

171. 組織幹細胞システム保護による次世代型造血幹細胞移植

豊嶋 崇徳

Key words : 造血幹細胞移植, 移植片対宿主病,
腸幹細胞, Paneth 細胞, 抗菌ペプチド

北海道大学 大学院医学研究科
内科学講座 血液内科学分野

緒言

同種造血幹細胞移植は難治性の白血病や骨髄不全症などに対して唯一の根治療法であるが、致命的な合併症である graft-versus-host disease (GVHD) や感染症が問題となる。GVHD は大きく急性と慢性に分けられ、急性 GVHD はドナー由来の T 細胞がレシピエント由来のアロ抗原を認識して、組織傷害をもたらす病態であり、消化管は急性 GVHD の代表的な標的臓器である。腸上皮細胞のターンオーバーはわずか 3 日程度であり、腸管粘膜によるバリア機能を保つためには持続的に腸幹細胞から再生され続ける必要がある。そして腸幹細胞を維持するにはニッチの一つである Paneth 細胞の存在が必要である¹⁾。しかし、消化管 GVHD はドナーのアロ反応性 T 細胞が腸陰窩基底部に存在する腸幹細胞を傷害することにより上皮再生機能を損なわせ、また Paneth 細胞も破壊し腸内微小環境を変化させる^{2,3)}。つまり、腸幹細胞-ニッチシステムの破綻による生体のホメオスタシスの破綻が GVHD の病態形成に関与する。さらに、Paneth 細胞は腸幹細胞のニッチであるだけでなく、内因性抗菌ペプチドを分泌し病原菌の増殖抑制や腸内細菌叢の制御を担っている。Paneth 細胞が分泌する内因性抗菌ペプチドの一つである α -defensin は、病原菌に対しては殺菌活性を有するが共生菌には活性を示さない選択的抗菌活性を有しており、健康な腸内細菌叢の維持に寄与している⁴⁾。我々は以前にマウスの移植モデルで腸上皮増殖因子 (R-Spondin1) を投与することにより移植前処置による消化管の傷害を軽減し消化管 GVHD の増悪を防ぐことを報告した⁵⁾が、新たに本研究において GVHD における腸幹細胞とニッチである Paneth 細胞の経時的变化と Paneth 細胞傷害による腸内微小環境の変化を検証し、組織幹細胞システム保護におけるニッチ細胞の役割について検証した。

方法および結果

1. マウスの移植モデルを用いた腸幹細胞と Paneth 細胞の経時的变化

移植マウスにおいて、移植前処置としての全身放射線照射や GVHD と、腸幹細胞傷害、Paneth 細胞傷害がどのように発生するのかを検討した。マウスの同種骨髄移植のモデルは、non-GVHD 群はドナー、レシピエントともに Jcl : BDF1 を使用し、GVHD 群はドナーを C57BL/6J、レシピエントを Jcl : BDF1 とした。Day 0 に致死量の全身放射線照射を行い、ドナーマウスの骨髄細胞 5×10^6 cells と脾細胞 5×10^6 cells をレシピエントマウスに尾静脈より輸注した。移植 day 4, day 7 に小腸の切片を作製し、H&E 染色にて Paneth 細胞数を比較したところ、GVHD 群は non-GVHD 群と比較して有意に Paneth 細胞が減少していた (図 1 A, B)。次にレシピエントマウスに *Lgr5-EGFP-ires-creERT* マウスを用いて同様の移植を行った。移植 day 4 の時点では移植前処置である全身放射線照射により non-GVHD 群、GVHD 群ともに腸幹細胞がほぼ消失していたが、Paneth 細胞は定常状態よりわずかに減少するものの両群で保たれていた (図 1 C)。しかし、移植 day 7 の時点では non-GVHD 群では腸幹細胞が回復しているのに対し、GVHD 群では腸幹細胞は消失したまま回復せず、ニッチである Paneth 細胞も著明な減少を来した (図 1 C)。つまり、腸幹細胞は移植前処置である全身放射線照射による傷害のため一時的に消失するが、GVHD を発症しない場合はニッチである Paneth 細胞が保たれるため移植 day 4 から day 7 にかけて腸幹細胞は回復可能であった。しかし、GVHD を発症した場合は、全身放射線照射による腸幹細胞傷害後にアロ反応性 T 細胞による Paneth 細胞傷害が加わり、ニッチの傷害により腸幹細胞は回復できず陰窩のアポトーシスを来すことが判明した。

