

学位授与番号：甲 954 号

氏 名：田中寿一

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 25 年 11 月 13 日

学位論文名：

ラット虚血性心不全モデルにおける clenbuterol および G-CSF 併用療法による幼弱未分化幹細胞の誘導とそれに伴う血管新生の左室機能に与える影響についての検討

主論文名：

Clenbuterol Plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor Regulates Stem/Progenitor Cell Mobilization and Exerts Beneficial Effect by Increasing Neovascularization in Rats with Heart Failure.

（ラット心不全モデルにおける clenbuterol と G-CSF の併用療法に関する検討）

学位審査委員長：南沢享教授

学位審査委員：靱山俊彦教授、桑野和善教授

論 文 要 旨

論文提出者名	田中 寿一	指導教授名	吉村 道博 教授
主論文題名： Clenbuterol Plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor Regulates Stem/Progenitor Cell Mobilization and Exerts Beneficial Effect by Increasing Neovascularization in Rats With Heart Failure (ラット心不全モデルにおける clenbuterol および G-CSF による幼弱未分化幹細胞の誘導とそれに伴う血管新生の左室機能に与える影響についての検討)			
投稿雑誌： Journal of Cardiac Failure (Volume 19, Issue 7, July 2013, Pages 503-508)			
【背景】 $\beta 2$ 受容体作動薬と G-CSF などの骨髄性サイトカインが虚血心筋内で幹細胞の動員と増殖を増強することは既に報告されている。しかし、 $\beta 2$ 受容体作動薬であるクレンブテロールと G-CSF の併用療法が左室機能を改善するかに関しては明らかではない。そのため、本研究では心筋梗塞モデルラットに対し、これらの併用療法により骨髄由来幹細胞の動員やそれに伴う血管新生の結果、心機能の改善を認めるかを目的に実験を行った。			
【方法】 Southern Arizona VA Health Care System において、心筋梗塞モデルラットを作成 3 週間後、併用療法群・単独療法群・未治療群について、末梢血を FACS で骨髄由来幼弱未分化幹細胞の遊走を、心エコーで心機能を、圧容量曲線で血行動態を、また免疫組織染色で血管新生を比較検討した。			
【結果】 未治療群と比較し、併用療法群では LVEF の改善 ($46 \pm 3\%$ vs $34 \pm 2\%$)、LV dP/dt の改善 (5789 ± 394 mmHg vs 4503 ± 283 mmHg) に加え、CD34 陽性細胞の増多を認めた。			
【結論】 心筋梗塞後 3 週間の虚血性心不全において、G-CSF と clenbuterol の併用療法により心機能の改善を認め、骨髄由来幼弱未分化幹細胞の集積とそれに伴う血管新生によると考えられる組織修復の可能性が示唆された。			

論文審査の結果の要旨

田中寿一氏の学位審査論文「ラット虚血性心不全モデルにおける clenbuterol および Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) 併用療法による幼弱未分化幹細胞の誘導とそれに伴う血管新生の左室機能に与える影響についての検討」は、2013年に Journal of Cardiac Failure 誌 (インパクトファクター3.3, 2012) に掲載された「Clenbuterol Plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor Regulates Stem/Progenitor Cell Mobilization and Exerts Beneficial Effect by Increasing Neovascularization in Rats With Heart Failure」と題される論文を軸に、吉村道博教授のご指導の下、作成されている。以下、学位申請論文の要旨と審査委員会における審査結果を報告する。

これまでに Granulocyte colony-stimulating factor (以下、G-CSF と略す) 投与により、幹細胞 (CD34 陽性細胞) 表面の交感神経 $\beta 2$ 受容体の発現が上昇すること、また $\beta 2$ 作動薬と G-CSF などの骨髄性サイトカインと併用することで、虚血心筋に対して幼弱幹細胞の遊走と増殖を惹起することが報告されていた。また、 $\beta 2$ 作動薬に関しては、抗アポトーシス作用や左室心筋リモデリングの抑制など心保護効果があること、 $\beta 2$ 作動薬の心肥大作用を介し重症心不全患者の左室補助装置の離脱が期待できるという臨床試験の結果も報告されていた。しかしながら、 $\beta 2$ 作動薬である clenbuterol と G-CSF の併用療法が心筋梗塞後の虚血心筋の左室機能の改善に寄与するかについてはこれまで報告がなかった。そこで、田中氏は本論文において、心筋梗塞後の虚血性心不全モデルのラットを用いた動物実験を行い、clenbuterol と G-CSF の併用療法により、骨髄由来の幼弱未分化幹細胞の血中への動員、病巣への集積、血管新生により左室機能の改善を認めることを明らかにしている。

まず田中氏は、冠状動脈前下行枝を結紮して作成した心筋梗塞モデルラットを用いて、コントロール、clenbuterol 単独投与、高用量 clenbuterol 投与、G-CSF + clenbuterol (併用) 投与のそれぞれの群に対し、心臓超音波検査等を用いて、形態変化、左室機能を含む血行動態を評価した。併用群では他の単独投与群と比較し、統計学的に有意に心機能の改善、左室の縮小、血行動態の改善を認めた。次いで田中氏は末梢血に動員された幹細胞 (CD34 陽性細胞) 数を各群間で比較し、併用群で CD34 陽性細胞の血液中へ有意な動員を認めた。さらに、動員された幹細胞の心筋損傷部位への集積を確認するために心臓を摘出し Factor VIII を用いた免疫組織染色学的手法で確認したところ、病巣周囲での新生血管 (Factor VIII 陽性血管) の増加を認めた。

以上の結果から、田中氏は G-CSF と clenbuterol を併用することにより、幼弱未分化幹細胞の遊走を病変部位に促し、損傷組織を修復し、心機能を改善させる可能性を示した。

平成 25 年 11 月 1 日、靱山俊彦教授、桑野和善教授の出席のもとに公開学位審査会を開催し、田中氏による研究概要の発表に続いて、口頭試験を実施した。審査会では以

下の点について、質疑応答があった。

1. 心不全に対する β 遮断薬治療は既に確立されたものであるが、 β 作動薬を用いることで、心不全はかえって悪化しないのか。
2. 実験のプロトコールにおいて、今回 G-CSF の単独効果を見ているのか。見ていないとしたらそれはどうしてか。
3. G-CSF と β 作動薬を併用しているが、どのようなメカニズムを考えているのか。
4. FACS 解析により骨髓由来の幹細胞が血中に動員していることが判明したが、果たしてその幹細胞が病巣にだけに集積しているのか。
5. 骨髓由来の幹細胞の再生医療への展望はどのようなものか。
6. CD34陽性細胞の増加が血管内皮細胞の増加に対してどのように関与するのか。
7. 今回の実験で薬剤を投与されたラットは 21 日後に心臓を摘出され免疫組織学的検討がなされているが、21 日以降はどのような形態的および組織学的な変化が予想されるのか。
8. 数ある幹細胞の中、今回骨髓由来の幼弱未分化幹細胞を使用しているが、果たしてその細胞が心機能の改善に関与しているか？間葉細胞など他の幹細胞の可能性はどうか。

これらの質問に対して、田中氏は適切に回答し、活発な議論がなされた。榎山教授、桑野教授と慎重に審議した結果、本論文は、増え続ける虚血性心不全患者の治療法を、現存するG-CSF、交感神経 β 2作動薬を併用する事によって、改善させる可能性を示しており、臨床医学への橋渡し研究としても意義深く、学位論文として十分に価値あるものと認定した次第である。