

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

脂肪由来幹細胞強皮症治療に関する研究

研究分担者 松尾清一 名古屋大学大学院医学系研究科 腎臓内科学 教授
丸山彰一 名古屋大学大学院医学系研究科 腎臓内科学 准教授
尾崎武徳 名古屋大学医学部附属病院 腎臓内科 病院助教

研究要旨

我々が開発した脂肪由来幹細胞(ASC)の低血清培養法は、高血清培養法と比較して優れた機能再生能をもつ細胞(LASC)を採取・増殖させることが示されている。自己免疫疾患である強皮症に対し、LASCが免疫系の機能再生を介し、その主症状を緩和することを動物実験で確認している。一方、比較的大量のASCを静脈内投与した後の死亡例が報告され、その安全性が大きな課題となっている。そこで本事業においてこのLASCの臨床応用を見据え、LASCの安全性について検討を行った。細胞の静脈内投与を行った際の重要な死亡原因である肺塞栓について、LASCはその頻度を低下させることを見出した。さらにこの細胞性質について解析を進めたところ、細胞の接着性・凝集性が低いことがLASCの高い安全性に寄与していることが示された。本検討でLASCの安全性が確認されたことで、LASCによる細胞治療法が難治性疾患に対する実用的な治療法になりえることが示唆された。

A. 研究目的

強皮症は皮膚や内臓が硬くなる変化(硬化)を特徴とし、慢性に経過する疾患である。本邦での強皮症患者は約二万人と推定されている。これらの患者では皮膚硬化が進行し、手足の皮膚に虚血性の皮膚潰瘍や皮膚壊疽をきたすと、難治性となることが多い。また、肺高血圧症や肺線維症による呼吸不全、腎クリーゼによる腎不全、食道蠕動低下による嚥下困難などで致

死的となることもある。

全身性強皮症の治療としては(1)ステロイド少量内服(皮膚硬化に対して)、(2)シクロホスファミド(肺線維症に対して)、(3)プロトンポンプ阻害剤(逆流性食道炎に対して)、(4)プロスタサイクリン(血管病変に対して)、(5)ACE阻害剤(強皮症腎クリーゼに対して)、(6)エンドセリン受容体拮抗剤(肺高血圧症に対して)などが挙げられる。しかしながら、これらの効果は限定的であり、重症の強皮症を

改善させうる薬剤は現時点では未だなく、新たな治療法の開発は急務である。

近年、骨髄由来幹細胞(MSC)は免疫抑制作用を有することが明らかとなってきた¹。骨髄移植後の移植片対宿主病(GVHD)に対する治療としてすでに臨床応用され効果を挙げている。その機序のひとつにT細胞に対する増殖抑制作用がある²。

我々は、ヒト皮下脂肪から分化能と増殖能の高いMSCの選択的分離培養法(=低血清培養法)を世界に先駆けて開発した³。2%血清を含む培養液を用いて、1gの脂肪組織から2週間で 10^9 個のLASCを得ることが可能である。また我々は、LASCが強力にT細胞増殖を抑制することを見出した。更にLASCのB細胞系に対する効果についても検討を行ったところ、LASCにはT細胞制御を介してB細胞の抗体産生を抑制する効果があることも見出した⁴。また、自然免疫に対する調整能や組織修復能を有していることも示されており、種々の疾患モデルに対してLASCが有効であることを報告している⁵⁻⁷。これらの結果から、LASCによる細胞療法は強皮症を始め、多くの免疫関連疾患の治療法として非常に有望であると考えられる。

そこで本研究事業では全身性強皮症に対する治療法を確立するために、LASCの安全性の確認及びその基礎的検討を行った。安全性に関しては細胞の全身性投与時に最も懸念される肺への影響を検討するために normal

mouse に対して高濃度の細胞溶解液を尾静注より投与し、肺塞栓によるLASCの致死量について検証を行った。また培養容器からの細胞剥離後、時間とともに細胞同士が凝集することが肺塞栓の大きな要因と考えられているため、細胞の凝集性についても検討を行った。死細胞は細胞隗のコアとなるため、細胞懸濁液を作成する際の溶媒についても細胞保護の点から検討を行った。基礎的検討としては、マイクロアレイを実施し、細胞接着因子や細胞外マトリックスなどについてLASCの遺伝子発現量の解析を行った。

