

審査の結果の要旨

氏名 木村 光利

本研究は、*in vitro* での研究および小動物実験を通して心筋再生医療における細胞ソースとなる可能性があると考えられた羊膜由来間葉系細胞に関して、臨床応用を目指して、大動物実験において同種羊膜由来間葉系細胞移植の有効性と安全性を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. ブタ胎仔より羊膜を採取し、その羊膜から間葉系細胞(ブタ羊膜由来間葉系細胞)を単離・培養した。この細胞は線維芽細胞様の形態をしていた。フローサイトメトリーによる細胞表面抗原解析で CD29、CD44、SLA クラス I の発現は認められたが、CD45、SLA クラス II-DR、II-DQ の発現は認められなかった。
2. 体細胞クローン技術によって作成された緑色蛍光タンパク (GFP) 遺伝子組み換え金華ブタの出産後の羊膜より間葉系細胞を単離・培養し、GFP 発現ブタ羊膜由来間葉系細胞を得た。この細胞は、フローサイトメトリー解析において 80%以上の GFP 発現率を示した。
3. 20kg の家畜ブタに全身麻酔下で側開胸を行い、左冠状動脈回旋枝 (LCX) にアメリロイドコンストラクターを留置することで、ブタ慢性心筋虚血モデルを作成した。このモデル動物は、虚血誘導 4 週間(アメリロイドコンストラクター留置 28 日後)の心エコーで、一律に左駆出率 (LVEF) の低下が確認された。
4. ブタ慢性心筋虚血モデルに、胸骨正中切開を行って同種ブタ羊膜由来間葉系細胞 1×10^6 個を虚血心筋に心外膜より直接注入し、これを移植群とした (n=5)。対照群として同様のブタ慢性心筋虚血モデルの虚血心筋に生理食塩水を注入した (n=4)。移植後 4 週間での心エコー検査では、左室駆出率 (LVEF) は移植群では約 10%の心機能の回復が認められたが、対照群では生理食塩水の注入前後で有意な LVEF の変化は認められなかった。また、対照群では生理食塩水注入後の 4 週間も左室拡張末期径 (LVDd) は平均 6mm / 4 週の増加が持続したが、移植群では LVDd はブタ羊膜由来間葉系細胞移植後 4 週間での LVDd の有意な増加は認められなかった。

5. 同種ブタ羊膜由来間葉系細胞移植後 4 週の摘出心の病理所見では、細胞移植による腫瘍形成は認められなかった。移植群と対照群とを比較したところ、抗第Ⅷ因子抗体免疫組織染色による微小血管密度評価では二群間に有意な差を認めなかったが、ピクロシリウスレッド染色による線維化率の測定では、対照群の線維化率約 6%に対して、移植群約 3%と有意な線維化の抑制を認めた。
6. ブタ慢性心筋虚血モデルに対して虚血誘導 4 週目に GFP 発現同種ブタ羊膜由来間葉系細胞 1×10^7 個を心筋内に直接注入した。免疫抑制剤を用いずに 4 週間飼育し、細胞移植 4 週後の摘出心標本を GFP および心筋特異タンパク (心筋トロポニン T・I) で免疫組織二重染色を施行したところ、宿主心筋内に共陽性の細胞が確認され、同種羊膜由来間葉系細胞は免疫抑制剤を用いずとも 4 週間宿主心筋内で生存し、心筋細胞へ分化したことが示唆された。

以上、本論文はブタ慢性心筋虚血モデルにおいて同種羊膜由来間葉系細胞移植の安全性および有効性を明らかにした。本研究は、これまで *in vitro* および小動物実験でしか示されてこなかった同種羊膜由来間葉系細胞移植の安全性・有効性をヒトと体格的に近い大動物での実験でも明らかにし、前臨床試験として心筋再生医療の臨床応用に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。