

# 論文内容要旨

Mesenchymal stem cells pretreated with  
interferon-gamma attenuate renal fibrosis by  
enhancing regulatory T cell induction

(インターフェロン $\gamma$ 前処置を行った間葉系幹細胞は  
制御性 T 細胞の誘導を介して  
腎線維化を抑制する)

Scientific Reports, 14(1): 10251, 2024.

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)

副指導教員：服部 登教授

(医系科学研究科 分子内科学)

倉脇 壮

(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。MSC は損傷部位からの interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) をはじめとする炎症性サイトカインなどを感知して、抗炎症作用を発揮することが知られている。IFN- $\gamma$  添加培地で培養した MSC は、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の分泌が増強し、CD4 陽性 T 細胞を制御性 T 細胞 (Treg 細胞) に誘導することが報告されている。しかし、IFN- $\gamma$  添加培地で培養した MSC によって誘導された Treg 細胞が腎線維化の進行を抑制するかについては解明されていない。そこで我々は、IFN- $\gamma$  添加培地で培養した MSC を siRNA を用いて IDO をノックダウンして、腎虚血再灌流：ischemia reperfusion injury (IRI) モデルに投与した際の治療効果について検討した。

方法：

- 1) ヒト骨髄 MSC をウシ胎児血清 (FBS) 含有培地を用いて培養を行い、dish の 70% 程度の密度にまで発育した後、IFN- $\gamma$  200 ng/mL を培地に添加した。48 時間後に細胞を回収し in vivo および in vitro の解析に使用した。
- 2) 右腎摘出 1 週間後に、左腎動脈を血管用クリップを用いて 45 分間クランプし、その後再灌流させた IRI モデルラットを作製した。再灌流後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 MSC (control MSC) または IFN- $\gamma$  添加 FBS 含有培地で培養した MSC (IFN- $\gamma$  MSC) を 50 万 cells、あるいは PBS を投与した。
- 3) モデル作製後 day7、day21 で屠殺し、各群における腎組織の炎症マーカーおよび線維化を比較した。
- 4) control MSC、IFN- $\gamma$  MSC における IDO の mRNA および蛋白質の発現を比較した。さらに control MSC および IFN- $\gamma$  MSC より馴化培地：conditioned medium (CM) を作製し、IDO の発現を酵素結合免疫吸着測定法を用いて測定した。
- 5) ヒト末梢血単核細胞からナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞を分離し、control MSC より作製した CM (control MSC-CM) または IFN- $\gamma$  MSC より作製した CM (IFN- $\gamma$  MSC-CM) を用いて培養した。さらに Dynabeads ヒト T 細胞アクティベーター CD3/CD28 を加え、5 日後に細胞を回収した。Control MSC-CM で培養した群と IFN- $\gamma$  MSC-CM で培養した群において、Treg 細胞マーカーの発現を比較した。
- 6) IDO を siRNA で抑制した IFN- $\gamma$  MSC を IRI モデルへ投与し、炎症抑制効果および線維化抑制効果に変化が生じるかを明らかにした。

結果：

- 1) control MSC の投与は障害組織中の FOXP3 (Treg 細胞マーカー) の陽性細胞数を増加させた。この増加は IFN- $\gamma$  MSC の投与でより顕著であった。また control MSC の投与は IRI により腎組織に誘導された CD3 (T リンパ球マーカー) および CD68 (マクロファージマーカー) の

陽性細胞数を有意に減少させ、IFN- $\gamma$  MSC の投与でさらに強く減少させた。また組織修復および炎症抑制に重要な役割を果たす vascular endothelial growth factor (VEGF) の組織中の発現を調べたところ、control MSC の投与では有意な上昇は認めなかったが、IFN- $\gamma$  MSC の投与では PBS 投与群と比較して発現レベルが有意に上昇していた。

2) Control MSC は、IRI により誘導された  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)、transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)、collagen I、collagen III の発現を有意に抑制し、IFN- $\gamma$  MSC はさらに強く抑制した。

3) IFN- $\gamma$  MSC における IDO の mRNA および蛋白質の発現は control MSC と比較して有意に上昇していた。また、IFN- $\gamma$  MSC-CM 中の IDO の発現も control MSC-CM と比較して有意に上昇していた。

5) IFN- $\gamma$  MSC-CM を用いて培養したナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞は、control MSC-CM で培養したナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞と比較して FOXP3 の発現が有意に増加していた。

6) Negative control siRNA を施行した IFN- $\gamma$  MSC の投与は、FOXP3 陽性細胞数を有意に増加させた。しかし IDO siRNA を施行した IFN- $\gamma$  MSC の投与では、その増強効果が消失した。また negative control siRNA を施行した IFN- $\gamma$  MSC の投与は、IRI により腎組織に誘導された CD3 および CD68 の陽性細胞数を有意に減少させたが、IDO siRNA を施行した IFN- $\gamma$  MSC の投与では、その抑制効果が消失した。さらに IRI により誘導された  $\alpha$ SMA、TGF- $\beta$ 1、collagen I は、negative control siRNA を施行した IFN- $\gamma$  MSC の投与により有意に抑制されたが、IDO siRNA を施行した IFN- $\gamma$  MSC の投与では、その抑制効果が減弱した。

まとめ：

IFN- $\gamma$  添加培地で培養した MSC は、IDO の分泌が促進しており、IRI モデルの腎組織への Treg 細胞の誘導が増強していることを明らかにした。さらに siRNA を用いて IDO をノックダウンした MSC を投与することで、この Treg 細胞の誘導が腎組織における炎症および線維化の抑制に関与していることを明らかにした。