

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860681

研究課題名(和文) 各種腎臓疾患における無血清培地を用いた間葉系幹細胞の治療効果：臨床応用を目指して

研究課題名(英文) The therapeutic effect of mesenchymal stem cells cultured under serum-free media on kidney diseases: to apply them to clinical application

研究代表者

上野 敏憲 (UENO, TOSHINORI)

広島大学・大学病院・医科診療医

研究者番号：50646891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植による、障害部位での抗炎症・抗線維化作用についてはこれまでに報告されているが、いずれも血清添加培地での培養条件であり、無血清培地を用いた検討はなされていない。本研究では無血清培地で培養したMSCを用いて、血清添加培地で培養したMSCとの効果の違いを確認した。腎線維化モデルラットに対してMSCを投与した結果、血清添加培地で培養したMSCと比べて無血清培地で培養したMSCを投与した群で、炎症細胞の浸潤や線維化がより強く抑制されている事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of mesenchymal stem cells (MSCs) transplanted into damaged tissues have been previously reported, almost all of them used serum-containing media and few studies have investigated using MSCs cultured under serum-free media. Here, we investigated a difference between the effect of MSCs cultured under serum-containing media and serum-free media. We administered both MSCs to a rat model of renal fibrosis. As a result of our investigation, renal inflammation and fibrosis were significantly suppressed in rats treated with serum-free MSCs compared with rats treated with serum-containing MSCs.

研究分野：腎臓

キーワード：間葉系幹細胞 無血清培地 腎線維化

1. 研究開始当初の背景

(1) 間葉系幹細胞: Mesenchymal Stem Cells (MSCs) 自体が免疫抑制作用を有しており、組織の障害部位に浸潤する炎症細胞を抑制することが報告されている (Am J Physiol Renal Physiol. 289: 31-42, 2005)。さらに、MSCs は T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞に対して抑制的な作用を有することが報告されており (Blood. 107: 367-72, 2006; Blood. 105: 1815-22, 2005)、免疫反応に関わる種々の疾患に対する MSCs の臨床応用が期待されている (J Intern Med. 262: 509-25, 2007)。

(2) 我々は免疫抑制薬 (Mizoribine) の投与が腎疾患における線維化を抑制することを報告しており (Takahashi S et al. Nephron Exp Nephrol. 112: 59-69, 2009; Doi T et al. PLoS One. 9(4): e93513, 2014)、MSCs の有する抗炎症作用によって障害された組織における線維化の進展を抑制することが可能ではないかと考えた。そこで、我々はラット腹膜硬化モデルへ MSCs の投与を行ったところ、投与した MSCs は障害を受けた腹膜中皮細胞へのマクロファージをはじめとする炎症細胞の浸潤を減少させることによって、線維化を抑制することを明らかにした (Ueno T, et al. Kidney Int. 84: 297-307, 2013)。

(3) 従来のウシ血清含有培地と比較して、幹細胞用の無血清培地 STK2 (DS ファーマバイオメディカル) は、MSCs の増殖を 100~1000 倍にすることが可能であり、STK2 を用いることで血清を使用せずに十分な細胞数の MSC をより短時間で準備することができる。さらに、MSCs を無血清培地 STK2 で培養すると、ウシ血清含有培地で培養した MSCs よりも、活性化 T 細胞の細胞増殖を有意に抑制できる。また、無血清培地は血清含有培地と比較して未知なる病原体への暴露が無く、臨床応用が期待できる。

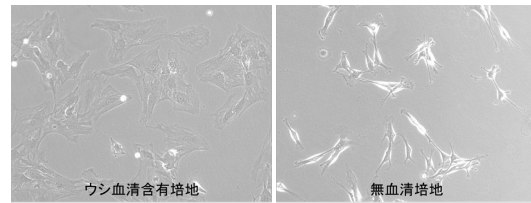
2. 研究の目的

無血清培地で培養した MSCs は、通常のウシ血清含有培地で培養した MSCs よりも強い免疫抑制作用を有することを明らかにした上で、無血清培地で培養した MSCs の投与が、腎疾患における線維化の抑制に対して有効であることを、ラット腎線維化モデル(UUO)を用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) ラットの骨髄から MSCs を採取し、それを 10%ウシ血清含有培地、初代間葉系幹細胞用無血清培地 (STK1、DS ファーマバイオメディカル) にて各々、培養する。一旦、保存後、各々を 10%ウシ血清含有培地、間葉系幹細胞用無血清培地 (STK2) にて引き続き培養し、十分な細胞数になるまで増殖し、継代は P3-4 の間で使用することとする。なお、細胞形態は、

血清含有培地培養 MSCs ではやや膨化した様な形態を初期から認めているのに対し、無血清培地培養 MSCs では紡錘型の形態を呈している事が分かっている(下図)。



(2) 緑色蛍光蛋白 (GFP) トランスジェニックラットより採取した MSCs を用いて前述した培養方法で培養し、初日に作製した左水腎症モデルに 4 日後に経尾静脈的に投与し 5, 7, 10 日後に屠殺し、免疫染色にて患側腎に GFP 陽性細胞が存在するかどうか、またその存在期間が各群でどの様に変化するかを調べる。

(3) ラットの左尿管を 2 重結紮し、左水腎症による腎線維化モデルを作製し、それらを各々、経尾静脈的に D-PBS のみ投与する群 (コントロールとする)、ウシ血清含有培地で培養した MSCs (10%MSCs) を投与する群、無血清培地で培養した MSCs (SF-MSCs) を投与する群の 3 群に振り分け、それとは別に尿管を結紮せず経尾静脈的に D-PBS のみ投与する群を用意する。

