

201322011A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)

卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する
新規移植再生療法の開発

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池田 智明

平成 26(2014) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)

卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する
新規移植再生療法の開発

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池田 智明

平成 26(2014) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する新規移植再生療法の開発に関する研究」

池田 智明 1

II. 分担研究報告書

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた細胞治療の臨床応用を目指した環境整備」

池田 智明 7

「全身性エリテマトーデスモデルにおけるヒト羊膜MSC移植による治療効果に関する研究」

高原 史郎 11

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた心臓血管外科領域における全身炎症抑制療法に関する研究」

丸井 晃 15

「胎児付属物（臍帯、卵膜）由来MSCを用いたGVHD治療」

相馬 俊裕 19

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた炎症性腸疾患の新規治療法の開発」

大西 俊介 21

「胎児付属物由来間葉系幹細胞の細胞製剤化を目指した研究」

山原 研一 25

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野））

総括研究報告書

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する
新規移植再生療法の開発に関する研究」

研究代表者 名前 池田 智明 所属 国立循環器病研究センター

研究要旨：卵膜由来間葉系幹細胞(MSC)移植による各種難治性疾患に対する新たな治療法確立を目指し、昨年度に引き続き、モデル動物の確立と作成したモデル動物に対する卵膜 MSC 移植による病態改善効果検証を行った。結果、全身性エリテマトーデス、人工心肺、炎症性腸疾患モデルにおいて、卵膜 MSC による治療効果を証明し、卵膜 MSC の免疫・炎症性疾患に対する細胞治療応用の可能性を証明した。更に胎児付属物由来 MSC の早期臨床応用を目指し、セルプロセッシングセンターでの臨床試験用胎児付属物 MSC の細胞調整、更には担当分担研究者の施設倫理委員会において、同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD に対する第一相臨床試験の計画承認並びに Crohn 病に対する臨床試験計画を立ち上げた。

A. 研究目的

近年、骨髄や脂肪組織などに存在する間葉系幹細胞（MSC:mesenchymal stem cells）を用いた再生医療応用研究が行われている。我々は自己骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)移植の難治性心不全に対する基礎および臨床応用研究（臨床試験登録:UMIN000000656）を行い、その効果を証明してきた。しかしながら、自己骨髄 MSC は、その樹立に侵襲を伴い重病人には不適である、培養時間を要するため迅速対応が困難である、白血病など骨髄疾患では不適である、といった問題点がある。これら問題を解決すべく、最近我々は通常破棄され、侵襲性がなく、倫理的問題の少ない胎児付属物である卵膜・臍帯から MSC の樹立に成功し、その細胞移植による組織再生効果を確認している。

このように組織再生を目的とした研究が

進んできた MSC 移植であるが、最近ではその免疫調節作用が注目され、骨髄移植における GVHD 予防、クローン病、敗血症などに効果のある可能性が示され、臨床応用も開始されつつある。しかしながら、上記再生医療同様、自己骨髄 MSC を中心とした研究が主体であり、卵膜・臍帯を含む他家 MSC による免疫調節作用の可能性を指摘し、その臨床応用を目指した研究は進んでいない。即ち、胎児付属物 MSC は他家移植であり、骨髄を含む自己 MSC と比較し、ホスト側の免疫応答反応により免疫調節作用効果が異なる可能性が考えられる。

そこで、本研究では、新たな細胞移植ソースである胎児付属物 MSC に着目し、①免疫調節作用を利用した卵膜 MSC 移植に関し、その治療効果、他家移植による免疫応答反応、安全性評価を、心・腎虚血再灌流、人工心肺、GVHD、炎症性腸疾患、全

身性エリテマトーデスなどの各種難治性疾患モデルにおいて総合的な観点から詳細な検討を行い、各種難治性疾患に対する新規細胞移植療法開発を目指した前臨床応用研究を進めた。更に、胎児付属物 MSC の早期臨床応用を目指し、セルプロセッシングセンターでの胎児付属物 MSC の調整(分離、大量培養、凍結保存)を行い、同時に、先行する骨髄 MSC を用いた治験に習い、同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD・Crohn 病に対する第一相臨床試験を立ち上げ、各関係施設倫理委員会において研究計画承認を目指した。

B. 研究方法

昨年度に引き続き、卵膜 MSC による免疫・炎症調節機能解析、並びに各分担研究者の専門分野においてその治療が問題となっている難治性疾患のモデル動物確立と卵膜 MSC 移植による治療効果検討を行った。

