

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790977

研究課題名(和文) 組織幹細胞に着目した移植片対宿主病の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Basic research of new treatment strategy for graft-versus-host disease via tissue stem cell protection

研究代表者

高嶋 秀一郎 (Takashima, Shuichiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70622116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々は同種造血幹細胞移植の重大な合併症である移植片対宿主病(GVHD)による組織障害について組織幹細胞に注目して研究を行った。GVHDが腸幹細胞のニッチを構成するパネート細胞を障害し、さらに抗菌ペプチド産生の変化を介して腸管内細菌叢を病的な細菌叢に変化させることを明らかにした。また、皮膚の幹細胞ニッチを構成する脂肪前駆細胞は移植前処置によって障害された後、皮膚慢性GVHDによってその再生を阻害され、結果として脱毛が生じる可能性を示唆する所見を得た。これらの成果は組織幹細胞がニッチも含めてGVHDの予防・治療の標的となりうる可能性を示すものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) is limited by the devastating complication, graft-versus-host disease (GVHD). We evaluated a link between GVHD induced tissue damage and tissue stem cells.

We discovered that Paneth cells, which are identified as niche for intestinal stem cells, are targeted by GVHD, resulting in marked reduction in the expression of alpha-defensins. GVHD associated changes in production of antimicrobial peptides including alpha-defensins delivered loss of physiological diversity among the intestinal microflora. We also found the possibilities that pretransplant conditioning regimen damaged a dipose precursor cells, which function as skin stem cell niche to drive hair cycling, and the process of a dipose precursor cell recovery was inhibited by chronic GVHD development, resulting in alopecia.

Therefore, protection of tissue stem cells as well as their niche from GVHD may ameliorate tissue damage and promote tissue regeneration after allo-SCT.

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：内科臨床医学・血液内科学

キーワード：組織幹細胞 腸幹細胞 移植片対宿主病 パネート細胞 脂肪前駆細胞 脱毛

1. 研究開始当初の背景

(1) 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、治療関連毒性や感染症、移植片対宿主病 (GVHD) などが原因の非再発死亡が高率でその克服が移植成績の向上に重要である。

(2) GVHD は免疫担当細胞、特に T 細胞が標的臓器である腸管や皮膚、肝臓を障害して発症する。これまでの GVHD 研究では T 細胞などの免疫担当細胞の機能解析に主眼が置かれ、GVHD 標的臓器の特に細胞レベルでの障害メカニズムの解析はあまり進んでいなかった。

(3) 我々は先行研究で近年注目され、組織修復の起点となる組織幹細胞の役割に注目して GVHD 標的臓器における細胞レベルでの障害メカニズムの解析を行った。代表的な GVHD 標的臓器である腸管では組織幹細胞にあたる“腸幹細胞”が GVHD によって障害されること、腸幹細胞の減少がそのまま腸管障害の重症化につながることを見出した。さらに腸幹細胞の増殖因子である R-spondin1 が GVHD による腸幹細胞の障害を緩和して障害を軽減することを明らかにし、組織幹細胞を標的にした新たな GVHD 予防・治療法の可能性を示した。

(4) 組織幹細胞にはその機能を維持する支持組織“ニッチ”が存在する。腸幹細胞のニッチとして腸幹細胞に隣接して存在し、Wnt シグナルを提供するパネート細胞の役割が注目されていた。

(5) 腸管と同様に GVHD の主要標的臓器である皮膚でも Lgr5 や CD34 などを標識マーカーとして組織幹細胞の同定が進んでいた。さらに脂肪前駆細胞が皮膚の幹細胞のニッチを構成する事が報告されていた。

2. 研究の目的

(1) 同種造血幹細胞移植の成績向上のため組織幹細胞を標的とした新たな GVHD の予防・治療法の開発を目標とする。今回の研究ではその基礎検討として GVHD による組織幹細胞を含む標的組織の障害メカニズムの解明を目指す。以下の(2)-(4)の研究目的を設定した。

