

## 157. オートファジーによるミトコンドリア分解の構造基盤

須藤 絵里子グレース

\*東京医科歯科大学 大学院保健衛生学研究科 分子生命情報解析学

Key words : 間葉系幹細胞, CD73, ヒト組織, 間質性肺炎モデル

### 緒言

間葉系幹細胞 (MSC) は、骨、脂肪、軟骨に分化する能力をもつ幹細胞であり、自己複製能や免疫寛容能を持つことが報告されている。臨床で既に様々な疾患に対して用いられているが、MSC の免疫寛容能に着目した実例として、造血幹移植時の GVHD 予防を目的とした MSC の共投与が行われている [1]。当研究室では、MSC の細胞表面分子 CD73 に対する抗体を用いて高効率で免疫寛容能を有する細胞を分離する“新鮮純化法”を開発し特許を申請した [2]。CD73 陽性細胞は幹細胞性の高い細胞が濃縮された細胞集団であり、一般的な MSCs よりも抗炎症能力が優位に高いことが予想される。過剰な免疫反応を原因とした難治性疾患に対する CD73 陽性細胞の効果を解析するため、疾患モデルマウスを用いた細胞移植治療の有効性検証 (Proof of Concept : POC) が求められる。

特発性間質性肺炎は肺胞の炎症や損傷の繰り返しにより線維化し、呼吸不全を引き起こす難病である。現存の治療薬としてステロイド剤や免疫抑制剤が広く使われているが、感染症や代謝障害などの多くの副作用が発生するだけでなく、肺線維症への進行を抑制することは出来ない。組織の過剰な炎症が病因の一つとして考えられているが、詳細な解明ができていないために治療困難な疾患であり、より有効な治療薬の探索が求められている。

本研究では、将来的な臨床応用を目的としてヒト組織を用いて CD73 陽性細胞の移植ソースに有用な組織を選択した。次に、間質性肺炎モデルマウスに対する CD73 陽性細胞の効果を解析するため、経鼻的に CD73 陽性細胞を投与し、CD73 陽性細胞の有効性検証を行った。

### 方法

#### 1. CD73 陽性細胞の分離と培養

ヒト皮下脂肪、内臓脂肪、胎盤はそれぞれ術中廃棄検体を入手し、摘出後 3 時間以内に処理をしてフローサイトメーターを用いて CD73 陽性細胞を純化分離した。マウス皮下脂肪は 8 週齢の C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) より摘出し、0.2% コラゲナーゼ溶液で処理したのちに純化分離した。分離後の細胞は 20% ウシ血清と 5 ng/mL bFGF を含有した培地中で 5% CO<sub>2</sub> 下の 37°C インキュベーターで培養した。

#### 2. 間質性肺炎モデルマウスの作製と移植効果の解析

9 週齢の C57BL/6-J マウスのオスに対しブレオマイシン (日本化薬) を 5  $\mu$ g/g-weight で点鼻投与し、健常コントロール群にはリン酸緩衝食塩水 (PBS) を点鼻投与した。この操作を初日、4 日目、7 日目、11 日目に計 4 回行った。次に、14 日目と 17 日目の計 2 回、CD73 陽性細胞投与群に培養した CD73 陽性細胞を  $7.0 \times 10^5$  個ずつ点鼻投与し、疾患コントロール群と健常コントロール群には PBS を投与した。28 日目に肺胞洗浄液 (BALF) の解析を行い、肺切片を作製した。

## 結果

### 1. ヒト組織各組織由来細胞の分離法による細胞表面抗原発現

ヒト皮下脂肪、内臓脂肪、胎盤組織より細胞を分離した。既存の分離方法、細胞表面の CD73 を標識して純化分離する新鮮純化法をそれぞれ比較したところ、皮下脂肪より新鮮純化法によって得られた CD73 陽性細胞は、純化分離後に早期の段階で間葉系幹細胞マーカーとして知られる CD29、CD44、CD90、CD271 を高発現していることが明らかとなった (図 1)。

