

論文内容要旨

Comparison of the Therapeutic Effects of Adipose- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Renal Fibrosis

(脂肪由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞の
腎線維化抑制効果の比較)

International Journal of Molecular Sciences,
24(23), 16920, 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
(医系科学研究科 幹細胞応用医科学共同研究講座)

副指導教員：土井 俊樹教授
(広島大学病院 腎臓病地域学講座)

吉田 マリア

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

背景：

間葉系幹細胞: Mesenchymal stem cells (MSC) は傍分泌作用により、障害組織の修復に寄与していることが報告されている (Hickson LTJ, et al. Stem Cells Transl. Med. 2021; 10: 1304–1319)。MSC は脂肪組織、臍帯血、骨髄、歯髄などさまざまな組織から単離されるが、これらの中でも脂肪組織と骨髄は比較的容易に採取できる組織であるため、脂肪由来 MSC: MSC derived from adipose tissue (ADSC) と骨髄由来 MSC: MSC derived from bone marrow (BMSC) は、再生医療の領域において広く用いられている。腎障害に対する MSC を用いた細胞療法においても、ADSC と BMSC の有効性について報告されているが (Zhao L, et al. Stem Cell Res Ther. 2019; 10: 385)、どちらの MSC において腎線維化抑制効果が強いかは明確ではない。そこで我々は、虚血再灌流障害: Ischemia-reperfusion injury (IRI) モデルを用いて、牛胎児血清: Fetal bovine serum (FBS) 含有培地で培養した ADSC と BMSC の線維化抑制効果について比較した。さらに、我々は過去に無血清培地で培養した MSC は、血清含有培地で培養した MSC と比較して、Tumor necrosis factor- α -induced protein 6 (TSG-6) の発現が増加し、腎線維化抑制効果が増強することを報告している (Yoshida K, et al. Stem Cells Transl. Med. 2018; 7: 893–905)。よって、血清含有培地に加えて無血清培地で培養した MSC に関しても、線維化抑制効果の比較を行った。

方法：

- 1) 6週齢のSDラットの大腿骨および脛骨の骨髄を採取した後、FBS含有培地を用いてMSCを樹立し、Passage 2で凍結保存した。再播種時にFBS含有培地を用いてPassage 4まで培養したものをBMSC、無血清培地を用いて培養したものをSF-BMSCと定義した。また、同ラットの肋骨下から脂肪組織を採取しMSCを樹立し、BMSCと同様に血清含有培地を用いてPassage 4まで培養したものをADSC、無血清培地を用いて培養したものをSF-ADSCと定義した。
- 2) 左腎動脈を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PBS、ADSC、BMSCもしくはSF-ADSC、SF-BMSCを25万cells投与した。投与から21日後に安楽死させ、腎組織における線維化と尿細管障害の程度を評価した。
- 3) MSC投与による肺血栓塞栓症のリスクを評価するため、C57/BL6マウスに尾静脈よりPBS、ADSC、BMSCもしくはSF-ADSC、SF-BMSCを10万~40万cellsを投与し、24時間後の生存率を調べた。さらに死亡直後、もしくは投与から24時間後に安楽死させたマウスから肺を摘出し、血栓形成の有無を評価した。
- 4) ADSCとBMSCおよびSF-ADSCとSF-BMSCの群間で、Tissue factor (TF)、Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、PGE2合成酵素: Prostaglandin E synthase (PTGES)、TSG-6、Vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現について比較した。

結果：

- 1) ADSCは、IRIにより誘導された α -smooth muscle actin (α -SMA)、Transforming growth

factor (TGF)- β 1、collagen I、collagen III の発現、尿細管障害スコア、間質の線維化領域を有意に抑制し、これらの抑制の程度は BMSC よりも強力であった。

2) ADSC を 10 万 cells 投与したマウスは 40%が死亡し、摘出した肺を観察すると多数の血栓形成を認めた。一方で BMSC を 10 万 cells 投与したマウスにおいては、全例で注射後 24 時間の生存を認め、肺に血栓形成を認めなかった。

3) TF、TSG-6、PTGES は BMSC よりも ADSC において高発現しており、一方で VEGF は ADSC よりも BMSC において高発現していた。

4) SF-ADSC と SF-BMSC は、IRI により誘導された α -SMA、TGF- β 1、collagen I、collagen III の発現、尿細管障害スコア、間質の線維化領域を有意に抑制し、両者に差を認めなかった。

5) SF-ADSC を 10 万 cells もしくは 20 万 cells 投与したマウスは、全例注射後 24 時間生存したが、40 万 cells 投与すると 40%が死亡し、摘出した肺には粗大な血栓形成を多数認めた。一方で SF-BMSC を 40 万 cells 投与したマウスは、全例注射後 24 時間生存し、肺には極少量のみ血栓形成を認めた。

6) TF、TSG-6、PTGES は SF-BMSC よりも SF-ADSC において高発現しており、一方で VEGF は SF-ADSC よりも SF-BMSC において高発現していた。

まとめ：

ADSC は BMSC と比較して、IRI により誘導された腎線維化を強力に抑制したが、SF-ADSC と SF-BMSC は同等に腎線維化を抑制した。よって血清含有培地で培養した MSC を炎症や線維化を伴う疾患に対して用いる場合には、ADSC は BMSC よりもより効果的であると考えた。一方で、無血清培地で培養した MSC を用いる場合には、ADSC と BMSC は同等の治療効果を示すことが期待された。さらに、ADSC を使用する際には、血栓形成のリスクに注意する必要性が示された。今回の知見から、治療の際に ADSC と BMSC のどちらを選択するかは、対象疾患と MSC の培養方法に基づいて決定する必要があると考える。