

称号及び氏名	博士(獣医学)	藤本 洋平
学位授与の日付	2024年2月29日	
論文名	炎症性疾患に対する治療効果向上を目的としたネコ間葉系幹細胞培養法の研究	
論文審査委員	主査	杉浦 喜久弥
	副査	桑村 充
	副査	松林 誠
	副査	鳩谷 晋吾
	副査	田畑 泰彦
		(京都大学医生物学研究所)

## 論文要旨

### 緒言

間葉系幹細胞 (MSC) は、骨、軟骨または脂肪などの間葉系細胞への分化能力を持つほか、他の幹細胞にはない特性として、抗炎症作用や組織保護作用を示す。また、その作用は、MSC から分泌される肝細胞増殖因子 (HGF)、腫瘍壊死因子誘導タンパク 6 (TSG-6)、インドールアミン 2,3 ジオキシングナーゼ 1 (IDO-1) などの抗炎症性物質によることも明らかになっている。MSC は、これら抗炎症性物質をバランスよく持続的に供給することで、さまざまな種類の炎症細胞を制御し、免疫機構の乱れを調整する。この特性を利用して、近年ヒト医療において、MSC を用いて慢性腎臓病、肝硬変、炎症性腸疾患などの難治性炎症疾患の治療が行われるようになり、従来の免疫抑制剤療法に見られた副作用や耐性を示すことなく、良好な治療効果が得られている。獣医療においても、MSC はイヌの脊髄損傷の治療に用いられて良好な結果をもたらしている。ネコにおいても、慢性腎臓病やネコ喘息などの難治性炎症疾患に対して MSC 療法が行われているが、ヒトの場合と比べて、良好な結果が得られていない。その主な原因として、ネコの MSC がヒトやイヌ MSC と比べて治療能力において非常に劣っているためであると思われる。すなわち、ネコ MSC はヒトやイヌの MSC と比較して、非常にわずかな継代数で増殖能が低下してしまう。そのため、一度の採材によって治療のための十分な細胞数を得ることができない。さらに、ネコ MSC は通常抗炎症性物質

をあまり分泌していない非活性の状態にある。MSC は様々な抗炎症物質を持続的に供給することによって治療効果を示すため、それらの物質の産生能力の低さは、そのまま治療能力の低さにつながる。塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は、様々な幹細胞に対して高い細胞増殖促進作用を示し、未分化性を維持することが報告されている。よって、ネコ MSC に対しても同様の効果を期待できる。また、腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) やインターフェロン  $\gamma$  などの炎症性サイトカインや Toll 様レセプター (TLR) への刺激は、MSC から抗炎症性物質の分泌を促進する。中でも TLR3 刺激は最も強く MSC の抗炎症能を誘導することが報告されている。よって、ネコ MSC を移植前に TLR3 のリガンド (L) で処理することにより、高い抗炎症能をもつ治療用細胞を得られると思われる。MSC を局所的に移植してもすぐに散逸してしまい、移植部位において十分な効果を発揮できない。さらに、ヒトの MSC を凝集させてスフェロイド化することで、移植部位に保持されやすくなるだけでなく、抗炎症能をも向上させることが近年明らかになった。

本研究では、ネコの炎症性疾患に対する MSC の効果を向上させるため、ネコ MSC について、bFGF による増殖促進および未分化性の維持、TLR3L 処理による抗炎症能、スフェロイド形成による移植部位での保持への影響を検討し、これら処理の総合作用について調べた。

