

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592377

研究課題名(和文) 骨髄由来間葉系幹細胞を用いた閉塞性腎症に対する新規治療方法の確立

研究課題名(英文) New treatment strategy with bone marrow-derived mesenchymal stem cells for obstructive nephropathy

研究代表者

浅沼 宏 (Asanuma, Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70245570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：閉塞性腎症に対する骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)の注入療法による治療効果をラット片側尿管結紮モデルを用いて検討した。治療後の腎組織を採取して、上皮・間葉系形質転換(EMT)、腎線維化、それに關与する増殖因子とサイトカインについて評価した。

1) 赤色蛍光標識したヒトおよびラットMSCは、閉塞性腎症モデルの腎間質と尿細管に4週間以上にわたり局在した。2) 閉塞性腎症モデルにおいて、EMTと腎線維化は、MSCの注入により治療後3日～4週間までそれぞれ有意に抑制された。3) MSC注入によるEMTと腎線維化の抑制には、多くの増殖因子やサイトカインのなかでTNF- $\alpha$ の關与が示された。

研究成果の概要(英文)：The effect of mesenchymal stem cells (MSCs) therapy on chronic obstruction-induced renal fibrosis has not previously been evaluated. Rats with left ureteral obstruction underwent injection of fluorescent-labeled human and rat bone marrow-derived MSCs. From 3 days to 4 weeks later, the kidneys were harvested and the renal cortex analyzed for evidence of stem cell infiltration, epithelial-mesenchymal transition (EMT), renal fibrosis, and cytokine and growth factor activity.

MSCs were detected in the interstitium of the kidney more than 4 weeks post-obstruction. MSCs provided protection against obstruction-induced EMT and chronic renal fibrosis. While the mechanism of MSCs-induced renal protection during obstruction remains unclear, exogenous MSCs reduced obstruction-induced TNF- $\alpha$  levels, but did not alter TGF- $\beta$ 1, VEGF, IL-10, FGF, HGF expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 泌尿器科学

キーワード：間葉系幹細胞 上皮・間葉系形質転換 腎線維化 増殖因子 サイトカイン 閉塞性腎症 再生医学 細胞療法

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性水腎症や尿路結石症などに伴う閉塞性腎症は、組織学的に腎間質線維化の進展を特徴とし、小児および成人の末期腎不全の主要な原因である。最近の知見では、尿路の閉塞状態において尿細管上皮細胞が筋線維芽細胞へと転換し(上皮-間葉系形質転換: EMT) この活性化された線維芽細胞が障害された尿細管基底膜を越えて間質へと遊走し、そこで細胞外基質の合成と分解の不均衡を生じることにより腎間質の線維化を増強させることが示されている。この EMT の制御には transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、interleukin (IL)-18 といった増殖因子やサイトカインが関与していることが報告されている。

ここで、末期腎不全はその頻度が今後 15 年間に 40%以上増加するとも予測されており、全世界通じて極めて深刻な健康問題となっている。その治療は、現在では最終的に腎移植術が必要となるが、移植臓器の不足による長期待機を余儀なくされ、その間の透析療法は患者の生活の質を著しく低下させると共に家族への負担も強い。また、移植後も生涯にわたり免疫抑制療法が必要で、感染症や薬剤の副作用など合併症も少なくない。したがって、生命予後を改善させより副作用が少ない、経済的にも効率的な新たな治療方法の確立が急務となっている。

(2) 幹細胞は自己複製能と多分化能を併せ持ち、細胞療法などの再生医療への応用が期待されている。現在までに胚性幹細胞、非胚性幹細胞(間葉系幹細胞、造血幹細胞)、人工多能性幹細胞などについて臨床応用を目指して研究が進められている。胚性幹細胞は三胚葉組織へと分化する理想的な幹細胞ではあるが、胚を直接扱うという倫理的問題や制御不能な増殖や腫瘍発生という安全性の問題が危惧されている。人工多能性幹細胞は体細胞を利用することで倫理的問題はないものの、その作製は容易ではなくウイルスベクターを用いるためその安全性は担保されていない。そこで、非胚性幹細胞、殊に中胚葉由来の間葉系幹細胞は胚性幹細胞に比べ内・外胚葉組織への分化には制限はあるものの骨髄、胎盤、羊水、脂肪などから採取可能であり、その増殖は容易で倫理的問題や腫瘍発生のリスクがほとんどないため現在最も臨床応用の可能性が高い。

