同様に、BALB/c または B6 をドナーマウスとして移植した際の生存曲線 (A) を示す (N=7-10/group)。移植前に WT と KO を 4 週間 co-housing した場合の生存曲線 (B, N=5-10/group) を示す。** p < 0.01, *** p < 0.005

このモデルにおいても移植前の rmIL-25 投与が GVHD を軽減するか検討を行った。WT においては移植後 50 日の時点で PBS 投与群でマウスが全て死亡したのに対して rmIL-25 投与群は 50% が生存 (3/6) しており (Figure 16A)、rmIL-25 により

GVHD が軽減された。これに対して KO においては生存率の改善は得られなかった (Figure 16B)。



以上の結果から、マウス GVHD モデルにおいて、大腸杯細胞はGVHD の標的細胞であり、抗菌分子 Lypd8 依存性に細菌の大腸上皮への侵入を抑制して、GVHD の進展に対して抑制的に働いていると考えられた。

4. ヒト造血幹細胞移植における大腸杯細胞の傷害に関する検討

これまでのマウス GVHD モデルから得られた知見をふまえて、ヒト同種造血幹細胞移植後の消化管 GVHD においても、マウスモデルと同様に大腸杯細胞が傷害を受けているか検討を行った。

1) 対象患者とその生検のカテゴリー分け

北海道大学病院血液内科にて、2009 年から 2015 年の間に初回同種造血幹細胞移植を受けた 205 名の患者を対象とした。このうち 200 名で好中球生着が得られた。そのうちの 88 名 (全体の 42.9%) で、移植前後に何らかの理由により、計 156 回の生検を施行されていた。

Table 2 に患者背景を生検未施行群および施行群に分けて示した。両群間で年齢、性別、基礎疾患、移植ソース、HLA 一致・不一致、前処置強度、放射線照射の有無に差は認めなかったが、生検施行群で GVHD grade および消化管 GVHD の stage が高く、重症の GVHD を多く認めた。

Table 2-1. 全体の患者背景(1)

Variable	Total	Post SCT Biopsy (-)	Post SCT Biopsy (+)	P
	Population n=205	Population n=130	Population n=75	
Age (median), y	17-67 (48)	17-67 (48)	18-67 (48)	0.987
Sex, n (%)				0.711
male	117 (57)	73 (56)	44 (59)	
female	88 (43)	57 (44)	31 (41)	
Underlying Disease, n (%)				0.711
AML	76 (37)	58 (45)	18 (24)	
ALL	37 (18)	23 (18)	14 (19)	
ML	48 (23)	24 (18)	24 (32)	
MDS	23 (11)	13 (10)	10 (13)	
CML	6 (3)	4 (3)	2 (3)	
AA	6 (3)	2 (2)	4 (5)	
MM	2 (1)	0 (0)	2 (3)	
Others	7 (3)	6 (5)	1 (1)	

Table 2-2. 全体の患者背景

Variable	Total	Post SCT Biopsy (-)	Post SCT Biopsy (+)	<i>P</i>
	Population n=205	Population n=130	Population n=75	
Disease Risk Index, n (%)				0.110
Low	25 (12)	13 (10)	12 (16)	
Intermediate	114 (56)	80 (62)	34 (45)	
High	53 (26)	31 (24)	22 (29)	
Very High	13 (6)	6 (5)	7 (9)	
Donor Source, n (%)				0.278
BMT	112 (55)	66 (51)	46 (61)	
PBSCT	53 (26)	38 (29)	15 (20)	
CBT	40 (20)	26 (20)	14 (19)	
HLA match, n (%)				1
Yes	102 (50)	65 (50)	37 (49)	
No	103 (50)	65 (50)	38 (51)	
Conditioning, n (%)				0.057
MAC	117 (57)	81 (62)	36 (48)	
RIC	88 (43)	49 (38)	39 (52)	
TBI, n (%)				0.212
Yes	187 (91)	116 (89)	71 (95)	
No	18 (9)	14 (11)	4 (5)	
GVHD grade, n (%)	n=200	n=125	n=75	<0.001
0-2	175 (88)	122 (98)	53 (71)	
3-4	25 (13)	3 (2)	22 (29)	
GI GVHD stage, n (%)	n=200	n=125	n=75	<0.001
0	147 (74)	122 (98)	25 (33)	
1-2	40 (20)	3 (2)	37 (49)	
3-4	13 (7)	0 (0)	13 (17)	

Abbreviations; AML; acute myeloid leukemia ALL; acute lymphoblastic leukemia ML; malignant lymphoma. MDS; myelodysplastic syndrome, CML; Chronic myeloid leukemia, AA; aplastic anemia MM; multiple myeloma, BMT; bone marrow transplantation, PBSCT; peripheral blood stem cell transplantation, CBT;

cord blood transplantation, MAC; myeloablative conditioning, RIC; reduced intensity conditioning, TBI; total body irradiation

生検検体を生検時期とその診断内容に応じて以下の通りに分類した (Figure 17)。27 検体(24 人)が移植前に生検されたものだったが、このうち 22 検体(21 人)は、下痢などの消化器症状のない患者で移植前スクリーニング目的に生検されたもので、これらを「pre-SCT screening」と分類した。

129 検体(75 人)が移植後に生検されたものであったが、このうち 7 検体(2 人)が Adult T cell lymphoma / leukemia (ATLL) の腸管病変もしくは移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)であり、解析から除外した。

109 検体(73 人)が下痢などの消化器症状が出現した際に診断目的に生検されており、これらを「initial biopsies」と分類した。そのうち 7 検体(6 人)で下痢が遷延したために再度生検が行われ、診断が initial biopsies のものと変わっており、これらを「Repeated biopsies with different diagnosis」と分類して独立した検体として扱った。その他、6 名の患者では治療により消化管 GVHD が寛解した状態で生検が採取されており、「follow-up biopsies」と分類し、GVHD 治療効果と大腸杯細胞数の比較検討に用いた。

「initial biopsies」には「pathologically confirmed GI-GVHD without CMV colitis」が 38 検体(33 人)、「pathologically confirmed GI-GVHD with CMV colitis」が 6 検体(6 人)、「clinical GVHD」(病理学的に GVHD 所見が確認できないもの)が 14 検体(12 人)、「CMV colitis」単独が 9 検体(8 人)と、それ以外の「non-specific colitis」が 42 検体(34 人)が含まれていた。

