

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591226

研究課題名(和文)自家脂肪幹細胞を用いた傷害腹膜の修復治療の確立

研究課題名(英文) Adipose-derived mesenchymal stem cells transplantation facilitate experimental peritoneal fibrosis repair by suppressing epithelial to mesenchymal transition

研究代表者

濱田 千江子 (Hamada, Chieko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50291662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：長期の腹膜透析は、腹膜の形態的異常と機能的異常を呈する。今回、クロルヘキシジン(CG)誘発腹膜線維化モデルラットを作製し、脂肪由来幹細胞(ASC)と腹膜中皮細胞(PMC)の効果を検討した。3週間のCG刺激終了後にPMCとASCをそれぞれ、刺激直後のday22とday29に移植し、day35に屠殺した。ASC投与では、移植時期に依らず、移植細胞数に容量依存性に線維化改善を認めた。ASCのday22移植群では、線維化関連因子の抑制と血管新生関連因子の上昇を認めた。ASCの腹腔内移植は、時期に依らず移植可能で、移植後早期での抗炎症作用や血管新生作用などにより腹膜線維化治療に対して促進的に作用した。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal fibrosis (PF) remains a serious complication of PD that involves in the morphological and functional deteriorations of peritoneum. It is still unclear the effect of adipose-derived mesenchymal stem cell (ASC) to the PF. The effect of ASC transplantation was compared with peritoneal mesothelial cell (PMC) during repair in chlorhexidine gluconate (CG)-induced PF rats. To induce the PF rat, continuous-infusion pumps containing 8% CG were placed into the abdominal cavity for 21 days. PMCs and ASCs were injected at day 22 or 29, and sacrificed at day 35. ASC transplantation significantly facilitated peritoneal repair in the dose dependent manner regardless of transplant timing. The mRNA expression of fibrosis-related factors were significantly suppressed. ASC transplantation induced the over-expression of angiogenesis-related factors. It appears that the ASC might be an effective strategy for morphological retrieval in the PF through the anti-inflammatory and anti-EMT effect.

研究分野：医歯薬学 腹膜透析

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：peritoneal fibrosis mesenchymal stem cell EMT angiogenesis 腹膜線維化 脂肪幹細胞 上皮間葉系移行 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

(1)長期間の腹膜透析(peritoneal dialysis: PD)では、生体不適合な透析液の腹膜への曝露や腹膜炎などの理由から、腹膜間質の線維性肥厚、新生血管増生、小血管の閉塞や腹膜中皮細胞(PMCs: peritoneal mesothelial cells)の脱落を来す。

腹膜線維化により、限外濾過能や溶質除去能に支障を来す。

腹膜線維化の最も重篤な状態が被嚢性腹膜硬化症(encapsulating peritoneal sclerosis: EPS)であり、EPSを発症すると腸閉塞や吸収不良症候群など重篤な消化器合併症を来し、死亡率が有意に上昇する。EPSに対して癒着剥離術やステロイド療法など試されているが、いまだに有効な治療法は確立されていない。EPSのために腹膜透析の有効利用期間が制限される。8年以上の腹膜透析歴は有意にEPSの発症率を増加させると言われている。

腹膜線維化には、炎症性サイトカインや異常な血管新生、上皮間葉系移行(epithelial-mesenchymal transition: EMT)などのメカニズムが関与している。誘導されたマクロファージ等の細胞により炎症性サイトカインやケモカインが分泌され、それらの刺激が腹膜中皮細胞や血管内皮細胞を刺激し、vascular endothelial growth factor (VEGF)やTransforming growth factor(TGF- )などの増殖因子が産生される。それらの過剰産生は、それぞれ異常な血管新生やEMTを誘導し、腹膜線維化を引き起こす。異常な血管新生は、腫大した内皮細胞を有する閉塞・虚脱しやすい血管網を形成し、微小循環を破綻させ炎症を助長するといわれている。さらにその低酸素環境自体がEMTを助長するとも言われている。またEMTが過剰に誘導されると、形質転換を来した上皮細胞が腹膜に筋線維芽細胞として誘導され、筋線維芽細胞からは過剰にコ

