

機関番号 : 32202
研究種目 : 国際共同研究加速基金 (帰国発展研究)
研究期間 : 2017~2019
課題番号 : 16K21750
研究課題名 (和文) 稀少呼吸器疾患の新たなモデルマウス作製とマクロファージによる新規細胞治療法の開発
研究課題名 (英文) New mouse model of rare lung disease and novel therapy with macrophages
研究代表者 鈴木 拓児 (SUZUKI, Takuji) 自治医科大学・医学部・准教授 研究者番号 : 80344670
交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 25,200,000 円

研究成果の概要 (和文) : 遺伝性肺胞蛋白症は GM-CSF 受容体遺伝子 (*CSF2RA* あるいは *CSF2RB*) 変異によって生じるが、いまだ有効な疾患特異的な治療法はない。*Csf2ra* ノックアウトマウスではマクロファージの機能低下や肺の病理組織学的所見が、ヒト *CSF2RA* 遺伝子変異による遺伝性肺胞蛋白症と同様の病態を呈する。本モデルマウスを用いることにより、マクロファージを一回、直接肺へ移植する肺マクロファージ移植法という細胞治療が、長期間にわたる移植細胞の生着と疾患の改善および安全性が確認された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで存在しなかったヒト *CSF2RA* 遺伝子変異による遺伝性肺胞蛋白症の有効な疾患モデルが確立されたことで、その病態解析および生物学的解析を行えるという学術的意義がある。また、新規治療法の開発といったトランスレーショナルな研究を行うことにより、患者さんへ治療法を還元していくという社会的意義がある。

研究成果の概要 (英文) : Hereditary pulmonary alveolar proteinosis (hPAP) is rare genetic diseases caused by GM-CSF receptor alpha or beta gene (*CSF2RA* or *CSF2RB*, respectively) mutation. hPAP with *CSF2RA* gene mutation has been difficult to study due to the unavailability of a mouse model with *Csf2ra* gene mutation. We demonstrated the *Csf2ra* gene deficient mice are the faithful model of human hPAP with *CSF2RA* gene mutations. The characteristics of the *Csf2ra* gene deficient mice including lung histology, macrophage phenotype and function, bronchoalveolar lavage fluid appearance, gene expression profiles and PAP biomarkers showed similar abnormality as hPAP patients with *CSF2RA* gene mutations. We also demonstrated that pulmonary macrophage transplantation therapy is effective and safe in *Csf2ra* gene deficient mice. These results strongly support the potential utility of the new disease model mice and the feasibility of novel cell therapy for the patients with this specific genetic lung disease.

研究分野 : 呼吸器内科

キーワード : 呼吸器疾患、肺胞蛋白症、ノックアウトマウス、マクロファージ



1. 研究開始当初の背景

呼吸に必須な肺サーファクタントは、肺 II 型上皮細胞と肺胞マクロファージによるその産生と分解のバランスによって恒常性が維持されている。肺胞蛋白症とは肺サーファクタント由来物質が肺の末梢気腔内に異常に貯留し呼吸不全に至る疾患群であり、その原因から自己免疫性、遺伝性、続発性等に分類され、その大部分は肺胞マクロファージの機能異常が原因である。遺伝性肺胞蛋白症は GM-CSF 受容体遺伝子 (*CSF2RA* あるいは *CSF2RB*) 変異によって生じるが、いまだ有効な疾患特異的な治療法はない。マウスモデルを用いた研究がなされてきたが、ヒトで患者数の多い(約 9 割を占める) *CSF2RA* 遺伝子変異による疾患に相当する *Csf2ra* ノックアウトマウスはこれまで存在しなかった。

2. 研究の目的

難治性稀少疾患である遺伝性肺胞蛋白症について、新たに作成した *Csf2ra* ノックアウトマウスを用いて、病態の解析および新規治療法の検討をおこなう。

3. 研究の方法

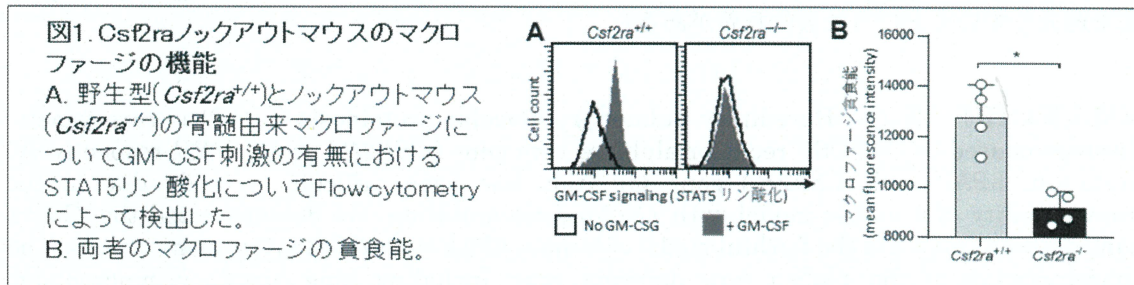
(1) *Csf2ra* ノックアウトマウスについて肺の病理組織学的検討を行い、気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar lavage: BAL) および BAL 細胞、マクロファージについて解析した。

