

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08636

研究課題名（和文）間葉系幹細胞による腎線維化の抑制効果：免疫抑制療法との併用

研究課題名（英文）Effect of mesenchymal stem cells on renal fibrosis: Combination with immunosuppressive therapy

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、間葉系幹細胞（MSC）を用いた細胞療法が新たな治療アプローチとして期待されているが、MSCの臨床応用が進むにつれ、どのような患者に有効であるかを明らかにすることが重要である。本研究では、免疫抑制薬がMSCの炎症抑制ならびに線維化抑制に与える影響を明らかにするために、臓器障害の前段階である線維化モデルとして既に確立されている腎臓の片側尿管閉塞モデルを用いて、異なる機序をもつ免疫抑制薬がMSCの治療効果に与える影響を調査した。特定の免疫抑制薬の投与後に経時的にサンプリングした腎組織では、MSCの治療効果が減弱しており、特定の免疫抑制薬はMSCの治療効果に影響を与えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫抑制薬は様々な疾患の治療薬として使用されるため、同薬で治療中の患者数は非常に多いが、免疫抑制薬の併用がMSCの治療効果へ与える影響は不明であった。本研究では、特定の免疫抑制剤の投与により、損傷部位におけるMSCの活性化および生着が阻害され、その治療効果が減弱する可能性が示唆された。今回の知見は、MSCを用いた臨床研究において、患者の選択に有用な情報を提供するものであり、今後さらなる詳細な研究が望まれる。

研究成果の概要（英文）：As mesenchymal stem cell (MSC) therapy for various organ disorders becomes more widespread, it is very important to investigate which patients are appropriate candidates for this therapy. While immunosuppressive drugs are used in a high percentage of patients with organ disorders, the impact of combination therapy with immunosuppressive drugs on the therapeutic effect of MSCs is still unclear. We evaluated the influence of immunosuppressive drugs on the therapeutic effect of MSCs using the renal unilateral ureteral obstruction (UUO) model. Our results showed that pre-administration of certain immunosuppressive drugs attenuated therapeutic efficacy of MSCs.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：再生医療 間葉系幹細胞 免疫抑制薬 治療効果 炎症細胞 腎線維化 IFN-

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病の原疾患として、糖尿病性腎症、IgA 腎症などの慢性糸球体腎炎、高血圧による腎硬化症などがあるが、これら全ての原疾患による慢性腎臓病が腎不全に至る過程における共通の病態は線維化の進展であり、障害を受けた組織には炎症細胞の浸潤が認められ、この炎症細胞浸潤の遷延が線維化を増悪させる。

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSC) は骨髄や脂肪組織などから単離することができる未分化・多能性の成体幹細胞で、自己複製能を有する細胞である。MSC は paracrine effect を含む多様な機序を介して免疫調整機能を発揮し、炎症細胞浸潤を抑制することで線維化抑制効果を呈するだけでなく、TGF- β /Smad シグナルを直接阻害することで直接的な抗線維化作用を発揮することが報告されており、臓器損傷から臓器不全への移行に対する新しい治療手段として期待されている (Ueno T, Nakashima A, et al. *Kidney Int.* 84: 297-307, 2013)。特に、皮下脂肪は入手が容易であること、大量に確保することが可能であることから臨床応用がしやすい利点がある。また、脂肪由来幹細胞は他部位から採取した MSC と比べて抗炎症作用が強いことが報告されている。近年、脂肪由来の MSC の免疫調整機能を利用した再生医療が臓器障害から臓器不全への進行を防ぐ新しい治療アプローチとして期待されており、欧米諸国では実際に脳梗塞や心疾患、肝硬変、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫性疾患に対して臨床応用され始めている。

MSC は健康な生体内では非活性型で存在するが、障害を受けた組織から放出される炎症性サイトカイン、成長因子などによって活性化される。活性化した MSC は障害部位から放出されるケモカインや DAMPs を目標に遊走し、治療効果を発揮することが判明している (*Am J Physiol Renal Physiol* 289: 31-42, 2005)。実際に申請者らも無血清培地を用いて培養した MSC や低酸素刺激や IFN- γ を用いて MSC をプレコンディショニングした MSC が液性因子の産生を増強し、IRI により誘導された腎線維化および炎症を強く抑制することを報告している (Ishiuchi N, Nakashima A, et al. *Stem Cell Res Ther.* 11: 130, 2020., Kanai R, Nakashima A, et al. *Sci Rep.* 11: 850, 2021)。さらに、MSC 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 MSC の臨床応用は効果が期待できると考えられ、臨床応用はさらに拡大する可能性がある (*J Intern Med* 262: 509-25, 2007)。