①高原らは、マウス全身性エリテマトーデスモデルを用い、卵膜MSC移植による病態改善効果ならびにその作用機序を検討した。

②丸井らは、人工心肺モデルを確立し、卵膜 MSC 移植による抗炎症効果、臓器保護効果を証明した。

④大西らは、ラット炎症性腸疾患モデルを確立し、病理学的評価並びに局所における炎症性サイトカイン分泌の検討、更には卵膜 MSC 移植による治療効果を証明した。

更に胎児付属物 MSC の早期臨床応用を目指し、特に骨髄 MSC において先行治験が行われている同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD・Crohn 病に対する治療応用を検討した。

⑤胎児付属物 MSC (卵膜：担当池田ら、臍帯：担当相馬ら) の同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD に対する臨床試験の準備を開始した。

⑥山原らは、臨床試験使用に相応しい胎児付属物 MSC 調整を目指し、その製剤化に向けた検討を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト胎児付属物の採取は、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、各関係施設の倫理委員会の審査により承認後、提供者本人による書面での同意を得て実施した。また、提供者に対するインフォームド・コンセントは書面で行った。

C. 研究結果

①マウス全身性エリテマトーデスモデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討 (高原ら)

マウス全身性エリテマトーデスモデルは、13週齢雄 BALB/c マウスに対してプリスタン (pristane; 2,6,10,14-tetramethylpentadecane) を 500 μ l 腹腔内投与することにより SLE モデルを作成した。同時にヒト羊膜 MSC(1×10^5 細胞/10g 体重)を経静脈的に投与し、以後隔週で投与した。プリスタンにより誘導される蛋白尿は、羊膜 MSC 移植により有意に改善した。組織学的検討では、羊膜 MSC 移植により、糸球体における IgG 沈着の減少、間質におけるマクロファージ浸潤の抑制、腎組織における MCP-1 や IL-4 の発現減少、を認めた。これらの事から、卵膜 MSC 移植が全身性エリテマトーデスモデルにおいて、治療効果を発揮することが明らかとなった。

②ラット人工心肺モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討（丸井ら）

ラット人工心肺モデルを、ラット用の人工心肺回路を独自考案し、作成した。人工心肺により著明に増加した血中および肺組織中の TNF- α 、IL-6、IL-1 β は、卵膜 MSC に移植により顕著に減少し、組織学的検討においてもその肺障害が移植により抑制されていた。更に、卵膜 MSC 移植による肺障害抑制メカニズムを検討したところ、TGF- β 、KGF 発現増加が関与していることが示唆された。

④ラット炎症性腸疾患における卵膜 MSC 移植による治療効果検討（大西ら）

ラット炎症性腸疾患モデルは 8%デキストラン硫酸(DSS)を 5 日間連日経口投与し作成した。投与開始 2 日目に卵膜 MSC(1×10^6)を経静脈的に投与し、細胞投与 4 日間の体重変化・臨床重症度検討と、4 日目の大腸の長さ、病理学的検討を行ったところ、全ての項目において、卵膜 MSC 移植による改善を認めた。卵膜 MSC 移植により、直腸における TNF- α 、IL-1 β 、MIF などの炎症性サイトカインの発現が有意に減少し、組織学的検討では腸管組織におけるマクロファージ浸潤の抑制を認めた。

⑤胎児付属物 MSC 移植（卵膜：担当池田ら、臍帯：担当相馬ら）を用いた同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD に対する臨床試験導入

卵膜・臍帯由来間葉系幹細胞 (MSC) を用いた細胞治療の早期臨床応用をめざし、骨髄 MSC を用いた治験が進んでいる、同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD 治療を目的とした臨床試験導入を目指した。厚生労働省研究開発振興課高度医療係との事前相談

を踏まえ、第一相臨床試験プロトコールを作成し、今後早期の先進医療 B 導入を目指している。現在、第一相試験に関しては、施設倫理委員会の承認を得ており、来年度から試験開始を行う予定である。

⑥臨床試験使用に相応しい胎児付属物 MSC の製剤化に向けた検討（山原ら）

胎児付属物由来 MSC の臨床応用をめざし、その細胞製剤化を目指した検討を行った。結果、倫理委員会の承認の元、胎児付属物 MSC のセルプロセッシングセンター (CPC) での大量培養とその凍結保存、品質管理法の確立を行い、更には PMDA 薬事戦略相談において、細胞製剤に必要な要件の確認を行った。

