

C-reactive protein and interleukin-6 levels with silent brain infarction.  
Stroke, 36(4):768-72.

## 2. 学会発表

Hoshi T, Kitagawa K, Yamagami H., et al. Increased levels of serum high-sensitivity C-reactive protein and Interleukin-6 are associated with silent brain infarction. 2005 International Stroke Conference. New Orleans, USA, February 2-4, 2005

## I. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1. 対象患者の臨床特徴と CD34 との相関

	Mean±SD or n(%)	$\rho$ or $r$	$P$
年齢, y	68.9±7.1	-0.221	NS
男性	25(59.5)	0.234	NS
Body mass index	22.6±2.0	-0.133	NS
喫煙 Never	21(50.0)		
Quitter	14(33.3)		
Current	7(16.7)	0.166	NS
高血圧	29(69.0)	-0.159	NS
高脂血症	25(59.5)	-0.094	NS
糖尿病	9(21.4)	-0.086	NS
脳梗塞	10(23.8)	0.125	NS
白質病変(Grade1/2/3)			
PVH, n	18/15/3	-0.352	0.022
DSWMH, n	19/12/4	-0.221	NS
WML		-0.309	0.047
収縮期血圧, mmHg	136.6±17.2	-0.386	0.039
拡張期血圧, mmHg	78.5±10.8	-0.286	NS
Total-cholesterol, mg/dl	202.1±32.9	0.124	NS
Triglyceride, mg/dl	105.2±83.5	0.107	NS
HDL-cholesterol, mg/dl	62.8±23.2	-0.209	NS
Blood glucose, mg/dl	104.0±28.8	0.121	NS
MMSE	27.8±1.8	-0.137	NS
Mean-mIMT, mm	1.25±0.53	-0.050	NS

WML=PVH+DSWMH

図1 白質病変の分布

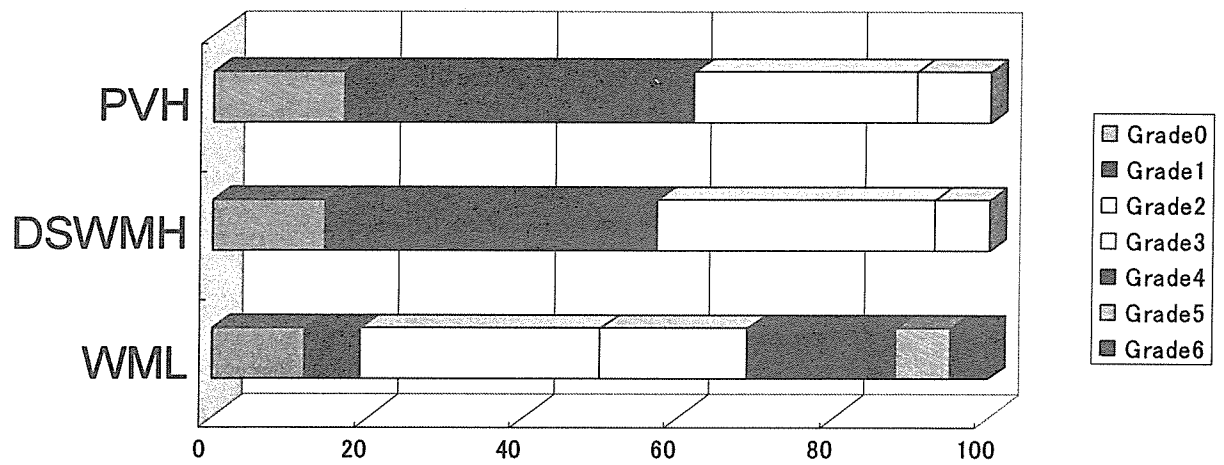
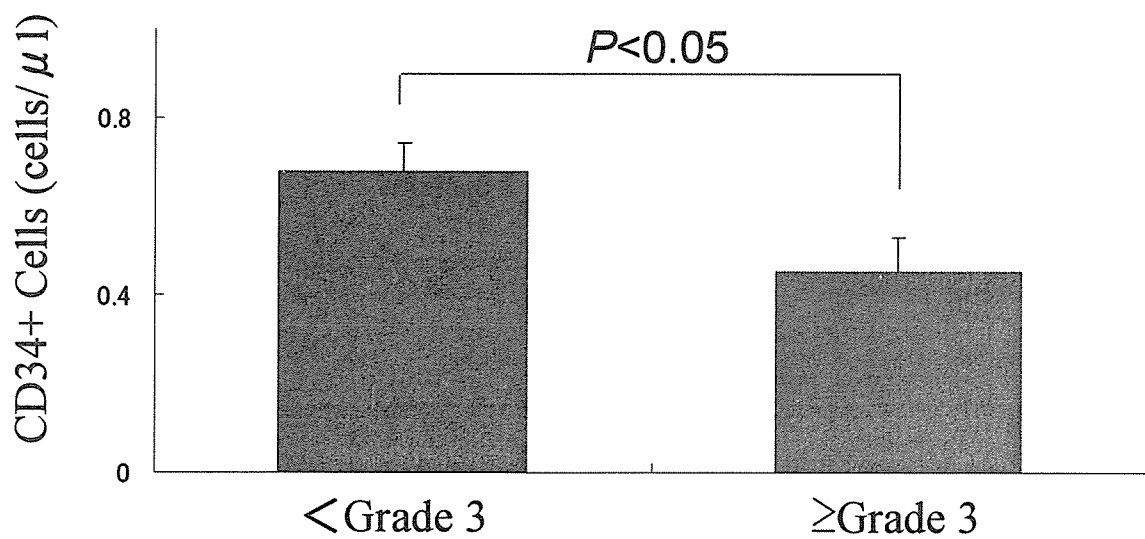