間葉系幹細胞は vascular endothelial growth factor (VEGF)、fibroblast growth factor (FGF)、hepatocyte growth factor (HGF)、insulin-like growth factor (IGF)-1 などの増殖因子、IL-6、IL-11 などのサイトカイン、その他プロスタグランジンなどの液性因子を分泌することが知られており、殊に VEGF や FGF などの増殖因子は血管新生、細胞の保護や生存を制御する重要なシグナル因子とされている。また、これら液性因子の分

泌能は幹細胞の性別によっても異なり、女性由来幹細胞が男性由来よりも分泌能が高いことが報告されている。さらに、間葉系幹細胞は HLA-II の欠如と HLA-I の低発現によりその抗原性が極めて低く、また、種々の液性因子を介して免疫抑制効果を示し、酸化窒素や indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の発現を制御することで T 細胞の増殖を抑制することが報告されている。

近年、間葉系幹細胞の臨床応用を目指した研究は虚血性心疾患などを対象とした循環器領域でいち早く進められ、動物モデルでは外因性間葉系幹細胞の注入により心機能の改善が示されている(Wang M et al., Shock, 2006)。腎・泌尿器科領域では腎虚血、薬剤による急性腎障害モデルでその有効性が検討されており、急性腎障害の機能改善が示されている (Tögel F et al., Stem Cells Dev, 2009、Imberti B et al., J Am Soc Nephrol, 2007)。また、このような急性疾患モデルでの作用機序としては障害された細胞への分化よりも VEGF、IGF-1 などの液性因子の関与が重要であることが報告されている (Bi B et al., J Am Soc Nephrol, 2007)。一方、慢性腎障害、殊に閉塞性腎症に対する外因性間葉系幹細胞の有効性については調査研究されていない。

## 2. 研究の目的

我々は他施設に先駆けて、商業的に入手可能な骨髄由来間葉系幹細胞を用いてラット片側尿管結紮モデルにおける腎線維化抑制効果の研究に着手した。本研究では、以下のようなプロセスを押し進め、骨髄由来間葉系幹細胞を用いて閉塞性腎症に対する新たな治療方法の確立を目指すと共に、その作用機序を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 骨髄由来間葉系幹細胞の樹立と長期継代に伴う安全性の評価

ラットおよびヒトの大腿骨の骨髄から採取された細胞成分をプラスチック培養フラスコ内で 72 時間培養し、接着した細胞のみを回収し、International Society for Cellular Therapy が提唱する間葉系幹細胞の条件である CD73、CD90、CD105 の発現と、CD11b または CD14、CD19 または CD79a、CD34、CD45 そして HLA-DR が発現していないことを確認する。樹立した幹細胞を多世代にわたり長期継代し細胞特性の変化、腫瘍細胞への変異の有無などその安全性を確認する。

(2) 閉塞性腎症に対する間葉系幹細胞の治療効果と安全性

幹細胞を投与前に Paul Karl Horan dye (PKH)-26 を用いて赤色蛍光標識し、Sprague-Dawley ラット片側尿管結紮モデルに注入後経時的に腎組織を採取して、蛍光顕微鏡を用いてその局在を詳細に評価し、幹細胞

胞の局在・分化について検討する。

ラットを麻酔後開腹して、a) 培養液のみを vehicle として左腎動脈に注入し、その後左尿管を結紮した閉塞性腎症群、b) 骨髄由来間葉系幹細胞 ( $1 \times 10^6$ /匹) を動注後に尿管結紮した幹細胞治療群、および c) 尿管結紮を行わない Sham 群を作製する。3 日～4 週間後に腎組織を採取して、western blotting 法により E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 発現を評価すると共に、組織切片の fibroblast specific protein (FSP)-1 染色により EMT について評価する。また、同組織を用いて ELISA 法による組織コラーゲン濃度測定、および組織切片の Masson's trichrome 染色により腎間質線維化を評価し、各群間の比較検討を行う。

1 週間前に予め左尿管結紮した腎間質線維化を確立したモデルについても同様の実験を行い、幹細胞治療効果を検討する。

上記治療後の動物モデルを 6 ヶ月以上の長期間にわたり経過観察することにより、腫瘍発生など長期合併症の有無を評価しその安全性を確認する。

### (3) 間葉系幹細胞による腎線維化抑制効果の作用機序の解明

上記(2)の実験で採取した腎組織をホモジナイズし、ELISA 法により増殖因子(TGF- $\beta$ 1、BMP-7、VEGF、FGF、HGF、IGF-1 など) サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-11、IL-18 など)の組織内タンパクレベルを評価する。また、腎組織から抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR 法により増殖因子およびサイトカインの組織内遺伝子発現を評価し、間葉系幹細胞による腎線維化抑制効果に関する EMT、MET の制御、および液性因子の関与を検討する。

