

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	金井 亮
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Interferon- γ enhances the therapeutic effect of mesenchymal stem cells on experimental renal fibrosis (インターフェロン γ は腎線維化に対する間葉系幹細胞の治療効果を増強する)			
論文審査担当者			
主査	教授	吉栖 正生	印
審査委員	教授	一戸 辰夫	
審査委員	准教授	亭島 淳	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>間葉系幹細胞: Mesenchymal Stem Cells (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。さらに MSC は傍分泌によって作用を発揮し、障害された組織の修復に働くことが報告されている。Interferon-γ (IFN-γ) 添加培地で培養した MSC は、prostaglandin E2 (PGE2) などの液性因子の分泌を増加させ、抗炎症作用が増強することが報告されている。本実験では、急性腎障害から慢性腎臓病への移行が観察可能な一側虚血再灌流障害 (IRI) モデルおよび尿細管間質の線維化モデルである一側尿管結紮 (UUO) モデルの異なる 2 種類の腎障害モデルラットを用いて、ウシ胎児血清 (FBS) 含有培地で培養した MSC と比較して IFN-γ を添加した FBS 含有培地で培養した MSC がより強い治療効果を発揮するかを明らかにするとともに、その機序について検討した。</p> <p>まず、SD ラットの大腿骨・脛骨から MSC (rMSC) を採取し FBS 含有培地で培養した。IFN-γ 刺激群では各腎障害モデルに投与する 24 時間前より培地に IFN-γ 200ng/mL を添加した。ラットの左腎動脈を 60 分クランプした後再灌流させ IRI モデルを作製し、直ちに左腎動脈近傍の腹部大動脈より FBS 含有培地で培養した rMSC (control rMSC) または IFN-γ 添加 FBS 含有培地で培養した rMSC (IFN-γ rMSC) を 50 万 cells、あるいは PBS を投与した。投与から 7 日および 21 日後に屠殺し、障害側の腎臓における炎症マーカーおよび線維化を評価した。control rMSC の投与は、IRI が誘導する α-smooth muscle actin (α-SMA)、transforming growth factor-β1 (TGF-β1)、collagen I、collagen III の発現を有意に抑制した。更に、これらの抑制は IFN-γ rMSC の投与でより強く認められた。IRI により腎組織に誘導された CD3 (T cell マーカー) および CD68 (マクロファージマーカー) の陽性細胞数は、control rMSC の投与で有意に減少し、IFN-γ rMSC の投与でさらに強く減少した。一方、control rMSC の投与は、M2 マクロファージマーカーである CD163、CD206 陽性細胞数を増加させた。この増加は IFN-γ rMSC の投与でより顕著であった。次に、ラットの左尿管を結紮し、UUO モデルを作製した。モ</p>			

デル作製より 4 日後に尾静脈より control rMSC または IFN- γ rMSC を 300 万 cells、あるいは PBS を投与した。投与から 7 日後に屠殺し、障害側の腎臓における線維化を評価した。control rMSC の投与は UUO が誘導する α -SMA、collagen I、collagen III の発現を有意に抑制した。更に、これらの抑制は IFN- γ rMSC の投与でより強く認められた。培養実験系では、まずヒト近位尿細管細胞 (HK-2 cell) に TGF- β 1 を添加することにより誘導される線維化因子が、FBS 含有培地で培養したヒト MSC (control hMSC) または IFN- γ 添加 FBS 含有培地で培養したヒト MSC (IFN- γ hMSC) より作製した馴化培地 (conditioned-medium : CM) によって抑制されるかを評価した。TGF- β 1 刺激を行った HK-2 cell において誘導される phosphorylated Smad2、 α -SMA の発現は、control hMSC より作製した CM によって抑制され、IFN- γ hMSC より作製した CM では、さらに強い抑制を示した。次に、IFN- γ hMSC によるマクロファージの phenotypic change についてヒト単芽球様細胞 (THP-1 cell) を用いて評価した。THP-1 cell を培養後、phorbol 12-myristate 13-acetate で刺激を行いマクロファージへの分化を誘導した。刺激後に上清を control hMSC または IFN- γ hMSC より作製した CM に置換した。置換から 48 時間後に THP-1 cell を回収し、M2 (炎症抑制型) マクロファージマーカーである CD163、CD206 の発現を評価した。control hMSC より作製した CM は CD163、CD206 の発現を有意に増加させ、この増加は IFN- γ hMSC より作製した CM でより顕著であった。さらに、それぞれの CM 中の PGE2 の発現について評価したところ、IFN- γ hMSC より作製した CM では、control hMSC より作製した CM と比較して、PGE2 の発現が有意に上昇していた。PGE2 が腎線維化の抑制に関与するかを検討するため、PGE2 合成酵素 (PTGES) の遺伝子発現を siRNA で抑制した IFN- γ rMSC をラット IRI モデルへ投与し、線維化抑制効果に変化があるかを評価した。IRI によって誘導される α -SMA、TGF- β 1、collagen III の発現は negative control siRNA を施行した IFN- γ rMSC 投与により有意に抑制されたが、PTGES siRNA を施行した IFN- γ rMSC の投与では、この抑制が減弱した。

本論文は、IFN- γ 添加培地で培養した MSC が、腎障害モデルにおける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。その機序として、IFN- γ 添加培地で培養した MSC の炎症抑制型 M2 マクロファージを誘導する作用が、PGE2 の分泌促進により増強されることが関与していると考えられた。また IFN- γ 添加培地で培養した MSC が、TGF- β /Smad シグナル経路を強く抑制することも重要な因子と考えられた。

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