

201322011B

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)

卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する  
新規移植再生療法の開発

平成 23 年度～平成 25 年度

総合研究報告書

研究代表者 池田 智明

平成 26(2014) 年 3 月



厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)

卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する

新規移植再生療法の開発

平成 23 年度～平成 25 年度

総合研究報告書

研究代表者 池田 智明

平成 26(2014) 年 3 月

# 目 次

---

## I. 総合研究報告書

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する新規移植再生療法の開発」 池田 智明	1
---	---

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	9
--------------------	---

III. 研究成果の刊行物・別刷	11
------------------	----

# I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業  
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)

総合研究報告書

## 「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する 新規移植再生療法の開発に関する研究」

研究代表者 名前 池田 智明 所属 国立循環器病研究センター

研究要旨卵膜間葉系幹細胞(MSC)移植による各種難治性疾患に対する新たな治療法確立を目指し、モデル動物の確立と、作成したモデル動物に対する卵膜 MSC 移植による病態改善効果検証を行った。結果、心筋炎、腎虚血再灌流、全身性エリテマトーデス、肺高血圧、人工心肺、炎症性腸疾患・放射線腸炎モデルにおいて、卵膜 MSC による治療効果を証明し、卵膜 MSC による治療効果を証明した。これら卵膜 MSC 移植による治療効果は、少なくとも一部は、T細胞・マクロファージの抑制によるものであることを明らかにし、卵膜 MSC の特に免疫・炎症性疾患に対する細胞治療応用の可能性を証明した。

更に胎児付属物由来 MSC の早期臨床応用を目指し、セルプロセッシングセンターでの臨床試験用胎児付属物 MSC の細胞調整、更には担当分担研究者の施設倫理委員会において、同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD に対する第一相臨床試験の計画承認並びに Crohn 病に対する臨床試験計画を立ち上げた。

### 研究分担者

高原 史郎 大阪大学大学院医学系研究科  
教授  
丸井 晃 京都大学医学部附属病院探索  
医療センター 准教授  
相馬 俊裕 兵庫医科大学・血液内科  
准教授  
田口 明彦 先端医療振興財団先端医療セ  
ンター再生医療研究 部長  
大西 俊介 北海道大学大学院医学研究科  
消化器内科学分野 助教  
山原 研一 独立行政法人国立循環器病研  
究センター再生医療部 室長

cells) を用いた再生医療応用研究が行われている。我々は自己骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)移植の難治性心不全に対する基礎および臨床応用研究(臨床試験登録:UMIN00000656)を行い、その効果に関し、ヒトを含め証明してきた。しかしながら、自己骨髄 MSC は、その樹立に侵襲を伴い重病人には不適である、培養時間を要するため迅速対応が困難である、白血病など骨髄疾患では不適である、といった問題点がある。これら問題を解決すべく、最近我々は通常破棄され、侵襲性がなく、倫理的問題の少ない胎児付属物である卵膜・臍帯から MSC の樹立に成功し、その細胞移植による組織再生効果を確認している。

### A. 研究目的

近年、骨髄や脂肪組織などに存在する間葉系幹細胞 (MSC:mesenchymal stem

このように組織再生を目的とした研究が進んできた MSC 移植であるが、最近では

その免疫調節作用が注目され、骨髄移植における GVHD 予防、クローン病、敗血症などに効果のある可能性が示され、臨床応用も開始されつつある。しかしながら、上記再生医療同様、自己骨髄 MSC を中心とした研究が主体であり、卵膜・臍帯を含む他家 MSC による免疫調節作用の可能性を指摘し、その臨床応用を目指した研究は進んでいない。即ち、胎児付属物 MSC は他家移植であり、骨髄を含む自己 MSC と比較し、宿主側の免疫応答反応により免疫調節作用効果が異なる可能性が考えられる。

そこで、本研究では、新たな細胞移植ソースである胎児付属物 MSC に着目し、①免疫調節作用を利用した卵膜 MSC 移植に関し、その治療効果、他家移植による免疫応答反応、安全性評価を、心筋炎、腎虚血再灌流、全身性エリテマトーデス、肺高血圧、人工心肺、炎症性腸疾患、放射線腸炎などの各種難治性疾患モデルにおいて総合的な観点から詳細な検討を行い、各種難治性疾患に対する新規細胞移植療法開発を目指した前臨床応用研究を進めた。更に、胎児付属物 MSC の早期臨床応用を目指し、セルプロセッシングセンターでの胎児付属物 MSC の調整（分離、大量培養、凍結保存）を行い、同時に、先行する骨髄 MSC を用いた治験に習い、同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD・Crohn 病に対する第一相臨床試験を立ち上げ、各関係施設倫理委員会において研究計画承認を目指した。

## B. 研究方法

卵膜 MSC による免疫・炎症調節機能解析、並びに各分担研究者の専門分野においてその治療が問題となっている難治性疾患

のモデル動物確立と卵膜 MSC 移植による治療効果検討を行った。

①池田らは、*in vitro*実験として、卵膜 MSC による免疫・炎症調節機能解析として、Tリンパ球に着目し、Tリンパ球分化における卵膜MSCによる効果検討を行った

②高原らは、ラット腎虚血再灌流障害モデル・マウス全身性エリテマトーデスモデルを用い、卵膜MSC移植による病態改善効果ならびにその作用機序を検討した。

③丸井らは、ラット人工心肺モデルを確立し、卵膜 MSC 移植による抗炎症効果、臓器保護効果を証明した。

④大西らは、ラット炎症性腸疾患・放射線腸炎モデルを確立し、病理学的評価並びに局所における炎症性サイトカイン分泌の検討、更には卵膜 MSC 移植による治療効果を証明した。

⑤山原らは、ラット自己免疫性心筋炎モデル、肺高血圧症モデルを用い、卵膜 MSC 移植による効果検討を行った。

また、胎児付属物 MSC の早期臨床応用を目指し、特に骨髄 MSC において先行治験が行われている同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD・Crohn 病に対する治療応用を検討した。

⑥胎児付属物 MSC（卵膜：担当池田ら、臍帯：担当相馬ら）の同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD に対する臨床試験の準備を開始した。

