

令和 2 年 7 月 11 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19499

研究課題名（和文）自己脂肪由来間葉系幹細胞を用いた包括的慢性腎不全治療法の開発

研究課題名（英文）Development of renal failure treatment using adipose derived mesenchymal stem cells

研究代表者

横手 伸也（Yokote, Shinya）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30459656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000 円

研究成果の概要（和文）：腎不全に対する間葉系幹細胞の治療効果を検討するため、慢性腎不全モデルにおける血管石灰化に対する脂肪由来間葉系幹細胞移植の影響についての検討を行った。結果、間葉系幹細胞治療群では、有意に腎臓の尿細管の拡張や線維化が抑制されていた。また、間葉系幹細胞投与により、ラット血管内のカルシウム・リン含有量が低下しており、組織学的にも石灰化の抑制が示された。以上より、アデニン腎不全石灰化モデルラットにおいて、脂肪由来間葉系幹細胞は腎機能の増悪及び血管石灰化進行を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究により自己脂肪由来間葉系幹細胞による慢性腎臓病治療の可能性が見いだされた。

慢性腎臓病は日本に1300万人の患者がおり、透析が必要な末期腎不全患者は30万人を超えおり、現在も増加傾向である。日本の透析医療費は1兆5千億円を超えており、この研究が進めば、医療費を圧迫している透析医療の回避に役立つことが予想される。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we explored the potential of ASCs for the treatment of CKD and vascular calcification. CKD was induced in male Sprague-Dawley rats by feeding them a diet containing 0.75% adenine for 4 weeks. ASCs transplantation significantly reduced serum inorganic phosphorus (Pi) as compared to that in the control. The histopathology of the kidneys showed a greater dilation of tubular lumens and interstitial fibrosis in the control group. Calcium and Pi contents of the aorta in the ASCs transplantation group were lower than those in the control group. Von Kossa staining of the thoracic aorta media revealed that ASCs transplantation suppressed vascular calcification. Thus, this study revealed that autogenic ASCs transplantation inhibits kidney damage and suppresses the progression of vascular calcification in the CKD rat model, suggesting that autogenic ASCs transplantation is a novel approach for preventing the progression of CKD and vascular calcification.

研究分野：腎臓病

キーワード：慢性腎臓病 間葉系幹細胞 腎臓再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、世界中で腎臓病患者は増加しており、それに伴う医療費の増大は、大きな問題となっている。そのため、腎臓病の進行を抑制することは、世界中で重要な課題である。腎臓は移植可能な臓器であるが、ドナーの数は限られており深刻な臓器不足となっている。日本においても、透析療法を受けている末期腎不全患者は年々増加傾向であり、その数は30万人を超え、その医療費は一人あたりで500万円、全体では1兆円以上となっており医療費全体の3%を超えている。また、腎不全自体は血管石灰化の進行にも関与しており、腎臓病患者は心血管合併症率が高いため、それがさらに医療費を逼迫させる要因となっている。慢性腎臓病及び血管石灰化進行の抑制が可能となれば、これら医療費を大幅に削減することが実現可能と考えられる。間葉系幹細胞移植は、近年、急性腎不全モデル及び腎移植モデルを用いた研究で、腎障害を抑制する効果、及び移植の拒絶を抑制する効果が示されている。しかし、慢性腎臓病及びそれに伴う血管石灰化に対する間葉系幹細胞の治療効果はまだ明らかではない。本研究では、まず初めに、①脂肪由来の間葉系幹細胞（以下 ADMSCs: Adipose-derived Mesenchymal stem cells）を投与することにより、慢性腎臓病の進行及びそれに伴う血管石灰化の増悪を抑制することが可能かを、実験動物を用いて検討することを目的とし研究を開始する。

2. 研究の目的

- (1) アデニン腎不全石灰化モデルラットを用いて、自己脂肪由来間葉系幹細胞を移植することによる腎不全の増悪及び血管石灰化の進行に対する治療効果を検討する。
- (2) 発達過程にある胎仔の後腎を移植する小動物モデルを用いて、自己脂肪由来間葉系幹細胞移植の有無により、後腎の発育程度に差が出るかどうかを検討する。

3. 研究の方法

- (1) ラット脂肪より ADMSCs を立ち上げる。

9週齢の雄性SDラットの鼠径部より皮下脂肪を外科的に摘出し、それより間葉系幹細胞を抽出する。ADMSCsはフローサイトメトリーにより、表面マーカー（CD90 陽性、CD29 陽性、CD31 陰性、CD45 陰性）を確認し、また、分化誘導により、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞へ分化可能であることを確認する。

- (2) アデニン腎不全モデルラットを作成し、ADMSCsによる治療介入を行う。

ラットを2群（MSC群、コントロール群）に分け、それぞれ0.75%アデニン含有食を4週間摂取し腎不全石灰化モデルラットを作成する。アデニン含有食摂取中は1週間おきに計5回、MSC群にはADMSCs 5×10^5 個/PBS 1mLを、コントロール群はPBS1mLをそれぞれ尾静脈より静脈投与する。血液検査、尿検査は2週間おきに定期的に試行し、アデニン投与終了後にと殺する。

- (3) 腎機能障害、血管石灰化の進行程度を評価する。

腎機能障害の程度は、血液検査（BUN, Cr）、尿検査（24時間CCr、尿中P, Ca）、腎組織（Masson、HE、ED-1、AQP-1）で評価する。血管石灰化の程度は、動脈内のCa, P含有量、染色（Kossa、Osteopontin、Runx2等）、real-time PCR（Osteopontin、Runx2等）で評価する。