B. 研究方法

安全投与量の検討

C57/BL6 マウスに対して尾静脈より高血清で培養したマウス脂肪由来間葉系幹細胞(HASC)あるいはLASCを1, 2, 3, 4×10^6 /body のdoseで投与して肺塞栓による死亡率を比較した。具体的な投与方法を以下に示す。

1. PBS EDTA(+) で培養皿を洗浄
2. トリプシン 1ml で細胞を剥離
3. 10% FBS 入り DMEM で酵素反応を止める
4. 70 μ m cell strainer に通して細胞隗を除去してシングルセルの状態になった細胞を回収
5. 遠心(1200rpm, 5min)して細胞を回収
6. PBS EDTA(-)に希釈
7. 細胞数のカウント
8. 遠心

9. 200 μ L/body で投与できるように PBS EDTA(-), 25U/ml ヘパリン(+) で細胞を懸濁
10. 200 μ L をマウスの尾静脈から投与。5sec 程度の速さで投与した。生存率は投与後 24 時間で評価を行った。

細胞凝集率の検討

マウスの HASC (N=5), LASC(N=4)および骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) (N=2) を 1×10^7 /mL (PBS EDTA(-), 25U/ml ヘパリン(+)) に調整し、シリンジ内で 30 分静置させた後ポアサイズ 70 μ m のフィルターに通してフィルターを通過した細胞の数を計測した。細胞数の計測には BioRad 社のオートセルカウンターを用いた。

マイクロアレイ

ヒトの HASC, LASC(3 ドナーより樹立。各群 N=12)の遺伝子発現について、アジレント社のマイクロアレイで解析を行った。検体は 6cm dish で培養した細胞を以下の手順で処理し、作成した。

1. PBS(-)で細胞を洗浄
2. 細胞溶解液を 600 μ L 添加
3. 細胞が溶解したのを確認してから液をスピンカラムに入れ、15000rpm, 2 分間遠心分離機にかける
4. サンプルをチューブに移し、-80 で保存する

マイクロアレイの結果は GeneSpring を使用して解析を行った。

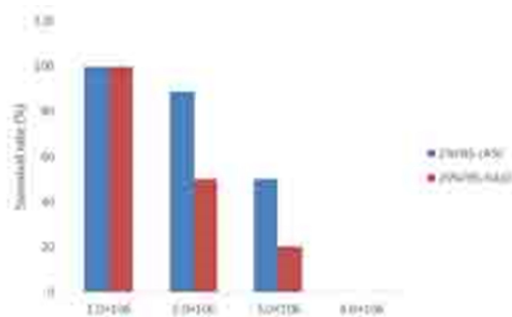
溶媒が細胞の生存率に及ぼす影響について

ヒトの LASC を生理食塩水、1%アルブミン含有生理食塩水、ラクテック、ラクテック D(各群 N=3)に懸濁し、1 時間静置したのちポアサイズ 70 μ m のフィルターに通してフィルターを通過した生細胞の割合を算出した。細胞数の計測には BioRad 社のオートセルカウンターを用いた。

C. 研究結果

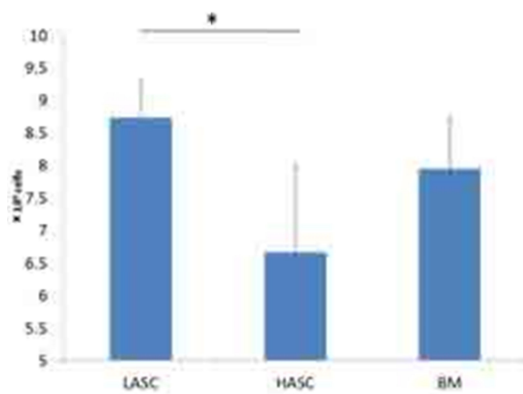
安全投与量の検討

細胞種にかかわらず 1×10^6 /body の投与では全マウスが生存し、 4×10^6 /body の投与で全マウスが死亡した。しかしながら、 $2, 3 \times 10^6$ /body の投与で HASC 投与群の半数以上のマウスが死亡したのに対し、LASC 投与群ではその死亡率が明らかに低下していることが示された。このことから、LASC は HASC よりも投与安全域が広いことが示唆された。死亡したマウスはほとんどが投与中、少なくとも投与後 10 分以内に死亡していることから、死亡の原因は投与した細胞が肺に詰まったことによる肺塞栓であると考えられた。HASC が LASC よりも肺にトラップされやすい原因として、細胞の大きさあるいは細胞の接着性が関与しているのではないかと考えられた。



