

無血清培地で培養した間葉系幹細胞は 腹膜線維化を改善する

長崎孝平*1 中島 歩*2 石内直樹*1 正木崇生*1

*1 広島大学病院腎臓内科 *2 広島大学大学院医系科学研究科幹細胞応用医科学

key words : 腹膜透析, 腹膜線維化, 間葉系幹細胞, 無血清培地

要 旨

長期の腹膜透析は腹膜への有害な要因から腹膜線維化をきたし、その結果、腹膜透過性の亢進、限外濾過の不良が生じ透析困難となる。しかし、これらに対する確立された治療法はない。本研究では、グルコン酸クロルヘキシジン (chlorhexidine gluconate; CG) で誘発した腹膜硬化症モデルラットを用いて、無血清培地で培養したヒト骨髄由来の間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells cultured in serum-free medium; SF-MSC) による線維化抑制効果を 10% ウシ胎児血清含有培地で培養した MSC (10% MSC) と比較した。

CG の投与により細胞数の増加、腹膜肥厚を認めたが、10% MSC の投与はそれらを抑制し、SF-MSC の投与はさらに強く抑制した。また筋線維芽細胞の発現、細胞外基質蛋白の発現、炎症細胞の浸潤においても SF-MSC の投与は 10% MSC の投与と比較して有意に抑制した。さらに炎症抑制型マクロファージ (M2) のマーカーである CD163 陽性細胞の比率は 10% MSC の投与で増加し、SF-MSC の投与でさらに増加した。また、MSC の細胞培養系において、炎症細胞浸潤を早期に抑制する tumor necrosis factor- α -induced protein 6 (TSG-6) の発現を検討した。10% MSC と比較して SF-MSC では TSG-6 の発現が有意に増加していた。

本研究では、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、腹膜硬化症モデルにおける線維化および炎症を強く抑制した。その機序

として、MSC によるマクロファージ表現型を M2 に誘導する作用が無血清培地によって増強されることが関与していると考えられた。また、無血清培地で培養した MSC において TSG-6 の発現が増強することも重要な因子であったと思われる。以上のことから、無血清培地で培養した MSC の投与は、腹膜線維化の進行を防ぐための有用な治療法になる可能性がある。

緒 言

2016 年末時点で、世界における腎代替療法を必要とする末期腎不全患者数は約 337 万人に上り、そのうち約 1 割が腹膜透析 (peritoneal dialysis; PD) を施行されている¹⁾。本邦では 2020 年末時点で慢性透析患者が 34 万人を超え、うち PD を施行している患者は 3% 程度である。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り、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。しかし長期の PD は、腹膜への生体適合性の低い透析液や尿毒症性毒素、腹膜炎などの有害な要因から腹膜線維化、劣化をきたすことが知られている²⁾。その結果、腹膜透過性の亢進、限外濾過の不良が生じ、透析困難となる。しかし、これらに対して確立された予防、治療法がないことから、導入患者数に対して維持患者数は減少している。腹膜線維症の組織学的特徴は、腹膜中皮細胞の喪失、筋線維芽細胞への分化、コラーゲンの蓄積、腹膜中皮の肥厚、血管新生があげられる³⁾。多くの研究で transforming

growth factor (TGF) β -1 がさまざまな線維症の発症に重要な役割を果たしていることが報告されており、我々は以前の研究で間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) が TGF- β 1 シグナルを阻害し、腹膜の線維化を抑制することを報告した⁴⁾。

MSC は骨髓、臍帯血、脂肪組織等から採取され、抗炎症作用および組織修復能を有し⁵⁾、その興味深い生物学的、臨床的可能性から 30 年以上にわたって広く研究されている。MSC の臨床使用では、十分な細胞数を得るために *ex vivo* での培養が必要である。以前の多くの研究ではウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) またはヒト血清を添加した培地を用いて MSC を培養している。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⁶⁾。我々は以前の研究で、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髓由来の MSC の投与が有血清培地で培養した MSC の投与と比較して炎症細胞の浸潤を減少させることによって腎線維化を抑制することを報告した⁷⁾。

本研究では、腹膜硬化症モデルを用いて無血清培地で培養したヒト骨髓由来の MSC (SF-MSC) による線維化抑制効果を、10% 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。

1 対象・方法

1-1 MSC とヒト腹膜中皮細胞

骨髓由来ヒト MSC は理化学研究所バイオリソース研究センター (茨城) から購入し、10% の FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich) あるいは STK2 (関東化学株式会社, 東京) を用いて培養した。ヒト腹膜中皮細胞 (human peritoneal mesothelial cells; HPMC) は以前の研究⁸⁾と同様にヒトの大網から分離し、10% の FBS を添加した M199 (Life Technologies, New York City, NY, USA) を用いて培養した。大網の採取に関しては、広島大学大学院医系科学研究科の倫理審査委員会の承認を得ており (E-84)、患者は書面によるインフォームドコンセントを受けた。

