

氏名	まつ うら たかし 松 浦 隆
学位の種類	博士（再生医科学）
学位記番号	甲第3号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	マウス血管新生における遺伝子治療と細胞治療の比較 検討
学位論文審査委員	(主査) 井藤久雄 (副査) 久留一郎 重政千秋

学位論文の内容の要旨

虚血性疾患に対する血管新生治療として、遺伝子治療や細胞移植治療が行われているが、その安全性や効果、そしてメカニズム解明などに未だ多くの課題を残している。両治療法の改善を図るにあたり、最も有力な作用機序と考えられている血管増殖因子発現の比較検討はなく、今後両治療法をどのように相補すべきかの検討材料に乏しい。

そこで、本研究ではマウス下肢虚血モデルを用いて、アデノウイルスベクターによる肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) 遺伝子導入およびマウス骨髄由来血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) 移植を行い、両者の血行改善作用およびその機序を実験的に比較検討した。

方法

実験動物として8~10週齢のc57bl/6J雌性マウスを用い、全身麻酔後、右下肢大腿動脈結紮による下肢虚血モデルを作製した。対照群は生理食塩水、遺伝子対照群はアデノウイルスベクターによるLacZ遺伝子導入(Ad-LacZ)、遺伝子治療群はアデノウイルスベクターによるHGF遺伝子導入(Ad-HGF)、細胞治療群はマウス骨髄由来血管内皮前駆細胞(EPC)を虚血下肢筋肉内に投与した(各群n=8)。投与後28日間を観察期間とし、laser doppler perfusion imager (LDPI)にて生理学的血行改善を、また免疫組織化学染色にて毛細血管密度および成熟血管数を算出し、病学的血管新生を各群で評価した(各群n=8)。血管増殖因子発現については、酵素関連免疫アッセイ(enzyme-linked immunoassay : ELISA法)にて虚血下肢筋肉中のHGFおよび血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor : VEGF)蛋白の発現量を、また免疫組織化学染色にて発現部位を各群で評価した(各群n=5)。さらに、PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (PKH-GL)にて蛍光標識したEPCを同様に投与し、虚血筋肉内でのEPCの動態を評価

した (n=3-5)。

結 果

術後 28 日目の LDPI 解析にて、Ad-HGF 群 1×10^8 プラーク形成ユニット (plaque forming unit : pfu) および EPC 群 10×10^5 cells で対照群・Ad-LacZ 群に比し、同等かつ有意な血行改善を認めた ($p < 0.01$)。このため以降の解析・評価はこの条件で行った。

病理学的解析では、Ad-HGF 群、EPC 群いずれも対照群や Ad-LacZ 群に比し、同等かつ有意に毛細血管密度の増加を認めたが ($p < 0.05$)、EPC 群では Ad-HGF 群より更に有意に成熟血管数の増加を認めた ($p < 0.05$)。

術後 5、14、28 日目での虚血下肢の HGF と VEGF 発現量を検討すると、Ad-HGF 群では、HGF は 5-14 日目まで対照群に比し有意に増加し、特に 5 日目では EPC 群と比較しても約 25 倍の発現量であったが ($p < 0.05$)、VEGF はいずれも対照群と有意差を認めなかった。EPC 群では、HGF は 5 日目のみ、VEGF は 5-28 日目まで持続的に対照群に比し有意に増加していた ($p < 0.05$)。術後 5 日目の HGF と VEGF 発現部位は、対照群および Ad-LacZ 群では血管内皮で認めた。これに対し Ad-HGF 群では、HGF は彌慢性に骨格筋細胞質内で強く発現していたが、VEGF は対照群と同様であった。EPC 群では、HGF、VEGF とも対照群と同様の所見に加え、毛細血管およびその周囲の骨格筋組織において高発現していた。

PKH-GL 標識 EPC は、移植後 1-3 日目まで筋線維束間に細胞塊を形成していたが、5 日目以降には徐々に拡散して分布し、その数も漸減し、28 日目にはごく僅かに散在していた。

考 察

血管新生療法は 1971 年に Folkman らが提唱した癌発育における「angiogenesis」の概念を嚆矢しており、その後の研究により血管新生の中心的役割を果たす VEGF が同定された。しかし、臨床応用には多くの課題が残されている。

マウス下肢虚血モデルを用いた本研究では、両治療群 (Ad-HGF 群、EPC 群) とも有意な血行改善効果と病理学的な血管新生を認めた。Ad-HGF 群では HGF 遺伝子だけの過剰発現により血行改善効果が得られたが、EPC 群では更に有意な成熟血管数の増加を認めており、複数の血管増殖因子の発現増加やその持続、およびその局所的な発現部位が、より機能的な血管新生に重要であることが示唆された。また移植 EPC の動態より、移植細胞の遊走能が血管新生に関与していることも示唆された。

また、これらの結果から、両治療法の併用により、目的部位での血管増殖因子過剰発現や移植細胞の機能亢進などの点で、今後の両治療法の改善につながる可能性も期待された。

結 論

マウス血管新生における遺伝子治療 (HGF 遺伝子導入) と細胞治療 (EPC 移植) を比較検討したところ、両者とも同等かつ有意な血行改善効果が得られた。また複数の血管増殖因子の相互関

連や発現時期、およびその発現部位が機能的な血管新生に重要であることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究はマウス下肢虚血モデル(片側大腿動脈結紮モデル)を用いて、アデノウイルスベクターによる肝細胞増殖因子遺伝子導入(Ad-HGF 群)と骨髄由来血管内皮前駆細胞移植(EPC 群)による血管新生治療の效果ならびにそのメカニズムを実験的に比較検討したものである。その結果、両治療群ともレーザードップラー血流計による血行評価や毛細血管レベルでの病理学的血管新生において同等の改善効果を得られたが、成熟血管数においてはEPC群でAd-HGF群よりも有意な増加が認められた。両治療法のメカニズムの違いとして血管増殖因子発現の量や時期およびその部位や、移植細胞の虚血組織内における分布が重要である可能性が示唆された。本論文の内容は、血管新生治療における遺伝子治療と細胞治療の效果およびメカニズムを詳細に比較検討し、今後の両治療法の改善に重要な示唆を与えており、明らかに学術水準を高めたものと認める。