

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08722

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞治療における現在の問題点を解決する新たな細胞治療用カラムの開発

研究課題名(英文) Development of new cell therapy columns to solve current problems in mesenchymal stem cell therapy

研究代表者

古橋 和弘 (Furuhashi, Kazuhiro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：50835121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)の臨床応用において、MSCを静脈投与した際の重篤な副作用として肺塞栓がある。本研究ではこの問題点を解決するために、細胞を直接体内に投与せず、MSCから分泌される液性因子のみを体内に投与できるMSC治療用中空系膜カラム(MSCカラム)の開発を目指し研究を進めている。我々は、カラム内中空系膜外に充填したMSCに最適な素材を選び出し、無菌的な閉鎖系培養システムを作製した。さらに、この作製したMSCカラムを使用することで、細胞は多くの成長因子を分泌するようになり、細胞を直接体内に投与せずに、治療が可能であることをラット腎炎モデルで確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞(MSC)の安全な臨床応用を目指して、多くの研究者が副作用を減らすために、新たな培養法の開発を試み、自殺誘導遺伝子を細胞に組み込み、幹細胞の性格を調整することに力を注いできた。しかし、私たちはこの問題に対して全く別のアプローチをとる。私たちが考案したのは、再生医学と医療工学の融合による、MSCカラムの開発である。本研究で開発するMSC治療用中空系膜カラムは、より安全でより効果の高いMSC治療を、より安くより多くの人に供給しうる新たな細胞治療装置として再生医療に新たなフィールドを形成する。

研究成果の概要(英文)：In the clinical application of mesenchymal stem cells (MSCs), pulmonary embolism is a serious side effect when MSCs are administered intravenously. To solve this problem, we are developing an MSC therapeutic hollow fiber membrane column (MSC column) in which only liquid factors secreted from MSCs are administered into the body without directly injecting cells into the body. We have selected the optimal material for MSCs packed outside the hollow fiber membrane in the column. Furthermore, the cells in the created MSC columns were able to secrete many growth factors, leading to the MSC columns ameliorating the rat nephritis model.

研究分野：腎臓

キーワード：間葉系幹細胞 腎臓

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(MSC)を用いた臨床試験はこの数年で著しく増加し、世界中で 700 件を超えている。MSC の採取臓器は約 50%が骨髄であり、20%が臍帯血、10%が脂肪である。私たちは、骨髄に比べ幹細胞率が高く、採取が容易である脂肪に着目し、世界に先駆けて脂肪から臓器再生促進因子・免疫制御因子の産生に優れた低血清培養脂肪由来MSC(LASC)の培養法を開発した(図 1)(PCT/JP2007/065431、PCT/JP2010/064682)。そして、急速進行性糸球体腎炎をはじめ様々な動物モデルで治療効果を確認し(図 2)、その治療効果が LASC から分泌される液性因子(成長因子・免疫制御因子)によることを報告した(図 3) (研究代表者 JASN、2013)。細胞を直接静脈内に投与することなく、この液性因子を効率よく生体内に投与できれば、現在臨床応用で問題となっている肺塞栓の副作用をなくすることが可能となる。一方でニプロ株式会社はすでに、中空糸膜カラムと尿細管細胞を組み合わせた細胞治療用中空糸膜カラムの開発に成功している。本研究では、ニプロの持つ細胞治療用中空糸膜カラムの技術と私たちが持つ LASC の培養技術を融合することで、MSC カラムを開発し、短期間で臨床応用につなげる。

