

称号及び氏名 博士(獣医学) 三谷 康介

学位授与の日付 2022年3月31日

論文名 イヌにおける細胞治療の評価と治療用細胞の純化に関する研究

論文審査委員 主査 杉浦 喜久弥
副査 岡田 利也
副査 松林 誠
副査 稲葉 俊夫(岡山理科大学 獣医学部)
副査 鳩谷 晋吾

緒言

細胞治療は、体外で加工した細胞を体内に投与することによって、疾病や損傷を受けた組織を治療または修復することである。犬では、多くの臨床現場において活性化リンパ球と間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cells: MSC）を用いた治療が行われている。活性化自己リンパ球療法は、体外で増殖、活性化させた末梢血 T リンパ球を用いるがん免疫療法の 1 つである。MSC 療法は、脂肪組織などから培養によって得られる体性幹細胞の免疫抑制効果等を利用した難治性炎症性疾患等に対する治療法である。これら 2 つの治療法においては、「生活の質（Quality of life: QOL）」を改善させることが認識されている。しかし、QOL を評価するための普遍的で客観性のある統一した基準はこれまで無かった。そのため、QOL が治療効果の指標として認められることはなかった。2013 年に Lavan は、QOL の包括的尺度として、「健常犬」および「疾患犬」の健康状態を定量的に捉えることができる canine health-related QOL survey-15（CHQLS-15）を確立した。本法の特徴として、飼い主が評価を行うことで一貫性のある基準で客観的に QOL を評価することができる。近年、犬は「飼い主と共に生きる家族の一員」である伴侶動物として認識されるようになってきた。そのため、飼い主は、疾病に苦しむ犬の様子から大きな心のつらさやストレスを受ける。したがって、罹患犬の QOL を改善させることは治療上の重要な課題となっている。そこで、本研究では、CHQLS-15 を用いて上記細胞治療の有効性について検討した。

MSC は、脂肪組織などから培養によって増殖する接着性細胞集団である。しかし、この細胞集団には、線維芽細胞や内皮細胞など他種細胞が混在しており、さらに、増殖能や分化能などの異なる MSC が含まれている。それゆえ、高能力な MSC を純化できれば、抗炎症能や再生能が増強され、安定した高い治療効果が期待できる。2010 年に Kuroda らは、ヒト MSC をトリプシン処理し、生き残った細胞の中に多能性幹細胞である ES 細胞や iPS 細胞の胚様体に類似したクラスターを形成し、胚葉を超えて分化する Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞を発見した。Muse 細胞は、損傷組織への高い遊走能と自発的な分化能を示し、組織修復や機能回復をもたらす。そこで、本研究では、同様な方法により、イヌ MSC から高能力な再生治療用細胞を純化することを検討した。

第 1 章 イヌの細胞治療における評価の検討

第 1 節 活性化自己リンパ球を用いた治療における評価の検討

活性化自己リンパ球療法を受けたがん罹患犬に CHQLS-15 による評価を行い、QOL の改善を検証した。さらに、QOL の改善の機序を検索した。

密度勾配遠心法によって末梢血から分離した単核球細胞（PBMCs）を固相化抗イヌ CD3 抗体およびインターロイキン（IL）-2 と共に培養して活性化リンパ球を作製した。治療では、がん罹患犬 58 頭から作製した活性化リンパ球を最高で 6 回、静脈内投与した。QOL の評価では、CHQLS-15 に基づき、「幸せ」、「身体機能」、「衛生」および「精神状態」の分野について 3～5 項目、合計 15 項目を 5 段階で採点し、その平均値を QOL スコアとした。さらに、Jaeschke らが提唱した「臨床的に意味があると解釈できる最小の変化値（minimal clinically important difference (MCID))」を標準偏差から算

出した。また、健常犬 14 頭から作製した活性化リンパ球について、抗腫瘍活性を増強する IFN- γ の産生やイヌ甲状腺腫瘍株に対する細胞傷害活性を調べた。さらに、鎮痛作用を持つ内因性オピオイドである Met-enkephalin の発現を調べた。その結果、活性化自己リンパ球療法のためのグループ(20 頭)における 6 回治療後の QOL スコアは、治療前のそれと比べて有意に上昇し、MCID (0.38) を上回る上昇幅 (0.65) を示した。一方、外科的切除や放射線などの治療を行った後に活性化自己リンパ球療法を実施したグループ (38 頭) における 6 回治療後の QOL スコアは、治療前のそれと比べてほとんど上昇せず、MCID (0.52) を下回る上昇幅 (0.27) を示した。健常犬から得た活性化リンパ球は、PBMCs に比べて IFN- γ の産生が有意に高く、細胞傷害活性が有意に増加し、さらに、Met-enkephalin を発現していた。

