

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 間葉系幹細胞治療用中空糸膜カラムの開発
(英語) Development of therapeutic hollow fiber membrane columns covered with mesenchymal stem cells

研究開発実施期間: 令和3年5月10日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 古橋 和広
(英語) Kazuhiro Furuhashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 機関名: 国立大学法人東海国立大学機構

所属・役職: 名古屋大学医学部附属病院・腎臓内科・病院講師

(英語) Institution: Nagoya University

Affiliation/Position: Lecturer, Department of Nephrology, Nagoya University Hospital

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

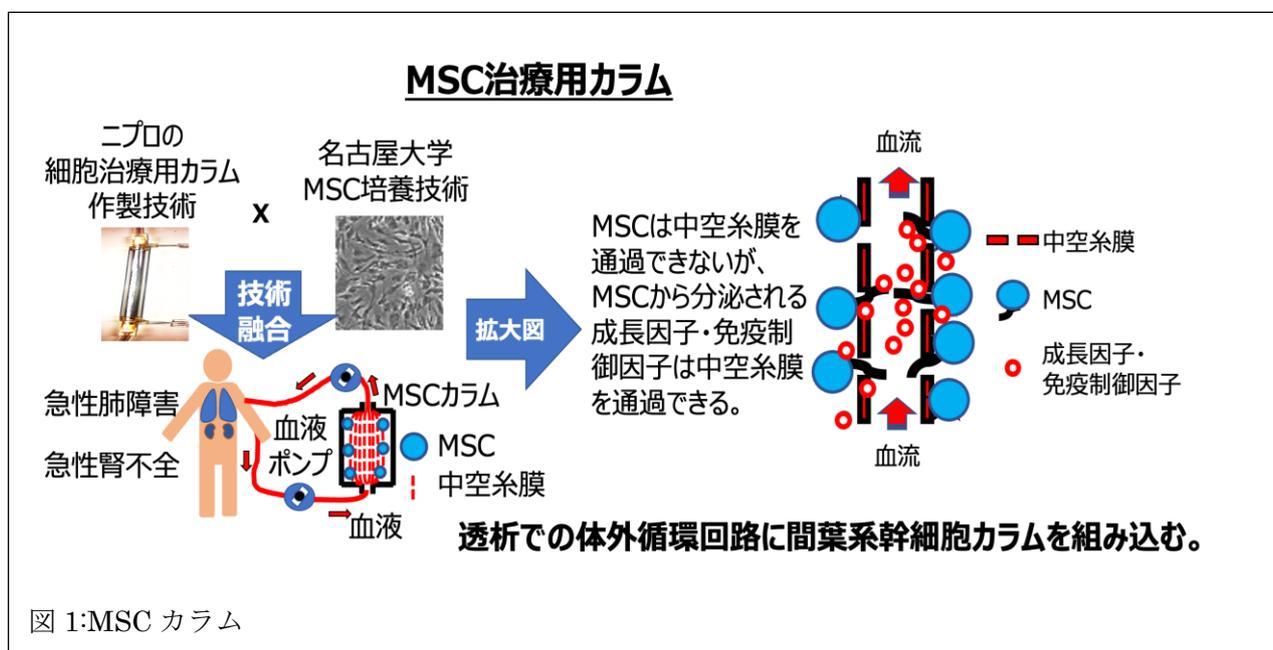
<背景>

集中治療室（ICU）患者においては5割が急性腎不全（AKI）を呈しており、急性腎不全の合併は生命予後を規定する重要な因子であることが判明し、その重要性が認識されている（KDIGO AKI ガイドライン）。さらに、AKIを合併したあと、一旦腎機能が回復してもその後に慢性腎不全になるリスクが高まることが分かってきた。そのため、早期にAKIを診断し、介入することの重要性が認識され、早期透析導入、各種昇圧薬、利尿薬など、多くの介入試験が実施されてきたが、AKIの進行抑制あるいは回復促進に作用する治療法は未だひとつもない（日本AKIガイドライン）。

