

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	河本 徹
<p>学位論文題目</p> <p><i>Ex vivo</i> Augmentation of Proangiogenic Potential of Human Peripheral Blood-derived Angiogenic Monocytes by Thrombopoietin (Thrombopoietinは、ヒト末梢血由来血管誘導性単球の血管新生誘導能を<i>ex vivo</i>で増強する)</p> <p>共著者名</p> <p>河本徹 杉山祥晃 中村和正 笹島順平 水上裕輔 蘆田知史 高後裕</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>末梢血または骨髄単核球には血管新生能を有する分画があり、虚血疾患を対象とした臨床試験 (TOPCARE-AMI)で、その治療効果が示されている (引用文献1)。我々はマウス骨髄由来培養単核球の膵臓がん動物モデルへの移植が、異常な腫瘍血管の正常化と、血流増加に伴う低酸素環境の改善を誘導し、抗がん剤抵抗性を克服させる可能性を示した (参考文献1)。しかし、これらの血管新生誘導作用を有する前駆細胞を短期間に十分量得るための、臨床応用に耐えうる効率的<i>ex vivo</i>培養法は未だに確立されていない。トロンボポイエチン (TPO) は巨核球分化・血小板分泌に重要な因子であるが、骨髄における造血幹細胞の増殖および<i>in vivo</i>の血管新生促進作用も報告されている (引用文献2)。本研究では、TPOが血管新生能を有する単核球を<i>ex vivo</i>で誘導するという仮説を立て、各種血管新生療法のトランスレーショナルな臨床応用に耐えうる新規無血清培養法を開発することを目的とした。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. 細胞培養と分離</p> <p>健康人の末梢血から単核球を分離し、X-VIV015 (Lonza) に、自家血清、VEGF (Peprotech)、bFGF (Peprotech)、又はTPO (協和発酵キリン株式会社より供与) の濃度を順次変えて添加し、4</p>			

日間培養を行った。CD11b陽性細胞の分離はAutoMACSシステム (Miltenyi Biotec)を用いた。

2. アセチルLDL染色と食作用の評価

培養後4日目に、DiI標識アセチル化LDL(Biomedical Technology Inc)および Vybrant™ Phagocytosis Assay Kit(Invitrogen)を用いてそれぞれの取り込みを評価した。

3. フローサイトメトリー

培養後の単核球細胞のFcレセプターをブロック後、各種市販の表面抗原抗体を用いて標識し、BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson)で解析した。

4. 定量的リアルタイムPCR

RNeasy Mini kit(Qiagen)で total RNAを抽出、High Capacity cDNA Archive kit(Applied Biosystems)でcDNAに変換し、TaqMan Gene Expression Assay(Applied Biosystems)を用いて各種血管新生関連因子の発現を評価した。

5. リン酸化STAT5の核内移行の評価

TPOシグナル伝達経路の下流に位置するリン酸化STAT5の核内移行を市販の抗リン酸化STAT5特異的抗体(Cell Signaling)を用いて細胞免疫染色を行った。

6. 下肢虚血マウスモデル

8週齢のBALB/Cヌードマウスの右大腿動静脈を麻酔下で結紮し下肢虚血モデルを作製した。
①対照群 (PBS局注)、②未培養CD11b+単核球移植群、③TPO無添加培養CD11b+単核球移植群、④TPO添加培養CD11b+単核球移植群の4群に分け、調整した細胞を下肢虚血筋肉内に直接注射した後、移植による血流改善効果をレーザードプラー法 (Moor Instruments)で評価した。また、BS-I lectin(Vector)による免疫染色で治療後の機能血管を評価した。

成 績

1. 無血清培養の確立

ヒト末梢血由来の単核球をX-VIVO15培地、20%自家血清、1ng/ml VEGFで培養すると、大小2種類の接着細胞が得られた。自家血清濃度の減少により接着細胞数は減少したが、VEGF濃度の上昇とbFGFの添加により、FibronectinコートなしでもSphere形態をとる単球由来と思われる大型の細胞が得られ、無血清化に成功した (X-VIVO15、50ng/ml VEGF/bFGF)。

2. 培養細胞の機能、表面抗原、血管新生関連遺伝子発現の評価

無血清培養で得られた大型の細胞はDiI標識アセチル化LDLを取り込み (80.6±0.6%)、食

作用を示した (78.3±5.1%)。これらはCD11b、CD14、CD31が陽性で、単球/マクロファージ系の細胞と考えられた。一方小型の細胞はCD3、CD4陽性であることからリンパ球系の細胞であると考えられた。そこで大型の培養単核球に注目し、培養後に分離したCD11b+単核球の血管新生関連因子の発現解析を行ったところ、CXCR4、TPO受容体であるcMplの発現が未培養CD11b+単核球と比較し有意に亢進していた。

3. 無血清培養におけるTPO添加の効果

TPOの無血清培養への効果を評価するためにTPO添加量を変え、無血清培養を行ったところ、TPOの増加に伴い単球から構成されるsphereの数及び大きさが増した。またTPO添加培養ではリン酸化STAT5の核内移行の誘導を認め、cMplを介したシグナルの活性化が確認された。さらにTPO添加により培養CD11b+単核球のCXCR4、IL-8、vasohibin2の発現が有意に亢進した

