

主論文の要旨

**Mesenchymal stem/stromal cells stably transduced
with an inhibitor of CC chemokine ligand 2
ameliorate bronchopulmonary dysplasia and
pulmonary hypertension**

〔 CCL2 を抑制する間葉系幹細胞は新生児慢性肺疾患および
それに伴う肺高血圧を改善する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

鈴木 俊彦

【緒言】

新生児慢性肺疾患（CLD）は、子宮内炎症、機械的外傷、酸素毒性などが要因となって生じる肺損傷であり、長期の呼吸障害や肺高血圧症（PH）、精神運動発達遅滞といった合併症を引き起こす。現在のところCLDに対する十分な治療法はなく、そのため新規治療法の開発は新生児医療における喫緊の課題である。近年、新規治療法として再生医療が注目されており、CLDに関しても間葉系幹細胞（MSC）を用いた臨床試験が進められている。しかし、MSCはCLDの病態に強く関わるマクロファージに対する作用が強いとは言えない。一方、7NDはCC chemokine ligand 2（CCL2）に対して阻害作用を持つヒトCCL2欠失変異体であり、マクロファージの遊走及び走化抑制効果を持つ。

本研究では、7NDを遺伝子導入したMSC（7ND-MSC）が、MSCによる治療効果に加え、7NDによるマクロファージ抑制効果を有するという仮説のもと、CLDモデルラットを用い、7ND-MSC及びMSCの治療効果について検討を行った。

【方法】

本動物実験は、名古屋大学の学内審査機関より承認を得た上で行った。

細胞調整：7ND-MSCは、ヒトCCL2欠失変異体（7ND）をレンチウイルスベクターに再クローニングした後、293T細胞にトランスフェクションしてベクターストックを作製し、ポリブレン（4 μ g/mL）下でラットMSCと共培養することで作製した。

モデル作製：CLDモデルは、Wistar/ST新生仔ラットを生直後から日齢15まで80%高酸素に暴露することで作製した。日齢5に、酢酸リンゲル液に懸濁した7ND-MSC（1 \times 10⁵個；7ND群）、対照MSC（1 \times 10⁵個；MSC群）または酢酸リンゲル液のみ（Vehicle群）を右外頸静脈から投与した。なお、高酸素負荷を行わず、日齢5に酢酸リンゲル液のみを投与したラットをSham群とした。日齢15にラットを屠殺し、4群間で各種評価を行った。

血液・気管支肺胞洗浄液（BALF）評価：全身および気道の炎症を評価するために、屠殺時に血液、BALFを採取し、白血球数やその分画を測定した。血液は、動物用血球計数装置を用いて測定を行った。BALFは、Türk溶液で染色後、血球計算盤を用いて総細胞数を計測した。次いで塗抹標本作製し、メイギムザ染色後に白血球分画を評価した。

肺組織評価：肺胞形成障害の評価として、肺組織切片を用いてヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色を行い、肺組織体積密度（Tissue volume density; VD_T）、肺胞表面積（Alveolar surface area; S_A）を評価した。

肺内マクロファージ評価：肺組織におけるマクロファージを評価するために、Iba-1（汎マクロファージマーカー）、iNOS（M1マクロファージマーカー）、およびCD206（M2マクロファージマーカー）を用いた免疫組織化学染色を行った。

肺血管リモデリング評価：血管平滑筋のマーカーである α -SMA抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、肺血管内壁厚（MWT）を測定した。次に、血管平滑筋細胞の増殖を評価するために、 α -SMA及び核増殖マーカーであるKi-67の二重染色を行い、Ki-67

陽性血管の割合を評価した。

肺高血圧評価：肺高血圧の評価として、右心室と、左心室及び心室中隔との乾燥重量比（RV/LV+S）、および右心室収縮期圧（RVSP）を評価した。

サイトカイン・ケモカイン評価：肺組織におけるIL-6及びCCL2のmRNA発現量を、定量RT-PCRを用いて評価した。

【結果】

血液・BALF評価：血液中の総細胞数及びリンパ球数は、Vehicle群と比較して7ND群で有意に減少していた（ $p < 0.01$ ）。また、BALF中の総細胞数及びマクロファージ数は、Vehicle群、MSC群と比較して、7ND群で有意な減少を認めた（共に $p < 0.01$ ）。（図1）

肺組織評価：VD_T、S_Aに関して、Vehicle群と比較して7ND群では著明な改善がみられた（共に $p < 0.01$ ）が、MSC群では有意な改善効果は認めなかった。（図2）

