

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860672

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞を用いた新たな腎再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of the kidney regeneration therapy using adipose tissue-derived stromal cells .

研究代表者

勝野 敬之 (Katsuno, Takayuki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：60642337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜炎は腹膜透析離脱を引き起こす重大な合併症である。本研究では、ザイモザンによるラット真菌性腹膜炎モデルに対して脂肪由来幹細胞(ASC)を投与し、その効果を補体の活性制御に焦点をあてて解析した。真菌性腹膜炎は、ラットの右側腹膜を機械的に擦過の後、ザイモザンを投与して作製した。ASCは腹腔内へ連日投与した。結果、ASC投与群で腹膜組織障害が軽減された。腹膜中皮細胞は補体制御因子を有しており、ASC投与で中皮細胞の再生が促進されたことが一つの機序として考えられた。ASCと中皮細胞の干渉には、肝細胞増殖因子を軸としたASCのパラクライン作用が関連していることがinvitroの実験で証明された。

研究成果の概要(英文)：BACKGROUND AIMS:Administration of rat adipose tissue-derived stromal cells (ASCs) potentially can improve several tissue injuries. The present study investigated whether rat ASCs could improve peritoneal inflammation in Zy/scraping peritonitis. METHODS:Rat ASCs were injected intraperitoneally on a daily basis in rats with Zy/scraping peritonitis. RESULTS:Peritoneal inflammation accompanied by accumulation of inflammatory cells and complement deposition was suppressed by day 5 after injection of rat ASCs. The peritoneal mesothelial layer in Zy/scraping peritonitis with rat ASC treatment was restored compared with the peritoneal mesothelial layer without rat ASC treatment. In vitro assays showed increased cellular proliferation of rat mesothelial cells combined with rat ASCs by co-culture assays. Hepatocyte growth factor was released from rat ASCs, and administration of recombinant hepatocyte growth factor increased rat mesothelial cell proliferation.

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪由来幹細胞 再生 低血清培養

1. 研究開始当初の背景

幹細胞治療の分野では iPS 細胞が注目されているが、安全性という点ではまだ克服すべき課題が多い。一方で、間葉系幹細胞 (mesenchymal stromal cells:MSC) は安全性が高く、また同種他家移植が可能であるなど実用化という点では優位性がある。MSC は組織障害に伴って惹起される生体の過剰反応を抑え調整する役割を担っていると考えられ、その多面的作用により幅広い疾患領域での再生効果が報告されている。近年、MSC のソースとして脂肪組織が注目されている。その特徴としては低侵襲に採取が可能であり、幹細胞数が多く、より良好な増殖能を持つことなどが挙げられる。申請者は、ヒト皮下脂肪から分化能と増殖能の高い脂肪由来幹細胞 (adipose tissue-derived-stromal cells:ASC) の選択的分離培養法 (= 低血清培養法) を世界に先駆けて開発した。この低血清培養 ASC に関する多くの研究で、骨髄由来幹細胞 (bone marrow-derived stromal cells:BMSC) と比較して細胞増殖が速い、再生促進因子を多く分泌するといった特徴を明らかにしている。申請者らはすでに下肢虚血、尿失禁、皮膚潰瘍及び骨粗鬆症の疾患モデルにおける低血清培養 ASC の優れた組織再生促進効果を確認しており、その結果を発信させている。

2. 研究の目的

この研究での最終目標は、低血清培養 ASC の臨床応用である。今回の研究では、腹膜透析 (peritoneal dialysis: PD) における難治性腹膜炎に対する細胞治療の臨床応用に向けた基礎研究を実施した。腹膜透析は重要な腎代替療法の一つである。全世界で 20 万人近い末期腎不全患者が腹膜透析を施行しているが、様々な理由で腹膜透析を離脱している。腹膜炎は腹膜透析離脱を引き起こす重大な合併症であり、被嚢性腹膜硬化症 (encapsulating peritoneal sclerosis; EPS) の発症との関連もあるとされている。とりわけ、真菌性の腹膜炎は予後不良で EPS への移行も報告されている。当研究室では、以前に酵母の細胞壁の成分であるザイモザンを用いた真菌性腹膜炎のモデルを作製し報告した。このモデルは高度な腹膜障害を来すが、その一つの原因として補体の活性化が重要であることも併せて報告している。この研究では、ザイモザンによるラット真菌性腹膜炎モデルに対して低血清培養 ASC を投与し、その効果を補体の活性制御に焦点をあてて解析した。

