

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590239

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞療法による糖尿病合併症の新規治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutics with bone marrow derived mesenchymal stem cells for diabetes complications

研究代表者

永石 歓和 (NAGASHI, KANNA)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：30544118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の主な死因は腎不全や脳心血管障害、肝障害などの主要臓器合併症である。骨髄間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell, MSC)は、免疫調節能や組織修復能を発揮する体性幹細胞で、細胞療法のソースとして注目される。本研究では、糖尿病合併症に対する新規根治的治療法として、MSCを用いた細胞治療の有効性について検討した。糖尿病モデル動物に対するMSC治療は、肝腎機能の増悪を抑制し、組織に集積する炎症細胞や肝脂肪の沈着を減少させ、組織の修復効果を示した。これらの有効性は主にMSCによって分泌される液性因子によることも判明した。糖尿病の臓器合併症に対するMSC治療の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The main cause of death in diabetes is severe complications in main organs such as cardiovascular systems, brain, kidney and liver. Bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) are known to exert immune-regulatory functions and tissue regenerations, and are focused as the source of cell-based therapies. In this study, we investigated the therapeutic effects of MSCs on diabetic complications. MSCs were administered to diabetic mice. MSC-conditioned medium (MSC-CM) was also administered to examine the trophic effects of MSCs on organ damages. The curative effects of the MSC and MSC-CM therapies were similar as both ameliorated liver and renal functions, suppressed the excessive expression of proinflammatory cytokines in parenchymal cells and prevented excessive lipid accumulation in hepatocytes. These effects are likely due to various paracrine effects via trophic factors secreted by MSCs. MSC therapy is a powerful tool for repairing diabetic organ damages.

研究分野：再生医療、糖尿病、炎症性腸疾患

キーワード：糖尿病合併症 骨髄間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

糖尿病人口の増加は世界的な現象であり、その主な死因は腎不全や心血管障害、脳血管障害、肝障害などの主要臓器合併症である。合併症に対する治療戦略は、ライフサイエンス的にも医療経済的にも最重要課題である。これまで、糖尿病における臓器障害は、「糖毒性」による代謝障害と考えられ、治療法として糖代謝改善薬の開発とインスリンの適正補充に主眼がおかれてきた。しかし、糖尿病性血管障害や腎不全による死亡率は近年増加の一途であり、臓器障害のメカニズム解明に立脚した新規治療法開発の必要性に迫られている。

研究分担者の藤宮らは、高血糖が引き金となって骨髄幹細胞に異常が生じ、これらの細胞が肝臓や後根神経節の細胞と細胞融合することで、相手の細胞をアポトーシスに導き、臓器障害を引き起こすことを示した。そこで、糖尿病における異常な骨髄幹細胞の各種合併症の病態への寄与を明らかにする必要性が示唆された。

一方、骨髄間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells, 以下 MSC)は、多様な細胞に分化転換して組織修復再生に働くほか、免疫担当細胞を制御し抗炎症作用を有する体性幹細胞で、低免疫原性で組織障害部に集積する特性を有する。根治的な組織修復・再生を目指す上で理想的な細胞療法のソースとして、多くの疾患において注目されている。

2. 研究の目的

糖尿病で起こる多臓器合併症を骨髄幹細胞の異常と捉え、各臓器に起こる現象を一元的に説明し、糖尿病における臓器障害の程度と骨髄由来細胞の関係を明らかにする。

また、糖尿病における骨髄幹細胞の異常性を、MSC と骨髄造血系幹細胞(Hematopoietic stem cells, 以下 HSC)の各々について明らかにする。

さらに、糖尿病の臓器合併症に対する MSC による細胞療法の有効性とそのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)糖尿病における臓器障害の程度と骨髄由来細胞の関係の解析；

GFP トランスジェニックマウス(CAG-GFP)の骨髄細胞を、致死放射線照射後の野生型マウスに移植し、GFP 骨髄キメラマウスを作成した。このマウスに、ストレプトゾトシン(STZ)150mg/kg 腹腔内投与(STZ モデル)あるいは High Fat Diet 給餌(HFD モデル)により糖尿病モデルマウスを作成した。各々のモデルにおいて、血糖値、体重、肝機能、腎機能について経時的変化を追跡した。さらに、各臓器における組織学的所見、GFP 陽性骨髄由来細胞(以下 GFP 陽性細胞)の発現頻度、およびサイトカイン等各因子の発現について解析した。

