

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04824

研究課題名（和文）間葉系幹細胞の微小環境での炎症制御機構に着眼した次世代型免疫・炎症制御法の創成

研究課題名（英文）Development of next-generation immune and inflammatory control methods focusing on the mechanisms of inflammation regulation in the microenvironment of mesenchymal stem cells.

研究代表者

丸山 彰一（Maruyama, Shoichi）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10362253

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 33,100,000円

研究成果の概要（和文）：既存の免疫抑制薬は過剰免疫抑制による感染症などの副作用が問題となっている。間葉系幹細胞（MSC）は、障害部位の炎症強度に応じた自律的かつ局所での炎症制御が可能ことから、次世代の免疫制御療法として期待されている。我々は、MSCの免疫・炎症制御機序に関して、『障害部位に到達したMSC由来細胞外小胞（EVs）が炎症細胞から放出される炎症性物質と微小空間で会合した時にのみ免疫抑制物質が生成されて局所での抗炎症作用が出現する』という仮説をたて研究を行った。この課題にて、標的分子が炎症を瞬時に抗炎症物質に変換することで、炎症制御を行っていることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々は、炎症物質を瞬時に抗炎症物質へ変換することができる間葉系幹細胞の成分が、腎炎の炎症状態を抗炎症・臓器再生状態へ変換することで、腎障害の進行を抑制することを見出した。本課題での間葉系幹細胞による生体内炎症制御機構の解明により、免疫抑制を炎症が存在する局所のみで行うことが可能となり、既存の免疫抑制薬の過剰免疫抑制の問題点を解決することができる。本課題で解明した時間・空間的炎症制御機構を治療へ結びつけるため、本分子の効果的な炎症部位への輸送システムの開発へ発展させる。

研究成果の概要（英文）：Existing immunosuppressive drugs have been problematic due to side effects such as infections caused by excessive immunosuppression. Mesenchymal stem cells (MSCs) are expected to be a next-generation immunomodulatory therapy because of their ability to autonomously and locally regulate inflammation according to the intensity of inflammation at the site of injury. We hypothesized that MSCs would produce immunosuppressive substances and exert local anti-inflammatory effects only when MSC-derived extracellular vesicles (EVs) reach the site of injury. In this study, we found that target molecule regulates inflammation by immediately converting inflammation into anti-inflammatory substances.

研究分野：腎臓

キーワード：間葉系幹細胞 炎症 腎臓

1. 研究開始当初の背景

炎症は生体防御に必須な反応であるが、過剰な炎症は膠原病や腎炎などの疾患を引き起こす。こうした病態には免疫抑制治療が有効であるが、既存の薬剤は過剰免疫抑制による感染症などの副作用が問題となっている。間葉系幹細胞 (MSC) は、生体が本来持つ免疫制御機構を利用して自律的かつ時間・空間特異的に炎症制御を行うことでこの課題を克服することが期待されている。しかし、MSC 治療の作用機序には不明な点が多く、肺塞栓など副作用も懸念されている。さらに、高額な費用も課題である。

申請者らは、これまでに、臓器再生や免疫制御に優れた効果を示す低血清培養脂肪由来 MSC (特許取得済 PCT/JP2007/065431, PCT/JP2010/064682) を開発して、急速進行性糸球体腎炎など様々な疾患モデル動物での高い治療効果を確認した。難治性 IgA 腎症に対して MSC を用いた医師主導臨床治験 (治験番号 NCT04342325) を既に開始し、さらに動物実験だけでなく治験のヒトサンプルを通して作用機序の解明を精力的に進めている。同時に、MSC の作用機序を解明するためのバイオイメージング技術の独自開発にも取り組んでおり、以前報告した MSC の液性因子による治療効果 (JASN 2013) は、細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) によって伝達されることを見出している。

最近、物質 A の抗炎症作用が注目されている。治験にて、急性腎障害に対して物質 A は長期的な腎機能の改善が報告されたが、全身に作用するため副作用が見られたことが報告された。我々は、物質 A への変換分子 B は MSC に発現しており、MSC の腎保護作用に変換分子 B が不可欠であることを見出した。

