

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591026

研究課題名（和文）脂肪由来細胞を用いた腎疾患治療の開発  
—再生促進作用と免疫抑制作用の融合—研究課題名（英文）Development of the therapy for the renal diseases using the cells  
derived from adipose tissue.  
— Fusion of the regenerative and the immunosuppressive action—

研究代表者：丸山彰一 (Shoich Maruyama)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10362253

研究成果の概要（和文）：我々の研究の最終ゴールは脂肪由来間葉系幹細胞（ASC=adipose tissue-derived stem/stromal cell）の再生促進作用と免疫抑制作用を融合し腎疾患に対する新たな細胞治療を開発することである。本研究はそのための基盤研究と位置づけられる。In vitroでのT細胞抑制およびin vivoでの異種抗原に対する抗体産生といったモデル、つまりLASCの免疫抑制作用を定量する系が確立された。このことは、今後LASCの免疫抑制作用に関する分子機序を解析を加速するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Our final goal is to develop a new cellular therapy for the renal disease by using the regenerative and immunosuppressive action of adipose tissue-derived stem/stromal cells (ASC). This study is a basic study for this purpose. We successfully established an in vitro model to evaluate the T cell suppression as well as in vivo model of suppression of anti-xenoantibody production. These systems to assay immunosuppressive actions of LASC will accelerate our future study to clarify the molecular mechanisms of LASC action.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：幹細胞、脂肪、間葉系細胞、免疫抑制、異種移植

## 1. 研究開始当初の背景

## 1) 再生医療の動向

申請者らは、「体内の幹細胞の量的・質的な低下が腎障害を含む各種臓器障害を進行させる要因であり、幹細胞の補充が臓器障害を抑制する」という仮説を立てた。申請時までに、透析患者では末梢血 CD34 陽性細胞数の減少が心血管事象を増加させる独立危険因子であることを報告した (Maruyama S, 2008 KI)。動物実験では骨髄由来幹細胞の投

与がマウスの腎不全を軽減させることが報告されていた (Morigi M, 2004 JASN)。臨床面では室原らが重症虚血肢に対する再生治療の有効性を報告している (Lancet 2002)。しかし、その後透析患者の虚血肢には無効であることも明らかとなり (TACT-NAGOYA)、再生医療における骨髄由来幹細胞の限界も明らかとなっていた。また iPS 細胞が注目されていたが、実用化にはまだ相当の時間を要するものと思われた。

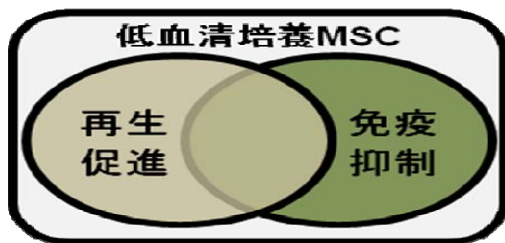
表1	脂肪組織	骨髄	末梢血
採取の難度	容易	やや難	容易
患者への負担	小	大	小
幹細胞率	極めて高	高	低
CD34陽性率	10% <sup>*</sup>	~1%	~0.01%
10 <sup>7</sup> 個調整するには	~100g	50ml <sup>*</sup>	20L

## 2) 脂肪由来幹細胞の再生医療への応用

幹細胞のソースとして脂肪組織が注目されている (Zuk PA, 2002 MBC)。低侵襲に採取可能であり、幹細胞数が多く、良好な増殖能を持つことが特徴である (表 1)。申請者らは、ヒト皮下脂肪から分化能力と増殖能力の高い MSC の選択的分離培養法 (=低血清培養法) を開発した (特願 2004-201615, 国際公開第 2006/006692)。厚生労働省の班研究 (慢性腎障害の重症化防止を目的とした幹細胞移植による残存腎機能再構築 H17-再生一般-010、腹圧性尿失禁に対する新規治療法の開発 H19-長寿一般-001) においては、低血清培養 MSC が各種疾患動物モデル (シスプラチン腎症、葉酸腎症、下肢虚血、皮膚潰瘍、尿失禁、骨粗鬆症など) に対し治療効果を示すことを明らかにした (国際出願 PTC/JP2007/065431)。また申請者らは腹圧性尿失禁患者に自己脂肪由来細胞を投与する再生医療を計画し、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得ていた。