「Repeated biopsies with different diagnosis」には pathologically confirmed GI-GVHD without CMV colitis、pathologically confirmed GI-GVHD with CMV colitis が 1 検体ずつ、CMV colitis 単独が 2 検体(2 人)、non-specific colitis が 3 検体(2 人)が含まれていた。

「follow-up biopsies」は全例が non-specific colitis という診断であった。

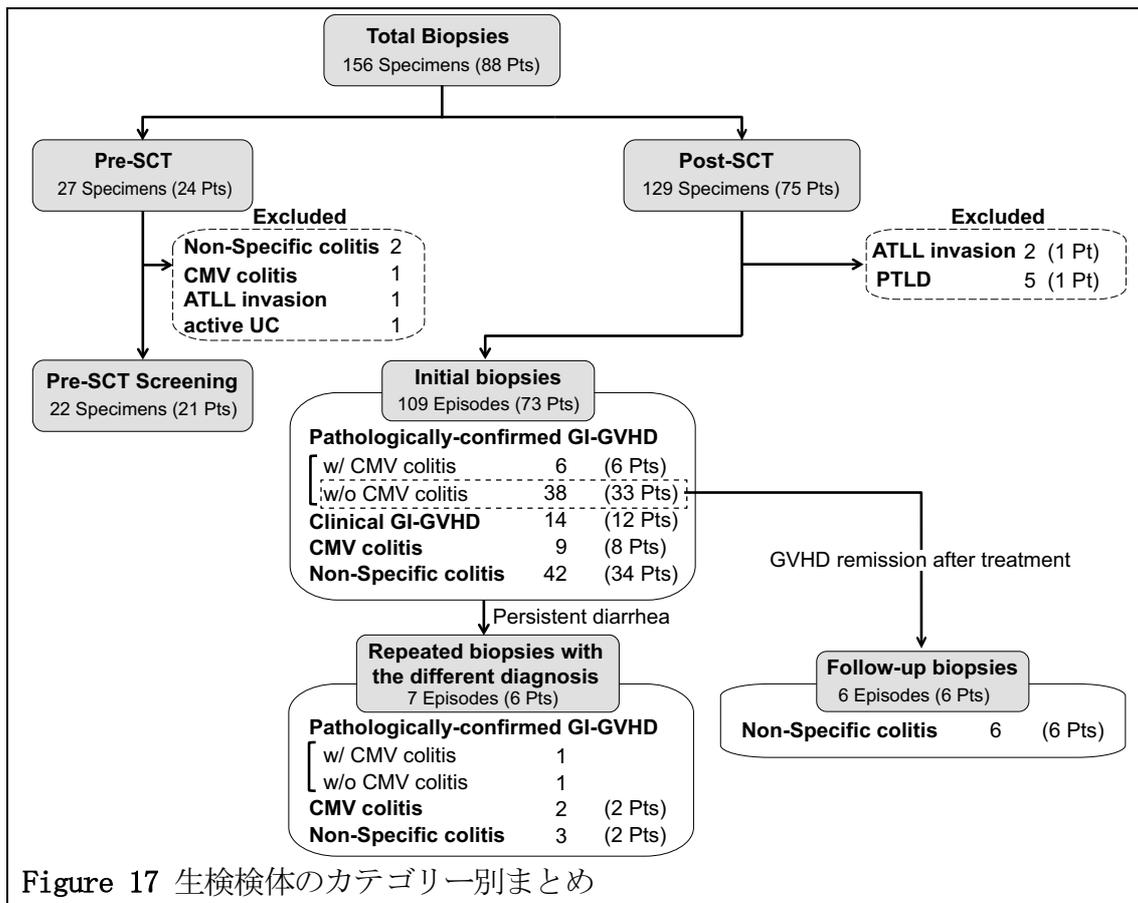
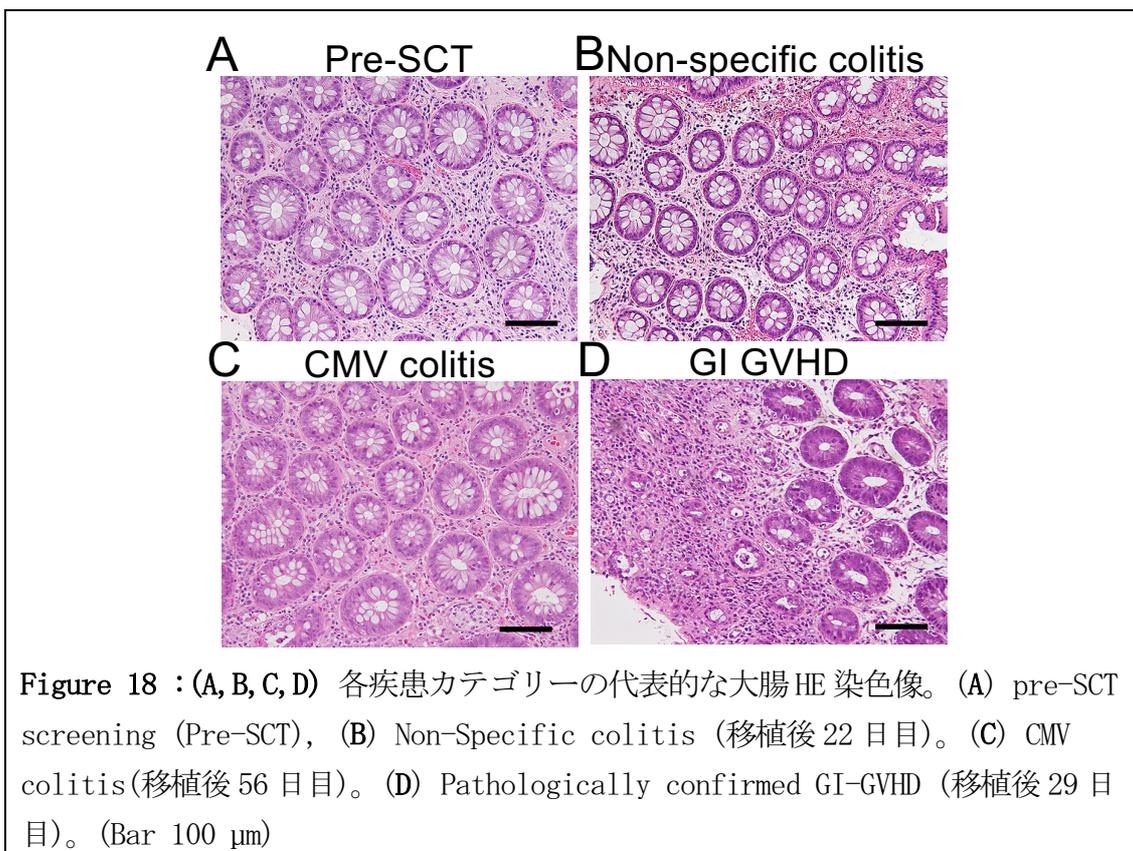


