

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22901

研究課題名(和文)同種造血細胞移植後GVHDと腸内細菌叢dysbiosisの発症機序解明と治療応用

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms in dysbiosis and GVHD post allo HSCT and its therapeutic application

研究代表者

藤原 英晃 (Fujiwara, Hideaki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90743683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血幹細胞移植(いわゆる骨髄移植)は、移植片対宿主病(GVHD)が主な合併症です。GVHD発症のメカニズムは免疫細胞を中心に研究されていますが、一旦発症すると治療抵抗性であることも多く、未だ不明な点が多いです。本研究において、GVHDの特徴である腸内細菌叢の乱れに注目し、これは、GVHD 腸上皮細胞ミトコンドリア呼吸障害 細胞内酸素濃度上昇 腸管内酸素濃度上昇 腸内細菌叢の乱れ GVHDの増悪という経路を明らかにしました。この経路は新たな知見であり、GVHD予防・治療の標的として今後さらに詳細を明らかにし、免疫抑制剤に頼らないGVHD予防治療法を検討していきます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は免疫細胞により攻撃される体組織(特に重症となる腸)に着目し、GVHDによって引き起こされる組織の変化を実験的に明らかにしています。GVHDによる腸内細菌叢の乱れが腸内環境の乱れであることに着目し、この原因が腸の細胞の呼吸・エネルギー産生器官であるミトコンドリア障害であることを明らかにしました。今後はミトコンドリアを標的とした治療法を確立し、体組織を丈夫にすることでGVHDを低減する安全な同種造血幹細胞移植法を確立することを目的としています。これによりこれまで同種造血細胞移植の適応とならなかった高齢者にも安全かつ有効な治療を可能とすることを目指しています。

研究成果の概要(英文)：Graft-versus-host disease (GVHD) is a major complication in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (bone marrow transplantation). The pathogenesis of GVHD is well studied as the immune cell mediated system but GVHD can be refractory to various treatments once it developed. In this study, we investigated other mechanisms that caused and exacerbated GVHD; GVHD disturbance of mitochondrial respiration in intestinal epithelial cells increased oxygen in cells increased oxygen in the intestinal lumen dysbiosis exacerbated GVHD. This novel insight brought a new strategy to GVHD prophylaxis and treatment independent of immunosuppressive therapies. We will target mitochondria as a therapeutic target to establish new strategies to prevent and treat GVHD post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

研究分野：造血細胞移植

キーワード：移植片対宿主病 造血細胞移植 腸管上皮細胞 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

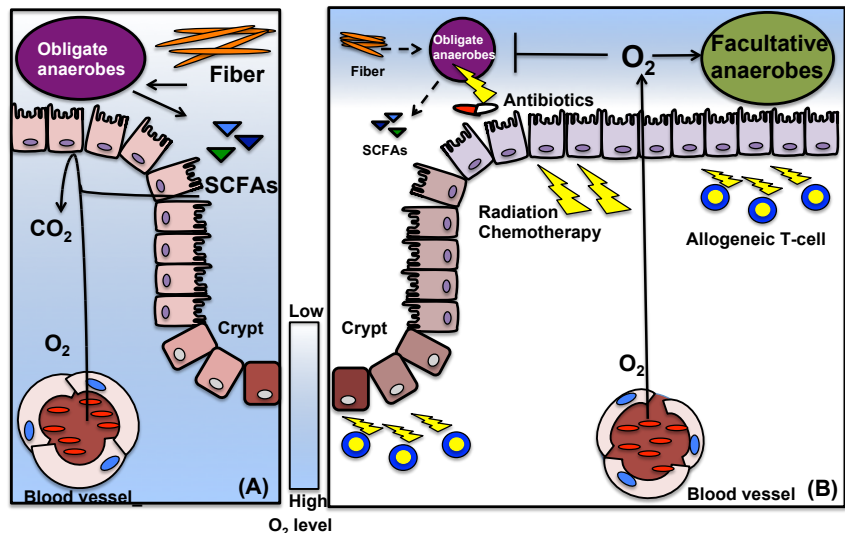
白血病などの血液悪性疾患は、加齢に伴う造血幹細胞への遺伝子異常が蓄積し発症する病気である。高齢者血液悪性疾患は年間 36,000 例 (2015 年) と増えているが、治療法は限られている。同種造血幹細胞移植は根治的治療法だが、ドナーT 細胞による GVHD が主な合併症であり、臓器機能の低下している高齢者の適応は難しい。GVHD 発症のメカニズムはドナーT 細胞を中心に研究されているが、一旦発症すると治療抵抗性であることも多く、未だ不明な点が多い。

