

ANCA 関連腎炎に対する  
脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植療法の開発

日本大学大学院医学研究科博士課程  
内科系腎臓内科学専攻

宇都宮 慧

修了年 2020 年

# 指導教員 阿部 雅紀

## [ 目次 ]

概要	1
緒言	3
間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell; MSC) の免疫抑制細胞治療	3
脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell; DFAT)	4
抗好中球細胞質抗体 (Anti-neutrophil cytoplasmic antibody; ANCA) 関連腎炎	5
SCG マウスの特徴および免疫異常	6
研究目的	7
対象と方法	7
1. 細胞移植後の体内分布の検討	7
DFAT 作製方法	7
DFAT のラベリングと体内分布の観察法	8
2. 細胞移植後の効果の検討	9
SCG マウスの繁殖	9
マウスの蓄尿	10
DFAT の投与	10
検体採取および血液生化学検査	10
臓器検体の解析	11
糸球体障害指数 (Glomerular injury scores; GIS) と尿細管間質障害指数 (Tubular injury scores; TIS) の評価	11
Real-time PCR 法による腎臓における各種 mRNA 発現の検討	12
Western blot 法による腎臓における各種蛋白発現の検討	13

腎臓での TSG-6 免疫染色.....	14
統計解析.....	14
結果.....	15
1. DFAT 投与後の体内分布の検討.....	15
2. DFAT 投与後の効果の検討.....	15
尿蛋白量に対する作用.....	15
組織傷害に対する作用.....	16
腎機能および MPO-ANCA 値に対する作用.....	16
Real-time PCR 法による腎臓における各種 mRNA 発現の検討.....	17
Western blot 法による腎臓における各種蛋白発現の検討.....	17
DFAT 移植後の腎臓での TSG-6 発現.....	17
考察.....	18
結語.....	22
謝辞.....	23
図表.....	24
参考文献.....	37
研究業績.....	39

## [ 概要 ]

近年、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell; MSC) は、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞など間葉系細胞への分化能を持ち、再生医療の移植細胞源として期待されている。一方、MSC には強力な免疫抑制作用を有することも判明し、治療抵抗性の免疫疾患に対する細胞治療として有望視されている。実際に、MSC と同等の性格を有する脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell; DFAT) が、MSC に代わる免疫抑制細胞治療として免疫性腎炎モデルである単クローン Thy 1-22-3 抗体誘発腎炎ラットに有効である事が報告されている。

抗好中球細胞質抗体 (Anti-neutrophil cytoplasmic antibody; ANCA) 関連腎炎は自己免疫性腎疾患で急速進行性の経過をたどり、生命予後不良の腎疾患であり、新たな有効な治療法の開発が喫緊の課題である。また、DFAT による ANCA 関連腎炎への特異的治療を開発することは予後不良の疾患の治療法を開発することであり、また透析導入の原疾患の一つの根治治療を開発することにもつながり、医療社会的意義は大きい。そのため、ANCA 関連腎炎に対する DFAT 移植療法の開発を目的に、ANCA 関連血管炎のモデル動物である SCG マウスに対する DFAT 移植の効果を検証した。

DFAT 投与後の体内動態を調べるため、PKH26 でラベリングした DFAT 10<sup>5</sup> 個を SCG マウスに経静脈的に投与した結果、投与後 1 時間において移植 DFAT は肺でのみトラップが確認され、その後時間経過とともに減少していった。またその後他の臓器への移行は認めなかった。

次に DFAT の経静脈的投与による ANCA 関連腎炎への効果を検討した。DFAT を 8 週齢に一度だけ細胞移植し 4 週間飼育する治療群 (DFAT 投与群) と、DFAT を移植しな

い群 (腎炎群) を作成した。12 週齢まで 2 週間に一度 1 日尿蛋白量を定量し、12 週齢で心臓採血後に腎臓・肺を摘出した。血清クレアチニン値や myeloperoxidase (MPO)-ANCA 抗体値を測定し、腎の組織傷害を糸球体傷害指数 (Glomerular injury scores; GIS) および間質傷害指数 (Tubular injury scores; TIS) で評価し、腎臓の Tumor necrosis factor-stimulated gene 6 protein (TSG-6) (*Tnfaip6*) や Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (*Tnf*) の mRNA 発現量を real-time PCR で測定した。また腎臓の TSG-6 や TNF- $\alpha$ 、Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) の蛋白量を Western blot 法で測定した。DFAT 10<sup>5</sup> 個の投与後は肺血栓塞栓症を含む副作用は認めず、全群が 12 週齢まで生存した。DFAT 投与群では腎炎群と比較して腎組織において GIS の低下を認め、DFAT 移植療法による腎病理組織学的検討で糸球体の半月体形成の抑制を確認した。

血清学的検査では、腎炎群と DFAT 投与群で血清 MPO-ANCA 値や血清クレアチニン値で差を認めなかった。Real-time PCR 解析では、腎炎群と比較し DFAT 投与群において腎臓での抗炎症性タンパクである TSG-6 mRNA の有意な発現増加がみられた。腎臓での Western blot 法では、腎炎群と比較し DFAT 投与群にて M1 マクロファージからのケモカインである MCP-1 蛋白発現の有意な低下、M2 マクロファージのケモカインである C-C chemokine ligand 17 (CCL17) 蛋白発現の有意な増加を認めた。

以上より DFAT が ANCA 関連腎炎を改善する機序の一つとして、TSG-6 による抗炎症反応が惹起されること、さらに 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関与していると考えられ、ANCA 関連腎炎に対し DFAT 移植が有効であることが示唆された。

## [ 緒言 ]

最近、致死率の高かった移植片対宿主病 (Graft versus host disease; GVHD) に間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell; MSC) を用いた免疫抑制細胞治療が始まり、治療成績が向上している。MSC を用いた治療は難治性自己免疫性疾患にも臨床応用されてきているが、急速進行性で予後不良な抗好中球細胞質抗体 (Anti-neutrophil cytoplasmic antibody; ANCA) 関連腎炎への免疫細胞治療はほとんど研究されていない。脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell; DFAT) は MSC とは異なるものの、同様の性質を持つことが証明されている。本研究は ANCA 関連腎炎モデルマウスに対し、DFAT を用いた免疫抑制細胞治療の効果を検討した。

### 1-1. 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell; MSC) の免疫抑制細胞治療

近年、MSC は強力な免疫抑制作用を有することが報告されており(1)、様々な免疫性疾患に対して MSC 移植治療が試みられている。ステロイド抵抗性の重篤な GVHD 患者に対し、骨髄由来 MSC の細胞移植治療の有効性が確認されている(2)。また副作用も少なく、MSC は HLA-DR を発現していないため、HLA 不適合であっても問題ない等の理由により安全性も示されている(3)。そのほかクローン病や関節リウマチ、再生不良性貧血、多発性硬化症などの自己免疫性疾患を対象にした細胞移植臨床試験もすでに行われている(4)。さらには MSC を難治性疾患への製剤として様々な新薬が開発されており、わが国でも 2015 年 9 月、JCR ファーマ社が米国のオサイリス社から技術導入し、造血幹細胞移植後の GVHD を対象にした骨髄由来 MSC 製剤 (商品名:テムセル®) が承認、

発売されている。しかし薬価が高価なことより、骨髄以外の MSC の細胞源として、胎盤羊膜や臍帯といった胎児付属物由来の MSC を使った次世代の MSC 製剤の開発が進められている。また2018年には、富士フイルム社がオーストラリアの Cynata Therapeutics 社の他家 iPS 細胞由来 MSC を使った GVHD を対象とした製剤の承認取得を2022年に目指す方針を発表し、注目されている。このように、実地医療としてより効果や安全性が高く、また比較的安価な MSC 製剤の開発が現在積極的に進められている。また MSC が、免疫調整性マクロファージを増加させることで急性腎障害 (Acute Kidney Injury: AKI) モデルラットにおいて腎保護作用を発揮することや(5)、PGE2 や IL-6 を介して免疫調整性マクロファージを腎炎部位に誘導することで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(6)。

## 1-2. 脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell; DFAT)

日本大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 を得る技術を開発し、特許化した(特願平 10-378013)。さらに DFAT を再生医療の移植細胞源として骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞に分化させる技術が開発され、MSC と同等の性質を有している事が解明されてきた(7)。DFAT は①MSC と同等の多分化能を有する、②高い増殖能を持ち低コストで大量調整可能である、③高い純度をもって調整が可能でありその分安全性に優れる、④細胞の維持管理が容易で高額な生理活性物質および試薬を用いない、⑤年齢および性別を問わず生体組織から高額精密機器を用いずに簡便に採取出来る、⑥胚、遺伝子操作やウイルスベクターを用いないので倫理的な問題や癌化の問題が他と比べて著しく低いなどの理由で、細胞移植治療の細胞源として期待されている。

DFAT は、皮下より摘出した小指頭大の脂肪組織に由来する。この皮下脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、低速度で遠心分離することにより、脂肪組織から成熟脂肪細胞が浮

遊し、他の細胞群から容易に単離可能である。そして単離された脂肪細胞は浮遊するため、フラスコ天井面で培養すると、約1週間で線維芽細胞様に変化する。この線維芽細胞様細胞が DFAT と呼ばれている細胞であり、その後急速に増殖し、約2週間でコンフルエントに達する(8)。このように DFAT は移植細胞源として調整が容易である。

丸山らは、DFAT が MSC 同様の免疫抑制作用があると考え、免疫性腎炎モデルおよび非免疫性腎症モデルの2種類のラットに経静脈的に細胞移植した際の効果を検証した(9)。その結果、進行性の免疫性腎炎モデルである単クローン Thy 1-22-3 抗体誘発腎炎ラットでは投与された DFAT は肺にトラップされ腎臓には到達していなかったが、尿蛋白の有意な低下、糸球体硬化および間質線維化の抑制を有意に認めた。一方、非免疫性腎症モデル動物であるアドリアマイシン腎症ラットでは DFAT 移植の効果を認めなかった。MSC 移植では、抗炎症性物質である TSG-6 を分泌し、免疫抑制作用を示すと考えられている(10)。DFAT 移植を行った免疫性腎炎モデルラットでも、TSG-6 の腎組織中 mRNA 発現量と血中濃度が有意に上昇していた。またこの TSG-6 を siRNA を用いてノックダウンした DFAT の投与では、腎傷害に対する抑制効果が見られなかった(9)。そのため、DFAT は肺組織で TSG-6 を分泌することにより、免疫抑制作用を発揮し、MSC と同様の性質を有すると考えられた。

### 1-3. 抗好中球細胞質抗体 (Anti-neutrophil cytoplasmic antibody; ANCA) 関連腎炎

ANCA 関連腎炎とは、ANCA 関連血管炎に見られる腎炎を指す。ANCA は間接蛍光抗体所見により、perinuclear pattern (核周囲型; P-ANCA) と cytoplasmic pattern (細胞質型; C-ANCA) に分けられ、我が国では前者が 90%以上を占める。P-ANCA の対応抗原は主に myeloperoxidase (MPO) であり、MPO-ANCA は顕微鏡的多発血管炎 (Microscopic



polyangiitis; MPA) の大部分に陽性で、また好酸球性多発血管炎性肉芽腫症

(Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis; EGPA) の約半数に陽性で検出される(11)。

