

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02904

研究課題名(和文)代謝チェックポイントを中心とした腸管組織免疫寛容性の解明と治療開発

研究課題名(英文)Induction of Immune tolerance in the intestine depending on metabolic checkpoint

研究代表者

藤原 英晃 (Fujiwara, Hideaki)

岡山大学・大学病院・研究准教授

研究者番号：90743683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,350,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血細胞移植後の重大な合併症である移植片対宿主病(GVHD)において腸内細菌叢の乱れや重篤な移植合併症のとなる腸管GVHDにおける腸管上皮細胞の代謝動態を研究した。同種反応性T細胞による腸管上皮細胞傷害においてミトコンドリア複合体IIの特異的傷害が発生しており薬剤性ミトコンドリア阻害・Vil1Cre-Sdha floxマウスによる遺伝学的阻害で腸管GVHDの増悪を確認した。病態生理としてミトコンドリア機能不全によるエネルギー不足によるhomeostasisの消失がGVHDによる組織障害の原因であること、酸素利用障害に伴う腸管内酸素濃度上昇が腸内細菌叢の乱れの原因であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同種造血細胞移植の腸管組織傷害ではドナーT細胞が腸管上皮細胞を標的とした傷害、特にミトコンドリア傷害が組織恒常性と腸内細菌叢の破綻・細菌由来代謝物の異常によるものであることを明らかにしてきた。これら恒常性破綻・腸内細菌叢の破綻とそれに伴う代謝物異常による組織代謝異常が、ミトコンドリア特異的傷害に由来していることから、免疫細胞を抑制せずにミトコンドリアを標的とした新たな治療開発への展開の可能性を見出し今後の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the metabolic dynamics of intestinal epithelial cells in intestinal GVHD, a serious complication after allogeneic hematopoietic cell transplantation (allograft-versus-host disease (GVHD)), which is a disorder of the intestinal microbiota and a serious transplant complication. We found that intestinal epithelial cell injury by allogeneic reactive T cells causes specific mitochondrial complex II injury, which is exacerbated by drug-induced mitochondrial inhibition and genetic inhibition using the Vil1Cre-Sdha flox mouse model of GVHD. The pathophysiology of GVHD is that the loss of homeostasis caused by energy deficiency due to mitochondrial dysfunction is the cause of tissue damage due to GVHD, and that increased oxygen concentration in the intestinal tract due to impaired oxygen utilization is the cause of disruption of the intestinal microbiota.

研究分野：造血細胞移植

キーワード：GVHD 腸管上皮細胞 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植 (以下 同種移植) は、血液悪性疾患に治癒をもたらす根治的治療法であり、近年の医療進歩により高齢者にも実施が可能となっている。しかし、同種移植に伴う重篤な合併症として、ドナーの T 細胞が患者の正常臓器を攻撃する GVHD と呼ばれる免疫反応が約 4 割の患者に起こる。GVHD が発症すると皮膚、肝臓、腸管が障害される。腸管 GVHD は特に重症化し高齢者では致命的となるため、移植成功への最大の障壁となっている。T 細胞を抑制する免疫抑制剤が GVHD の治療に用いられるが、その効果は限定的であり、かつ免疫力の低下が白血病の再発に繋がるため、新たな治療法の開発が喫緊の課題となっている。腸内細菌叢の乱れや多様性の減少 (以下 dysbiosis) は GVHD と深く関連しており、GVHD が発症し dysbiosis を起こした場合には、正常腸内細菌叢由来の代謝産物である短鎖脂肪酸が減少していること (Mathewson: Nat Immunol 2016)、腸管上皮細胞における短鎖脂肪酸受容体を介するインフラマソームの活性化が細胞障害を軽減し GVHD を改善することを明らかにした (Fujiwara: Nat Commun 2018, Fujiwara: Nat Microbiol 2019)。つまり、dysbiosis → 短鎖脂肪酸の減少 → インフラマソームの不活性化 → 腸管細胞の恒常性の破綻 → GVHD 増悪という一連の流れを解明した。しかし、そもそも dysbiosis がなぜ起こるかは不明であり、dysbiosis が起こる機序を解明することが、免疫による傷害である腸管 GVHD に対する根本的治療法を開発する上で非常に重要となっている。

2. 研究の目的

本研究において腸管 GVHD と dysbiosis の原因となりうる腸管上皮細胞代謝という新たな観点から病態を捉えなおして解明し、腸管上皮細胞を標的とした新たな治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) GVHD が与えるマウス腸管酸素濃度の検討: GVHD 発症マウスにおける腸管 (大腸) 内酸素濃度を内視鏡を用いて直接的に、免疫染色を用いて間接的に測定する。

