

法の導入は、遺伝子治療の手技を単純化させるだけでなく、それまでカテーテルのアクセスが困難であった症例さえも治療可能とし、その適応症例を大きく拡大させることにつながった。また、筋注法は、心筋への遺伝子導入にも応用可能であり、虚血性心疾患に対する血管新生療法の臨床応用への契機ともなった。

V 血管新生療法の問題点

末梢動脈疾患に対する血管新生療法は、今から約10年前、VEGFを用いた遺伝子治療として幕を開けた。重症下肢虚血に対する本法の治療成績は良好である。安静時疼痛や難治性潰瘍を有する患者の少なくとも6～7割において、臨床所見の改善が期待可能である。しかしながら、本法のメカニズムに関しては不明な点が少なくない。臨床症状の改善にもかかわらず血管造影での改善が明らかでないことも多く、はたして血管新生療法によって血管新生が本当に促進されるのか、その治療メカニズムの基本的な部分でさえ、解明されていないのが実情である。また、遺伝子のパテント問題、遺伝子を用いることの倫理的問題など、一般臨床の場に普及するに至るまでに解決されるべき問題も決して少なくない。

●文献

- 1) Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al : Therapeutic angiogenesis ; a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 93 : 662-670, 1994
- 2) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al : Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF₁₆₅ in patients with ischemic limb. *Lancet* 348 : 370-374, 1996
- 3) Ferrara N, Henzel WJ : Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161 : 851-855, 1989
- 4) Takeshita S, Weir L, Chen D, et al : Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 227 : 628-635, 1996
- 5) Takeshita S, Losordo DW, Kearney M, et al : Time course of recombinant protein secretion after liposome-mediated gene transfer in a rabbit arterial organ culture model. *Lab Invest* 71 : 387-391, 1994
- 6) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al : Constitutive expression of phVEGF₁₆₅ after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97 : 1114-1123, 1998

●参考：海外の研究施設

・ St. Elizabeth's Medical Center
<http://www.semc.com>

動脈疾患 閉塞性動脈硬化症

竹下 聡*
たけした さとし

- 閉塞性動脈硬化症は quality of life への影響は大きい、生命予後に対する影響は小さい。
- 閉塞性動脈硬化症患者の生命予後は、合併する動脈硬化性疾患によって規定される。
- 閉塞性動脈硬化症の早期発見によって、動脈硬化の危険因子コントロールを早期に開始し、虚血性心疾患や脳血管疾患の予防へと結びつけることが肝要である。

Key Words ABPI, Fontaine 分類, 血管超音波検査, 近赤外線分光法

はじめに

人は血管とともに老いると言われるように、動脈硬化は加齢とともに進行する。この進行に影響を与えるのが、糖尿病、高脂血症、高血圧、喫煙などの動脈硬化性危険因子である。これらの危険因子を治療することによって、狭心症や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患の進行を阻止することが可能である。これは閉塞性動脈硬化症においても同様で、より早期に発見し危険因子のコントロールを開始することが患者予後の改善において肝要である。

□ 閉塞性動脈硬化症とは

従来、閉塞性動脈硬化症はわが国では少なく、同じ末梢動脈閉塞疾患である Buerger 病が多数を占めるとされていた。しかしながら、食生活の欧米化とともに閉塞性動脈硬化症が増加し、Buerger 病の占める割合は次第に減少してきた。

わが国における閉塞性動脈硬化症の発生頻度については、大規模な疫学データが存在しないため詳細は不明であるが、欧米における罹患率は人口の数パーセント程度とされている¹⁾。

閉塞性動脈硬化症では、末梢動脈の粥状動脈硬化によって血管内腔の狭窄が進行し、下肢虚血が生じる。これにともない、しびれ、冷感、間歇性跛行、疼痛、潰瘍、壊疽などのさまざまな症状が出現する。自覚症状による病期分類としては Fontaine 分類が代表的である (表 1)。Fontaine

表 1 Fontaine 分類

グレード	症 状
I	無症状
II	間歇性跛行
III	安静時疼痛
IV	皮膚潰瘍、壊疽

I 度の軽症 (無症状) 患者に対しては、禁煙指導を行ったり、糖尿病・高血圧など動脈硬化の危険因子コントロールを行いながら経過を観察する。病状が進行してくると、Fontaine II 度に見られるような間歇性跛行が出現する。間歇性跛行とは、一定距離の歩行後に下肢の疼痛が出現するが、休息により痛みは一時的に消失し、再び歩行することによって再出現するといった特徴的な症状をいう。閉塞性動脈硬化症でもっとも多い症状は、この間歇性跛行である。間歇性跛行が軽度の場合、運動療法や抗血小板剤などによる薬物療法を行うが、重症例では狭窄した血管をカテーテルによって拡張する経皮的血管形成術 (percutaneous transluminal angioplasty: PTA) や外科手術 (バイパス手術) による血行再建が必要となる。Fontaine III~IV 度を重症下肢虚血 (critical limb ischemia: CLI) と呼ぶ。このような状態にまで進行すると、安静時にも下肢疼痛が出現し、皮膚潰瘍や壊疽も見られるようになる。重症下肢虚血を呈する患者では、痛みや壊疽のために運動療法を施行するのは困難で、薬物治療に対する反応性も

* 国立循環器病センター 心臓血管内科

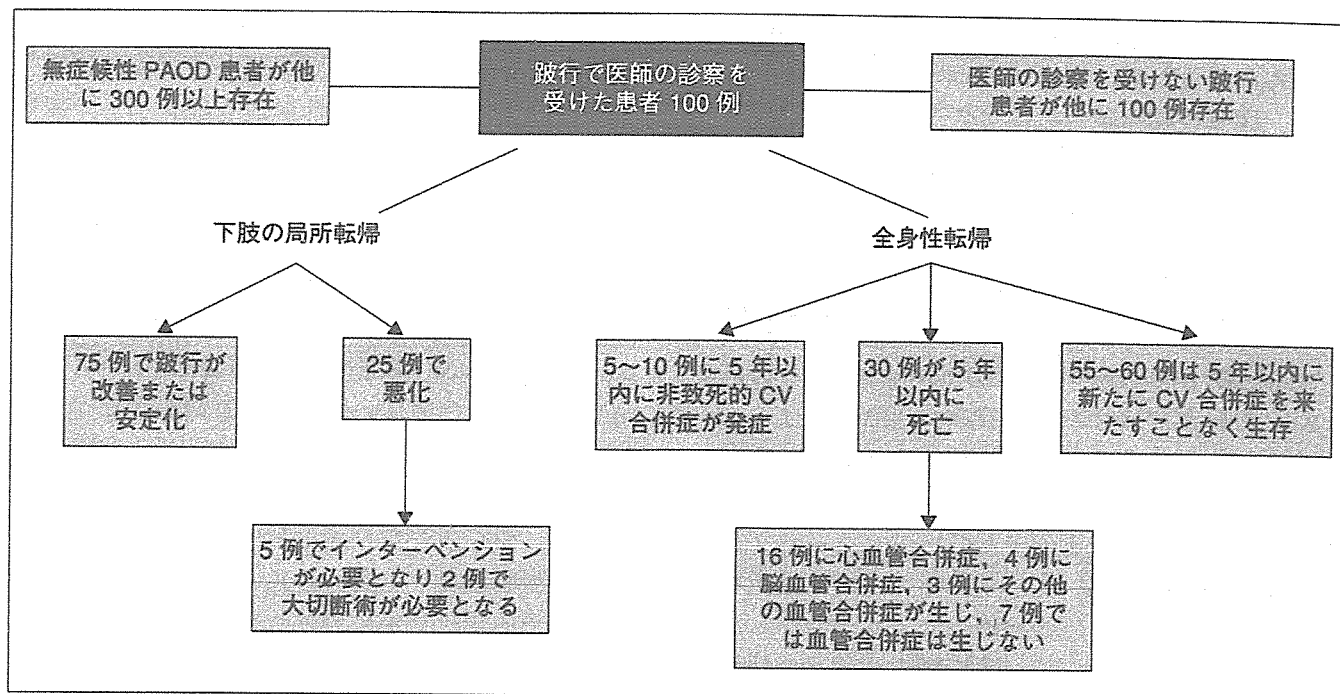


図1 跛行患者の5年間の経過

(文献 | 日本語訳: 日本脈管学会編: 下肢閉塞性動脈硬化症の診断・治療指針 日本語版, p. 21, 2000 より引用)

低い。また、重症下肢虚血をきたすような血管は動脈硬化が高度で、血管形成術やバイパス手術の適応にならないことも少なくない。このような重症例に対しては血管新生療法 (therapeutic angiogenesis²⁾) が考慮されることになる。

閉塞性動脈硬化症の早期発見

動脈硬化を原因とする疾患として、閉塞性動脈硬化症以外に心筋梗塞などの冠動脈疾患、脳梗塞などの脳血管疾患などさまざまな循環器疾患があげられる。心筋梗塞や脳梗塞が生命に関わるような重篤な疾患であるのに対し、閉塞性動脈硬化症は主に quality of life へ関与するため、その早期発見に対する医療従事者の関心は、冠動脈疾患などのそれに比べて低い。

