

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15358

研究課題名(和文)真菌感染症とGVHDのクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between GVHD and fungal infection

研究代表者

豊嶋 崇徳(Teshima, Takanori)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号：40284096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：真菌感染症がGVHDに及ぼす影響についてマウスモデルを用いて検討した。Candida菌体壁成分 $\alpha$ -MannanあるいはCandida死菌の投与によってGVHD、特に肺病変の重症化がみられた。 $\alpha$ -Mannan投与はGVHDに伴う肺マクロファージのTh17分化を促進するIL-6、IL-23、CCL20などの発現を増強し、ドナーTh17細胞の肺浸潤を促進した。一方、Dectin-2欠損レシピエント、あるいはIL-17A欠損ドナーでは肺GVHDの増悪はみられなかった。以上から、Candida感染はレシピエントのdectin-2を介し、ドナーTh17細胞の肺集積を促進する新たな機序が判明した。

研究成果の概要(英文)：We evaluated mechanistic link between graft-versus-host disease (GVHD) and Candida infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (SCT) in mouse models. Injection of  $\alpha$ -Mannan, a major component of fungal cell wall, or heat-killed *Candida albicans* accelerated lung GVHD.  $\alpha$ -Mannan induced donor Th17 differentiation and lung specific chemokine environment in GVHD led to Th17 infiltration to the lung. Such effects of  $\alpha$ -Mannan on GVHD was dependent on both recipient Dectin-2 and donor IL-17A. These results demonstrate a novel mechanistic link between GVHD and Candida infection following allogeneic SCT.

研究分野：血液内科学

キーワード：GVHD Candida 肺 Th17 Dectin-2 mannan

### 1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は白血病、リンパ腫などの造血器悪性腫瘍や、再生不良性貧血、先天性免疫異常症など血液、免疫、代謝疾患に対する根治療法である。同種造血幹細胞移植の最大の合併症は移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) と感染症であり、その成績向上にはこれらの克服が喫緊の課題となっている。

申請者を含めた今までの基礎的、臨床的研究により、細菌、ウイルス感染症は GVHD に伴う合併症であるのみならず、GVHD の増悪因子であることは明らかにされており、GVHD と感染症のクロストークの存在が示されている (Eriguchi et al, Blood 2012)。

一方で、同種造血幹細胞移植後に特に頻度が高く、予後に影響する合併症である真菌感染は、GVHD とその治療に伴う合併症であることはよく知られているが、真菌感染症が GVHD の病態生理に及ぼす影響は今までに明らかにされていない。

申請者は以下のような臨床的観察に注目した。一つは、米国における同種造血幹細胞移植後のカンジダ症予防の大規模臨床試験において、fluconazole 投与群で急性 GVHD の発症が低下することが報告されたことである (Marr et al, Blood 2000)。二つ目は、腸管内カンジダ定着が GVHD 発症のリスクであることが示唆されたことである (van der Velden et al, Clinical Immunology 2010)。申請者は、これらの報告から、真菌感染症においても、細菌、ウイルス感染症と同様に GVHD の増悪に関わるメカニズムが存在するのではないかと仮説を持つに至った。しかし真菌感染症と GVHD の関連は明確にはされておらず、両者の病態メカニズムの関連性も不明であった。

急性 GVHD の古典的な罹患組織は、皮膚、肝臓、消化管である。一方、頻度は低いものの肺にも GVHD が発症することが知られている。しかし肺 GVHD の発症は必ずしも古典的な皮膚、肝臓、消化管の GVHD の発症とパラレルではなく、両者の発症メカニズムには相違点もあるものと考えられている。

申請者は、真菌感染と GVHD の両者の研究に適したマウスモデルを開発し、真菌感染が GVHD、とくに肺 GVHD に及ぼす影響を検討することで、同種造血幹細胞移植の合併症である GVHD と真菌感染の理解を深め、その治療成績の向上を目指すこととした。