これまで我々は、既存の治療法とは異なる新規治療の開発を目指し、独自の培養液で調整した脂肪組織由来幹細胞（ASC）を用いて、腎障害モデルに対する検討を進めてきた（Cell Transplant. 2013、J Am Soc Nephrol. 2013）。この研究をもとに2020年からは、難治性IgA腎症に対して医師主導治験を行った。その中で、我々はASCが炎症が強ければ強いほど強い治療効果を示すことを見出している。ICUの患者は炎症状態が強いことが多く、炎症によるASCの活性化を通してASCがICUにおけるAKIの病態を改善させることが期待される。しかしながら、ASC静脈投与の際の副作用として肺塞栓が知られている。循環動態が安定した患者においては、小さな血栓は問題にならないが、循環動態が崩壊した患者においては小さな血栓も致命的となることがある。特に、ICUのAKI患者は肺障害を合併していることが多く、循環動態も悪いことから、肺塞栓は致命的な影響を及ぼす危険がある。

<目的>

本課題では、こうした副作用の心配がなく、腎臓の回復を強力に促進する全く新たな治療システムの構築を目指し、再生医学と医療工学の融合による新たな間葉系幹細胞（MSC）治療装置としてASC治療用中空糸膜カラム（ASCカラム）の開発を進めた。具体的には、中空糸膜の外側にASCを充填したカラムに血液を循環させる。中空糸膜の内側を通過した血液は中空糸膜を介してASCと物質のやり取りを行うこととなる。中空糸膜が壁となり、ASCは生体内に直接入ることがないため、細胞による肺塞栓のリスクはゼロである。さらに、我々はASCの免疫調整能が液性因子によって発揮されることを報告してきた（Cell Transplant. 2013、J Am Soc Nephrol. 2013）。ASCを直接体内に投与せずとも、ASC由来の組織修復因子・炎症制御因子を効率的に体内へ投与できる治療法が確立できれば、ASCの静脈投与が難しい疾患に対して細胞そのものを投与せずとも治療効果を発揮できると考え、ASCカラムの開発を進めた（図1）。本治療法の確立は、循環動態が崩壊したICUのAKI患者に対して、ASCの肺塞栓を心配することなく、ASCの有効成分を投与することが可能となり、未だ治療法がないAKIに対する新たな治療法を創出し、ICUにおいては患者の生存率改善にも寄与することが期待される。



<結果>

①ASCカラム培養法の確立

まず、MSCに関して、骨髄由来MSC（BM-MSC）または脂肪由来MSC（ASC）のどちらの細胞を使用するのか決定するために、BM-MSCとASCを静脈投与にて急速進行性腎炎ラットモデル（糸球体免疫複合体型AKIモデル）に投与し、有効性を比較した。ASCは、BM-MSCより強力な腎保護効果を示し、免疫細胞に対してもより強い免疫制御能を有していることを見出し報告した（Communications Biology 2022）。この結果より、急速進行性腎炎ラットモデル（糸球体免疫複合体型AKIモデル）およびASCを用いて、本課題ではASCカラムの有効性および治療機序の解明

を進めることとした。

ASC カラム治療での使用前に ASC を中空糸膜に接着させることが必要である。そこで、中空糸膜での ASC 培養を開始したが、ただ単に ASC をカラムに充填するだけでは、細胞はほとんど中空糸膜に接着しなかった。さまざまな中空糸膜の素材に関する検討を行い、親水化処理した中空糸膜を用いること、中空糸膜の外腔表面に播種した ASC を中空糸膜に流体力学的負荷を加える条件で培養することにより、ASC が複数層に重なった状態で培養することに世界で初めて成功した。現在では、安定して閉鎖形・流体・三次元培養を行うことができるようになった。