図2 白質病変の重症度とCD34抗原陽性細胞数



分担研究課題名

ハイリスク患者における予後の解析

分担研究者

丸山 彰一

名古屋大学医学部附属病院腎臓内科講師

研究要旨

慢性腎疾患が脳および心血管事象に対する危険因子となることが明らかとなってきたが、特に維持透析を行っている患者はハイリスク患者であり、この集団における予後の解析は透析患者のみならず非透析患者の診断・予防・治療に役立つ重要な情報を提供するものと期待される。そこで我々は、1) 透析患者では血管内皮前駆細胞や骨髄幹細胞が減少していて、このことが血管事象の発病を促進する、2) 不足した幹細胞を投与することで血管事象の発生が抑制される、という仮説を立て、このことを実証するための研究を行った。その結果、①透析患者ではコントロール群と比較して有意に減少していること、②1年間の前向き研究の結果、透析患者のうちCD34が少ない群では比較的保たれている群では比較して全死亡率および血管事象による死亡率ともに有意に高いこと、さらに③動物モデルを用いた検討においては、骨髄由来幹細胞投与がG-CSFとの併用によりシスプラチン腎症に対する治療効果があることを明らかにした。

## A. 研究目的

我が国の透析患者数は25万人を超えなお直線的に増え続けており、透析に要する医療費は1兆円を超え、慢性腎不全治療が我が国の医療財政に与える影響は多大なものとなっている。さらに最近では慢性腎臓病が血管疾患の独立した危険因子であることが報告されており、本分担研究は、ハイリスク患者である透析患者における予後を幹細胞の観点から解析することを目的とする臨床研究と、細胞治療の可能性を検討する基礎研究のふたつの部分から構成される研究を行った。