腎病理組織所見としては、壊死性半月体形成が典型的である。病変が軽度であれば、巣状・分節性壊死性糸球体腎炎であるが、病変が高度になるとほとんどの糸球体で壊死性半月体形成性糸球体腎炎を呈し、病状の進行に伴って線維性変化がみられるようになる。また尿細管間質でも、病初期には炎症性細胞浸潤や浮腫がみられ、進行例では尿細管萎縮、間質の線維化がみられる。蛍光抗体法等の免疫染色においては、免疫グロブリンや補体の沈着を認めない、いわゆる“pauci-immune”型を示す(12)。

病態としては ANCA による好中球過剰活性説が有力である。すなわち、遺伝因子的背景に加え、薬剤や感染といった環境因子が加わり、好中球細胞質内の自己蛋白である MPO や Proteinase3 (PR3) が抗原性を獲得し、ANCA が産生される。次に、感染症などで産生された TNF- $\alpha$  や Interleukin-8 (IL-8) などのサイトカインが好中球の細胞質内に存在する ANCA に対する抗原を表出させる。この表出された抗原に ANCA が結合し、好中球が活性化される。活性化された好中球は血管壁への接着や血管壁内への遊走が増強され、蛋白分解酵素および活性酸素を放出することにより糸球体内皮細胞を障害し、壊死性の糸球体腎炎を生ずると推測されている(11,12)。

治療はステロイドが主体であるが長期の投与が必要であり、発症者の約 20%は治療抵抗性であり、発症後 2 年以内に死に至っている。ステロイド治療が奏功し、寛解に至った場合も再発を繰り返す事が多く、発症者の約 30%は透析治療に移行している。したがってステロイドとは別の治療法の開発が望まれている。

#### 1-4. SCG マウスの特徴および免疫異常

SCG マウスは、半月体形成性糸球体腎炎を起こす BXSB マウス雌と ANCA 関連血管炎を起こす MRL/lpr マウス雄を兄妹交配して確立したハイブリット近交系で、MRL/MpJ に由来する自己免疫促進遺伝子 lpr を有する遺伝的 ANCA 関連腎炎モデルマウスである。蛋白尿やリンパ節腫脹が観察され、血清 MPO-ANCA 値や TNF- $\alpha$  値が腎炎の発症とともに増加して半月体形成をともなう腎炎を、早いものであれば 8 週齢に発症する。また同時に全身性の血管炎を起こし、初期には小血管のみであるが、週齢が進行するにつれて大血管や各臓器にも波及する。生後 90 日以内には約半数に蛋白尿を認め、平均生存日数は約 120 日であり、そのほとんどが腎不全で死亡する(13,14)。本研究でヒトの ANCA 関連腎炎に対する細胞移植治療の前臨床試験として、この SCG マウスに対する DFAT 細胞移植治療の効果を検証した。

## [ 研究目的 ]

今回、ヒトの難治性免疫性腎炎である ANCA 関連腎炎に対する DFAT 細胞治療の臨床応用を最終目的として、モデルマウスである SCG マウスに DFAT を投与し、ANCA 関連腎炎の活動性への効果とメカニズムを検討した。

## [ 対象と方法 ]

### 1. 細胞移植後の体内分布の検討

#### 1-1. DFAT 作製方法

凍結保存された ddy マウス由来の DFAT を解凍し、10% Fetal Bovine Serum (FBS) Standard South America Origin (#CCP-FBS-BR-500, コスモ・バイオ株式会社, Japan) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM) (#D6429-500ML, Sigma-Aldrich, USA) 培地を用いて 25cm<sup>2</sup> フラスコで培養し、コンフルエントに達する前に継代を行った。継代する時に細胞を剥がす際は、培地を吸引除去し、Dulbecco's Phosphate Buffered Salt (DPBS) (#14190-144 500 ML, Thermo Fisher Scientific, USA) で1~2回洗浄後に、Accutase (#AT104 100ML, Innovative Cell Technologies, USA) を加える。全ての細胞塊が分散し、球状の単一細胞になっている事を顕微鏡 (#CK2, Olympus, Japan) で確認し、新たなフラスコに継代培養を行なった。

## 1-2. DFAT のラベリングと体内分布の観察法

上記の手順で培養した細胞を Accutase で剥がし、10% FBS 含有 DMEM 培地を加えて細胞浮遊液を作成し、遠心分離 (1500rpm 3 分間) した。上澄み液をアスピレーターで除去し、ソルラクト TMR 輸液 (#TP-A03TMRV-250mL, テルモ, Japan) 1ml を加え、細胞浮遊液とし、細胞計測器 (#ノイバウエル計算盤, エルマ販売株式会社, Japan) を用いて細胞数を算定した。最終的に、細胞数が 10<sup>5</sup> 個/0.2ml となるように細胞浮遊液を調整した。

DFAT のラベリングには赤色蛍光色素の PKH26 を用いた。PKH26 は親油性であり、細胞膜を標識する。PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling (#PKH26GL-1KT, Sigma-Aldrich, USA) のプロトコルに従いラベリングした。ソルラクト TMR 輸液を用いて、ラベリングした DFAT が 10<sup>5</sup> 個/0.2ml となるように細胞浮遊液を調整した。8 週齢の ICR マウス 4 頭にイソフルラン吸入麻酔液 (#871119, Pfizer,

USA) (導入 4%, 維持 2%) 吸入麻酔下で、10<sup>5</sup> 個/0.2ml をインスリン用 29G 針付き 1.0ml シリンジにて後眼窩静脈叢からゆっくり注入した。DFAT 投与 1 時間後、1 日後、7 日後、14 日後にそれぞれイソフルランで深麻酔し、ヘパリン Na 注 1 万単位/10mL (#873334, 持田製薬株式会社, Japan) を少量含ませたシリンジを用いて心臓から採血した。死亡を確認後に開腹開胸し、腎臓・脾臓・肝臓・心臓・肺・腫大リンパ節を摘出した。検体は分割して、Mildform® 10N (#133-1-1L, 和光純薬, Japan) にて固定し、Tissue-Tek® O.C.T compound (#4583-118mL, Sakura Finetek, Japan) で凍結保存した。組織切片標本を作製し、蛍光顕微鏡下 (#IX73, Olympus, Japan) で観察した(図 1)。

## 2. 細胞移植後の効果の検討

### 2-1. SCG マウスの繁殖

実験動物は、全て日本大学医学部動物実験委員会の指針に従って行った (動物実験承認番号 AP18MED021-1)。SCG マウスは、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 (Japan) から購入し、繁殖を行なった。

8 週齢の SCG マウス雌雄 8 ペアと里親用の ICR マウス雌雄 8 ペアを同日に交配させた。妊娠成立後約 3 週間で出産した。SCG マウスは出産後に死亡してしまう個体もいるため、SCG マウスの仔は出産した ICR マウス雌のゲージに移動し、ICR 仔は間引いて数匹のみ残し、腎炎非発症 ICR マウス群として飼育を続けた。5 週齢で離乳させ、個体識別のためにそれぞれの個体を 1 ゲージずつに分け、雌雄判別とナンバリングを行った。

SCG マウス 12 頭 (雄 7 頭、雌 5 頭) を 6 週齢時に、その後に DFAT を投与する DFAT 投与群 7 頭 (雄 4 頭、雌 3 頭) と、DFAT を投与しない腎炎群 5 頭 (雄 3 頭、雌 2 頭) に

振り分けた。また、腎炎非発症マウスである ICR マウス 7 頭 (雄 3 頭、雌 4 頭) を腎炎非発症 ICR マウス群とした(図 2)。

## 2-2. マウスの蓄尿

出生したマウス全頭に対し、生後 6 週齢から蓄尿を開始した。代謝ゲージ (#CM-10S, 日本クレア株式会社, Japan) を使用し、12 週齢まで 2 週間に 1 回 24 時間蓄尿した。溜まった尿はスポイトで遠心スピッツへ移し、尿量は電子スケール (#ATX124, shimadzu corporation, japan) で重量を測定して求めた。オリエンタル酵母工業に依頼して尿中総蛋白濃度を測定し、尿量から 1 日尿蛋白排泄量を算出した。

## 2-3. DFAT の投与

SCG マウスである DFAT 投与群の 8 週齢時に DFAT を投与した。イソフルラン (導入 4%、維持 2%) 吸入麻酔下で、上記の手順で調整した DFAT 10<sup>5</sup> 個/0.2 ml をインスリン用 29G 針付き 1.0ml シリンジを用いて、後眼窩静脈叢からゆっくりと静注した。

## 2-4. 検体採取および血液生化学検査

マウスが 12 週齢に達したところで、イソフルラン (4%) で深麻酔し、ヘパリンを少量含ませたシリンジを用いて心臓採血を行った。死亡を確認後に直ちに開胸開腹し、腎臓・脾臓・肝臓・心臓・肺・腫大リンパ節を観察後に摘出した。検体は分割して凍結保存した。血液は遠心により血清検体とし、血液生化学検査としてオリエンタル酵母工業

に依頼し、血清 UN (Urea Nitrogen; UN)、クレアチニン (Creatinine; Cr) の測定および MPO-ANCA 値を ELISA 法で測定した。

## 2-5. 臓器検体の解析

### 2-5-1. 糸球体障害指数 (Glomerular injury scores; GIS) と尿細管間質障害指数 (Tubular injury scores; TIS) の評価

Sabbaniti らの報告(15) を参考に腎障害のスコア化を行った。マウスの腎臓を Hematoxylin-Eosin (HE) 染色及び Masson Trichrome 染色を行った。GIS (Glomerular injury scores) ではそれぞれにおいて 30 個の糸球体をランダムに選び、糸球体の間質占拠率を評価し、下記の通りスコア化した。次に TIS (Tubular injury scores) ではそれぞれにおいて 20 箇所 of 腎皮質領域をランダムに選び、繊維化の度合いを下記の通りスコア化した。またスコアリングは、ブラインド下で 1 人の有識者により行った。

$$\text{GIS: } [(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] \div 30$$

0: normal appearance

1: involvement of up to 25% of the glomerulus

2: involvement of 25 to 50% of the glomerulus

3: involvement of 50 to 75% of the glomerulus

4: involvement of 75 to 100% of the glomerulus

$$\text{TIS: } [(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] \div 20$$