(2) GVHD 腸上皮細胞のエネルギー・代謝変化の検討: 細胞外フラックスアナライザーを用いて腸管上皮細胞細胞のエネルギー代謝・呼吸能を測定する。また、メタボローム解析を用いて特異的な代謝物及び代謝異常の原因を同定する。

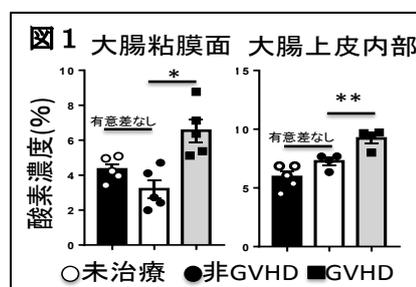
(3) ミトコンドリアの形態学的量的検討: 代謝異常の原因となるミトコンドリアの特定部位の質的・量的変化を免疫染色を用いて検討する。また、形態学的変化を電子顕微鏡を用いて明らかにし腸管 GVHD との相関性を検討する。

(4) 薬理的ミトコンドリア阻害及び遺伝学的ミトコンドリア代謝異常モデルを用いた腸管 GVHD に与える影響の評価: ミトコンドリア傷害部位を増悪させる薬剤である itaconate や Malonate を用いて薬理的にミトコンドリア障害を誘導した場合における腸管 GVHD への影響を確認する。また、腸管上皮特異的ミトコンドリア代謝異常マウスを Villn-Cre-flox システムを確立し腸管 GVHD への影響を確認する。

(5) ミトコンドリア傷害発症機序の検討: 既報からは腸管幹細胞の障害は TNF- α や IFN γ によるサイトカインの影響と細胞障害性 T 細胞による直接的な原因が報告されている。腸上皮細胞、特にミトコンドリア障害に関しては細胞障害性 T 細胞による Perforin/Granzyme が関与しているとされている (Nat Med 2016)。これより、腸上皮細胞をサイトカイン及び Perforin/Granzyme と培養しミトコンドリアの変化を確認する。また、Transwell assay を用いて T 細胞との細胞接着がミトコンドリア傷害に与える影響を確認する。

4. 研究成果

(1) GVHD が与えるマウス腸管酸素濃度の検討: 大腸内視鏡下酸素測定器を用いて測定した酸素濃度は GVHD マウスでは粘膜面及び上皮内部ともに上昇 (図 1) を認めており、低酸素組織特異的免疫染色でも GVHD マウスの腸上皮細胞における酸素レベルが上昇していた。



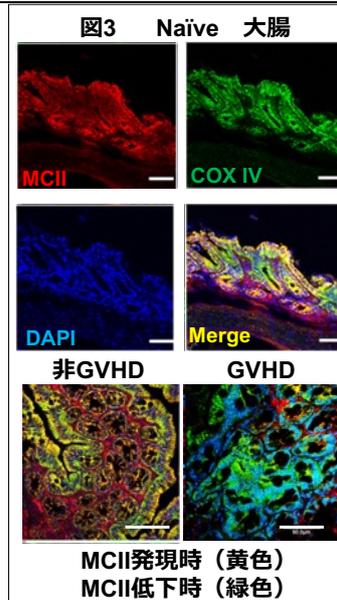
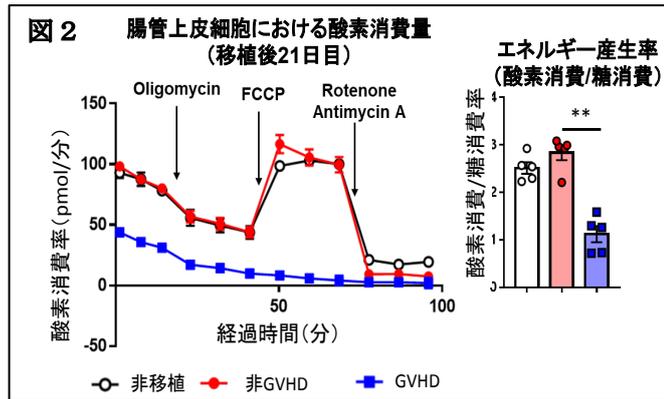
(2) GVHD 腸上皮細胞のエネルギー・代謝変化の検討：細胞における酸素代謝の中心であるミトコンドリアの代謝・呼吸能を測定するため、GVHD マウスから単離した腸管上皮細胞を細胞外フラックスアナライザーにより酸素消費量及び細胞外酸化速度を測定したところ、腸上皮細胞の酸素消費量（ミトコンドリア機能）が低下していた（図2）。これらの結果より、細胞内において主に酸素を消費するミトコンドリアの障害が考えられた。次に、