閉塞性動脈硬化症の大部分は、Fontaine II 度の間歇性跛行患者で占められる。Fontaine II 度の閉塞性動脈硬化症が進行し、下肢血管に対する血行再建術や下肢切断術が必要となってくる確率は5年間で10%以下である。一方、これらの患者が、冠動脈疾患や脳血管疾患で死亡する確率は20%以上ときわめて高い (図1)¹⁾。すなわち、閉塞性動脈硬化症患者の早期発見は、閉塞性動脈硬化症の進展阻止よりも、むしろ他の心血管合併症を阻止す

る意味において重要である。また、Fontaine I 度の無症状患者は、間歇性跛行例の3倍以上存在し (図1)¹⁾、潜在する無症候症患者をいかに見つけるか大きな課題といえる。

Vascular Lab

バスキュラーラボ (vascular lab: 血管検査室) は、血管疾患の診断を行うためのさまざまな無侵襲検査装置を集約した検査室である。診断装置には四肢血圧脈波測定装置、末梢血管診断装置 (バソガード)、超音波診断装置、近赤外分光法、トレッドミルなどがある。DSA や CT-angiography などの診断法との大きな違いは、血管疾患の画像診断だけでなく、血管の機能評価も行える点にある。

1. 上腕・足関節血圧比 (ABPI)

上腕・足関節血圧比 (ankle-brachial pressure index: ABPI) は、上肢と下肢の収縮期血圧の比から末梢動脈病変の有無を推定する基本指標である。四肢血圧脈波測定装置、末梢血管診断装置 (バソガード)、ドプラ血流計などを用いて測定する。上肢収縮期血圧は上腕動脈または橈骨動脈で、下肢収縮期血圧は足背動脈または後頸骨動脈で求め、下肢血圧の上肢血圧に対する比を算出する。

0.9未満を異常値とするが、ABPIの低下は早期より認められるため、無症状例の早期発見に有用である。閉塞性動脈硬化症に対するABPIの診断感度と特異度はともに90%を超えるとされているが、慢性透析症例などでは血管が高度に石灰化しているためABPIが低下しない（下肢血圧が高値となる）ので、その評価には注意を要する。

2. 血管超音波検査

血管超音波検査は末梢動脈疾患の早期診断にもっとも有用な検査の1つである。無侵襲なので繰り返し施行することが可能である。血管の断層像、血流速度、血流波形などから病変の有無や重症度を判断する。最近の機器では、カラードプラ法を用いることによって、きわめて良好に血流を描出可能であり、病変の検出率向上につながっている。本法の欠点は、その診断精度が術者の技量に大きく依存する点にある。術者の育成に加え、学会などによる検査法の標準化が急務といえる。

3. 近赤外線分光法

近赤外線分光法 (near infrared spectroscopy : NIRS) は、酸化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの相対変化を測定することで虚血の有無を判定する検査法である。下肢の任意の部位における虚血判定が可能であること、トレッドミルによる歩行負荷時の虚血判定や、負荷後における虚血からの回復過程を経時的に観察可能なことなどが特徴である。たとえば、前述したABPIは閉塞性動脈硬化症に対して優れた診断感度と特異度を有する。しかしながら、安静時に下肢の血圧低下を呈さないような軽度狭窄病変例や、石灰化の高度な慢性透析例などでの診断には無効なことがある。NIRSは、歩行負荷などを加えることによって軽症例の診断に有用であり、また、マンシエットを必要としないため、高度石灰化例に対する診断にも有用である。

■ 微小血管造影法の早期発見への応用

新エネルギー産業技術総合開発機構 (NEDO) の支援のもと、浜松ホトニクス (株) を中心に、

NHK エンジニアリングサービス、国立循環器病センター研究所、東海大学医学部などが協力して、病院設置型の微小血管造影装置を開発した。通常の血管造影装置は直径200 μm 程度の血管までしか描出できないが、本造影装置は高出力のX線源と高感度のハイビジョン撮像系との組み合わせにより50 μm 程度の微小血管までの描出を可能としている。

本装置は2004年に国立循環器病センターに移設され、血管新生療法の施行患者を対象にすでに臨床応用されている³⁾。また、糖尿病性微小循環障害の診断に対する臨床応用も始まった。本装置は近い将来、微小血管レベルにおける動脈硬化の新しい画像診断法として用いられる可能性を秘めている。微小血管レベルにおける動脈硬化の進行が、閉塞性動脈硬化症の早期診断においてどのような意味を持つのかは、今後の検討課題である。

おわりに

閉塞性動脈硬化症は quality of life への影響は大きいものの、生命予後に対する影響は小さい。その生命予後は、合併する動脈硬化性疾患によって規定されていると言ってよい。閉塞性動脈硬化症の早期発見によって、動脈硬化の危険因子コントロールを早期に行い、虚血性心疾患や脳血管疾患の予防へと結びつけることが肝要である。

文献

- 1) Dormandy JA, Rutherford RB : Management of peripheral artery disease (PAD). TASC Workig Group. J Vasc Surg 31 : S1, 2000
- 2) Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, et al : Therapeutic angiogenesis : a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. J Clin Invest 93 : 662-670, 1994
- 3) 知久正明, ed : 微小血管の描出. メディカ出版, 大阪, 2005. 松尾 汎, ed : Vascular Lab 増刊 血管検査マニュアル

第1 特集

先端医療と看護

心筋に対する再生医療

清水 達也

Shimizu Tatsuya

東京女子医科大学先端生命医科学研究所講師

●要旨：近年，循環器領域においても欠損部あるいは機能不全に陥った組織・臓器に対する新たな治療法として再生医療が注目を集め，いくつかの治療法が臨床応用されるに至っている。再生医療には回収した細胞を注射針などで不全部に注入する細胞移植療法や組織工学的手法により細胞から組織を再構築したうえで移植する方法などがある。後者はこれまでの医学だけでは実現が困難であった研究領域であり工学的な技術との融合により急速に進歩しつつあり，今後の臨床応用が期待されている。

●Key Words：心筋再生，細胞移植，組織工学，細胞シート，血管新生

はじめに

循環器領域においては虚血性心疾患，拡張型心筋症，弁膜症，不整脈，下肢虚血性疾患と多くの疾患に対する再生医療が世界中で追及されており，虚血部位に対する血管新生を目的とした遺伝子や細胞移植療法はすでに臨床応用が行われている。とくに重症心不全に対する再生医療はここ数年で急速に進歩しており，生体内にも心筋細胞の幹細胞が存在することが示されている。これらの幹細胞から心筋細胞を分化・増殖し移植することにより，これまで不可能と考えられていた壊死した心筋組織の再生が可能になりつつある。さらに医学と工学の融合により生まれた組織工学により体外で心筋組織を再生する試みも始まっている。本稿ではこれら重症心不全に対する再生医療を中心にその現状と今後の展望を概説する。

心筋に対する再生医療

心筋再生医療のアプローチとしては①血管新生因子の蛋白あるいは遺伝子を導入し傷害部の血管新生を促進することで心筋虚血を改善する方法，②細胞の浮遊液を傷害心筋組織内に注入することにより血管あるいは心筋組織を再生させる方法，③骨髄中の幹細胞をサイトカインを用いて不全心筋組織に動員し心筋組織を再生させる方法，④組織工学的手法により作成した心筋組織を移植する方法が追究されている(図1)。

血管新生因子を用いた心筋再生医療

虚血性心疾患において血液供給が不十分な心筋組織では壊死には至らないものの十分に機能できない状態とな

臨牀看護, 32(8): 1136-1143, 2006.

