

免疫性腎炎に対するDFAT細胞療法の治療効果と安全性の検討

阿部雅紀¹⁾, 丸山高史¹⁾, 福田 昇²⁾, 福家吉伸¹⁾,
逸見聖一郎¹⁾, 松本太郎²⁾, 加野浩一郎³⁾

Evaluation of efficacy and safety of the dedifferentiated fat cells therapies for the immune-induced nephritis

Masanori ABE¹⁾, Takashi MARUYAMA¹⁾, Noboru FUKUDA²⁾, Yoshinobu FUKU¹⁾,
Seiichiro HEMMI¹⁾, Taro MATSUMOTO²⁾, Koichiro KANO³⁾

要旨

本学で開発された脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell; DFAT) は障害組織を修復するとされる間葉系幹細胞に類似した性質を持つ。一方、腎臓疾患は慢性化すると根治的治療が困難な場合が多く、経時的に悪化して腎予後や生命予後が不良となる。今回、このDFATの移植により慢性腎障害を来す疾患の中でも特に生命予後不良であるANCA関連腎炎に対する新しい治療法として期待できる結果が得られたので紹介する。

1. はじめに

本学生物資源科学部の加野らは皮下成熟脂肪細胞を脱分化させDFAT (dedifferentiated fat cell) を得る技術を開発、特許化した (特願平10-378013)。これまでDFATを再生医療の移植細胞源として骨、軟骨、筋、上皮および神経細胞などに分化転換させる技術の開発や間葉系幹細胞と同等の性質を有している事も解明してきた。間葉系幹細胞は多分化能を示し、再生医療分野において細胞移植源として期待されている。

DFATは、局所麻酔下に1gの脂肪組織を採取できれば調製可能であるため、侵襲や組織破壊が非常に少なく、心不全患者や高齢患者からも採取・調製が可能である。進行性腎障害に罹患した場合、根治的治療はなく透析療法を余儀なくされる事も少なくない。透析療法は週3回、1回あたり4時間拘束され患者自身のQOLが低下する。また、わが国の国民医療費に占める割合も年間1兆円以上と高額である。さらに、わが国の慢性腎臓病の患者数は1330

万人と推計されており、国民8人に1人が慢性腎臓病患者である。そのため、慢性腎臓病に対する根治的治療としての再生医療が期待されている。

一方、免疫性腎炎である慢性腎炎の治療はステロイド療法が主体であるが、長期ステロイド内服による感染症、骨粗鬆症、糖尿病などの副作用が出現することも多く、最終的には末期腎不全に至る予後不良な疾患であり、代表的な透析導入の原疾患の一つでもある。われわれはDFAT細胞移植の進行性腎障害に対する作用を検討し、DFATは間葉系幹細胞と同様に免疫抑制作用を介して、免疫性腎炎である慢性腎炎モデルの病態を改善することを報告した¹⁾。その機序の一つとして、TSG-6 (Tumor necrosis factor-stimulated gene-6) が関与していることが明らかとなった。しかし、DFAT移植による詳細な免疫抑制作用機序は不明であり検討する必要があった。

ヒトにDFAT細胞移植を行う場合、基本的には患者自身の細胞、血清を用いてDFATを作成、培養、増殖させて移植に役立てる計画であるため拒絶反応

1) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野
2) 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野
3) 日本大学生物資源科学部応用生物科学科
阿部雅紀: abe.masanori@nihon-u.ac.jp

などの免疫毒性の副作用は考えにくいと思われる。しかし、多彩な細胞への分化能を有する幹細胞の一種であるDFATを移植した場合、何らかの部位に生着し、異所性組織形成を起こす可能性や形質転換による癌化の可能性も完全には否定できない。DFATは他の再生医療の移植細胞源と比較し、これらの可能性が低いと考えられる。しかし、自家移植の場合であってもこれらの安全性の検証も必要である。また、緊急度が高い疾患の場合、患者自身のDFATを作製する時間がなく、他人由来の凍結保存DFATを利用する、つまり他家移植を行う可能性も考えられる。

そのため、DFATを臨床応用するために移植による免疫毒性、異所性組織形成・癌化などの安全性についても検討する必要がある。

2. 対象及び方法

- 1) SCG/ThpNkc マウスは他のマウスと異なり、生命力の弱いマウスである。そのため、同マウスを輸入後は体力低下でそのまま死亡することもまれでなく、実験で使用する場合は輸入後、良好な環境におきその後繁殖した次世代マウスを使用することが必要になった。また繁殖後も本マウスは約8週齢より糸球体腎炎および血管炎を発症するため、雌親の授乳が困難であるため、ddy マウスを同時期に同数交配し里親として使用した。5週齢のSCG/ThpNkc マウスを一週間の順化期間後、繁殖し、実験用マウスを作出する。繁殖では1回の繁殖で約5頭の出産が予想されることから、実験に使用する41頭を得るためにはメス9頭の交配が必要となった。
- 2) 7週齢のSCG/ThpNkc マウスにddy マウス由来DFATをそれぞれ 1×10^6 個/頭、 1×10^5 個/頭、 1×10^4 個/頭の割合で各4頭ずつ静脈より細胞移植を行った。さらに移植後の体内分布を検討するため、PKH26GLでラベルしたDFATを 10^5 個/頭の割合で移植した。
- 3) 細胞移植後1カ月飼育した。その間1週間おきに体重測定、畜尿を施行した。1日尿蛋白量と定性試験にて潜血反応の経過を観察した。
- 4) 移植1カ月後、ddy マウス由来DFATを移植した群では生化学的検査として血液中のBUN, Cre, ANCA, ANA, WBC, CRP, IL-1, 6, 8, TNF- α , TSG-6濃度をELISA法で測定した。腎臓と肺に

ついてReal-time PCR解析、Western blot法を用いて免疫制御分子としてTSG-6・IDOを、Th1-type cytokineとしてIFN- γ ・TNF- α を、M1マクロファージ関連サイトカインとしてMCP-1・IL-6・IL-12をM2マクロファージ関連サイトカインとしてCCL17・IL-4・IL-10・mannose receptorの発現の変化を観察した。これによりDFAT細胞移植が免疫系のどの部位に作用するかを検討した。また移植片対宿主病(graft-versus-host disease; GVHD)の症状としての皮膚病変、消化器病変、肝臓病変の有無についても検討した。

3. 結果

移植後のDFATの体内分布について、PKH26GLでラベルしたDFATは投与後1時間においてDFATの肺でのトラップが確認され、その他の臓器への分布は認めなかった。その後1週間、2週間と徐々に肺にトラップされDFAT数は減少していったが、この間その他の臓器への移行は認めなかった(図1)。移植細胞数については 1×10^5 個/頭投与した群が最も生存率、治療成績が良く今回の結果ではこの方法が最適と考えられた。以下の結果はDFATを 1×10^5 個/頭投与した結果について述べる。

生存率についてはDFAT投与群が移植2か月後89%であったが、腎炎群(非移植群)が67%と低下しており、生存率の改善を認めた(図2)。尿蛋白排泄量はDFAT移植群で有意な低下を認めた。腎臓組織の評価として、組織GIS(Glomerulus injury score; 糸球体障害指数)は腎炎群と比較し、DFAT投与群で改善を認めた(図3)。一方、尿細管障害指数であるTIS(Tubulointerstitial injury score)では2群間において有意な差は認めなかった。

腎臓でのTSG-6のmRNA発現は腎炎群と比較し、DFAT投与群において有意な発現の亢進($P=0.041$)を認めた(図4)。TSG-6の発現を免疫組織学的に観察した。染色性は腎炎群とDFAT投与群で糸球体において同等であった。一方、腎間質でのTSG-6の染色性は、腎炎群と比較し、DFAT投与群において、近位尿細管と遠位尿細管の両者において亢進を認めた。またCD44の発現は、DFAT投与群で低下傾向であった。免疫調整物質であるIL-10の発現はDFAT投与群で増加傾向であり、PGE2の発現は、腎炎群と比較し、DFAT投与群で増加傾向であった。