細胞凝集率の検討

肺に詰まる原因として HASC が接着しやすい細胞なのではないかと考え、細胞凝集率について検討を行った。細胞調整後 ($1 \times 10^7/\text{ml}$) シリンジ内で 30 分静置し、フィルターに通して細胞数を計測した。凝集した細胞はフィルターにトラップされるため、フィルターを通過した細胞が少ないほど凝集しやすいと考えられた。検討に LASC, HASC に加え、BM-MSc も加えて行ったところ、HASC は明らかにフィルターによってロスする細胞が多かった (p-value: 0.023)。



このことから、HASC は細胞が凝集し、大きな細胞塊となることで肺にトラップされ、肺塞栓を起こしているのではないかと考えられた。細胞塊を形成する原因としては死細胞が多く、死細

胞に生細胞が結合して細胞塊を形成する、あるいは接着因子を多く発現しているということが考えられた。そこで次に我々は LASC, HASC のマイクロアレイを行い、接着因子の遺伝子発現について網羅的に解析を行った。

マイクロアレイ

解析は GeneSpring を用いて行った。まずデータの正規化を行い、データの信頼性をあげるための quality control を行った。

1. Filtered on Expression

- ◇ Row data における発現量が低いものを解析から除去【発現量 20-100th percentile に設定】
50739 49944

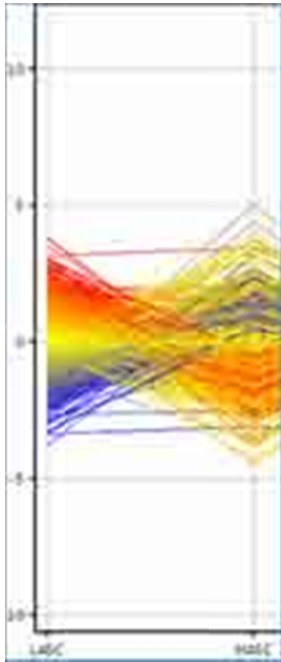
2. Filtered on Flags

- ◇ Flag がついているもの (測定結果が安定していないもの) を解析から除去 **49944 38076**

3. Filtered on Error

- ◇ 同一グループ内における変動が激しいもの (ドナー差が大きいもの) を解析から除去
- ◇ 【Standard Deviation (SD) < 0.5 に設定】 **38076 28275**

抽出の結果、以下の図に示す通り HASC と LASC の遺伝子発現プロファイルは正反対であることが示された (LASC で高発現の遺伝子は HASC での発現レベルは低い)。



抽出された 28275 の遺伝子に対して T 検定を行い、 $P < 0.05$ で発現頻度に差がある遺伝子を抽出し、さらに発現量に 2 倍以上の差がある ($\text{Fold Change} \geq 2.0$) 遺伝子を抽出した。これらの遺伝子に対して、細胞接着に関連していると考えられる【adhesion】、【collagen】、【extracellular matrix】の 3 つのキーワードで変動遺伝子を抽出した。

Adhesion		Collagen	
Gene Symbol	LASC	Gene Symbol	LASC
AMIGO2	Down	MMP1	Down
MCAM	Down	COLQ	Up
CHL1	Up	COL14A1	Up
PEACAM1	Up	COL21A1	Up
SDK1	Up	COL8A1	Down
MRCAM	Up	COL5A1	Down
Extracellular Matrix		COL8A2	Up
Gene Symbol	LASC	COL22A1	Down
SPON2	Up	PLOD2	Down
ECM2	Up	COL27A1	Down
EFEMP1	Up		
SPON1	Up		

抽出された遺伝子が LASC の高い安全性に関連していると考え、現在解析を進めている。

溶媒が細胞の生存率に及ぼす影響について

最後に実際の臨床応用を想定し、ヒト LASC を投与する際の細胞懸濁液の溶媒について検討を行った。細胞剥離から投与まで 1 時間程度かかることが予想されるため、懸濁液の状態を保護できる溶媒がふさわしいと考えられる。そこで、4 種類の溶媒を用意し、1 時間静置後の細胞の生存率を検討した。



ラクテック D は浸透圧の影響で細胞の半数近くが死滅 (トリパンブルー陽性) してしまったが、他の溶媒については 80% 以上の高い生存率を得ることができた。

D. 考察

本研究において、LASC が通常培養される間葉系幹細胞よりも高い安全性を持つ細胞であることが示唆された。細胞の経静脈的投与による治療は全身への有効性を期待できる一方、肺への影響が懸念される。本検討において、我々が臨床応用を目指す LASC は肺への負担が小さいというメリットを持つことが予想された。この要因として、細胞の接着性の違いが関連している可能性が示されたが、網羅的な遺