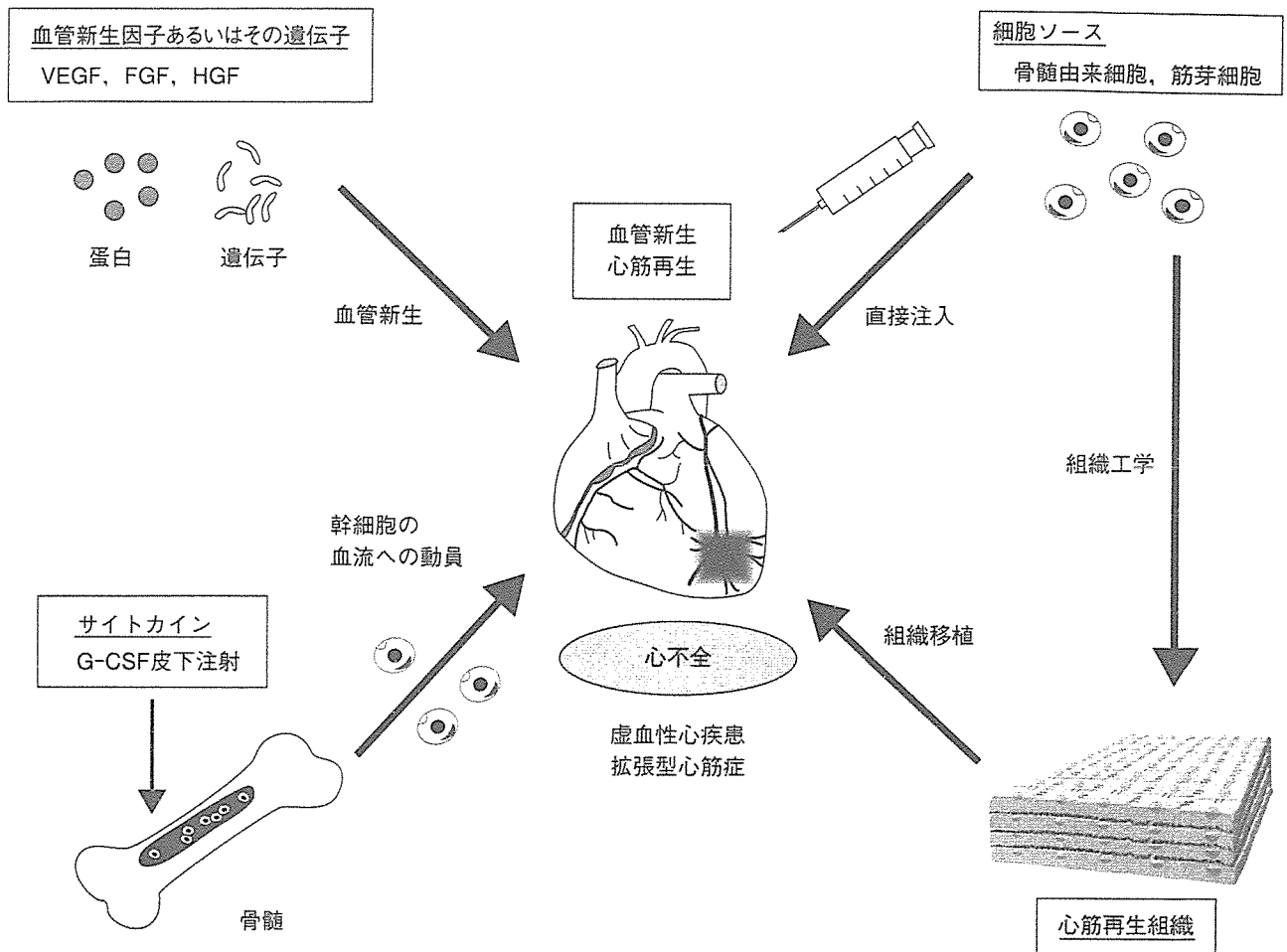


図1 心筋再生に対する再生医療

るが、毛細血管新生や側副血行路形成を促進することによりその機能を回復させることができる。Isner らのグループは血管内皮成長因子 (VEGF) の遺伝子治療を世界に先駆けて臨床応用しその有効性を示した¹⁾。その後、線維芽細胞成長因子 (FGF) や肝細胞成長因子 (HGF) などの血管新生因子の遺伝子治療も追究されている²⁾³⁾。Isner らはウイルスを用いた遺伝子導入法によるリスクを回避するため naked DNA の注入を行ってきたが、より効率よくかつ長期にわたって安全に遺伝子を導入できるシステムの開発が必要となっている。一方、血管新生因子の蛋白を用いた治療法に関しては酸性ゼラチンハイ

ドロゲルを担体としてそれらの蛋白を徐放することで血管が再生し虚血が改善することが示されており、今後の臨床応用が期待される⁴⁾。

細胞浮遊液注入による心筋再生医療

心筋組織に細胞浮遊液を移植する研究は1990年代前半から行われており、Soonpaa らは単離したマウス心筋細胞を心筋組織に注入したところ細胞がホストの組織に

生着し、その移植により心機能が改善しうることを初めて示した⁵⁾。当初ヒトにおいては心筋になる細胞ソースの入手が困難と考えられていたため研究者も限られていたが、幹細胞生物学の発展により骨髄や脂肪組織などいくつかの組織に存在する幹細胞から心筋細胞への分化誘導が可能であることが示されたのをきっかけに多くの研究者が心筋再生医療の研究を開始した。

心筋再生の細胞ソースとして倫理的問題や免疫拒絶の観点から、もっとも精力的に研究されてきたのは自己から採取可能な骨髄由来の幹細胞である。Makino らはマウス骨髄間質細胞から DNA メチル化阻害薬 5-azacytidine を使い心筋細胞の分化誘導が可能であることを示した⁶⁾。一方、Anversa らのグループは骨髄中で多能性を有する細胞を心筋梗塞部に注入したところ、移植した細胞の多くが心筋細胞に分化し、さらに一部は血管内皮細胞、平滑筋細胞にも分化、血管網を伴った心筋組織が再生したと報告し、世界的に衝撃を与えた⁷⁾。これら骨髄由来の細胞の心筋細胞への分化に関しては否定的な報告もなされているが、骨髄由来の細胞の注入療法が血管新生を促進することや心機能を改善することは数多くの報告で確認されており、すでに日本をはじめ多くの国々で自己骨髄由来の細胞注入療法が臨床応用され、すでに数百例に及んでいる⁸⁾⁹⁾。また末梢血中に骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (EPC) が存在し、生体内の血管新生に寄与していることから、虚血心筋部位の血管新生促進を目的として骨髄ではなく、末梢血から採取した EPC を使った血管再生療法も臨床応用が始まっている¹⁰⁾。

これら骨髄由来の細胞に対し、筋芽細胞を不全心筋に移植する臨床応用も行われている。筋芽細胞は自己の筋肉組織から採取が可能であり、虚血に対して耐性がある。Menasche らはこれを初めて臨床応用し、自己骨格筋より採取した筋芽細胞を一定の期間培養し、それら増殖させた細胞の注入移植を冠動脈バイパス術と併用して行った。その結果、心機能が回復することが確認された¹¹⁾。現在、アメリカ、ヨーロッパなどで治験が進行中である。移植された筋芽細胞は不全心筋のひ薄化およびリモデリングによる心拡大の阻止、サイトカイン分泌による血管新生に寄与するものと考えられている。しかしながら、筋芽細胞移植においては不整脈により死亡した症例が

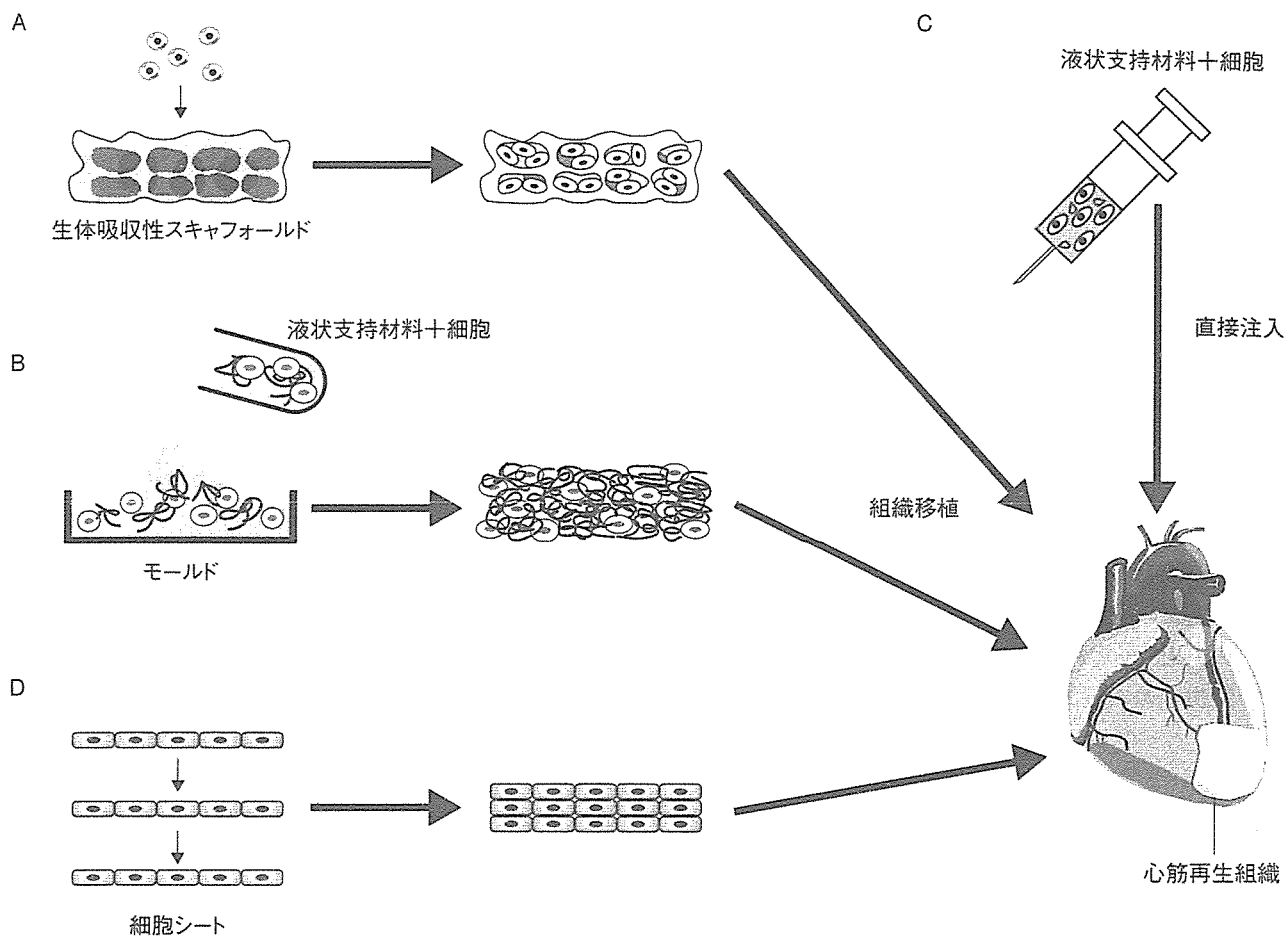
あったため、抗不整脈薬や植え込み型除細動装置の併用が必須となっており、今後の課題である。これに関しては長期遠隔成績を検討するとともに不整脈発生の機序やその抑制法を明らかにしていく必要がある。

