

	おだ まさと
氏 名	小田 雅人
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第250号
学位授与の日付	平成20年3月24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	体外増幅自己赤芽球を用いた血管再生治療に関する基礎的研究
論文審査委員	主査 教授 相澤 義房 副査 教授 林 純一 副査 教授 中田 光

博士論文の要旨

【目的】

日米欧の先進諸国においては、心血管系・中枢神経および他の臓器における虚血性障害が死因の過半を占めており、これらの疾患が血管再生治療の潜在的な適応疾患と位置づけられる。臓器移植が困難な我が国においては血管再生治療法の開発は特に重要な課題の1つと考えられる。既に血管再生治療が循環器系虚血性疾患に対する先端的治療法として試みられ、現在では標準的治療法の開発競争の段階に至っている。血管新生療法には大きく2つの流れがある。すなわち血管新生サイトカインやその遺伝子を導入することで血管新生を促す「サイトカイン療法」と、末梢血単核細胞や骨髄細胞を虚血局所に移植することで血管前駆細胞およびサイトカイン産生細胞を供給する「細胞療法」である。

これらの血管再生治療法の中で現在最も広く行われているものは、自家骨髄細胞移植療法 (BMI) であり、当施設でもこれまでに40例以上で施行した。本治療は8割以上の患者に有効で、当初は画期的な治療として認識された。しかしながら症例の中には、本治療後も血流量の改善が小さく、臨床的治療効果およびQOLの改善も必ずしも十分とはいえない例が少なからず存在することが次第に明らかとなってきた。またBMI治療では全身麻酔下に500から1,000mlの骨髄を採取するなど患者自身への侵襲が大きいことなど多くの問題が存在し、より洗練された治療法の開発が望まれた。

我々はBMIによる血管新生において、移植骨髄中に含まれる赤芽球とマクロファージが主要な役割を果たしていることを報告した。骨髄には造血幹細胞や前駆細胞が含まれ、少量の骨髄から体外増幅培養によって赤芽球とマクロファージの浮遊液を得る方法を開発すれば、新たな治療法となりうると考え、Neildez-Nguyenらの3段階培養法を参考にして、強い血管新生能力を有する赤芽球とマクロファージの混合物を得るための体外増幅法の検討を行った。

【方法と結果】

1. ヒト骨髄から比重遠心法と免疫磁気ビーズ法を用いて低比重の前赤芽球/青染色赤芽球・中比重の多染性赤芽球・高比重の成熟赤芽球を精製し、CD34 陽性細胞と比較した。VEGF・PLGF・PDGF・FGF-2 の血管増殖因子群は、ヘモグロビン合成開始前後の未熟な赤芽球である低比重細胞に最も強く発現していた。
2. 未熟赤芽球を増幅培養する条件について検討した。ヒト骨髄 MNC を第1段階で rhFlt-3L・rhSCF・rhTPO の3種のサイトカインの存在下に、第2段階で rhEPO・rhSCF・rhIGF-I の3種のサイトカインの存在下で培養した。また rhEPO・rhIGF-I の2種のサイトカインの存在下で第3段階の培養も行った。メイ・ギムザ染色像の所見では、第1段階培養の終了時には帰属不明の骨髄系芽球様形態を示す細胞とマクロファージが主な構成成分であったものが、第2段階培養の終了時には主に前赤芽球に分化するとともに一部にマクロファージを混じり、第3段階培養の終了時にはヘモグロビン合成が進行していた。VEGF および PLGF の蛋白発現と mRNA 発現は第2段階培養の終了時に強く誘導され、第3段階培養で減少した。以上のことから、2段階の培養で目的とする未熟赤芽球が得られ、第3段階の培養によって赤芽球をさらに分化させることは本目的には則さないことが分かった。次に第1段階の培養日数を7-10日間、第2段階の培養日数を4-7日間として比較を行った。細胞総数では、第1段階の培養日数を延長しても大きな効果は見られず、また第2段階の培養日数を短縮すると細胞数の増加が著しく損なわれることがわかった。VEGF および PLGF の蛋白発現と mRNA 発現は、細胞総数とほぼ同様の分布を示した。PDGF- β などの mRNA 発現はこれらと鏡像をなす分布を示した。このことから、第1段階の培養日数を7日間、第2段階の培養日数を7日間とすることが適切であると考えた。
3. この方法で得られた体外増幅赤芽球の移植による血流改善効果を、マウス下肢虚血モデルの治療実験を用いて評価し、骨髄細胞移植の効果と比較した。1 x 10⁶ コの体外増幅赤芽球の移植は、1 x 10⁶ コの骨髄細胞移植より良好な血流改善効果を示し、その作用は1 x 10⁷ コの骨髄細胞移植に匹敵した。

【結論】

ヒト骨髄中に存在する赤芽球のうち最も血管新生作用の強い細胞は、ヘモグロビン合成開始前後の未熟な赤芽球であった。このような未熟赤芽球を、少量の骨髄から体外増幅によって得る培養法を樹立した。体外増幅赤芽球の移植による血流改善効果は、従来の骨髄細胞移植より強力であった。本治療法は本学に設置の倫理委員会および本病院に設置の IRB の承認を受け、第 I/II 相臨床試験を開始し、これまでに本治療法を施行した2例では良好な結果を得ている。また本治療法は米国に設置の臨床試験登録センター“IRSCN”に公開されている。症例数を増やして報告する予定である。

(論文審査の要旨)

申請者らはこれまでに重症動脈閉塞症 40 例以上で自家骨髄細胞移植療法 (BMI) を施行したが、効果不十分な例が存在し、多量に骨髄採取するなどの問題もあった。一方、BMI による血管新生には移植骨髄中の赤芽球とマクロファージが主要な役割を果たしていることを報告してきた。そこで申請者は少量の骨髄を用い体外増幅法により強い血管新生能力を有する赤芽球とマクロファージの混合物を得るための検討を行った。

方法と結果。1. 成熟度の異なる赤芽球で血管増殖因子の mRNA を定量評価すると、未熟な赤芽球ほど血管増殖因子群を強く発現していた。2. 未熟赤芽球をより有効に増幅できる培養条件について検討し、2 段階での培養が適切であった。3. マウス下肢虚血モデルで体外増幅赤芽球移植により、同量の CD34 を指標にした骨髄細胞移植より良好な血流改善効果が得られ、その効果は約 10 倍量の骨髄細胞移植に匹敵した。

結論。血管新生作用の強い未熟赤芽球を用いて体外増幅法を樹立した。本治療法は本学の倫理委員会および本病院の IRB の承認を受け第 I/II 相臨床試験が開始となったが、これは国際臨床試験登録センター “IRCTN” に公開されている。

以上、BMI 治療の有効性を高めるための赤芽球の役割と増幅による臨床応用への可能性を示した点に学位論文としての価値を認める。