伝子解析では接着因子の中でも LASC で発現頻度が減少しているものと増加しているものの双方が確認された。今後はこれらの遺伝子がどのような細胞性質に関与しているのか、個別の解析を行っていく必要がある。

E. 結論

今回我々は LASC の臨床応用を目指し、LASC の安全性に関して検討を行った。LASC は HASC に対して肺塞栓によるマウスの死亡率を低下させ、細胞凝集能も低いことが示された。また、これらの性質に関与していると考えられる因子についても網羅的に解析を行い、候補となる遺伝子を抽出することができた。実際の臨床応用を想定した検討を行うことで、最適な細胞懸濁液の作成方法を示すことができた。

F. 参考文献

1. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(9419):1439-41. doi:10.1016/S0140-6736(04)16104-7 .
2. Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol*. 2006;84(5):413-21. doi:10.1111/j.1440-1711.2006.01458.x.
3. Iwashima S, Ozaki T, Maruyama S, et al. Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue. *Stem Cells Dev*. 2009;18(4):533-43. doi:10.1089/scd.2008.0358.
4. Saka Y, Furuhashi K, Katsuno T, et al. Adipose-derived stromal cells cultured in a low-serum medium, but not bone marrow-derived stromal cells, impede xenoantibody production. *Xenotransplantation*. 2011;18(3):196-208. doi:10.1111/j.1399-3089.2011.00640.x.
5. Watanabe T, Maruyama S, Yamamoto T, et al. Increased urethral resistance by periurethral injection of low serum cultured adipose-derived mesenchymal stromal cells in rats. *Int J Urol*. 2011;18(9):659-66. doi:10.1111/j.1442-2042.2011.02795.x.
6. Furuhashi K, Tsuboi N, Shimizu A, et al. Serum-Starved Adipose-Derived Stromal Cells Ameliorate Crescentic GN by Promoting Immunoregulatory Macrophages. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(4):587-603. doi:10.1681/ASN.2012030264.
7. Kim H, Mizuno M, Furuhashi K, et al. Rat adipose tissue-derived stem cells

attenuate peritoneal injuries in rat zymosan-induced peritonitis accompanied by complement activation. *Cytotherapy*. 2014;16(3):357-68. doi:10.1016/j.jcyt.2013.10.011.

Crescentic Glomerulonephritis By Promoting Immunoregulatory Macrophages. ; Naotake Tsuboi, Kazuhiro Furuhashi, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama : *Forefronts in Nephrology Florence*

G. 研究発表

論文発表

1. Kim H, Mizuno M, Furuhashi K, Ozaki T, Matsuo S, Maruyama S. Rat adipose tissue-derived stem cells attenuate peritoneal injuries in rat zymosan-induced peritonitis accompanied by complement activation. *Cytotherapy*. 2014;16(3):357-68. doi:10.1016/j.jcyt.2013.10.011

3. Low Serum Cultured Adipose Tissue-derived Stromal Cells Ameliorate Acute Kidney Injury In Rats. ; Takayuki Katsuno, Naotake Tsuboi, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama ; *Forefronts in Nephrology Florence*

4. 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた急性呼吸窮迫症候群への治療戦略；三村哲史，坪井直毅，橋本直純，清水明日花，金恒秀，古橋和拡，松尾清一，丸山彰一；第34回日本炎症再生医学会

学会発表

1. Serum-starved adipose-derived stromal cells ameliorate rat crescentic glomerulonephritis by promoting immunoregulatory macrophages. ; Kazuhiro Furuhashi, Naotake Tsuboi, Asuka Shimizu, Yiqin Shi, Hangsoo Kim, Takayuki Katsuno, Yosuke Saka, Takenori Ozaki, Waichi Sato, Enyu Imai, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama ; ISSCR 11th Annual Meeting

5. 低血清培養脂肪由来間葉系幹細胞の創傷治癒促進効果についての検討；阿部 智子，尾崎 武徳，堀之内明日花，金 恒秀，古橋 和拡，秋山 真一，勝野 敬之，安田 香，坪井 直毅，松尾 清一，丸山 彰一；第34回日本炎症再生医学会

2. Serum-starved Adipose-derived Stromal Cells Ameliorate Rat

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
「脂肪組織由来多分化能幹細胞を含有する細胞製剤」

特願 PTC/JP2007/065431

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし