

腸内細菌叢 dysbiosis と同種造血細胞移植後 GVHD を発症させる代謝チェックポイントに着目した

GVHD 新規発症機序の解明と新規治療法の開発

藤原英晃

岡山大学病院 血液腫瘍内科

【研究の背景】

高齢化社会に伴い血液悪性疾患数は増加しているが、根治療法である同種造血幹細胞移植は致死的な合併症である移植片対宿主病(以下 GVHD)を伴うため適応は限定される。近年、腸内細菌叢の乱れ(dysbiosis)と GVHD 悪化の関連性が報告されているが、意義は不明である。本研究は、腸上皮のミトコンドリア機能異常が dysbiosis を引き起こす新たな GVHD の機序を解明し、高齢化社会のニーズに合致する新たな GVHD を軽減した安全な移植法を開発することを目的とする。

申請者はこれまで、GVHD を研究テーマに、GVHD 発症に関わる T 細胞などの免疫担当細胞と、障害をうける組織のそれぞれの観点から研究を行ってきた¹⁻⁸⁾。免疫性疾患である GVHD の治療法として、免疫抑制剤が研究されてきたが、免疫抑制剤は感染症の増加と原病の再発に繋がるという課題を抱えている。このため、GVHD によって障害されている組織で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きた^{1, 4, 5, 8)}。組織が GVHD による障害を受けにくければ、つまり障害抵抗性があれば、GVHD が発症しても患者のダメージが少なく済む。この組織障害抵抗性をあげる治療法は、免疫抑制剤に頼らない、全く新しい方法であり、本視点で行う研究は、国内外において学術的に新規性が高い。

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おり、ヒトおよびマウスでも GVHD と腸内細菌叢の乱れ“dysbiosis”の関連性が報告されているが、その意義は不明である。申請者はこれまで、dysbiosis と腸管上皮細胞の関わりに着目し、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^{1, 4, 5)}。これらの研究から、1) dysbiosis により腸上皮細胞の栄養源である短鎖脂肪酸が低下する、2) dysbiosis は正常偏性嫌気性菌から通性嫌気性菌への腸内細菌叢の変化を特徴としている、3) 腸上皮細胞のミトコンドリア依存性アポトーシスが GVHD を調節する、ことに着目し、GVHD の発症に腸上皮細胞の酸素・エネルギー代謝が大きく関与していると考えた。予備実験により GVHD では、腸上皮細胞のミトコンドリアによる酸素消費量の低下のため腸管内酸素濃度が上昇し、これにより dysbiosis が誘導されており、特に細胞内エネルギー代謝チェックポイントであるミトコンドリア複合体 II(以下 MCII)が特異的に障害を受けていることが原因として示された。細胞代謝により組織障害抵抗性を維持することで、免疫学的障害から組織保護を試みる本研究は、細菌学、生化学、分子生物学、免疫学解析による複合的な観点から行われる研究であり、未知の GVHD 機序を検討するという世界的に独創的なものである。この観点より新たな GVHD のメカニズムを解明し新規予防・治療法を開発することにより、臓器機能の低下した高齢者にも骨髓移植を安全に行うことで血液悪性疾患を治療可能とする、社会のニーズに答えたい。

【目 的】

本研究では、申請者がこれまで明らかにしてきたミトコンドリア機能異常に着目し、細胞代謝を中心に生化学、分子生物学、免疫学解析により未知の GVHD 機序を解明し、新たな GVHD のメカニズムを解明し新規予防・治療法を開発することを目的とする。