細胞の注入法に関してもいくつかのバリエーションがある。1つは外科的に開胸して心外膜から注入する方法である。2つ目はカテーテルを用いて病変を支配する冠動脈へ細胞を注入するという内科的な手法である。またカテーテル先端の位置と心筋の電気的情報をリアルタイムで取得できる NOGA システムという特殊な装置を用いて心内膜側から病変部に安全かつ正確に注入する方法も用いられている。これらの注入法に関しては今後どの方法がもっとも有効か客観的に評価していく必要がある。

心筋再生における将来的な細胞ソース

将来的な心筋細胞のソースとして盛んに研究されているのは ES 細胞である¹²⁾。これまでにヒト ES 細胞から拍動する心筋細胞を分化誘導できることは明らかとなっている。また、動物モデルでは ES 細胞から分化誘導した心筋細胞が移植後、心臓に生着することも示されており、ES 細胞に対する期待は高まっている。ES 細胞の使用に関しては、倫理的問題、免疫拒絶、奇形腫の形成など解決すべき問題も多く、臨床応用に至るには十分な基礎研究と社会的なコンセンサスが必要であるが、その研究は飛躍的に進んでおり、将来的に ES 細胞から作られた再生心筋組織を不全心筋に移植できる日が来るかもしれない。

一方、近年新たな細胞ソースとして注目されているのは心臓に存在する心筋内幹細胞である。c-kit あるいは stem cell antigen-1 (Sca-1) といった幹細胞の表面抗原マーカーを指標として心臓から心筋細胞になる幹細胞が分離され、それを虚血傷害部位に移植すると心筋細胞に分化することが報告されている¹³⁾¹⁴⁾。これらの報告はこれまでの常識をくつがえすものであり、事実であるとすると心筋に対する再生医療の可能性を広げるものであ



A: 生体吸収性高分子からなる多孔性スキャフォールドを作製し、それに細胞を播種する。スキャフォールドは徐々に分解し細胞あるいは生体が産生する細胞外マトリクスと置換されて組織が再生される。B: 溶液状の生体吸収性材料と細胞を混合したものをモールドに流し込み、ゲル化させることで細胞を3次元に組織化する。C: 溶液状の生体吸収性材料と細胞を混合したものを不全心筋に直接注入する。D: 温度応答性培養皿からシート状に回収した細胞シートを積層化することで3次元組織を再生する。今後の課題として心筋細胞のソース、組織内血管網新生法の開発があげられる

図2 組織工学による心筋組織再生

る。ただし心臓内幹細胞の臨床応用に関しては心臓そのものからのバイオプシーが必要であり少量のサンプルからいかに分離増殖させるかが大きな課題である。

サイトカインを用いた心筋再生療法

骨髄には心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞など種々

の細胞に分化する多能性の幹細胞が存在し、必要に応じて血液中に流出し組織の再生に貢献していることが示されてきた。この幹細胞の流血中への動員を白血病の治療の際に用いられる granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)などのサイトカインを用いることにより増強することで心筋組織の再生を促進させることが可能である¹⁵⁾。これらサイトカインの皮下投与は非侵襲的で簡便な治療法としてすでに臨床応用が開始されその効果が期待されている。これらのサイトカインは骨髄からの幹

細胞の動員に加え、病変部の心筋細胞そのものに作用し細胞死(アポトーシス)を抑制することで心機能を改善するという報告もされており¹⁶、今後の臨床試験における治療効果の評価と併行して効果発現の基礎的なメカニズムの解明も重要となっている。

組織工学(tissue engineering)による心筋再生医療

細胞浮遊液の注入による移植法では、細胞が互いに分離した状態で組織内に導入されるため、移植場所の制御が困難なことや流出・壊死により細胞が損失することが問題となっている。また、細胞浮遊液の移植では先天性心疾患など欠損組織を補完する治療は困難である。そこで近年、組織工学の技術を用い体外で心筋組織を再構築し移植する研究が始まっている¹⁷。

他の臓器同様に細胞を播種する足場として生体吸収性のスキャフォールドを用いた研究が世界的な主流となっている。これまでに報告されている方法として生体吸収性高分子からなるスキャフォールドを作成し、それを足場として細胞を播種する手法(図2A)および溶液状の支持材料と細胞を混合したのち重合する手法(図2B)が報告されている。

前者の方法としては、生体吸収性高分子のスキャフォールドとしてメッシュあるいはスポンジ状のポリグリコール酸、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸を用いた研究が報告されている。ゼラチンあるいはアルギン酸を使った心筋組織に関しては不全心筋モデルへの移植実験が行われ、その生着と心機能の改善が報告されている。これらあらかじめ重合した高分子の構造体を用いる場合には内部にまでいかに細胞を播種するかが大きな課題となっている。一方、後者の手法は Zimmermann らのグループが、コラーゲン溶液と心筋細胞を混和しシリコンモールド内で培養することにより比較的細胞が内部まで入り込んだ3次元心筋組織の再生に成功している¹⁸。彼らは *in vitro* での張力測定を行うとともに伸展負荷により組織の配向性の付与と張力の増進を実現している。

上記した2つの手法はいずれも生体外で心筋組織を形

作ったうえで移植しようとするものであるが、細胞浮遊液の移植と再生心筋組織の移植の中間に位置するアプローチとして溶液状の支持材料と細胞を混合したものを直接不全心筋部に注入する方法も報告されている(図2C)。これにより細胞浮遊液の移植時に問題となる細胞の損失を軽減できる可能性があり、これまでにフィブリンあるいはコラーゲン溶液と細胞を混和後、不全心筋部に注入することで心機能が改善することが報告されているが細胞浮遊液の注入同様に注入部位の組織傷害が問題となることが予測される^{19,20}。

細胞シート工学による心筋組織再生

一方、われわれは独自に開発した細胞シート工学の技術を用いて心筋組織再生の研究を展開している²¹。温度応答性培養皿から温度降下処理のみで回収した細胞シートを積層化することで生体吸収性のスキャフォールドを用いることなく3次元組織を再構築できる(図2D)。この技術によりスキャフォールドを用いた場合には作製困難であった細胞密度の高い組織再生が可能であり、スキャフォールドの分解に伴う炎症反応を避けることができる。ラット心筋細胞シートを重層化すると細胞シート間には1時間以内にギャップジャンクションが形成され、同期して拍動することが明らかとなっている。この短時間での電気的結合は細胞シート脱着時に細胞下面に温存されている接着因子が細胞シート間で糊のような役割をしていることに起因する。積層化された心筋細胞シートは *in vitro* において肉眼レベルで同期して自律拍動し、皮下組織に移植後、1年以上拍動を維持して生存することが示された²²。また積層化心筋細胞シートをラット心筋梗塞モデルへ移植したところ、グラフトホスト間には心筋細胞同士の接着が起るとともにそれらの細胞間に心筋細胞の電気的な結合に重要であるギャップジャンクションが形成されていることが示された²³。さらに虚血によって低下した心機能が改善することも確認された²⁴。

臨床応用に関しては、現時点では心筋細胞のソースが

未確立であるため代替として筋芽細胞シートや間葉系幹細胞を用いた移植実験が行われている(大阪大学心臓血管外科, 国立循環器病センターとの共同研究)。すでにラット心筋梗塞モデル²⁵ および心筋症ハムスターモデル²⁶ への筋芽細胞シート移植およびラット心筋梗塞モデルへの脂肪組織由来間葉系幹細胞シート移植²⁷ により心機能が改善することが確認されている。現在, これらの細胞シートを大動物モデルへ移植してその効果を検討する前臨床試験が始まっており, 早期の臨床応用が期待される。

これら細胞シート移植の心機能改善効果のメカニズムとしては, 細胞が互い連結した組織として損失なく移植されることで細胞浮遊液の注入に比べ, より効果的に心筋壁のひ薄化・心室の拡大を抑制しているものと考えられる。また細胞シートから分泌される VEGF や HGF などが強力に血管新生を促進し stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) が傷害心筋への幹細胞動員に寄与している可能性が示唆されている。このように種々の液性因子がいわば“取替え不要の貼り薬”のように細胞シートから安定かつ持続的に分泌されることにより心筋再生に貢献しているものと考えられる。

このようにシート状の細胞を積層化することで3次元組織を再生する細胞シート工学は今まで不可能であったことを可能としており, とくに細胞密度が高く細胞が互いに連結している心筋組織の再生にはきわめて有用と考えられ今後心筋組織の再生に大きく貢献するものと考えられる。

心筋の組織工学における課題と展望

組織工学的手法を用いて3次元的心筋組織を再生することは可能となっているが, 今後の臨床応用にむけていくつかの課題がある。第一は細胞ソースである。現段階では何らかの幹細胞から心筋細胞を分化誘導し, 十分にまで増殖させる技術は未確立である。したがって, 臨床応用を目指して筋芽細胞や間葉系幹細胞などを用いて心筋再生を促進しうる組織を作製し移植することが試

みられている。自律拍動して心臓のポンプ機能を補助するような心筋組織を再生するには心筋細胞のソースに関する技術革新を待たなければならないが, 前記したように種々の幹細胞の可能性が示されており近い将来この課題が解決されるものと期待される。