## 第1章 bFGF によるネコ MSC の増殖および未分化性維持への影響

ネコ脂肪組織由来 MSC (AdMSC) の増殖、未分化性および抗炎症能に対する bFGF の影響を検討した。

飼い主の承諾を得て健常雌ネコから脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理によって細片化して培養した。培養中、コロニー状に増殖した接着性細胞集団を AdMSC として回収した。AdMSC を bFGF とともに培養し、増殖性への影響を培養後の細胞数を算定することで調べるとともに、未分化性への影響をフローサイトメトリーにおける表面マーカー解析によって評価した。また、間葉系細胞への分化に対する影響をそれぞれの分化培地を用いて調べ、さらに、抗炎症物質の発現を RT-realtime PCR によって調べた。その結果、bFGF 添加培養することで、非添加の培養に比べて細胞数が有意に増加し、濃度依存性もみられた。また、bFGF 添培養の細胞は紡錘形の形態を保っていたが、非添加培養では細胞老化を示す細胞質の大型化がみられた。bFGF の濃度に関わらず、培養細胞のほぼ全てが MSC マーカーである CD29、CD44、CD90 および CD105 を発現していたが、間葉系細胞の未分化性を示す CD90 の発現量は、bFGF の濃度依存性に増加していた。骨細胞および脂肪細胞への分化は、bFGF 添加培養において非添加培養と同程度に認められた。一方、抗炎症・抗アポトーシス因子である HGF および TSG-6 遺伝子の発現は、bFGF 添加によって有意に増加した。

以上、bFGF は、ネコ AdMSC の増殖を有意に促進するとともに、細胞老化を抑制する可能性が示された。また、bFGF はネコ AdMSC の未分化性を向上させ、抗炎症能を増強することがわかった。一方、ネコ AdMSC の間質細胞への分化能は、bFGF によって影響されないことがわかった。

## 第2章 TLR3 刺激によるネコ AdMSC の抗炎症能への影響

TLR3 刺激がネコ AdMSC の抗炎症能に与える影響を検討した。さらに、bFGF との相互作用について検討した。ヒト MSC の TLR3 を刺激することにより IDO-1 の遺伝子発現が著しく促進される。IDO-1 は自ら免疫抑制作用を示すとともに、トリプトファンからキヌレニンを生合成して、抗炎症性細胞を誘導する。キヌレニンの阻害はヒト MSC の抗炎症能を著しく阻害する。よって、TLR3 刺激によるネコ AdMSC の抗炎症能に対する影響を IDO-1 遺伝子の発現およびキヌレニンの産生によって評価した。

TLR3L の一つである Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) とともにネコ AdMSC を 1 時間培養した後に洗浄し、さらに培地のみで 24 時間培養した。また、ネコ AdMSC を bFGF で培養した後、TLR3 刺激を同様に行った。IDO-1 遺伝子発現量を RT-realtime PCR によって調べ、キヌレニンの産生量を ELISA 法により評価した。その結果、TLR3 刺激したネコ AdMSC の IDO-1 遺伝子発現は、刺激を行っていないものと比較して有意に増加することが認められた。また、bFGF 処理した後に TLR3 刺激したネコ AdMSC の IDO-1 遺伝子発現およびキヌレニンの産生は、TLR3 刺激のみ、または bFGF 処理のみに比べて有意に増加した。しかしながら、第1章において bFGF 処理で増加が認められたネコ AdMSC の HGF および TSG-6 の遺伝子発現は、bFGF 処理 + TLR3 刺激によってさらに増加することはなかった。

以上、TLR3 刺激により、ネコ AdMSC からの IDO-1 とキヌレニン産生が増加した。また、bFGF は、TLR3 刺激ネコ AdMSC の抗炎症能を部分的に増強することがわかった。