Figure 17 生検検体のカテゴリー別まとめ

2) 大腸杯細胞は消化管 GVHD において特異的に減少し、消化管 GVHD の重症度および治療反応性に相関する

各カテゴリーにおける大腸 HE 染色の代表的なものを示した (Figure 18 A, B, C, D)。大腸杯細胞は HE 染色ではムチンが明るく抜けた胞体を有するように見えるが、大腸杯細胞は「pathologically confirmed GI-GVHD」のみで減少していた。



続いて、これら各検体の大腸杯細胞の多寡を、杯細胞数を陰窩を構成する上皮細胞数との比率で定量化して評価した (Figure 19)。

「pathologically confirmed GI-GVHD without CMV colitis」(20.0 ± 1.8 %)と「pathologically confirmed GI-GVHD with CMV colitis」(17.0 ± 3.0 %)では、他のカテゴリーと比較して有意に大腸杯細胞が減少していたが、clinical GI-GVHD, CMV colitis, non-specific colitis では、移植前スクリーニング時と同等の杯細胞が残存しており、杯細胞の減少は無しと判断された (「pre-SCT screening」(37.2 ± 1.2 %), 「non-specific colitis」(36.0 ± 1.2 %), 「clinical GI GVHD」(37.5 ± 2.0 %), 「CMV colitis」(30.3 % ± 5.0 %))。

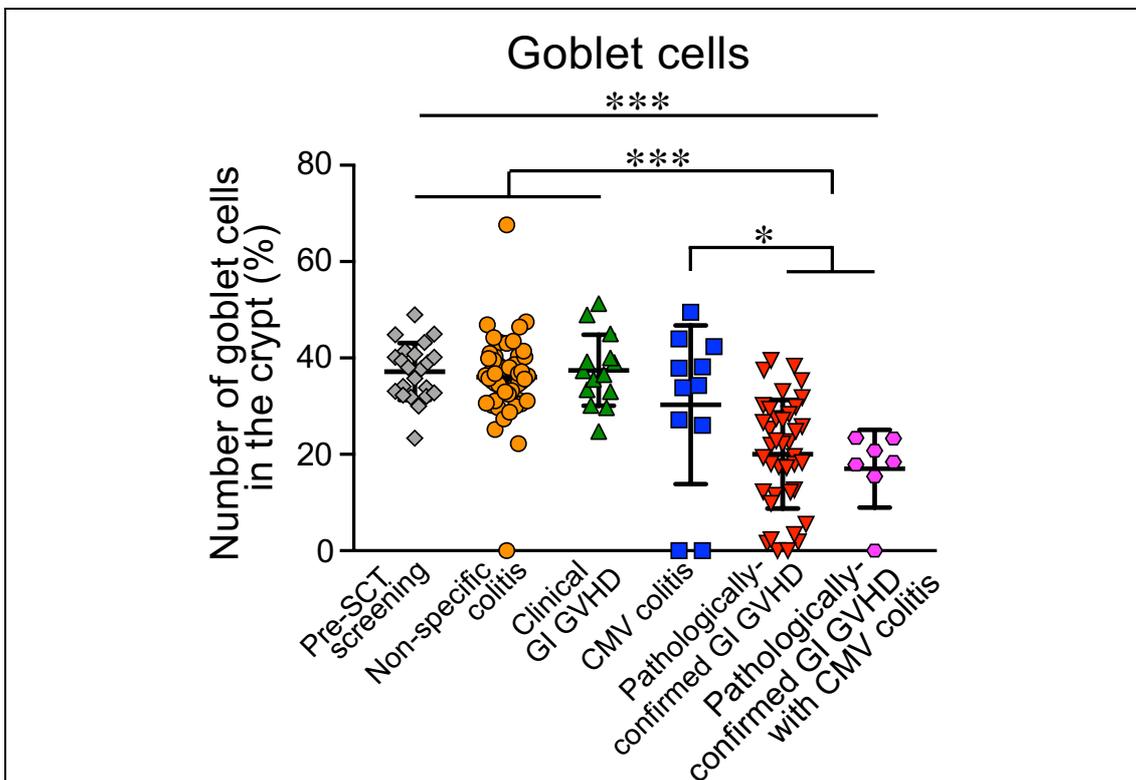
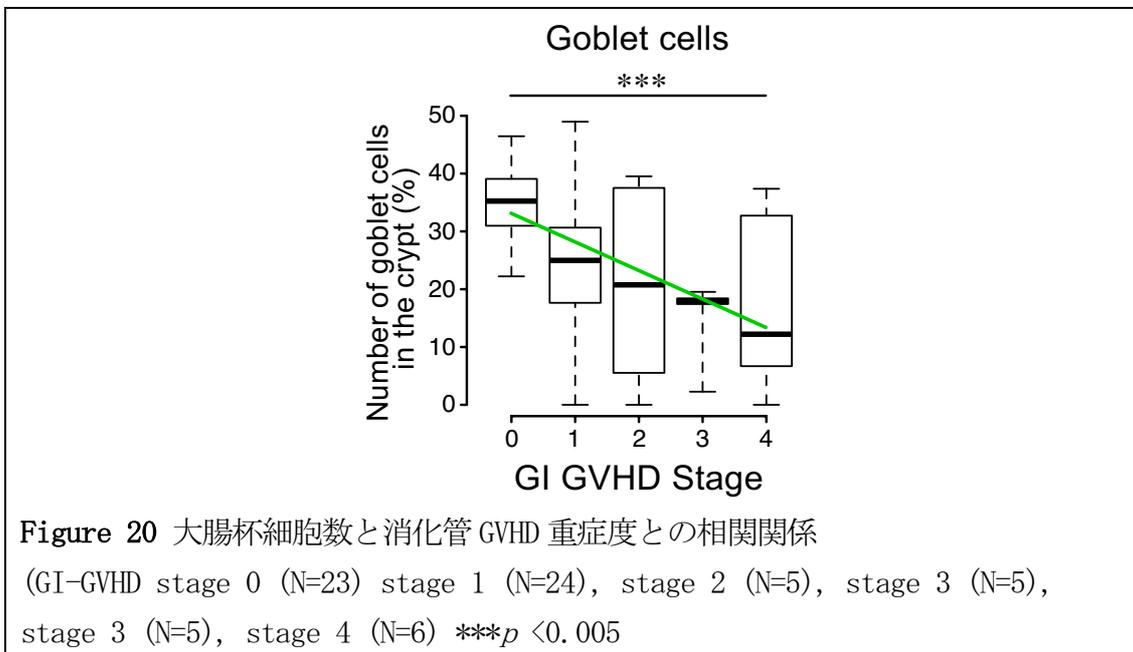