## 3) 脂肪由来幹細胞の免疫抑制作用

骨髄由来 MSC は免疫抑制作用を有することが知られている。近年骨髄移植後の GVHD に対する治療として臨床応用され効果を挙げている (Blanc KL, 2004 The Lancet)。その機序のひとつに T 細胞の増殖抑制作用がある。申請者らは低血清培養脂肪由来 MSC が強力に T 細胞増殖を抑制することを見出した。申請者らは「MSC 移植は再生促進作用のみならず免疫抑制 (抗炎症) 作用により腎保護効果を呈する」という仮説を立てていた。



## 2. 研究の目的

低血清培養脂肪由来 MSC の治療効果を、腎再生促進作用と免疫抑制作用の両面から明らかにする。特に従来の高血清培養との違い、あるいは臨床で最もよく使用されている骨髄由来間葉系幹細胞との違いに着目し、そ

の治療効果を明らかにする。さらに、投与経路 (経静脈的あるいは腹腔内投与など) についても検討する。

また、今後の研究展開にむけた基盤として、着実に治療効果を判定できるシステムを *in vitro* および *in vivo* の系で作成することも本研究における重要な目的のひとつである。

## 3. 研究の方法

手術中に採取されたヒト ASC を低血清 (ウシ胎児血清 2%+FGF-2) もしくは高血清 (ウシ胎児血清 20%+FGF-2) にて培養増殖した。健常者より採取し分離したヒト末梢血単核球 (PBMC) を T 細胞依存性の PHA もしくは T 細胞非依存性の抗 IgM 抗体で刺激し増殖させた。PHA もしくは抗 IgM 抗体で刺激したヒト PBMC にヒト LASC もしくはヒト HASC を共培養することにより、ヒト PBMC の増殖抑制効果を検討した。ヒト PBMC の増殖はトリチウムおよび CFSE を用いたフローサイトメトリーにて評価した。

ラットの脂肪・骨髄を採取し各種培養にてラット LASC・HASC・LBM-MSC (low serum cultured BM-MSC)・HBM-MSC (high serum cultured BM-MSC) を作成した。ラット LASC・HASC・LBM-MSC・HBM-MSC の増殖能を検討したところラット LBM-MSC はほとんど増殖しなかったため以後の実験にはラット LASC・HASC・HBM-MSC のみを用いた。まず、ラット LASC・HASC・HBM-MSC の表面マーカー (CD34・44・45・54・90) および VEGF・HGF の分泌能を検討した。次にラットの脾臓から単核球を分離し PHA で刺激した。PHA で刺激したラット脾臓由来単核球にラット LASC・HASC・HBM-MSC を共培養することにより、ラット脾臓由来単核球の増殖抑制効果を試験した。

Lewis ラットにブタの赤血球である pRBC (porcine red blood cells) を腹腔内投与し Lewis ラットの体内に抗 pRBC 抗体を産生させた。抗 pRBC 抗体産生抑制効果を検討するため pRBC 投与 1 日後・6 日後に F344 ラット由来の LASC・HASC・HBM-MSC を 2×10<sup>6</sup> 個ずつ静脈内もしくは腹腔内投与した。無治療群は PBS のみを投与した。7 日後・20 日後に Lewis ラットの血清を採取し、フローサイトメトリーを用いて pRBC に対する IgG 抗体・IgM 抗体を測定し、ELISA にて総 IgG・IgM を測定した。トレースの実験として CFSE でラベリングした F344 ラット LASC を Lewis ラットの静脈内もしくは腹腔内に投与した。投与 6 時間・24 時間・48 時間後に Lewis ラットの脾臓を採取し CFSE 陽性細胞をカウントした。

## 4. 研究成果

PHA で刺激されたヒト PBMC はヒト LASC を共

培養することによって有意に増殖が抑制され、フローサイトメトリーにて T 細胞・B 細胞ともに抑制されていることが確認された。抑制効果はヒト HASC よりも LASC で優れていた。またヒト LASC と PBMC を transwell にて分離して培養するよりも共培養するほうが増殖抑制効果に優れており LASC と PBMC の細胞同士の接着が重要であると思われた。一方抗 IgM 抗体で刺激した PBMC はヒト LASC との共培養にて増殖は抑制されず(図 1)、フローサイトメトリーにて B 細胞の抑制は確認されなかった(図 2)。