変換分子 B は、炎症性物質を瞬時に抗炎症分子 A へ変換することができ、物質 A の半減期は短くその作用部位は産生された局所にとどまる。このことより、物質 A の産生量を規定するのは、炎症物質とその変換分子 B となる。よって、MSC を過剰投与しても全身の過剰免疫抑制とはならないと考えた。申請者らは、これら独自の研究成果を踏まえて『MSC が持つ炎症制御効果のキープレイヤーは MSC 由来細胞外小胞上の変換分子 B である』という仮説を立て「新概念：変換分子 B 物質 A 産生系が形成する炎症局所限定的な免疫・炎症制御機構」を提唱するに至った。本概念から全く新しい免疫・炎症制御治療法の開発が可能であると考えた。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞 (MSC) が有する炎症強度に応じた自律的かつ時間・空間特異的な炎症制御機構を、次世代型免疫・炎症制御治療の開発に結びつけることを目的とする。

3. 研究の方法

静脈投与 MSC および生体内 MSC の炎症制御機構を変換分子 B 物質 A 産生系が形成する炎症局所限定的な免疫・炎症制御機構に着目して解析を進め、次世代型炎症制御治療の開発を目指す。MSC の治療機構の解明やそのためのツール開発を、医学、分析科学、化学、工学などの異分野共同研究により実施しようとする点、さらに最先端の合成化学技術を用いて創薬基盤を創出しようとする点に独自性がある。

変換分子 B の生体内での炎症制御に関する検討

我々は、既に変換分子 B 欠損マウスでは野生型と比べて腎炎誘導後に腎機能がさらに悪化することを確認した。変換分子 B の有無により生じる、腎臓に浸潤する白血球およびアポトーシス細胞の細胞分画の変化を免疫組織染色・フローサイトメトリーを用いて解析する。これにより変換分子 B-物質 A の効果発現部位と細胞を同定する。

投与 MSC 変換分子 B による炎症制御

変換分子 B を阻害した MSC を投与し、治療効果に関して評価する。

投与 MSC 変換分子 B の体内動態

投与 MSC 変換分子 B の体内動態に関して、投与 MSC 由来変換分子 B は細胞によって運搬されるのか、EVs によって運搬されるのか、蛋白として循環するのか検討した。生体顕微鏡で MSC、MSC 由来 EVs を観察し、炎症部位である糸球体での動態を評価する。また、EVs が炎症物質を物質 A へ変換することができるか評価する。

生体が本来持つ物質 A を介した炎症制御機構は内在性 MSC の変換分子 B によって維持されるかを検討する。

内在性 MSC から変換分子 B を除去した遺伝子改変マウスを使用することで、生体が本来持つ物質 A を介した炎症制御機構は内在性 MSC の変換分子 B によって維持されるかを検討する。内在性 MSC として Meflin-CreERT2 マウスを使用し、変換分子 B の flox マウスはドイツの研究者より提供いただき、本研究を行った。

物質 A が時間・空間特異的に標的細胞に作用することを検討する。

腎炎に対する投与 MSC による一連の物質 A を介した炎症制御機構について、時間・空間を俯瞰した定性的かつ定量的な解析を行い、標的細胞の同定などを含めた炎症局所における炎症制御の実態解明に取り組む。MSC、EVs、変換分子 B および物質 A を介した一連の炎症制御の様相を明らかにする。

かにするために、変換分子 B 欠損型または野生型マウスに腎炎誘導後、変換分子 B 陽性/欠損 MSC 投与を行い、超高感度生体顕微鏡、イメージング MS、一細胞発現解析技術などを用いた最先端のイメージング解析やオミックス解析を行う。

新概念に基づいた次世代型免疫・炎症制御治療の開発

MSC を投与せずに、変換分子 B を炎症部位へ効率的に届ける投与キャリアーを開発する。

4. 研究成果

変換分子 B の生体内での炎症制御に関する検討

変換分子 B 欠損マウスでは野生型と比べて腎炎誘導後に腎機能がさらに悪化することを確認した(図1)。さらに変換分子 B 欠損マウスに腎炎を誘導すると、好中球、単球、マクロファージ分画に変化が認められたことから、物質 A の標的細胞は好中球、単球、マクロファージであることを同定した。

