

## 塩分と腸内細菌叢による移植片対宿主病の病態解明と治療法確立

藤原 英晃<sup>1</sup>, 前田 嘉信<sup>2</sup>, 西森 久和<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 岡山大学病院血液・腫瘍内科, <sup>2</sup> 岡山大学学術研究院医歯薬学域・血液・腫瘍・呼吸器内科学

**概要** 同種造血幹細胞移植(以下, 同種移植)は, 白血病等の根治的治療法だが, 重篤な合併症としてドナーの T 細胞が患者の正常臓器を攻撃する GVHD と呼ばれる免疫反応が約 4 割の患者に起こり, 同種移植成功への最大の障壁となっている。同種移植前に用いる抗がん剤や放射線照射により約 8 割の患者が一時的に経口摂取困難となり経静脈栄養(TPN)を受ける。粘膜障害の回復とともに経口摂取が可能となるが, この間に *dysbiosis* の完成や GVHD の発症を来すため, 経口・経腸栄養療法が試みられているが, その効果ははっきりとしない。

その中で, *sucrose* を主体とする栄養はリンパ球や好中球の回復を促進することが明らかとなっているが, 通常の食生活に多く含まれる塩分(NaCl)が同種移植下の生理機能や腸内細菌叢に及ぼす影響は不明である。過剰な塩化ナトリウムにより, ①免疫制御性 T 細胞(Treg)の減少と炎症性 Th17 細胞(Th17)の増加, ②GVHD 患者と同様の腸内細菌叢 *dysbiosis* を誘発による短鎖脂肪酸の低下, ③短鎖脂肪酸減少によるヒストン脱アセチル化による遺伝子発現低下, ④糖質ステロイド増加による免疫抑制作用等が明らかにされている。

これまで高塩分食による全身への影響は様々な検討がなされているが, 塩分摂取 0 の状態が腸内細菌ならびに全身免疫に及ぼす影響は不明である。このため, 本研究では骨髄移植マウスモデルを用いて, 経口摂取不良に伴う NaCl 欠乏が同種移植に及ぼす影響・病態を明らかにし, NaCl の適切な補充により同種造血幹細胞移植療法の成績向上につなげることを目的としている。

GVHD 発症マウスでは, 適量の NaCl は免疫細胞よりも腸管組織の障害低減に伴い, 同種造血幹細胞療法の合併症を低減する可能性が示唆された。免疫細胞に影響を与えないことは, 免疫抑制剤による GVHD 予防が不要であり, 免疫細胞機能の維持による抗腫瘍効果を発揮する一方で, 免疫抑制非依存性に, 正常組織障害である GVHD を低減させたより安全かつ有効な造血幹細胞移植療法の可能性が示唆された。

### 1. 研究目的

加齢に伴い造血幹細胞へ遺伝子異常が蓄積するため, 高齢化社会では白血病などの血液悪性疾患が増加し, 健康寿命を短縮させる重大な要因となる。事実, 高齢者の血液悪性疾患は年間 36000 例(2015 年)と増えており, 白血病は 70 歳以上の日本人における最も死亡率の高い難病である。骨髄移植などの同種造血幹細胞移植(以下 同種移植)は, 血液悪性疾患に治癒をもたらす根治的治療法であり, 近年の医療進歩により高齢者にも実施が可能となっている。しかし, 同種移植に伴う重篤な合併症として, ド

ナーの T 細胞が患者の正常臓器を攻撃する GVHD と呼ばれる免疫反応が約 4 割の患者に起こる。GVHD が発症すると皮膚, 肝臓, 腸管が障害される。腸管 GVHD は特に重症化し高齢者では致命的となるため, 移植成功への最大の障壁となっている<sup>(1, 2)</sup>。T 細胞を抑制する免疫抑制剤が GVHD の治療に用いられるが, その効果は限定的であり, かつ免疫力の低下が白血病の再発に繋がるため, 新たな治療法の開発が喫緊の課題となっている。しかし, 治療法開発のための GVHD の病態解明はまだ十分では

