

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659490

研究課題名（和文） 造血幹細胞移植後のGVHDと感染症のクロストーク

研究課題名（英文） Crosstalk between graft-versus-host disease and infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

豊嶋 崇徳 (TESHIMA TAKANORI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40284096

研究成果の概要（和文）：腸幹細胞とそのニッチである Paneth 細胞が GVHD の標的であることを世界で初めて明らかにし、GVHD とは生体のホメオスタシスと修復機転の破綻による免疫病であることを証明した。また GVHD による Paneth 細胞ダメージによって、defensin など内因性抗菌ペプチドの産生が低下し、腸内細菌叢の多様性が喪失し、常在菌から病原菌への菌交代現象がみられ、これが破綻した粘膜バリアより侵入し感染症の原因となることを示した。非吸収性抗生剤の投与によって、腸内細菌叢の是正により、GVHD の軽減も観察され、以上の結果から、造血幹細胞移植後の新たな菌交代メカニズムが明らかとなり、造血幹細胞移植後の 2 大合併症である GVHD と感染症の間に従来認識されていなかったクロストークが存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We discovered that Paneth cells are targeted by GVHD, resulting in marked reduction in the expression of α -defensins, which selectively kill non-commensals, while preserving commensals. Molecular profiling of intestinal microbial communities showed loss of physiological diversity among the microflora and the overwhelming expansion of otherwise rare bacteria, which caused septicemia. These results reveal the novel mechanism responsible for shift in the gut flora from commensals towards the widespread prevalence of pathogens and the previously unrecognized association between GVHD and infection following allogeneic stem cell transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：GVHD、Paneth cell、defensin

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は造血器悪性腫瘍の根治的治療法であるが、その成績向上には、移植片対宿主病（GVHD）と感染症の克服が課題である。とくにGVHDの直接死因として、GVHDで破綻した腸管粘膜を侵入門戸とする病原性菌による敗血症が最も頻度が高い。申請者は一貫してGVHDのメカニズムの研究を行いその病態の解明に貢献してきた。とくに腸管傷害とGVHDにフォーカ

スして研究を行ってきたが、健常人の腸内細菌フローラの大部分は“共生菌”であり、病原性菌はごく一部を占めるに過ぎないのに、なぜGVHD患者で、病原菌が猛威を振るうのか明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

GVHDと感染症は造血幹細胞移植の成績を左右する二大合併症であり、その克服が移植成績の向上に必須の課題である。とくに細

菌感染症はGVHD患者に高率に発症するが、そのメカニズムは明らかでない。われわれは現在までの予備研究において、GVHDの発症によって共生菌を主体とした腸内細菌フローラの多様性が失われ、腸管エコロジーが破綻することにより、病原菌が優位となり、感染症が発症することをマウスモデルで見出した。これは従来全く認識されてこなかった、T細胞性免疫病であるGVHDと腸内細菌フローラとの間のクロストークを示唆する新知見である。本研究では本現象の普遍性を検証し、さらにそのメカニズムを解明することを目的とした。本研究によって、造血幹細胞移植成績の向上のための基礎的知見を得ることが最終的な目的である。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄移植モデルにおいて、T細胞非投与群(非GVHD群)とT細胞投与群(GVHD群)における腸内細菌フローラの変化を経時的に解析した。全フローラを定量的に評価するために培養法でなくT-RFLP法を用いた。具体的には、腸管内容を採取し、その遺伝子を抽出し、細菌特異的16SrRNAに対する蛍光標識ユニバーサルプライマーを用いてPCR法を行い、増幅産物を制限酵素で切断し、キャピラリー電気泳動を行い、細菌フローラを解析した。薬剤の影響を除外するため、抗生剤、免疫抑制剤は投与しなかった。腸内細菌フローラの多様性が失われ、優勢菌が出現した場合、その菌種を同定した。このような腸内フローラの変化と感染症の発症、およびGVHD重症度の相関性を検証した。

(2) 細菌叢変動のメカニズムの解明のため、腸内細菌フローラをアクティブに制御しているPaneth細胞からの抗菌ペプチドの産生がGVHD発症によってどのような影響を受けるのか、免疫組織化学法、定量的リアルタイムPCR法などによりPaneth細胞を含む腸管組織の評価、抗菌ペプチド α -defensinの発現を解析した。

