



Title	Engineered clustered myoblast cell injection augments angiogenesis and muscle regeneration in peripheral artery disease
Author(s)	三宅, 啓介
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87892
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	三宅 啓介
論文題名 Title	Engineered clustered myoblast cell injection augments angiogenesis and muscle regeneration in peripheral artery disease (マウス下肢虚血モデルに対する筋芽細胞シート由来細胞集塊投与の有効性の検討)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 末梢動脈疾患 (PAD) の細胞治療は、高度の虚血・炎症環境における投与細胞の生着率の低さが治療効果を制限していると考えられる。細胞シート技術は、虚血炎症環境においても効果的な細胞投与方法であり、当教室ではこれまでに筋芽細胞シートの心筋虚血に対する優れた再生治療効果を示してきた。一方で、PADにおいては虚血筋肉量が虚血心筋に比して大きく、また理想的細胞投与部位は筋肉深部を走行する閉塞血管周囲が望ましいことから、細胞シートの貼付は理想的投与方法とはならないと考えられる。細胞シート投与による細胞生着率の改善には、シート内に存在する細胞外マトリックス (ECM) の存在が重要であると考えられることから、ECMを有した細胞群の投与がPADにおいて治療効果を高める可能性が考えられる。そこで、今回、細胞シート技術を用いて作成した細胞集塊は、細胞単体投与に比較して細胞生着率を改善することで、PAD (下肢虚血) においても組織再生効果を示すという仮説のもと研究を行った。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 C57BL/6マウス由来の筋芽細胞を用いて細胞シートを作成し (1.0×10^6 /シート)、筋肉内注入投与が可能な細胞集塊を作成した。8週齢のC57BL/6マウスを用いて下肢虚血モデル (HLI) を作成し、HLI導入後7日目に細胞集塊の筋肉内投与を行った (CC群)。投与細胞の生着率の検証はGFP+ C57BL/6マウス由来の筋芽細胞を用いて実施した。対照群として同数の筋芽細胞 (SC群)、生理食塩水 (SA群) の投与を行った。足部血流を投与後4週までlaser Doppler perfusion imaging (LDPI) にて計測した。また経時的に虚血筋肉を採取し、血管新生・骨格筋新生効果ならびに炎症の状態に関する評価を行った。投与細胞の生着数はSC群と比較してCC群で投与後1週目で有意に高く (CC, $2130.0 \pm 554.5 / \text{mm}^2$; SC, $471.4 \pm 182.8 / \text{mm}^2$; $P=0.02$)、投与後4週目でも有意に高かった (CC, 411.8 ± 67.8; SC, 182.8 ± 17.9; $P=0.008$)。投与後4週後でのLDPIで評価した足部血液灌流状態は、CC群がSC群ならびにSA群に比して有意に優れていた (CC, $72.0 \pm 3.2\%$; SC, $49.0 \pm 4.8\%$; SA, $36.2 \pm 3.2\%$)。LDPIの評価と一致して、組織染色の結果、投与後4週でのCD31+/α SMA+の血管数はCC群で有意に高い値を示した (CC, $71.7 \pm 17.1 / \text{mm}^2$; SC, $34.1 \pm 3.1 / \text{mm}^2$; SA, $16.9 \pm 3.2 / \text{mm}^2$)。また、CC群では骨格筋新生が投与後早期より増強されており、CC群では投与後4週時点には骨格筋修復過程がほぼ完了していた。PCRの結果では、投与後1週間以内に、CC群で血管新生ならびに筋新生に関与する種々の遺伝子発現 (VEGF, FGF, HGF, SDF-1, Myo-D, Pax7) の有意な増強を認めた。炎症に関する評価としてのマクロファージの解析の結果、CC群においては、投与後5日目に炎症性マクロファージ (CD11c-/CD206+) の有意な増加を認め (CC, $202.8 \pm 25.1 / \text{mm}^2$; SC, $15.2 \pm 1.7 / \text{mm}^2$; SA, $3.6 \pm 1.6 / \text{mm}^2$)、PCRの結果においても同様に炎症性サイトカインに関連した遺伝子発現 (IL-10, TGF-β) の増強を認めた。 〔総 括(Conclusion)〕 細胞シート技術を用いて作成した細胞集塊は、下肢虚血において優れた細胞生着率を示し、細胞単体投与と比較して優れた血管新生効果ならびに骨格筋新生効果を示した。本研究で利用した細胞治療は、末梢動脈疾患の臨床において、重度に傷害された下肢に対しても有効である可能性が示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 三宅 啓介		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 大阪大学教授	宮川 繁
	副 査 大阪大学教授	坂田 泰史
	副 査 大阪大学教授	新谷 康

論文審査の結果の要旨

細胞再生治療は、治療困難例が多く存在する下肢重症虚血領域において重要な治療選択肢となりうる。その一方で、これまで実施されてきた細胞再生治療は、重度虚血炎症環境における投与細胞の生着率の低さが一因となり、十分な治療効果を得ることが困難であった。本研究の目的は、下肢重症虚血に対して有効性を示しうる、細胞生着率を改善する新規治療法を開発することである。

本研究では、細胞シート技術の細胞生着率の高さに着目し、優れた細胞生着率を示す主要因が細胞外マトリックスであることに着目し、細胞外マトリックスを周囲に有する細胞集塊技術を確立した。マウス下肢重度虚血モデルにおいて、細胞集塊投与は細胞単体投与と比較して有意に良好な細胞生着率を示し、結果的に血管新生及び骨格筋再生の有意な増強を認めた。さらに、本研究では、マクロファージの挙動という炎症反応の経時的な変化まで追跡し、下肢虚血モデルにおいて細胞再生治療がどのようなメカニズムで組織修復を生じるか追求した。

本研究は、今後の下肢虚血領域における再生治療の可能性を示すとともに、臨床上有効な再生治療の確立に寄与するものと考えられ、学位に値するものと認める。