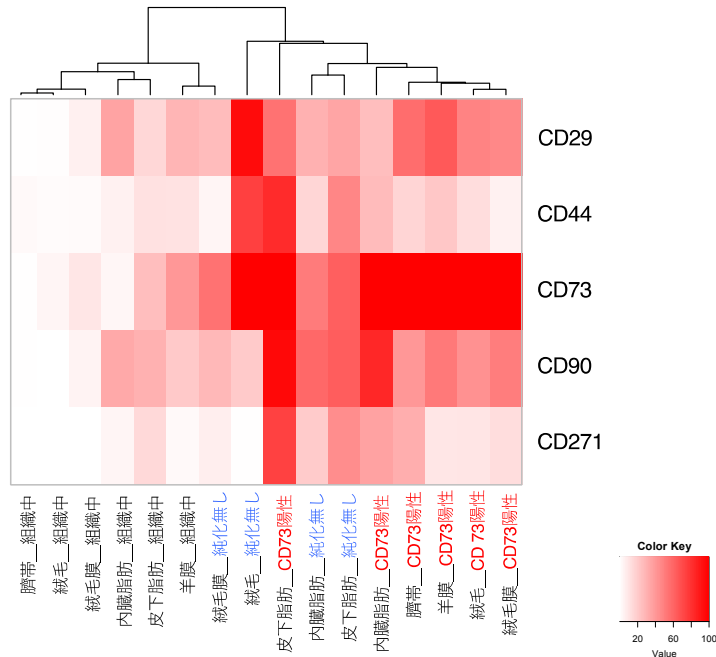


図 1. 分離方法によるヒト組織中間葉系幹細胞マーカー発現率

各組織から回収した細胞集団を“組織中”、細胞表面 CD73 を標識することによって純化分離した細胞を“CD73 陽性”、組織から回収した細胞を従来法に則り培養したものを“純化無し”とした。各細胞の CD29、CD44、CD73、CD90、CD271 の発現率をフローサイトメーターで解析した。

### 2. マウス皮下脂肪由来 CD73 陽性細胞の間質性肺炎に対する検証

ヒト組織を用いた結果より、皮下脂肪が CD73 陽性細胞の移植ソースとして有用であると考えられた。細胞移植による線維化への影響を解析するため、間質性肺炎マウスモデルに対し、マウス皮下脂肪由来 CD73 陽性細胞を移植した。肺組織切片の線維化割合を比較したところ、疾患コントロールで線維化した部位の占める割合が高く、健常コントロールと有意な差が見られた。一方、CD73 陽性細胞投与群では健常コントロールとの差は認められなかった (図 2c、d、e)。

肺組織切片の染色像より、疾患コントロールにおいては肺の線維化が広範囲に広がっており、赤色のマクロファージのマーカーである Iba1 が集積していることが確認された (図 3a)。一方、細胞移植を行ったマウスの肺 (CD73 陽性細胞投与群) では、一部で炎症が起きている様子が確認されたものの、疾患コントロールよりも炎症部位が少なく肺胞構造も維持されていた。

BALF 中の有核細胞を分離し、炎症応答に関わる細胞表面抗原を染色して、検出された細胞数に対する肺の炎症度を比較した。図 3b より、CD11b 陽性マクロファージ数が CD73 陽性細胞投与群と疾患コントロールで有意な差が得られた。CD4、CD8、Gr-1、F4/80、CD11c 陽性の細胞に関しても、疾患コントロール群に比べて CD73 陽性細胞投与群で発現が抑制されている傾向が確認された。