D. 考察

昨年度に引き続き、各分担研究者が得意分野とする各種難治性疾患モデルを確立し、卵膜 MSC 移植による治療効果を証明した。

全身性エリテマトーデス、人工心肺、炎症性腸疾患の各モデルにおいて、卵膜 MSC 移植が治療効果を発揮し、その効果はこれまでの *in vitro* での結果に合致し、免疫・炎症制御によるものであった。我々は卵膜 MSC の臨床応用を想定し、他家移植にこだわって検討を行ったが、既報の骨髄 MSC を用いた検討同様、自家・他家を問わず MSC は免疫・炎症抑制に働くことが証明された。

更に今年度は、目標である卵膜・臍帯 MSC 移植の臨床応用を目指した整備を開始し、その細胞製剤化に向けた検討と、造血幹細胞移植後の急性 GVHD 治療をターゲットとした第一相臨床試験プロトコール作成およびその倫理委員会承認を得た。既に、米国 Osiris 社や日本ケミカルリサーチ社は

骨髄 MSC を用いた治験による同様の検討を進めているが、大量・長期培養の必要性から、骨髄 MSC 製剤は高額になる可能性が高い。我々の胎児付属物 MSC の特徴は、①大量の MSC を初代培養で得られること、②結果、比較的少ない継代数で目的細胞数 ($>10^{10}$ 細胞) を確保出来ること、を特徴とし、骨髄 MSC と比較し低コストで調整出来る。今後、将来的な治験導入を見据え、胎児付属物 MSC の細胞製剤化を考えており、それを旨とした議論を PMDA と継続していく予定である。また、急性 GVHD 以外では分担研究者大西らが専門とする Crohn 病に対する治療応用を目指し、北海道大学病院高度先進医療支援センターの支援を受け、同 CPC での卵膜 MSC を GMP 準拠にて製造予定である。

E. 結論

卵膜 MSC 移植による各種難治性疾患に対する新たな治療法確立を目指し、様々なモデル動物の確立に加え、作成したモデル動物に対する卵膜 MSC 移植の、免疫・炎症調整効果による病態改善を確認した。更に、卵膜・臍帯 MSC 移植の早期臨床応用を目指し、既に骨髄 MSC を用いた治験が進んでいる急性 GVHD 治療応用を検討し、その細胞調整、第一相臨床試験の整備を行った。今後、GVHD や Crohn 病を含む各種難治性免疫関連疾患に対し、胎児付属物 MSC を用いた新規細胞治療を強力に推進していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K, Ikeda T. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. PLoS One. 2014;9(2):e88319.
- 2) Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34(+) cells in a mouse model of neonatal stroke. Neuroscience. 2014;263:148-58.
- 3) Ishikane S, Hosoda H, Yamahara K, Akitake Y, Kyoungsook J, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Miyazato M, Kangawa K, Ikeda T. Allogeneic transplantation of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets increases neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. Transplantation. 2013;96(8):697-706.
- 4) Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Yazawa K, Kaimori JY, Taguchi A, Kangawa K, Ikeda T, Takahara S, Isaka Y. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived

mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. Cell Transplant. 2013 in press.

2. 学会発表（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

国内学会

- 1) 津田 秀年(国立循環器病研究センター再生医療部), 山原 研一, 大谷 健太郎, 斯波 真理子, 寒川 賢治, 高原 史郎, 猪阪 善隆 急性腎障害モデルにおける抗炎症性因子を介した同種他家卵膜由来間葉系幹細胞移植の腎保護作用 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (2013.11.23)
- 2) 河嶋 秀和, 銭谷 勉, 大谷 健太郎, 福田 肇, 橋川 美子, 山原 研一, 犬伏 正幸, 飯田 秀博 心筋梗塞モデルラットに移植したhNIS発現細胞シートのSPECTイメージング 日本薬学会第133年会 (2013.3.29)
- 3) 銭谷 勉, 大谷 健太郎, 河嶋 秀和, 福田 肇, 橋川 美子, 森口 哲朗, 越野 一博, 堀 祐樹, 圓見 純一郎, 井口 智史, 山本 明秀, 山原 研一, 犬伏 正幸, 飯田 秀博 レポーター遺伝子とSPECTを用いた心筋梗塞モデルラットにおける移植細胞シートの機能定量イメージング 第8回日本分子イメージング学会総会・学術集会 (2013.5.30)
- 4) 第 66 回日本胸部外科学会定期学術集会(2013/10/16-19 仙台市)卵膜由来間葉系幹細胞の他家移植による全身炎症および肺障害に対する治療の可能性～ラット人工心肺モデルを用いた検討～