GVHD 発症したマウスから単離した腸管上皮細胞・小腸・腎臓を用いて、TCA回路を中心としたミトコンドリア関連メタボローム解析を行った。GVHD 群では腸管上皮細胞・小腸において TCA回路特異的代謝物として Succinate の増加と Citrate・Malate の低下を認め、Succinate→Malate→Citrate への反応が低下していることが判明した。GVHD を発症しない腎臓ではこれら代謝物の変化は認められず GVHD 特異的な反応であることが確認された。

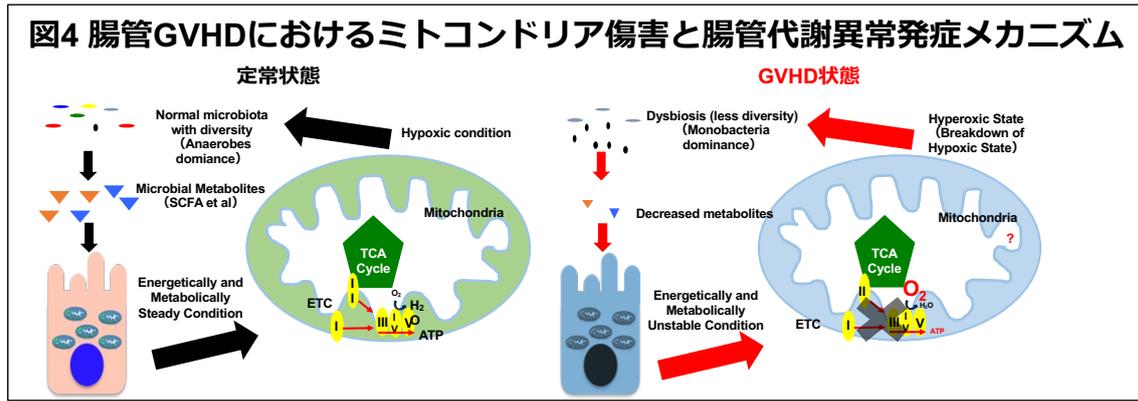
(3) ミトコンドリアの形態学的量的検討：Succinate→Malate の反応を調節する酵素はミトコンドリア電子伝達系複合体 II である Succinate Dehydrogenase (MCII) であり、この異常がミトコンドリア傷害の原因として考えられたため、GVHD が発生する腸管のみならず皮膚・肝臓、非 GVHD 標的組織である腎臓及び心筋細胞を対照に用いて蛍光免疫染色を行った。GVHD 発症腸管のみ MCII 蛋白の発現低下が認められ、その他部位では MCII 蛋白量は対照群と著変を認めなかった（図3）。次に MCII 蛋白の低下がミトコンドリア形態に与える影響を電子顕微鏡を用いて検討した。GVHD 発症腸管上皮細胞においてはミトコンドリアのクリステの粗雑・膨化が認められ MCII 蛋白低下がミトコンドリア形態にも強く影響を与えていることが確認できた。その他ミトコンドリア電子伝達複合体に関しては機能・タンパク量ともに GVHD の有無で相違は確認できなかった。

(4) 薬理的ミトコンドリア障害及び遺伝学的ミトコンドリア代謝異常モデルを用いた腸管 GVHD に与える影響の評価：腸上皮細胞 MCII の障害が GVHD の発症及び増悪に重要であることを生体内で明らかにするために、薬理的に MCII 抑制作用をもつ Itaconate 及び Malonate を用いて GVHD 実験及び腸管上皮細胞のミトコンドリア機能評価実験を行った。Itaconate、Malonate 投与マウスは Vehicle 投与マウスと比較して臨床的 GVHD スコア、腸管病理学的 GVHD スコアの両者が上昇し重症化が認められた。薬理的ミトコンドリア障害は off target 効果が考えられるため、腸管上皮細胞特異的 MCII 欠損マウスを作成した。C57BL/6 バックグラウンドの Villn-Cre マウスと C57BL/6 バックグラウンド Sdha-flox マウスの交配を重ねて制作した。この腸管特異的 MCII 欠損マウスをレシピエントに造血細胞移植を行ったところ、野生型マウスと比較して腸管特異的 MCII 欠損マウスでは臨床的 GVHD スコア、腸管病理学的 GVHD スコアの両者が上昇し重症化を認めた。これらの結果から腸管における MCII は同種免疫反応に対する保護的組織恒常性維持効果を有していることが確認できた。