Figure 19 各カテゴリー毎の大腸杯細胞数

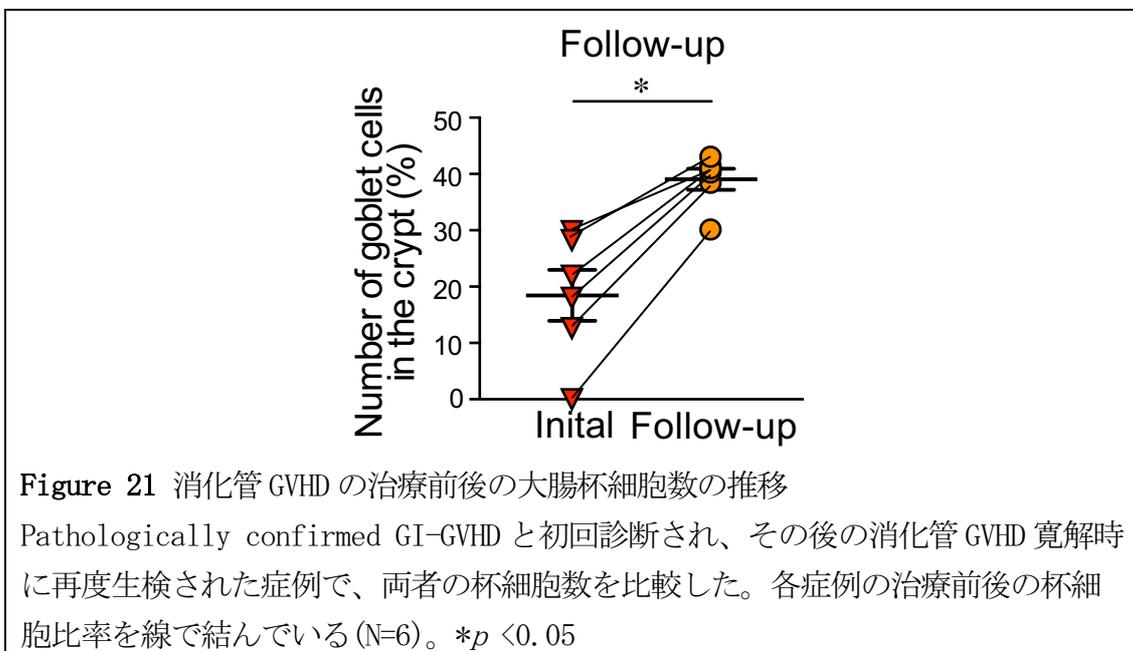
HE 染色にて陰窩中の大腸杯細胞と腸上皮細胞との比を算出した。各検体で少なくとも 5 個以上の陰窩で評価し、その平均値を算出した。(pre-SCT screening (N= 22), non-specific colitis (N= 51) clinical GI-GVHD (N= 14) CMV colitis (N= 11), pathologically confirmed GI-GVHD without CMV colitis (N= 39), pathologically confirmed GI-GVHD with CMV colitis (N= 7))

*** $p < 0.05$, *** $p < 0.005$

さらに大腸杯細胞の傷害の程度は臨床症状で分類される消化管 GVHD の重症度と相関していた (Figure 20)。



また、消化管 GVHD が治療により寛解がえられることで、杯細胞数が回復することも判明した (Figure 21)。



以上のことから大腸杯細胞が消化管 GVHD 治療によける診断・重症度分類・治療モニタリングの指標となりうることを示された。

5. ヒト同種造血幹細胞移植における大腸杯細胞の傷害と移植成績との関連性

最後に大腸杯細胞の傷害の程度が移植成績と関連するかの検討を行った。

検討に際して、経過中に一度でも大腸杯細胞数が15%以下となったものを Severe Goblet Loss 群(N= 8)とし、反対に常に15%以上であったものを Mild Goblet Loss (N= 65)群と定義した。

Severe Goblet Loss 群と Mild Goblet Loss 群の患者背景を Table 3 にまとめた。両群間で年齢、性別、基礎疾患、移植ソース、HLA 一致・不一致、前処置強度、放射線照射の有無には差がなかったが、Severe Goblet Loss 群で GVHD の grade および消化管 GVHD の stage が高く重症 GVHD を多く認めた。

Table 3-1. 杯細胞の傷害の程度で分けた患者背景 (1)

Variable	Severe Goblet Loss	Mild Goblet Loss	<i>P</i>
	Population n=8	Population n=65	
Age (median), y	18-63 (49)	18-67 (47)	0.81
Sex, n (%)			0.272
male	3 (38)	39 (60)	
female	5 (63)	26 (40)	
Underlying Disease, n (%)			0.59
AML	1 (13)	17 (26)	
ALL	1 (13)	12 (18)	
ML	4 (50)	19 (29)	
MDS	1 (13)	9 (14)	
CML	0 (0)	2 (3)	
AA	0 (0)	4 (6)	
MM	0 (0)	1 (2)	
Others	1 (13)	1 (2)	
Disease Risk Index, n (%)			0.2430
Low	0 (0)	12 (18)	
Intermediate	6 (75)	27 (42)	
High	1 (13)	20 (31)	
Very High	1 (13)	6 (9)	

