

論文内容の要旨

論文題目 胎盤細胞を用いた血管新生に関する実験
的研究
学生証番号 41-97454
氏名 大内 邦枝

慢性閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患の血管新生治療は、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF)、肝細胞成長因子 (hepatocyte growth factor; HGF) などの血管新生因子をプラスミド、ウイルスベクターにより導入し行われているほか、実験的には間葉系幹細胞、血液幹細胞、血管内皮前駆細胞などの細胞移植が報告されている。これらの細胞移植に用いられる細胞は多くは骨髄由来の単核球や末梢血単核球である。骨髄液の採取には全身麻酔が必要であり、末梢血を材料とした場合は十分な細胞を採取するために血球分離装置によるアフエレーシスが必要となり、患者のリスクも無視できない。よってより簡便で安全な治療が求められる。

近年分娩に際して得られる臍帯血が骨髄移植に利用されるようになっており、臍帯血バンクも設立されている。これまで臍帯血を利用するのみで胎盤そのも

のは廃棄されていたが、羊水中の細胞による tissue engineering の可能性の報告に続き、胎盤由来の細胞でも同様の報告が存在する。正常ヒト胎盤から得られる間葉系細胞を *in vitro* で神経・骨への分化誘導を行ってみたところ神経細胞、骨への分化が認められたという報告もあり、胎盤由来細胞は再生医療への臨床応用に非常に有用な細胞である可能性がある。また胎盤が血管に富み、短期間に成長する器官であることから、私たちのグループは胎盤由来細胞自体に何らかの血管新生因子の産生能などがあるのではないかと考え、本研究を行った。

まず *in vitro* 実験として、いくつかの血管新生因子を測定してみたところ胎盤由来細胞から高濃度の VEGF が産生されることを見出した。HUVEC, 正常ヒト繊維芽細胞、ヒト大動脈平滑筋細胞、293 細胞、HeLa 細胞など他の細胞と単位細胞あたりの VEGF 産生量を測定したところ、胎盤細胞はばらつきがあるものの 16.27-93.47pg/ml と非常に高濃度の VEGF 産生が認められた。これは腫瘍由来細胞株である HeLa 細胞の 24.03pg/ml と比較しても高値であると考えられる。さらに本細胞が産生している VEGF が生理活性を有するものか否かを確認するために HUVEC を用いた ³H-サイミジン取り込み能を調べたところ、培養上清中 VEGF 量に相当する human recombinant VEGF を添加したものとほぼ同等の細胞増殖刺激が認められた。

次に本細胞の細胞移植治療への可能性の検討として臨床上問題となる血清病、アレルギー、未知病原体の感染、ヒトアジュバント病のリスクを減らすための無血清培養条件の検討を行った。10%ウシ胎児血清添加培地とほぼ同等の結果が得られる培養条件 (DMEM に以下を添加する : L-glutamine 2mM, ITS-X 100 分の 1 容, vitamin E 10 μ M, dexamathazone, hydrocortisone 10pM, HSA 5mg/ml および bFGF10ng/ml, EGF10ng/ml, PDGF-AB10ng/ml) を得た。この条件下での培養上清中の VEGF 値は血清添加培地と 20 日間の長期培養後も同

等であった。フローサイトメトリーを用いて無血清培養を行った細胞と血清添加培養を行った細胞での表面マーカーの違いを検討したが、CD105, CD73 などの間葉系細胞に認められる表面マーカーには著明な変化は認められなかった。

in vivo 実験は片側大腿動静脈の結紮を行って作製したマウス後肢虚血モデルを用いて行った。ELISA により VEGF の産生が確認された胎盤細胞を I 型コーゲンに浮遊させ、モデル動物の虚血側大腿の皮下、筋肉内に移植したところ虚血の改善が認められた。また細胞移植部組織より total RNA を抽出し、ヒト mRNA 量を real time RT-PCR で検討したところ、マウスに移植投与した細胞は少なくとも 5 日間はヒト VEGF を産生していることが明らかとなった。

これらの結果は胎盤細胞が血管新生治療を目的とした細胞移植治療において遺伝子導入によらない VEGF ベクターとして非常に有望な細胞である可能性を有していることを示すものである。