1-2 動物実験

雄の 8 週齢の Sprague-Dawley ラット (日本チャー

ルス・リバー株式会社, 横浜) を使用した。2 週間の馴化後、15% エタノール 0.1% グルコン酸クロルヘキシジン (chlorhexidine gluconate; CG) 含有生理食塩液 3 mL を腹腔内注射し腹膜の線維化を誘発した。CG 注射の 30 分後に 1 mL のリン酸緩衝生理食塩液に懸濁した MSC (5.0×10^6 cells) を腹腔内注射した。CG 注射の 10 日後、腹膜平衡試験 (PET) を実施するため、ラットに 100 mL/kg の腹膜透析液 (4.25% Dianeal; Baxter HealthCare, Deerfield, IL, USA) を腹腔内注射し、30 分後に開腹、心臓穿刺を行い腹水、血液を採取した。その後、腹膜を採取し各種免疫染色を行った。

1-3 細胞実験

馴化培地 (conditioned medium; CM) を作製するため、MSC を 10% FBS 含有 DMEM と STK2 を用いて培養し、サブコンフルエントに達した際に 0.1% FBS 含有 DMEM に培地交換を行った。その後 48 時間培養し、細胞上清を回収した。HPMC は、10% FBS 含有 M199 を用いてサブコンフルエントに達するまで培養した後、0.1% DMEM (control 群)、10% MSC および SF-MSC より作製した CM と培地を交換した。12 時間後に TGF- β 1 (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) を添加し、30 分後または 24 時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロットで解析した。

1-4 water-soluble tetrazolium salts (WST)-1 assay

MSC (2.5×10^3 cells/100 μ L) を 96well プレートに播種し、10% FBS 含有 DMEM または STK2 で培養した。0, 12, 24, および 48 時間インキュベートした後、10 μ L の WST-1 試薬 (タカラバイオ, 滋賀) を各 well に添加し、4 時間インキュベートした。その後、620 nm における吸光度を測定した。

