

10. 田口 明彦

循環器領域における血管再生療法－Buerger 病から心臓、脳梗塞まで－  
茨城県医療講演会

2005. 12. 03

11. 田口 明彦

脳血管障害に対する再生医療の実現に向けて  
北海道大学工学部第2回生物機能高分子セミナー

2005. 12. 20

12. 田口 明彦

脳血管障害に対する再生医療  
日本循環器病学会

2006. 03. 25

[著作]

Burger 病専門誌(改訂版)

－バージャー病治療と看護総覧－

監修：田口 明彦

H. 知的財産の申請

松山知弘、田口明彦、芳川浩男

神経幹細胞の調整法

国際出願番号：PCT/JP2006/302350

## 厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）分担研究報告書

### 分担研究課題

虚血性脳疾患に対する再生医療技術を用いた治療法の開発に関する総合的研究

### 分担研究者

田口明彦 国立循環器病センター研究所 循環動態機能部 室長

成富博章 国立循環器病センター 内科脳血管部門 部長

### 共同研究者

吉原智之 国立循環器病センター 内科脳血管部門 専門臨床研修者

清水葉子 国立循環器病センター 内科脳血管部門 専門臨床研修者

### 研究要旨

脳梗塞患者と CD34 陽性細胞数との関連に関する本臨床研究では、末梢血中 CD34 陽性細胞で代表されるような血管血球系幹細胞の減少が、認知機能の低下や循環器疾患の発症に関与していることが明らかにされつつあるが、この研究ではそれらの知見を新しい治療法として確立するための基礎的検討を行った。

### 目的及び背景

循環器領域における血管新生療法においては、骨髄や末梢血中に存在する血管血球系幹細胞等の比較的未分化な細胞を虚血臓器に直接移植することにより

血管新生を促進し、臓器障害を予防するという戦略がとられている。我々はマウス脳梗塞モデルを用いて脳梗塞後の血管再生が神経機能の回復に必須であることを明らかにしてきたが、本研究ではそれらの知見を脳梗塞患者に応用するための知見の収集を行った。

## 方法

1. 我々が開発した非常に再現性の高いマウス脳梗塞モデルを使用し、脳梗塞後の①骨髄単核球投与、②顆粒球を含む全骨髄球投与、③G-CSFによる骨髄細胞の動員、等の治療による脳梗塞後の神経機能の改善効果に関する検討を行うと共に、それらの最適な治療時期に関する検討を行った。

2. 脳梗塞後骨髄単核球投与の安全性および有効性の検討のため、カニクイザル脳梗塞モデルの手技の検討を行うと共に、長期予後に関する検討を行った。

## 結果

1. 脳梗塞後の G-CSF により脳梗塞巣周囲に著明な萎縮を認めると共に、神経機能の改善効果は全く認められなかった。また、顆粒球を含む全骨髄球投与においても、脳萎縮の促進を認めると共に、神経機能改善効果は認めなかった。

2. 脳梗塞後の骨髄単核球投与により、形態学的な改善効果を認めると共に、神経機能の改善を認めた。

3. 脳梗塞後の骨髄単核球投与は比較的少量の単核球細胞でも効果があることおよび脳梗塞 2-10 日目の投与で治療効果があるものの、48 時間以内の急性期および 11 日目以降の慢性期にては治療効果がないことを明らかにした。

4. 放射光を用いた再生血管の評価

コントロール群で脳梗塞を来した大脳半球を撮影すると、対側の大脳半球と

比較して脳実質の萎縮が目立ち、梗塞巣周囲では脳表動脈は描出されるものの Perforator は消失していた。骨髄単核球投与群では脳実質の萎縮はあまり認められず、Perforator は対側の梗塞を来していない大脳半球のそれと比較してやや拡張や蛇行を認めるが、先述した正常血管解剖を参照して詳細に検討すると、治療群では移植によって本来の Perforator が残存していると考えられた。また、梗塞巣周囲で正常ではあまり血管が存在しない分水嶺や脳室周囲深部白質に Perforator よりも微細な血管が増生しており、移植により誘導された再生血管と考えられた。よってこれら再生血管が梗塞巣への側副路となり、梗塞巣へ必要な血液を供給したと示唆された。