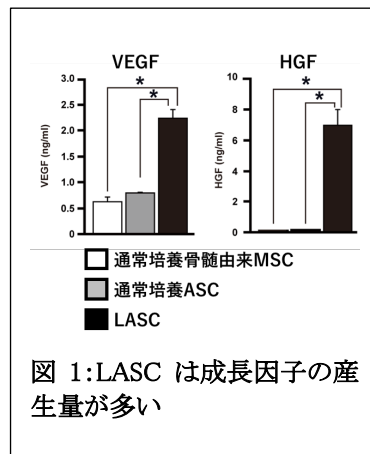


図 1:LASC は成長因子の産生量が多い

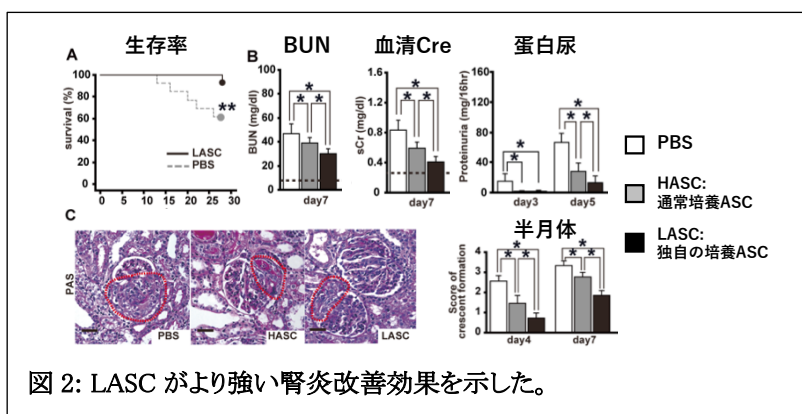


図 2: LASC がより強い腎炎改善効果を示した。

2. 研究の目的

本研究では、LASC がもつ優れた成長因子・免疫制御因子の産生能力に着目し、細胞を直接体内に投与せず、これらの液性因子を体内に投与できる治療法として MSC 治療用中空糸膜カラム(MSC カラム)を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

MSC の安全な臨床応用を目指して、多くの研究者が副作用を減らすために、新たな培養法の開発を試み、自殺誘導遺伝子を細胞に組み込み、幹細胞の性格を調整することに力を注いできた。しかし、私たちはこの問題に対して全く別のアプローチをとる。私たちが考案したのは、再生医学と医療工学の融合による、MSC カラムの開発である。具体的には、中空糸膜の外側に LASC を充填したカラムに血液を循環させる。中空糸膜の内側を通過した血液は中空糸膜を介して LASC と物質のやり取りを行うこととなる。中空糸膜が壁となり、LASC は生体内に直接入ることがないため、細胞による肺塞栓のリスク・癌化リスクはゼロである。再生医療技術と医療工学技術を融合した間葉系幹細胞カラムを開発し、カラムの有効性を様々な腎障害動物モデルで検証する。さらに、カラム培養することで生じる LASC の機能変化を解析し、治療効果との関係を検討する。

(1)間葉系幹細胞カラム開発がもたらす新規医療

①間葉系幹細胞カラムの開発

In vivo で使用する中空糸膜を介した間葉系幹細胞カラムの開発には、すでに尿細管細胞カラムの開発に成功し、カラム作製に経験豊かなニプロ株式会社と名古屋大学腎臓内科の共同開発で行う。通常の培養では、中空糸膜へ MSC は接着しないことから、中空糸膜へ細胞を接着させる中空糸膜の素材や条件を検討する。

②間葉系幹細胞カラムの有用性を検証する腎疾患モデル

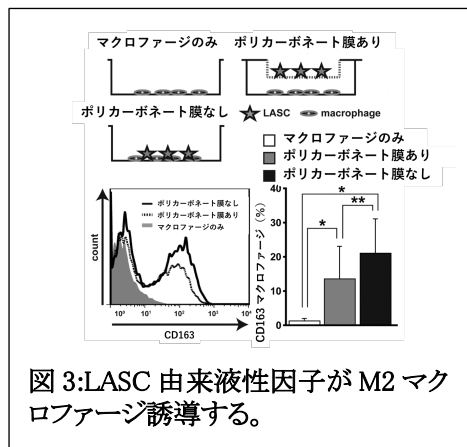


図 3:LASC 由来液性因子が M2 マクロファージ誘導する。

血液を循環させる。中空糸膜の外側に LASC を充填したカラムに血液を循環させる。中空糸膜の内側を通過した血液は中空糸膜を介して LASC と物質のやり取りを行うこととなる。中空糸膜が壁となり、LASC は生体内に直接入ることがないため、細胞による肺塞栓のリスク・癌化リスクはゼロである。