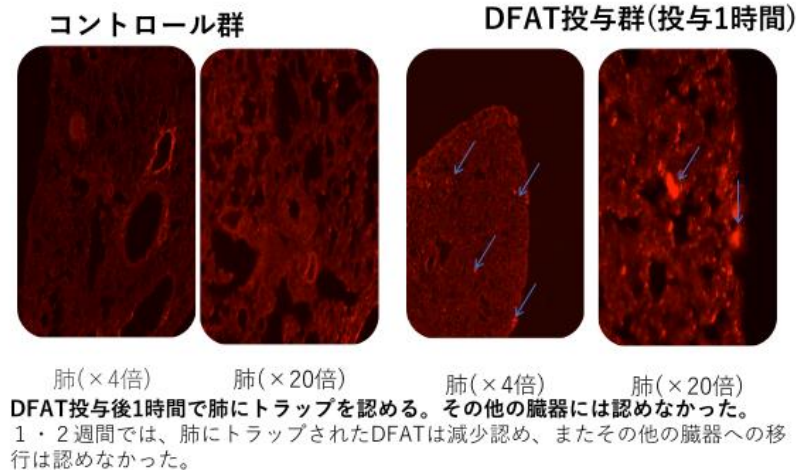


図1 DFATの肺への分布

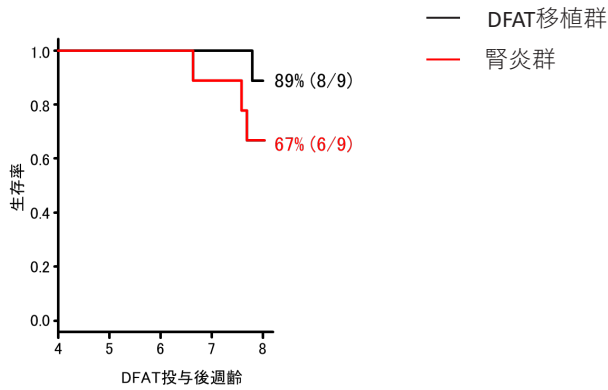


図2 2群間の生存率

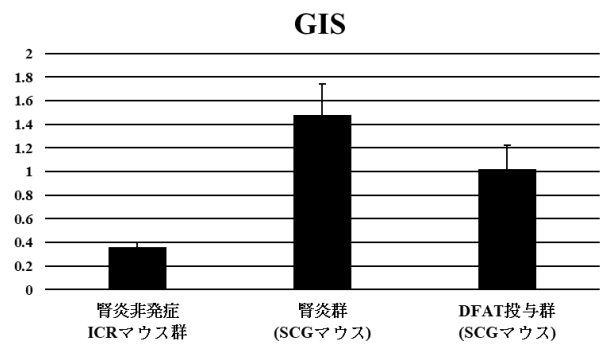


図3 GISの比較

IL-1 β の発現は両群で差を認めず、TNF- α の発現は腎炎群と比較しDFAT投与群で低下傾向であった。またM1マクロファージのケモカインであるMCP-1の蛋白発現は、腎炎群と比較し、DFAT投与群において有意な発現低下 (P=0.04) を認めた(図5)。M2マクロファージに発現するケモサイトカインであるCCL-17の蛋白発現は、腎炎群と比較してDFAT投与群で有意な発現亢進 (P=0.04) を認めた(図6)。real-time PCR法でICAM、VCAMにおいては両群に優位な発現の差を認めず、脾臓細胞におけるActivated Tregの発現は両群に有意差を認めなかった。

以上より、DFATが免疫性腎炎を改善する機序として、抗炎症作用をもつTSG-6の発現亢進と、M1マクロファージからM2マクロファージへの形質変換の誘導が病態の改善に関与していると考えられた。