5. カニクイザル脳梗塞モデルでは、既存の手技では脳ヘルニアによる急性期での死亡(骨髄細胞投与前)のため慢性期の観察が不適であることを明らかにし、比較的小さな脳梗塞が形成される方法の開発を行った。

6. 脳梗塞後に長期生存したカニクイザルにおいては、骨髄投与 8 ヶ月後の時点においても、出血や痙攣などの副作用は観察されなかった。

## 考察

脳梗塞後の骨髄系幹細胞の投与においては、炎症の促進などによる脳萎縮の拡大などの可能性があり、移植細胞を十分に考慮する必要があると考えている。また、カニクイザル脳梗塞モデルにおける慢性期の評価には今年度に行った PET や MRI (T1、T2、DWI) による評価とともに、perfusion MRI などを組み合わせた検討も必要であると考えている。

## 結論

脳梗塞後の神経幹細胞の投与では治療効果がほとんどないことが、様々な基

礎研究および臨床試験で明らかになってきているが、血管血球系幹細胞の減少と認知機能の低下や循環器疾患の発症との関連の知見と総合することにより、新しい治療法の開発につなげることが可能であると考えている。

## 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

1. 吉原智之, 田口明彦, 中込隆之, 松山知弘, 温 仲民, 成富博章

脳梗塞後の G-CSF 投与による脳組織障害

第 30 回日本脳卒中学会

2005.04.22

2. 吉原智之、太田正佳、糸数裕、松本直也、出澤真理、鈴木義久、足立靖、池

原進、田口明彦、杉本壽、井出千束

急性期の脊髄損傷に対する骨髄単核球細胞移植の有効性

第 33 回日本救急医学会

2005.11.26

3. 吉原智之、太田正佳、糸数裕、松本直也、鈴木義久、出澤真理、田口明彦、

杉本壽、井出千束

第 11 回日本脳神経外科救急学会

急性期の脊髄損傷に対する骨髄単核球細胞移植の有効性

2006. 1.20

厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業） 分担研究報告書

分担研究課題

糖尿病患者における末梢血中 CD34 陽性細胞の減少と心機能障害

分担研究者

田口明彦	国立循環器病センター研究所	循環動態機能部	室長
成富博章	国立循環器病センター	内科脳血管部門	部長

共同研究者

岡田 定規	国立循環器病センター	代謝内科	医師
吉政 康直	国立循環器病センター	代謝内科	部長
吉原智之	国立循環器病センター	内科脳血管部門	専門臨床研究者
清水葉子	国立循環器病センター	内科脳血管部門	専門臨床研究者

研究要旨 近年、血管内皮前駆細胞数の減少が血管内皮機能障害の程度と関連することや、心血管イベントの予知因子となりうることが注目されており、2型糖尿病患者では非糖尿病患者と比較して、血管内皮前駆細胞数が減少していることが報告されている。本研究で我々は高齢 2 型糖尿病患者において、末梢血中の血管内皮前駆細胞数が左心機能障害に関連する可能性を明らかにした。

A. 研究目的

2 型糖尿病患者の左心機能障害の評価における血漿 BNP (B-type Natriuretic Peptide) 濃度の有用性が報告されていることを用いて 5、高齢 2 型糖尿病患者

における左心機能障害と末梢血 CD34 陽性細胞数の関連を検討する。

## B. 研究方法

当院動脈硬化代謝内科に入院した 60 歳以上の 2 型糖尿病患者のうち、明らかな冠動脈疾患を有さない 31 人(男性 14 人、女性 17 人)を対象とした。

**測定項目** 病歴から糖尿病罹患歴および冠動脈疾患の既往について調査した。病歴上、冠動脈疾患が疑われる例については、経胸壁心臓超音波検査または負荷心筋 SPECT 検査、冠動脈造影検査を行い冠動脈疾患の鑑別診断を行った。早朝空腹時に末梢血採血を行い、血漿 BNP 濃度、CD34 陽性細胞数、空腹時血糖、HbA1c、血清クレアチニン、総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール、トリグリセライドを測定した。また、同時期に臥位で血圧測定を行った。

