

【考察】

用いた14種の癌細胞すべてが VEGF を産生し、VEGF 産生能と造腫瘍能には相関も認められた。すなわち多くの癌細胞が自ら血管新生因子を産生し腫瘍血管新生を誘導して成長することが示唆される。そして可溶性 VEGF 受容体を用いて VEGF の作用を抑制すると、腫瘍血管新生が阻害され癌細胞のアポトーシスが亢進し癌の退縮が達成された。この戦略には汎用性も期待できる。用いた可溶性 VEGF 受容体は血流に乗って腫瘍血管新生の場に到達できると考えられ、癌細胞自身に遺伝子発現される必要がない点は極めて有用な特長である。組換え蛋白としての導入も可能であり、臨床応用への実用性が高い。

可溶性 VEGF 受容体が無効であった癌細胞は VEGF 以外の血管新生因子に依存している可能性があり、複数の抗血管新生分子の併用療法が検討されるべきである。(現在検討中)

【結論】

有効で汎用性に富み、臨床応用への実用性も高い抗腫瘍血管新生による癌の遺伝子治療法の開発に動物レベルで成功した。来年度以降、複数の抗血管新生分子の併用や、腫瘍の成育段階に応じた治療法の開発などさらに臨床応用に向けた開発を行いたい。

【論文発表】

1. Takayama K, Ueno H, Nakanishi Y, Sakamoto T, Inoue K, Shimizu K, Oohashi H, Hara N. Suppression of tumor angiogenesis and growth by gene transfer of a soluble form of VEGF receptor into a remote organ. *Cancer Res.* 60: 2169-2177, 2000.
2. Honda M, Sakamoto T, Ishibashi T, Inomata H, Ueno H.

Adenovirus-mediated gene transfer of soluble flt-1 receptor inhibits the experimental subretinal neovascularization.

Gene Ther 7: 978-985, 2000.

3. Shiose S, Sakamoto T, Yoshikawa H, Hata Y, Kawano Y, Ishibashi T, Inomata H, Takayama K, Ueno H.

Adenovirus-mediated gene transfer of a soluble receptor of vascular endothelial growth factor inhibits the growth of experimental eyelid malignant melanoma.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41: 2395-2403, 2000.

4. Sato N, Mizumoto K, Nakamura M, Ueno H, Minamishima Y, Farber JL, Tanaka M. A possible role for centrosome overduplication in radiation-induced cell death. *Oncogene* 19: 5281-5290, 2000.

厚生科学研究費（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

骨髄細胞移植による末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症・ピュルガー病）・
虚血性心疾患（狭心症・心筋梗塞）への血管再生治療

分担研究者 松原弘明 関西医科大学 第二内科・心臓血管病センター

A. 研究目的

骨髄単核球細胞中には血球系幹細胞と内皮前駆細胞(EPC)に分化可能な hemangioblasts が存在する。大動物実験よりこの hemangioblasts を含む骨髄単核球細胞の虚血臓器（下肢・心筋）への自家移植は非常に高率に側副血管形成を誘導した。移植骨髄単核球細胞は新生血管の構成細胞に分化するだけでなく、bFGF>>VEGF>angiopoietin-1 といった血管内皮増殖因子や血管新生効果を持つ炎症性サイトカイン(IL1- β , TNF- α)を豊富に分泌することも見いだした。

これらの基礎データをもとに関西医科大学倫理委員会の承認を得て“自家骨髄単核球細胞移植による末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症・ピュルガー病）・虚血性心疾患（狭心症・心筋梗塞）への血管新生治療”を実施した。研究目的はこれら症例において、骨髄細胞移植の血管再生医療としての有効性・安全性を確認することである。

B. 研究方法

末梢性血管疾患の適用は内科的・外科的血行再建術の困難な安静時疼痛の存在する Fontaine 分類 III の症例であった。虚血性心疾患への臨床応用は、末梢性血管疾患への治療効果を評価後とした。実施方法は全身麻酔下に患者腸骨より骨髄液(約 400mL)を採取し、骨髄単核球細胞を 1%Hes (dextran)を用いて高率に回収した（87%回収率）。分離・濃縮された骨髄単核球細胞を虚血下肢腓腹筋内に筋肉内注射 (1×10^8 細胞 x 40 箇所)を行なった。評価方法は 1) 経皮的組織酸素分圧 (TcO₂, mmHg)、2) 皮膚温（サーモグラフィー）、3) Laser

