

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460279

研究課題名(和文)自己骨髄間葉系幹細胞を用いた糖尿病腎症に対する新規治療戦略

研究課題名(英文) Umbilical cord extracts improve diabetic abnormalities in bone marrow-derived mesenchymal stem cells and increase their therapeutic effects on diabetic nephropathy

研究代表者

永石 歓和 (NAGAISHI, 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症(DN)は、糸球体構成細胞や尿細管上皮、間質に多彩な異常を生じる慢性難治性疾患である。間葉系幹細胞(MSC)は、多彩な液性因子・分泌小胞によるパラクライン作用を介して、組織再生能や免疫制御能を発揮し、腎組織構成細胞の障害に対する有効性が期待される。一方で糖尿病患者骨髄由来MSCは、その細胞機能異常により自家移植において十分な治療効果が期待できない。そこで異常化したMSCを調整し治療効果を高めるために、臍帯由来抽出物を用いた新しい細胞賦活化法を開発した。賦活化したMSCは、in vitroにおける細胞機能が回復し、DNモデル動物に対する治療効果も改善した。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSC) has been applied as the most valuable source of autologous cell transplantation for diabetic complications. However, hyperglycemia may cause abnormalities in intrinsic BM-MSC which might lose sufficient therapeutic effects in diabetic patients. We demonstrated the functional abnormalities in BM-MSC derived from diabetes models (DM-MSC) in vitro, which resulted in loss of therapeutic effects in vivo in diabetic nephropathy (DN). Then, we developed a novel method to improve abnormalities in BM-MSC using human umbilical cord extracts, namely Wharton's jelly extract supernatant (WJs). WJs ameliorated proliferative capacity, motility, mitochondrial degeneration, endoplasmic reticular functions in DM-MSC. DM-MSC activated by WJs ameliorated renal injury in DN. In this study, we developed a novel activating method using WJs to significantly increase the therapeutic effect of BM-MSC, which may allow effective autologous cell transplantation.

研究分野：再生医療、糖尿病

キーワード：間葉系幹細胞 糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症 (Diabetic nephropathy, 以下 DN) は、有効な既存治療法がなく高率で腎不全へ移行する。進行期腎症に対してアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の有効性が報告されているが、限定的であり、多くの患者が透析導入を余儀なくされる。わが国の透析患者数は約 32 万人で、その 43.7% を糖尿病性腎症が占める。人工透析の医療費は 1 人あたり年間 500 万円とされ、毎年約 1.4 兆円以上の医療費が透析療法に投じられているほか、透析患者の導入後 5 年生存率は約 60% にまで低下する。従って、腎不全への進行を抑制して透析導入を回避あるいは遅延させることで、患者の QOL 向上および医療経済効果をもたらす、新しい治療法の開発が急務である。

DN に対する新しい治療戦略として、近年再生医療が注目されている。各種幹細胞を用いた細胞治療について、実用化を目指して研究が進められている。なかでも骨髄間葉系幹細胞 (Bone marrow derived-mesenchymal stem cell, 以下 BM-MSC) は、体性幹細胞の一つで、旺盛な増殖能と免疫制御能、組織修復・再生を促進する栄養因子の産生能、組織リモデリング作用等の多彩な機能を有することから、細胞治療のソースとして有望視される。実際、GVHD や脳梗塞、脊髄損傷等に対する臨床試験が実施され、最も実用化に近い細胞である。一方で、複雑で多種多様な細胞成分で構成される腎組織に対する BM-MSC の有効性の報告はまだ少なく、有効性機序を含めて未解明な点が多い。

さらに、自己の骨髄細胞を用いた BM-MSC 治療は、免疫拒絶や感染症のリスクが低く、細胞源の倫理的ハードルも低いことから、安全で実用化への期待が高い治療法である。一方で、糖尿病をはじめとする慢性炎症性疾患では骨髄細胞が異常化しているとされ、自己 BM-MSC が自家移植において十分な治療効果を発揮するかどうか、定かでない。

2. 研究の目的

本研究では、まず糖尿病モデル動物由来 BM-MSC の異常性を明らかにし、異常化した BM-MSC を賦活化する方法を開発することとした。さらに、賦活化した糖尿病モデル動物由来 BM-MSC が DN に対して十分な治療効果を発揮するかどうか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病骨髄由来 MSC (DM-MSC) と非糖尿病骨髄由来 MSC (control-MSC) の比較解析；
 ストレプトゾトシン (STZ) 55 mg/kg を腹腔内投与した 1 型糖尿病 STZ ラットを作製した。これらの糖尿病ラットから骨髄由来 MSC (DM-MSC) を単離培養した。DM-MSC と

Control-MSC について、細胞形態や増殖能、液性因子の産生能等を *in vitro* で解析した。さらに、DM-MSC による DN の治療効果を *in vivo* で解析した。DN モデルとして、STZ ラットを用いた。

