

難治性呼吸器疾患に対する次世代細胞治療法の開発

千葉大学大学院医学研究院呼吸器内科学

鈴木 拓児

我々は以前に遺伝性肺胞蛋白症が、GM-CSF受容体遺伝子(*CSF2RA*あるいは*CSF2RB*)変異によって生じることを初めて報告したが、いまだ疾患特異的な治療法はない。全身麻酔下において大量の生理食塩水で片肺ずつ洗浄する全肺洗浄が臨床的に行われているが、患者によっては頻回に洗浄が必要で非常に侵襲的であり、より有効な治療法の開発が望まれている。肺胞マクロファージの機能を改善するために理論的には骨髄移植が有効であると考えられるが、進行した重症患者では呼吸器状態が悪く、骨髄移植の施行を断念せざるを得ない症例を経験している。また、骨髄移植をうけた本疾患患者ではドナー骨髄の生着前に感染症で亡くなった例が、肺移植が行われた例では再発し病状進行のために亡くなった例が報告されている(*J Exp Med.*2008;205:2711, *J Med Genet.*2011;48:209)。一方、申請者らが開発した肺マクロファージ移植治療法(Pulmonary Macrophage Transplantation, PMT)は骨髄移植の際に必要な放射線照射や化学療法といった骨髄破壊的前処置を行わずに、マクロファージを一回、直接肺へ移植する方法であり、GM-CSF受容体機能が正常なドナー細胞がレシピエント細胞に比べて生存と増殖により有利に働くことにより、長期間にわたる正常マクロファージの生着と有効性・安全性が確認されており画期的新規治療法と考えられる(Suzuki et al. *Nature.*2014)。本治療法はヒト*CSF2RB*遺伝子変異に相当する*Csf2rb*ノックアウトマウスにて骨髄由来マクロファージを用いて、その有効性が示されているが、iPS細胞由来マクロファージなどドナー細胞の選択肢についての検討は次なる重要な課題である。また、ヒトで患者数の多い(約9割を占める)*CSF2RA*遺伝子変異による遺伝性肺胞蛋白症に相当する*Csf2ra*ノックアウトマウスはこれまで存在しなかったために、動物モデルの解析や治療法の検討といった基礎的な研究が困難であった。そこで今回あらたに作成したマウスを用いてPMTの有効性と安全性について検討した。

(1) 遺伝性肺胞蛋白症の新規モデルマウスである*Csf2ra*ノックアウトマウスについて野生型マウスと比較解析した。とくに骨髄細胞およびマクロファージ(骨髄由来および肺胞マクロファージ)におけるGM-CSFシグナル伝達および機能、肺の表現型である肺胞蛋白症の病態について病理組織学的検討および気管支肺胞洗浄法(Bronchoalveolar lavage, BAL)によりその細胞およびBAL液の混濁度、脂質・蛋白濃度・サイトカイン濃度などについて測定解析した。その結果、ヒト遺伝性肺胞蛋白症の忠実な疾患モデルマウスであることが示された(図1)。

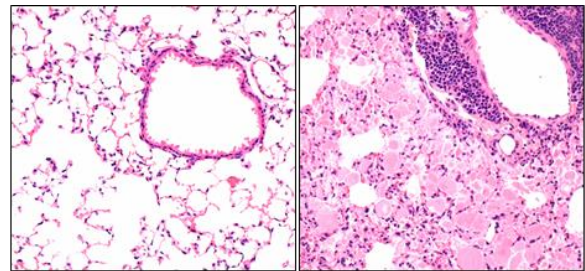


図1 肺病理組織所見
(左)野生型正常マウス、(右)*Csf2ra*遺伝子欠損マウスでは肺胞内に、肺胞蛋白症に特徴的なサーファクタント関連物質の貯留が観察された。

