

第 8 号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )	氏名	三上 慎祐
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
Autologous Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cell Implantation and Endothelial Function in a Rabbit Ischemic Limb Model (ラビット下肢虚血モデルに対する自家骨髄間葉系幹細胞移植は血管内皮機能を改善する)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	末 田 泰 二 郎	印
審査委員	教 授	吉 栖 正 生	
審査委員	講 師	内 田 直 里	
〔論文審査の要旨〕			
<p>重症末梢動脈疾患では、潰瘍や壊疽を合併し、既存の治療に反応せず四肢切断に至る例は少なくない。骨髄単核球細胞移植による血管新生は、これまで no option であった患者の新たな治療戦略として臨床応用されている。しかし、同療法は、ハイリスク患者に対し全身麻酔下で骨髄細胞を採集すること、単回しか施行できない等の多くの問題が指摘されている。一方、間葉系幹細胞(MSC)は、血管内皮細胞を含む多種の細胞に分化し得る。また、骨髄や末梢血から容易に分離でき、急速かつ大量に培養可能である。動脈硬化は血管内皮機能障害を第一段階として発症、進展し、さらに進行すれば心血管合併症を惹起すると考えられている。細胞移植は、血管再生に有効なだけでなく、血管内皮機能を改善する可能性がある。</p> <p>今回、我々は、ラビットの下肢虚血モデルを用いて、自家骨髄 MSC 移植による血管内皮機能改善に関して検討した。40 匹のラビットにおいて、無作為に MSC 移植群(n=20)と生理食塩水を注入する対照群(n=20)とに分けた。自家 MSC はラビットの腸骨より採取した骨髄細胞より分離し、1 か月間の培養増殖を行った。大腿動脈を結紮して下肢虚血モデルを作成し、モデル作成 7 日後に MSC(総数 10<sup>6</sup> 個)を移植し、対照群には生理食塩水を注入した。移植 1 ヶ月後に Laser Doppler perfusion image(LDPI)、血管造影を施行し angiographic score を算定した。また MSC の分化誘導を確認するため、green fluorescent protein(GFP)を用いて移植する MSC を染色した。血管内皮機能は、内皮依存性血管拡張薬であるアセチルコリン(ACh)、内皮非依存性血管拡張薬であるニトロプルシド(SNP)および nitric oxide (NO)合成酵素阻害薬である N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine に対する下肢血流の変化で評価した。</p>			

MSC は、1 ヶ月間の培養で  $10^3$  個から  $10^{12}$  個まで容易に増殖することを確認した。MSC 移植後の angiographic score, capillary index, LDPI は、対照群に比し、MSC 移植群で有意に高値を示した。組織学的検討では、MSC 移植後、血管新生が確認できた部位において、移植した MSC より分化誘導された血管内皮細胞 (GFP/CD31 陽性細胞) はほとんど認められなかった。虚血障害の強い部位の辺縁部において、希ではあるが、移植した MSC より分化誘導された血管内皮細胞が認められた。これらのことは、移植された MSC は、生着あるいは血管内皮細胞に分化することなく血管新生を惹起したことを示唆している。最近の報告でも、骨髄細胞移植は有意に血管を再生させるが、移植した細胞が血管内皮細胞や血管内皮前駆細胞に分化することはほとんど認められず、内包された各種 angiogenic cytokine が骨髄より血管構成細胞を動員することが示されている。MSC もまた、血管増殖因子 vascular endothelial growth factor など、様々な angiogenic cytokine を内包している。移植された MSC は、数日で死滅するが、その際に、angiogenic cytokine を放出することにより、骨髄より血管内皮前駆細胞を動員することで血管新生を惹起するものと考えられる。

血管内皮機能の検討において、ACh に対する下肢血流反応は対照群に比し、MSC 移植群で有意に増加していた。SNP に対する下肢血流反応は両群で同等であった。これらのことは、MSC 移植が、選択的に血管内皮機能を改善したことを示唆している。さらに、 $N^G$ -nitro-L-arginine は、MSC 群での ACh に対する下肢血流増強反応を消失させた。MSC 移植が、血管内皮機能を改善する機序は不明であるが、少なくとも NO の産生の増加によるものと考えられた。また、VEGF は血管内皮細胞や血管内皮前駆細胞を動員し、側副血管を形成し、側副血行を増加させるだけでなく、内皮型 NO 合成酵素の発現を直接増加させることにより内皮依存性血管拡張反応を改善することも知られている。

ラビット下肢虚血モデルにおいて MSC 移植は血管新生を惹起し、血管内皮機能を改善した。今後、MSC 移植による血管新生や血管内皮機能改善の詳細な機序の解明、大規模臨床試験による MSC 移植の効果、長期予後、安全性に関する検討が待たれる。

以上の結果から、本論文は、MSC 移植が、重症末梢動脈患者の血管を再生し、血管内皮機能を改善する可能性を示した。このことは、血管再生医療に新たな治療戦略を提示できると考えられる。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。