⑦山原らは、臨床試験使用に相応しい胎児付属物 MSC 調整を目指し、その製剤化に向けた検討を行った。

（倫理面への配慮）

ヒト胎児付属物の採取は、「臨床研究に関する



る倫理指針」を遵守し、各関係施設の倫理委員会の審査により承認後、提供者本人による書面での同意を得て実施した。また、提供者に対するインフォームド・コンセントは書面で行った。

### C. 研究結果

#### ①Tリンパ球分化における卵膜MSCによる効果検討（池田ら）

市販ヒト CD4 陽性 T 細胞に Th1 誘導：抗 CD28 抗体、抗 CD3 抗体、抗 IL-4 抗体、IL-2、IL-12 を添加、Th17 誘導：抗 CD28 抗体、抗 CD3 抗体、TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-23 を添加し、同時にヒト卵膜 MSC あるいはヒト骨髄 MSC との共培養にて 5 日間培養した。浮遊している T 細胞数を計測したところ、Th1・Th17 誘導共に、卵膜・骨髄 MSC との共培養による細胞数の著明な減少を認めた。更に FACS にて IFN- $\gamma$ ・CD4 陽性 Th1 細胞、IL-17・CD4 陽性 Th17 細胞を計測したところ、Th1・Th17 誘導共に卵膜・骨髄 MSC との共培養により、顕著な Th1・Th17 分化の誘導抑制が認められた。

#### ②ラット腎虚血再灌流障害・マウス全身性エリテマトーデスモデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討（高原ら）

ラット腎虚血再灌流障害モデルは、Lewis ラットの右腎を摘出後、左腎動脈を 60 分間結紮することで作成した。再灌流時に卵膜 MSC ( $5 \times 10^5$  細胞) を経静脈的に投与した。再灌流後の評価から、卵膜 MSC 移植により、血中 BUN・クレアチニンの改善、病理学的所見における T 細胞・マクロファージ浸潤の改善、腎組織における MCP-1 や IL-6 の発現減少、を認めた。更に卵膜 MSC 移植による治療効果に IL-10 増加が関与してい

ることを、同モデルにおける中和抗体を用いた検討により確認した。これらの事から、卵膜 MSC 移植が腎虚血再灌流モデルにおいて、治療効果を発揮することが明らかとなった。

マウス全身性エリテマトーデスモデルは、13 週齢雄 BALB/c マウスに対してプリスタン (pristane; 2,6,10,14-tetramethylpentadecane) を 500 $\mu$ l 腹腔内投与することにより SLE モデルを作成した。同時にヒト羊膜 MSC ( $1 \times 10^5$  細胞/10g 体重) を経静脈的に投与し、以後隔週で投与した。プリスタンにより誘導される蛋白尿は、羊膜 MSC 移植により有意に改善した。組織学的検討では、羊膜 MSC 移植により、糸球体における IgG 沈着の減少、間質におけるマクロファージ浸潤の抑制、腎組織における MCP-1 や IL-4 の発現減少、を認めた。これらの事から、卵膜 MSC 移植が全身性エリテマトーデスモデルにおいて、治療効果を発揮することが明らかとなった。

#### ③ラット人工心肺モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討（丸井ら）

ラット人工心肺モデルを、ラット用の人工心肺回路を独自考案し、作成した。人工心肺により著明に増加した血中および肺組織中の TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  は、卵膜 MSC の移植により顕著に減少し、組織学的検討においてもその肺障害が移植により抑制されていた。更に、卵膜 MSC 移植による肺障害抑制メカニズムを検討したところ、TGF- $\beta$ 、KGF 発現増加が関与していることが示唆された。

#### ④ラット炎症性腸疾患・放射線腸炎における卵膜 MSC 移植による治療効果検討（大西ら）

ラット炎症性腸疾患モデルは 8%デキストラン硫酸(DSS)を 5 日間連日経口投与し作成した。投与開始 2 日目に卵膜 MSC( $1 \times 10^6$ )を経静脈的に投与し、細胞投与 4 日間の体重変化・臨床重症度検討と、4 日目の大腸の長さ、病理学的検討を行ったところ、全ての項目において、卵膜 MSC 移植による改善を認めた。卵膜 MSC 移植により、直腸における TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIF などの炎症性サイトカインの発現が有意に減少し、組織学的検討では腸管組織におけるマクロファージ浸潤の抑制を認めた。

放射線腸炎モデルは腹部に放射線を 8Gy 照射することで作成し、同時に卵膜 MSC( $5 \times 10^5$ )を経静脈的に投与した。5 日目において、体重減少や病理学的所見の改善傾向を認めた。

⑤ラット自己免疫性心筋炎モデル、肺高血圧症モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討 (山原ら)

ラット自己免疫性心筋炎モデルは、ブタ心筋ミオシンを Lewis ラットに皮下注射し、作成した。誘導後 10、14 日目に卵膜 MSC( $5 \times 10^5$ )を経静脈的に移植した群では、有意な心機能改善、心臓におけるマクロファージ浸潤抑制の他、血中における Th1/Th17 誘導が抑制された。

ラット肺高血圧症モデルは Wister ラットにモノクロタリン(60mg/kg)を皮下投与することにより作成し、同時に卵膜 MSC( $5 \times 10^5$ )を経静脈的に移植した。3 週間後における血行動態評価では、卵膜 MSC 移植により、肺動脈圧の有意な減少、病理学的評価による心不全の改善および肺血管壁の肥厚改善が認められた。

⑥胎児付属物 MSC 移植 (卵膜：担当池田

ら、臍帯：担当相馬ら)を用いた同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD に対する臨床試験導入

卵膜・臍帯由来間葉系幹細胞 (MSC) を用いた細胞治療の早期臨床応用をめざし、骨髄 MSC を用いた治験が進んでいる、同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD 治療を目的とした臨床試験導入を目指した。厚生労働省研究開発振興課高度医療係との事前相談を踏まえ、第一相臨床試験プロトコルを作成し、今後早期の先進医療 B 導入を目指している。現在、第一相試験に関しては、施設倫理委員会の承認を得ており、来年度から試験開始を行う予定である。