**末梢血 CD34 陽性細胞数測定方法** 末梢血からフローサイトメーター (FACS 法) を用いて、CD34 陽性細胞の定量を行った。

**高血圧症、高脂血症の定義** 高血圧症として、収縮期血圧 140mmHg 以上、拡張期血圧 90mmHg 以上、降圧剤内服のいずれかを満たすものと定義した。高脂血症として、総コレステロール 220mg/dl 以上、LDL コレステロール 140mg/dl 以上、HDL コレステロール 40mg/dl 未満、トリグリセライド 150mg/dl 以上、脂質降下剤内服のいずれかを満たすものと定義した。

**解析方法** 血漿 BNP 濃度と末梢血 CD34 陽性細胞数について単変量解析を行った。また、血漿 BNP 濃度とその他の臨床データ(年齢、性別、BMI、血清クレアチニン、空腹時血糖、HbA1c、糖尿病罹患歴、高血圧症、高脂血症)について単変量解析を行った。単変量解析で相関を認めた項目について、最小 2 乗法による多変量解析を行った。

C. 研究結果

臨床背景

	n=31
年齢 (年)	70.3 ± 6.6
男性, n (%)	14 (45%)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.8 ± 4.3
血漿BNP濃度 (pg/ml)	85.8 ± 292.3
末梢血CD34陽性細胞数 (/ μl)	0.83 ± 0.49
血清クレアチニン (mg/dl)	0.76 ± 0.31
空腹時血糖 (mg/dl)	180 ± 55
HbA1c (%)	9.2 ± 1.8
糖尿病罹患歴 (年)	16.7 ± 10.4
収縮期血圧 (mmHg)	143 ± 20
拡張期血圧 (mmHg)	75 ± 13
総コレステロール (mg/dl)	197 ± 40
LDLコレステロール (mg/dl)	123 ± 34
HDLコレステロール (mg/dl)	53 ± 16
トリグリセライド (mg/dl)	131 ± 68
<b>薬剤</b>	
β遮断薬, n (%)	3 (10%)
Ca拮抗薬, n (%)	17 (55%)
ACE阻害薬/ARB, n (%)	13 (42%)
スタチン, n (%)	12 (39%)
TZD誘導体, n (%)	2 (6%)
高血圧症, n (%)	27 (87%)
高脂血症, n (%)	19 (61%)
mean±S.D.	