臨床的研究としては、「ハイリスク群である透析患者では血管内皮前駆細胞や骨髄幹細胞が減少していて、このことが血管事象の発生を促進する」ということを検証するための研究を行った。これまでの報告では、非透析患者では内皮前駆細胞の数が少ない者では多い者に比較して予後が不良である可能性が報告されているが、透析患者では血中の血管内皮前駆細胞が少ないとする報告とそうではないとする報告があり、一定の結果が得られていない。また、透析患者における血中の骨髄幹細胞と疾患や予後との関連を検討した研究はこれまでに報告がない。我々はまず、透析患者におけるCD34陽性細胞数を測定することによりCD34数と各種パラメータや既往症との関連を検討するとともに、1年間透析患者を前向きに追跡し検討した。一次エンドポイントは心血管事象による死亡、二次エンドポイントは全死亡とした。

また、動物モデルを用いて細胞治療の可能性を検討する基礎研究に関しては、小動物にて腎障害モデルを作成し、各種体性幹細胞を動物モデルに投与しその治療効果の検討を行った。

## B. 研究方法

## (1) 透析患者における CD34 陽性細胞数と脳・心血管事象との関連の検討

### ① 患者エントリー

対象患者は名古屋共立病院で日中に維持透析を行っているすべての患者とした。全員に研究についての十分な説明をし、同意が得られた方から血液を採取し独立行政法人国立病院機構大阪南医療センターに移送した。田口らが独自に開発した方法で、CD34 陽性細胞数（絶対数）を測定した。対象患者として、循環器病センターに通院中の非透析患者（高血圧、脳血管障害等の疾患を含む）から同様に血液を採取し CD34 陽性細胞数を測定した。

### ② 横断的解析

透析患者では CD34 陽性細胞数が少なく CD34 陽性細胞数は血管障害の有病率と相関するとの仮説のもとに横断的解析を行った。透析患者とコントロール群の CD34 陽性細胞数を、各年齢層に分けて比較検討した。続いて、各種臨床パラメータ毎に CD34 陽性細胞数を比較した。

### ③ 前向き予後追跡研究

エントリーした患者を前向きに 1 年間追跡した。ROC 解析で、CD34 陽性細胞数のカットオフ値を決定した。一次エンドポイントは心血管事象の発生、二次エンドポイントは全死亡とした。

## (2) Cisplatin 腎症に対する G-CSF、骨髄単核球細胞併用療法の効果の検討

7 週齢の Lewis ラットに cisplatin 6 mg/kg を腹腔内投与し、骨髄単核球細胞単独群、G-CSF 単独群、G-CSF + 骨髄単核球細胞群、コントロール群の 4 群に分けた。骨髄単核球細胞単独群では、cisplatin 投与 24 時間後に他の Lewis ラットから採取した骨髄単核球細胞  $2.5 \times 10^7$  個を尾静脈より投与した。G-CSF 単独群では cisplatin 投与時、6 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後に G-CSF 50  $\mu$ g/kg を皮下投与した。G-CSF + 骨髄単核球細胞群では、G-CSF 単独群と同様の G-CSF 投与に加え、cisplatin 投与 6 時間後に他の Lewis ラットから

採取した骨髄単核球細胞 $2.0 \times 10^7$ 個を尾静脈より投与した。コントロール群ではcisplatin投与時、6時間後、24時間後、48時間後、72時間後に同量の生理食塩水を皮下投与した。4群とも day0、day1、day4、day5、day7、day11、day29 に血液を採取し、腎機能を比較検討した。

#### (倫理面への配慮)

臨床研究に関しては、名古屋共立病院の倫理委員会に申請し承認を得ている。特に CD34 数の研究においては、名古屋大学倫理委員会と国立循環器センター倫理委員会の承認も得ている。血液を提供して頂く際には十分な説明の上にご本人に文書で同意を得ている。またすべての検体は匿名化して扱い、個人情報漏洩することがないように最大限の注意を払っている。

