

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08409

研究課題名（和文）肝臓オルガノイドを用いたGVHDにおけるマクロファージによる組織幹細胞障害の検討

研究課題名（英文）Liver organoid-based study of macrophage-induced injury of liver stem cells in GVHD

研究代表者

橋本 大吾（Hashimoto, Daigo）

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：20419576

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：同種造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病（graft-versus-host disease: GVHD）は、皮膚・腸管・肝臓を標的とし、致死的になるうる重要な合併症である。申請者はこれまで、GVHDが主に腸管や皮膚の組織幹細胞を標的とすることで組織修復が障害されていることを報告していたが、もうひとつのGVHDの主要な標的臓器の一つである肝臓においては、組織幹細胞の役割はこれまでわかっていなかった。本研究では、肝臓GVHDにおける、胆管上皮細胞の組織幹細胞の動態や役割を明らかにすることを旨とし、マウスの同種造血幹細胞移植モデルと肝臓オルガノイド培養系を用いて研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、肝臓GVHDで胆管上皮の組織幹細胞が傷害され、胆管機能の増悪につながることを、世界で初めて示した。さらに、胆管上皮の組織幹細胞が傷害されるメカニズムが、マクロファージから産生されるTGF-betaであることも明らかにし、TGF-betaの阻害剤を用いて、胆管上皮の組織幹細胞を保護できることを証明した。胆管上皮の組織幹細胞の機能を評価するために、肝臓の胆管からのオルガノイドの作成効率を指標に行った研究であり、これまでに例のない方法である。こうした知見によって、肝臓GVHDにおいて、TGF-betaを標的とする新規治療法の開発への道が開かれる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Acute graft-versus-host disease (GVHD) following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is a one of the major life-threatening complications targeting the skin, intestines, and liver. We have previously reported that GVHD primarily targets the tissue stem cells of the intestines and skin, impairing tissue repair, but the role of tissue stem cells in the liver, another major target organ of GVHD, was not previously understood. In this study, we aimed to clarify the fate and role of the tissue stem cells of the bile duct epithelial cells in liver GVHD, using a mouse model of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and a liver organoid culture system.

研究分野：血液学

キーワード：同種造血細胞移植 移植片対宿主病 GVHD 組織幹細胞 マクロファージ 肝臓オルガノイド オルガノイド

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: SCT) 後の急性移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) は、皮膚・腸管・肝臓を標的とし、致死的になるうる重要な合併症である。生体において、損傷した組織は、組織特異的な幹細胞からの再生によって修復されることが示されており、申請者はこれまで、GVHD が主に腸管や皮膚の組織幹細胞を標的とすることで組織修復が障害されていることを報告していた (Takashima S: JEM 2011, Takahashi S: Blood 2018)。もうひとつの GVHD の主要な標的臓器の一つである肝臓においては、GVHD で病理学的に、門脈単核球浸潤、胆管障害を認め、最終的に胆管が消失し胆管消失症候群を引き起こし、胆道上皮細胞 (biliary epithelial cell: BEC) の障害が病態の主座であることが知られている。しかし、肝臓 GVHD における胆管上皮の組織幹細胞や前駆細胞の運命や病態生理学的役割については、いまだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、同種造血幹細胞移植のマウスモデルを用いて、肝臓 GVHD における胆管上皮幹細胞 (bile duct stem cells: BDSCs) の動態を探り、BDSCs を標的とした新規治療戦略を開発することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 肝臓 GVHD の評価: 既に急性 GVHD モデルとして確立されている、マウスの同種造血幹細胞移植モデルを利用した。移植後経時的に血清ビリルビン値、肝臓病理組織検査、フローサイトメトリーによるドナー細胞の浸潤、蛍光免疫染色法による胆管上皮細胞傷害の解析を行った。

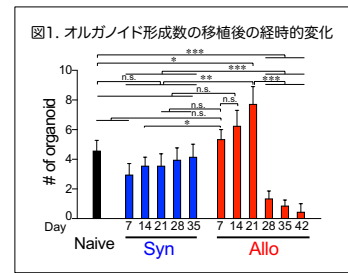
(2) GVHD における BDSCs の動態解析: 移植後のマウスの肝臓右葉から胆管を可能な限り収集し、胆管細胞を単離する。これを必須 9 因子存在下に培養し、オルガノイドを作製した。形成されたオルガノイドの数を GVHD における BDSCs ダメージの指標とし、本検討を移植後に経時的に行った。BDSCs ダメージとドナー T 細胞、ドナーマクロファージ浸潤、肝臓 GVHD 重症度との相関性を検討した。

