

氏名	なかお みつよし 中尾 光良
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲 第 5038 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	細胞治療に向けた間葉系幹細胞シートの構造及び機能の解明
論文審査委員	(主査) 金澤 秀子 教授(薬学博士) (副査) 齋藤 英胤 教授(医学博士) 登美 斉俊 教授(博士(薬学))

論文内容の要旨

【背景・目的】

細胞・組織を利用した再生医療は、ES 細胞、iPS 細胞、間葉系幹細胞などの幹細胞研究の急進展と共に発展し、従来の低分子医薬品、バイオ医薬品の限界を超えた治療効果が得られる新たな医療として期待されている。特に間葉系幹細胞は、臍帯や骨髄、脂肪などの様々な組織から細胞が確保でき、高い増殖能と多分化能を有することが知られているため、再生医療に有望な細胞として注目を集めている。また、免疫原性が低いことに加え、抗炎症性サイトカインなどのタンパク質を分泌することが報告されており、これまでに世界中で 900 件以上の臨床試験が実施されている。間葉系幹細胞は移植片対宿主病、クローン病や脊椎損傷などの疾患に対する新規治療法として既に 4 件が製品化されており、今後も様々な疾患の治療に応用されることが期待されている。

現在までの再生医療における細胞移植では、患者から単離した細胞を培養皿上に接着・増殖させ、細胞を培養皿から剥離・回収した後、細胞懸濁液として移植する方法が取られている。この場合では、培養皿に接着した細胞は細胞外マトリックス (ECM, Extra Cellular Matrix) を中心とする接着タンパク質を介して培養皿と強く結合しているため、Trypsin や Dispase などのタンパク質分解酵素を用いて接着タンパク質を化学的に破壊することで剥離・回収を行なう。この手法は調製が容易であることから、細胞移植の方法として最も一般的に用いられてきた技術であるが、細胞と培養皿表面の接着タンパク質の破壊に留まらず、細胞表面のタンパク質を非特異的に破壊してしまうため、細胞の機能を高く維持できないことが課題である。実際、従来の酵素を用いた細胞剥離法で作製した細胞懸濁液の移植は、多くの疾患において臨床試験で治療効

果が低いため、大きな問題となっている。さらに、移植細胞の生着率が低いため治療効果が短期的であり、大量の細胞を繰り返し移植する必要があるため、細胞源の確保も臨床応用への重大な障壁となっている。

一方で、温度応答性培養皿により作製した細胞シートを用いた細胞移植が、高効率な細胞移植法として注目を集めている。細胞シートは、細胞同士の結合を維持したままシート状に回収した細胞組織である。32°Cに下限臨界溶解温度を持つ温度応答性ポリマーpoly (*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) を修飾して作製した温度応答性培養皿表面は、37°Cで疎水性、32°C以下では親水性に変化する。この性質を利用して、37°Cで細胞を温度応答性培養皿に播種し、増殖させてコンフルエントまで培養する。その後、培養温度を32°C以下に下げ温度応答性培養皿表面を親水性にすることで、細胞と培養皿表面の疎水性相互作用を低下させることで、シート状の細胞組織が回収できる。この方法では、従来の酵素を用いた細胞剥離方法とは異なり、膜タンパクの破壊や物理的な細胞傷害は起こらず、細胞の構造と機能を維持したまま剥離・回収することが可能である。

これまで、細胞シートが高い生着率や治療効果を有することが非臨床・臨床研究で報告されており、細胞剥離時に分解されずに保持されるECMが重要な役割をしていると考えられてきた。一方、生着率や治療効果にどのような細胞の構造(ECM, 細胞-基質間結合, 細胞間結合, 細胞骨格)が重要な役割を担っているか、明らかにされていなかった。そこで本博士論文では、様々な組織から採取される間葉系幹細胞の特性の違いを明らかにし、異なる細胞剥離方法(細胞シート・細胞懸濁液)を用いたときの、細胞の構造および機能の変化を比較・解析し、さらに、細胞構造の変化が生着率に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

細胞シートおよび細胞懸濁液の作製

細胞シートは、温度応答性培養皿を用いて作製した。一方、細胞懸濁液(ET, Enzyme Treatment)はTrypsinなどの酵素を異なる濃度・時間で処理することで作製した。また、酵素処理されていない細胞懸濁液(TR, Temperature Reduction)は温度応答性培養皿を用いて作製した。

細胞シートの移植および生着率の評価

細胞シートおよび細胞懸濁液(ET・TR)を蛍光色素で染色後、ICRマウスに皮下移植し、1, 7, 14, 28日後にIn Vivo Imaging System (IVIS)を用いて蛍光強度を解析

