

主論文の要旨

**Rat adipose tissue-derived stem cells attenuate  
peritoneal injuries in rat zymosan-induced peritonitis  
accompanied by complement activation**

ラット脂肪由来幹細胞は、ラットの補体活性を伴う  
ザイモザン誘導腹膜炎による腹膜障害を軽減する

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：松尾 清一 教授)

金 恒秀

## 【緒言】

腹膜透析(PD)は重要な腎代替療法の一つである。全世界で20万人近い末期腎不全患者が腹膜透析を施行しているが、様々な理由で腹膜透析を離脱している。腹膜炎は腹膜透析離脱を引き起こす重大な合併症であり、被嚢性腹膜硬化症(EPS)の発症との関連もあるとされている。とりわけ、真菌性の腹膜炎は予後不良でEPSへの移行も報告されている。我々は以前に酵母の細胞壁の成分であるザイモザンを用いた真菌性腹膜炎のモデルを作製し報告した。このモデルは高度な腹膜障害を来すが、その一つの原因として補体の活性化が重要であることも併せて報告している。

一方、間葉系間質細胞(MSC)は、様々な動物疾患モデルにおける組織障害の修復をすることで注目されている。脂肪由来間葉系間質細胞(ASCs)は骨髄細胞よりも採取が容易で侵襲が少ないという利点があり、免疫調整能を有することも報告されている。

この研究では、ザイモザンによるラット真菌性腹膜炎モデルに対してASCsを投与し、その効果を補体の活性制御に焦点をあてて解析した。

## 【対象及び方法】

### (1)ラット脂肪由来間葉系間質細胞(rASC)およびラット腹膜中皮細胞(rMC)の調整

雄のSprague-Dawley (SD)ラットの鼠径部より脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理後遠心分離して2%のFBS添加培地で細胞を培養した(rASC)。SDラットの体網を採取し、トリプシン処理後に遠心分離して10%FBS添加のM199培地にて培養した(rMC)。

### (2)In vivo 実験のプロトコル(Supplementary Figure. 1)

真菌性腹膜炎は、ラットの右側腹膜を機械的に擦過の後、5mgのザイモザンを5日間連続投与して作製した。rASCは $6 \times 10^6$ 個をDay0からDay4に腹膜透析液で希釈して腹腔内へ連日投与した。Day5にラットを安楽死させ組織採取を行い、rASC投与群(ASC(+))と非投与群(ASC(-))で比較検討した。

### (3)腹膜の組織学的評価(Figure. 1, 2, 3, 4)

右側の壁側腹膜から、5mmx20mmの4切片を採取した。採取した組織を用いて、HE染色を行い、腹膜障害の程度を評価するために腹膜の厚さを計測した。組織の免疫学的評価のために、好中球・ED-1の染色を行い1視野あたりの陽性細胞数を数えた。腹膜表層の中皮細胞の回復を評価するために、抗サイトケラチン抗体にて染色した。

補体の活性産物として、C3b・C5b-9を観察するために抗C3および抗C9抗体を用いて染色を行った。両者をスコア化するために、沈着した面積を用いて半定量化した。また、補体制御因子の分布をみるために、Crry・CD55・CD59各々のモノクローナル抗体にて染色を行った。これらも同様に半定量化した。

いずれの計測も20視野の平均値を用い、それらを比較検討した

### (4)ザイモザン誘導腹膜炎におけるrASCの追跡実験(Figure. 5)

CFSEにて染色したrASCを腹膜炎モデルに投与し、3日目にその分布を評価した。抗サイトケラチン抗体でも染色して、rMCの分布もあわせて観察した。

### (5)In VitroでのrASCとrMCの共培養とWST-1分析での評価 (Figure. 6, 7)

rASCとrMCを直接および間接的(トランズウェルを使用)に48時間共培養し、rMCの細胞数を数えた。また、WST-1分析を用いてrMCがrASCの上清にて増殖が加速されるのかどうかを評価した。さらに、rASC上清のHGF濃度を測定し、リコンビナントHGFによるrMCの増殖効果をWST-1分析にて確認した。

## 【結果】

### (1)rASC投与群で腹膜組織障害は軽減する(Figure. 1, 2)

rASC投与群(ASC(+))において腹膜肥厚・総浸潤細胞数・好中球数・ED-1陽性細胞数が非投与群(ASC(-))と比較して有意に抑制された。腹膜表層の中皮細胞の回復はrASC投与群において有意に促進された。

### (2)補体制御因子の分布および補体活性産物(C3b、C5b-9)沈着の比較(Figure. 3, 4)

rASC投与群において、Crry・CD55・CD59といった補体制御因子の腹膜表層における分布は非投与群と比較して有意に増加した。一方補体活性産物であるC3b・C5b-9の沈着はrASC投与群において有意に減少した。

### (3)投与したrASCは中皮細胞に隣接して位置する(Figure. 5)

CFSEで染色したrASC(緑)は、抗サイトケラチン抗体陽性の中皮細胞(赤)に隣接して分布していた。しかし、両者が合致することはなかった。

### (4)In vitroにおいてrASCはrMCの増殖を促進する(Figure. 6)

rMCをrASCと共培養した結果、単独での培養よりも増殖が有意に促進された。その効果が液性因子によるものか細胞間コミュニケーションによるものかを区別するためにトランズウェルを用いて間接的な共培養を施行したが、rMCの増殖効果は保たれた。さらに、rASCの上清を用いてrMCの増殖効果がWST-1分析においても確認できた。

### (5)リコンビナントHGFはrMCの増殖を促進する(Figure. 7)

rASCの上清にはHGFがELISAにて検出された。リコンビナントHGFを添加した培地にてrMCの増殖が濃度依存的に促進された。

## 【考察】

今回の実験において、rASCは補体活性を伴ったザイモザン誘導の腹膜炎における腹膜障害を改善させた。この効果の少なくとも一部はrASCによる補体活性制御と考えられる。rASC投与によって補体活性が抑制される理由として、中皮細胞層の修復に注目した。腹膜中皮細胞はCrry・CD55・CD59などの補体制御因子を豊富に持っているため、その回復は腹膜における補体活性の制御に働いた可能性がある。In vitroにおいてrASCはrMCの増殖を促進し、rASCの追跡実験ではrMCに隣接して分布していた。これらの結果は、投与したrASCが中皮細胞の修復に寄与するという考えを支持する。さらに、トランズウェルを用いた実験の結果から、rASCが放出する何らかのパラクラインが中皮細胞の修復を促進したことが示唆され、その因子としてHGFに着目した。今回の実験結果から、rASCより放出されたHGFが補体制御因子を豊富に持つrMCの修復の一助となった可能性がある。加えて、rASCそのものがCrry・CD55・CD59といった補体制御因子

を有しており、rASC自体が局所の補体活性に対して抑制的に直接働いた可能性もある。

**【結語】**

脂肪由来間葉系間質細胞投与は、補体活性制御という真菌性腹膜炎の腹膜障害に対する新たな治療戦略の一つとなり得る。