## 第3章 スフェロイド化によるネコ AdMSC の抗炎症能および移植部位での保持への影響

ネコ AdMSC スフェロイドの抗炎症能と移植部位での保持に与える影響を検討した。

ネコ AdMSC を 96 well の U-bottom plate へ播種した後、200 ×g で 1 分間遠心し、その後 24 時間培養を行うことでスフェロイドを形成させた。TLR3 刺激したネコ AdMSC を用いてスフェロイド形成を行ってスフェロイドの形態を検討し、IDO-1 発現とキヌレニン産生による抗炎症能について平面培養の TLR3 刺激ネコ AdMSC と比較した。また、TLR3 刺激に加えて bFGF 処理を行い、これらの処理がスフェロイド化に及ぼす影響について調べた。スフェロイド化 AdMSC の抗炎症効果を *in vitro* で調べるために、トランスウェルを用いてスフェロイドをラット腹腔内マクロファージと非接触培養した後、マクロファージにおける TNF- $\alpha$  の発現を調べた。スフェロイド化による移植部位での保持への影響を検討するため、ネコ AdMSC スフェロイドをラット腎皮膜下に移植し、RT-realtime PCR または組織標本における検索によって残存移植細胞を調べた。また、移植部位に浸潤したマクロファージの種類を免疫組織化学染色によって調べた。その結果、TLR3 刺激ネコ AdMSC は、非刺激の AdMSC と同様の大きさや形態を示すスフェロイドを形成した。一方、TLR3 刺激 AdMSC のスフェロイドは、非刺激 AdMSC のスフェロイドに比べて有意に高い IDO-1 発現とキヌレニン産生を示し、TLR3 刺激した平面培養 AdMSC よりも高くなる傾向を示した。bFGF 処理と TLR3 刺激の両処理を行った AdMSC のスフェロイドは、bFGF 処理のみを行った AdMSC のスフェロイドや両処理を行った平面培養 AdMSC よりも有意に高い IDO-1 の発現が認めら

れた。さらに、bFGF 処理を TLR3 刺激前後に 2 回行って形成させたスフェロイドは、bFGF 処理 1 回のものに比べてプロスタグランジン E2 の合成酵素である COX-2 遺伝子の発現を有意に増加させた。この bFGF 処理×2 回+TLR3 刺激スフェロイドは、ラットマクロファージとの非接触培養によってマクロファージにおける TNF- $\alpha$  の発現を有意に低下させ、抗炎症効果を示した。さらに、本スフェロイドをラットの腎皮膜下に移植して、同様の前処置をして移植した AdMSC 単細胞と比較したところ、有意に多くの移植細胞が残存していた。また、本スフェロイドの移植部位には、PBS 注入部位に比べて多く抗炎症性の CD163<sup>+</sup>マクロファージが浸潤しており、CD68<sup>+</sup>マクロファージとの比が有意に高かった。

以上、ネコ AdMSC をスフェロイド化することによって抗炎症能が増強した。また、bFGF 処理、TLR3 刺激およびスフェロイド化は、ネコ AdMSC の抗炎症能を相互に増強し合うことが分かった。また、スフェロイド化 AdMSC を移植することによって、移植部位により保持されて抗炎症効果を発揮する可能性が示された。

## 総括

1. bFGF 処理によって、ネコ AdMSC の増殖が促進した。また、未分化性が維持されたが、分化能には影響なかった。さらに、抗炎症能が高まった。
2. TLR3 刺激によって、ネコ AdMSC の抗炎症能が向上した。また、本機能の向上について TLR3 刺激と bFGF との相加／相乗効果が認められた。
3. スフェロイド化によって、ネコ AdMSC の抗炎症能が向上し、また、スフェロイド化 AdMSC を移植することによって、移植部位により保持されて抗炎症効果示す可能性が示された。

以上の結果から、bFGF 処理、TLR3 刺激およびスフェロイド化は、炎症性疾患に対するネコ MSC 治療の効果を向上させると思われる。

## 審査結果の要旨

間葉系幹細胞 (MSC) は、培養において自己複製しながら増殖し、骨や軟骨などの間葉系細胞へ分化するが、他の幹細胞と異なり抗炎症作用を示す。その作用は、MSC から分泌される肝細胞増殖因子 (HGF)、腫瘍壊死因子誘導タンパク 6 (TSG-6)、インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ 1 (IDO-1) などの抗炎症性物質によるもので、MSC は、これらをバランスよく持続的に供給することで、さまざまな炎症細胞を制御する。この特性を利用して、近年ヒト医療において、慢性腎臓病、肝硬変、炎症性腸疾患などの難治性炎症疾患の治療が行われるようになり、良好な治療効果が得られている。ネコにおいても、慢性腎臓病や喘息などの難治性炎症疾患がみられ、それらに対して MSC 療法が行われているが、良好な結果を得られていない。ネコ MSC は、ヒトやイヌの MSC と比べて、培養においてわずかな継代数で増殖能が低下してしまうため、一度の

