

称号及び氏名	博士(獣医学) 仁科 嘉修
学位授与の日付	2022年9月23日
論文名	Pathological Studies on Characteristics of Rat Somatic Stem Cell-Recognizing Antibody (A3)-Labeled Cells; in Particular, the Analyses of Organogenesis and Fibrogenesis of the Colon (ラット体性幹細胞認識抗体 A3 標識細胞の特性に関する病理学的研究, 特に結腸の発生と線維化病変における解析)
論文審査委員	主査 桑村 充 副査 岡田 利也 副査 杉浦 喜久弥

## 論文要旨

### 緒言

幹細胞は自己複製能と多分化能を有し, その性状を維持し, 繰り返し増殖可能な細胞群として定義されている. 成体には体性幹細胞が備わっており, 組織傷害後の修復(再生・線維化)に関与するとされるが, その病理学的な役割についてはさらなる研究が必要である. このような体性幹細胞を基軸とした病態解析は「幹細胞病理学」の新たな展開に資すると考える.

悪性線維性組織球腫(MFH; 現在は未分化多形肉腫と称される)は, 多分化能を有する未分化な間葉系細胞に起源がある. ラットのMFHから樹立されたクローン細胞株を抗原として, MFH構成細胞に特異的なモノクローナル抗体A3が開発された. A3認識のエピトープは, 胚幹細胞の細胞分化に係るとされるN型糖鎖とされる. A3は, MFH構成細胞以外に, ラットの正常組織において骨髓幹細胞や血管周皮細胞などの間葉系の体性幹細胞を標識することが分かった. さらに, 毛包のバルジにある上皮系の幹細胞も標識する. すなわちA3はラットの上皮系と間葉系の双方に分化し得る体性幹細胞を認識する新たな抗体である.

消化管は, 陰窩底部に存在する上皮幹細胞が絶えず自己複製を行うことで腸管粘膜の恒常性維持および修復が行われている. この自己複製は, 陰窩周囲の微小環境(幹細胞ニッチ)によって制御されている. 幹細胞ニッチ形成には陰窩周囲に分布する筋

線維芽細胞が主要なファクターとされているが、その詳細は未だ明らかとなっていない。また、消化管の傷害では、粘膜にびらんや潰瘍が形成され、重度となると線維化が生じる。代表的な疾患に炎症性腸疾患がある。このような消化管の粘膜傷害後の組織修復にも消化管に存在する幹細胞が関与するとされる。消化管に出現する A3 標識細胞の動態とその標識細胞の粘膜再生や線維化への関与は十分には研究されていない。

この研究では、特に、明瞭な陰窩が観察される結腸における A3 標識細胞の特性を解明することを目的とし、第 1 章では結腸の発生過程と、成体の結腸における A3 標識細胞の分布について解析した。第 2 章では、炎症性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎のモデルとされるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発結腸傷害ラットモデルを作製し、粘膜上皮傷害後の上皮再生と線維化における A3 標識細胞の関与を解析した。さらに、これまでの研究で肝、肺、皮膚の線維化の病変形成において A3 標識細胞が関与していることが示されていることから、第 3 章では、結腸の線維化病変に加え、シスプラチン誘発腎線維化ラットモデルを新たに作製し、これらの臓器・組織での A3 標識細胞の線維化における役割を臓器横断的に解析し、包括的な考察を行った。

## **第 1 章 結腸の発生過程および成体の結腸における A3 標識細胞の分布と特性**

### **第 1 節 結腸の発生過程における A3 標識細胞の分布**

胎齢 18 日から生後 20 日のラット胎子および新生子の結腸を用いた。胎子および生後初期の結腸では、A3 は粘膜下組織の紡錘形間質細胞と毛細血管内皮細胞を標識した。発生の進行に伴い、粘膜下組織の A3 標識紡錘形間質細胞は減少し、生後 15 日以降では A3 標識細胞は結腸の陰窩周囲に局在した。A3 に標識された紡錘形間質細胞は RECA-1 (血管内皮細胞マーカー) を共発現していた。以上より、発生過程では、A3 は未分化な血管内皮細胞を認識することが分かった。