⑦臨床試験使用に相応しい胎児付属物 MSC の製剤化に向けた検討

胎児付属物由来 MSC の臨床応用をめざし、その細胞製剤化を目指した検討を行った。結果、倫理委員会の承認の元、胎児付属物 MSC のセルプロセッシングセンター (CPC) での大量培養とその凍結保存、品質管理法の確立を行い、更には PMDA 薬事戦略相談において、細胞製剤に必要な要件の確認を行った。

#### D. 考察

本研究事業により、各分担研究者が得意分野とする各種難治性疾患モデルを確立し、卵膜 MSC 移植による治療効果を証明することができた。

心筋炎、人工心肺、腎虚血再灌流、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患の各モデルにおいて、卵膜 MSC 移植が治療効果を発揮し、その効果は *in vitro* での結果に合致し、免疫・炎症制御によるものであった。我々は卵膜 MSC の臨床応用を想定し、他家



移植にこだわって検討を行ったが、既報の骨髄 MSC を用いた検討同様、自家・他家を問わず MSC は免疫・炎症抑制に働くことが証明された。

更に目標である卵膜・臍帯 MSC 移植の臨床応用を目指した整備を行い、その細胞製剤化に向けた検討と、造血幹細胞移植後の急性 GVHD 治療をターゲットとした第一相臨床試験プロトコール作成およびその倫理委員会承認を得た。既に、米国 Osiris 社や日本ケミカルリサーチ社は骨髄 MSC を用いた治験による同様の検討を進めているが、大量・長期培養の必要性から、骨髄 MSC 製剤は高額になる可能性が高い。我々の胎児付属物 MSC の特徴は、①大量の MSC を初代培養で得られること、②結果、比較的少ない継代数で目的細胞数 ( $>10^{10}$  細胞) を確保出来ること、を特徴とし、骨髄 MSC と比較し低コストで調整出来る。今後、将来的な治験導入を見据え、胎児付属物 MSC の細胞製剤化を考えており、それを目指した議論を PMDA と継続していく予定である。また、急性 GVHD 以外では分担研究者大西らが専門とする Crohn 病に対する治療応用を目指し、北海道大学 CPC での卵膜 MSC 調整を検討中である。

#### E. 結論

卵膜 MSC 移植による各種難治性疾患に対する新たな治療法確立を目指し、様々なモデル動物の確立に加え、作成したモデル動物に対する卵膜 MSC 移植の、免疫・炎症調整効果による病態改善を確認した。更に、卵膜・臍帯 MSC 移植の早期臨床応用を目指し、既に骨髄 MSC を用いた治験が進んでいる急性 GVHD 治療応用を検討し、その細胞

調整、第一相臨床試験の整備を行った。今後、GVHD や Crohn 病を含む各種難治性免疫関連疾患に対し、胎児付属物 MSC を用いた新規細胞治療を強力に推進していきたい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. Tsuda H, Yamahara K, Ishikane S, Otani K, Nakamura A, Sawai K, Ichimaru N, Sada M, Taguchi A, Hosoda H, Tsuji M, Kawachi H, Horio M, Isaka Y, Kangawa K, Takahara S, Ikeda T. Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010 Nov;299(5):F1004-13.
2. Ishikane S, Yamahara K, Sada M, Harada K, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Hayakawa K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Kangawa K, Ikeda T. Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Nov;49(5):753-61.
3. Nakanishi C, Nagaya N, Ohnishi S, Yamahara K, Takabatake S, Konno T, Hayashi K, Kawashiri M, Tsubokawa T, Yamagishi M. Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose

- tissue and bone marrow. *Circ J*. 2011;75(9):2260-8.
4. Ohshima M, Yamahara K, Ishikane S, Harada K, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Miyazato M, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Kodama M, Kangawa K, Ikeda T. Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Sep;53(3):420-8.
  5. Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Kanda T, Inoue T, Kasahara Y, Hirose H, Sato I, Matsuyama T, Nakagomi T, Yamahara K, Stern D, Ogawa H, Soma T. Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2012 Apr;14(4):441-50.
  6. Ishikane S, Hosoda H, Yamahara K, Akitake Y, Kyoungsook J, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Miyazato M, Kangawa K, Ikeda T. Allogeneic transplantation of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets increases neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. *Transplantation*. 2013 Oct 27;96(8):697-706.
  7. Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Yazawa K, Kaimori JY, Taguchi A, Kangawa K, Ikeda T, Takahara S, Isaka Y. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Cell Transplant*. 2013 in press.
  8. Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K, Ikeda T. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2014 Feb 14;9(2):e88319.
2. 学会発表（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）  
国内学会
1. 津田 秀年, 山原 研一, 大谷 健太郎, 斯波 真理子, 寒川 賢治, 高原 史郎, 猪阪 善隆 急性腎障害モデルにおける抗炎症性因子を介した同種他家卵膜由来間葉系幹細胞移植の腎保護作用 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (2013.11.23)
  2. 河嶋 秀和, 銭谷 勉, 大谷 健太郎, 福田 肇, 橋川 美子, 山原 研一, 犬伏 正幸, 飯田 秀博 心筋梗塞モデルラットに移植したhNIS発現細胞シートのSPECTイメージング 日本薬学会第133年会 (2013.3.29)
  3. 銭谷 勉, 大谷 健太郎, 河嶋 秀和, 福田 肇, 橋川 美子, 森口 哲朗, 越野