(2)糖尿病における骨髄幹細胞異常の解析；糖尿病モデルマウスおよびコントロールマウスの骨髄細胞を用いて、骨髄幹細胞とくに MSC の異常性を解析した。MSC (PDGFR α ⁺ Sca-1⁺CD45⁻Ter119⁻)を FACS にて単離し、ケモカインとその受容体、HSC の相互作用に寄与する因子の発現変化を解析した。また、肝組織に遊走した骨髄由来 GFP 陽性細胞の形質を解析した。

(3)糖尿病モデルマウスに対する MSC を用いた細胞療法の有効性とそのメカニズム解析；糖尿病モデルマウスに、GFP 標識した MSC を投与し、各臓器における MSC の局在・生着率を検討した。MSC による治療効果について、生化学的検査および形態学的解析から評価した。また、GFP キメラマウスを用いて、MSC 治療による骨髄由来細胞の動態解析を行った。さらに、MSC 治療のメカニズム解析として、MSC の培養上清の投与による治療効果を評価した。

4. 研究成果

(1)糖尿病における臓器障害と骨髄由来細胞の関係；

STZ モデルおよび HFD モデルにおいて、体重、血糖値の変化、および肝・腎機能を血液尿生化学検査にて評価したところ、STZ モデルでは疾患群で血糖値 400mg/dL 以上の高血糖の持続と著明な体重減少を認めた。HFD モデルでは HFD 摂食開始から 5 ヶ月後に、疾患群で空腹時血糖値 200mg/dL 以上の高血糖と、週齢一致コントロールマウスの約 1.5 倍の体重増加(肥満)を認めた。肝機能は、両モデルともに疾患群で著明な異常を認め、腎機能障害も経時的に進行した。

疾患群の肝臓および腎臓の組織では、GFP で標識された内在性の骨髄由来細胞(Bone marrow derived cells, BMDCs)の著明な集積を認めた。疾患群の肝組織に集積した BMDCs は、免疫組織学的検索および mRNA の発現解析から M1 マクロファージ形質を発現した。STZ モデルでは、肝円索構造の障害を認め、HFD では著明な大型の脂肪滴の沈着を伴う肝細胞の脂肪変性を認めた。肝実質細胞における TNF α , MCP-1, Toll like receptor 4 の発現上昇を認め、類洞内皮細胞の ICAM-1 の発現も亢進していた。

(2)糖尿病における骨髄幹細胞異常の解析；糖尿病モデル、特に STZ モデルにおいては、骨髄から単離される PDGFR α ⁺ MSC の数が減少しており、マイクロアレイによる網羅的解析において STZ モデルの MSC において発現が上昇する 2 因子、および発現が低下する複数の因子を検出した。

骨髄造血幹細胞については、STZ および HFD モデルにおける骨髄細胞から Lineage 分画を採取し、さらに CD117(c-kit)⁺ Sca-1⁺分画から CD34 および CD135(Flt3)を指標に分化段階別に分取した。STZ モデルにおいては、未分化度の高い long-term re-constituting

HSC(LT-HSC)の数が減少しており、網羅的解析において STZ モデルにおいて特に発現が低下する複数の因子を検出した。HSC の解析は、これを支持するニッチ細胞の解析とともに研究分担者の安宅らが施行し報告した (Chiba H, Ataka K, *et al.* Am J Physiol Cell Physiol.2013)。

(3)糖尿病モデルマウスに対する MSC を用いた細胞療法の有効性とそのメカニズム解析；移植した MSC の局在・生着率の検討；STZ あるいは HFD で誘導した高血糖マウスに、CAG-GFP 動物から単離培養した MSC を経静脈的に投与し、GFP を標識として骨髄および末梢臓器における MSC の局在・生着率を検討したところ、投与7日目において肝臓、腎臓、骨髄に各々約1%程度の GFP 陽性細胞(MSC)が検出された。