(3) 肝臓 GVHD における BDSCs ダメージのメカニズム解析: BDSCs を傷害する候補分子として、移植後肝臓におけるサイトカインの発現を qPCR 法で検討した。次いで、発現亢進が認められた候補分子については、産生細胞を同定した。候補分子をオルガノイド培養系に添加し、オルガノイド形成に対する影響を確認した。最終的に候補分子に対する阻害分子を検索し、in vitro および in vivo における BDSCs に対する保護効果を確認する。

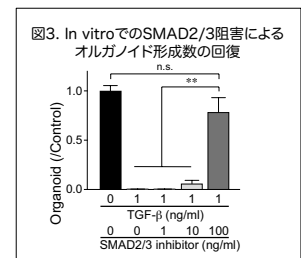
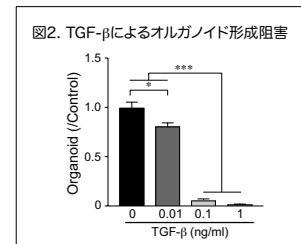
4. 研究成果

(1) 同種造血幹細胞移植後の肝臓細胞の動態: 本研究では主に腸管急性 GVHD のマウスモデルとして確立されている B6 マウスをドナー、B6D2F1 マウスをレシピエント (Allogeneic 群: Allo 群) とした MHC 半合致同種造血幹細胞移植モデルを使用した。コントロールとして GVHD の発症しない BDF1 マウスから BDF1 マウスへの Syngeneic (Syn) 群を用いて比較検討を行った。Syn 群と比較して、Allo 群では、移植後 7 日目以降より有意差を持って、GVHD score が高い値を示した。次に、このモデルにおける肝臓 GVHD の存在を確認するため、移植後、経時的に肝臓の組織標本を作成し、HE 染色にて組織学的検討を行い、ヒトと同様に門脈周囲を主体とした炎症性細胞浸潤像を呈しており、胆管障害が病態の主座であると考えられた。移植後 1 週間でほぼ全ての肝臓浸潤単核細胞 (liver-infiltrating mononuclear cells: LMCs) はドナー由来細胞に置き換わっており、フローサイトメトリーでは、ドナー T 細胞、単球および単球由来の炎症性マクロファージが移植後に肝臓に浸潤していることが確認された。次に、BEC 傷害を定量的に評価するために、アポトーシスのマーカーである cleaved caspase-3 (cCasp3) の蛍光免疫染色を施行し、移植後の BEC における cCasp3 の発現の検討を行った。その結果、移植後 28 日目において、cCasp3 を発現する胆管上皮は、Syn 群や Naïve 群と比較して Allo 群において有意に増加しており、肝臓 GVHD に伴い胆管上皮がアポトーシスに陥っていることが判明した。また Allo 群では、移植後 35 日目において Syn 群に比して CK19 陽性の BEC の面積比が減少しており、Allo 群において血漿ビリルビン値の有意な上昇を認めた。

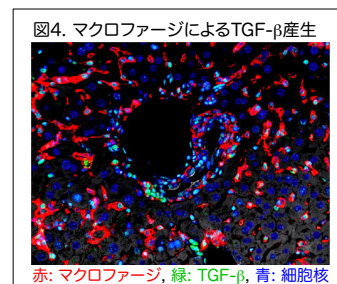
(2) 肝オルガノイド作成能による肝組織幹細胞機能の評価: 肝臓においては、肝内胆管を単離し一定の条件下で培養することで BEC オルガノイドが形成されることが報告されている。そこで我々は、移植後の肝臓から胆管を遊離し培養することで、BEC オルガノイドの生成効率の推移を検討した。Allo 群の肝臓右葉から形成された肝臓オルガノイド数は、Naïve および Syn 群と比較して移植後 28 日目以降に著しく低下していた (図 1)。Allo 群とは対照的に、Syn 群では、オルガノイドの形成数は経過中、有意な変化は見られなかった。以上のことから、Allo 群において、肝臓 GVHD が BDSCs を標的にしていること、また、肝臓オルガノイドを用いることで、GVHD が肝臓幹細胞を標的とするメカニズムの検討が可能であることが示唆された。