【方 法】

急性 GVHD モデルとして BALB/c into C57BL/6、C3H.SW into C57BL/6 モデルを用いた。移植後 21 日目に腸管組織上皮細胞(大腸、小腸)および腎皮質を採取し、液体クロマトグラフィーを用いてミトコンドリア代謝物を中心としたメタボローム解析を行った。また、臓器特異的 MCII 障害を視覚化するために腸管(大腸、小腸)、肝臓、皮膚、腎臓、心臓といった GVHD 標的および非標的臓器に蛍光免疫染色および機能染色を行い MCII の障害の部位および程度を検討した。また、MCII はミトコンドリアにおける TCA 回路と電子伝達系をつなぐ hub(図1)であるため、その障害により細胞内エネルギー産生低下とミトコンドリア機能不全が予想される。このため、GVHD および非 GVHD マウスから単離した腸管上皮細胞を用いてエネルギー産生の指標である酸素消費量ならびにアデノシン三リン酸の測定を行った。

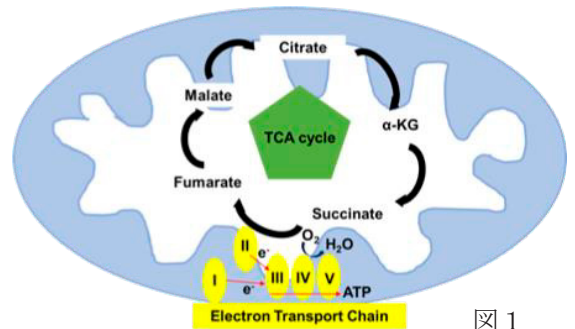


図 1

【結 果】

① ミトコンドリア代謝物の解析;

腸上皮細胞(標的)及び腎皮質細胞(非標的)細胞のミトコンドリアに関連する代謝物を液体クロマトグラフィーによるメタボローム解析を行なった。Lactate に関しては GVHD マウスと非 GVHD マウスでは有意差を認めなかった。Citrate、Malate、Fumarate といった TCA 回路関連代謝物に関しては GVHD 群では非 GVHD 群と比較して有意に低下しており、MCII により代謝される Succinate のみ有意差を持って上昇していた。対象となる GVHD 非標的臓器である腎臓ではこれら代謝物の相違は認められなかった。

② ミトコンドリア複合体 II の障害の臓器特異性の探索;

GVHD 発症マウスの GVHD 標的臓器(腸管、肝臓、皮膚)及び非標的臓器における MCII の機能および蛋白評価を酵素活性染色と蛍光免疫染色を行なった。GVHD 及び非 GVHD マウスより移植後 21 日目に摘出した各臓器(大腸、小腸、肝臓、皮膚、腎臓、心臓)を液体窒素により凍結し病理切片を作成。青色色素に Succinate を添加し、反応させた。Succinate が代謝された場合切片が濃青色に染色される。GVHD マウスの大腸小腸では染色性が低下していたが、GVHD マウスの腸管以外の臓器及び非 GVHD マウスでは濃青染色した。この結果より MCII は機能的に障害されていることが判明した。次に MCII の障害が機能的なものか、器質的なものかどうかを明らかにするため、MCII の成分である Succinate Dehydrogenase A (SDHA)を蛍光免疫染色で確認したところ、GVHD マウスの腸管上皮細胞でのみ SDHA のタンパク発現が低下しており、その他臓器及び非 GVHD マウスでは SDHA タンパクの発現は維持されていた。

③ ミトコンドリア複合体 II によるエネルギー代謝能の解析;

MCII はミトコンドリアにおける TCA 回路と電子伝達系をつなぐ hub であることから、MCII 障害はエネルギー産生に直接影響することが予想された。電子伝達系では酸素を利用したエネルギー産生を行なっている。このため、酸素消費量はミトコンドリアによるエネルギー産生と関連しており、細胞外フラックスアナライザーを用いて腸管上皮細胞における酸素消費量を測定した。GVHD 発症マウスから単離した腸上皮細胞は非 GVHD マウス由来の超上皮細胞 50%以下の酸素消費量であり、電子伝達系の各複合体に対する基質を添加して測定した場合 MCII における酸素消費量が著減していた。また、産生されたエネルギーを直接測定するためアデノシン三リン酸(ATP)を測定したところ、GVHD マウス由来腸管上皮で有意に低下しており、その程度は MCII 阻害剤である Malonate を添加した場合と同程度であった(図2)。