(2) 肺マクロファージ移植治療として、種々のマクロファージを麻酔下に *Csf2ra* ノックアウトマウスの肺へ経気管的に一回投与 (移植) した。肺病理組織像、BAL 細胞像およびその BAL 液について (混濁度、脂質濃度、蛋白濃度、サイトカイン濃度)、未治療群と比較検討し解析した。

4. 研究成果

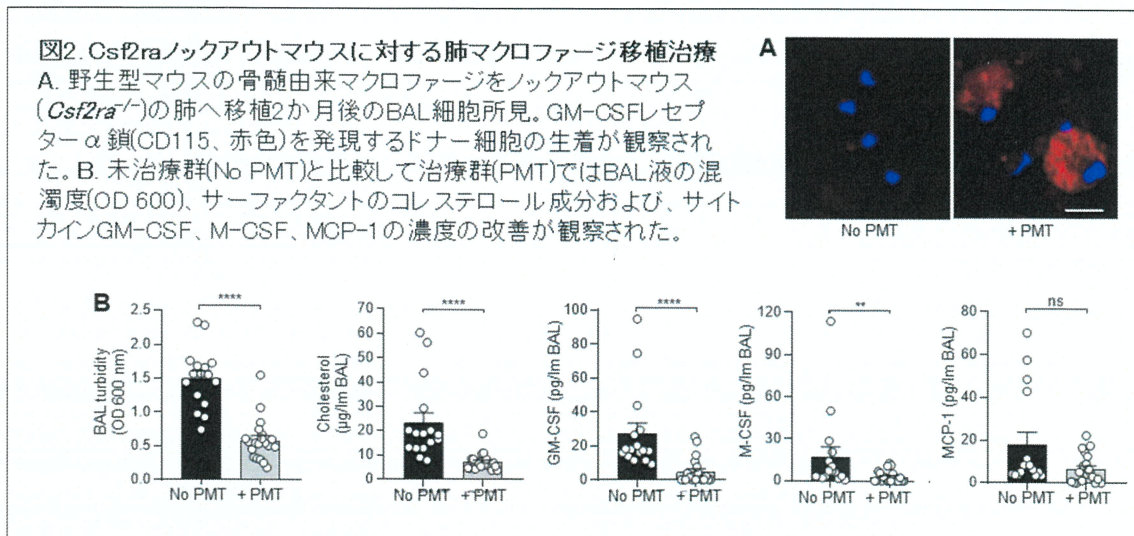
(1) *Csf2ra* ノックアウトマウスの解析

新たに作成した *Csf2ra* 遺伝子ノックアウトマウスは、メンデルの法則に従う遺伝形式を示し、以前に報告されているような *Csf2rb* ノックアウトマウスと同様に、肺では病理学的に肺胞蛋白症の病態を呈していた。*Csf2ra* ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて、マクロファージの機能 (GM-CSF による STAT5 リン酸化、食食能、サーファクタント取り込み分解能) の低下が認められた (図 1)。また、BAL 液は白濁し、蛋白成分およびサーファクタント成分、サイトカイン GM-CSF、M-CSF、MCP-1 の濃度上昇がみられた。



(2) 肺マクロファージ移植治療

野生型マウス骨髄由来マクロファージを、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、2 か月後にはドナー細胞の生着が確認された (図 2A)。肺の病理組織像、BAL 細胞像およびその BAL 液について (混濁度、脂質濃度、蛋白濃度、サイトカイン GM-CSF、M-CSF、MCP-1 の濃度) 比較検討したところ、未治療群と比較していずれの項目も有意な改善効果が観察された (図 2B)。その効果は 6 か月後においても持続していることが明らかとなった。





遺伝子治療のためのウイルスベクターとして *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、その機能について遺伝子発現および下流シグナル伝達について機能することを確認した。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行ったところ、野生型マウス骨髄由来マクロファージの移植と同様に、ドナー細胞の生着がみられ、未治療群と比較して、肺の病理像および BAL 液 (混濁度、脂質濃度、蛋白濃度、サイトカイン濃度) の有意な改善効果が確認された。

