

## 論文の内容の要旨

論文題目：経気道的間葉系幹細胞移入による肺線維症の治療開発に関する研究

氏名：中島拓弥

### 背景

線維化は組織損傷の治癒における重要な過程である。しかし、損傷・修復・治癒にかけての過程が破綻すると、傷害部位に線維芽細胞や筋線維芽細胞が分泌する I 型コラーゲンをはじめとした細胞外基質が過剰に沈着し、臓器線維症が引き起こされる。臓器線維症は多岐の臓器に渡り、先進国の死因の 45% が線維症に関係している。慢性的な進行性の間質性肺疾患の 1 つである特発性肺線維症 (IPF) は、難治性であり予後不良である。IPF の治療として支持療法や薬剤療法、肺移植が行われているが根治には遠く及ばない。近年、がんや慢性炎症性疾患、線維化疾患など、従来の薬剤療法では治療が困難な難治性疾患に対して、細胞療法への期待が高まっている。慢性炎症性疾患や、臓器の機能不全を伴う疾患に対しては、抗炎症性作用や組織再生を誘導する機能を持つ間葉系幹細胞 (MSC) の投与が試みられている。数多くの臓器や疾患に対する MSC を用いた細胞療法の研究が行われる中で、肺疾患に対しても MSC が治療効果を示すことが明らかとされた。さらに、IPF の動物モデルに対しても MSC の細胞療法が有効であることが明らかとされた。それらの前臨床研究をもとに、すでに世界中で IPF を中心とする肺疾患に対する MSC を用いた細胞治療の臨床治験が行われている。

MSC は身体の骨髓腔内や臍帯血、筋肉、脂肪組織など幅広い組織に存在する自己増殖能やシャーレへの接着能、間葉系の細胞への多分化能を有する間葉系の幹細胞である。これらの他にも、炎症・障害部位へのホーミング能を持つことや抗炎症性サイトカインや増殖因子などを介して炎症制御や組織修復にも関与していること、主要適合性抗原 (MHC) class II は発現しないため、他家移植であっても拒絶されにくいことが明らかとなり、これらの特性を利用して MSC は細胞療法・再生医療に用いられるようになった。一方、他家 MSC の移植に関しては、移植後に拒絶が起こることも報告されているため、今後の解析が急務である。MSC は特異的な表面抗原が同定されていないため、接着性を利用して分離が行われてきたが、血球細胞や組織細胞中にも接着性を示す細胞が存在するため、条件により細胞集団の構成が大きく左右されていた。また、培養中に MSC が変化する可能性もあった。肺疾患、特に IPF に対する MSC を用いた細胞療法を行う際の移入方法には、経気道的移入と経静脈移入がある。これまで肺疾患に対する MSC を用いた細胞療法の研究では、安定性や利便性、臨床応用への外挿の観点から経気道的移入よりも経静脈移入が行われてきた。どちらの移入方法でも移入した MSC が肺に生着し、治療効果が得られることは確かであるが、移入ルートによる治療効果の違いや移入後の細胞動態に関しては未だに不明な点が多い。

上記のように、MSC を用いた肺疾患に対する細胞療法では、MSC の分離方法や MHC の差異、

移入ルートなど不明な点が多かった。そこで本研究では、まず、新規分離法であるマイクロビーズを用いたネガティブセレクションにより、脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)が分離可能であることを示した。その後、IPFの動物モデルとしてよく知られているBLM誘導性肺線維症モデルを用いて、ASCの移入ルートの違いによる移入効率や治療効果を解析し、経気道的MSC移入が経静脈移入よりも効率的な細胞移入法であることを明らかとした。最後に、肺線維症に対して治療効果を示すMSCと、同じ間葉系の細胞でありながら症状を悪化させる線維芽細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行うことで、肺線維症に対して治療効果期待できる遺伝子の探索を行い、候補となった遺伝子を用いた遺伝子編集細胞移入による治療効果を検証した。

## 方法

CAG-EGFPマウスから摘出した脂肪組織を酵素消化によりシングルセル化した後、CD31, CD45, CD146, EpCAM, Ter119陽性細胞をネガティブセレクションで除去しASCを分離した。フローサイトメーターを用いて表面抗原を解析及び分化能の確認により、ASCが分離されていることを確認した。3x10<sup>6</sup>個のASCを経気道的、経静脈的に移入し、フローサイトメーターを用いて移入効率を比較した。また、移入21日目に、ヒドロキシプロリン定量とHE染色により移入ルートによる治療効果の違いを比較した。