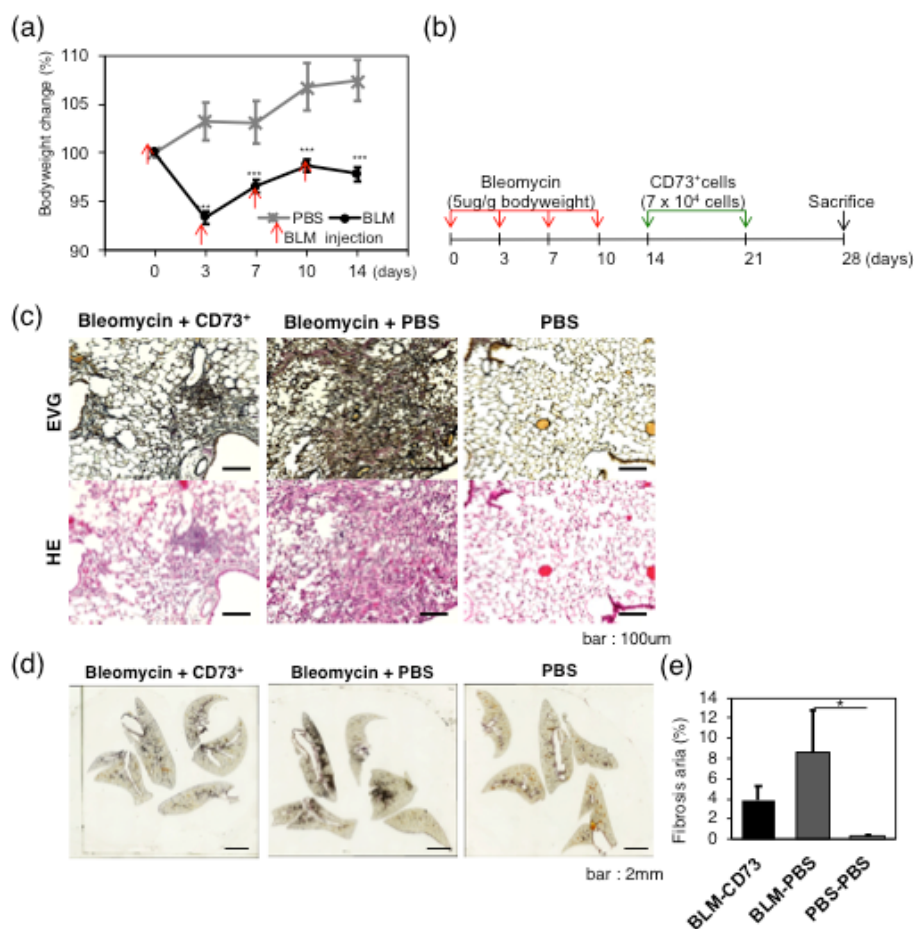


図2. 間質性肺炎モデルマウスに対する CD73 陽性細胞の投与

- (a) ブレオマイシン投与群と健常コントロール群の体重変動比較。
- (b) ブレオマイシン及びCD73陽性細胞の投与スケジュール。
- (c) 実験開始より28日後の肺組織切片をエラスチカ・ワーギンソン染色及びヘマトキシリン・エオジン染色にて評価した。
- (d) 各群の肺組織切片のタイリング画像によって、肺線維化を評価した。
- (e) Image Jによって線維化面積の割合を算出した。Kruskal-Wallis testによって有意差を評価した。

## 考 察

本研究の結果から、ヒト皮下脂肪より CD73 陽性細胞を純化分離することによって高効率に MSC を分離できることが示唆された。

CD73 陽性細胞投与群では、ブレオマイシン投与後 2 週間で解析した疾患コントロールの組織染色像や線維化の割合との比較から、線維化および炎症反応が軽減していると考えられる。これまでに脂肪組織や胎盤から分離したヘテロな細胞集団を間質性肺炎モデルマウスに投与したという報告もあるが、その効果にはばらつきがみられた。CD73 陽性という質の均一な細胞を用いたことで、安定した移植効果を示すことができたと考えられる。CD73 のアデノシン産生能が炎症性マクロファージを抑制した可能性などが考えられるが、その詳細なメカニズム解明が求められる。

免疫染色像から、移植した GFP 発現 CD73 陽性細胞を確認できなかった。CD73 細胞の移植回数を増やすことで、よりその治療効果を促進させることが予想される。

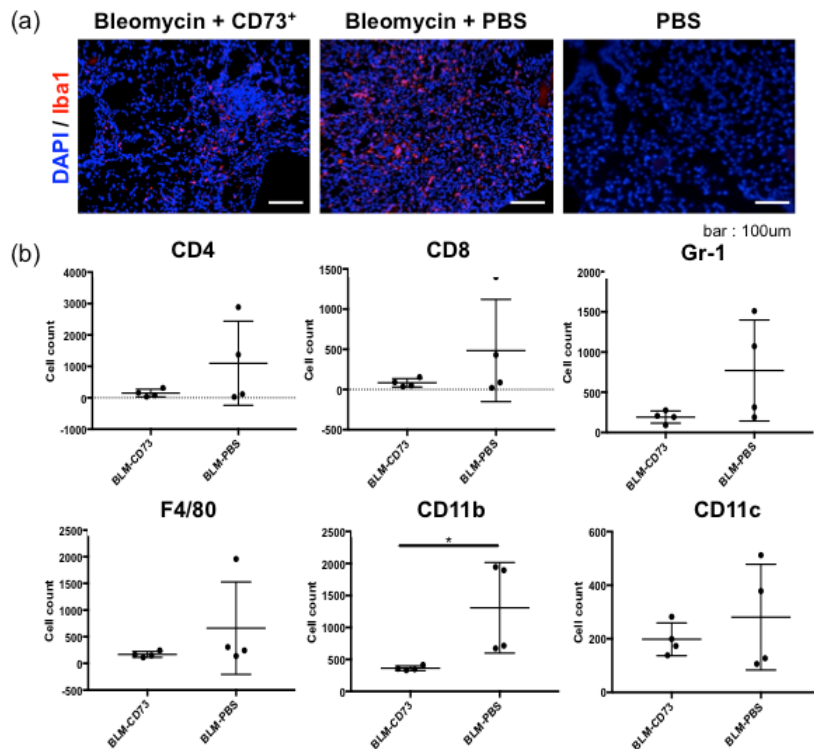


図 3. 肺組織中マクロファージ数の解析

(a) 肺組織切片を Iba1 で染色した。

(b) 肺胞洗浄液を回収し、洗浄液中の各種細胞数を比較した。Mann-Whitney test で解析。

### 共同研究者・謝辞

本研究へ術中検体をご提供いただいた東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科の宮坂尚幸教授 (器官システム制御学講座 生殖機能協関学分野)、藤井靖久教授 (器官システム制御学講座腎泌尿器外科学分野)、ならびに検体提供へご賛同いただいた全ての患者様に対しここに深く謝意を表します。また、本研究をご指導いただいた東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科の赤澤智宏教授、馬渕洋助教 (分子生命情報解析学)、ならびにご協力いただいた研究室メンバーの皆さまに対し深く御礼申し上げます。

### 文献

- 1) Nasef A, Mathieu N, Chapel A, et al. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation*. 2007 Jul 27;84(2):231-7. doi: 10.1097/01.tp.0000267918.07906.08
- 2) Eriko Grace Suto, Yo Mabuchi, Chihiro Akazawa, et al. "Prospectively isolated mesenchymal stem/stromal cells are enriched in the CD73+ population and exhibit efficacy after transplantation", *Scientific reports* 2017;7:4838 doi: 10.1038/s41598-017-05099-1