0: normal appearance

1: involvement of less than 10% of the cortical areas

2: involvement of 10 to 30% of the cortical areas

3: involvement of 30 to 50% of the cortical areas

4: involvement more than 50% of the cortical areas

### 2-5-2. Real-time PCR 法による腎臓における各種 mRNA 発現の検討

SCG マウスの器質的腎障害の原因を解析するために腎臓から RNA を抽出し、腎炎群と DFAT 投与群の mRNA 発現を比較した。12 週齢の SCG マウスから摘出した腎臓を RNA-later (#76106-250mL, QIAGEN, Netherlands) に浸漬し、RNeasy Plus Mini Kit (#74134, QIAGEN, Netherlands) を用いて RNA 抽出後、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (#4387406, Applied Biosystems, USA) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, USA) を用いて TSG-6 (*Tnfaip6*)、CD44 (*Cd44*)、PGE2 (*Ptger2*)、IL-10 (*Il10*)、IL-1 $\beta$  (*Il1b*)、TNF- $\alpha$  (*Tnf*) および内因性コントロールとして  $\beta$ -actin (*Actb*) の mRNA 発現量を SYBER Green 法でアッセイした。cDNA と Power UP SYBR® Green PCR Master Mix (#A25742, Applied Biosystems, USA) および各遺伝子に対するプライマーを混ぜ、95°C15 秒を初期変性とし、60°C60 秒、95°C15 秒を 1 サイクルとして、55 サイクル行った。ターゲットの発現は検量線法を用いて相対定量で求めた。各種プライマーは既知の塩基配列をもとに、ファスマック株式会社 (Japan) に作製を依頼した。使用したプライマーリストを以下に示す。

#### SYBR Green 法 (ファスマック株式会社, Japan)

<i>Tnfaip6</i>	Forward 5' to 3'	GCT GTC CTG GAA CTC ACT TTG
----------------	------------------	-----------------------------

	Reverse 5' to 3'	GAG GCA GGT GGA TTT CTG AG
<i>Cd44</i>	Forward 5' to 3'	TCC TTC TTT ATC CGG AGC AC
	Reverse 5' to 3'	CCT GGA GTC CTT GGA TGA GT
<i>Ptger2</i>	Forward 5' to 3'	ATC ACC TTC GCC ATA TGC TC
	Reverse 5' to 3'	GCT CGG AGG TCC CAC TTT
<i>Tnf</i>	Forward 5' to 3'	TCT TCT CAT TCC TGC TTG TGG
	Reverse 5' to 3'	GGT CTG GGC CAT AGA ACT GA
<i>Il10</i>	Forward 5' to 3'	CAG AGC TCC TAA GAG AGT TGT GAA
	Reverse 5' to 3'	TCA TCA AAG GAT CTC CCT GGT
<i>Il1b</i>	Forward 5' to 3'	AGT TGA CGG ACC AAA G
	Reverse 5' to 3'	AGC TGG ATG CTC TCA TCA GG
<i>Actb</i>	Forward 5' to 3'	CCA ACC GTG AAA AGA TGA CC
	Reverse 5' to 3'	ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA

### 2-5-3. Western blot 法による腎臓における各種蛋白発現の検討

Western blot 法による腎臓での TSG-6、TNF- $\alpha$ 、Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)、C-C chemokine ligand 17 (CCL17) 蛋白および内因性コントロールとして  $\beta$ -Actin 蛋白の発現を測定した。SCG マウス 12 週齢の腎臓より 8-min Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit (#P504L, 101Bio, USA) を用いて蛋白を抽出し、Pierce™ 660nm Protein Assay Kit (#22662, Thermo Fisher Scientific, USA) にて蛋白定量した。2-メルカプトエタノール (#M3148-25ML, Sigma-Aldrich, USA) を含有する sample buffer を用いて 95°C、3 分間熱処理を行い変性処理し、サンプルを 1 レーンあたり 10  $\mu$ g 添加し、100 mA で電気泳動を行った。その後、Trans-Blot SD (Bio-Rad, USA) にて Amersham Protran 0.2um NC (200 mm $\times$ 4 m) (#10600006, GE Healthcare, USA) に転写し、5%スキムミルク溶液で 1 時間室温にてブロッキングした。1 次抗体に、抗 TSG-6 ウサギポリクローナル抗体 (#sc-30140, SANTA CRUZ, USA)、抗 TNF- $\alpha$  抗体 (#11948, cell signaling technology, USA)、抗 MCP-1 抗体 (#orb36895, biorbyt, UK)、抗 TARC (CCL17) ポリクローナル抗体



(#PA5-78933, Invitrogen, USA) および Anti-beta Actin antibody (#ab8227, abcam, UK) を使用し、4°Cで一晩インキュベートし、2次抗体に Peroxidase IgG Fraction Monoclonal Mouse Anti-Rabbit IgG, Light Chain Specific (#211032-171, Jackson ImmunoResearch, USA) を用いて室温で1時間インキュベートした。続いて Western Lightning ECL Pro (#NEL120001EA, PerkinElmer, USA) を使用し化学発光させ、LAS4000mini (Fuji film, Japan) にてバンドを検出した。同時に画像ファイルを作成し、ImageStudio Lite (<https://www.licor.com/bio/image-studio-lite>) にてバンドを定量化した。

#### 2-5-4. 腎臓での TSG-6 免疫染色

SCG マウス 12 週齢の腎臓を APS200S (Leica Biosystems, Germany) にてパラフィン包埋し 5 $\mu$ m に薄切後、脱パラフィン処理を行った。Sodium citrate buffer (10 mM Sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0) (#T9172, タカラバイオ株式会社, Japan) にて圧力鍋で 20 分抗原賦活化を行い、PBS で洗浄後、0.3% $H_2O_2$  で 20 分間インキュベートし、内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行った。PBS で洗浄後、2.5%ウマ血清 (#7800, VECTOR, USA) を含む PBS にて保湿箱内で 20 分ブロッキング後、1次抗体として TSG-6 についてはウサギポリクローナル抗 TSG-6 抗体 (#sc-30140, Santa Cruz Biotechnology, USA) を PBS で 500 倍に希釈し、4°Cで 12-24 時間反応させた。反応後、2次抗体として ImmPRESS Reagent (#7800, VECTOR, USA) を使用し、保湿箱にて 30 分室温でインキュベーション後、PBS で洗浄し、ImmPACT DAB 基質キット (#MP-7800, VECTOR, USA) を使用し、2-10 分室温で発色させた。その後 PBS、さらに流水で洗浄後、マイヤーヘマトキシリン溶液に 10 分間浸し、核染色後、流水で 20 分間洗浄した。脱水、透徹処理し、マリノールで封入後、Olympus BX51 (Olympus, Japan) で観察した。画像の撮影は DP72 (Olympus, Japan) を用いて行なった。

## 2-6. 統計解析

すべての結果は mean ± Standard Error (SE) にて示した。有意差検定は統計解析ソフトウェア SPSS ver26 (SPSS Inc, Chicago, USA) を用いた。腎炎群と腎炎非発症 ICR マウス群の比較により、本研究等が交配した SCG マウスにおける腎炎の発症を組織学的に確認し、血液生化学的に解析した。腎炎群と DFAT 投与群の比較により、SCG マウスの腎炎に対する DFAT の効果を解析した。群間の比較は F 検定で  $P > 0.05$  を確認した後、t 検定を行い、 $P < 0.05$  を有意差とした。

### [ 結果 ]

#### 1. DFAT 投与後の体内分布の検討

PKH26 でラベルした  $10^5$  個の DFAT を ICR マウスの後眼窩静脈叢より投与後 1 時間の肺組織標本において陽性細胞を確認した(図 3)。一方、心臓、肝臓、脾臓、腎臓では陽性細胞をほとんど確認せず、頸静脈的に投与された DFAT の殆どは肺組織でトラップされていると考えられた。その後 1 週間、2 週間と徐々に肺での陽性細胞はみられなくなり、トラップされた DFAT 数の減少が示唆された。この間その他の臓器でも陽性細胞は検出されなかった。

#### 2. DFAT 投与後の効果の検討

### 2-1. 尿蛋白量に対する作用

DFAT 投与前の 6 週齢では、SCG マウスでは腎炎群、DFAT 投与群共に尿蛋白量は 4.4 mg/day であり、群間に差を認めなかった(図 4)。SCG マウスの腎炎発症週齢とされる 8 週齢を超えた 10 週齢においては、DFAT 投与群で 6.4 mg/day、腎炎群で 4.3 mg/day と DFAT 群の方が多かったが、有意差を認めなかった。12 週齢では両群共に 6.5 mg/day とほぼ同じとなった。腎炎非発症 ICR マウス群では、6 週齢と 10 週齢で腎炎群よりも多かったが、12 週齢ではほぼ同じであった。

### 2-2. 組織傷害に対する作用

マウス 12 週齢の GIS では、腎炎群において、腎炎非発症 ICR マウス群よりも有意な高値 ( $P=0.013$ ) を示し、SCG マウスが腎炎を起こしていると考えられた(図 5)。腎炎群と DFAT 投与群の比較では、ともにメサンギウム領域の拡大を認め、GIS は DFAT 投与群で低下傾向であったが、有意差を認めなかった。しかし腎炎群の糸球体では細胞性半月体形成を認めたが (図 5、矢印)、DFAT 投与群では半月体形成は抑制されていた。

TIS では腎炎群では腎炎非発症 ICR マウス群より有意な高値 ( $P=0.018$ ) を示した (図 6)。腎炎群と DFAT 投与群の比較では差を認めなかった。

SCG マウスにおいて組織学的に腎障害を認め、腎炎を発症していることを確認できた。一方、DFAT 投与は糸球体の障害を軽減したが、尿細管障害には影響しなかった。

### 2-3. 腎機能および MPO-ANCA 値に対する作用

腎炎群では、腎炎非発症 ICR マウス群と比較し、血清 MPO-ANCA 値 (P=0.005)、血清 BUN 値 (P=0.042)、血清 Cr 値 (P=0.001) は高値を示した(図 7)。腎炎群と DFAT 投与群では差を認めなかった。SCG マウスの腎障害が ANCA 関連腎炎であることを確認できた。DFAT 投与は血中 MPO-ANCA 濃度に影響しなかった。

#### **2-4. Real-time PCR 法による腎臓における各種 mRNA 発現の検討**

腎臓での TSG-6 の mRNA 発現は、腎炎群と比較し、TSG-6、PGE2、IL-10 は DFAT 投与群で増加傾向であり、IL-1 $\beta$  はほぼ同じであった(図 8)。CD44 と TNF- $\alpha$  は DFAT 投与群で低下傾向であった。DFAT 投与では TSG-6 mRNA 発現の有意な上昇 (P=0.042) を認めた。

#### **2-5. Western blot 法による腎臓における各種蛋白発現の検討**

TSG-6 蛋白量は、DFAT 投与群では腎炎群と比較して増加傾向であった(図 9)。TNF- $\alpha$  蛋白量は、DFAT 投与群では腎炎群と比較して減少傾向であった(図 10)。また M1 マクロファージのケモカインである MCP-1 の蛋白量は、腎炎群と比較し、DFAT 投与群において有意な低下 (P=0.04) を認めた(図 11)。M2 マクロファージに発現するケモカインである CCL17 の蛋白量は、腎炎群と比較して DFAT 投与群で有意な増加 (P=0.04) を認めた(図 12)。

#### **2-6. DFAT 移植後の腎臓での TSG-6 発現**

TSG-6 の蛋白発現を免疫組織学的に観察した。糸球体においては、腎炎群と DFAT 投与群の両群で、同程度に染色された。尿細管においては、DFAT 投与群において、近位尿細管と遠位尿細管の両方で腎炎群よりも強く染色されていた(図 13)。