### C. 研究結果

#### (1) 透析患者における CD34 陽性細胞数と血管事象との関連の検討

血管事象発生のハイリスク群である透析患者の血中の幹細胞につき検討した。名古屋共立病院の維持透析患者 204 名から同意を得て血液サンプルを採取し、CD34 陽性細胞数を測定した。その結果を年齢毎にコントロール群（高血圧症、動脈硬化性疾患を含む）の CD34 陽性細胞数と比較検討を行ったところ、各年齢群で透析患者における有意な減少が観察された(表 1)。次に疾患と CD34 陽性細胞数との関連を横断的に検討したところ、年齢、Ht、Hb、WBC、アルブミンそして、Ca x P 値で有意差が見られた (表 2)。次に1年間の前向き追跡結果を、ROC 解析で求めたカットオフ値 0.37 (AUC 0.71) で区切って解析した。基礎データを表 3 に示す。エントリー時のデータでは年齢、脳血管障害の既往、CaxPi 値、BMI が、CD34 陽性細胞数が多い群とより少ない群との間で有意差が見られた。血管事象は

CD34 低下群でより多く発生していた(表 4)。Cox 解析では低 CD34 陽性細胞数と血管事象の既往、iPTH が心血管事象の発生に対する危険因子であることが判明した(表 5)。全死亡に対しても低 CD34 陽性細胞数は強力な危険因子であった(表 5)。Kaplan-Meier 解析では、CD34 陽性細胞数が 0.37 を下回った患者群では、血管事象のない期間と全原因による死亡率ともに不良であった(表 6)。

## (2) Cisplatin 腎症に対する G-CSF、骨髄単核球細胞併用療法の効果の検討

骨髄単核球細胞単独群ではコントロール群に比べ腎機能の改善効果は認められなかった(図 1)。G-CSF 単独群ではコントロール群に比べ有意に腎機能の悪化を抑制していた(図 2)。G-CSF + 骨髄単核球細胞群では G-CSF 単独群に比べ腎機能悪化の抑制効果が強かった(図 3)。

## D. 考察

透析患者は血管事象の発症に関して、ハイリスク患者であると言える。そのハイリスク患者の予後を解析することは、非透析患者の予後推測・診断・予防などに重要な示唆を与えてくれる。特にハイリスク患者で検討することで、より短い追跡期間で確実な結果が得られることが期待される。

透析患者の血中の内皮前駆細胞(血中骨髄系幹細胞)に関する検討では、各年齢群いずれでも透析患者ではコントロール群に比較して CD34 陽性細胞数が減少していることが明らかとなった。このことは、透析患者がハイリスク患者であることの結果というだけでなく、原因となっている可能性も示唆していると考えられる。疾患と CD34 陽性細胞数、およびベースラインのデータと CD34 陽性細胞数との関連も横断的に検討においては、年齢、Ht、Hb、WBC、アルブミンそして、Ca x P 値で有意差が見られた。年齢が高いほど CD34 陽性細胞数が少ないことはこれまでの報告と一致していた。Ht、Hb が高値であること、Ca x P 値が高



値であることは、比較的若年で栄養状態、全身状態が良好な患者である可能性が高く、そのことがより多い CD34 陽性細胞数と関連している可能性が考えられた。

続いて1年間の前向き追跡結果を、ROC 解析で求めたカットオフ値 0.37 (AUC 0.71) で区切って解析した。エントリー時のデータでは年齢、脳血管障害の既往、CaxPi 値、BMI について、CD34 陽性細胞数が多い群とより少ない群との間で有意差が見られた。この結果は CaxPi 値以外は従来考えられていることと矛盾のないデータであった。Pi 値に関しては血管障害促進因子という面もあり、今後の検討を要すると考えている。1年間の前向き追跡結果では入院を要する血管事象は CD34 低下群でより多く発生していた。Cox 解析では低 CD34 陽性細胞数が心血管事象の発生に対する危険因子であることが判明した。血管事象の既往、iPTH も全死亡に対しても低 CD34 陽性細胞数は強力な危険因子であった。これは、従来の報告と矛盾しない結果である。Kaplan-Meier 解析では、CD34 陽性細胞数が 0.37 を下回った患者群では、血管事象のない期間と全原因による死亡率ともに不良であった。今回の成果により、CD34 陽性細胞数を測定し、低値を示す患者はハイリスク患者としてより厳重な管理を行い血管事象の発生を予防する必要性を示唆していると考えている。また、ハイリスク群である透析患者における検討を行ったことにより、1年間という短期間で有意義な結果が得られたが、こうしたハイリスク群の解析結果は非透析患者にも応用可能であると考える。今後も、まずはハイリスク群である透析患者で各種の検討を行い、それを非透析患者に拡大していくという研究の戦略は有用であることが示唆された。

