

慢性腎臓病に対するDFAT細胞治療に関する研究

丸山高史¹⁾, 福田昇¹⁾, 松本太郎¹⁾, 加野浩一郎²⁾

Study on cell transplantation of DFAT in chronic kidney disease

Takashi MARUYAMA¹⁾, Noboru FUKUDA¹⁾,
Taro MATSUMOTO¹⁾, Koichiro KANO²⁾

要旨

我々は脱分化脂肪細胞を細胞移植するとラットの免疫性腎炎の病態が改善することを報告した¹⁾。細胞移植の方法として別の個体で事前に作成したDFATを尾静脈から注射する、つまり他家移植で行った。他家移植の場合に拒絶反応や感染症など安全性の面に不安が残るのも事実であるが、一方で細胞治療は他家移植こそ効果があるという説もある。そこで将来この細胞治療の臨床応用を見据えた場合に、他家移植よりも安全と考えられる自家移植でも移植の効果が得られるかを確認する必要があり検証を行った。今回その結果をここに報告する。

1. はじめに

脂肪組織は「贅肉」という言葉から想像出来るように余分なものとして考えられてきた。本当に余分であるかはさておき大量採取しても他の組織と違って人体の機能を大きく損なうことはない。そのため脂肪組織は細胞治療の細胞供給源として注目されている。

DFATの作成方法を示す(図1)。脂肪組織の約20~30%と最も多くを占める成熟脂肪細胞はたがいに疎に結合しあっているため脂肪組織から容易に単離することが出来る。単離した脂肪細胞はその浮遊性を利用して、培地を満たしたフラスコの天井測で天井培養という方法²⁾により、培養・増殖させることが可能である。脂肪細胞を天井培養する過程で、繊維芽細胞様の形態をもった細胞が出現してくるが、Yagi³⁾らはこの繊維芽細胞様細胞から成熟脂肪細胞に分化し得るマウス前駆脂肪細胞株を樹立し、脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)と名付けた。

DFATは高い細胞増殖活性を示すだけでなく、成

熟脂肪細胞マーカーであるリポプロテインリパーゼ、レプチン、GLUT4の発現が消失しており、成熟脂肪細胞の機能を失い脱分化していると考えられる。さらに、DFATは適切な分化誘導培地で培養すると脂肪細胞だけでなく、骨芽細胞、軟骨細胞など間葉系に由来する細胞系列へも分化することが示された⁴⁾。つまりDFATは前駆脂肪細胞より間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)に近い多能性をもつ細胞であるということである。またDFATは、MSCにほぼ一致した細胞表面抗原発現プロファイル(CD13⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD49d⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺)を示し、2006年国際細胞治療学会が定めたMSCのminimal criteria⁵⁾を満たす。またDFAT培養上清中に分泌される液性因子の分泌パターンもMSCとほぼ一致しており⁶⁾、DFATがMSCと同等のパラクライン機序を介した組織再生能を有すると考えられている。

DFATの特性を以下に述べる。微量の脂肪細胞が原料であるため性別や年齢を問わず低侵襲性に採取出来る。高い純度をもって調整が可能で、またiPS

1) 日本大学医学部

2) 日本大学生物資源科学部

丸山高史: maruyama.takashi@nihon-u.ac.jp

細胞のような全能性は示さないものの遺伝子操作やウイルスベクターを用いないため安全性にも優れている。低コストで大量調整やその後の維持管理も可能である。さらに外科手術時に大量廃棄される脂肪組織を利用することでバンキングシステムの構築が容易なのは明らかである。つまり低コストで安全性の高い再生医療を可能とする細胞源としてDFATは期待出来る。

一方透析患者の増加が続いており現在我が国では32万人以上とされている。また不可逆的な腎機能障害に陥った病態を総称してCKD (chronic kidney disease) と呼ぶようになったが、それに対する治療は一部の腎炎などの疾患を除き大半は食事療法や血圧や血糖、貧血、酸塩基平衡に対する対症療法が中心で、腎臓自体への根治治療がほぼ存在しない。そのため最も薬剤に対して患者の治療満足度は、当然であるが最も低い部類の疾患として慢性腎臓病は知られている。そのため新しい腎臓病の治療法の誕生が待たれており再生医療が注目されている。そこでDFATの細胞移植、つまり細胞移植が慢性腎臓病の新たな治療法になり得るかを検証すべく、慢性腎臓病の原疾患つまり慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎硬化症のそれぞれについて移植の治療効果を検証する必要がある、今回の報告はその一部つまり慢性糸球体腎炎に対する移植の結果である。

