

令和 2 年 4 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09699

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞移植による腎臓におけるストレス誘導性老化の抑制

研究課題名(英文) Suppression of stress-induced senescence in kidney by transplantation of mesenchymal stem cells

研究代表者

正木 崇生 (Masaki, Takao)

広島大学・病院(医)・教授

研究者番号：30397913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Interferon- (IFN-) 添加培地で培養した間葉系幹細胞は、プロスタグランジン E2の発現が上昇しており、マクロファージのフェノタイプを炎症抑制型(M2)に誘導して炎症の継続を抑制することが示唆された。さらに、IFN- 添加培地で培養した間葉系幹細胞は、ラット腎虚血再灌流障害モデルによって生じる腎線維化を強く抑制することを明らかにした。また、コントロールの腎臓と比較して、ラット腎虚血再灌流障害21日後の腎臓においてp16INK4A陽性細胞数が増加しており、IFN- 添加培地で培養した間葉系幹細胞の投与はp16INK4Aを有意に抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、我が国における新規の透析導入患者数は年間4万人を超えている。新規の透析導入患者数を減少させることは、医療費の節減を考えるうえでも非常に重要な課題であるが、腎不全への進行を抑制するための有効な治療法は限られている。間葉系幹細胞を用いた治療法を確立し、臨床応用することが可能になれば、腎障害の進行を遅らせて透析療法を回避させることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Interferon- (IFN-) stimulation promotes the secretion of prostaglandin E2 from mesenchymal stem cells (MSCs), and increased prostaglandin E2 induces polarization of immunosuppressive CD163-positive macrophages, suppressing the persistence of inflammation. In addition, administration of MSCs treated with IFN- more effectively suppressed the p16INK4A positive cells and renal fibrosis than that of control MSCs in a rat ischemia-reperfusion injury model.

研究分野：腎臓内科

キーワード：間葉系幹細胞 抗炎症作用 線維化 再生医療 ストレス誘導性老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ストレス誘導性細胞老化

酸化ストレスや紫外線などによって細胞老化が引き起こされる。このような細胞分裂寿命によらない細胞老化はストレス誘導性細胞老化とよばれ、細胞周期の停止した p16^{INK4A} 陽性細胞の蓄積は液性因子を分泌して臓器障害を増悪させる (Kuilman T, et al. *Genes Dev* 24:2463-79, 2010)。さらに、炎症細胞浸潤の遷延は線維化を増悪させる。

間葉系幹細胞

移植された間葉系幹細胞は障害部位に遊走し、障害部位に浸潤する炎症細胞を抑制することによって組織の修復に働くことが報告されている (*Am J Physiol Renal Physiol* 289: 31-42, 2005)。申請者らも、間葉系幹細胞の投与が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ている。

間葉系幹細胞によるストレス誘導性細胞老化の抑制

間葉系幹細胞は TNF-stimulated gene 6 (TSG-6) タンパクが高発現していることが示されている。TSG-6 は TNF- α による NF- κ B のリン酸化を抑制する。さらに、間葉系幹細胞は組織が障害を受けた際に遷延する炎症細胞浸潤を抑制することから、間葉系幹細胞の投与によってストレス誘導性細胞老化を抑制できると考えられる。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞の投与は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、申請者らも明らかにしているように、間葉系幹細胞は強い抗炎症作用を有している。さらに、間葉系幹細胞は TSG-6 が高発現しており、TSG-6 はストレス誘導性細胞老化の原因となる TNF- α による NF- κ B のリン酸化を抑制することから、腎虚血再灌流障害によるストレス誘導性細胞老化および線維化を、間葉系幹細胞の投与によって抑制できると考えられる。

3. 研究の方法

1. 腎虚血再灌流障害によるストレス誘導性細胞老化に対する間葉系幹細胞の抑制効果

通常の血清含有培地で培養した間葉系幹細胞と比較し、Interferon- γ (IFN- γ) を添加した培地で培養した間葉系幹細胞の投与によって、ラット一側性尿管結紮モデルにおける炎症浸潤をより強く抑制し、腎線維化もより強く抑制できることを明らかにしており、通常の 10% 血清含有培地で培養した間葉系幹細胞の投与群と、IFN- γ 添加培地で 24 時間培

養した間葉系幹細胞の投与群で、腎虚血再灌流モデルにおける治療効果との比較を行う。次に、腎虚血再灌流障害によって誘導される p16^{INK4A} 陽性細胞数を抑制するかを検討する。Green fluorescent protein (GFP) 陽性 SD ラットの大腿骨・脛骨から間葉系幹細胞を採取した。MSC は 10% ウシ血清含有培地にて培養し、IFN- γ 添加群ではラット腎虚血再灌流モデルに投与する 24 時間前に IFN- γ :200ng/ml を添加した。8 週齢 SD ラットに腎虚血再灌流障害を作製した後、左腎動脈近傍腹部大動脈より間葉系幹細胞または PBS (コントロール) を投与する。

2. ストレス誘導性細胞老化を間葉系幹細胞が抑制する機序と TNF-stimulated gene 6 (TSG-6)

MSC の培養液中に高発現している TSG-6 タンパクは、TNF- α による NF- κ B の活性を抑制することから、TNF- α で誘導される NF- κ B リン酸化および p16^{INK4A} の発現を TNF- α が抑制する作用は、TSG-6 の siRNA によって減弱するかを検討する。さらに、間葉系幹細胞における TSG-6 発現が増加する培養法を検討する。TSG-6 の siRNA を施行した間葉系幹細胞を使用して、TNF- α で誘導される NF- κ B のリン酸化および p16^{INK4A} を間葉系幹細胞が抑制する作用を、TSG-6 の siRNA によって減弱するかを検討する。さらに、間葉系幹細胞の TSG-6 発現が増強する各種培養法を検討する。

