

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09280

研究課題名(和文) 進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた細胞移植治療の開発

研究課題名(英文) Development of the treatment using the cell transplantation of DFAT for the progressive renal failure

研究代表者

丸山 高史 (MARUYAMA, takashi)

日本大学・医学部・専修指導医

研究者番号：10459901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎障害の根治療法開発が切望される現在、本学で開発された、間葉系幹細胞と同等の多分化能を有する脱分化脂肪細胞(DFAT)を慢性腎障害モデルに細胞移植した。自己免疫疾患のANCA関連腎炎モデルマウスでは腎障害の改善が診られたが抗癌剤腎障害モデルラットでは改善が診られなかった。移植により抗炎症作用を持つTSG6が腎臓や肺に強発現しており、またTSG6発現をノックダウンしたDFATを移植した場合、改善効果がキャンセルされた。DFATの細胞移植は免疫調整作用により腎症を改善していると考えられた。自己免疫疾患による腎障害の疾患に臨床応用出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is wished a curative treatment of the chronic renal impairment is developed. DFAT with nature like mesenchymal stem cells was developed in Nippon University. We transported DAFT in a chronic renal impairment model through caudal vein. As a result, ANCA-related nephritis mice were improved, but were not improved in nephropathy rat models with the adriamycin. TSG-6 has anti-inflammatory action. In the former case, TSG6 significantly developed in lung and kidney. When we knocked down TSG6 expression, the effect was canceled. The mechanism of the renal failure improvement was regarded as immunoregulation effects. The DFAT cell transplantation was thought to be able to apply a clinic to autoimmune nephritis.

研究分野：慢性腎不全

キーワード：慢性腎障害 脱分化脂肪細胞(DFAT) 間葉系幹細胞 細胞移植

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在国内では約 32 万人を超える患者が末期腎不全にて透析医療を受けている。透析医療費は年間 1 兆 3,000 億円と全医療費の約 4 % を越え、腎不全は医療経済も大きく圧迫している。毎年、新規に 3 万 5 千人以上の患者が透析導入となるが、腎移植は年間 1,000 例前後であり、移植では末期腎不全に対応することは困難である。腎不全の原疾患である慢性糸球体腎炎、腎硬化症、糖尿病性腎症などの根本的治療は現在の医薬では出来ない。したがって腎再生を促す細胞治療に対する期待が高まっている。腎臓は糸球体上皮、メサンギウム、内皮細胞、尿細管上皮細胞、ボウマン嚢、尿管からなる複雑臓器であり、これまで ES 細胞、iPS 細胞や腎 side population (SP) 細胞を細胞源とする腎再生の研究が試みられているが、未だ臨床応用されるまでには至っていない。細胞移植に使用する再生医療の細胞源として、現在までに骨髄細胞による再生医療が多方面において試みられているが、骨髄採取に伴う侵襲性や、多様な細胞混入による安全性に問題が残っている。また幹細胞の体外増幅法も効率や経済性などに問題があり臨床応用されるまでには至っていない。

(2) 幹細胞移植は免疫性疾患に対し免疫調整作用を示し、間葉系幹細胞を骨髄移植前に投与しておくことで骨髄移植による拒絶反応 (GVHD) が抑制されることが知られており、欧州を中心に臨床の現場ですで行われている。また間葉系幹細胞は他の疾患にも用いられ閉塞性動脈硬化症や心筋梗塞、腹膜癒着などヒトへの臨床応用から基礎研究に至るまでその効果は広く報告されている。一方脱分化脂肪細胞 (DFAT) は日大で開発され、間葉系幹細胞と同等の多分化能を持つことが証明されている。日本大学生物資源科学部の加野浩一郎は皮下成熟脂肪細胞を培養、脱分化させ脱分化脂肪細胞 (DFAT) を得る技術を開発、特許化した (特願平 10-378013)。さらに我々はこの脱分化脂肪細胞 (DFAT) を骨、軟骨、筋、上皮および神経細胞などに分化転換させる技術の開発や間葉系幹細胞と同等の性質を有している事も解明してきた (J Cell Physiol, 215:210-222, 2008)。最近、移植細胞源として脂肪組織由来幹細胞 (ASC) が用いられているが、この細胞は全身麻酔下に脂肪吸引を行い、成熟脂肪細胞を除去したストローマ分画を付着培養し増殖させて得られる細胞群であり、雑多な細胞集団を付着培養するため、他細胞の混入が避けられないといった問題点がある。これに対して脱分化脂肪細胞 (DFAT) は、局所麻酔下に 1 g の脂肪組織を採取できれば調製可能であるため、採取に伴う侵襲や組織破壊が非常に少ない。重症心不全のような全身状態不良の患者からも採取・調製が可能である。また同細胞は癌化の問題も他の移植細胞源と比して少なく格段に安全性が高いとされている。以上より