(2) 同種造血幹細胞移植後の腸管 GVHD における腸幹細胞のニッチであるパネート細胞の障害過程を解析する。

(3) パネート細胞の障害が GVHD を発症したマウスに与える影響を特に抗菌ペプチドの役割に注目して明らかにする。

(4) 皮膚 GVHD における皮膚の組織幹細胞

の役割を明らかにし、ニッチを含めた障害過程と治療介入の可能性を探索する。

3. 研究の方法

(1) 腸管 GVHD におけるパネート細胞の解析では B6 マウスをドナーに、BDF1 マウスをレシピエントとして使用するマウス急性 GVHD モデルを用いた。移植日に移植前処置として致死線量の全身放射線照射 (TBI) を行い、ドナーマウスの純化 T 細胞 2×10^6 個と T 細胞除去骨髄細胞 5×10^6 個を尾静脈より経静脈的に輸注した。GVHD を発症する群に対して GVHD を発症しないコントロール群として T 細胞除去骨髄細胞のみを輸注する群を設定した。

移植後 7 日目のマウスから腸管組織を取り出し、10%ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋したものから切り出してスライドを作成した。腸管組織は主に空腸を使用した。パネート細胞を特定するために lysoenzyme の免疫組織化学染色を行い、パネート細胞が産生する抗菌ペプチドである defensin 1、regenerating islet-derived (Reg) の産生をリアルタイム PCR と病理組織の免疫組織化学染色で評価した。

また、移植後 1 週間ごとに糞便を採取し、細菌由来の DNA を抽出した後、Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析を用いて腸管内における細菌叢の多様性を評価した。

(2) 皮膚の組織幹細胞と GVHD による組織障害過程の解析においては B10.D2 マウスをドナーに、BALB/c マウスをレシピエントとして使用するマウス慢性 GVHD モデルを用いた。移植日に移植前処置として 6.5Gy の TBI を行い、ドナーマウスの脾細胞と骨髄細胞をそれぞれ 8×10^6 個ずつ、尾静脈より経静脈的に輸注した。GVHD を発症する同種移植群に対してコントロールとしてレシピエントと同じ BALB/c マウスをドナーとして使用することで GVHD を発症しない同系移植群を設定した。

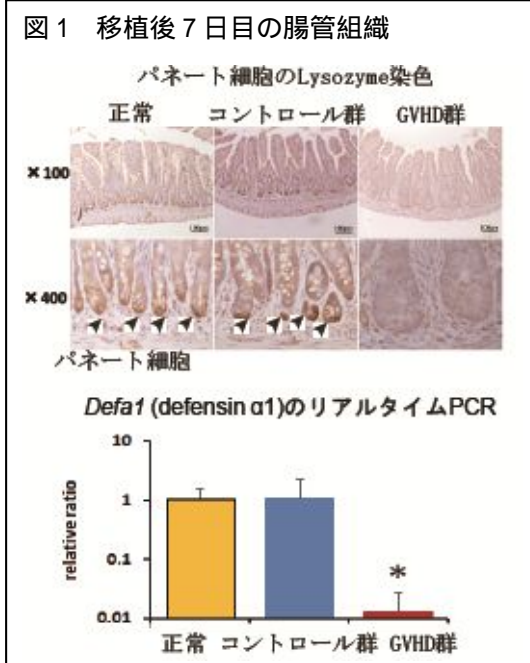
慢性 GVHD を移植後生存率と体重で評価した。皮膚 GVHD の肉眼的所見として脱毛に注目し、GVHD 重症度を脱毛の面積で定量的に評価した (慢性皮膚 GVHD スコア)。具体的には脱毛面積が 0cm^2 を 0 点、 1cm^2 未満を 1 点、 $1 \sim 2\text{cm}^2$ を 2 点、 2cm^2 より広い場合を 3 点とスコア化した。さらに耳、尾、四肢に皮膚病変を認めた場合にはさらに 0.3 点ずつ加えた。慢性皮膚 GVHD スコアの最低点は 0 点、最高点は 3.9 点となった。体重測定と慢性皮膚 GVHD スコアの評価は移植後 3 日毎に実施した。皮膚の病理検体として肩甲骨間の 2cm^2 の皮膚を脱毛して切り出し、10%ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋したものから切り出してスライドを作成し、HE 染色した。病理組織学的には線維化、脂肪組織の減少、毛乳頭の消失等を評価した。

