

低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞は免疫調整型マクロファージを誘導して半月体形成性糸球体腎炎を軽減する

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・高橋雅英）腎臓内科学 古橋 和拓（ふるはし かずひろ）元大学院生、丸山 彰一（まるやま しょういち）准教授、同大学医学部附属病院 腎臓内科学 坪井直毅（つばい なおたけ）講師らの研究チームは、低血清培養法という特殊な培養法で得られた脂肪由来幹細胞（LASCと命名）が、透析に至る可能性の高い急速進行性腎炎に対して格段に治療効果が高いことを動物実験で明らかにしました。またそのメカニズムとして、LASCが腎炎症部位に集積したマクロファージを免疫調整型細胞へ高率に誘導することにより抗炎症効果を果たすことを証明しました。

本研究で得られた結果から、急速進行性腎炎患者へのLASC投与は、全身性の副作用を軽減しながら、局所において効率的に組織障害を軽減し得ると期待できます。

本研究成果は、米国腎臓病学会雑誌『Journal of the American Society of Nephrology』（3月7日付けの電子版）に掲載されました。

低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞は免疫調整型マクロファージを誘導して半月体形成性糸球体腎炎を軽減する

ポイント

- 脂肪由来間葉系幹細胞が重篤な糸球体腎炎モデルに大きな治療効果を果たした。
- 脂肪由来間葉系幹細胞は骨髄由来間葉系幹細胞と比較して治療効果に優れていた。
- 研究チームは低血清培養法という特殊な培養法を世界に先駆けて開発した。この培養法で得られた細胞（LASC と命名）が一般的な脂肪由来幹細胞と比較して腎炎に対して格段に治療効果が高いことを見出した。
- 治療メカニズムのひとつとして、LASC が炎症性マクロファージを減少させ、免疫調整型マクロファージを増やすことを世界で初めて証明した。

要旨

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・高橋雅英）腎臓内科学 古橋 和拓（ふるはし かずひろ）元大学院生、丸山 彰一（まるやま しょういち）准教授、同大学医学部附属病院 腎臓内科 坪井直毅（つばい なおたけ）講師らの研究チームは、低血清培養法という特殊な培養法で得られた脂肪由来幹細胞（LASC と命名）が、透析に至る可能性の高い急速進行性腎炎に対して格段に治療効果が高いことを動物実験で明らかにしました。またそのメカニズムとして、LASC が腎炎症部位に集積したマクロファージ^{*1} を免疫調整型細胞へ高率に誘導することにより抗炎症効果を果たすことを証明しました。

これまでの研究では、間葉系幹細胞^{*2} が有する脂肪・軟骨・骨への分化能に注目が集まってきましたが、最近同幹細胞が免疫調整能を有することが分かってきました。研究チームは、脂肪由来間葉系幹細胞に注目してきましたが、その臨床的優位性として採取が比較的容易であり、増殖能に優れるという点があります。細胞治療を目的に間葉系幹細胞を培養する際は、微生物・プリオンなどの感染リスクを軽減するため、培養液中に添加する血清^{*3} 濃度をできる限り下げることが理想的ですが、反面それによる細胞増殖・機能への悪影響も無視できません。実際、骨髄由来の間葉系幹細胞は 5%以下の血清濃度では増殖できません。しかしながら、脂肪由来間葉系幹細胞は血清濃度を 5%以下に下げても、20%血清で培養した骨髄由来間葉系幹細胞と同等の優れた増殖能を有します。また、培養血清濃度を下げることにより、LASC は再生を促進する因子、免疫調整する因子を逆に多く産生するようになります。

急速進行性腎炎は現在でもなお難治性の腎炎であり、未だにステロイドやシクロフォスファミド^{*4} といった免疫抑制剤しか有効な治療法がないのが現状であり、これらを用いた免疫抑制療法中には、しばしば感染や薬剤による細胞毒性といった副作用を経験します。そこで、研究チームは、再生能、免疫調整能に優れた LASC が急速進行性腎炎モデルにおいて腎保護効果、生命予後の改善をさせ得るか検討しました。その結果、骨髄由来間葉系幹細胞との比較において、脂肪由来間葉系幹細胞が急速進行性腎炎に対して高い治療効果を示し、さらにその効果が低血清培養により大幅に増強することを初めて見出しました。その機序として、LASC は糸球体障害の早期において炎症性免疫細胞