#### [ 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、また本邦の透析導入原疾患の中で第 5 位を占めている(16)。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(11)。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 (17)。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。肺でトラップされた MSC が腎臓へ直接移行することなく免疫調整能を発揮する機序として、エクソソームなどの細胞外小胞を介した機序が考えられる(18,19)。MSC が、微小小胞体を放出することによりその中の各種のサイトカイン、microRNA、ペプチド等を介して、重症複合免疫不全症モデルマウスや急性腎障害モデル動物において急性腎障害の形態的・機能的な改善をもたらす事が報告されている(18,19)。DFAT においても、微小小胞体やエクソソームなどの細胞外小胞を介して免疫調整能を発揮している可能性が考え

られる。このメカニズムの検証方法として細胞培養上清から細胞外小胞を精製する方法が確立されており(18)、今後課題としては、DFAT から抽出・精製した細胞外小胞を SCG マウスに投与し、同様に免疫調整能を発揮するか検証する必要がある。

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所見であった。また、糸球体障害の程度を評価する GIS において、腎炎を発症しない ICR マウスよりも有意に高値を示し、尿細管障害の程度を評価する TIS においても ICR マウスよりも有意に高値を示し、形態学的な腎炎を確認した。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 評価で有意差は無いが抑制効果を認め、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、腎臓の尿細管間質傷害に対する効果は比較的弱いことが考えられた。

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(20)。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だったため、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(21)。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(22)。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(6)。本研究において、腎炎群と比較し、DFAT投与群では、抗炎症作用を有する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と報告されている(6)。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- $\alpha$ 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可能性が示唆された。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出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 10<sup>5</sup> 個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発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(23)。MSC 製剤の問題点として、その想定されている作用機序が複数にわたるゆえの複雑さと、それゆえの評価の難しさがあげられる。DFAT は安価で調整がしやすく安全であり、自己移植と比較して同種移植での安全性・効果の非劣勢が確認できているというメリットが存在しており、今後免疫性腎炎への実用化に向けて、その免疫調整能を引き起こすメカニズムのさらなる探求が必要であると考えられた。

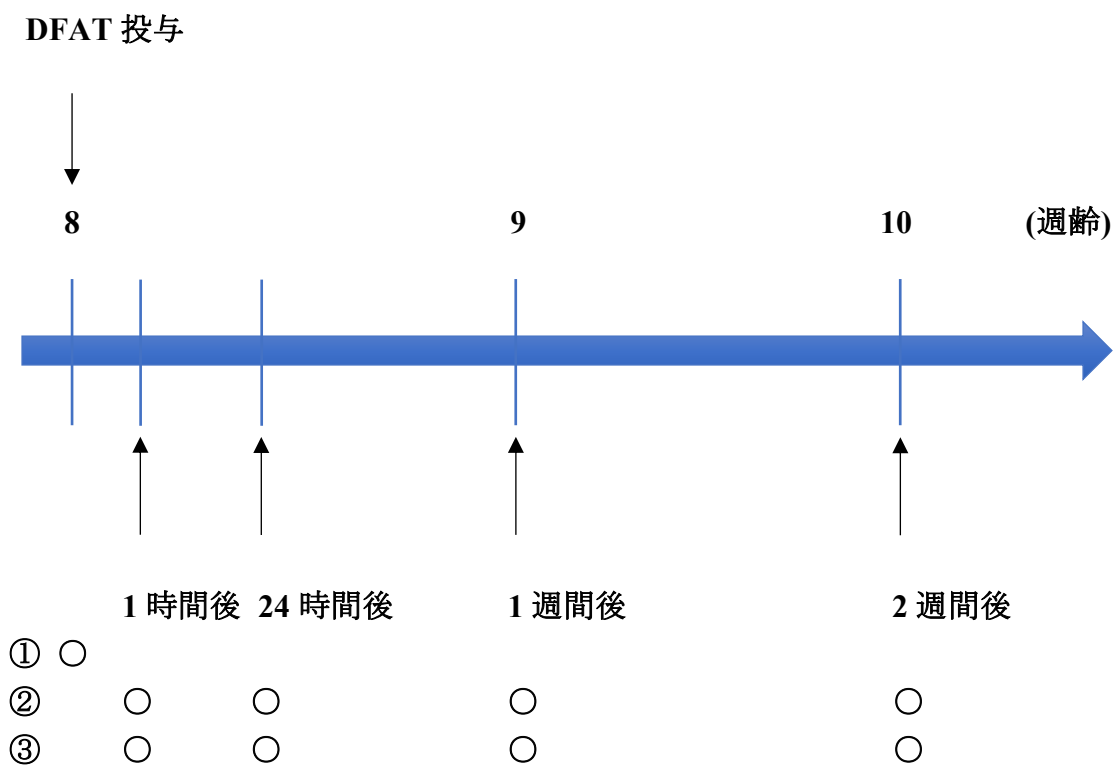


## [ 結語 ]

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、病理像において半月体形成を抑制する効果を発揮し、その機序の一つとして、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する。

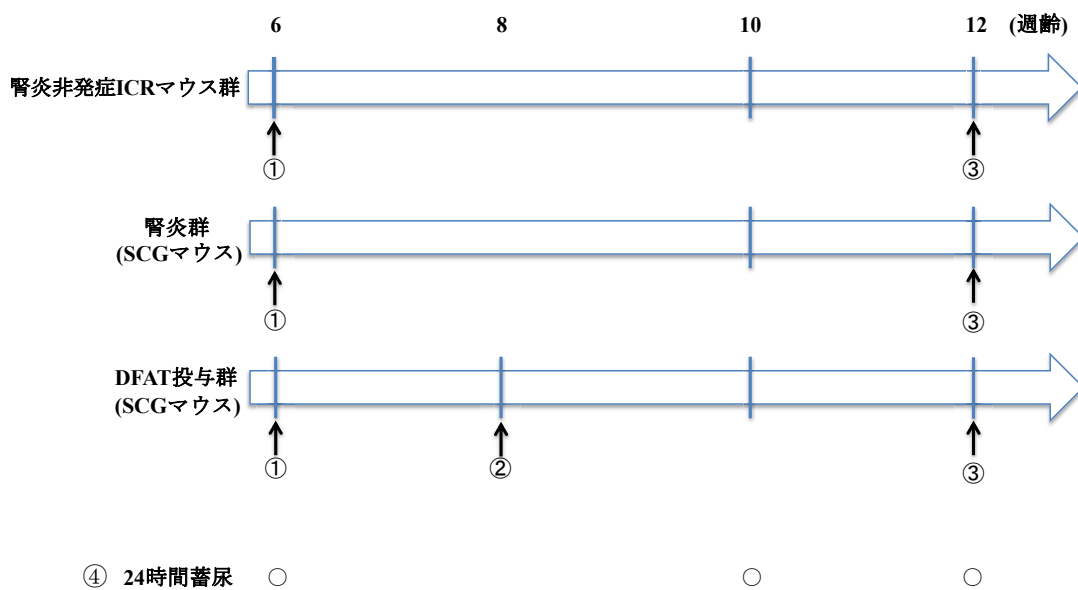
[ 謝辞 ]

本研究にあたり、研究全般においてご指導いただきました日本大学総合科学研究所、福田昇教授に心から感謝致します。そして、研究全般を支えていただきました医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、阿部雅紀教授、八戸学院大学健康医療学部、遠藤守人教授に心から感謝致します。また、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、丸山高史先生、日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内科学分野、深澤みゆきさん他、ご協力いただきました皆様に深く感謝致します。



- ① PKH26 でラベリングした脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell; DFAT) 10<sup>5</sup> 個を ICR マウス 4 匹に投与 (8 週齢)。
- ② それぞれ投与 1 時間後、24 時間後、1 週間後、2 週間後に心臓採血。
- ③ 腎臓・脾臓・肝臓・心臓・肺・腫大リンパ節を摘出して分割し、蛍光顕微鏡で観察。

図 1 DFAT 投与後の体内分布検証のプロトコール



- ① SCG マウス 12 頭 (雄 7 頭、雌 5 頭) を DFAT 投与群 7 頭 (雄 4 頭、雌 3 頭)、腎炎群 5 頭 (雄 3 頭、雌 2 頭) の 2 群に別け、そこに腎炎非発症 ICR マウス 7 頭 (雄 3 頭、雌 4 頭) を加え、3 群を作成する。
- ② DFAT 10s 個静脈投与する。
- ③ 心臓採血し、死亡を確認後に直ちに開胸開腹し、腎臓を採取。腎組織評価や、血液生化学検査、real-time PCR による腎臓における各種 mRNA 発現の検討、western blot 法による腎臓における各種蛋白発現の検討を行なった。
- ④ 6、10、12 週齢で 24 時間蓄尿及び尿蛋白定量を行なった。

