

|               |  |
|---------------|--|
| 氏 名           | 小 池 雅 人  |
| 学 位 の 種 類     | 博 士 (医 学)  |
| 学 位 記 番 号     | 博 士 (論) 第 3 7 8 号  |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 2 3 年 3 月 1 0 日  |
| 学 位 論 文 題 目   | Transfer of Bone Marrow Progenitors Prevents Coronary Insufficiency and Systolic Dysfunction in the Mechanical Unloaded Heart in Mice<br>(骨髄前駆細胞移植はマウスの機械的負荷軽減心臓において冠動脈血流不全と収縮不全を予防する) |
| 審 査 委 員       | 主 査 教 授 江 口 豊<br>副 査 教 授 松 浦 博<br>副 査 教 授 陣 内 皓 之 祐  |

## 論文内容要旨

|  |  |              |                  |
|--|--|--------------|------------------|
| ※整理番号  | 382  | (ふりがな)<br>氏名 | こいけ まさと<br>小池 雅人 |
| 学位論文題目   | Transfer of Bone Marrow Progenitors Prevents Coronary Insufficiency and Systolic Dysfunction in the Mechanical Unloaded Heart in Mice<br>(骨髄前駆細胞移植はマウスの機械的負荷軽減心臓において冠動脈血流不全と収縮不全を予防する) |              |                  |
| <p>【研究の目的】</p> <p>左室補助人工心臓(LVAD)は負荷軽減(unloading)を目的として、心移植への架け橋として使用されているが、一方で、特に虚血性心不全の症例では、長期使用により心筋萎縮、収縮不全と血栓塞栓症を生じさせる諸刃の剣でもある。しかし、この欠点を補えば、LVAD を重症心不全からの脱却をめざす究極の治療法へと進化させることが可能である。また血管内皮前駆細胞(EPC)は血管新生に寄与すること、また血管内皮障害に対する血管内皮再生が報告されており虚血に陥った組織の血管再生治療の可能性がある。我々は chronic unloading heart model である異所性(腹部)心移植マウスを用いて、血管内皮前駆細胞(EPC)を含む KSL 細胞(Lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>/Scal<sup>+</sup>)の心筋内移植を行い、EPC の治療効果を検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>10 週齢の雄 C57BL/6 マウス(レシピエント)の腹部に、別の 10 週齢雄 C57BL/6 マウス(ドナー)胸部より摘出した心臓を全身麻酔科に移植を行った。移植心臓の肺循環はなく、移植心臓上行大動脈はレシピエントマウスの腹部大動脈に、移植心臓の肺動脈はレシピエントマウスの下大静脈に各々端側吻合した。移植心への骨髄細胞移植は移植直後に行った。骨髄細胞は C57BL/6 マウスおよび GFP トランスジェニックマウス(GFP マウス)より採取し、磁気細胞分離システムおよび細胞分取装置により KSL 細胞を単離した。KSL 細胞は心移植直後に左心筋内 3 箇所にて <math>2.0 \sim 3.0 \times 10^4</math> 個ずつ移植し(治療群 n=14)、PBS 投与(未治療群 n=13)と比較して、7 及び 56 日後に以下の検討を行った 1)高感心エコーを用いて、移植心の冠血流量、収縮末期および拡張末期左室壁厚の計測、左室内径短縮率(LVFS)、左室内血栓の計測。2)還流固定を行った移植心臓を摘出し、血管径により 3 群(血管径 <math>&lt; 10 \mu\text{m}</math>、<math>10 \mu\text{m} \leq</math> 血管径 <math>\leq 20 \mu\text{m}</math>、血管径 <math>&gt; 20 \mu\text{m}</math>)に分類して血管密度の測定、及び心筋面積の測定。3)共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP マウス KSL 細胞からの血管新生の検証。</p> |  |              |                  |

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

**【結果】**

治療後 7 及び 56 日目ともに、KSL 治療群で 1)冠血流及び LVFS の改善、左室収縮期末期壁厚の有意な増大( $p < 0.01$ )、左室内血栓の有意の縮小( $p < 0.01$ )、2)左室毛細血管(血管径  $< 10 \mu\text{m}$ )密度の有意な増加( $p < 0.05$ )と心筋の萎縮抑制( $p < 0.01$ )が認められた。また、3)移植した GFP 陽性 KSL 細胞は CD31 陽性の血管内皮細胞へ分化し、血管新生に寄与していた。

