

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590887

研究課題名（和文）

脂肪由来間葉系幹細胞を用いた免疫抑制療法の開発

研究課題名（英文） Development of a new immunosuppressive therapy using adipose derived mesenchymal stem cell

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：自己免疫疾患モデル動物(抗 GBM 抗体腎炎ラット、強皮症マウス)を用いて低血清脂肪由来 MSC の全身投与が治療に有効であることを明らかにした。低血清脂肪由来 MSC は M2 マクロファージを誘導することにより、治療効果を発揮する可能性を見出した。低血清脂肪由来 MSC は全身に投与しても悪性腫瘍を形成することなく、 7×10^7 /kg 個の投与は安全であることが確認された。

研究成果の概要（英文）：We clarified that administration of low serum cultured adipose derived mesenchymal stem cells (MSCs) showed therapeutic effect on animal models including rat anti-GBM glomerulonephritis and mouse systemic sclerosis. We demonstrated that low serum cultured adipose derived MSCs may exert immunosuppressive effect by inducing M2 macrophages. We also found that low serum cultured adipose derived MSCs did not promote malignant tumorigenesis and administration of 7×10^7 /kg cells was safe.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：脂肪由来間葉系幹細胞、低血清培養、抗糸球体基底膜抗体腎炎、強皮症、M2 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1)現在の自己免疫疾患治療の限界

現在、各種膠原病や糸球体腎炎に対してステロイドや免疫抑制剤を用いた治療が中心に行われている。ステロイドは長期に使用すると骨粗鬆症、脂質代謝異常、糖尿病、大腿骨頭壊死などの副作用が問題となり、長期に

大量には使用できない。また、免疫抑制剤もそれぞれ固有の副作用があり、使用が制限されることもしばしばある。ステロイドや免疫抑制剤ではコントロールできない自己免疫疾患に対する新たな治療オプションの開発が望まれている。

(2) 臓器移植の増加に向けての課題

今後臓器移植の増加にあたって、HLA不適合の夫婦間移植や再移植が増えることが予想され、抗体関連拒絶反応をいかに抑えるかが非常に重要な課題となっている。

(3) 脂肪由来幹細胞の免疫抑制療法への応用

近年、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)。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 (表1)。

我々は、ヒト皮下脂肪から分化能力と増殖

表1	脂肪組織	骨髓	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%	1%	0.01%
10 ⁷ 個調製するには	100g	50ml	20L

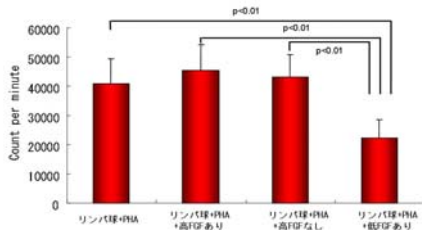
脂肪組織は再生医療の細胞ソースとして有望である。

能力の高い MSC 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 (特願 2004-201615, 国際公開第 2006/006692)。2%自己血清を含む培養液を用いて、1gの脂肪組織から2週間で10⁹個のMSCを得ることが可能である。

一方、骨髓由来 MSC は免疫抑制作用を有することが知られている。近年骨髓移植後の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 細胞に対する増殖抑制作用がある。我々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 (図1)。