肺内マクロファージ評価：Iba-1陽性細胞、Iba-1/iNOS二重陽性細胞の総数は、Vehicle群及びMSC群と比較して、7ND群では有意に減少していた（共に $p < 0.01$ ）。対照的に、Iba-1/CD206二重陽性細胞の数は、Vehicle群及びMSC群と比較して、7ND群で有意に増加していた（共に $p < 0.01$ ）。（図3）

肺血管リモデリング評価：Vehicle群では、Sham群と比べ末梢肺動脈での α -SMA発現が強くなり、MWTは有意に高かった。一方、7ND群のMWTは、Vehicle群及びMSC群と比較して有意に低下していた。さらに、Ki-67陽性血管の割合は、Sham群と比較してVehicle群で有意に増加していたが、7ND群では減少していた（ $p < 0.01$ ）。（図4）

肺高血圧評価：Vehicle群、MSC群と比べ、7ND群ではRV/LV+Sが著明に減少しており、右心室肥大の改善が示唆された（共に $p < 0.01$ ）。さらに、7ND群のRVSPは、Vehicle群及びMSC群と比較して有意な低下を認めた。（図5）

サイトカイン・ケモカイン評価：肺組織におけるIL-6及びCCL2のmRNA発現量は、Vehicle群と比較して7ND群で有意に低下していた（ $p < 0.01$ ）。一方、MSC群でもmRNA発現量は低下傾向を認めたが、有意な差はなかった。（図6）

【考察】

CLDは、炎症、気管支平滑筋肥厚、間質性浮腫などによる肺胞形成障害を特徴とする肺損傷である。そのため、肺組織では肺胞中隔の大小不同や肥厚が生じ、VD_T、S_Aの低下が認められる。本研究では、Vehicle群と比較して、7ND-MSC投与後にVD_T及びS_Aの有意な改善を認めたが、MSC投与による改善効果は乏しかった。このことは、7ND-MSCがMSCよりも肺胞形成障害を改善させたことを示している。

さらに本研究では、PHに対する7ND-MSCの高い治療効果も示された。CLDにおけるPHは、炎症および異常血管新生、血管リモデリングにより、肺細動脈の筋性化や血管平滑筋細胞の増殖、さらには右室肥大やRVSPの上昇を引き起こす。しかし、7ND-MSCは、右室肥大の改善やRVSPの低下をもたらし、肺血管壁肥厚の改善や血管平滑筋細胞の増殖血管減少など、血管リモデリングに対する高い抑制効果を示した。

7ND-MSDが、MSDと比較して高い治療効果を有する機序として、7NDによる肺内炎症の軽減/抑制が推察された。7ND-MSDは、単球/マクロファージの遊走及び走化を調節するCCL2に対し、阻害作用を持つヒトCCL2欠変異体、7NDを分泌する。従って、MSDと比較して7ND-MSDには、特にマクロファージを抑制する強力な効果があると考えられた。肺組織内において、マクロファージは炎症性（M1）マクロファージと抗炎症（M2）マクロファージに分類され、特にM1マクロファージは急性肺損傷に重要な役割を果たす。本研究では、7ND-MSD投与によりBALF中のマクロファージ数が有意に減少し、しかも肺組織において、主にM1マクロファージが減少しM2マクロファージが増加していた。本結果から、7ND-MSDが肺組織内の炎症を引き起こすM1マクロファージを抑制し、さらにM1からM2へマクロファージの極性を変化させることで、炎症を抑制している可能性が示唆された。

また、7ND群では血液中の炎症細胞、特にリンパ球数が、Vehicle群及びMSD群よりも減少していた。このことは、7ND-MSDがマクロファージ以外の免疫細胞にも何らかの影響を与え、全身性の非特異的炎症を改善させる可能性が考えられた。さらに、肺組織におけるIL-6及びCCL2のmRNA発現量は、MSDと比較して7ND-MSD投与により、強く抑制されていた。CCL2を抑制することで、IL-6などの炎症性サイトカインが抑制されることが報告されており、本結果は、CCL2を抑制する7NDによって、7ND-MSDの炎症軽減効果がMSD単独と比べさらに強化されるという機序を補完すると考えられた。

【結語】

新生仔CLDモデルラットにおいて、7ND-MSDの静脈内投与は、MSDと比較して肺胞形成障害やPHに対して強い改善効果を認めた。その機序として、7ND-MSDがMSD単独と比べて、肺組織におけるIL-6及びCCL2のmRNA発現量を抑制し、マクロファージの極性を変化させていることから、7NDによる炎症抑制作用の増強が考えられた。