

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16220

研究課題名（和文）トロンボモジュリンを高発現させた間葉系幹細胞の抗凝固能と腎線維化抑制効果

研究課題名（英文）Anticoagulant and anti-fibrotic effects of mesenchymal stem cells overexpressing thrombomodulin

研究代表者

石内 直樹 (Ishichi, Naoki)

広島大学・医系科学研究科（医）・共同研究講座講師

研究者番号：30898010

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：間葉系幹細胞：Mesenchymal Stem Cells (MSC) の移植療法は、腎線維化の進行抑制に有効であることが報告されている。骨髄由来MSCと比較して脂肪由来MSCは樹立が容易であることから臨床応用が期待されているが、血液凝固作用が強く、血栓症のリスクが懸念されている。本研究では、抗凝固因子の一つであるThrombomodulinを過剰発現させた脂肪由来MSCを作製し、右腎摘出+腎虚血再灌流モデルのラットに左腎動脈より投与したところ、MSCの血栓形成による死亡を劇的に減少させることができた。また尾静脈よりこのMSCを大量に投与したところ、肺血栓塞栓症による死亡が著明に減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Thrombomodulinを過剰発現させた脂肪由来MSCは、血栓形成のリスクを大幅に減少させることが明らかとなった。この結果は、Thrombomodulinを高発現させた脂肪由来MSCが臨床研究で安全に使用できることを示唆しており、腎不全の進行を抑制するための有効な治療法になると考える。

研究成果の概要（英文）：Adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) exhibit anti-inflammatory and anti-fibrotic effects via their paracrine actions, and thereby are expected to be a new therapy to impede progression of renal fibrosis. Meanwhile, ASCs reportedly exhibit procoagulant activity compared to other mesenchymal stem cell types, raising concerns about thrombogenic risk in the clinical application. In this study, we found that ASCs overexpressing thrombomodulin (TM), anticoagulant and antifibrinolytic factor, dramatically reduce intravascular thrombus formations and rat death associated with thrombus formation induced by ASCs. TM-overexpressing ASCs can be safely used for cell therapy by reducing the risk of thromboembolism.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：間葉系幹細胞 Thrombomodulin アデノ随伴ウイルス 血栓 腎線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞：Mesenchymal Stem Cell (MSC) は骨髄、脂肪組織、臍帯血等から単離される多能性細胞であり、多分化能と自己再生能を有する。また MSC は paracrine effect による抗炎症作用、抗線維化作用を有しており、腎線維化の進展を抑制することが報告されている (Ishuchi N, et al. Stem Cell Res Ther. 2021)。これまで、MSC の研究においては骨髄から樹立した骨髄由来 MSC が広く用いられてきたが、脂肪組織にも大量の MSC を含んでいることが判明し、脂肪組織から樹立した脂肪由来 MSC についても近年研究が盛んに行われている。とくに脂肪組織は骨髄と比較して入手しやすく、大量に MSC を樹立することが可能であることから、脂肪由来 MSC については臨床応用が期待されている。MSC 自体は免疫寛容であり、他家の MSC を使用する際にヒト白血球抗原のハプロタイプを一致させる必要はない。したがって他家の脂肪由来 MSC を安全に臨床応用することができれば、大量の細胞ソースを確保することによってバンク化することも可能である。しかし、脂肪由来 MSC は骨髄由来 MSC と比較して血液凝固作用が強く血栓症のリスクが懸念されている。

MSC の血液凝固作用に関しては、細胞表面に発現している凝固因子の一つである Tissue factor (TF) を起点に血栓が形成されることが知られている (Gleeson BM, et al. Stem Cells. 2015)。一方で生体内においては過剰な凝固反応を抑制する機構が備わっており、それらの因子の一つとして Thrombomodulin (TM) があげられる。TM は細胞表面に発現する抗凝固因子の一つであり、トロンピンが TM と複合体を形成すると、トロンピンが保持していたフィブリン形成能、血小板活性化能を消失させる。さらに、プロテイン C を活性化させることで、凝固カスケード反応に必須の VIIIa 因子および Va 因子を不活性化し、トロンピンの産生を阻害する。TM は播種性血管内凝固症候群の治療薬として臨床応用されるなど、多くの研究が行われているが、MSC における TM の役割については十分に解明されていない。