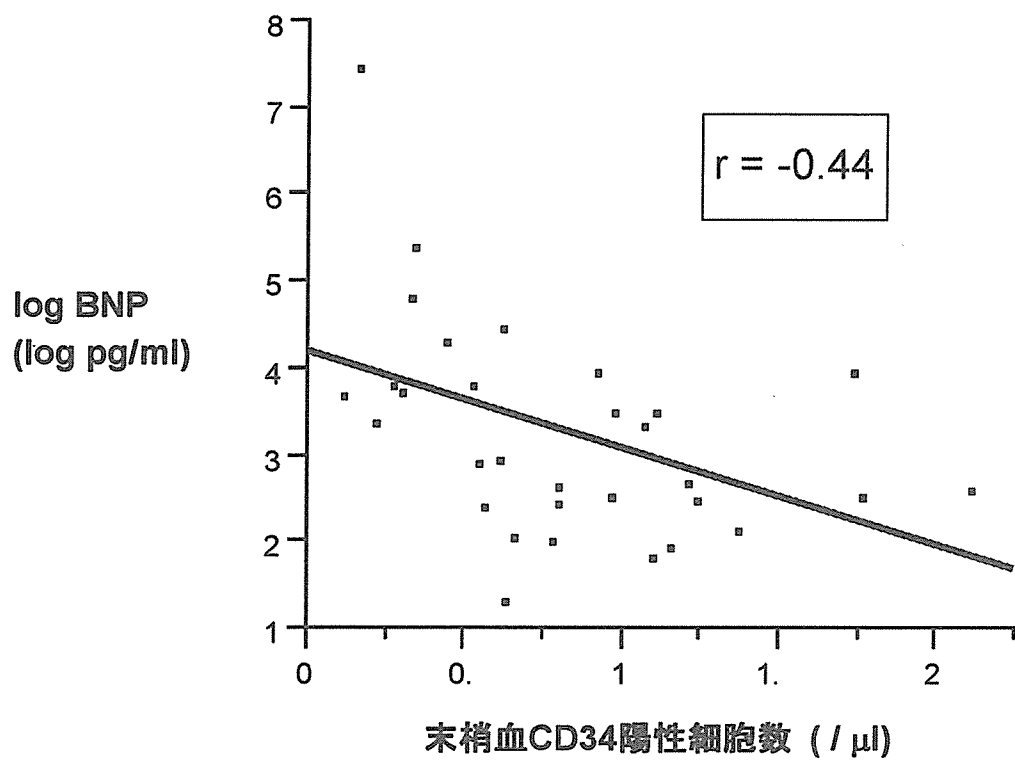
血漿 BNP 濃度と臨床データの単変量解析

	$\beta$	S.E.	<i>P</i>
末梢血CD34陽性細胞数	-1.11	0.42	0.01
年齢	0.08	0.03	0.01
男性	-0.27	0.45	0.55
BMI	-0.03	0.05	0.60
血清クレアチニン	0.80	0.72	0.27
空腹時血糖	0.00	0.00	0.44
HbA1c	-0.13	0.13	0.29
糖尿病罹患歴	0.02	0.02	0.45
高血圧症	0.86	0.65	0.20
高脂血症	0.22	0.46	0.63

血漿 BNP 濃度と末梢血 CD34 陽性細胞数、年齢の多変量解析

	$\beta$	S.E.	<i>P</i>
末梢血CD34陽性細胞数	-0.87	0.40	0.04
年齢	0.07	0.03	0.03

血漿 BNP 濃度と末梢血 CD34 陽性細胞の単変量解析



## 心臓超音波所見との関連

経胸壁心臓超音波検査を実施した 28 例において、血漿 BNP 濃度および血管内皮細胞数と心臓超音波所見との解析を行った。心臓超音波検査により以下の所見を測定した。左室内径短縮率 (%FS) 左室重量係数 (LV mass index) 左室流入拡張早期波/左室流入心房収縮期波 (E/A) 心臓超音波所見

%FS (%)	37.1 ± 7.0
LV mass index (g/m <sup>2</sup> ) (n=27)	98.9 ± 40.9
E/A (n=27)	0.79 ± 0.24
mean ± S.D.	

## 血漿 BNP 濃度と心臓超音波所見の単変量解析

	$\beta$	S.E.	P
%FS	-0.03	0.03	0.03
log LV mass index (n=27)	2.65	0.73	0.00
E/A (n=27)	2.22	0.94	0.03

### D. 結果のまとめ、および考察

1. 単変量解析において、血漿 BNP 濃度と末梢血 CD34 陽性細胞数は負の相関を認めた。また血漿 BNP 濃度と年齢は正の相関を認めた。2. 多変量解析において、末梢血 CD34 陽性細胞数は年齢と独立して血漿 BNP 濃度と負の相関を認めた。

3. 血漿 BNP 濃度と%FS は負の相関、LV mass index、E/A は正の相関を認めた。  
末梢血 CD34 陽性細胞数と LV mass index は負の相関を認めた。

以上の事より高齢 2 型糖尿病患者において、末梢血中の血管内皮前駆細胞数が左心機能障害に関連する可能性が示唆されるとともに、心臓超音波所見からは、末梢血 CD34 陽性細胞数と血漿 BNP 濃度の相関関係には、左室肥大の関与が疑われた。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

岡田定規 他

2006. 03. 25

日本循環器病学会総会

## 厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）分担研究報告書

### 分担研究課題

末梢血血管内皮前駆細胞と糖尿病性腎症の進展

### 分担研究者

田口明彦	国立循環器病センター研究所	循環動態機能部	室長
長束一行	国立循環器病センター	内科脳血管部門	医長

### 共同研究者

榎野 久士	国立循環器病センター	代謝内科	医員
吉政 康直	国立循環器病センター	代謝内科	部長
吉原智之	国立循環器病センター	内科脳血管部門	専門臨床研究者
清水葉子	国立循環器病センター	内科脳血管部門	専門臨床研究者

