

# 論文内容要旨

Serum-Free Medium Enhances the Immunosuppressive and Antifibrotic Abilities of Mesenchymal Stem Cells Utilized in Experimental Renal Fibrosis

(無血清培地で培養した間葉系幹細胞は抗炎症作用と抗線維化作用が増強し腎線維化を抑制する)

STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE, 7(12): 893-905, 2018.

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：茶山 一彰教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・代謝内科学)

副指導教員：東 幸仁教授

(原爆放射線医科学研究所 ゲノム障害病理)

吉田 健

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## (背景・目的)

間葉系幹細胞: Mesenchymal Stem Cells (以下 MSCs) は造血能を持たない未分化な多能性を有した幹細胞であり、種々の組織 (主に骨髄、脂肪組織、臍帯血など) から採取することが出来る。幹細胞の中でも癌化する可能性がかなり低いとされ、また間葉系組織以外にも分化することが出来る報告もあり、MSCs を利用した各種障害モデルへの有効性がこれまでに報告されている。障害された組織の修復に働く機序の一つとして、MSCs が持つ免疫調節能が注目されており、ラット腎線維化モデルにおいても MSCs の投与によって線維化を抑制することが報告されている。

本邦を含め全世界における末期腎不全患者数は増加の一途を辿っており、今後も更なる増加が予想されている。原疾患の如何に関わらず、腎尿細管間質の線維化は末期腎不全に至る共通の経路であり、慢性腎臓病における線維化の抑制、ひいてはそこに至る炎症の制御が治療ターゲットとなりうる。

これまで用いられている MSCs は一般的にウシ血清やヒト血清を添加した培地で培養されている。血清添加によって細胞増殖は促されるが、未知のウイルスへの感染や免疫反応に曝される危険性をはらんでおり、臨床応用する際には障害となる。間葉系幹細胞用の無血清培地である STK シリーズは既知組成培地で作られており、一般のウシ血清添加培地で培養した際と比較して増殖能が高く、短期間で多量の MSCs を用意することが可能となり、臨床応用にも期待できる。

本研究の目的は、無血清培地で培養した MSCs の抗炎症・抗線維化作用を明らかにした上で、有血清含有培地で培養した MSCs との腎線維化に対する治療効果の比較、及び作用に関わる因子を検討することである。

## (方法)

- 1) ラット骨髄から採取した MSCs をウシ胎児血清含有培地 (10%MSCs) と無血清培地 (SF-MSCs) で各々培養し、腎間質線維化モデルである一側尿管結紮 (以下 UUO) ラットへ投与した際の線維化マーカー、炎症性サイトカインの発現の変化
- 2) ヒト近位尿細管細胞 (HK-2) への Angiotensin-II (Ang-II) 、 Transforming growth factor (TGF) - $\beta$ 1 刺激による線維化マーカー、炎症性サイトカインの発現亢進に対する各ヒト MSCs (hMSCs) 馴化培地の抑制効果
- 3) ヒト単球様細胞 (THP-1) から誘導した炎症促進型 (M1) マクロファージと各 hMSCs との共培養におけるマクロファージ表現型の変化
- 4) 各 hMSCs における Prostaglandin E2 (PGE2) 、 Interleukin (IL) -6、Hepatocyte growth factor (HGF) 、 Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced protein 6 (TSG-6) の発現
- 5) TSG-6 発現をノックダウンした SF-hMSCs (TSG-6 siRNA/SF-hMSCs) と、THP-1 から誘導した M1 マクロファージとの共培養におけるマクロファージ表現型の変化
- 6) HK-2 への TGF- $\beta$ 1 刺激による炎症性サイトカインの発現に対する、TSG-6 siRNA/SF-

#### hMSCs 馴化培地の効果

- 7) TSG-6 発現をノックダウンした SF-MSCs を用いて、UUO ラットへの投与における線維化マーカー、炎症性サイトカインの発現の変化

以上を検討した。

#### (結果)

- 1) UUO ラットに対する 10%MSCs 及び SF-MSCs の投与により、線維化マーカーや炎症性サイトカインの発現亢進は抑制され、SF-MSCs 投与群で有意に強く抑制された。
- 2) HK-2 に Ang-II、TGF- $\beta$ 1 刺激を行い誘導される線維化マーカー、炎症性サイトカインの発現亢進は各馴化培地にて抑制され、10%hMSCs 群と SF-hMSCs 群で同等であった。
- 3) THP-1 と各 hMSCs を共培養することで、M1 マクロファージから炎症抑制型 (M2) マクロファージへの分化が誘導され、SF-hMSCs 群で有意に強く誘導された。
- 4) 10%hMSCs において PGE2 や HGF、IL-6 は SF-hMSCs より有意な産生亢進を認めた。一方で、SF-hMSCs では抗炎症性サイトカインである TSG-6 の有意な発現亢進を認めた。
- 5) SF-hMSCs における TSG-6 発現のノックダウンは M2 マクロファージへの分化誘導に影響を及ぼさなかった。
- 6) HK-2 に TGF- $\beta$ 1 刺激を行い発現亢進する炎症性サイトカインにおける SF-hMSCs 馴化培地による抑制効果は、SF-hMSCs における TSG-6 発現のノックダウンによって減弱した。
- 7) UUO ラットに対する SF-MSCs 投与による線維化マーカー、炎症性サイトカイン発現の抑制効果は、SF-MSCs の TSG-6 発現をノックダウンすることにより減弱した。

#### (考察)

本研究において、無血清培地で培養した MSCs は有血清含有培地で培養した MSCs よりも有意に抗炎症・抗線維化作用を示すことが明らかとなった。その機序として、MSCs によるマクロファージ表現型を炎症抑制型 M2 に誘導する作用が無血清培地によって増強されることが関与していると考えられた。また、無血清培地で培養した MSCs において TSG-6 の発現が増強することも重要な因子であった。無血清培地を用いることで、感染などの危険性を排除するとともに、MSCs の抗炎症・抗線維化作用が増強することから、腎線維化に対する臨床応用が期待できる。