(2) 次にこの*Csf2ra*ノックアウトマウスに対して肺マクロファージ移植(PMT)の治療効果と安全性について検討した。

① マウス骨髄由来マクロファージを用いた肺マクロファージ移植治療（細胞治療モデル）

肺マクロファージ移植法(PMT)によって*Csf2ra*ノックアウトマウスの病態が改善するか及びその安全性について検討した。正常野生型のマウス骨髄より分化させたマクロファージ(2×10^6 個/マウス)を、麻酔下で*Csf2ra*ノックアウトマウスの肺へ経気管的に一回投与(移植)し、PMT2か月後にBALを行い(図2A)、そのBAL細胞像(図2B,C)を解析した。また、BAL液について未治療群と比べてその病態を混濁度、脂質濃度、蛋白濃度、サイトカイン(GM-CSF, M-CSF, MCP-1など)濃度について比較検討したところ、PMTによる有意な治療効果が認められた(図2D)。また、BAL液中の細胞(主に肺泡マクロファージ)について、その表面マーカーをフローサイトメリーで評価し、包括的遺伝子発現についてRNA-seqによって比較測定した。末梢血液の血球分画および炎症性サイトカインの解析では、治療に伴う副作用などは観察されなかった。

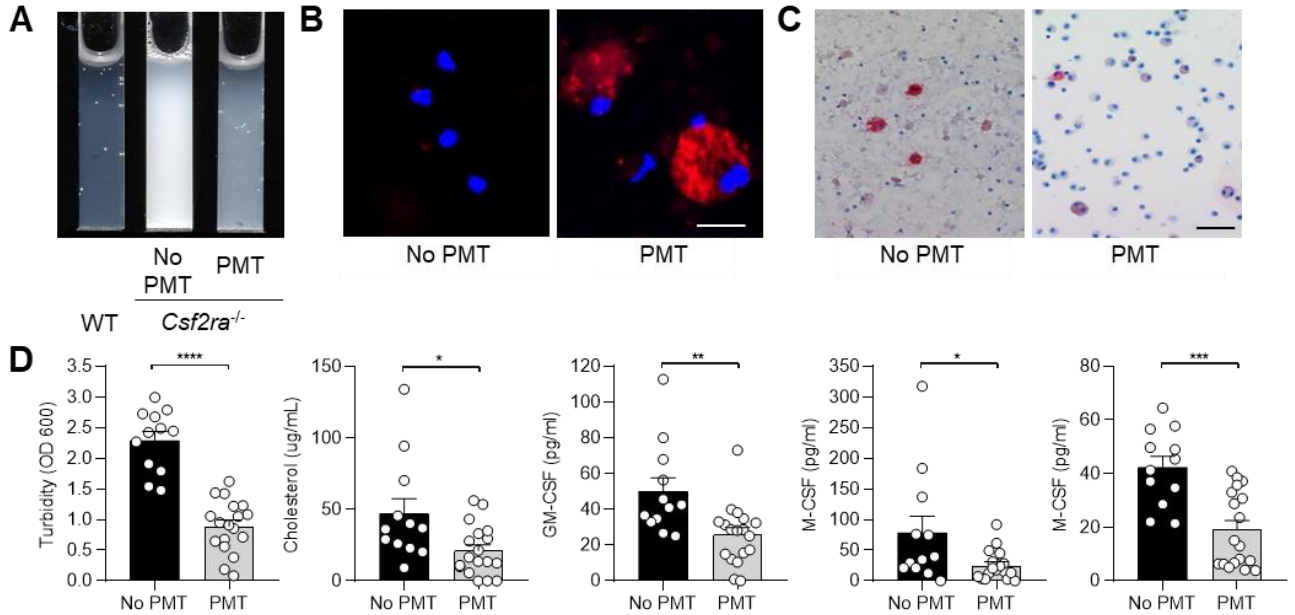


図2 肺マクロファージ移植(PMT)の治療効果

A. 肺胞洗浄液(BAL)。野生型マウス(WT)に比べて未治療の*Csf2ra*遺伝子欠損マウスでは肺胞蛋白症に特徴的な白濁が観察されたが(No PMT)、PMT治療後にはその改善が観察された。B. *Csf2ra*(CD116)免疫染色。PMT治療2か月後には移植細胞の生着が観察された。C. BALではOil red O染色陽性な泡沫細胞およびサーファクタント関連物質貯留の改善がみられた。D. PMT治療6か月後にはBALの混濁度(Turbidity)、Cholesterol、GM-CSF、M-CSF、MCP-1の濃度の有意な低下といった治療効果がみられた。****: $P < 0.0001$, ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$ 。