以上、客観性を持つ QOL 評価法を用いることにより、活性化自己リンパ球療法はがん罹患犬の QOL を改善することが証明された。また、その機序として、抗腫瘍免疫活性の増加とともに内因性オピオイドの産生が関与していると考えられた。

第 2 節 MSC を用いた治療における評価の検討

MSC 療法を受けた慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) 罹患犬に CHQLS-15 による評価を行い、臨床病理学的評価と比較した。

健常犬の脂肪組織をコラゲナーゼで細片化して培養した。増殖した接着細胞を回収し、表面抗原の解析と中胚葉系細胞への分化誘導を行った。小動物における国際基準で中等度以上のステージに分類される CKD 罹患犬 8 頭に対して 1.0×10^6 cells/kg の MSC を最高で 4 回静脈内に投与し、腎機能障害を示す臨床病理学的指標である BUN および CRE を測定するとともに、CHQLS-15 による評価を行った。その結果、回収した細胞は、MSC マーカーである CD44 および CD90 を発現し、一方、単球マーカーである CD14 や白血球マーカーである CD45 を発現していなかった。また、本細胞は骨芽、脂肪、および軟骨細胞への分化能を示した。本細胞を脂肪組織由来 MSC (Adipose-derived stem cells: ADSC) として CKD 罹患犬に投与した結果、8 頭中 1 頭のみにおいて、治療前に高値であった BUN および CRE が治療後に基準値以下に低下した。一方、治療後の QOL スコアは、治療前のそれと比べて有意に上昇し、MCID (0.39) を上回る上昇幅 (0.83) を示した。

以上、CKD 罹患犬に対する MSC 療法の治療効果判定に CHQLS-15 を用いることで、QOL の改善が認められた。したがって、細胞治療の臨床的有効性が示された。

第 2 章 イヌの再生治療用細胞の純化

第 1 節 イヌのストレス耐性細胞の分離

ADSC から長時間トリプシン処理と浮遊培養によってストレス耐性細胞の分離を試みた。

ADSC をトリプシン溶液に懸濁し、37°C、16 時間培養した。その後、ボルテックスで死細胞を粉砕し、遠心分離によって除去した。生存細胞の割合、Muse 細胞マーカーである SSEA-3 の発現、およびマウス ES 細胞マーカーである SSEA-1 やその合成

酵素である *FUT9* の発現を調べた。さらに、本細胞を浮遊培養し形態的観察を行った。その結果、生存細胞の割合は $9.3 \pm 0.5\%$ であった。処理後の細胞において、処理前のそれに比べて *SSEA-3* の発現に有意差は見られなかったが、*SSEA-1* や *FUT9* の発現の有意な上昇が観察された。本細胞を浮遊培養することにより、多能性幹細胞の胚様体に類似した直径約 $50 \mu\text{m}$ のクラスターを形成するストレス耐性細胞を得た。

以上、イヌ ADSC から長時間のトリプシン処理と浮遊培養によって、Muse 細胞に類似したストレス耐性細胞を得た。

第2節 イヌのストレス耐性細胞の特性解析

前節で得られたストレス耐性細胞が高能力な再生治療用細胞となりうるかを検討するために、その多能性、造腫瘍性、および MSC としての機能を解析した。

多能性について、未分化マーカーである ALP 活性、多能性幹細胞マーカーである *SSEA-1*、*NANOG*、*SOX2*、*OCT3/4* および *TRA-1-60* の発現や三胚葉への分化能を調べた。また、造腫瘍性と相関のある *TERT* の発現を調べた。さらに、核型分析による染色体異常を調べた。MSC としての機能について、線維芽細胞コロニー形成による増殖能、ヒト MSC の分化能マーカーの発現や骨細胞および脂肪細胞への分化能、Boyden Chamber 法による遊走能、および末梢血リンパ球のマイトジェン反応やリンパ球混合反応に対する抑制能を調べた。その結果、ストレス耐性細胞は、ALP 活性を示し、上記多能性幹細胞マーカーを発現していた。また、中胚葉系の骨芽細胞および脂肪細胞、内胚葉系の肝細胞、外胚葉系の神経細胞への分化能を示した。一方、*TERT* の発現については、無処置の ADSC と同程度に低値であった。また、正常な核型を持っていた。さらに、ストレス耐性細胞は、ADSC と比較して、有意に高い増殖能、間葉系細胞への分化能、遊走能および免疫抑制能を示した。

