主論文の要約

# Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating acute lung injury in mice

（歯髄幹細胞が分泌する因子群はマウスの急性肺傷害に多面的な治療効果を示す）

名古屋大学大学院医学系研究科　細胞情報医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座　顎顔面外科学分野
（指導：日比 英晴　教授）
若山 博隆

【緒言】

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は、急速に進行する呼吸不全と肺の組織破壊に続く非可逆性の線維化を特徴とする炎症性疾患である。炎症と線維化を制御・抑制することはARDSの治療の鍵と考えられているが、病態を直接改善するような有効な治療法は開発されていない。これまでに、ブレオマイシン(BLM)を用いて作成した肺傷害マウスモデルに対して、骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)をはじめとする各種幹細胞の移植による病態改善効果が報告されている。しかしながら、移植された細胞の生着率や分化効率の低さから、幹細胞による治療効果は細胞由来の液性因子によるものが主体であると考えられている。一方、幹細胞が産生する治療効果因子の実体は多くが不明のままである。治療効果因子が同定できれば、細胞移植を要しない新しい治療法の開発が期待できる。

ARDSの病態に重要な役割をはたす細胞の一つにマクロファージがある。近年、マクロファージには炎症性のM1と抗炎症性･組織再生型のＭ２というフェノタイプが存在することが報告されている。M1は炎症性サイトカインを産生し、生体防御の要であるが、その異常な活性化が組織破壊や線維化を引き起こす。M2には炎症反応や線維化を抑制することが報告されている。ARDSのＭ１環境をＭ２環境に変換できれば、治療効果が期待出来る。

ヒト乳歯歯髄幹細胞(SHED)は優れた増殖能と多分化能を示す幹細胞である。われわれはこれまでに、ヒトSHEDを肝障害や神経損傷などのさまざまな炎症性疾患の動物モデルに移植すると優れた治療効果を示すことを報告してきた。今回、SHEDとSHEDが分泌する液性因子を含んだ無血清培養上清（SHED-CM）をBLM肺傷害モデルマウスへ投与しその治療効果を検討した。またCMのプロテオーム解析を行い、CM中に含まれる液性因子の機能分類を行った。本研究では、肺傷害に対して細胞が分泌する液性因子を用いた新たな治療法の可能性について検討した。

【材料と方法】

本学倫理委員会承認のもと本学附属病院で患者の同意を得て提供されたヒト乳歯よりSHEDを分離・培養した。比較対照群として、Lonza社から購入したヒト骨髄間葉系幹細胞（BMSC）を使用した。各細胞を培養し、８０%コンフルエント状態で無血清培地（DMEM）に交換、さらに４８時間培養した後に上清を回収した。上清を遠心し細胞残骸などを除去したものをCMとして使用した。

７～９週齢雌C57BL/6Jマウスを麻酔し、舌を牽引した状態で6U/kgのBLMを生理食塩水溶液として気管内投与し肺傷害モデルを作成した。モデル作成２４時間後に頸静脈より各種細胞($1\times10^6$)を移植、またはCM(500μl)を投与した。体重変化を９日間、生存率を１４日間評価し、H-E 染色による組織学的解析と、免疫組織学的解析およびReal time RT-PCR 法を用いた炎症性/抗炎症性因子の遺伝子発現解析にて各群の治療効果を検討した。*in vitro*では、マウス大腿骨髄より採取した単球をM-CSFでマクロファージへ分化させ、SHED-CMで培養したときのM2マクロファージへの誘導能を評価

した。SHED-CMとBMSC-CMについてヒト２７４種類のサイトカインアレイ解析を行い、CM中に含まれる液性因子群の機能分類を行った。

**【結果】**

肺傷害モデルマウスにPBS、BMSC、SHEDを投与した結果、SHED移植群では体重減少の抑制と生存率の改善が得られた（図1B、C)。組織学的解析にて、PBSを投与した肺傷害モデルマウスは投与６日後の時点で肺胞および間質に炎症性細胞が浸潤し、組織の破壊と線維化を認めた。一方、SHED移植群ではこのような炎症反応は著明に改善した。肺傷害を病理学的に評価するアシュクロフトスコアも有意に改善した(図2A、C)。一方、SHED-CM投与群も、DMEM投与群及びBMSC-CM群と比較し有意な改善を認めた(図2B,C)。重要なことに、生存率、体重変化および組織評価実験において、SHEDによる治療効果とSHED-CMによる治療効果は同等であった(図1B、C、図2)。さらに、MHC-classⅠ特異的抗体を用いた免疫組織学的解析によって、移植後１週間における、SHEDの肺生着率は１%以下であった（図1D)。