近年、様々な免疫性疾患と腸内細菌叢の関連が注目されている。ヒトおよびマウスでも GVHD と dysbiosis の関連性が報告されているが、その意義は不明である。我々はこれまで、dysbiosis と腸管上皮細胞の関係に着目し、dysbiosis による腸内細菌由来代謝物の変化と細胞内分子複合体インフラマソームの活性化が腸管上皮細胞の恒常性に関与する研究を行ってきた (Nat Immunol 2016, Nat Commun 2018, Nat Microbiology 2019)。しかし、依然として GVHD における dysbiosis が起こる機序は不明である。

ヒトの腸内は出生時には無菌状態であるが、出生後母乳栄養や周囲の環境、食物の経口摂取などの影響により数兆個に及ぶ腸内細菌叢が形成される。これらの腸内細菌は酸素により死滅する偏性嫌気性細菌であり、多種多様の代謝産物を産生し腸上皮細胞の栄養源を作り出している。腸上皮細胞はこの栄養源と酸素を用いた効率的なエネルギー産生をミトコンドリアで行っている。ミトコンドリアによる酸素消費が腸管内の生理的低酸素状態を保ち、正常腸内細菌叢が維持されるポジティブな関係を形成している。同種造血幹細胞移植後 GVHD 状態では、大腸菌や腸球菌などの酸素存在下で生存可能な通性嫌気性細菌が増加した dysbiosis を呈しており、GVHD の発症に腸管上皮細胞におけるミトコンドリア代謝が関与している

という発想に至った (図 1)。腸管に起きる GVHD は特に死亡率が高く腸内細菌叢変化が重症 GVHD と関連していることから、dysbiosis が起きる機序を解明することで同種造血幹細胞移植を安全に行う方法の開発につながると考えている。

図 1



## 2. 研究の目的

本研究は、GVHD における dysbiosis が腸上皮細胞の傷害により発症するという仮説のもと、同種造血幹細胞移植後に、腸上皮細胞のミトコンドリア機能不全による酸素利用障害が腸管内酸素濃度の上昇を引き起こす機序を明らかにすることを目的とする。

申請者らはこれまで、組織による寛容性の観点から GVHD の標的である組織障害部位に起きている変化を直接的に解析することに主眼を置いている (Fujiwara *et al.*, *J Immunol* 2014, *Nat Commun* 2018, *Nat Microbiology* 2019)。この組織寛容という視点で行う研究は、国内外において学術的に独自のであり、特に GVHD マウスの腸管における酸素代謝に関わるミトコンドリア異常を引き起こす機序を解明することは、組織の恒常性を維持することで組織寛容性を誘導することで T 細胞による組織傷害の低

減を試みる点が、従来の T 細胞機能を主眼とする研究とは異なる。

### 3. 研究の方法 (図 2)

腸管上皮は主にミトコンドリアにおける酸素を利用したエネルギー産生を行う。GVHD によるミトコンドリア機能異常が腸内酸素レベルを変化させるかどうかを検討し、マウス腸管上皮細胞における酸素代謝変化が与える影響を、ミトコンドリア機能の点から検討する。