なく、また、なぜ皮膚、肝臓、腸管が障害され他の臓器が障害されないのか全く不明である。

ヒトの腸管、特に大腸には多様な腸内細菌が生息し、生体の恒常性維持に重要な役割を担っている。この腸内細菌叢の乱れや多様性の減少(以下 *dysbiosis*)は炎症性腸疾患など様々な疾患との関連が発見され、その重要性に注目が高まっている。*dysbiosis* と GVHD との関連も報告されつつある<sup>(3,4)</sup>。申請者は腸内細菌叢の代謝産物に注目し、GVHD が発症し *dysbiosis* を起こした場合には、正常腸内細菌叢由来の代謝産物である短鎖脂肪酸が減少していることを見出した(図1)<sup>(5)</sup>。インフラマソームは、感染や傷害に伴う危険シグナルに応答して炎症の惹起を制御する細胞内の分子複合体であるが、腸管上皮細胞における短鎖脂肪酸受容体を介するインフラマソームの活性化が、細胞障害を軽減し GVHD を改善することを明らかにした(図1)<sup>(6,7)</sup>。また、同種移植後に患者の腸内細菌叢が偏性嫌気性菌から大腸菌や腸球菌などの酸素存在下

で生存可能な好気性細菌や通性嫌気性細菌へ変化することに着目し、*dysbiosis* は腸管内の酸素濃度の変化から誘導されたものであり、腸管上皮細胞内ミトコンドリア機能異常による腸管内酸素濃度の変化が *dysbiosis* の発生に大きく関与しており、ミトコンドリア機能異常が腸上皮細胞の恒常性を破綻させ、GVHD が増悪していることを明らかにしている<sup>(8)</sup>。つまり、ミトコンドリア機能異常 → *dysbiosis* → 短鎖脂肪酸の減少 → インフラマソームの不活性化 → 腸管細胞の恒常性の破綻 → GVHD 増悪という一連の流れを解明した(図2)。また、ミトコンドリア機能異常 → 細胞内酸素利用量低下 → 腸管内酸素濃度上昇 → *dysbiosis* 発生の組織環境原因であることから明らかにし、鉄キレート剤を用いた腸管内酸素濃度減少による *dysbiosis* 改善と組織障害低減を明らかにしている<sup>(9)</sup>。しかしながら、これらの解明は複雑な病態のごく一部を明らかにしたのみであり、依然として実臨床では免疫抑制剤による不十分な治療法以外に有効な治療・予防法が確立されていない。

