

自家骨髄間葉系幹細胞による糖尿病性腎症に対する新規治療法の開発研究

——細胞賦活化剤の有用性の検討——

大谷美穂

札幌医科大学医学部解剖学第二講座

key words : 間葉系幹細胞, 糖尿病性腎症

要 旨

近年, 糖尿病性腎症に対して, 間葉系幹細胞 (mesenchymal stem/stromal cell; MSC) を用いた細胞療法の有効性が数多く報告されている¹⁾。しかしながら, ヒト糖尿病患者由来の MSC では細胞機能異常の報告²⁾があり, 自家移植では十分な治療効果が得られない可能性がある。そこで我々は, 糖尿病性腎症モデルラットの骨髄 MSC をヒト胎盤抽出液にて培養調整し, 糖尿病性腎症モデルラットに静脈投与し, その治療効果を検討した。結果, 未治療群との比較において, MSC 静脈投与群では, 尿アルブミン/クレアチニン比など, 腎機能に対して, 顕著な治療効果を認めなかった。今後, 糖尿病性腎症への自家 MSC 治療として, 適切な投与細胞数, また, 局所投与も含めた投与経路を検討する必要性が示唆された。

緒 言

現在, 透析導入となる主要原疾患のうち最も多いのが糖尿病性腎症であり³⁾, 根本的治療法は存在せず, 新たな治療法の開発が待ち望まれている。近年, MSC は, MSC がもつ高い組織修復機能から, 糖尿病性腎症を含め, 様々な慢性疾患に対する治療効果が期待されている。これまで MSC は, 免疫特権を有するとされ, 他家移植の報告が数多く見られたものの, 最近では MSC が IFN- γ など炎症性サイトカインの影響で MHC クラス II の発現を増強させるなど, 免疫特権を有するわけではない⁴⁾, と報告されて以降, 自家移植の重要

性が注目されている。

我々は糖尿病性腎症に対して, 自家骨髄 MSC を採取し, その機能を培養環境を調整することで賦活化し, 投与することで, より効果的で安全な自家移植が可能になるという仮説をたてた。本研究の目的は, 糖尿病性腎症モデルラットに賦活化した糖尿病性腎症ラット骨髄 MSC を静脈投与することで, 腎機能を改善させることである。

1 方 法

糖尿病性腎症モデル動物として OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットのオス 11 カ月齢で, Ualb/gCre (尿アルブミン/クレアチニン比) が 1,500 mg/gCre 以上の OLETF ラットを用いた。糖尿病性腎症由来 MSC として, OLETF ラットの大腿骨, 脛骨, 上腕骨から骨髄液を回収し, プラスチックシャーレ上で 15% Fetal Bovine Serum 入り α -MEM 培地で培養し, 接着培養にて MSC を回収した。回収した MSC は, ヒト胎盤由来抽出物を添加した培地で培養し, 治療用 MSC を回収した。OLETF ラットは, MSC 治療群 (n=7) に, 1 匹あたり, MSC 5×10^5 を 1.5 mL の PBS で懸濁し, 尾静脈投与した。また, Vehicle 群 (n=7) として, 1.5 mL の PBS を治療群と同様に尾静脈投与を行った。

治療開始時 (0 週) から 6 週までの期間, 2 週間ごとに, 24 時間畜尿と採血を行った。生化学的評価として, 尿アルブミン (免疫比濁法), 尿クレアチニン (酵素法) および血清クレアチニン (酵素法), 尿素窒

素（ウレアーゼ・LED・UV法，すべてSRL），ELISA法にて尿KIM-1（Kidney injury marker-1, R&D systems）および尿L-FABP（fatty acid binding protein, RSD）を計測した。血糖について，16時間の絶食を行ったのち，空腹時血糖を測定した。統計学的評価は，各種生化学的評価について，2配置分散分析後に，pairwise t-testを行い，p値をBonferroni法を用いて補正し，MSC治療群とVehicle群の比較を行った。

2 結果

血糖は，治療群は 219 ± 55.6 （平均値 \pm SD，以下同様）mg/dlとVehicle群では 190 ± 44.4 mg/dlで有意差を認めなかった（図1）。また体重も，治療群は 438 ± 24.7 gとVehicle群では 452 ± 42.3 gで有意差を認めなかった（図2）。腎機能について，尿アルブミン/クレアチニン比について，治療群は $2,309 \pm 775$ mg/gCreとVehicle群では $1,776 \pm 654$ mg/gCreで有意差を認めなかった（図3）。また，血清の尿素窒素について，

