

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21610

研究課題名（和文）R-Spondinによる肝幹細胞を標的とした造血幹細胞移植後肝傷害の治療開発

研究課題名（英文）Title of Research Project

研究代表者

豊嶋 崇徳（Teshima, Takanori）

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：40284096

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：同種造血幹細胞移植後の重大な合併症である移植片対宿主病（GVHD）において肝幹細胞の動態を研究した。Lgr5-eGFP-レポーターマウスの移植後の肝臓の胆管上皮オーガノイド数は有意に減少していた。移植後肝組織でTGF-betaの発現亢進がみられ、TGF-betaの添加でオーガノイド生成が抑制された。TGFはマクロファージによって産生された。TGF-beta阻害薬SB-431542はTGFによるオーガノイド形成抑制を解除した。移植後のSB-431542の投与によってオーガノイド形成能が有意に改善した。TGF-betaが移植後のGVHDにおける胆管上皮幹細胞傷害のメカニズムであると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同種造血幹細胞移植の組織傷害はドナーT細胞が組織幹細胞を標的とすることによる組織恒常性、修復、細菌叢などの破綻によるものであることを我々は、腸、皮膚で明らかにしてきた。残るのは肝臓GVHDであったが、ここでも同様に胆管上皮幹細胞が標的となることを世界で最初に明らかにすることができた。さらにマクロファージ由来のTGF-betaがその原因であることを明らかにできたことで、将来的な新たな治療開発への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated fate of liver stem cells in liver GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-SCT). After allo-SCT, donor T cells and macrophages infiltrated in the portal area of the liver with apoptosis of the adjunct bile duct epithelial cells. Using Lgr5-eGFP-reporter mice, Lgr5+ cells isolated from the liver after allo-SCT were cultured to generate liver organoids. Number of the organoids was significantly decreased after allo-SCT. PCR analysis showed an upregulated expression of IFN-gamma, TGF, and TNF in the liver. Addition of TGF-beta suppressed the organoid formation in culture. Addition of TGF-beta inhibitor SB-431552 abrogated inhibitory effect of TGF-beta on the organoid formation. Administration of SB-431552 to mice after allo-SCT restored the organoid formation. These results indicated that macrophage-derived TGF-beta damage liver stem cells in GVHD.

研究分野：血液内科学・造血細胞移植

キーワード：GVHD TGF-beta 肝幹細胞 オーガノイド

### 1. 研究開始当初の背景

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造血・免疫不全症の根治的治療である。一方、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) は同種造血幹細胞移植後の重大な免疫学的合併症で、皮膚、腸管、肝臓が3大標的臓器である。そのうち肝 GVHD は最も難治であり、有効な治療法の開発が喫緊の課題である。我々は腸・皮膚 GVHD の本質が幹細胞ダメージに伴う組織のホメオスタシスの破綻であることを世界に先駆けて証明した (Takashima: JEM 2011, Hayase: JEM 2017, Takahashi: Blood 2018)。しかし肝 GVHD における組織幹細胞の動態についてはいまだ明らかになっていなかった。肝 GVHD に対する有効な治療法は乏しく、そのメカニズムの解明は喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

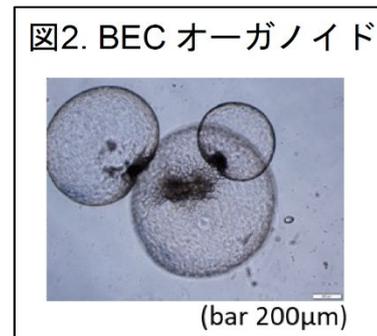
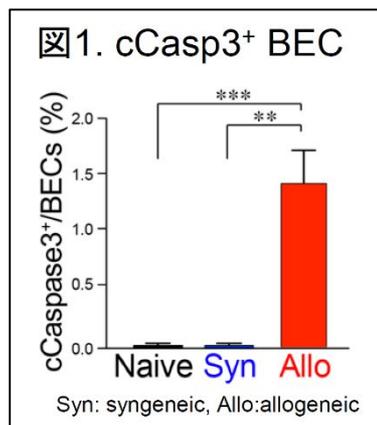
本研究において肝 GVHD における肝幹細胞傷害とそのメカニズムを、新たな視点である組織側から捉えなおして解明し、肝幹細胞を標的とした新たな治療法を開発する。