の浸潤を抑制し、さらにそれに続く炎症増悪時に浸潤したマクロファージを免疫調整性マクロファージへ導くことで腎障害を軽減したものと考えられました。

本研究で得られた結果から、急速進行性腎炎患者への LASC 投与は、全身性の副作用を軽減しながら、局所において効率的に組織障害を軽減し得ると期待できます。

本研究成果は、米国腎臓病学会雑誌『Journal of the American Society of Nephrology』（3月7日付けの電子版）に掲載されました。

1. 背景

昨今 iPS 細胞の臨床応用が注目されていますが、実現化へは時間がかかると考えられます。実際には、組織再生促進能と免疫調整能を有する間葉系幹細胞、中でも骨髄由来間葉系幹細胞が最も多く研究されており、すでに臨床試験が進められています。例えば、骨髄移植後の GVHD（移植片対宿主病）に対する免疫抑制療法としての臨床試験がすでに進行中です。研究チームは、採取の際に人体にかかる負担の大きい骨髄ではなく、脂肪から得られる幹細胞に注目して研究を行い、低血清培養法という特殊な幹細胞培養法を開発しました。この方法で得られる脂肪由来間葉系幹細胞を LASC と呼んでいます（特許申請済）。LASC は通常の脂肪由来間葉系幹細胞（HASC）と比較して、HGF や VEGF といった成長因子を多く分泌しており、同細胞による治療が虚血肢や尿失禁モデル、急性腎不全に有効であること、また LASC が HASC や骨髄由来間葉系幹細胞と比較して、その強力な T リンパ球抑制能により、異種に対する抗体産生を抑制することをそれぞれ動物実験で明らかにし論文報告してきました。今回研究チームは、LASC の強力な免疫抑制能に着目し、ラットの半月体形成性糸球体腎炎モデル（最も重篤な腎炎モデルのひとつであり、ヒトの抗糸球体基底膜抗体型腎炎に相当する）に対する治療効果、およびその作用メカニズムについて検討を行いました。

2. 研究成果

まず、従来用いられてきた細胞培養法で、採取部位の違う間葉系幹細胞による抗糸球体基底膜抗体型腎炎への腎保護効果を比較検討したところ、脂肪由来間葉系幹細胞投与により有意な腎保護効果が認められました(図 1)。そこで腎臓を顕微鏡下に観察したところ、腎糸球体において組織障害を増悪させる炎症細胞の浸潤が抑制され、組織修復を誘導する免疫調整性マクロファージが脂肪由来間葉系幹細胞投与群で増加していました。つぎに通常培養法(HASC)と、研究チームが開発した低血清培養法(LASC)の治療効果比較を行ったところ、抗糸球体基底膜抗体型腎炎ラットの生存率や腎保護効果は LASC 投与群で有意に優れていました。さらに腎炎の重症度の指標である半月体形成・炎症細胞の浸潤抑制、免疫調整性マクロファージの誘導能においても LASC 投与の有効性が証明されました(図 2)。疾患腎での炎症性物質解析を行ったところ、HASC 投与群に比べて LASC 投与群で炎症性メディエーターである $IL-1\beta$ 、 $IL-12p70$ は低値であり、抗炎症性物質である $IL-10$ は高値でした(図 3)。HASC、LASC 間での腎臓炎症部位への到達細胞数に差は認めなかったことから、LASC 投与の腎炎に対する優れた有効性は、LASC の機能的優位性によるものと考えられました。一方、LASC をマクロファージと共に培養したところ、BM-MSc、HASC と比べてより強力な $IL-10$ の産生能と免疫調整性マクロファージ誘導能を発揮しました(図 4)。そのメカニズムとして、細胞間接着と LASC が産生する液性因子両者の重要性が示されました。そこで炎症性メディエーターである $PGE2$ や $IL-6$ の阻害処理の下、LASC とマクロファージと一緒に培養した結果、免疫調整性マクロ

