

論文の内容の要旨

論文題目 遺伝子導入細胞凝集塊スフェロイドの再生医療への応用

氏名 柳原歌代子

再生医療とは、疾患、外傷、手術等で失われた組織や臓器の修復・再生を目指すものであり、患者自身の細胞・組織又は他家細胞・他家組織の移植が、その中核を担う方法論として期待されている。その中でも細胞移植治療は、従来の低分子医薬を用いた治療と比べ、失われた機能をより根本的に回復する可能性を持つ。細胞移植に用いる細胞として、自己増殖能と分化能を有する幹細胞の利用が期待され、多分化能を持つ胚性幹細胞（ES 細胞）や人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の研究が近年盛んに行われている。しかしながら、我々の身体の組織にも造血幹細胞や間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cell; MSC）といった体性幹細胞が存在しており、特定の細胞群への分化能を持ち、細胞死や損傷した組織の再生において、新しい細胞を供給する機能を持つと考えられている。ES 細胞や iPS 細胞に比べると、体性幹細胞の持つ分化能は限定的であるが、自家細胞を治療に用いることができることから、これらを用いた基礎研究並びに臨床応用が活発に行われている。

これまでの研究において、細胞移植では、移植組織での虚血や炎症といった微小環境が原因となり、ホスト組織内で移植細胞が十分に生存・機能できず、期待されていた効果が得られない場合があるという問題点があることが分かっている。これを解決し、細胞移植の治療効果を向上するための手法として、3次元スフェロイド培養技術が確立された。スフェロイドの中では生体内環境と同様に細胞間相互作用が保たれるため、培養条件下で細胞機能が維持されることが知られている。従って、移植細胞を従来の平面培養とは異なり、スフェロイドの形態にすることで、移植細胞の生存率や機能が向上すると考えられる。スフェロイドの調製には様々な方法が知られているが、細胞治療への応用に必要な条件である、簡便に均一かつ大量作製が可能な作製方法は少ないのが現状である。そこで、著者の研究室では、スフェロイドを用いた細胞移植治療の実現に向けて、簡便かつ大量にスフェロイドを作製するため、径 100 μm の細胞接着面の周りをポリエチレングリコール（polyethylene glycol; PEG）で覆われた細胞非接着面が取り囲むよう設計された、微細加工プレートを開発した。本プレートに細胞を播種すると、細胞接着面にのみ細胞が重層化して接着し、直径 100 μm の均一なスフェロイドが 1 cm^2 あたり 2,500 個作製される。さらに、スフェロイドを回収して *in vivo* で応用するために、細胞接着面を温度応答性ポリマーである Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) (PIPAAm) でコートした。これにより、プレ

ートを冷やすことで簡単に細胞を回収することが可能となった。

また、スフェロイド培養技術に遺伝子導入技術を融合することによって、細胞移植の更なる治療効果向上が期待できる。スフェロイドへの遺伝子導入において、脂質から成る遺伝子導入試薬はスフェロイドの形態を崩壊するが、著者らの研究室で開発されたカチオン性ポリマー PAsp(DET) (poly (N'-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl] aspartamide)) を用いることで、スフェロイドの形態を維持して遺伝子導入を行うことが可能であることが分かっている。PAsp(DET)は、エンドソーム脱出能と生分解性の機能を持つため、低毒性でかつ高効率な遺伝子の導入を可能とする。

細胞移植への治療遺伝子導入には、①分泌型治療因子を導入することで、増殖因子などの治療因子の分泌能が向上し、細胞移植におけるパラクライン効果を増強する方法、②細胞分化因子や抗アポトーシス因子のような治療因子を導入することで、移植細胞の生存率・分化が促進する方法が考えられる。本システムを脊髄損傷に応用した治療研究では、分泌因子である BDNF をコードする遺伝子を導入することで、移植細胞からのパラクライン作用の増強を試みた。一方、本システムでは、細胞分化因子や抗アポトーシス因子のような治療因子を導入する方法で示されるように、細胞内で作用し、移植細胞の機能を制御するような因子の導入も可能である。後者において、本システムが有用であることを示すことができれば、様々な治療応用が可能となる。従って、本研究では、骨分化誘導因子である runt-related transcription factor 2 (Runx2) の pDNA を導入した MSC スフェロイドを用いた骨再生治療に取り組んだ。Runx2 を MSC に導入することで、MSC の骨分化能が向上し、骨再生が促進されることが期待された。そこで、MSC から作製したスフェロイドに骨分化誘導因子を導入し、ラットの骨欠損モデルへ移植を行い、骨再生を評価した。一方、従来の細胞培養法である単層培養にて培養を行った MSC や、骨分化誘導因子を導入していないスフェロイドを移植した群とも比較し、本システムの有効性について検証を行った。また、細胞の機能を制御する際、生体内での移植細胞の機能や動態が非常に重要となるため、本研究ではスフェロイド化による影響に焦点を絞り、移植細胞の機能や生体内動態の変化、及び生体を模倣した環境での詳細な機能評価に取り組んだ。

骨分化誘導因子である Runx2 を導入した MSC スフェロイドを骨欠損モデルラットに移植したところ、Runx2 未導入スフェロイド移植群や Runx2 導入単層培養由来 MSC 移植群と比べて明らかに骨形成が促進された。また、Runx2 を導入していない場合でも、スフェロイド移植群において単層培養由来 MSC 移植群と比べて有意に早期の骨形成が促進していた。スフェロイドによる骨分化能の向上は *in vivo* の実験でも顕著に観察され、本研究において、スフェロイド化が治療において重要な役割を果たしていたと考えられる。従って、スフェロイド化の *in vivo* での効果や、そのメカニズムについて詳細に調べた。すると、スフェロイド化することで細胞の遊走能

が向上し、移植細胞の遊走能が亢進することが分かった。一方で、スフェロイド化による移植細胞の生着率や、Runx2 の発現効率への影響はなく、スフェロイド化により移植細胞の機能が向上し、優れた治療効果が得られことが想定された。さらに、炎症反応や虚血といった特殊な微小環境下における移植細胞の機能について調べるために、炎症・虚血環境下における骨分化について検証したところ、スフェロイド群では、単層培養群に比べ骨分化が有意に促進していた。従って、スフェロイドでは炎症・虚血条件下でも細胞の機能が維持されることが明らかとなった。以上により、分泌因子を導入することで、細胞移植への有効性を示された遺伝子導入細胞移植システムにおいて、細胞分化因子や抗アポトーシス因子のような細胞内因子を導入した際の本システムの有効性を示すことができた。

また、分泌因子を導入する際は、遺伝子が導入されタンパク質を発現する細胞の割合が少なくても、優れた効果が期待されるが、細胞内で機能する因子を導入する場合、多くの細胞に導入されることが必要となる。これに関して、DNA を用いた遺伝子導入では、核膜が大きな障害となり、多くの細胞で DNA が核膜を透過できずタンパク質発現が得られないことが分かっている。一方で、RNA は核への移行が不要なので、多くの細胞で発現が得られることも分かっている。実際、細胞内で機能する因子の生体への導入を目指した治療研究で、RNA を用いた方が DNA を用いるよりも効果が高いという報告もあった。そこで、遺伝子導入スフェロイド移植治療にも RNA を用いることを着想し、その可能性を検証した。

まず、レポーター遺伝子を用いて mRNA と pDNA で発現を比較したところ、mRNA を導入した場合に、スフェロイドのより多くの細胞においてタンパク質発現が得られた。このメカニズムを調べるために、遺伝子発現と細胞分裂の相関について調べると、スフェロイド化すると細胞分裂の停止する細胞が増えるという報告と一致して、スフェロイドでも大部分の細胞が非分裂状態であった。mRNA を導入した場合は非分裂細胞でも効率的にタンパク質が発現するが、pDNA を導入した場合はほとんど発現しなかった。mRNA は、pDNA の持つゲノム挿入のリスクを解決するだけでなく、スフェロイドに加えて、神経細胞等のような非分裂細胞のみならず、細胞老化により分裂スピードが遅くなった細胞にも効率的に遺伝子を導入することができ、新たな遺伝子導入法として様々な疾患に対する遺伝子治療へ用いられることが期待される。さらに、mRNA 導入スフェロイドの臨床応用への可能性考えて、骨分化にて評価したところ、スフェロイドへの骨分化誘導因子の導入において、pDNA に比べて mRNA でより骨分化が促進した。これらの結果により、mRNA は *ex vivo* におけるスフェロイドへの遺伝子導入に適していることが示された。本システムを臨床応用するには、*in vivo* における機能解析が今後必要であるが、mRNA 導入スフェロイドは細胞移植治療の効果を劇的に向上する可能性を持っていることが示された。