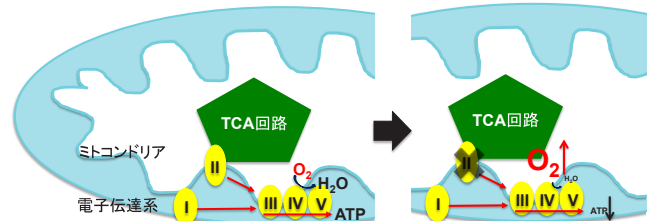


図 2

④ GVHD における薬理学的・遺伝学的手法を用いたミトコンドリア複合体 MCII 機能の解析;

In vivo における MCII が及ぼす影響を明らかにするため、MCII 阻害剤や、今までに報告されていない腸管上皮特異的 MCII 欠損したマウス(現在作成中)を用いて、マウス実験を行う予定にしている。しかしながら、現時点では十分に検討できておらず今後行う予定である。

【考 察】

これまでの研究では、GVHD と dysbiosis の関連性が広く報告されているが、発症機序及び根底にある病態生理を明らかにしたものはない。本研究では、GVHD による腸管上皮細胞障害、特に MCII 障害、が組織障害の中心であることを明らかにした。これまでの研究と合わせ、GVHD によるミトコンドリア MCII 障害→エネルギー不足及び酸素利用障害→腸管内酸素濃度上昇→dysbiosis→短鎖脂肪酸低下→インフラマソーム不活化→homeostasis 低下→GVHD 増悪といった負のサイクルに陥ることが考えられた(図3)。今後に関しては MCII 障害発症機序の解明を行い治療及び予防法の検討を行う予定である。また、ヒト GVHD 検体においても MCII 障害が GVHD に関与していることを検討する予定である。

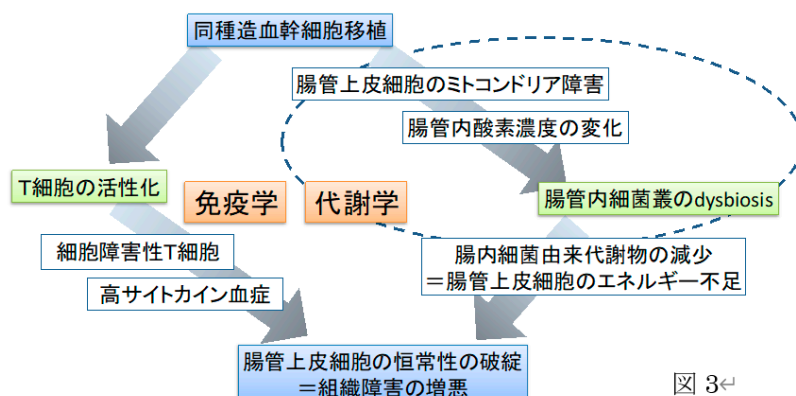


図 3←

【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまでの同種造血幹細胞移植後 GVHD 予防・治療は免疫細胞、特に T 細胞、を標的としたものであり、GVHD の過度な抑制は白血病等の悪性疾患の再発増加及び感染症を始めとする合併症の増加につながる。本研究は GVHD により障害される標的臓器、特に致死的な障害となりうる腸管上皮細胞における障害機序を明らかにするものであり、腸管上皮細胞を照準とした新たな予防・治療法開発への糸口となることが期待される。言い換えれば、免疫細胞に対する組織免疫寛容不全を予防・治療し、免疫抑制剤以外の方法で組織耐性を誘導することで、白血病の再発や感染症を低減し、高齢者にも安全な同種造血幹細胞移植法を可能にすることを期待する。また、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、「代謝免疫寛容」という分野を新たに開拓し、創造することにつながるのではないかと考える。