ファージへの誘導が有意に減弱しました。また急速進行性腎炎ラットを起こしたラットに PGE2 阻害処置した LASC を投与した治療群では、LASC による腎保護効果は減弱し、糸球体内の免疫調整性マクロファージは減少しました(図 5)。以上より投与された LASC は PGE2、IL-6 依存的に、免疫抑制物質 IL-10 を産生する免疫調整性マクロファージを腎炎症部位で誘導することで、急速進行性腎炎に対し骨髄由来間葉系幹細胞、HASC に比べ優れた治療効果を果たしたと考えられました(図 6)。

3. 今後の展開

研究チームでは、低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞 (LASC) を急速進行性糸球体腎炎を含む数々の難知性炎症性疾患に対する新規治療法として臨床応用したいと考えています。まずは他に治療法のない難治性強皮症患者を対象とした臨床試験を計画していますが、現在は、ヒトから得られた培養 LASC の安全性確認を第一の目標に掲げ研究しています。安全性確認がとれ次第、まずは患者自身の脂肪から LASC を培養し自分にもどす治療 (自家移植) を進める予定ですが、将来的には他人の脂肪から得た LASC により患者治療を行うこと(他家移植)を目指しています。

【論文名】

Serum-starved adipose-derived stromal cells ameliorate rat crescentic glomerulonephritis by promoting immunoregulatory macrophages

※米国腎臓病学会雑誌『Journal of the American Society of Nephrology (ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ソサエティー・オブ・ネフロロジー)』3月7日付けの電子版に掲載

【補足説明】

※1 マクロファージ

動物の組織内に分布する大形のアメーバ状細胞。生体内に侵入した細菌などの異物を捕らえて細胞内で消化する、炎症物質を産生し組織炎症を惹起する、それらの異物に抵抗するための免疫情報をリンパ球に伝えるなど多彩な機能を有する細胞。別名大食細胞。貪食細胞。

※2 間葉系幹細胞

幹細胞とよばれる分化可能な細胞の一種であり、骨や筋肉、神経などに分化する能力を持つ。再生医療の分野において広い用途に対応できるものとして大きな期待を集めている。また、間葉系幹細胞は、採取が比較的容易で、製剤化に当たっても低コスト化が図りやすいという利点がある。