閉鎖形・流体・三次元培養を ASC カラムで行うことにより、ELISA にて ASC 由来の成長因子である肝細胞増殖因子 (HGF) および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の産生が増強し、フローサイトメトリー解析において免疫調整因子である PD-L1 および CD73 などの発現が増強することを見出した。さらに、MSC の作用伝達様式と知られているエクソソームを含む細胞外小胞 (EVs) の産生が ASC カラムの流体負荷により分泌が増強することを見出した。

②ASC カラムの in vivo での検討

ASC カラムの有効性および安全性を確認するためには、安定した体外循環評価法が必要であり、小動物ではラット、大動物ではミニブタにおいて体外循環の方法を確立した。安全性に関しては、ASC 静脈投与の際には、肺において投与した細胞周囲に血栓が認められたが、ASC カラムでは血栓はほとんど認めなかった。有効性に関する検討は、AKI を原因別に 3 つ (糸球体免疫複合体型、尿細管障害型、血管内皮障害型) にわけ検討を行った。

糸球体免疫複合体型 AKI モデルでは、抗基底膜抗体型の急速進行性糸球体腎炎ラットモデルを用いて検討を行った。長期留置カテーテルを右内径静脈より留置し、手術創が安定した 3-5 週後に抗基底膜抗体 (TF78) を投与することで腎炎を惹起し、day0, day2, day4 で 1 回 5 時間の体外循環 ASC カラム治療を行い、day4 に蛋白尿を day7 に血清学的および組織学的に腎機能を評価した。ASC カラムにおいて、細胞数依存的に高い治療効果を認めた (図 2)。

組織学的には、投与した病的抗体の沈着に差は認めなかったが、糸球体障害および腎臓へ浸潤するマクロファージの減少を細胞数依存的に認めた。またフローサイトメトリー解析において、ASC カラムにより腎臓での M2 マクロファージ分画の増加を認めたが、ASC 静脈投与の際に見られる Treg の増加は認めなかった。

尿細管障害型 AKI モデルでは、横紋筋融解症ラットモデルを用いて ASC カラムの有効性を評価した。50%グリセロールを両側大腿筋に投与し横紋筋融解症を誘導した後に、5 時間の体外循環にて ASC カラム治療を行い生存率および腎機能を評価した。ASC カラムは、生存率を改善させ、血清学的にも腎保護効果も示した (図 3)。

血管内皮障害型 AKI においては、敗血症に伴うモデルを使用するため循環動態が崩壊しており小動物での体外循環は負担が大きすぎること、臨床では ICU での AKI の原因として頻度が高いことから、ASC カラムの大型化を目指して大動物での検討を行った。最初に、カテーテル留置法の確立、大腸菌の投与量の決定、麻酔・呼吸管理法の確立を達成し、安定したマイクロミニブタにおける体外循環を使用した状況での AKI モデルの確立につなげた。次に、ASC カラムの有効性を評価し、生存率、腎機能 (血清尿素窒素、血清クレアチニン)、血行動態 (血圧、SpO2) の改善が見られた。

