

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15665

研究課題名(和文) 難治性腎疾患における骨髄由来間葉系幹細胞を利用した新規治療法の研究開発

研究課題名(英文) Development of treatment for refractory renal disease using bone marrow-derived mesenchymal stromal cells

研究代表者

松岡 大輔 (Matsuoka, Daisuke)

信州大学・医学部附属病院・助教(特定雇用)

研究者番号：90814567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)は多くがステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の経過をとり、最終的に末期腎不全に至る難治性ネフローゼ症候群の代表的疾患である。FSGSの治療法は十分に確立されておらず、ネフローゼ症候群から脱しきれない症例の予後は極めて不良である。本研究は、FSGSモデルとして、アドリマイシン腎症ラットを用いて、自己脂肪由来間葉系幹細胞を静脈投与、もしくは、積層した細胞シートによる治療効果を評価した。静脈投与による移植と細胞シート移植による尿蛋白抑制効果や腎機能障害抑制効果の有用性は認められなかった。しかし、静脈投与において、組織学的には腎障害を軽減している傾向が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アドリマイシン腎症ラットにおける骨髄や臍帯血由来間葉系幹細胞の他家移植による細胞治療の報告は、国内外で散見される。しかし、治療効果に一定の見解は得られておらず、また、適切な細胞移植方法についても検討された報告がない。本研究の学術的意義は、臨床での実用化を想定した自己脂肪由来間葉系幹細胞による細胞治療の効果を検討した点にある。さらに、静脈投与と細胞シートの細胞移植を実施し、適切な移植方法を検討した点にある。静脈投与において、組織学的に腎障害を軽減する傾向が示され、FSGSに対する新規治療法となる可能性が示唆された。本研究は、難治性腎疾患の新規治療開発研究という点で社会的意義を有している。

研究成果の概要(英文)：Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is the leading cause of refractory nephrotic syndrome. Most patients with FSGS have a steroid-resistant disease course and progress to end-stage renal disease. The optimal treatment strategy for steroid-resistant FSGS is controversial. The prognosis is extremely poor for patients who do not recover from nephrotic syndrome. This study was designed to evaluate the therapeutic effect of autologous adipose-derived mesenchymal stromal cells (MSC) in a rat FSGS model of adriamycin-induced nephropathy using two different cell delivery methods: intravenous cell injection and cell sheet transplantation. Both methods did not show the suppression of urinary protein excretion or renal dysfunction. However, histologic study showed that autologous MSC delivered via intravenous cell injection mitigated renal injury.

研究分野：小児腎臓

キーワード：間葉系幹細胞 アドリマイシン腎症 巣状糸球体硬化症 細胞シート 立方型構造体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) は多くがステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の経過をとり、最終的に末期腎不全に至る難治性ネフローゼ症候群の代表的疾患である。FSGS の治療法は十分に確立されておらず、ネフローゼ症候群から脱しきれない症例の予後は極めて不良である。ネフローゼ症候群を呈する一次性 FSGS における腎生存率は、5 年で 85.3%、10 年で 70.9%、15 年で 60.9%、20 年で 43.5% とほぼ直線的に低下している。また、FSGS は小児透析導入原因の第二位 (約 20%) に位置している。さらに、腎移植を行っても移植腎で頻回に再発することが知られている。そのため、FSGS に対する新規治療開発は重大な研究課題である。

間葉系幹細胞は、多分化能を有するとともに、分泌される種々の液性因子は、免疫調節作用、抗炎症作用、血管新生作用を有しており、様々な疾患に対する細胞療法としてのソースとして期待されている。基礎研究においては、Adriamycin を投与し腎障害を引き起こした (ADR 腎症) ラットは FSGS モデルとして用いられている。ADR 腎症ラットにおける骨髓や臍帯血由来の間葉系幹細胞の他家移植による細胞治療での報告は、国内外で散見されるが、治療効果に一定の見解は得られていない。また、自己脂肪由来間葉系幹細胞 (AMC) を用いた報告はなく、適切な移植方法について検討された報告もない。

2. 研究の目的

本研究は、アドリアマイシンを投与し腎障害を誘発させたラットに対して、脂肪由来間葉系幹細胞を静脈投与、もしくは、細胞シートを積層した立体型構造体を移植することによって、腎機能が改善するか、あるいは、腎組織が再生されるのかを評価する。当初、骨髓由来間葉系幹細胞を用いるとしていたが、臨床での実用化を想定した場合、自家細胞移植の方が有利であると判断し AMC を用いることとした。