### 2. 研究の目的

真菌感染症が GVHD の発症に及ぼす影響を検討可能なマウスモデルを作成する。このシステムを用いて真菌感染症が GVHD の発症に及ぼす影響を検証し、両者の関連性を証明し、そのメカニズムを解明する。これにより世界に先駆けて GVHD と真菌感染のクロストークを示すことにより、新たな観点から同種造血幹細胞移植の成績向上を目指す。

### 3. 研究の方法

真菌菌体成分である  $\alpha$ -Mannan を MHC 完全不適合の BALB/c B6、MHC 半合致の代表的なマウス同種造血幹細胞移植モデル B6 BDF1、あるいは MHC 適合マイナー組織適合性抗原不適合の C3H.Sw B6 の 3 種類のモデルマウスにおいて投与し、全身的な GVHD に対する影響を死亡率、臨床スコアで判定する。さらに各臓器の GVHD に対する影響を病理組織学的に検討する。

また、各臓器よりドナー T 細胞とマクロファージを免疫学的に分離し、各ヘルパー T 細胞分画およびその機能分化ならびに活性化、遊走に関連するサイトカイン、ケモカインおよびそのリガンド群の発現を検討する。特に肺 GVHD においては Th17 細胞が重要と報告されていることから、IL-17 fate map system を用いドナー Th17 細胞の各臓器への浸潤とその機能分化を経時的かつ詳細に検討する。

最終的に  $\alpha$ -Mannan のレセプターである Dectin2<sup>-/-</sup>、Th17 分化が阻害される IL-17A<sup>-/-</sup> マウスにおいて、肺 GVHD の発症が影響されるか検討し、そのメカニズムを確認する。

最後に、 $\alpha$ -Mannan の代わりに *Candida albicans* の死菌の投与実験を行い、GVHD 発症との関連を確認する。

### 4. 研究成果

真菌感染症が GVHD に及ぼす影響についてマウスモデルを用いて検討した。同種造血幹細胞移植モデルとしては MHC 完全不適合の BALB/c B6、MHC 半合致である B6 BDF1、MHC 適合マイナー組織適合性抗原不適合の C3H.Sw B6 の 3 種類を用いた。

真菌感染モデルとしては、菌体壁成分である  $\alpha$ -Mannan、あるいは *Candida albicans* の死菌を投与する標準的なモデルを用いた。

$\alpha$ -Mannan を移植日に腹腔内に単回投与したところ、GVHD スコアの悪化と死亡率の増加がすべてのモデルで普遍的に観察された。その効果は  $\alpha$ -Mannan の用量依存性であった。すなわち、真菌感染は全身 GVHD の増悪因子であることが明らかにされた。

次いで、臓器別に GVHD を病理学的に検討したところ、腸、肝で有意な GVHD の増悪が認められたが、とくに肺 GVHD の増悪が顕著であった。一方、皮膚 GVHD の増悪は見られなかった。同種造血幹細胞移植後の各臓器の解析において、腸、肝、皮膚に比較し、とくに肺に顕著なドナー T 細胞の浸潤がみられた。その T 細胞の性格を調べるため、T 細胞を肺組織から分離解析したところ Th17 細胞の著明な浸潤が認められた。一方、肺マクロファージにおいては Th17 分化に関連する IL-6、IL-23、CCL20 などの多数のサイトカイン、ケモカイン群の発現亢進がみられた。このような肺における変化が Th17 細胞の肺への遊走を招来し、肺病変が悪化する機序と想定された。

このような肺における T 細胞およびマクロファージの変化は同系造血幹細胞移植ではみられ

ず、アロ免疫応答の存在が必須であると考えられた。すなわち、全身 GVHD によって肺には Th17 環境となり、Th17 依存性の肺 GVHD が発症するものと考えられた。一方、このような Th17 環境は、GVHD の古典的な罹患組織である皮膚、肝臓、消化管では軽度であり、これが  $\alpha$ -Mannan 投与による GVHD の臓器別影響が異なる機序であると考えられた。