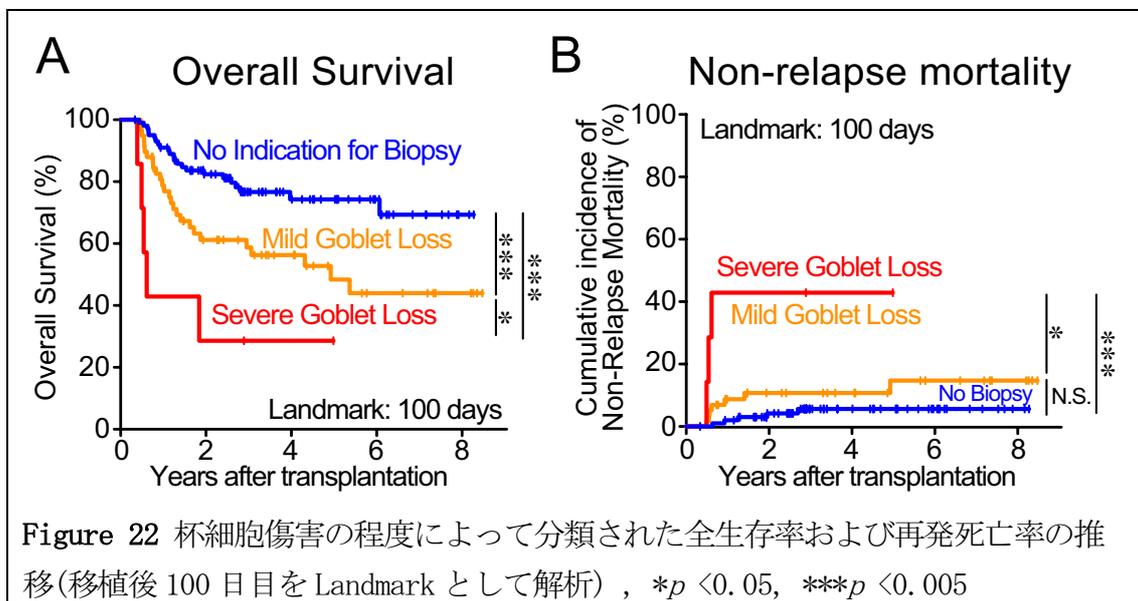
Table 3-2 杯細胞の傷害の程度で分けた患者背景 (2)

Variable	Severe Goblet Loss	Mild Goblet Loss	<i>P</i>
	Population n=8	Population n=65	
Donor Source, n (%)			0.5000
BMT	4 (50)	40 (62)	
PBSCT	1 (13)	14 (22)	
CBT	3 (38)	11 (17)	
HLA match, n (%)			0.2640
Yes	2 (25)	33 (51)	
No	6 (75)	32 (49)	
Conditioning, n (%)			0.4600
MAC	5 (63)	29 (45)	
RIC	3 (38)	36 (55)	
TBI, n (%)			0.0569
Yes	6 (75)	63 (97)	
No	2 (25)	2 (3)	
GVHD grade, n (%)			0.0078
0-2	2 (25)	49 (75)	
3-4	6 (75)	16 (25)	
GI GVHD stage, n (%)			0.0571
0	0 (0)	23 (35)	
1-2	5 (63)	32 (49)	
3-4	3 (38)	10 (15)	

Abbreviations: AML; acute myeloid leukemia ALL; acute lymphoblastic leukemia ML; malignant lymphoma. MDS; myelodysplastic syndrome, CML; Chronic myeloid leukemia, AA; aplastic anemia MM; multiple myeloma, BMT; bone marrow transplantation, PBSCT; peripheral blood stem cell transplantation, CBT; cord blood transplantation, MAC; myeloablative conditioning, RIC; reduced intensity conditioning, TBI; total body irradiation

Severe Goblet Loss 群と Mild Goblet Loss 群に、さらに残りの経過中に大腸生検を行わなかった群(No indication for Biopsy)を加えた 3 群で、移植後 100 日を landmark とした全生存率および非再発死亡率を比較検討した。

全生存率の解析では、下痢がなく大腸内視鏡検査および生検が必要なかった群が、下痢症状があり大腸生検を要した症例に比べて有意に予後良好であった一方で、重度に杯細胞傷害を受けた(=Severe Goblet Loss)群は軽度の杯細胞傷害に止まった(=Mild Goblet Loss)群よりも移植後の全生存率が有意に低く (Figure 22A)、非再発死亡率も高率だった(Figure 22B)。



このことから大腸杯細胞の受傷の程度は全生存や非再発死亡などの移植成績に影響を及ぼすと考えられた。

以上の結果から、ヒト同種造血幹細胞移植において、大腸杯細胞数は消化管 GVHD の診断およびモニタリングに加えて、予後予測にも有用なバイオマーカーであると考えられた。

考察

GVHD はドナー移植片中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組織傷害を引き起こす医原性疾患である (Teshima et al., 2002)。GVHD の主な標的臓器である消化管では成熟した上皮細胞や腸幹細胞などの前駆細胞がその標的となる (Takashima et al., 2011; Teshima et al., 2011)。

近年の研究により GVHD や graft versus leukemia (GVL) 効果という観点から腸内細菌叢が造血幹細胞移植の予後に影響を及ぼすということが報告されている (Eriguchi et al., 2012; Jenq et al., 2012; Peled et al., 2017)。例えば酪酸を産生する常在性嫌気性菌は直接腸管上皮を保護すると同時に (Mathewson et al., 2016)、制御性 T 細胞性を誘導することが知られており (Furusawa et al., 2013)、GVHD 症例では病原性細菌の増加および酪酸産生菌の減少によって移植成績が悪化するという報告がある (Atarashi et al., 2013; Taur et al., 2014)。

腸管粘膜は、細菌の体内への侵入を防ぐ障壁として重要であり、その腸管粘膜を覆うように存在している粘液層もまた、細菌に対する物理的かつ化学的な障壁として非常に重要である。同種移植後は腸内細菌叢に乱れが生じるため、腸管粘液層の機能が維持されることは同種移植の成績を左右する要素となりうる。

抗菌ペプチドを始めとする抗菌分子は腸内細菌を維持することや、直接的に上皮に対して保護的に働くことで腸内の恒常性を保つために非常に重要である (Eriguchi et al., 2012; Hayase et al., 2017; Zhao et al., 2018)。