またDFATについての催奇形性であるが、肺には

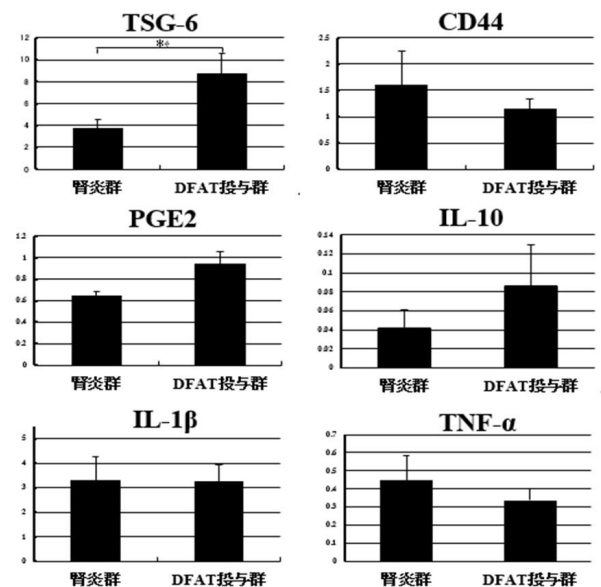


図4 DFAT投与後の腎におけるreal-time PCR

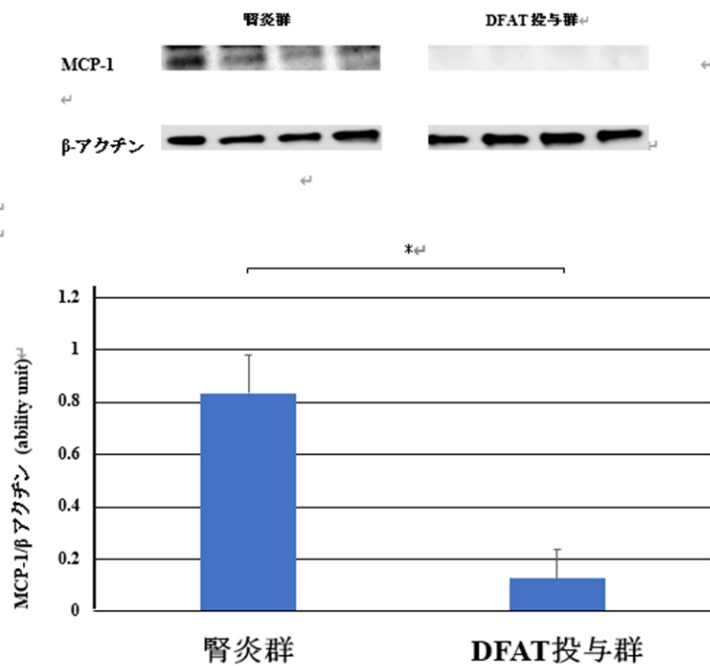


図5 MCP-1の発現

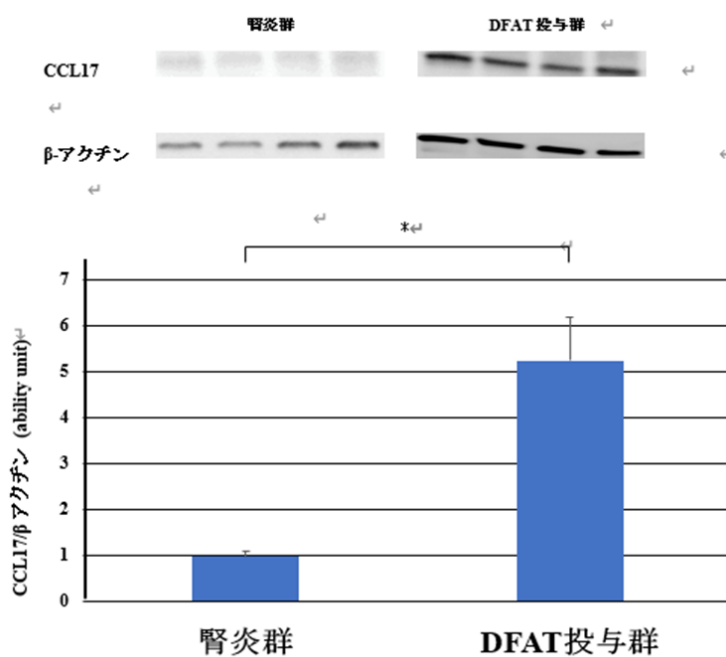


図6 CCL17の発現

DFATがトラップされた後も肺への腫瘍形成などは認められず、現時点でのDFATによる催奇形性は認められなかった。また、GVHDが移植後に観察されることはなかった。これらより、DFATの細胞移植が難治性の自己免疫性腎炎に治療効果、副作用の両