**【考察】**

LVAD は unloading を目的として、心移植への架け橋として使用されているが、一方で、特に虚血性心不全の症例では、長期使用により心筋萎縮と収縮不全と血栓塞栓症を生じさせる。我々は、KSL 細胞の左室心筋内移植治療によって、冠血流の有意な改善が認められ、慢性的負荷軽減モデルである異所性移植心の心筋萎縮と収縮不全の予防効果を確認した。マウス異所性心臓移植モデルは、負荷軽減によって引き起こされると考えられている心筋萎縮とリモデリングの研究に利用されているが、移植心の冠血流の測定を行った報告は殆どみられない。我々は高感度心エコーを用いて、移植心の肺動脈と吻合されたレシピエント下大静脈の血流速度と移植心の心電図を測定し、移植心に還流する微量な冠血流を測定した。

未治療の移植心冠血流は正常なマウス心冠血流の 2~4%しかなく、異所性移植心は顕著な冠血流低下が存在することが示唆された。組織学的に移植心冠動脈には異系移植心で認められる求心性狭窄を引き起こすような動脈内膜肥厚病変は認められず、慢性的冠血流低下は左室心筋内毛細血管の減少と移植心上行大動脈と吻合したレシピエント腹部大動脈血流が胸部大動脈血流の約 20%であることが寄与している可能性が示唆された。

KSL 細胞治療群の移植心冠血流では、正常なレシピエントの胸部心冠血流に比べ減少していることは確かであるが腹部大動脈血流低下を考慮すると、血流に適応した冠血流であることが示唆された。組織学的には未治療群に比べて左室心筋毛細血管密度(血管径  $< 10 \mu\text{m}$ )の有意な増加が認められた。また移植 KSL 細胞に GFP マウスの骨髄より採取した細胞を用いて、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると移植された KSL 細胞は、移植後 7 日後では、血管内皮細胞マーカーである CD31 陽性細胞に分化しているのが検証され、56 日後では管腔形成を伴った CD31 陽性細胞に分化しているのが検証された。また移植後 7 日後及び 56 日後に測定した左室収縮期末期壁厚および左室内径短縮率(FS)は、KSL 細胞移植の治療群が未治療群に比べて有意に高値であり、組織学的に検証した左室心筋面積は、KSL 細胞移植の治療群が未治療群に比べて有意に高値で心筋萎縮予防効果が認められた。

**【結論】**

KSL 細胞移植治療はマウス異所性移植心において毛細血管密度を増加させ、unloading による冠血流量の低下と心筋萎縮ならびに左室収縮不全を抑制し、左室内血栓の縮小効果が認められたことから、LVAD との combination therapy としての有用性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

|  |     |    |       |
|--|-----|----|-------|
| 整理番号   | 382 | 氏名 | 小池 雅人 |
| 論文審査委員   |     |    |       |
| <p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>左室補助人工心臓は負荷軽減を目的として重症心不全の心機能回復に有効であるが、長期使用により心筋萎縮や収縮不全および血栓塞栓症を生じる。血管内皮前駆細胞(EPC)は血管新生に重要な役割をはたし、血管内皮の再生が報告されていることから、EPC を虚血に陥った心筋組織に移植をすることで血管再生から心筋収縮改善効果が期待される。小池雅人氏は、負荷軽減心筋の冠動脈血流量の低下に着目し、慢性の負荷軽減心臓モデルである異所性心移植マウスを用いて、EPC を含む KSL 細胞の心筋内移植を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) KSL 細胞の移植は移植心の冠動脈血流量を増加させた。</li> <li>2) 左室収縮能の改善と左室内血栓形成を抑制された。</li> <li>3) KSL 細胞から直接心筋細胞への分化は観察されなかった。</li> <li>4) 移植心における毛細血管の増加と心筋萎縮の抑制効果が認められた。</li> </ol> <p>本論文は、KSL 細胞心筋内移植が左室補助人工心臓補充療法としての有用性について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 449 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 23 年 2 月 4 日 )</p> |     |    |       |