脱分化脂肪細胞 (DFAT) は安全性や経済性、倫理上の問題からも他と比して優れており細胞移植の移植細胞源として期待されている。慢性腎臓病患者は国内で 1330 万人存在すると考えられており、つまり慢性腎臓病は国民 1/8 人の国民病であると言える。そのような現状の中、一部の患者のみに出来る治療技術よりも、経済的にも安全性や倫理の面から鑑みてもより多くの患者に使用できると考えられる、この脱分化脂肪細胞 (DFAT) は移植細胞源、つまり治療材料として非常に適していると言える。

### 2. 研究の目的

(1) 間葉系幹細胞と類似した性質をもつ脱分化脂肪細胞 (DFAT) を腎不全モデル動物に細胞移植することで腎障害が改善するかを主目的とした。

(2) モデル動物で移植の効果があつた場合に臨床応用することが可能か検討することを次の目的とした。そのため腎不全改善の機序を究明して腎不全の中でも対象疾患や安全性に対してさらに考察出来ることも目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Wistar ラットの皮下脂肪を 1 g 採取してコラゲナーゼで処理し、低速遠心で得られた均一成熟脂肪細胞を採取して、20% ウシ胎仔血清含有 DMEM を満たしたプラスチック天井側で培養する。Adipose-derived stromal cells (ASC) とは分画が異なる。脂肪細胞は 3 日以内に分裂を開始し、脱分化脂肪細胞 (DFAT) を産生する。脱分化脂肪細胞 (DFAT) のコロニーが形成される培養 7 日頃にプラスチックを反転し、通常の付着培養を行うことにより脱分化脂肪細胞 (DFAT) は急速に増殖して、その状態から 1 週間後に凍結保存した。

(2) 自己免疫性疾患であり、進行性腎障害が生じる単クローン抗体 1-22-3 誘発腎炎を Wistar ラットでモデル動物を作成した。具体的には 7 週齢 Wistar ラットの右の腎臓を摘出し、1 週間後に単クローン 1-22-3 抗体を 1mg/1 頭の割合で尾静脈より注射して作成した。単クローン 1-22-3 抗体誘発腎炎モデルに対して先に作成した脱分化脂肪細胞 (DFAT) を他家移植の形で腎動脈から直接腎臓に細胞移植する群と尾静脈から全身投与する群を作成して、移植 1 か月後に結果を検討した。移植細胞数としては  $1 \times 10^6$  個/頭を使用した。一方、免疫を障害の機序としない抗癌剤腎症を Wistar ラットにアドリアマイシンを投与して使用して腎障害モデルを作成、脱分化脂肪細胞 (DFAT) を同様に腎臓に直接移植する群、全身投与する群を作成して移植の効果を判定した。

(3) ヒトに実際に起こる疾患で予後不良の免疫原性疾患である ANCA 関連腎炎モデルマウスである SCG/ThpNkc マウスに DFAT を  $1 \times 10^5$  個/頭を静脈投与により細胞移植を行い、ヒトに近いモデルマウスでの効果を検討した。効果判定には血清 BUN、Cre、ANCA、尿蛋白定

