

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08255

研究課題名(和文) 免疫性腎炎に対する脱分化脂肪細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of DFAT cells therapy for the immunologic nephritis

研究代表者

丸山 高史 (MARUYAMA, Takashi)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：10459901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、ANCA腎炎モデルSCGマウスへの経静脈的DFAT移植では、病理像において半月体形成を含む糸球体傷害を抑制する効果を発揮し、その機序として腎臓でのTSG-6発現亢進による抗炎症作用と、単核球系でのM1マクロファージからM2マクロファージへの形質変換を介した全身性の免疫調整能が関与している可能性が考えられた。また移植後の腫瘍形成や過剰な拒絶反応も認められなかった。今回のモデル動物はヒトにも存在する疾患で予後不良でかつ根治療法が困難な「慢性腎臓病」の一因である。今回得られた結果は難治性の腎疾患に対して、DFATを用いた免疫抑制細胞療法の確立の可能性を示唆するものとする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性腎障害はその原因を取り除くことで腎臓は治癒する場合も少なくないが、慢性腎障害である場合は治療法が根治的なものは少なく、経時的に腎機能が悪化し透析導入をせざるを得ない場合もあり得る。そのため透析患者数が増え続けているのが現状であり、このような「慢性腎臓病」の根治的治療開発が望まれている。今回動物モデルで使用した疾患はこの「慢性腎臓病」の一因でもありかつ最も生命予後不良の疾患である。今回この病態改善の結果が得られたことで、予後不良の疾患に対して治療法が開発される可能性だけでなく透析導入を減らす礎になれば学術的価値だけでなく患者のQOL改善や医療費削減といった社会的意義も大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated ANCA nephritis in animal models. Anti-inflammatory action by TSG-6 and immunoregulation effects which was associated with Transformation from M1 macrophage to M2 macrophage were regarded as the mechanism to ameliorate nephritis. The tumorigenesis and the excessive rejection after the transplant were not found and the safety of this technique was confirmed, too. This animal models are diseases of the human, are causes of CKD, have a poor prognosis. Likelihood of the DFAT cell therapy was suggested for immunologic nephritis.

研究分野：慢性腎不全

キーワード：慢性腎臓病 免疫性腎炎 間葉系幹細胞 細胞治療 DFAT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本学生物資源科学部の加野らは皮下成熟脂肪細胞を脱分化させ DFAT を得る技術を開発、特許化した(特願平 10-378013)。これまで DFAT を再生医療の移植細胞源として骨、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。間葉系幹細胞は多分化能を示し、再生医療分野において細胞移植源として期待されている。

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、侵襲や組織破壊が非常に少なく、心不全や高齢患者からも採取・調製が可能である。進行性腎障害に罹患した場合、根治治療はなく透析療法を余儀なくされる事も少なくない。透析療法は週 3 回、1 日あたり 4 時間拘束され患者自身の QOL も格段に下がり、治療の中でも患者満足度の最も低い部類の治療法である。またそれに費やされる医療費も年間 1 兆円以上と高額である。また透析に至らなくても腎機能障害が慢性的に存在する慢性腎臓病の患者数は 1330 万人で国民 8 人に 1 人は腎障害が存在すると言われており、根治治療を目指した慢性腎不全への再生医療が期待されている。

2. 研究の目的

免疫性腎炎である慢性腎炎の治療はステロイド療法が主体であるが、繰り返し再発し、経過途中重篤な感染症を併発したり、長期ステロイド内服による骨粗鬆症や糖尿病、胃潰瘍といった副作用が診られたり、腎予後的に最終的には末期腎不全に陥る予後不良疾患である場合が珍しくなく、透析導入の原因疾患の一つでもある。我々は DFAT 細胞移植の進行性腎障害に対する作用を検討し、DFAT は間葉系幹細胞と同様に免疫抑制作用を介して、免疫性腎炎である慢性腎炎モデルの病態を改善する事を見出した⁽¹⁾。また平成 27 年～29 年度の科学研究費(15K09280)「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」にて免疫抑制作用に TSG-6 が関与している事を見出した。しかし、DFAT 移植による詳細な免疫抑制作用機序は不明であった。免疫性腎炎に対する DFAT 移植の臨床応用の可能性が考えたく、治療効果のメカニズムを明らかにする共に DFAT 投与細胞数、投与期間、投与回数などの細胞治療として DFAT 移植の最適治療条件を確立する。今回は免疫性腎炎の中でも最も予後不良な ANCA 腎炎をターゲットに、そのモデル動物である SCG/ThpNkc マウスを使用して実験することとした。

3. 研究の方法

(1) 実験に使用する SCG/ThpNkc マウスの繁殖

SCG/ThpNkc マウスは他のマウスと違い、生命力の弱いマウスである。発売元も大阪のメーカーであり輸送が必要であった。そのため同マウスを輸送後は体力低下でそのまま死亡することもまれでなく、実験で使用する場合は輸送後、良好な環境におきその後繁殖した次世代マウスを使用することが必要になった。また繁殖後も本マウスは約 8 週齢より糸球体腎炎および血管炎を発症するため、雌親の授乳が困難であるため、ddy マウスを同時期に同数交配し里親として使用した。5 週齢の SCG/ThpNkc マウスを一週間の順化期間後、繁殖し、実験用マウスを作出する。繁殖では 1 回の繁殖で約 5 頭の出産が予想されることから、実験に使用する 41 頭を得るためにはメス 9 頭の交配が必要となった。

