

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	門野 充記
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Adipose-derived mesenchymal stem cells cultured in serum-free medium attenuate acute contrast-induced nephropathy by exerting anti-apoptotic effects (造影剤腎症に対する、無血清培地で培養した間葉系幹細胞の治療効果)			
論文審査担当者			
主 査	教授	栗井 和夫	印
審査委員	教授	東 幸仁	
審査委員	准教授	仲 一仁	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>造影剤腎症 (contrast induced nephropathy: CIN) は入院患者における急性腎障害の約 10%を占めており、発症予防に造影剤投与前後の輸液が推奨されている。CIN の病態には、虚血性障害、酸化ストレス、尿細管細胞のアポトーシス等が関与していることが報告されているが、発症後の有効な治療法は確立されていない。間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) は腎障害モデルにおいて抗炎症作用や抗アポトーシス作用により、障害を軽減することが報告されている。無血清培地で培養した MSC (serum free MSC: SF-MSC) は抗炎症作用が増強することが報告されているが、抗アポトーシス作用が増強するかについては不明である。よって本研究では MSC の抗アポトーシス作用が無血清培地培養によって増強されるのかを調べるとともに、CIN モデルマウスに対する SF-MSC の治療効果を評価した。</p> <p>MSC は同意を取得した患者より提供を受けた手術の際に生じた余剰の脂肪組織から分離し、ウシ胎児血清含有培地あるいは無血清培地を用いて培養した。CIN マウスは右腎摘出 1 週間後に左腎動脈を 30 分クランプし虚血再灌流障害を誘導させ、その後造影剤注射と左腎への放射線照射を行い作製した。CIN マウス作製後に PBS、あるいはウシ胎児血清含有培地で培養した MSC (control-MSC)、または SF-MSC を 10 万 cells 投与した。MSC 投与 24 時間後に安楽死させ、各群における腎機能、尿細管障害スコア、尿細管の DNA 障害、アポトーシスの程度を比較した。CIN 群および control-MSC 投与群で上昇を認めた血清尿素窒素 (BUN) 値、血清クレアチニン (Cr) 値および尿細管障害スコアは、SF-MSC 投与群において有意に低下した。CIN 群において発現が増強された DNA 障害マーカーである γH2AX は control-MSC 投与群で抑制され、SF-MSC 投与群ではさらに強く抑制された。CIN 群および control-MSC 投与群において誘導されたアポトーシス因子である cleaved-caspase3 の発現量、および TUNEL 染色における TUNEL 陽性細胞数は、SF-MSC 投与群において有意に減少した。次に培養実験系で、ヒト胎児腎細胞 293 (HEK293 cell) において、放射線照射により誘導されたアポトーシスが control-MSC および SF-MSC より作製した馴化培地 (conditioned medium: CM) によって抑制されるかを検討した。放射線照射で誘導された cleaved-caspase3 の発現は、control-MSC より作製した CM によって有意に抑制され、SF-MSC より作製した CM ではさらに強力に抑制された。一方で cleaved-PARP の発現は control-MSC より作製した CM および SF-MSC より作製した CM によって強力に抑制され、両者に差を認めなかった。次に control-MSC および SF-MSC より作製した CM に含まれるアポトーシス抑制因子について ELISA を用いて解析した。control-MSC より作製した CM と比較して、SF-MSC より作製した CM では epidermal growth factor: EGF の発現が有意に増加していた。SF-MSC における</p>			

EGF の発現増加が CIN モデルマウスに対する腎保護作用およびアポトーシス抑制効果に与えるかを、siRNA を用いて EGF をノックダウンした SF-MSC (EGF siRNA SF-MSC) を作製し、CIN モデルマウスに投与して検討した。CIN 群で上昇を認めた血清 BUN 値、血清 Cr 値および尿細管障害スコアは、negative siRNA を施行した SF-MSC (NC siRNA SF-MSC) 投与群において有意に低下したが、EGF siRNA SF-MSC 投与群ではその減少効果が減弱した。CIN 群で誘導された γ H2AX、cleaved-caspase3 の発現、および増加した TUNEL 陽性細胞数は NC siRNA SF-MSC 投与群において有意に抑制されたが、EGF siRNA SF-MSC 投与群ではその抑制効果が減弱した。さらに培養系実験で、SF-MSC より作製した CM に EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬を添加し、アポトーシス抑制効果に変化が生じるかを、放射線照射を行った HEK293 cell を用いて検討した。HEK293 cell を放射線照射し誘導された cleaved-caspase3 の発現は、SF-MSC より作製した CM により抑制されたが、EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬を CM に添加することでその抑制効果が消失した。

以上の結果から、本論文は無血清培地で培養した MSC が、CIN モデルマウスで誘導された腎機能障害および尿細管アポトーシス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、MSC は無血清培地により EGF 分泌が促進され、抗アポトーシス作用が増強することで CIN モデルマウスの尿細管アポトーシスを強く抑制し、腎機能障害改善に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、本論文が門野 充記に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。