

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461229

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を用いた腎線維化の抑制：無血清培地の検討

研究課題名(英文) Mesenchymal stem cells cultured in serum-free medium ameliorate experimental renal fibrosis.

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞：Mesenchymal Stem Cells (MSCs) が障害された組織の修復や線維化の抑制に働く機序の一つとして、MSCsの有する抗炎症作用が注目されている。通常血清含有培地で培養したMSCと比較して、無血清培地で培養したMSCsは強力な免疫抑制作用を示したことから、無血清培地で培養したMSCsは腎臓疾患における線維化を抑制することが可能であるかを検討した。ラット一側性尿管結紮(UUO)モデルに対して、通常血清含有培地で培養したMSCsと比較して、無血清培地で培養したMSCsの移植は、線維化を抑制する作用および炎症細胞の浸潤を抑制する作用が増強していた。

研究成果の概要(英文)：The Mechanism underlying the anti-inflammatory effect of mesenchymal stem cells (MSCs) has been gradually elucidated. However, the effect of MSCs cultured in serum-free medium has not been clarified. We investigated the difference between MSCs cultured under 10% fetal bovine serum (FBS) containing medium and serum-free medium of the therapeutic effects in a rat model of renal fibrosis. After 4 days of unilateral ureteral obstruction (UUO) operation, we injected rat MSCs cultured with 10% FBS containing DMEM (10%MSCs) or serum-free medium (SF-MSCs), or PBS only (PBS) through the rat tail vein. As a results, transplantation of SF-MSCs potently inhibited the infiltration of inflammatory cells and the progression of fibrosis compared with 10% MSCs.

研究分野：腎臓病学

キーワード：再生医療 間葉系幹細胞 線維化 抗炎症作用

1. 研究開始当初の背景

移植された間葉系幹細胞：Mesenchymal Stem Cells (MSC) が障害を受けた組織に分化して組織の修復を行うことを支持する報告は少ないが、移植された MSC 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)。

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: e93513, 2014)、MSC 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症モデルへ MSC の投与を行ったところ、投与した MSC 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)。また、本研究の研究協力者である加藤 幸夫 名誉教授 (広島大学) が開発した幹細胞用の無血清培地：STK2 (DS Pharma Biomedical) を用いて MSC を培養することで、患者血清を使用せずに十分な細胞数の MSC をより短期間で準備することができ、感染症などのリスクも軽減できることから、臨床応用にも有用であると考えられる。

2. 研究の目的

従来の血清含有培地で培養した MSC と比較して、無血清培地で培養した MSC を用いた移植療法が、腎疾患における線維化の抑制に有効であるかを検討する。また、Green Fluorescent Protein (GFP) ラットより採取した MSC を用いて、無血清培地で培養した MSC は血清含有培地で培養した MSC よりも長期間

の生着が可能であるかを検討する。

我々は既にラット一側性尿管結紮 (Unilateral ureteral obstruction: UUO) モデルにおいて、通常血清含有培地で培養した MSC と比較して、無血清培地で培養した MSC の投与は MCP-1, TNF- α , IL-1 の発現を一層抑制していることを確認しており、無血清培地で培養した MSC は抗炎症作用が増強していると考えられる。無血清培地で培養した MSC がより強い抗炎症作用を有する機序についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ラット一側性尿管結紮 (UUO) モデルに対する MSC の治療効果

8 週齢雄性 SD ラットを麻酔下にて開腹し、左尿管を結紮して UUO モデルを作製する。手術の 4 日後に尾静脈から無血清培地 STK2 で培養した MSC (SF-MSC) および 10%ウシ血清含有 DMEM 培地で培養した MSC (10%MSC) または PBS (コントロール) の投与を行う。経時的に左腎臓を採取し、障害の程度、炎症細胞の浸潤の程度を比較する。さらに、GFP 陽性ラットより採取した MSC を用いて MSC の生着期間についても検討する。

MSC の投与は、1 個体あたり 5×10^6 cells 投与する。MSC 投与後 3, 6 日目に組織障害の程度を判定し、それぞれの群間で比較する。さらに、CD68, MCP-1, CD3 などの抗体を用いて免疫組織化学的評価を行い、炎症細胞の浸潤がどの程度抑制されるかを検討する。また、Green Fluorescent Protein (GFP) ラットより採取した MSC を用いた生着率について検討する。

