

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03669

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた難治性遺伝性呼吸器疾患の病態解析と次世代新規治療法開発

研究課題名(英文) Development of novel genome editing therapy for genetic lung diseases

研究代表者

鈴木 拓児 (Suzuki, Takuji)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：80344670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)： 遺伝性肺胞蛋白症は、申請者らがGM-CSF受容体遺伝子の変異によることを同定した難治性呼吸器疾患である。新規Csf2raノックアウトマウスを使用して、申請者らが開発した肺へ直接マクロファージを移植する治療について、(1)前臨床試験としてドナー細胞の種類や細胞数など詳細な治療条件検討を行い、(2)iPS細胞由来マクロファージの特徴を解析し同細胞の治療への可能性を探り、(3)ゲノム編集技術を用いた病態解析とPMT治療への応用について研究した。本研究により肺サーファクタントの病態生理機構の解明と難治性呼吸器疾患の次世代細胞治療の基盤を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性肺胞蛋白症の基礎研究として、Csf2raノックアウトマウスの基本的な解析から治療に向けた前臨床試験まで一貫した次世代細胞治療研究の基盤を構築した。本研究では、ヒト稀少呼吸器疾患研究において重要な新規モデルマウスを提示し、新規治療法の有効性について検討するとともに、希少遺伝疾患研究に有用なiPS細胞技術とゲノム編集技術の統合を試みた個別化医療(プレジジョン医療)を目指した新たな治療法のトランスレーションリサーチとしての意義がある。

研究成果の概要(英文)： Hereditary alveolar proteinosis is a refractory rare lung disease due to mutations in the GM-CSF receptor genes. We investigated the novel treatment (Pulmonary Macrophage Transplantation: PMT), a directly transplantation of macrophages into the lung using a new Csf2ra knockout mouse, about (1) detailed treatment conditions such as donor cell type and cell number, (2) analysis of the characteristics of iPS cell-derived macrophages to explore the potential of the cells for PMT treatment, and (3) pathological analysis using genome editing technology and its application to PMT treatment. Through this study, we elucidated the pathophysiological mechanism of pulmonary surfactant and investigated the basis of next-generation cell therapy for intractable respiratory diseases.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：遺伝性肺胞蛋白症 肺サーファクタント 肺マクロファージ移植治療 ゲノム編集

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝性肺胞蛋白症は、申請者らが GM-CSF 受容体遺伝子の変異によることを同定した難治性呼吸器疾患である。肺サーファクタントが肺の末梢気腔内に貯留し呼吸不全に至るが、侵襲的な全肺洗浄法以外に未だ有効な特異的治療法がない。さらに、その 90% を占める *CSF2RA* 遺伝子異常に相当する *Csf2ra* ノックアウトマウスはこれまでなかったために病態解析および治療開発の基礎研究が困難であった。

### 2. 研究の目的

新規 *Csf2ra* ノックアウトマウスを使用して、申請者らが開発した肺へ直接マクロファージを移植する治療 (Pulmonary Macrophage Transplantation: PMT) について 前臨床試験としてドナー細胞の種類や細胞数など詳細な治療条件検討を行い、iPS 細胞由来マクロファージの特徴を解析し同細胞の PMT 治療への可能性を探り、ゲノム編集技術を用いた病態解析と PMT 治療への応用について研究する。本研究により肺サーファクタントの病態生理機構の解明と難治性呼吸器疾患の次世代細胞治療の基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

遺伝性肺胞蛋白症モデルマウス (*Csf2ra* ノックアウトマウス) について、GM-CSF 受容体の機能およびマクロファージ機能に関して野生型マウス由来のマクロファージと比較して解析した。

ドナー細胞として、野生型マウスの骨髄細胞から分化誘導した骨髄由来マクロファージを準備し、*Csf2ra* ノックアウトマウスに肺マクロファージ移植治療をおこない、その病態改善効果を検討した。また、*Csf2ra* ノックアウトマウスの骨髄細胞に *Csf2ra* レンチウイルスベクターによって欠損分子を発現させてマクロファージを誘導し、PMT による効果についても検討した。*Csf2ra* ベクターの発現によってノックアウトマウス細胞の機能が回復するかどうか実験をおこなった。iPS 細胞由来マクロファージの特徴を解析し同細胞の PMT 治療への可能性を検討した。ゲノム編集技術により遺伝子修復した患者 iPS 細胞由来マクロファージについては、GM-CSF 受容体機能、細胞内シグナル伝達 (GM-CSF 刺激後 STAT5 リン酸化)、細胞増殖能、自然免疫反応について解析をおこなった。

