

主論文の要旨

**Mesenchymal stem cells exert renoprotection via
extracellular vesicle-mediated modulation of M2
macrophages and spleen-kidney network**

〔臓器連関・細胞外小胞の生体内動態から
MSC の作用機構を解明〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導: 丸山 彰一 教授)

島村 涌子

【緒言】

間葉系幹細胞は組織再生能のみならず免疫調整能を有しており、既存の免疫抑制薬で治療が困難な難治性疾患に対し優れた治療効果を示している。しかしその作用機序についてはまだ明らかになっていない点が多く残っている。本研究では、ラットの急速進行性糸球体腎炎モデルに対しヒト脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)を投与し、その有効性を検討し、さらにASCの体内動態に着目して治療機序の解明を行った。

【方法】

- (1) WKY ラットに急速進行性糸球体腎炎を惹起させ、ASC を経静脈的に投与した。ASC の治療効果は血清 BUN・Cr 値と組織所見で評価した。治療群とコントロール群の腎臓中の白血球分画を、flowcytometry にて網羅的に解析し比較した。
- (2) 細胞膜を蛍光標識した ASC を腎炎ラットに投与し、組織染色とで体内での ASC の分布の確認を試みた。
- (3) (2)の結果 ASC は脾臓に集積しており、脾臓での ASC の役割を示すため、脾臓を摘出する事で ASC の治療効果が減弱するかを検討した。
- (4) ASC は多くの Extra cellular vehicles (EVs) を産生することが知られている。我々は蛍光色素を使用する事で ASC 由来 EVs をトラッキングする方法を確立し、ASC 由来 EVs の体内動態を生体顕微鏡、flowcytometry を用いて評価した。
- (5) ASC が実際に EVs を放出するか、また ASC 由来の EVs が実際に治療効果に寄与しているかを検討した。
- (6) (5)の結果 ASC 由来の EVs がマクロファージに取り込まれ、抗炎症効果を呈している可能性が示唆されたため、脾臓から EVs transferred M2 マクロファージと EVs untransferred M2 マクロファージをソートし、M1 マクロファージ・M2 マクロファージのマーカ遺伝子について qPCR を行った。また EVs transferred/ untransferred M2 マクロファージに加え、未治療の腎炎ラットと非腎炎ラット(正常ラット)の脾臓由来の M2 マクロファージをコントロールとして加え、4 群で Bulk RNS-Seq を行った。

【結果】

- (1) ASC の投与で血清学的にも組織学的にも腎機能障害の進行が阻止された (Figure 1A-D)。ASC を投与したラットの腎臓において、好中球・M1 マクロファージの分画が減少し、M2 マクロファージ・制御性 T 細胞 (Treg) 分画の増加が確認された (Figure 1E-F)。
- (2) 蛍光標識した ASC を腎炎ラットに投与し、腎臓、脾臓、肺、肝臓を蛍光顕微鏡で観察したところ、脾臓において多くの蛍光色素陽性細胞を認めた (Figure 2A, B)。
- (3) 脾摘を行ったラットでは ASC の治療効果が消失し、腎臓における Treg の誘導は認めなかった (Figure 3A-D)。
- (4) ラットの腎臓で認められた蛍光色素陽性細胞について flowcytometry で評価したと

ころ、ほとんどの蛍光色素陽性細胞が ASC そのものではなく、ラットの白血球であり、M2 マクロファージであった (Figure 4A-C)。ラット白血球における蛍光色素の分布を共焦点顕微鏡で観察すると、ほとんどが細胞膜上に存在しており (Figure 4D, E)、ASC がアポトーシスを起こしマクロファージに貪食されたというよりは、ASC 由来の EVs が白血球上に移送されたことが示唆された。

- (5) 蛍光色素標識 ASC とラットマクロファージの共培養を行い Live imaging で観察を行なったところ、ASC から EVs が放出され、マクロファージに取り込まれる瞬間を捉えることができた (Figure 5A)。次に ASC、ASC 由来 EVs、EVs 陽性 M2 マクロファージをそれぞれ CD4 陽性 T 細胞と共培養を行なったところ、それぞれ Treg への誘導が認められた (Figure 5B-E)。ASC 由来 EVs を腎炎ラットに投与したところ治療効果を認めた (Figure 5F-H)。また、蛍光標識をした ASC を腎炎ラットに投与し、生体顕微鏡で脾臓を観察したところ、EVs が transferred された白血球が脾臓実質から血管中に移動する瞬間を捉えることができた (Figure 5I)。
- (6) 蛍光標識を行なった ASC を腎炎ラットに投与し、脾臓から EVs transferred macrophage、EVs untransferred macrophage をソーティングして qPCR を行なったところ、EVs transferred macrophage では EVs untransferred macrophage と比較し抗炎症性サイトカインの Il10 の遺伝子発現が上昇していたが、TGF- β 1、IL6、TNF α では特に両方で差を認めなかった (Figure 6A)。

また、EVs transferred M2 マクロファージと EVs untransferred M2 マクロファージ、ASC を投与していない腎炎ラットと正常ラットの脾臓マクロファージの 4 群について RNA-Seq を行った。先行研究に、代表的な M1 分極性の刺激 (IFN- γ)、M2 分極性の刺激 (IL-4)、プロスタグランジン (PGE) を含む 28 種類の刺激によりヒトマクロファージがどのような transcriptome の変化が起こるかを報告したものがあり、我々のマクロファージサンプルが EVs の transfer により起こった transcriptome の変化が、先行研究においてどの外的刺激によるものと近いのかを解析した。我々のデータベースにおける DEG group 1 (腎炎で発現が上昇し、ASC 投与後のマクロファージでさらに上昇、EVs 陽性マクロファージで EVs 陰性マクロファージより比較的上昇する遺伝子群) は PGE による刺激において高い発現を示す遺伝子群と近いことが分かった。一方、腎炎で発現が低下し、EVs 陽性マクロファージでさらに低下した DEG group 6 は、IFN- γ 刺激で最も高い発現を示した (Figure 6B-F)。

これらの知見を総合すると、投与された ASCs から分泌された EVs は、少なくとも部分的には PGE2 刺激と炎症経路のダウンレギュレーションを介して、M2 マクロファージを活性化、あるいは過分極させることが示唆された。

【考察】

我々は、EV を介したマクロファージおよび脾臓-腎臓免疫ネットワークの調節に焦点を当て、ASC の治療作用について研究した。急速に進行する糸球体腎炎のモデルとしてラットを選んだのは、ヒトの抗塩基膜抗体腎炎に匹敵すること、誘発された腎炎

が急速に進行すること、既存の治療法では腎予後がかなり悪いこと、免疫細胞が病態に深く関与していること、などの理由からである。我々は、ヒト ASC が顕著な治療効果を発揮することを示した。白血球のフローサイトメトリー解析から、ASC が抗炎症性の M2 マクロファージ、Treg を増加させることが分かった。Intravital imaging と flowcytometry により、生体内における ASC と EVs の動態を解明することができた。ASC 由来の EVs は主に M2 マクロファージに移行すること、ASC 由来の EVs は脾臓で PGE2 を介して M2 マクロファージの性質を増強させることが明らかになった。その後 M2 マクロファージは血流に入り、腎臓の Treg を増加させることが示唆された。この研究は、ASC、EVs、PGE2、脾臓、損傷した腎臓の相互関係に着目し、ASCs の治療効果を明らかにした。

【結論】

急速進行性糸球体腎炎に対する ASC の治療効果発現の機序として、ASC から放出される EVs がマクロファージに作用し、抗炎症性作用を発揮させる。またその反応の場として脾臓が重要である。