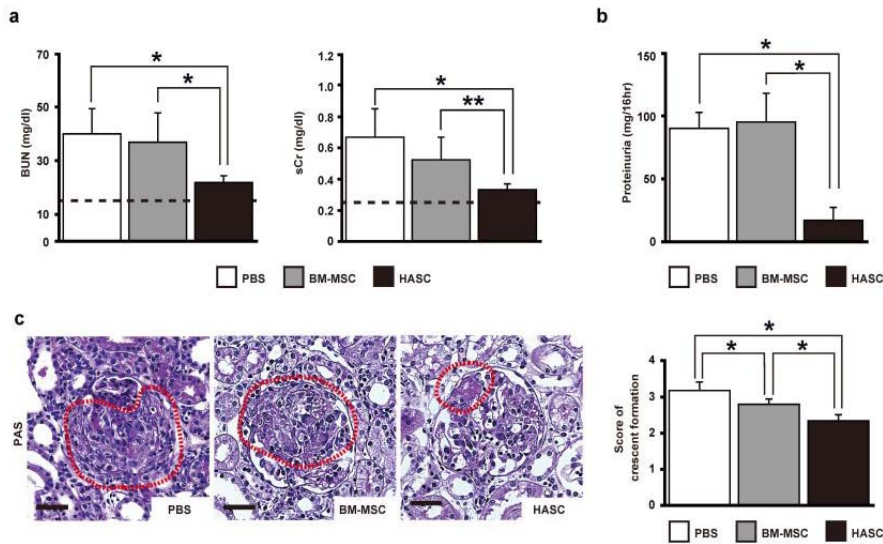
※3 血清

血液が凝固して上澄みにできる淡黄色の液体成分。細胞培養に必要なさまざまな栄養素のほか、免疫抗体や老廃物を含む。

※4 シクロフォスファミド

アルキル化剤に分類される抗悪性腫瘍剤、免疫抑制剤。腎臓分野では難知性腎炎や自己免疫疾患に用いられる。

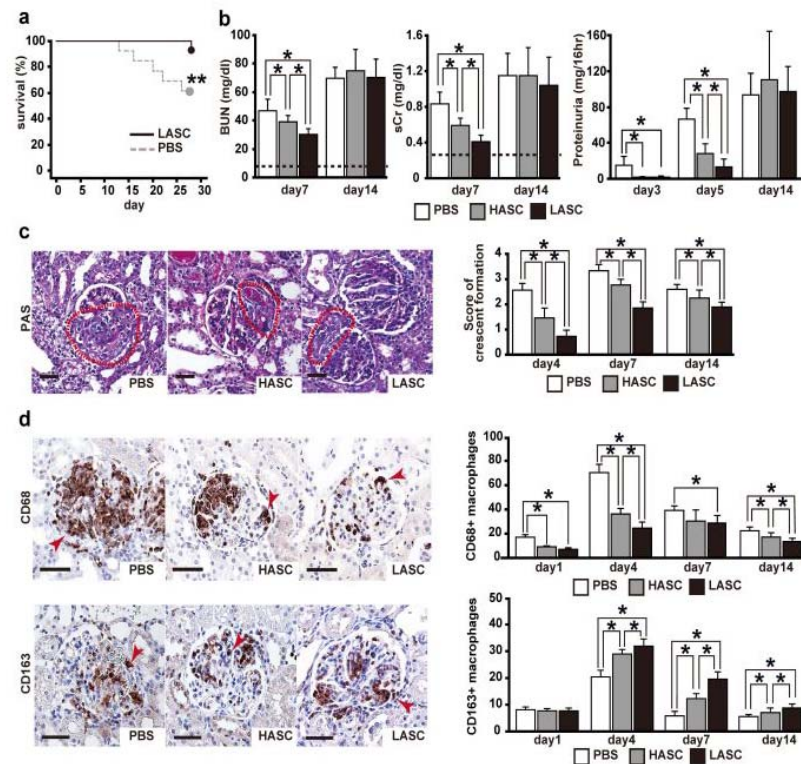
図1 採取部位の違う間葉系幹細胞による抗糸球体基底膜抗体型腎炎への腎保護効果



a-b. 脂肪由来間葉系幹細胞 (HASC) が骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) より強く腎機能を保護した。
 c. 脂肪由来間葉系幹細胞 (HASC) が有意に糸球体における半月体形成 (赤枠内) を抑制した。

脂肪由来間葉系幹細胞は骨髄由来間葉系幹細胞に比較して、抗糸球体基底膜抗体型腎炎への腎保護効果・マクロファージへの抗炎症作用が強い。

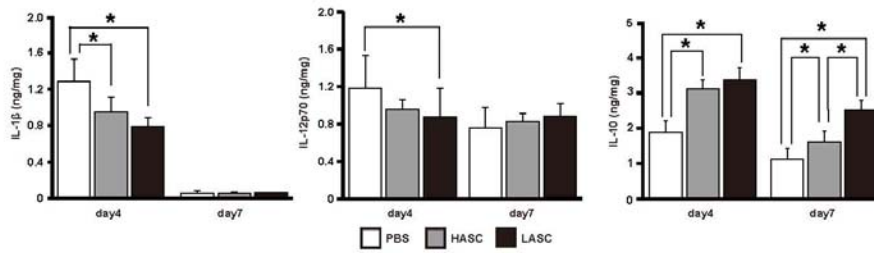
図2 低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞 (LASC) は脂肪由来間葉系幹細胞の腎保護効果を増強する



a. 低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞 (LASC) は抗糸球体基底膜抗体型腎炎モデルラットの生存率を改善させる。
 b. LASC は通常培養脂肪由来間葉系幹細胞 (HASC) よりさらに強い腎保護効果を示した。
 c. LASC は HASC よりさらに強い半月体形成抑制効果 (赤枠内) を示した。
 d. LASC は HASC より有意に糸球体への CD68 陽性浸潤マクロファージ (上段矢印) を減少させ、さらに CD163 陽性免疫調整性マクロファージ (下段矢印) を増加させた。