図 2 DFAT 投与後の効果検証のプロトコール

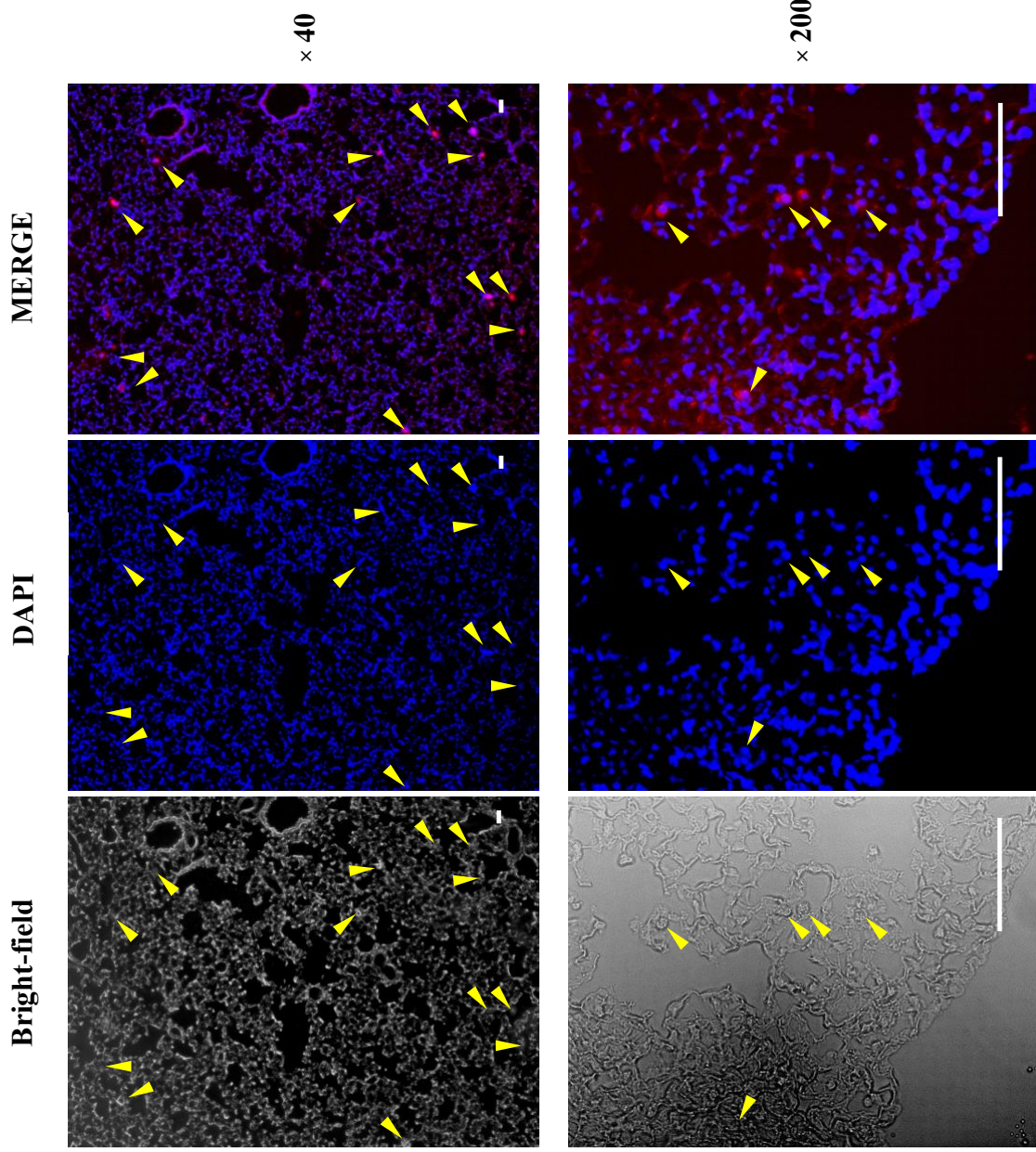


図3 DFAT投与1時間後の肺の蛍光顕微鏡

PKH26でラベリングしたDFAT10<sup>5</sup>個を8週齢ICRマウスの後眼窩静脈叢より投与すると、投与後1時間でDFATの肺でのトラップが確認された。しかしその他の臓器への分布はほとんど認めなかった。蛍光色素で染色されたDFATを(▼)で示した。スケールバーは50  $\mu\text{m}$ を示す。

PKH26

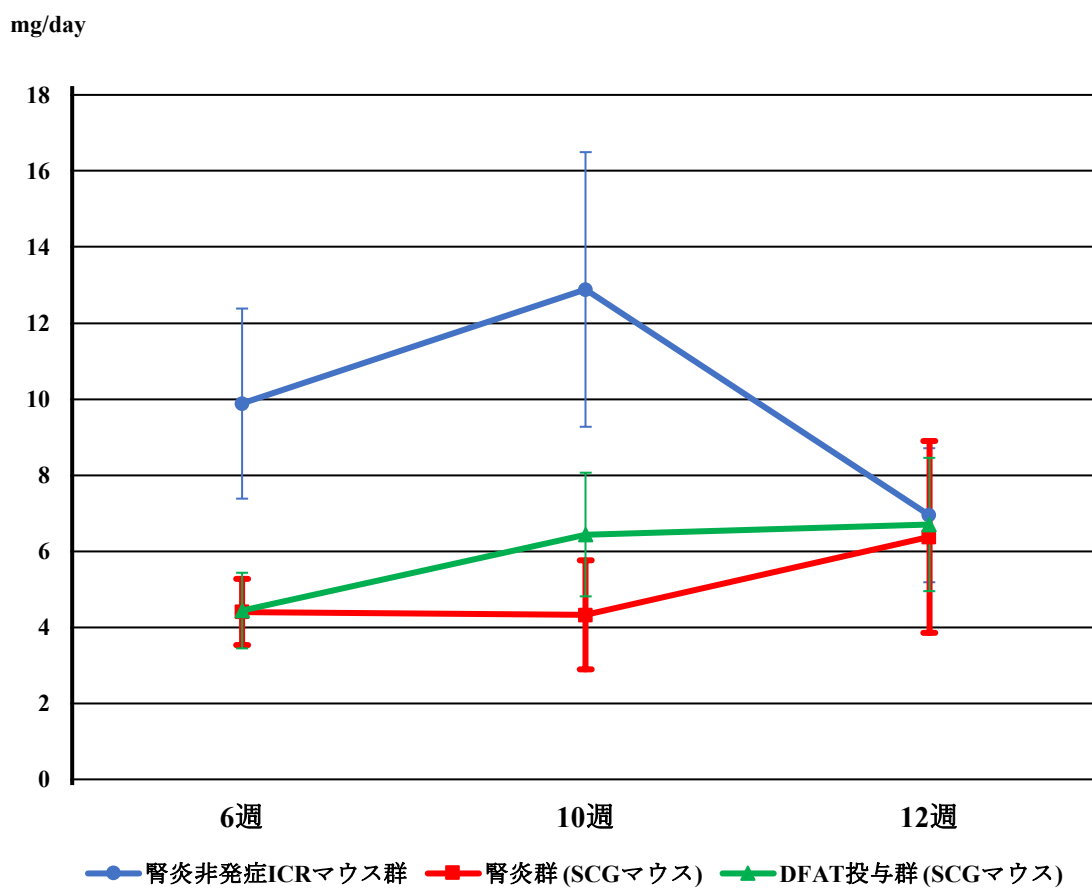
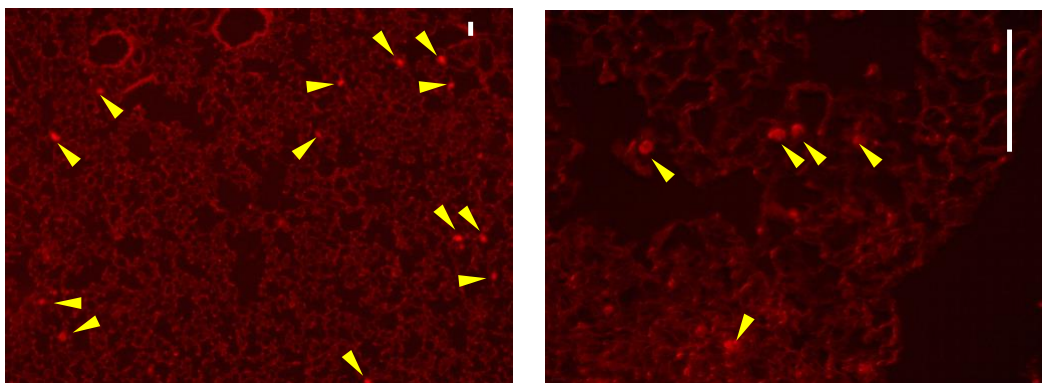
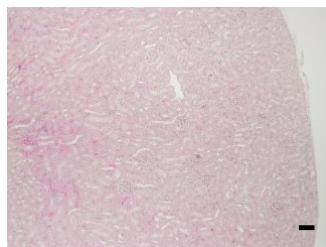


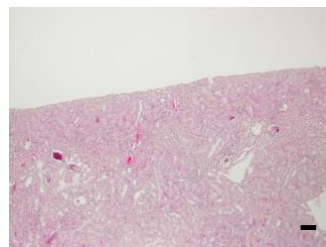
図4 1日尿蛋白定量の推移

尿蛋白定量では、腎炎非発症 ICR マウス群と腎炎群の比較では差を認めなかった。腎炎群と DFAT 投与群の比較でも差を認めなかった。値は平均値±標準誤差 (腎炎非発症 ICR マウス群 n=7、腎炎群 n=5、DFAT 投与群 n=7)。

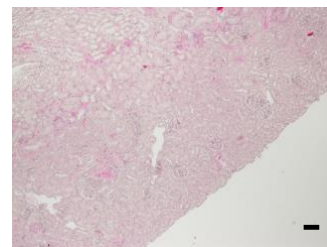
腎炎非発症  
ICR マウス群



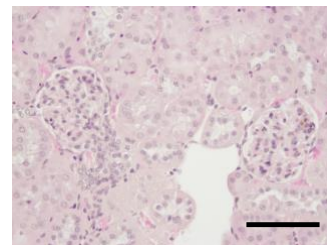
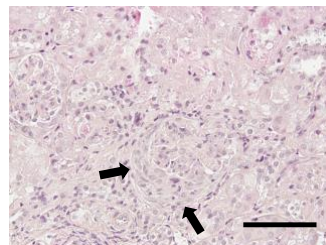
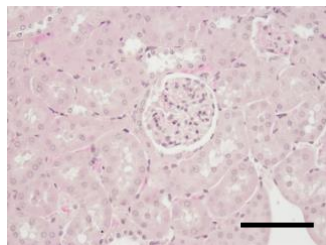
腎炎群  
(SCG マウス)



DFAT 投与群  
(SCG マウス)



HE 染色, × 40



HE 染色, × 200



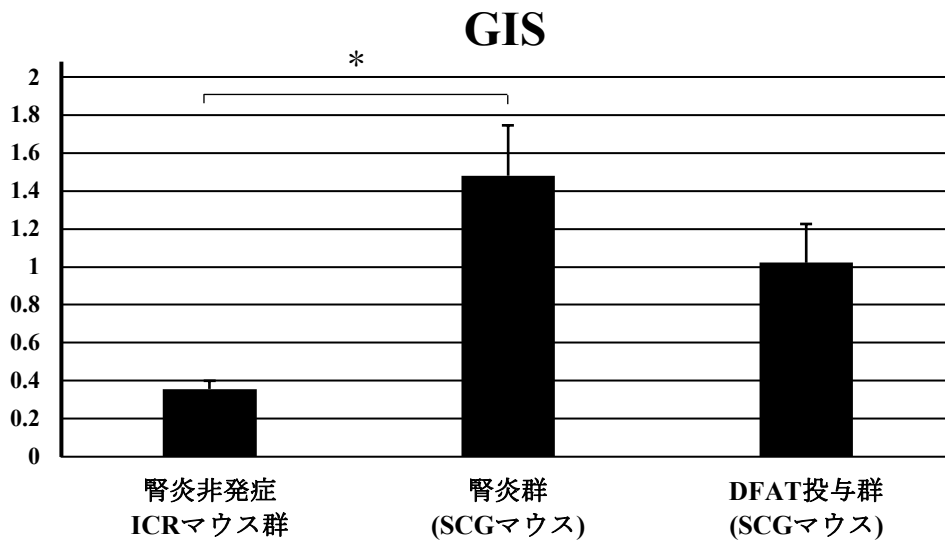
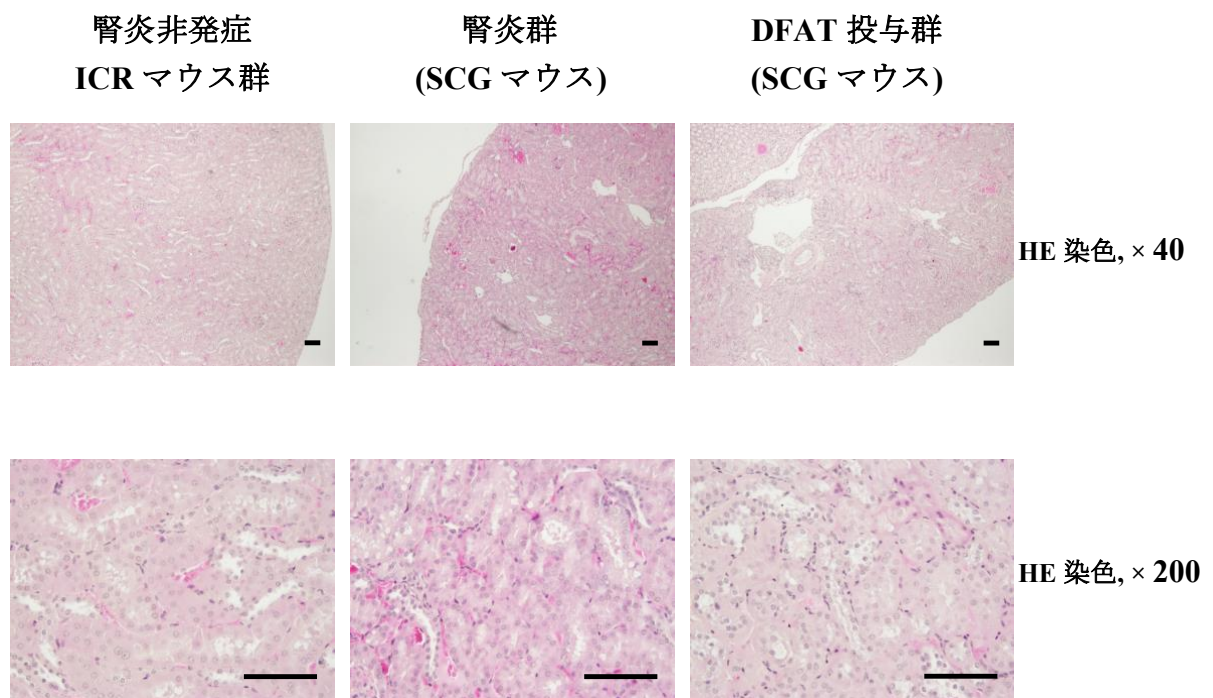