次に iPS 細胞についてマウスの系で評価した。まずは正常なマウス 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、iPS 細胞由来マクロファージは他の組織マクロファージに比べて骨髄由来マクロファージに表面抗原や遺伝子発現パターンが類似していることが明らかになった。さらにこの iPS 細胞由来マクロファージを用いてノックアウトマウスに対して肺マクロファージ移植し、未治療群と比較してその治療効果と、上記の他のドナー細胞の移植の際と同様に肺への生着が確認され、未治療群と比較して肺の病理像および BAL 液 (混濁度、脂質濃度、蛋白濃度、サイトカイン濃度) の有意な改善効果が確認された。

こうした肺マクロファージ移植治療では、肺における炎症性サイトカイン (IL-18, IL-6, TNF- $\alpha$ ) の上昇はなく、末梢血液分画における異常所見もみられず、とくに治療に伴う副作用はみられなかった。

本研究では、新たに作成した *Csf2ra* ノックアウトマウスがヒト *CSF2RA* 遺伝子変異による遺伝性肺胞蛋白症の病態研究に有用であることが示された。また、肺マクロファージ移植法という細胞治療は、マクロファージを一回、直接肺へ移植する方法であり、長期間にわたる移植細胞の生着と疾患の改善および安全性が確認されており、有効な新規治療法と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Suzuki T, McCarthy C, Carey B, Borchers M, Beck D, Wikenheiser-Brokamp KA, Black D, Chalk C, Trapnell BC. Increased Pulmonary GM-CSF Causes Alveolar Macrophage Accumulation: Mechanistic Implications for Desquamative Interstitial Pneumonitis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (査読あり) 2020 62:87-94. doi: 10.1165/rcmb.2018-02940C.
2. Yamanouchi Y, Sawahata M, Sakamoto N, Hisata S, Shijubo N, Konno S, Yamaguchi T, Watanabe M, Kawashima H, Suzuki T, Bando M, Hagiwara K. Characteristics of 68 patients with clinically proven sarcoidosis based on the Japan Society of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders 2015 criteria. *Respir Investig.* (査読あり) 2020 58:102-109. doi: 10.1016/j.resinv.2019.11.003.
3. Arumugam P, Suzuki T, Shima K, McCarthy C, Sallese A, Wessendarp M, Ma Y, Meyer J, Black D, Chalk C, Carey B, Lachmann N, Moritz T, Trapnell BC. Long-Term Safety and Efficacy of Gene-Pulmonary Macrophage Transplantation Therapy of PAP in *Csf2ra*<sup>-/-</sup> Mice. *Mol Ther.* (査読あり) 2019 27:1597-1611. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.06.010.
4. Hetzel M, Lopez-Rodriguez E, Mucci A, Nguyen AHH, Suzuki T, Shima K, Buchegger T, Dettmer S, Rodt T, Bankstahl JP, Malik P, Knudsen L, Schambach A, Hansen G, Trapnell BC, Lachmann N, Moritz T. Effective hematopoietic stem cell-based gene therapy in a murine model of hereditary pulmonary alveolar proteinosis. *Haematologica.* (査読あり) 2020 105:1147-1157. doi: 10.3324/haematol.2018.214866.
5. Mucci A, Lopez-Rodriguez E, Hetzel M, Liu S, Suzuki T, Happle C, Ackermann M, Kempf H, Hillje R, Kunkiel J, Janosz E, Brenning S, Glage S, Bankstahl JP, Dettmer S, Rodt T, Gohring G, Trapnell B, Hansen G, Trapnell C, Knudsen L, Lachmann N, Moritz T. iPSC-Derived Macrophages Effectively Treat Pulmonary Alveolar Proteinosis in *Csf2rb*-Deficient Mice. *Stem Cell Reports.* (査読あり) 2018 11:696-710. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.07.006.
6. McCarthy C, Lee E, Bridges JP, Sallese A, Suzuki T, Woods JC, Bartholmai BJ, Wang T, Chalk C, Carey BC, Arumugam P, Shima K, Tarling EJ, Trapnell BC. Statin as a novel pharmacotherapy of pulmonary alveolar proteinosis. *Nat Commun.* (査読あり) 2018 9:3127. doi: 10.1038/s41467-018-05491-z.
7. Happle C, Lachmann N, Ackermann M, Mirenska A, Göhring G, Thomay K, Mucci A, Hetzel M, Glomb T, Suzuki T, Chalk C, Glage S, Dittrich-Breiholz O, Trapnell B, Moritz T, Hansen G. Pulmonary Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Macrophages Ameliorates Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med.* (査読あり) 2018 198:350-360. doi: 10.1164/rccm.201708-15620C.