(2) MSC 馴化培地による TGF- β 1, Smad 経路の制御

ヒト近位尿管細胞を、0.1%ウシ血清含有培地 10%ウシ血清含有培地で培養した MSC による馴化培地 無血清培地で培養した MSC による馴化培地でそれぞれ培養し、

TGF- 1 刺激で誘導されるリン酸化 Smad の抑制が認められるか検討する。

(3) MSC による Immune-regulatory phenotype

(M2) マクロファージの誘導

ヒト単芽球様細胞 (THP-1) を培養後、PMA 160nM で 48hr 刺激を行い Pro-inflammatory phenotype (M1) マクロファージへの分化を誘導する。ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を、10% ウシ血清含有 DMEM 培地 (10%MSC) および無血清培地 STK2 (SF-hMSC) で培養し、Transwell system を用いて THP-1 と共培養する。72hr 後に THP-1 を回収し、Immune-regulatory phenotype (M2) マクロファージのマーカである CD163、CD206 の発現を FACS 法にて定量する。

(4) Tumor necrosis factor (TNF) - stimulated gene 6 (TSG-6) ノックダウンによる MSC の治療効果

無血清培地で培養した MSC では TSG-6 の発現が上昇していたため、TSG-6 ノックダウンによる MSC の治療効果について検討する。実験(1)と同様に、ラット一側性尿管結紮モデルを作製し、手術の4日後に尾静脈から無血清培地で培養した MSC または TSG-6 siRNA を施行した無血清培地で培養した MSC の投与を行う。経時的に左腎臓を採取し、障害の程度、炎症細胞の浸潤の程度を比較する。

4 . 研究成果

(1) ラット一側性尿管結紮 (UUO) モデルに対する MSC の治療効果

無血清培地 STK2 で培養した MSC (SF-MSC) および 10%ウシ血清含有 DMEM 培地で培養した MSC (10%MSC) およびコントロール (PBS) のうち、UUO モデルに対して SF-MSCs 投与群で最も TGF- 1, -SMA の発現が抑制されていた。さらに、SF-MSCs 群で CD3、CD68 の発現が最も低下していた。以上より、通常の血清含有培地で培養した間葉系幹細胞の移植と比較して、無血清培地で培養した間葉系幹細胞の

移植は、線維化を抑制する作用および炎症細胞の浸潤を抑制する作用が増強していることが示された。

GRP 陽性 MSC を用いた実験系において、腎組織への MSC の生着は3日間まで認められ、両群とも1週間後の生着細胞は認められなかった。また、3日目の MSC の生着数には 10%MSC と SF-MSCs で有意差はなかった。

(2) MSC 馴化培地による TGF- 1、Smad 経路の制御

MSC 馴化培地によって TGF- 1 で誘導されるリン酸化 Smad の抑制が認められたが、10%ウシ血清含有培地で培養した MSC と無血清培地で培養した MSC による馴化培地で有意差は認めなかった。

(3) MSC による M2 マクロファージの誘導

CD163 陽性細胞および CD 206 陽性細胞が無血清培地で培養した MSC (SF-hMSC) 群で著明に増加していたことから、無血清培地で培養した間葉系幹細胞は、マクロファージを Pro-inflammatory phenotype (M1) から Immune-regulatory phenotype (M2) により強く変化させることが示された。

(4) TSG-6 ノックダウンによる MSC の治療効果

TSG-6 siRNA を施行した無血清培地で培養した MSC 群では、無血清培地で培養した MSC の投与群で抑制された TGF- 1, -SMA の抑制が減少していたことから、無血清培地で培養した MSC の治療効果の一部に TSG-6 の発現増加が関与していることが示唆された。

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 1 件)

名称：生体組織損傷の修復剤および当該修復剤の製造方法

発明者：中島歩、正木崇生、土井盛博、吉田健、加藤幸夫、辻紘一郎

権利者：国立大学法人広島大学(504136568)、株式会社ツーセル(503328193)

番号：特願 2016-256779

出願年月日：2016 年 12 月 28 日

国内外の別： 国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

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

正木 崇生 (MASAKI TAKAO)

広島大学・病院(医)・教授

研究者番号：30397913

(2)研究分担者

中島 歩 (NAKASHIMA AYUMU)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・特任助教

研究者番号：40448262

土井 盛博 (DOI SHIGEHIRO)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：80626127

(3)連携研究者

(4)研究協力者

加藤 幸夫 (KATO YUKIO)

広島大学名誉教授

研究者番号：10112062