1-5 統計解析

統計分析はマン・ホイットニー U 検定とクラスカル・ウォリス検定を使用した。P < 0.05 を統計学的に有意とした。

2 結果

CG の投与により細胞数の増加と著明な腹膜の肥厚を認めたが、MSC の投与によりそれらは抑制され、

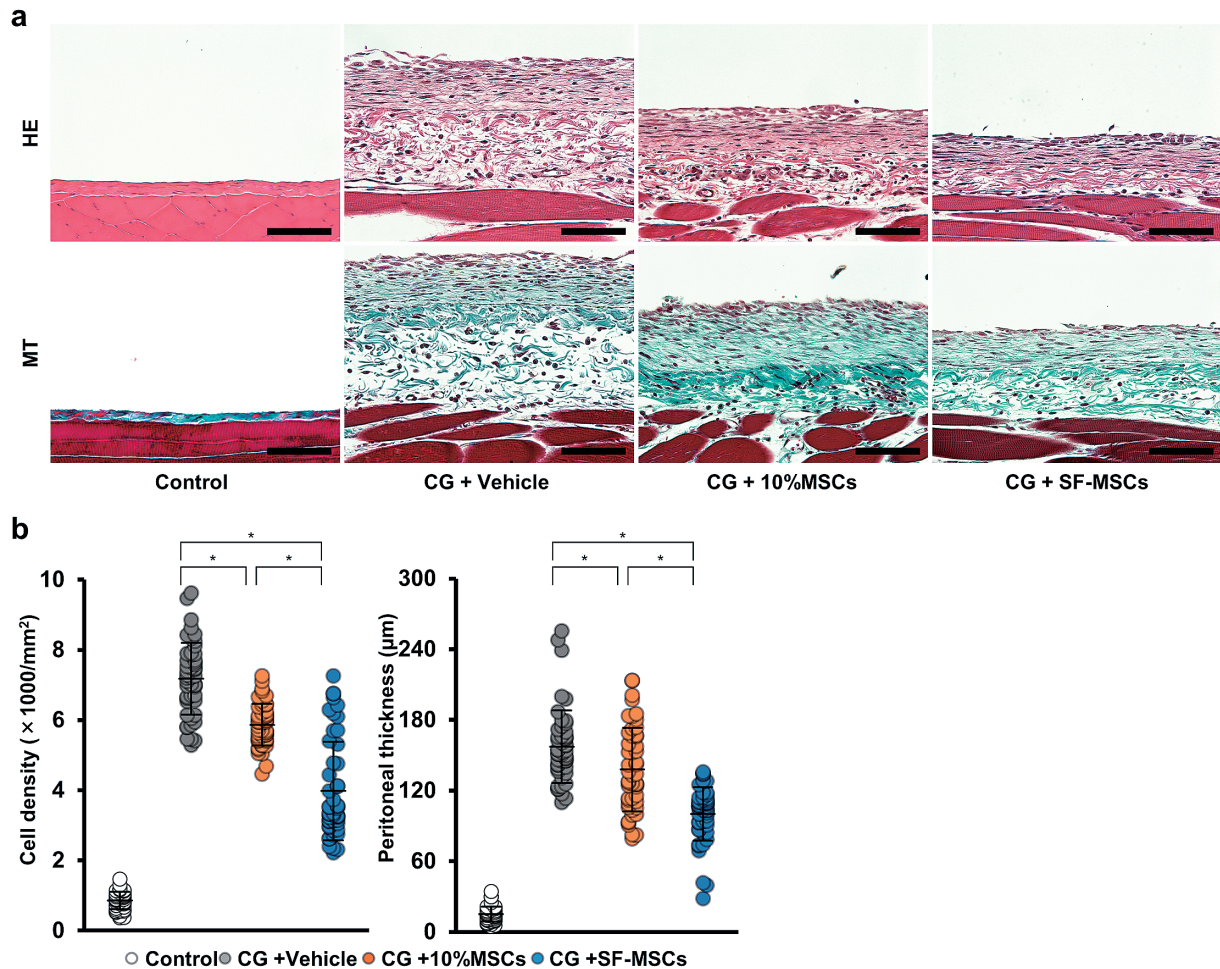


図1 間葉系幹細胞 (MSC) 注射がグルコン酸クロルヘキシジン (CG) 誘発腹膜細胞の密度と厚さに及ぼす影響

(a) ヘマトキシリン-エオジン染色およびマッソントリクローム染色, (b) 細胞密度または腹膜肥厚を示すグラフ. グループごとに5匹のラットからランダムに選択した50のフィールドを測定. Control: CG注射なしの対照ラット, CG: ビヒクルで処置されたCG注射ラット, CG+10% MSC: 10% MSCで治療されたCG注射ラット, CG+SF-MSC: SF-MSCで治療されたCG注射ラット. * $P < 0.05$ (クラスカル・ウォリス検定)

10% MSCと比較してSF-MSCでより強く抑制された(図1). α -smooth muscle actin (α -SMA), TGF- β 1, I型コラーゲン, III型コラーゲンにおいても同様にCGの投与で発現が増加し, 10% MSCの投与でそれらの発現は抑制され, SF-MSCの投与でさらに強く抑制された(図2).

CGの投与により誘導された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の投与により有意に減少し, SF-MSCの投与でさらに強く減少した. さらに炎症抑制系マクロファージ(M2)のマーカーであるCD163陽性細胞のCD68陽性細胞との比率は10% MSCの投与で増加し, SF-MSCの投与でさらに増加した(図3).

腹膜平衡試験ではCGを投与したラットはD/P尿

素窒素の増加, D/D0グルコースの減少を認め, 腹膜機能障害を呈した. しかし, これらの機能障害は10% MSCの投与により軽減され, SF-MSCの投与ではさらに強く軽減した(図4).

細胞実験では, HPMCに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MSCより作製したCMにより抑制されるか検討した. 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の発現はMSCより作製したCMにより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(図5a, b, c).

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. SF-MSCは, 10% MSCと比較して増殖能が有意に亢進していた(図5d).

