



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Conditioned medium from human amnion-derived mesenchymal stem cells regulates activation of primary hepatic stellate cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	付, 慶傑
Description	配架番号 : 2559
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14093号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77928
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Fu_Qingjie_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 付 慶 傑

	主査	教授	荒戸	照世
審査担当者	副査	教授	武富	紹信
	副査	教授	平野	聡
	副査	教授	廣瀬	哲郎

学 位 論 文 題 名

Conditioned medium from human amnion-derived mesenchymal stem cells
regulates activation of primary hepatic stellate cells
(羊膜間葉系幹細胞由来培養上清の培養肝星細胞に対する活性化制御)

本研究は、ラットの肝星細胞に対するヒト羊膜間葉系幹細胞由来の培養上清の活性化制御機構について検討したものである。

審査は2回に分けて実施された（1回目は主査と副査2名、2回目は副査1名）。1回目の審査にあたり、まず副査の武富教授から次のような質問があった。1) 用いた間葉系幹細胞は単一のドナー由来か。2) ヒト由来の間葉系幹細胞上清を用いて、ヒトではなくラットの肝星細胞に対して試験を行った理由。3) 異なるドナー由来の間葉系幹細胞培養上清中に含まれるTGF β の量の差異。これに対し、申請者は以下のように回答した。1) 予備試験では、ドナー或いは継代数の異なる間葉系幹細胞を用いたが、最終的には単一ドナー由来の間葉系幹細胞を用いて一連の試験を行った。2) 臨床応用に向けての検討としては、人の肝星細胞を使うのが最も適しているが、人の未活性化肝星細胞の源が限られており入手困難であるため、ラットの肝星細胞を用いた。3) 異なるドナーからの間葉系幹細胞培養上清中のTGF β の含有量は異なるが、今回の実験では培養上清中のTGF β 含有量が肝星細胞の活性化に与える影響については検討しなかった。次に副査の廣瀬教授から、間葉系幹細胞培養上清にTGF β を追加しても、依然として肝星細胞の活性化が抑制されている理由について質問があった。申請者は、培養上清中にもTGF β が含まれているが、更に追加しても活性化は認められず、かえって抑制しているという結果は、上清の中に未知の因子が存在し、非TGF β 経路を通じて肝星細胞の活性化を調整している可能性があることを示している。しかし、具体的な因子と経路はまだ分からないと回答した。更に、廣瀬教授からの培養上清中の未知の因子の検出方法についての質問に対して、未知の因子をHPLCで分離し機能を検討した上で、構造を核磁気共鳴により解析することも想定されるが、これまでの検討により新しい因子の含有量は非常に少なく、構造解析を行うには大量の培養上清が必要であると回答した。主査の荒戸教授から次のような質問があった。1) 間葉系幹細胞由来の培養上清により、肝星

細胞の MMP9 の発現量が極めて著しく上昇したにもかかわらず、MMP13/TIMP1 を介した機構を想定した理由。2) 線維芽細胞の培養上清に比べて間葉系幹細胞の培養上清で、MMP9 の発現量の上昇が顕著であるが、この作用は間葉系幹細胞の特有なものなのか。これに対し、申請者は以下のように回答した。1) MMP9 の発現量は最も上昇しているが、MMP9 はゼラチナーゼであり 1 型コラーゲンを分解する能力は非常に弱い。一方、MMP13 はコラーゲナーゼであり、細胞外マトリックスの中の 1 型コラーゲンは主に MMP13 で分解されることから MMP13/TIMP1 を介した機構を想定した。2) 間葉系幹細胞培養上清と線維芽細胞培養上清は、例えば α -SMA の発現を抑え MMPs の発現を高めることができる点で似ているが、異なっている点もあり、線維芽細胞の培養上清は COL1A1 の発現を著しく向上させる。したがって、MMP9 の著しい上昇は、間葉系幹細胞培養上清の特有の作用結果かもしれないが、データに限りがあり、具体的な理由は不明である。2 回目の審査にあたり、副査の平野教授から次のような質問があった。1) 間葉系幹細胞においてある程度の CD26 発現が認められているが、間葉系幹細胞に線維芽細胞が混在しているということか。2) TGF β R1 の発現の上昇はどういう意義があるのか。3) 今回の研究の成果をどのように臨床応用に転化するか。以上の質問に対して、申請者は次のように回答した。1) CD26 は線維芽細胞のマーカーとして使用しており、今回の試験に用いた間葉系幹細胞も CD26 を発現しているが、コントロールの線維芽細胞に比して発現量は低い。同時に、間葉系幹細胞のマーカーである ITGA 11 が高発現であることを踏まえると、間葉系幹細胞の純度は十分に高いと考えている。2) TGF β は TGF β R1 の発現を上昇させることから、TGF β の追加による TGF β R1 の発現上昇を介して追加された TGF β が機能を発揮できたと考えられた。3) 本検討により、間葉系幹細胞の上清が肝星細胞の活性化を抑制することを確認したので、肝線維化、肝硬変の治療に応用できることを期待している。次の計画は上清中の有効な抗活性化物質を突き止め、これを用いて臨床応用を行うことである。

この論文は、間葉系幹細胞培養上清が肝星細胞の活性化を抑制する役割を検討し、細胞外マトリックスの蓄積を抑制するメカニズムを部分的に解明した。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。