CAG-EGFPマウス及びBalb/cマウスから分離したASCあるいは線維芽細胞を経気道的に供移入し、MHCの不一致による生着への影響を解析した。また、移入21日目に、ヒドロキシプロリン定量とHE染色により移入ルートによる治療効果の違いを比較した。

移入3日目にASC及び線維芽細胞をソーティングにより純化し、移入前のASC及び線維芽細胞と合わせて網羅的遺伝子発現解析を行った。

## 結果

ネガティブセレクションにより分離された細胞は、CD11b陰性であり、CD29, CD44, CD90, CD105陽性であった。また、MHC class Iを発現しており、MHC class IIは発現していなかった。また、脂肪細胞、骨芽細胞への分化が認められた。このことから、ネガティブセレクションにより分離された細胞はASCであると結論づけた。分離されたASCの経気道的移入と経静脈移入を行ったところ、移入ルートに関わらず、肺への生着が認められた。移入後、1・3・7日目に肺に生着した細胞数を解析したところ、常に経気道的に移入したASCの細胞数が経静脈移入したASCの細胞数の2倍以上であった。移入21日目での治療効果の解析では、経気道的移入では対象群と比較してコラーゲン量が有意に減少しており、線維化部位の縮小も認められたが、経静脈移入ではコラーゲン量及び線維化部位に変化はみられなかった。経気道的にASCを移入してから7日目以降の生着細胞数の解析により、移入されたASCが肺で1ヶ月以上維持されることが明らかとなった。

自家由来 ASC・線維芽細胞及び他家由来 ASC・線維芽細胞の経気道的移入では、他家由来の ASC と線維芽細胞は移入 4 日目から 7 日目にかけて細胞数が顕著に減少し、検出限界を下回った。自家由来 ASC 及び他家由来 ASC の経気道的移入 21 日目での治療効果の解析では、自家 ASC 移入では、コラーゲンの沈着量は減少し、線維化部位も減少していた。一方、他家 ASC 移入では、コラーゲンの沈着量や線維化部位に変化はみられなかった。

移入前後の ASC と線維芽細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析により、発現変動している 3418 個の遺伝子が抽出され、その発現パターンから 12 の遺伝子モジュール(GM)に区別された。このうち 2 つの GM に含まれる遺伝子は発現の変動パターンが ASC 特異的であった。この 2 つの GM から遺伝子を抽出し、再解析すると ASC に特徴的に発現する 195 の遺伝子が抽出された。生着後に治療効果を示すためには、細胞外に分泌される必要があると考え、gene ontology 解析を用いて細胞外に分泌されるものを抽出した。さらに、ASC に特異的に発現している遺伝子を絞り込むため、移入前の ASC での発現が移入前の線維芽細胞より 2 倍以上高い遺伝子を抽出した。その結果、28 の遺伝子が抽出された。これらの遺伝子の移入前の ASC での発現を比較すると、*dcn* の発現量が圧倒的に高かったため、治療効果の期待できる遺伝子として着目した。*dcn* の治療効果を比較するため、すでに細胞療法を含め、種々の方法で治療効果が報告されている肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor; hgf)との比較を行った。レトロウイルスを用いて *dcn* 及び *hgf* の過剰発現 ASC 及び線維芽細胞を作製し、定量リアルタイム PCR により発現が上昇していることを確認した。*dcn* 及び *hgf* の過剰発現 ASC 移入では、コントロール ASC と比較して治療効果の上乗せは得られなかった。一方、線維芽細胞の経気道的移入では、コントロール線維芽細胞ではコラーゲンの沈着量が増加し、線維部位も拡大していたのに対して、過剰発現線維芽細胞移入ではコラーゲンの沈着量が優位に減少し、線維化部位も減少していた。

## 結論

本研究により、経気道的移入は線維化局所への細胞デリバリー及び定着効率に優れた移入方法であり、移入細胞による長期的な治療効果を期待するためには、同種細胞ではなく同系細胞が必要であることが明らかとなった。このことから、自家 ASC の経気道的移入が、線維症に対する新規治療法になる可能性が示唆された。また、治療効果の異なる種類や時間軸の細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析により、治療効果の期待できる遺伝子の探索が可能であることが明らかとなった。さらに、この方法により着目された *dcn* の過剰発現細胞の経気道的移入は肺線維症に対して有効であった。