肺 GVHD を発症したマウスでは、動脈血酸素飽和度が著明に低下しており、肺 GVHD が機能的にも証明された。

また *Candida albicans* 感染死菌投与実験を行ったところ、 $\alpha$ -Mannan 投与時と同様な、肺 GVHD の増悪、T 細胞機能分化と肺浸潤が確認でき、 $\alpha$ -Mannan 投与実験で起こった変化は真菌感染症による変化と考えてよいものと結論付けられた。一方、肺 GVHD の増悪はレシピエントに  $\alpha$ -Mannan の受容体である Dectin-2 ノックアウトマウスを用いた場合、あるいはドナーに Th17 分化が阻害される IL-17A ノックアウトマウスを用いた場合にはキャンセルされた。

以上の結果から、*Candida* 感染は壁成分である  $\alpha$ -Mannan がレシピエントの dectin-2 受容体を介し、ドナー T 細胞の Th17 細胞分化を促進し、肺における Th17 環境がドナー Th17 細胞の集積を促進し、肺 GVHD の発症、増悪に関与する可能性が示唆された。一方で  $\alpha$ -Mannan を投与しない場合には、急性 GVHD は古典的な罹患組織は、皮膚、肝臓、消化管に顕著であり、肺病変は目立たなかった。すなわち肺 GVHD と古典的 GVHD の発症メカニズムは異なるものと考えられ、これが肺 GVHD の発症は必ずしも古典的な皮膚、肝臓、消化管の GVHD の発症とパラレルではない原因と考えられた。

次に治療介入を目指し、Th17 免疫応答に深く関連する抗 IL-6 抗体の投与により GVHD 増悪が阻止できないかどうか検討した。MHC 半合致である B6 BDF1 モデルを用い、 $\alpha$ -Mannan 投与後に抗マウス IL-6 抗体である MR16-1 を投与し、その T 細胞免疫応答、および肺 GVHD に対する影響を検討した。しかし、T 細胞応答、肺 GVHD ともに抑制されず、おそらく IL-6 のみならず、さまざまなサイトカインやケモカインがその発症に関与しているものと示唆された。従って、単一分子の標的ではその治療は困難であると考えられ、これも臨床において、単一のサイトカインの阻害のみでは肺 GVHD の治療が困難である事実在即しており、その説明となるものと考えられた。

最近、GVHD に伴う腸内細菌叢の変化が注目され、申請者を含め、国際的に研究が進んでいる(Eriguchi et al, Blood 2012, Eriguchi et al, BBMT 2013, Teshima et al, BBMT 2016)。

すなわち、腸内細菌叢は個体の GVHD 感受性に関連し、一方で GVHD はパネト細胞ダメージからデフェンシンなどの抗菌ペプチドの産生を抑制することで、腸内細菌叢の構成に変化を与え、それがさらに GVHD の増悪因子となる。一方、腸内細菌叢の攪乱はときに腸内真菌叢の増加を招来する。また経口広域抗菌剤の投与に

よっても腸内真菌叢が優勢になることが知られている。

しかし腸内真菌叢と GVHD の関連については全く報告がない。そこでこの問題を検討するため、MHC 半合致の代表的なマウス同種造血幹細胞移植モデル B6 BDF1 において、移植後の糞便サンプルを個体ごとに継時的に収集し、次世代シーケンサーを用いて糞便中のファンジーム解析を行った。真菌の検出頻度は同系造血幹細胞移植に比べ、同種造血幹細胞移植で明らかに高かった。今後、その菌量および菌種について今後検討を行う予定である。これらの一連の研究によって、真菌感染と GVHD の関連について包括的な理解を深めて行く予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計7件)

