

論文内容要旨

Mesenchymal stem cells cultured in serum-free
medium ameliorate experimental peritoneal
fibrosis

(無血清培地で培養された間葉系幹細胞は腹膜線維化
を改善する)

Stem Cell Research & Therapy, 12(1):203, 2021

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：服部 登教授

(医系科学研究科 分子内科学)

長崎 孝平

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

背景：

世界における腎代替療法を必要とする腎不全患者数は2016年末時点で373万人（血液透析265万人、腹膜透析34万人、腎移植74万人）に上り、2030年には544万人に至ると推測されている（Thaminda L, et al. Lancet. 2015; 385: 1975-1982）。腹膜透析（PD）は腹腔内に透析液を貯留することにより24時間連続して行える緩徐な透析方法である。血液透析と比較して体循環への影響が少なく残腎機能の維持が可能とされ、通院回数も月に1、2回で済むなどメリットがある。一方で継続するにつれて腹膜の劣化が生じることや、被嚢性腹膜硬化症といった重篤な腹膜の障害を引き起こすことにより、腹膜透析の継続が困難となる場合がある。さらにこれらに対して有効な治療法が乏しいことから、導入患者数に対して維持患者数は減少している。

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）。しかし、血清を含む培地で培養されたMSCは、未知のウイルスへの感染や免疫反応に曝されるリスクがある。我々はラット片側尿管結紮モデルにおいて無血清培地で培養したラット骨髄由来のMSCの投与が有血清培地で培養したMSCと比較して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）。

本研究では、腹膜線維化モデルを用いて、無血清培地で培養したヒト骨髄由来のMSC (SF-MSC) による線維化抑制効果を、10%ウシ胎児血清 (FBS)含有培地で培養したMSC (10%MSC) の線維化抑制効果と比較した。

方法：

- 1) 0.1%グルコン酸クロルヘキシジン (Chlorhexidine Gluconate : CG) をSDラットに腹腔内投与した。さらに30分後10%MSCまたはSF-MSCを腹腔内投与した。
- 2) 腹膜平衡試験を行うため、MSC注射10日後に腹膜透析液を腹腔内へ注入し、30分後にそれらを回収した。その後屠殺し血液および腹膜を採取した。
- 3) 細胞実験では、ヒト腹膜中皮細胞 (human peritoneal mesothelial cell : HPMC) にTransforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) を添加することによって誘導される線維化因子がSF-MSCより作製した馴化培地 (conditioned medium : CM) にて抑制されるか検討した。
- 5) WST-1アッセイを用いて10%MSCとSF-MSCの増殖活性を比較した。
- 6) 10%FBS含有培地、10%FBS (エクソソームフリー) 含有培地、2%FBS含有MSC専用培地、無血清培地で培養したMSCにおけるTumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) の発現を比較した。

結果：

- 1) 10%MSCの投与は、CGにより誘導された α -smooth muscle actin (α SMA)、TGF- β 1、collagen

I、collagenIIIの発現を有意に抑制し、SF-MSCの投与はさらに強く抑制した。

2) CGにより誘導されたCD3 (Tリンパ球) およびCD68 (マクロファージ) の陽性細胞数は、10%MSCの投与によって有意に減少し、SF-MSCの投与でさらに強く減少した。一方で炎症抑制系マクロファージ (M2) のマーカーであるCD163陽性細胞数は10%MSCの投与で増加し、SF-MSCの投与でさらに増加した。

3) CGを投与したラットにおいてSF-MSCは、10%MSCと比較して腹膜機能障害を有意に軽減させた。

4) HPMCにおいてTGF- β 1の添加で誘導された α SMA、リン酸化Smad2、リン酸化Smad3は10%MSCとSF-MSCより作製したCMで有意に抑制されたが、10%MSCとSF-MSCでは有意差を認めなかった。

5) SF-MSCは、10%MSCと比較して増殖能が有意に亢進していた。

6) TSG-6の発現は各種10%FBS含有培地で培養したMSCと比較してMSC専用培地で培養したMSCで増加し、SF-MSCではさらに強く増加した。

考察とまとめ：

無血清培地で培養したMSCは有血清培地で培養したMSCと比較して、CGにより誘導された腎線維化および炎症を強く抑制した。無血清培地で培養したMSCは、腹膜線維化の進行を抑制する有用な治療法と考える。