国際学会

- 1) Onishi R, Ohnishi S, Higashi R, Watari M, Kobayashi W, Katsurada T, Takeda H, Sakamoto N. Transplantation of human fetal membrane-derived mesenchymal stem cells improves severe colitis induced by dextran sulfate sodium in rats. Digestive Disease Week 2013. Orlando. May 2013.
- 2) Ohnishi S, Onishi R, Higashi R, Yamahara K, Watari M, Kobayashi W, Katsurada T, Takeda H, Sakamoto N. Transplantation of human amnion-derived mesenchymal stem cells improves severe colitis via attenuation of macrophage activity in rats. International Society for Stem Cell Research 2013. Boston. June 2013.
- 3) The 21st Annual Meeting Of The Asian Society For Cardiovascular And Thoracic Surgery (ASCVTS2013). 2013.4.4-7. Kobe, Japan.
Novel approach to reduce systemic inflammation and lung injury following prolonged cardiopulmonary bypass using allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells in rats.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野））

分担研究報告書

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた細胞治療の臨床応用を目指した環境整備」

研究代表者 名前 池田 智明 所属 国立循環器病研究センター

研究要旨：卵膜由来間葉系幹細胞（MSC）を用いた細胞治療の早期臨床応用をめざし、急性 GVHD 治療を目的とした臨床試験導入を開始した。結果、第一相臨床試験プロトコール作成とその施設倫理委員会の承認を得た。

共同研究者

山原研一 国立循環器病研究センター
再生医療部
山本晴子 国立循環器病研究センター
先進医療・治験推進部
相馬俊裕 兵庫医科大学血液内科
佐藤典宏 北海道大学病院
高度先進医療支援センター
大西俊介 北海道大学医学部消化器内科
荒戸照代 北海道大学大学院医学研究科
レギュラトリーサイエンス部門

A. 研究目的

これまで間葉系幹細胞（MSC）は主に骨髄由来を用いた研究が報告されているが、骨髄採取による侵襲性や培養期間の必要性などの問題を有している。しかしながら、その先行性から骨髄MSCを用いた臨床試験が最も進んでいる。そこで我々は、非侵襲的で一度に多くの細胞数を確保可能な卵膜由来MSCのメリットを生かした臨床試験の早期開始を目指した環境整備を開始した。特に骨髄MSCにおいてその治験が最も進行している移植片対宿主病（GVHD）およびCrohn病をターゲットとした臨床試験

の早期開始を目指した。

B. 研究方法

胎児付属物 MSC を用いた細胞治療の第一相臨床試験プロトコール作成および倫理委員会申請

既に先行して治験が行われている骨髄 MSC を参考に、同種造血幹細胞移植後のステロイド抵抗性急性移植片対宿主病（GVHD）の症例を対象とした卵膜および臍帯 MSC を用いた細胞治療の第一相臨床試験計画を作成した。更に、骨髄 MSC を持った臨床研究が進んでいる Crohn 病に関し、北海道大学病院高度先進医療支援センターの協力を得て、卵膜 MSC を持った細胞治療計画を立ち上げた。

（倫理面への配慮）

ヒト卵膜 MSC の製剤化および急性 GVHD に対する細胞治療応用は、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、当センターおよび兵庫医大の倫理委員会の審査により承認後、提供者本人による書面での同意を得て実施した。また、提供者に対するインフォームド・コンセントは書面で行った。

C. 研究結果

胎児付属物 MSC を用いた細胞治療の第一相臨床試験プロトコール作成および倫理委員会申請

既報および米国 Osiris 社の同種造血幹細胞移植に伴うステロイド抵抗性急性移植片対宿主病（急性 GVHD）に対する骨髄 MSC 移植治療プロトコール (Biol Blood Marrow Transplant. 2009;15: 804-11) を参考に、羊膜・臍帯 MSC 細胞移植の第一相臨床試験計画書を作成した。対象は、同種造血幹細胞移植後に急性 GVHD を発症した患者で、初回細胞投与日に II 度以上(HLA 不適合の造血幹細胞移植を受けた場合は I 度以上)のステロイド抵抗性急性 GVHD と診断された者とした。細胞投与は一回あたり 2×10^6 個/kg の卵膜および臍帯 MSC を週 2 回 4 週連続（計 8 回）点滴静注することとし、主要評価項目は安全性評価として、細胞投与後 24 時間までの輸注毒性に伴う事象とした。本研究計画書は兵庫医大倫理委員会にて平成 25 年 1 月承認を受けた。

