

# 論文内容要旨

Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells  
prevent renal fibrosis and inflammation in  
ischemia-reperfusion rats

(腎虚血再灌流障害に対する、低酸素下で培養した骨  
髄間葉系幹細胞移植の線維化抑制効果)

Stem Cell Research & Therapy, 11(1):130,2020.

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：東 幸仁教授

(原爆放射線医科学研究所 ゲノム障害病理)

副指導教員：横田 和典教授

(広島大学病院 形成外科学)

石内 直樹

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

背景：

間葉系幹細胞：Mesenchymal Stem Cell (MSC) は骨髄、臍帯血、脂肪組織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、抗線維化作用も有しており、障害された組織の修復に寄与していることが報告されている (Darwin J, et al. Mol Ther. 2012; 20: 14-20)。我々はラット片側尿管結紮モデルにおいて、MSC の投与が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 (Yoshida K, et al. Stem Cells Transl Med. 2018; 7: 893-905)。さらに通常酸素下で培養した MSC と比較して、低酸素下で培養した MSC では抗線維化作用を有する Hepatocyte Growth Factor (HGF) の分泌増強が報告されている (Zhang Z, et al. Stem Cell Res Ther. 2017; 8: 89)。そこで低酸素下で培養した MSC をラット腎虚血再灌流：Ischemia Reperfusion Injury (IRI) モデルへ投与し、通常酸素下で培養した MSC と比較して腎線維化がより強く抑制されるかを検討した。

方法：

- 1) ラットの大腿骨、脛骨から MSC を採取しウシ胎児血清含有培地を用いて通常酸素下にて培養を行った。なお低酸素刺激を行う MSC に関しては、モデルラットに投与する 24 時間前より 1% の低酸素下にて培養を行った。
- 2) 腎動脈を 60 分クランプした後、再灌流させた IRI モデルのラットに、左腎動脈近傍の腹部大動脈よりラット MSC を 50 万 cell 投与した。
- 3) モデル作製後 day7、day21 で屠殺し、PBS のみ (コントロール群)、通常酸素下で培養した MSC の投与群、低酸素下で培養した MSC の投与群において、腎組織の炎症マーカーおよび線維化を比較した。
- 4) ヒト MSC を同様の方法にて投与し、腎組織の線維化を比較した。
- 5) ヒト近位尿管細胞 (HK-2 cell) に Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) を添加することによって誘導される線維化因子が、通常酸素下で培養したヒト MSC と低酸素下で培養したヒト MSC より作製した馴化培地 (conditioned medium) にて抑制されるかを検討した。
- 6) 通常酸素下で培養したヒト MSC と低酸素下で培養したヒト MSC において、変化する遺伝子群から線維化抑制に関与する候補遺伝子を選定した。さらにその遺伝子を siRNA で抑制した場合に、腎虚血再灌流モデルへ移植後の腎線維化に変化が生じるかを明らかにした。

結果：

- 1) 通常酸素下で培養したラット MSC は、虚血再灌流障害により誘導された  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ SMA)、TGF- $\beta$ 1、collagen I、collagenIII の発現を有意に抑制し、低酸素下で培養したラット MSC はさらに強く抑制した。
- 2) 虚血再灌流障害により腎組織に誘導された CD3 (T リンパ球) および CD68 (マクロファージ) の陽性細胞数は、通常酸素下で培養したラット MSC の投与によって有意に減少し、低酸素下で

培養したラット MSC の投与でさらに強く減少した。一方で通常酸素下で培養したラット MSC は、炎症抑制系 (M2) マクロファージのマーカーである CD163 陽性細胞数を増加させた。低酸素下で培養したラット MSC はその発現をより一層増加させた。

- 3) 通常酸素下で培養したヒト MSC は、虚血再灌流障害により誘導された  $\alpha$ SMA、TGF- $\beta$ 1、collagen I、collagen III を有意に抑制し、低酸素下で培養したヒト MSC はさらに強く抑制した。
- 4) HK-2 cell において TGF- $\beta$ 1 の添加で誘導された  $\alpha$ SMA、リン酸化 Smad2 (p-Smad2) は、通常酸素下で培養したヒト MSC より作製した conditioned medium では有意に抑制されなかった。しかし低酸素下で培養したヒト MSC より作製した conditioned medium は  $\alpha$ SMA、p-Smad2 の発現を有意に抑制した。
- 5) 低酸素下で培養したヒト MSC より作製した conditioned medium では、通常酸素下で培養したヒト MSC より作製した conditioned medium と比較して、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)、HGF、Prostaglandin E2 (PGE2) の発現が有意に上昇していた。
- 6) 低酸素下で培養し VEGF siRNA を施行したヒト MSC より作製した conditioned medium では、低酸素下で培養し negative control siRNA を施行したヒト MSC より作製した conditioned medium と比較して、HGF の発現が減弱していた。
- 7) HK-2 cell において TGF- $\beta$ 1 の添加で誘導された  $\alpha$ SMA は、低酸素下で培養し negative control siRNA を施行したヒト MSC より作製した conditioned medium により、有意に抑制された。しかし低酸素下で培養し VEGF siRNA を施行したヒト MSC より作製した conditioned medium では、その抑制が減弱した。
- 8) 虚血再灌流障害により誘導された  $\alpha$ SMA、TGF- $\beta$ 1、collagen I、collagen III は、低酸素下で培養し negative control siRNA を施行したヒト MSC により、有意に抑制された。しかし低酸素下で培養し VEGF siRNA を施行したヒト MSC では、その抑制が減弱した。

考察とまとめ：

低酸素下で培養した MSC の投与は、虚血再灌流障害により誘導された腎線維化および炎症を強く抑制した。またラット MSC とヒト MSC における線維化抑制効果は同等であった。さらに低酸素下で培養した MSC は VEGF の発現を増強することで、HGF の分泌を促進し TGF- $\beta$ /Smad シグナル伝達を抑制した。低酸素下で培養した MSC は腎線維化を抑制する治療法として有用と考える。