特に、小腸の Paneth 細胞が産生する抗菌ペプチドである α -defensin は病原性細菌に対する選択的な抗菌活性を有する一方で、常在細菌叢には保護的に働くことが報告されており、正常の常在細菌叢を維持するのに重要な役割を果たしていると考えられる。我々は以前にマウスの GVHD モデルを用いて、Lgr5 陽性腸幹細胞とそのニッチである Paneth 細胞が、GVHD の標的細胞となっており、その傷害による組織修復機転の破綻と抗菌ペプチドの分泌不全による腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) が GVHD の増悪をもたらすことを示した (Masuda et al., 2011)。

今回、我々は大腸杯細胞も Paneth 細胞と同様に GVHD の標的細胞となり、その傷害によってムチン層が破綻をきたし、bacterial translocation が引き起こされることを示した。

様々な抗菌活性を有する物質が腸管上皮細胞で産生された後、ムチン層を介して消化管管腔へと放出される。このためムチン層は高濃度の抗菌分子を保持しており、細菌に対する腸上皮の化学的なバリアとしての機能を有している。

実際、いくつかの抗菌活性を有する分子は、主にムチン層に止まって機能していることが報告されている。Vaishnava らは抗菌ペプチドである REGIII γ が細菌刺激に反応して腸上皮細胞で産生・分泌され、ムチン層で殺菌作用を示すと報告している (Vaishnava et al., 2011)。また奥村らは大腸の腸上皮細胞が産生する Lypd8 がムチン層において細菌の活動性を抑えることにより、bacterial translocation を抑えることを報告している (Okumura et al., 2016)。これらの抗菌分子がムチン層で主に作用しているという事実からは、杯細胞によって形成されるムチン層が、抗菌分子が十分に効果を発現するために必須な存在である可能性がある。また、庄野らは、マウスモデルにおいてムチン分解菌の一種である *Akkermansia muciniphila* の腸管内での増殖が GVHD を増悪させると報告しており (Shono et al., 2016)、消化管 GVHD における大腸杯細胞およびムチン層の重要性を示唆する知見の一つと言えるだろう。

我々は、マウスモデルにおいて、腸管上皮増殖因子である R-Spondin 1 が Paneth 細胞を保護し、 α -defensin の産生を維持することにより腸管 dysbiosis を抑制して GVHD を軽減させることを報告した (Hayase et al., 2017)。さらにマウス α -defensin である cryptdin-4 を内服することでも腸管 dysbiosis を抑制して GVHD も軽減することを示した。その際、R-Spondin1 投与による GVHD 抑制効果は、抗菌ペプチド投与による GVHD 抑制に比較して、強力であった。R-spondin 1 は Paneth 細胞だけでなく杯細胞も増殖させるため、R-spondin 1 の投与がムチン層の破綻を抑制して α -defensin の抗菌活性を増強させている可能性もある。一方、dysbiosis に対する治療および GVHD 予防目的として cryptdin-4 などの抗菌分子を投与する際における、ムチン層の役割とそのサポートの必要性については更なる検討が必要と考える。

我々は移植前に IL-25 を投与して成熟杯細胞を増殖させることで、移植後にもそのバリア機能を維持させて、bacterial translocation と炎症性サイトカインの産生を抑制し GVHD を軽減しうることを発見した。

IL-25 は腸管の Tuft cell で産生され、ILC2 を介して杯細胞を増殖させる (Gerbe et al., 2016; von Moltke et al., 2016)。ILC は GVHD に関して保護的に働くことがわかってきている。Hanash らは放射線耐性である ILC3 が GVHD によって傷害を受けることで腸管上皮増殖因子である IL-22 の産生が低下してバリア機構が破綻することを報告している (Hanash et al., 2012)。ILC2 は ILC3 と異なり、GVHD の有無とは関係なく、移植前処置後に激減して長期間回復しない。Bruce ら IL-25 を投与して別

個に採取しておいた ILC2 を、移植時に輸注することで Myeloid-derived suppressor cells を誘導して GVHD を軽減させるという方法を報告しているが、この研究では ILC2 投与後の腸杯細胞については検討していない(Bruce et al., 2017)。今回、我々は同種移植後の ILC2 の動態についての評価は行なっていないが、移植前に投与していた IL-25 によって増殖した ILC2 が、前処置後には減少していることが予測される。

ヒトにおいても末梢血中に活性化した ILC2 と ILC3 を認めた場合に GVHD の発症率が低下するという報告があるが(Munneke et al., 2014)、これらの患者で実際に杯細胞の増加や成熟が認められるかについては不明である。更なる検討が必要である。

我々はヒトにおいて他の下痢をきたす移植後の合併症と比較して、消化管 GVHD でのみ大腸杯細胞が減少することを発見した。Levine らは十二指腸の Paneth 細胞数が消化管 GVHD の重症度に相関すると報告している(Levine et al., 2013)。大腸杯細胞も、十二指腸の Paneth 細胞と同様に、簡便な診断的かつ経過観察に有用なバイオマーカーになりうる。

今回の検討では、非特異的な下痢や CMV 腸炎においては大腸杯細胞が減少しないことは判明したが、今後は血栓性微小血管障害症や Epstein-Barr ウイルス関連腸炎などの他の移植後消化管合併症における大腸杯細胞数に関しても比較検討が必要と考える。

近年では、共焦点レーザー内視鏡の開発により、消化管生検を行わずに大腸杯細胞を評価することも可能となってきた(Arya and Yan, 2012)。

内視鏡や組織学的による大腸杯細胞の評価が、簡便な診断的かつ、経過観察可能で、予後予測可能な消化管バイオマーカーとして用いられるかもしれない。

また、杯細胞を保護することで抗菌分子を保持した状態のムチン層を維持し、bacterial translocation を防ぎ、移植成績を改善させるという新たな治療戦略も考えられ、今後の更なる基礎および臨床研究が望まれる。

総括および結論

本研究にて以下の知見が得られた。

- 消化管 GVHD によって大腸杯細胞は傷害を受ける
- 大腸杯細胞の傷害は大腸のムチン層構造を破綻させ、細菌の腸管粘膜内への侵入 (bacterial translocation) を引き起こす
- 杯細胞増殖因子である IL-25 は、移植による杯細胞傷害に対して保護的に働き、bacterial translocation と炎症性サイトカイン産生を抑制することで GVHD を軽減させる
- 杯細胞から産生されるムチンによる細菌に対するバリア機構は、抗菌分子 Lypd8 依存性である
- ヒト造血幹細胞移植において、大腸杯細胞は消化管 GVHD に特異的に傷害を受け、その重症度・治療反応性・移植成績と相関する

