

論文内容の要旨

論文題目 ブタ慢性心筋虚血モデルにおける同種羊膜間葉系細胞移植

氏名 木村 光利

要旨

1. 序文

近年、重症心不全治療の治療法として新たに再生型治療法の研究が始まっている。細胞移植による心機能改善効果の機序に関しては解明中の段階ではあるが、骨格筋芽細胞、骨髄由来単核球細胞などを用いて数多くの心不全患者に対する心筋再生医療の臨床試験が行われてきた。骨髄由来細胞を用いた無作為抽出臨床試験が心筋梗塞患者に対して積極的に行われており、心不全に対する細胞医療の安全性とわずかな有効性が示されている。しかし、心筋再生医療における細胞移植ではその心機能改善のメカニズムが未だに解明されておらず、投与方法、移植時期、移植細胞数と並んで細胞ソースも臨床適応における重要な問題のままである。

間葉系幹細胞(MSCs)は細胞療法において最も期待されている細胞ソースの1つであり、骨髄由来 MSCs を用いた臨床試験も始まっている。しかし、高齢者や罹病患者では幹細胞数の減少や機能低下が見られるという報告があり、自家細胞移植による細胞療法では患者状態によって限界がある可能性がある。そのため、拒絶反応を考慮しても同種細胞移植は自家移植の代替手段として検討される治療法である。骨髄由来 MSCs は免疫原性が低いと言われてはいるが、同種骨髄由来 MSCs 移植では、移植した細胞は最終的に宿主の免疫機構により拒絶されてしまうことが指摘されている。

羊膜からも MSCs は単離可能であり、ヒト羊膜由来間葉系細胞(AMSCs)は多分化能が示されている。さらに、羊膜は胎児が母体から拒絶されるのを防ぐために重要な役割を果たしていることが知られている。最近、ラットの同種 AMSCs 移植において移植細胞が長期間生存し、梗塞心の心機能を改善させたと報告されている。さらに、ヒト AMSCs をラット心筋梗塞モデルに異種移植をしたところ有意に心機能を改善させ、移植されたヒト AMSCs は免疫能の正常なラット心筋内で免疫抑制剤を用いることなしに4週間以上生存し心筋細胞へ分化したことが示された。以上の結果から、AMSCs は骨髄由来 MSCs と比較して免疫原性が低く、宿主心筋内で長期の生存が可

能であると考えられる。加えて、AMSCsを使用することの利点としては、腫瘍形成性がないことと倫理的な問題が少ないことが挙げられる。

同種 AMSCs 移植の臨床適応について検討するために、私は臨床前試験としてブタ慢性心筋虚血モデルにおいて同種 AMSCs 移植を行った。免疫抑制剤を用いない同種移植の条件下で移植した AMSCs が生存し心筋細胞へ分化できるかを評価した。さらに同種 AMSCs 移植の有効性を心機能、血管新生、心筋の線維化の観点から検討を行った。

2. 方法

2.1 ブタ羊膜由来間葉系細胞 (AMSCs) の単離と培養

出産直前の妊娠ブタに帝王切開を施行してブタ胎盤を採取した。ブタ羊膜組織を約 1cm^2 の小片に細断し、Dispase II および Collagenase II の順に反応させた。これらの酵素処理を行った羊膜組織を培養液に再度懸濁し、培養ディッシュに播種し培養を行った。このようにして得られた細胞をブタ羊膜由来間葉系細胞 (AMSCs) とした。

さらに、移植した AMSCs を同定するために今回の実験で緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現ブタ AMSCs を作製した。静岡県畜産技術研究所で体細胞クローン技術によって作製された GFP 遺伝子組み換え金華ブタの分娩後に、GFP 発現ブタ胎仔の羊膜を採取した。このブタ羊膜より前述の方法で GFP 発現ブタ AMSCs を単離、培養した。

これらのブタ AMSCs の細胞表面マーカーをフローサイトメトリーにより解析した。一次抗体として用いたものは、抗 CD29、抗 CD44、抗 CD45、抗ブタ白血球抗原 (SLA) クラス I、抗 SLA クラス II-DR および抗 SLA クラス II-DQ 抗体であった。GFP 発現ブタ AMSCs に対しては、細胞表面抗原の解析だけでなく GFP 発現解析も行った。

2.2 心筋虚血モデルの作成と細胞移植

体重 20kg の家畜ブタ 15 頭に対して、プロトコール初日 (Day 0) に左開胸を行い、左冠状動脈回旋枝の根部に内径 2.25mm のアメロイドコンストラクターを装着した。虚血作成処置を行った 15 頭のブタのうち術後 4 週間 (Day 28) まで生存した 9 頭を移植群 (N=5) と対照群 (N=4) に振り分けた。胸骨正中切開で心臓を露出し、1ml の生理食塩水に懸濁した 1×10^6 個のブタ AMSCs および 1ml の生理食塩水を、25G 針を用いて 16~20 ヶ所に分けて虚血心筋内に心外膜より注入した。細胞移植処置後、このブタは免疫抑制剤の投与なしで飼育された。