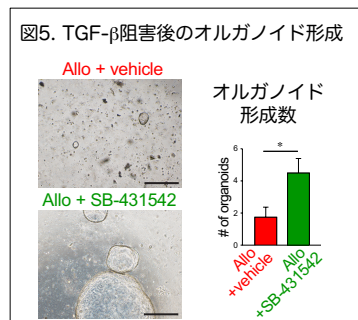
(3) 肝オルガノイドを用いた肝組織幹細胞障害の機序の検討: 次に、GVHD が同種移植マウスの肝臓オルガノイド形成を減少させる機序を探った。移植後 28 日目では肝臓で IFN- γ 、TNF- α 及び TGF- β の発現が、Allo 群で上昇していた。IFN- γ や TNF- α が腸管オルガノイドのアポトーシスを誘導することが知られており、BEC オルガノイドにおいても同様の影響を及ぼすか検討した。しかし、IFN- γ 及び TNF- α は高用量でも BEC オルガノイドの増殖に影響を与えなかった。一方で、TGF- β をオルガノイド培養に添加すると、BEC オルガノイドは用量依存性に形成が抑制された。(図 2)。続いて、選択的 SMAD2/3 阻害剤である SB-431542 を用いて、TGF- β によるオルガノイド形成抑制が解除されるかを検討した。TGF- β を添加した培地に用量を振って SB-431542 を添加したところ、TGF- β が存在下においても、用量依存的にオルガノイド形成効率が回復した (図 3)。以上のことから、移植後 Allogeneic 群の肝臓では、IFN- γ 、TNF- α 、TGF- β のいずれも移植後 28 日目に高発現をしているが、腸管とは異なり IFN- γ 、TNF- α は肝臓幹細胞に影響は与えず、TGF- β が肝臓幹細胞の傷害に寄与している可能性が示唆された。



(4) 肝組織幹細胞障害の責任細胞を明らかにする: 肝臓 GVHD において TGF- β 産生細胞を同定するために、移植後 28 日目の肝臓の蛍光免疫染色およびフローサイトメトリーを施行したところ、門脈浸潤 F4/80 陽性マクロファージの大部分 (83.0 \pm 3.2%) が TGF- β 陽性であることが確認された (図 4)。続いて、移植後に LMCs が肝臓オルガノイドの形成に与える影響について検討を行った。移植後 28 日目の Allo または Syn 群の肝臓から LMCs を単離し、Naïve BDF1 由来のオルガノイドと共培養を行った。共培養開始 4 日後のオルガノイド形成能を検討した結果、Allo 群で有意に発育が抑制された。これらの所見を総合すると、肝臓 GVHD においては、肝臓の門脈領域に浸潤する炎症性マクロファージが TGF- β を介して、BEC オルガノイド形成能の低下に関与していることが示唆された。



(5) 肝組織幹細胞を標的とする肝臓 GVHD 治療法の開発: TGF- β 経路の障害が肝臓 GVHD における肝臓幹細胞の障害を改善させるかどうかを in vivo で検討した。移植後、SB-431542 を 14 日目から 28 日目まで連日腹腔内投与を行い、移植後 28 日目における肝臓オルガノイド形成能を検討した。SB-431542 投与群は、非投与群と比較して、オルガノイド形成効率を有意に増加させ、TGF- β 経路の障害はオルガノイド形成肝臓幹細胞を GVHD から保護していることが示唆された (図 5)。さらに、SB-431542 は、Allogeneic レシピエントにおける BEC のアポトーシス、血漿ビリルビン値を有意に減少させ、TGF- β 阻害によるオルガノイド形成幹細胞の保護が GVHD における胆管機能障害の緩和につながったことを示唆した。以上のことから、本研究では、肝臓 GVHD におけるオルガノイド形成幹細胞細胞の動態、およびドナー免疫細胞による肝臓の TGF- β 依存性オルガノイド形成能障害メカニズムを明らかにした。これらの知見は、肝臓 GVHD における肝臓幹細胞の役割の解明、及び TGF- β 阻害剤を肝臓 GVHD の予防や治療のための新たな戦略に繋がるものである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 6件）

