

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：87105

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20885

研究課題名（和文）急性移植片対宿主病における腸管上皮細胞再生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of regeneration of intestinal epithelium during graft-versus-host disease

研究代表者

高嶋 秀一郎（Shuichiro, Takashima）

独立行政法人国立病院機構九州医療センター（臨床研究センター）・その他部局等・血液内科医師

研究者番号：70622116

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞移植後のマウス陰窩上皮細胞のシングルセル解析の結果に基づき、我々はインターフェロンガンマ（IFNg）が移植片対宿主病（GVHD）発症時に腸幹細胞でMycの発現を亢進させ、腸管上皮細胞を増殖させるという仮説を立て検証した。腸管オルガノイドを用いてヒトでもIFNgがMYC遺伝子の発現亢進を伴って腸管上皮細胞を増殖させることを明らかにした。マウス腸管陰窩におけるMycの蛋白発現はGVHDを発症しない同系移植後より同種移植後に亢進していた。最後にGVHDマウスへのMyc阻害剤の投与はGVHD病理スコアと腸幹細胞分画の障害を増悪させ、Mycの発現亢進の腸管GVHD軽減への寄与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では腸管上皮細胞のシングルセルRNAシーケンス解析の結果に基づいて腸管上皮細胞の免疫学的な再生メカニズムを明らかにした。腸管GVHDのように免疫学的な機序で障害がおこる病態で炎症サイトカインがどのように腸管上皮の再生にかかわっているかは解明されておらず、本研究の成果は複雑なGVHD病態への理解を深めるものである。さらに近年、GVHD治療に炎症性サイトカインのシグナルを遮断する薬剤が登場しつつある状況を考えると本研究成果は将来的なGVHD治療開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this project, based on the results of preliminary single cell RNA sequencing of mouse crypt epithelial cells from bone marrow transplantation (BMT) recipients, we hypothesized that interferon-gamma (IFNg) drives proliferation of intestinal epithelium through Myc expression in intestinal stem cells (ISCs) during graft-versus-host disease (GVHD). We found that IFNg stimulates proliferation of intestinal epithelium also in human in association with MYC upregulation using an intestinal organoid system. We next performed immunofluorescent staining of Myc protein after BMT. Ileal crypts from recipients of allogeneic BMT demonstrated greater Myc expression than crypts from non-GVHD syngeneic BMT recipients. Finally, treatment with the Myc inhibitor reduced both GVHD pathology scores and crypt loss, which is a marker of the ISC compartment injury, in allogeneic BMT recipients. These findings suggested Myc upregulation in the intestinal crypts may contribute to reduction of gut GVHD.

研究分野：血液学

キーワード：GVHD 同種造血幹細胞移植 腸管オルガノイド IFN-gamma MYC

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) はドナーT細胞の免疫反応によって引き起こされる同種造血幹細胞移植の重大な合併症であり、その克服は移植成績の向上に必須である

(2) 申請者らはこれまでの研究で GVHD の主要標的臓器である腸管で腸幹細胞が GVHD の標的となること、インターフェロンガンマ (IFN $\gamma$ ) がドナーT細胞による腸幹細胞傷害のメカニズムであることを見出した。腸管 GVHD の病理は同時並行で進行する幹細胞を含む上皮細胞の傷害と再生に特徴づけられる。腸幹細胞と腸管上皮の再生が GVHD においてどのようなメカニズムで起こるのか、特に炎症性サイトカインがどのように関与しているかは明らかにならなかった。

(3) 近年、シングルセル RNA シークエンス解析を用いた画期的な発見が相次いでおり、腸管上皮細胞でも成果が複数報告されている。我々はこの手法を用いることで腸幹細胞がアポトーシスに至る過程だけでなく、その後の組織修復にかかわる反応や免疫制御タンパクの発現を介した GVHD 制御への関わりをシングルセルレベルで解析できると考えた。