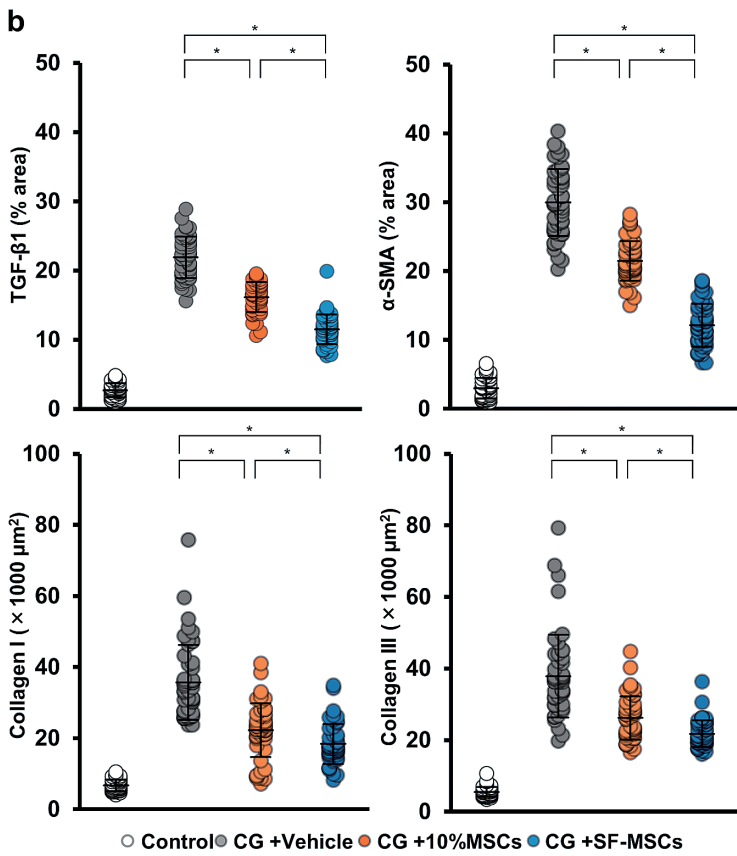
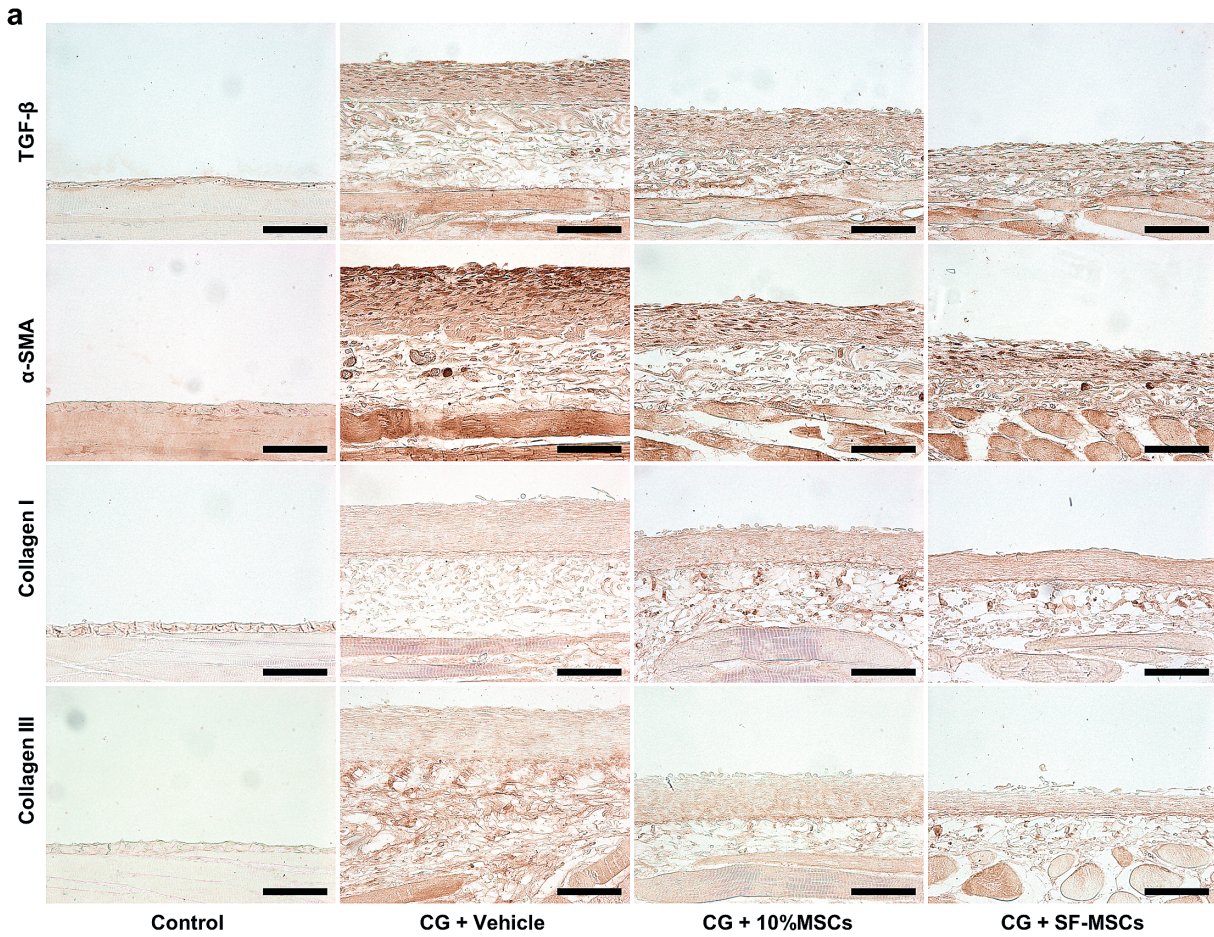


図2 CG誘発性腹膜線維症における線維症マーカーおよびコラーゲン発現に対するMSC注射の効果
 (a) TGF-β1, α-SMA, コラーゲンIおよびコラーゲンIIIの免疫組織染色。(b) TGF-β1陽性領域またはα-SMA陽性領域の割合, およびコラーゲンI陽性またはコラーゲンIII陽性の領域を示すグラフ。グループあたり5匹のラットから50フィールドを測定。transforming growth factor (TGF), smooth muscle actin (SMA), その他の略語は図1同様。*P<0.05 (クラスカル・ウォリス検定)