2. 研究の目的

脂肪由来 MSC の血液凝固作用は、脂肪由来 MSC を用いた腎臓病に対する臨床応用に極めて重要な問題である。この血液凝固作用に対して、MSC に発現している TM がどのような影響を及ぼしているかは不明である。よって本研究では、TM を過剰発現させた脂肪由来 MSC を作製し、血栓症のリスクを軽減することができるかを明らかにするとともに MSC における TM の役割を明確にする。

3. 研究の方法

継代培養における脂肪由来 MSC の TF と TM の発現量の変化

脂肪由来 MSC の継代培養を行い、P3、P5、P7 で細胞を回収した。それぞれの継代数での脂肪由来 MSC における TF と TM の発現量を、ウエスタンブロット法を用いて比較した。

腎臓における TM を過剰発現させた脂肪由来 MSC の血栓症リスクの評価

TM のベクターを組み込んだアデノ随伴ウイルスと空のベクターを組み込んだアデノ随伴ウ

ウイルスをそれぞれ脂肪由来 MSC に感染させ、TM を過剰発現させた脂肪由来 MSC (TM-MSC) と null-MSC を作製した。7 週齢雄 SD ラットの右腎を切除し、その 1 週間後に左腎を 45 分遮断し再灌流させた片腎摘出 + 腎虚血再灌流モデルを作製した。再灌流後に左腎動脈より null-MSC と TM-MSC を 50 万 cells ずつ投与し、それぞれの MSC 投与群におけるラットの生存率を比較した。このモデルでは MSC の投与によって、血管内に血栓形成をきたすと片腎のため腎不全によって死亡する。

肺における TM を過剰発現させた脂肪由来 MSC の血栓症リスクの評価

ラットの尾静脈より null-MSC と TM-MSC を 750 万 cells ずつ投与した肺血栓塞栓症モデルを作製し、それぞれの MSC 投与群におけるラットの生存率を比較した。さらに血栓形成の程度を、HE 染色を用いて評価した。つづいて GFP を過剰発現させた脂肪由来 MSC を作製したのち、上記モデルに投与した。GFP 抗体と CD41 抗体を用いて免疫染色を行い、MSC と血栓の局在を調べた。

4 . 研究成果

継代培養における脂肪由来 MSC の TF と TM の発現量の変化

TF の発現量は MSC の継代を重ねるごとに増加した。一方で TM の発現量は継代を重ねるごとに減少した。

腎臓における TM を過剰発現させた脂肪由来 MSC の血栓症リスクの評価

アデノ随伴ウイルスを用いて TM-MSC を作製し、MOI の濃度依存的に TM の発現量が増加することを確認した。つづいて動物モデルに投与し生存率をそれぞれの MSC 投与群において比較したところ、null-MSC 投与群では 11 匹のうち投与後 3 日以内に 3 匹死亡したが、TM-MSC 投与群では 11 匹すべて生存していた。

肺における TM を過剰発現させた脂肪由来 MSC の血栓症リスクの評価

null-MSC 投与群では 12 匹のうち投与後 24 時間以内に 3 匹死亡したが、TM-MSC 投与群では 12 匹すべて生存していた。つづいて HE 染色を用いて血栓形成の程度を比較したところ、null-MSC 投与群ではランダムに評価した 120 視野のうち 30 視野において血栓の形成があり、これらの血栓は比較的太い血管から小血管までさまざまな血管において認められた。一方で TM-MSC 投与群では 120 視野のうち 3 視野においてのみ血栓の形成があり、これらは小血管に認められた。また免疫染色により、形成された血栓は集簇した MSC の周囲に形成されることを見出した。

以上の結果より、Thrombomodulin を過剰発現させた脂肪由来 MSC は、MSC による血栓形成のリスクを大幅に減少させることが可能であった。したがって Thrombomodulin を高発現させた脂肪由来 MSC は臨床研究で安全に使用できると考える。

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 Naoki, Nakashima Ayumu, Maeda Satoshi, Miura Yoshie, Miyasako Kisho, Sasaki Kensuke, Uchiki Toshio, Sasaki Ayano, Nagamatsu Shogo, Nakao Naoki, Nagao Masataka, Masaki Takao	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparison of therapeutic effects of mesenchymal stem cells derived from superficial and deep subcutaneous adipose tissues	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-023-03350-3	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石内 直樹, 中島 歩, 宮迫 貴正, 前田 悟, 三浦 由恵, 正木 崇生
2. 発表標題 浅層脂肪組織由来および深層脂肪組織由来の間葉系幹細胞の線維化抑制効果の比較
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------