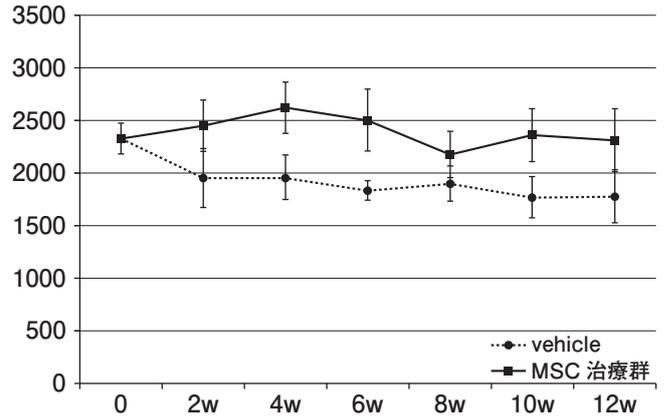


図3 尿アルブミン/クレアチニン

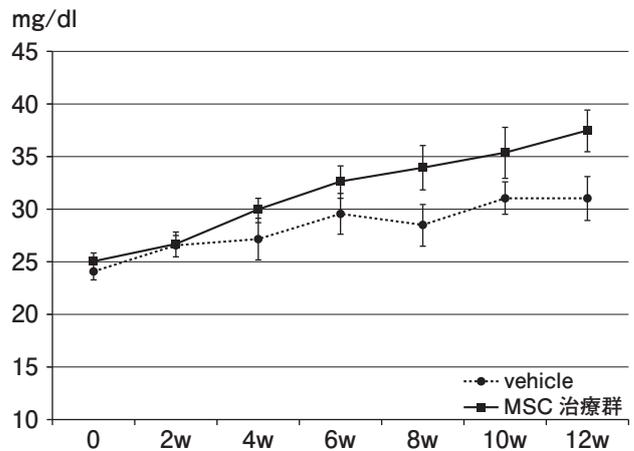


図4 尿素窒素

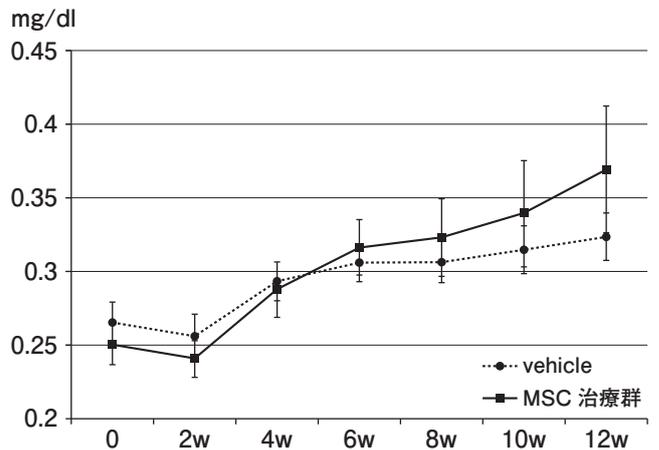


図5 血清クレアチニン

治療後約6週で治療群は 37.4 ± 5.2 mg/dlとVehicle群 31 ± 5.5 mg/dlに比して有意差を認めなかった（図4）。血清クレアチニンについて，治療後約6週以降で治療群は 0.37 ± 0.11 mg/dlとVehicle群では 0.31 ± 0.04 mg/dlで有意差を認めなかった（図5）。尿細管障害マーカーである尿中kim-1について，治療後約6週以降で治療群は 74.1 ± 51.2 ng/dayとVehicle群では