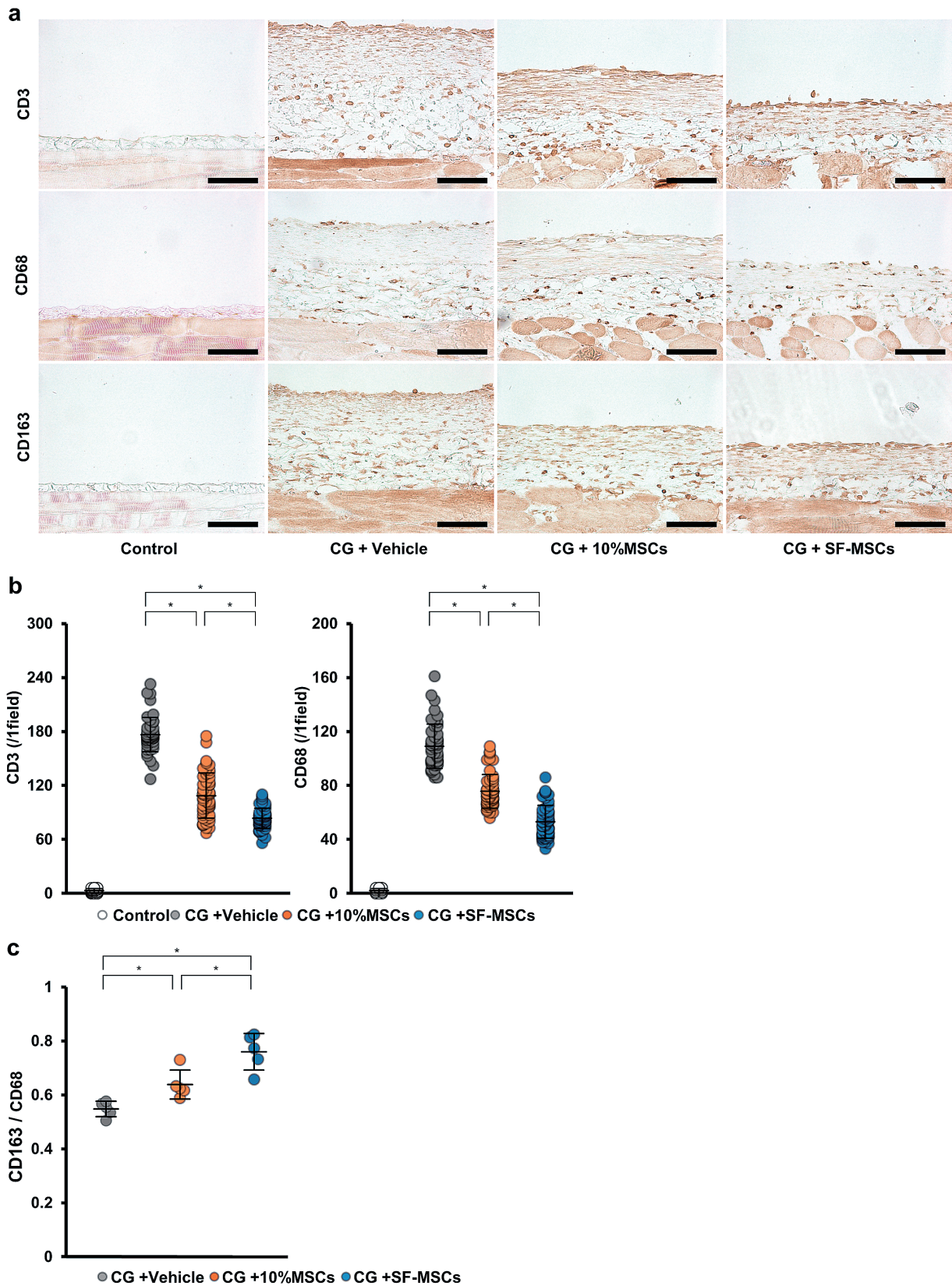


図3 CD3+Tリンパ球とマクロファージの浸潤, およびCG誘発性腹膜線維症におけるM2マクロファージ極性化に対するMSC注射の効果

(a) CD3, CD68およびCD163の免疫組織染色。(b) CD3およびCD68陽性細胞の数を示すグラフ。グループあたり5匹のラットから50フィールドを測定。(c) CD163陽性細胞とCD68陽性細胞数の比率。グループあたり5匹のラット。略語は図1同様。* $P < 0.05$ (クラスカル・ウォリス検定)