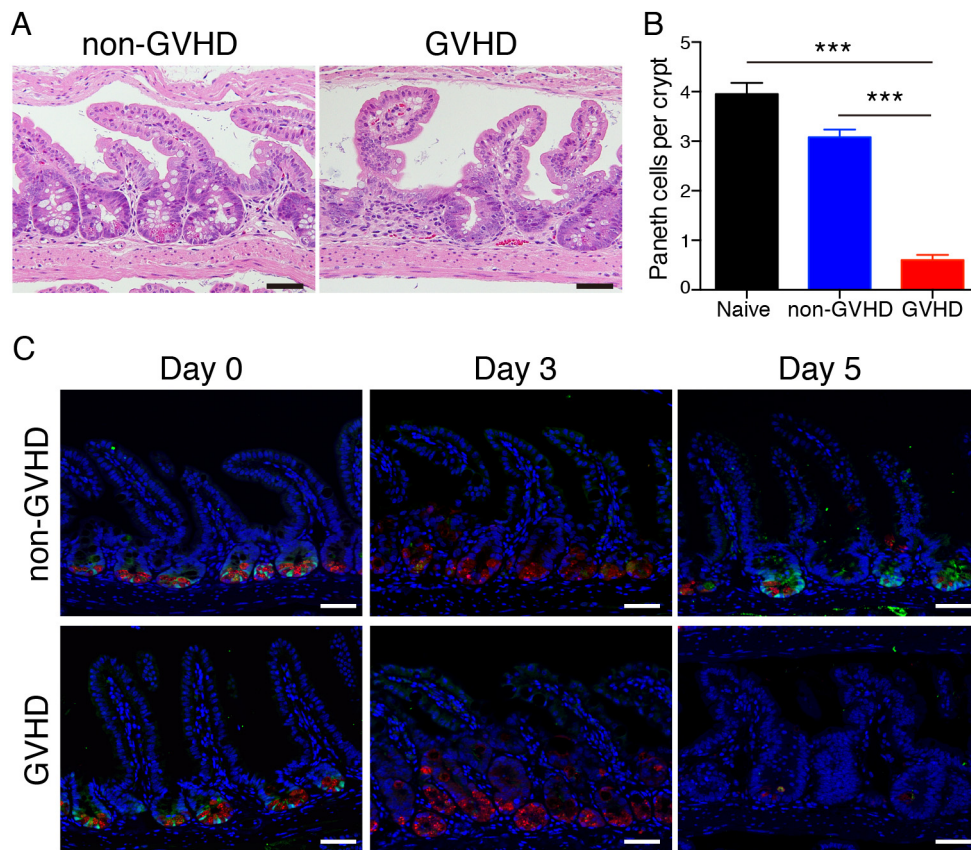


図1. マウスの移植モデルを用いた腸幹細胞と Paneth 細胞の経時的変化。

A) H&E 染色にて GVHD 群では Paneth 細胞が消失し上皮内へのドナー T 細胞の浸潤を認めるのに対し、non-GVHD 群では Paneth 細胞が保たれていた (Scale bar: 50 μ m). B) 移植 day 7 の Paneth 細胞数では、GVHD 群は定常状態、non-GVHD 群と比較して有意に減少していた (Naive, n=4; non-GVHD, n=4; GVHD, n=4; multiple comparison procedure, ***p < 0.001). C) Lysozyme (赤: Paneth 細胞) と Lgr5⁺GFP (緑: 腸幹細胞), DAPI (青) の蛍光免疫染色. Scale bar: 50 μ m. 移植 day 3 の時点で腸幹細胞は non-GVHD 群と GVHD 群の両方で消失した. 移植 day 5 の時点では、non-GVHD 群では腸幹細胞が回復したのに対し、GVHD 群では腸幹細胞の消失に加え Paneth 細胞の消失も加わり、陰窩アポトーシスを呈した.

2. GVHD の Paneth 細胞傷害による腸内細菌叢の変化

マウスの同種骨髄移植のモデルは、non-GVHD 群はドナー、レシピエントともに Jcl:BDF1 を使用し、GVHD 群はドナーを C57BL/6J、レシピエントを Jcl:BDF1 とした。Day 0 に致死量の全身放射線照射を行い、ドナーマウスの骨髄細胞 5×10^6 cells と脾細胞 5×10^6 cells をレシピエントマウスに尾静脈より輸注した。移植 day 7 にマウスの糞便を回収し T-RFLP 法にて腸内細菌叢の変化を検討した。Paneth 細胞が保たれる non-GVHD 群と比較して、著明な Paneth 細胞の減少を来した GVHD 群では腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) が認められた (図 2)。つまり、病原菌の増殖抑制や腸内細菌叢の制御をする Paneth 細胞の傷害は内因性抗菌ペプチドの分泌低下を来たすことから dysbiosis につながり、これにより感染症の発症やさらなる GVHD の増悪につながるものと考えられた。造血幹細胞移植において Paneth 細胞は腸幹細胞の保護と腸内細菌叢の維持の 2 つの点で非常に大きな役割を担っている。

