

論 文 内 容 要 旨

Adipose-derived mesenchymal stem cells cultured in serum-free medium attenuate acute contrast-induced nephropathy by exerting anti-apoptotic effects

(造影剤腎症に対する、無血清培地で培養した間葉系幹細胞の治療効果)

Stem Cell Research & Therapy, 14(1):337, 2023.

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：中島 歩教授

(大学院医系科学研究科 幹細胞応用医科学)

副指導教員：服部 登教授

(大学院医系科学研究科 分子内科学)

門野 充記

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

背景：

造影剤腎症（Contrast induced nephropathy：CIN）は入院患者における急性腎障害の約 10% を占めており、発症予防に造影剤投与前後の輸液が推奨されている。CIN の病態には、虚血性障害、酸化ストレス、尿細管細胞のアポトーシス等が関与していることが報告されているが、発症後の有効な治療法は確立されていない。間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell：MSC）は腎障害モデルにおいて抗炎症作用や抗アポトーシス作用により、障害を軽減することが報告されている。我々は以前の研究で、無血清培地で MSC を培養すると抗炎症作用が増強することを報告したが（Yoshida, et al. Stem Cells Transl Med. 2018; 7: 893–905）、抗アポトーシス作用が増強するかについては不明である。本研究では無血清培地で培養した MSC (SF-MSC) が CIN マウスにおける尿細管細胞のアポトーシスを抑制し、腎障害を強力に改善することができるかを検討した。

方法：

- 1) 同意を取得した患者より提供を受けた手術の際に生じた余剰の脂肪組織から MSC を分離し、ウシ胎児血清含有培地あるいは無血清培地を用いて MSC を培養した。
- 2) 右腎摘出 1 週間後に左腎動脈を 30 分クランプし左腎に虚血再灌流障害を誘導した。その後造影剤注射と左腎への放射線照射を行い CIN マウスを作製した。CIN マウス作製後に PBS、あるいはウシ胎児血清含有培地で培養した MSC (control-MSC) または無血清培地で培養した MSC (SF-MSC) を 10 万 cells 投与した。
- 3) MSC 投与 24 時間後に安楽死させ、PBS 投与群 (CIN 群)、control-MSC 投与群、SF-MSC 投与群における、腎機能や尿細管の DNA 障害、アポトーシスの程度を比較した。
- 4) ヒト胎児腎細胞 293 (HEK293 cell) において、放射線照射により誘導されたアポトーシスが control-MSC および SF-MSC より作製した馴化培地 (conditioned medium：CM) により抑制されるかを検討した。
- 5) control-MSC および SF-MSC より作製した CM に含まれるアポトーシス抑制因子について、ELISA を用いて解析した。
- 6) アポトーシス抑制因子である Epidermal growth factor：EGF を、siRNA を用いてノックダウンした SF-MSC を作製し、CIN マウスに対する腎保護効果およびアポトーシス抑制効果に変化が生じるかを明らかにした。
- 7) SF-MSC より作製した CM に EGF の阻害薬を添加し、アポトーシス抑制効果に変化が生じるかを、放射線照射を行った HEK293 cell を用いて明らかにした。

結果

- 1) CIN 群で上昇を認めた血清尿素窒素 (BUN) 値、血清クレアチニン (Cr) 値および尿細管障害スコアは、SF-MSC 投与群において有意に低下した。CIN モデルにより誘導された γ H2AX の発現は MSC 投与群で抑制され、SF-MSC 投与群ではさらに強く抑制された。また CIN モデ

ルにより誘導された cleaved-caspase3 の発現は、SF-MSC 投与群において有意に抑制され、TUNEL 染色においても TUNEL 陽性細胞の有意な減少を認めた。

2) HEK293 cell を放射線照射し誘導された cleaved-caspase3 の発現は、control-MSC より作製した CM によって有意に抑制され、SF-MSC より作製した CM ではさらに強力に抑制された。一方で cleaved-PARP の発現は control-MSC より作製した CM および SF-MSC より作製した CM によって強力に抑制され、両者に差を認めなかった。

3) control-MSC より作製した CM と比較して、SF-MSC より作製した CM では EGF の発現が有意に増加していた。

4) CIN 群で上昇を認めた血清 BUN 値、血清 Cr 値および尿細管障害スコアは、negative siRNA を施行した SF-MSC (NC siRNA SF-MSC) 投与群において有意に低下したが、EGF siRNA を施行した SF-MSC (EGF siRNA SF-MSC) 投与群ではその減少効果が減弱した。

5) CIN モデルにより誘導された γ H2AX、cleaved-caspase3 の発現、および増加した TUNEL 陽性細胞数は NC siRNA SF-MSC 投与群において有意に抑制されたが、EGF siRNA SF-MSC 投与群ではその抑制が減弱した。

6) HEK293 cell を放射線照射し誘導された cleaved-caspase3 の発現は、SF-MSC より作製した CM により抑制されたが、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬を CM に添加することでその抑制効果が消失した。

考察とまとめ：

無血清培地で培養した MSC は CIN モデルマウスの尿細管細胞のアポトーシスを抑制し腎機能障害を改善した。その機序として、無血清培地で培養した MSC は EGF の分泌が増加することで、抗アポトーシス作用が増強したと考えた。SF-MSC を用いた細胞療法は、CIN の新たな治療戦略となる可能性がある。