### 4. 研究成果

遺伝性肺胞蛋白症は、GM-CSF 受容体遺伝子変異により肺サーファクタントが肺の末梢気腔内に貯留し呼吸不全に至る難治性呼吸器疾患である。本研究では、これまでなかったマウス疾患モデルである *Csf2ra* ノックアウトマウスを使用し、肺へ直接マクロファージを移植する治療 (PMT) について、(1) 前臨床試験としてドナー細胞の種類や細胞数など詳細な治療条件検討を行い、(2) iPS 細胞由来マクロファージの特徴を解析し同細胞の PMT 治療への可能性を探り、(3) ゲノム編集技術を用いた病態解析と PMT 治療への応用について研究する。本研究により肺サーファクタントの病態生理機構の解明と難治性呼吸器疾患の次世代細胞治療の基盤を構築することを目的としている。

新たな遺伝性肺胞蛋白症モデルマウス (*Csf2ra* ノックアウトマウス) について、野生型マウス由来のマクロファージと比較して GM-CSF 受容体の機能としてリガンドに対する結合能および細胞内シグナル伝達 (GM-CSF 刺激 STAT5 リン酸化) が欠如していることを示し、貪食能およびサーファクタント処理能の低下を確認した (図 1)<sup>1)</sup>。

PMT のドナー細胞として、野生型マウスの骨髄細胞から分化誘導した骨髄由来マクロファージを  $2 \times 10^6$  個準備し、*Csf2ra* ノックアウトマウスに肺マクロファージ移植治療をおこない、その病態改善効果を検討した。PMT を行った 2 か月後および 6 か月後に、肺胞洗浄 (BAL) 液の混濁度 (OD=600)、サーファクタント (SP-D、脂質、コレステロール濃度)、サイトカイン (GM-CSF、M-CSF、MCP-1) の濃度、および BAL 細胞の遺伝子発現を解析した。無治療群と比較して PMT 治療群ではいずれの項目も有意な改善がみられ、細胞の生着

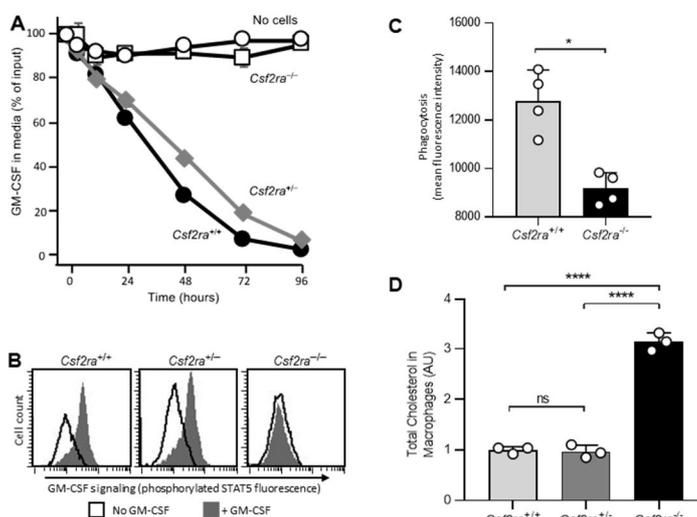


図1 *Csf2ra*ノックアウトマウス (*Csf2ra*<sup>-/-</sup>)の機能解析  
A. GM-CSFへの結合能 B. 細胞内シグナル伝達 (GM-CSF刺激STAT5リン酸化)  
C. 貪食能 D. サーファクタント処理能

と効果の持続が確認されている(図2)<sup>1)</sup>。

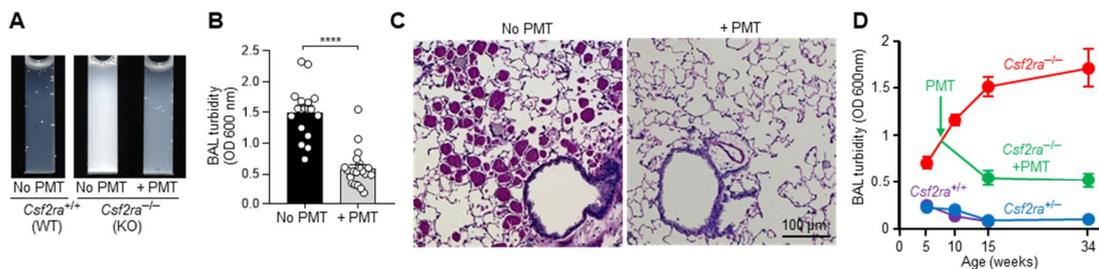


図2 *Csf2ra*ノックアウトマウス(*Csf2ra*<sup>-/-</sup>)へのPMTの効果

A. BAL液. B. BAL液混濁度(OD600). C. 肺組織. D. PMT後の治療効果 (BAL液混濁度)

野生型マウスおよび *Csf2ra* ノックアウトマウスで PMT の有無について肺胞洗浄液細胞について RNA-seq 解析を行った。階層分析の結果では、PMT を行った *Csf2ra* ノックアウトマウスと野生型マウスの細胞において近い遺伝子発現結果がみられ、*Csf2ra* ノックアウトマウスの細胞とは大きく異なっていた。遺伝子オントロジー分析の結果、GM-CSF とペルオキシソームによって調節される遺伝子、PPAR 関連遺伝子、マクロファージの生存に関与する複数の経路、細胞増殖、脂質代謝、および免疫機能関連の遺伝子発現などが野生型と *Csf2ra* ノックアウトマウスで大きく異なり、PMT によって野生型マウスの遺伝子発現パターンに近づくことが確認された(図3)<sup>1)</sup>。

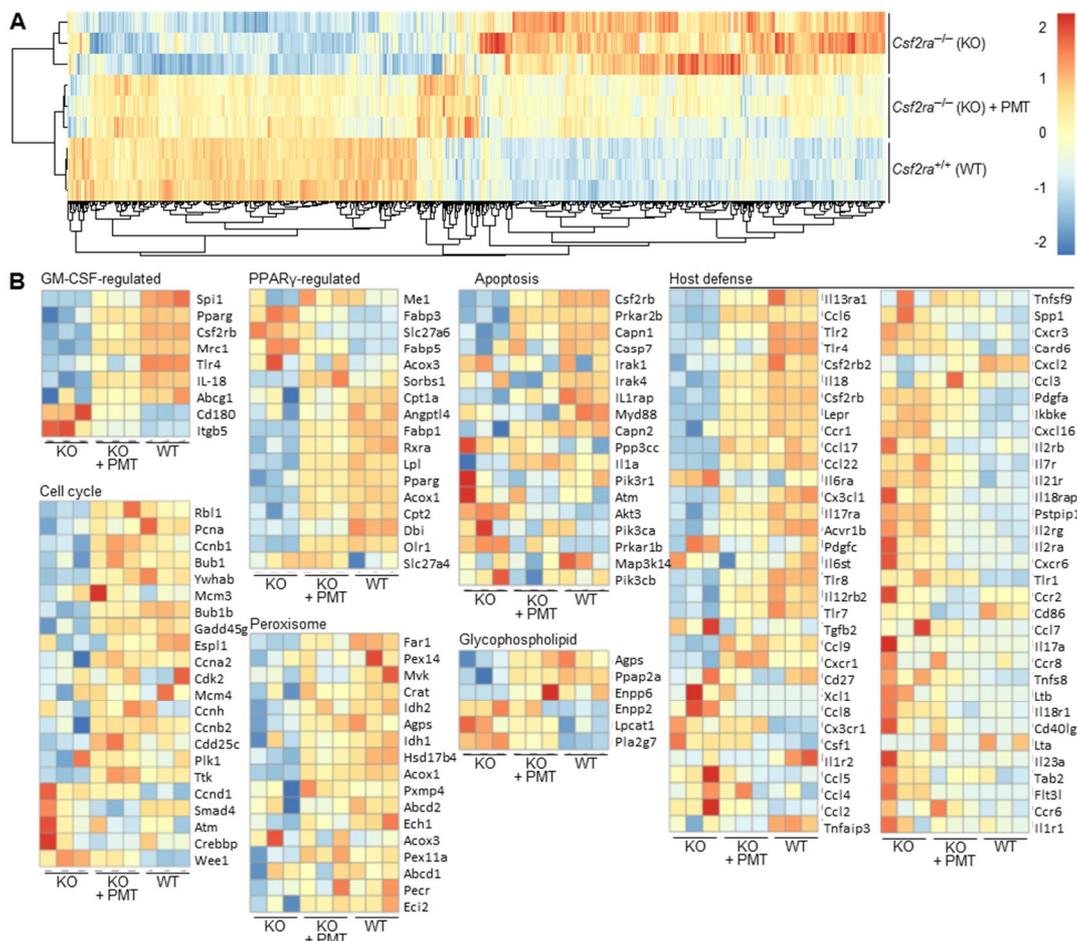


図3 *Csf2ra*ノックアウトマウスでPMTの有無(KO, KO + PMT)と野生型マウス(WT)における肺胞洗浄液細胞についてのRNA-seq解析

臨床応用に向けて拒絶反応のない患者自身の細胞を使用する syngeneic な系を想定し、*Csf2ra* ノックアウトマウスの骨髄細胞に *Csf2ra* レンチウイルスベクターによって欠損分子を発現させてマクロファージを誘導し、PMT による効果について検討した。*Csf2ra* ベクターの発現によってノックアウトマウス細胞の機能が回復する事が示された。また、野生型マウス骨髄由来マクロファージの PMT と同様に、無治療群と比較して PMT 治療群ではいずれの項目も有意な改善がみられている<sup>2)</sup>。