- 一博, 堀 祐樹, 圓見 純一郎, 井口 智史, 山本 明秀, 山原 研一, 犬伏 正幸, 飯田 秀博 レポーター遺伝子とSPECTを用いた心筋梗塞モデルラットにおける移植細胞シートの機能定量イメージング 第8回日本分子イメージング学会総会・学術集会(2013.5.30)
4. 瀧 智史、丸井 晃、船本 成輝、升本 英利、山崎 和裕、南方 謙二、池田 義、坂田 隆造 卵膜由来間葉系幹細胞の他家移植による全身炎症および肺障害に対する治療の可能性～ラット人工心肺モデルを用いた検討～第 66 回日本胸部外科学会定期学術集会(2013/10/16・19 仙台市)
  5. 瀧 智史、丸井 晃、山原 研一、船本 成輝、升本 英利、山崎 和裕、南方 謙二、池田 義、坂田 隆造 ラット人工心肺モデルを用いた他家卵膜由来間葉系幹細胞移植による全身炎症抑制効果の検討 第 12 回日本再生医療学会 (2013.03.21)
  6. 津田秀年、山原研一、他 7 名、9 番目腎虚血再灌流障害における卵膜由来間葉系幹細胞を用いた治療効果の検討 第 54 回日本腎臓学会学術総会 2011
  7. 津田秀年、山原研一、他 6 名、8 番目卵膜由来間葉系幹細胞移植による腎虚血再灌流障害に対する治療効果の検討 第 37 回日本臓器保存生物医学会学術集会 2011
  8. 津田秀年、山原研一、他 4 名、6 番目腎虚血再灌流障害に対する卵膜由来間葉系幹細胞移植による治療効果の検討 第 46 回日本移植学会学術集会 2011
- 国際学会
- 1) Onishi R, Ohnishi S, Higashi R, Watari M, Kobayashi W, Katsurada T, Takeda H, Sakamoto N. Transplantation of human fetal membrane-derived mesenchymal stem cells improves severe colitis induced by dextran sulfate sodium in rats. Digestive Disease Week 2013. Orlando. May 2013.
  - 2) Ohnishi S, Onishi R, Higashi R, Yamahara K, Watari M, Kobayashi W, Katsurada T, Takeda H, Sakamoto N. Transplantation of human amnion-derived mesenchymal stem cells improves severe colitis via attenuation of macrophage activity in rats. International Society for Stem Cell Research 2013. Boston. June 2013.
  - 3) Novel approach to reduce systemic inflammation and lung injury following prolonged cardiopulmonary bypass using allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells in rats. The 21st Annual Meeting Of The Asian Society For Cardiovascular And Thoracic Surgery (ASCVTS2013). 2013.4.4-7. Kobe, Japan.
  - 4) K. Yamahara, M. Ohshima, K. Ishikane, K. Harada, H. Tsuda, K. Otani, A. Taguchi, M. Kodama, K. Kangawa, T. Ikeda. Systemic administration of allogeneic fetal



- membrane-derived mesenchymal stem cells suppressed Th1 and Th17 T-cell immunity in experimental autoimmune myocarditis. European Society of Cardiology Congress 2012. European Heart Journal ( 2012 ) 33 ( Abstract Supplement ), 431. 2012.8.27
- 5) Kenichi Yamahara, Makiko Ohshima, Ken Ishikane, Kazuhiko Harada, Hidetoshi Tsuda, Kentaro Otani, Makoto Kodama, Kenji Kangawa, and Tomoaki Ikeda. Systemic Administration of Allogenic Fetal Membrane-derived MSC Ameliorates Experimental Autoimmune Myocarditis via Suppression of Th1/Th17 Immunity. American Heart Association 2012 Scientific Sessions. Circulation. 2012;126:A18331. 2012.11.5
- 6) Tomofumi Taki, Akira Marui, Kenichi Yamahara, Masaki Funamoto, Hidetoshi Masumoto, Kazuhiro Yamazaki, Kenji Minakata, Tadashi Ikeda, Tomoaki Ikeda, Ryuzo Sakata. Novel Approach to Prevent Systemic Inflammation Following Prolonged Cardiopulmonary Bypass Using Allogeneic Administration of Fetal Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cells in Rats. American Heart Association 2012 Scientific Sessions. Circulation. 2012;126:A15292. 2012.11.5
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
「羊膜間葉系細胞の高純度簡便分離培養法、治療剤および至適凍結保存法」特願 2013-170008号
2. 実用新案登録  
なし
- 3.その他  
なし

## Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsuda H, Yamahara K, Ishikane S, Otani K, Nakamura A, Sawai K, Ichimaru N, Sada M, Taguchi A, Hosoda H, Tsuji M, Kawachi H, Horio M, Isaka Y, Kangawa K, Takahara S, Ikeda T.	Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis.	Am J Physiol Renal Physiol.	299(5)	F1004-13	2010
Ishikane S, Yamahara K, Sada M, Harada K, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Hayakawa K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Kangawa K, Ikeda T.	Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats.	J Mol Cell Cardiol.	49(5)	753-61	2010
Nakanishi C, Nagaya N, Ohnishi S, Yamahara K, Takabatake S, Konno T, Hayashi K, Kawashiri M, Tsubokawa T, Yamagishi M.	Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow.	Circulation Journal	75	2260-2268	2011
Ohshima M, Yamahara K, Ishikane S, Harada K, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Miyazato M, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Kodama M, Kangawa K, Ikeda T.	Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis.	J Mol Cell Cardiol.	53(3)	420-428	2012



Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Kanda T, Inoue T, Kasahara Y, Hirose H, Sato I, Matsuyama T, Nakagomi T, Yamahara K, Stern D, Ogawa H, Soma T.	Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells.	Cytotherapy.	14(4)	441-450	2012
Ishikane S, Hosoda H, Yamahara K, Akitake Y, Kyoungsook J, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Miyazato M, Kangawa K, Ikeda T.	Allogeneic transplantation of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets increases neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction in rats.	Transplantation.	96(8)	697-706	2013
Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Yazawa K, Kaimori JY, Taguchi A, Kangawa K, Ikeda T, Takahara S, Isaka Y.	Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury.	Cell Transplant.			2013 in press
Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K, Ikeda T.	Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells.	PLoS One.	9(2)	e88319	2014

### Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

## Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis

Hidetoshi Tsuda,<sup>1,2,3</sup> Kenichi Yamahara,<sup>1</sup> Shin Ishikane,<sup>1</sup> Kentaro Otani,<sup>1</sup> Atsubiro Nakamura,<sup>1,5</sup> Kazutomo Sawai,<sup>6</sup> Naotsugu Ichimaru,<sup>7</sup> Masaharu Sada,<sup>1</sup> Akihiko Taguchi,<sup>1</sup> Hiroshi Hosoda,<sup>1</sup> Masahiro Tsuji,<sup>1</sup> Hiroshi Kawachi,<sup>8</sup> Masaru Horio,<sup>3</sup> Yoshitaka Isaka,<sup>2</sup> Kenji Kangawa,<sup>6</sup> Shiro Takahara,<sup>2</sup> and Tomoaki Ikeda<sup>1,4</sup>