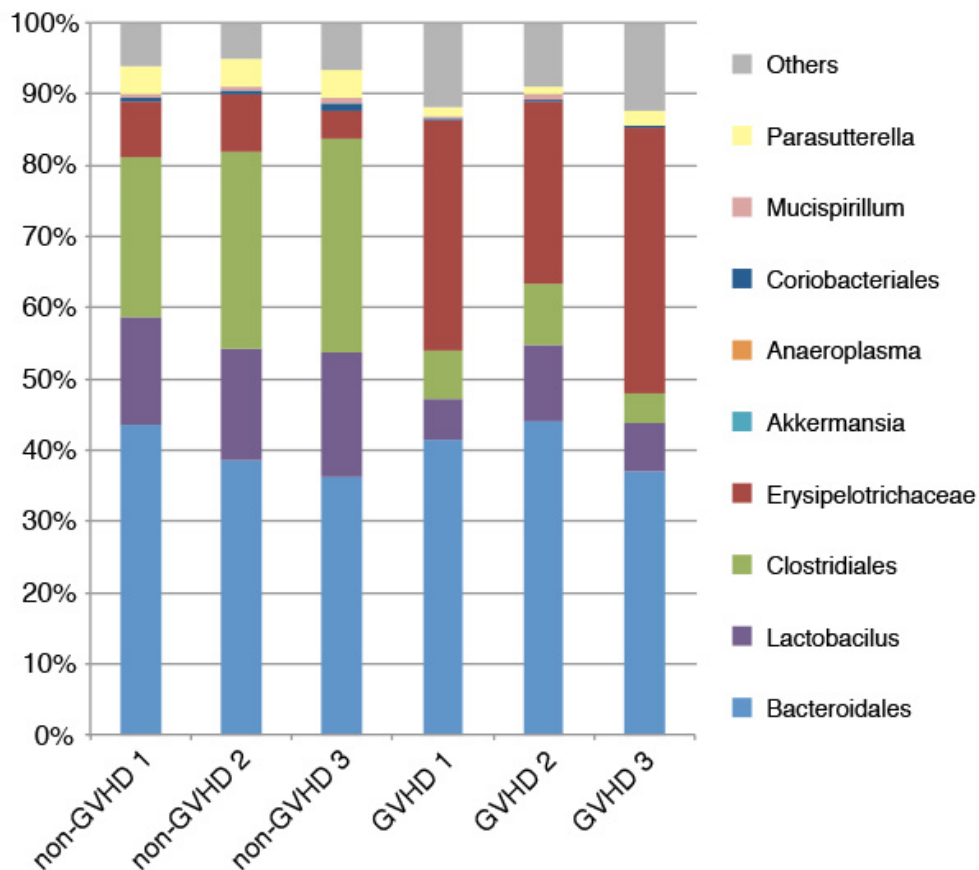


図2. GVHD における腸内細菌叢の変化.

移植 day 7 の推定菌群ピーク面積比. GVHD 群の腸内細菌叢は non-GVHD 群と異なり著明な dysbiosis を呈した.

考 察

造血幹細胞移植後の消化管 GVHD は腸管免疫システムの破綻と腸内細菌叢の変化をもたらし造血幹細胞移植の成績に影響を与えるが、今回我々は造血幹細胞移植における Paneth 細胞の維持には腸幹細胞の保護作用と腸内細菌叢の制御という2つの大きな役割があることを見出した。マウスの移植モデルに用いることによって、以前に我々が解明した移植前処置による消化管傷害を軽減し GVHD の増悪を防ぐ作用だけでなく、Paneth 細胞の減少を抑制することにより GVHD による腸内細菌叢の病的な変化を抑制し GVHD の増悪を防ぐ作用が求められる。

これまで骨髄抑制を伴う造血幹細胞移植においては抗菌薬による病原体の排除が重要視されてきたが、近年、移植経過中に共生菌や腸内細菌叢の多様性を維持すること、つまり共生エコロジシステムを維持することが GVHD の抑制において最も有効である可能性が示唆されている⁵⁾。このことから腸幹細胞とニッチである Paneth 細胞の保護作用は次世代型造血幹細胞移植の確立における重要な治療法の一つと考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究科内科学講座血液内科学分野の橋本大吾、早瀬英子、北海道大学大学院先端生命科学研究所細胞生物科学分野自然免疫研究室の綾部時芳、中村公則、および櫻木直也である。本研究の御支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M. & Clevers, H. : Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, **469** : 415-418, 2011.
- 2) Takashima, S., Kadowaki, M., Aoyama, K., Koyama, M., Oshima, T., Tomizuka, K., Akashi, K. & Teshima, T. : The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J. Exp. Med.*, **208** : 285-294, 2011.
- 3) 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** : 223-231, 2012.
- 4) Masuda, K., Sakai, N., Nakamura, K., Yoshioka, S. & Ayabe, T. : Bactericidal activity of mouse α -defensin cryptdin-4 predominantly affects noncommensal bacteria. *J. Innate Immun.*, **3** : 315-326, 2011.
- 5) Taur, Y., Jenq, R. R., Perales, M. A., Littmann, E. R., Morjaria, S., Ling, L., No, D., Gobourne, A., Viale, A., Dahi, P. B., Ponce, D. M., Barker, J. N., Giralt, S., van den Brink, M. & Pamer, E. G. : The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, **124** : 1174-1182, 2014.