次に課題となっているのがいかに再生心筋組織そのものの内部に血管網を新生し, 酸素・栄養の供給増大をはかりより厚い心筋組織を再生するかである。生体の心筋組織では血管が約10%の体積を占有しており, 毛細血管相互の距離も約15 μ m ときわめて高密度な血管網が形成されている。毛細血管網を伴わず培地や間質液の拡散のみで生存できる心筋組織の厚さは50~100 μ m と考えられており, それ以上の厚みのある心筋組織の再生には新たな技術開発が必要となっている。通常, 再生組織内の血管網形成は移植後ホストからの血管新生を待つことになる。そこでより厚い組織を作るアプローチとして移植後の組織内への血管新生を促進する方法がある。一つは VEGF, HGF, FGF など血管新生を促進する蛋白・遺伝子を再生組織の移植の際に導入することにより血管新生を促進することが可能である。あるいは内皮細胞・血管内皮前駆細胞といった血管の細胞ソースを導入することにより血管新生を促進することもできる。実際, われわれも血管内皮細胞と心筋細胞を混合して作製した共培養細胞シートを移植することにより再生組織内の血管新生が促進されることを確認している²⁸。生体内での血管新生に対し生体外であらかじめ毛細血管網を含有した組織を再構築したうえで移植するアプローチも追求されている。これまでに種々の微細加工技術を用いた培養基材や高分子材料をマイクロオーダーで3次元的心筋組織網状に加工することが実現しており, これらの基材に内皮細胞を播種し周囲に目的の細胞を培養することで毛細血管網を伴った組織を再生する試みがなされている。一方, われわれは生体内における新たなアプローチとして最初に移植した重層化心筋細胞シートに十分な血管が新生されるのを待って新たな重層化心筋細胞シートを繰り返し移植することにより, 血管網を伴ったより厚く(約1mm), しかも同期して自律拍動する心筋組織を再生することを可能としている。さらに既存血管上に移植を反復することにより血管付きの心筋組織を作製し異所性

に移植することも実現した²⁹⁾。このように再生組織内へ血管網を導入する研究は多面的なアプローチにより飛躍的に発展しており、再生可能な心筋組織のさらなるスケールアップが期待され、実現すれば欠損部の補完のみならず心臓そのものの再生も可能になるかもしれない。

おわりに

心筋に対する再生医療の研究開発は、飛躍的に進んでおり、近い将来重症心不全に対する有効な治療法の一つとなるものと予測される。しかしながら、前述した細胞ソースの開発、心筋組織内の血管網新生法に加え、再生組織の保存法、移植法さらにその安全性と有効性の確保に関し多分野にまたがる研究開発が必要であり、フィールドを越えた研究者間の連携と融合が必須であろう。また、臨床の現場においても細胞の単離から移植に至る行程、さらには移植後のケアに関し再生医療という新しい医療に対する専門的な看護体制の整備が必須と考えられる。これには看護従事者が再生医療に対し早くから興味を持ち、その知識や技術を習得することが肝要であり、そのことが再生医療の発展を加速し、多くの人命を早期に救うものと期待したい。

●引用・参考文献●

- 1) Losordo, D. W., Vale, P. R., Symes, J. F., et al. : Gene therapy for myocardial angiogenesis : initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*, 98 : 2800-2804, 1998.
- 2) Grines, C. L., Watkins, M. W., Helmer, G., et al. : Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation*, 105 : 1291-1297, 2002.
- 3) Ahmet, I., Sawa, Y., Yamaguchi, T., et al. : Gene transfer of hepatocyte growth factor improves angiogenesis and function of chronic ischemic myocardium in canine heart. *Ann. Thorac. Surg.*, 75 : 1283-1287, 2003.
- 4) Nakajima, H., Sakakibara, Y., Tambara, K., et al. : Therapeutic angiogenesis by the controlled release of basic fibroblast growth factor for ischemic limb and heart injury : toward safety and minimal invasiveness. *J. Artif. Organs*, 7 : 58-61, 2004.
- 5) Soonpaa, M. H., Koh, G. Y., Klug, M. G., et al. : Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*, 264 : 98-101, 1994.
- 6) Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., et al. : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro : *J. Clin. Invest.*, 103 : 697-705, 1999.
- 7) Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., et al. : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410 : 701-705, 2001.
- 8) Mathur, A. and Martin, J. F. : Stem cells and repair of the heart. *Lancet*, 364 : 183-192, 2004.
- 9) Wollert, K. C., Meyer, G. P., Lotz, J., et al. : Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction : the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*, 364 : 141-148, 2004.
- 10) Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., et al. : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275 : 964-967, 1997.
- 11) Menasche, P., Hagege, A. A., Scorsin, M., et al. : Myoblast transplantation for heart failure : *Lancet*, 357 : 279-280, 2001.
- 12) Caspi, O. and Gepstein, L. : Potential applications of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1015 : 285-98, 2004.
- 13) Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., et al. : Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114 : 763-776, 2003.
- 14) Oh, H., Bradfute, S. B., Gallardo, T. D., et al. : Cardiac progenitor cells from adult myocardium : homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 : 12313-12318, 2003.
- 15) Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., et al. : Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 : 10344-10349, 2001.
- 16) Harada, M., Qin, Y., Takano, H., et al. : G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat. Med.*, 11 : 305-311, 2005.
- 17) Zandonella, C. : Tissue engineering : The beat goes on. *Nature*, 421 : 884-886, 2003.
- 18) Zimmermann, W. H., Schneiderbanger, K., Schubert, P., et al. : Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ. Res.*, 90 : 223-230, 2002.
- 19) Christman, K. L., Fok, H. H., Sievers, R. E., et al. : Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. *Tissue Eng.*, 10 : 403-409, 2004.
- 20) Kofidis, T., de Bruin, J. L., Hoyt, G., et al. : Injectable bioartificial myocardial tissue for large-scale intramural cell transfer and functional recovery of injured heart mus-

- ele. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 128 : 571-578, 2004.
- 21) Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A., et al. : Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*, 24 : 2309-2316, 2003.
- 22) Shimizu, T., Yamato, M., Isoi, Y., et al. : Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ. Res.*, 90 : e40-48, 2002.
- 23) Sekine, H., Shimizu, T., Kosaka, S., et al. : Cardiomyocyte bridging between hearts and bioengineered myocardial tissues with mesenchymal transition of mesothelial cells. *J. Heart Lung Transplant.*, 25 : 324-332, 2006.
- 24) Miyagawa, S., Sawa, Y., Sakakida, S., et al. : Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium : their integration with recipient myocardium. *Transplantation*, 80 : 1586-1595, 2005.
- 25) Memon, I. A., Sawa, Y., Fukushima, N., et al. : Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 130 : 1333-1341, 2005.
- 26) Kondoh, H., Sawa, Y., Miyagawa, S., et al. : Implantation of Tissue-Engineered myoblast sheet improves cardiac performance with attenuation of cardiac remodeling in cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc. Res.*, 69 : 466-475, 2006.
- 27) Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., et al. : Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat. Med.*, 12 : 459-465, 2006.
- 28) Sekiya, S., Shimizu, T., Yamato, M., et al. : Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential. *J. Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, 341 : 573-582, 2006.
- 29) Shimizu, T., Sekine, H., Yang, J., et al. : Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *Faseb J.*, 20 : 708-710, 2006.

●「音楽療法講座；成人・高齢者編開催」のお知らせ●

■日時：2006年7月22日(土)11：00～16：40(90分講義3コマ)
7月23日(日)9：00～12：10(90分講義2コマ)

■会場：東海大学短期大学部高輪校舎
(東京都港区高輪2-3-23)

■受講料：10,000円

■定員：30名

■講義内容

7月22日(土) 11：00～12：30 成人分野の音楽療法理論①
13：30～15：00 成人分野の音楽療法理論②
15：10～16：40 成人分野の音楽療法実践例
7月23日(日) 9：00～10：30 高齢者分野の音楽療法理論
10：40～12：10 高齢者分野の音楽療法実践例

■講師：今村ゆかり(東海大学教養学部講師)

■申込方法：

電話，FAX，もしくはE-mailにてお申し込みください。
ホームページからお申し込みできます。

■申込先・問い合わせ先：

学校法人東海大学エクステンションセンター

担当：井波・上田・関根

東京都港区高輪2-3-23

TEL：03-5793-7133/FAX：03-5793-7132

E-mail：ext@ttc.u-tokai.ac.jp

http://ext.tokai.ac.jp/

ventriculectomy. Ann Thorac Surg 71: 2046-2049, 2001

- 11) 須磨久喜: 左室減容術: 外科. 新・心臓病診療プラクティス, 心疾患の手術適応と至適時期. 文光堂, 東京, 338-341, 2004
- 12) Suma, H et al: Left ventriculoplasty for ischemic cardiomyopathy. Eur J Cardiothorac Surg 20: 319-323, 2001
- 13) Suma, H et al: Left ventriculoplasty for non-ischemic cardiomyopathy with severe heart failure in 70 patients. J Cardiol 37: 1-10, 2001

(伊東博史・濱野公一)

g) 心移植

心臓移植は従来の治療限界となった重症心不全が対象で, これまでに66,000例以上に施行されている¹⁾. わが国では1997年10月「臓器の移植に関する法律」が施行されてから28例に行われ, 2001年5月からは拡張型心筋症および拡張相肥大型心筋症に対する心臓移植手術が高度先進医療として承認された.