以上、ストレス耐性細胞は、多能性を有するが、造腫瘍性の極めて低い細胞であり、MSC としての ADSC よりも有意に高い機能を持つことが明らかとなった。

総括

イヌにおける細胞治療の評価と治療用細胞の純化を行い、以下の結論を得た。

1. 客観性を持つ QOL 評価法 (CHQLS-15) を適用することにより、活性化自己リンパ球療法はがん罹患犬の QOL を改善することが証明された。また、その機序として、活性化リンパ球によって産生される内因性オピオイドの関与が示唆される。
2. CKD 罹患犬に対する MSC 療法に CHQLS-15 を用いることで、QOL の改善が認められた。
3. CHQLS-15 を用いることにより、上記細胞治療の臨床的有効性が示された。
4. 長時間のトリプシン処理と浮遊培養によってイヌ ADSC から Muse 細胞に類似したストレス耐性細胞を純化した。
5. 本ストレス耐性細胞は、未分化性と多分化能を持つが、造腫瘍性が極めて低く、さらに、MSC としての非常に高い能力を持っている。
6. 本ストレス耐性細胞は、高能力を持つ再生治療用細胞として期待できる。

審査結果の要旨

細胞治療とは、体外で加工した細胞を体内に投与することによって、疾病や損傷を受けた組織を治療する手法である。イヌでは、細胞治療として、活性化リンパ球と間葉系幹細胞(MSC)を用いた治療が最も多く行われており、これらは、「生活の質(Quality of life: QOL)」を改善させることが広く認識されている。しかし、これまでに QOL が客観的に評価されなかったため、QOL の改善が治療効果として認められなかった。近年提唱された canine health-related QOL survey-15 (CHQLS-15) は、「遊びたがる」、「きれいに身繕いしている」などの客観的に評価可能な項目を健康であった状態を基準としてスコア化し、定量的に表す評価法である。また、ヒトで用いられている minimal clinically important difference (MCID) は、スコアの標準偏差などから算出される値で、QOL 値の変化を臨床的に意味があるものとして表したものである。近年、イヌは飼い主と共に生きる伴侶動物として認識されるようになり、飼い主は、疾病に苦しむイヌの様子から大きな精神的ストレスを受ける。したがって、罹患犬の QOL を改善させることは治療上の重要な課題でもある。そこで、本研究では、CHQLS-15 と MCID によって上記細胞治療による QOL の変化を評価し、それらの治療効果について検討している。

一方、MSC 療法では、脂肪組織などの培養中に増殖する接着細胞を用いている。しかし、本細胞集団には、MSC の他に線維芽細胞や内皮細胞などが混在しており、さらに、MSC の中でも増殖能や分化段階が異なるため、抗炎症能や再生能にバラツキがあり、安定した高い治療効果が得られていない。Kuroda らは、ヒト骨髄培養における接着細胞をトリプシン処理して、生き残った細胞の中に胚葉を超えて分化する Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞を発見した。Muse 細胞は、損傷組織への高い遊走能と自発的な分化能を示し、組織修復や機能回復をもたらす。そこで、本研究では、イヌの脂肪組織由来接着細胞から Muse 細胞と同様な高い再生能力を持つ治療用細胞を純化することを検討している。

第 1 章では、CHQLS-15 によって活性化リンパ球療法および MSC 療法の治療効果を検討している。自己の末梢血単核球に抗 CD3 抗体とインターロイキン 2 を作用させて活性化リンパ球を作製し、それを用いて 20 頭のがん罹患犬を治療したところ、CHQLS-15 スコアの平均値は、治療前のものと比べ、統計的に有意に増加し、その変化は MCID を上回ったことを示している。一方、外科手術などの処置により QOL を改善させた後に活性化リンパ球療法を行った 38 頭において、CHQLS-15 スコアは、本療法終了後もほとんど変わらずに維持されていることを示している。また、活性化リンパ球が QOL を増加させる機序として、末梢血単核球よりも有意に高い腫瘍細胞傷害能を持つこと、有意に高いオピオイド産生能を持つことを明らかにしている。さらに、脂肪組織由来の MSC を用いて治療した 8 頭の慢性腎臓病罹患犬においても、CHQLS-15 スコアは治療前と比較して有意に増加し、その変化は、MCID を上回ったことを示している。以上の結果により、活性化リンパ球療法と MSC 療法は臨床的に効果のある治療法であることを明らかにしている。

第2章では、イヌにおける高能力の治療用細胞の純化を行っている。脂肪組織由来接着細胞に対してトリプシン処理と接着阻害を行って得たストレス耐性細胞は、**Muse**細胞と同様に多能性幹細胞の胚様体に似たクラスターを形成し、多能性幹細胞の持つ未分化マーカーを発現し、外、中および内胚葉系すべての細胞に分化する能力を持つが、造腫瘍性は無く、正常な核型を持つことを見出している。さらに、本細胞は、脂肪組織由来接着細胞に比べて有意に高い増殖能、間葉系細胞への分化能、傷害組織への遊走能および免疫抑制能を持ち、**MSC**としても非常に高い能力を持つことを見出している。以上の結果から、イヌにおいても高能力を持つ再生治療用細胞を純化できたことを明らかにしている。

以上、本研究の成果は、小動物医療の発展に有用であるだけでなく、臨床獣医学の新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。