② ノックアウトマウスの造血幹細胞をウイルスベクターを用いて遺伝子治療し、マクロファージに分化させた細胞を用いた肺マクロファージ移植治療（遺伝子治療モデル）

*Csf2ra*遺伝子を発現するレンチウイルスベクター(EFS.*Csf2ra*.LV)を構築し(図3A)、その機能について確認した(図3B)。このベクターを用いて、ノックアウトマウス骨髄造血幹細胞(LSK細胞)に遺伝子導入し、上記方法と同様にマクロファージに分化させた後にノックアウトマウスに対して肺マクロファージ移植を施行したところ、治療効果と安全性が確認された(図3C)。

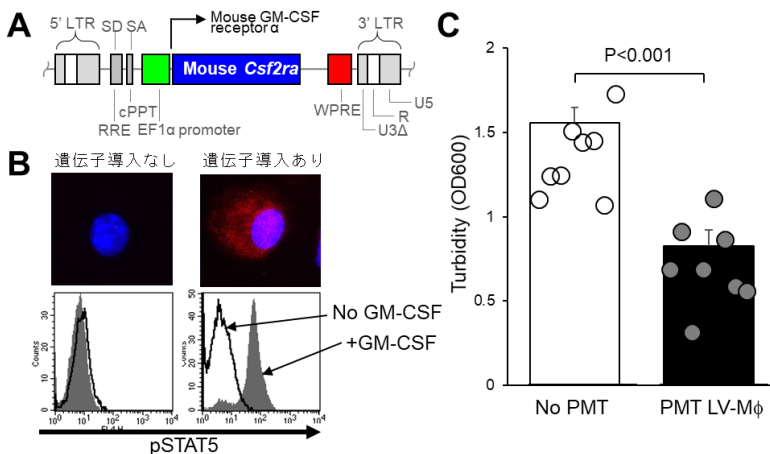


図3 遺伝子導入細胞を用いた肺マクロファージ移植(PMT)の治療効果
A. *Csf2ra*遺伝子導入のレンチウイルスベクター(EFS.*Csf2ra*.LV)。B. *Csf2ra*遺伝子導入によるGM-CSF受容体 α 鎖(*Csf2ra*)の発現(上段、赤:*Csf2ra*(CD116)免疫染色)とGM-CSF刺激後のSTAT5リン酸化(pSTAT5)でみた機能的改善(下段)。C. PMT治療2か月後にはBALの混濁度(Turbidity)有意な低下(治療効果)が認められた。

③ マウスiPS細胞由来マクロファージによる肺マクロファージ移植治療 (iPS細胞治療モデル)

将来のヒトにおける細胞治療の魅力的なリソースであるiPS細胞については、実験計画の都合で*Csf2rb*ノックアウトマウスの系で解析した。正常なマウスiPS細胞から分化させたマクロファージについて他の組織マクロファージと表面マーカーおよび包括的遺伝子発現(RNA-seq)について比較検討したところ、骨髄由来マクロファージに近い特徴を示した。さらにこのiPS細胞由来マクロファージ(CD45.1⁺)を用いて上記の様にノックアウトマウス(CD45.2⁺)に対して肺マクロファージ移植を行い、未治療群と比較してその治療効果と安全性について評価した。肺マクロファージ移植後にはドナー由来細胞の生着が確認され(図4A)、BALでは治療効果が確認された(図4B)。さらにその表面マーカーと遺伝子発現について解析し、移植前のパターンからの変化について検討したところ、ドナー細胞(iPS細胞由来マクロファージ)は移植前のiPS細胞由来マクロファージや骨髄由来マクロファージよりも、肺泡マクロファージに近い特徴を示すことが明らかとなり(図4C)、細胞にとって肺微小環境が重要であることが示唆された(*Stem Cell Report*. 2018: 11; 696-710)。

