

## 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 マリア
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ㉑・2 項該当		
論文題目 Comparison of the Therapeutic Effects of Adipose- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Renal Fibrosis (脂肪由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞の腎線維化抑制効果の比較)			
論文審査担当者			
主査	教授	東 幸仁	印
審査委員	教授	渡邊 朋信	
審査委員	准教授	仲 一仁	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>間葉系幹細胞: mesenchymal stem cells (MSC) は傍分泌作用により、障害組織の修復に寄与していることが報告されている。MSC は脂肪組織、臍帯血、骨髄、歯髄などさまざまな組織から単離されるが、これらの中でも脂肪組織と骨髄は比較的容易に採取できる組織であるため、脂肪由来 MSC: MSC derived from adipose tissue (ADSC) と骨髄由来 MSC: MSC derived from bone marrow (BMSC) は、再生医療の領域において広く用いられている。腎障害に対する MSC を用いた細胞療法においても、ADSC と BMSC の有効性について報告されているが、どちらの MSC において腎線維化抑制効果が強いかは明確ではない。そこで著者らは、虚血再灌流障害: ischemia-reperfusion injury (IRI) モデルを用いて、ウシ胎児血清: fetal bovine serum (FBS) 含有培地で培養した ADSC と BMSC の線維化抑制効果について比較した。さらに、過去に無血清培地で培養した MSC は、血清含有培地で培養した MSC と比較して、tumor necrosis factor-<math>\alpha</math>-induced protein 6 (TSG-6) の発現が増加し、腎線維化抑制効果が増強することが報告されている。よって、本論文では、無血清培地で培養した MSC に関しても、線維化抑制効果の比較を行った。</p> <p>まず、6 週齢のラットから、肋骨下の脂肪組織、大腿骨および脛骨の骨髄を採取した後、FBS 含有培地を用いて MSC を樹立し、2 回継代の後、凍結保存した。再播種時に FBS 含有培地を用いて 4 回目の継代まで培養したもので、脂肪由来を ADSC、骨髄由来を BMSC と定義した。また、再播種時に無血清培地を用いて同様に培養したもので、脂肪由来を SF-ADSC、骨髄由来を SF-BMSC と定義した。</p> <p>治療効果を評価するため、鉗子を用いて左腎動脈の血流を 60 分遮断した後に再灌流させた IRI モデルのラットに、左腎動脈近傍の腹部大動脈よりリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、ADSC、BMSC もしくは SF-ADSC、SF-BMSC をそれぞれ 25 万細胞だけ投与した。投与から 21 日後に安楽死させ、腎組織における線維化と尿細管障害の程度を評価した。</p> <p>次に MSC 投与による肺血栓塞栓症のリスクを評価するため、マウスに尾静脈より PBS、ADSC、BMSC もしくは SF-ADSC、SF-BMSC を 10 万~40 万細胞だけ投与し、24 時間後の生存率を調べた。死亡直後、または投与から 24 時間後に安楽死させたマウスから肺を摘出し、血栓形成の有無を評価した。</p> <p>さらに、ADSC と BMSC および SF-ADSC と SF-BMSC の群間で、tissue factor (TF)、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、PGE2 合成酵素: prostaglandin E synthase (PTGES)、TSG-6、vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現について比較した。その結果から、ADSC は、IRI により誘導された <math>\alpha</math>-smooth muscle actin (<math>\alpha</math>-SMA)、transforming growth factor (TGF)-<math>\beta</math>1、collagen I、collagen III の発現、尿細管障害スコア、および、間質の線維化領域を有意に抑制し、これらの抑制の程度は BMSC よりも強力であることが示された。</p> <p>また、ADSC を 10 万細胞だけ投与したマウスは 40%が死亡し、摘出した肺を観察すると多数の血栓形成を認めた。一方で BMSC を 10 万細胞だけ投与したマウスにおいては、全例で注射後 24 時間の生存を認め、肺に血栓形成を認めなかった。</p> <p>さらに、TF、TSG-6、PTGES は BMSC よりも ADSC において高発現しており、一方で VEGF</p>			

は ADSC よりも BMSC において高発現していた。

次に無血清培地で培養した MSC を用いた実験を同様に行った。SF-ADSC と SF-BMSC は、IRI により誘導された  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、collagen I、collagen III の発現、尿細管障害スコア、間質の線維化領域を有意に抑制し、両者に差を認めなかった。

副作用の評価では、SF-ADSC を 10 万もしくは 20 万細胞だけ投与した群は、全例注射後 24 時間生存したが、40 万細胞を与えると 40%が死亡し、摘出した肺には粗大な血栓形成を多数認めた。一方で SF-BMSC を 40 万細胞だけ投与した群は、全例注射後 24 時間生存し、肺には極少量のみ血栓形成を認めた。

また、TF、TSG-6、PTGES は SF-BMSC よりも SF-ADSC において高発現しており、一方で VEGF は SF-ADSC よりも SF-BMSC において高発現していた。

上記の結果から、ADSC は BMSC と比較して、IRI により誘導された腎線維化を強力に抑制したが、SF-ADSC と SF-BMSC は同等に腎線維化を抑制した。よって血清含有培地で培養した MSC を炎症や線維化を伴う疾患に対して用いる場合には、ADSC は BMSC よりもより効果的であると考えた。一方で、無血清培地で培養した MSC を用いる場合には、ADSC と BMSC は同等の治療効果を示すことが期待された。さらに、ADSC を使用する際には、血栓形成のリスクに注意する必要性が示された。

今回の知見から、本論文は ADSC と BMSC のどちらを患者に使用するかを、対象疾患と MSC の培養方法の両方に基づいて選択することの重要性を示唆したものであり、評価される。

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。