Departments of <sup>1</sup>Regenerative Medicine and Tissue Engineering and <sup>6</sup>Biochemistry, National Cardiovascular Center Research Institute; Departments of <sup>2</sup>Advanced Technology for Transplantation, <sup>3</sup>Functional Diagnostic Science, Course of Health Science, and <sup>7</sup>Urology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita; <sup>4</sup>Department of Perinatology, National Cardiovascular Center, Osaka; <sup>5</sup>Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University, Nara; and <sup>8</sup>Department of Cell Biology, Institute of Nephrology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

Submitted 14 October 2009; accepted in final form 24 August 2010

**Tsuda H, Yamahara K, Ishikane S, Otani K, Nakamura A, Sawai K, Ichimaru N, Sada M, Taguchi A, Hosoda H, Tsuji M, Kawachi H, Horio M, Isaka Y, Kangawa K, Takahara S, Ikeda T.** Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells contribute to renal repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F1004–F1013, 2010. First published August 25, 2010; doi:10.1152/ajprenal.00587.2009.—Mesenchymal stem cells (MSC) have been reported to be an attractive therapeutic cell source for the treatment of renal diseases. Recently, we reported that transplantation of allogenic fetal membrane-derived MSC (FM-MSC), which are available noninvasively in large amounts, had a therapeutic effect on a hindlimb ischemia model (Ishikane S, Ohnishi S, Yamahara K, Sada M, Harada K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Kitamura S, Nagaya N, Ikeda T. *Stem Cells* 26: 2625–2633, 2008). Here, we investigated whether allogenic FM-MSC administration could ameliorate renal injury in experimental glomerulonephritis. Lewis rats with anti-Thy1 nephritis intravenously received FM-MSC obtained from major histocompatibility complex-mismatched ACI rats (FM-MSC group) or a PBS (PBS group). Nephritic rats exhibited an increased urinary protein excretion in the PBS group, whereas the FM-MSC group rats had a significantly lower level of increase ( $P < 0.05$  vs. PBS group). FM-MSC transplantation significantly reduced activated mesangial cell (MC) proliferation, glomerular monocyte/macrophage infiltration, mesangial matrix accumulation, as well as the glomerular expression of inflammatory or extracellular matrix-related genes including TNF- $\alpha$ , monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), type I collagen, TGF- $\beta$ , type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) ( $P < 0.05$  vs. PBS group). In vitro, FM-MSC-derived conditioned medium significantly attenuated the expression of TNF- $\alpha$  and MCP-1 in rat MC through a prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent mechanism. These data suggest that transplanted FM-MSC contributed to the healing process in injured kidney tissue by producing paracrine factors. Our results indicate that allogenic FM-MSC transplantation is a potent therapeutic strategy for the treatment of acute glomerulonephritis.

prostaglandin E<sub>2</sub>; cell therapy; anti-Thy-1 nephritis

MESENCHYMAL STEM CELLS (MSC) are multipotent stem cells present in bone marrow (BM), adipose tissue, and many other organs and have the ability to differentiate into a variety of

lineages including adipocytes, osteocytes, and chondrocytes (9, 11, 42). Previous reports described that BM-derived stem cells including MSC contributed to the repair of several compartments of the kidney, including the endothelium (47), interstitium (16), epithelium (23), and the mesangium (21). Moreover, several studies have demonstrated that transplanted BM-derived MSC (BM-MSC) contribute to improve renal function in experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1 (31, 58). These features make BM-MSC an attractive therapeutic tool for the treatment of renal diseases.

However, there are limitations in using autologous BM-MSC as a source of regenerative medicine. BM aspiration may be painful and sometimes yields low numbers of MSC on processing (61). Therefore, an alternative source of MSC that can be obtained noninvasively and in large quantities would be advantageous. Fetal membrane (FM), which is generally discarded as medical waste, has been found to be a rich, easily expandable source of MSC (18, 43). Recently, we demonstrated that transplantation of allogenic FM-derived MSC (FM-MSC) as well as autologous BM-MSC induced therapeutic angiogenesis using a rat hindlimb ischemia model (20). These results suggest that allogenic FM-MSC are a potential alternative to autologous BM-MSC as a source of regenerative therapy.

In the present study, we investigated whether systemic administration of allogenic FM-MSC could improve the course of anti-Thy1 nephritis. Anti-Thy1 nephritis is a model of mesangioproliferative glomerulonephritis characterized by mesangiolysis followed by repair via mesangial cell (MC) proliferation, mesangial matrix accumulation, and monocyte/macrophage influx (25). Because we previously reported that MSC possessed paracrine angiogenic and anti-fibrotic effects (20, 39), we also examined the contribution of the paracrine effects to ameliorate anti-Thy1 nephritis after allogenic FM-MSC transplantation.

### MATERIALS AND METHODS

**Animals.** All experimental protocols were approved by the Animal Care Committee of the National Cardiovascular Center Research Institute. Different strains of rats were used according to their major histocompatibility complex (MHC) antigen disparity: Lewis (MHC haplotype: RT-11) and ACI (MHC haplotype: RT-1a) rats (Japan SLC, Hamamatsu, Japan). Green fluorescent protein

Address for reprint requests and other correspondence: K. Yamahara, Dept. of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan (e-mail: yamahara@ri.nccvc.go.jp).



(GFP)-transgenic Lewis rats (Institute of Laboratory Animals, Kyoto University, Kyoto, Japan) were used to investigate the distribution of injected FM-MSC.

**Isolation and expansion of FM-MSC and glomerular MC.** Isolation and expansion of FM-MSC were performed as previously described (20). In brief, FM was obtained from pregnant rats on day 15 postconception. Minced FM was digested with type II collagenase solution (300 U/ml; Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) for 1 h at 37°C. After filtration and centrifugation, FM-derived cells were suspended in  $\alpha$ -MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and cultured in standard plastic dishes. The adherent MSC populations appeared by days 5–7, and these FM-MSC were used for the experiments at passage 3–6.