### 研究要旨

糖尿病性腎症の初期に認められる尿中微量アルブミンは心血管病発症の危険因子であり、このことは心血管病と糖尿病性腎症のメカニズムに共通の因子があることを示唆している。近年、末梢血血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell:EPC）の減少が虚血性心疾患などの動脈硬化性疾患発症と関連していることが報告されているが、本研究においては、糖尿病患者における EPC と microangiopathy である糖尿病性腎症の関連を明らかにした。

#### A. 研究目的

本研究では糖尿病性腎症と末梢血 EPC の関連を明らかにすることを目的とし

て、断面的検討および前向き検討を行う。

## B. 研究方法

腎症病期が早期腎症までの70歳以下の2型糖尿病患者85人について検討した。末梢血 EPC 測定として末梢血 CD34 陽性細胞をフローサイトメトリーにより測定し、尿アルブミン排泄量との関連や腎症病期との関連を横断的に検討した。更に低 EPC 血症が腎症進展に及ぼす影響を検討するため、CD34 陽性細胞数の上位 25% (CD34 陽性細胞 1.0 個/ml 以上、高 EPC 群 21 名) と下位 25% (CD34 陽性細胞 0.68 個/ml 未満、低 EPC 群 21 名) について、6ヶ月後の尿アルブミン排泄について検討した。

## C. 研究結果

末梢血 CD34 陽性細胞数は HbA1c、収縮期血圧、総コレステロール、尿アルブミン排泄の間には有意な相関関係を示さなかった。一方尿アルブミンの有無により、患者を2群に分けた解析では、CD34 陽性細胞数は微量アルブミンを呈する早期腎症群において腎症前期群に比し有意に減少していた ( $0.68 \pm 0.27$  vs.  $1.01 \pm 0.55$  個/ $\mu$ l,  $p < 0.02$ )。また高 EPC 群では6ヶ月後の尿アルブミン排泄は前値と差がなかったが ( $13.1 \pm 4.0 \rightarrow 15.1 \pm 3.0$  mg/gCr)、低 EPC 群では6ヶ月後の尿アルブミン排泄が前値に比し有意に増加していた ( $33.5 \pm 6.3 \rightarrow 67.0 \pm 22.1$  mg/gCr,  $p < 0.05$ )。

## D. 考察および結論

早期腎症を有する患者では末梢血 EPC の減少が存在し、低 EPC 血症が腎症進展に関与する可能性が示唆された。これらの結果は、末梢血 EPC の補充や薬剤に

よる骨髄からの動員が、糖尿病性腎症の進展予防に役立つ可能性を示している  
ものと、我々は考えている。

E. 健康危惧情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

田口 明彦

2006.03.25

日本循環器病学会総会





## A. 研究目的

近年血管性疾患と思われる、脳梗塞、心筋梗塞、糖尿病性腎不全、リウマチ等において末梢血中の CD34 陽性細胞や血管前駆細胞と病態が関連している可能性が示唆されている。しかし CD34 陽性細胞や血管前駆細胞数の測定はその絶対数の少なさから正確な測定値を出すことが難しく、その再現性についても疑問視されている点も多い。本研究では厳密な測定方法を用いて、末梢血中血管血球系幹細胞と患者病態に関する検討を行った。