4. 下肢虚血マウスモデルにおける培養CD11b+単核球移植の効果

下肢虚血マウスを用い、①対照群 (PBS局注)、②未培養CD11b+単核球移植群、③TPO無添加培養CD11b+単核球移植群、④TPO添加培養CD11b+単核球移植群の4群に分け、移植効果を評価した。下肢自然脱落または下肢壊疽は①100%、②66.7%、③66.7%、④0%に認められ、④群で著明な効果を示すとともに、レーザードプラー法による血流評価でもTPOを添加した④群で有意な虚血の改善が認められた。更にBS-1 lectin免疫染色による機能血管の評価でも、④群で有意な機能血管の増加を認めた。

考 案

我々は、TPOを添加することにより、強力な血管新生能を有する血管新生単球を効率的に誘導することが出来る新規培養法を確立した。この新規培養法で得られるSphereは、貪食能を持つ大型のCD11b+単核球から構成されており、血管新生能を有する末梢血または骨髄由来細胞の主体が単球/マクロファージであるという報告と一致する。TPOの添加はsphereの数および大きさを増加させるだけでなく、下肢虚血モデルマウスにおいて既存の培養法に比べてより強力な治療効果を示し、虚血疾患をふくめ各種血管新生療法への治療応用が期待される。この新規培養法は、TPO以外は臨床応用可能な材料を用いており、TPOの課題を克服できれば、即時のトランスレーションが可能である。

結 論

TPO添加新規無血清培養法は、強力な血管新生能を有する血管新生単核球を効率的に誘導することができる。

引 用 文 献

(重要な引用文献3編以内を掲載すること。)




- (1) Birgit A, Volker S, Claudius T, Martina B, Ralf L, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TROPICA-AMI) *Circulation* 2002; 106:3009-3017.
- (2) Maria Felice B, Edda B, Giuseppe M, Patrizia D, et al. Thrombopoietin Stimulates Endothelial Cell Motility and Neoangiogenesis by a Platelet-Activating Factor- Dependent Mechanism *Circulation* 1999; 84:785-796.

参 考 論 文

(参考論文5編以内を掲載すること。)

- (1) Sasajima J, Mizukami Y, Sugiyama Y, Nakamura K, Kawamoto T, et al. Transplanting Normal Vascular Proangiogenic Cells to Tumor-Bearing Mice Triggers Vascular Remodeling and Reduces Hypoxia in Tumors *Cancer Res* 2010; 70:6283-6292.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	河本 徹
審査委員長 <u>長谷部直幸</u> 			
審査委員 <u>高後 裕</u> 			
審査委員 <u>津省文隆</u> 			
学 位 論 文 題 目 Ex vivo Augmentation of Proangiogenic Potential of Human Peripheral Blood-derived Angiogenic Monocytes by Thrombopoietin (Thrombopoietin は、ヒト末梢血由来血管誘導性単球の血管新生誘導能を ex vivo で増強する)			
<p>虚血性心血管疾患の新たな治療法として、末梢血単核球を用いた血管新生療法が注目されている。しかし、高機能な細胞系の確立や効率的な細胞導入法の開発など、臨床応用までには越えなければならない多くの課題が残されている。</p> <p>本研究では、ヒト末梢血単核球系細胞に in vivo で血管新生促進作用の報告されている thrombopoietin を添加することにより、血管新生誘導能の高い単核球系細胞を確立し、各種虚血性疾患の治療に用いることを目指したものである。</p> <p style="text-align: center;">(次ページへ)</p>			

健常ヒト末梢血から単核球を分離し、動物由来成分を除去するため無血清環境下に培養し得る最適条件を検討し、sphere 形態をとる CD11b, CD14, CD31 陽性の細胞を単離することに成功した。この細胞は、アセチル化 LDL の貪食作用に優れると同時に、CXCR4, IL-8, Vasohibin2 など血管新生関連因子の発現亢進を伴っており、合わせて thrombopoietin の受容体 cMpl 遺伝子を発現していた。この細胞に thrombopoietin を添加すると、血管新生関連因子は有意に発現亢進を示し、リン酸化 STAT5 の核内移行も確認され、血管新生は促進するものと考えられた。

実際にこの細胞の虚血性疾患に対する有効性を in vivo で検証するため、マウスの下肢虚血モデルを用いて検討が行われた。

対照群では、血管結紮により下肢が自然脱落ないし高度の壊疽に陥ったが、thrombopoietin 添加 CD11b 陽性細胞の導入により、レーザードップラー法で検討した下肢の血流は有意に改善し、全例救肢に成功した。

本研究は、強力な血管新生能を有する単核球の新たな誘導法を確立したものであり、虚血性心血管疾患に対する臨床応用に繋がる研究である。

各審査委員から論文・関連領域に関する諮問が行われたが、申請者からいずれも的確な回答がなされ、この領域において十分な見識と経験を有することが確認された。

以上より本審査委員会は、本論文が学位授与に値するものと結論した。