(4) 我々は先行研究で造血幹細胞移植を実施したマウスから腸管陰窩 (クリプト) を取り出し、上皮細胞のシングルセルを作成し、シングルセル RNA シークエンスに供した。解析の結果、炎症性サイトカインである IFN $\gamma$  が腸幹細胞における Myc の発現を介して腸管上皮細胞の増殖、再生にかかわっている可能性が明らかになった。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究は腸管上皮細胞のシングルセル RNA シークエンス解析の結果に基づいて、炎症性サイトカインである IFN $\gamma$  が直接上皮細胞の増殖・再生に関与しているという仮説の検証を目的とする。より具体的な目的として以下の(2)、(3)を設定した。

(2) マウス実験で示唆された IFN $\gamma$  による腸管上皮細胞の増殖効果について腸管オルガノイドシステムを用いてヒトでも検証する。

(3) マウス移植モデルを用いて GVHD 発症時の腸管における Myc の発現とその機能的な役割を検証する。

### 3. 研究の方法

上記の目的(2)と(3)を達成するために下記の方法で研究を進めた。

(1) ヒト腸管オルガノイドを用いた検証:

上部消化管内視鏡検査で得られた十二指腸粘膜の生検検体のうち、結果的に正常粘膜であったものからクリプトを単離してマトリゲル上にヒトオルガノイドを作成して (Linedmans CA, *Nature* 2015) ヒト IFN $\gamma$  を様々な濃度に加え、上皮細胞の増殖に与える効果を検証した。さらに real-time PCR でヒト IFN $\gamma$  を加えたときの MYC 遺伝子、ならびのその関連遺伝子の発現を検証した。

(2) マウスモデルを用いた検証:

全身放射線照射 (TBI) で前処置を施したマウスに骨髓細胞と T 細胞を移植して GVHD を発症させるマウスモデルを用いて GVHD 発症時の腸幹細胞における Myc 発現を蛋白レベルで免疫蛍光染色を用いて検証した。また GVHD を発症したマウスに選択的 Myc 阻害剤である 10058-F4 を全身投与し、腸管 GVHD における腸幹細胞分画に対する障害や組織全体に対する障害を腸管クリプトの減少や腸管 GVHD 病理スコアを用いて検証した。

### 4. 研究成果

上記の研究方法(1)と(2)に対応して下記の研究成果が得られた。

(1) 腸管上皮細胞を人工的に培養した腸管オルガノイドに低用量の IFN $\gamma$  を加えたところ、何も加えないコントロールと比較して有意に個々のオルガノイドのサイズが増大し、IFN $\gamma$  による上皮細胞の増殖促進効果が示された (図 1A)。我々は以前に高用量の IFN $\gamma$  は腸管上皮細胞に傷害活性を持ち、腸幹細胞のアポトーシス誘導を介してオルガノイドの発育抑制をもたらすことを報告した。興味深いことに低用量の IFN $\gamma$  を加えた場合、生存オルガノイドの数もわずかながら

増加しており、低用量の IFN $\gamma$  による増殖刺激効果は高用量の傷害活性とは別のメカニズムによることが示唆された (図 1B)。そのメカニズムを探索するため IFN $\gamma$  を加えたヒト腸管オルガノイドの遺伝子発現を real time PCR 法で評価した。MYC 遺伝子の発現が早期に亢進することが示され、さらに腸幹細胞の細胞周期の制御に重要で MYC の標的遺伝子でもある CCND1 の発現亢進も同時にみられた (図 1C)。この結果からヒトの腸管上皮でも IFN $\gamma$  による腸管上皮の増殖に IFN $\gamma$  MYC CCND1 の経路が関与していることが示唆された。将来的な課題としてヒト腸管オルガノイドにおける IFN $\gamma$  による MYC 発現亢進の機能的役割を検証する。具体的には IFN $\gamma$  を加えたヒト腸管オルガノイドの培養にさらに選択的 MYC 阻害剤を加え、IFN $\gamma$  による増殖活性に与える効果を評価する。

