

氏名(本籍)	すぎ もり はる ひこ 杉 森 治 彦 (千葉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博 甲 第 5832 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	<b>Endothelial Progenitor Cells with Low ALDH Activity Lend Efficient Neovascularization in Hind Limb Ischemia</b> (Alde-Low EPC を用いた虚血肢に対する血管再生治療の開発)
主査	筑波大学教授 博士(医学) 田 中 誠
副査	筑波大学教授 薬学博士 原 田 義 則
副査	筑波大学准教授 博士(医学) 長谷川 雄 一
副査	筑波大学講師 博士(医学) 酒 井 俊

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

筑波大学再生医学研究室において aldehyde dehydrogenase; ALDH の低活性の血管内皮前駆細胞 endothelial progenitor cells; EPC は増殖能に優れ、低酸素下に血管新生因子を発現し、マウス皮膚虚血モデルを用いて皮膚壊死を治癒することが実証された。この ALDH 低活性の EPC は Alde-Low EPC と命名されたが、この新たな EPC の subgroup を虚血性疾患に対する治療に臨床応用するには、下肢などの筋肉を主体とする臓器等における虚血改善能を明らかにしなければならない。

### (対象と方法)

4～5 週齢の ICR スードマウスを用いて、左大腿動脈を静脈および神経から剥離し、総大腿動脈中枢側から伏在動脈中央部までの動脈のみを切除し後脚虚血モデルを作成した。帝王切開術の際に採取した臍帯血から、再生医学研究室により EPC が分離・培養された。PBS のみを投与した群 (PBS 群)、Alde-High EPC を投与した群 (Alde-High 群) および Alde-Low EPC を投与した群 (Alde-Low 群) の 3 群に対して、虚血モデル作成の翌日に PBS 200  $\mu$ L あるいは EPC を尾静脈から全身投与した。また、レーザードプラ血流計を用いて、経時的に後脚血流を測定した。虚血側血流を健常側血流で除した値を blood flow ratio として示した。高エネルギー加速器研究機構において放射光微小血管造影をおこない側副血管の発達を観察した。側副血管網の定量的な評価として angiographic score を用いた。側副血管の径は NIH image により測定した。F4/80 免疫染色法により細動脈周囲に集積した単球/マクロファージを定量的に評価した。蛍光標識レクチン染色法を用いて蛍光顕微鏡下に毛細血管密度を測定した。GFP 遺伝子を導入した EPC を用いて組織内に生着した EPC を観察し定量化した。その他、各種血管新生因子の発現に関して RT-PCR 法を用いて解析をおこなった。

### (結果)

Alde-Low 群では PBS 群と比較して投与後 7 日、10 日、28 日目において有意に高い blood flow ratio を示した。Alde-Low 群と Alde-High 群との比較においては、統計学的な有意差には至らなかったものの、Alde-Low 群

では一貫して Alde-High 群よりも高い blood flow ratio を示した。Alde-High 群の blood flow ratio は、PBS 群との比較において、有意差を示さなかった。投与後 4 週目に放射光微小血管造影をおこなった angiographic score は、Alde-Low 群において有意に高値を示した。また側副血管の径を測定したところ、Alde-Low 群においては有意に側副血管が拡張していた。投与後 5 日目に Alde-Low 群では細動脈周囲に有意に多くの F4/80 陽性細胞の集積を認めた。投与後 2 週目には各群間の毛細血管密度に有意差は認められなかったが、投与後 4 週目においては Alde-Low 群における毛細管密度が、PBS 群および Alde-High 群と比較して有意に高値を示した。毛細血管に生着した Alde-Low EPC は、投与後 2 週目から 4 週目にかけて統計学的有意な減少を認めなかった。しかし、毛細血管に生着した Alde-High EPC は有意に減少した。

#### (考察および結論)

Alde-Low EPC による arteriogenesis の発達には、MCP-1 を介する細動脈周囲への単球／マクロファージの遊走が関与し側副血管を形成・拡張させていること、angiogenesis の発達には VEGF に加えて Ang-2, PDGF- $\beta$ , b-FGF が関与し毛細血管密度を上昇させていると考えられた。本研究により Alde-Low EPC が arteriogenesis と angiogenesis という異なる血管形成の機序を介してマウス後脚虚血モデルにおける血流回復に作用しているという結果が得られた。これらの特性やメカニズムがさらに明らかとなれば、ALDH 活性に基づく EPC の分離は末梢動脈閉塞性疾患をはじめとする虚血性疾患に対して有望な細胞治療となりうる可能性を示唆するものである。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究の結果、二つの異なる特性の EPC が Arteriogenesis と Angiogenesis という異なる機序を介してマウス後脚虚血モデルにおける血流回復に作用していることを示している。移植後の細胞の長期生存を世界に先駆けて示した点は画期的であり、さらなるメカニズムが明らかになれば、ヒトにおける末梢動脈閉塞性疾患の新たな治療に結びつく貴重な基礎研究と考えられた。

論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。