4. 研究成果

MSC群はコントロール群に比べて、有意に腎臓の線維化及び尿細管の拡張を抑制していた（図1）。また、尿細管マーカーであるAQP-1の発現はMSC群で有意に上昇を認め、マクロファージマーカーであるED-1の発現はMSC群で有意に抑制されていた（図2）。

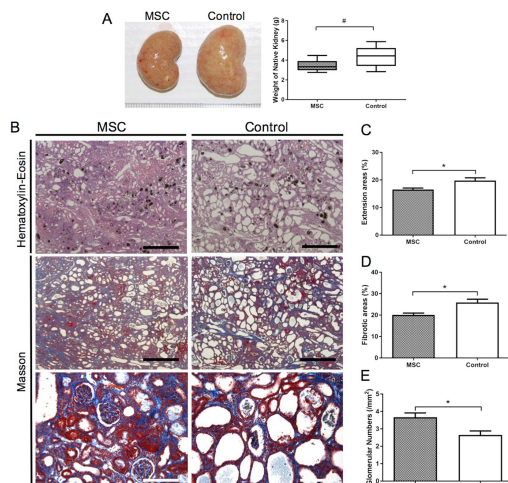


図 1

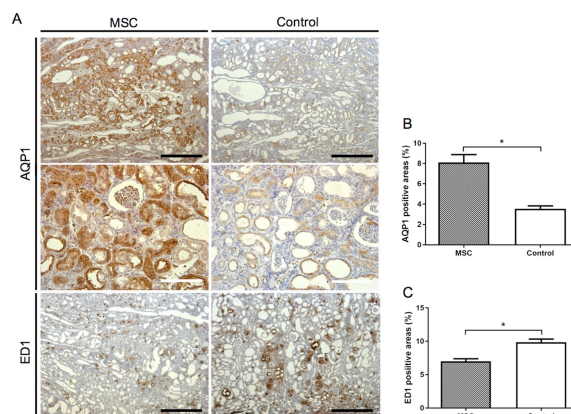


図 2

血液所見では、アデニン投与 14 週後の血清 Cr は MSC 群で有意に低下を認めており、尿所見では、MSC 群ラットの 24 時間 CCr は、コントロール群に比べて有意に高値であった。以上より、ADMSC の投与は、アデニンによる腎機能障害を有意に抑制することが示唆された。

次に、MSC 群とコントロール群で、血管の Ca、Pi 含有量を測定した。その結果、MSC 群では有意に血管内 Ca、Pi 含有量が有意に低下していた (図 3)。また、血管石灰化マーカーである Osteopontin (OP)、Runx-2、Fibronectin の発現を real-time PCR で測定した結果、MSC 群で有意に抑制されており、組織学的にも同様の結果が得られた (図 4)。

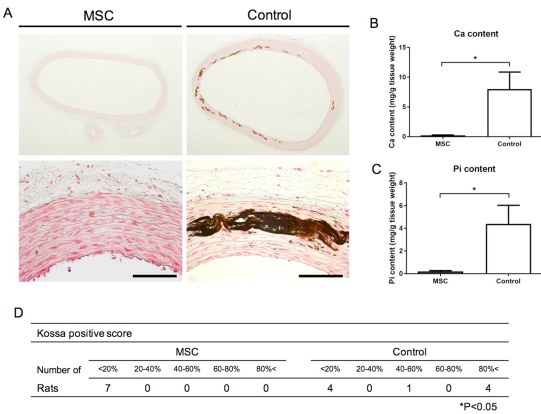


図 3

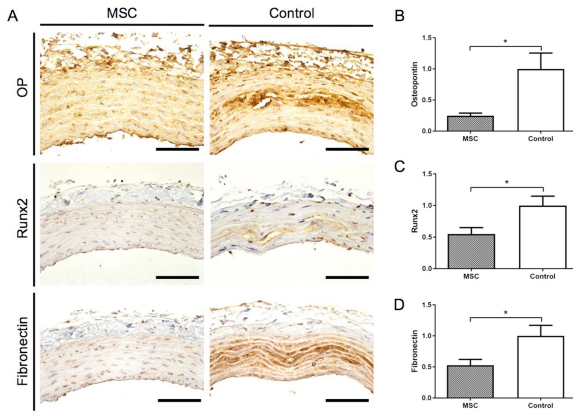


図 4

以上の結果より、ADMSC 治療は、アデニン腎不全ラットモデルにおいて、腎機能障害を改善し、血管石灰化を抑制することが示された。

今回得られた研究結果は、日本遺伝子細胞治療学会、国際腎臓学会等で国内外に広く発表し、英文雑誌 (Scientific Report 2017 Oct 25;7(1):14036.) に報告した。間葉系幹細胞による血管石灰化効果が確かなものになれば、間葉系幹細胞療法によって慢性腎不全患者の心血管イベントが抑制されることにより生命予後が今後大きく改善されることが期待され、今後、ヒトによる臨床研究への発展が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yokote S, Katsuoka Y, Yamada A, Ohkido I, Yokoo T.	4. 巻 Oct 25; 7 (1)
2. 論文標題 Effect of adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation on vascular calcification in rats with adenine-induced kidney disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 scientific reports	6. 最初と最後の頁 14036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-14492-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yokote S, Katsuoka Y, Yamada A, Ohkido I, Yokoo T.
2. 発表標題 Effect of adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation on vascular calcification in rats with adenine-induced kidney disease.
3. 学会等名 国際腎臓学会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横手伸也、長嶋 比呂志、小林 英司、横尾 隆
2. 発表標題 再生腎臓における尿排泄路機構の構築
3. 学会等名 日本透析医学会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Shinya Yokote
2. 発表標題 The effect of autologous adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation on vascular calcification in rats with adenine-induced kidney disease.
3. 学会等名 日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----