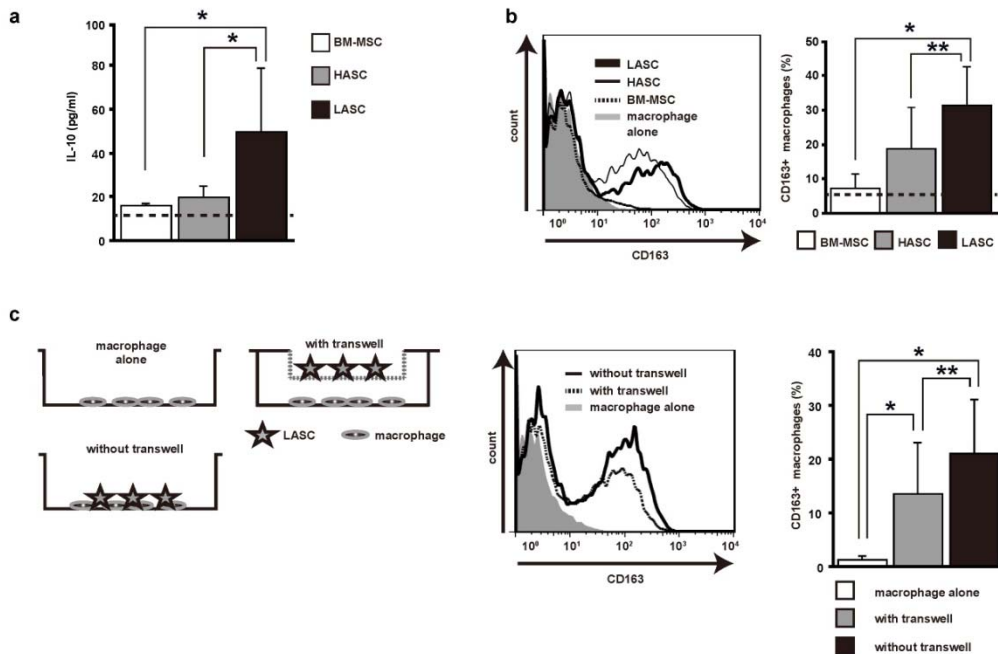
LASC は通常培養脂肪由来間葉系幹細胞 (HASC) より強い腎保護効果を示し、腎炎の重症度の指標である半月体形成、浸潤マクロファージの抑制効果を示した。さらに、LASC は CD163 陽性免疫調整性マクロファージを HASC より優位に増加させた。

図3 腎皮質サイトカインの解析



腎皮質のサイトカインの解析において、LASC 治療群は HASC 治療群より炎症性サイトカイン (IL-1-β, IL-12p70) が低値で、抗炎症性サイトカイン (IL-10) が高値を示した。

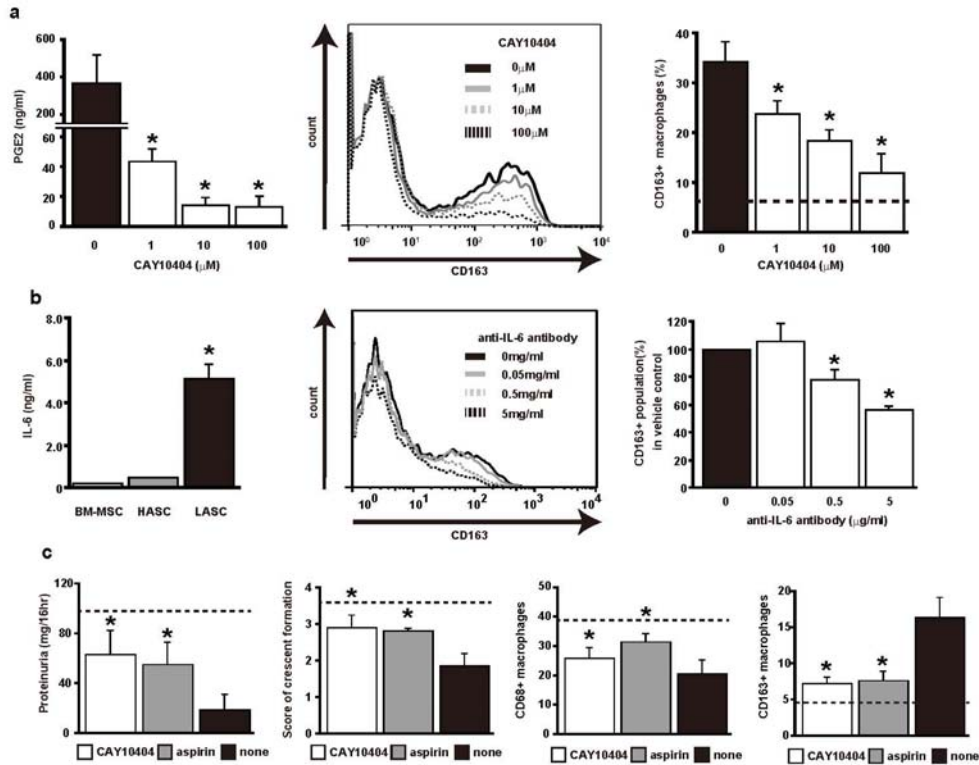
図4 マクロファージ共培養下における間葉系幹細胞による免疫調整性マクロファージ誘導能の違い