#### (1) GVHDが与えるマウス腸管酸素レベルの検討:

大腸内視鏡下酸素測定器や低酸素組織特異的免疫染色を用いて GVHD マウスの腸管内腔及び腸上皮細胞における酸素レベルが上昇していることを明らかにする。

#### (2) 腸管上皮細胞における酸素消費能の解析:

次に、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(ミトコンドリアでのエネルギー産生)及び細胞外酸化速度(酸素を用いない非ミトコンドリアエネルギー産生)を測定し、腸上皮細胞内の酸素消費量(ミトコンドリア機能)が低下していることを明らかにする。

#### (3) 酸素消費を変化させる細胞内部位・器官の同定:

さらに、腸管上皮細胞の代謝物をメタボローム解析し酸素消費量の低下を引き起こすミトコンドリア内外の部位を明らかにする。

以上より、本研究にあたり、GVHD における dysbiosis が腸管上皮細胞における酸素代謝の変化、特にミトコンドリア機能異常により惹起されることを明らかにする。

### 4. 研究成果

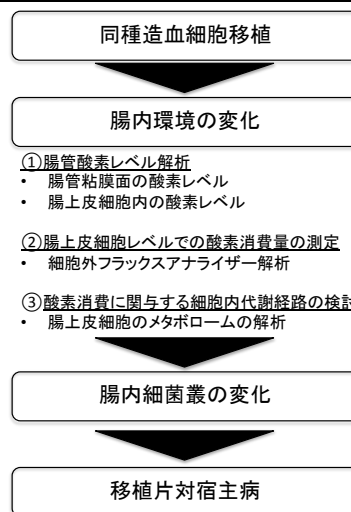
本研究は、GVHDマウスモデルとして放射線照射したB6レシピエントマウスにドナーBALB/c骨髄細胞と脾臓から単離したT細胞を投与しGVHDを発症させたマウスを用いて解析を行った。

#### (1) GVHDが与えるマウス腸管酸素レベルの検討:

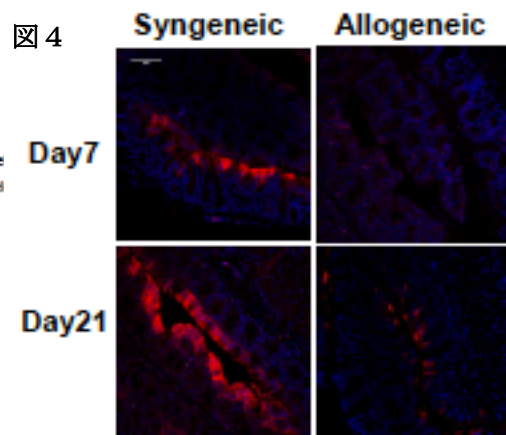
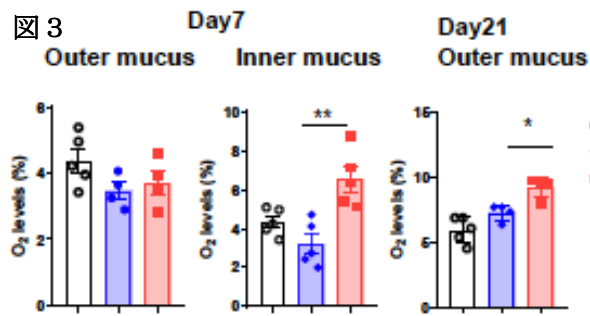
ミトコンドリア障害が発症した場合、酸素を利用したエネルギー産生が低下することが予想された。このため、腸管内酸素濃度GVHD発症、非発症、ナイーブB6マウスに対して大腸内視鏡下に酸素測定器を用いて腸管内腔(腸上皮表面)および腸上皮細胞内(腸上皮細胞深部)の酸素濃度測定を行った。ナイーブマウスと比較してGVHD非発症マウス(Syngeneic)では酸素濃度の変化は認めなかったが、GVHD発症マウス(Allogeneic)では、移植後早期には腸上皮細胞深部(Inner mucus)の酸素濃度上昇を、移植後後期には腸上皮表面(Outer mucus)および腸上皮細胞深部の両方で酸素濃度の上昇を認めた(図3)。これら腸管内酸素濃度の上昇が腸内細菌叢の変化、特に好気性菌を中心としたdysbiosisに影響を与えていることが推測された。次に酸素濃度上昇の原因として、腸上皮細胞内部の変化もしくは周囲の支持組織の酸素濃度変化を検討するため、低酸素組織特異的免

