

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	倉脇 壮
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ㉑・2 項該当		
論文題目 Mesenchymal stem cells pretreated with interferon-gamma attenuate renal fibrosis by enhancing regulatory T cell induction (インターフェロン γ 前処置を行った間葉系幹細胞は制御性 T 細胞の誘導を介して腎線維化を抑制する)			
論文審査担当者			
主査	教授	保田 朋波流	印
審査委員	教授	渡邊 朋信	
審査委員	講師	稗田 圭介	
<p>[論文審査の結果の要旨]</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。MSC は損傷部位からの interferon-γ (IFN-γ) をはじめとする炎症性サイトカインなどを感知して、抗炎症作用を発揮することが知られている。IFN-γ 添加培地で培養した MSC は、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) の分泌が増強し、CD4 陽性 T 細胞を制御性 T 細胞 (Treg 細胞) に誘導することが報告されている。しかし、IFN-γ 添加培地で培養した MSC によって誘導された Treg 細胞が腎線維化の進行を抑制するかについては解明されていない。そこで筆者らは、IFN-γ 添加培地で培養した MSC に siRNA を用いて IDO をノックダウンして、腎虚血再灌流: ischemia reperfusion injury (IRI) モデルに投与した際の治療効果について検討した。</p> <p>まず、ヒト骨髄 MSC をウシ胎児血清含有培地を用いて培養を行い、dish の 70% 程度の密度にまで発育した後、IFN-γ 200 ng/mL を培地に添加し、48 時間後に細胞を回収した。右腎摘出 1 週間後に、左腎動脈を血管用クリップを用いて 45 分間クランプし、その後再灌流させた IRI モデルラットを作製した。再灌流後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 MSC (control MSC) または IFN-γ 添加 FBS 含有培地で培養した MSC (IFN-γ MSC) を 50 万 cells、あるいは PBS を投与し、day7、day21 で屠殺し、各群における腎組織の炎症および線維化を評価した。</p> <p>次に control MSC、IFN-γ MSC における IDO の mRNA および蛋白質の発現を比較した。さらに control MSC および IFN-γ MSC より馴化培地: conditioned medium (CM) を作製し、IDO の発現を ELISA 法 (酵素結合免疫吸着測定法) を用いて測定した。</p> <p>また、ヒト末梢血単核細胞からナイーブ CD4⁺T 細胞を分離し、control MSC より作製した CM (control MSC-CM) または IFN-γ MSC より作製した CM (IFN-γ MSC-CM) を用いて培養した。さらに Dynabeads ヒト T 細胞アクティベーター CD3/CD28 及び IL-2 を加え、5 日後に細胞を回収し、Treg 細胞マーカーの発現を比較した。</p> <p>最後に IDO を siRNA で抑制した IFN-γ MSC を IRI モデルへ投与し、炎症抑制効果および線維化抑制効果に変化が生じるかを評価した。</p> <p>その結果 IFN-γ MSC の投与群は control MSC の投与群よりも障害組織中の FOXP3 (Treg 細胞マーカー) の陽性細胞数を増加させた。さらに腎組織に誘導された CD3 (汎 T リンパ球マーカー) および CD68 (マクロファージマーカー) の陽性細胞数の減少もより顕著だった。FOXP3 と CD3 の二重染色においても、二重染色陽性細胞数は IFN-γ MSC の投与群で control MSC の投与群よりも増加していた。Vascular endothelial growth factor (VEGF) の組織中の発現を調べたところ、control MSC の投与では有意な上昇は認めなかったが、IFN-γ MSC の投与では発現レベルが有意に上昇していた。</p> <p>また、線維化の評価として western blotting 法により α-smooth muscle actin (α-SMA)、transforming growth factor-β 1 (TGF-β 1) を評価したところ、IRI により誘導さ</p>			

れた α -SMA、TGF- β 1 はそれぞれ IFN- γ MSC の投与群で control MSC の投与群よりも有意に抑制された。Masson trichrome 染色、 α -SMA と collagen type I の免疫染色においても IFN- γ MSC の投与群で control MSC の投与群よりも有意に抑制された。

In *vitro* の結果として、IFN- γ MSC における IDO の mRNA および蛋白質の発現は control MSC と比較して有意に上昇していた。また、IFN- γ MSC-CM 中の IDO の発現も control MSC-CM と比較して有意に上昇していた。

また IFN- γ MSC-CM を用いて培養したナイーブ CD4+T 細胞は、control MSC-CM で培養したナイーブ CD4+T 細胞と比較して FOXP3 の発現が有意に増加していた。

最後に Negative control siRNA を施行した IFN- γ MSC の投与は、FOXP3 陽性細胞数を有意に増加させたが、IDO1 siRNA を施行した IFN- γ MSC の投与では、その増強効果が減弱した。また negative control siRNA を施行した IFN- γ MSC の投与は、IRI により腎組織に誘導された CD3 および CD68 の陽性細胞数を有意に減少させたが、IDO1 siRNA を施行した IFN- γ MSC の投与では、その抑制効果が減弱した。

さらに IRI により誘導された線維化の抑制効果についても IDO siRNA を施行した IFN- γ MSC の投与では、その抑制効果が減弱した。

IFN- γ 添加培地で培養した MSC は、IDO の分泌が促進しており、IRI モデルの腎組織への Treg 細胞の誘導が増強していることが明らかになった。さらに siRNA を用いて IDO をノックダウンした MSC を投与することで、この Treg 細胞の誘導が腎組織における炎症および線維化の抑制に関与していることが明らかになった。

今回の知見は、MSC を用いた治療戦略の新たな可能性を評価する上で重要な一歩となるものであり、MSC が腎保護効果を発揮するメカニズムの理解を深めるものである。

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。