



Synchrotron Radiation Coronary Microangiography for Morphometric and Physiological Evaluation of Myocardial Neovascularization Induced by Endothelial Progenitor Cell Transplantation

福島, 和人

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4066

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004066>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 福島 和人
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 1868 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 19 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Synchrotron Radiation Coronary Microangiography for Morphometric and Physiological Evaluation of Myocardial Neovascularization Induced by Endothelial Progenitor Cell Transplantation (放射光冠微小血管造影法による血管内皮前駆細胞移植誘導心筋内新生血管形成の形態学的ならびに生理学的評価)

審 査 委 員

主 査 教 授 林 祥剛
教 授 横野 浩一
教 授 大北 裕

背景

骨髄に由来する血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cell:EPC)は浅原らにより末梢血中の単核球成分の一部として存在することが証明され、また、単核球中の CD34 陽性分画が EPC の enriched population であることが証明されて以来、多くの *in vivo/in vitro* の実験を通じて虚血性疾患に対しての治療応用の有用性を示唆する知見が集積されている。

小動物を用いて作成した心筋梗塞モデルに対して、幹細胞/前駆細胞移植を行い、心筋における新生血管形成や側副血行路の形成を評価する際に、現在汎用されている血管造影装置では評価が困難であるため、病理学的な毛細血管密度の評価や、マイクロスフェア法による組織血流の測定により、その治療効果が評価されてきた。

世界最大の第3世代大型放射光施設であるSPring-8(西播磨科学公園都市・兵庫県)の放射光は平行性が高く、輝度が極めて高いため、微細構造の観察が容易であり、その放射光から取り出した単色 X 線を用いた微小血管造影装置の空間解像度は $6\mu\text{m}$ であることから $20\mu\text{m}$ レベルの微小血管の観察が可能である。

本研究では、放射光微小血管造影法を用いて、高心拍で拍動する状態で、 $20\mu\text{m}$ レベルのラット冠微小血管を観察するとともに血管弛緩物質に対する反応性より冠微小血管機能を評価した。心筋梗塞ラットに対する骨髄由来 CD34 陽性細胞移植による新生血管形成効果を側副血行路の観察や冠微小血管機能評価における第3世代放射光微小血管造影装置の有用性を報告する。

方法

重症下肢虚血患者からの CD34 陽性細胞の分離

重症下肢虚血患者に五日間の G-CSF (10μm/kg/d)の連日皮下投与を行い、骨髄から強制動員された単核球をアフェレーシスで採取した後に、磁気細胞分離法により CD34 陽性細胞を単核球より分離した。

動物モデル

7-8 週齢の雌性ヌードラットを用いて、麻酔下に開胸し、前下行枝を近位部で結扎し、心筋梗塞モデルを作成した。心筋梗塞作成 20 分後に PBS または 1×10^5 個の CD34 陰性細胞または 1×10^5 個の CD34 陽性細胞を梗塞部周囲の心筋に直接移植した(PBS群、CD34 陰性群、CD34 陽性群: 各群ともに $n = 9$)。

放射光微小血管造影システム

SPring-8 のビームライン BL28B2 の実験ハッチにおいて、画像コントラストが最も強調されるように、1 結晶分光器を用いて造影剤に含まれるヨードの X 線吸収端 (33.17keV)の直上にあたる 33.2 keV の単色 X 線のみを取り出した。検出器は X 線直接変換型のサチコンカメラを用いて 4.5mm あるいは 7.0mm の視野 (pixel size: 4.5 μm, 7.0 μm)で 30 frames/sec 速度で撮像した。さらに高心拍で拍動する心臓を用いるため、X 線シャッターを用いて X 線露光時間を 2 msec に短縮し、ブレのない

画像を撮るための工夫を行い、拡張末期の静止画像を撮像した。

冠微小血管造影

それぞれのグループのラットを麻酔下に開胸し、大動脈弓部と心臓をすばやく取り出し、ランゲンドルフ灌流装置を用いて摘出心を定流量で灌流した。約 30 分間の灌流し、灌流圧が安定したのを確認した上で、非イオン性 37%ヨード含有造影剤 (Iopamiron 370, Nihon Schering)を用いて、薬剤負荷前の冠動脈造影を実行した。撮像部位は心基部、中央部、心尖部とし、側副血行路の形成、新生血管の形成を評価した。次に内皮非依存性拡張薬であるsodium nitroprusside (SNP)を 1×10^{-6} mol/L で約 5 分間灌流し、灌流が最も低下した時点で同様の部位で冠動脈造影を撮像した。