量を測定した。組織においては糸球体障害指数 (GIS)、尿細管障害指数 (TIS) を各群においてスコア化して比較検討した。DFAT の作用機序の研究のため、血液検体で IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、TSG-6 濃度を ELISA 法で測定した。両腎のうち一方を -80 に凍結保存。もう一方をパラフィン包埋して後に HE 染色、PAS 染色、PAM 染色、マッソントリクローム染色を行った。また肺も摘出し -80 に凍結保存して、腎臓と共に real-time PCR 解析にて TSG-6、IL-1、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、PGE2 を測定した。また脾臓も摘出し -80 に凍結保存して腎臓と共に、FACS 解析にて Treg を、また western blot 法に TSG-6、IDO、IFN- $\gamma$ 、MCP-1、IL-6、IL-12TNF- $\alpha$ 、CCL17、IL-4、IL-10、mannose receptor を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 移植後 1 週間の時点で DFAT を全身投与した場合、DFAT は腎臓に到達せず肺に殆どトラップされ、他臓器には存在を確認できないが、腎動脈から移植した場合は殆どが腎臓の糸球体内に、一部尿細管に存在を確認、他臓器には確認できない結果であった。

(2) 尾静脈から DFAT を移植した場合、腎臓に脱分化脂肪細胞 (DFAT) が到達しないにもかかわらず移植による腎症改善の効果は 1-22-3 誘発腎炎モデルにおいて血液、尿、組織所見とも見られた。腎臓に直接投与する方法も効果が確認出来たが、全身投与の方がより大きい効果を認めた。一方アドリアマイシン腎症では脱分化脂肪細胞 (DFAT) の移植効果は血液、尿、組織共に明らかな効果は得られなかった。

(3) 1-22-3 誘発腎炎モデルにおいては腎臓や肺に於いて抗炎症作用があるとされる TSG-6 が real-time PCR 解析にて強発現していることが確認された。

(4) 追加実験として si-RNA 導入により TSG-6 の発現をノックダウンした脱分化脂肪細胞 (DFAT) を用いた場合、1-22-3 誘発腎炎モデルに脱分化脂肪細胞 (DFAT) を移植しても尿蛋白や組織所見から効果がキャンセルされていることが確認された。また脱分化脂肪細胞 (DFAT) と高血圧モデルである SHR ラットのメサングウム細胞を同一容器内で共培養細胞同士は直接先接着出来ないが化学物質はコンタクトできる環境とした結果、単独培養に比べて細胞培養液中の TSG-6 濃度は ELISA 法にて有意に上昇、メサングウム細胞に於いての脱分化脂肪細胞 (DFAT) の発現は real-time PCR 解析により増強している結果が得られた。また脱分化脂肪細胞 (DFAT) を正常ラットに静脈注射した場合、血清中の TSG-6 の濃度が生理食塩水を注射した場合よりも有意に上昇している結果が ELISA 法にて確認された。

(5) 以上は他家移植の結果であるが、脱分化脂肪細胞 (DFAT) の自家移植を全身投与により行った場合も同様の効果が 1-22-3 誘発腎炎では血液、尿、組織共に確認出来た。

(6) 1-22-3 誘発腎炎での脱分化脂肪細胞 (DFAT) 細胞移植は効果があり、免疫原性の抗癌剤腎症では効果が認められなかったことや上記の結果から脱分化脂肪細胞 (DFAT) の細胞移植は TSG-6 を中心とした免疫調整作用によるものと考えた。1-22-3 誘発腎炎はラット特有の疾患であるためヒトにも存在して予後不良の疾患である ANCA 関連腎炎モデルである SCG/ThpNkc マウスに脱分化脂肪細胞 (DFAT) の細胞移植を静脈投与で行ったが結果は移植により生存率の上昇、尿蛋白量と血清 ANCA 値の減少、血液中の免疫性制御因子 TSG-6 濃度の有意な上昇を認めた。また real-time PCR 解析にて CD44 の発現が腎臓に於いて抑制されている結果が得られた。また Treg や IDO の変化を予想したが有意な変化は見られなかった。