臨床において、敗血症症候群に代表される全身性炎症反応症候群に急性腎障害が合併した患者の死亡率は60% (JAMA 2005) と非常に高く、現在の血液浄化療法をさらに発展させた治療法の開発が必要である。そこで急性腎障害モデルとして、より臨床に近い急性尿細管障害モデル・急速進行性腎炎モデルを使用して、間葉系幹細胞カラムの治療効果を検証する。急性尿細管障害モデル・急速進行性腎炎モデルでは、すでに LASC を投与することで優れた治療効果が確認されており、間葉系幹細胞カラムの有用性を検証するのに適している (研究代表者 JASN 2013, Cell Transplantation 2013)。

(2) 間葉系幹細胞カラムによる新規培養システム

生体内において、MSC は血管周囲に存在し、流体力学的な負荷をうけている。しかし、循環システムを有するカラム内で MSC を培養することで、LASC に流体力学的な負荷が与えられる。流体力学的な負荷を LASC にどのような変化を生じるかを検討し、新たな細胞の培養法へと発展させる。この評価項目は以下である。LASC の自己複製能、HGF/VEGF/PGE2 といった成長因子・免疫制御因子の発現に関して評価する。

4. 研究成果

各研究計画に基づいて研究を行い、以下の結果を得た。

(1) 間葉系幹細胞カラム開発がもたらす新規医療

① 間葉系幹細胞カラムの開発

中空糸膜への MSC の接着性は通常の状態では非常に低く、中空糸膜へ細胞を接着させる膜の素材および膜形状の選定をまず行った。膜の親水性処理を加えることで接着性が向上し、さらに中空糸膜形状および細胞播種法に工夫を加えることで、現在では細胞を中空糸膜へ多層性に培養することが可能となった (図4 特願2022-054023)。次に、カラム内中空糸膜内で培養するための閉鎖系培養システムの開発を目指し、無菌的な閉鎖系培養システムを作製した。この開発した閉鎖系培養システムを併用することで、LASC をカラム内中空糸膜上でより安定して培養することが可能となり、MSC カラムを安定して作製することに成功した。

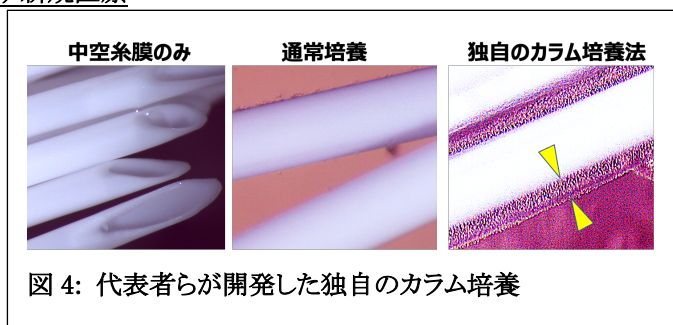


図4: 代表者らが開発した独自のカラム培養

② 間葉系幹細胞カラムの有用性を検証する腎疾患モデル

開発した間葉系幹細胞カラムを使用するには、動物において体外循環を行う必要があった。体外循環法の開発当初は、ラットにおいて尻静脈に2本カテーテルを挿入して行っていたが、この状況では30分の体外循環が限界であった。そこで、中心静脈へ長期留置カテーテルを留置し、頻回に穿刺可能な中心静脈ポートを皮下に留置するラットブラッドアクセス法を開発した。これにより、週3回・1回5時間の体外循環を安定して行えるようになった。現在、急性尿細管障害モデル・急速進行性腎炎モデルで MSC カラムの治療効果の検討を開始し、その治療効果を確認した (図5)。現在、複数の膜形状の MSC カラムで治療効果の比較検討を行っている。さらに、大動物での治療実験を目指して、ミニブタでの急性腎障害モデルの作成を開始している。