### **第 2 節 成体の結腸における A3 標識細胞の分布と特性**

6 週齢以上の成体ラットの結腸を用いた。A3 標識細胞は陰窩周囲に特異的に局在しており、特に陰窩底部で顕著であった。陰窩周囲の A3 標識細胞は、Thy-1 (未分化間葉系細胞マーカー) を共発現し、未熟な間葉系細胞の特徴を示すとともに、一部は CK19 (未分化上皮系マーカー) を発現する特徴があった。一方で、陰窩周囲に  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -平滑筋アクチン) を発現する筋線維芽細胞が認められたが、その細胞は A3 で標識されなかった。免疫電顕による解析で、A3 標識細胞は陰窩上皮に近接して局在していた。以上より、陰窩周囲の A3 標識細胞は、未分化間葉系細胞であり、一部は未分化な上皮系細胞の特徴を有しており、筋線維芽細胞とは異なる幹細胞ニッチを構成する新たな細胞である可能性が示された。

## **第 2 章 DSS 誘発結腸病変における A3 標識細胞の分布および特性**

### **第 1 節 DSS 誘発結腸病変における A3 標識細胞の分布**

成体ラットに 5%DSS を 3, 5, 7 日間投与、および 5 日間の DSS 投与後、1, 3, 5 日の回復期間を設けた個体から結腸を採材し、病理組織学的に解析した。投与 3 日目では粘膜上皮の非薄化、間質の浮腫、そして好中球、リンパ球やマクロファージなどの軽度な炎症細胞浸潤が認められた。投与 5 日目では、粘膜上皮の傷害・剥離に加え、陰窩構造の乱れが観察された。さらに、びらん・潰瘍が生じ、粘膜固有層に重度の線維化が形成された。投与 7 日目および回復 1 日目では、粘膜固有層と粘膜下組織において線維化が進行し、陰窩の消失と粘膜上皮の剥離が認められた。一方で、潰瘍形成部位では単層上皮細胞による被蓋上皮が形成され、上皮化 (粘膜再生) が始まった。回

復 5, 7 日目では線維化形成部位に陰窩の再生が認められた。A3 標識細胞は傷害初期では、対照群と同様に陰窩周囲に局在していたが、傷害の進行に伴い、変性した陰窩の周囲では A3 標識細胞は消失した。なお、線維化部位の RECA-1 を発現する新生血管の内皮細胞が A3 に標識された。潰瘍形成部位では A3 標識細胞が表層を覆うように集簇するとともに、その辺縁に粘膜上皮の再生が生じた。また、回復期間の線維化部位の再生した陰窩周囲には A3 標識細胞が再局在した。

## 第 2 節 DSS 誘発結腸病変における潰瘍表層の A3 標識細胞の特性

潰瘍形成部位の表層を覆うように集簇した A3 標識細胞は Thy-1 を共発現し、一部の A3 標識細胞は、CK19 発現細胞と局在が一致した。一方で、潰瘍形成部位を覆う再生しつつある上皮細胞は AE1/AE3 (成熟上皮細胞マーカー) を発現していたが、直下の A3 標識の集簇細胞は AE1/AE3 の発現は認められなかった。また、線維化部位の  $\alpha$ -SMA を発現する筋線維芽細胞と A3 標識細胞は一致しなかった。以上より、特に潰瘍部位を覆う A3 標識細胞は未熟な間葉系と上皮系の双方の性質を有するレスキュー細胞と考えられた。レスキュー細胞は、骨髄から動員される細胞であり、粘膜保護および再生の足場として粘膜上皮の再生に関与するとされる。

## 第 3 章 線維化病変における A3 標識細胞の特性に関する臓器横断的解析

### 第 1 節 シスプラチン誘発腎病変における A3 標識細胞の分布

シスプラチンをラットに投与し、尿細管傷害後の腎線維化病変を作製し、A3 標識細胞の分布を解析した。その結果、腎の間質線維化部位において、A3 は、新生した毛細血管内皮細胞と紡錘形の間葉系細胞の一部を認識した。後者の紡錘形細胞は Thy-1 を共発現しており、未熟な間葉系細胞であることが示された。また、線維化部位の糸球体に A3 により標識される細胞が存在した。この糸球体の A3 標識細胞は、vWF 発現血管内皮細胞とは一致せず、Thy-1 (メサンギウム細胞マーカー) と WT-1 (糸球体上皮細胞マーカー) を共発現していた。糸球体の A3 標識細胞は、これら細胞の更新 (恒常性) に係わる所見と考えられた。

