

[50]

氏 名 (本籍)	ふく だ しん いち 福 田 慎 一 (富 山 県)		
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	博 甲 第 6326 号		
学位授与年月日	平成 24 年 7 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	機能性が高い血管内皮前駆細胞の網膜色素変性症モデルマウスへの投与効果の検討		
主 査	筑波大学教授	理学博士	岡 村 直 道
副 査	筑波大学准教授	博士 (薬学)	長谷川 潤
副 査	筑波大学講師	博士 (医学)	佐 藤 藤 夫
副 査	筑波大学講師	博士 (医学)	石 川 栄 一

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

網膜色素変性症は、日本において中途失明の三大原因の一つであり難病特定疾患に認定されている遺伝病であるが、現在確実な治療法が存在しない。頻度は約 4,000 人から 8,000 人に一人と言われており、視細胞の一つである杆体細胞が主に障害され、網膜血管の委縮も徐々に進行していく。初期には夜盲を自覚し、徐々に視野狭窄を示し、視覚関連 QOL を低下させる。症状が進行すると視力の低下や色覚異常をきたし、失明に至る場合もある。

現在、血管内皮前駆細胞 (EPC) を用いた虚血性疾患に対する細胞治療の有効性について報告されている一方で、期待したほどの効果が得られていないとの報告もなされている。即ち EPC は、均一の集団ではなく、その中に虚血改善能の低い EPC も含まれていることを示唆するものである。本研究は Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性を指標とし、機能性の高い EPC の分離を試み、それを神経変性疾患であるとともに血管委縮性疾患でもある網膜色素変性症モデルマウスへ投与して血管・神経保護作用について検討を行うことを目的として行われた。

### (対象と方法)

ALDH 活性をマーカーとして EPC を酵素活性の高い群 (Alde-High) と低い群 (Alde-Low) に分けて培養を行う。培養した Alde-Low あるいは Alde-High EPC を生後 6 日の網膜色素変性症モデルマウスである C3H 系マウスの硝子体内および網膜下に注入する。注入後、時系列を追って病理学的組織解析および免疫染色を用いてマウス網膜視細胞数、網膜浅層・深層における血管評価を行う。

組織学的解析により Alde-Low EPC を投与した網膜には大量のマクロファージが遊走してくる事が明らかとなった。機能性の高い Alde-Low EPCs は単球遊走因子である CCL2 を高発現していた。そこで、Alde-Low EPCs に対し shRNA を用いて CCL2 の発現を低下させた。一方、機能性が低く CCL2 の発現が低い Alde-High EPCs に対し CCL2 を過剰発現させた。また、マクロファージの機能を低下させるために Clodronate liposome を Alde-Low EPCs と共に注入した。

## (結果)

Alde-Low EPC 投与群では、有意に血管委縮及び神経変性に至る速さを抑制した。さらに視細胞層におけるアポトーシスを有意に抑制した。shRNA を用いて CCL2 の発現を低下させた Alde-Low EPC 投与、Clodronate liposome および Alde-Low EPC 投与群ではそれぞれ血管・神経保護作用は低下した。CCL2 を過剰発現させた Alde-High EPC 投与では血管・神経保護作用が回復した。

## (考察)

網膜色素変性症の治療法に関して、遺伝子治療、網膜移植、人工網膜などの研究が主として動物実験で行われている。そのうちのひとつとして造血幹細胞 (HSC) が含まれている骨髄を網膜色素変性症のモデルマウスの硝子体に注入することにより視細胞の変性の一部をくい止める事が報告された。骨髄には造血幹細胞以外に、EPC が含まれており、EPC が網膜血管の委縮を抑制し、血流が保たれることにより神経保護因子の枯渇が抑制され視細胞の変性の一部をくい止めるのではないかと推測されている。

現在、虚血性疾患治療に用いている EPC 採取方法は、CD34 陽性細胞を分離し使用する方法、細胞を分画せずに全体を使用する方法の 2 通りであるがまだ画期的な効果が上がっているとは言い難い。EPC には階層性があり、未分化で増殖能の高い EPC と低い EPC が混在していることは知られていたが、増殖性の高い EPC を分離するのに有効なマーカーについての報告はなかった。本研究では、先ず、ALDH 活性の低い EPC において細胞増殖能が高いことを明らかにした。更に、Alde-Low EPC を硝子体内注射および網膜下注射することにより、血管委縮および神経変性に至る速さが抑制されることを明らかにした。一方 Alde-High EPC は血管委縮および神経変性に至る速さを抑制しなかった。また、Alde-Low EPCs は単球遊走因子である CCL2 を高発現しており、Alde-Low EPC を投与した網膜には大量のマクロファージが遊走してくる事が分かった。

CCL2、別名 Monocyte chemoattractant Protein 1 (MCP1) は、CC サブファミリーの一員であり網膜の炎症・障害・慢性的な病態において単球・マクロファージや好塩基球の遊走を引き起こす。これまで EPC 自体 CCL2 を多く分泌していると報告されているが、その役割・機能については不明な点が多かった。近年、CCL2 自身が微弱な神経保護効果を持つ事が報告されているが、Clodronate liposome により Alde-Low EPC の神経・血管保護効果が消失した結果より、Alde-Low EPC による血管・神経保護効果は、直接 CCL2 自身の作用によるものではなく遊走してきたマクロファージによるものと考えられた。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、先ず、ALDH 活性を指標として機能性の高い EPC の分離を試み、Alde-Low EPC において増殖能・虚血改善能が高いことを明らかにし、さらに、機能性が高い Alde-Low EPC による血管・神経保護作用に CCL2 の分泌およびマクロファージの遊走が関与している可能性を初めて示した。これらの知見は、Alde-Low EPC を用いた網膜色素変性症の細胞治療の有効性をその分子機序とともに示すものであり、高く評価できる。

平成 24 年 6 月 4 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、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。