## B. 研究方法

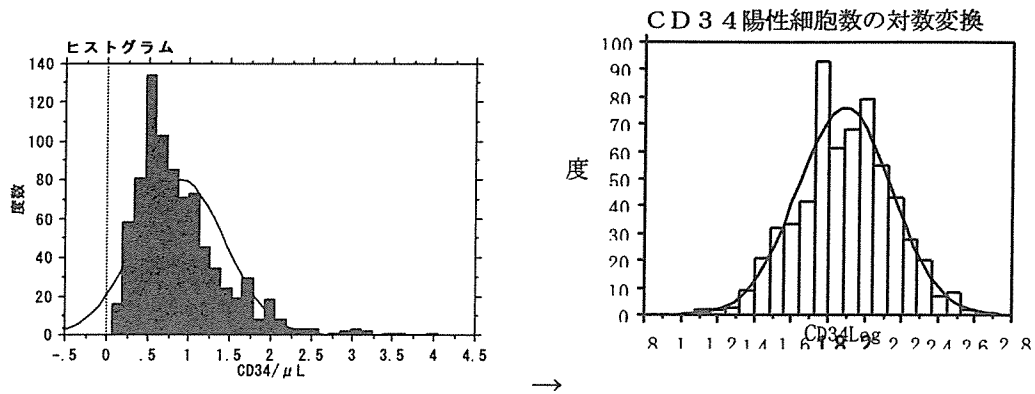
種々の循環器疾患患者末梢血中の CD34 陽性細胞を、我々の開発した高感度法で測定し統計解析を行った。また一部について CD34 陽性 KDR (VEGFR 2) 陽性細胞を測定するとともに、CD34 陽性細胞や CD34KDR 陽性細胞の測定値の特性を明らかにした

(倫理面への配慮) 採血の目的、解析などにつき 同意書を作成し文書による同意を得た。

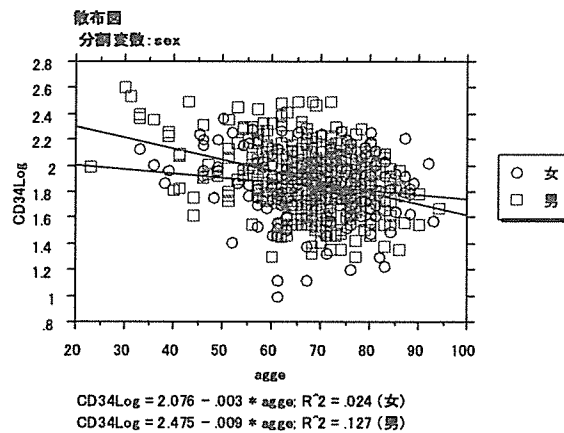
## C. 研究結果

### # 1 末梢血中 CD34 陽性細胞数の特徴

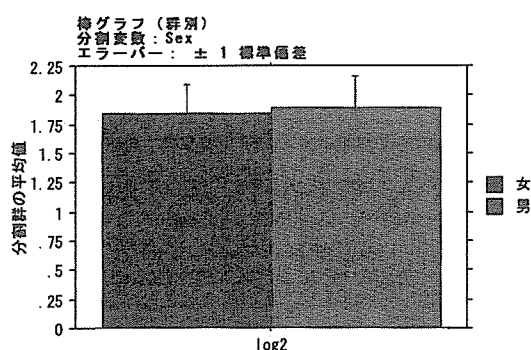
約 830 例の循環器疾患の末梢血単位あたりの CD34 陽性細胞数を測定した。その結果の分布は下図の様である。 平均末梢血 1 $\mu$ L あたり 0.9 個で 0.1 個から 4.0 個まで観察された。



この結果は左図のように正規分布を示さないため種々の統計処理に用いる目的で対数変換した。結果は右図のようにきれいに正規化され、統計的にも正規性が確認された。対数変換した患者末梢血 CD34 陽性細胞と年齢、性に分けて検討したところ年齢と強い負の相関が見られ、また性差が明らかであった。(下図)