さらに骨髄など体性幹細胞を用いた治療法の開発に関しても、G-CSF 単独は有効であり、骨髄単核球と G-CSF の併用ではさらなる治療効果の増強が確認された。臨床応用を実現する際、この結果の持つ意味は大きいと考える。すなわち、幹細胞単独での投与という治療法に固執することなく幹細胞の作用を最大限に引き出す因子の併用も含めあらゆる可能性を検討する必要があると考えている。我々は G-CSF が骨髄単核球を *in vivo* で刺激し、腎再生促進因子の分泌を増強するという仮説を立て、現在その分子機序を解明するための研

究を進めている。

## E. 結論

ハイリスク群である透析患者の前向き研究で、CD34 陽性細胞の減少が脳・心血管事象の発生に関与していることを示す結果が得られた。このことは、CD34 陽性細胞数の測定が予後不良患者を選定する上で大変有用な検査となることを示しており、臨床的な意義は大きいと考える。動物モデルでの検討では、体性幹細胞が臓器再生を促進する可能性を示す実験結果が得られた。我々は細胞治療のソースとしては臍帯血や骨髄細胞だけでなく脂肪組織も有望であることを明らかにしつつあるが、本研究では骨髄由来幹細胞に関してはG-CSFをはじめとする再生促進分子との併用の有用性も示された。本研究の成果は脳および心血管事象の新たな診断・予防・治療法の開発をめざす上で大変重要なものであると考えられた。今後は引き続き、有効かつ実現可能な新たな診断・予防・治療法の開発につながる研究を推し進める予定である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Suzuki S, Maruyama S, Sato W, Morita Y, Sato F, Miki Y, Kato S, Katsuno M, Sobue G, Yuzawa Y, Matsuo S: Geranylgeranylacetone ameliorates ischemic acute renal failure via induction of Hsp70. *Kidney int* 67: 2210-2220. 2005.

### 2. 学会発表

- 1) Maruyama S, Ozaki T, Chabouk A, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ono Y, Yuzawa Y,

and Matsuo S: Renoprotective properties of G-CSF and mononuclear cells derived from bone marrow. ASN 38th Annual Renal Week Meeting, 2005.

- 2) Ozaki T, Chabouk A, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ono Y, Yuzawa Y, and Matsuo S: Recombinant human soluble thrombomodulin inhibits apoptosis and attenuates ischemic acute renal failure. ASN 38th Annual Renal Week Meeting, 2005.
- 3) Chabouk A, Ozaki T, Maruyama S, Yamamoto T, Yasuda K, Morita Y, Ono Y, Yuzawa Y, and Matsuo S: The effects of olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, on ischemic acute renal failure, ASN 38th Annual Renal Week Meeting, 2005.
- 4) 丸山彰一: ワークショップ「Heat shock orotein と腎疾患」第 35 回日本腎臓学会西部学術大会 (長崎) 2005. 9. 30-10. 1

#### H. 知的財産権の出願・登録取得状況 (予定を含む)

##### 1. 特許

- 1) Geranylgeranylacetone 投与によるラット腎での Hsp70 の誘導と腎虚血再灌流障害の抑制作用について : 特許出願済み

表 1. Comparison of Stem Cell Level Between Dialysis and Age-matched Control Patients