(5) ミトコンドリア傷害発症機序の検討：MCII による腸管組織恒常性維持効果を明らかにするため、単離腸管上皮細胞を Malonate との培養を行ったのち同種反応 T 細胞と共培養を行い細胞傷害性を確認したところ Malonate との培養群で腸管上皮の傷害が高まった。さらに、GVHD の有無別に単離した腸管上皮細胞における ATP 産性能を測定したところ、GVHD マウス由来腸管上皮細胞では非 GVHD マウス由来腸管上皮細胞と比較して ATP 産生の著大な低下を認めた。これは、Malonate 投与 Naïve マウス由来腸管上皮細胞と同レベルの低 ATP 産生レベルであった。既報からは腸管幹細胞の障害は TNF- α や IFN γ によるサイトカインの影響と細胞障害性 T 細胞による直接的な原因が報告されている。腸上皮細胞、特にミトコンドリア傷害に関しては細胞障害性 T 細胞による Perforin/Granzyme が関与しているとされている (Nat Med 2016)。これより、Transwell assay を用いて T 細胞由来サイトカインによるミトコンドリア傷害と細胞接着由来 Perforin/Granzyme によるミトコンドリア傷害のいずれが MCII 傷害の発症原因となりうるかを検討した。コントロール群、サイトカイン群、細胞接着群を比較したところ細胞接着群で腸管上皮細胞における MCII タンパク量の低下を認め、Perforin/Granzyme を介する経路と思われる MCII 傷害が同種造血細胞移植後腸管 GVHD のメカニズムであると結論付けた。これらの結果から腸管 GVHD の病態生理としてミトコンドリア傷害によるエネルギー不足による homeostasis の消失が GVHD による組織障害の原因であること、酸素利用障害に伴う腸管内酸素濃度上昇が腸内細菌叢



の乱れの原因であることを明らかにした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto Akira, Kambara Yui, Fujiwara Hideaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Impact of oral microbiota on pathophysiology of GVHD	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1132983-1132983
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1132983	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Seike Keisuke, Kiledal Anders, Fujiwara Hideaki, Henig Israel, Burgos da Silva Marina, van den Brink Marcel R.M., Hein Robert, Hoostal Matthew, Liu Chen, Oravec-Wilson Katherine, Lauder Emma, Li Lu, Sun Yaping, Schmidt Thomas M., Shah Yatrik M., Jenq Robert R., Dick Gregory, Reddy Pavan	4. 巻 56
2. 論文標題 Ambient oxygen levels regulate intestinal dysbiosis and GVHD severity after allogeneic stem cell transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 353 ~ 368.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.immuni.2023.01.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamasuji-Maeda Yoshiko, Nishimori Hisakazu, Seike Keisuke, Yamamoto Akira, Fujiwara Hideaki, Kuroi Taiga, Saeki Kyosuke, Fujinaga Haruko, Okamoto Sachiyo, Matsuoka Ken-ichi, Fujii Nobuharu, Tanaka Takehiro, Fujii Masahiro, Mominoki Katsumi, Kanekura Takuro, Maeda Yoshinobu	4. 巻 17
2. 論文標題 Prevention of non-infectious pulmonary complications after intra-bone marrow stem cell transplantation in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0273749 ~ 0273749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0273749	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujiwara Hideaki	4. 巻 63
2. 論文標題 Recent advances in the understanding of the pathophysiology of graft-versus-host disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 423-432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.63.423.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Hideaki	4. 巻 63
2. 論文標題 Gut microbiome, metabolites, and tissue metabolism in graft-versus-host disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rinsho Ketsueki	6. 最初と最後の頁 286-293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.63.286.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Hideaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Crosstalk Between Intestinal Microbiota Derived Metabolites and Tissues in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 e703298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.703298	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujiwara Hideaki, Seike Keisuke, Reddy Pavan, et al.	4. 巻 22
2. 論文標題 Mitochondrial complex II in intestinal epithelial cells regulates T cell-mediated immunopathology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1440 ~ 1451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-01048-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 藤原 英晃
2. 発表標題 腸管GVHDに対する組織抵抗性、回復力、寛容性を考える
3. 学会等名 第44回日本造血・免疫細胞療法学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神原 由依
2. 発表標題 歯周病モデルマウスを用いた口腔内細菌叢が慢性GVHDに及ぼす影響とその治療による移植予後改善の検証
3. 学会等名 第45回日本造血・免疫細胞療法学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kambara Yui
2. 発表標題 Influence of Oral Microbiota on Chronic Graft-Versus-Host Disease and Its Role As a Therapeutic Target
3. 学会等名 64th ASH Annunal Meeting & Exposition
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原英晃
2. 発表標題 組織代謝・恒常性と腸管GVHD
3. 学会等名 第43回日本造血・免疫細胞療法学会総会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原英晃
2. 発表標題 Gut microbiome, metabolites and tissue metabolism in GVHD
3. 学会等名 83rd Annual Meeting of Japanese Society of Hematology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	藤井 伸治 (Fujii Nobuharu) (60362977)	岡山大学・大学病院・准教授 (15301)	
研究 分担者	前田 嘉信 (Maeda Yoshinobu) (60403474)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究 分担者	西森 久和 (Nishimori Hisakazu) (70756064)	岡山大学・大学病院・客員研究員 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------