図 1

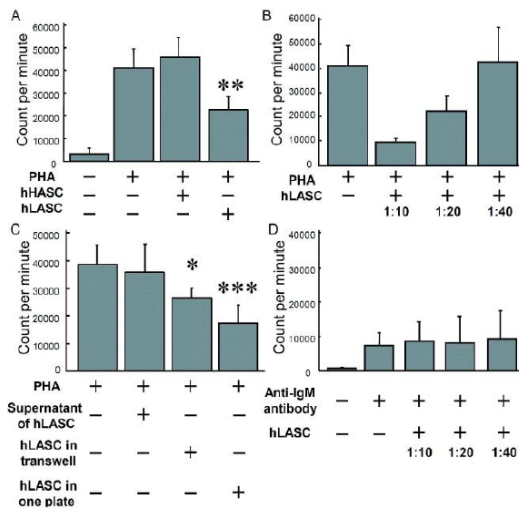
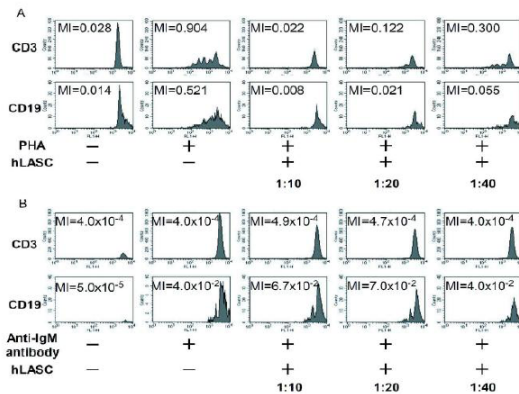


図 2

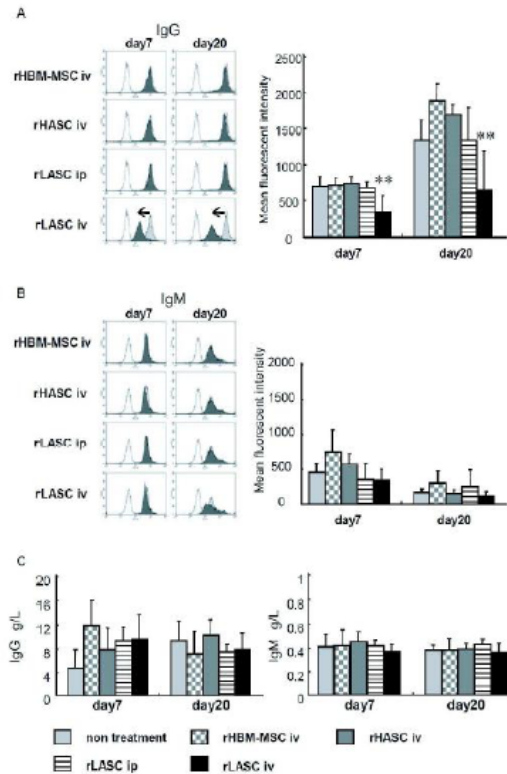


ラット LASC・HASC・HBM-MSc の表面マーカーの結果は従来の間葉系細胞マーカーと一致する結果であった。一方ラット LASC はラット HASC・HBM-MSc に比べて VEGF・HGF の分泌能に優れていた。また PHA で刺激されたラット脾臓由来単核球をラット LASC・HASC・HBM-MSc でそれぞれ共培養すると LASC>HASC>HBM-MSc の順で増殖抑制効果に優れていた。

In vivo の実験において Lewis ラット内の抗 pRBC 抗体の産生を抑制するために F344 ラットの LASC・HASC・HBM-MSc を静脈内投与したが、ラット LASC でのみ無治療群に比べて

