

# 論文内容要旨

Mesenchymal stem cells ameliorate experimental  
peritoneal fibrosis by suppressing inflammation and  
inhibiting TGF- $\beta$ 1 signaling

(間葉系幹細胞は炎症抑制および TGF- $\beta$ 1 シグナル  
の抑制を介し腹膜線維化を改善させる)

Kidney International,2013,in press.

主指導教員：正木 崇生 教授  
(広島大学病院 腎臓内科学)  
副指導教員：松原 昭郎 教授  
(統合健康科学部門 腎泌尿器科学)  
副指導教員：河野 修興 教授  
(応用生命科学部門 分子内科学)

上野 敏憲

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

<背景>腹膜透析は有効な治療である一方、長期腹膜透析による限外濾過能の低下や、合併症としての被嚢性腹膜硬化症の発症が臨床上問題となっている。腹膜線維化の機序として、腹膜への TGF- $\beta$ 1 の過剰発現や腹膜中皮細胞の上皮間葉移行( epithelial-to-mesenchymal transition: EMT)の関与が指摘されている。一方、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)は多分化能を有するだけでなく、MSC 自体の paracrine effect により線維化抑制効果や抗炎症作用を示す報告を認めており、多くの疾患に対し MSC 移植療法が検討されている。

<目的>骨髄より採取し培養下にて増殖させた MSC の腹膜線維化に対する抑制効果を検討する。

<方法>(1)雄性、8 週齢の F344 ラットを使用し、0.1% chlorhexidine gluconate (CG)+15%エタノール生食液 2ml を腹腔内投与し、30 分後に PBS に混濁した MSC( $1 \times 10^7$  個)を腹腔内投与した。7、14 日後に屠殺し、得られた壁側腹膜にて組織学的な評価を行った。また、14 日目に腹膜平衡試験(peritoneal equilibrium test: PET)を行い腹膜の機能的評価を行った。(2) GFP 陽性ラットの骨髄由来の MSC を用い、投与した GFP 陽性 MSC の腹膜への生着の有無を経時的に検討した。(3) MSC 自体の paracrine effect を検討するため、4%ブドウ糖刺激を行ったヒト中皮細胞(human peritoneal mesothelial cell: HPMC)とヒト MSC のトランスウェルを用いた共培養を行い、TGF- $\beta$ 1、fibronectin の mRNA 発現量を検討した。(4)HPMC に対して MSC-conditioned medium (MSC-CM)によるプレインキュベーションを行った後、TGF- $\beta$ 1刺激による Smad2 のリン酸化および間葉系および上皮系マーカーの蛋白発現をウェスタンブロッティングにて評価した。また、MSC-CM 中の hepatocyte growth factor (HGF)濃度を ELISA にて測定し、HGF 中和抗体を用い Smad2 リン酸化への影響を検討した。

<結果>GFP 陽性 MSC の腹膜への生着は投与後 3 日目までしか確認できなかったが、CG の腹腔内投与により惹起された腹膜肥厚は、MSC の投与により有意に抑制された。また、免疫組織化学的検討では、MSC 投与により腹膜への間葉系マーカー( $\alpha$ -SMA、FSP-1)の発現、collagen 沈着、CD68 陽性マクロファージ数、CD68/ TGF- $\beta$ 1陽性細胞数、phosphorylated Smad2 陽性細胞の抑制を認めた。PET では CG の投与により、腹膜透析液から血中への glucose の吸収率(D/D0 glucose)および血中から腹膜透析液への BUN 移行率(D/P BUN)は亢進していたが、MSC の投与により有意に抑制され機能的な改善を得た。また、HPMC に対する 4%ブドウ糖刺激により TGF- $\beta$ 1、fibronectin の発現が上昇したが、MSC との共培養により有意に抑制され、MSC の分泌する液性因子が抗線維化に関与していることが示唆された。さらに HPMC において、MSC-CM によるプレインキュベーションにより、TGF- $\beta$ 1刺激による Smad2 のリン酸化が抑制された。また、TGF- $\beta$ 1刺激により HPMC の $\alpha$ -SMA 蛋白発現が上昇し ZO-1 蛋白発現が低下したが、これらの EMT 反応は MSC-CM によるプレインキュベーションにより抑制された。また、MSC は HGF の分泌能を有し、Smad2 のリン酸化の抑制に関与していた。

<結語>ラット腹膜線維化モデルにおいて、MSC の腹腔内投与により腹膜線維化は抑制され機能的な改善を得た。その機序として、MSC による抗炎症作用および TGF- $\beta$ 1シグナルの抑制作

用が示唆された。