Glomerular MC were established as described elsewhere (29). MC obtained from Sprague-Dawley rats were cultured in standard medium (DMEM, high glucose, Invitrogen, 10% FBS, and 1% penicillin/streptomycin) and used for experiments at passages 13–15.

**Experimental model and design.** Mesangial proliferative glomerulonephritis was induced in 6-wk-old male Lewis rats (170–180 g) by intravenous injection of anti-Thy1 monoclonal antibody (mAb 1–22–3; 0.5 mg/rat) (24). Because FM-MSC reportedly express high levels of Thy1 (20), we administered FM-MSC on day 2 after anti-Thy1 antibody injection when its antibody in plasma is undetectable (Supplemental Figure and Method; supplemental material for this article is available online at the journal website). On day 2 after mAb injection, rats were randomized to two groups: 1) FM-MSC injection (FM-MSC group;  $n = 8$ ) and 2) control PBS injection alone (PBS group;  $n = 8$ ). A total of  $5 \times 10^5$  FM-MSC obtained from MHC mismatched ACI rats or PBS (200  $\mu$ l each) was injected into the tail vein of Lewis nephritic rats. Sham rats (Sham group;  $n = 8$ ) received a PBS injection instead of mAb. On days 7 and 14, rats were placed in metabolic cages for collection of urine to determine the excretion of urine protein.

**Histological examination.** Kidney tissues were fixed with 4% phosphate-buffered formalin solution (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), embedded in paraffin block, and cut into 2- $\mu$ m sections. To quantify mesangial matrix accumulation, sections were stained with periodic acid-Schiff (PAS), photographed using a digital microscope (BIOREVO BZ-9000; KEYENCE, Osaka, Japan), and evaluated by assessing 30 randomly selected glomeruli/kidney and scoring each glomerulus on a semiquantitative scale (0–4) as described previously (19).

Immunohistochemical staining was performed with mouseanti- $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) antibody (clone 1A4; Dako, Glostrup, Denmark), mouse anti-CD68 antibody (clone ED-1; Serotec, Oxford, UK), and rabbit anti-GFP antibody (Invitrogen). Negative control staining was performed by replacing the primary antibody with normal IgG. Following antigen retrieval, endoge-

nous peroxidase activity was quenched with 1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min. The first antibodies were incubated for 1 h at room temperature, followed by incubation with Envision system-horseradish peroxidase-labeled polymer (Dako) for 30 min. The sections were visualized with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Dako) and counterstained with hematoxylin.

The  $\alpha$ -SMA-positive area relative to the glomerular area was calculated as a percentage using a computer-aided manipulator (Win-Roof; Mitani, Fukui, Japan). The  $\alpha$ -SMA staining percentage of total glomerular area was determined, and the mean value of 30 randomly selected glomeruli was calculated. The number of ED-1-positive monocytes/macrophages was evaluated by counting stained cells per glomerulus in at least 30 randomly selected glomeruli. To evaluate the distribution of GFP-positive administered cells, we counted all the GFP-positive cells in one randomly selected section ( $n = 4$ ) from each organ and an overall average for all rats was calculated.

**Quantitative RT-PCR analysis.** Glomeruli were isolated from rat kidneys using a graded sieving technique (19). Total RNA was extracted from isolated glomeruli using an RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Obtained RNA was reverse-transcribed into cDNA using a Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen). PCR amplification was performed using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA).  $\beta$ -Actin transcript was used as an internal control. Primers used are listed in Table 1.

**Western blot analysis.** Western blotting was performed as previously described (36). Briefly, kidney tissues were homogenized in 0.1% Tween 20 with a protease inhibitor, loaded (30  $\mu$ g) on a 10–20% gradient gel (Bio-Rad, Hercules, CA), and blotted onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA). After blocking for 1 h, membranes were incubated with mouse anti-monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 antibody (1:1,000; BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA), then incubated with peroxidase-labeled secondary antibody (1:1,000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Positive protein bands were visualized with an ECL kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ) and measured by densitometry. A mouse monoclonal antibody against  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was used as a control ( $n = 8$  in each group).

**Assessment of paracrine effects of FM-MSC on glomerular MC.** Conditioned medium was collected from  $1 \times 10^6$  cells of FM-MSC cultured in 8 ml of standard medium (DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin) with or without the cyclooxygenase (COX) 2 inhibitor NS-398 (0.1  $\mu$ M; Wako) for 48 h, and filtered through a 0.22- $\mu$ m filtration unit (Millipore). MC were plated on six-well plates ( $2 \times 10^5$  cells/well) with standard medium for 24 h. The medium was then changed to serum-free DMEM for 24 h, followed by conditioned medium obtained from FM-MSC. After 8 h, total RNA was extracted from MC.

**ELISA.** The concentration of PGE<sub>2</sub> in the conditioned medium of FM-MSC was determined using an ELISA kit, according to the

Table 1. Primers for qRT-PCR

Gene	Forward	Reverse
Type I collagen	5'-AATGGTGCTCCTGGTATTGC-3'	5'-GGTTCACCACTGTGCCTTT-3'
TGF- $\beta$	5'-CTACTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3'	5'-ACCTTGGGCTTGGACC-3'
PAI-1	5'-ACCTCGATCTTGACCTTTG-3'	5'-GACAATGGAAGCAACATG-3'
MMP-2	5'-GATCTGCAAGCAAGACATTGCTT-3'	5'-GCCAATAAACCGATCCTTGA-3'
MMP-9	5'-TGGAACCTCACACACCGTCTTCA-3'	5'-TCACCGGTTGTGAAACT-3'
TIMP-1	5'-ATCAAGATGACTAAGATGCTCAAAGG-3'	5'-GGCCCGGATGAGAACT-3'
TNF- $\alpha$	5'-TGCCCTCAGCCTCTTCTCATT-3'	5'-CCGATTTGGGAACCTTCTCT-3'
MCP-1	5'-ATGCAGGTCTCTGTACAGCT-3'	5'-GGTGTGAAGTCTTAGGGT-3'
HGF	5'-TGCAACGGTGAAGCTACAG-3'	5'-AGCCCTTGGTCGGGATATCTT-3'
VEGF	5'-AGAAAGCCCAATGAAGTGGTG-3'	5'-ACTCCAGGGCTCATCATTTG-3'
$\beta$ -Actin	5'-GCCCTAGACTTCGAGC-3'	5'-CTTACGGATGTCAACGT-3'

TGF, transforming growth factor; PAI-1, type 1 plasminogen activator inhibitor; MMP, membrane-type matrix metalloproteinase; TIMP-1, tissue inhibitor of MMP-1; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1.

manufacturer's protocol (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). The absorbance was measured by a microplate reader (Bio-Rad) at 405 nm.