抗 pRBC の IgG 抗体が抑制された。ラット LASC も静脈内投与では抗 pRBC 抗体の産生を抑制したが同量の腹腔内投与では抑制されなかった。抗 pRBC の IgM 抗体に関しては、どの投与方法でも抑制されなかった。Lewis ラット血清中の総 IgG・IgM 濃度は無治療群とラット LASC・HASC・HBM-MSc 治療群において有意な差を認めなかった(図 3)。

図 3



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Toda S, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Ito I, Hiramatsu H, Ozaki T, Tsuboi N, Sato W, Maruyama S, Imai E, Matsuo S. Asymptomatic diverticulosis identified by computed tomography is not a risk factor for enteric peritonitis. *Nephrol Dial Transplant*, 査読有, inpress
2. Yasuda K, Vasko R, Hayek P, Ratliff BB, Bicer H, Mares J, Maruyama S, Bertuglia S, Mascagni P, Goligorsky MS, Functional Consequences of Inhibiting Exocytosis of Weibel-Palade Bodies in Acute Renal Ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 査読有, inpress

3. Watanabe T, Maruyama S, Yamamoto T, Kamo I, Yasuda K, Saka Y, Ozaki T, Yuzawa Y, Matsuo S, Gotoh M. Increased urethral resistance by periurethral injection of low serum cultured adipose-derived mesenchymal stromal cells in rats. *Int J Urol*. 査読有, 18(9):659-66. 2011
4. Yasuda K, Khandare A, Burianovskyy L, Maruyama S, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Tunneling nanotubes mediate rescue of prematurely senescent endothelial cells by endothelial progenitors: exchange of lysosomal pool. *Aging (Albany NY)* 査読有; 3(6):597-608. 2011
5. Saka Y, Furuhashi K, Katsuno T, Kim H, Ozaki T, Iwasaki K, Haneda M, Sato W, Tsuboi N, Ito Y, Matsuo S, Kobayashi T, Maruyama S. Adipose-derived stromal cells cultured in a low-serum medium, but not bone marrow-derived stromal cells, impede xenobody production. *Xenotransplantation*. 査読有, 18(3):196-208. 2011
6. Mizuno M, Ito Y, Tanaka A, Suzuki Y, Hiramatsu H, Watanabe M, Tsuruta Y, Matsuoka T, Ito I, Tamai H, Kasuga H, Shimizu H, Kurata H, Inaguma D, Hiramatsu T, Horie M, Naruse T, Maruyama S, Imai E, Yuzawa Y, Matsuo S. Peritonitis is still an important factor for withdrawal from peritoneal dialysis therapy in the Tokai area of Japan. *Clin Exp Nephrol*, 査読有, 15(5):727-37. 2011
7. Kato H, Mizuno T, Mizuno M, Sawai A, Suzuki Y, Kinashi H, Nagura F, Maruyama S, Noda Y, Yamada K, Matsuo S, Ito Y. Atrial natriuretic peptide ameliorates peritoneal fibrosis in rat peritonitis model. *Nephrol Dial Transplant*. 査読有, 27(2):526-36, 2011
8. Saito S, Murakumo Y, Tsuzuki T, Dambara A, Kato T, Enomoto A, Asai N, Maruyama S, Matsuo S, Takahashi M. Analysis of glial cell line-derived neurotrophic factor-inducible zinc finger protein 1 expression in human diseased kidney. *Hum Pathol*. 査読有, 42(6):848-58. 2011
9. Kato N, Kosugi T, Sato W, Ishimoto T, Kojima H, Sato Y, Sakamoto K, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S, Kadomatsu K. Basigin/CD147 promotes renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *Am J Pathol*. 査読有, 178(2):572-9. 2011
10. Fadini GP, Maruyama S, Ozaki T, Taguchi A, Meigs J, Dimmeler S, Zeiher AM, de Kreutzenberg S, Avogaro A, Nickenig G, Schmidt-Lucke C, Werner N. Circulating progenitor cell count for cardiovascular risk stratification: a pooled analysis. *PLoS One*. 査読有, 5(7):e11488. 2010
11. Yamada S, Ishii H, Takahashi H, Aoyama T, Morita Y, Kasuga H, Kimura K, Ito Y, Takahashi R, Toriyama T, Yasuda Y, Hayashi M, Kamiya H, Yuzawa Y, Maruyama S, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T. Prognostic value of reduced left ventricular ejection fraction at start of hemodialysis therapy on cardiovascular and all-cause mortality in end-stage renal disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 査読有, 5(10):1793-8. 2010
12. Ishii H, Kumada Y, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Tanaka M, Kamoi D, Kawamura Y, Yamada S, Hayashi M, Yasuda Y, Yuzawa Y, Maruyama S, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T. Effects of oral cilostazol 100 mg BID on long-term patency after percutaneous transluminal angioplasty in patients with femoropopliteal disease undergoing hemodialysis: a retrospective chart review in Japanese patients. *Clin Ther*. 査読有, 32(1):24-33. 2010
13. Yazaki S, Iwamoto M, Onishi A, Miwa Y, Suzuki S, Fuchimoto D, Sembon S, Furusawa T, Hashimoto M, Oishi T, Liu D, Nagasaka T, Kuzuya T, Maruyama S, Ogawa H, Kadomatsu K, Uchida K, Nakao A, Kobayashi T. Successful cross-breeding of cloned pigs expressing endo-beta-galactosidase C and human decay accelerating factor. *Xenotransplantation*. 査読有, 16(6):511-21. 2009
14. Kurata K, Maruyama S, Kato S, Sato W, Yamamoto J, Ozaki T, Nitta A, Nabeshima T, Morita Y, Mizuno M, Ito Y, Yuzawa Y, Matsuo S. *Am J Physiol Renal Physiol*. 査読有, 297(6):F1510-7. 2009
15. Watanabe N, Hiramatsu K, Miyamoto R, Yasuda K, Suzuki N, Oshima N, Kiyonari H, Shiba D, Nishio S, Mochizuki T, Yokoyama T, Maruyama S, Matsuo S, Wakamatsu Y, Hashimoto H. A murine model of neonatal diabetes mellitus in Glis3-deficient mice. 583(12):2108-13. 2009 査読有
16. Hobo A, Yuzawa Y, Kosugi T, Kato N, Asai N, Sato W, Maruyama S, Ito Y, Kobori H, Ikematsu S, Nishiyama A, Matsuo S, Kadomatsu K. The growth factor midkine regulates the renin-angiotensin system in mice. *J Clin Invest*. 査読有, 119(6):1616-25. 2009
17. Watanabe N, Kato M, Suzuki N, Inoue C, Fedorova S, Hashimoto H, Maruyama S, Matsuo S, Wakamatsu Y. Kidney regeneration through nephron neogenesis in medaka. *Dev*