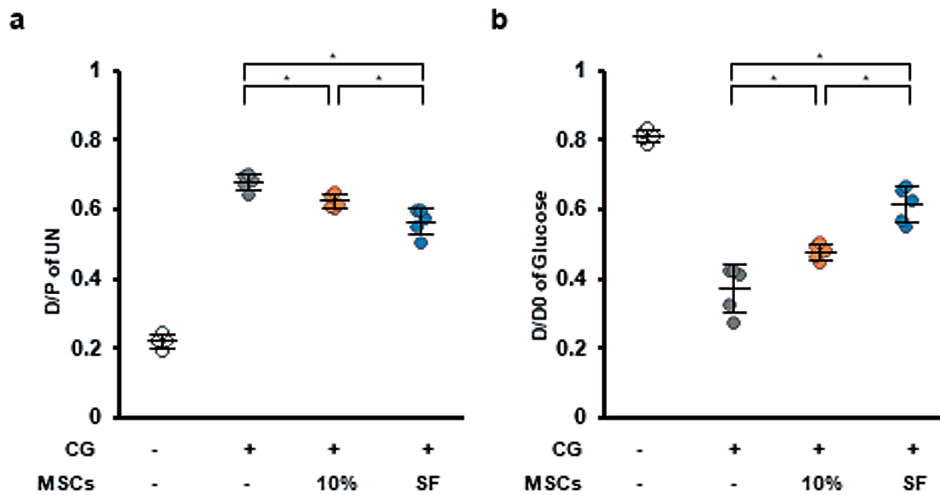


図4 CG誘発性腹膜機能障害に対するMSC注射の効果

(a) 尿素窒素の透析液対血漿濃度比によるD/P, (b) グルコースの透析液対ベースライン透析液濃度比によるD/D0. グループあたり5匹のラット, urea nitrogen (UN), その他の略語は図1同様. * $P < 0.05$ (クラスカル・ウォリス検定)

最後に各種MSCにおけるtumor necrosis factor- α -induced protein 6 (TSG-6)の発現を検討した。FBSのロット間におけるMSCへの影響を考慮し、2社のFBSおよびエクソソームを除去したFBSの3種類の10%血清含有培地と、市販されているMSC専用の2%血清含有培地、そして無血清培地STK2を用いてMSCを培養しTSG-6のmRNAの発現を評価した。10%血清含有培地と比較して、市販のMSC専用培地ではTSG-6の発現が有意に増加し、無血清培地ではさらに強く増加した(図6)。

3 考察

本研究では動物実験において、無血清培地で培養したMSCの投与は、有血清培地で培養したMSCの投与と比較して、CGによって誘発された細胞増加、腹膜肥厚、およびコラーゲンの沈着と炎症性細胞の浸潤を有意に改善した。一方で、細胞実験では無血清培地で培養したMSCの直接的な抗線維化作用は、有血清培地で培養したMSCと同等であった。

MSCの抗炎症作用の機序の一つにTSG-6の分泌が知られている⁹⁾。TSG-6はケモカイン受容体に作用し炎症性細胞の遊走を阻害し、損傷部位の炎症初期の炎症カスケードを減衰させる¹⁰⁾。今回、SF-MSCは10%MSCだけでなく、MSC培養専用の2%血清含有培地で培養したMSCと比較してもTSG-6発現を有意に増加させることを示した。また、10%MSCと比較して、SF-MSCはマクロファージのM1からM2表現型への

分化を促進した。一方で、SF-MSCの直接的な抗線維化作用は、10%MSCと同等であった。よってSF-MSCのより強力な線維化抑制効果は、SF-MSCの抗炎症作用増強によるものと考えられる。

PETでは、SF-MSCは10%MSCと比較して、CGによって誘発された腹膜機能障害を有意に抑制した。したがって、SF-MSCの投与は炎症や腹膜線維症を改善することにより、腹膜機能障害の進行を抑制すると考えられる。

臨床応用の際に、MSCの培養に無血清培地を使用すれば、血清ロットの違いをチェックする必要がなくなり、さらに血清由来成分による感染のリスクが軽減される。また増殖能が強化されることから培養期間が短縮されるなど、無血清培地の使用には多くの利点がある。しかし、PD患者は透析液を1日に数回交換し、炎症の原因となる透析液成分に慢性的にさらされているため、腹膜の炎症がいつ発生するかを予測することは困難である。よって今後の研究ではMSCの投与時期、投与期間、投与方法、および投与量を評価する必要がある。

4 結論

無血清培地で培養したMSCの投与は、有血清培地で培養したMSCの投与と比較して腹膜硬化症モデルにおける炎症、線維化を有意に抑制した。その機序として、MSCによるマクロファージ表現型を炎症抑制型M2に誘導する作用が無血清培地の使用により増強