初日に左水腎症モデルを作製し、4 日後にそれぞれの群で D-PBS 500 μ l / 匹 (MSCs 投与モデルは、約 5×10^6 cells/匹となるように同量の D-PBS に懸濁) を経尾静脈的に投与、7, 10 日後に屠殺し左腎を摘出の上、評価を行う。

(4) ヒト近位尿細管細胞を 0.1%ウシ血清含有培地のみ、10%ウシ血清含有培地で培養した MSCs による馴化培地、無血清培地で培養した MSCs による馴化培地でそれぞれ培養し、TGF- β 1 投与で 48 時間刺激した際に、馴化培地による線維化の抑制効果を評価する。

4. 研究成果

(1) GFP トランスジェニックラットから採取した MSCs を投与したモデルでは、投与翌日の 5 日目には肺・腎での GFP 陽性細胞の存在を確認でき、それは 7 日目まで認められるも、10 日目には確認できなくなっていた。ウシ血清添加培地培養 MSCs と無血清培地培養 MSCs の両群で、生着期間や細胞数に差は認められなかった (図 1)。

これらから、血清添加培地もしくは無血清培地で培養した MSCs における障害部位への生着能・遊走能には差が生じない事が示された。また、尿管結紮を行わずに、血清添加培地培養 MSCs もしくは無血清培地培養 MSCs を経尾静脈的に投与したモデルにおいては、両

群とも投与翌日の腎に GFP 陽性細胞が確認されなかった。

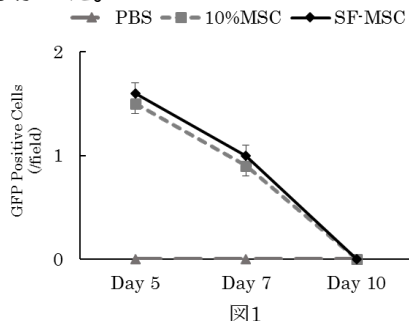


図1

(2) 一方で、10 日後に摘出した腎における α -SMA や TGF- β 1 といった線維化マーカーの蛋白発現量は、コントロール群と比べて、MSC 投与群で有意に低下しており、さらに無血清培地培養 MSCs を投与した群でより有意な低下を認めた (図 2)。他に、線維化マーカーである Collagen type 1 や type 3 については、免疫染色にて評価を行い、同様にコントロールと比べて MSCs 投与群で発現の低下を認め、その中でも無血清培地培養群でより有意に発現が低下していた。

炎症マーカーにおいても、MCP-1 や IL-6 の mRNA レベルが、コントロール群と比較して MSCs 投与群で有意に低下しており、その中でも無血清培地培養 MSCs を投与した群で有意に低下していた。

マクロファージマーカーである ED-1 や T 細胞系マーカーの CD3 については免疫染色で評価し、同様に無血清培地培養 MSCs 投与群で有意に発現が最も低下していた。

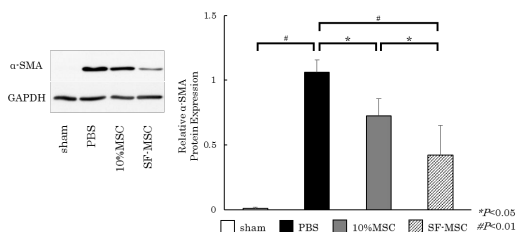


図2

(3) ヒト近位尿管細胞での馴化培地の効果の検討では、48 時間刺激後の線維化マーカーである α -SMA が、馴化培地への変更が無い群と比較して馴化培地培養群で有意に発現が低下しており、腎組織と同様に無血清培地培養 MSCs による馴化培地群で最も強く発現が低下していた。

これらから、MSCs 投与による抗炎症作用・抗線維化作用が確認できた上で、無血清培地で培養する事でその効果が一層強くなる事が示された。我々が知る限り、これまでに腎障害モデルに対して無血清培地で培養した MSCs の有用性を検討した報告は知り得なく、これまでの血清添加培地での MSCs 研究結果よりも有意に障害の改善がもたらされる事から、有効な治療法になる事が期待できる。

しかも、この無血清培地 STK2 は約 80 種類の化合物から組成されるが、未知の物質は含まれておらず安全性が高い。更に血清を用いずに、MSCs の高い自己複製能と多分化能を保持したまま増殖能を飛躍的に高める事から、臨床応用する際には、未知の病原体への暴露のリスクはなく、それでいて治療効果の向上や治療適応の拡大などが見込めると考える。

これまでに血清添加培地での MSCs からは HGF などが産生される事が知られているが、無血清培地培養 MSCs からは、それと比較して余り多く産生されない事が我々の研究で分かっている。今後は、無血清培地培養 MSCs から分泌される他の抗炎症・抗線維化作用を持つ因子の同定や、その抑制メカニズムについての解明に力を注ぐ予定である。

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 0 件)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 敏憲 (UENO TOSHINORI)
広島大学病院・医科診療医
研究者番号：50646891

(4) 研究協力者

正木 崇生 (MASAKI TAKAO)

広島大学病院・教授
研究者番号：30397913

土井 盛博 (DOI, SHIGEHIRO)
広島大学病院・助教
研究者番号：80626127

中島 歩 (NAKASHIMA, AYUMU)
広島大学病院・特任助教
研究者番号：40448262