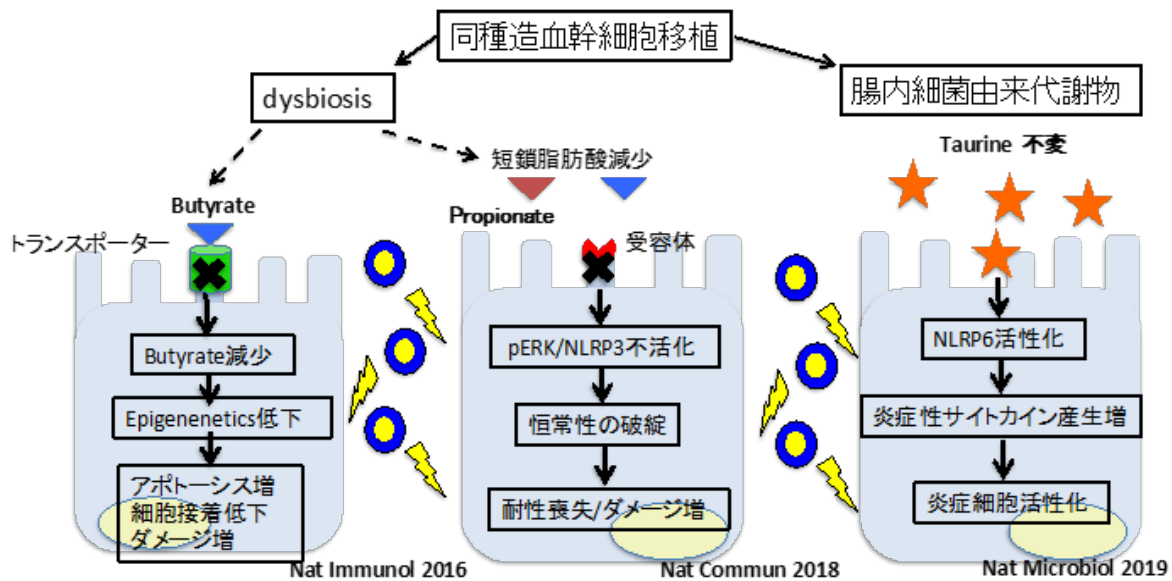


図1 同種造血幹細胞移植と *dysbiosis* が腸管上皮細胞に及ぼす影響

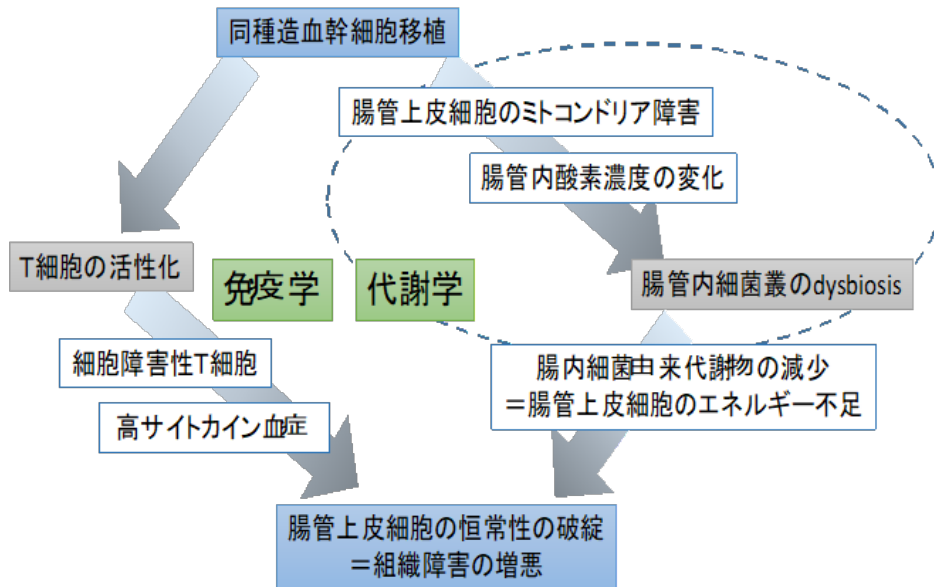


図2 同種造血幹細胞移植におけるミトコンドリア障害に由来する dysbiosis 発症機序とその影響

同種造血細胞移植による抗がん剤や放射線の使用により約 8 割の患者が一時的に経口摂取困難となり経静脈栄養 (TPN) を受ける。粘膜障害の回復とともに経口摂取が可能となるが、特に高齢者は回復にはかなりの時間を要する。この間に dysbiosis の完成や GVHD の発症を来すため、予防として経口・経腸栄養療法が試みられているがその効果は確立されておらず、障害粘膜への食物による刺激によって下痢の増加につながるため経口摂取は避けられることがほとんどである。その中で、sucrose を主体とする腸管栄養はリンパ球や好中球の回復を促進すること、glutamine を主体とする腸管栄養は障害腸管粘膜の回復とリンパ球の回復へ寄与することが明らかとなっている<sup>(10, 11)</sup>。にもかかわらず生存率や GVHD 発症率の低下といった臨床成績への寄与はほとんど認められていない。一方で、通常の食生活に多く含まれる塩分 (特に塩化ナトリウム) が同種移植下の生理機能や腸内細菌叢に及ぼす影響は不明である。過剰な塩化ナトリウムにより、①免疫制御性 T 細胞 (Treg) の減少と炎症性 Th17 細胞 (Th17) の増加<sup>(12, 13)</sup>、②GVHD 患者と同様の腸内細菌叢 dysbiosis を誘発による短鎖脂肪酸の低下<sup>(14)</sup>、③短鎖脂肪酸減少によるヒストン脱アセチル化による遺伝子発現低下<sup>(6)</sup>、④糖質ステロイドとの関連<sup>(15)</sup> 等が明らかにされている。これまで高塩分食による全身への影響は様々な検討がなされているが、塩分摂取 0 の状態が腸内細菌ならびに全身免疫に及ぼす

影響は全く不明である。これらの観点から、経口接種不良に伴う塩化ナトリウム欠乏が同種移植に及ぼす影響・病態を明らかにし、塩化ナトリウムの適切な補充により、良好な組織恒常性の維持及び腸内細菌叢により、免疫抑制剤に依存しすぎない GVHD 予防・治療法の開発を最終的な目標とする。