**Statistical analysis.** All data are expressed as means  $\pm$  SE. Comparisons between two parameters were analyzed by using the unpaired Student's *t*-test. Comparisons of parameters among the three groups were made by one-way ANOVA, followed by Tukey's test. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

**Reduction of proteinuria by FM-MSC transplantation.** In the anti-Thy1 nephritic model, transient renal damage with massive proteinuria developed (25). On *day 7*, the 24-h urine protein excretion rate was significantly increased in rats with anti-Thy1 nephritis ( $84.9 \pm 7.6$  mg/24 h in the PBS group) compared with control ( $10.7 \pm 0.5$  mg/24 h in the Sham group), and FM-MSC treatment significantly reduced this increase ( $60.8 \pm 8.0$  mg/24 h,  $P < 0.05$  vs. PBS group) (Fig. 1). On *day 14*, the 24-h urine protein excretion rate in these three groups fell to within the normal range. Creatinine clearance was significantly decreased in nephritic rats ( $2.14 \pm 0.06$  ml/min in the PBS group) compared with the Sham group ( $2.97 \pm 0.15$  ml/min,  $P < 0.01$ ). However, no significant difference in creatinine clearance was observed between the PBS and FM-MSC groups ( $2.14 \pm 0.09$  ml/min in the FM-MSC group).

**Inhibition of accumulation of activated MC and mesangial matrix by FM-MSC transplantation.** Glomerular expression of  $\alpha$ -SMA, a marker of activated MC, was increased after disease induction (Fig. 2, D–F). Expression of  $\alpha$ -SMA in nephritic rats increased to a peak level on *day 7* and then gradually decreased thereafter (Fig. 2M). On *days 7* and *14*,  $\alpha$ -SMA staining of the glomerular area in FM-MSC-treated rats ( $30.7 \pm 0.8$  and  $22.4 \pm 0.8\%$ , respectively) was significantly decreased compared with the PBS group ( $37.5 \pm 0.6$  and  $26.6 \pm 0.7\%$ , respectively,  $P < 0.01$  vs. FM-MSC group).

PAS staining in rats with anti-Thy1 nephritis revealed the accumulation of mesangial matrix (Fig. 2, G–I). Similar to  $\alpha$ -SMA expression, the glomerular PAS-positive area in nephritic rats reached its peak on *day 7* (PAS score;  $2.72 \pm 0.12$  in the PBS group vs.  $0.20 \pm 0.05$  in the Sham group,  $P < 0.01$ )

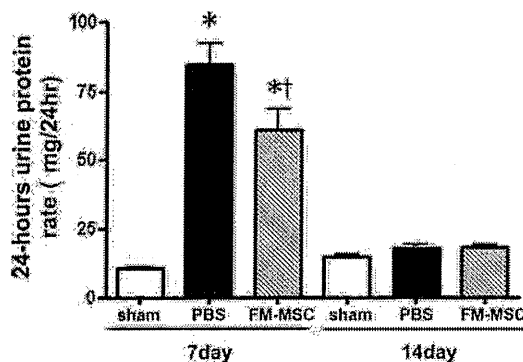


Fig. 1. Effect of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells (FM-MSC) administration on proteinuria in anti-Thy1 nephritis. The 24-h urine protein excretion rate was measured in the Sham, PBS, and FM-MSC groups. On *day 7*, the rate was significantly increased in the PBS group compared with the FM-MSC group. On *day 14*, both groups showed remission of proteinuria, and no significant differences were seen among these 3 groups. \* $P < 0.05$  vs. Sham group. † $P < 0.05$  vs. PBS group.

and remained elevated on *day 14* ( $2.97 \pm 0.08$  in the PBS group and  $0.25 \pm 0.05$  in the Sham group,  $P < 0.01$ ), which was significantly decreased by FM-MSC administration (FM-MSC group:  $2.21 \pm 0.08$  on *day 7* and  $1.54 \pm 0.06$  on *day 14*,  $P < 0.05$  vs. PBS group) (Fig. 2N). qRT-PCR analysis revealed that the reduction of mesangial matrix accumulation in FM-MSC-treated rats was associated with decreased expression of glomerular type I collagen, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) ( $P < 0.05$  vs. PBS group) (Fig. 3, A–C). However, FM-MSC treatment did not significantly affect the glomerular expression of membrane-type matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of MMP-1 (TIMP-1) in anti-Thy1 nephritic rats (Fig. 3, D–F).

**Attenuation of glomerular monocyte/macrophage influx by FM-MSC transplantation.** Immunostaining of ED-1 in rats with anti-Thy1 nephritis revealed a significant monocyte/macrophage infiltration into the glomeruli (Fig. 2, J–L). On *day 7*, the number of infiltrating monocytes/macrophages in the PBS group ( $7.5 \pm 0.2$ /glomerulus) was significantly higher than in the Sham group ( $0.4 \pm 0.1$ /glomerulus), which was significantly lower than in the FM-MSC group ( $6.0 \pm 0.2$ /glomerulus,  $P < 0.01$  vs. PBS group) (Fig. 2O). A similar result was also observed on *day 14* (PBS group  $5.1 \pm 0.2$ /glomerulus vs. FM-MSC group  $3.9 \pm 0.1$ /glomerulus,  $P < 0.01$ ).