■ ①適応

表9に心臓移植の適応を示す. 拡張型心筋症 dilated cardiomyopathy (DCM) および拡張相肥大型心筋症 dilated phase hypertrophic cardiomyopathy (dHCM) と虚血性心筋疾患が主な対象疾患で, DCM と dHCM の診断確定には心筋生検が必須である. 適応検討では, 表9の2, 3に示す適応条件および除外条件に加え, 免疫抑制療法を一生継続する必要があることより, 移植以外の治療手段, 予測される余命, 移植後の治療に対するコンプライアンスなど慎重に評価する.

■ ②適応決定と待機

適応決定は, 当面各施設内検討会と日本循環器学会心臓移植適応検討小委員会の2段階審査で行われる. 適応とされれば, 各移植施設で本人および家族へのインフォームドコンセントの後, 諸手続きを経て日本臓器移植ネットワークに登録し, 移植待機となる. なお, わが国での心臓移植は現在7施設に限定されている. 待機中はいつでも移植できるように患者管理を続ける. 心機能改善, 感染, 臓器障害などで適応外となる症例があるため, 再検討を6ヵ月ごとに行う. 心不全が進行し, 諸臓器障害を伴う症例では, 左心補助人工心臓 left ventricular assist system (LVAS) の適応を

【表9】心臓移植におけるレシピエント適応基準

1. 適応となる疾患

心臓移植の適応となる疾患は従来の治療法では救命ないし延命の期待がもてない以下の重症心疾患とする

- 1) 拡張型心筋症, および拡張相の肥大型心筋症
- 2) 虚血性心筋疾患
- 3) その他 (日本循環器学会および日本小児循環器学会の心臓移植適応検討会で承認する心臓疾患)

2. 適応条件

- 1) 不治の末期的状態にあり, 以下のいずれかの条件を満たす場合
 - a) 長期間または繰り返し入院治療を必要とする心不全
 - b) β 遮断薬およびACE (angiotensin converting enzyme) 阻害薬を含む従来の治療法ではNYHA 3度ないし4度から改善しない心不全
 - c) 現存するいかなる治療法でも無効な致死的重症不整脈を有する症例
- 2) 年齢は60歳未満が望ましい
- 3) 本人および家族の心臓移植に対する十分な理解と協力が得られること

3. 除外条件

A) 絶対的除外条件

- 1) 肝臓, 腎臓の不可逆的機能障害
- 2) 活動性感染症 (サイトメガロウイルス感染症を含む)
- 3) 肺高血圧症 (肺血管抵抗が血管拡張薬を使用しても6 wood単位以上)
- 4) 薬物依存症 (アルコール性心筋疾患を含む)
- 5) 悪性腫瘍
- 6) HIV (human immunodeficiency virus) 抗体陽性

B) 相対的除外条件

- 1) 腎機能障害, 肝機能障害
- 2) 活動性消化性潰瘍
- 3) インスリン依存性糖尿病
- 4) 精神神経症 (自分の病気, 病態に対する不安を取り除く努力をしても, 何ら改善がみられない場合に除外条件となることがある)
- 5) 肺梗塞症の既往, 肺血管閉塞病変
- 6) 膠原病などの全身性疾患

考慮する. 現時点では, 体外設置型の東洋紡製国立循環器病センター型 (国循型) と植込み型のNovacor LVASがある²⁾.

■ ③ドナー心の評価とレシピエント候補の決定

心臓移植のドナーとして以下は適さない; 全身性の活動性感染症がある場合, HIV (human immunodeficiency virus) 抗体, HTLV-1 (human T-cell leukemia virus-1) 抗体, HBs (hepatitis B surface) 抗原, HCV (hepatitis C virus) 抗体などの陽性者, Creutzfeldt-Jakob病およびその疑い,

悪性腫瘍がある場合、心疾患、心臓外傷、開心術の既往がある場合。

年齢は60歳以下が対象となるが、男性45歳、女性50歳以上では冠動脈硬化性病変に注意する。また、ドパミン10 μ g/kg/min相当以上の強心薬を必要とする場合は慎重な評価が必要である。ドナー心としての最終判定は、開胸下に触診および視診により冠動脈病変を含め心臓に異常がないことを確認して行う。

ドナーに対するレシピエント候補選定は、まず適合条件として、血液型の一致あるいは適合、サイズの適合(体重差-20~+30%が望ましい)、前感作抗体がないこと(リンパ球・クロスマッチを実施)が検討される。候補者が複数存在する場合の優先順位は、虚血許容時間(4時間以内に血流再開ができること)、医学的緊急度(status 1を優先:表10)、ABO式血液型および待機期間により決定する。血液型は一致が優先され、一致者がいなければ適合者に配分される。以上の選定で同一条件の候補が複数いる場合は待機期間の長い者から優先される。

■④移植手術および移植後管理³⁾

手術法には、心房位で吻合するLower-Shumway法と、上・下大静脈で吻合するbicaval法がある。われわれはレシピエントの右房後壁の一部を温存して上・下大静脈で吻合するmodified bicaval法を採用している⁴⁾。

移植手術において重要なことはドナー心の虚血時間を短縮することで、レシピエント手術は、ドナー心摘出手術の進行および搬送状況を把握して進め、ドナー心が到着した時点でレシピエントの心臓摘出および吻合が行えるよう調整する。

移植手術後早期の注意点は、免疫抑制と感染対策である。免疫抑制療法には、一般的にシクロスポリン(ネオーラル)あるいはタクロリムス(プロGRAF)、ミコフェノール酸モフェチル(セルセプト)、ステロイド(プレドニン)の3者併用療法で行われる。腎機能障害を認める症例などでは、免疫抑制の導入においてCD3に対するモノクローナル抗体(OKT3)あるいはポリクローナル抗体である抗ヒト胸腺細胞ウマ免疫グロブリン(リン

【表10】わが国における心臓移植希望者(レシピエント)選択基準
医学的緊急度

Status 1: 次の(ア)~(エ)までの状態のいずれかに該当すること (ア) 補助人工心臓を必要とする状態 (イ) 大動脈内バルーンポンピング(IABP)を必要とする状態 (ウ) 人工呼吸を必要とする状態 (エ) ICU, CCUなどの重症室に収容され、かつ、カテコラミンなどの強心薬の持続的な点滴投与が必要な状態
Status 2: 待機中の患者で、上記以外の状態
Status 3: Status 1, Status 2で待機中、除外条件(感染症など)を有する状態のため一時的に待機リストから削除された状態

フォグロブリン:HATG)が用いられる。急性拒絶反応は、移植後1年以内に発生する頻度が高く、また明らかな臨床症状を伴うことが少ないため、心内膜心筋生検を定期的に行う。治療を要する拒絶反応(国際心臓肺移植学会グレード3a以上)を認める場合には、ステロイドパルス療法を行う⁵⁾。感染対策においては、細菌感染症のみならずサイトメガロウイルス cytomegalovirus (CMV)や単純ヘルペスウイルスなどの日和見感染への配慮が重要である。慢性期に注意すべきものとして、移植心冠動脈病変や悪性リンパ腫(post transplant lymphoproliferative disorder; PTL)などの悪性腫瘍がある。

■⑤わが国の心臓移植の現状^{6,7)}

2005年8月31日現在で、延べ216人が日本臓器移植ネットワークに登録され、そのうち27例はわが国で心臓移植を受けた。また、23例は海外渡航移植を受け、11例は心機能回復例も含む登録取消し例で、73例が待機中に死亡し、82例が移植待機中で、その50%以上はstatus 1であった。

その後、1例の心臓移植が行われ、現在のわが国での移植例は28例である(表11)。年齢は平均37歳で、男性21例、女性7例であった。原疾患は拡張型心筋症18例、拡張相肥大型心筋症5例など大部分は非虚血性の心筋症で、虚血性および非虚血性心筋症がほぼ同数の国際レジストリーと異なる¹⁾。実施施設は、国立循環器病センター14例、大阪大学9例、東京女子医科大学2例、埼玉医大、九州大および東北大が各1例である。

[表11] わが国における心臓移植症例

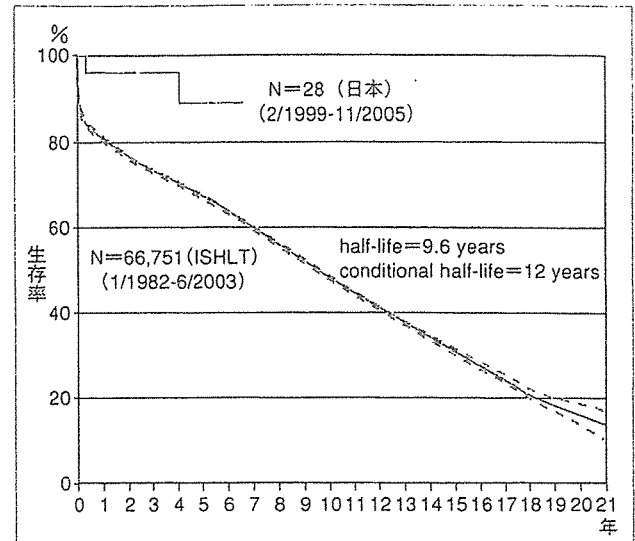
移植症例数	28例
年齢	8～61 (平均37) 歳
性別	男性：21例，女性：7例
原疾患	拡張型心筋症：19例，拡張相肥大型心筋症：5例 薬剤性心筋症：1例，虚血性心筋疾患：1例 心筋炎後心筋症：1例，先天性心疾患：1例
待機状況	Status 1：全例 補助人工心臓装着：20例 強心薬持続投与：8例
待機期間 (status 1)	29～1,304 (平均619) 日 [21例]
補助人工心臓補助期間	21～1,227 (平均651) 日 [14例] (最長例：東洋紡-左室型) 東洋紡-左房型：1例 東洋紡-左室型：13例 [9例] Novacor：2例 [1例] HeartMate-IP：2例 [2例] HeartMate-VE：2例 [2例]
実施施設	国立循環器病センター：14例 大阪大：9例 東京女子医大：2例 埼玉医大：1例 九州大：1例 東北大：1例

