

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	長崎 孝平
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1, 2 項該当			
論文題目 Mesenchymal stem cells cultured in serum-free medium ameliorate experimental peritoneal fibrosis (無血清培地で培養された間葉系幹細胞は腹膜線維化を改善する)				
論文審査担当者				
主査	教授	今泉 和則	印	
審査委員	教授	田中 信治		
審査委員	准教授	仲 一仁		
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>世界における腎代替療法を必要とする末期腎不全患者数は約 400 万人に上る。そのうち、約 1 割が腹膜透析 (PD) を施行されている。本邦では 2019 年末時点で慢性透析患者が 34 万人を超え、うち PD は 3%程度である。PD は腹腔内に透析液を貯留することにより 24 時間連続して行える緩徐な透析方法である。血液透析と比較して体循環への影響が少なく残腎機能の維持が可能とされ、通院回数も月に 1、2 回で済むなどメリットがある。一方で継続するにつれて腹膜の劣化が生じることや、被嚢性腹膜硬化症といった重篤な腹膜の障害を引き起こすことにより、PD の継続が困難となる場合がある。さらにこれらに対して有効な治療法が乏しいことから、導入患者数に対して維持患者数は減少する。腹膜透析において腹膜への有害な要因から腹膜中皮細胞の喪失、筋線維芽細胞への分化、コラーゲンの蓄積、血管新生を生じ腹膜線維化、劣化を呈する。その結果、腹膜透過性の亢進、限外濾過の不良が現れ、透析困難となる。</p> <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、抗線維化作用も有しており、障害された組織の修復に寄与することが報告されている。我々は以前の研究でラット腹膜硬化症モデルにおいて有血清培地で培養した MSC が炎症および線維化を抑制し腹膜線維化を抑制することを報告した。しかし、血清を含む培地で培養された MSC は、未知のウイルスへの感染や免疫反応に曝されるリスクがある。我々は以前、ラット片側尿管結紮モデルにおいて無血清培地で培養したラット骨髄由来の MSC の投与が有血清培地で培養した MSC と比較して炎症細胞の浸潤を減少させることによって、線維化を抑制することを明らかにした。</p> <p>本研究では、腹膜硬化症モデルを用いて、無血清培地で培養したヒト骨髄由来の MSC (SF-MSC) による線維化抑制効果を、10%ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) 含有培地で培養した MSC (10%MSC) の線維化抑制効果と比較した。</p> <p>動物実験では 0.1%グルコン酸クロルヘキシジン (Chlorhexidine Gluconate : CG) を SD ラットに腹腔内投与した。さらに 30 分後に vehicle、10%MSC または SF-MSC を腹腔内投与した。10 日後に腹膜平衡試験を行うため、腹膜透析液を腹腔内へ注入し、30 分後にそれらを回収した。その後屠殺し血液および腹膜を採取し各種免疫染色を行った。</p> <p>ヘマトキシリン・エオジン染色で細胞密度、マッソントリクローム染色で腹膜の肥厚を確認した。CG 投与群では細胞が豊富で腹膜肥厚も著明であった。MSC で治療した群ではそれらは抑制され、10%MSC と比べて SF-MSC でより強く抑制された。α-SMA、Transforming growth factor-β1 (TGF-β1)、I 型コラーゲン、III 型コラーゲンにおいても同様に CG 投与で発現が増加し、MSC で治療した群ではそれらは抑制され、10%MSC と比べて SF-MSC でより強く抑制された。</p> <p>CG により誘導された CD3 (T リンパ球) および CD68 (マクロファージ) の陽性細胞数は、10%MSC の投与によって有意に減少し、SF-MSC の投与でさらに強く減少した。さらに炎症抑制系マクロファージ (M2) のマーカーである CD163 陽性細胞の CD68 陽性細胞との比率は 10%MSC の投与で増加し、SF-MSC の投与でさらに増加した。</p>				

腹膜平衡試験では CG を投与したラットにおいて生じた腹膜機能障害は MSC で治療した群で軽減し、10%MSC と比較して SF-MSC は腹膜機能障害をさらに強く軽減させた。

細胞実験では、ヒト腹膜中皮細胞 (human peritoneal mesothelial cell : HPMC) に TGF- β 1 を添加することによって誘導される線維化因子が MSC より作製した馴化培地 (conditioned medium : CM) で抑制されるか検討した。HPMC において TGF- β 1 の添加で誘導された α -SMA、リン酸化 Smad2、リン酸化 Smad3 は MSC により作製した CM で有意に抑制されたが、10%MSC と SF-MSC では有意差を認めなかった。

WST-1 アッセイにより増殖活性を調べたところ、SF-MSC は 10%MSC と比較して増殖能が有意に亢進していた。

最後に各種 MSC (FBS のロット間での性能の違いの除去のため 2 社の FBS、エクソソームを除去した FBS の 3 種類の 10%血清含有培地、市販されている MSC 専用の 2%血清含有する有血清培地、無血清培地 STK2 を用いて培養した MSC) の Tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) mRNA 発現レベルを比較した。その結果、10%血清含有培地に比べて市販の MSC 専用培地は有意に発現が増加し、無血清培地ではより強く増加した。

本研究では腹膜線維化モデルにおいて、MSC の投与による炎症、線維化の抑制効果は無血清培地で培養した MSC のほうが有意に強いことが示された。無血清培地での培養によって MSC によるマクロファージ表現型の炎症抑制型 M2 への分化促進、及び、TSG-6 の発現増強が引き起こされることで、MSC の抗炎症作用の増強が生じた。無血清培地で培養した、MSC の投与は、腹膜線維化の進行を防ぐための有用な治療法になる可能性があると考えられた。

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