### 第 2 節 肝, 肺, 皮膚, 結腸, 腎の線維化病変における A3 標識細胞に関する考察

線維化病変において、A3 は、肝では未分化な肝星細胞を、肺では新生血管の内皮細胞を、皮膚では新生血管の内皮細胞と周皮細胞、さらには、毛包結合織鞘の未分化間葉系細胞を認識した。結腸では、第 2 章で示したように新生血管の内皮細胞を、そして腎では第 3 章第 1 節で示したように新生血管の内皮細胞と Thy-1 発現の未分化な間質細胞をそれぞれ認識することが示された。A3 を発現する MFH 由来クローン細胞は TGF- $\beta$  添加条件下において、Thy-1 発現が減じ  $\alpha$ -SMA 発現筋線維芽細胞に形質転換することから、これらの細胞が、線維化部位で膠原線維を産生する筋線維芽細胞に分化することで線維化が進展すると考えられた。さらには、皮膚と結腸では線維化部位の表層において、A3 は未熟な上皮系細胞を認識することが分かった。A3 認識の上皮系細胞は上皮化 (表皮や粘膜の再生) にも寄与する可能性が示された。

## 総括

ラットの結腸の発生過程と DSS 誘発の結腸潰瘍・線維化病変における、A3 標識の体性幹細胞の分布と役割について解析し、以下の成果を得た。

1. 結腸の発生過程における A3 標識細胞は未熟な血管内皮細胞であり、陰窩の組織形成に関与することが示唆された。

2. 成体の結腸における A3 標識細胞は、陰窩周囲に見られ、それは筋線維芽細胞とは異なる未分化間葉系細胞と上皮系細胞の双方の特徴を示す細胞で、幹細胞ニッチを構成する新たな細胞と考えられた。
3. DSS 誘発腸病変では、潰瘍形成部位の被蓋上皮を形成する A3 標識細胞は未熟な間葉系および上皮系の双方の性質を有する細胞で、粘膜の保護および再生の足場となるレスキュー細胞として関与していることが示唆された。
4. DSS 誘発腸病変においては、線維化部位において、再生しつつある陰窩上皮の周囲に A3 標識細胞が再出現し、粘膜の再生に係ることが示された。
5. 腎の糸球体において、A3 は未熟なメサングウム細胞と糸球体上皮細胞を認識し、糸球体構成細胞の恒常性に関与する可能性が示唆された。
6. 肝、腎、肺、皮膚、結腸の線維化部位における A3 標識細胞の分布を臓器横断的に解析したところ、A3 は、新生血管構成細胞や未熟な間質細胞を認識し、それら細胞は線維化の進展に係る筋線維芽細胞の前駆細胞と考えられた。また、皮膚や結腸では、A3 は、傷害後の未熟な上皮系細胞を認識し、上皮化（再生）に寄与する細胞であることが分かった。
7. A3 は、ラットにおける間葉系と上皮系細胞に分化し得る体性幹細胞の解析に有用な抗体であることが示された。

## 審査結果の要旨

幹細胞は自己複製能と多分化能を有し、その性状を維持しつつ、繰り返し増殖可能な細胞群として定義されている。成体には体性幹細胞が備わっており、組織傷害後の修復（再生・線維化）に関与する。消化管では、陰窩底部に存在する上皮幹細胞が絶えず自己複製を行うことで腸管粘膜の恒常性維持および修復が行われている。この自己複製は、陰窩周囲の微小環境（幹細胞ニッチ）によって制御されている。幹細胞ニッチ形成には陰窩周囲に分布する筋線維芽細胞が大きな役割を担うとされている。また、消化管の傷害では、粘膜にびらんや潰瘍が形成され、重度になると線維化が生じるが、粘膜傷害後の組織修復にも消化管に存在する幹細胞が関与するとされる。A3 は、多分化能を有する未分化間葉系細胞由来の悪性線維性組織球腫（MFH；現在は未分化多形肉腫と称される）から樹立されたクローン細胞株を抗原として作製したモノクローナル抗体で、ラットの上皮系と間葉系の双方に分化し得る体性幹細胞を認識するとされる。しかし、消化管に出現する A3 標識細胞の動態とその標識細胞の再生や線維化への関与は十分には研究されていない。

