

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	町 口 敏 彦
論文題目	Cellular interactions via conditioned media induce <i>in vivo</i> nephron generation from tubular epithelial cells or mesenchymal stem cells (培養上清を介した細胞間相互作用は尿細管上皮細胞又は間葉系幹細胞の移植によるネフロン新生を誘導する)		
(論文内容の要旨)			
<p>腎不全／透析患者の増加に伴い、腎臓の再生医療への期待がますます高まっている。近年、発生過程の胚盤胞や腎臓原基（後腎）、間葉／尿管芽等を用いた腎臓再生の試みもなされるようになった。</p> <p>本研究では、『培養上清（conditioned medium; CM）を介した細胞間相互作用』という新しい概念を用い、分化した尿細管上皮細胞（tubular epithelial cell; TEC）や間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell; MSC）の移植によるネフロンの新生を試みた。CM としてマウスの血管内皮細胞（vascular endothelial cell; VEC）である MS1 とイヌの TEC である MDCK 細胞の 10 倍に濃縮されたものを用いた。まず、これらの CM を用いて VEC (MS1) と TEC (MDCK 細胞) の間での 2 次元培養による細胞増殖及び 3 次元培養による管腔形成における相互作用を検討したが、VEC は TEC-CM の添加により、一方、TEC は VEC-CM の添加によりそれぞれこれらの変化が有意に促進された。VEC と TEC の間で細胞増殖及び管腔形成における促進的なクロス・トークが存在することが示唆された。</p> <p>ヒトの MSC に関しては、VEC-CM はその細胞増殖及び形態学的変化を促進したが、TEC-CM はむしろ CM を含まないコントロール群に比して有意にこれらの変化を抑制した。傷害されていない TEC は MSC の変化を抑制している可能性が示唆された。一方、TEC-CM を加え 4 週間 2 次元培養された MSC はその 40-50% に免疫組織化学上 cytokeratin を発現するようになり、さらに 3 次元培養では尿細管様の管腔構造を形成した。これらの所見は TEC-CM、つまり TEC が MSC を TEC に分化させる作用を有していることを示唆している。</p> <p>最後に、これらの所見に基づいて、TEC (MDCK 細胞) 又はヒト MSC を VEC-CM と TEC-CM を含む I 型コラーゲン・ゲルと混ぜラット皮下へ移植した。12 週間後のそれぞれの組織内には血管の新生とともに糸球体及び尿細管からなるネフロン様構造物が新生されていた。PECAM-1, <math>\alpha</math>-smooth muscle actin, vimentin 及び synaptopodin に対する免疫組織化学法により糸球体内皮細胞、メサングウム細胞及び糸球体上皮細胞（足細胞）が同定された。尿細管は糸球体様構造物に比してその数は少なかったが、aquaporin-1 を発現している近位尿細管と cytokeratin のみを発現している遠位尿細管が識別された。</p> <p>本例は臓器再生の領域に CM を導入した最初の報告である。VEC-CM 及び TEC-CM には PDGF-BB、VEGF、bFGF 等が含まれていたが、どの成長因子がこれ</p>			

<p>らの相互作用を引き起こしたのかは今後の検討を待たねばならない。しかし、腎臓の様な複雑な構造の臓器の再生には複数の因子が必要と考えられ、本研究で CM の腎臓再生促進因子としての有用性が示されたと思われる。CM を用いた本方法は他の臓器や組織の再生においても有用であるかもしれない。</p>
<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>細胞間相互作用という概念のもと、異なる細胞の培養上清を用いて尿細管上皮細胞ないし腎ネフロンの新生を試みた。まず、マウス血管内皮細胞とイヌ尿細管上皮細胞の相互作用を解析したところ、それぞれ他方の培養上清により 2 次元培養による増殖能の亢進及び 3 次元培養による管腔形成が促進された。次に間葉系幹細胞に対するそれぞれの培養上清の効果を検討したところ、血管内皮細胞の培養上清は同様の効果を示した。一方、尿細管上皮細胞の培養上清は 2 次元培養での増殖を抑制したが、サイトケラチンの発現を誘導し、さらに 3 次元培養により尿細管上皮細胞様の管腔構造形成が促進され、尿細管上皮細胞から産生される因子が間葉系幹細胞を尿細管上皮細胞へと分化させうる可能性が示唆された。これらの結果に基づいて、血管内皮細胞と尿細管上皮細胞の培養上清を含む 1 型コラーゲン・ゲルとともに尿細管上皮細胞ないし間葉系幹細胞をラット皮下に移植したところ、いずれの場合にも 12 週間後にネフロン様構造物の形成がみられ、これらの培養上清中に腎ネフロン新生を促進する因子が存在している可能性が示唆された。以上の研究は腎ネフロン新生における細胞間相互作用の理解に貢献し、腎臓再生研究にも示唆を与えるところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 2 6 年 1 月 2 4 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。</p>