4. 研究成果

マウスモデルのGVHD群では、移植後7日目には腸内細菌叢の多様性が消失し、常在菌から病原菌への菌交代現象がみられた。優勢菌が破綻した粘膜バリアより侵入し感染症の起因菌となった。このような腸内細菌叢の変化は、臨床的なGVHDの重症度と相関した。また、MHC不適合骨髄移植の場合にはその変化はMHC適合移植の場合と比較し、より速やかに劇的な変化がみられた。また、移植後にGVHDが改善した場合には、腸内細菌叢の多様性の回復がみられた。このような腸内細菌叢の変化によって大腸菌が優勢菌となり、破綻した腸管粘膜から血中に移行し、敗血症などの全身性感染症の起因菌となった。

一方、非吸収性抗生剤polymyxin Bの投与によって、腸内細菌叢が部分的に是正され、全身性GVHDの軽減が観察された。この免疫学的な菌交代現象のメカニズムとして、GVHDによるPaneth細胞ダメージを明らかにした。これにより、Paneth細胞由来抗菌ペプチド α -defensinの発現が著明に低下し、これがGVHDによる菌交代のメカニズムと考えられた。

以上の結果から、造血幹細胞移植後の新たな菌交代メカニズムが明らかとなり、造血幹細胞移植後の2大合併症であるGVHDと感染症の間に従来認識されていなかったクロストークが存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計18件)

- ① Kuriyama T, Takenaka K他12名13番目、Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis, Blood, 査読有、120巻、2012、4058-4067、10.1182/blood-2012-02-408864
- ② Eriguchi Y, Takashima S他10名12番目、Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α -defensins, Blood, 査読有、120巻、2012、223-231、10.1182/blood-2011-12-401166
- ③ Takenaka K, Nagafuji K他11名12番目、Initial low-dose valganciclovir as a preemptive therapy is effective for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients, Int J Hematol, 査読有、96巻、2012、94-100、10.1007/s12185-012-1087-9
- ④ Teshima T, GVHD-associated immunosuppression: soil or seed?, Blood, 査読有、119巻、2012、5618-5619、10.1182/blood-2012-04-418616
- ⑤ Harris AC, Ferrara JL計11名5番目、Plasma biomarker of loser gastrointestinal and liver acute graft-versus-host disease, Blood, 査読有、119巻、2012、2960-2963、10.1182/blood-2011-10-387357
- ⑥ Mori Y, Miyamoto T他12名13番目、Different risk factors related to adenovirus- or BK virus-associated hemorrhagic cystitis following allogeneic stem cell transplantation, Biol B