更に、北海道大学病院高度先進医療支援センターの協力を得て、既報および米国 Osiris 社の Crohn 病に対する骨髄 MSC 移植治療プロトコール() を参考に、羊膜 MSC 細胞移植の第一相臨床試験を計画した。対象は、。。。

考察

本研究は、胎児付属物 MSC を用いた①同種造血幹細胞移植における GVHD、② Crohn 病、③膠原病、などの難治性免疫関連疾患を対象とした細胞治療研究の早期確立を目指している。我が国でも、Osiris 社

からライセンスを受け、骨髄 MSC を用いた GVHD 治療を目的とした治験が行われているが、ソースである骨髄を米国から輸入するなどオリジナル性に乏しい。そこで、我が国発の新しい細胞治療法の開発を目指し、骨髄 MSC と比べて、①低コスト、②高い治療効果、という特徴を持つ胎児付属物 MSC を用いた細胞治療の早期臨床試験導入を目指す。従来医療廃棄物として遺棄されていた胎児付属物が免疫抑制能に優れた MSC を多く含有することに着目した本研究は、高いオリジナル性と共に将来的な治療応用の可能性を期待させるものである。

今年度は、先行する骨髄 MSC 治験にならない、胎児付属物 MSC を用いた急性 GVHD 治療の第一相臨床試験プロトコールを作成し、その倫理委員会承認を得た。今後、本プロトコールに基づいた臨床試験を兵庫医大と共に開始する予定である。また、Crohn 病に関しても分担研究者である北海道大学消化器内科大西先生が、同高度先進医療支援センターの協力を得て、第一相臨床試験を計画した。

E. 結論

胎児付属物 MSC を用いた細胞治療の早期臨床試験開始を目指し、その環境整備を行った。結果、先行する骨髄 MSC を用いた急性 GVHD・Crohn 病治療の治験をモデルに、卵膜・臍帯 MSC を用いた第一相臨床試験プロトコールの作成とその倫理委員会承認を得た。今後、本研究の強力な推進を進め、胎児付属物 MSC を用いた細胞治療を他の難治性免疫関連疾患への治療応用につなげたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K, Ikeda T. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. PLoS One. 2014;9(2):e88319.
2. Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34(+) cells in a mouse model of neonatal stroke. Neuroscience. 2014;263:148-58.
3. Ishikane S, Hosoda H, Yamahara K, Akitake Y, Kyoungsook J, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Miyazato M, Kangawa K, Ikeda T. Allogeneic transplantation of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets increases neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. Transplantation. 2013;96(8):697-706.
4. Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Yazawa K, Kaimori JY, Taguchi A, Kangawa K, Ikeda T, Takahara S, Isaka Y. Transplantation

of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. Cell Transplant. 2013 in press.

2. 学会発表（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

全身性エリテマトーデスモデルにおけるヒト羊膜MSC移植による
治療効果に関する研究

研究分担者 高原史郎

大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療学 寄附講座教授

研究要旨

全身性エリテマトーデスモデルマウスに羊膜由来間葉系幹細胞を移植したところ、ループス腎炎における腎機能を改善した。また治療機序として免疫調節作用を介していることが明らかとなった。

共同研究者

津田秀年 国立循環器病研究センター 再生医療部

山原研一 国立循環器病研究センター 再生医療部

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス (Systemic lupus erythematosus; SLE) は免疫応答異常による全身の結合組織および血管における免疫複合体の沈着を特徴とした全身性炎症性疾患であり、ループス腎炎は最も予後を左右する重要な臓器障害である。近年、ループス腎炎を含む腎疾患患者数は増加の一途をたどっており、それに伴う移植待機患者数も増加し続け深刻な問題となっている。SLEの予後はステロイドを含む免疫抑制剤の進歩とともに大きく改善されたが、その使用に伴う副作用はいまだ問題となっている。またSLEに対する腎移植の成績は他の腎疾患と同等であるが、移植前に病態コントロールが良好であるほど術後成績がよいことが知られており、SLEの活動性を良好に保ちつつ免疫抑制剤を減量していくことが望ま