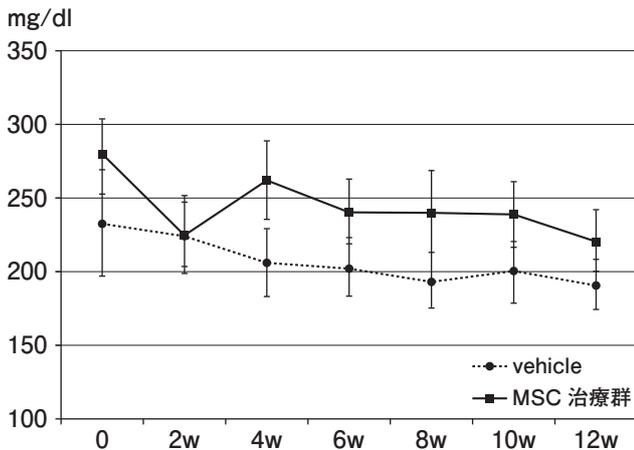


図1 血糖

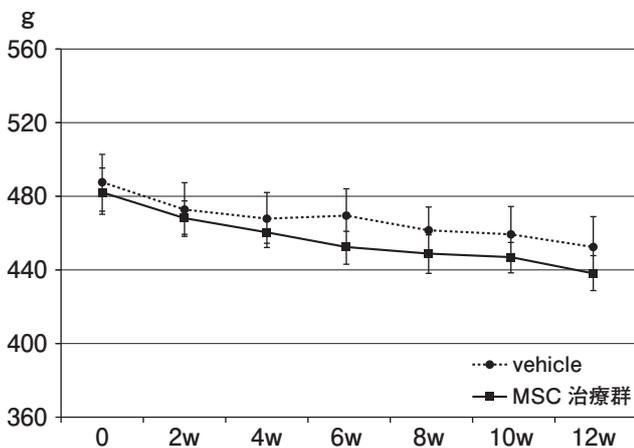


図2 体重

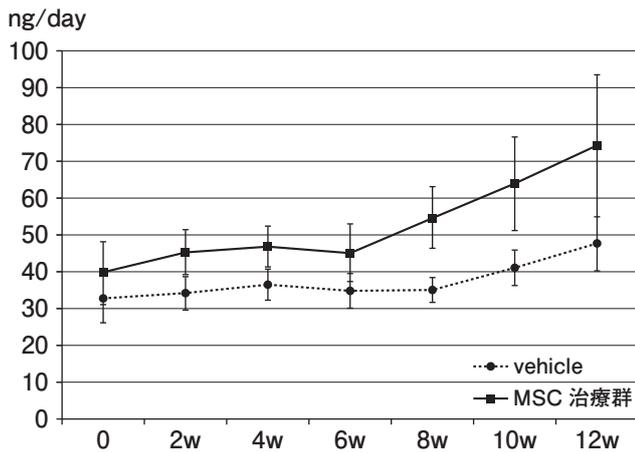


図6 u-kim-1

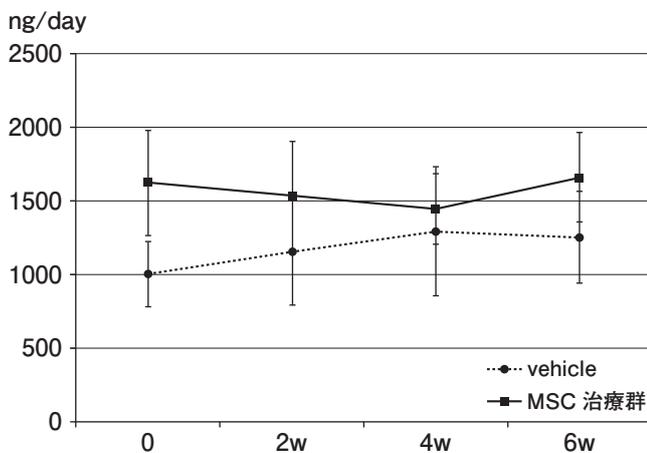


図7 u-L-FABP

47.6 ± 19.5 ng/day で有意差を認めなかった (図6). 同様に尿中 L-FABP についても, 治療後約 6 週以降で治療群は 1,657.4 ± 800 ng/day と Vehicle 群では 1,248 ± 829 ng/day で有意差を認めなかった (図7).

3 考察

ラット由来骨髄 MSC を糖尿病性腎症モデルである OLETF ラットに経静脈的に投与し, 生化学的に腎機能の改善を認めなかった. もともと糖尿病では骨髄異常が指摘されているため, その異常を改善すべく胎盤由来抽出物を用いて, 独自の方法で賦活化したが, 効果を認めなかった. MSC の全身投与を行った報告で,

腎臓にはあまり認められず, 肺や脾臓でわずかに認められるのみであったとの報告もある⁵⁾. そのため, 細胞の質は改善したものの, 全身投与という投与方法によって良好な結果が得られなかった可能性がある.

4 結論

培養調整したラット由来骨髄 MSC を, 糖尿病性腎症モデルである OLETF ラットに経静脈投与した. 生化学的および組織学的評価の両方において, 治療群で腎機能の改善を認めなかった. 今後, 細胞投与量, 投与回数および投与経路などを評価していく必要がある.

利益相反自己申告: 2015 年アインホールディングスが提供する糖尿病細胞療法講座においてこの研究を行った.

平成 27 年日本透析医会公募研究助成により得られた成果の一部は, 他雑誌に投稿予定のため, 二重投稿となることを避け, 本報告書ではその概要を簡易的にかつ総論的に記載した.

文献

- 1) Weimin N, Yan F, Ling X, et al. : Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation alleviates Renal Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy. *J Histochem Cytochem* 2015; 63 : 842-853.
- 2) Cesselli D, Betrami PA : Stem Cell Senescence in Diabetes : Forgetting the Sweet Old Memories. *Diabetes* 2014; 63(6) : 1841-1843.
- 3) 日本透析医学会統計調査委員会 : わが国の慢性透析療法の現況 2016 年 12 月 31 日現在 : 日本透析医学会, 2017.
- 4) Le Blanc K, Tammik C, Resendahi K, et al. : HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31 : 890-896.
- 5) Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, et al. : Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes. *Scientific Reports*. 2016; 6 : 34842.