

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790867

研究課題名(和文) 卵膜由来間葉系幹細胞移植による腎虚血再灌流モデルにおける組織再生保護効果の検討

研究課題名(英文) The regenerative and renoprotective potential of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells in renal ischemia-reperfusion injury model.

研究代表者

津田 秀年 (Tsuda, Hidetoshi)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：40622618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：卵膜由来間葉系幹細胞(FM-MSC)を用いて腎虚血再灌流障害モデルにおける組織再生保護効果を検証した。Lewisラットにおいて右腎摘後左腎を虚血し、再灌流時にFM-MSCを移植した。コントロール群では血清クレアチニン、BUNの増加がみられたが、FM-MSC移植群ではその増加は抑制された。組織学的検討ではFM-MSC移植により尿管障害が軽減し、マクロファージおよびT細胞浸潤も同様に抑制された。FM-MSC移植群では血清IL-10の増加が認められ、それらはIL-10中和抗体との同時投与により減少し、腎機能改善が消失した。本モデルにおける病態改善機序として、IL-10産生促進の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We recently showed that fetal membrane-derived MSCs (FM-MSCs), which are available non-invasively in large amounts, had renoprotective effect in a glomerulonephritis model. Here, we investigated whether FM-MSCs administration could protect kidneys from ischemia/reperfusion (I/R) injury. Lewis rats were subjected to right nephrectomy and left renal I/R injury by clamping left renal artery. After decamping FM-MSCs were intravenously administered. I/R injured rats exhibited increased serum creatinine and BUN, whereas FM-MSCs ameliorated renal function. Histological analysis revealed that FM-MSCs suppressed tubular apoptosis and infiltration of macrophages and T cells. Administration of FM-MSCs mainly homed into lung, but increased serum IL-10 levels. Of interest is that renoprotective effects of FM-MSCs 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 I/R injury in this model.

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：間葉系幹細胞 組織再生 免疫制御 虚血再灌流障害 卵膜 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

我が国における腎疾患患者数は年々増加し、急性腎障害においては患者の高齢化に伴い発症頻度が高まっており、全入院患者の5-10%、ICU 入院患者の約 20%で発症している。慢性腎障害に関してもその患者数は増加の一途をたどり、2010 年における慢性透析患者数は約 30 万人である。腎機能低下を防止し、人工透析導入を阻止する有効な治療法を確立することは、医療経済的にも重要な課題となっている。

近年、既存の治療法では治癒し得ない様々な難治性疾患に対して、骨髄単核球や血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞といった体性幹細胞・前駆細胞移植による再生医療研究が行われている。我々の研究室では、これまで分化能・増殖性に優れた間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem cell) を中心とした細胞移植研究を行い、難治性心不全に対する自己骨髄由来 MSC 移植による有効性検討を含め (臨床試験登録番号 UMIN00000656)、積極的に MSC 移植の再生医療応用研究を行ってきた。しかし、自己 MSC は、その樹立には身体への侵襲を伴うこと、また移植に必要な細胞数を得るまでに培養期間を要することから急性期に適用が困難であること、更に、骨髄由来 MSC であれば白血病などの骨髄疾患では採取不適であること、といった問題点が指摘されている。そこで、我々は自己 MSC に代わる新たな MSC として、出産時に廃棄されることから非侵襲的で倫理的な問題も少ない胎児付属物である卵膜に着目し、卵膜由来 MSC の樹立に成功した。我々は腎炎モデルにおいて自家骨髄由来 MSC のみならず他家卵膜由来 MSC が炎症制御により移植治療効果を示すことを確認しており (Am J Physiol.2010)、免疫原性が低いことが知られている卵膜由来の MSC 移植は、他家であっても自己骨髄由来 MSC と同様の免疫制御・炎症抑制効果を示す可能性が考えられる。

2. 研究の目的

腎虚血再灌流モデル動物における卵膜由来 MSC 移植治療効果およびその機序の解明を行う。治療機序として、従来骨髄由来 MSC にて報告されている血管再生や抗アポトーシスなど再生保護効果によるものが想定されるが、近年報告されている抗炎症・免疫調節効果にも着目して検討する。具体的には