	Dialysis	Control	P value
Overall	0.48 ± 0.32	0.87 ± 0.55	<0.0001
< 49 years	0.62 ± 0.21 (12)	1.11 ± 0.56 (9)	0.011
50-59 years	0.57 ± 0.33 (36)	1.29 ± 0.59 (20)	<0.0001
60-69 years	0.47 ± 0.32 (82)	0.87 ± 0.68 (65)	<0.0001
70-79 years	0.46 ± 0.36 (54)	0.75 ± 0.37 (79)	<0.0001
>80 years	0.34 ± 0.21 (20)	0.65 ± 0.37 (10)	0.0059

( ); n

表 2 . Correlation of Stem Cell Level to Each Parameter in Dialysis Patients

	r	P value
Age	-0.234	<u>0.0006</u>
Ht	0.169	<u>0.013</u>
Hb	0.151	<u>0.026</u>
WBC	0.304	<u>&lt;0.0001</u>
Albumin	0.201	<u>0.0032</u>
Total cholesterol	0.011	0.86
CaxPi	0.191	<u>0.0052</u>
iPTH	0.034	0.61

表 3 Baseline Characteristics

	CD34 > 0.37 (n=123)	CD34 < 0.37 (n=93)	P value
Male (%)	72 (58.5)	50 (53.7)	0.48
Age (years)	62 ± 11	68 ± 9	<0.0001
Duration of HD (years)	7.8 ± 6.7	8.7 ± 7.7	0.39
Diabetes (%)	61 (49.5)	44 (47.3)	0.73
Hypertension (%)	90 (74.3)	67 (72.0)	0.70
Smoking (%)	32 (26.0)	32 (34.7)	0.16
Previous CVD (%)	79 (64.2)	70 (75.2)	0.082
CAD (%)	39 (31.9)	35 (38.0)	0.35
Stroke (%)	33 (27.0)	37 (39.7)	0.048
PAD (%)	16 (13.0)	17 (18.2)	0.28
Previous PTx (%)	7 (5.6)	9 (9.6)	0.26
Hematocrit (%)	32.6 ± 3.5	31.8 ± 3.1	0.062
Albumin (mg/dl)	3.6 ± 0.3	3.5 ± 0.3	0.11
Total cholesterol (mg/dl)	155 ± 36	154 ± 34	0.84
HDL cholesterol (mg/dl)	40 ± 14	42 ± 12	0.30
LDL cholesterol (mg/dl)	76 ± 26	75 ± 27	0.93
Ca x Pi	51.7 ± 11.7	47 ± 11	0.0062
Intact PTH (ng/ml)	126 ± 101	116 ± 130	0.52
KT/V	1.44 ± 0.22	1.49 ± 0.24	0.10

Body Mass Index	21.4 ± 3.4	19.9 ± 2.7	<u>0.0008</u>
-----------------	------------	------------	---------------

CVD; cardiovascular disease; CAD; coronary artery disease requiring PCI or CABG; PAD; peripheral artery disease

表 4 Cardiovascular (CV) events during 12 months

	CD34 > 0.37 (n=123)	CD34 < 0.37 (n=93)
Hospitalization due to CVD		
PCI	7	10
CABG	0	1
Stroke	0	2
PAD	1	3
Death		
Congestive heart failure	0	1
Stroke	1	1
Pericarditis	0	2
Infection	0	2
Ischemic colitis	0	1



表5 Predictors for CV Events and Mortality during 1-year on Cox Multivariate Analysis\*

	Odds ratio	95%CI	P value
CV events			
CD34 < 0.37	2.99	2.01-4.46	0.0059
Previous CVD	20.40	6.52-63.94	0.0082
Intact PTH	1.02	1.01-1.04	0.048
Mortality			
CD34 < 0.37	7.14	2.44-20.82	0.032
Age	1.06	1.01-1.13	0.033
Body mass index	0.69	0.53-0.89	0.016

\*; including gender, age, duration of HD, diabetes, hypertension, smoking, previous CVD, previous PTx, Hematocrit, Albumin, LDL cholesterol, intact PTH and BMI