し、細胞の生着率を評価した。

その他の実験: 幹細胞マーカーの発現はフローサイトメトリー法を用いて解析した。細胞シート、細胞懸濁液のタンパク質発現量はウェスタンブロット法により、培養上清・マウス血液・移植部位（皮膚）中のタンパク質発現量は ELISA 法により、タンパク質の局在・形態は免疫染色法により解析した。細胞の表面構造は走査電子顕微鏡、内部構造は透過電子顕微鏡により解析した。細胞生存率の評価は Annexin V 法、LDH 法、Live and Dead 染色法を用いて解析した。細胞の接着率の評価は Time-lapse microscopy および WST-8 法を用いて評価した。

【結果・考察】

間葉系幹細胞の特性解析および間葉系幹細胞シートの作製

細胞シートおよび細胞懸濁液の構造・機能を比較するために、まず臍帯由来間葉系幹細胞（UC-MSC）・骨髄由来間葉系幹細胞（BM-MSC）・脂肪由来間葉系幹細胞（AD-MSC）の三種類の間葉系幹細胞の特性を解析した。間葉系幹細胞の特性である骨芽細胞・脂肪細胞への分化能および、幹細胞マーカーの発現を解析した。その結果、全ての間葉系幹細胞で脂肪および骨芽細胞への分化が確認された。また、幹細胞マーカーの発現を解析したところ、CD45 および HLA-DR が陰性、HLA-ABC が陽性であった。以上の結果から今回用いた間葉系幹細胞は幹細胞の特性を有していることが確認された。次に、これらの間葉系幹細胞を用いた細胞シート作製条件を確立した。細胞の播種濃度、培養日数、前処理方法を検討することで間葉系幹細胞シートを作製した。次に、作製した細胞シートが間葉系幹細胞の機能を保持しているか調べるため、培養上清中のサイトカイン産性能を解析した。その結果、全ての間葉系幹細胞シートにおいて増殖因子（HGF）および、抗炎症性サイトカイン（TGF- β 1, PGE₂, IL-6, IL-10）を産生し、間葉系幹細胞の機能が保持されていることが分かった。以上のことから、温度応答性培養皿は間葉系幹細胞が有する機能に影響を与えずに細胞シートが作製できることが分かった。また、臍帯由来間葉系幹細胞は温度応答性培養皿への接着性が、骨髄由来間葉系幹細胞および脂肪由来間葉系幹細胞と比べて高く、細胞シートの作製が容易であったので、以後の実験では臍帯由来間葉系幹細胞を用いて行なった。

臍帯由来間葉系幹細胞用いた細胞シートおよび細胞懸濁液の構造的特性の解析

細胞剥離方法の違いが細胞の構造に与える影響を調べるため、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて細胞の表面構造を解析した。その結果、細胞シートでは細胞同士が

接着している組織様の構造が観察された。一方、細胞懸濁液（ET）では細胞間接着は破壊され、トリプシン処理時間依存的に細胞表面のタンパク質が分解されていた。これらの結果より、細胞表面のタンパク質が変化している可能性が示されたので、ウェスタンブロット法を用いて各種タンパク質の発現量を解析した。その結果、細胞シート群では ECMs, Cell-ECM junction のタンパク質発現量は接着細胞と同等であったが、細胞懸濁液（ET）ではトリプシンの濃度・処理時間依存的にタンパク質発現量が減少していることがわかった。次に、接着タンパク質の発現量の変化が、細胞内シグナルの活性に影響するかを細胞のメカノセンサーに着目して解析した。メカノセンサーは、細胞外の機械的シグナルを、細胞内の化学的シグナルに変換する役割を持つ。そこで代表的なメカノセンサーである YAP (Yes-associated Protein) および FAK (Focal Adhesion Kinase) を解析した。その結果、培養皿から剥離した細胞シートの YAP および FAK の活性が、細胞懸濁液（ET）より高く、接着細胞と同程度であることが分かった。YAP の活性は、Actin のストレスファイバー構造によって制御されていることが報告されている。そこで、免疫染色法を用いて Actin の構造を解析した。その結果、細胞シートではストレスファイバーが確認されたが、細胞懸濁液（ET）ではストレスファイバーを形成していないことがわかった。YAP および FAK は、活性化されている状態で核内の生存・増殖シグナル因子を活性化し、細胞-基質間結合が分解されると、YAP および FAK の抑制を介して、アポトーシスの一種である anoikis を誘導することが知られている。そこで、トリプシン処理がアポトーシスを誘導するか Annexin V 法を用いて解析した。その結果、トリプシン処理時間依存にアポトーシスが誘導されることが分かった。また、細胞剥離法の違いによる細胞傷害性を比較するため、細胞シートおよび細胞懸濁液（ET）を用いて細胞剥離直後の細胞生存率を Live and Dead 染色法で解析し、剥離した細胞を再播種した 24 時間後の細胞生存率は LDH 法を用いて解析した。その結果、細胞シートは細胞懸濁液と比較して細胞傷害性が低いことが示された。以上のことから、細胞シートでは、細胞の構造（ECM, 細胞-基質間結合, 細胞間結合, 細胞骨格）が保持され、細胞傷害性が細胞懸濁液（ET）と比較して低いことが分かった。また、細胞シートの YAP や FAK の活性が維持されていたことが細胞の生存に関与していることが示唆された。