しい。我々は免疫・炎症抑制効果をもつ羊膜由来間葉系幹細胞 (MSC) 移植によるSLEに対する有効性を検討した。

B. 研究方法

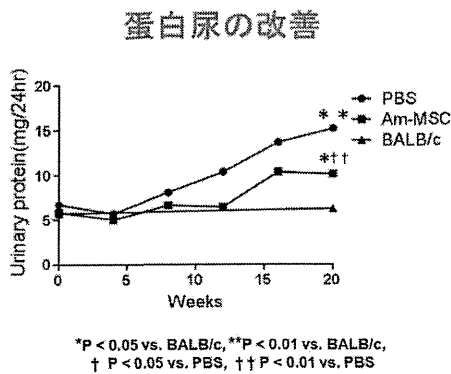
ヒト羊膜は帝王切開時に倫理委員会の承認ならびに母親の同意を得て採取し、分離・培養することで羊膜MSC(Am-MSC)を得た。13週齢雄BALB/cマウスに対してプリスタン (pristane; 2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane) を500 μ l腹腔内投与することによりSLEモデルを作成した。同時にAm-MSC (1x10⁵個/10g 体重) を尾静脈より移植し、以後隔週で行った。また病態対照としてプリスタン投与後、隔週でPBSを投与した群、正常対照としてPBSのみ隔週で投与したBALB/c群も作成した。その後、20週経過後に生化学的・病理学的評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」等に従い、動物実験委員会に研究計画書を提出、承認を受け、動物愛護に配慮して実施した。

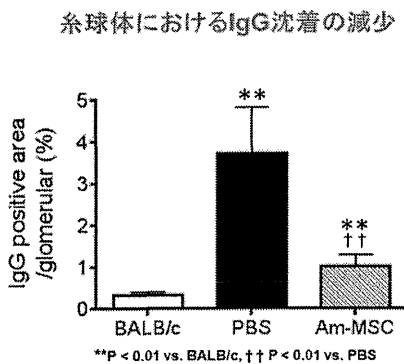
C. 研究結果

プリスタン投与後8週目から著しい蛋白尿の増加がみられた。投与後20週目においてAm-MSc移植により有意に改善した。(BALB/c 群 ; 6.3± 0.3mg/24hr, PBS 群 ;15.2±1.3mg/24hr, Am-MSc 群 ;10.2±1.3 mg/24hr) (図1)



(図1)羊膜MSC移植による蛋白尿の減少

次に組織学的検討を行ったところ、プリスタン投与により糸球体の腫大、富核や基底膜の肥厚といった異常な糸球体が多く見られた。一方、Am-MSc移植群においては、それらが減少しており、糸球体におけるIgG沈着も同様に減少していた。(図2)

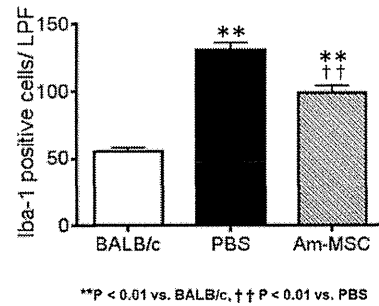


(図2)羊膜MSC移植による糸球体IgG沈着の減少

次にマクロファージ浸潤を評価するため抗Iba-1抗体を用いて免疫染色を行ったところ、

病態群では間質に多くのマクロファージ浸潤がみられたが、Am-MSc移植により有意に減少した。一方、糸球体における浸潤はほぼみられず3群間で差はなかった。(図3)

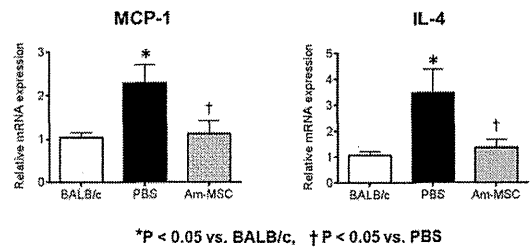
間質におけるマクロファージ浸潤抑制



(図3)羊膜MSC移植によるマクロファージ浸潤の抑制

また、腎皮質よりRNAを抽出し、定量的リアルタイムPCR法にて解析を行ったところ、プリスタン投与よりマクロファージの走化因子であるMCP-1やB細胞の活性化やIgGへのクラススイッチ誘導するIL-4の腎mRNA発現が亢進されており、羊膜MSC移植群にて有意に抑制されていた。(図4)

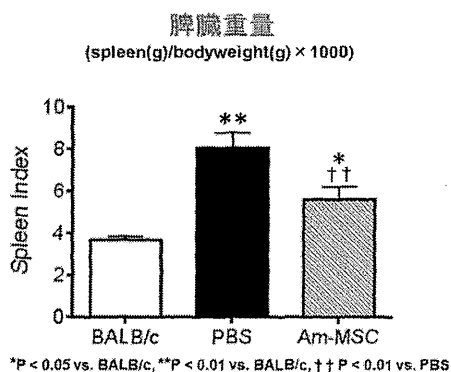
腎臓におけるmRNA発現の検討



(図4)羊膜MSC移植による腎MCP-1およびIL-4発現の抑制

SLEではしばしば脾腫を含むリンパ節肥大がみられるので、脾臓重量を体重で補正し評価したところ、PBS投与群で有意な脾

臓重量の増加がみられた。一方、Am-MSC



移植群において脾腫は軽減していた。(図5)