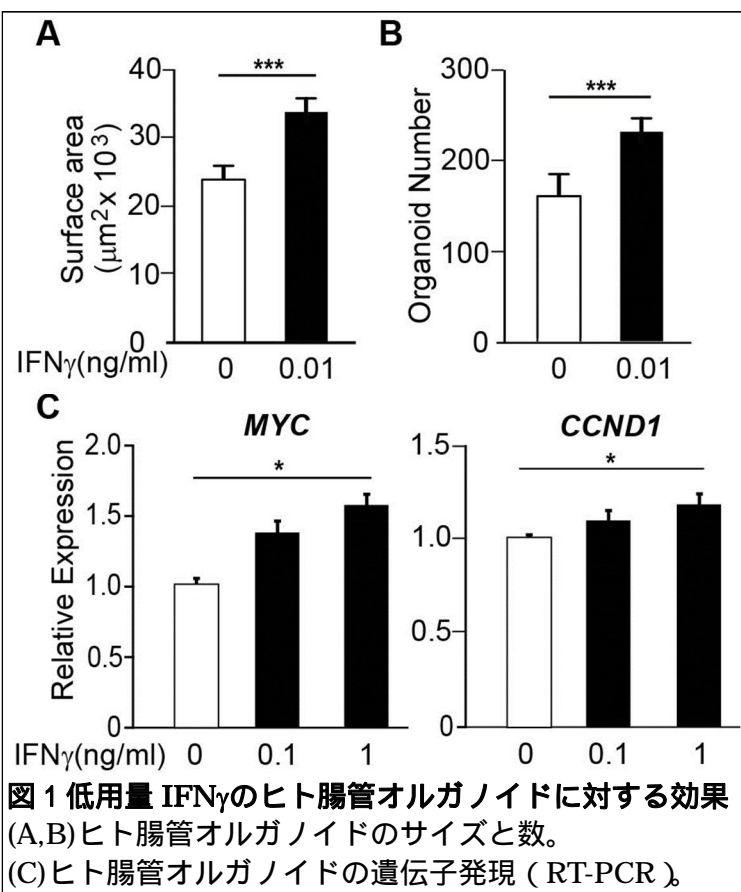


図 1 低用量 IFN $\gamma$  のヒト腸管オルガノイドに対する効果 (A,B) ヒト腸管オルガノイドのサイズと数。 (C) ヒト腸管オルガノイドの遺伝子発現 (RT-PCR)。

(2) GVHD を発症したマウスから小腸組織を取り出し、Myc 遺伝子がコードする c-Myc タンパクの免疫蛍光染色を行ったところ、何の処置もしていない Naive マウスや GVHD を発症しない同系移植後のマウスと比較して c-Myc の発現向上が上皮細胞の増殖が盛んな陰窩領域に認められた。これは同種移植後の腸管上皮細胞の増殖亢進と一致して c-Myc 遺伝子の発現向上が見られることを示し、これらの関連性が示唆された (図 2)。

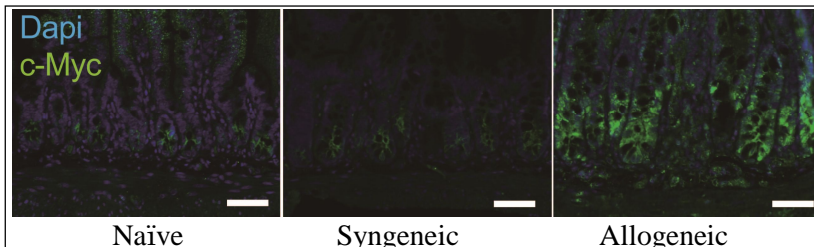


図 2 骨髄移植後の腸管上皮の c-Myc 免疫蛍光染色 (回腸) 同種移植後のクリプト領域において明らかな c-Myc 陽性細胞の増加を認める。スケールバー：100 $\mu\text{m}$ 。

さらに、GVHD マウスに選択的 Myc 阻害剤である 10058-F4 の全身投与を行って腸管 GVHD に対するその効果を検証した。本報告時点までの解析で 10058-F4 の投与が腸管 GVHD の障害程度の指標の一つである腸管クリプトの減少や腸管 GVHD の病理スコアを有意に増悪させる結果が得られている (図 3)。この結果は Myc 遺伝子を介した腸管上皮の増殖・再生が腸管 GVHD の改善に寄与している可能性を示すものである。現在、GVHD 発症マウスに対する選択的 MYC 阻害剤の投与が GVHD 生存率に与える影響を検証中である。