面から考えても臨床応用が可能であることが示唆された。

4. 考 察

厚生労働省進行性腎障害調査研究班と日本腎臓学会の指針では、「腎炎を示す尿所見を伴い、数週から数ヶ月の経過で急速に腎不全が進行する症候群」と定義される急速進行性糸球体腎炎 (Rapidly progressive glomerulonephritis; RPGN) は、近年患者数が増加しており、またわが国の新規透析導入原疾患の第5位を占めている²⁾。ANCA関連腎炎はRPGNをきたす原疾患のなかで、最も頻度が高い疾患である³⁾。また、ANCA関連腎炎はステロイド治療により一時的に軽快しても再発を繰り返し、生命予後不良な疾患である。本研究は、ANCA関連腎炎に対して、新たな免疫抑制療法としてのDFAT移植療法の効果をANCA関連腎炎モデルマウスであるSCGマウスを用いて検討を行った。Lee等はMSCを経静脈的に全身投与すると、その大多数が肺にトラップされ、24時間でトラップされた細胞が約半数となり、またその他の臓器への移行はごく僅かであることを報告している⁴⁾。本研究においても、DFAT投与後1時間で肺へのトラップを認めたが、その他の臓器へのトラップはほとんど認めなかった。その後、肺におけるDFATの数は徐々に減少していったが、その他の臓器への移行は認めなかった。

続いて、SCGマウスがANCA関連腎炎を発症していることを確認した。機能的には尿蛋白量の増加を12週齢では認めなかったものの、形態学的に糸球体の半月体形成像を認めANCA関連腎炎の腎組織障害の所見であった。さらに血中MPO-ANCA濃度が腎炎を発症しないICRマウスよりも高く、SCGマウスの腎炎がANCA関連腎炎であることを確認した。

このSCGマウスのANCA関連腎炎に対してDFAT移植の効果を検討した。DFAT投与群では腎炎群と比較し、GIS評価で抑制傾向を認め、TIS評価ではDFAT投与による変化を認めなかった。これらの結果はDFAT投与が、ANCA関連腎炎における糸球体での半月体形成を含む糸球体障害の抑制効果を有する可能性を示唆する一方、DFAT投与による腎臓の尿管間質傷害に対する効果は弱いと考えられた。

DFAT移植後の腎機能の検討では、尿蛋白定量や血清Cr値、血清MPO-ANCA値でDFAT投与群と腎炎群の間に差を認めなかった。しかしNeumannらは、SCGマウスでは16週齢までは週齢が高くなるのに応じて病理像での半月体形成が増加することを

報告している⁵⁾。今後の研究でSCGマウスの週齢が高くなることで腎炎が進行していけば、DFAT移植による効果が出現する可能性が考えられる。本研究の観察期間が短期間であったため、今後は期間をより延長して腎炎発症に伴う変化を検討する必要がある。ProckopはMSCが免疫調整能を発揮する機序として、2種類の機序について報告している⁶⁾。一つは、TSG-6を分泌することにより、T細胞上に存在する接着因子のCD44を抑制し、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報告がある⁷⁾。もう一つの機序としては、PGE2の分泌をすることにより、M1マクロファージからM2マクロファージへの形質転化を誘導することで炎症反応調整が制御されているとの報告である⁸⁾。本研究において、腎炎群と比較し、DFAT投与群では、抗炎症性作用を有するTSG-6の腎臓でのmRNAの有意な発現亢進を認め、蛋白発現量も増加を認めた。またCD44のmRNA発現においては腎炎群と比較し、DFAT投与群では低下を認めた事より、DFATが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可能性が示唆された。今後CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞の分布の比較を免疫染色やフローサイトメトリーで検証していく必要がある。また間葉系幹細胞がPGE2やIL-6依存性に、免疫抑制物質である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により、抗糸球体基底膜抗体型腎炎において腎保護作用を発揮することが報告されている⁹⁾。今回の研究においても腎臓でのmRNA発現において、抗炎症性メディエーターであるPGE2の腎での発現は、腎炎群と比較しDFAT投与群で増加傾向を認めた。同じく抗炎症性サイトカインであるIL-10のmRNA発現において、腎炎群と比較し、DFAT投与群で増加傾向を認めた。また腎炎群と比較し、DFAT投与群においてM1マクロファージの発現するケモカインであるMCP-1の蛋白発現低下を認め、M1マクロファージの産生する炎症性サイトカインであるTNF- α のmRNA発現は低下傾向を認めている。さらにM2マクロファージに発現するケモカインであるCCL17の蛋白発現が増加していることより、DFATが免疫調整能を発揮する機序の一つとして、M1マクロファージからM2マクロファージへの形質変換を誘導し、その結果IL-10等の抗炎症性サイトカインが産生されるなど

