

# 論文内容要旨

Antifibrotic effect of lung-resident progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity

(肺 aldehyde dehydrogenase 高発現細胞の抗線維化作用)

Stem Cell Research & Therapy, 12: 471, 2021.

主指導教員：服部 登教授

(医系科学研究科 分子内科学)

副指導教員：濱田 泰伸教授

(医系科学研究科 生体機能解析制御科学)

副指導教員：藤高 一慶講師

(医系科学研究科 分子内科学)

高橋 広

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【背景】

難治性疾患に対する組織幹細胞を用いた細胞治療は数多く報告されており、なかでも骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSCs)はブレオマイシン (BLM)によるマウス肺傷害を改善することが知られている。肺組織由来 MSCs は Hoechst 33342<sup>dim</sup>である side population (SP)細胞とされ、SP細胞が BLM 誘導肺傷害モデルマウス肺において減少すること、SP 細胞治療が BLM 肺傷害を軽減すること、が報告されている。これらの結果から肺にも組織幹細胞が存在し、肺傷害の病態に関与することが示唆される。

Aldehyde dehydrogenase (ALDH)は様々な組織における幹細胞及び前駆細胞に高発現し、ALDH 高発現細胞 (ALDH<sup>br</sup>)は組織修復に関与することが報告されている。しかし肺固有の ALDH<sup>br</sup>についてはまだ知られていない。我々は肺固有 ALDH<sup>br</sup>の特徴を明らかにし、BLM 肺傷害モデルマウスに対する細胞治療ツールとしての有用性を評価するために本研究を行った。

## 【方法】

C57BL6J マウスにそれぞれ BLM (2.0 µg/g BW)と PBS を経気道投与し、BLM 肺傷害群およびコントロール群を作成した。BLM 投与後 7 および 14 日目に肺を摘出し、ハイドロキシプロリンによる線維化評価、フローサイトメトリーによる ALDH<sup>br</sup>検出、PCR を用いた mRNA 発現解析、組織学的評価を行った。ALDH<sup>br</sup>並びに ALDH 低発現細胞 (ALDH<sup>dim</sup>)はセルソーターを用いて採取し、増殖能及びコロニー形成能を評価した。

またソーティングにより得られた ALDH<sup>br</sup>及び ALDH<sup>dim</sup>を PBS 100 µL に懸濁し、別に作成した BLM 投与後 2 日目の肺傷害モデルマウスに対して経尾静脈投与し、細胞治療効果を検証した。BLM 投与後 7 および 14 日目に肺を摘出し、同様の検討を行った。

## 【結果】

ALDH<sup>br</sup>のなかでも肺固有の分画を調査するため、汎血球マーカー (CD45)の発現を欠く CD45 陰性細胞 (CD45<sup>-</sup>)分画に着目した。マウス肺における CD45<sup>-</sup>/ALDH<sup>br</sup>は約 1%とまれな集団であった。さらに CD45<sup>-</sup>/ALDH<sup>br</sup>は上皮系マーカー (EpCAM)陽性集団、間葉系マーカー (PDGFRα)陽性集団、およびいずれも陰性の集団、に分類された。

CD45<sup>-</sup>/ALDH<sup>br</sup>は増殖能及びコロニー形成が高い細胞集団で、特に CD45<sup>-</sup>/ALDH<sup>br</sup>/PDGFRα<sup>+</sup>がその高い増殖能やコロニー形成能を支えていた。また、フローサイトメトリーを用いた検討で CD45<sup>-</sup>/ALDH<sup>br</sup>は、肺組織 MSCs とされる SP細胞とは異なる細胞集団であることが確認された。

BLM 肺傷害マウス肺では、BLM 投与後 7 および 14 日目に CD45<sup>-</sup>/ALDH<sup>br</sup>が有意に減少しており、なかでも CD45<sup>-</sup>/ALDH<sup>br</sup>/PDGFRα<sup>+</sup>の減少が顕著であった。CD45<sup>-</sup>/ALDH<sup>br</sup>/PDGFRα<sup>+</sup>減少は線維化の指標であるハイドロキシプロリンと有意な負の相関を認めた。さらに PCR を用いた mRNA 発現解析では多くの ALDH アイソフォームの発現が低下していた。

続いて BLM 肺傷害に対する細胞治療の有効性について検討した。CD45<sup>-</sup>/ALDH<sup>br</sup>を経尾静脈投与すると、肺組織中の IL-6 や TGF-β を抑制し、線維化を軽減することで生存率を上昇させる

ことが明らかになった。肺傷害が軽減したマウス個体において、低下していた ALDH アイソフォームの中で、*ALDH1a1* と *ALDH4a1* の発現が有意に改善していた。

#### 【考察】

本研究は肺固有 ALDH<sup>br</sup> が BLM による肺傷害に関与していることを示した初めての報告である。他臓器における ALDH<sup>br</sup> と同様に、肺固有 ALDH<sup>br</sup> は幹細胞性を持つことが示唆された。特に CD45<sup>-</sup>/ALDH<sup>br</sup>/PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> は、肺組織 MSCs とされる SP 細胞とは集団が明らかに異なっており、過去に報告されていない細胞群であると考えられた。今後より詳細な細胞性質の検討が必要である。

ALDH アイソフォームと肺疾患の関連については未知な部分が多いが、*ALDH1a1* や *ALDH3a1* がヒト気道上皮に発現し、中でも *ALDH3a1* が喫煙による気道上皮障害に対して保護的に働くことが知られている。本研究では BLM 肺障害により低下した ALDH アイソフォームの中で、細胞投与により肺傷害が軽減する過程において *ALDH1a1* と *ALDH4a1* の発現が改善しており、*ALDH1a1* と *ALDH4a1* が肺線維症に対して保護的に働く可能性が示唆される。

#### 【結論】

肺の ALDH 発現及び肺固有 CD45<sup>-</sup>/ALDH<sup>br</sup> は肺線維症に関与しており、CD45<sup>-</sup>/ALDH<sup>br</sup> 投与は肺線維症に対する細胞治療ツールとして有用である。