ラーゲンが分泌される。以上により肥厚した線維化腹膜が形成される。

(2)腹膜線維化動物モデルにおいて、骨髄幹細胞の腹腔内投与で線維化修復が促進された。

骨髄幹細胞は、腹膜中皮細胞(PMCs: peritoneal mesothelial cells)への分化能を有する。

骨髄幹細胞は、抗炎症作用や抗EMT作用を有する。

(3)様々な分野で、脂肪幹細胞(ASCs: adipose derived mesenchymal stem cells)移植の組織修復作用が確認されているが、ASCsの腹膜線維化に対する効果に関する報告はない。

骨髄幹細胞より培養・抽出が簡便で非侵襲的であり、短期間で大量の細胞を獲得することができる。特に腹膜透析領域では、透析用カテーテルを全身麻酔下で挿入する必要があり、その手術の際に十分量の脂肪組織を容易に獲得することができる。保存方法も確立されており、臨床の現場では十分培養し保存しておけば、必要なときに即時に準備することができる。

抗炎症作用やVEGFなどによる血管新生作用、hepatocyte growth factor (HGF)による抗線維化作用を有する。

(4)PMCsを腹膜線維化モデル動物に移植した際、刺激直後の炎症存在下では腹膜線維化をむしろ助長した。刺激終了から1週間後の炎症鎮静下での移植では、腹膜修復において促進的に作用した。つまり、炎症下でのPMCsの移植は炎症を助長し、EMTが誘導され移植細胞は線維芽細胞へ形質転換しコラーゲンを分泌する。1週間の間隔を開けると炎症は治まり、形質転換する中皮細胞は減少する。

## 2. 研究の目的

(1)ASCs は腹膜障害抑制作用を有するという仮説のもと、幹細胞の性質を維持し分泌能に富む細胞の大量増殖する方法を確立し、さらに、腹膜線維化モデルラットに ASCs を移植し、腹膜線維化進展の予防法を確立する。

移植には大量の細胞を必要とするため、培養促進のため basic fibroblast growth factor (bFGF) を添加した基本培地で培養する。

組織再生促進因子の Paracrine effect : VEGF, HGF などによる血管新生作用や抗線維化作用を確認する。

抗炎症作用：刺激下での幹細胞移植による線維化の予防効果を確認する。

(2)PMCs 移植群と ASCs 移植群で、腹膜線維化に対する効果を比較検討する。

移植時期による検討

(刺激終了直後と刺激終了から 1 週間の間隔を開けての移植群)

移植細胞数による検討

(ASCs:  $3 \times 10^6$  cells/rat 移植群と  $3 \times 10^7$  cells/rat 移植群)

## 3. 研究の方法

(1)ASCs の抽出・培養

既報<Lopez et al. *Methods Mol Biol* 2011>に従い、Green Fluorescent Protein(GFP)遺伝子改変ラットの鼠径部から ASCs を抽出・培養した。

既報<Iwashima, S, et al. *Stem Cells and Development* 2009>に従い、bFGF を添加した基本培地を用いて幹細胞の増殖を行った。

幹細胞の証明のために、脂肪細胞や骨芽細胞への分化能を確認した。さらに、細胞の表

面マーカーをフローサイトメトリーで確認した。

(2)PMCs の準備

既報<Hotta Y et al. *Nephrology Dialysis Transplant*, 2010>の PMCs の cell line を使用した。33 で増殖し、38 増殖は止まり分化する細胞である。

(3)腹膜線維化モデルラットの作製

既報<Komatsu H et.al. *Perit Dial Int*, 2008>に従い、腹膜線維化モデルラットを作製する。8%クロルヘキシジン (chlorhexidine gluconate : CG) を  $2.5 \mu\text{L}/\text{時}$  で持続注入するシリンジポンプをラットの腹腔内に 3 週間留置し腹膜線維化を誘発した。