従来再生促進作用による治療効果と考え

図1 リンパ球:MSC比は20:1におけるリンパ球増殖

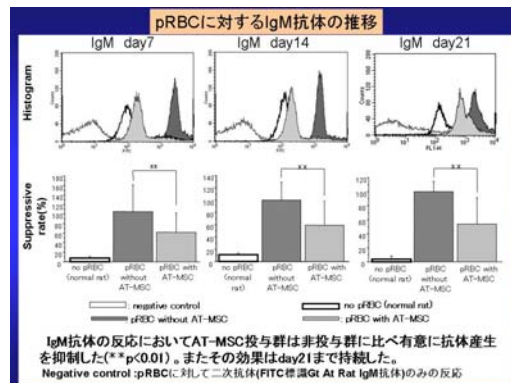
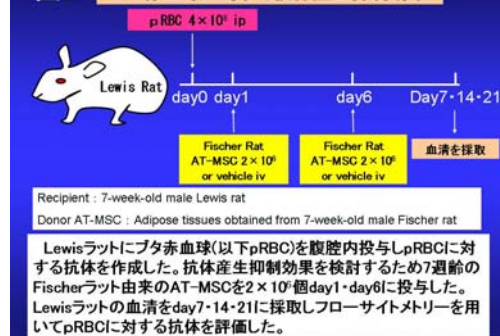


低血清培養法による脂肪由来間葉系細胞において有意にリンパ球増殖を抑制した。

られていたものが実は免疫抑制 (抗炎症) 作用によるものであった可能性があると考えている。

また、我々は低血清培養脂肪由来 MSC の T 細胞増殖抑制効果だけでなく、B 細胞系に対する効果についても検討を行った。その結果、低血清培養脂肪由来 MSC には B 細胞の抗体産生を抑制する効果があることを見出した (図2)。これらの結果から、低血清培養脂肪由来 MSC による細胞療法は自

図2 プタ赤血球に対する抗体産生抑制効果



己免疫疾患や臓器移植後の拒絶反応の治療法として非常に有望であると考えられる。

4) 同種細胞移植による免疫抑制治療の可能性

骨髓由来 MSC は ClassII 抗原を発現せず、HLA 非適合の同種移植でも拒絶されない。実際に HLA 非適合の骨髓由来 MSC がヒトのGVHDの治療に実用化されている。この事実は脂肪由来 MSC バンクを用いた新たな免疫抑制治療の実現の可能性を示唆する。脂肪由来 MSC を凍結保存する細胞バンクを設立す

ることで**自家細胞移植**を至適時期に繰り返して行うことが可能になるだけでなく、**他家細胞移植**による細胞医療が実現可能となる。

2. 研究の目的

(1) 低血清培養脂肪由来 MSC の免疫抑制効果の in vivo での確認

低血清培養脂肪由来 MSC の in vitro での強力な T 細胞増殖抑制効果についてはすでに確認ができています。現在 In vivo での免疫抑制効果について、自己免疫疾患モデル動物（強皮症モデル、抗 GBM 抗体腎炎モデル）を用いて確認中であるが、それを更に進める。

(2) 脂肪由来 MSC 治療の安全性の検討

骨髄由来 MSC はすでに臨床応用されており、安全性は確認されている。脂肪由来 MSC の安全性についても動物を用いて確認する。

(3) 同種細胞移における効果の解明

同種他家移植における脂肪由来 MSC の可能性と限界を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 低血清培養脂肪由来 MSC の免疫抑制効果について

① 自己免疫疾患モデル動物を用いての解析

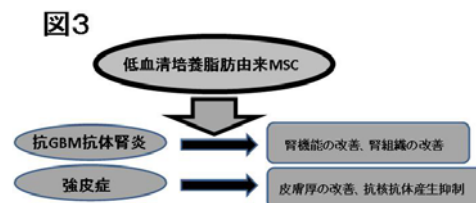
申請者らは脂肪由来 MSC と T リンパ球を共培養する系において、低血清培養脂肪由来 MSC には強力な T リンパ球増殖抑制作用があることを見出した（研究目的：図 1）。更に、**異種移植モデル**（ブタ赤血球→マウスモデル）に脂肪由来 MSC を投与し抗ブタ赤血球抗体を測定する系において、B リンパ球による抗体産生を抑制する作用があることも確認した（研究目的：図 2）。