- マクロファージとの共培養下において、HASC、BM-MSC と比べて LASC との培養上清中の抗炎症性サイトカイン IL-10 は高値を示した。
- LASC はマクロファージに作用して HASC、BM-MSC より強く CD163 免疫調整性マクロファージを誘導した。
- LASC とマクロファージが直接接着できないように、膜を使用し培養皿を上下に仕切って LASC による免疫調整性マクロファージ誘導能に細胞同士の接着が必要か検討した。結果は、LASC は液性因子だけでも免疫調整性マクロファージを誘導できるが細胞間接着によりさらにその効果は増強した。

LASC はマクロファージに対して強力な免疫調整性マクロファージ誘導能を有していた。その機序として LASC 由来の液性因子が重要であるが、細胞間接着によりその効果が増強された。

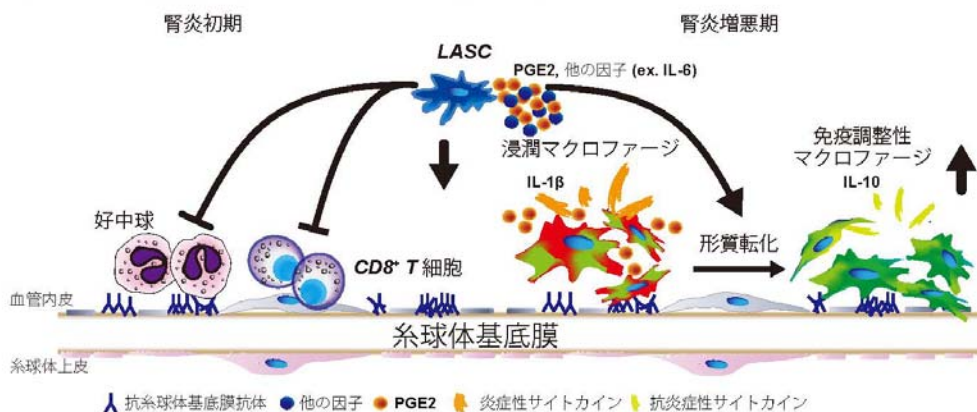
図5 免疫調整性マクロファージを誘導するLASCの液性因子の解析



- COX-2 阻害薬により PGE2 の合成を阻害することで、LASC による免疫調整性マクロファージへの誘導能は低下した。
- LASC は IL-6 を多く分泌し、この IL-6 を中和抗体により阻害することにより、LASC による免疫調整性マクロファージへの誘導能は低下した。
- 抗糸球体基底膜抗体型腎炎ラットへ LASC 投与する際に、COX-2 阻害薬またはアスピリンでにより LASC を前処理することで、腎保護効果、糸球体内の免疫調整性マクロファージへの誘導が減弱した。

炎症性メディエーターである PGE2 や IL-6 の阻害処理の下、LASC とマクロファージを一緒に培養した結果、免疫調整性マクロファージへの誘導が減弱したことから、急速進行性腎炎ラットを起こしたラットに PGE2 阻害処置を施した LASC を投与した治療群では、LASC による腎保護効果は減弱し、糸球体内の免疫調整性マクロファージは減少しました。

図6 抗糸球体基底膜抗体型腎炎へのLASCの作用機序のまとめ



投与された LASC は PGE2、IL-6 依存的に、免疫抑制物質 IL-10 を産生する免疫調整性マクロファージを腎炎部位で誘導することで、急速進行性腎炎に対し骨髄由来間葉系幹細胞、HASC に比べ優れた治療効果を果たすと考えられました。