## 2. 研究方法

以下の急性・慢性 GVHD マウスモデルを用いて、実験及び検討を行った。

### 急性 GVHD マウスモデル:

C57BL/6 マウス由来骨髄細胞 ( $5 \times 10^6$  個) + CD90.2 陽性脾臓リンパ球 ( $1 \times 10^6$  個) をドナー細胞として、合計 8 Gy (2 分割照射) の全身放射線照射による前処置を行った C57BL/6 レシピエントマウス (syngeneic; 非 GVHD) と BALB/c レシピエントマウス (allogeneic; GVHD) に骨髄移植を行ったのち、急性 GVHD スコア、生存率を観察する。

### 慢性 GVHD マウスモデル:

B10.D2 マウス由来骨髄細胞 ( $5 \times 10^6$  個) + CD90.2 陽性脾臓リンパ球 ( $2.5 \times 10^6$  個) をドナー細胞として、合計 7 Gy の全身放射線照射による前処置を行った B10.D2 レシピエントマウス (syngeneic; 非 GVHD) と BALB/c レシピエントマウス (allogeneic; GVHD) に骨髄移植を行ったのち、慢性 GVHD スコア、生存率を観察する。

## 2. 1 ナトリウム経口補充による GVHD 増悪有無の検討

同種移植後にはマウスの経口摂取が一時的に低下する。経口摂取の低下する移植後 0 日-14 日にマウス経口食餌摂取量にあたる 1.5 g/kg/day を基準とした塩化ナトリウムを経口補充し、生存率・体重減少率・GVHD 重症度を検討する。また、対照としてナトリウム 0, 15 g/kg/day を用いて塩化ナトリウムが及ぼす影響を検討する。ナトリウムの生理的摂取量が GVHD に与える影響の有無を検討しナトリウムの重要性を確認する。

## 2. 2 ナトリウムが及ぼす免疫能回復の検討

経口摂取低下に伴う sucrose の低下はリンパ球や好中球の免疫能の回復を遅延させていることが報告されている<sup>(11)</sup>。塩化ナトリウム経口補充により同種移植後の免疫能の回復、特に GVHD を引き起こす Th17 細胞や GVHD を抑制する Treg 細胞増減の有無を、血液、脾臓、肝臓等から抽出して検討する。また、細胞数に変化がない場合も塩化ナトリウムは Treg 細胞の機能抑制を起こすため、機能評価も行う。感染症を防ぐ好中球などの骨髄系細胞に関しても血液、脾臓、肝臓等から抽出して検討する。これらの結果より、ナトリウムによる同種移植後の免疫能回復促進効果の有無を検討する。

## 2. 3 ナトリウムによる免疫能回復及び GVHD 改善機序の解明

同種移植後にナトリウム補充をすることで GVHD 改善及び免疫能を回復させる機序として以下の点が挙げられる。

①ナトリウム補充に伴う腸管上皮機能の改善;長期にわたる経口接種不良に伴う腸管絨毛の萎縮及び腸管バリア機能の改善を検討する。病理学的腸管絨毛長の改善及び上皮間接着因子である Zo-1/2, JAM-1, Occludin, Claudin といったタンパク発現を検討する。腸管上皮の機能改善により Bacterial Translocation の減少を確認する目的で Dextran Assay や血中 LPS 量の測定を行う。

②ナトリウム関連転写因子である Nuclear factor of activated T cells 5 (NFAT5) は免疫細胞の活性化を引き起こすため、リンパ球、骨髄系細胞、腸管細胞それぞれにおける NFAT5 発現及び機能の検討を行う<sup>(16)</sup>。NFAT5 欠損マウスを使用することで、特異的に塩分との関連性を検討する。

