

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	吉田 健
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Serum-Free Medium Enhances the Immunosuppressive and Antifibrotic Abilities of Mesenchymal Stem Cells Utilized in Experimental Renal Fibrosis (無血清培地で培養した間葉系幹細胞は抗炎症作用と抗線維化作用が増強し腎線維化を抑制する)			
論文審査担当者			
主査	教授	安達 伸生	印
審査委員	教授	松原 昭郎	
審査委員	准教授	仲 一仁	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>間葉系幹細胞: Mesenchymal Stem Cells (MSCs) は造血能を持たない未分化な多能性を有した幹細胞であり、種々の組織（主に骨髄、脂肪組織、臍帯血など）から採取することが出来る。幹細胞の中でも癌化する可能性がかなり低いとされ、また間葉系組織以外にも分化することが出来る報告もあり、MSCs を利用した各種障害モデルへの有効性がこれまでに報告されている。障害された組織の修復に働く機序の一つとして、MSCs が持つ免疫調節能が注目されており、ラット腎線維化モデルにおいても MSCs の投与によって線維化を抑制することが報告されている。しかし、これまで用いられている MSCs は一般的にウシ血清やヒト血清を添加した培地で培養されており、血清添加によって細胞増殖は促されるが、未知のウイルスへの感染や免疫反応に曝される危険性をはらんでおり、臨床応用する際には障害となる。MSCs 用の無血清培地である STK シリーズは既知組成培地で作られており、一般のウシ血清添加培地で培養した際と比較して増殖能が高く、短期間で多量の MSCs を用意することが可能となり臨床応用にも期待できる。そこで本論文では、無血清培地で培養した MSCs の抗炎症・抗線維化作用を明らかにした上で、有血清含有培地で培養した MSCs との腎線維化に対する治療効果の比較、及び作用に関わる因子を検討した。</p> <p>まず、ラット骨髄から採取した MSCs を 10%ウシ胎児血清含有培地 (10%MSCs) と無血清培地である STK (SF-MSCs) で各々培養した。腎間質線維化モデルである一側尿管結紮 (UUO) ラットを作製し、4 日後に尾静脈から <math>5 \times 10^6</math> 個/匹で各 MSCs を投与した際の腎臓における線維化マーカー、炎症性サイトカインの発現の変化を検討した。UUO により誘導される線維化マーカーである transforming growth factor-<math>\beta</math>1 (TGF-<math>\beta</math>1) や <math>\alpha</math>-smooth muscle actin の発現、コラーゲン type1 や type3 といった細胞外基質の蓄積、及び炎症性サイトカインの発現の亢進は 10%MSCs 及び SF-MSCs の投与により抑制され、SF-MSCs 投与群で有意に強く抑制された。次に培養実験系では、ヒト MSCs (hMSCs) を有血清含有培地及び STK 培地で培養した後、馴化培地を作製した。各 hMSCs の馴化培地下で、ヒト近位尿細管細胞 (HK-2) に対し angiotensin-II (Ang-II)、TGF-<math>\beta</math>1 刺</p>			

激で発現亢進する線維化マーカー、炎症性サイトカインへの影響を検討した。HK-2 を Ang-II、TGF- $\beta$ 1 で刺激し発現亢進する線維化マーカー、炎症性サイトカインは各馴化培地下にて抑制されたが、10%hMSCs 群と SF-hMSCs 群で同等であった。続いて、SF-MSCs の持つ抗炎症作用の機序を検討するために、ヒト単球様細胞 (THP-1) から誘導した炎症促進型 (M1) マクロファージと各 hMSCs との共培養におけるマクロファージ表現型の変化を FACS にて解析した所、MSCs との共培養によって M1 から炎症抑制型 (M2) マクロファージへの分化が誘導され、SF-hMSCs 群で有意に強く誘導された。さらに、MSCs の持つパラクライン作用として無血清培地で培養することで増強する因子の有無を RNA マイクロアレイで解析した。各 hMSCs における prostaglandin E2 (PGE2)、interleukin (IL) -6、hepatocyte growth factor (HGF)、tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced protein 6 (TSG-6) の発現を解析した所、既存の報告の通り 10%hMSCs において PGE2 や HGF、IL-6 は産生されていたが、SF-hMSCs では反対に減弱していた。一方で、SF-hMSCs では抗炎症性サイトカインであり炎症細胞浸潤の動員を制御する TSG-6 の有意な発現亢進を認めた。そこで、無血清培地で培養した MSCs の抗炎症作用と TSG-6 との関連について検討するために、まず TSG-6 発現をノックダウンした SF-hMSCs と THP-1 から誘導した M1 マクロファージとの共培養におけるマクロファージ表現型の変化を調べたが、TSG-6 発現のノックダウンは M2 マクロファージへの分化誘導に影響を及ぼさなかった。そこで、培養実験として行った HK-2 への TGF- $\beta$ 1 刺激による炎症性サイトカインの発現亢進に対する、TSG-6 発現をノックダウンした SF-hMSCs から作製した馴化培地の効果を確認した。その結果、negative control siRNA を transfect した SF-hMSCs の馴化培地下で炎症性サイトカインの発現が抑制され、TSG-6 発現をノックダウンした SF-hMSCs の馴化培地下でその抑制効果が減弱していた。最後に、TSG-6 発現をノックダウンした SF-MSCs を用いて、UUO ラットへの投与における線維化マーカー、炎症性サイトカインの発現の変化以上を検討した。UUO ラットに対する SF-MSCs 投与による線維化マーカー、炎症性サイトカイン発現の抑制効果も、SF-MSCs の TSG-6 発現をノックダウンすることにより減弱した。

以上の結果から、本論文は無血清培地で培養した MSCs が有血清含有培地で培養した MSCs よりも有意に抗炎症・抗線維化作用を示すことを明らかにした。更にその機序として、無血清培地で培養することで MSCs によるマクロファージ表現型を炎症抑制型 M2 に誘導する作用が増強し、また、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。

よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	吉田 健
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目			
<p>Serum-Free Medium Enhances the Immunosuppressive and Antifibrotic Abilities of Mesenchymal Stem Cells Utilized in Experimental Renal Fibrosis</p> <p>（無血清培地で培養した間葉系幹細胞は抗炎症作用と抗線維化作用が増強し腎線維化を抑制する）</p>			
最終試験担当者			
主査	教授	安達 伸生	印
審査委員	教授	松原 昭郎	
審査委員	准教授	仲 一仁	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成31年2月7日の第78回広島大学研究科発表会（医学）及び平成31年1月31日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 間葉系幹細胞（MSCs）の至適投与量・細胞数・投与タイミング及び投与経路</li> <li>2 無血清培地で培養したMSCsが発現・分泌する因子の網羅的解析とその機序</li> <li>3 無血清培地がMSCsの障害抑制効果を増強する理由</li> <li>4 無血清MSCsによるM2マクロファージへの分化促進における長期的な影響</li> <li>5 組織障害に対して薬剤投与ではなくMSCs投与を用いる利点</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			