図 5 腎糸球体の組織評価

GIS では腎炎群において、腎炎非発症 ICR マウス群よりも高値を示し (P=0.013)、SCG マウスが腎炎を起こしていると考えられた。腎炎群と DFAT 投与群の比較では、DFAT 投与群で低下傾向であったが、有意差を認めなかった。しかし腎炎群では細胞性半月体形成を認めたが、DFAT 投与群では半月体形成は抑制されていた。矢印 (◄) は、半月体形成を示している。値は平均値±標準誤差 (腎炎非発症 ICR マウス群 n=7、腎炎群 n=5、DFAT 投与群 n=7)。スケールバーは 100 μm を示している。





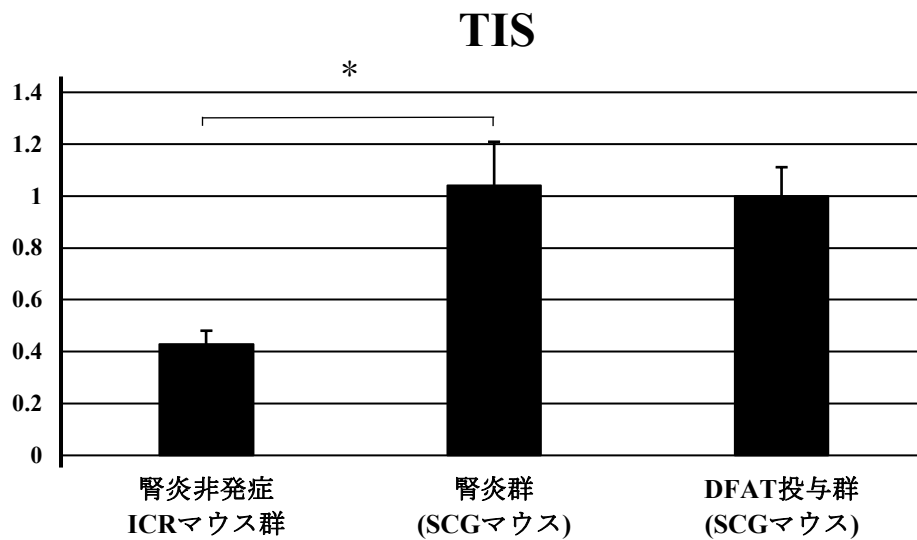
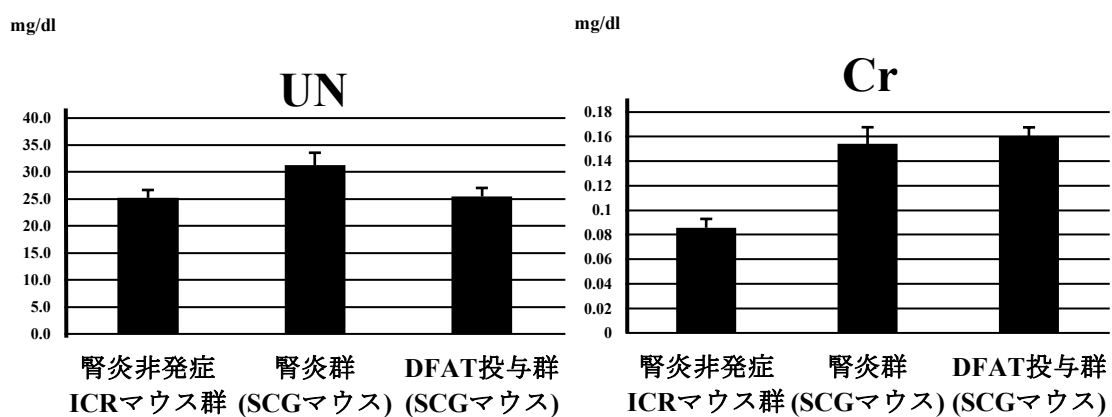


図 6 腎尿細管の組織評価

TIS では、腎炎群で腎炎非発症 ICR マウス群より高値を示した (P=0.018)。腎炎群と DFAT 投与群の比較では差を認めなかった。値は平均値±標準誤差 (腎炎非発症 ICR マウス群 n=7、腎炎群 n=5、DFAT 投与群 n=7)。スケールバーは 100 μm を示している。



ng/ml

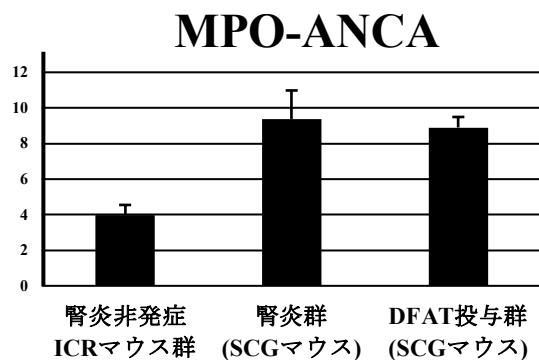
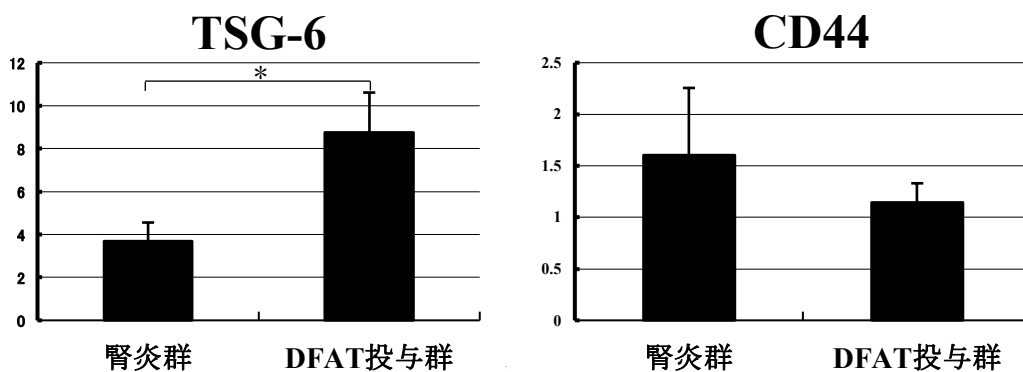


図 7 DFAT 投与後の血液生化学検査

血清抗好中球細胞質抗体 (Myeloperoxidase-anti-neutrophil cytoplasmic antibody; MPO-ANCA) 値と血清 UN (Urea Nitrogen; UN) 値、血清クレアチニン (Creatinine; Cr) 値は、腎炎群で腎炎非発症 ICR マウス群よりも高値を示した (血清 MPO-ANCA 値:  $P=0.005$ 、血清 UN 値:  $P=0.042$ 、血清 Cr 値:  $P=0.001$ )。腎炎群と DFAT 投与群では差を認めなかった。値は平均値±標準誤差 (腎炎非発症 ICR マウス群  $n=7$ 、腎炎群  $n=5$ 、DFAT 投与群  $n=7$ )。





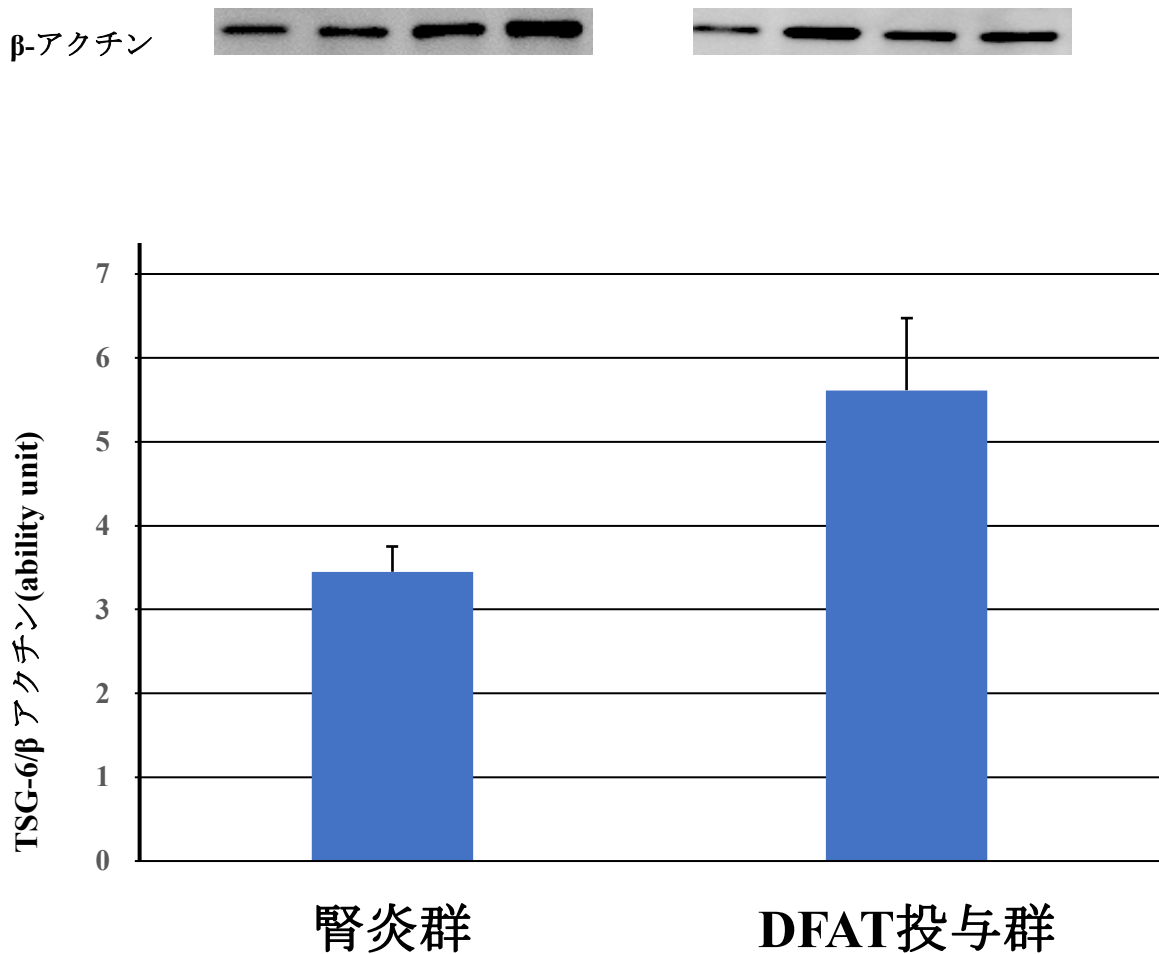


図9 Western blot 法における腎臓での TSG-6 の発現の検討

腎炎群と比較し、DFAT 投与群において、腎臓での TSG-6 蛋白発現は増加傾向であったが、有意差を認めなかった。値は平均値±標準誤差（腎炎群 n=5、DFAT 投与群 n=7）で示している。