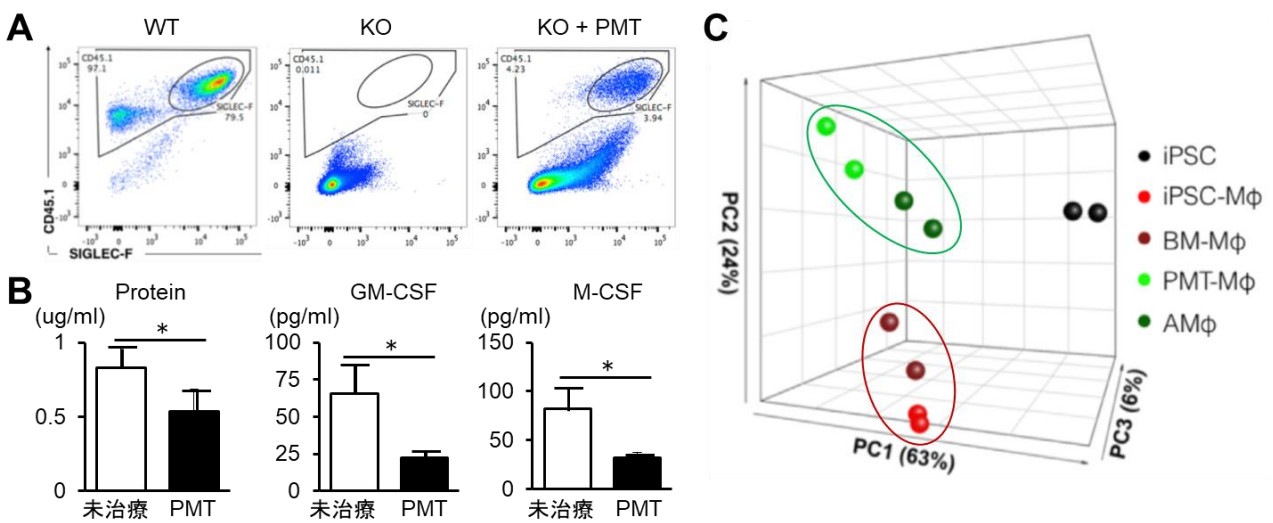


図4 iPS細胞由来マクロファージを用いた肺マクロファージ移植(PMT)

A. 肺マクロファージ移植(PMT)後のiPS細胞由来マクロファージの解析。肺泡洗浄液(BAL)細胞についてCD45.1⁺SiglecF⁺細胞(ドナー細胞)をFlow cytometryによって解析した。野生型マウス(WT)で見られる肺泡マクロファージ(CD45.1⁺SiglecF⁺細胞)は*Csf2rb*遺伝子欠損マウス(KO)では認められないが、PMT後にドナー細胞が生着していることが観察された。

B. PMT治療2か月後にはBAL液中の蛋白質、GM-CSF、M-CSFの濃度の有意な低下といった治療効果がみられた。*;P<0.05。

C. 包括的遺伝子発現の主成分解析(principal component analysis; PCA)。iPS細胞(iPSC)、iPS細胞由来マクロファージ(iPSC-Mφ)、骨髄由来マクロファージ(BM-Mφ)、iPS細胞由来マクロファージを肺マクロファージ移植(PMT)した後に再回収したマクロファージ(PMT-Mφ)、肺泡マクロファージ(AMφ)についてRNA-seqにより遺伝子発現を解析した結果。PMT-MφはiPSCやiPSC-MφやBM-MφよりもAMφに近い遺伝子発現の特徴を示した。

以上のように本研究では、これまで基礎的な研究が困難であった*CSF2RA*遺伝子変異による遺伝性肺泡蛋白症について、相当する*Csf2ra*ノックアウトマウスを新たに作成して解析を行った(*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. in press)。そして新規治療法である肺マクロファージ移植治療(PMT)および遺伝子治療について、その有効性と安全性について研究をおこなった(*Mol Ther*. 2019;27;1597-1611)。またPMTのドナー細胞としてiPS細胞由来のマクロファージの有効性についても評価をおこなった結果(*Stem Cell Report*. 2018: 11; 696-710)、将来の非常に有望な治療方法であることが示唆された。