Doppler 血流計、4) Air plethymography、5) ABPI (ankle-brachial index)、6) 血管造影 (DSA)、7) 自覚症状を基準に解析した。

C. 研究結果及び考察

2001 年 2 月 9 日までにすでに 7 例の ASO 症例に細胞移植を行った。下記に代表的治療成績を述べるが、安静時疼痛の消失・歩行時疼痛出現時間が延長した（4.5-8.4 分延長）。移植下肢での組織酸素分圧の上昇（+28~+58mmHg 上昇）、皮膚温の上昇（2.2-3.2 度）、下肢血流量の増加（Air plethymography：63~214%増加）、ABPI（0.11~0.38 上昇）が各症例で観察された。移植 4 週後以降に行われた血管造影では微細血管の新生が観察された。副作用として、細胞移植による下肢浮腫・発赤・疼痛は全く観察されなかった。血中 VEGF 濃度の上昇は観察されない。下肢 MRI では骨形成は観察されなかった。全身麻酔の煩雑さを除けば、安価で効果的な治療法と考えられた。

第 1 症例：66 歳・男性であり、合併する糖尿病は経口薬にてコントロール良好であった。2 年前に ASO による壊死のため膝関節より下肢切断、本年より右下肢の安静時疼痛が増強し Fontaine III に分類された。TcO₂: 17mmHg (正常 80-100)、皮膚温: 30°C、ABPI: 0.2 (正常 1.1) と下肢血流は低下していた。移植 3 週間後には TcO₂: 17→55、皮膚温: 30°→33°C、ABPI: 0.2→0.38、血管造影にて微細末梢血管像の増加と客観評価にて下肢血流改善効果が観察されるとともに完全に安静時疼痛は消失した。

第 2 症例：63 歳・男性であり、二度にわたる下

肢バイパス手術にても血行再建術効果なく、左下肢の安静時疼痛が増強し Fontaine III に分類された。TcO₂: 45mmHg、皮膚温: 32.4°C、ABPI: 0.4 と下肢血流は低下していた。移植 3 週間後には TcO₂: 45→60、皮膚温: 31.4°C→33.8°C、トレッドミルでの下肢疼痛出現時間: 3.5→7 分と改善、ABPI: 0.24→0.42、自覚症状も安静時疼痛は消失した。しかしながら、血管造影では明らかな末梢血管像の増加は観察されなかった。

D. 評価

1) 達成度について:

動物基礎実験での成績が十分に症例にて反映された。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について: 国際的には初めての臨床治験である。ASO で下肢疼痛・運動機能抑制だけでなく、切断を余儀なくされる症例は本邦には約 10 万人存在すると考えられる。これら患者さん方には有効で安全な血管再生治療と考えられる。

3) 今後の展望について:

臨床成績をまとめて高度先進医療に申請し保険適用を受けることが望まれる。虚血心筋に対しては NOGA システムを用いた冬眠心筋へのピンポイントでの移植が望まれる。

E. 結論: ASO 患者に対する骨髄単核球細胞移植は虚血下肢血行再建術として安全で有効な血管再生医療と考えられるが、効果の持続性・骨髄細胞の他の間葉系細胞への分化・有効注入細胞数の評価などが、今後さらに検討される必要がある。

F. 研究発表

1) 国内

口頭発表 4 件

原著論文による発表 1 件

それ以外 (レビュー等) の発表 1 件

そのうち主なもの

論文発表:

正木浩哉、松原弘明、他 2 人。閉塞性動脈硬化症、日本臨床、第 59 巻・1 号・141-146

学会発表: 2001 年日本循環器学会で 1) シンポジウム: 急性心筋梗塞における再疎通療法 (虚血性心疾患に対する自家骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生療法の基礎的研究)、2) シンポジウム: Molecular basis for atherosclerosis (自家骨髄単核球細胞移植による慢性閉塞性動脈硬化症例への血管再生医療)

2) 海外

口頭発表 3 件

原著論文による発表 2 件 (ASO 臨床成績は投稿準備中)

それ以外 (レビュー等) の発表 1 件

そのうち主なもの

論文発表:

1) Fujiyama S, Matsubara H, Mori Y, Masaki H, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Kitabayashi I, Uchiyama Y, Iba S, Iwasaka T. Angiotensin AT1 and AT2 Receptors Differentially Regulate Angiopoietin 2 Expression and VEGF Expression and Angiogenesis by Modulating Heparin Binding EGF-Mediated EGF Receptor Transactivation. Circ Res, 2001;88:22-29