3. 研究の方法

(1)低血清培養ラット脂肪由来間葉系幹細胞 (rASC) およびラット腹膜中皮細胞 (rat mesothelial cell : rMC) の調整

雄の Sprague-Dawley (SD)ラットの鼠径部より脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理

後遠心分離して 2% の fetal bovine serum(FBS) 添加培地で細胞を培養した (rASC)。SD ラットの体網を採取し、トリプシン処理後に遠心分離して 10%FBS 添加の M199 培地にて培養した (rMC)。

(2) In vivo 実験のプロトコル

真菌性腹膜炎は、ラットの右側腹膜を機械的に擦過の後、5mg のザイモザンを 5 日間連続投与して作製した。rASC は 6×10^6 個を Day0 から Day4 に腹膜透析液で希釈して腹腔内へ連日投与した。Day5 にラットを安楽死させ組織採取を行い、rASC 投与群と非投与群で比較検討した。

(3) 腹膜の組織学的評価

右側の壁側腹膜から、5mmx20mm の 4 切片を採取した。採取した組織を用いて、HE 染色を行い、腹膜障害の程度を評価するために腹膜の厚さを計測した。組織の免疫学的評価のために、好中球・ED-1 の染色を行い 1 視野あたりの陽性細胞数を数えた。腹膜表層の中皮細胞の回復を評価するために、抗サイトケラチン抗体にて染色した。補体の活性産物として、C3b・C5b-9 を観察するために抗 C3 および抗 C9 抗体を用いて染色を行った。両者をスコア化するために、沈着した面積を用いて半定量化した。また、補体制御因子の分布をみるために、Crry・CD55・CD59 各々のモノクローナル抗体にて染色を行った。これらも同様に半定量化した。いずれの計測も 20 視野の平均値を用い、それらを比較検討した。

(4) ザイモザン誘導腹膜炎における rASC の追跡実験

CFSE にて染色した rASC を腹膜炎モデルに投与し、3 日目にその分布を評価した。抗サイトケラチン抗体でも染色して、rMC の分布もあわせて観察した。

(5) In Vitro での rASC と rMC の共培養と WST-1 分析での評価

rASC と rMC を直接および間接的 (トランスウェルを使用) に 48 時間共培養し、rMC の細胞数を数えた。また、WST-1 分析を用いて rMC が rASC の上清にて増殖が加速されるのかどうかを評価した。さらに、rASC 上清の HGF 濃度を測定し、リコンビナント HGF による rMC の増殖効果を WST-1 分析にて確認した。

4. 研究成果

(1) rASC 投与群で腹膜組織障害は軽減する。

rASC 投与群において腹膜肥厚・総浸潤細胞数・好中球数・ED-1 陽性細胞数が非投与群と比較して有意に抑制された。腹膜表層の中皮細胞の回復は rASC 投与群において有意に促進された。

(2) 補体制御因子の分布および補体活性産物 (C3b、C5b-9) 沈着の比較。

rASC 投与群において、Crry・CD55・CD59 といった補体制御因子の腹膜表層における分布は非投与群と比較して有意に増加した。一方補体活性産物である C3b・C5b-9 の沈着は rASC 投与群において有意に減少した。

(3)投与した rASC は中皮細胞に隣接して位置する。

CFSE で染色した rASC は、抗サイトケラチン抗体陽性の中皮細胞に隣接して分布していた。しかし、両者が合致することはなかった。

(4)In vitro において rASC は rMC の増殖を促進する。

rMC を rASC と共培養した結果、単独での培養よりも増殖が有意に促進された。その効果が液性因子によるものか細胞間コミュニケーションによるものかを区別するために、トランスウェルを用いて間接的な共培養を施行したが、rMC の増殖効果は保たれた。さらに、rASC の上清を用いて rMC の増殖効果が WST-1 分析においても確認できた。