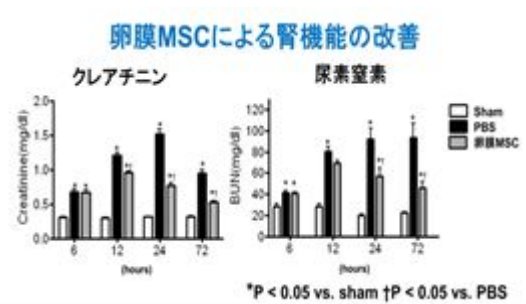
- (1) 急性腎障害モデルである腎虚血再灌流障害において卵膜由来 MSC 移植を行い、その治療効果の有無を検証する。
- (2) 治療効果メカニズムに関し、MSC 移植による組織保護再生効果および免疫・炎症調節効果両者の面から検討を行う。
- (3) 卵膜由来 MSC 移植の臨床応用は他家移植が想定されることから、免疫系に対する作用を詳細に検討する。

3. 研究の方法

腎虚血再灌流障害モデルは雄 Lewis ラットの右腎を摘出後、左腎動脈を動脈クリップにて血流を遮断し 60 分後に再灌流することにより作成した。また再灌流時に MHC ハプロタイプが大きく異なる ACI ラット由来卵膜由来 C を 5×10^5 個経静脈的に移植した。その後、6, 12, 24, 72 時間後に生化学的・病理学的評価、さらに各種サイトカイン測定を行った。なお動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」等に従い、動物実験委員会に研究計画書を提出、承認を受け、動物愛護に配慮して実施した。

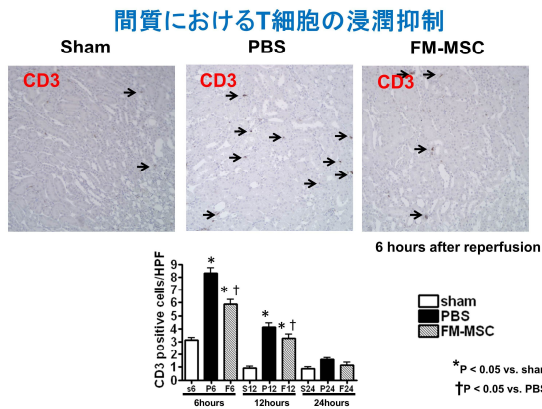
4. 研究成果

再灌流 24 時間後、PBS 投与群において腎機能のマーカーである血清クレアチニン ($1.45 \pm 0.24 \text{ mg/dl}$)、BUN ($92.5 \pm 10.5 \text{ mg/dl}$) の顕著な増加がみられたが、卵膜由来 MSC 移植群ではその増加は有意に抑制された ($0.80 \pm 0.11 \text{ mg/dl}$, $58.5 \pm 8.6 \text{ mg/dl}$)。 (図 1) またその効果は再灌流 72 時間後においても同様にみられた。



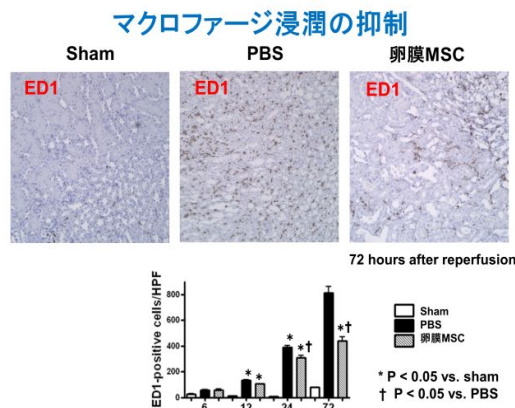
(図 1) 卵膜由来 MSC 移植による腎機能の改善

次に組織学的検討を行ったところ、虚血再灌流障害により尿細管細胞の壊死や逸脱、刷子縁の消失、円柱形成といった尿細管障害が見られた。一方、卵膜 MSC 移植群においては、それらが軽減されており、尿細管のアポトーシスに関しても同様に抑制されていた。本モデルでは再灌流後早期から T 細胞浸潤が起き、24 時後には消失することが報告されている。T 細胞浸潤を評価するため抗 CD3 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、再灌流後 6 時間から 12 時間後において病態群でみられた T 細胞浸潤は卵膜 MSC 移植により有意に減少した。(図 2)