本研究では、抗糸球体基底膜抗体腎炎（抗 GBM 抗体腎炎）モデルラットとブレオマイシン投与強皮症モデルマウスを用いて、低血

清培養脂肪由来 MSC の効果を確認する。（図 3）

② MSC の免疫抑制メカニズムの解明

申請者らは脂肪由来 MSC から分泌され



るサイトカインにより T リンパ球、B リンパ球、マクロファージなどの炎症惹起機能を抑制する機序を想定している。低血清培養脂肪由来 MSC は高血清培養脂肪由来 MSC より免疫抑制効果が強いことから、それぞれの細胞の培養上清をプロテインアレイを用いて網羅的に解析し、どのサイトカインが最も重要かを解明する。

(2) 脂肪由来 MSC 治療の安全性の検討

ラットの脂肪組織から MSC を採取し、静脈内投与して塞栓症、癌化、その他の細胞毒性について検討する。投与する細胞数を段階的に増量し、安全性について検討する。

(3) 実用化への基盤整備

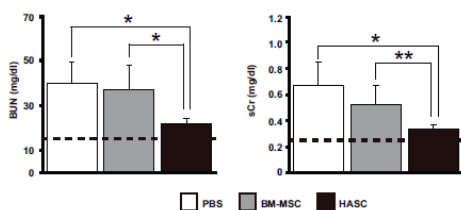
名古屋大学遺伝子再生・医療センターのセルプロセッシングセンターを用い GMP 基準で細胞調整する系を確立する。

4. 研究成果

(1) 低血清培養脂肪由来 MSC の免疫抑制効果について

① 自己免疫疾患モデル動物を用いての解析

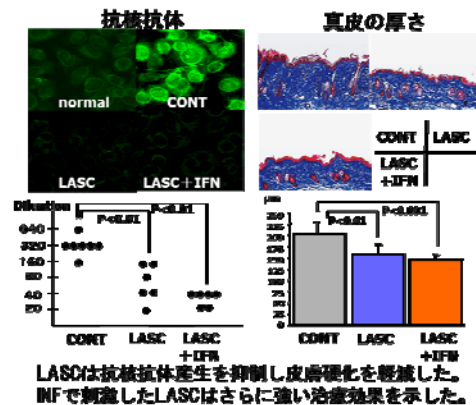
Wister-kyoto ラットに抗GBM抗体を投与することにより、抗GBM抗体腎炎を惹起し、低血清培養脂肪由来MSC、高血清培養脂肪由来MSC、コントロール(生食)を尾静脈より投与した。経時的にBUN、Cr、蛋白尿を測定し、治療効果を判定した。また、経時的に腎組織も採取し、半月体形成率や炎症細胞浸潤の程度などを検討した。その結果、低血清培養脂肪由来MSC投与群では、コントロール群や高血清培養脂肪由来MSC群に比べ、有意に腎機能や尿蛋白を改善した(下図)。



また、半月体形成率も低血清培養脂肪由来MSC投与群では他の2群に比べ有意に低かった。腎組織への炎症性細胞浸潤の検討では、低血清培養脂肪由来MSC投与群では他の2群に比べ、組織障害性のM1マクロファージの浸潤が少なく、抗炎症作用を持つM2マクロファージの浸潤が多いことが明らかとなった。尾静脈から投与したMSCは腎臓内にわずかしき見られなかったことから、MSCは腎構成細胞に分化するわけではなく、何らかの機序により免疫調整能を発揮して腎機能の改善に寄与している可能性が高いと考えられた。

次に、ブレオマイシンを複数回皮下注射することにより、強皮症モデルマウスを作成した。このモデルは抗核抗体が産生され、皮膚も厚くなり、強皮症のモデルとして確立されている。低血清培養脂肪由来MSCを尾静脈から投与することにより、抗核抗体の産生や皮膚の肥厚が改善するかどうかについて検討した。また、低血清培養脂肪由来MSCをあらかじめIFN- γ で前処理したものを投与し、治

療効果について検討した。結果としては、低血清培養脂肪由来MSC投与群ではコントロール群に比べ、有意に抗核抗体産生が抑えられ、皮膚硬化も改善することが明らかとなった。また、IFN- γ で刺激した低血清培養脂肪由来MSCは更に強い治療効果を示した(下図)。