(2) 7 週齢の SCG/ThpNkc マウスに ddy マウス由来 DFAT をそれぞれ 1×10^6 個/頭、 1×10^5 個/頭、 1×10^4 個/頭の割合で各 4 頭ずつ静脈より細胞移植を行った。更に移植後の体内分布を検討する為、PKH26GL でラベルした DFAT を 10^5 個/頭の割合で移植した。

(3) 細胞移植後 1 カ月飼育した。その間 1 週間おきに体重測定、畜尿を施行した。1 日尿蛋白量と定性試験にて潜血反応の経過を観察した。

(4) 移植 1 カ月後、ddy マウス由来 DFAT を移植した群では生化学的検査として血液中の BUN、Cre、ANCA、ANA、WBC、CRP、IL-1、6、8、TNF- α 、TSG-6 濃度を ELISA 法で測定した。腎臓と肺について Real-time PCR 解析、Western blot 法を用いて免疫制御分子として TSG-6・IDO を、Th1-type cytokine として IFN- γ ・TNF- α を、M1 マクロファージ関連サイトカインとして MCP-1・IL-6・IL-12 を M2 マクロファージ関連サイトカインとして CCL17・IL-4・IL-10・mannose receptor の発現の変化を観察した。これにより DFAT 細胞移植が免疫系のどの部位に作用するかを考察した。

さらに免疫毒性として代表的なのが移植片対宿主病(GVHD)である。この症状として代表的な皮膚病変(手のひらや足の裏、四肢や体幹の赤い斑点の有無、全身の皮膚の赤色化や水ぶくれ、脱落の有無)、消化器病変(食欲低下、嘔吐、下痢等)、肝臓病変(黄疸や意識障害)などが移植後の実験動物に診られないか注意深く観察した。以上の結果を踏まえて免疫性腎炎への DFAT 細胞移植療法について効果の有無や作用機序、免疫毒性を中心とした安全性について多角的に判断した。

4. 研究成果

(1) DFAT 投与後の体内分布の検討

PKH26 でラベルした 10^5 個の DFAT を ICR マウスの後眼窩静脈叢より投与後 1 時間の肺組織標本において陽性細胞を確認した。一方、心臓、肝臓、脾臓、腎臓では陽性細胞をほとんど確認せず、経静脈的に投与された DFAT の殆どは肺組織でトラップされていると考えられた。その後 1 週間、2 週間と徐々に肺での陽性細胞は観られなくなり、トラップされた DFAT 数の減少が示唆された。この間その他の臓器でも陽性細胞は検出されなかった。

(2) DFAT 投与後の効果の検討

尿蛋白量に対する作用

DFAT 投与前の 6 週齢では、SCG マウスでは腎炎群、DFAT 投与群共に尿蛋白量は 4.4 mg/day であり、群間に差を認めなかった。SCG マウスの腎炎発症週齢とされる 8 週齢を超えた 10 週齢においては、DFAT 投与群で 6.4 mg/day、腎炎群で 4.3 mg/day と DFAT 群の方が多かったが、有意差を認めなかった。12 週齢では両群共に 6.5 mg/day とほぼ同じとなった。腎炎非発症 ICR マウス群では、6 週齢と 10 週齢で腎炎群よりも多かったが、12 週齢ではほぼ同じであった。

組織傷害に対する作用

マウス 12 週齢の GIS では、腎炎群において、腎炎非発症 ICR マウス群よりも高値を示し ($P=0.013$)、SCG マウスが腎炎を起こしていると考えられた。腎炎群と DFAT 投与群の比較では、ともにメサンギウム領域の拡大を認め、GIS は DFAT 投与群で低下傾向であったが、有意差を認めなかった。しかし腎炎群の糸球体では細胞性半月体形成を認めたが、DFAT 投与群では半月体形成は抑制されていた。

TIS では腎炎群では腎炎非発症 ICR マウス群より有意な高値 ($P=0.018$) を示した。腎炎群と DFAT 投与群の比較では差を認めなかった。

SCG マウスにおいて組織学的に腎障害を認め、腎炎を発症していることを確認できた。一方、DFAT 投与は糸球体の障害を軽減したが、尿管障害には影響しなかった。

腎機能および MPO-ANCA 値に対する作用

腎炎群では、腎炎非発症 ICR マウス群と比較し、血清 MPO-ANCA 値 ($P=0.005$)、血清 BUN 値 ($P=0.042$)、血清 Cr 値 ($P=0.001$) は高値を示した。腎炎群と DFAT 投与群では差を認めなかった。SCG マウスの腎障害が ANCA 関連腎炎であることを確認できた。DFAT 投与は血中 MPO-ANCA 濃度に影響しなかった。