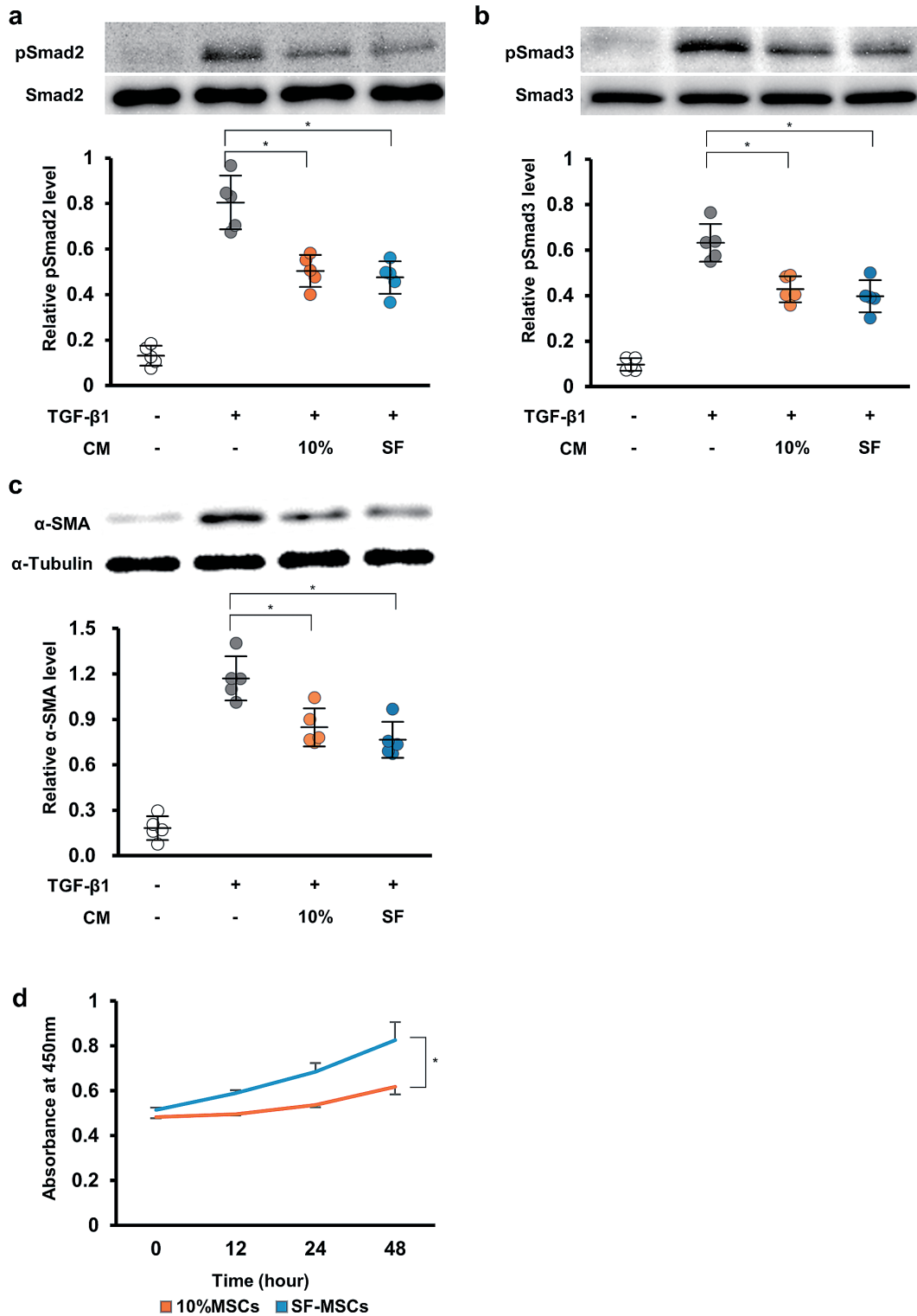


図5 TGF-β1/Smad シグナル伝達経路および増殖能に対する STK2 無血清培地または 10 % FBS 含有培地で培養された MSC の馴化培地の影響

(a) リン酸化 Smad2. (b) リン酸化 Smad3. (c) α-SMA. ヒト腹膜中皮細胞を刺激後、培地を馴化培地へ変更し全細胞溶解物を調製してウエスタンブロット分析、それぞれ Smad2, Smad3, および GAPDH 発現に対して正規化したグラフ. グループあたり 5 サンプル. * $P < 0.05$ (クラスカル・ウォリス検定). (d) MSC を有血清培地または無血清培地で、0, 12, 24, および 48 時間培養し WST-1 アッセイで評価、各時点での吸光度値を示すグラフ. Conditioned Medium (CM), その他の略語は図 1 同様. グループあたり 5 サンプル. * $P < 0.05$ (マン・ホイットニー U 検定).