2) Maruyama K, Mori Y, Murasawa S, Masaki H, Takahashi N, Tsutsumi Y, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Yoko Tanaka, Shibuya M, Inada M, Matsubara H, Iwasaka T. Interleukin-1 β Upregulates Cardiac Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor KDR / Flk-1 via Activation of Protein Tyrosine Kinases. J Mol Cell Cardiol 1999;31:607-617

学会発表: 2000 年 American Heart Association (New Orleans)

Nishiue T, Kamihata H, Matsubara H, et al. Bone marrow-derived cell secretes angiogenic factors and intramyocardial autologous transplantation enhances

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

平成 12 年 12 月 4 日 特許出願「骨髄単核球細胞の
分離、濃縮方法及び血管再生剤」

collateral perfusion in pigs with myocardial infarction.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sekiguchi K, Kurabayashi M, Oyama Y, Aihara Y, Tanaka T, Sakamoto H, Hoshino Y, Kanda T, Yokoyama T, Shimomura Y, Iijima H, Ohyama Y, Nagai R.	Homeobox protein hex induces SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain-B gene expression through the cAMP-responsive element.	Circ Res	88	52-58	2001
Hoshino Y, Kurabayashi M, Kanda T, Hasegawa A, Sakamoto H, Okamoto E, Kowase K, Manabe I, Suzuki T, Nakano A, Takase S, Wilcox JN, Nagai R.	Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in smooth muscle cells: analysis of developmental and pathological expression profiles show implications as a predictive factor for restenosis.	Circulation	102	2528-34	2000
Kanai H, Tanaka T, Aihara Y, Takeda Si, Kawabata M, Miyazono K, Nagai R, Kurabayashi M.	Transforming growth factor-ss/Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells	Circ Res	88	30-36	2000
Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, Shimamura K, Kimura J, Michishita I, Suzuki T, Nagai R.	Circulating oxidized low density lipoprotein levels; a biochemical risk marker for coronary heart disease.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	20	2243-2247	2000
Saito Y, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, Kuro-o M, Nabeshima Yi, Kurabayashi M, Nagai R.	In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome.	Biochem Biophys Res Commun	276	767-7772	2000
Shindo T, Kurihara H, Kuno K, Yokoyama H, Wada T, Kurihara Y, Imai	ADAMTS-1: a metalloproteinase- disintegrin essential for normal growth, fertility, and	J Clin Invest	105	1345-1352	2000

T, Wang Y, Ogata M, Nishimatsu H, Moriyama N, Ohhashi Y, Morita H, Ishikawa T, Nagai R, Yazaki Y, Matsushima K.	organ morphology and function.				
Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saiura A, Sugiura S, Aoyagi T, Imai Y, Kurihara H, Kimura K, Omata M, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R.	A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia.	J Mol Cell Cardiol	32	1395-1400	2000
Nagai R	Transcriptional regulation of smooth muscle phenotypic modulation.	Ann N Y Acad Sci	902	214-222 222-223	2000
Wada Y	Expression of the transcriptional factor egr-1/BTEB2 in cardiac xenograft vascular remodeling.	Transplant Proc	32	1089-1091	2000
Hoshino Y	Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in vascular smooth muscle cells : analysis of developmental and pathological expression profiles shows implications as a predictive facto	Circulation	102	2528-2534	2000
Ogata T	Inducible expression of BTEB2, a member of the zinc-finger family of transcription factors, in cardiac allograft arteriosclerosis.	Transplantation.	32	2032-2033	2000
Ogata T	Inducible expression of basic transcription factor-binding protein 2 (BTEB2), a member of zinc finger family of transcription factors, in cardiac allograft vascular disease.	Transplantation	70	1653-1656	2000
Ogata T	Inducible expression of basic transcription element-binding protein 2 in proliferating smooth muscle cells at the vascular anastomotic stricture.	J Thorac Cardiovasc Surg	119	983-989	2000