本研究では、特に、明瞭な陰窩が観察される結腸における A3 標識細胞の特性を解明することを目的とし、ラットの結腸の発生過程、そして潰瘍性大腸炎モデルの再生と線維化における A3 標識細胞の役割を解析するとともに、様々な臓器における線維化病変に出現する A3 標識細胞の役割について包括的な考察を行っている。

第 1 章では、第 1 節において、ラットの胎子および新生児の結腸の発生過程における A3 標識細胞の分布を解析している。この時期、A3 は粘膜下組織の紡錘形間質細胞と毛細血管内皮細胞を標識しており、A3 標識の紡錘形間質細胞は RECA-1（血管内皮細胞

マーカー)を共発現していた。以上より、発生過程の結腸では、A3は未分化な血管内皮細胞を認識することを示した。第2節では、成体の結腸におけるA3標識細胞の分布と特性を解析している。A3標識細胞は、陰窩周囲に特異的に局在しており、Thy-1を共発現し未熟な間葉系細胞の特性を示すとともに、一部はCK19(未熟な上皮系細胞マーカー)を発現することが分かった。一方で、陰窩周囲のこのA3標識細胞は、 $\alpha$ -平滑筋アクチン( $\alpha$ -SMA)を発現する筋線維芽細胞とは一致せず、異なる細胞であることを示唆している。以上より、陰窩周囲のA3標識細胞は、未分化間葉系と一部は未分化上皮系の細胞の特性を有すること、そして幹細胞ニッチを構成する新たな細胞である可能性を示している。

第2章では、デキストラン硫酸ナトリウム誘発ラット結腸病変における粘膜傷害後の再生と線維化におけるA3標識細胞の分布と特性を解析している。陰窩周囲に局在しているA3標識細胞は、陰窩上皮の変性ととともに消失したが、回復期間では再生しつつある陰窩上皮の周囲に再局在していた。潰瘍部位では、A3標識細胞が表層を覆うように集簇しており、その辺縁に粘膜上皮の再生が生じた。その潰瘍表層のA3標識細胞は、Thy-1を共発現し、一部はCK19を発現していたことから、未熟な間葉系と上皮系の双方の性質を有し、粘膜再生(上皮化)の足場として機能するレスキュー細胞と考えられた。さらに、結腸の線維化部位にはA3とRECA-1を共発現する新生血管が観察された。以上より、A3標識細胞は、結腸粘膜傷害後の修復現象である上皮化(粘膜の再生)と線維化に関与することを明らかにしている。

第3章では、線維化病変におけるA3標識細胞の特性を臓器横断的に解析している。シスプラチン誘発ラット腎線維化モデルを作製し、A3標識細胞の分布を解析したところ、線維化部位においてA3は新生血管内皮細胞と紡錘形の間葉系細胞の一部を認識した。その紡錘形細胞はThy-1を共発現しており、未熟な間葉系細胞であることが示された。さらに、肝、肺、皮膚、腎、結腸の線維化病変において、A3は、肝では未分化な肝星細胞を、肺では新生血管の内皮細胞を、皮膚では新生血管の内皮細胞と周皮細胞、さらには、毛包結合織鞘の未分化間葉系細胞を、腎では新生血管の内皮細胞と未分化な間質細胞を、そして結腸では、第2章で示したように新生血管の内皮細胞をそれぞれ認識することを示した。A3を発現するMFH由来クローン細胞株は線維原性因子(TGF- $\beta$ )の影響を受け、Thy-1の発現が減じ $\alpha$ -SMAを発現する筋線維芽細胞に形質転換することから、線維化部位でのA3標識細胞が筋線維芽細胞の前駆細胞である可能性を示した。さらには、皮膚と結腸では線維化部位の表層において、A3は未熟な上皮系細胞を認識しており、A3標識細胞は、線維化に加え、上皮化(表皮や粘膜の再生)にも関与する可能性を示している。

本研究は、ラットの体性幹細胞を認識する抗体A3を用いて、結腸の発生過程における組織形成と、化学物質誘発の結腸病変における上皮化と線維化におけるA3標識細胞の役割の一端を明らかにしている。この成果は、獣医学・医学、特に生命科学分野の基礎研究の新たな展開に資するものと考えられる。よって、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。