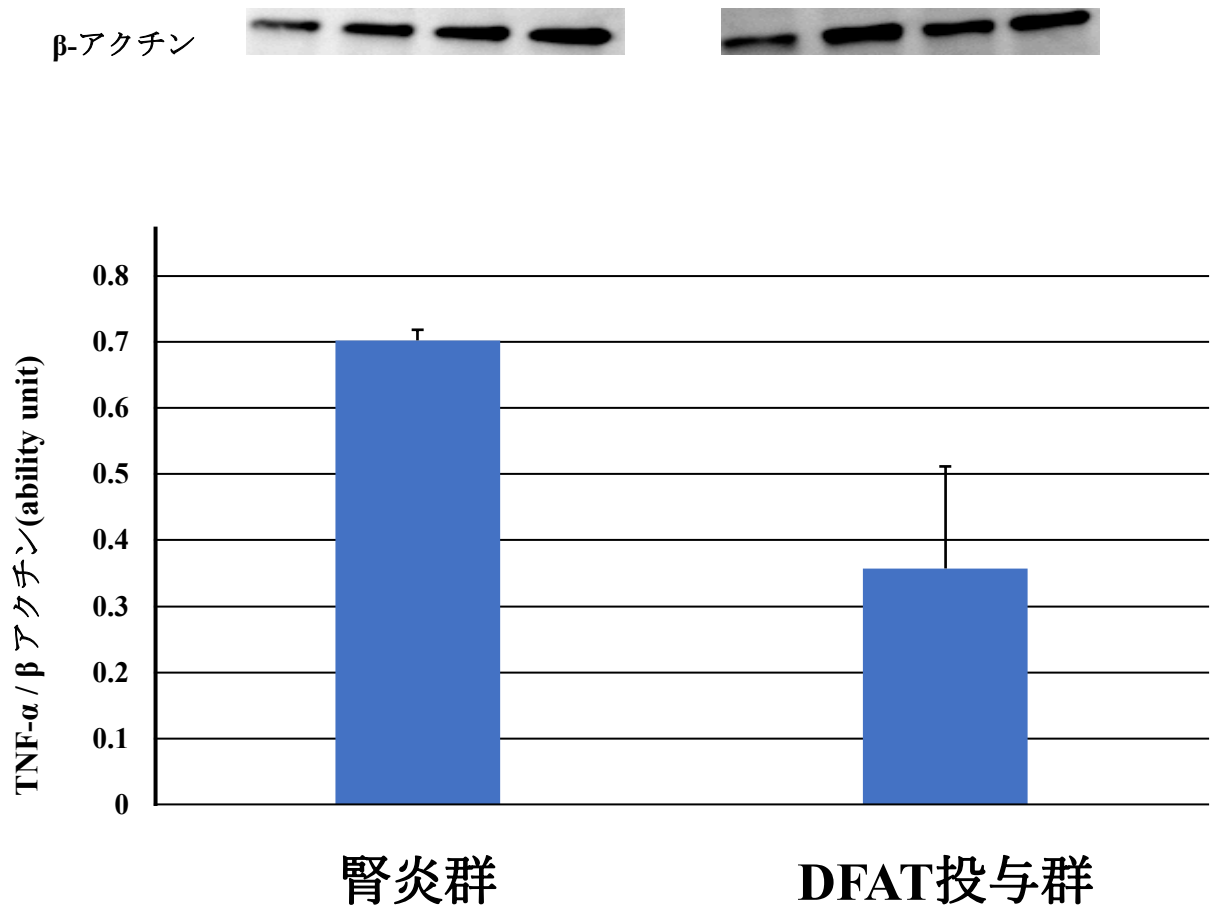
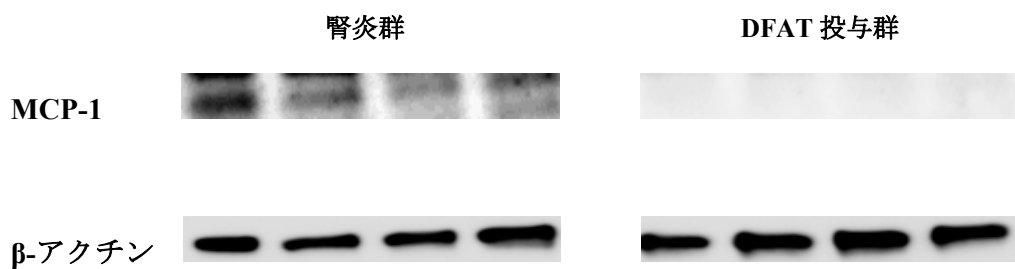


図 10 Western blot 法における腎臓での TNF- $\alpha$  の発現の検討

腎炎群と比較し、DFAT 投与群において、腎臓での TNF- $\alpha$  蛋白発現は低下傾向であったが、有意差を認めなかった。グラフは平均値±標準誤差（腎炎群 n=5、DFAT 投与群 n=7）。



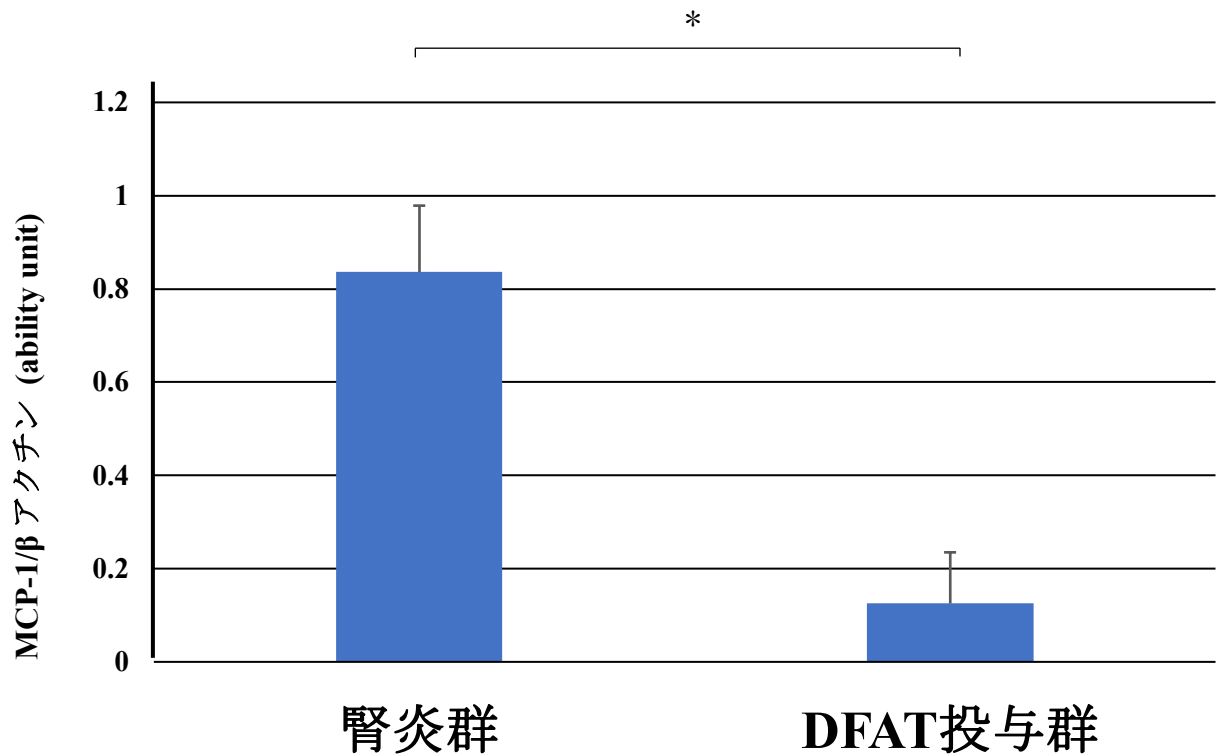
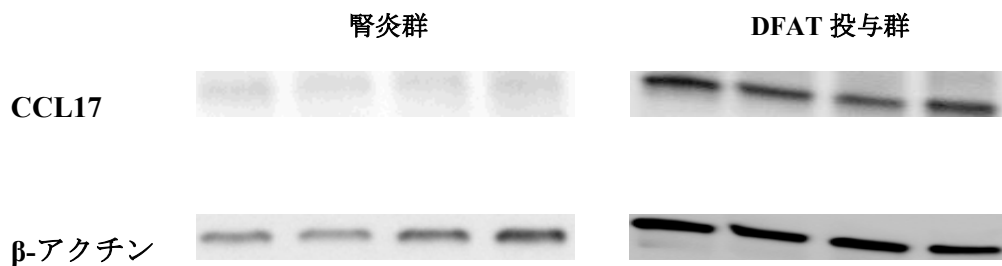


図 11 Western blot 法における腎臓での MCP-1 の発現の検討

腎炎群と比較し、DFAT 投与群において、腎臓での Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) 蛋白の有意な発現低下 ( $P=0.04$ ) を認めた。グラフは平均値±標準誤差 (腎炎群  $n=5$ 、DFAT 投与群  $n=7$ )。\*  $P < 0.05$ 。