3. 間葉系幹細胞による Immune-regulatory (M2) マクロファージの誘導

Immune-regulatory phenotype (M2) マクロファージは、ストレス誘導性老化による炎症細胞浸潤の継続を抑制する。間葉系幹細胞による M2 マクロファージ誘導を明らかにする。Phorbol myristate acetate (PMA) の添加によって THP-1 monocyte を Pro-inflammatory phenotype (M1) マクロファージに誘導した後、Transwell を用いて間葉系幹細胞と共培養を行い、CD163 陽性・CD206 陽性の Immune-regulatory phenotype (M2) マクロファージへの変化率を明らかにする。

4. 研究成果

1. 腎虚血再灌流障害によるストレス誘導性細胞老化に対する間葉系幹細胞の抑制効果

間葉系幹細胞の抗炎症作用は、本来備わっているものではなく、急性炎症の場で免疫細胞から放出される IFN- γ や TNF- α などの炎症性サイトカインでプライミングされることで誘導され、好中球の遊走や活性化を抑制する (English K et al. Cell Biol. 2013)。そこで、間葉系幹細胞は障害を受けた組織から産出する High-mobility group box-1 (HMBG1) によって障害部位に遊走し、障害部位の Natural killer cells から産出される Interferon- γ (IFN- γ) によって抗炎症作用を有するサイトカインを産出するようになることから、腎虚血再灌流後の腎組織における HMBG1、IL-18、IFN- γ の経時的な発現を確認した。次

に、腎線維化の進展を強く抑制できる間葉系幹細胞の培養法について検討し、IFN- γ 添加培地で培養した間葉系幹細胞の投与は、ラット腎虚血再灌流障害モデルによって生じる腎線維化を強く抑制することを明らかにした。また、コントロールの腎臓と比較して、腎虚血再灌流障害 21 日後の腎臓において p16^{INK4A} 陽性細胞数が増加しており、IFN- γ 添加培地で培養した間葉系幹細胞の投与は、IFN- γ 非添加培地で培養した間葉系幹細胞と比較して、p16^{INK4A} 陽性細胞の発現を強力に抑制することを明らかにした。

2. ストレス誘導性細胞老化を間葉系幹細胞が抑制する機序と TNF-stimulated gene 6 (TSG-6)

TSG-6 の siRNA を施行した間葉系幹細胞を使用して、TNF- α で誘導される NF- κ B のリン酸化および p16^{INK4A} を間葉系幹細胞が抑制する作用を明らかにする研究は施行できなかったが、間葉系幹細胞の TNF-stimulated gene 6 (TSG-6) 発現について検討し、MSC の培地内の血清濃度を減少させたものほど TSG-6 の発現が増強すること、無血清培地で培養した間葉系幹細胞では TSG-6 の発現が著増することを明らかにした。

3. 間葉系幹細胞による Immune-regulatory (M2) マクロファージの誘導

Phorbol myristate acetate (PMA) の添加によって THP-1 monocyte を Pro-inflammatory phenotype (M1) マクロファージに誘導した後、間葉系幹細胞との共培養を行い、CD163 陽性・CD206 陽性の Immune-regulatory phenotype (M2) マクロファージへの変化率を検討し、間葉系幹細胞との共培養によってマクロファージの phenotype を M1 から M2 に誘導することを明らかにした。次に、IFN- γ 添加培地で培養した間葉系幹細胞では、プロスタグランジン E2 の発現が増加しており、IFN- γ 添加培地で培養した間葉系幹細胞によってマクロファージの phenotype を M1 から M2 に強力に誘導できることを明らかにした。さらに、腎虚血再灌流障害後に増加する CD68 陽性マクロファージ数は IFN- γ 添加培地で培養した間葉系幹細胞の投与によって減少し、CD163 陽性 M2 マクロファージ数は IFN- γ 添加培地で培養した間葉系幹細胞の投与によって増加することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishiuchi N, Nakashima A, Doi S, Yoshida K, Maeda S, Kanai R, Yamada Y, Ike T, Doi T, Kato Y, Masaki T	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia reperfusion rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther.	6. 最初と最後の頁 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-020-01642-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中島歩、加藤幸夫、正木崇生
2. 発表標題 間葉系幹細胞を用いた腎線維化抑制療法の開発
3. 学会等名 日本透析医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田健、中島歩、土井盛博、上野敏憲、加藤幸夫、東幸仁、正木崇生
2. 発表標題 Mesenchymal stem cells cultured in serum-free medium ameliorate experimental renal fibrosis by their strong immunosuppressive effects
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石内直樹、中島歩、土井盛博、金井亮、土井俊樹、正木崇生
2. 発表標題 Hypoxia-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Prevent AKI to CKD
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金井亮、中島歩、土井盛博、石内直樹、土井俊樹、正木崇生
2. 発表標題 Mesenchymal Stem Cells Cultured in IFN- γ -Containing Medium Ameliorate Experimental Renal Fibrosis
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中島 歩 (Nakashima Ayumu) (40448262)	広島大学・医系科学研究科(医)・共同研究講座教授 (15401)	
研究分担者	土井 盛博 (Doi Shigehiro) (80626127)	広島大学・病院(医)・助教 (15401)	