

審査の結果の要旨

氏名 生富 公康

血管内皮前駆細胞 (EPC) はその特徴から様々な血管病における再生治療への応用が期待されている。本研究は、骨髄単核球を用いた EPC の培養における特性について解析している。ラット骨髄単核球より EPC を培養し、その培養期間に応じて、「early EPC (day3-6)」、「late outgrowth cell (LOC) (day8-14)」、「very LOC (VLOC) (day15-21)」の3つに分類し、*in vitro* で比較している。さらに、骨髄由来 EPC が真にどのような血管修復能を有するのかを調べるため、「モノクロタリン (monocrotaline: MCT) による肺動脈傷害モデル(肺高血圧モデル)」と「大腿動脈ワイヤー挿入による機械的動脈内皮傷害モデル」という肺体血管同時傷害モデルラットを作成し、傷害モデルにおける骨髄由来 EPC の血管修復能を検証し、以下の結果を示している。

1. ラット骨髄単核球を用いた EPC 培養においては、培養早期(day 3-7)に colony を形成する小円形細胞集団の「early EPC」と、培養後期(day7 以後)に内皮系細胞に特徴的な cobblestone colony を呈する「late outgrowth cells (LOC)」、の二種の異なる集団が観察される。cobblestone colony は外観上の大きな変化はなく増殖していく(LOCとVLOCの間ではコロニー外観上明らかな変化はない)。
2. 古典的に EPC 特定法として用いられてきた acetylated LDL と lectin binding 能の二重染色において、いずれの EPC も同様に二重陽性となった。しかし免疫染色・flow cytometry による表面抗原解析においては、[early EPC] $CD31^+CD45^+CD34^{high}Flk1^{low}$, [LOC] $CD31^+CD45^-CD34^{low}Flk-1^{high}$, [VLOC] $CD31^-CD45^-CD34^-Flk-1^{low}$ と各 EPC は全く異なる表現形質を呈し、LOC で有意に高い内皮系形質 (CD31, Flk-1)が確認された。eNOS 蛋白発現能(Western-blot)、増殖能(MTS assay)および管腔構造形成能 (Matrigel tube-formation assay) の全ての *in vitro* の機能解析において、LOC は最も高い angiogenic property を示していた。
3. 肺体血管同時傷害モデルラットにおける骨髄由来 EPC の治療効果の検証においては、肺高血圧変化パラメーター(右室圧、右室リモデリング、肺動脈リモデリング)と、組織学的な EPC の傷害肺血管床における局在性、の両者において、いずれの EPC も無効であることが確認された。
4. 逆に、ワイヤー障害後の大腿動脈においては、投与された LOC は傷害血管内皮に遊走・集積し、実際に内皮化している像が確認され(replacement ratio= 12.7%)、LOC 投与によりワイヤー傷害後に形成される新生内膜の量は有意に抑制されていた。mRNA 発現量の比較から、LOC の投与が傷害血管部位で、炎症性サイトカインの上昇を抑制していることが確認された。同効果は、early EPC/VLOC 投与群ではみられず、LOC に特異的な血管修復能であることが示された。

以上、ラット骨髄由来のEPC培養において、cobblestone colonyを呈するLOCは高いangiogenic potentialおよび内皮細胞形質を有することが *in vitro* の検証で確認された。しかしこの cobblestone colony を有する LOC も培養が長期に及ぶことにより(VLOC 化することにより)、EPC としての機能が低下することが明らかとなった。ワイヤーによる機械的動脈内皮損傷において、経静脈的に投与された LOC は傷害血管に遊走集積し、新生内膜形成抑制効果を有した。この血管修復には、直接的内皮化と、paracrine effect による抗炎症効果という、二つの効果がみられた。一方で EPC 投与は、たとえ LOC であっても、MCT による肺高血圧に対しては治療効果を一切みとめなかった。

本研究は、EPC 研究における新たな知見を示しており、血管障害病態に対する骨髄由来 EPC の臨床応用にむけて、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。