(図5)羊膜MSC移植による脾臓腫大の抑制

D. 考察

本モデルにおいて、羊膜MSC移植による腎機能の改善、異常糸球体数の減少および糸球体IgG沈着抑制がみられた。また、間質におけるマクロファージ浸潤抑制がみられ、これに伴い腎皮質におけるMCP-1およびIL-4の発現が減少していた。脾臓においては羊膜MSC移植により肥大が改善されていた。これらのことより、移植した羊膜MSCが脾臓および腎臓に対する抗炎症・免疫調節作用を発揮し、腎機能および組織障害を改善したことが示唆された。

E. 結論

羊膜MSC移植はループス腎炎を含むSLEの病態を改善し、組織保護および炎症調節作用を有することを明らかにした。今後、本治療がSLEを含む難治性疾患に対して新規治療となりうると考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Yazawa K, Kaimori JY, Taguchi A, Kangawa K, Ikeda T, Takahara S, Isaka Y. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. Cell Transplant. 2013 in press.

2. 学会発表

1) 津田秀年、山原研一、他5名、6番目 急性腎障害モデルにおける抗炎症性因子を介した同種他家卵膜由来間葉系幹細胞移植の腎保護作用 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

現時点では該当事項はない。

2. 実用新案登録

現時点では該当事項はない。

3. その他

現時点では該当事項はない。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野）
分担研究報告書

卵膜由来間葉系幹細胞を用いた心臓血管外科領域における
全身炎症抑制療法に関する研究

研究分担者 丸井 晃

京都大学医学部附属病院・探索医療センター 准教授

研究要旨

心臓血管外科領域の種々の疾患において、全身炎症から臓器不全に陥ることが知られている。我々は小動物人工心肺モデルを作成し、卵膜由来間葉系幹細胞の移植治療がどのように抗炎症効果、臓器保護効果を発揮するのかを検討した。

共同研究者

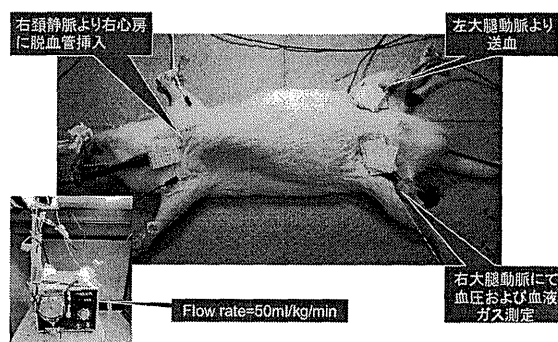
池田 智明 三重大学産婦人科
山原 研一 国立循環器病研究センター再生医療部
瀧 智史 京都大学医学部心臓血管外科
瀬戸崎 修司 京都大学医学部心臓血管外科
坂田 隆造 京都大学医学部心臓血管外科

A. 研究目的

人工心肺（CPB）を用いた心臓手術後の強い全身炎症は種々の臓器障害を招くことが知られており、原因の一つが高サイトカイン血症とされている。特に全身炎症に伴う急性肺障害は未だに高い死亡率につながり、有効な治療法がないのが現状である。我々はこれまでに心筋炎や腎炎において、他家卵膜由来間葉系幹細胞（FM-MSC）移植が、その抗炎症効果により臓器保護に働くことを証明しており、今回ラット CPB モデルを用いて、FM-MSC による全身炎症ならびに肺障害抑制効果の検討を行った。

B. 研究方法

Lewis ラットを Sham 群（カニュレーションのみ）、Control 群（CPB のみ）、MSC 群（CPB + FM-MSC）に分け、CPB はオリジナルに作成した回路システムを用いて 50ml/kg/min の flow で 30 分間維持した（図 1）。MSC 群は、Lewis ラットと MHC ハプロタイプの異なる ACI ラット由来 FM-MSC を CPB 開始前に 1×10^6 個経静脈的に移植した。