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 -
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 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 -
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 Shouval Roni, Hashimoto Daigo, et al. (19番目、他26名)	4. 巻 29
2. 論文標題 Conditioning Regimens are Associated with Distinct Patterns of Microbiota Injury in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 165 ~ 173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-22-1254	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 荒 隆英、橋本 大吾	4. 巻 63
2. 論文標題 GVHDの病態生理と新規治療薬	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1261 ~ 1269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.63.1261	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 Hashimoto Daigo	4. 巻 116
2. 論文標題 Guest editorial: prophylaxis and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 307 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-022-03407-8	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 Takamiya Soichiro, Kawabori Masahito, Yamazaki Kazuyoshi, Yamaguchi Sho, Tanimori Aki, Yamamoto Koji, Ohnishi Shunsuke, Seki Toshitaka, Konno Kotaro, Tha Khin Khin, Hashimoto Daigo, Watanabe Masahiko, Houkin Kiyohiro, Fujimura Miki	4. 巻 17
2. 論文標題 Intravenous transplantation of amnion-derived mesenchymal stem cells promotes functional recovery and alleviates intestinal dysfunction after spinal cord injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0270606	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 Senjo Hajime, Onozawa Masahiro, Hidaka Daisuke, Yokoyama Shota, Yamamoto Satoshi, Tsutsumi Yutaka, Haseyama Yoshihito, Nagashima Takahiro, Mori Akio, Ota Shuichi, Sakai Hajime, Ishihara Toshimichi, Miyagishima Takuto, Kakinoki Yasutaka, Kurosawa Mitsutoshi, Kobayashi Hajime, Iwasaki Hiroshi, Hashimoto Daigo, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 High CRP-albumin ratio predicts poor prognosis in transplant ineligible elderly patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12813-1	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 Varelias Antiopi, Zhang Ping, Hashimoto Daigo	4. 巻 13
2. 論文標題 Editorial: Mouse Models of Hematopoietic Stem Cell Transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 882592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.882592	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 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ara T, Hashimoto D	4. 巻 12
2. 論文標題 Novel Insights Into the Mechanism of GVHD-Induced Tissue Damage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 713631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.713631	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 Zhang Z, Hasegawa Y, Hashimoto D, Senjo H, Kikuchi R, Chen X, Yoneda K, Sekiguchi T, Kawase T, Tsuzuki H, Ishio T, Ara T, Ohigashi H, Nakagawa M, Teshima T.	4. 巻 -
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 Transplant	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2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- β -Dependent Manner
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	Hajime Senjo, Daigo Hashimoto, Shinpei Kubota, Yuki Tanaka, Shinpei Harada, Kazuki Yoneda, Zixuan Zhang, Xuanzhong Chen, Ryo Kikuchi, Yuta Hasegawa, Hiroyuki Ohigashi, Takahide Ara, Yoshinori Hasegawa, Masaaki Murakami, DVM., Ph.D. and Takanori Teshima
2. 発表標題	Calcineurin Inhibitors Inhibit Tolerance Induction By Suppressing Terminal Differentiation of Donor Exhausted T Cells after Allogeneic SCT
3. 学会等名	64th ASH Annual Meeting and Exposition
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Shinpei Harada, Daigo Hashimoto, Hajime Senjo, Kazuki Yoneda, Zixuan Zhang, Xuanzhong Chen, Ryo Kikuchi, Masahiro Chiba, Hiroyuki Ohigashi, Takahide Ara, Masao Nakagawa, Masashi Suganuma, Rick C. Tsai, and Takanori Teshima
2. 発表標題	Intercellular Mitochondrial Transfer Enhances Metabolic Fitness and Anti-Tumor Effects of CAR T Cells
3. 学会等名	64th ASH Annual Meeting and Exposition
4. 発表年	2022年

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, Takanori Teshima
2. 発表標題	Gvhd Targets Organoid-Forming Biliary Epithelial Stem Cells Via a TGF- β -Dependent Manner
3. 学会等名	The 63rd ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年	2021年～2022年

1. 発表者名	Daigo Hashimoto
2. 発表標題	Intestinal dysbiosis and GVHD: preclinical and clinical findings
3. 学会等名	The International Congress of BMT 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年	2021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
---------	---------