③腸内細菌叢の改善に伴う短鎖脂肪酸増加が及ぼすヒストン脱アセチル化阻害による遺伝子発現の改善;リンパ球、

骨髄系細胞及び腸管上皮細胞におけるヒストンアセチル化阻害を、Western blot 法を用いて確認する。

## 2. 4 ナトリウム経口補充による腸内細菌叢の変化および特徴的な細菌の同定

GVHD マウスに、減量、適量及び過量の塩化ナトリウムを投与し、同種移植後腸内細菌叢 dysbiosis の変化を検討する。非移植マウスや GVHD を発症しない同系移植マウスにおける塩化ナトリウム投与群を対照とし、同種移植における塩分量が及ぼす腸内細菌叢への影響を検討する。また、同種移植時には、易感染性に対する複数の抗生物質投与により腸内細菌叢の乱れが必発である。抗生剤投与をおこなった GVHD マウスに塩化ナトリウムを補充することで腸内細菌叢に対する影響を確認する。Dysbiosis の改善が認められた場合は、特徴的な細菌の同定を行い腸管生理機能へ与える影響、特に短鎖脂肪酸をはじめとする細菌由来代謝物の metabolome 解析を中心に検討する。

## 3. 研究結果と考察

### 3. 1 ナトリウム経口補充による GVHD 増悪有無の検討

急性 GVHD マウスモデルを用いて、ナトリウム無投与(対照群)、ナトリウム少量投与(0.15 g/kg/day; 20 mg マウスあたり 3 mg)、ナトリウム投与(1.5 g/kg/day; 20 mg マウスあたり 30 mg)を行ったところ、ナトリウム投与群では GVHD の有無にかかわらず対照群と比較して生存率の低下を認めた。一方で、少量投与群は対照群と比較して投与期間中は生存率が改善していたものの投与終了後には同程度となった(図 3)。GVHD 重症度は少量投与群では投与中に改善を認めたが、投与終了後には対照群と同程度となった(図 3)。急性 GVHD モデルでは、ナトリウム投与量が多い場合はそのメリットが得られず過負荷になること、少量投与により炎症低減効果があるのではないかと推定された。慢性 GVHD マウスモデルにおけるナトリウム投与の影響に関しては、対照群・少量投与群・ナトリウム投与群のいずれも差は認めなかった。GVHD 重症度も同様であり、慢性 GVHD ではナトリウム摂取量の影響は少ないことが考えられた。これらは、急性炎症による食事摂取低下が急性 GVHD モデルマウスでは顕著だが、慢性 GVHD マウスモデルでは急性炎症そのものが軽いため食事摂取に影響が見られなかったことに起因したと思われる。

上記結果から急性 GVHD モデルにおいては移植前処置の毒性及び急性免疫反応の強さから、食事摂取に対す

る影響と組織障害の重症度が高く、ナトリウムによる効果が認められるのではないかと考えられた。

### 3. 2 ナトリウムが及ぼす免疫能回復の検討

3. 1の結果から、急性 GVHD におけるナトリウム投与の効果が期待されるため、今後は急性 GVHD モデルを用いたナトリウム投与の影響を検討することとした。急性 GVHD では過剰な免疫反応による組織障害のため CD4/8 T 細胞の増加と制御性 T 細胞の低下を特徴としている。少量ナトリウム投与による全身性炎症の低下の可能性を検討し、レシピエントマウスから採取した血液、脾臓、肝臓における血液細胞ならびにリンパ球の比較を GVHD の改善が認められている移植後 21 日目に行った(図 4)。対照群と比較したところ、ナトリウム少量投与群、ナトリウム投与群のいずれもリンパ球数の増加、サイトカイン産生能の上昇、制御性 T の細胞減少に関して対照群と同程度であった。移植後 7 日目のデータでも同程度であることから、ナトリウムの投与は同種反応性リンパ球の数・質に影響を与えないことが判明した。

### 3. 3 ナトリウムによる免疫能回復及び GVHD 改善機序の解明

少量ナトリウム投与による GVHD 改善の影響は、免疫能に与える影響ではないことが考えられた。急性 GVHD

は腸管の障害を契機に誘導・発症されることが判明しており、少量ナトリウムによる GVHD の軽減はナトリウムによる腸管の機能改善・障害低減によるものではないか？と考えている。このため、現在 GVHD 改善機序の解明として上皮間接着因子である Zo-1/2, JAM-1, Occludin, Claudin といったタンパク発現を免疫染色で核確認中である。また、腸管上皮の機能改善による Bacterial Translocation の減少を確認する目的で Dextran Assay や血中 LPS 量の測定を行う予定にしている。NFAT が与える影響も否定はできないが、免疫細胞の数・質の相違は認められなかったため、優先度は低いと考える。

