

論 文 内 容 要 旨

Interferon- γ enhances the therapeutic
effect of mesenchymal stem cells
on experimental renal fibrosis

(インターフェロン γ は腎線維化に対する
間葉系幹細胞の治療効果を増強する)

Scientific Reports, 2020, 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：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)

金井 亮

(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 Cells (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。さらに MSC は傍分泌によって作用を発揮し、障害された組織の修復に働くことが報告されている (Caplan A, et al. J Cell Biochem. 2006; 98: 1076-1084)。我々はラット腎障害モデルにおいて、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)。Interferon- γ (IFN- γ) 添加培地で培養した MSC は、prostaglandin E2 (PGE2) などの液性因子の分泌を増加させ、抗炎症作用が増強することが報告されている (English K, et al. Immunol Lett. 2007; 110: 91-100)。今回我々は、一側虚血再灌流障害 (IRI) モデルおよび一側尿管結紮 (UUO) モデルの 2 種類の腎障害モデルラットを用いて、ウシ胎児血清 (FBS) 含有培地で培養した MSC と比較して IFN- γ を添加した FBS 含有培地で培養した MSC がより強い治療効果を発揮するかを明らかにするとともに、その機序について検討した。

方法：

- 1) 6 週齢の SD ラットの大腿骨・脛骨から MSC (rMSC) を採取し FBS 含有培地で培養した。IFN- γ 刺激群では各腎障害モデルに投与する 24 時間前より培地に IFN- γ 200ng/ml を添加した。
- 2) ラットの左腎動脈を 60 分クランプした後再灌流させ IRI モデルを作製し、直ちに左腎動脈近傍の腹部大動脈より FBS 含有培地で培養した rMSC (control rMSC) または IFN- γ 添加 FBS 含有培地で培養した rMSC (IFN- γ rMSC) を 50 万 cells、あるいは PBS を投与した。投与から 7 日および 21 日後に屠殺し、障害側の腎臓における炎症マーカーおよび線維化を評価した。
- 3) ラットの左尿管を結紮し、UUO モデルを作製した。モデル作製より 4 日後に尾静脈より control rMSC または IFN- γ rMSC を 300 万 cells、あるいは PBS を投与した。投与から 7 日後に屠殺し、障害側の腎臓における線維化を評価した。
- 4) ヒト近位尿管細胞 (HK-2 cell) に transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) を添加することにより誘導される線維化因子が、FBS 含有培地で培養したヒト MSC (control hMSC) または IFN- γ 添加 FBS 含有培地で培養したヒト MSC (IFN- γ hMSC) より作製した馴化培地 (conditioned-medium : CM) にて抑制されるかを評価した。
- 5) 抗炎症性メディエーターとして、control hMSC または IFN- γ hMSC より作製した CM 内の PGE2 の発現量について酵素結合免疫吸着法 (ELISA) を用いて評価した。
- 6) マクロファージの phenotypic change の変化についてヒト単芽球様細胞 (THP-1 cell) を用いて評価した。THP-1 cell を培養後、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 刺激を行いマクロファージへの分化を誘導した。刺激後に上清を control hMSC または IFN- γ hMSC より作製した CM に置換した。置換から 48 時間後に THP-1 cell を回収し、M2 (炎症抑制型) マクロファージマーカーの発現を評価した。
- 7) PGE2 合成酵素 (PTGES) の遺伝子発現を siRNA で抑制した IFN- γ rMSC をラット IRI モデルへ投与し、線維化抑制効果に変化があるかを評価した。

結果：

- 1) control rMSC の投与は、IRI が誘導する α -smooth muscle actin (α -SMA)、TGF- β 1、collagen I、collagen III の発現を有意に抑制した。更に、これらの抑制は IFN- γ rMSC の投与でより強く認められた。
- 2) IRI により腎組織に誘導された CD3 (T cell マーカー) および CD68 (マクロファージマーカー) の陽性細胞数は、control rMSC の投与で有意に減少し、IFN- γ rMSC の投与でさらに強く減少した。一方、control rMSC の投与は、M2 マクロファージマーカーである CD163、CD206 陽性細胞数を増加させた。この増加は IFN- γ rMSC の投与でより顕著であった。
- 3) control rMSC の投与は UUO が誘導する α -SMA、collagen I、collagen III の発現を有意に抑制した。更に、これらの抑制は IFN- γ rMSC の投与でより強く認められた。
- 4) TGF- β 1 刺激を行った HK-2 cell において誘導される phosphorylated Smad2、 α -SMA の発現は、control hMSC より作製した CM によって抑制され、IFN- γ hMSC より作製した CM では、さらに強い抑制を示した。
- 5) control hMSC より作製した CM と比較して、IFN- γ hMSC より作製した CM では PGE2 の発現が有意に増加していた。
- 6) PMA 刺激を行った THP-1 cell において、control hMSC より作製した CM は M2 マクロファージマーカーである CD163、CD206 の発現を有意に増加させ、この増加は IFN- γ hMSC より作製した CM でより顕著であった。
- 7) negative control (NC) siRNA を施行した IFN- γ rMSC より作製した CM と比較して、PTGES siRNA を施行した IFN- γ rMSC より作製した CM では、PGE2 の発現が有意に低下していた。また THP-1 cell から誘導したマクロファージにおいて、NC siRNA を施行した IFN- γ hMSC から作製した CM は、CD163 の発現を有意に増加させた。しかし PTGES siRNA を施行した IFN- γ hMSC より作製した CM では CD163 の有意な発現の増加を認めなかった。
- 8) IRI モデルラットに PBS、PTGES siRNA もしくは NC siRNA を施行した IFN- γ rMSC を投与したところ、IRI によって誘導される α -SMA、TGF- β 1、collagen III の発現は NC siRNA を施行した IFN- γ rMSC 投与により有意に抑制されたが、PTGES siRNA を施行した IFN- γ rMSC の投与では、この抑制が減弱した。

まとめ：

IFN- γ 添加培地で培養した MSC は、腎障害モデルにおける腎線維化および炎症を強く抑制した。その機序として、IFN- γ 添加培地で培養した MSC の炎症抑制型 M2 マクロファージを誘導する作用が、PGE2 の分泌促進により増強されることが関与していると考えられた。また IFN- γ 添加培地で培養した MSC が、TGF- β /Smad シグナル経路を強く抑制することも重要な因子と考えられた。以上より、IFN- γ 添加培地で培養した MSC は、腎線維化の進行を抑制する治療法として有用と考える。