

平成23年3月

# 原田真吾 学位論文審査要旨

主 査 久 留 一 郎  
副主査 重 政 千 秋  
同 西 村 元 延

## 主論文

心筋梗塞後心不全に対する平滑筋細胞シートの効果に関する実験的研究

(著者：原田真吾)

平成23年 米子医学雑誌 62巻 52頁～59頁

# 学 位 論 文 要 旨

## 心筋梗塞後心不全に対する平滑筋細胞シートの効果に関する実験的研究

重症心不全の新しい治療法として自己の骨格筋芽細胞や骨髄単核球細胞などを心筋に移植する再生型の治療が注目されている。従来、これら細胞の移植は注射針を用いた組織内への細胞注入によることが多かったが、この方法では移植細胞の低い生存率が問題であった。また細胞移植治療が効果を示す機序の一つに、移植細胞より分泌される各種の血管新生因子によるパラクライン効果があると考えられており、パラクライン作用の高い細胞種を選択することも重要である。最近、移植細胞の生存率を向上させる方法の一つとして移植する細胞を単層のシート状に培養し、細胞シートとして移植する方法が注目されている。この方法では細胞外マトリクスが保持されたまま移植されるため、細胞注入法に比して移植細胞の生存率が高いとされている。既に動物実験において、骨格筋芽細胞や脂肪組織由来の間葉系幹細胞の細胞シート移植により心不全が改善したとする報告が散見され、また骨格筋芽細胞シートを用いた臨床治験も開始されている。一方、平滑筋細胞は、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）や血管内皮増殖因子（VEGF）といった各種増殖因子を多く分泌することが知られており、平滑筋細胞注入移植が心不全に有効であったとする実験的報告もある。そこで本研究では、平滑筋細胞と細胞シートによる心筋細胞移植法に注目し、ラット虚血性心不全モデルにおける平滑筋細胞シートの心機能改善効果及びリモデリング抑制効果を検討した。

## 方 法

体重200-250 gのオスのLewisラットを用い、大動脈壁より血管平滑筋を、皮膚より線維芽細胞を単離・培養した。これら細胞をPKH-26にて標識した後、温度感受性細胞培養皿に播種し単層の細胞シートを作成した。ラット虚血性心不全モデルは、全身麻酔下にラット心の冠状動脈左前下行枝を結紮し心筋梗塞とすることにより作成した。心筋梗塞後7日目に平滑筋細胞シートあるいは線維芽細胞シートを心筋梗塞部に貼付・移植し、移植後28日で犠牲死させた。平滑筋細胞シート群、線維芽細胞シート群、および細胞シートを貼付せず開胸手術のみを行った細胞シート非移植群の3群において、心臓超音波検査による心機能評価、ならびに犠牲死後に摘出した心臓を用いて各種組織学的検討を行った。使用した細胞の増殖因子分泌能および低酸素条件への耐性を検討するため、ELISA法にてbFGF、VEGFの測

定を、フローサイトメトリーによりアポトーシスアッセイを行った。

## 結 果

心臓超音波検査による細胞シート移植後28日の時点での心機能は、線維芽細胞シート移植群ならびに細胞シート非移植群と比して平滑筋細胞シート移植群が有意に良好であった。組織学的検討による健常部心筋における心筋間質の線維化は、平滑筋細胞シート移植群が他の2群に比して軽度であった。また心筋梗塞境界領域における $\alpha$ -SMA陽性の血管密度は平滑筋細胞シート移植群において最も高かった。移植後28日における移植細胞生存率の検討では、平滑筋細胞シート移植群でPKH陽性細胞が層状に確認されたのに対し、線維芽細胞シート移植群ではまばらにしか観察されなかった。増殖因子分泌能の検討では、通常条件下では、平滑筋細胞と線維芽細胞の産生するbFGF量に差は認めなかったが、低酸素下条件では、平滑筋細胞の産生するbFGF量は経時的に増加し、培養48時間後では線維芽細胞に比して有意に高値であった。アポトーシスアッセイでは、低酸素下48時間培養後のAnnexin V陽性率は平滑筋細胞に比して線維芽細胞で有意に高く、平滑筋細胞は線維芽細胞に比して低酸素状態に耐性であることが示された。

## 考 察

本研究では心筋梗塞後のラット虚血性心不全モデルを用いて平滑筋細胞シート移植の効果について検討した。その結果、平滑筋細胞シート移植により心機能が維持され、また健常心筋部分における心筋間質の線維化が抑制された。この機序の一つとして、平滑筋細胞シートから分泌されたbFGFが $\alpha$ -SMA陽性の新生血管を増加させ、それにより心筋虚血を改善した可能性が考えられた。またin vitroでの低酸素条件下アポトーシスアッセイにおいて、平滑筋細胞で有意にAnnexin V陽性率が低く、線維芽細胞シートに比し平滑筋細胞シートにおいて移植細胞の生存率が高かった原因の一つと考えられた。これらより、平滑筋細胞シートは移植細胞の生存率が高く長期間にわたってパラクライン効果を維持し、それにより心筋梗塞境界部の心筋虚血を改善し、かつ健常部心筋における間質の線維化を抑制し得た可能性が示唆された。

## 結 論

平滑筋細胞シートは移植細胞の生存率が高く、パラクライン効果を長期間にわたって維持し、心筋梗塞後のリモデリングを抑制した。平滑筋細胞シート移植は、虚血性心不全治療に有用である可能性が示唆された。