2. 対象及び方法

7週齢の雌性Wistar Ratから先に述べた方法(図1)でDFATを作製して凍結保存をした。次に単クローン抗体1-22-3を1mg/頭の用量で静脈注射して進行

性腎障害モデルを作製した。腎障害発症から1か月後に凍結保存をしておいたDFAT細胞移植を尾静脈からそれぞれの個体に行い、すなわち自家移植を施行して移植1か月後に効果を血液・尿・組織の所見から判定した。

3. 結果

得られた結果を以下の図2のグラフ1～5に示す。

血液・尿検査の結果においては血清尿素窒素、クレアチニンの濃度や尿蛋白の排泄については共に他家移植と同等に低下作用が示された(グラフ1,3)。組織所見においてもGISスコア、TISスコアから腎炎モデルラットより有意に組織改善効果が観られた(グラフ2)。DFAT細胞治療後、抗炎症性タンパク分子として知られるTSG-6 (Tumor necrosis factor stimulated genes 6) が血液中の濃度および組織での発現において有意に上昇、亢進していることが確認された(グラフ4,5)。

4. 考察

自家移植においてもDFATの細胞移植は他家移植で移植を行った結果と同等に腎症の改善効果が確認出来た。血液や組織においてもTSG-6の濃度や発現が亢進していた。TSG-6は抗炎症作用だけでなく免疫調整作用があることを大阪大学が報告している⁷⁾。TSG-6が直接的、間接的にT細胞上に存在して、接着因子であるCD44を抑制してT細胞活性化や細胞浸潤を抑制することで免疫調整作用を発揮するとされる。よってDFAT細胞治療により体内に分泌、発現されたTSG-6を中心とした免疫調整作用が腎炎改