1. Uryu H, Hashimoto D, Kato K, Hayase E, Matsuoka S, Ogasawara R, Takahashi S, Maeda Y, Iwasaki H, Miyamoto T, Saijo S, Iwakura Y, Hill GR, Akashi K, Teshima T:  $\alpha$ -Mannan induces Th17-mediated pulmonary graft-versus-host disease in mice. *Blood*. 125(19): 3014-3023, doi: 10.1182/blood-2014-12-615781, 2015 May.
2. Eriguchi Y, Nakamura K, Hashimoto D, Shimoda S, Shimono N, Akashi K, Ayabe T, Teshima T: Decreased secretion of Paneth cell  $\alpha$ -defensin in graft-versus-host disease. *Transpl Infect Dis*. 17(5): 702-706, 2015 Jul 2
3. Teshima T, Reddy P, Zeiser R: Acute Graft-versus-Host Disease: Novel Biological Insights. *Biol Blood Marrow Transplant*. 22(1): 11-16, 2016 Jan.
4. Teshima T: The primacy of IL-6 in IPS? *Blood* 125(15): 2320-2322, doi: 10.1182/blood-2015-02-629816, 2015 Apr.
5. Kanaya M, Shibuya K, Hirochika R, Kanemoto M, Ohashi K, Okada M, Wagatsuma Y, Cho Y, Kojima H, Teshima T: Soluble DNAM-1, as a Predictive Biomarker for Acute Graft-Versus-Host Disease. **PLoS One**. 2016 Jun 3; 11(6):e0154173. doi: 10.1371/journal.pone.0154173. eCollection 2016.
6. Shimoji S, Hashimoto D, Tsujigiwa H, Miyawaki K, Kato K, Takahashi S, Ogasawara R, Jiromaru T, Iwasaki H, Miyamoto T, Akashi K, Teshima T: Graft-versus-host disease targets ovary and causes female infertility in

mice. Blood. 2017 Mar  
2;129(9):1216-1225, doi:  
10.1182/blood-2016-07-728337, 2016  
Nov 30.

7. Kanaya M, Hayashi Y, Hashimoto D, Endo T, Sugita J, Ohigashi H, Hashiguchi J, Matsukawa T, Matsuoka S, Kosugi-Kanaya M, Goto H, Onozawa M, Kahata K, Fujimoto K, Kondo T, Akizawa K, Shibuya H, Shimizu C, Teshima T: MALDI-TOF MS in post-transplant bloodstream infections: reliable identification of causative bacteria in the neutropenic phase. Bone Marrow Transplant. 2017 Jan30. doi: 10.1038/bmt.2016.365. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Hayase E, Hashimoto D, Nakamura K, Ogura Y, Hayashi T, Kurokawa K, Teshima T: R-spondin1 Promotes Paneth cell growth, maintains intestinal microbial ecology, and ameliorates GVHD. American society of Hematology, Dec 4-8, Orland (USA)
2. Teshima T: Emerging concepts on tissue injury in GVHD. BMT Tandem Meetings 2016, Feb 17-22, Honolulu (USA)
3. 豊嶋崇徳: GVHD 組織障害の新たな概念. 第 38 回日本造血幹細胞移植学会総会, 2016 May 3-5, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
4. Teshima T: JAK inhibition for GVHD. 42th EBMT meeting, 2016 Apr 3-6, Valencia (Spain)
5. Hayase E, Hashimoto D, Nakamura K, Ogura Y, Hayashi T, Kurokawa K, Teshima T: R-spondin1 Promotes Paneth cell growth, maintains intestinal microbial ecology, and ameliorates GVHD. The 7th JSH International Symposium, 2016 May 13-14, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県・淡路市)
6. Yakmakawa T, Hashimoto D, Hayase E, Takahashi S, Teshima T: Vitamin A-coupled liposomes containing siRNA against HSP47 ameliorate skin fibrosis in chronic graft-versus-host disease. American society of Hematology, 2016 Dec 3-6, San Diego (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)  
名称: 皮膚繊維症治療剤  
発明者: 豊嶋 崇徳、橋本 大吾、新津 洋司郎、味香 憲二郎  
権利者: 日東電工株式会社  
種類: 特許  
番号: 特許願 2015-112071  
出願年月日: 27 年 5 月 29 日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
なし  
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
豊嶋 崇徳 (TESHIMA TAKANORI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 40284096