

論文の内容の要旨

論文題目 **Human umbilical cord derived CD34+ cells enhance neovascularization and improve cardiac function after myocardial infarction**

和訳 心筋梗塞に対する臍帯血CD34陽性細胞移植による血管新生と心機能回復の検討

指導教官 高本眞一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成13年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 平田 康隆

要旨

研究の背景

臍帯血には多くの未熟・幼若細胞が含まれることが知られており、現在、骨髄移植の代替としての幹細胞移植などで利用されている。さらに、臍帯は、従来ならば廃棄されていたものであり、患者に苦痛を与えず採取できるという利点がある。

今回、我々は、ヒト臍帯血のCD34陽性細胞を心筋梗塞モデルのラットの心臓に筋注することで心機能改善効果が得られるかどうかを検討した。

方法

臍帯血の採取・CD34陽性細胞の分離：臍帯血は、母親から同意書を得た後東京都赤十字血液センター臍帯血バンクにおいて採取された研究用臍帯血を用いた。一人由来の臍帯血から単核球を分離し、次いでCD34に対するモノクローナル抗体のついたマイクロビーズを用いて、CD34陽性細胞を分離した。

動物実験：実験にはウィスターラット(♂、270-320g)を用いた。免疫抑制としてFK506(tacrolimus)

0.3mg/kg/dayの腹腔内注射を手術前6時間、手術直後、その後毎日施行した。麻酔、人工呼吸下に左開胸を行い、左前下行枝を7-0 silkにて結紮して心筋梗塞を作成した。30分後に 2×10^5 個のCD34陽性細胞を含む細胞浮遊液を虚血領域へ注入。コントロール群には、細胞を除いた培養液のみを注入した。

心機能の評価：心機能の評価法としては、1) 心エコーによる評価、2) コンダクタンスカテーターによるEmaxによる心機能評価を施行した。心エコーは術前、および4週間後、コンダクタンスカテーターによる心機能評価は4週間後のエコー施行後におこなった。

組織学的検査：心機能評価後、致死量の麻酔の後ラットを偽性死させ、心臓を摘出。OCTコンパウンドに包埋し、凍結した。凍結切片をヒトCD34, CD45, PECAM-1に対する抗体を用いて免疫染色し、臍帯血由来細胞の存在を確認した。また、ラットCD31に対する抗体による免疫染色により、心筋虚血領域の毛細血管密度の測定を行った。

結果

心エコーによる左室駆出率は細胞注入群で有意に高く、($31 \pm 2\%$ vs $24 \pm 2\%$, $P < 0.05$) 心拡大も抑制されていた (7.3 ± 0.3 mm versus 8.5 ± 0.4 mm, $P < 0.05$) (Figure 1)。また、コンダクタンスカテーターによる測定でも細胞注入群のEmaxは有意に高いことが示された (778 ± 36 mmHg/ml vs 610 ± 20 mmHg/ml, $P < 0.01$)。

組織学的検査では、虚血領域において有意に細胞注入群の方が毛細血管密度が高かった (Figure 2)。またヒトCD34, CD45, PECAM-1に対する抗体を用いて免疫染色では、臍帯血由来細胞が確認され、一部は血管組織にとりこまれていた。 (Figure 3)。

細胞数の計測では、CD34陽性、CD45陽性、PECAM-1陽性細胞はそれぞれ当初注入した細胞と比較して220%、330%、140%存在した。ただし、このうち血管に取り込まれていると考えられるものは約1%であった (Table 1)。

考察と結語

我々は臍帯血由来のCD34陽性細胞移植によって心筋梗塞後の血管新生の増強と心機能の回復が認められることを示した。また、ヒト由来の臍帯血由来細胞がヌードラットではなく、正常ラットの免疫抑制モデルにおいても生存可能であるということが認められた。ヒト由来の細胞がラットの心筋内で生存できることの説明としては、二つの可能性が考えられる。まず、1) 臍帯血由来細胞が未熟であるために、免疫反応における抗原抗体反応のターゲットになりにくいということ、そして、2) ドナー/ホストの細胞が混合された組織になっていることで、ホスト側からの免疫反応を逃れやすいということが考えられた。

注入した臍帯血細胞は、その99%が血管外に存在しており、ラットの血管と共存しているものは約1%であった。このことにより、臍帯血由来CD34陽性細胞は血管内皮前駆細胞というよりはむしろ造血幹細胞として働き血管増殖因子等を放出することで血管増生に寄与すると示唆された。臍帯血CD34陽性細胞による血管新生は、いまだ倫理的問題を抱える胎児、新生児の心筋細胞移植、あるいはES細胞由来の心筋細胞移植と比べて臨床応用に優れている可能性がある。同種移植に伴う問題については、すでに骨髄移植に対して臍帯血バンクが確立されており、HLAマッチングによって解決がはかれるかもしれない。