(4)腹膜線維化モデルラットへの細胞移植

3 週間の CG 刺激後、day 22 にシリンジポンプを腹腔内から取り出し、細胞移植を刺激直後(day 22)に細胞移植する群 (PMCs 移植群 : Tx1、ASCs 移植群 : Tx3) と刺激終了から 1 週間後(day 29)に移植する群 (PMCs 群 : Tx2、ASCs 移植群 : Tx4) に分けた。

移植細胞数を  $3 \times 10^6$  個/ラットを移植する群 (Tx1-4) と day 22 に ASCs を  $3 \times 10^7$  個/ラットを移植する群(Tx5)に分けた。

いずれも刺激終了から 1 週間後と 2 週間後 (day 29 と day 35) に屠殺し、壁側腹膜を回収した。

Masson-Trichrome 法を用いて肥厚した腹膜を染色し、肥厚径を既報<Honda K et al. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008>に従い、KS400 imaging System を用いて測定した。

Real-time PCR 法を用いて、腹膜における炎症系サイトカイン、血管新生に関与する因子(VEGF や platelet-derived growth factor-BB: PDGF-BB、platelet-derived growth factor-receptor :PDGF-R )、EMT

に關与する因子(TGF- $\beta$ 、Snail、 $\alpha$ -SMA)の mRNA を測定した。

蛍光抗体法を用いて、移植細胞の分布・血管構成細胞(血管内皮細胞、壁細胞)への分化能を確認した。また、各増殖因子がどの細胞から分泌されているか確認した。

末梢循環の評価として、hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )の mRNA や腹膜における新生血管数の測定を行った。

#### 4. 研究成果

(1)脂肪細胞と骨細胞に分化し、骨髓幹細胞と同様の表面抗原パターンを示す [ CD29(+), CD44(+), CD73(+), CD90(+), CD11b(-), CD31(-), CD34(-), CD45(-) ] ASCs を抽出・培養することができた。

(2)腹膜線維化モデルラットは、正常ラットに比べて有意に肥厚した腹膜を有し、腹膜線維化関連因子(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、Type 3 collagen、TGF- $\beta$ 、VEGF、Snail、 $\alpha$ -SMA)の mRNA も有意に上昇していた。Tx2-4において細胞移植は、腹膜肥厚・線維化関連因子の mRNA に対して抑制的に作用したが、Tx1においては促進的に作用した。Tx2-4における線維化改善は非治療群に比べ有意ではなかったが、Tx5では移植細胞数に容量依存性に線維化の改善を認めた。Tx5では炎症性サイトカインや EMT 関連因子の低下を認めたが、VEGF や PDGF-BB などの血管新生関連因子の有意な上昇を認めた。また、蛍光抗体法では、移植細胞からの VEGF や PDGF-BB の分泌を確認することができた。また、管腔構造を形成する移植細胞においては、PDGF-R が発現していた。移植細胞の血管構成細胞(血管内皮細胞、血管壁細胞)への分化も認め、HIF-1 $\alpha$  や新生血管数の減少も確認できた。

脂肪幹細胞の腹膜線維化モデルラットへの腹腔内移植は、抗炎症作用、血管新生作用、抗 EMT 作用により腹膜線維化を抑制した。

#### 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)

[学会発表](計2件)

発表者、課題、学会名、日時、場所、

若林啓一、濱田千江子、神田怜生、中野貴則、井尾浩章、堀越哲、富野康日己、  
Facilitative effects of transplanted adipose-derived mesenchymal stem cells during repair in chlorhexidine(CH)-induced peritoneal fibrosis rats、第 50 回欧州腎臓学会・欧州透析移植学会、2013 年 5 月 18-21 日、イスタンブール

若林啓一、濱田千江子、神田怜生、中野貴則、井尾浩章、堀越哲、富野康日己、  
Facilitative effects of transplanted adipose-derived mesenchymal stem cells during repair in chlorhexidine-induced peritoneal fibrosis rats、第 14 回国際腹膜透析学会、2012 年 9 月 9 日-12 日、クアラルンプール

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

濱田 千江子 (HAMADA Chieko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50291662