**表 6 1-year CV Event-free and All-caused Survival (%) on Kaplan-Meier Analysis**

	CD34 > 0.37 (n=123)	CD34 < 0.37 (n=93)	P value (Log-rank)
CV event-free survival	92.7	76.3	0.0008
All-caused survival	99.2	92.2	0.0084

図1 Cisplatin腎症に対する骨髄単核球細胞治療

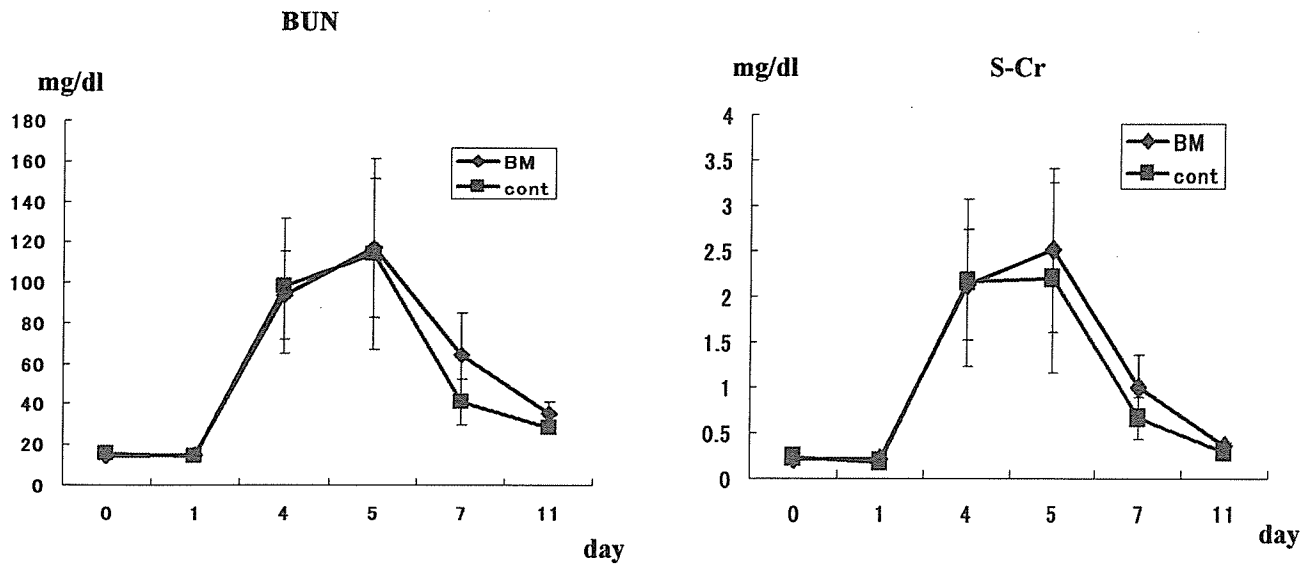


図2 Cisplatin腎症に対するG-CSF治療

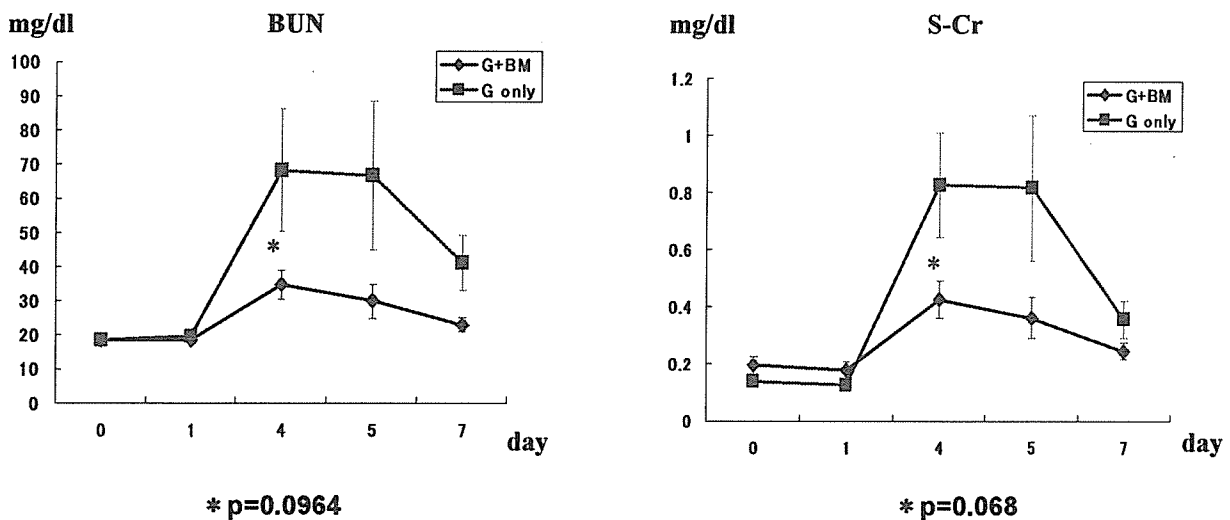
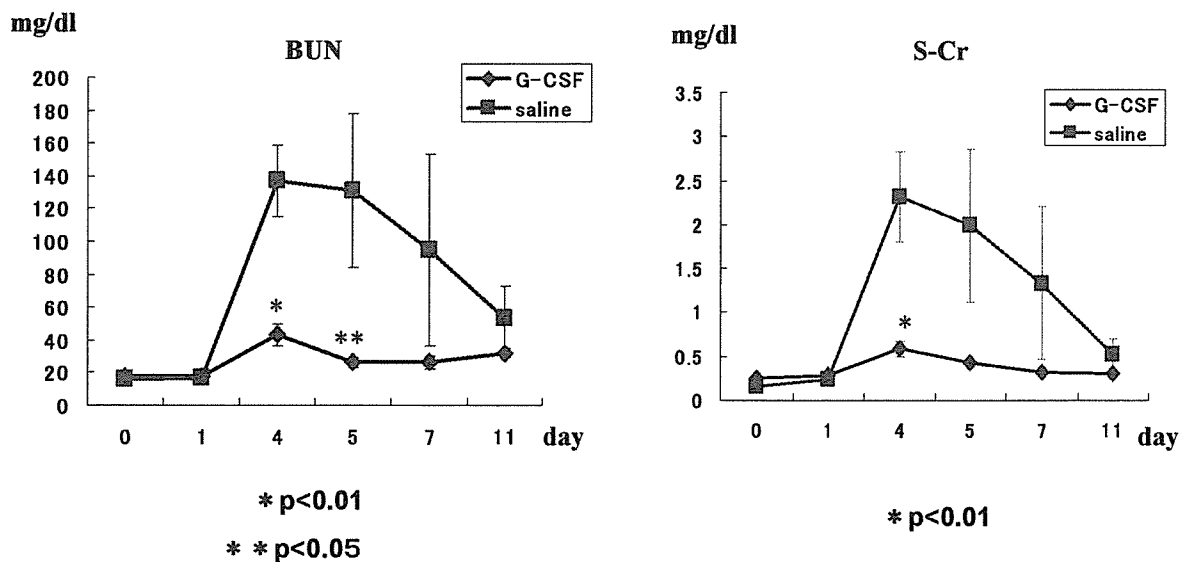


図3 Cisplatin腎症に対するG-CSF+骨髄単核球細胞治療



Reprinted from CIRCULATION, Volume 109, Number 24, June 22, 2004  
Lippincott Williams & Wilkins Printed in U.S.A.

## **Circulating CD34-Positive Cells Provide an Index of Cerebrovascular Function**

ihiko Taguchi, MD; Tomohiro Matsuyama, MD; Hiroshi Moriwaki, MD; Takuya Hayashi, MD;  
Kohei Hayashida, MD; Kazuyuki Nagatsuka, MD; Kenichi Todo, MD;  
Katsushi Mori; David M. Stern, MD; Toshihiro Soma, MD; Hiroaki Naritomi, MD