

氏 名	皆 川 史 郎
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第196号
学位授与の日付	平成19年 3月22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	アジアロエリスロポエチンの血管新生作用に関する研究

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 内 藤 眞

博士論文の要旨

【背景】 閉塞性動脈硬化症や心筋梗塞などの慢性臓器虚血に対して自己骨髄細胞移植 (BMI) 等による血管新生治療が試みられ一定の効果が示されているが、重症虚血患者に対する効果は不十分である。我々はこれを改善する目的で一連の基礎研究をおこない、BMI による血管新生の機序を明らかにする過程で、赤血球系造血因子のエリスロポエチン (EPO) に血管新生作用があることを見いだしたが、その作用は十分に大きいとは言えず、また EPO 本来の造血作用による多血症等の副作用を来す。そこで EPO 代謝産物の 1 つであるアジアロ EPO (AsEPO) に着目し、血管新生治療への応用の可能性を探った。

【方法】 8 週齢の ICR マウスを用い、大腿動脈起始部の結紮により下肢虚血を作成した。同系マウス的大腿骨より骨髄を採取し、マウス 1 虚血下肢あたり 1×10^7 個の骨髄有核細胞を 4 カ所にわけて筋肉内投与した (BMI ; B 群)。BMI のかわりにメディウム 0.2 ml を使用したものをコントロールとした (C 群)。EPO および AsEPO は一回投与量が 400 IU/kg BW となるように同メディウム 0.2 ml に希釈して用いた。EPO または AsEPO 併用 BMI は、 1×10^7 個の骨髄細胞を EPO または AsEPO (400 IU/kg BW) を含む同メディウム 0.2 ml に浮遊して筋肉内投与し、さらに 24・48・72・96・120 時間後に EPO または AsEPO のみの筋注を行った (BE 群および BA 群)。また BMI のかわりに EPO または AsEPO のみの筋注を行い、さらに 24・48・72・96・120 時間後に EPO または AsEPO のみの筋注を行った (E 群および A 群)。下肢の壊死脱落をマーカーに下肢の生存曲線を

比較した（各群 N = 13）。また虚血作成 6 日後の下肢でレーザードップラーによる血流の測定を行い、さらに大腿二頭筋標本を作製し血管の数を測定し比較した（各群 N = 5・7）。健常マウスに 40、400、4,000 IU/kgBW の EPO または AsEPO の単独投与を行い、Hb 値 (g/dl)、Hct 値(%)、網状赤血球比率(Ret %)、脾臓の重量を測定し造血作用を比較した。

【結果】C 群では 7 日目までに 12 個体（92.3%）で脱落壊死が見られ、1 個体は 16 日目にチアノーゼから回復した。E 群では 16 日目までに 12 個体（92.3%）で脱落壊死が見られ、1 個体は 16 日目にチアノーゼから回復した。A 群では 10 日目までに 8 個体（61.5%）で脱落壊死が見られ、5 個体は 22 日目までにチアノーゼから回復した。生存曲線の差の検定ではこの 3 群の全ての間で有意差が見られた。B 群では 5 日目までに 8 個体（61.5%）で脱落壊死が見られ、5 個体は 18 日目までにチアノーゼから回復した。BE 群では 6 日目までに 6 個体（46.2%）で脱落壊死が見られ、7 個体は 10 日目までにチアノーゼから回復した。BA 群では 14 日目までに 4 個体（30.8%）で脱落壊死が見られ、5 個体はチアノーゼを示さず、チアノーゼに陥った 8 個体のうち 4 個体は 24 日目までにチアノーゼから回復し、回復の見られなかった数はわずか 4 個体であった。生存曲線および回復曲線で B 群と BA 群の間に有意差が見られた。下肢虚血作成 6 日後のレーザードップラーによる flux 比では、単独治療群では、C 群： 0.087 ± 0.045 、E 群： 0.141 ± 0.082 、A 群： 0.187 ± 0.154 で、C 群と A 群の間に有意差が見られた。BMI 併用治療では、B 群： 0.159 ± 0.116 、BE 群： 0.227 ± 0.095 、BA 群： 0.299 ± 0.178 で、3 群間に有意差が見なかったが、無治療の C 群と比較すると BE 群（ $p = 0.0311$ ）および BA 群（0.0009）では有意な血流増加が認められた。下肢虚血作成 6 日後にレーザードップラー測定後作成した大腿二頭筋組織の観察において、骨格筋線維 1 本あたりの血管数を比較したところ、単独治療の結果は、C 群： 0.50 ± 0.34 、E 群： 0.61 ± 0.32 、A 群： 2.83 ± 1.13 で、A 群で有意に多数の血管が観察された。BMI 併用の結果は、B 群： 1.43 ± 0.38 、BE 群： 1.64 ± 0.32 、BA 群： 4.45 ± 2.02 で、やはり AsEPO に強い血管新生効果が観察された。造血作用に関しては、EPO では用量依存性の多血症が観察されたが、AsEPO では 4,000 IU/kg の 6 日間投与でも多血症は見られず、造血活性は自然型 EPO の 1/100 ないしそれ以下であると推測された。

【結論】AsEPO は単独で BMI に匹敵する強い血管新生作用を示すと同時に、副作用としての赤血球造血活性が極めて低いことが示された。AsEPO は体内に存在する生理的物質であることから、血管再生療法における実用化に大きな期待が持てることが示された。

(論文審査の要旨)

閉塞性動脈硬化症や心筋梗塞に対し、自己骨髄細胞移植 (BMI) 等による血管新生治療が試みられているが、効果は不十分である。申請者らはエリスロポエチン (EPO) に血管新生作用があることを見だし、その代謝産物であるアシアロ EPO (AsEPO) に着目し、血管新生治療への効果を検討した。

8 週齢のマウスに大腿動脈起始部の結紮により下肢虚血を作成し、同系マウスの骨髄を採取し、マウス 1 虚血下肢あたり 1×10^7 の骨髄有核細胞を 4 カ所にわけて筋肉内投与した。また 400 IU/kgBW の EPO または AsEPO の単独又は同時投与を行った。各治療群で下肢の生存曲線、レーザードップラーによる血流、大腿二頭筋内の血管数を比較した。EPO または AsEPO の造血作用も比較した。

AsEPO は EPO と比較して、単独投与でも BMI との併用でも、下肢の生存・血流の改善・血管数において有意な増加を示した。EPO は既知の赤血球造血活性を示したが、AsEPO は 4,000 IU/kgBW の超高容量の投与によっても赤血球造血活性を示さなかった。

AsEPO は強い血管新生作用を示し、赤血球造血活性が極めて低いことが示された。AsEPO は元来体内に存在する生理的物質であることから、血管再生治療で有用と思われた。以上の新規の知見を明らかにした点に学位論文として価値を認める。