8. Nakayama M, Yamamoto S, Kaneko N, Mato N, Suzuki T, Hagiwara K. Use of low-cost three-dimensional printer to simulate grasping of bronchial foreign body. *Respirol Case Rep.* (査読あり) 2018 6:e00351. doi: 10.1002/rcr2.351.
9. Hiruma T, Tsuyuzaki H, Uchida K, Trapnell BC, Yamamura Y, Kusakabe Y, Totsu T, Suzuki T, Morita S, Doi K, Noiri E, Nakamura K, Nakajima S, Yahagi N, Morimura N, Chang K, Yamada Y. IFN- $\beta$  Improves Sepsis-related Alveolar Macrophage Dysfunction and Postseptic Acute Respiratory Distress Syndrome-related Mortality. *Am J Respir Cell Mol Biol.* (査読あり) 2018 59:45-55. doi: 10.1165/rccb.2017-02610C.
10. Hetzel M, Suzuki T, Hashtchin AR, Arumugam P, Carey B, Schwabbauer M, Kuhn A, Meyer J, Schambach A, Van Der Loo J, Moritz T, Trapnell BC, Lachmann N. Function and Safety of Lentivirus-Mediated Gene Transfer for CSF2RA-Deficiency. *Hum Gene Ther Methods.* (査読あり) 2017 28:318-329. doi: 10.1089/hgtb.2017.092.
11. Kong F, Liu Z, Jain VG, Shima K, Suzuki T, Muglia LJ, Starczynowski DT, Pasare C, Bhattacharyya S. Inhibition of IRAK1 Ubiquitination Determines Glucocorticoid Sensitivity for TLR9-Induced Inflammation in Macrophages. *J Immunol.* (査読あり) 2017 199:3654-3667. doi: 10.4049/jimmunol.1700443.
12. Sallese A, Suzuki T, McCarthy C, Bridges J, Filuta A, Arumugam P, Shima K, Ma Y, Wessendarp M, Black D, Chalk C, Carey B, Trapnell BC. Targeting cholesterol homeostasis in lung diseases. *Sci Rep.* (査読あり) 2017 7:10211. doi: 10.1038/s41598-017-10879-w.

[学会発表] (計 10 件)

1. Hisata S, Suzuki T, Yamauchi H, Ohkouchi S, Bando M, Hagiwara K. Long-Term Follow-Up of a Patient with GM-CSF Antibody-Negative Pulmonary Alveolar Proteinosis Following Exposure to Dust After the Great East Japan Earthquake. American Thoracic Society 112th International Conference. 2019
2. Shima K, Suzuki T, Ma Y, Mayhew C, Sallese A, Carey BC, Arumugam P, Trapnell BC. CRISPR/Cas9 Genome Editing Therapy for Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Thoracic Society 112th International Conference. 2019
3. Suzuki T. Alveolar Macrophages and Lung Homeostasis. Symposium: Disease formation by macrophage dysfunction. The 91st Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. 2019
4. Suzuki T. Gene Editing for Pulmonary Alveolar Proteinosis. Technology & Research Workshop. Gene Editing. The 2018 International Rare Lung Diseases Research Conference And LAMPOSIUM. 2018
5. Arumugam PI, Suzuki T, Shima K, Wessendarp M, McCarthy C, Meyer J, Black D, Chalk C, Carey BC, Lachmann N, Moritz T, Trapnell BC. Restoration of GM-CSF Signaling and Pulmonary Macrophage Transplantation Therapy of Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis Is Safe, Efficacious, and Durable in Csf2ra Deficient Mice. American Thoracic Society 111th International Conference. 2018
6. Shima K, Suzuki T, Arumugam PI, Lachmann N, Moritz T, Ma Y, Black D, Chalk C, Carey BC, Trapnell BC. Long-Term Evaluation of Pulmonary Macrophage Transplantation Therapy in Csf2ra Gene-Deficient Mice, a Clinically Relevant Model of Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Thoracic Society 111th International Conference. 2018
7. Suzuki T, Shima K, Arumugam P, Trapnell B.C. Pulmonary Macrophage Transplantation Therapy in Csf2ra Gene-Deficient Mice, a Novel Clinically Relevant Model of Children with Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society. 2017
8. 鈴木拓児、島賢治郎、Paritha Arumugam、萩原弘一、Bruce Trapnell. 遺伝性肺胞蛋白症に対する肺マクロファージ移植治療. 第53回日本肺サーファクタント関連医学会. 2017
9. Suzuki T, Shima K, Arumugam P, Ma Y, Black D, Chalk C, Carey B, Trapnell B.C. Development and Validation of Csf2ra Gene-Deficient Mice as a Clinically Relevant Model of Children with Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis. American Thoracic Society 110th International Conference. 2017
10. Suzuki T, Arumugam P, Sallese T, Shima K, Trapnell B.C. Pulmonary Macrophage Transplantation (PMT) Therapy of Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis (hPAP) Is Effective with Mature Macrophages without Progenitor Expansion Requirement. 日本呼吸器学会. 2017



様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。