

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591028

研究課題名（和文）卵膜由来間葉系幹細胞移植による再生医療の基礎的検討

研究課題名（英文） Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect kidney

## 研究代表者

猪阪 善隆 (ISAKA YOSHITAKA)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00379166

研究成果の概要（和文）：自己骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)移植に代わる移植法として、新たな細胞バンクに基づいた同種移植による再生医療を目指すこととし、新たな細胞ソースとして卵膜由来MSCに着目した。移植した卵膜由来MSCは、腎臓に生着する細胞は少数であったが、Thy-1腎炎モデルや虚血再灌流モデルに対して、組織保護作用を示し、糸球体腎炎や尿細管傷害を軽減した。そのメカニズムとして、移植した卵膜由来MSCが細胞の再生に作用するのではなく、MSCから分泌されるIL-10のような液性因子が組織再生に作用すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Mesenchymal stem cell (MSC) is an attractive therapeutic cell source for treating renal diseases. MSC administration has been shown to improve renal function, although underlying mechanisms are incompletely understood. We recently showed that allogenic fetal membrane-derived MSC (FM-MSC), which is available non-invasively in large amounts, had renoprotective effect in an experimental glomerulonephritis model. Here, we investigated whether allogenic FM-MSC administration could protect kidneys from anti-Thy-1 glomerulonephritis or ischemia/reperfusion (I/R) injury. Histological examination revealed that FM-MSC administration significantly suppressed glomerular injury or I/R injury. Administered FM-MSC were rarely observed in kidneys, but administration of FM-MSC increased serum IL-10 levels. In addition, renoprotective effects of FM-MSC were abolished by using anti-IL-10 neutralization antibody, suggesting that IL-10 would be one of the candidate factors to protect rat kidney from kidney injury. We concluded that allogenic FM-MSC transplantation is a potent therapeutic strategy for the treatment of kidney diseases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：幹細胞、移植、腎炎、虚血再灌流傷害、腎炎、再生

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎不全は進行性の病態であり、臨床における治療の主眼は進行抑制におかれており、一般に腎臓の再生能力は低いものとみなされている。しかし、急性尿管細管壊死では、明らかな組織修復・再生が認められ、また、急性糸球体腎炎が可逆性の病変であることから、腎臓に再生能力があることに疑いはない。多くの研究者が腎臓の再生を目指して研究を進めており、腎臓にも幹細胞様の性質をもつ細胞が複数存在し、また腎臓再生を促進する因子や幹細胞移植による部分的腎機能回復も報告されており、腎臓領域においても再生医療への期待は高まっている。

これまで、心不全や閉塞性動脈硬化症モデルにおける骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の移植による心筋や血管の再生効果が報告されており、臨床応用も開始されている。腎臓領域においても、骨髄由来間葉系幹細胞の移植により治療効果が動物実験レベルで報告されている。移植された骨髄由来 MSC 自身が腎臓の構成細胞として再生に関与するのか、あるいはサイトカイン分泌などを介して腎臓の再生を促進させているだけなのかは、いまだ議論の余地があるところであるが、幹細胞移植が再生のための有力なツールであることは間違いない。しかし、骨髄由来 MSC 移植の問題点として、①骨髄採取は身体への侵襲を伴う②得られる細胞数が少量であり、移植に必要な細胞数を確保するまでに、数週間の培養期間を要するため、急性期に適用困難である③ドナーの年齢、疾患によっては移植に適した細胞が得られない場合がある、などがあげられる。

## 2. 研究の目的

われわれは、自己骨髄由来 MSC 移植に代わる移植法として、新たな細胞バンクに基づいた同種移植による再生医療を目指すこととし、新たな細胞ソースとして、出産後に廃棄されている胎児付属物である卵膜に着目した。卵膜由来 MSC の利点としては、①大量、かつ非侵襲的に細胞を得ることが可能 (6000 人分の骨髄に相当する MSC 採取可能)、②ストックしておくことにより、必要時に迅速に移植が可能 (急性期に適用可能)、③年齢、疾患による自己細胞移植が困難な患者への適用が可能、などが考えられる。同種移植では、拒絶反応が問題となるが、HLA に対応した細胞バンクにより、拒絶反応を最小限とすることも可能であるが、MSC は免疫抑制効果を示すことが報告され、骨髄由来 MSC

は拒絶反応を回避し、同種移植において治療効果を示すことが報告されている。一般に、胎児付属物は免疫原性が低く、羊膜が角膜移植などに用いられていることから、卵膜由来 MSC も同種移植において拒絶反応を回避し治療効果を示すことが予想される。

## 3. 研究の方法

(1) 移植した卵膜由来 MSC が生着するかどうかを検討する

① GFP-transgenic Lewis rat から卵膜由来 MSC を分離し、Lewis rat に  $1 \times 10^6$  個の MSC を経静脈的、経腎動脈的、皮膜下に注入し、腎臓、肝臓、肺における GFP 陽性卵膜由来 MSC を経時的に観察する。長期観察したレシピエントの GFP 陽性卵膜由来 MSC が腎臓系統の細胞に分化するかどうか検討する。

② GFP-transgenic Lewis rat から卵膜由来 MSC を分離し、Lewis と MHC 不適合である ACI rat に  $1 \times 10^6$  個の MSC を経静脈的、経腎動脈的、皮膜下に注入し、腎臓、肝臓、肺における GFP 陽性卵膜由来 MSC を経時的に観察する。