MSC による治療効果の検討；GFP 骨髄キメラマウスを STZ あるいは HFD で高血糖状態にしたのち、骨髄から単離培養した MSC を経静脈的に投与したところ、治療群では、STZ, HFD モデルともに AST/ALT の上昇が抑制された(図 1A, 2A)。STZ モデルでは間質に集積する炎症細胞浸潤が抑制され(図 3)、HFD モデルでは肝細胞に沈着する脂肪滴の小型化し、脂肪肝やインスリン抵抗性が改善した(図 4)。

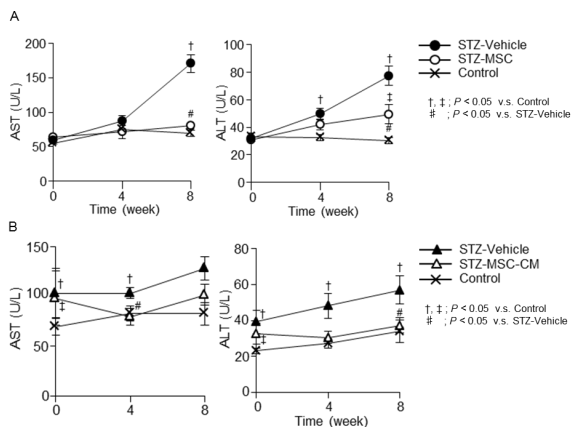


図1 MSCおよびMSC-CM治療によるSTZモデルの肝機能の変化

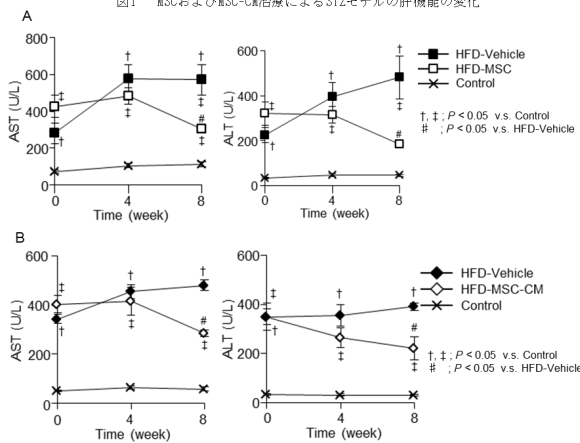


図2 MSCおよびMSC-CM治療によるHFDモデルの肝機能の変化

また、肝臓の間質に集積した GFP 陽性骨髄由来細胞の数が、MSC 治療により減少し、細胞障害性サイトカインの発現が減少した。また腎機能も改善する傾向がみられた。

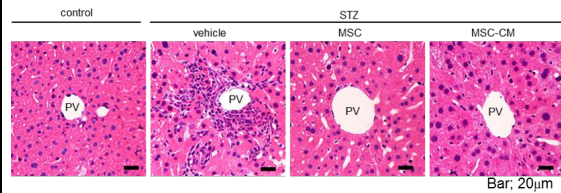


図3 MSCおよびMSC-CM治療によるSTZモデルの肝組織所見の変化

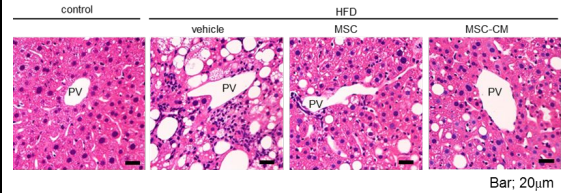


図4 MSCおよびMSC-CM治療によるHFDモデルの肝組織所見の変化

骨髄および末梢臓器における MSC の作用機序の検討；骨髄あるいは末梢臓器に生着した MSC の、標的細胞に及ぼす作用を検討した。有効性に比較して、標的臓器に生着する MSC の数が少なかったことから、MSC が産生する液性因子 (HGF, VEGF, bFGF, Ang, SDF-1, STC, TGF- 等) が治療効果を発揮するかどうか明らかにする目的で、MSC の培養上清 (MSC-conditioned medium, MSC-CM)のみを連日投与したところ、細胞治療と同様の効果が得られた(図 1B, 2B)。MSC が産生・分泌する多彩な生理活性物質によるパラクライン効果が、肝腎障害を改善したと考えられた。MSC の培養上清の含有成分を解析したところ、VEGF や MCP-1 を初め多数の増殖因子やサイトカイン、ケモカインを含有した。これらは、高血糖や高脂血症で障害された臓器の、実質・間質の修復、リモデリングに関与する因子を多く含有した。MSC 自身の明らかな標的細胞への分化転換による組織再生修復効果については、明らかではなかった(Nagaishi K, *et al.* Hepatology 2014)。