Growth Differ. 査読有, 51(2):135-43. 2009

18. Sakamoto I, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Sawai A, Tanaka A, Maruyama S, Takei Y, Yuzawa Y, Matsuo S. Lymphatic vessels develop during tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int.* 査読有, 75(8):828-38. 2009

19. Iwashima S, Ozaki T, Maruyama S, Saka Y, Kobori M, Omae K, Yamaguchi H, Niimi T, Toriyama K, Kamei Y, Torii S, Murohara T, Yuzawa Y, Kitagawa Y, Matsuo S. Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 査読有, 18(4):533-43. 2009

20. Kobayashi T, Liu D, Ogawa H, Miwa Y, Nagasaka T, Maruyama S, Li YT, Onishi A, Iwamoto M, Kuzuya T, Kadomatsu K, Uchida K, Nakao A. Removal of blood group A/B antigen in organs by ex vivo and in vivo administration of endo-beta-galactosidase (ABase) for ABO-incompatible transplantation. *Transpl Immunol.* 査読有, 20(3):132-8. 2009 [学会発表] (計 18 件)

1. Kazuhiro Furuhashi, Low Serum Cultured Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells, but Not Bone-Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells, Ameliorate Rat Crescentic Glomerulonephritis by Functional Polarization of Macrophages into Immunoregulatory Phenotype, *ASN*, 2011.11.10, Philadelphia, PA

2. Kaoru Yasuda, Prognostic Value of Geriatric Nutritional Risk Index for Cardiovascular and All-Cause Mortality in End-Stage Renal Disease Patients on Chronic Hemodialysis, *ASN*, 2011.11.10, Philadelphia, PA