iPS 細胞由来マクロファージの PMT 治療への可能性を検討したところ、骨髄由来マクロファージを用いた際と同様に、肺に細胞の生着がみられ、肺胞蛋白症の病態の改善効果がみられることを確認した<sup>3)</sup>。ゲノム編集技術により遺伝子修復した患者 iPS 細胞由来マクロファージについては、GM-CSF 受容体機能、細胞内シグナル伝達(GM-CSF 刺激後 STAT5 リン酸化)、細胞増殖能、自然免疫反応においては正常 iPS 細胞由来マクロファージと同様の改善がみられ、包括的遺伝子発現パターンも大きく改善することを確認することができた。

#### 参考文献

- 1) Shima K. et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2022 Mar 1;322(3):L438-L448.
- 2) Arumugam P. et al. Mol Ther. 2019 Sep 4;27(9):1597-1611.
- 3) Mucci A. et al. Stem Cell Reports. 2018 Sep 11;11(3):696-710.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hetzel Miriam, Lopez-Rodriguez Elena, Mucci Adele, Nguyen Ariane Hai Ha, Suzuki Takuji, Shima Kenjiro, Buchegger Theresa, Dettmer Sabine, Rodt Thomas, Bankstahl Jens P., Malik Punam, Knudsen Lars, Schambach Axel, Hansen Gesine, Trapnell Bruce C., Lachmann Nico, Moritz Thomas	4. 巻 105
2. 論文標題 Effective hematopoietic stem cell-based gene therapy in a murine model of hereditary pulmonary alveolar proteinosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 1147 ~ 1157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2018.214866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Suzuki Takuji, McCarthy Cormac, Carey Brenna C., Borchers Michael, Beck David, Wikenheiser-Brokamp Kathryn A., Black Dianna, Chalk Claudia, Trapnell Bruce C.	4. 巻 62
2. 論文標題 Increased Pulmonary GM-CSF Causes Alveolar Macrophage Accumulation. Mechanistic Implications for Desquamative Interstitial Pneumonitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 87 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2018-02940C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Arumugam Paritha, Suzuki Takuji, Shima Kenjiro, McCarthy Cormac, Sallese Anthony, Wessendarp Matthew, Ma Yan, Meyer Johann, Black Diane, Chalk Claudia, Carey Brenna, Lachmann Nico, Moritz Thomas, Trapnell Bruce C.	4. 巻 27
2. 論文標題 Long-Term Safety and Efficacy of Gene-Pulmonary Macrophage Transplantation Therapy of PAP in Csf2ra <sup>+/+</sup> Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 1597 ~ 1611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2019.06.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shima Kenjiro, Arumugam Paritha, Sallese Anthony, Horio Yuko, Ma Yan, Trapnell Cole, Wessendarp Matthew, Chalk Claudia, McCarthy Cormac, Carey Brenna C., Trapnell Bruce C., Suzuki Takuji	4. 巻 322
2. 論文標題 A murine model of hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by homozygous <i>Csf2ra</i> gene disruption	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology	6. 最初と最後の頁 L438 ~ L448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajplung.00175.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Arumugam P.I., Suzuki T., Shima K., Wessendarp M., McCarthy C., Meyer J, Black D., Chalk C., Carey BC., Lachmann N., Moritz T., Trapnell BC.
2. 発表標題 Restoration of GM-CSF Signaling and Pulmonary Macrophage Transplantation Therapy of Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis Is Safe, Efficacious, and Durable in Csf2ra Deficient Mice.
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shima K, Suzuki T, Ma Y, Mayhew C, Sallèse A, Carey BC, Arumugam P, Trapnell BC,
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 Genome Editing Therapy for Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis.
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島賢治郎、菊地利明、Bruce Trapnell、鈴木拓児
2. 発表標題 Csf2ra遺伝子欠損マウスの樹立：遺伝性肺胞蛋白症モデル
3. 学会等名 日本肺サーファクタント・界面医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Horio Y, Suzuki T, Shima K, Ma Y, McCarthy C, Carey BC, Arumugam P, Trapnell BC
2. 発表標題 The Effect of Pulmonary Macrophage Transplantation Therapy on Bacterial Infection in Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	久田 修  (Hisata Shu)  (60466571)	自治医科大学・医学部・講師   (32202)	
研究 分担者	間藤 尚子  (Mato Naoko)  (80406149)	自治医科大学・医学部・准教授   (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Cincinnati Children's Hospital			