### 3. 研究の方法

(1) 肝幹細胞の評価システムの確立: Lgr5+肝幹細胞を可視化する Lgr5 レポーターマウスを用いたマウス同種造血幹細胞移植系を確立する。  
(2) 肝 GVHD の評価: 上記モデルにおいて、移植後経時的に血清ビリルビン値、肝病理組織検査、フローサイトメトリーによるドナー細胞の浸潤を解析する。  
(3) GVHD における胆管上皮幹細胞 (Biliary epithelial cell [BEC] stem cell) の動態解析: 移植後経時的に肝右葉組織から collagenase と dispase 処理後サイズフィルターにより胆管細胞を単離する。これを必須9因子存在下に培養し、オーガノイドを作製する。形成されたオーガノイドの数とサイズを GVHD における BEC stem cell ダメージの指標とする。肝幹細胞ダメージとドナーT細胞、ドナーマクロファージ浸潤、肝 GVHD 重症度との相関性を検討する。  
(4) GVHD における BEC stem cell ダメージのメカニズム解析: 肝組織におけるサイトカイン、ケモカインなどの発現を PCR 法で検討する。次いで発現亢進がみられた候補分子については、産生細胞を同定する。候補分子をオーガノイド培養系に添加し、オーガノイド形成に対する影響を確認する。最終的に候補分子に対する阻害分子を探索し、in vitro および in vivo における肝幹細胞に対する効果を確認する。

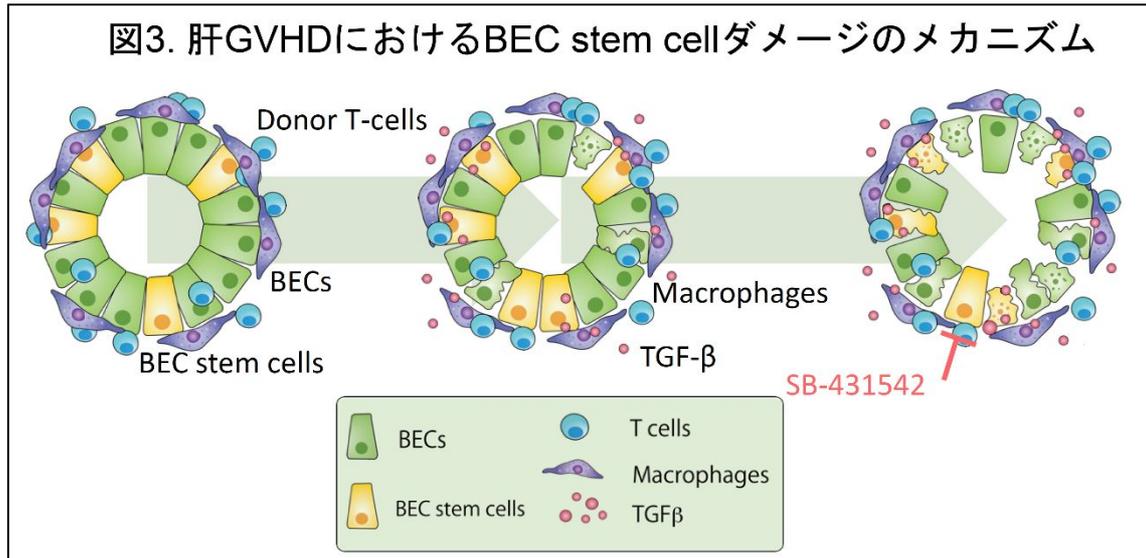
### 4. 研究成果

(1) 肝幹細胞の評価システムの確立: B6D2F1 バックグラウンドの Lgr5-eGFP レポーターマウスを交配を重ねて作製した。MHC 不適合移植モデル (B6 ドナー、B6D2F1 レシピエント) に Lgr5-eGFP-B6D2F1 マウスを用いたマウス同種造血幹細胞移植モデルを確立し、以下の研究に用いた。  
(2) 肝 GVHD の評価: 移植後経時的に肝 GVHD の臨床的マーカーである血清ビリルビン値を測定したところ、移植後 28 日目に上昇のピークを認めた。また、肝臓の移植片対宿主病 (graft versus host disease: GVHD) を病理学的に検討した。同種造血幹細胞移植後 14 日目より門脈域への単核球浸潤を伴う胆管上皮細胞のアポトーシスといった典型的な satellitosis を伴う GVHD 病理像がみられ、28 日目に最大変化がみられ、以後プラトーとなった。28 日目の組織で、胆管上皮細胞障害のバイオマーカーである matrix metalloproteinase 7 (MMP7) と cCaspase 3 の発現亢進がみられ (図 1)、血清ビリルビンの上昇と一致していた。一方、同種移植後にみられた上記の様々な変化はコントロールである同系移植後にはみられず、GVHD に伴う変化であることが確認できた。  
(3) GVHD における肝幹細胞の動態解析: 胆管上皮幹細胞が肝 GVHD の好発部位である門脈域胆管周囲に出現し、GVHD による肝障害に対する反応と考えられた。次に肝臓から分離した胆管分画を培養し胆管上皮オーガノイド作製に成功した (図 2)。同種移植後 14 日目、28 日目の肝臓由来のオーガノイドは同系移植後と比較し、有意に減少していた。このことから胆管上皮幹細胞が GVHD の標的となることを世界で初めて証明できた。  
(4) GVHD における肝幹細胞ダメージのメカニズム解析: 肝組織でのサイトカイン発現を PCR 法で検討したところ、interferon (IFN)-gamma, tumor necrosis factor (TNF)、transforming growth factor (TGF)-beta mRNA の有意な発現