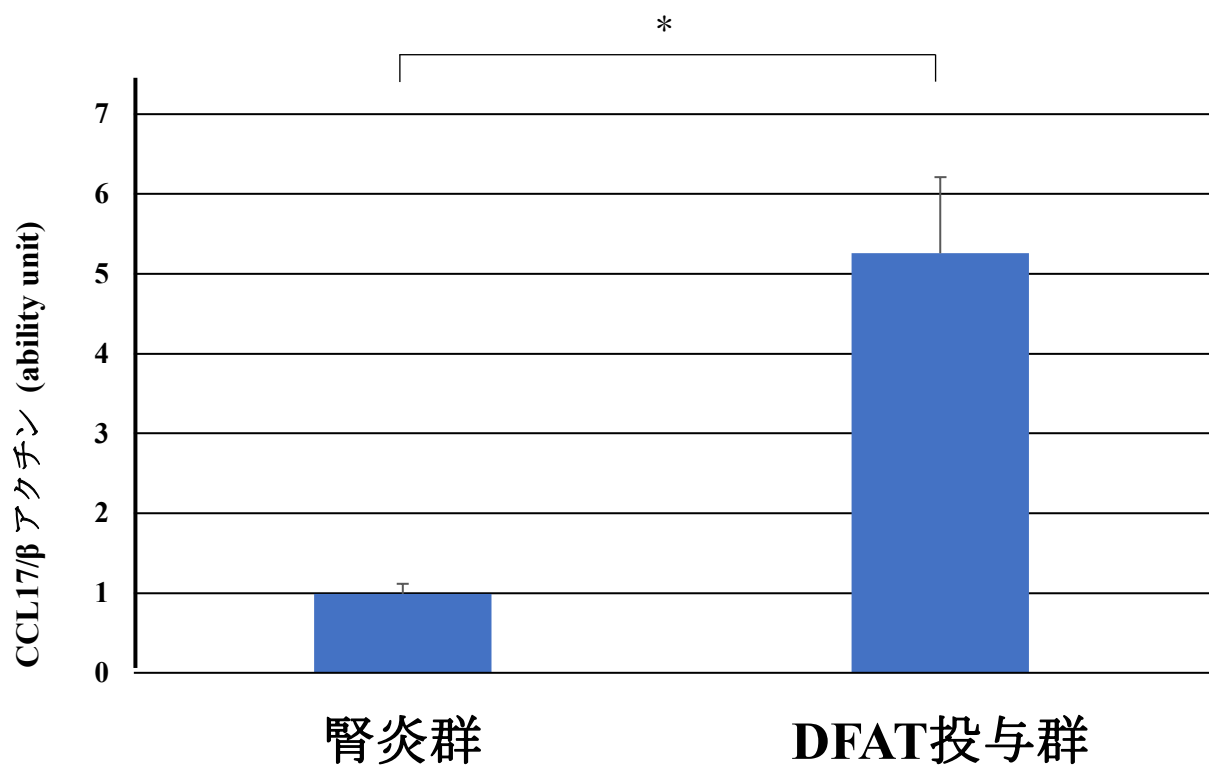


図 12 Western blot 法における腎臓での CCL17 の発現の検討

腎炎群と比較し、DFAT 投与群において、腎臓での C-C chemokine ligand 17 (CCL17) 蛋白の有意な発現増加 ( $P=0.04$ ) を認めた。グラフは平均値±標準誤差 (腎炎群  $n=5$ 、DFAT 投与群  $n=7$ )。\*  $P < 0.05$ 。

腎炎群

DFAT 投与群

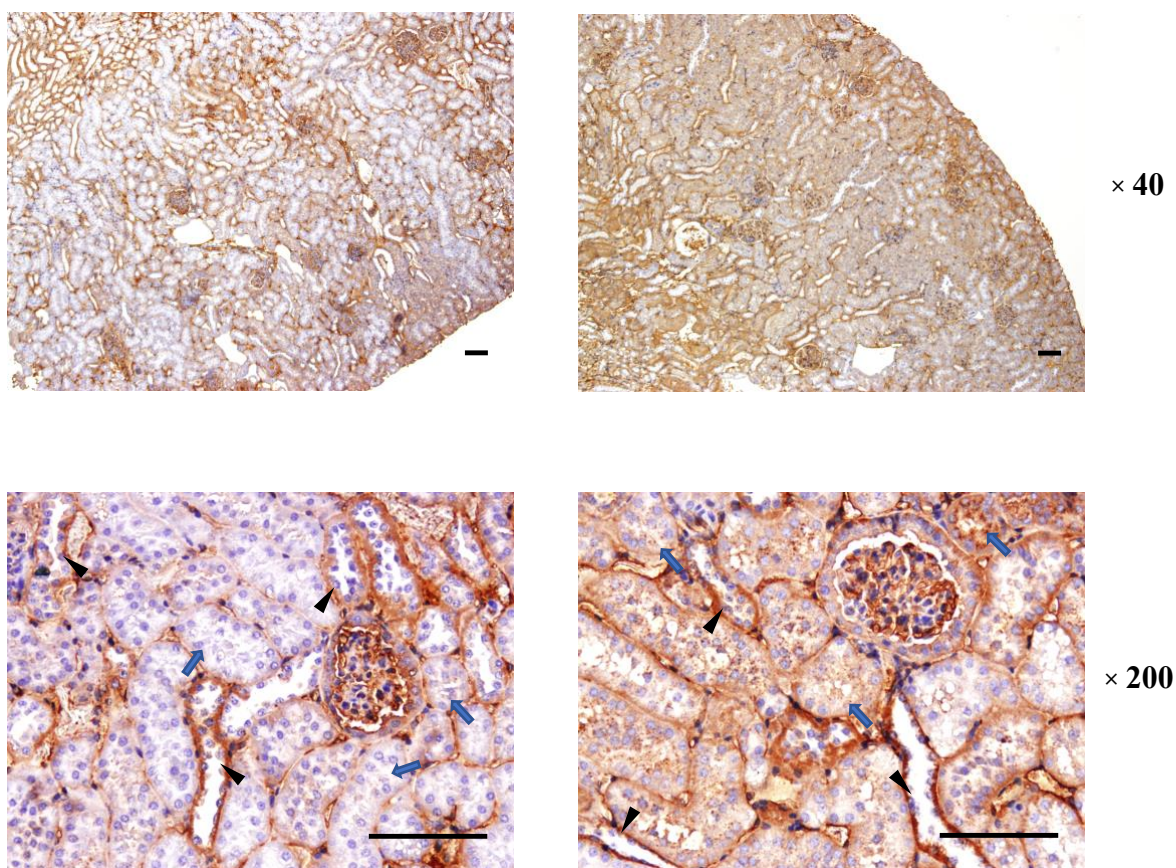


図 13 腎臓での TSG-6 の免疫染色

糸球体の染色性は腎炎群と DFAT 投与群で差を認めなかった。しかし糸球体の染色性を同一として比較した場合、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 ( ◄ ) で染色性の亢進を認めた。(腎炎群 n=5、DFAT 投与群 n=7)。スケールバーは 100 μm を示す。

[ 参考文献 ]

1. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol. 2008; 8: 726-736.



2. Kuzmina LA, Petinati NA, Parovichnikova EN, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells for the prophylaxis of acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem Cells Int.* 2012; 968213. 1-8.
3. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008; 371: 1579-1586.
4. Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy.* 2016; 2: 3-20.
5. Geng Y, Zhang L, Fu B, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via the activation of M2 macrophages. *Stem Cell Res Ther.* 2014; 5: 80. 1-14.
6. 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.
7. Matsumoto T, Kano K, Fukuda N, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008; 215: 210-222.
8. Nobusue H, Endo T, Kano K. Establishment of a preadipocyte cell line derived from mature adipocytes of GFP transgenic mice and formation of adipose tissue. *Cell Tissue Res.* 2008; 332: 435-446.
9. 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. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6: 80. 1-16.
10. Roddy GW, Oh JY, Lee RH, et al. Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- $\alpha$  stimulated gene/protein 6. *Stem Cells.* 2011; 29: 1572-1579.
11. 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.
12. 松本紘一, 遠藤守人, 福家吉伸, 他. [腎疾患の病態と治療( I )] ANCA 関連腎炎. *医学と薬学.* 2011; 65: 319-325.
13. Kinjoh K, Kyogoku M, Good RA. Genetic selection for crescent formation yields mouse strain with rapidly progressive glomerulonephritis and small vessel vasculitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 3413-3417.
14. Ishida-Okawara A, Ito-Ihara T, Muso E, et al. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19: 1708-1715.

15. Sabbatini M, Vitaioli L, Baldoni E, et al. Nephroprotective effect of treatment with calcium channel blockers in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 294: 948-954.
16. 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.
17. 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.
18. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20: 1053-1067.
19. Tsuji K, Kitamura S, Wada J. Secretomes from mesenchymal stem cells against acute kidney injury. *Stem cell Int.* 2018; 8693137. 1-14.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.

[ 研究業績 ]

宇都宮慧

I. 発表 ①一般発表

7(なし)

	②特別発表	なし
Ⅱ. 論文	①原著論文	1(共 1)
	②症例報告	なし
	③総論	なし
Ⅲ. 著書		なし

以上

- I. 発表  
①一般発表

1. 宇都宮慧, 及川治, 小林洋輝, 堀越周, 馬場晴志郎, 鈴木紘子, 林田迪子, 小熊秀隆, 中村吉宏, 鈴木敏子, 岡村真喜誉, 阿部雅紀, 岡田一義. 両腎摘出後に内シャント感染から感染性心内膜炎を併発した HD 患者の剖検例. 第 61 回日本透析医学会, 大阪, 2016 年 6 月
2. 宇都宮慧, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 遠藤守人, 松本太郎, 福田昇, 阿部雅紀: 免疫異常に起因する進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の開発. 53 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 福岡, 2017 年 11 月
3. 宇都宮慧, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 遠藤守人, 松本太郎, 福田昇, 阿部雅紀: Development of DFAT cell therapy for anca-induced nephritis. 2018 ISN FRONTIER MEETINGS, 東京, 2018 年 2 月
4. 宇都宮慧, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 遠藤守人, 松本太郎, 福田昇, 阿部雅紀: 免疫異常に起因する進行性腎障害に対する脱分化脂肪細胞を用いた細胞治療の開発. 第 16 回日本再生医療学会, 横浜市, 2018 年 3 月
5. 宇都宮慧, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 遠藤守人, 松本太郎, 福田昇, 阿部雅紀: ANCA 関連血管炎に対する DFAT 細胞治療の開発. 第 61 回腎臓学会, 新潟, 2018 年 6 月
6. 宇都宮慧, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 遠藤守人, 松本太郎, 福田昇, 阿部雅紀: ANCA 関連血管炎に対する DFAT 細胞治療の開発. 第 17 回日本再生医療学会, 神戸, 2019 年 3 月
7. 宇都宮慧, 丸山高史, 深澤みゆき, 常見明子, 遠藤守人, 松本太郎, 福田昇, 阿部雅紀: ANCA 関連血管炎に対する DFAT 細胞治療の開発. 第 62 回腎臓学会, 名古屋, 2019 年 6 月

②特別発表

なし

II. 論文

①原著論文

Tomoyasu Otsuki, Kei Utsunomiya, Masari Moriuchi, Shu Horikoshi, Masahiro Okamura, Hiroko Suzuki, Makiyo Okamura, Noriaki Maruyama, Nami Shibahara, Masanori Abe. Effect of Sucroferric Oxyhydroxide on Fibroblast Growth Factor 23 Levels in Hemodialysis Patients. Nephron. 2018; 140: 161-168.

②症例報告

なし

③総論

なし

Ⅱ. 著書

なし