3. 研究の方法

(1) ADR 腎症ラットモデルの作成と評価

8 週齢雄 SD ラットに 4mg/kg (n=6)、8mg/kg ADR (n=10)、あるいは、対照薬 (DMSO、n=4) を尾静脈から投与した。ADR 投与 3 週、6 週後に採血、24 時間蓄尿により腎機能を評価した。

(2) ADR 腎症ラットへの AMC 単回移植の有用性の検討

7 週齢雄 SD ラットの下腹部脂肪組織を採取して、AMC を単離、培養した。同ラットの 8 週齢時に ADR 4mg/kg を尾静脈から投与した。ADR 投与 3 週後に鼠径静脈から自己 AMC ($2.0-7.0 \times 10^6$ cells/1.5ml, n=7) を投与して、経過観察を行った。AMC は移植前に細胞標識 (PKH26) した。対照群では、同様の方法で、下腹部脂肪組織の採取と ADR 4mg/kg を投与した後、無細胞液 (生理食塩水) を投与した (n=7)。また、アドリアマイシン投与前、細胞移植直前 (アドリアマイシン投与 3 週間後)、および、細胞移植 3 週間後に、24 時間蓄尿から尿中蛋白量などの測定、血液検査から腎機能測定を実施した。細胞移植 3 週間後に摘出した腎組織を HE 染色、マッソン染色、および、Periodic acid-Schiff 染色により、硬化系球体や線維化などの病理的变化を評価した。

(3) ADR 腎症ラットへの AMC 細胞シート移植の有用性の検討

7週齢雄 SD ラットの腹部脂肪組織を採取して、AMC を単離、培養した。同時に右腎を摘出し単腎とした。AMC には細胞標識(PKH26)を行い、培養した AMC 4.0×10^5 cells を UpCell® に播種し培養し、その後 Genocel® で回収し細胞シートを作成した。10週齢時に ADR 4mg/kg を投与し、腎被膜下に細胞シートを移植した。移植 2 週、4 週後に 24 時間蓄尿から尿中蛋白量などの測定、血液検査から腎機能測定を実施した。

(4) ADR 腎症ラットへの AMC 複数回移植の有用性の検討

7週齢雄 SD ラットの腹部脂肪組織を採取して、AMC を単離、培養した。同時に右腎を摘出し単腎とした。同ラットの 8 週齢時に ADR 4mg/kg を鼠径静脈から投与した。また AMC を day0、2、7 にそれぞれ 1.0×10^6 cells/1.5ml を投与して、経過観察を行った(n=7)。AMC は移植前に細胞標識(PKH26)した。対照群では、同様の方法で、腹部脂肪組織の採取と ADR 4mg/kg を投与した後、無細胞液(生理食塩水)を投与した(n=8)。移植 2 週、4 週後に 24 時間蓄尿から尿中蛋白量などの測定、血液検査から腎機能測定を実施した。

4. 研究成果

(1) ADR 腎症ラットモデルの作成と評価

ADR を投与すると、経時的な尿蛋白、血中クレアチニン、尿素窒素の増大を認める腎機能の低下、および、糸球体硬化が認められた。さらに、腎機能低下においては、ADR の用量依存性が認められた。また、8mg/kg ADR 投与群では、薬剤投与後のラット生存率が約 50%であった。そこで、自己 AMC 移植療法の評価系モデルとして、ADR 4mg/kg 投与したラットを用いた。

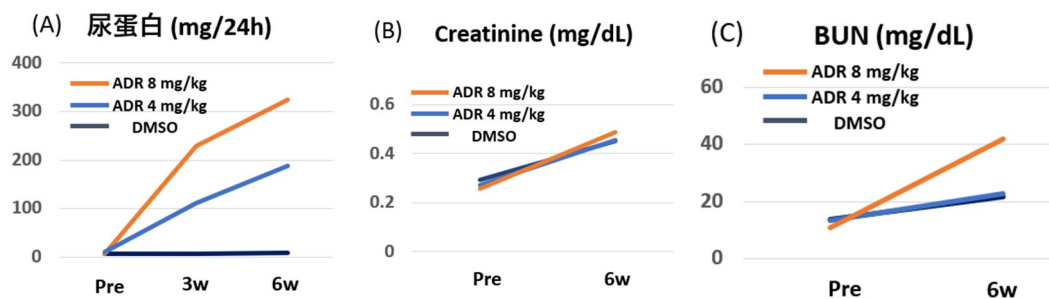


図1 ADR 腎症ラットの尿蛋白(A)、血清 Creatinine(B)、血清 BUN(C)の経時的変化

(2) ADR 腎症ラットへの AMC 単回移植の有用性の検討

AMC 群では移植 3 週後において尿蛋白の上昇を抑制する傾向がみられた (AMC 群 150.2 ± 160.2 mg/day, Vehicle 群 401.8 ± 247.0 mg/day, $p=0.057$)。血液検査では明らかな変化はなかった。腎病理では Vehicle 群でメサンギウム基質の増加、糸球体腫大、繊維化所見を認めた。AMC 群ではいずれの所見も軽度であった (図 2)。