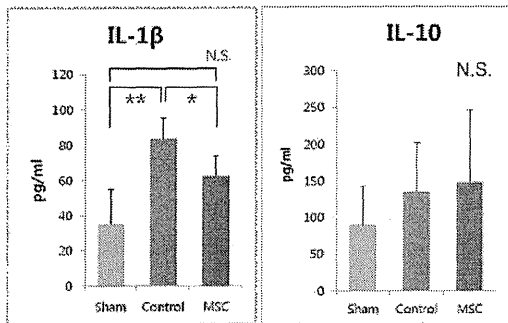
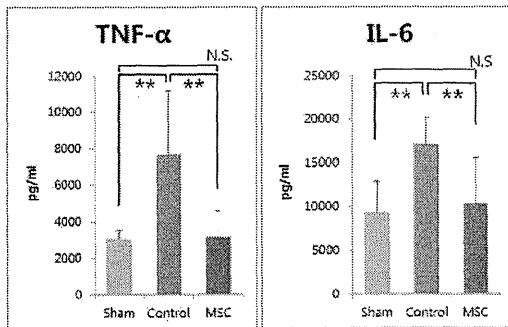


（図 1）ラット人工心肺モデル

C. 研究結果

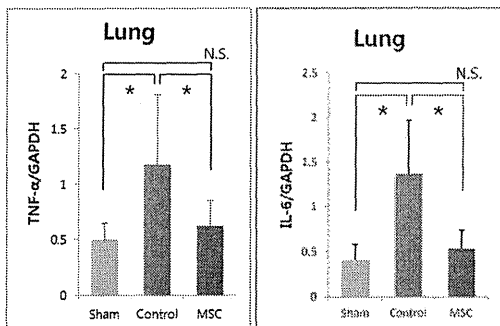
FM-MSC 群では、CPB 後 1 時間の血清サイトカイン値（TNF- α , IL-6,

IL-18) が Control 群に比し有意に減少し(図 2)、肺における TNF- α および IL-6 mRNA 発現も有意に低かった(図 3)。病理組織学的検討では、FM-MSC 移植による肺胞形態の維持と好中球浸潤の抑制が認められた(図 4)。また、FM-MSC の移植により、肺における TGF- β , KGF の mRNA 発現促進が認められた(図 5)。

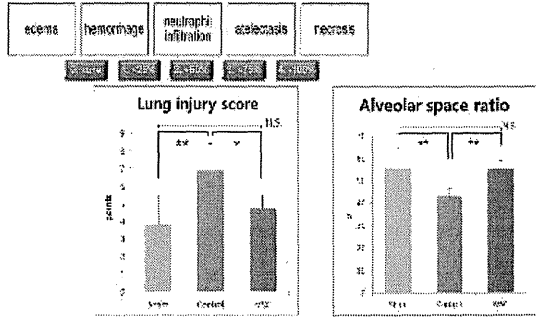
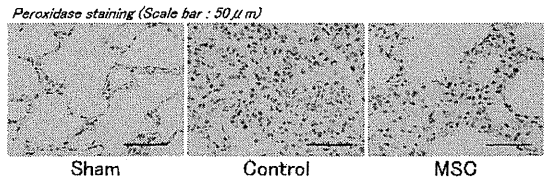
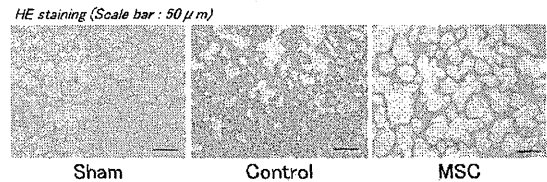


n=7, *p<0.05, **p<0.01

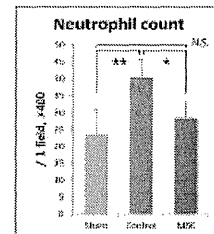
(図 2) 人工心肺終了 1 時間後の炎症性サイトカイン値



(図 3) 肺における炎症性サイトカインの mRNA 発現

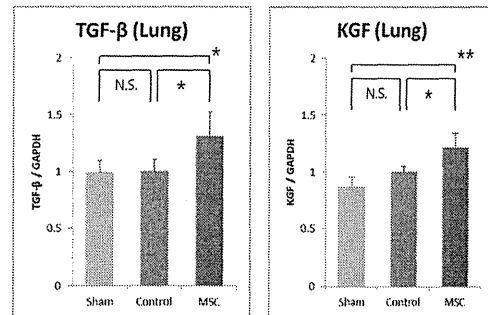


n=7, *p<0.05, **p<0.01



n=5, *p<0.05, **p<0.01

(図 4) 人工心肺後の肺障害スコア/好中球浸潤数



n=5, *p<0.05, **p<0.01

(図 5) 肺における TGF- β , KGF (mRNA) の発現