### 3. 4 ナトリウム経口補充による腸内細菌叢の変化および特徴的な細菌の同定

これまでの研究からは高濃度ナトリウムは dysbiosis を誘導することが判明している。一方で、本研究から少量ナトリウム投与により GVHD の軽減が示唆されていることから、腸内細菌叢の変化及び特徴的な細菌の同定を行うことで、関連する細菌由来代謝物である短鎖脂肪酸等の腸管上皮細胞に有益な代謝物 metabolite の同定、さらには metabolite 及ぼす正の影響(短鎖脂肪酸の場合ヒストン脱アセチル化阻害効果による遺伝子発現の改善を、Westernblot 法を用いて確認する)を調べることを検討している。

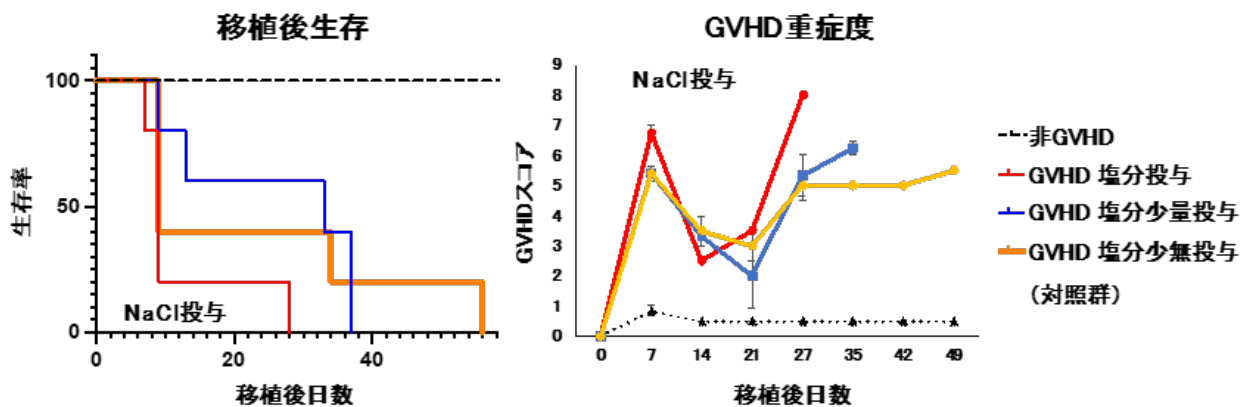


図 3 急性 GVHD モデルにおける NaCl 投与の影響

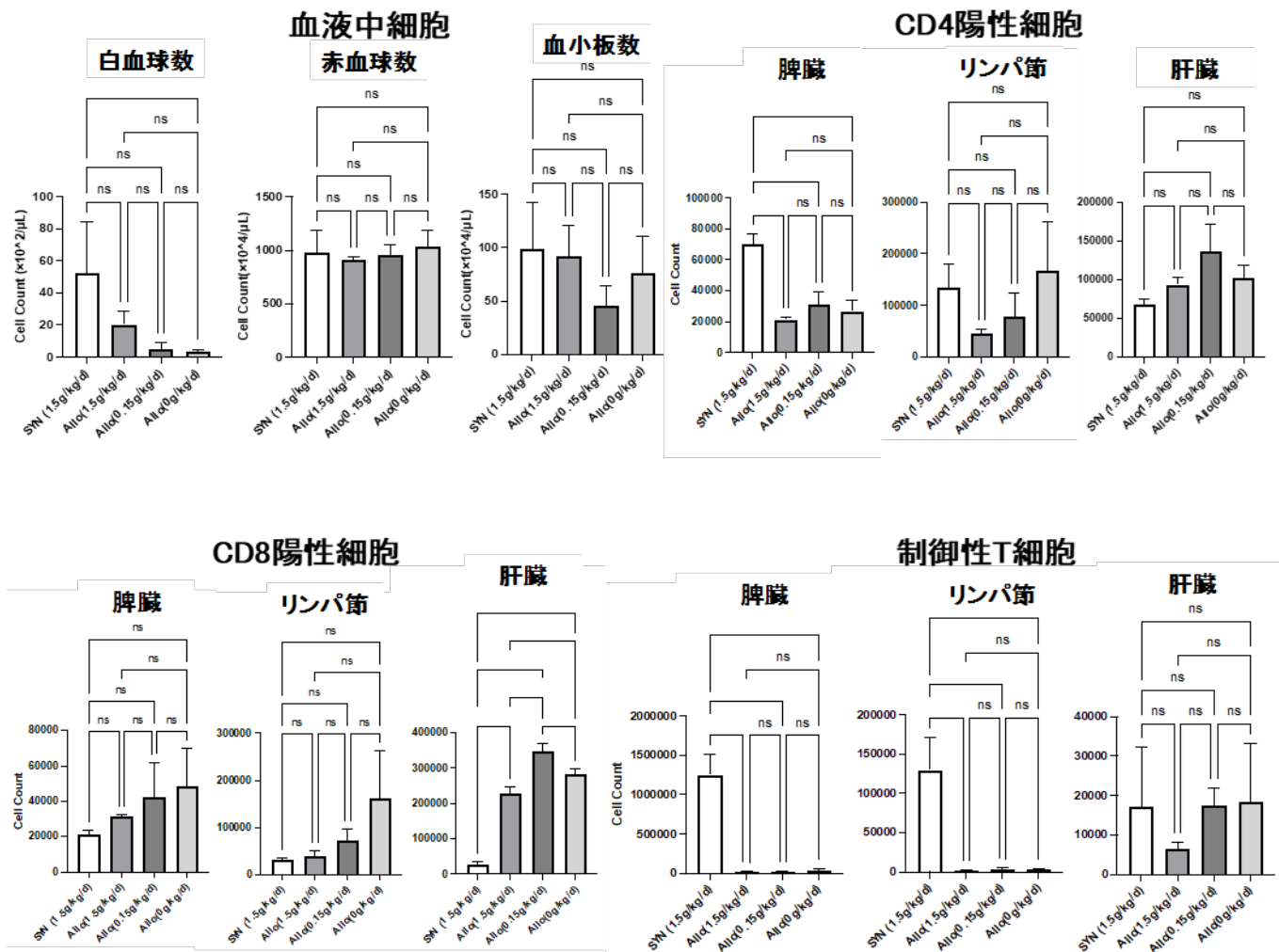


図4 急性GVHDモデルにおける移植後21日目の免疫細胞の変化

#### 4. 今後の課題

同種造血幹細胞移植における経口摂取の重要性は腸内細菌や腸管細胞の機能、免疫細胞の回復の観点から非常に重要である。本研究では少量の塩分の経口摂取はGVHDを改善する可能性が示されたものの、長期的な臨床データは得られていない。現時点では少量投のナトリウム投与中は経口摂取不良時期において免疫細胞の再構築に影響を与えることはなく、むしろ塩分と直接接する腸管組織への影響が示唆されている。しかしながら、現時点では腸管組織の障害がどのように低減しているか(上皮機能の改善やエピゲノム作用等)は明らかとなっていない。また、塩分が腸内細菌叢に与える影響も明らかにすることで、metaboliteに由来する物質の同定につなげることができると考える。塩分の投与のみならず正の効果を及ぼす細菌の投与もしくは細菌由来代謝物を同時に投与するこ

とでシナジー効果を期待できるのではないかと考える。今後はこれらを明らかにし塩分の至適投与量並びに投与期間、細胞障害低減機序を解明する予定にしている。最終的には、経口摂取不良に伴う塩分欠乏が同種造血幹移植に及ぼす影響・病態を明らかにし、塩分の適切な補充による同種造血幹細胞移植療法の成績向上を目標とする。

#### 5. 終わりに

本研究課題は、岡山大学大学院血液・腫瘍内科山本晃助教の協力を得て実施しました。助成いただきました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に深く感謝申し上げます。