【参考・引用文献】

1. Toubai Tomomi, Fujiwara Hideaki, Rossi Corinne, Riwe Mary, Tamaki Hiroya, Zajac Cynthia, Liu Chen, Mathew Anna, Byun Jaeman, Oravec-Wilson Katherine, Matsuda Isao, Sun Yaping, Peltier Daniel, Wu Julia, Chen Jiachen, Seregin Sergey, Henig Israel, Kim Stephanie, Brabbs Stuart, Pennathur Subramaniam, Chen Grace, Reddy Pavan. Host NLRP6 exacerbates graft-versus-host disease independent of gut microbial composition. *Nat Microbiol.* 4:800-812, 2019.
2. Sun Yaping, Oravec-Wilson Katherine, Bridges Sydney, McEachin Richard, Wu Julia, Kim Stephanie, Taylor Austin, Zajac Cynthia, Fujiwara Hideaki, Peltier Daniel, Saunders Thomas, Reddy Pavan. miR-142 controls metabolic reprogramming that regulates dendritic cell activation. *J Clin Invest.* 129:2029-2042, 2019.
3. Toubai Tomomi, Tamaki Hiroya, Peltier Daniel, Rossi Corinne, Oravec-Wilson Katherine, Liu Chen, Zajac Cynthia, Wu Julia, Sun Yaping, Fujiwara Hideaki, Henig Israel, Kim Stephanie, Lombard David, Reddy Pavan. Mitochondrial Deacetylase SIRT3 Plays an Important Role in Donor T Cell Responses after Experimental Allogeneic Hematopoietic Transplantation. *J Immunol.* 201:3443-3455, 2018.
4. Fujiwara Hideaki, Docampo Melissa, Riwe Mary, Peltier Daniel, Toubai Tomomi, Henig Israel, Wu Julia, Kim Stephanie, Taylor Austin, Brabbs Stuart, Liu Chen, Zajac Cynthia, Oravec-Wilson Katherine, Sun Yaping, Núñez Gabriel, Levine John, van den Brink Marcel, Ferrara James, Reddy Pavan. Microbial metabolite sensor GPR43 controls severity of experimental GVHD. *Nat Commun.* 9:3674, 2018.
5. Mathewson Nathan, Jenq Robert, Mathew Anna, Koenigsnecht Mark, Hanash Alan, Toubai Tomomi, Oravec-Wilson Katherine, Wu Julia, Sun Yaping, Rossi Corinne, Fujiwara Hideaki, Byun Jaeman, Shono Yusuke, Lindemans Caroline,

- Calafiore Marco, Schmidt Thomas, Honda Kenya, Young Vincent, Pennathur Subramaniam, van den Brink Marcel, Reddy Pavan. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat Immunol.* 17:505–513, 2016.
6. Fujiwara Hideaki, Maeda Yoshinobu, Sando Yasuhisa, Nakamura Makoto, Tani Katsuma, Ishikawa Tatsunori, Nishimori Hisakazu, Matsuoka Ken-ichi, Fujii Nobuharu, Kondo Eisei, Tanimoto Mitsune. *Transfusion*. Treatment of thrombotic microangiopathy after hematopoietic stem cell transplantation with recombinant human soluble thrombomodulin. 56:886–92, 2016.
7. Okamoto Sachiyo, Fujiwara Hideaki (SO and HF contributed equally), Nishimori Hisakazu, Matsuoka Ken-ichi, Fujii Nobuharu, Kondo Eisei, Tanaka Takehiro, Yoshimura Akihiko, Tanimoto Mitsune, Maeda Yoshinobu. Anti-IL-12/23 p40 antibody attenuates experimental chronic graft-versus-host disease via suppression of IFN- γ /IL-17-producing cells. *J Immunol.* 194:1357–63, 2015.
8. Fujiwara Hideaki, Maeda Yoshinobu, Kobayashi Koichiro, Nishimori Hisakazu, Matsuoka Ken-ichi, Fujii Nobuharu, Kondo Eisei, Tanaka Takehiro, Chen Lieping, Azuma Miyuki, Yagita Hideo, Tanimoto Mitsune. Programmed death-1 pathway in host tissues ameliorates Th17/Th1-mediated experimental chronic graft-versus-host disease. *J Immunol.* 193:2565–73, 2014.