3. Shoichi Maruyama, Association of Adipokines with Cardiovascular Mortality in Patients on Hemodialysis, *ASN*, 2011.11.10, Philadelphia, PA,

4. Yuka Sato, The Pivotal Role of Midkine on the Development of Hypertension in Endothelial Dysfunction, *ASN*, 2011.11.10, Philadelphia, PA

5. Hangsoo Kim, Low Serum Cultured Adipose Derived Stem Cells Ameliorate Zymosan Induced Severe Rat Peritonitis Model, *ASN*, 2011.11.10, Philadelphia, PA

6. Yoshinari Yasuda, Clinical Impact of the Examination of the Ocular Fundus for CKD Patients without Atherosclerosis Risk Factors, *ASN*, 2011.11.10, Philadelphia, PA

7. Kazuhiro Furuhashi, Adipose-derived stem cells therapy is effective in the treatment of anti-GBM glomerulonephritis., *APCN 2010*, 2010.6.6, Convention and Exhibition Center (COEX), Seoul, Korea

8. T KATSUNO, RENOPROTECTIVE EFFECTS AND MECHANISMS OF HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED STROMAL CELLS CULTURED IN LOW SERUM MEDIA ON ACUTE KIDNEY INJURY, *APCN 2010*, 2010.6.6, Convention and Exhibition Center (COEX), Seoul, Korea

9. Yosuke-Saka, Adipose-derived mesenchymal stem cells suppress antibody production against graft antigens, *ISN nexus*, 2010.4.17, 京都国際会議センター (ICC京都府)

10. Takayuki Katsuno, Renoprotective effects of human adipose tissue-derived stromal cells cultured in low serum media on acute kidney injury, *ISN nexus*, 2010.4.17, 京都国際会議センター (ICC京都府)

11. Kazuhiro Furuhashi, Adipose-derived stem cells therapy is effective in the treatment of anti-GBM glomerulonephritis, *ISN nexus*, 2010.4.17, 京都国際会議センター (ICC京都府)

12. Shoichi Maruyama, Reduced number of circulating CD34-positive cells is associated with poor cardiovascular outcomes in chronic hemodialysis patients, *ISN nexus*, 2010.4.17, 京都国際会議センター (ICC京都府)

13. Kazuhiro Furuhashi, Therapeutic potential of adipose-derived stem cells for anti-GBM glomerulonephritis, 7th International Conference on Innate Immunity, 2010.7.4, ギリシャ

14. Shoichi Maruyama, Association of CD34+ Circulating Progenitor Cells and C-Reactive Protein with Cardiovascular and All-Cause Mortality in Hemodialysis Patients, 42rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, 2010.11.18, Colorado Convention Center Denver, CO

15. Takayuki Katsuno, Knock-Down of HGF and VEGF Production Reduces the Renoprotective Effects of Adipose-Derived Stromal Cells in the Acute Kidney Injury, 42rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, 2010.11.19, Colorado Convention Center Denver, CO

16. Kazuhiro Furuhashi, Therapeutic Potential of Adipose-Derived Stem Cells for Anti-GBM Glomerulonephritis, 42rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, 2010.11.20, Colorado Convention Center Denver, CO

17. Shoji Saito, Analysis of GDNF-Inducible Zinc Finger Protein 1 Expression in Human Diseased Kidney, 42rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, 2010.11.20, Colorado Convention Center Denver, CO

18. Takayuki Katsuno, Renoprotective effect of human adipose tissue-derived stromal cells in acute kidney injury -Comparison between low and high serum cell culture condition, 42rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, 2009.10.27-11.1, San Diego, California, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称：脂肪組織由来間葉系肝細胞を含有する免疫抑制剤及びその用途

発明者：丸山彰一、尾崎武徳、坂洋祐、古橋和祐、坪井直毅

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：2011-535314

出願年月日：平成 24 年 2 月 17 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 彰一 (maruyama shoichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10362253

(2) 研究分担者

尾崎 武徳 (ozaki takenori)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：10452195

湯澤 由紀夫 (yuzawa yukio)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：00191479

松尾 清一(matsuo seiichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10790410

(3) 連携研究者

なし