### (4) 異種間治療の可能性

樹立したヒト由来幹細胞をラット閉塞性腎症モデルに注入し、その腎組織切片を用いて拒絶反応の有無、治療効果の有無を上記(2)、(3)と同様に検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 骨髄由来間葉系幹細胞の樹立と長期継代に伴う安全性の評価

ラットおよびヒト骨髄由来間葉系幹細胞を樹立し、10 世代以上にわたり継代し、細胞特性の変化や腫瘍細胞への変異を認めず、その安全性が確認された。

### (2) 閉塞性腎症に対する間葉系幹細胞の治療効果と安全性

蛍光標識された幹細胞は主に尿管閉塞モデルの腎間質と尿管に追跡した 4 週間後まで検出された。Sham 群および閉塞性腎症群ではバックグランドのみで明らかな蛍光は認めなかった。

正常尿管のマーカーとなる E-cadherin は、閉塞性腎症群で Sham 群に比べ有意に低下したが、幹細胞治療群は Sham 群同様に

E-cadherin が維持された。一方、myofibroblast のマーカーとなる $\alpha$ -SMA 発現は、閉塞性腎症群で Sham 群に比べ有意に増加したが、幹細胞治療群は Sham 群レベルの低値を示した。さらに、FSP-1 染色陽性細胞数は、閉塞性腎症群で Sham 群に比べ有意に増加したが、幹細胞治療群は閉塞性腎症群に比べ有意に低値を示した。これらの結果は、幹細胞が閉塞性腎症に伴う EMT と fibroblast の集積を防止することを示した。

閉塞性腎症群で、Sham 群ではほとんど認められない Masson's trichrome 染色による collagen deposition が著明に観察された。一方、幹細胞治療群は閉塞性腎症群に比べ有意に collagen deposition が低下した。閉塞性腎症群で、Sham 群に比べ腎皮質コラーゲン濃度の有意な増加を認めた。幹細胞治療群では、この閉塞に伴い増加した組織コラーゲン濃度の有意な低下を示した。これらの結果は、幹細胞が閉塞性腎症に伴う腎線維化を防止することを示した。

予め尿管結紮により腎間質線維化を確立したモデルにおいても、同様に幹細胞の投与による EMT、fibroblast の集積、腎線維化を防止することが示された。

幹細胞投与した動物モデルを 6 ヶ月以上観察したが、腫瘍発生などの明らかな合併症は認められず、間葉系幹細胞治療の安全性が認められた。

### (3) 間葉系幹細胞による腎線維化抑制効果の作用機序の解明

ELISA 法による腎皮質内のタンパクレベルの評価では、VEGF と IL-10 は測定値以下であったが、TNF- $\alpha$  と TGF- $\beta$ 1 は尿管閉塞にて有意に増加した。そして、幹細胞の投与により TGF- $\beta$ 1 には変化が認められなかったが、TNF- $\alpha$  は有意に低下した。

リアルタイム PCR 法による腎皮質内の mRNA 発現の評価では、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、FGF、HGF は尿管の閉塞により有意に増加、VEGF は有意に低下した。尿管閉塞 4 週間後には、TNF- $\alpha$  の発現は幹細胞の投与により有意に低下した。これらの結果は、幹細胞による EMT、腎線維化防止のメカニズムとして、TNF- $\alpha$  の関与が示唆された。

### (4) 異種間治療の可能性

(2)、(3)の実験をヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いて同様に行った。種を超えたヒト幹細胞の投与においても、ラットの閉塞性腎症に伴う EMT、fibroblast の集積、腎線維化を防止することが示され、経過中、拒絶反応は認められなかった。この結果から、間葉系幹細胞は抗原性が低く、将来の異種間治療の可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1) 浅沼 宏、大家基嗣、閉塞性腎症による

尿細管間質障害、腎と透析、査読なし、71、  
2011、57-63

〔学会発表〕(計 1件)

1) 浅沼 宏、閉塞性腎症に対する骨髄由来  
間葉系幹細胞注入療法の有効性、第 11 回泌  
尿器科再建再生研究会、2014 年 7 月 5 日、青  
森市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅沼 宏 (ASANUMA, Hiroshi)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：70245570

### (2) 研究分担者

大家 基嗣 (OYA Mototsugu)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：00213885

水野 隆一 (MIZUNO Ryuichi)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：60383824

香野 日高 (KONO Hidaka)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：50338133