**Reduction of renal inflammatory cytokine/chemokine expression by FM-MSC transplantation.** We examined the glomerular expression of inflammatory cytokines/chemokines in nephritic rats on *day 7*. QRT-PCR analysis showed that tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  expression in glomeruli was significantly increased by  $7.70 \pm 0.54$ -fold in the PBS group ( $P < 0.01$  vs. the Sham group), and this increase was significantly decreased in the FM-MSC group ( $5.92 \pm 0.20$ -fold,  $P < 0.05$  vs. PBS group) (Fig. 3G). Glomerular MCP-1 mRNA expression in the PBS group showed a  $5.41 \pm 0.38$ -fold increase compared with the Sham group ( $P < 0.01$ ) (Fig. 3H), but FM-MSC transplantation reduced this increase by  $>30\%$  ( $3.51 \pm 0.51$ -fold,  $P < 0.05$  vs. PBS group). Similarly, Western blot analysis showed that renal MCP-1 protein expression in the PBS group was significantly increased compared with the Sham group ( $7.65 \pm 2.49$ -fold,  $P < 0.05$ ) (Fig. 4), and FM-MSC administration showed a tendency of decreasing the expression of MCP-1 protein ( $6.44 \pm 0.96$ -fold vs. the Sham group) (Fig. 4).

**Renal expression of VEGF and HGF after FM-MSC transplantation.** Previously, we reported that cultured FM-MSC secreted large amounts of angiogenic/antiapoptotic factors including VEGF and HGF (20). Because VEGF and HGF have been reported as renoprotective factors (34, 41, 53, 55), we analyzed glomerular expression of these factors in FM-MSC-transplanted nephritic rats. qRT-PCR analysis revealed that expression of VEGF mRNA in the PBS group was significantly decreased ( $0.36 \pm 0.07$ -fold vs. Sham group,  $P < 0.05$ ), and no significant upregulation was seen after FM-MSC administration ( $0.30 \pm 0.08$ -fold vs. Sham group,  $P < 0.05$ ) (Fig. 3I). Glomerular expression of HGF mRNA was significantly increased in the PBS group ( $2.64 \pm 0.38$ -fold vs. Sham group,  $P < 0.05$ ), but no significant difference was observed between PBS and FM-MSC groups ( $2.51 \pm 0.34$ -fold vs. Sham group,  $P < 0.05$ ) (Fig. 3J).

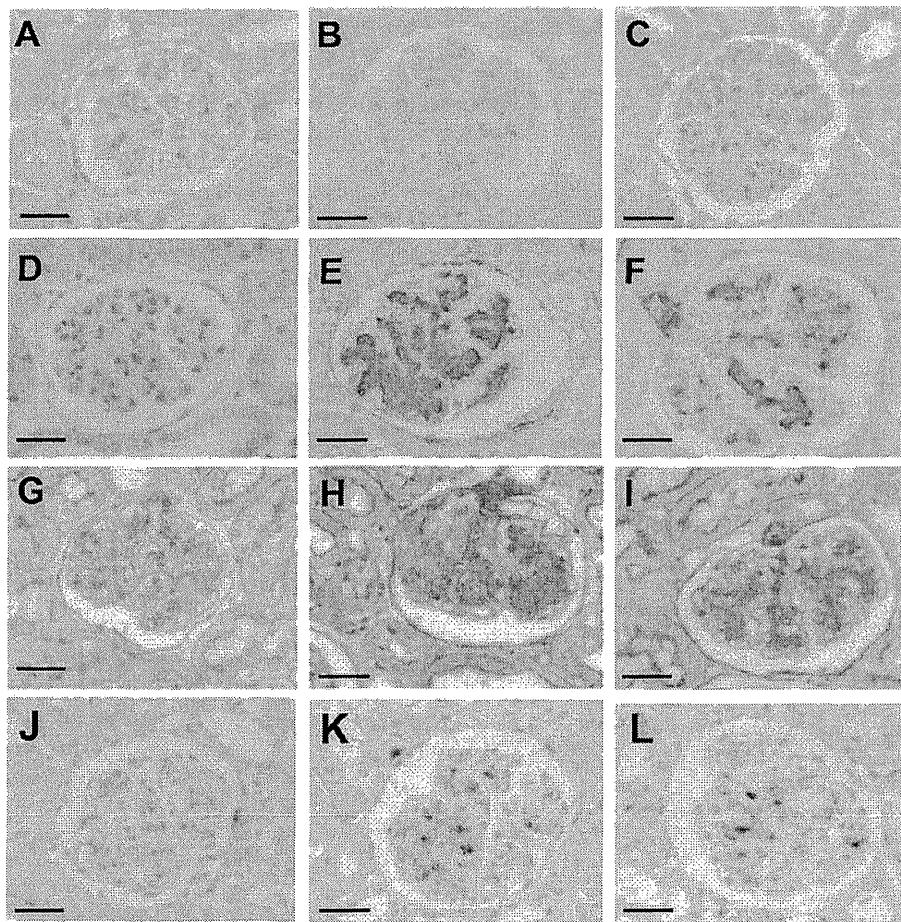


Fig. 2. Inhibition of the accumulation of activated MC, mesangial matrix, and glomerular monocyte/macrophages by FM-MSC transplantation in rats with anti-Thy1 nephritis. *A–L*: representative micrographs of negative control (*A–C*),  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA; *D–F*), periodic acid-Schiff (PAS; *G–I*) and ED-1 (*J–L*) staining in the Sham (*A, D, G, J*), PBS (*B, E, H, K*) and FM-MSC (*C, F, I, L*) groups on *day 7*. *M*: quantitative analysis revealed that the number of  $\alpha$ -SMA-positive activated MC was lower in the FM-MSC group compared with the PBS group on *days 7* and *14*. *N*: mesangial matrix accumulation was significantly reduced in the FM-MSC group compared with the PBS group on *days 7* and *14*. *O*: the number of infiltrated ED-1-positive monocytes/macrophages was significantly reduced in the FM-MSC group compared with the PBS group on *days 7* and *14*. Scale bars = 20  $\mu$ m. \* $P < 0.05$  vs. Sham. † $P < 0.05$  vs. PBS group.