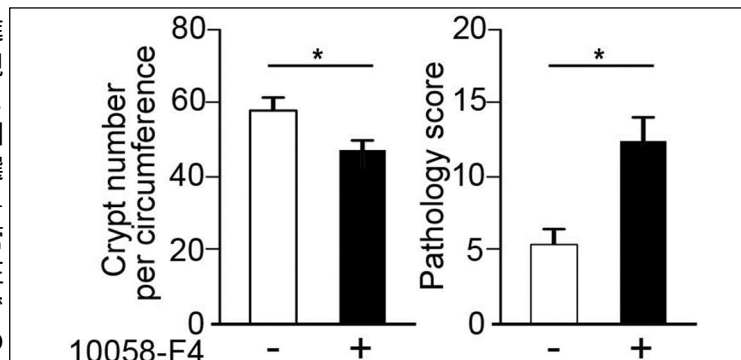


図 3 同種骨髄移植マウスへの選択的 Myc 阻害剤の投与同種移植を実施したマウスに選択的 Myc 阻害剤ないしコントロールを投与した時の小腸断面あたりのクリプトの数と GVHD 病理スコアを示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jinnouchi Fumiaki, Mori Yasuo, Yoshimoto Goichi, Yamauchi Takuji, Nunomura Takuya, Yurino Ayano, Hayashi Masayasu, Yuda Junichiro, Shima Takahiro, Odawara Jun, Takashima Shuichiro, Kamezaki Kenjiro, Kato Koji, Miyamoto Toshihiro, Akashi Koichi, Takenaka Katsuto	4. 巻 115
2. 論文標題 Incidence of refractory cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 96～106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-021-03218-3	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 Sugio Takeshi, Baba Shingo, Mori Yasuo, Yoshimoto Goichi, Kamesaki Kenjiro, Takashima Shuichiro, Urata Shingo, Shima Takahiro, Miyawaki Kohta, Kikushige Yoshikane, Kunisaki Yuya, Numata Akihiko, Takenaka Katsuto, Iwasaki Hiromi, Miyamoto Toshihiro, Ishigami Kousei, Akashi Koichi, Kato Koji	4. 巻 116
2. 論文標題 Prognostic value of pre-transplantation total metabolic tumor volume on 18fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography/computed tomography in relapsed and refractory aggressive lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 603～611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-022-03394-w	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shuichiro Takashima, Roshan Sharma, Anastasiya Egorova, Jason Kuttiyara, Takahiro Ito, Winston Chang, Suze A Jansen, Chen Liu, Caroline Lindemans, Linas Mazutis, Nicolas Robine and Alan M Hanash
2. 発表標題 Immune-Mediated Reprogramming of Intestinal Stem Cells Drives STAT1-Dependent Myc Expression and Epithelial Regeneration in GI-Gvhd
3. 学会等名 63rd ASH Annual Meeting and Exposition（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Viktor Arnhold, Suze A Jansen, Winston Chang, Govindarajan Thangavelu, Paola Vinci, Shuichiro Takashima, Anastasiya Egorova, Jason Kuttiyara, Marliek van Hoesel, Chen Liu, Marco Calafiore, Bruce R. Blazar, Caroline Lindemans and Alan M Hanash
2. 発表標題 Corticosteroid Treatment Impairs Epithelial Regeneration, Limiting Intestinal Recovery in Experimental Graft Vs Host Disease
3. 学会等名 63rd ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuichiro. Takashima, Roshan Sharma, Suze A. Jansen, Takahiro Ito, Winston Chang, Anastasiya Egorova, Jason Kuttiyara, Ya-Yuan Fu, Hiromi Iwasaki, Chen Liu, Nicolas Robine, Linas Mazutis, Caroline A. Lindemans, and Alan M. Hanash
2. 発表標題 T細胞はインターフェロンガンマと腸幹細胞のSTAT1を介して上皮再生を促進する
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Ito, Shuichiro Takashima, Marco Calafiore, Ya-Yuan Fu, Anastasiya Egorova, Jason Kuttiyara, Winston Chang, Paola Vinci, Viktor Arnhold, Dietmar Zaiss, Alan M. Hanash
2. 発表標題 Donor-Derived Amphiregulin Drives CD4+ T Cell Expansion and Promotes Tissue Pathology after Experimental Allogeneic BMT
3. 学会等名 64th ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------