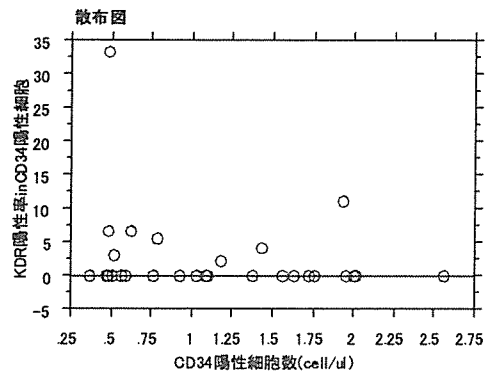
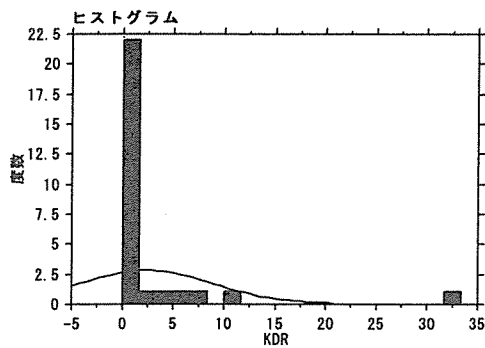
統計的有意差は年齢については  $p < 0.0001$  と非常に強い有意差を有した(下図)。一方性差はそこまでの有意差はないが女性の方が低い値を示した。  $P = 0.0196$



そこで主に循環器疾患患者について基礎疾患と CD34 陽性細胞の相関を調べたところ、高脂血症、喫煙、高血圧、四肢動脈閉塞疾患、糖尿病、心筋梗塞とは有意の相関を示さなかったが、労作性狭心症とは相関が見られた。細胞数はごく軽微な差であるが  $p < 0.0006$  とかなりの有意差水準である。

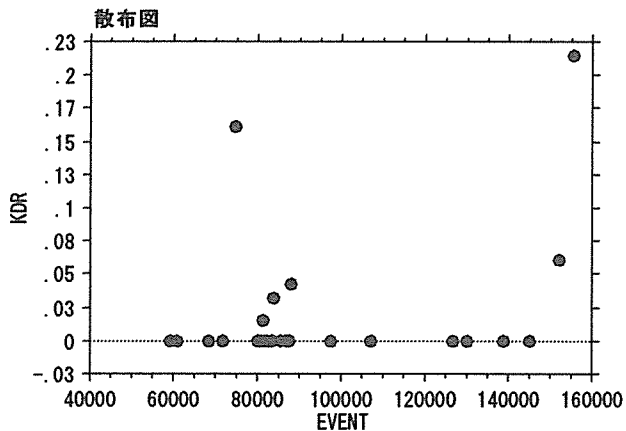
## # 2 患者末梢血中の CD34 と KDR の 2 重陽性細胞測定 (以降 KDR と略す)

我々の測定した CD34 陽性、KDR 陽性細胞数は末梢血中の CD34 陽性細胞の 1-3% を示すにすぎなかった。また数値にかなりのばらつきがみえ、KDR についても対数変換が必要と考えられたが我々の測定では“0”が圧倒的に多いため変換は行わなかった。下図左に KDR 観測%を CD34 陽性細胞に対する%で表している。末梢血 1  $\mu$ L あたり平均 0.9 個の CD34 は 1ml 辺り 900 個に過ぎず、その 2% は 18 個となり異様に少ない細胞集団である。約 800 症例中最低 CD34 数を示した患者は 1  $\mu$ L あたり 0.1 個であるからその場合は 100 個の CD34 に当たり、末梢血中の KDR は 1ml あたり平均 2 個となる。このレベルではバックグラウンドと区別がつかない。また測定値がとれた症例数は少ないが、我々の結果では CD34 陽性細胞数と KDR 数とは相関しなかった (下図右)。



### # 3 KDR の測定法の検討

そこで KDR を正確にフローサイトメータで分析する方法を検討してみた。下図にフローサイトメータのイベント数と KDR 値の散布図を示す。16 万までイベント数を増やしているがイベント数と検出 KDR 数には十分な相関がなく、この程度のイベント数では正確に検出できないことがわかる。



フローサイトメータの機構から来る制限事項として、あまりイベント数を増やすと蛍光色素を非特異的に吸着する流路中のゴミや死細胞、表面にゴミを吸着した細胞の頻度が上昇する。この点から 10 万以上イベント数を上げるのは危険と言わざるを得ない。そこで何らかの細胞濃縮の方法が必要であるが細胞濃縮を行うと絶対数の信頼性が低下するので濃縮時の測定値は%値となる。以下に正確な測定プロトコールの案を示した。