#### 6. 文献

1. R. Zeiser, B. R. Blazar, Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. N Engl J Med 377, 2565-2579 (2017).

2. R. Zeiser, B. R. Blazar, Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med* 377, 2167-2179 (2017).
3. K. A. Markey et al., The microbe-derived short-chain fatty acids butyrate and propionate are associated with protection from chronic GVHD. *Blood* 136, 130-136 (2020).
4. J. U. Peled et al., Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 382, 822-834 (2020).
5. N. D. Mathewson et al., Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 17, 505-513 (2016).
6. H. Fujiwara et al., Microbial metabolite sensor GPR43 controls severity of experimental GVHD. *Nat Commun* 9, 3674 (2018).
7. T. Toubai et al., Host NLRP6 exacerbates graft-versus-host disease independent of gut microbial composition. *Nat Microbiol* 4, 800-812 (2019).
8. H. Fujiwara et al., Mitochondrial complex II in intestinal epithelial cells regulates T cell-mediated immunopathology. *Nat Immunol* 22, 1440-1451 (2021).
9. K. Seike et al., Ambient oxygen levels regulate intestinal dysbiosis and GVHD severity after allogeneic stem cell transplantation. *Immunity* 56, 353-368.e356 (2023).
10. H. O. da Gama Torres et al., Efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition on short-term survival following allo-SCT: a randomized study. *Bone Marrow Transplant* 41, 1021-1027 (2008).
11. A. Staffas et al., Nutritional Support from the Intestinal Microbiota Improves Hematopoietic Reconstitution after Bone Marrow Transplantation in Mice. *Cell Host Microbe* 23, 447-457.e444 (2018).
12. A. L. Hernandez et al., Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Clin Invest* 125, 4212-4222 (2015).
13. J. Matthias et al., Salt generates antiinflammatory Th17 cells but amplifies pathogenicity in proinflammatory cytokine microenvironments. *J Clin Invest* 130, 4587-4600 (2020).
14. Y. Li et al., High-Salt Diet-Induced Gastritis in C57BL/6 Mice is Associated with Microbial Dysbiosis and Alleviated by a Buckwheat Diet. *Mol Nutr Food Res* 64, e1900965 (2020).
15. S. G. Turnamian, H. J. Binder, Regulation of active sodium and potassium transport in the distal colon of the rat. Role of the aldosterone and glucocorticoid receptors. *J Clin Invest* 84, 1924-1929 (1989).
16. M. Vaeth et al., Selective NFAT targeting in T cells ameliorates GvHD while maintaining antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 1125-1130 (2015).

## The Role of Salt and Microbiota in the Pathophysiology of GVHD

Hideaki Fujiwara<sup>1</sup>, Hisakazu Nishimori<sup>1</sup>, Yoshinobu Maeda<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Okayama University Hospital, Hematology and Oncology,

<sup>2</sup> Okayama University Graduate School of Medicine, Hematology, Oncology and Respiratory Meidcine

### Summary

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) is a curative treatment for leukemia and other diseases. However, a serious complication, an immune reaction called graft-versus-host disease (GVHD), in which donor T cells attack normal organs, occurs in about 40% of patients and is the biggest barrier to a successful allogeneic transplant. About 80% of patients are temporarily unable to take oral intake due to anticancer agents or irradiation prior to allogeneic transplantation and receive total parenteral nutrition (TPN). Although oral intake becomes possible with recovery of mucosal damage, completion of dysbiosis and development of GVHD occur during this period, and oral and enteral nutritional therapy has been tried, but its efficacy is not clear. Among them, it is clear that sucrose-based nutrition promotes lymphocyte and neutrophil recovery, but the effects of salt (NaCl), which is abundant in the normal diet, on physiological functions and intestinal flora under alloHSCT are unknown. Excessive sodium chloride causes (1) a decrease of immunoregulatory T cells (Treg) and an increase of inflammatory Th17 cells (Th17), (2) a decrease of short-chain fatty acids by inducing dysbiosis of the intestinal microbiota similar to GVHD patients, (3) a decrease in gene expression due to histone deacetylation by decreasing short-chain fatty acids, and (4) immunosuppressive effects due to increased carbohydrate and steroid levels. Although various studies have examined the systemic effects of high-salt diets, the effects of zero salt intake on intestinal bacteria and systemic immunity are unknown. In mice with GVHD, adequate NaCl supplementation is more effective in reducing damage to intestinal tissues than to immune cells, suggesting that NaCl may reduce complications of alloHSCT with reduced damage to intestinal tissues. The lack of effects on immune cells suggests the possibility of a safer and more effective HSCT therapy that reduces GVHD, a normal tissue disorder, in an immunosuppression-independent manner while providing an antitumor effect by maintaining immune cell function, without the need for GVHD prophylaxis with immunosuppressive agents.