(2) DM-MSC の賦活化法の開発；

臍帯組織抽出物を原材料とした DM-MSC に対する細胞賦活剤を作製した。さらに賦活剤の DM-MSC に対する細胞調整効果、および賦活剤に含有される有効因子を解析した。

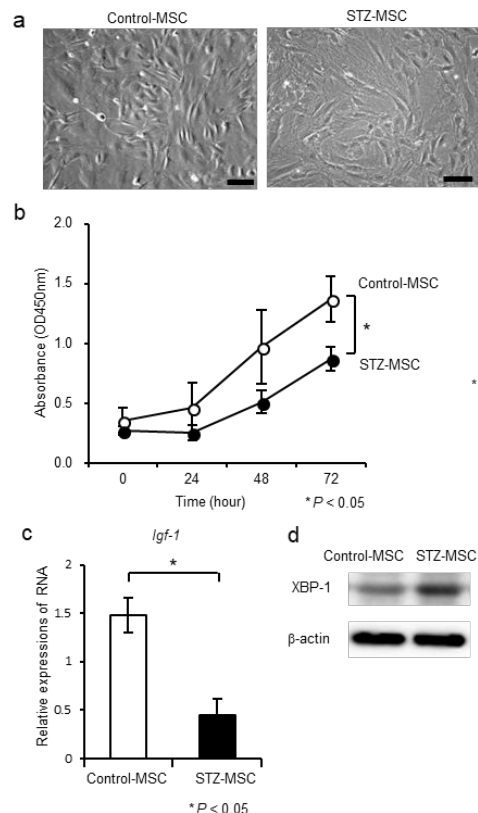
(3) DN に対する賦活化 DM-MSC の治療効果の解析；

賦活化した DM-MSC を DN モデルラットに投与し、腎機能障害に対する治療効果の改善度を評価した。

4. 研究成果

(1) 糖尿病における BM-MSC の異常性

STZ-MSC は、Control-MSC に比較して、ストレスファイバーが増加して細胞面積が拡大し (図 1a) 細胞増殖能や増殖因子 Igf-1 の発現が低下していた (図 1b, c)。また、小胞体ストレス関連因子 XBP-1 の発現が亢進していた (図 1d)。さらに、これらの異常な STZ-MSC は、STZ モデルラットの腎機能の指標である尿中アルブミン・クレアチニン比 (U-alb/Cr) を改善せず (図 1e)、組織学的にも尿細管拡張や尿細管上皮障害および間質の炎症細胞浸潤が Vehicle 群と同様に遺残した (図 1f)。STZ-MSC の DN に対する腎機能改善効果が低下していたことから、糖尿病患者においても患者由来 BM-MSC は、自家移植において十分な治療効果を有さないことが示唆された。



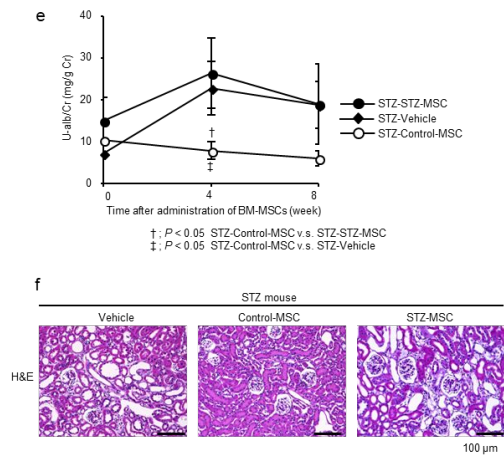


図1 糖尿病におけるBM-MSCの異常性

(2) 異常なDM-MSCの賦活化

次に、異常なDM-MSC(STZ-MSC)の細胞機能を改善する方法として、臍帯組織抽出物を原材料とした新たな賦活剤(WJ)を開発した。WJは、各種増殖因子や細胞外基質、アミノ酸、miRNAに代表される核酸成分などの多彩な生理活性物質を含有する。STZ-MSCにWJを添加して培養したところ、細胞質のストレスファイバーが減少して細胞面積が縮小し、形態的に紡錘形を呈した(図2a)。細胞増殖能や増殖因子Igf-1の発現が上昇し(図2b, c)、小胞体ストレス関連因子XBP-1やストレスファイバー α -SMAの発現が低下した(図2d, e)。この結果から、WJはSTZ-MSCにおける多彩な異常性を包括的に改善し、細胞機能を向上させることが示唆された。