(3) 全ての実験は九州大学動物実験施設の規則に従って実施した。

4. 研究成果

(1) パネート細胞は GVHD の標的となり、その障害は抗菌ペプチド defensin の産生低下をもたらす。GVHD の発症は複数の抗菌ペプチドの産生に影響を与え、腸内細菌叢に変化をもたらす。

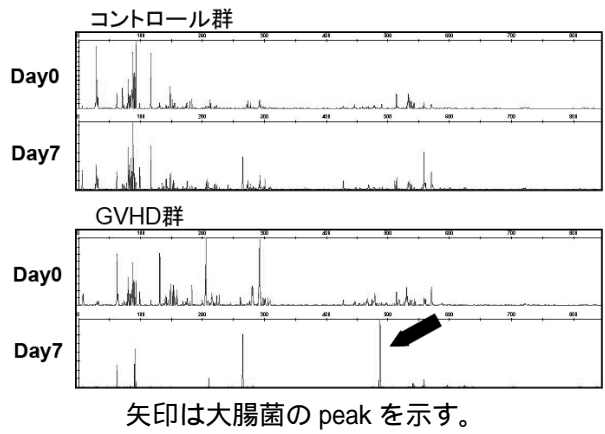
純化したドナーT細胞を移植した群ではGVHDを発症し、day+50 までにはほとんどのマウスが死亡した。Day+7 に採取した腸管組織の病理像はGVHDを発症しない群ではほとんど正常組織像であったのに対してGVHD群では柔毛の短縮や炎症細胞浸潤などの所見を認めた。Lysoenzymeの免疫組織化学染色を行うとGVHD群ではほとんどのパネート細胞が消失していた(図1)。さらにパネート細胞が産生する代表的な抗菌ペプチドである defensin 1 の発現を腸管組織から抽出したRNAのリアルタイムPCR法で評価した所、GVHDを発症しないコントロール群では保たれていたのに対し、GVHD群では著明に低下していた(図1)。これとは別に defensin 1 の免疫組織化学染色でもその産生低下を確認できた。興味深い事にこの所見は移植前処置のみ



を行った場合には得られず、移植前処置を実施せずに大量の脾細胞を輸注してGVHDを誘導した際には認めたことからパネート細胞の障害は移植前処置には依存しないGVHDの直接的な免疫反応によることも明らかになった。

この抗菌ペプチドの産生低下が腸内の細菌叢に与える影響を考え、細菌種に特異的な16SリボソームRNAをRFLP法で解析して細菌叢の多様性を評価した。それぞれのRFLPパターンが細菌種に相当し、ピークの高さが細

図2 腸管内細菌叢の多様性



菌量を表す。移植後の7日目の腸管内細菌叢の多様性はGVHDを発症しないコントロール群では移植前と比較してほとんど変化していなかったのに対し、GVHDを発症した群では細菌の種類も一つ一つの細菌量も低下し、細菌叢の多様性が失われていた(図2)。また、例外的に一つの菌種の細菌叢に占める割合が大きく増加しており(図2 矢印)これが大腸菌であることがさらなる解析で明らかとなった。

さらに別の抗菌ペプチドである Reg についてその発現を腸管組織から抽出したRNAのリアルタイムPCR法で評価した所、GVHDの発症に伴ってむしろ増加することが明らかになった。免疫組織化学染色の結果からこれは吸収上皮細胞からの Reg の産生が増加する結果であることが明らかになり、この産生増加は MyD88 のシグナル伝達に依存していた。