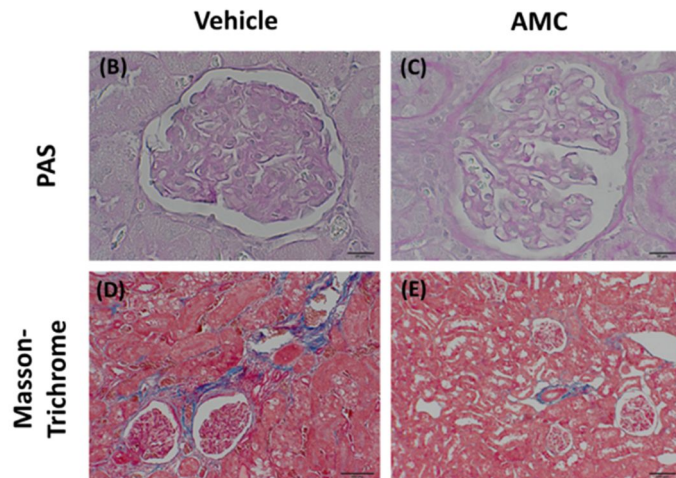


図2 細胞移植群(AMC群)と対照群(Vehicle群)の腎組織の比較。AMC群ではVehicle群に比べ組織変化が軽度であった。

脂肪由来間葉系幹細胞移植による改善傾向が認められるものの統計学的な有意差が認められなかった。そこで、モデルを再検討し、移植による腎機能改善効果を明らかにするため、片腎を摘出したラットへのアドリアマイシン投与モデルを用いて実験を行った。

(3) ADR腎症ラットへのAMC細胞シート移植の有用性の検討

尿中蛋白量はAMC群とVehicle群では移植後2週(205.8 mg/day vs 227.6 mg/day, $p=0.78$)、4週(492.9 mg/day vs 370.7 mg/day, $p=0.23$)ともに差は認めなかった。

血清CreatinineでもAMC群とVehicle群では移植後2週(0.51 mg/dL vs 0.51 mg/day, $p=1.0$)、4週(0.73 mg/day vs 0.72 mg/day, $p=0.89$)ともに差は認めなかった。

(4) ADR腎症ラットへのAMC複数回移植の有用性の検討

尿中蛋白量はAMC群とVehicle群では移植後2週(247.1 mg/day vs 225.1 mg/day, $p=0.77$)、4週(407.1 mg/day vs 478.2 mg/day, $p=0.54$)ともに差は認めなかった。

血清CreatinineでもAMC群とVehicle群では移植後2週(0.51 mg/dL vs 0.51 mg/day, $p=0.98$)、4週(0.64 mg/day vs 0.66 mg/day, $p=0.87$)ともに差は認めなかった。

以上の解析から、ADR腎症ラットに対するAMCの全身投与と細胞シート移植による尿蛋白抑制効果や腎機能障害抑制効果の有用性は認められなかった。しかし、組織学的には腎障害を軽減している傾向が示唆された。今後、細胞標識を行ったAMCの動態や、組織学的解析や遺伝子発現解析を行い細胞移植による変化を検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松岡大輔、今村哲也、道面尚久、石塚修
2. 発表標題 アドリアマイシン腎症ラットを用いた自己脂肪由来間葉系細胞移植療法の検討
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Matsuoka, Tetsuya Imamura, Naohisa Domen, Osamu Ishizuka, Yozo Nakazawa
2. 発表標題 Autologous adipose-derived mesenchymal stromal cells attenuate the progression of Adriamycin-induced nephropathy in rats
3. 学会等名 the Congress of International Pediatric Nephrology Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡大輔、今村哲也、道面尚久、石塚修
2. 発表標題 アドリアマイシン腎症ラットにおける自家志望由来間葉系細胞の有用性の検討
3. 学会等名 小児腎臓病学会
4. 発表年 2019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
研究協力者	今村 哲也 (Imamura Tetsuya) (00467143)	信州大学泌尿器科学教室	

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
---------	---------