【 】：1年以上例

待機状況は全例 status 1 で，うち 20 例が LVAS 装着例であった。待機期間 (status 1) は，平均 669 日で，最長は 1,304 日に及び，1 年以上の待機例は 21 例であった。LVAS 補助期間は平均 651 日で，1 年以上の補助例が 14 例で，最長例は東洋紡左室脱血型で 1,227 日であった。死亡はこれまで 2 例 (移植 5 ヶ月後および 4 年 2 ヶ月後：共に感染症) であるが，他の 26 例の経過は良好で，最長 6 年 9 ヶ月に及んでいる。わが国の累積生存率を国際レジストリーと比較すると，施行数は少ないものの成績は良好である (図 41)。

■ まとめ

わが国での心臓移植施行例は少なく，さらに重症例のみが長い待機期間後に行われているが，移植後の成績は良好であり，心臓移植が末期心不全に対する治療選択の一つとして定着することが望まれる。



[図41] 心臓移植後の累積生存率

文献

- 1) Taylor, DO et al : The registry of the International Society for heart and Lung Transplantation : Twentieth-second official adult heart transplant report-2005. J Heart Lung Transplant 24 : 945-955, 2004
- 2) 中谷武嗣 : 治療の進歩 : 補助人工心臓. 日本内科学会雑誌 94 : 111-118, 2005
- 3) 中谷武嗣ほか : 心臓移植療法のパラダイムシフト. 治療 86 : 2147-2155, 2004
- 4) Kitamura, S et al : Modification of bicaval anastomosis technique for orthotopic heart transplantation. Ann Thorac Surg 72 : 1405-1406, 2001
- 5) 植田初江ほか : 臓器移植の病理 : 心臓移植. 移植 38 : 8-13, 2003
- 6) 日本臓器移植ネットワーク HP. <http://www.jotnw.or.jp/>
- 7) 中谷武嗣 : 日本における心臓移植の現況. 今日の移植 18 : 287-293, 2005

(中谷武嗣)

h) 心不全治療のメガトライアル

心不全は心疾患による死亡あるいは入院の原因となる病態の主たるものであり，その治療戦略の確立が望まれている。これまでにアンジオテンシン変換酵素 angiotensin converting enzyme (ACE) 阻害薬や β 遮断薬などの予後改善効果は多くの大規模臨床試験により明らかとなり，米国および欧州の心臓病学会における心不全治療ガイドラインにおいてはこれらの薬剤の投与が禁忌となる症例以外には全例に投与することが推奨されている。しかし，これらの薬剤の予後改善効果は未だに十分とはいえず，さらなる予後改善に向け，現在

Unblinded Pilot Study of Autologous Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells in Patients With Thromboangiitis Obliterans

Koji Miyamoto, MD; Kazuhiro Nishigami, MD; Noritoshi Nagaya, MD; Koichi Akutsu, MD; Masaaki Chiku, MD; Masataka Kamei, MD; Toshihiro Soma, MD; Shigeki Miyata, MD; Masahiro Higashi, MD; Ryoichi Tanaka, MD; Takeshi Nakatani, MD; Hiroshi Nonogi, MD; Satoshi Takeshita, MD

Background—The short-term clinical benefits of bone marrow mononuclear cell transplantation have been shown in patients with critical limb ischemia. The purpose of this study was to assess the long-term safety and efficacy of bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with thromboangiitis obliterans.

Methods and Results—Eleven limbs (3 with rest pain and 8 with an ischemic ulcer) of 8 patients were treated by bone marrow mononuclear cell transplantation. The patients were followed up for clinical events for a mean of 684 ± 549 days (range 103 to 1466 days). At 4 weeks, improvement in pain was observed in all 11 limbs, with complete relief in 4 (36%). Pain scale (visual analog scale) score decreased from 5.1 ± 0.7 to 1.5 ± 1.3 . An improvement in skin ulcers was observed in all 8 limbs with an ischemic ulcer, with complete healing in 7 (88%). During the follow-up, however, clinical events occurred in 4 of the 8 patients. The first patient suffered sudden death at 20 months after transplantation at 30 years of age. The second patient with an incomplete healing of a skin ulcer showed worsening of the lesion at 4 months. The third patient showed worsening of rest pain at 8 months. The last patient developed an arteriovenous shunt in the foot at 7 months, which spontaneously regressed by 1 year.

Conclusions—In the present unblinded and uncontrolled pilot study, long-term adverse events, including death and unfavorable angiogenesis, were observed in half of the patients receiving bone marrow mononuclear cell transplantation. Given the current incomplete knowledge of the safety and efficacy of this strategy, careful long-term monitoring is required for future patients receiving this treatment. (*Circulation*. 2006;114:2679-2684.)

Key Words: angiogenesis ■ collateral circulation ■ endothelium ■ peripheral vascular diseases

The clinical consequences of severe peripheral arterial disease or critical limb ischemia include rest pain and the loss of tissue integrity in the distal limb.¹⁻³ Therapeutic options for such patients are limited. These conditions are often refractory to conservative measures and are typically unresponsive to drug therapy. When vascular obstruction involves a long segment or is widespread, percutaneous revascularization may not be feasible. Surgical therapy, consisting of arterial bypass or amputation, is complicated by variable morbidity and mortality, and its effectiveness depends on the short- and long-term patencies of the conduit employed. Therapeutic angiogenesis thus constitutes a potential alternative treatment strategy for such patients.^{4,5}

Previous investigators have suggested that endothelial progenitor cells, originating from bone marrow, circulate in

Editorial p 2581 Clinical Perspective p 2684

adult peripheral blood and participate in postnatal neovascularization.⁶⁻⁸ Subsequent experiments have shown that bone marrow or bone marrow-derived cells have the potential to stimulate angiogenesis and thereby modulate the hemodynamic deficit in ischemic limbs *in vivo*.^{9,10} The Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation (TACT) study first demonstrated that the magnitude of angiogenesis stimulated by these cells is sufficient to constitute a therapeutic benefit in patients with critical limb ischemia.¹¹ In that study, the investigators injected bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs) into the ischemic limb of patients and documented a significant improvement in the hemodynamic deficit as well as the relief of ischemic symptoms. Although the TACT

Received June 9, 2006; revision received September 19, 2006; accepted September 21, 2006.

From the Departments of Medicine (K.M., K.N., K.A., M.C., H.N., S.T.), Regenerative Medicine and Tissue Engineering (N.N.), Anesthesiology (M.K.), Transfusion Medicine (S.M.), Radiology (M.H., R.T.), and Organ Transplantation (T.N.), National Cardiovascular Center, Osaka; and the Department of Clinical Laboratory (T.S.), Osaka Minami Medical Center, Osaka, Japan.

Correspondence to Dr Satoshi Takeshita, MD, FACC, Department of Medicine (Cardiology), National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan. E-mail stake@muse.ocn.ne.jp

© 2006 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.644203

study established the concept of using BM-MNCs for therapeutic angiogenesis, limited information is available about the long-term safety and efficacy of this strategy.

The purpose of the present study was to determine the long-term safety and clinical impact of BM-MNC transplantation for "no-option" patients with thromboangiitis obliterans.

Methods

Patients

Eight patients with thromboangiitis obliterans were treated with an autologous transplantation of BM-MNCs between March 2002 and September 2004. The diagnosis of thromboangiitis obliterans was based on the criteria proposed by Olin¹²: (1) onset before age 45; (2) current (recent) history of tobacco use; (3) the presence of distal-extremity ischemia (infrapopliteal or infrabrachial) indicated by claudication, rest pain, ischemic ulcers, or gangrene; (4) exclusion of autoimmune or connective tissue diseases, hypercoagulable states, and diabetes mellitus; (5) exclusion of a proximal source of emboli by echocardiography and arteriography; and (6) consistent arteriographic findings in the clinically involved and noninvolved limbs.

Patients qualified for cell transplantation if they had chronic limb ischemia, with rest pain or a nonhealing ischemic ulcer, present for a minimum of 4 weeks without evidence of improvement in response to conventional drug therapy; showed angiographic evidence of vasculopenia in the affected limb; and were not candidates for percutaneous or surgical revascularization. The exclusion criteria included severe concurrent illness, the presence of proliferative diabetic retinopathy, and a history or clinical evidence of a malignant disorder.

All the patients involved in the present study received continuous medical therapy for >2 months before BM-MNC transplantation to confirm that conventional measures would be insufficient to achieve improvement in rest pain or skin ulcer/gangrene. During this period, no surgical therapies such as bypass grafting, extensive debridement, skin grafting, or limb amputation were performed. In addition, the patients were admitted to the hospital for a minimum of 1 month before BM-MNC transplantation to exclude the likelihood of spontaneous improvement in ischemic symptoms resulting from an enrollment bias. It should be also pointed out that the patients remained in the hospital and received the same therapy for at least 1 month after BM-MNC transplantation to avoid changes in their treatment.