今回の検証で腸幹細胞だけでなく、パネート細胞もGVHDの標的となることが明らかになった。これはGVHDによる腸幹細胞の障害は移植前処置やGVHDによる直接的な障害だけでなく、ニッチの障害を介した間接的な機序も存在する可能性を示す。さらにパネート細胞の障害は defensin の産生低下を伴い、腸内細菌叢は多様性が消失して大腸菌が優勢な状況となっていた。別の抗菌ペプチドである Reg はGVHD発症に伴ってむしろ産生が増加していることから腸内細菌叢の変化は少なくとも複数の抗菌ペプチドの挙動が複雑に絡み合った結果と考えられるが、GVHDが腸内細菌叢にまで影響を与えることを示唆する興味深い結果と考えられた。

(2) 移植前処置によって障害された皮下脂肪細胞の再生を慢性GVHDが阻害し、毛乳頭の消失、脱毛が起こる。

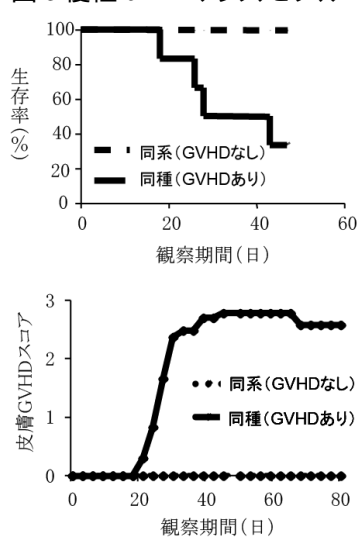
B10.D2マウスをドナーとして移植した群ではday+20頃からGVHDの発症に伴って生存率低下を認め、day+50には40%未満まで低下した(図3)。生存マウスのGVHD重症度の指標である体重についても移植前処置のTBIの影響でGVHDの発症に関係なく移植後1週間

目(day+7)には同種移植群、同系移植群とも体重が70-80%前後に低下したが、その後は徐々に回復し、移植後3週目(day+21)には約90%まで回復した。GVHDを発症しない同系移植群ではさらに回復し、day+30頃までにほぼ移植時の体重まで回復したのに対し、GVHD群では体重の回復が得られなくなり、むしろ減少傾向となった。Day+30以降の体重差はday+80頃まで変化がなかった。

皮膚GVHDを発症した結果、同種移植群でday+21頃から脱毛を認めた。Day+30の同系移植群のマウスでは全く脱毛を認めなかったのに対して、同種移植群では移植したマウスの約半数で脱毛を認めた。これを慢性皮膚GVHDスコアで定量化して評価した所、図3に示すような結果となった。同種移植群の皮膚GVHDスコアはday+42頃までに3近くまで増加し、以後はほとんど変化なく推移した。

さらに移植後経時的に皮膚組織を採取し、組織レベルで皮膚GVHDの進展機構について検討を加えた(図4)。正常組織では真皮下に豊富な脂肪組織を認め、毛根にあたる毛乳頭は真皮層と皮下脂肪組織の境界面付近に位置する。移植後day+14のマウスから採取した組織では正常組織と比較して真皮下の脂肪組織の減少と毛乳頭の先端が真皮層内部でより表皮層に近い浅い所に位置する所見を認めた。この所見は同系移植群と同種移植群とほぼ共通で差は認めなかった。これらの所見はGVHDではなく、移植前処置による放射線性皮膚障害の所見と考えられた。同系移植群ではday+20前後には皮下脂肪組織が正常組織と同程度まで回復したが、毛乳頭の先端に変化は認めなかった。さらにday+45前後から毛乳頭は皮下脂肪組織の内部に位置する所見を認め、ほぼ正常組織に近い所見となり、組織学的には放射線による皮膚障害がday+45頃までには回復する事が確認された。一方、皮膚GVHDを発症した同種移植群ではday+20を過ぎると脂肪組織はほぼ消失し、以後脂肪組織の回復は認めなかった。Day+45になると真皮層の肥厚に加え、毛乳頭の減少・消失の所見を認めた。皮膚GVHDを発症すると移植前処置による皮下脂肪組織の減少が回復せず、時間を経るに従って真皮

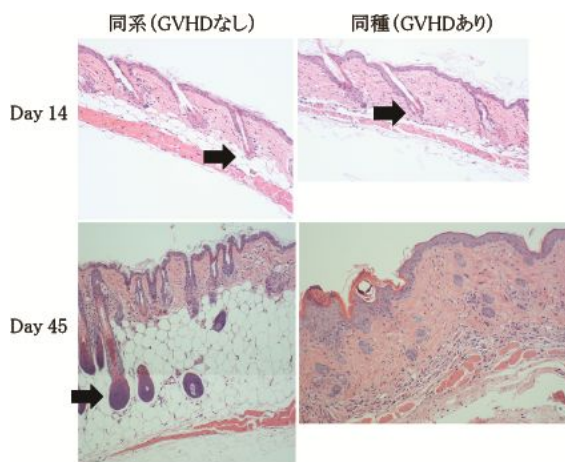
図3 慢性GVHD マウスモデル



層の肥厚や毛乳頭の消失といった所見が加わることが明らかになった。

層の肥厚や毛乳頭の消失といった所見が加わることが明らかになった。

図4 慢性GVHDの皮膚病理組織所見



矢印は毛乳頭の位置を示す。

これらの結果から皮下脂肪組織の前駆細胞で皮膚の幹細胞のニッチとして機能する脂肪前駆細胞も同様に移植前処置、GVHDによって障害される結果、皮膚の幹細胞の再生・維持が困難となって毛乳頭が消失、脱毛が生じると推察された。皮膚でもGVHDの組織障害の進展に組織幹細胞の関与が示唆される結果であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

1. Takashima S, Miyamoto T, Kamimura T, Yoshimoto G, Kato K, Ito Y, Muta T, Matsushima T, Shiratsuchi M, Tanimoto K, Takenaka K, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K. Comparison of bortezomib, cyclophosphamide, and dexamethasone (VCD) induction with bortezomib and dexamethasone (BD) induction for the newly diagnosed symptomatic multiple myeloma. *Int J Myeloma*. 4(1):7-12, 2014. 査読あり

URL:

http://www.jsm.gr.jp/files/journalpdf/2014_4_1_final2.pdf

2. Takashima S, Eto T, Shiratsuchi M, Hidaka M, Mori Y, Kato K, Kamezaki K, Oku S, Henzan H, Takase K, Matsushima T, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Akashi K, Teshima T. The Use of Oral Beclomethasone Dipropionate in the Treatment of Gastrointestinal Graft-versus-host Disease: The Experience of the Fukuoka BMT Group. *Intern Med*. In press. 査読あり

3. Eriguchi Y, Uryu H, Nakamura K, Shimoji S, Takashima S, Iwasaki H,

Miyamoto T, Shimono N, Hashimoto D, Akashi K, Ayabe T, Teshima T. Reciprocal expression of enteric antimicrobial proteins in intestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 19(10):1525-9, 2013. 査読あり
DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.07.027.

4. Miyamoto T, Yoshimoto G, Kamimura T, Muta T, Takashima S, Ito Y, Shiratsuchi M, Choi I, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Takamatsu Y, Teshima T, Akashi K. Combination of high-dose melphalan and bortezomib as conditioning regimen for autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *Int J Hematol.* 98(3):337-45, 2013. 査読あり
DOI: 10.1007/s12185-013-1402-0.

5. Kamimura T, Miyamoto T, Yokota N, Takashima S, Chong Y, Ito Y, Akashi K. Higher incidence of injection site reactions after subcutaneous bortezomib administration on the thigh compared with the abdomen. *Eur J Haematol.* 90(2):157-61, 2013. 査読あり
DOI: 10.1111/ejh.12055.

6. Kamimura T, Miyamoto T, Takashima S, Yokota N, Chong Y, Ito Y, Akashi K. Injection site reaction after subcutaneous administration of bortezomib in Japanese patients with multiple myeloma. *Int J Hematol.* 96(4):525-7, 2012. 査読あり
DOI: 10.1007/s12185-012-1167-x.

7. Mori Y, Miyamoto T, Kamezaki K, Kato K, Kikushige Y, Takashima S, Urata S, Shimoda S, Shimono N, Takenaka K, Iwasaki H, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K. Low incidence of adenovirus hemorrhagic cystitis following autologous hematopoietic stem cell transplantation in the rituximab era. *Am J Hematol.* 87(8):828-30, 2012. 査読あり
DOI: 10.1002/ajh.23247.

8. Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H, Shimoda S, Iwasaki H, Shimono N, Ayabe T, Akashi K, Teshima T. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α -defensins. *Blood.* 120(1):223-31, 2012. 査読あり
DOI: 10.1182/blood-2011-12-401166.

{ 学会発表 } (計 7 件)

1. 高嶋 秀一郎、門脇 賢典、上村 智彦、宮本 敏浩、吉本 五一、高瀬 謙、赤司 浩一、多発性骨髄腫に対する自家末梢血幹細胞移植後の地固め療法としての VTD 療法の安全性と有効性の検討、第 36 回日本造血細胞移植学会、2014 年 3 月 8 日、那覇

2. Shimoji S, Kato K, Tsujigiwa H, Eriguchi Y, Lee L, Uryu H, Takashima S, Hashimoto D, Akashi K, Teshima T. Graft-Versus-Host Disease Targets Ovary and Causes Infertility After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. The 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2013.12.07-10. New Orleans.

3. Uryu H, Shimoji S, Eriguchi Y, Takashima S, Kato K, Akashi K, Teshima T. Fungal cell wall component induces Th17 response and accelerates acute GVHD in lung. 第 75 回日本血液学会 学術集会、2013 年 10 月 12 日、札幌

4. Shuichiro Takashima, Tetsuya Eto, Motoaki Shiratsuchi, Michihiro Hidaka, Yasuo Mori, Koji Kato, Kenjiro Kamezaki, Seido Oku, Hideho Henzan, Ken Takase, Takamitsu Matsushima, Katsuto Takenaka, Hiromi Iwasaki, Toshihiro Miyamoto, Koichi Akashi, and Takanori Teshima. Oral beclomethasone dipropionate for treatment of gastrointestinal graft-versus-host disease: Experience of the Fukuoka BMT group. 第 75 回日本血液学会 学術集会、2013 年 10 月 12 日、札幌

5. 高嶋 秀一郎、加藤 光次、林 正康、浦田 真吾、菊繁 吉謙、牟田 毅、竹中 克斗、岩崎 浩己、宮本 敏浩、豊嶋 崇徳、赤司 浩一、同種移植後再発に対して Azacitidine 併用ドナーリンパ球輸注を行い、非血縁者間同種骨髄移植を実施した急性骨髄性白血病、第 35 回日本造血細胞移植学会、2014 年 3 月 9 日、金沢

6. Shuichiro Takashima, Toshihiro Miyamoto, Tomohiko Kamimura, Shingo Urata, Yoshikane Kikushige, Yong Chong, Yoshikiyo Ito, Koji Kato, Kazuki Tanimoto, Katsuto Takenaka, Hiromi Iwasaki, Takanori Teshima, and Koichi Akashi. Bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone (VCD) induction for symptomatic multiple myeloma. 第 74 回日本血液学会 学術集会、2012 年 10 月 21 日、京都

7. Shuichiro Takashima, Yoshihiro

Eriguchi, Nobuyuki Shimono, Tokiyoshi Ayabe, Koichi Akashi, and Takanori Teshima. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α -defensins. The ISSCR 10th Annual Meeting. 2012.06.15. Yokohama

〔図書〕(計1件)

安部 達生、谷脇 雅史、横田 昇平、日本医事新報社、New 専門医を目指すケース・メソッド・アプローチ血液疾患 2012 年、pp346-354 を分担執筆

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院 病態修復内科

<http://www.1nai.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高嶋 秀一郎 (Shuichiro Takashima)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70622116