

おざわたくや	
氏名	小澤拓也
学位	博士(医学)
学位記番号	新大院博(医)第31号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	赤芽球造血による血管新生作用一血管再生療法の治療成績向上を目指した基礎的研究
論文審査委員	
	主査 教授 相澤義房
	副査 教授 内藤眞
	副査 教授 林純一
博士論文の要旨	
【背景】骨髄単核細胞移植治療(BMI)による血管再生療法は重症下肢虚血に対して有効性が示されているが、さらなる治療成績の向上が望まれる。BMIで虚血組織に移植される成分は血管前駆細胞およびサイトカイン産生細胞を含有する。このうち赤芽球は遊走能をもたず、従って正常骨髄組織では液性因子を分泌し恒常に新生血管を赤芽球島へ誘致することで末梢血流へ供給されることが推測される。この性質を利用し BMI にエリスロポエチン(EPO)投与を併用することで移植片に含まれる赤芽球を活性化し血管再生効果を増強することを目的とし、赤芽球による <i>in vitro</i> での血管新生効果を検討した。	
【方法と結果】	
<i>in vitro</i> 血管新生モデルとして、ヒト血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養を施行し、その管腔形成を観察した。この共培養系にヒト末梢血から作製した赤芽球コロニー(BFU-e)もしくは白血球系コロニー(CFU-c)を添加した。培養11日目に抗CD31抗体を用いて血管内皮を染色し、血管内皮の面積から血管新生能を評価した。BFU-eの添加によって用量依存性に血管新生効果が増強し、EPO添加によりさらに血管面積の増加を認めた。CFU-cにはこの作用はなかった。BFU-e存在下では培養上清中VEGF、PIGF濃度はともに増加しEPOの添加によってさらに増強した。CFU-cはVEGF、PIGF産生に影響しなかった。抗PIGF抗体の添加はBFU-eによる血管新生効果に影響しなかったが、可溶性VEGFレセプターの添加ではBFU-eによる血管新生効果が中和された。さらに興味深いことに、BFU-eを中心に集簇した血管ネットワークの著しい造成が観察され、骨髄造血における赤芽球島への血管の誘致が <i>in vitro</i> で再現された。この効果はEPOの添加によりさらに増強した。	
次にヒト骨髄細胞の血管新生因子産生を浮遊培養系で測定した。健常人から骨髄を採取し、比重遠心法によって単核球成分を分離し、PE標識抗CD235a抗体とmagnetic cell sorting systemを用いて赤芽球と非赤芽球細胞に分離した。各分画 $1 \times 10^6 / ml$ を10%FBSを含むRPMI1640メディウムでrhEPOもしくはrhG-CSFを添加して4日間培養	

し、上清および細胞成分を回収しサイトカイン濃度および mRNA 発現レベルを測定した。骨髓単核細胞は VEGF と PI GF を産生したが、主な分泌細胞は赤芽球であり、非赤血球系細胞による産生は弱く、特に PI GF は赤芽球のみが分泌していた。この作用は EPO の添加でさらに増強した。

【結語】赤芽球系細胞は VEGF（内皮増殖）と PI GF（平滑筋増殖）を産生することで血管新生を誘導し、EPO 添加によりその効果が増強することが示された。臨床応用として、EPO 併用 BMI 治療は移植局所において赤芽球によるサイトカイン分泌を増強することで臨床効果を高める可能性が示された。

審査結果の要旨

骨髓単核細胞移植治療 (BMI) による血管再生療法は重症下肢虚血に対して有効性が示されている。申請者は、*in vitro* 血管新生モデルで、赤芽球コロニー (BFU-e) と erythropoietin (EPO) の血管新生能を評価した。

BFU-e の添加によって用量依存性に血管新生効果が増強し、EPO 添加により血管面積がさらに増加した。CFU-c にはこの作用はなかった。BFU-e 存在下では培養上清中の内皮増殖因子 (VEGF)、平滑筋増殖因子 (PI GF) 濃度はともに増加し EPO の添加によってさらに増強した。CFU-c は VEGF、PI GF 産生に影響しなかった。可溶性 VEGF レセプターの添加で BFU-e による血管新生作用が中和された。BFU-e を中心に集簇した血管ネットワークの著しい造成が観察され、EPO の添加によりさらに増強した。

次に健常人から骨髓を採取し赤芽球と非赤芽球細胞に分離した。各分画 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ を 10% FBS を含む RPMI1640 メディウムで rhEPO もしくは rhG-CSF を添加して 4 日間の培養すると、赤芽球による VEGF と PI GF の産生を認め、EPO で増強された。非赤血球系細胞では産生は弱かった。

赤芽球系細胞は VEGF と PI GF を産生して血管新生を誘導し、EPO はその効果が増強した。これらの有意義な知見を示した点に学位論文としての価値を認める。