臍帯由来間葉系幹細胞シートの細胞懸濁液に対する移植効率および機能の評価

ここまで、異なる細胞剥離方法を用いることによる細胞構造（ECM, 細胞-基質間結合, 細胞間結合, 細胞骨格）の変化を解析してきた。その結果、異なる構造を有

する細胞を作製することができることが分かった。上述の通り、細胞シートを用いた細胞移植は生着率が高いことが報告されており、ECMが生着率の促進に重要な役割を果たしていると考えられてきた。一方、ECM以外の細胞の構造を有することが移植細胞の生着率にどのように影響するかは解析されていなかった。そこで、移植細胞の生着率の向上に重要な役割を担う細胞の構造を明らかにするため、細胞シート、およびトリプシン処理した細胞懸濁液(ET)、温度応答性培養皿により非侵襲的に回収した細胞懸濁液(TR)をICRマウスの皮下に移植し、IVISで移植細胞の生着率を解析した。その結果、移植4週間後において、細胞シートを移植したマウスでは高い生着率を確認できたが、細胞懸濁液(ET)を移植したマウスでは細胞の生着がほとんど確認できなかった。一方、細胞懸濁液(TR)を移植したマウスでは、移植直後より生着率は低いものの、細胞が生着していることが確認できた。細胞シートと細胞懸濁液(ET)の生着率を比較すると、ECM、細胞間結合、細胞骨格が、細胞の生着率に関与していることが考えられた。また、細胞シートと細胞懸濁液(TR)を比較すると、細胞間結合、細胞骨格が生着率の向上に重要であることが示された。さらに、細胞懸濁液ETとTRを比較することで、ECMが生着率の向上に重要な役割を担うことが示された。

次に、生着した細胞の機能が維持されているかを評価するために、マウスの血漿および移植部位(皮膚)中のサイトカイン量を解析した。ヒト特異的抗体を用いることで、移植した間葉系幹細胞由来のサイトカイン量を解析した。その結果、細胞シートを移植したマウスでは移植部位(皮膚)でHGF、VEGF、TGF- β 1を、血中でVEGF、TGF- β 1、IL-10を発現していることが確認できた。一方、細胞懸濁液(ET、TR)を移植したマウスでの移植部位(皮膚)ではこれらのサイトカインの発現は確認できなかったが、血中ではVEGF、TGF- β 1、IL-10の発現が確認された。サイトカインの発現量は、移植部位における生着率に依存すると考えられるため、細胞シート移植が高い生着率を示し、さらに、生着した細胞が移植部位で機能を維持することが分かった。

以上の結果から、細胞の生着率にはECMだけではなく、細胞間結合および細胞骨格が維持されていることも生着率の向上に重要な役割を担っていることが明らかになった。

【結論】

本研究により、細胞シートは培養皿接着時と同様の構造（ECM、細胞-基質間結合、細胞間結合、細胞骨格）を保持しながら剥離・回収できることが示された。一方、タンパク質分解酵素処理による細胞剥離法では構造が破壊され、細胞の接着性が低いことが分かった。さらに、本研究により細胞シートが細胞懸濁液（ET および TR）と比較して高い生着率を有していることが明らかになった。このことから、移植細胞の生着率には ECM に加えて細胞間結合、細胞骨格が重要な役割をしていることが示唆された。さらに、細胞シートは移植後 4 週間のマウス移植部位（皮膚）および血液中にサイトカインを産生・分泌しており、移植後長期間にわたり細胞の機能を維持することが示された。これらのことから、細胞シートを用いた再生医療は、細胞の構造保持を介して高い生着率を示し、移植周辺部位で治療効果を示すことが考えられる。

- 慶應義塾大学動物実験委員会（細胞治療の実現に向けた細胞シート移植技術の開発、承認番号 18028- (0)）

論文審査結果の要旨

中尾君は、博士課程期間中に我が国発の技術である細胞シート技術の習得及び共同研究のため 1 年間米国 University of Utah, College of Pharmacy, Cell Sheet Tissue Engineering Center の岡野光夫教授、David W. Grainger 教授のもとに留学した。ユタ大学はライフサイエンス分野では米国屈指の大学であり、Grainger 教授は、中尾君の帰国後も 2 度来日し、海外副指導教授として共著論文の指導も行った。

