

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 近森 正智

本研究は、尿細管上皮細胞上に発現した一次繊毛がずり応力で曲げられることにより、細胞内カルシウム濃度の上昇が起こり複数の細胞応答を示すことに着目し、虚血再灌流障害を想定した酸化ストレスにより伸長した一次繊毛において細胞内カルシウム濃度がどのように変化するかについて検証したものである。この検証のため、灌流量によりずり応力を調節可能な4つの細胞培養チャンバーを有する灌流培養可能なマイクロ流体培養デバイスを設計・構築して機能評価を行い下記の結果を得た。

1. マイクロ流体培養デバイス内に細胞懸濁液を灌流すると、流速の低下した部位で細胞接着が起こることに着目し、細胞培養チャンバー以外の部位に接着する細胞数を減らすため、汎用シミュレーションソフトウェアを用いてチャンネル内で流速が低下しないチャンネル設計を行った。これにより細胞培養チャンバー以外の部位に接着する細胞数は十分に少なくなり、4つの細胞培養チャンバー間で流路抵抗が同等となることが示された。
2. 尿細管上皮細胞を灌流培養した後の細胞数を計測したところ、4つの細胞培養チャンバー間で細胞数に有意な差は認めなかった。これにより本培養デバイスで培養された尿細管上皮細胞は、細胞培養チャンバー間で同程度の接触阻害が得られることが示された。
3. 細胞培養チャンバー内のずり応力を、汎用シミュレーションソフトウェアでシミュレーションした。細胞培養チャンバー内の観察範囲内であれば、尿細管上皮細胞に与えられるずり応力が一定であることが示された。また細胞培養チャンバーの天井・底面に接着している細胞同士の表面間隙の距離を、構造化照明顕微鏡法により計測した結果を上記ずり応力のシミュレーションの結果と合わせることで、細胞培養チャンバー内の灌流培養によって *in vivo* の半分程度のずり応力が再現可能であることが示された。
4. 本培養デバイスへの薬剤曝露法には、数時間単位の短期間曝露もしくは数日間単位の長期間曝露の2種類がある。Fluorescein を用いて蛍光輝度を計測し細胞培養チャンバー間での濃度勾配を短期間曝露・長期間曝露について検証した。短期間曝露・長期間曝露のいずれにおいてもマイクロミキサによって細胞培養チャンバー間で Fluorescein 濃度が 0:25:75:100 に分配されることが示された。
5. 本培養デバイスで灌流培養した尿細管上皮細胞へ、酸化ストレスを起こす過酸化水素水を各細胞培養チャンバー間で 0、100、300 及び 400 μM になるよう分配して曝露させた。過酸化水素水を曝露して2日後に、抗 acetylated α tubulin 抗体及び ARL13B 抗体を用いて免疫染

色をして一次繊毛の長さを計測したところ、300 μM で一次繊毛が最長となり、300 μM までであれば酸化ストレスによる一次繊毛伸長効果に濃度依存性があることが示唆された。

6. 過酸化水素水を尿細管上皮細胞に曝露させた2日後に、虚血再灌流後の乏尿期を想定して一次繊毛にかかるずり応力を灌流量調節により漸増させ、細胞内カルシウム濃度の変化をFluo 4-AMによる蛍光輝度で検証した。尿細管上皮細胞に曝露された過酸化水素水が0、100及び300 μM と濃くなる程、細胞内カルシウム濃度が急上昇するずり応力が弱くなっている、一次繊毛の伸長効果がずり応力による細胞内カルシウム濃度上昇の感度に関与していることが示唆された。

以上、本論文は酸化ストレスを起こす過酸化水素水を尿細管上皮細胞に曝露させることで一次繊毛が伸長し、弱いずり応力であっても一次繊毛を介した細胞内カルシウム濃度の上昇が認められることを初めて明らかにした。本研究は虚血再灌流障害による急性腎障害後の乏尿期の尿細管上皮細胞のモデルとなり、本培養デバイスを用いることで虚血再灌流障害に対する治療薬開発に貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。