

平成18年12月

# 杉原志伸 学位論文審査要旨

主査	重政千秋
副主査	井藤久雄
同	久留一郎

## 主論文

骨髄単核球細胞の血管新生能に及ぼす加齢の影響

(著者：杉原志伸、山本康孝、松浦 隆)

平成18年9月 米子医学雑誌 57巻 190頁～199頁

# 学 位 論 文 要 旨

## 骨髄単核球細胞の血管新生能に及ぼす加齢の影響

現在、重症下肢虚血性疾患に対して自己骨髄単核球細胞（BM-MNC）移植による血管新生療法が広く行われ始めており高い治療効果が報告されている。しかし細胞移植治療の対象患者は高齢者が多く、動物実験においては、加齢マウスでは虚血後の血管新生反応が遅延することが報告されているが、骨髄単核球細胞自体に及ぼす加齢の影響の検討は現在まで報告されていない。本研究は若年、高齢マウスのBM-MNCの血管新生機能を比較検討し、血管新生に及ぼす加齢の影響を探求することを目的とした。

### 方 法

8週齢の若年、18ヶ月齢の高齢のC57BL/6J雄マウスを用いて、右下肢の大腿動脈を結紮、抜去して片側下肢虚血モデルを作成した。細胞移植に使用するBM-MNCはマウスの両大腿骨と脛骨より採取し、Ficol-Paque Plusを用いて単核球分画を遠心分離後、マウス1匹につき、BM-MNC  $1 \times 10^6$  個細胞移植群、 $5 \times 10^6$  個細胞移植群、生食投与群（細胞非移植群、コントロール）の3群に分け、下肢虚血マウスの右大腿部に筋肉内投与した。虚血後ならびにBM-MNC移植後血管新生効果について、laser Doppler blood flow解析器を用いた血流回復、CD31抗体による免疫組織染色による血管新生数、虚血筋肉中の血管増殖因子〔vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF)〕発現をもって評価した。一方、細胞移植に用いる若年、高齢マウスの培養BM-MNC各々について、血管増殖因子（VEGF、HGF）産生能、VEGF、HGF添加後BIOCOAT cell culture insertsを用いて測定した細胞遊走能、DiI-acLDLおよびlectin2重染色陽性細胞である血管内皮細胞（endothelial progenitor cell : EPC）数を測定した。

### 結 果

虚血後の血管新生を比較したところ血流回復、新生血管数とも若年群と比較して高齢群で有意に減少しており、虚血筋肉中の増殖因子はVEGFが高齢群で有意に低下していた。若年、高齢各々から採取したBM-MNCを若年の下肢虚血レシピエントマウスに移植すると若年のBM-MNC移植群と比較して高齢BM-MNC移植群は血流回復、新生血管数、VEGF発現量いずれも有意に低下していた。一方、BM-MNC培養液中のVEGF産生能、VEGFによる細胞遊走能、培養液中のEPC含量も若年に比べ、高齢BM-MNCで有意に減少していた。次に若年BM-MNCを高齢

の下肢虚血レシピエントマウスに移植し、加齢個体がBM-MNCに与える影響について検討したが、若年BM-MNC移植群はコントロールと比較して、血流回復、血管新生能、虚血筋肉中のVEGF産生能を有意に増強していた。

## 考 察

本研究において虚血後血管新生，ならびにBM-MNC移植後血管新生に関して若年群と高齢群で比較検討した。

加齢に伴い虚血後の血管新生が減弱することは以前から幾つかの報告があり、その一因として高齢個体の増殖因子の産生低下が考えられている。今回の検討でも高齢個体のVEGF産生低下が示され、同様の結果が得られた。

自己骨髄単核球細胞移植による血管新生効果は、移植細胞、被移植骨格筋という二つの因子を考慮して評価する必要があるが、これまで各々の因子に対しての加齢の影響を検討した報告はない。今回の細胞移植実験では若年BM-MNC移植群と比較して高齢BM-MNC移植群では血流回復、新生血管数、虚血筋肉中のVEGFが低下していることが示された。またin vitroの実験では、高齢BM-MNCは若年BM-MNCと比較してVEGF産生能、VEGFによる細胞遊走能が低下していることが示され、加齢に伴う細胞移植後の血管新生能の低下は移植されたBM-MNCの機能低下が一因である可能性が示唆された。また高齢BM-MNCは若年BM-MNCと比較してEPC数の減少がみられ、高齢個体における血管新生効果の減弱はEPC数の減少も一因であると考えられる。

次に高齢個体被移植骨格筋に、より血管新生能の高い若年BM-MNCを投与することにより、高齢虚血下肢の血管新生が亢進することが示された。加齢した筋肉では投与されるBM-MNCに対して過酷な環境であるが、今回の結果は移植された若年BM-MNCが投与された環境に影響を受けることなく血管新生能を発揮し得ることを示している。BM-MNC投与によって虚血筋肉中VEGFが増加しており、これが血管新生改善の一つの大きな要因と考えられる。すなわち加齢によって血管新生能の減弱した高齢個体においても、VEGF産生能の保たれた若年のBM-MNCを移植することで血管新生が改善することが示された。

今後、移植細胞の機能を改善する方法を詳細に検討することが臨床的な高齢者対象の細胞治療法の改善に役立つと考えられる。

## 結 論

加齢によって血管新生能は減弱するが、VEGF産生能の保たれた若年BM-MNCを移植することで高齢個体の血管新生は改善する。