

主論文の要旨

**Therapeutic Potential of Stem Cells from Human
Exfoliated Deciduous Teeth in Models of
Acute Kidney Injury**

〔 急性腎障害モデルにおけるヒト乳歯歯髄由来幹細胞の治療効果 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

服部 由佳

【諸言】

近年、急性腎障害（AKI）に対する前臨床研究においては、数多くの治療法の効果が検討されており、特にその中の細胞治療の分野において、様々な組織から分離された間葉系幹細胞（MSC）による治療介入により、腎障害が改善し、腎組織の修復を促進することが報告されているが、そのメカニズムはいまだ完全には解明されていない。また我々の研究室では、歯髄由来幹細胞が多岐の疾患モデルに対して有効であることを報告してきたが、腎疾患治療への応用の可能性についてはいまだ十分検討されていない。本研究はヒト乳歯歯髄由来幹細胞（SHED）の急性腎障害モデルに対する治療効果の検討とそのメカニズムの解明を研究目的とした。

【方法】

マウス虚血再灌流モデルを作製後、SHED またはコントロールとして PBS を腎被膜下投与し治療効果の比較検討を行った。その後、血清クレアチニンと尿素窒素による腎機能評価、腎組織障害の定量的評価、SHED の細胞動態の確認、腎組織中の好中球やマクロファージなどの炎症性細胞の浸潤の程度の評価、腎組織細胞の増殖の程度の評価、腎組織中の炎症性サイトカイン（IL-1 β ）やケモカイン（MIP-2、MCP-1）の定量的評価を行った。腎機能評価と投与後の細胞動態の確認においては、従来治療効果が報告されているヒト骨髄由来幹細胞（BMMSC）においても検討を行った。

in vitro 実験系においては、SHED 上清の腎尿細管細胞または血管内皮細胞への抗炎症効果、増殖促進効果を検討するため、H₂O₂ 刺激下における上清中の MCP-1 の定量的評価と、スクラッチアッセイによる細胞増殖能の比較検討を行った。*in vitro* 実験系においてはコントロールとして DMEM を用いた。スクラッチアッセイでは、HGF 中和抗体を用い、上清中の HGF の腎尿細管細胞への効果の検討もあわせて行った。また、SHED、BMMSC、ヒト繊維芽細胞（FB）の上清中の HGF の定量的評価も行った。

【結果】

SHED 治療介入後、day1、day2 において腎機能の改善がみられ、day2 において腎組織の炎症性細胞浸潤、腎組織細胞の増殖、腎組織中の MIP-2、IL-1 β 、MCP-1 がコントロール群と比較して有意に減少していた。BMMSC においては、腎機能の改善は認められなかった。また、SHED 治療介入後 day2 において、SHED は腎被膜下に観察されたが、day7、day14 では観察できなかった。BMMSC 投与群では、day2、day7 の腎被膜下に BMMSC が観察された。両群ともに day7、day14 になると、腎被膜下に炎症性細胞の浸潤が認められ、その多くはリンパ球であることが確認された。*in vitro* 実験系における H₂O₂ 刺激実験では、SHED 上清投与群はコントロール群と比較して腎尿細管細胞からの MCP-1 の分泌を有意に減少していることが確認された。血管内皮細胞では減少は認められなかった。一方、上清中の HGF の定量的評価では、本実験条件下では BMMSC や FB からよりも SHED からより多くの HGF が分泌されていることが確認され、スクラッチアッセイにおいては、SHED 上清投与群ではコントロール群と比較

して有意に尿細管細胞の増殖が促進した。HGF 中和抗体処理群では SHED 上清投与群と比較して、有意に増殖が抑制された。

【考察】

本研究において、SHED の抗炎症効果により急性障害における腎機能改善効果が確認された。SHED は MSC の一種で、骨欠損、創傷治癒、脊髄損傷、低酸素脳症など様々な疾患モデルにおいてその治療効果が報告されている。これらの治療効果は SHED が分泌する組織再生因子群による、抗炎症効果、抗アポトーシス効果組織の保護効果、組織治癒促進効果によると考えられている。

AKI に対する MSC を用いた今までの研究において、その作用機序に関しては、投与した MSC が腎構成細胞に分化するという直接作用説と、投与した MSC が腎保護作用のある因子を分泌し、パラクライン効果によって腎機能を改善するという間接作用説が提唱されている。また MSC は、様々な種類の成長因子やサイトカイン、ケモカインを分泌すると言われている。より近年の報告では、これらに加えて microvesicles (MVs) の治療効果も報告されている。MVs は mRNA や microRNA、DNA など様々な物質を含み、他の細胞への細胞構成物の輸送や、recipient cells のフェノタイプや行動を制御する役割を果たしている。本実験における SHED と BMMSC の治療効果の違いは microRNA の違いに基づく可能性もある。

近年我々は AKI モデルに対するヒト脂肪由来幹細胞 (ASC) の腎被膜下投与により腎機能が改善し、その効果には HGF が関与することを証明した。投与した ASC は day14 まで腎被膜下に留まり、腎組織内への浸潤は観察されなかった。本研究においても腎被膜下に投与した SHED の腎組織内への浸潤は観察されなかった。これも SHED がパラクライン効果により腎機能を改善したとした理由の一つである。

また、本実験においては、SHED の抗炎症効果により治療効果が発揮されたことも示唆された。急性腎障害が起こると、腎上皮細胞から MCP-1 や MIP-2 などの炎症促進性のケモカインが分泌され、それらにより間質への好中球やマクロファージなどの炎症細胞浸潤が引き起こされ、組織障害の進展や修復に大きく関与すると言われている。障害の早期には好中球の浸潤が多く認められ、それが産生するサイトカインやケモカインにより腎組織が直接障害される。またそれらはさらにマクロファージやリンパ球の浸潤を誘導しマクロファージは IL-1 β などのサイトカインを分泌し、組織炎症を増悪持続させる。炎症性細胞により惹起されたサイトカインやケモカインの経時的発現により、腎組織は障害、再生、線維化といった急性腎障害の進展機序をたどる。本実験においては特に MCP-1、MIP-2、IL-1 β の 3 つに着目した。

本実験では、SHED 治療群の day2 において好中球やマクロファージの浸潤や、腎組織中のサイトカインやケモカインが有意に抑制された。それに加えて H₂O₂ 刺激実験では、SHED 上清処置により腎尿細管細胞からの MCP-1 の分泌が有意に抑制されることが確認された。このことから SHED の分泌した因子は抗炎症効果を持ち、パラクライン効果によって腎機能改善を改善したことが示唆された。以上のことから、腎機能

改善のメカニズムとしては、腎局所への白血球導入をはじめとする初期炎症反応を SHED が制御している可能性が示唆された。

また、スクラッチアッセイの結果より、SHED 上清処置群においては尿細管細胞の増殖が促進され、一方 HGF 中和抗体処理群では有意に増殖が抑制された。これらの結果より、SHED の分泌した HGF により尿細管細胞の増殖が促進されたことが確認された。

【結論】

SHED の治療介入により、腎機能改善効果をきたすことが確認された。そのメカニズムとしては、SHED の分泌する因子がパラクライン効果により、腎局所への白血球導入を始めとする初期炎症反応を抑制し、腎尿細管細胞の増殖を促進することによることが示唆された。SHED は急性腎障害における細胞治療の分野においても有用な細胞の供給源となる可能性が示唆された。