

## 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

学位申請者：中尾 光良

指導教員：金澤 秀子 教授

担当教員：長瀬 健一 准教授

海外副指導教員：Prof. David W Grainger (University of Utah)

細胞・組織を利用した再生医療は、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、世界中で既に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に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。

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

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。

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いることから、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得られる可能性がある。しかしながら、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。

そこで第二章では、臍帯由来間葉系幹細胞(UC-MSC, Umbilical Cord derived-Mesenchymal Stem Cell)、骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC, Bone Marrow derived-Mesenchymal Stem Cell)および脂肪由来間葉系幹細胞(AD-MSC, Adipose derived-Mesenchymal Stem Cell)を用いた細胞シートの作製方法を確立し、由来の異なる間葉系幹細胞の特性および、その違いを明らかにすることを目的とした。その結果、3種類の間葉系幹細胞シート全ての培養上清中で、抗炎症作用、免疫系の抑制作用および、細胞の生存・増殖・遊走に重要な役割を担うサイトカインが分泌・産生されていることが分かった。一方、3種類の間葉系幹細胞シート間では、種々のサイトカイン産生能に差があることが分かった。このことから、3種類の間葉系幹細胞はそれぞれより高い治療効果が得られる疾患が異なることが分かった。さらに、温度応答性培養皿から剥離後、TCPSに再接着させた細胞シートは、TCPS表面へ高い接着性を示し、15分程度で接着することが分かった。

第三章では、従来の細胞剥離法(化学的破壊法・物理的破壊法)に対する細胞シート技術の利点を明らかにすることを目的として、細胞シートおよび細胞懸濁液の調製過程が、細胞が本来有する構造に対して、どのような影響を与えるかを解析した。その結果、細胞シートは細胞の構造(ECM, 細胞間結合, 細胞基質間結合, 細胞骨格)を保持したまま回収できることが分かった。さらに、細胞シートは細胞の機能に関係している構造(ストレスファイバー形成およびメカノセンサーの活性)も保持したまま回収できることが分かった。一方で、トリプシン処理によって得られた細胞懸濁液では、細胞の構造に関わるタンパク質の多くが

分解されることが分かった。さらに、トリプシン処理された細胞のタンパク質では、細胞機能を維持できる構造のまま回収されておらず、ストレスファイバー構造の崩壊や、メカノセンサーの活性が抑制されていることが分かった。以上のことから、細胞シート技術はタンパク質分解酵素を使用せず、細胞の化学的破壊なしに細胞をシート状に剥離できることが分かった。また、回収された単層の hUC-MSC を用いた細胞シートは、間葉系幹細胞の培養に共通して用いられる化学的破壊法と比較して、細胞を剥離・回収した後より高い細胞生存率と接着率が得られることが明らかになった。

第四章では、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(Enzyme Treated, 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(Temperature Reduction, TR)を用いて、生着率および移植した細胞の機能を解析することで、細胞移植に重要な細胞の構造を明らかにすることを目的とした。その結果、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。これまで、細胞の生着率に重要な役割を担う細胞の構造についてはほとんど明らかになっていなかった。今回の結果から、化学的破壊法を用いてきた従来の細胞治療の生着率が低い原因の一つとして、ECM に加えて細胞間結合および細胞骨格に関わるタンパク質が分解されずに保持されていることが挙げられる。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。

以上、これらの研究により、本博士論文では、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、本博士論文により、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細胞治療は、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。

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、組織構造を有する様々な臓器で起こる炎症性疾患(腸、肝臓、腎臓など)の治療、および臓器の再生(心臓など)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できると考えられる。本研究の結論は、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と考えられる。