これらの結果から、臍帯血CD34陽性細胞による細胞治療は、心筋梗塞に対して有用である可能性があると考えられた。

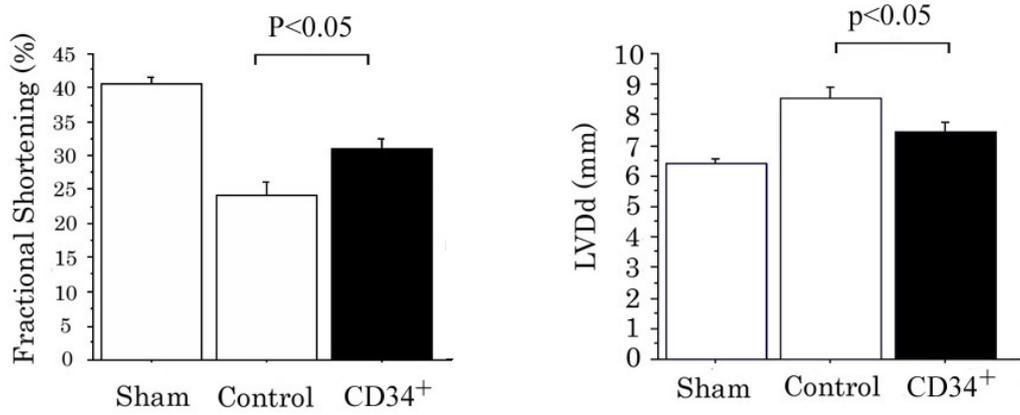


Figure 1
心エコーによる心筋梗塞後4週間における左室内径短縮率(%FS)と、左室拡張期内径(Dd)

A

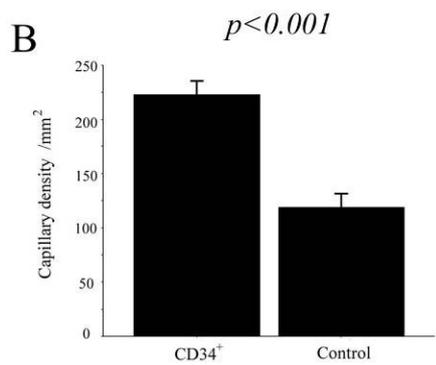
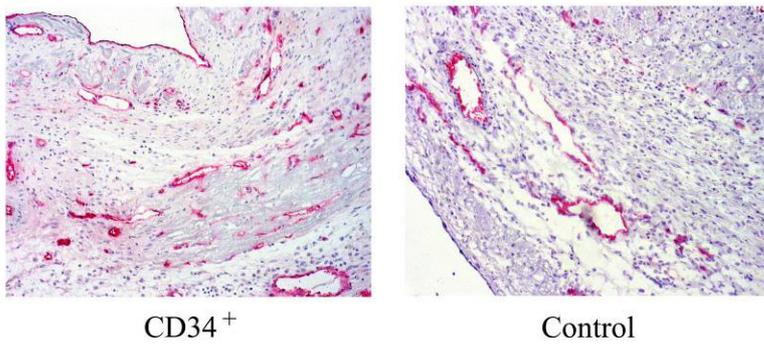


Figure 2
心筋梗塞周囲の虚血領域における毛細血管密度の比較

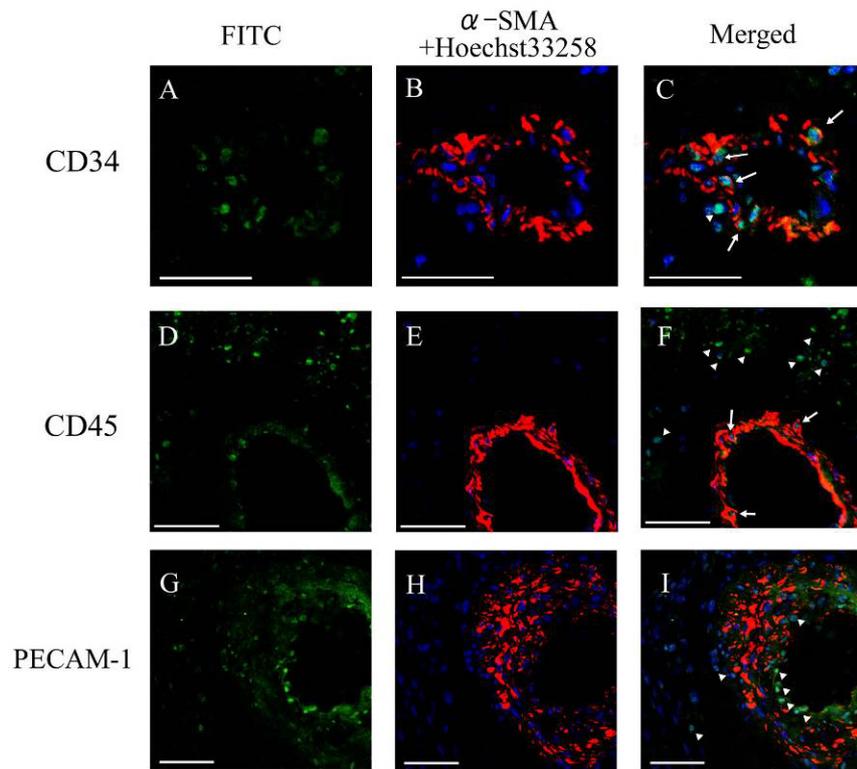


Figure 3

ヒト CD34,CD45,PECAM-1 抗体(緑)および α -smooth muscle actin(赤)による免疫二重染色

	Number of cells/section	Estimated number of cells present at the time of sacrifice	Original number of human cells present at the time of sacrifice (%)
CD34	730 \pm 270	438,000	220
CD45	1110 \pm 476	668,000	330
PECAM-1	461 \pm 266	276,000	140

	Vascular incorporation/section	Estimated number of cells present at the time of sacrifice	The ratio of vascular incorporation/existed cells (%)
CD34	10 \pm 5	5,760	1.3
CD45	13 \pm 7	7,560	1.1
PECAM-1	6 \pm 4	3,600	1.3

Table 1

心筋内における注入された細胞の存在数

(上段：全細胞数、下段：血管内取り込みの認められたもの)