Real time RT-PCR法による肺傷害モデルの急性期炎症性/抗炎症性因子の遺伝子発現解析では、各種炎症性サイトカイン（IL-1β、TNF-α、IL-6）やiNOSの発現がピークとなるBLM投与後３０時間で、SHED-CM投与群では有意な発現抑制を認めた(図4A)。一方、M2マーカー（CD206、Arginase1、Ym1）の発現はSHED-CM群で有意に増加した（図4A)。BLM投与７日後に、線維化マーカー（TGF-β、α-SMA）もSHED-CM投与群では有意な発現抑制を認めた（図3C)。

免疫組織学的解析では、BLM投与６時間後に肺組織に集積したマクロファージを免疫組織学的に解析すると、SHED-CM群において有意にCD206/CD11b陽性M2マクロファージ数が増加した（図4B)。さらにBLM投与７日後に、SHED-CM群ではα-SMA陽性を示す組織の面積が有意に減少していた（図3A、B)。

マウス大腿骨髄より採取した単球をM-CSFでマクロファージへ分化させ、各種条件で培養した。SHED-CMで培養した骨髄由来マクロファージは、対照群であるDMEMで培養したマクロファージと比較してM2マクロファージ形質に特徴的な突起伸長をともなう紡錘形を示した(図5A)。Real time RT-PCR法による遺伝子発現解析では、SHED-CMで培養した群ではM2マーカー(CD206、Arginase1、Ym1)の発現が有意に増加した（図5B)。

SHED-CM、BMSC-CMのヒト２７４種類サイトカインアレイの結果、SHED-CMには７９種類、BMSC-CMには４３種類の液性因子が含まれていた。これらのうち４０因子は共通に発現し、３９因子はSHED-CM特異的に発現していた。機能分類の結果、SHED-CMは、抗炎症、抗線維化、肺上皮の再生促進、及び血管新生効果を示すとされる１５種類の治療効果因子を含むことが分かった。(表Ⅱ)。

**【考察】**

SHED移植およびSHED-CM投与は、BLMによる肺の線維化を軽減し、体重減少を

抑制し、生存率を改善した。移植した SHED の生着率が低いことや、SHED と SHED-CM の治療効果がほぼ同じであることから、SHED による治療効果は、SHED が分泌する液性因子によることが示唆された。サイトカインアレイ解析で、これまでに肺傷害に対して病態改善効果があることが報告されている KGF、HGF、DKK、IL-1Ra、SCF、VEGF、MCP-1、IGF-1 などの因子が SHED-CM に多く含まれていることが確認された。CM 中のこれら治療効果因子の濃度は低いが、複数の因子が協調的に作用して治療効果を発揮していることが考えられた。

*in vitro* の実験で、SHED-CM で誘導した骨髄由来マクロファージを Real time RT-PCR 法で解析すると、M2 マーカーである Arginase1 や CD206、Ym1 の発現増加を認めた（図 5B）。近年、M2 には異なるいくつかのフェノタイプが存在することが報告されている。SHED-CM で誘導した M2 では、IL-10 などの代表的な M2 マーカーの発現上昇を認めなかった。今後、SHED-CM により誘導される M2 と、従来型の M２誘導因子 IL-4 や IL-13 などによって誘導される M2 について比較することで、それぞれのフェノタイプや治療メカニズムがより明らかになる可能性がある。

われわれはこれまでに、SHED-CM をマウス低酸素脳症モデルやラット脊髄損傷モデルに投与すると、M2 環境を誘導し病態改善を促すことを報告してきた。本研究とあわせて、この炎症性 M1 環境から抗炎症性 M2 環境への変換は難治性の炎症性疾患に対する有効な治療戦略となることが示唆された。

**【結語】**

SHED-CM は、肺傷害モデルの病態を改善した。サイトカインアレイ解析から SHED-CM には炎症抑制や線維化抑制、M2 マクロファージの誘導に働く治療効果因子が複数含まれることが示唆された。本研究により、SHED-CM は ARDS を始めとする肺傷害に対する有効な治療戦略となることが示唆された。