亢進がみられた。この3つのサイトカインのうち、TGF-beta のみが培養系への添加によってオーガノイド形成を有意に抑制したため、胆 BEC stem cell 障害に関わっているものと考えられた。肝臓における TGF-beta 産生細胞として、肝臓に浸潤したドナー由来活性化マクロファージが同定できた。一方、ホスト由来 Kupffer 細胞からの産生は見られなかった。TGF-beta 阻害薬である SB-431542 を TGF-beta 存在下の胆管上皮オーガノイド培養系に添加したところ、TGF-beta によるオーガノイド形成抑制が解除された。次に SB-431542 を移植後 14 日目からマウスに連日腹腔内投与したところ、肝臓から分離したオーガノイド形成能が有意に改善した。以上の結果からドナー T 細胞の肝浸潤によって肝臓にルクルートされたドナーマクロファージから産生される TGF-beta が、同種造血幹細胞移植後の GVHD における胆管上皮幹細胞傷害のメカニズムであると結論付けた (図 3)。

図3. 肝GVHDにおけるBEC stem cellダメージのメカニズム



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhang Zixuan, Hasegawa Yuta, Hashimoto Daigo, Senjo Hajime, Kikuchi Ryo, Chen Xuanzhong, Yoneda Kazuki, Sekiguchi Tomoko, Kawase Tatsuya, Tsuzuki Hirofumi, Ishio Takashi, Ara Takahide, Ohigashi Hiroyuki, Nakagawa Masao, Teshima Takanori	4. 巻 57
2. 論文標題 Gilteritinib enhances graft-versus-leukemia effects against FLT3-ITD mutant leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 775 ~ 780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-022-01619-4	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 Nakamura Shunta, Nakamura Kiminori, Yokoi Yuki, Shimizu Yu, Ohira Shuya, Hagiwara Mizu, Song Zihao, Gan Li, Aizawa Tomoyasu, Hashimoto Daigo, Teshima Takanori, Ouellette Andre J., Ayabe Tokiyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Decreased Paneth cell -defensins promote fibrosis in a choline-deficient L-amino acid-defined high-fat diet-induced mouse model of nonalcoholic steatohepatitis via disrupting intestinal microbiota	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-30997-y	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 Chen Xuanzhong, Hashimoto Daigo, Ebata Ko, Takahashi Shuichiro, Shimizu Yu, Shinozaki Ryuga, Hasegawa Yuta, Kikuchi Ryo, Senjo Hajime, Yoneda Kazuki, Zhang Zixuan, Harada Shinpei, Hayase Eiko, Ara Takahide, Ohigashi Hiroyuki, Iwakura Yoichiro, Nakamura Kiminori, Ayabe Tokiyoshi, Teshima Takanori	4. 巻 119
2. 論文標題 Reactive granulopoiesis depends on T-cell production of IL-17A and neutropenia-associated alteration of gut microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2211230119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2211230119	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 Dertschnig Simone, Gergely Peter, Finke Jurgen, Schanz Urs, Holler Ernst, Holtick Udo, Socie Gerard, Medinger Michael, Passweg Jakob, Teshima Takanori, Stylianou Christos, Oehen Stephan, Heim Dominik, Bucher Christoph	4. 巻 29
2. 論文標題 Mocravimod, a Selective Sphingosine-1-Phosphate Receptor Modulator, in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Malignancy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transplantation and Cellular Therapy	6. 最初と最後の頁 41.e1 ~ 41.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtct.2022.10.029	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 Teshima T, Hill GR	4. 巻 12
2. 論文標題 The Pathophysiology and Treatment of Graft-Versus-Host Disease: Lessons Learnt From Animal Models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 715424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.715424	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 該当する