(5)リコンビナント HGF は rMC の増殖を促進する。

rASC の上清には HGF が ELISA にて検出された。リコンビナント HGF を添加した培地にて rMC の増殖が濃度依存的に促進された。

今回の実験において、rASC は補体活性を伴ったザイモザン誘導の腹膜炎における腹膜障害を改善させた。この効果の少なくとも一部は rASC による補体活性制御と考えられる。rASC 投与によって補体活性が抑制される理由として、中皮細胞層の修復に注目した。腹膜中皮細胞は Crry・CD55・CD59 などの補体制御因子を豊富に持っているため、その回復は腹膜における補体活性の制御に働いた可能性がある。In vitro において rASC は rMC の増殖を促進し、rASC の追跡実験では rMC に隣接して分布していた。これらの結果は、投与した rASC が中皮細胞の修復に寄与するという考えを支持する。さらに、トランスウェルを用いた実験の結果から、rASC が放出する何らかの液性因子が中皮細胞の修復を促進したことが示唆され、その因子として HGF に着目した。今回の実験結果から、rASC より放出された HGF が補体制御因子を豊富に持つ rMC の修復の一助となった可能性がある。加えて、rASC そのものが Crry・CD55・CD59 といった補体制御因子を有しており、rASC 自体が局所の補体活性に対して抑制的に直接働いた可能性もあると考えられた。

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 8 件)

全て査読あり

1. Yamaguchi M, Ando M, Yamamoto R, Akiyama S, Kato S, Katsuno T, Kosugi T, Sato W, Tsuboi N, Yasuda Y, Mizuno M, Ito Y, Matsuo S, Maruyama S. Patient age and the prognosis of idiopathic membranous nephropathy. *PLoS One*. 2014 Oct 20;9(10):e110376. doi: 10.1371/journal.pone.0110376.
2. Yamaguchi M, Ando M, Yamamoto R, Akiyama S, Kato S, Katsuno T, Kosugi T, Sato W, Tsuboi N, Yasuda Y, Mizuno M, Ito Y, Matsuo S, Maruyama S. Smoking is a risk factor for the progression of idiopathic membranous nephropathy. *PLoS One*. 2014 Jun 25;9(6):e100835. doi: 10.1371/journal.pone.0100835.
3. Kim H, Mizuno M, Furuhashi K, Katsuno T, Ozaki T, Yasuda K, Tsuboi N, Sato W, Suzuki Y, Matsuo S, Ito Y, Maruyama S. Rat adipose tissue-derived stem cells attenuate peritoneal injuries in rat zymosan-induced peritonitis accompanied by complement activation. *Cytotherapy*. 2014 Mar;16(3):357-68. doi:10.1016/j.jcyt.2013.10.011.
4. Katsuno T, Ochi M, Tominaga K, Tanaka F, Sogawa M, Tanigawa T, Yamagami H, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Fujiwara Y, Arakawa T. Mesenchymal stem cells administered in the early phase of tumorigenesis inhibit colorectal tumor development in rats. *J Clin Biochem Nutr*. 2013 Nov;53(3):170-5. doi:10.3164/jcbn.13-68.
5. Furuhashi K, Tsuboi N, Shimizu A, Katsuno T, Kim H, Saka Y, Ozaki T, Sado Y, Imai E, Matsuo S, Maruyama S. Serum-starved adipose-derived stromal cells ameliorate crescentic GN by promoting immunoregulatory macrophages. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Mar;24(4):587-603. doi:10.1681/ASN.2012030264.
6. Katsuno T, Ozaki T, Saka Y, Furuhashi K, Kim H, Yasuda K, Yamamoto T, Sato W, Tsuboi N, Mizuno M, Ito Y, Imai E, Matsuo S, Maruyama S. Low serum cultured adipose tissue-derived stromal cells ameliorate acute kidney injury in rats. *Cell Transplant*.

