

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	石内 直樹
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent renal fibrosis and inflammation in ischemia-reperfusion rats (腎虚血再灌流障害に対する、低酸素下で培養した骨髄間葉系幹細胞移植の線維化抑制効果)			
論文審査担当者			
主査	教授	堤 保夫	印
審査委員	教授	渡邊 朋信	
審査委員	講師	林 哲太郎	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>間葉系幹細胞: Mesenchymal Stem Cell (MSC) は骨髄、臍帯血、脂肪組織等から単離される多能性細胞であり、多分化能と自己再生能を有する。また MSC は paracrine effect による抗炎症作用や抗線維化作用を有しており、障害された組織の修復に寄与していることが報告されている。さらにこの paracrine effect は、MSC を低酸素下で培養することで増強することが報告されている。よって本研究では、低酸素下で培養した MSC をラット腎虚血再灌流: Ischemia Reperfusion Injury (IRI) モデルへ投与すると、通常酸素下で培養した MSC と比較して、腎臓における線維化や炎症がより強く抑制されるかを検討した。</p> <p>まず、ラットの大腿骨、脛骨から MSC を採取しウシ胎児血清含有培地を用いて通常酸素下にて培養を行った。なお低酸素刺激を行う MSC に関しては、モデルラットに投与する 24 時間前より 1%の低酸素下にて培養を行った。次に腎動脈を 60 分クランプした後、再灌流させた IRI モデルのラットを作製し、左腎動脈近傍の腹部大動脈よりラット MSC を 50 万 cell 投与した。MSC 投与後 7 日および 21 日に屠殺し PBS のみ投与した群、通常酸素下で培養した MSC の投与群、低酸素下で培養した MSC の投与群において、腎組織の炎症マーカーおよび線維化を比較した。通常酸素下で培養したラット MSC は、IRI により誘導された α-Smooth Muscle Actin (αSMA)、TGF-β1、collagen I、collagen III の発現を有意に抑制し、低酸素下で培養したラット MSC はさらに強く抑制した。</p> <p>また、IRI により腎組織に誘導された CD3 (T リンパ球) および CD68 (マクロファージ) の陽性細胞数は、通常酸素下で培養したラット MSC の投与により有意に減少し、低酸素下で培養したラット MSC の投与ではさらに強く減少した。一方で通常酸素下で培養したラット MSC は、炎症抑制系 (M2) マクロファージのマーカーである CD163 陽性細胞数を増加させ、低酸素下で培養したラット MSC はその発現をより一層増加させた。MSC 治療を臨床応用する際にはヒト MSC を投与するため、低酸素下で培養したヒト MSC もラット MSC と同様に抗線維化作用が増強するかを確認した。IRI モデルにラット MSC と同様の手順でヒト MSC を投与したところ、通常酸素下で培養したヒト MSC は、IRI により誘導された αSMA、TGF-β1、collagen I、collagen III の発現を有意に抑制し、低酸素下で培養したヒト MSC はさらに強く抑制した。次に培養実験系では、ヒト MSC を通常酸素下もしくは低酸素下で培養し、馴化培地 (conditioned medium) を作製した。それぞれの</p>			

conditioned medium 下で、ヒト近位尿細管細胞 (HK-2) に対して TGF- β 1 添加で誘導される線維化因子の発現を検討した。HK-2 において TGF- β 1 の添加で誘導された α SMA、リン酸化 Smad2 (p-Smad2) は、通常酸素下で培養したヒト MSC より作製した conditioned medium では有意に抑制されなかった。

しかし低酸素下で培養したヒト MSC より作製した conditioned medium は、 α SMA、p-Smad2 の発現を有意に抑制した。また、低酸素下で培養したヒト MSC より作製した conditioned medium では、通常酸素下で培養したヒト MSC より作製した conditioned medium と比較して、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)、Hepatocyte Growth Factor (HGF)、Prostaglandin E2 (PGE2) の発現が有意に上昇していた。特に VEGF の発現の上昇が著明であったことから、VEGF が腎線維化の抑制に関与するかを検討するため、siRNA を用いて VEGF をノックダウンしたヒト MSC を作製した。さらに低酸素下で培養し VEGF siRNA を施行したヒト MSC より作製した conditioned medium 中の HGF の発現を検討したところ、低酸素下で培養し negative control siRNA を施行したヒト MSC より作製した conditioned medium と比較して、HGF の発現が減弱した。また HK-2 において TGF- β 1 の添加により誘導された α SMA は、低酸素下で培養し negative control siRNA を施行したヒト MSC より作製した conditioned medium により有意に抑制されたが、低酸素下で培養し VEGF siRNA を施行したヒト MSC より作製した conditioned medium では、その抑制が減弱した。

最後にこの VEGF をノックダウンしたヒト MSC を IRI モデルに投与した。IRI により誘導された α SMA、TGF- β 1、collagen I、collagenIII は、低酸素下で培養し negative control siRNA を施行したヒト MSC により有意に抑制されたが、低酸素下で培養し VEGF siRNA を施行したヒト MSC では、その抑制が減弱した。

以上の結果から、本論文は低酸素下で培養した MSC が、IRI により誘導された腎線維化および炎症を強く抑制することを明らかにした。更にその機序として、低酸素下で培養した MSC は VEGF の発現を増強することで、HGF の分泌を促進し TGF- β /Smad シグナル伝達を強く抑制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、本論文が石内 直樹に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。