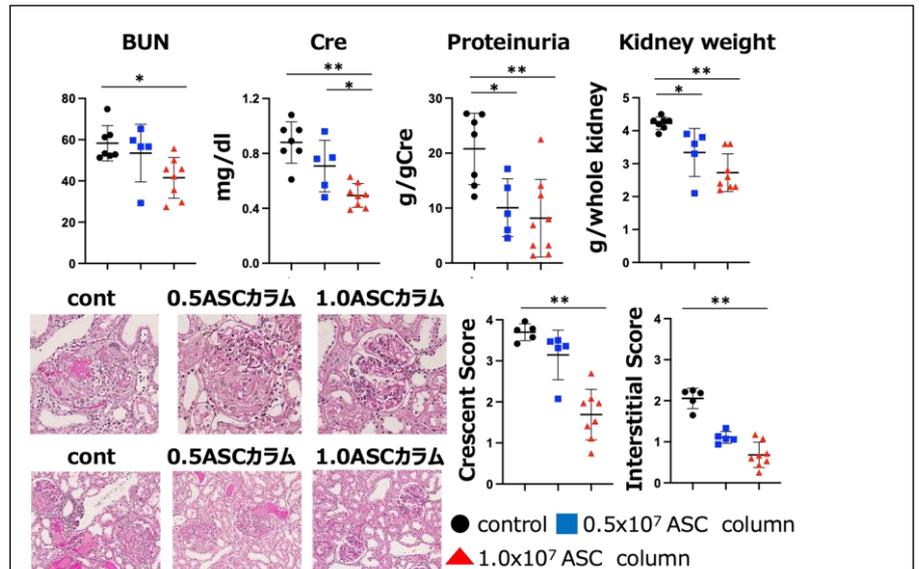


図 2: ASC カラム体外循環は糸球体型 AKI モデルを劇的に改善させた

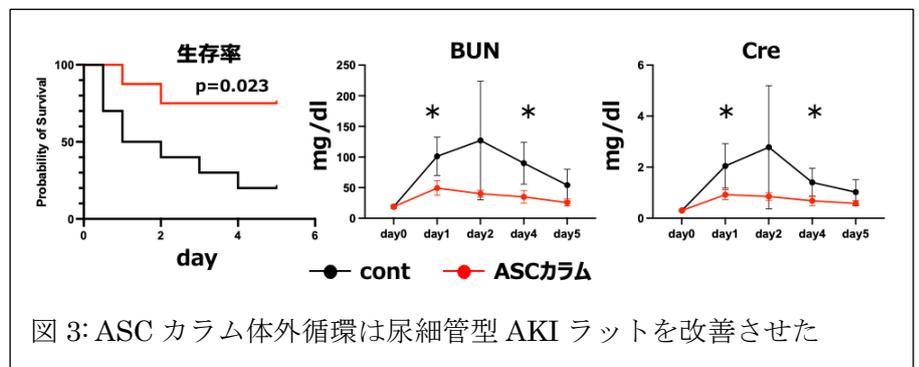


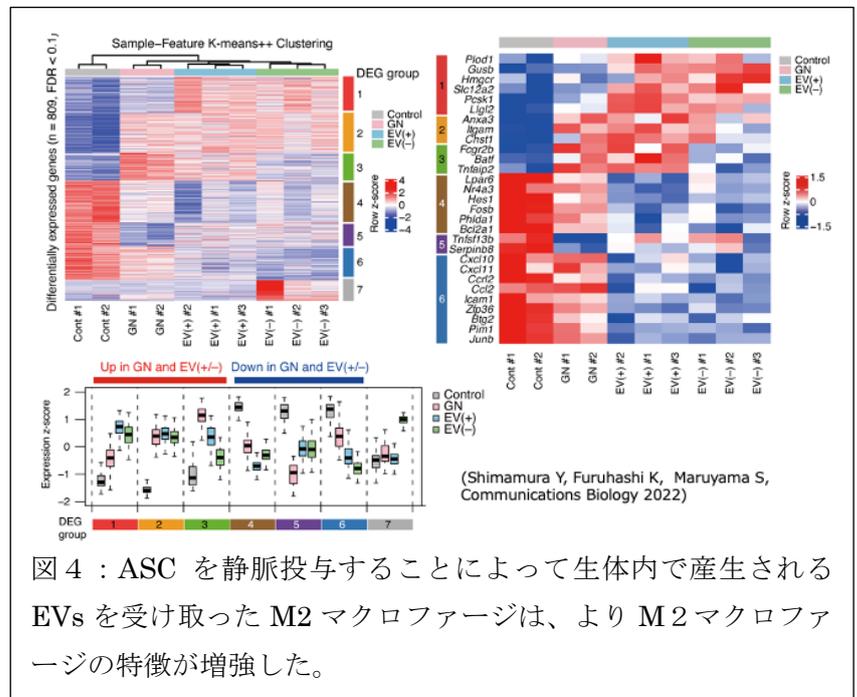
図 3: ASC カラム体外循環は尿細管型 AKI ラットを改善させた

作用機序についても解析を進めている。我々は、ASC を静脈投与することによって生体内で産生される ASC 由来 EVs が M2 マクロファージに優先的に移送されること、EVs を移送された M2 マクロファージは、より M2 マクロファージの特徴が増強することを見出した (図 4)