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 4 件)

1. Nagaishi K, Ataka K, Echizen E, Arimura Y, Fujimiya M. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic hepatocyte damage in mice by inhibiting infiltration of bone marrow-derived cells. *Hepatology*. 2014, 59(5):1816-29. doi: 10. 1002/hep. 26975. (査読有り)
2. Chiba H, Ataka K, Iba K, Nagaishi K, Yamashita T, Fujimiya M. Diabetes impairs the interactions between long-term hematopoietic stem cells and osteopontin-positive cells in the endosteal niche of mouse bone marrow. *Am J Physiol Cell Physiol*.2013, 305:C693-C703. doi:10.1152/ajpcell.00400.2012. (査読有り)
3. Yamashita T, Fujimiya M, Nagaishi K,

Ataka K, Tanaka M, Yoshida H, Tsuchihashi K, Shimamoto K, Miura T. Fusion of bone marrow-derived cells with renal tubules contributes to renal dysfunction in diabetic nephropathy. FASEB J, 2012; 26: 1559-68. doi: 10.1096/fj.11-183194. (査読有り)

4. Fujimiya M, Nagaishi K, Yamashita T, Ataka K. Bone marrow stem cell abnormality and diabetic complications. Anat Rec (Hoboken). 2012, 295(6):917-21. doi: 10.1002/ar.22445. (査読有り)

〔学会発表〕(計7件)

1. 永石 歆和, 「自己骨髄間葉系幹細胞を用いた糖尿病性腎症治療の課題と最適化」第14回日本再生医療学会, 2015年3月21日, パシフィコ横浜(神奈川県、横浜)

2. 永石 歆和, 「自己骨髄間葉系幹細胞を用いた糖尿病合併症の新規治療戦略」, 第35回日本炎症・再生医学会 シンポジウム, 2014年7月4日, 万国津梁館(沖縄県、名護)

3. 永石 歆和, 'Novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy using optimally pre-conditioned self-bone marrow derived mesenchymal stem cells in mice.' International Society for stem cell research (ISSCR) 2014, 2014年6月20日, バンクーバー(カナダ)

4. 永石 歆和, 「骨髄間葉系幹細胞を用いた糖尿病性腎症に対する新規治療戦略」第13回日本再生医療学会総会, 2014年3月5日, 国立京都国際会館(京都府、京都)

5. 永石 歆和, 'Mesenchymal stem cell therapy ameliorates hepatocyte damage in both type 1 and type 2 diabetic mice via trophic effects.' Digestive Disease Week (AASLD) 2013 (oral), 2013年5月20日, オールランド(米国)

6. 永石 歆和, 「骨髄間葉系幹細胞を用いた糖尿病性肝障害に対する新規治療法」第12回日本再生医療学会総会, 2013年3月21日, パシフィコ横浜(神奈川県、横浜)

7. 永石 歆和, 「骨髄間葉系幹細胞を用いた糖尿病合併症の治療」第118回日本解剖学会総会・全国集会(シンポジウム), 2013年3月28日, サポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県、高松)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 間葉系幹細胞の賦活化剤、賦活化された間葉系幹細胞およびその製造方法

発明者: 藤宮 峯子, 永石 歆和, 水江 由佳, 千見寺 貴子

権利者: 北海道公立大学法人札幌医科大学

種類: 国際出願

番号: PCT/JP2015/ 57217

出願年月日: 2015年3月11日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ

<http://web.sapmed.ac.jp/anat2/index.htm>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永石 歆和 (NAGAISHI, Kanna)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30544118

(2) 研究分担者

藤宮 峯子 (FUJIMIYA, Mineko)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10199359

有村 佳昭 (ARIMURA, Yoshiaki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80305218

安宅 弘司 (ATAKA, Kouji)

鹿児島大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号: 30563358