博士論文を提出後、副査 2 名による個人面談（試問）を行い、指摘事項について修正した。博士論文発表会は、平成 31 年 2 月 21 日（木）に、慶應義塾大学薬学部 1 号館マルチメディア講堂において、研究科委員会のメンバー等の出席の下、学内公開の形で実施された。25 分間の口頭発表では、研究の背景並びに問題点、研究過程並びに研究成果が整然と提示された。その後の 15 分間の試問では、質問に対して概ね的確な応答がなされた。

近年、細胞・組織を利用した再生医療・細胞治療は、iPS 細胞研究の進歩と相俟って急速に発展している。これまで臨床試験が様々な疾患に対して実施されてきたが、多くの場合で治療効果が限定的あるいは短期的なことが大きな問題となっている。一方、細

胞シート移植による治療は、心臓や食道など様々な臓器に対する有用な細胞治療として注目を集めている。これまでの臨床試験の結果から、移植技術は細胞治療の治療効果に大きく影響することが考えられる。中尾君の研究では、間葉系幹細胞に着目し、従来の移植技術に対する細胞シートの構造的・機能的な特性を解析し、間葉系幹細胞の治療効果をより高めることを目的とした。

中尾君は、細胞内外の様々な構造変化を感知し、化学的シグナルに変換するメカノセンサータンパク質として知られる YAP および FAK を解析した結果、これらが、間葉系幹細胞シートでは活性化され、従来の移植技術では活性が抑制されていることを明らかにした。タンパク分解酵素を使用する細胞懸濁液を用いた従来法と比較し、細胞シートにおいて YAP や FAK の活性が維持されていたことが細胞の生存に関与している可能性を見出した。本研究により、間葉系幹細胞シートが、従来法の細胞懸濁液と比較して高い生着率を有していることが明らかとなり、移植細胞の生着率には ECM に加えて細胞間結合、細胞骨格が重要な役割をしていることが示唆された。

さらに、移植細胞の生着率の向上に重要な役割を担う細胞の構造を明らかにするため、細胞シートおよびトリプシン処理した細胞懸濁液、温度応答性培養皿により非侵襲的に回収した細胞懸濁液を ICR マウスの皮下に移植し、IVIS で移植細胞の生着率を解析した。細胞シートは移植後 4 週間のマウス移植部位及び血液中にサイトカインを産生・分泌しており、移植後長期間にわたり細胞の機能を維持することが示された。これらのことから、細胞シートを用いた再生医療は、細胞の構造保持を介して高い生着率を示し、移植部位周辺において治療効果を示すことが考えられる。

既に様々な疾患に対して間葉系幹細胞を用いた治療が行われており、間葉系幹細胞を用いた細胞シートを再生医療に応用することで多くの疾患でより高い治療効果が期待されるが、これまでヒト組織由来間葉系幹細胞の細胞シートの特性を解析する研究はほとんど行われていなかった。間葉系幹細胞を用いた細胞治療は、炎症反応の抑制および移植周辺組織の再生を目的として実施されている。現在、GVHD を始めとする血球系で起こる炎症性疾患では治療効果が得られており、既に間葉系幹細胞が製品として承認されている一方で、組織構造を有する様々な臓器で起こる炎症性疾患の治療、および臓器の再生は大規模な臨床試験では治療効果が得られず失敗している。これらの要因の一つに、移植した間葉系幹細胞の生着率が低く、長期に生存することで治療効果を発揮することができないことが挙げられる。この課題は、本研究で明らかにした間葉系幹細胞シートの”高い生着率”という特性を応用することで解決することができると

考えられる。本研究は、間葉系幹細胞の本来有する特性を、細胞シート技術を応用することで、移植後の様々なストレスにさらされている生体内環境でも発揮でき、治療効果を発揮させ、理想的な間葉系幹細胞治療を実施させるために重要である。

本論文の内容は査読のある国際学術誌に掲載されており、博士（薬科学）の学位に値する業績であると判定した。さらに、中尾君の博士論文発表会での発表、試問に対する応答も妥当であり、さらに周辺知識も十分であり、これらに関しても博士（薬科学）の学位に十分値するものと考ええる。

以上の経緯を踏まえ、博士論文発表会後に行われた薬学研究科委員会の合否判定会議で本研究論文に関する討議が行われ、中尾 光良 君提出の学位論文の内容は、博士の学位を授与するに値するものであると評価され、学位を授与することが決定した。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

1. Mitsuyoshi Nakao, Daimu Inanaga, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa, Characteristic Differences of Cell Sheets Composed of Mesenchymal Stem Cells with Different Tissue Origins., *Regenerative Therapy*, in press.
2. Mitsuyoshi Nakao, Kyungsook Kim, Kenichi Nagase, David W. Grainger, Hideko Kanazawa, Teruo Okano., Phenotypic traits of mesenchymal stem cell sheets fabricated by temperature-responsive cell culture plates: structural characteristics of cell sheets, *Biomaterials*, under review.