(Communications Biology 2022)。ASC カラムでは、腎臓のフローサイトメトリー解析から、治療後に腎臓で M2 マクロファージは増加し、浸潤白血球が減少することを見出した。ASC カラムも M2 マクロファージに注目しながら作用機序の解析を進めた。

In vitro でも培養皿 ASC と ASC カラムの ASC を RNA-seq で比較することで、シェアストレス負荷がどのような細胞機能変化をきたし、どのようにして治療効果に寄与しているか解明をすすめた。In vivo の解析と in vitro の ASC カラムの RNA-seq 解析・メタボローム解析・プロテオーム解析から統合的な解析を行ったことで、現在では ASC カラムの治療機序の本幹に近づきつつある。

ASC カラムの有効性は示され、基盤技術の開発に成功した。今後は、臨床で使用するための必要な評価を進め、早期の臨床応用へつなげていく。また、ASC カラムの治療機序の本幹を同定することで、ASC カラムの品質保証マーカー開発へ発展させる。



<English version>

About 50% of intensive care unit (ICU) patients suffer from acute kidney injury (AKI), and AKI complications were found to be an important factor in defining life expectancy (KDIGO AKI Guidelines). Furthermore, it has been found that even once renal function is restored after complications of AKI, there is an increased risk of developing chronic renal failure in the future. Therefore, the importance of early diagnosis and intervention of AKI has been recognized, and many clinical trials have been performed, including early introduction of dialysis, various hypertensive drugs, diuretics, etc. However, no treatment has yet been found to prevent the progression of AKI or promote recovery (Japanese AKI Guidelines). Aiming to develop a novel therapy for AKI, we have investigated the therapeutic potential of adipose tissue-derived stem cells (ASC) generated in a unique culture medium for animal AKI models and demonstrated their therapeutic efficacy (Cell Transplant. 2013, J Am Soc Nephrol. 2013). In these studies, we have found that ASCs exhibit stronger therapeutic effects depending on the strength of inflammation. Patients in the ICU are often in a highly inflammatory state, and ASC is expected to improve the pathogenesis of AKI in the ICU through inflammation-induced activation of ASC. However, pulmonary embolism is a known side effect of intravenous administration of ASC. While a small thrombus is not a problem in patients with stable hemodynamics, even a small thrombus can be fatal in patients with hemodynamic collapse. Since patients with AKI in the ICU are often complicated by pulmonary problems and have poor circulation, pulmonary emboli are at risk of fatal consequences. The goal of this project was to establish a treatment method that combines the medical engineering of hollow fiber columns and the regenerative medicine of ASC. The cell therapy device under development is expected to be a new cell therapy that eliminates the disadvantages of intravenous cell administration, as it can be expected to have pleiotropic effects through the release of humoral factors without the need to administer cells into the body. We have established a unique culture method of tightly attaching ASCs around a specialized hollow-fiber membrane resulting in the development of a therapeutic device (ASC column). ASC columns showed therapeutic potential in two rat models of acute kidney injury: glomerulopathy and tubular injury. To optimize the treatment conditions of the ASC columns, we determined the requirements regarding the number of seeded cells per hollow fiber membrane area and the shear stress level. Moreover, a porcine acute renal failure model was established using an E. coli induced sepsis model, and the ASC columns showed efficacy in a large animal AKI model. With the integrated analysis from RNA-seq, metabolomic, and proteomic analysis of in vivo and in vitro ASC columns, we are now approaching the therapeutic core of the ASC columns.

The efficacy of the ASC column has been demonstrated and the basic technology has been successfully developed. We will proceed with the necessary evaluations for clinical use, leading to early clinical application.