2. 新知見の意義

消化管 GVHD における大腸杯細胞の傷害の意義についてはこれまで検討がなされてこなかった。GVHD による杯細胞の傷害によって、大腸のムチン層が破綻して細菌の腸上皮内への侵入が引き起こり、炎症の増悪によって更に GVHD が悪化するというメカニズムを示した。rmIL-25 の投与によって杯細胞を増殖させて保護することで GVHD が軽減することから、杯細胞の保護による GVHD 予防・治療という新たな予防戦略の可能性が示された。一方で、ムチン層は Lypd8 のような抗菌分子と協調的に作用するため、両者を保つことが、腸管粘膜のバリア機構を保持して GVHD を予防するためには重要であり、このような予防戦略の可能性も示唆された。

また、ヒト造血幹細胞移植において、消化管 GVHD において特異的に杯細胞は減少し、その重症度と治療反応性、移植成績と相関することから、簡便な消化管 GVHD のバイオマーカーとなりうることが予想される。近年では内視鏡観察のみでも杯細胞や陰窩の配列など、病理学的所見に準ずるような情報把握が可能となっており、今回得た知見と組み合わせることでより患者への負担の少ない消化管 GVHD 診療を実現することができるかもしれない。

3. 今後の研究展開

今回の検討では、IL-25 が ILC2 を介して杯細胞の増殖を導いて保護することで、GVHD を軽減させるというメカニズムを示したが、IL-25 が他の経路を介して GVHD を軽減させている可能性は完全には否定できていない。これに関して検証するために IL-25 のレセプターである IL-17RB のノックアウトマウスを用いた移植を行い、作用メカニズムの詳細について検討していく。

また、IL-25 投与および移植後の ILC2 について経時的に観察していくことで ILC2 の傷害のメカニズムおよびその保護が可能か検討していく。

ムチン層と抗菌分子は互いに相補的に腸管バリア機構の維持に携わっている。そこで rmIL-25 と cryptdin-4 を組み合わせて、双方の効果を増強させてより強力に腸管 dysbiosis を抑制することが可能かを検討する。

ヒト同種造血幹細胞移植において、前向き研究または多施設共同研究を行い、大腸杯細胞と消化管 GVHD との関係性や、他の移植合併症疾患との鑑別方法について、より症例を集積して検討したい。またその際に、共焦点レーザー内視鏡による観察と病理標本における杯細胞の傷害の程度とを比較検討して、より簡便な消化管 GVHD の診断および経過観察方法を構築していく。

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、小野澤真弘助教、杉田純一講師、早瀬英子先生
高橋秀一郎助教、Dr. Clara Noizat, 松岡里湖先生、江端浩先生、小笠原励起先生、
山川知宏先生、大東寛幸先生、横山絵美先生、立野貴大先生、長谷川裕太先生

大阪大学大学院医学研究科 免疫制御学

竹田 潔教授、奥村 龍助教

利益相反

開示すべき利益相反状態はない

引用文献

- Alexander, K.A., Flynn, R., Lineburg, K.E., Kuns, R.D., Teal, B.E., Olver, S.D., Lor, M., Raffelt, N.C., Koyama, M., Leveque, L., *et al.* (2014). CSF-1-dependant donor-derived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* *124*, 4266-4280.
- Anderson, J.R., Cain, K.C., and Gelber, R.D. (1983). Analysis of survival by tumor response. *J. Clin. Oncol.* *1*, 710-719.
- Arya, A.V., and Yan, B.M. (2012). Ultra high magnification endoscopy: Is seeing really believing? *World J. Gastrointest. Endosc.* *4*, 462-471.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., *et al.* (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* *500*, 232-236.
- Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2000). Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.* *1*, 113-118.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., *et al.* (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* *449*, 1003-1007.
- Bevins, C.L., and Salzman, N.H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 356-368.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., *et al.* (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* *31*, 513-525.
- Brown, E.M., Sadarangani, M., and Finlay, B.B. (2013). The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat. Immunol.* *14*, 660-667.
- Bruce, D.W., Stefanski, H.E., Vincent, B.G., Dant, T.A., Reisdorf, S., Bommiasamy, H., Serody, D.A., Wilson, J.E., McKinnon, K.P., Shlomchik, W.D., *et al.* (2017). Type 2 innate lymphoid cells treat and prevent acute gastrointestinal graft-versus-host

disease. *J. Clin. Invest.* *127*, 1813-1825.

Cash, H.L., Whitham, C.V., Behrendt, C.L., and Hooper, L.V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* *313*, 1126-1130.

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

Cornick, S., Tawiah, A., and Chadee, K. (2015). Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers* *3*, e982426.

de Lau, W., Peng, W.C., Gros, P., and Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes. Dev.* *28*, 305-316.

Eigenbrodt, M.L., Eigenbrodt, E.H., and Thiele, D.L. (1990). Histologic similarity of murine colonic graft-versus-host disease (GVHD) to human colonic GVHD and inflammatory bowel disease. *Am. J. Pathol.* *137*, 1065-1076.

Eriguchi, Y., Takashima, S., Oka, H., Shimoji, S., Nakamura, K., Uryu, H., Shimoda, S., Iwasaki, H., Shimono, N., Ayabe, T., *et al.* (2012). Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α -defensins. *Blood* *120*, 223-231.

Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T.A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., *et al.* (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* *504*, 446-450.

Gale, R.P., and Champlin, R.E. (1984). How does bone-marrow transplantation cure leukaemia? *Lancet* *2*, 28-30.

Ganz, T., Selsted, M.E., and Lehrer, R.I. (1990). Defensins. *Eur J Haematol* *44*, 1-8.

Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., *et al.* (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* *529*, 226-230.

Gerbitz, A., Schultz, M., Wilke, A., Linde, H.J., Schölmerich, J., Andreesen, R., and Holler, E. (2004). Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood* *103*, 4365-4367.

Gersemann, M., Becker, S., Kübler, I., Koslowski, M., Wang, G., Herrlinger, K.R., Griger, J., Fritz, P., Fellermann, K., Schwab, M., *et al.* (2009). Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation* *77*, 84-94.