- 2013;22(2):287-97.doi:10.3727/096368912X655019.
7. Abe T, Kato S, Tsuruta Y, Sugiura S, Katsuno T, Kosugi T, Tsuboi N, Matsuo S, Maruyama S. Neutrophil/lymphocyte ratio as a predictor of cardiovascular events in incident dialysis patients: a Japanese prospective cohort study. Clin Exp Nephrol. Epub.2013
〔学会発表〕(計 18 件)
 1. 鈴木 康弘、坂田 史子、勝野 敬之、加藤 規利、尾崎 武徳、小杉 智規、佐藤 和一、坪井 直毅、丸山 彰一、水野 正司、松尾 清一、伊藤 恭彦. 腹膜透析患者における C.E.R.A. 投与量に関連する因子の検討. 第 59 回日本透析医学会学術総会・集会. 神戸国際会議場. 兵庫県神戸市. 2014/6/14
 2. 田中 章仁、水野 正司、大島 英揮、筑紫 さおり、石川 英昭、坂田 史子、加藤 規利、鈴木 康弘、勝野 敬之、尾崎 武徳、小杉 智規、坪井 直毅、佐藤 和一、丸山 彰一、松尾 清一、伊藤 恭彦. 長期腹膜透析 (PD) 患者に生じた左房内 calcified amorphous tumor (CAT) の 1 例. 第 59 回日本透析医学会学術総会・集会. 神戸国際会議場. 兵庫県神戸市. 2014/6/14
 3. 田中 章仁、加藤 規利、勝野 敬之、尾崎 武徳、加藤 佐和子、小杉 智規、佐藤 和一、坪井 直毅、丸山 彰一、稲熊 大城、松尾 清一. 透析導入時の血清マグネシウム値と背景因子の関連についての検討 ~AICOPP 研究より~ 第 59 回日本透析医学会学術総会・集会. 神戸国際会議場. 兵庫県神戸市. 2014/6/14
 4. 山口 真、安藤 昌彦、秋山 真一、加藤 佐和子、勝野 敬之、小杉 智規、佐藤 和一、坪井 直毅、安田 宜成、水野 正司、伊藤 恭彦、松尾 清一、丸山 彰一. 喫煙と特発性膜性腎症の腎予後との関連性について. 第 59 回日本透析医学会学術総会・集会. 神戸国際会議場. 兵庫県神戸市. 2014/6/14
 5. 田中 章仁、神谷 文隆、永原 靖子、鈴木 康弘、加藤 規利、勝野 敬之、尾崎 武徳、小杉 智規、佐藤 和一、坪井 直毅、水野 正司、丸山 彰一、伊藤 恭彦、松尾 清一. SLE に伴う Podocyte infolding の 1 例. 第 43 回日本腎臓学会西部学術大会. 松山. 2013/10/11
 6. 永原 靖子、鈴木 康弘、加藤 規利、勝野 敬之、尾崎 武徳、小杉 智規、佐藤 和一、坪井 直毅、水野 正司、丸山 彰一、伊藤 恭彦、松尾 清一. 視力障害で発症し多発性硬化症と診断した腹膜透析患者の一例. 第 43 回日本腎臓学会西部学術大会. 松山全日空ホテル. 愛媛県松山市 2013/10/11
 7. Takayuki Katsuno, Naotake Tsuboi, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama. Low Serum Cultured Adipose Tissue-derived Stromal Cells Ameliorate Acute Kidney Injury In Rats. Forefronts in Nephrology Florence. Florence. Italy. 2013/9/14
 8. 阿部 智子、尾崎 武徳、堀之内明日花、金 恒秀、古橋 和弘、秋山 真一、勝野 敬之、安田 香、坪井 直毅、松尾 清一、丸山 彰一. 低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞の創傷治癒促進効果についての検討. 第 34 回日本炎症再生医学会. 国立京都国際会館. 京都市左京区. 2013/7/3
 9. 武藤玲子、勝野 敬之、鈴木康弘、安田香、尾崎武徳、小杉智規、安田宜成、佐藤和一、坪井直毅、水野正司、伊藤恭彦、丸山彰一、松尾清一. Fabry 病による慢性腎不全で長期に安定した腹膜透析 (PD) 施行中の一例. 第 58 回日本透析医学会学術集会. 福岡国際会議場. 福岡市博多区. 2013/6/22
 10. 鈴木康弘、勝野 敬之、安田香、尾崎武徳、小杉智規、佐藤和一、坪井直毅、水野正司、丸山彰一、伊藤恭彦、松尾清一. 腹膜透析患者における C.E.R.A 投与の検討. 第 58 回日本透析医学会学術集会. 福岡国際会議場. 福岡市博多区. 2013/6/22
 11. 水野正司、鈴木康弘、勝野 敬之、尾崎武徳、佐藤和一、坪井直毅、丸山彰一. 腹膜透析 (PD) 導入時に、高度の好酸球性腹膜炎にステロイド治療が有効であった一例. 第 58 回日本透析医学会学術集会. 福岡国際会議場. 福岡市博多区. 2013/6/22
 12. Kazuhiro Furuhashi, Naotake Tsuboi, Asuka Shimizu, Yiqin Shi, Hangsoo Kim, Takayuki Katsuno, Yosuke Saka, Takenori Ozaki, Waichi Sato, Enyu Imai, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama Serum-starved adipose-derived stromal cells ameliorate rat crescentic glomerulonephritis by promoting immunoregulatory macrophages. Industry Wednesday Symposia. Boston. USA. 2013/6/12
 13. Tomoko Abe, Asuka Horinouchi, Hangsoo Kim, Kazuhiro Furuhashi, Shinichi Aiyama, Takayuki Katsuno, Kaoru Yasuda, Takinori Ozaki, Naotake Tsuboi, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama. LOW SERUM CULTURED ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS AMELIORATE RAT MODEL WITH UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION. The World Congress of Nephrology 2013. Hong Kong. 2013/6/1