Real-time PCR 法による腎臓における各種 mRNA 発現の検討

腎臓での TSG-6 の mRNA 発現は、腎炎群と比較し、TSG-6、PGE2、IL-10 は DFAT 投与群で増加傾向であり、IL-1 はほぼ同じであった。CD44 と TNF- α は DFAT 投与群で低下傾向であった。DFAT 投与では TSG-6 mRNA 発現の有意な上昇 ($P=0.042$) を認めた。

Western blot 法による腎臓における各種蛋白発現の検討

TSG-6 蛋白量は、DFAT 投与群では腎炎群と比較して増加傾向であった。TNF- α 蛋白量は、DFAT 投与群では腎炎群と比較して減少傾向であった。また M1 マクロファージのケモカインである MCP-1 の蛋白量は、腎炎群と比較し、DFAT 投与群において有意な低下 ($P = 0.04$) を認めた。M2 マクロファージに発現するケモカインである CCL17 の蛋白量は、腎炎群と比較して DFAT 投与群で有意な増加 ($P = 0.04$) を認めた。

DFAT 移植後の腎臓での TSG-6 発現

TSG-6 の蛋白発現を免疫組織学的に観察した。糸球体においては、腎炎群と DFAT 投与群の両群で、同程度に染色された。尿管においては、DFAT 投与群において、近位尿管と遠位尿管の両方で腎炎群よりも強く染色されていた。

安全性の検討

今回の移植により DFAT はほぼ肺にトラップされることが確認されているがその後肺組織にて腫瘍組織を認めることはなく、また移植後 GVHD を思わせる皮膚病変 (手のひらや足の裏、四肢や体幹の赤い斑点の有無、全身の皮膚の赤色化や水ぶくれ、脱落の有無)、消化器病変 (食欲低下、嘔吐、下痢等)、肝臓病変 (黄疸や意識障害) は認められなかった。

<引用文献>

(1). Takashi Maruyama, Noboru Fukuda, Taro Matsumoto, Koichiro Kano, Morito Endo, Minako Kazama, Tomohiko Kazama, Jin Ikeda, Hiroyuki Matsuda, Takahiro Ueno, Masanori Abe, Kazuyoshi Okada, Masayoshi Soma, Koichi Matsumoto, Hiroshi Kawachi. 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 Res Ther.* 2015 Apr 16;6(1):80. doi: 10.1186/s13287-015-0069-2.

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takashi Maruyama, Hiroyuki Takashima, Masanori Abe	4. 巻 21(10)
2. 論文標題 Blood pressure targets and pharmacotherapy for hypertensive patients on hemodialysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Expert Opin Pharmacother .	6. 最初と最後の頁 1219-1240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14656566.2020.1746272.	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 -

1. 著者名 Takashi Maruyama, Noriaki Maruyama, Terumi Higuchi, Chinami Nagura, Hiroyuki Takashima, Maki Kitai, Kei Utsunomiya, Ritsukou Tei, Tetsuya Furukawa, Toshio Yamazaki, Erina Okawa, Hideyuki Ando, Fumito Kikuchi, Masanori Abe	4. 巻 73/ 2
2. 論文標題 Efficacy of L-carnitine supplementation for improving lean body mass and physical function in patients on hemodialysis: a randomized controlled trial.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European journal of clinical nutrition	6. 最初と最後の頁 293-301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41430-018-0348-y	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸山高史、清水諭、宇都宮慧、深澤みゆき、常見明子、遠藤守人、松本太郎、福田昇、阿部雅紀
2. 発表標題 脱分化脂肪細胞（DFAT）によるANCA関連腎炎への細胞移植治療の開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田 昇、丸山高史、宇都宮慧、阿部雅紀、加野浩一郎、松本太郎
2. 発表標題 免疫性腎炎に対する脱分化脂肪細胞(DFAT) 移植療法の開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇都宮 慧, 丸山 高史, 深澤 みゆき, 遠藤 守人, 松本 太郎, 福田 昇, 阿部 雅紀
2. 発表標題 ANCA関連腎炎に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植療法の開発
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇都宮 慧, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 遠藤守人, 松本太郎, 福田 昇, 阿部雅紀
2. 発表標題 ANCA関連腎炎に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)治療の開発
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇都宮慧, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 遠藤守人, 松本太郎, 福田昇, 阿部雅紀
2. 発表標題 ANCA関連腎炎に対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 治療の開発
3. 学会等名 第10回腎不全研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇都宮慧, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 遠藤守人, 松本太郎, 福田昇, 阿部雅紀
2. 発表標題 ANCA関連腎炎に対する脱分化脂肪細胞(DFAT)治療の開発
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇都宮慧、丸山高史、深澤みゆき、常見明子、遠藤守人、松本太郎、福田昇、阿部雅紀
2. 発表標題 免疫異常に起因する進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の開発
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会学術総会
4. 発表年 2018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	逸見 聖一朗 (HEMMI Seiichiro) (10817240)	日本大学・医学部・助教 (32665)	

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
---------	---------