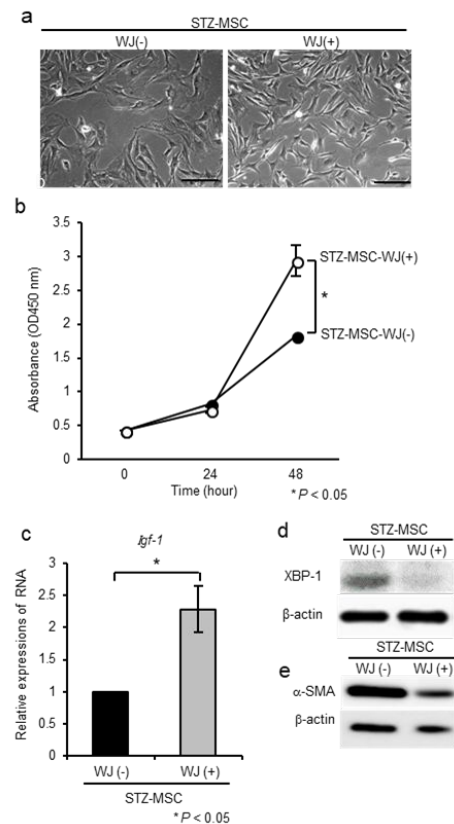


図2 異常なBM-MSCの賦活化

(3) DNに対する賦活化DM-MSCの治療効果

さらに、WJで賦活化したSTZ-MSC(STZ-MSC-WJ(+))を用いて、DNモデルラットに対する治療効果を解析した。STZ-MSC-WJ(+)投与群は、非賦活化STZ-MSC(STZ-MSC-WJ(-))投与群と比較して、U-alb/Crの増悪が抑制された(図3a)。組織学的には、STZ-MSC-WJ(+)投与群で尿細管拡張や尿細管上皮細胞の変性、間質の炎症細胞浸潤・線維化が抑制された(図3b)。すなわち、WJは異常なSTZ-MSCの機能を改善することにより、DNに対する細胞治療の効果を回復させることが可能であった。賦活剤の添加法の工夫により、DNに対する治療効果を最大に発揮する賦活化DM-MSCを得ることも可能と考えられた。

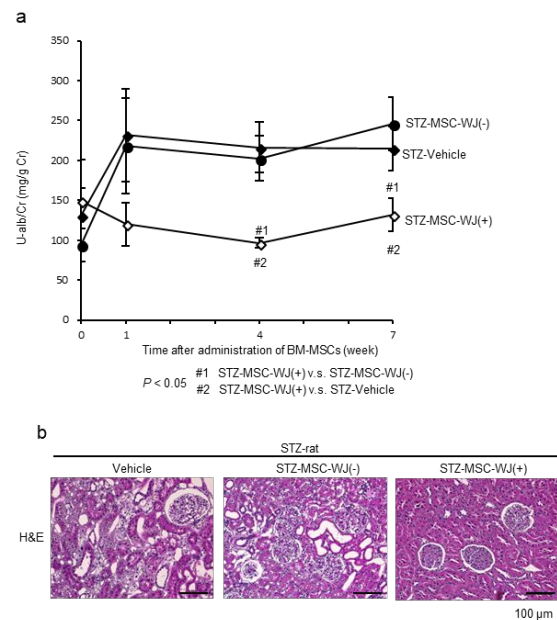


図3 賦活化DM-MSCのDNに対する治療効果

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3件)

1. Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, Otani M, Nakano M, Saijo Y, Tsuchida H, Ishioka S, Nishikawa A, Saito T, Fujimiya M. Umbilical cord extracts improve diabetic abnormalities in bone marrow-derived mesenchymal stem cells and increase their therapeutic effects on diabetic nephropathy. *Sci Rep* 2017; 7:8484. doi: 10.1038/s41598-017-08921-y(査読有り)
2. Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, Otani M, Nakano M, Konari N, Fujimiya M. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes. *Sci Rep* 2016; 6:34842. doi: 10.1038/srep34842

(査読有り)

3. 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)

[学会発表] (計 7 件)

1. 小成尚人, 永石 歆和, ' Mitochondria transfer of bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits apoptosis in Proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy. ' International Society for stem cell research (ISSCR) 2017. 2017年6月16日, ボストン(アメリカ)
2. 永石 歆和, 「自己骨髄間葉系幹細胞を用いた糖尿病性腎症の治療」 第 28 回北海道輸血シンポジウム IV, 2016年7月9日, 日本赤十字社北海道ブロック血液センター3 階研修室(北海道、札幌)
3. 永石 歆和, 「胎児付属物抽出液で賦活化した自己骨髄間葉系幹細胞による糖尿病性腎症の新規治療法の開発」, 第 28 回代用臓器・再生医学研究会総会 一般演題 II, 2016年2月27日, 北海道大学 鈴木章記念ホール(北海道、札幌)
4. 永石 歆和, 「糖尿病性腎症に対する自己骨髄間葉系幹細胞治療の課題と最適化法の開発」 第 3 6 回日本炎症再生医学会、2015年7月21日~22日、虎ノ門ヒルズ(東京都)
5. 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 1 4 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)
6. 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)
7. 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, バンクーバー(カナダ)

[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: 国際出願番号: PCT/JP2015/57217
国際公開 WO2015137419 A1
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・研究員

研究者番号: 80305218