(7) 結論として脱分化脂肪細胞 (DFAT) 細胞移植はモデルマウスにおいて ANCA 関連腎炎を改善させ、その機序の一つに TSG-6 の発現亢進による免疫調整作用が考えられた。肺でトラップされた脱分化脂肪細胞 (DFAT) が肺との間にインターアクションを起こし、障害臓器である腎臓との間にケミカルな物質を通じて TSG-6 の発現が組織で増強、血清中にも上昇して免疫調整採用が発揮され、腎症が改善されたことが予想された。但し、免疫調整作用が TSG-6 の発現によるもの以外にも機序がある可能性があり、今回調査した Treg や IDO については移植による変化は無かったが再度の検討や別の機序の究明が必要であると考えられた。しかし今回結果としてヒトにも存在するモデルでその効果や機序の一端を証明したことは、臨床化に近づけたと考えられた。また CD44 は糖尿病の一因ともいわれており、今回この発現が抑制された結果から、DFAT 細胞移植は臨床において、維持透析導入の原因第一位の糖尿病性腎症にも効果がある可能性があると考えている。また以前我々の研究室で DFAT を培養すると HGF を有意に分泌することも確認しており、線維化抑制に寄与する可能性もある。以上より、将来的に慢性腎炎、糖尿病性腎症、腎硬化症にも効果がある可能性もあり、CKD の原疾患において幅広く臨床応用出来る可能性があり今後更なる検証が必要である。

#### <引用文献>

- Li Y, Wingert RA. Regenerative medicine for the kidney: stem cell prospects & challenges. Clin Trans Med. 2013;2:11.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001;7:211-28.
- Mitchell JB, McIntosh K, Zvonick S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human

adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. Stem Cells. 2006;24:376-85.  
Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, Kano K. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2004;321:967-74.

#### 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2件)

Maruyama T, Fukuda N, Matsumoto T, et al, Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene. 6. Stem Cell Research & Therapy, 2巻, 2016, 1-16 査読有

丸山 高史、松本 太郎、腎疾患に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療、臨床免疫・アレルギー科、65/6巻、2016、593-598 査読無

[学会発表](計5件)

第16回日本再生医療学会総会(仙台国際センター(仙台市青葉区青葉山無番地)、2017-03-07) 演者:丸山高史 演題名: 免疫性腎症に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植による改善効果

第39回日本高血圧学会総会(仙台国際センター(仙台市青葉区青葉山無番地)、2016-09-30) 演者:丸山高史 演題名: 脱分化脂肪細胞(DFAT)のTSG-6を介した免疫性腎症の改善

第59回日本腎臓学会(パシフィコ横浜(横浜市西区みなとみらい)、2016-06-18)

演者:丸山高史 演題名: 脱分化脂肪細胞(DFAT)のTSG-6を介した腎症改善効果

第15回日本再生医療学会総会(大阪国際会議場(大阪府大阪市北区中之島)、2016-03-17) 演者:丸山高史 演題名:

腎障害モデルに対するDFAT細胞移植の効果とTSG-6を介したその機序の考察

第58回日本腎臓学会学術総会(名古屋国際会議場(名古屋市熱田区熱田西町)、2015-06-05) 演者:丸山高史 演題名:

脱分化脂肪細胞(DFAT)の腎症改善効果の検討

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 高史(MARUYAMA, Takashi)

日本大学・医学部・専修指導医

研究者番号: 10459901

(2)研究分担者

福田 昇(FUKUDA, Noboru)

日本大学・総合科学研究所・教授

研究者番号: 40267050

松本 太郎(MATSUMOTO, Tarou)

日本大学・医学部・教授

研究者番号: 50366580