LASCは抗核抗体産生を抑制し皮膚硬化を軽減した。IFNで刺激したLASCはさらに強い治療効果を示した。

②MSCの免疫抑制メカニズムの解明

低血清および高血清培養脂肪由来MSCの培養上清をプロテインアレイにて解析した。様々なサイトカインの差異について現在分析・検討中である。

(2) 脂肪由来MSC治療の安全性の検討

脂肪由来MSCの安全性を確認するために、ヌードラットにヒト脂肪由来MSCを投与し、6か月間の経過観察を行った後に主要臓器を摘出して腫瘍形成能について検討を行った。その結果、明らかな腫瘍の形成は認めず、安全性が確認された。

投与細胞数の致死量の検討では、 $7 \times 10^7/\text{kg}$ では100%の生存率を示すことは確認している。それ以上の細胞数の投与については検討中である。

(3) 実用化への基盤整備

実用化を目指して、細胞の培養方法の見直しを行い、GMP基準に準拠して細胞培養ができるプロトコールを作成している。

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7件)

全て査読有

1. Low serum cultured adipose tissue-derived stromal cells ameliorate acute kidney injury in rats. Ozaki T, Tsuboi N, Mizuno M, Matsuo S, Maruyama S. (他9名,2番目) Cell Transplant. 2012 in press.
2. Efficacy and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for supporting hematopoiesis. Nishiwaki S, Ozaki T, Maruyama S, Nishida T. (他7名,5番目) Int J Hematol. 96(3):295-300. 2012
3. Adipose-derived stromal cells cultured in a low-serum medium, but not bone marrow-derived stromal cells, impede xenobody production. Saka Y, Ozaki T, Sato W, Tsuboi N, Ito Y, Matsuo S, Kobayashi T, Maruyama S. (他5名,5番目) Xenotransplantation. 18(3):196-208. 2011
4. Circulating progenitor cell count for cardiovascular risk stratification: a pooled analysis. Maruyama S, Ozaki T, Nickenig G, Werner N. (他8名,3番目) PLoS One. 5(7):e11488. 2010

〔学会発表〕(計28件)

1. 金恒秀, Low Serum Cultured Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Rat Model with Zymosan Induced Severe Peritonitis, 45rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, San Diego, USA. 2012/11/3
2. 金恒秀, 腹膜擦過後のZymosan投与により誘導される補体依存腹膜炎モデルに対する低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞の有用性, 第57回日本透析医学会学術集会, 札幌, 2012/06/22
3. 金恒秀, LOW SERUM CULTURED ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS AMELIORATE RAT MODEL WITH ZYMOSAN INDUCED SEVERE PERITONITIS, International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, 横浜, 2012/6/13
4. 丸山彰一, POTENTIAL OF ADIPOSE-DERIVED STEM CELLS FROM HUMAN/RAT/MOUSE AS A NEW TOOL FOR THE TREATMENT OF SYSTEMIC SCLEROSIS, International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, 横浜, 2012/6/13
5. 古橋和拓, Low Serum Cultured Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Crescentic Glomerulonephritis

by Functional Polarization of Macrophages into Immunoregulatory M2 Phenotype, The Asia Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012(AP-VAS), 東京, 2012/3/29