MSC の臨床応用が進むにつれ、同時にどのような患者が治療適応であるかを研究することの意義も重要になる。免疫抑制薬は臓器移植後、結合組織病、血液疾患、腫瘍性疾患、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、皮膚疾患など様々な疾患の治療薬として使用されるため、同薬で治療中の患者数は非常に多い。しかし、免疫抑制薬の併用が MSC の治療効果へ与える影響はいまだに明らかになっていない。

2. 研究の目的

今後、MSCを用いた治験が各国で展開されることが予想されるが、免疫抑制薬で治療中の患者に対するMSC治療の有効性は不明であり、同患者に対してMSC治療効果が維持されるかを明らかにすることは非常に重要である。本研究では、免疫抑制薬がMSCの炎症抑制効果、抗線維化効果、遊走能ならびに活性化に与える影響を明らかにする。さらに、免疫抑制薬の投与によ

り治療効果が低下している際には外的要因を用いてMSCを事前に活性化させることで治療効果を維持することが可能かを調査する。

3．研究の方法

免疫抑制薬がMSCの炎症細胞抑制効果ならびに線維化抑制効果に与える影響を明らかにするために、臓器障害の前段階である線維化モデルとして既に確立されている腎臓の一側性尿細管閉塞 (UUO) モデルを用いて、異なる機序をもつ免疫抑制薬 A, B が MSC の治療効果ならびに遊走能力に与える影響を調査した。

まず、8週齢のSDラットに対してUUO処置を施し、時間の経過によりMSCの活性化因子ならびに遊走因子の発現がどう変化するかを調査した。次に、同様の8週齢のSDラットに対してUUO処置を施した動物モデルに対して免疫抑制薬を投与し、MSCの活性化因子ならびに遊走因子の発現を調査し、非投与時と比較した。さらに、同様のUUOモデルに対してMSCや事前に活性化したMSCを投与することでMSCの炎症細胞浸潤抑制効果と線維化抑制効果を評価し、同様に免疫抑制薬非投与時と比較した。MSCの遊走能や活性化に関わる因子に関してはRT-PCR、Western blottingなどを用いて評価を行った。抗 α -SMA抗体、抗Type-I Collagen抗体を用いた免疫組織化学染色およびマッソントリクローム染色で線維化の評価を、抗CD3抗体、抗CD68抗体を用いた免疫組織化学染色で炎症細胞浸潤の評価を行った。

4．研究成果

ラットUUOモデルにおいて、免疫抑制薬Aは免疫組織化学染色およびマッソントリクローム染色を用いた検討で、腎間質の線維化に対するMSCの治療効果を減弱させた。さらに炎症細胞浸潤に関しても、免疫抑制薬Aの投与によりMSCの腎臓における炎症細胞浸潤の抑制効果が減弱していた。免疫抑制薬Aの投与後にサンプリングした腎組織を用いた検討ではMSCの活性化因子ならびに遊走因子の発現が低下しており、MSCの活性化ならびに遊走能力が阻害された可能性が示唆された。一方で、免疫抑制薬Bを投与した場合は腎間質の線維化に対するMSCの治療効果は維持できており、炎症細胞浸潤に対する抑制効果も残存していた。同様にMSCの活性化因子ならびに遊走因子の発現も免疫抑制薬非投与時と同程度の発現レベルを呈していた。MSCを事前に薬剤で刺激しプレコンディショニングしたMSCの治療効果は免疫抑制薬投与をしている場合でも改善傾向を示していた。

以上から、特定の免疫抑制剤の投与により、損傷部位におけるMSCの活性化および生着が阻害され、その治療効果が減弱する可能性が示唆された。特定の免疫抑制薬を併用している患者において、他の種類の免疫抑制薬へ変更を行うことでMSCの治療効果を良好に維持することができる可能性があるとともに、特定の免疫抑制薬を併用している患者においても、MSCをプレコンディショニングすることでMSCの治療効果が維持できることを可能性があることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関