Saito Y	In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome.	Biochem Biophys Res Comm.	276	767-772	2000
Sata M, Kakoki M, Nagata D, Nishimatsu H, Suzuki E, Aoyagi T, Sugiura S, Kojima H, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Omata M, Nagai R, Hirata Y	Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cGMP-independent mechanism.	Hypertension	36	83-88	2000
Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, Arai N, Sata M, Sugiura S, Takenaka K, Gualberto A, Hixon ML, Wagner MW, Aoyagi T.	Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training	Circulation	101	2134-2137	2000
Nagata D, Suzuki E, Nishimatsu H, Yoshizumi M, Mano T, Walsh K, Sata M, Kakoki M, Goto A, Omata M, Hirata Y.	Cyclin A downregulation and p21(cip1) upregulation correlate with GATA-6-induced growth arrest in glomerular mesangial cells.	Circ Res	87	699-704	2000
Aoki M, Morishita R, Taniyama Y, Kida I, Moriguchi A, Matsumoto K, Nakamura T, Kanda Y, Higaki J, Ogihara T.	Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets	Gene therapy	7	417-427	2000
Matshusiba H, Morishita R, Aoki M, Tomita N, Taniyama Y, Nkagami H, Shiozato T, Higaki J, Kaneda Y, Ogihara T.	Transfection of antisense p53 tumor suppressor gene oligodeoxynucleotides into rat carotid artery resulted in abnormal growth of vascular smooth muscle cells	Circulation	101	1447-1452	2000
Yamamoto K, Morishita R, Tomita N, Shimozato T, Nakagami H, Kikuchi A, Aoki M, Higaki J, Kaneda Y, Ogihara T.	Ribozyme oligonucleotides against transforming growth factor- β inhibited neointimal formation after vascular injury in rat model: potential application of ribozyme strategy to treat cardiovascular disease	Circulation	102	1308-1314	2000
Taniyama Y, Morishita R, Nakagami H,	Potential contribution of a novel antifibrotic factor, hepatocyte growth factor, to	Circulation	102	246-252	2000

Moriguchi A, Salonjyo H, Kim S, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T.	prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamsters				
Morishita R, Aoki M, Kaneda Y.	Oligonucleotide-based gene therapy for cardiovascular disease: are oligonucleotide therapeutics novel cardiovascular drugs? receptor α	Current Drug Targets	1	15-23	2000
Murohara T, et al.	Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization.	J Clin Invest	105	1527-1536	2000
Duan J. Murohara T. et al	Hypercholesterolemia inhibits angiogenesis in response to hindlimb ischemia: nitric oxide-dependent mechanism.	Circulation	111	370-376	2000
Duan J. Murohara T. et al	Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia.	Arterioscler Thromb Vasc Biol.	20	2579-2585	2000
Shintani S. Murohara T. et al.	Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation.	Circulation	103	879-903	2001
Takayama K, Ueno H, Nakanishi Y, Sakamoto T, Inoue K, Shimizu K, Oohashi H, Hara N.	Suppression of tumor angiogenesis and growth by gene transfer of a soluble form of VEGF receptor into a remote organ.	Cancer Res	60	2169-2177	2000
Honda M, Sakamoto T, Ishibashi T, Inomata H, Ueno H.	Adenovirus-mediated gene transfer of soluble flt-1 receptor inhibits the experimental subretinal neovascularization.	Gene Ther	7	978-985	2000
Shiose S, Sakamoto T, Yoshikawa H, Hata Y, Kawano Y, Ishibashi T, Inomata, Takayama K, Ueno H.	Gene transfer of a soluble receptor of vascular endothelial growth factor inhibits the growth of experimental eyelid malignant melanoma.	Ophthalmol Vis Sci	41	2395-2403	2000
Sato N, Mizumoto K, Nakamura M, Ueno H, Minamishima Y, Farber JL, Tanaka M.	A possible role for centrosome overduplication in radiation-induced cell death.	Oncogene	19	22-29	2000

Fujiyama S, Matsubara H, Mori Y, Masaki H, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Kitabayashi I, Uchiyama Y, Iba S, Iwasaka T.	Angiotensin AT1 and AT2 receptors differentially regulate angiotensin 2 expression and VEGF expression and angiogenesis by modulating heparin binding EGF- mediated EGF receptor transactivation	Circ Res	88	22-29	2001
Murasawa S, Matsubara H, Mori Y, Masaki H, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Kitabayashi I, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Iba S, Iwasaka T.	Angiotensin II initiates tyrosine kinase Pyk2- dependent signaling leading to activation of Rac1- mediated c-Jun NH2- terminal kinase.	J Biol Chem	275	26856- 26863	2000
正木浩哉、松原弘 明、岩坂壽二	閉塞性動脈硬化症	日本臨床	59 : 1	141-146	2001