③ 投与方法により、生着率、生着期間に差があるかどうかを検討する。

(2) Thy-1 腎炎モデルを用いて、糸球体の障害修復における卵膜由来 MSC の効果を検討する

① Thy-1 腎炎作成 2 日後に、卵膜由来 MSC を経静脈的、経腎動脈的に注入し、糸球体の障害修復に対して治療効果を有するか検討する。

② また、注入した MSC がメサンジウム細胞などの腎臓系統細胞に分化するか検討する。

③ MSC は免疫抑制効果・制御性 T 細胞誘導効果を有することが報告されており、末梢血、腎臓における T 細胞分画を検討する。

④ 糸球体の障害修復における卵膜由来 MSC の効果について、サイトカイン産生等の可能性について検討する。

(3) 腎虚血再灌流傷害の尿管細管細胞の障害修復における卵膜由来 MSC の効果を検討する

① 腎虚血再灌流傷害モデル作成 24 時間後に、卵膜由来 MSC を経静脈的、経腎動脈的、皮膜下に注入し、尿管細管障害修復に対して治療効果を有するか検討する。

② また、注入した MSC が尿管細管細胞に分化するか検討する。

③ さらに尿管細管障害修復における卵膜由来 MSC の効果について、サイトカイン産生

等の可能性について検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 移植した卵膜由来 MSC が生着するかどうかの検討

GFP-transgenic Lewis rat から卵膜由来 MSC を分離し、Lewis rat に  $1 \times 10^6$  個の MSC を経静脈的、経腎動脈的、皮膜下に注入し、腎臓、肝臓、肺における GFP 陽性卵膜由来 MSC を経時的に観察したが、肺や肝臓には、GFP 陽性の卵膜由来 MSC を少数認めたが、腎臓においては、間質などにわずかに認めただけで、尿細管細胞や糸球体細胞として、生着する卵膜由来 MSC は認めなかった。経静脈投与や腹腔内投与や投与量増加、あるいはフィルターを用いて MSC 細胞を投与することにより、生着率に変化があるか検討したが、いずれの投与方法においても変化を認めなかった。

(2) Thy-1 腎炎モデルを用いた検討

糸球体の障害修復における卵膜由来 MSC の効果を検討し、卵膜由来 MSC 投与群で、7 日目の蛋白尿が有意に抑制されていること、PAS 染色で糸球体メサンジウム領域の細胞外基質産生が抑制されていること、糸球体メサンジウム細胞の形質転換のマーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin 発現は抑制されていること、糸球体への ED-1 陽性マクロファージの浸潤が抑制されていることが確かめられた。また、糸球体における線維化因子である TGF- $\beta$  や I 型コラーゲン発現も抑制されていた。マクロファージ浸潤抑制のメカニズムとして、MCP-1 発現を検討したところ、卵膜由来 MSC 投与群で MCP-1 発現が抑制されていることが、明らかとなった。糸球体および尿細管間質への卵膜由来 MSC の生着はごく少数であったため、卵膜由来 MSC 投与による組織保護効果のメカニズムを培養メサンジウム細胞を用いて検討した。通常の刺激では、8 時間後に TNF- $\alpha$  の発現が上昇するが、卵膜由来 MSC を共培養すると、この TNF- $\alpha$  の発現が抑制されることが明らかとなった。また、同様に卵膜由来 MSC を共培養すると、この MCP-1 の発現も抑制されることが明らかとなった。以上から、卵膜由来 MSC 投与による Thy-1 腎炎の抑制効果は、卵膜由来 MSC 自身がメサンジウム細胞へ再生するからではなく、卵膜由来 MSC が分泌する液性因子などの作用により、TNF- $\alpha$  や MCP-1 の発現抑制を介したものであることが明らかとなった。

(3) 腎虚血再灌流傷害を用いた検討

腎虚血再灌流傷害モデル作成 24 時間後に、卵膜由来 MSC を経静脈的に注入し、尿細管障害修復に対して治療効果を有するか検討したところ、vehicle 投与群に比して、卵膜由来 MSC 投与群では、クレアチニン、BUN は有意に上昇が抑制されていた。PAS 染色でも、卵膜由来 MSC 投与群では、尿細管傷害が抑制され、間質への細胞浸潤も抑制されていた。TUNEL 染色でアポトーシスを検討したところ、卵膜由来 MSC 投与群では、有意に細胞死が抑制されていた。卵膜由来 MSC 投与群では、間質細胞への ED-1 陽性マクロファージの浸潤が抑制されていたが、そのメカニズムとして、腎臓における MCP-1、IL-6 発現が抑制されることが要因であることが明らかとなった。また、間質の形質転換のマーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin 発現は抑制され、線維化因子である TGF- $\beta$  や I 型コラーゲン発現も抑制されていた。上述したように、卵膜由来 MSC 投与群では、腎臓への MSC の浸潤はほとんど認められなかったが、血清 IL-10 が上昇していることが確かめられたことから、卵膜由来 MSC 投与群に抗 IL-10 抗体を投与したところ、クレアチニンや BUN の改善が消失したことから、卵膜由来 MSC 投与による虚血再灌流障害抑制効果は、卵膜由来 MSC 自身が尿細管細胞へ再生するからではなく、卵膜由来 MSC が分泌する IL-10 などの組織保護性のサイトカインの作用を介したものであることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Tsuda H, Yamahara K, Ishikane S, Otani K, Nakamura A, Sawai K, Ichimaru N, Sada M, Taguchi A, Hododa H, Tsuji M, Kawachi H, Horio M, Isaka Y, Kangawa K, Takahara S, Ikeda T. Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis. Am J Physiol Renal Physiol 査読有 (2010) 299: F1004-1013.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪阪 善隆 (ISAKA YOSHITAKA)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：00379166

(2)研究分担者

高原 史郎 (TAKAHARA SHIRO )  
大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授  
研究者番号：70179547

山原 研一 (YAMAHARA KENICHI )  
国立循環器病センター・再生医療部・室長  
研究者番号：50450888

(3)連携研究者

なし