(図2) 卵膜由来 MSC 移植による間質の T 細胞浸潤抑制

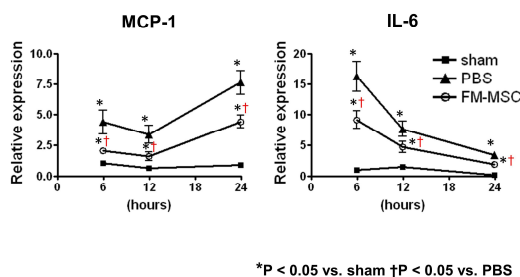
一方、マクロファージは再灌流後中期から後期に生じることが知られている。同様に、マクロファージ浸潤の評価のため抗 ED-1 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、間質におけるマクロファージ浸潤は、卵膜 MSC 移植により再灌流 12、24 および 72 時間後において有意に抑制された。(図3)



(図3) 卵膜由来 MSC 移植によるマクロファージ浸潤の抑制

また、腎組織より RNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR 法にて解析を行ったところ、虚血再灌流障害に伴いマクロファージの走化因子である MCP-1 や炎症性サイトカインである IL-6 の腎 mRNA 発現が亢進されており、卵膜由来 MSC 移植群にて有意に抑制されていた。(図4)

腎臓におけるMCP-1およびIL-6発現の定量的解析

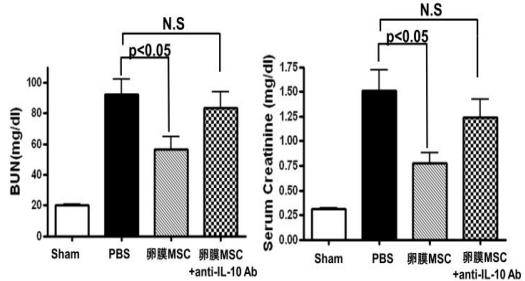


*P < 0.05 vs. sham †P < 0.05 vs. PBS

(図4) 卵膜由来 MSC 移植による MCP-1 および IL-6 発現の減少

以前、我々は卵膜由来 MSC がプロスタグランジン E2 を分泌していることを確認している。プロスタグランジン E2 は腎構成細胞であるメサンギウム細胞に対して抗炎症作用を発揮することが知られている。さらにマクロファージに作用して抗炎症性サイトカインであるインターロイキン-10(IL-10)の分泌を促すことが報告されている。そこで、血清 IL-10 量を測定したところ卵膜由来 MSC 移植群にのみ IL-10 が確認された。また IL-10 が本実験における治療機序の重要因子であるかを検討するため虚血後の再灌流時に十分量の抗 IL-10 中和抗体を卵膜由来 MSC と同時に投与したところ、卵膜由来 MSC 投与群にみられた腎保護効果は減弱した。(図5)

抗IL-10中和抗体による卵膜MSCの治療効果の減弱



(図5) 抗 IL-10 中和抗体による卵膜由来 MSC の治療効果の減弱

本モデルにおいて卵膜由来 MSC 移植は腎機能を改善し、尿細管細胞におけるアポトーシスを含む尿細管障害を抑制した。また、T 細胞浸潤やマクロファージ浸潤は卵膜由来 MSC 移植により抑制され、同時に炎症性サイトカイン、ケモカインである IL-6 および MCP-1 の発現増加も同様に抑制された。これらのことより、炎症抑制による腎機能および組織障害の改善が示唆され、それには IL-10 が重要な因子の 1 つであることが示唆された。今後、本治療が腎移植時における虚血再灌流障害を減弱し、かつ免疫抑制剤の減量の一助となり得ると考えられる。また急性腎障害に対しても有効な治療戦略となり得ることが示された。

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)

Tsuda H, Yamahara K, Otani K, 他8名, 10 番目. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect against

ischemia-reperfusion-induced acute
kidney injury. Cell Transplant. 査読有
2013 Apr 2.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 秀年 (TSUDA, Hidetoshi)
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員
研究者番号：40622618