採材で治療のための十分な細胞数を得ることができない。それに対し、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は様々な幹細胞の増殖を促進し、未分化性を維持させることが報告されている。また、通常 MSC の抗炎症性物質の産生には炎症刺激が必要であるが、それには Toll 様レセプター (TLR) 3 への刺激が最も効果的であることが報告されている。また、MSC を単細胞で移植しても散逸してしまい、炎症部位において十分な効果を発揮できない。それに対し、MSC を凝集させてスフェロイド化することで、移植部位に保持されやすくなることが報告されている。そこで、申請者は、ネコの炎症性疾患に対する MSC 治療の効果向上を目的として、培養において bFGF および TLR3 リガンドを作用させ、また、スフェロイド化することによるネコ MSC の抗炎症能に対する影響を検討している。

第 1 章では、bFGF 添加培養によるネコ MSC の増殖および未分化性維持への影響について調べている。ネコの脂肪組織をコラゲナーゼ処理によって細片化して培養し、コロニー状に増殖した接着性細胞集団を MSC として回収した。MSC を 100 ng/ml の bFGF とともに 5 日間培養し、増殖性への影響を培養後の細胞数を算定して調べた。また、フローサイトメトリーでの表面マーカー解析により未分化性への影響を、専用培地を用いて間葉系細胞への分化能を調べた。さらに、抗炎症物質の発現を RT-realtime PCR によって調べた。その結果、bFGF の添加培養をすることで、非添加の培養に比べて細胞数が有意に増加し、発現間葉系細胞の未分化性を示す CD90 の発現量が bFGF の濃度依存性に増加していた。また、骨細胞および脂肪細胞への分化能は維持され、HGF および TSG-6 遺伝子の発現が有意に増加した。以上より、bFGF 培養によってネコ MSC の増殖が促進され、未分化性が亢進し、抗炎症能が増強されることを見出している。

第 2 章では、TLR3 刺激によるネコ MSC の抗炎症能への影響を調べている。抗炎症物質であるIDO-1は、トリプトファンから抗炎症作用を示すキヌレニンを生産する。ネコ MSC を TLR3 リガンドであるポリイノシン・ポリシチジル酸 1  $\mu\text{g/ml}$  とともに 1 時間培養後、IDO-1 の発現量を RT-realtime PCR により、培地中のキヌレニン生成量を ELISA 法により測定したところ、TLR3 刺激しないものに比べて有意に増加した。また、TLR3 刺激前に bFGF 培養をすることにより、IDO-1 発現量およびキヌレニン生成量がさらに増加した。以上より、TLR3 刺激培養によってネコ MSC の抗炎症能が有意に亢進し、bFGF 培養によってさらに増強されることを見出している。

第 3 章では、スフェロイド化によるネコ MSC の抗炎症能および移植部位での保持への影響について調べている。ネコ MSC を 96 well の U-bottom plate 中で 200 $\times$ g、1 分間遠心した後 24 時間培養してスフェロイドを形成させた。抗炎症能を平面培養 MSC と比較したところ、スフェロイド化 MSC は有意に高く IDO-1 を発現し、キヌレニンを生成した。これら抗炎症物質の産生亢進は、スフェロイド化の前に MSC を bFGF 培養と TLR3 刺激を行うことで有意に増強した。この bFGF 培養—TLR3 刺激スフェロイドは、ラットマクロファージとの非接触培養において、炎症物質である腫瘍壊死因子の発現を有意に低下させた。さらに、本スフェロイドをラットの腎被膜下に移植したところ、単細胞の移植と比較して有意に多くの細胞が残存しており、その移植部位には多くの CD163<sup>+</sup>抗炎症性マクロファージが認められた。以上より、スフェロイド化によってネコ MSC の抗炎症能が亢進し、それが bFGF 培養および TLR3 刺激により増強さ

れること、また、移植部位により保持されて抗炎症効果を発揮する可能性を見出している。

以上、本研究の成果は、小動物再生医療に新たな展開をもたらすものであり、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。