図 2

想定されるGVHDのメカニズムと解析ポイント

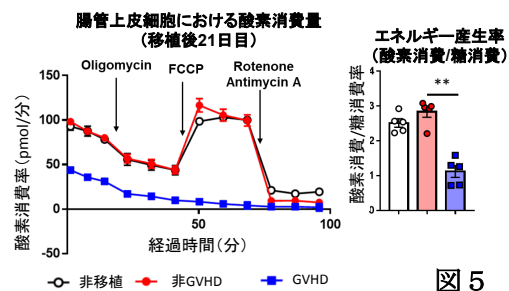


疫染色を施行したところ、GVHD発症マウスの腸上皮細胞では細胞内酸素濃度の上昇を認めた(図4)。これらの結果から、通常低酸素状態である腸管上皮細胞はGVHD発症後に腸管上皮細胞の酸素利用障害が発生していることが考えられる。



### (2) 腸管上皮細胞における酸素消費能の解析:

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 スアナライザーにより酸素消費量(ミトコンドリアでのエネルギー産生; OCR)及び細胞外酸性化度(酸素を用いない非ミトコンドリアエネルギー産生; ECAR)を測定し、腸管上皮細胞内の酸素消費量(ミトコンドリア機能)を検討する。(1)の結果から、GVHD マウスでは酸素利用障害に伴う酸素消費量の低下が予想されるが、細胞外酸性化度に関しては不明である。Bioenergetic analyzer (Seahorse™)を用いて酸素消費量を測定したところ、GVHD マウス由来腸管上皮細胞は非GVHD マウスと比較して約半分の基礎酸素消費量を呈しており最大酸素消費量も極端に低下していた。一方で解糖系によるエネルギー産生の指標となる ECAR はGVHD マウスと非GVHD マウスでは著変なく、GVHD マウスではOCRの低下が大きく変化していた(図5)。この結果よりGVHDにより腸管上皮細胞のミトコンドリア呼吸機能が障害されていることが明らかとなった。