経胸壁心エコーを Day 0(アメロイドコンストラクター装着前)、Day 28(細胞移植あるいは生理食塩水注入前)、Day 56 にそれぞれ実施した。左室乳頭筋レベルの左室拡張末期径 (LVDD)、左室収縮末期径 (LVDS)、左室後壁の壁厚 (PWT) をそれぞれ計測し、その結果より左室駆出率 (LVEF) を算出した。

細胞移植 4 週間後に各ブタを犠牲死させ、ホルマリン固定後にヘマトキシリン-エオジン (H&E) 染色を実施した。血管数を計測するために抗第Ⅷ因子抗体による免疫組織染色を行い、各標本を光学顕微鏡下で 200 倍の倍率で観察して血管内皮細胞数を測定した。心筋の線維化率を評価するため、ピクロシリウスレッド染色を行った。各標本を光学顕微鏡下で 100 倍の倍率で観察し、傍梗塞領域から 3 視野を選びデジタル画像を取得した。このデジタル画像を Photoshop ソフトウェアで解析し、全心組織中の赤ピクセル領域の割合を算出して線維化率とした。

2.3 同種 GFP 発現ブタ AMSCs 移植

移植細胞の生存評価のために同種 GFP 発現ブタ AMSCs をブタ慢性虚血心に移植した。新たなブタ 1 頭に前述の方法にて心筋虚血を作成した。虚血作成 4 週間後 (Day 28) に GFP 発現ブタ AMSCs を梗塞部位に直接注入した。細胞移植 4 週間後 (Day 56) にブタを犠牲死させ、ホルマリン固定後にパラフィン包埋した心筋組織標本を作製した。組織切片を一次抗体である抗心筋トロポニン T 抗体、抗心筋トロポニン I 抗体および抗 GFP 抗体に反応させた。核を DAPI で染色した。各染色標本をレーザー共焦点顕微鏡を用いて解析した。

3. 結果

3.1 ブタ羊膜由来間葉系細胞 (AMSCs)

培養したブタ AMSCs の形態は線維芽細胞様であり、間葉系細胞マーカーである CD29、CD44 を発現していたが、造血系マーカーである CD45 の発現は認められなかった。また、ブタ AMSCs は SLA クラス I 抗原が陽性であったが、SLA クラス II-DR および DQ 抗原は陰性であった。GFP 発現ブタ AMSCs でも細胞表面抗原は同じ発現パターンを示していた。さらに、フローサイトメトリー解析において GFP 発現ブタ AMSCs は 80%以上の GFP 発現率を示していた。

3.2 虚血モデルの作成と心筋内細胞移植

15 頭の家畜ブタに対して本実験を施行した。そのうち 6 頭がアメロイドコンストラクター留置後に死亡した。残りの 9 頭に対して Day28 に細胞移植または生理食塩水注入を行った。

同種ブタ AMSCs 移植を行った移植群では、移植 4 週間後 (Day56) の心エコーにおいて、移植前 (Day28) と比較して LVEF の有意な改善が認められ、4 週間の LVEF の変化量は $10.0\% \pm 5.2\%$ であった ($p = 0.013$)。一方、生理食塩水の注入を行った対照群では 4 週間での LVEF の有意な変化は認められなかった ($-1.2\% \pm 2.6\%$, $p = 0.435$)。対照群では生理食塩水注入後 4 週間で LVDd の増加 (5.8 ± 1.9 mm) が見られたが、PWT に変化なかった。一方、移植群ではブタ AMSCs 移植後の 4 週間で LVDd の値に変化はなかった (-1.5 ± 5.8 mm) が、PWT は有意に増加していた。

3.3 病理組織学的評価

移植群における摘出心の肉眼像では、対照群と比較して側壁の線維化・菲薄化の回復が認められた。抗第Ⅷ因子抗体での免疫組織染色による微小血管密度の測定では、移植群と対照群とでは微小血管密度に有意な差は認められなかった。一方、ピクロシリウスレッド染色による線維化率の測定では、移植群の線維化率が $3.0 \pm 1.5\%$ であったのに対し対照群では $6.1 \pm 3.6\%$ であり、移植群では線維化率の有意な改善が認められた ($p=0.015$)。

ブタ AMSCs を注入した心臓でも、細胞移植後 4 週間の時点で腫瘍形成の所見は認められなかった。さらに骨や軟骨などへの異所性分化、過剰な細胞外器質の増生といった所見も、AMSCs 移植群で認められなかった。

3.5 細胞生存に関する評価

心筋内に注入された同種 GFP 発現 AMSCs を Day 56 に傍梗塞領域で確認した。ブタ AMSCs は同種移植後 4 週間、免疫抑制剤なしに宿主の心筋内で生存していた。移植された同種 GFP 発現 AMSCs は心筋トロポニン I および T を発現しており、このことは移植した AMSCs が心筋細胞に分化し得ることを示唆していた。

4. 結論

私は、臨床の慢性虚血性による心不全と同様のモデルを作成し同種羊膜由来間葉系細胞 (AMSCs) 移植を評価した。前臨床試験として、同種 AMSCs は大動物モデルでも免疫抑制剤を用いることなく宿主心筋内に生着し心筋細胞の表現型を獲得していたことが示された。これらの安全性および有効性に関するデータは AMSCs が心疾患に対する細胞移植治療の有効な細胞ソース候補となることを示唆している。

(3953 字)