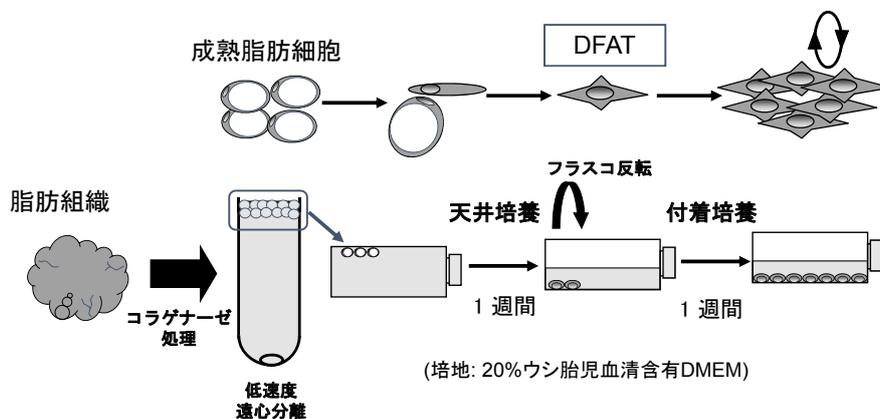


図 1

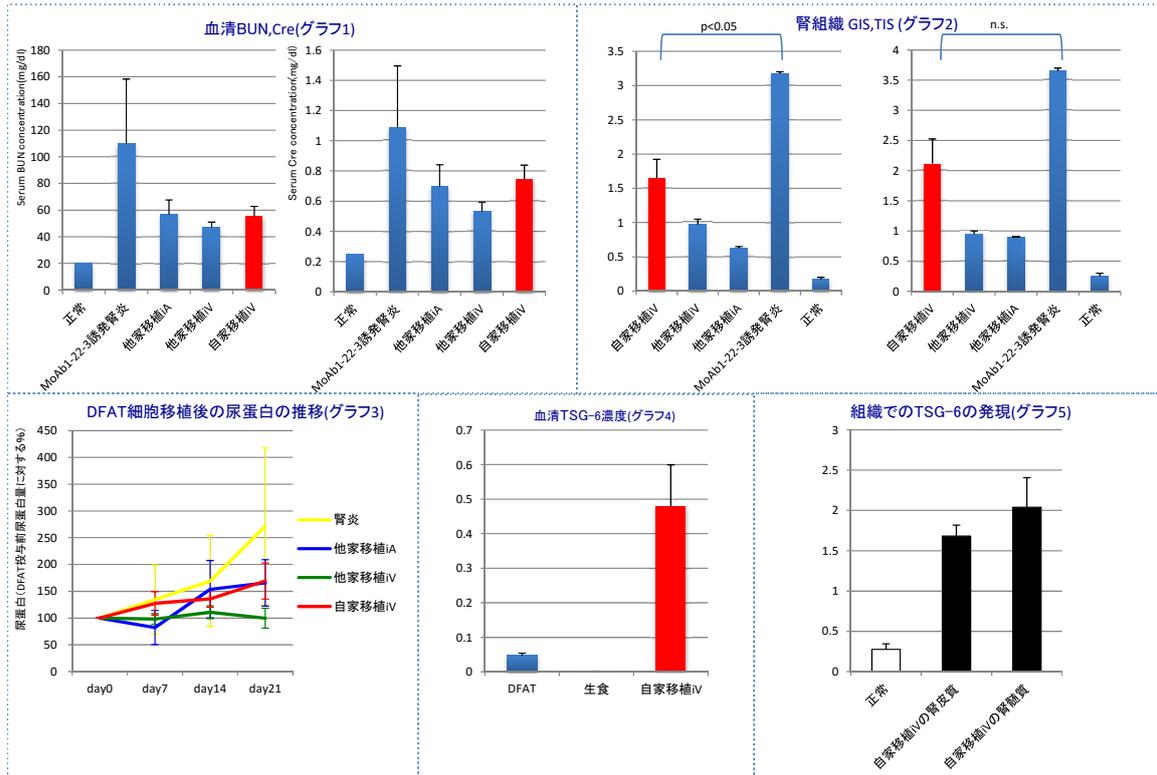


図 2

善の機序として考えられた。

5. 結 語

DFATの細胞治療においては他家移植のみならず自家移植でも同様に腎症改善効果が期待出来ることが示唆された。すなわち自家移植でより安全を期して細胞治療を行えることが可能であることを意味しており、自家移植による安全性や他家移植による治療までの準備期間の短縮など、病態の緊急度などに応じて治療方法を選択することが可能であると考えられた。

6. 今後の展望

前述した我々の報告¹⁾はラット特有の免疫性腎障害である。そこで臨床応用を目指すために免疫性腎炎の中でも予後不良でヒトの疾患にも存在する、ANCA関連腎炎の疾患モデルSCG/Kjマウスに対してDFAT細胞治療の検証を開始している。SCG/Kjマウスは30頭に繁殖することに成功した。畜尿により尿蛋白の排出を確認後DFAT細胞移植を行った。移植後の尿所見、血液検査、組織の改善の有無、移植されたDFATの局在などを中心に移植の治療効

果、機序の解明を平成28年12月にまで終了して別に結果を報告する予定である。

またTSG-6が免疫調整作用を発揮する際に作用点とされるCD44はスタンフォード大学や北里大学らの研究チームが糖尿病の原因物質でもあると米科学アカデミー紀要(電子版)に2012年4月10日報告している。これはDFAT細胞移植が、免疫異常を本態とする慢性糸球体腎炎のみならず糖尿病性腎症にも効果がある可能性も示唆されたものと考えている。また我々の研究室ではDFATがHGFを有意に産生するという結果も得ている。HGFは線維化抑制やアポトーシス抑制効果があるとされており、これは慢性腎臓病のもう一つの原疾患である腎硬化症の本態である線維化やアポトーシスをDFAT細胞移植により改善できる可能性を示唆しており、まとめると透析導入の3大原疾患である慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎硬化症のいずれもDFAT細胞移植で改善する可能性があるということである。それらの効果を検証して将来DFATの細胞移植を用いて慢性腎臓病を根治的に治す、全国に類を見ない、本学だからこそ可能な治療法を確立させるべく実験を遂行したいと考えている。

文 献

- 1) Maruyama T, et al. 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; 6:80.
- 2) Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, et al. Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation* 1986; 31:42.
- 3) Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, et al. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321:967.
- 4) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; 215:210.
- 5) McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 2006; 24:1246.
- 6) Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Engineering Part A* 2013; 19:1792.
- 7) Kato, Taigo, et al. Adipose Tissue-Derived Stem Cells Suppress Acute Cellular Rejection by TSG-6 and CD44 Interaction in Rat Kidney Transplantation. *Transplantation* 2014;98:3.