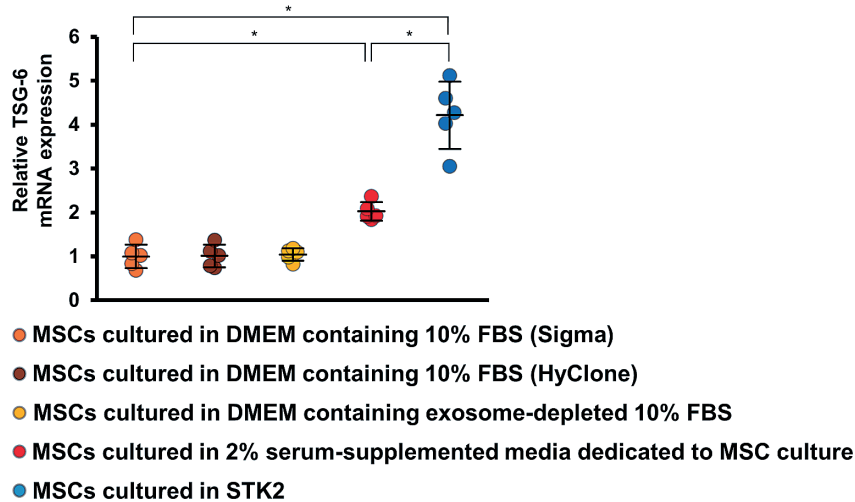


図6 MSCにおけるTSG-6発現に対する培地の影響

MSCは以下の培地で培養：10% FBS (Sigma) 含有DMEM, 10% FBS (HyClone) 含有DMEM, エクソソーム除去10% FBS (System Biosciences) DMEM, 2% 血清含有MSC専用培地 (Promo Cell), およびSTK2無血清培地. 全RNAはTRIzol試薬を使用して抽出. β -アクチンmRNAレベルで正規化したTSG-6のmRNAレベルを示すグラフ. グループあたり5サンプル. Fetal bovine serum (FBS), その他の略語は図1同様. * $P < 0.05$ (クラスカル・ウォリス検定)

されること、無血清培地で培養したMSCでは自身のTSG-6の発現が増強することが関与していると考えられた。無血清培地で培養したMSCの投与は、腹膜線維化の進行を防ぐための有用な治療法になる可能性がある。

令和元年度日本透析医会公募研究助成により得られた成果は、原著論文として『Stem Cell Research & Therapy』に投稿したため、二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総括的に記載した。なお原著論文「Mesenchymal stem cells cultured in serum-free medium ameliorate experimental peritoneal fibrosis」は2021年3月に公表された。

利益相反

正木崇生：奨学寄附金（大塚製薬（株）、小野薬品工業（株）、キッセイ薬品工業（株）、協和キリン（株）、（株）JMS、田辺三菱製薬（株）、中外製薬（株）、武田薬品工業（株）、鳥居薬品（株）、テルモ（株）、バクスター（株））

中島歩：寄附講座（株式会社ツーセル）

ただし、この研究に対して開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Liyanage T, Ninomiya T, Jha V, et al. : Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease : a systematic review. *Lancet* 2015; 385(9981) : 1975-1982. doi: 10.1016/S0140-6736(14) 61601-9.
- 2) Williams JD, Craig KJ, Topley N, et al. : Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(2) : 470-479.
- 3) Mateijsen MA, van der Wal AC, Hendriks PM, et al. : Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int* 1999; 19(6) : 517-25. Doi: 10.1177/089686089901900605.
- 4) Ueno T, Nakashima A, Doi S, et al. : Mesenchymal stem cells ameliorate experimental peritoneal fibrosis by suppressing inflammation and inhibiting TGF- β 1 signaling. *Kidney Int* 2013; 84(2) : 297-307.
- 5) Darwin JP, Joo YO : Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) : role as guardians of inflammation. *Mol Ther* 2012; 20(1) : 14-20. doi: 10.1038/mt.2011.211.
- 6) Pérez-Illarbe M, Díez-Campelo M, Aranda P, et al. : Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion* 2009; 49(9) : 1901-1910. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02226.x.
- 7) Yoshida K, Nakashima A, Doi S, et al. : Serum-free medium enhances the immunosuppressive and antifibrotic abilities of mesenchymal stem cells utilized in experimental renal fibrosis. *Stem Cells Transl Med* 2018; 7(12) : 893-905. doi: 10.1002/sctm.17-0284.
- 8) Stylianou E, Jenner LA, Davies M, et al. : Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells.

- Kidney Int 1990; 37(6) : 1563-1570. doi: 10.1038/ki.1990.150.
- 9) Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. : Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. Cell Stem Cell 2009; 5(1) : 54-63. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.003.
- 10) Dyer DP, Salanga CL, Johns SC, et al. : The anti-inflammatory protein TSG-6 regulates chemokine function by inhibiting chemokine/glycosaminoglycan interactions. J Biol Chem 2016; 291(24) : 12627-12640. Doi: 10.1074/jbc.M116.720953.