Grogan, D. (2015). The microbes within. *Nature* *518*, S2.

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.

Hayase, E., Hashimoto, D., Nakamura, K., Noizat, C., Ogasawara, R., Takahashi, S., Ohigashi, H., Yokoi, Y., Sugimoto, R., Matsuoka, S., *et al.* (2017). R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* *214*, 3507-3518.

Heimesaat, M.M., Nogai, A., Bereswill, S., Plickert, R., Fischer, A., Loddenkemper, C., Steinhoff, U., Tchaptchet, S., Thiel, E., Freudenberg, M.A., *et al.* (2010). MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease. *Gut* *59*, 1079-1087.

Hill, G.R., and Ferrara, J.L. (2000). The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* *95*, 2754-2759.

Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V., *et al.* (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* *139*, 485-498.

Jenq, R.R., Ubeda, C., Taur, Y., Menezes, C.C., Khanin, R., Dudakov, J.A., Liu, C., West, M.L., Singer, N.V., Equinda, M.J., *et al.* (2012). Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.* *209*, 903-911.

Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* *48*, 452-458.

Klein, J.P., Rizzo, J.D., Zhang, M.J., and Keiding, N. (2001). Statistical methods for the analysis and presentation of the results of bone marrow transplants. Part 2: Regression modeling. *Bone Marrow Transplant.* *28*, 1001-1011.

Levine, J.E., Huber, E., Hammer, S.T., Harris, A.C., Greenson, J.K., Braun, T.M., Ferrara, J.L., and Holler, E. (2013). Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality. *Blood* *122*, 1505-1509.

Levy, D.A., and Wefald, A. (1986). Gut mucosal mast cells and goblet cells during acute graft-versus-host disease in rats. *Ann. Inst. Pasteur. Immunol.* *137D*, 281-288.

Masuda, K., Sakai, N., Nakamura, K., Yoshioka, S., and Ayabe, T. (2011).

Bactericidal activity of mouse α -defensin cryptdin-4 predominantly affects noncommensal bacteria. *J. Innate Immun.* *3*, 315-326.

Mathewson, N.D., Jenq, R., Mathew, A.V., Koenigsnecht, M., Hanash, A., Toubai, T., Oravec-Wilson, K., Wu, S.R., Sun, Y., Rossi, C., *et al.* (2016). Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* *17*, 505-513.

Munneke, J.M., Björklund, A.T., Mjösberg, J.M., Garming-Legert, K., Bernink, J.H., Blom, B., Huisman, C., van Oers, M.H., Spits, H., Malmberg, K.J., *et al.* (2014). Activated innate lymphoid cells are associated with a reduced susceptibility to graft-versus-host disease. *Blood* *124*, 812-821.

Nowarski, R., Jackson, R., Gagliani, N., de Zoete, M.R., Palm, N.W., Bailis, W., Low, J.S., Harman, C.C., Graham, M., Elinav, E., *et al.* (2015). Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. *Cell* *163*, 1444-1456.

Okumura, R., Kurakawa, T., Nakano, T., Kayama, H., Kinoshita, M., Motooka, D., Gotoh, K., Kimura, T., Kamiyama, N., Kusu, T., *et al.* (2016). Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. *Nature* *532*, 117-121.

Pelaseyed, T., Bergström, J.H., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Birchenough, G.M., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Nyström, E.E., *et al.* (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol. Rev.* *260*, 8-20.

Peled, J.U., Devlin, S.M., Staffas, A., Lumish, M., Khanin, R., Littmann, E.R., Ling, L., Kosuri, S., Maloy, M., Slingerland, J.B., *et al.* (2017). Intestinal Microbiota and Relapse After Hematopoietic-Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol.* *35*, 1650-1659.

Przepiorka, D., Weisdorf, D., Martin, P., Klingemann, H.G., Beatty, P., Hows, J., and Thomas, E.D. (1995). 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* *15*, 825-828.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., *et al.* (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* *464*, 59-65.

Sale, G.E., Shulman, H.M., McDonald, G.B., and Thomas, E.D. (1979). Gastrointestinal graft-versus-host disease in man. A clinicopathologic study of the rectal biopsy. *Am. J. Surg. Pathol.* *3*, 291-299.

Salzman, N.H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson-Sjöberg, J., Amir, E., Tegatz, P., Barman, M., Hayward, M., Eastwood, D., *et al.* (2010). Enteric defensins

are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat. Immunol.* *11*, 76-83.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., *et al.* (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* *459*, 262-265.

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.

Shono, Y., Docampo, M.D., Peled, J.U., Perobelli, S.M., Velardi, E., Tsai, J.J., Slingerland, A.E., Smith, O.M., Young, L.F., Gupta, J., *et al.* (2016). Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci. Transl. Med.* *8*, 339ra371.

Shulman, H.M., Cardona, D.M., Greenson, J.K., Hingorani, S., Horn, T., Huber, E., Kreft, A., Longerich, T., Morton, T., Myerson, D., *et al.* (2015). NIH Consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: II. The 2014 Pathology Working Group Report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *21*, 589-603.

Smith, N.R., Davies, P.S., Silk, A.D., and Wong, M.H. (2012). Epithelial and mesenchymal contribution to the niche: a safeguard for intestinal stem cell homeostasis. *Gastroenterology* *143*, 1426-1430.

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.

Taur, Y., Jenq, R.R., Perales, M.A., Littmann, E.R., Morjaria, S., Ling, L., No, D., Gouborne, A., Viale, A., Dahi, P.B., *et al.* (2014). The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *124*, 1174-1182.

Teshima, T., Maeda, Y., and Ozaki, K. (2011). Regulatory T cells and IL-17-producing cells in graft-versus-host disease. *Immunotherapy* *3*, 833-852.

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.

Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K.M., Ruhn, K.A., Yu, X., Koren, O., Ley,

R., Wakeland, E.K., and Hooper, L.V. (2011). The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* *334*, 255-258.

von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.E., and Locksley, R.M. (2016). Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature* *529*, 221-225.

Zhao, D., Kim, Y.H., Jeong, S., Greenson, J.K., Chaudhry, M.S., Hoepting, M., Anderson, E.R., van den Brink, M.R., Peled, J.U., Gomes, A.L., *et al.* (2018). Survival signal REG3 α prevents crypt apoptosis to control acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* *128*, 4970-4979.