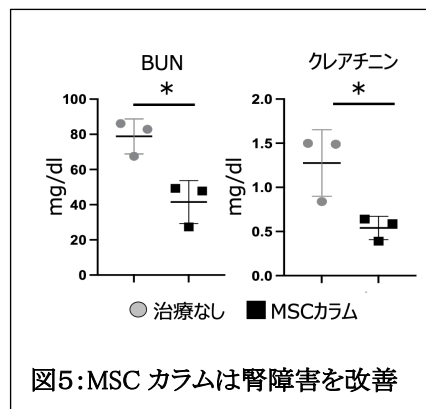


図5: MSC カラムは腎障害を改善

(2) 間葉系幹細胞カラムによる新規培養システム

循環システムを有するカラム内で MSC を培養することで、LASC にどのような変化を生じるかを検討した。カラム内で培養した MSC は、成長因子である HGF、VEGF の産性能が増強し、炎症性のサイトカインである IL-6 は減少した (図6)。さらに細胞表面の免疫調整因子である PD-1、PDL1 はカラム培養により増強した (図7)。

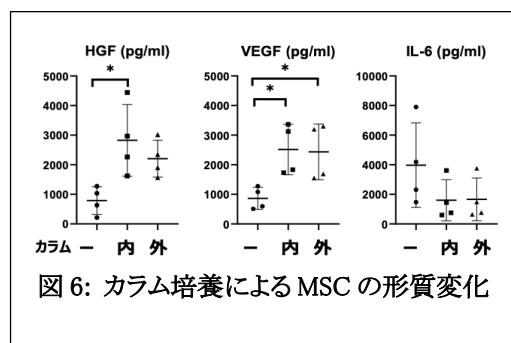


図6: カラム培養による MSC の形質変化

<今後の展望>

カラム内で MSC を培養する技術の開発に成功し、

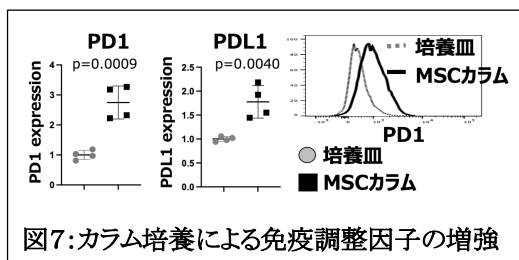


図7: カラム培養による免疫調整因子の増強

カラム内で安定して MSC を培養可能となった。さらに、カラム内の MSC は免疫制御因子発現を増強し、成長因子産生を増強した。この結果として、MSC カラムは腎障害モデルにおいて腎機能を改善させた。今後、最良の中空糸膜の選定を行い、最良の MSC カラムを決定する。その MSC カラムを使用し、大動物腎障害モデルでの有効性・安全性の検討へと進む。

本研究で開発する ASC 治療用中空糸膜カラムは、より安全でより効果の高い MSC 治療を、より安くより多くの人に供給しうる新たな細胞治療装置として再生医療に新たなフィールドを形成する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 島村 湧子, 古橋 和拓, 唐澤 宗稔, 野寄 智也, 渡邊 絢史, 堀之内明日花, 田中 章仁, 神村 豊, 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 (ASC) の急速進行性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41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古橋 和拓
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 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古橋 和拓
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

1. 発表者名 古橋 和拓
2. 発表標題 脂肪間葉系幹細胞を用いた腎炎治療の可能性 -治療特性とその作用機序-
3. 学会等名 再生医療学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 間葉系幹細胞の培養方法	発明者 古橋 和拡	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-054023	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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・准教授 (33920)	
研究分担者	前田 佳哉輔 (Maeda Kayaho) (00836306)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (13901)	
研究分担者	丸山 彰一 (Maruyama Shoichi) (10362253)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	勝野 敬之 (Katsuno Takayuki) (60642337)	愛知医科大学・医学部・准教授 (33920)	

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