投与 MSC 変換分子 B による炎症制御

変換分子 B 阻害 MSC は、腎保護作用が减弱した(図2)。

投与 MSC 変換分子 B の体内動態

投与 MSC 変換分子 B の体内動態に関して、投与 MSC 由来変換分子 B は細胞によって運搬されるのか、EVs によって運搬されるのか検討した。細胞膜および核を染色後に、生体顕微鏡で MSC、MSC 由来 EVs を観察し、炎症部位である糸球体での動態を評価した。MSC そのものは腎臓に浸潤しておらず、循環血中を循環しており糸球体に一旦接着しても剥がれて再度血中を循環する形態であった。EVs は、腎臓に接着しているものもあり、MSC よりも多くの EVs が糸球体を循環していることが判明した。

また、EVs が炎症物質を物質 A へ変換することができることを確認した。

生体が本来持つ物質 A を介した炎症制御機構は内在性 MSC の変換分子 B によって維持されるかを検討する。

内在性 MSC から変換分子 B を除去した遺伝子改変マウスを使用することで、生体が本来持つ物質 A を介した炎症制御機構は内在性 MSC の変換分子 B によって維持されるかを検討した。内在性 MSC として Mef1in-CreERT2 マウスを使用し、変換分子 B の flox マウスはドイツの研究者より提供いただき、内在性 MSC の変換分子 B が腎臓の炎症制御機構に関わる結果を得た。しかし、結果にばらつきが生じたため、現在マウスの交配を増やし、タモキシフェンの投与タイミングを変更し再現性の確認を行っている。

物質 A が時間・空間特異的に標的細胞に作用することを検討する。

物質 A の腎臓での存在部位を探るため、WT マウスと変換分子 B 欠損マウスを用いて、イメージング質量分析を共同研究者に依頼し行った。物質 A は腎臓では、糸球体および皮髄境界に多く存在しており、細胞投与にて物質 A は炎症部位である糸球体および皮髄境界で増加することを見出した。一方で、変換分子 B 欠損マウスでは、腎臓での物質 A の存在はごく少量で、炎症環境下で変換分子 B 陽性の MSC を投与した際にのみ物質 A が検出された。このことから、腎臓での物質 A の産生には変換分子 B が必須であり、MSC 投与のみで物質 A 産生は十分であることを見出した(図3)。