14. Kazuhiro Furuhashi, Naotake Tsuboi, Asuka Shimizu, Hangsoo Kim, Takayuki Katsuno, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama. SERUM-STARVED ADIPOSE-DERIVED STROMAL CELLS AMELIORATE RENAL INJURY ASSOCIATED WITH RAT CRESCENTIC GLOMERULONEPHRITIS BY PROMOTING THE GENERATION OF IMMUNOREGULATORY MACROPHAGES. The World Congress of Nephrology 2013. Hong Kong. 2013/6/1
15. Hangsoo Kim, Masashi Mizuno, Kazuhiro Furuhashi, Takayuki Katsuno, Takenori Ozaki, Kaoru Yasuda, Naotake Tsuboi, Yasuhiko Ito, Shoichi Maruyama, Matsuo Seiichi. RAT ADIPOSE TISSUE-DERIVED STROMAL CELLS ATTENUATE PERITONEAL INJURIES IN RAT ZYMOSAN-INDUCED PERITONITIS ACCOMPANIED BY COMPLEMENT ACTIVATION. The World Congress of Nephrology 2013. Hong Kong. 2013/6/1
16. 阿部 智子、堀之内 明日花、金 恒秀、古橋 和弘、秋山 真一、勝野 敬之、安田 香、尾崎 武徳、坪井 直毅、松尾 清一、丸山 彰一。片側尿管結紮モデルラットに対する低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞の効果。第 56 回日本腎臓学会学術総会。東京国際フォーラム。東京都千代田区。2013/05/10
17. 金 恒秀、水野 正司、古橋 和弘、勝野 敬之、安田 香、尾崎 武徳、坪井 直毅、伊藤 恭彦、松尾 清一、丸山 彰一。Zymosan 投与により誘導される補体依存性腹膜炎モデルに対する脂肪由来間葉系幹細胞の有用性。第 56 回日本腎臓学会学術総会。東京国際フォーラム。東京都千代田区。2013/05/10
18. 古橋 和弘、坪井 直毅、清水 明日花、金 恒秀、勝野 敬之、安田 香、尾崎 武徳、佐藤 和一、松尾 清一、丸山 彰一。ラット anti-GBM 腎炎に対する脂肪由来間葉系幹細胞治療で誘導されるマクロファージフェノタイプの詳細検討。第 56 回日本腎臓学会学術総会。東京国際フォーラム。東京都千代田区。2013/05/10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝野 敬之 (Katsuno Takayuki)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：60642337