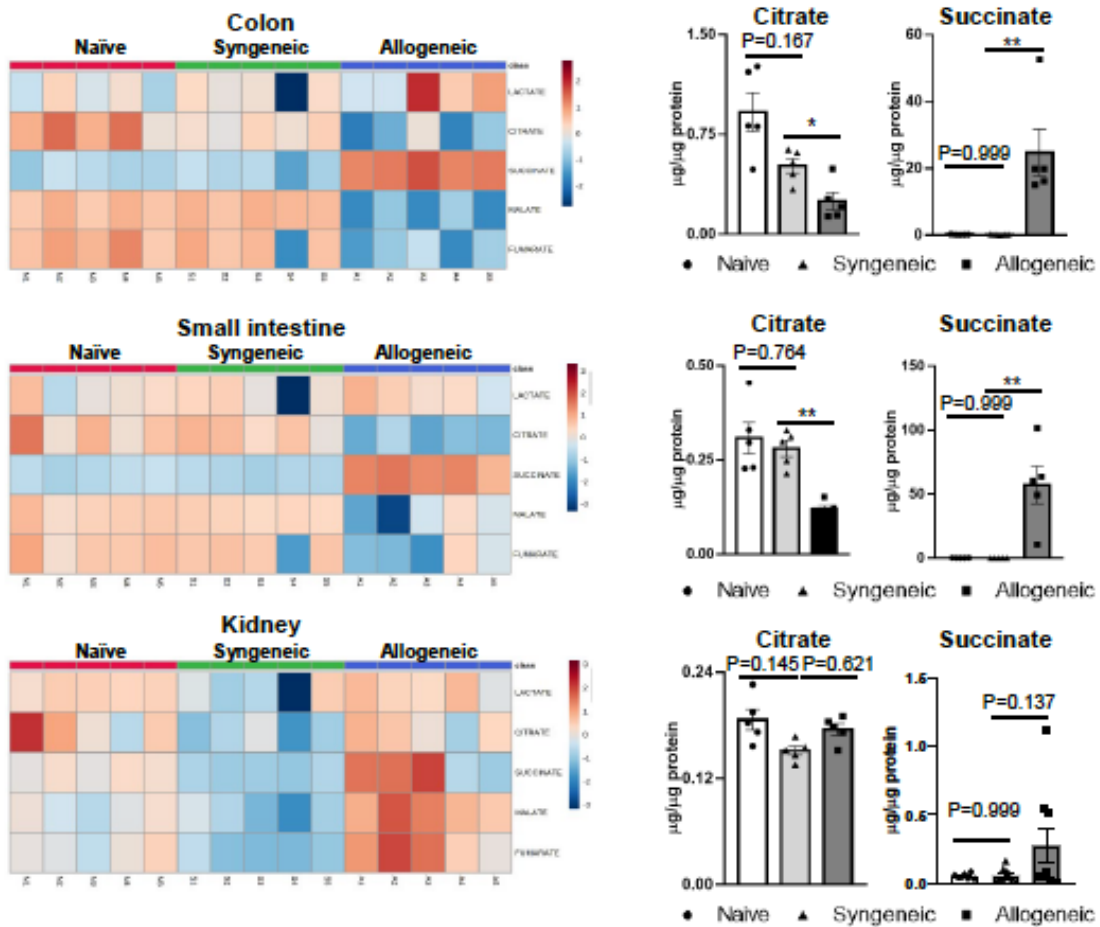
### (3) 酸素消費を変化させる細胞内部位・器官の同定:

(2)の解析結果からミトコンドリア障害、特に呼吸障害が明らかになっており、この障害部位を特定するため、metabolome解析から障害部位の同定を試みた。Naive、非GVHD、GVHD マウスからGVHD 標的臓器である腸管上皮細胞及び非標的臓器である腎臓を単離し、液体クロマトグラフィーによる metabolome 解析を行った。腎臓ではNaive、非GVHD 及びGVHD マウス間では metabolome に明らかな差異は認めなかったが、腸管上皮細胞ではGVHD マウスにおいて、succinateの著増ならびに citrate や fumarate 等のその他 metabolome の著減を認めた(図6)。解糖系の指標となる Lactate は各群において相違を認めず、これらの結果から TCA 回路における Succinate dehydrogenase (SDH) の障害が考えられた。

今後はSDHの障害に着目し、同種造血幹細胞移植後にdysbiosisが発症するかを明らかにし、治療標的として今後のさらなる研究を行う予定である。本研究で得られた、腸管上皮細胞のミトコンドリア異常が酸素濃度変化によるdysbiosisを引き起こしGVHDが悪化するという知見は、これまで明らかにされていなかったGVHDとdysbiosisを結びつける重要な知見であり、免疫細胞による組織障害発生機序と

関連しているものと思われる。この機序を解明し、治療応用することは免疫細胞性障害に対する組織免疫寛容性につながり、GVHD に限らず広く T 細胞により引き起こされる腸炎等の自己免疫性疾患の機序解明にも応用される可能性を示唆している。

図 6



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 1件/うちオープンアクセス 2件）

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 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, 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 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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原英晃
2. 発表標題 腸上皮におけるミトコンドリア電子伝達系酵素複合体IIは腸管GVHDにおける代謝チェックポイントである
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤原英晃
2. 発表標題 腸管上皮細胞の組織代謝・恒常性と腸管GVHD
3. 学会等名 第43回日本造血細胞移植学会総会（招待講演）
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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