新概念に基づいた次世代型免疫・炎症制御治療の開発

MSC を投与せずに、変換分子 B を炎症部位へ効率的に届ける投与キャリアーの開発は、検討を続けている。

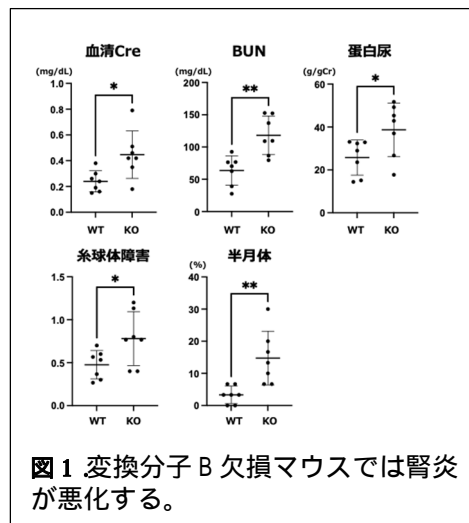


図1 変換分子 B 欠損マウスでは腎炎が悪化する。

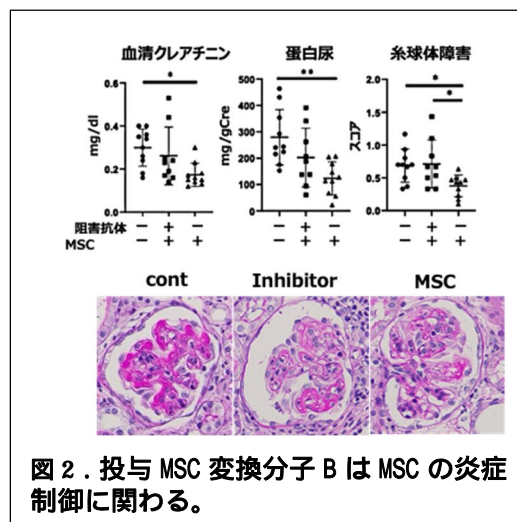


図2 投与 MSC 変換分子 B は MSC の炎症制御に関わる。

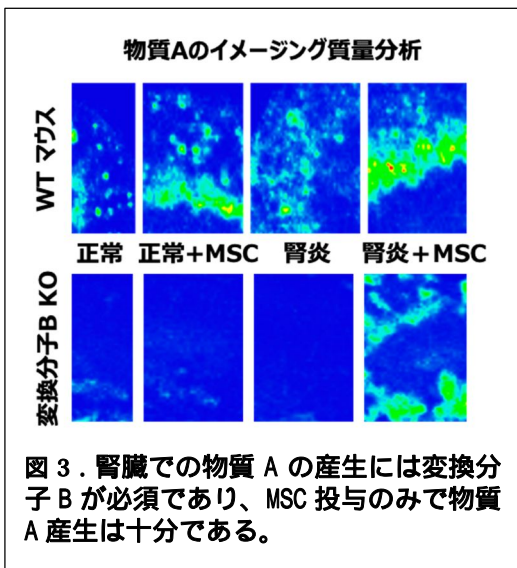


図3 腎臓での物質 A の産生には変換分子 B が必須であり、MSC 投与のみで物質 A 産生は十分である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuko Shimamura, Kazuhiro Furuhashi, Akihito Tanaka, Munetoshi Karasawa, Tomoya Nozaki, Shintaro Komatsu, Kenshi Watanabe, Asuka Shimizu, Shun Minatoguchi, Makoto Matsuyama, Yuriko Sawa, Naotake Tsuboi, Takuji Ishimoto, Hiroshi I Suzuki, Shoichi Maruyama	4. 巻 5
2. 論文標題 Mesenchymal stem cells exert renoprotection via extracellular vesicle-mediated modulation of M2 macrophages and spleen-kidney network	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications biology	6. 最初と最後の頁 753
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03712-2	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

1. 著者名 Tomonori Aoi, Akihito Tanaka, Kazuhiro Furuhashi, Makoto Ikeya, Asuka Shimizu, Yuko Arioka, Itaru Kushima, Norio Ozaki, Shoichi Maruyama	4. 巻 85
2. 論文標題 Mesenchymal stem/stromal cells generated from induced pluripotent stem cells are highly resistant to senescence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nagoya Journal of Medical Science	6. 最初と最後の頁 682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18999/nagjms.85.4.682	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 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 丸山彰一、島村湧子、田中章仁、古橋和拓
2. 発表標題 間葉系幹細胞の免疫抑制能を応用した難治性腎疾患治療
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古橋和拓、丸山彰一
2. 発表標題 生体内細胞動態からアプローチした 脂肪由来間葉系幹細胞の糸球体腎炎モデルに 対する治療機序の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuhiro Furuhashi, Shoichi Maruyama
2. 発表標題 MESENCHYMAL STEM CELLS EXERT RENOPROTECTION VIA EXTRACELLULAR VESICLE- MEDIATED MODULATION OF M2 MACROPHAGES AND SPLEEN- KIDNEY NETWORK
3. 学会等名 The International Society for Stem Cell Research (ISSCR) (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究分担者	石本 卓嗣 (Ishimoto Takuji) (00534835)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究分担者	平山 明由 (Hirayama Akiyoshi) (00572405)	慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・准教授 (32612)	
研究分担者	榎本 篤 (Enomoto Atsushi) (20432255)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	秋山 真一 (Akiyama Shinichi) (20500010)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師 (13901)	
研究分担者	田中 章仁 (Tanaka Akihito) (20846290)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	杉浦 悠毅 (Sugiura Yuki) (30590202)	京都大学・医学研究科・特定准教授 (14301)	
研究分担者	古橋 和拡 (Furuhashi Kazuhiro) (50835121)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	

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