

検討した。ACE 遺伝子の D 型遺伝子は人工心肺下手術後の予後危険因子であった。術後総出血量・総輸血量の増加，人工呼吸器時間，集中治療室滞在日数の延長，感染率の増加を認めた。ACE 遺伝子の I/D 多型は術後管理への重大な影響が示唆された。

## 論文審査の要旨

アンギオテンシン変換酵素 (angiotensin converting enzyme : ACE) は，相当遺伝子配列の第 16 イントロンに 287bp の挿入 (insertion : I) と欠損 (deletion : D) を持ち，II，ID，DD の遺伝子多型の違いによる血漿 ACE 活性および心血管疾患罹患率の違いが報告されている。

本研究は，ACE 遺伝子多型の違いにより，人工心肺下弁疾患手術患者の術前状態，麻酔管理と予後に差を認めるという仮説を人工心肺下に開胸弁置換・形成手術の定例手術患者 110 人を対象とし DNA ポリメラーゼ増幅反応を用いて ACE 遺伝子多型を解析し II，ID，DD 遺伝子型に分類し，II 型と non-II 型 (DD 型および ID 型) の 2 群に分けて比較検討したものである。

遺伝子多型の分布は II 型 32 人と non-II 型 78 人 (ID 型 65 人，DD 型 13 人) であった。non-II 型患者は術後集中治療室での総出血量および，赤血球総輸血量が多かった ( $p < 0.05$ )。人工呼吸管理時および集中治療室在室期間が長く，術後感染率が約 3 倍高かった ( $p < 0.05$ )。

すなわち，ACE 遺伝子の D 型遺伝子は人工心肺下手術後の予後危険因子であることが示唆され，臨床的にも極めて有用な知見である。

氏名	関 口 治 樹
学位の種類	博士 (医学)
学位授与の番号	甲第 525 号
学位授与の日付	平成 24 年 2 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (医学研究科専攻，博士課程修了者)
学位論文題目	<b>Improved culture-based isolation of differentiating endothelial progenitor cells from mouse bone marrow mononuclear cells</b> (培養法改善によるマウス骨髓単核球から血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) の分離法解明について)
主論文公表誌	PLoS ONE 第 6 巻 第 12 号 e28639 頁 2011 年
論文審査委員	(主査) 教授 萩原 誠久 (副査) 教授 清水 達也，泉二登志子

## 論文内容の要旨

### 〔目的〕

マウス骨髓からの血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) の分離法は多岐にわたり，いまだに確立されていない。近年，ヒト EPC を用いた虚血組織への細胞治療が臨床応用されつつあるが，この際の EPC を定義する細胞マーカーを用いた細胞分離法は複雑である。本研究の目的は，心筋梗塞マウスにおいて分離法の異なる骨髓単核球細胞移植による心機能改善効果を比較し，効率的な EPC の分離法を確立することである。

### 〔対象および方法〕

マウス骨髓単核球細胞を全単核球細胞 (total mononuclear cell : TT)，浮遊単核球 (floating mononuclear cell : FL)，接着単核球 (attached mononuclear cell : AT) に分離し，それぞれから EPC を培養した。これらより得られた EPC の細胞的性質と血管内皮としての機能を PCR，FACS analysis および in vitro での細胞機能評価 (func-

tional assay) で比較を行った。次にマウス心筋梗塞モデルに対する経静脈的骨髄単核球細胞移植後の心機能改善効果を心臓超音波と免疫組織染色により検討した。

#### 〔結果〕

FL より培養した EPC は、TT および AT から培養した EPC と比較して、より多分化能をもつ細胞群を多く含み、また EPC の表面マーカーと考えられている CD34, sca-1, Flk-1 を多く発現していた。一方で AT より培養した EPC は F4/80, CD11b といったマクロファージ表面マーカーを発現する細胞を多く含んでいた。血管内皮細胞の機能評価である tube formation assay, incorporation assay, shear stress test および多分化能をもつ EPC の評価法である colony formation assay, EPC の虚血状態 (hypoxia condition) での細胞内活性化の反応はいずれも FL において優れた結果を示した。

心筋梗塞モデルでは、AT 細胞は心筋梗塞層の炎症の中心部に細胞の集積を認めた。一方、FL 細胞は虚血部位と健常部位の境界部である血管新生の盛んな部位に多くの集積が認められ、これらの細胞は血管への分化が確認された。さらに、心エコーを用いた心機能も FL において AT, TT より良好な改善効果が認められた。

#### 〔考察〕

今回の検討により、FL 由来の EPC は最も多分化能をもつ細胞群を多く含み、血管内皮細胞への分化および機能も TT, AT と比較して優れていた。AT 細胞由来の EPC にはマクロファージ様の細胞群を多く含むことも確認された。また心筋梗塞に対する治療効果も FL 由来の EPC が他の群と比較して良好であった。

#### 〔結論〕

新たな培養法の確立により、細胞マーカーを使用せずにより純度の高い EPC を得ることができた。この EPC 分離培養方法は、今後の EPC を用いた細胞治療においても応用可能な方法と考えられた。

## 論文審査の要旨

マウス骨髄からの血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) の分離法は多岐にわたり、いまだに確立されてはいない。本研究の目的は、心筋梗塞マウスにおいて分離法の異なる骨髄単核球細胞移植による心機能改善効果を比較し、効率的な EPC の分離法を確立することである。マウス骨髄単核球細胞を全単核球細胞 (total mononuclear cell : TT), 浮遊単核球 (floating mononuclear cell : FL), 接着単核球 (attached mononuclear cell : AT) に分離し、それぞれから EPC を培養した。これらより得られた EPC の細胞的性質と血管内皮としての機能を PCR, FACS analysis および in vitro での細胞機能評価で比較検討した。FL より培養した EPC は、TT および AT から培養した EPC と比較して、より多分化能をもつ細胞群を多く含み、また EPC の表面マーカーと考えられている CD34, sca-1, Flk-1 を多く発現していた。今回の検討により、FL 由来の EPC は最も多分化能をもつ細胞群を多く含み、血管内皮細胞への分化および機能も TT, AT と比較して優れていた。したがって、新たな培養法の確立により、細胞マーカーを使用せずにより純度の高い EPC を得ることが可能となった。