血管造影による側副血行路形成の評価

血管造影像を用いた Rentrop スコアにより、SNP 負荷前後における前下行枝領域の側副血行路形成を評価した。側副血行路形成を定量するために、SNP 負荷前後における結さつした前下行枝領域における濃度を NIH Image (ver. 1.62)を用いて測定し、angiographic microvessel density (AMVD)を計測した。さらに SNP 負荷前後で AMVD の比(AMVD ratio)を求めた。

参考: Rentrop 分類

grade 0 = no visible collateral vessels

grade 1 = faintly visible collateral vessels without filling of the occluded epicardial vessel

grade 2 = partial filling of the occluded vessel

grade 3 = complete filling of the occluded vessel

毛細血管密度の病理学的評価

イソレクチン B4 (Vector Laboratories)を用いて組織化学的に染色し、毛細血管密度を評価した。

統計解析

得られた結果は Statview 5.0 (Abacus Concepts Inc.)を用いて時計学的に解析された。

結果

SNP 負荷前後の Rentrop Score と AMVD

細胞移植 5 日後 (Figure 1)

細胞移植 5 日後では、PBS 群、CD34 陰性群および CD34 陽性群における Rentrop Score と AMVD, AMVD ratio に有意差は認められなかった。

また、各群における SNP 負荷前後の Rentrop Score と AMVD にも有意差は認められなかった。これらの結果から細胞移植 5 日後の段階では、側副血行路、新生血管の形成に差は認められないことが示された。

細胞移植 28 日後 (Figure 2)

細胞移植 28 日後では、PBS 群と CD34 陰性群において Rentrop Score と AMVD, AMVD ratio ともに有意差は認められなかったが、CD34 陽性群の Rentrop Score と AMVD, AMVD ratio は PBS 群、CD34 陰性群よりも有意に高値を示した。これらの結果から CD34 陽性群において側副血行路、新生血管の形成が行われていることが示された。

さらに、SNP 負荷後の Rentrop Score と AMVD, AMVD ratio は負荷前に比較して有意に高値を示し、特に CD34 陽性群においてその差は大きかった。これらの結果は、SNP 負荷が新生された血管の拡張能を評価するだけでなく、血管造影法を用いた側副血行路、新生血管の形成の評価における過小評価を回避するのに有用であることを示唆している。

毛細血管密度の病理学的評価 (Figure 3)

細胞移植 28 日後にイソレクチン B4 を用いて病理学的に評価した毛細血管密度に関しては、PBS 群と CD34 陰性群において有意差は認められなかったが、CD34 陽性群において PBS 群、CD34 陰性群よりも有意に高値を示した。さらに、放射光微小血管造影法による AMVD が CD34 陽性細胞移植による側副血行路、新生血管の発達を正確に評価しているかを確認するために、細胞移植 28 日後に病理学的に評価した毛細血管密度と AMVD の相関性を評価したところ、SNP 負荷前の AMVD と毛細血管密度との間には有意な相関は認められなかったが、SNP 負荷後の AMVD と毛細血管密度との間には有意な相関が認められた ($R = 0.82, P < 0.0001$)。

これらの結果は SNP 負荷後の AMVD が細胞移植による側副血行路、新生血管の発達を正確に評価するのに有用であることを示唆している。

考察

多くの研究者が心筋梗塞や下肢虚血などの虚血疾患に対する幹細胞/前駆細胞移植の有用性を報告している。虚血組織に対するヒト由来幹細胞/前駆細胞の再生能の評価にヌードラット/マウスは大いなる情報を提供するが、小動物を用いたヒト由来幹細胞/前駆細胞の血管新生能の評価は技術的な制限により病理学的に評価されてきた。最近、冠動脈側副血行路形成の評価に micro CT が有用であることが報告されたが、拍動する心臓を用いた評価は困難であり、空間解像度も $18\mu\text{m}$ と理想的な手法とは言い難い。我々の開発した放射光冠微小血管造影システムは空間解像度が $6\mu\text{m}$ であり、拍動する心臓を用いた評価も可能であることから、小動物における幹細胞/前駆細胞移植により誘導された心筋内の新生血管形成や側副血行路形成の形態学的ならびに生理学的評価を可能にした。

本研究では、CD34 陽性細胞移植により誘導される新生血管形成や側副血行路形成の経時的変化を評価することができなかった。将来、生体内におけるイメージングを実現し、幹細胞/前駆細胞移植により誘導される新生血管形成や側副血行路形成の経時的変化を評価できるシステムの開発が望まれる。

結語

放射光冠微小血管造影法は小動物を対象とした幹細胞移植に誘導された心筋内の新生血管形成の形態学的ならびに生理学的評価に有用であることが示唆された。この画像システムは将来の幹細胞を用いたトランスレーショナル・リサーチだけでなく、高血圧や糖尿病、心筋症などの様々な小動物の疾患モデルにおける微小循環の病態評価に必要不可欠な手法と考えられる。

