

Title	Bcl-2 Expression Enhances Myoblast Sheet Transplantation Therapy for Acute Myocardial Infarction
Author(s)	Kitabayashi, Katsukiyo
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/26320
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

[論文題名: Thesis Title]

Bcl-2 Expression Enhances Myoblast Sheet Transplantation Therapy for Acute Myocardial Infarction (ラット急性心筋梗塞モデルに対する骨格筋芽細胞シート移植へのbcl2遺伝子導入の効果について)

専攻名 : 外科系臨床医学
Division

学位申請者 : 北林 克清
Name

[目的(Purpose)]

当科では、温度感応性培養皿を用いて作成した細胞シートによる細胞移植法は針注入法による細胞移植法の問題点を解決することが可能で、より優れた細胞移植法であることを証明して来た。しかし依然、移植後のドナー細胞は低栄養、低酸素など厳しい環境下におかれており、細胞シート移植によっても4週間後には13%まで生存率が低下している。移植細胞の生存数を獲得するためにこれまでも種々の方法が試みられており、重層化シートの植え込みや多重手術により供給細胞数を増量する方法、大網の同時移植や血管内皮細胞との共培養で血流、細胞環境を改善する方法などが試みられている。しかしこれらの方法にもそれぞれに問題点があり、今回、我々は直接的に移植細胞のアポトーシスを抑制することで長期の細胞生存を得る方法を試みた。

Bcl2はミトコンドリア外膜に存在し、ミトコンドリアからのチトクロームCの流出を阻害することでアポトーシスを抑制することが知られている。そこで、心筋梗塞に伴う心不全に対する骨格筋芽細胞シート移植療法においてbcl-2遺伝子の導入が移植細胞のアポトーシスを抑制、生存数を向上するとともに治療効果を増強するという仮説を立てた。bcl-2遺伝子を導入した骨格筋芽細胞シートを作成、*in vitro*において抗アポトーシス効果を有するか検討し、*in vivo*ではラット急性心筋梗塞にモデルに対する治療効果を検討した。

[方法ならびに成績(Methods/Results)]

pBABEpuro-bcl2レトロウイルスベクターを用いてbcl-2遺伝子を導入したL6骨格筋芽細胞から細胞シートを作成(L6bcl2)、L6からシートを作成した群(L6WT)と比較した。まず*in vitro*でマイクロアレーを用いて遺伝子の発現を評価した。結果、Growth factorとしてはPIGF、VEGFのmRNAがアップレギュレートされていた。次にアポトーシス誘導時のサイトカイン分泌能、抗アポトーシス効果を調べるため、血清を除いた低栄養環境およびスタウロsporin投与によるアポトーシスの誘導を行った。それぞれの条件下でELISA法により上澄み血清中のVEGFを定量し、シート細胞のCaspase3活性を調べた。両方の条件下においてL6bcl2群で有意にVEGFの分泌が増加し、Caspase3の活性は抑制されていた。

次に*in vivo*でラットの心筋梗塞モデルに対する治療効果を検討した。冠動脈左前下行枝を結紮した心筋梗塞モデルを作成、コントロールはシート移植なしで、L6シート移植群(L6WT)とL6bcl2シート移植群(L6bcl2)との比較を行った。心筋梗塞作成後、3、10、28日目に心エコー検査を行い、28日目に病理学的評価を行った。心エコー検査では拡張期および収縮期の前壁、後壁の壁厚および左室内径を測定しEjection Fractionを算出した。病理学的評価としてシリウスレッドで心筋の繊維化を評価した。また免疫染色はvWFで血管新生の評価を梗塞部、周辺部、遠隔部に分けて行い、c-kitで心臓へのc-kit陽性細胞の誘導を評価した。結果、エコーの各測定値では有意な変化は後壁の壁厚のみであったが、算出したEjection fractionは梗塞後10日目の時点でL6bcl2群で他の二群と比較して有意に高く、28日目までその効果は継続していた。シリウスレッド染色ではL6bcl2群は他の二群と比較して有意に繊維化の拡大が抑制されていた。血管新生の評価ではL6bcl2群は心筋梗塞部において他の二群より有意に血管新生を惹起しており、その他の部位でも有意差はないものの同様の傾向を認めた。c-kit陽性細胞の誘導については、L6bcl2群は他の二群に比べ有意に多くのc-kit陽性細胞を心臓内に認めた。さらに生存細胞の定量的な比較するため、*gfp*遺伝子を導入した骨格筋芽細胞シート(L6-GFP)、bcl2と*gfp*を同時に遺伝子導入した骨格筋芽細胞シート(L6bcl2-GFP)を作製し同様の方法で心筋梗塞モデルに移植、21日後に摘出した心臓表面の蛍光度を、条件をそろえて測定した。結果、有意にL6bcl2-GFP群で蛍光度が高く、多くの細胞生存が示唆された。

[総括(Conclusion)]

心筋梗塞に伴う心不全に対してbcl-2遺伝子を導入した骨格筋芽細胞シート移植を行ったところ移植細胞の生着が延長し治療効果が向上した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		北林 克清	
論文審査担当者	(職)	氏	名
	主 査	大阪大学教授	澤 芳樹
	副 査	大阪大学教授	金 田 安史
副 査	大阪大学教授	奥村 明之進	
論文審査の結果の要旨			
<p>骨格筋芽細胞シート移植は心不全に対する有効な治療法であるが、移植されたドナー細胞は高度のストレス状態にあり、その生存数が治療効果に影響を及ぼす。pBABEpuroレトロウイルスベクターを用いて<i>bcl-2</i> 遺伝子を導入したL6骨格筋芽細胞から細胞シートを作成(L6-Bcl2)、その抗アポトーシス効果およびラット急性心筋梗塞モデルに対する治療効果をL6からシートを作成した群(L6-WT)と比較検討した。L6-Bcl2は遺伝子解析で2.3～5.5倍のVEGFファミリーの遺伝子を発現し、スタウロスポリン刺激、低栄養の環境下で有意にアポトーシスを抑制した。ラット急性心筋梗塞モデルへの移植実験では移植28日後の心エコー検査で有意に心収縮能を改善した。組織学的にも心筋梗塞巣の拡大を抑制し、有意な血管新生の増加を認めた。</p> <p>大阪大学医学部附属病院で臨床応用されている骨格筋芽細胞シート移植治療を遺伝子導入という形で進化させた研究であり学位に値するものとする。</p>			