- lood Marrow Transplant、
査読有、18 卷、2012、458-465、
10.1016/j.bbmt.2011.07.025
- ⑦ Nishimori H, Maeda Y 他 11 名 3 番目、
Synthetic retinoid Am80 ameliorates
chronic graft-versus-host disease by
downregulating Th1 and Th17、Blood、
査読有、119 卷、2012、285-295、
10.1182/blood-2011-01-332478
- ⑧ Mori Y, Teshima T 他 8 名、Validation of
pretransplantation assessment of
mortality risk score in the outcome
of hematopoietic stem cell transplan-
tation in non-Caucasians、Bone Marro
w Transplant、
査読有、47 卷、2012、1075-1081、
10.1038/bmt.2011.229
- ⑨ Kamimura T, Miyamoto T 他 8 名 8 番目、
Successful treatment by donor lympho-
cyte infusion of adult T-cell leukem-
ia/lymphoma relapse following allogeneic
hematopoietic stem cell transplanta-
tion、Int J Hematol、
査読有、95 卷、2012、725-730、
10.1007/s12185-012-1056-3
- ⑩ Teshima T、Th1 and Th17 join forces
for acute GVHD、Blood、
査読有、118 卷、2011、4765-4767、
10.1182/blood-2011-09-377325
- ⑪ Ferrara JL, Harris AC 他 15 名 6 番目、
Regenerating islet-derived 3 alpha is
a biomarker of gastrointestinal gr-
aft-versus-host disease、Blood、
査読有、118 卷、2011、6702-6708、
10.1182/blood-2011-08-375006
- ⑫ Mori Y, Miyawaki K 他 7 名 9 番目、
Diagnostic value of serum procalcitonin
and C-reactive protein for infections
after allogeneic stem cell transplan-
tation versus nontransplant setting、
Intern Med、
査読有、50 卷、2011、6702-6708、
10.2169/internalmedicine.50.5798
- ⑬ Hashimoto D, Chow A 他 14 名 12 番目、
Pretransplant CSF-1 therapy expands
recipient macrophages and ameliorates
GVHD after allogeneic hematopoietic
stem cell transplantation、J Exp
Med、査読有、208 卷、2011、1069-1082、
10.1084/jem.20101709
- ⑭ Tsukamoto H, Nagafuji K 他 11 名 11 番
目、Analysis of immune reconstituti-
on after autologous CD34+ stem/progen-
itor cell transplantation for systemic
sclerosis: predominant reconstitu-
tion of Th1 CD4+ T cells、Rheumatolo-
gy、査読有、50 卷、2011、944-952、
<http://rheumatology.oxfordjournals.org/content/50/5/944.full>
- ⑮ Takashima S, Kadowaki M 他 6 名 8 番目、
The Wnt agonist R-spondin1 regulates
systemic graft-versus-host disease
by protecting intestinal stem cells、
J Exp Med、査読有、208 卷、2011、285-
294、10.1084/jem.20101559
- ⑯ Kamimura T, Miyamoto T 他 14 名 12 番目、
Role of autotransplantation in the t-
reatment of acute promyelocytic leuk-
emia patients in remission: fukuoka
BMT group observations and a literat-
ure review、Bone Marrow Transplant、
査読有、46 卷、2011、820-826、
10.1038/bmt.2010.207
- ⑰ Tanimoto T, Uchida N 他 3 名、4 番目、
Safety of workers at the Fukushima D-
aiichi nuclear power plant、Lancet、
査読有、377 卷、2011、1489-1490
10.1016/S0140-6736(11)60519-9
- ⑱ 江里口芳裕、前原依子 他 4 名、6 番目、
造血幹細胞移植の新たな感染対策、
無菌生物、査読有、41 卷、2011、45-47、
<http://ci.nii.ac.jp/naid/10029651305>
- [学会発表] (計 6 件)
- ① Teshima T、Separation of GVL from GVH
D by targeting leukemic stem cells while
preserving normal tissue stem cells
and their niche、Shanghai Workshop
for Hematopoietic Stem Cell Trans-
plantation 2012、2012.7.27-28、Shang-
haiHospital(China)
- ② Teshima T、Intestinal stem cells and
their niche are targeted in GVHD、Sem-
inar at Memorial Sloan Kettering Can-
cer Center、2012.12.6、Memorial Sloan
Kettering Cancer Center(USA)
- ③ 豊嶋崇徳、造血幹細胞移植：急性および
慢性 GVHD 対策、第 74 回日本血液学会総
会、2012.10.21、国立京都国際会館(京都)
- ④ Teshima T、Current status of the graf-
t processing in Japan、The 1th Intern-
ational Workshop on Hematopoietic St-
em Cell Transplantation in Emerging
countries、2011.11.11-12、Vietnam Nat-
ional University(Vietnam)
- ⑤ Teshima T、Intestinal homeostasis and
graft-versus-host disease、The 16th
Annual Meeting of the Asian-Pacific
Blood and Marrow Transplantation、
2011.10.30-11.2、Sydney Convention &
Exhibition Centre(Australia)
- ⑥ Teshima T、A novel strategy to improv-
e outcome of allogeneic stem cell tr-
ansplantation、The 16th Annual Meetin-

g of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation, 2011.08.19-20, Busan Exhibition & Convention Center (Korea)

〔図書〕 (計 5 件)

- ① 神田善伸編、医薬ジャーナル社、造血幹細胞移植の基礎と臨床 (改訂版)、2012、77-82
- ② 大野竜三編、最新医学社、新しい診断と治療の ABC 3 6 / 血液 4 急性白血病 (改訂第 2 版)、2012、163-172
- ③ 日本臨床腫瘍学会編集、南江堂、新臨床腫瘍学 (改訂第 3 版)、2012、210-214
- ④ 谷口修一編、医薬ジャーナル社、やさしい GVHD 外来治療の自己管理、2011、12-21
- ⑤ 豊嶋崇徳編、医薬ジャーナル社、造血細胞移植と感染症、2011、16-23

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊嶋 崇徳 (TESHIMA TAKANORI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40284096

(2) 研究分担者

高嶋 秀一郎 (TAKASHIMA SHUICHIROU)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：70622116

(3) 連携研究者

なし