1. 著者名 Chakraverty R, Teshima T	4. 巻 138
2. 論文標題 Graft-versus-host disease: a disorder of tissue regeneration and repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1657-1665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021011867	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 Zeiser R, Teshima T	4. 巻 138
2. 論文標題 Nonclassical manifestations of acute GVHD	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2165-2172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021012431	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 Ara Takahide, Hashimoto Daigo, Hayase Eiko, Noizat Clara, Kikuchi Ryo, Hasegawa Yuta, Matsuda Kana, Ono Shoko, Matsuno Yoshihiro, Ebata Ko, Ogasawara Reiki, Takahashi Shuichiro, Ohigashi Hiroyuki, Yokoyama Emi, Matsuo Keitaro, Sugita Junichi, Onozawa Masahiro, Okumura Ryu, Takeda Kiyoshi, Teshima Takanori	4. 巻 12
2. 論文標題 Intestinal goblet cells protect against GVHD after allogeneic stem cell transplantation via Lypd8	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 eaaw0720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aaw0720	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Yuta Hasegawa, Daigo Hashimoto, Ryo Kikuchi, Zixuan Zhang, Hajime Senjo, Tomoko Sekiguchi, Eiko Hayase, Takahiro Tateno, Emi Yokoyama, Shuichiro Takahashi, Xuanzhong Chen, Kazuki Yoneda, Hiroyuki Ohigashi, Takahide Ara, and Takanori Teshima
2. 発表標題 GVHD Targets Organoid-forming Biliary Epithelial Stem Cells via a TGF- $\beta$ -Dependent Manner
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会 (福岡, 10月15日): Plenary
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Teshima T
2. 発表標題 Novel insights in biology and treatment of acute GVHD
3. 学会等名 The 27th Congress of Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation. 2022年10月8日. Kochi, India (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Teshima T
2. 発表標題 Treatment for steroid-refractory chronic GVHD
3. 学会等名 The International Congress of BMT 2022. 2022年9月2日. Busan (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Teshima T
2. 発表標題 Tissue stem cell injury in graft vs host disease
3. 学会等名 Australia Centre for Blood Transplant and Cell Therapies Webinar Series . 2022年6月14日 . Web (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Teshima T
2. 発表標題 Tales from the intestinal crypt
3. 学会等名 Tandem Meetings 2022: Transplantation & Cellular Therapy Meetings of ASTCT and CIBMTR . 2022年4月23日 . Salt lake city (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Teshima T
2. 発表標題 Novel insights into biology and treatment of acute GVHD
3. 学会等名 The 3rd Annual Meeting of Indian Society for Blood & Marrow Transplantation . 2022年4月8日 . Web (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Teshima T
2. 発表標題 Novel approach in GVHD prophylaxis
3. 学会等名 26th Annual Meeting of Asian Pacific Blood and Marrow Transplantation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teshima T
2. 発表標題 Intestinal goblet cell and IL-25 in intestinal GVHD
3. 学会等名 International Congress of Bone Marrow Transplantation 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teshima T
2. 発表標題 Pathogenesis of GVHD -from bench to bedside-
3. 学会等名 中日血液専門家検討会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hasegawa Y, Zhang Z, Kikuchi R, Chen X, Yoneda Y, Senjo H, Sekiguchi T, Kawase T, Tsuzuki H, Ishio T, Ohigashi H, Nakagawa M, Hashimoto D, Teshima T
2. 発表標題 Gilteritinib Enhances Graft-Versus-Leukemia Effects Against FLT3-ITD+ Leukemia after Mouse Allogeneic HSCT
3. 学会等名 Transplantation & Cellular Therapy Meetings of ASBMT and CIBMTR 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 張紫, 長谷川祐太, 菊池遼, 陳炫仲, 米田和樹, 千丈創, 関口智子, 川瀬竜也, 續啓史, 石尾崇, 大東寛幸, 中川雅夫, 橋本大吾, 豊嶋崇徳
2. 発表標題 ギルテリチニブはマウスFLT3-ITD陽性白血病に対する移植片対白血病効果を促進する
3. 学会等名 第43回日本造血免疫細胞療法学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hasegawa Y, Hashimoto D, Kikuchi R, Zhang Z, Senjo H, Sekiguchi S, Eiko Hayase E, Tateno T, Yokoyama E, Takahashi S, Chen X, Yoneda K, Ohigashi H, Ara T, and Teshima T
2. 発表標題 GVHD targets organoid-forming Biliary Epithelial Stem Cells Via a TGF- $\beta$ -Dependent Manner
3. 学会等名 63rd American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takanori Teshima
2. 発表標題 Gut microbiome and its relevance to immunology of transplantation
3. 学会等名 The 25th Annual Congress of APBMT-2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒隆英、橋本大吾、早瀬英子、Clara Noizat、菊池遼、長谷川祐太、奥村龍、竹田潔、豊嶋崇徳
2. 発表標題 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予防する
3. 学会等名 第24回腸内細菌学会学術集会
4. 発表年 2020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	坂本 直哉  (Sakamoto Naoya)  (10334418)	北海道大学・医学研究院・教授    (10101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	富塚 一磨  (Tomizuka Kazuma)  (40444640)	東京薬科大学・生命科学部・教授    (32659)	

## 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			
米国	University of Southern California			
スイス	Zurich University	Novartis Institute, Biomedical Research	Piothera SAS	
ドイツ	Regensburg University	University of Cologne	University of Freiburg	
フランス	University of Paris			