の機序を介して関与していることが示唆された。今後、DFAT投与により浸潤性マクロファージと免疫調整性マクロファージの分布にどのような差があるのかを検証していく必要がある。

今後の課題としては、安全性の確認のためには、さらに長期間の観察の必要性がある。SCGマウスは平均生存日数が120日であるため、今回の観察は12週齢までとした。しかし生存率や、DFAT投与後の副作用や催腫瘍性の確認のためにはより長期間の観察が必要である。

臨床でのGVHD等に対する間葉系幹細胞に対する免疫抑制療法や癌に対する活性化自己リンパ球療法が免疫抑制細胞療法として実地医療として行われているが、細胞療法の安全性確保のため、厚生労働省は臨床治験や再生医療等製品として患者に投与される細胞製品については、平成25年に医薬品医療機器等法を制定し、さらに平成30年に改正をした。その中で細胞移植も、薬剤と同様に投与量の設定が必要となった。本実験では、DFAT 1×10^5 個/頭の経静脈投与では明らかな有害事象を認めなかったが、今後はさらなる投与量の調整を行っていく必要がある。また間葉系幹細胞の免疫調整能を發揮するメカニズムとして、液性成分による免疫担当細胞への影響のほかに、T細胞のアポトーシスが誘導され、その結果免疫応答を制御する制御性T細胞が増加することで免疫寛容を獲得することも報告されている⁹⁾。DFATは調整が容易で安全性も高く、自己移植と比較して同種移植での安全性・効果の非劣勢も証明されている。DFAT移植の免疫性腎炎への実用化に向けて、その免疫調整能の機序についてさらなる検証が必要である。

5. 結語

本研究により、ANCA腎炎モデルSCGマウスへの経静脈的DFAT移植では、腎組織像において半月体形成を含む糸球体障害を抑制する効果を認め、その機序として、腎臓でのTSG-6発現亢進による抗炎症作用と、単核球系でのM1マクロファージからM2

マクロファージへの形質変換を介した全身性の免疫調整能が関与している可能性が考えられた。このことは本疾患に対してDFATを用いた免疫抑制細胞療法確立の可能性を示唆するものと考えられる。

謝辞

本研究は、「令和2年度日本大学学術研究・総合研究」の助成により実施しました。本研究にあたり、研究の機会を与えて頂いた本学に感謝致します。研究全般においてご指導いただきました医学部 福田 昇 研究所教授、松本太郎教授、生物資源学科 加野浩一郎教授に心から感謝致します。そして、多くのご援助をいただきました日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内科学分野 医局員、ご協力いただきました皆様に深く感謝致します。

文献

- 1) Maruyama T, Fukuda N, Matsumoto 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. 2015; 6: 80.
- 2) 新田孝作, 政金生人, 花房規男, 他. 我が国の慢性透析療法の現況2017. 透析会誌. 2018; 51: 699-766.
- 3) 丸山彰一監修. エビデンスに基づく急速進行性腎炎症候群 (RPGN) 診療ガイドライン2017. 東京医学社. 2017.
- 4) Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. Cell Stem Cell. 2009; 5: 54-63.
- 5) Neumann I, Birck R, Newman M, et al. SCG/Kinjoh mice: a model of ANCA-associated crescentic glomerulonephritis with immune deposits. Kidney Int. 2003; 64: 140-148.
- 6) Prockop DJ. Concise review: Two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. Stem Cells. 2013; 31: 2042-2046.
- 7) Kato T, Okumi M, Tanemura M, et al. Adipose tissue-derived stem cells suppress acute cellular rejection by TSG-6 and CD44 interaction in rat kidney transplantation. Transplantation. 2014; 98: 277-284.
- 8) Furuhashi K, Tsuboi N, Shimizu A, et al. Serum-Starved Adipose-Derived Stromal Cell Ameliorate Crescentic GN by Promoting Immunoregulatory Macrophages. J Am Soc Nephrol. 2013; 24: 587-603.
- 9) 秋山謙太郎, 古味桂子, 窪木拓男. 間葉系幹細胞の新しい機能—免疫調節細胞としての間葉系幹細胞—. 日補綴会誌. 2016; 8: 346-353.