

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
堀本佐智子	主査 教授 勝間田 敬弘 副査 教授 古谷 榮助 副査 教授 北浦 泰 副査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 上田 晃一
主論文題名 Synthetic Vascular Prosthesis Impregnated with Genetically Modified Bone Marrow Cells Produced Recombinant Proteins (遺伝子導入骨髄細胞で被覆した人工血管の組換えタンパク発現に関する実験的検討)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究の目的》</p> <p>人工血管置換術に用いられる人工血管は、内径 7mm 以上であれば安定した長期成績が得られる。しかし、内径 6mm 以下の小口径人工血管は早期の血栓形成などによる閉塞や狭窄が生じやすく、成績向上のために未だ改善の余地が多い。膝部以下の閉塞性動脈硬化症などの末梢動脈病変を有する患者の血行再建手術や、適切な自己グラフトを持たない患者の冠動脈バイパス手術のグラフトとして、長期開存性に優れた小口径人工血管の開発が待望されている。</p> <p>優れた小口径人工血管を開発するために、これまでに様々な研究が行われてきた。1996年に、内壁に自己骨髄細胞を播種することで、血管新生因子のオートクライン機能を有した内皮細胞による被覆が生じ、血栓原性が抑制されるということが報告された。</p> <p>骨髄細胞は、多様な系統の細胞に分化するという性質を有するため、様々な臓器障害の再生治療に利用されている。また、遺伝子治療のベクターとしての有用性も報告されている。</p> <p>そこで、あらかじめ血栓原性を抑制するような遺伝子を導入した骨髄細胞を小口径人工血管に播種すれば、抗血栓性を有する内皮で内壁が被覆され、開存性の向上が期待できるのではないかと考えられる。</p> <p>申請者らは、ラットの下腿骨から採取し初代培養した骨髄間質系細胞(MSC)に、レポーター遺伝子である beta-galactosidase 遺伝子を導入し、これを小口径人工血管に播種し、内壁での、その遺伝子産物であるタンパク産生を評価した。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>MSC の増幅:SD ラットの下腿骨より骨髄を採取し、骨髄細胞を培養した。培地交換を行うことで、骨髄造血系細胞を除去し、MSC を分離し、継代培養した。</p> <p>MSC の beta-galactosidase 遺伝子導入:二次感染能をもたないアデノウイルス(Adeno-X vector)を用いて beta-galactosidase 遺伝子の組み換え体を作成し、HEK293 細胞を用いて増殖させた(lacZ/Adeno-X vector)。lacZ/Adeno-X vector のタイターは、X-gal 染色を用いた、連続希釈法によって測定した。MSC に lacZ/Adeno-X vector を感染多重率 2000 で暴露させ、遺伝子導入を行った。</p> <p>遺伝子導入 MSC の人工血管への播種:beta-galactosidase 遺伝子を導入した MSC を、内径</p>	

2mm、繊維長 90 μ m、長さ 40mm の人工血管に圧入した。

MSC の遺伝子発現の確認: 遺伝子導入 MSC は、0.25% glutaraldehyde で固定し、X-gal 染色を行い、光学顕微鏡で人工血管内壁での beta-galactosidase の発現を評価した。

《 結 果 》

MSC の性質: MSC は紡錘様形態をしており、プラスチックの培養皿に固着し、一層に伸展していた。いくつかの細胞は小型で円形であり、紡錘様細胞に付着していた。紡錘様細胞は、急速に増殖し、倍化時間は約 3 日であった。遺伝子導入 MSC のほとんどは、高い感染多重率でアデノウイルスに感染させても、継続して培養皿に固着していた。感染多重率を 250,500,1000,2000 とした場合の遺伝子導入効率率は、それぞれ、17%,29.5%,51%,90%であった。

人工血管への遺伝子導入 MSC の播種: 遺伝子導入 MSC を播種した ePTFE 人工血管を X-gal 染色後、縦方向に切開し内壁を確認した。内壁は、X-gal 陽性細胞で被覆されていた。X-gal 陽性細胞は、2 種類に分類され、一方は大型で内壁に集団を形成し、他方は小型で散在していた。

《 考 察 》

小口径人工血管の開発において、組織工学の適応は新しい試みであり、細胞療法に遺伝子導入を組み合わせることで治療の応用範囲が広がると考えられる。今回の研究では、ePTFE 人工血管内壁を被覆した beta-galactosidase 遺伝子導入した MSC が、遺伝子産物であるタンパクを発現していることが示された。

MSC の性質: 骨髄細胞は、主に単核球細胞を含む造血系細胞と、骨髄間質細胞もしくは骨髄間質系幹細胞に分類される。申請者らは、多くの研究者らと同様に再生医学領域の研究で単核球細胞移植の効果を示してきたが、良好な性質を持つことから、最近では MSC が注目されるようになっている。MSC は、分離と増殖が比較的容易である。さらに、増殖スピードが速く、低い血清濃度でも生存することができるため、遺伝子導入のベクターとして好適である。実際に、MSC を用いた遺伝子治療が osteogenesis imperfecta の治療に利用されている。

細胞治療の足場としての多孔性 ePTFE: ePTFE 人工血管は PTFE ポリマーを延伸した有孔の素材である。内壁は、血栓が付着しないように陰性に荷電しているが、このために細胞の付着も抑制されている。ePTFE の繊維長が長いほうが多孔性であり、陰性荷電が抑えられるため、in vivo での内皮化に至適であると考えられている。本研究では 90 μ m の ePTFE を使用している。

オートクライン機能を有する人工血管: 本研究では、人工血管内壁に播種した遺伝子導入 MSC が、生理活性を有する組み換えタンパクを発現していることが示された。これによって、人工血管が血液導管としてだけでなく、治療効果を発揮する可能性が示唆された。今後、一酸化窒素のような血管保護効果のある生体物質のオートクライン機能を発揮させることができれば、人工血管の開存性の向上が見込まれるだけでなく、移植部より末梢の動脈の治療効果の可能性も期待できると考えられる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	堀 本 佐 智 子
論文審査担当者		主 査 教 授 勝 間 田 敬 弘 副 査 教 授 古 谷 榮 助 副 査 教 授 北 浦 泰 夫 副 査 教 授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教 授 上 田 晃 一	
主論文題名 Synthetic Vascular Prosthesis Impregnated with Genetically Modified Bone Marrow Cells Produced Recombinant Proteins (遺伝子導入骨髄細胞で被覆した人工血管の組換えタンパク発現に関する実験的検討)			
論文審査結果の要旨			
<p>末梢動脈の血行再建手術や冠動脈バイパス手術に際して、小口径人工血管の需要が高まっている。しかし、小口径人工血管は早期に閉塞しやすく、長期開存率も低い。申請者らは、ラットの骨髄から分離した骨髄間質系細胞にアデノウイルスベクターにより beta-galactosidase 遺伝子を導入し、これを小口径人工血管に播種して、人工血管内壁に beta-galactosidase 遺伝子の発現を示す細胞を生着させることに成功している。</p> <p>骨髄細胞は、様々な臓器に細胞移植することで再生治療に用いられているが、本研究は、骨髄細胞を移植前に遺伝子導入により適切な性質に改変し、これを用いて小口径人工血管に細胞移植できる可能性を示しており、移植医療に貢献するところが大きい。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Artificial Organs 29(10): 815-819, 2005</p>			