6. 金恒秀, Low Serum Cultured Adipose Derived Stem Cells Ameliorate Zymosan Induced Severe Rat Peritonitis Model, 44rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, Philadelphia, PA, 2011/11/10
7. 古橋和拓, 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, 44rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, Philadelphia, PA, 2011/11/10
8. 古橋和拓, 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた壊死性半月体形成腎炎への新たな治療法の確立～骨髄由来間葉系細胞にはなく塩脂肪由来幹細胞がもつ Macrophage への unique character～, 第三回腎疾患と高血圧研究会, 大阪, 2011/6/27
9. 金恒秀, Zymosanによる高度炎症の腹膜炎モデルに対する低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞(LASC)の効果, 第54回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2011/6/17
10. 古橋和拓, 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた難治性腎疾患への新たな治療戦略, 第56回日本透析医学会, 横浜, 2011/6/17
11. 丸山彰一, 脂肪細胞由来幹細胞は腎臓をどう守るのか, 第54回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2011/6/15
12. 古橋和拓, 脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)を用いた難治性腎疾患・自己免疫疾患に対する新たな治療戦略, 再生医療学会, 東京, 2011/3/2
13. 古橋和拓, Therapeutic Potential of Adipose-Derived Stem Cells for Anti-GBM Glomerulonephritis, 43rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, Denver. co, 2010/11/20
14. 勝野敬之, Knock-Down of HGF and VEGF Production Reduces the Renoprotective Effects of Adipose-Derived Stromal Cells in the Acute Kidney Injury, 43rd Annual Meeting of The American Society of Nephrology, Denver. co, 2010/11/19
15. 丸山彰一, 低血清培養法による脂肪組織由来間葉系細胞を用いた骨粗鬆症モデルマウスに対する治療効果, 第31回日本炎症・再生学会, 東京, 2010/8/5
16. 丸山彰一, 脂肪由来間葉系細胞による移植抗原に対する抗体産生抑制効果, 第31回日本炎症・再生学会, 東京, 2010/8/5

17. 古橋和弘, Therapeutic potential of adipose-derived stem cells for anti-GBM glomerulonephritis, 7th International Conference on Innate Immunity, ギリシヤ, 2010/7/4
18. 勝野敬之, 低血清培養法による脂肪組織由来間葉系細胞の腎保護効果とそのメカニズム, 第 55 回日本透析医学会学術集会, 神戸, 2010/6/18
19. 古橋和弘, 脂肪由来間葉系幹細胞による Goodpasture disease モデルへの治療効果の検討, 第 55 回日本透析医学会学術集会, 神戸, 2010/6/17
20. 坂洋祐, 脂肪由来間葉系細胞による移植抗原に対する抗体産生の抑制効果, 第 55 回日本透析医学会学術集会, 神戸, 2010/6/17
21. 尾崎 武徳, 超音波造影剤を用いた腎血流と腎機能との関連の検討, 第 55 回日本透析医学会学術集会, 神戸, 2010/6/17
22. 勝野敬之, RENOPROTECTIVE EFFECTS AND MECHANISMS OF HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED STROMAL CELLS CULTURED IN LOW SERUM MEDIA ON ACUTE KIDNEY INJURY, APCN 2010, Korea, 2010/6/6
23. 古橋和弘, Adipose-derived stem cells therapy is effective in the treatment of anti-GBM glomerulonephritis, APCN 2010, Korea, 2010/6/6
24. 古橋和弘, Adipose-derived stem cells therapy is effective in the treatment of anti-GBM glomerulonephritis, ISN nexus, 京都, 2010/4/17
25. 勝野敬之, Renoprotective effects of human adipose tissue-derived stromal cells cultured in low serum media on acute kidney injury, ISN nexus, 京都, 2010/4/17
26. 坂洋祐, Adipose-derived mesenchymal stem cells suppress antibody production against graft antigens, ISN nexus, 京都, 2010/4/17
27. 勝野敬之, 低血清培養法による脂肪組

織由来間葉系細胞の急性腎障害抑制効果, 第 9 回日本再生医療学会, 広島, 2010/3/18

28. 古橋和弘, Goodpasture disease モデルに対して脂肪由来幹細胞を用いた治療効果の検討, 第 9 回日本再生医療学会, 広島, 2010/3/18

〔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幹細胞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、古橋和弘、坪井直毅

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2011-535314

取得年月日: 平成 24 年 2 月 17 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

(3) 連携研究者

小林 孝彰 (KOBAYASHI TAKAAKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号: 70314010