将来、生体内におけるイメージングを実現することにより、臨床前および臨床応用における微小循環障害や治療に伴う血管新生の解明、最適な治療戦略の決定に放射光微小血管造影法の有用性が期待される。

要旨

骨髓に由来する血管内皮前駆細胞 (Endothelial progenitor cell:EPC)は、浅原らにより末梢血中の単核球成分の一部として存在することが証明され、また、単核球中の CD34 陽性分画が EPC の enriched population であることが証明されて以来、多くの *in vivo/in vitro* の実験を通じて虚血性疾患に対する治療応用の有用性を示唆する知見が集積されている。小動物を用いて作成された心筋梗塞モデルに対して、幹細胞/前駆細胞移植を行い、心筋における新生血管形成や側副血行路の形成を評価する際に、現在汎用されている血管造影装置では、評価が困難であるため、病理学的な毛細血管密度の評価や、マイクロスフェア法による組織血流の測定により、その治療効果が評価されてきた。世界最大の第 3 世代大型放射光施設である SPring-8(西播磨科学公園都市・兵庫県)の放射光は平行性が高く、輝度が極めて高いため、微細構造の観察が容易であり、その放射光から取り出した単色 X 線を用いた微小血管造影装置の空間解像度は 6 μ m であることから 20 μ m レベルの微小血管の観察が可能である。本研究では、放射光微小血管造影法を用いて、高心拍で拍動する状態で、20 μ m レベルのラット冠微小血管を観察するとともに血管弛緩物質に対する反応性より冠微小血管機能を評価した。心筋梗塞ラットに対する骨髓由来 CD34 陽性細胞移植による新生血管形成効果を側副血行路の観察や冠微小血管機能評価における第 3 世代放射光微小血管造影装置の有用性が報告されている。

多くの研究者が心筋梗塞や下肢虚血などの虚血疾患に対する幹細胞/前駆細胞移植の有用性を報告している。虚血組織に対するヒト由来幹細胞/前駆細胞の再生能の評価にヌードラット/マウスは大いなる情報を提供するが、小動物を用いたヒト由来幹細胞/前駆細胞の血管新生能の評価は技術的な制限により病理学的に評価されてきた。最近、冠動脈側副血行路形成の評価に micro CT が有用であることが報告されたが、拍動する心臓を用いた評価は困難であり、空間解像度も 18 μ m と理想的な手法とは言い難い。本研究において開発された放射光冠微小血管造影システムは空間解像度が 6 μ m であり、拍動する心臓を用いた評価も可能であることから、小動物における幹細胞/前駆細胞移植により誘導された心筋内の新生血管形成や側副血行路形成の形態学的ならびに生理学的評価を可能にした。

本研究では、CD34 陽性細胞移植により誘導される新生血管形成や側副血行路形成の経時的変化を評価することができなかった。将来、生体内におけるイメ

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1870 号	氏名	福島 和人
論文題目 Title of Dissertation	<p>Synchrotron Radiation Coronary Microangiography for Morphometric and Physiological Evaluation of Myocardial Neovascularization Induced by Endothelial Progenitor Cell Transplantation</p> <p>放射光冠微小血管造影法による血管内皮前駆細胞移植誘導 心筋内新生血管形成の形態学的ならびに生理学的評価</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 林 祥園 Chief Examiner</p> <p>副査 稲野 浩一 Vice-examiner</p> <p>副査 大西 伸之 Vice-examiner</p>		
審査終了日	平成 19 年 7 月 18 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

ジングを実現し、幹細胞/前駆細胞移植により誘導される新生血管形成や側副血行路形成の経時的変化を評価できるシステムの開発が望まれる。

放射光冠微小血管造影法は小動物を対象とした幹細胞移植に誘導された心筋内の新生血管形成の形態学的ならびに生理学的評価に有用であった。この画像システムは将来の幹細胞を用いたトランスレーショナル・リサーチだけでなく、高血圧や糖尿病、心筋症などの様々な小動物の疾患モデルにおける微小循環の病態評価に必要不可欠な手法と考えられる。将来、生体内におけるイメージングを実現することにより、臨床前および臨床応用における微小循環障害や治療に伴う血管新生の解明、最適な治療戦略の決定に放射光微小血管造影法の有用性が期待される。

本研究は、心筋梗塞ラットに対する骨髓由来CD34陽性細胞移植による新生血管形成効果について、その新たな評価法の開発を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかつたSPring-8における放射光冠微小血管造影法を用いた微小循環の病態評価法について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。