BM-MNC Transplantation

While the patients were under general anesthesia, marrow cells were aspirated from the ileum. BM-MNCs were sorted on an AS-104 blood-cell separator (Fresenius HemoCare, Redmond, Wash) and concentrated to a final volume of ≈ 50 mL. After bone marrow cells were sorted on the AS-104 blood-cell separator, a small fraction of the cells was used for BM-MNC counting; the concentration of BM-MNCs in the final product was determined by using a microscope counting chamber after May-Giemsa staining. By using another fraction of cells, the number of CD34⁺ cells in the BM-MNCs was also determined by fluorescence-activated cell sorting (FACS SCAN flow cytometer; Becton Dickinson, San Jose, Calif). The cells were incubated with the FITC-conjugated mouse monoclonal antibody against human CD34 (clone 581; Becton Dickinson) according to manufacturer's instructions.

For each patient, ≈ 100 aliquots of BM-MNCs (0.5 mL per aliquot) were administered via a syringe with a 27-gauge needle. Injection was performed into 9 lower limbs in 7 of the patients and the bilateral hands in 1. Injection sites were arbitrarily selected according to angiographic findings (ie, the degree of vasculopenia) and included calf muscles such as the soleus and gastrocnemius muscles as well as the sole muscles of the foot. For the patient with hand ischemia, injection was performed in palm muscles.

Assessment of Short-Term Outcome

Ischemic pain was assessed with a visual analog pain scale (VAS) with 10 levels. Ischemic ulcers were documented by color photography. Resting ankle-brachial pressure index (ABI) was calculated as the quotient of absolute ankle pressure and brachial pressure (the patient who received BM-MNC transplantation in his hands was excluded from ABI analysis). Angiographic assessment was performed with magnetic resonance angiography, computed tomographic angiography, or digital subtraction angiography. Adverse events were defined as death, limb amputation, pathological angiogenesis, recurrence/worsening of ischemic symptoms (ie, rest pain, skin ulcer, gangrene), myocardial infarction, stroke, and malignant disease.

Assessment of Long-Term Outcome

The mean length of follow-up was 684 ± 549 days (range 103 to 1466). Patients were followed up by history analysis, physical examination, routine blood testing, ABI, and angiography at pre-scribed intervals during the first year, after which they were contacted at an outpatient clinic or by telephone to track events.

Data Analysis

All data are presented as mean \pm SD (range) or frequencies (percentage).

The authors had full access to and take full responsibility for the integrity of the data. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Results

Diagnosis

The diagnosis of thromboangiitis obliterans was made according to the criteria described above. Among the 8 patients, only patient 6 did not completely fulfill the criteria; ie, this patient had no history of tobacco use (Table 1). Laboratory screening excluded the possibility of other underlying diseases, however, including autoimmune and connective tissue diseases. It should be also pointed out that patient 6 had diabetes mellitus at the time of cell transplantation but not at the onset of thromboangiitis obliterans. With the typical characteristic angiographic findings of thromboangiitis obliterans, such as multiple segmental arterial involvement (skip lesions) and "cork-screw" collateral vessels, we diagnosed patient 6 as having thromboangiitis obliterans, even though the patient did not have a history of tobacco use.

Patient Characteristics

The demographic and clinical data of the 8 patients are shown in Table 1. The mean age of the patients enrolled was 46 ± 14 years (range 28 to 63). Seven patients (88%) were male. One patient had undergone prior femoral-tibial artery bypass grafting, and 1 had undergone sympathetic ganglion block. These treatments were performed >1 year before BM-MNC transplantation. Seven patients (88%) had a history of smoking, all of whom stopped smoking at least 1 month before transplantation.

Short-Term Outcome

The total volume of cells aspirated from the ileum was 728 ± 72 mL (range 600 to 800) per patient, and the total volume of injected BM-MNCs was 45 ± 7 mL (range 30 to 50) per patient. Total number of injected BM-MNCs was $3.5 \pm 0.8 \times 10^9$ (range 2.0 to 4.7×10^9), and that of CD34⁺ cells was $6.8 \pm 2.6 \times 10^7$ (range 2.4 to 9.7×10^7).

TABLE 1. Patient Characteristics

Patient	Age	Sex	Fontaine Stage	Previous Treatment	DM	HT	HLP	Smoking	BM-MNC ($\times 10^6$)	CD34 ⁺ in BM-MNC ($\times 10^7$)	ABI, Baseline	ABI, 1 Month	VAS, Baseline	VAS, 1 Month
1	63	M	III(lt)	Bypass graft	-	-	+	+	3.0	6.6	0.34	0.55	5	0
2	31	M	IV(rt)	Medical	-	-	-	+	4.7	9.7	0.49	0.39	5	1
3	52	M	IV(lt)	Medical	-	-	-	+	4.1	9.0	0.65	0.67	7	2
4	28	M	IV(lt)	Sympathetic ganglion block	-	-	-	+	2.0	6.8	0.50	0.26	5	0
5	32	M	IV(rt) IV(lt)	Medical	-	-	-	+	3.8	2.4	-	-	5	2
6	55	F	IV(lt)	Medical	+	+	-	-	3.4	4.0	0.53	0.51	4	3
7	63	M	III(rt) IV(lt)	Medical	-	+	-	+	3.0	9.1	1.10	0.91	5	3
8	43	M	IV(rt) III(lt)	Medical	-	+	-	+	3.6	6.8	1.00	1.04	5	0
											1.00	1.07	5	0

DM indicates diabetes mellitus; HT, hypertension; and HLP, hyperlipidemia.

Angiographic assessment at 4 weeks after transplantation revealed an apparent increase in limb vascularity in 3 of the 8 (38%) patients (4 of the 11 limbs) (Figure 1). Hemodynamic assessment also failed to document evidence of improved collateral development. Specifically, an increase in ABI (>0.1) was observed in 2 of 7 (29%) patients (2 of 8 limbs), whereas a decrease in ABI (>0.1) was observed in 2 of 7 (29%) patients (2 of 8 limbs). As a result, mean ABI measured at 4 weeks (0.71 ± 0.30) did not differ from that at the baseline (0.70 ± 0.27). Because 2 patients had sites of arterial occlusion distal to the ankle, they showed normal ABIs before treatment. Even after the exclusion of these 2 patients, ABI showed no changes between before (0.55 ± 0.15) and after transplantation (0.55 ± 0.24).

In contrast to the angiographic and hemodynamic results, improvement in limb status was observed in all 8 patients

(100%). Improvement in VAS was observed in all 11 limbs, with a decrease from a mean of 5.1 ± 0.7 to 1.5 ± 1.3 . Furthermore, complete pain relief was achieved in 4 of the 11 limbs (36%). Improvement in skin ulcers was also observed in all 8 limbs (100%), with complete healing in 7 (88%). Although surgical amputations of the distal limb were performed in 2 patients at 1 month, these operations were intentionally scheduled to be performed after transplantation with the expectation of sufficiently improving the limb perfusion to distally advance the site of amputation (Table 2; Figure 2A and 2B).

Long-Term Outcome

The mean follow-up period was 684 ± 549 days (range 103 to 1466). At the final follow-up, VAS score remained unchanged from that observed at 1 month after transplantation in 5 of the 8 patients (63%). The mean VAS score at follow-up also remained low (2.3 ± 1.9) compared with that observed at baseline (5.1 ± 0.7).

In contrast to the pain scale results, adverse events were observed in as many as 4 patients (50%) (Table 2). At age 30

TABLE 2. Adverse Outcomes After Autologous Transplantation of BM-MNCs in Patients With Thromboangiitis Obliterans

Adverse Outcomes	30 Days	Final Follow-Up
Death	0	1 (13)
Major amputation	0	0
Minor amputation	2 (25)*	0
Unexpected angiogenesis	0	1 (13)
Recurrence/worsening of skin ulcer/gangrene	0	2 (25)†
Recurrence/worsening of pain	0	1 (13)
Cardiovascular event	0	0
Cerebrovascular event	0	0
Malignancy	0	0

Values are expressed as n (%).

*Amputation was intentionally scheduled to be performed at 1 month after transplantation.

†One patient was the same one who developed unexpected angiogenesis.

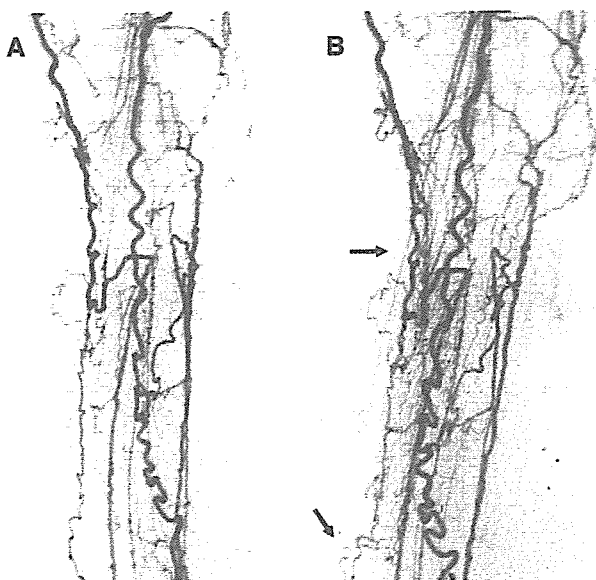


Figure 1. Digital subtraction angiography at (A) baseline and (B) 1 month after cell transplantation. Arrows indicate newly visible collateral vessels at the calf level.

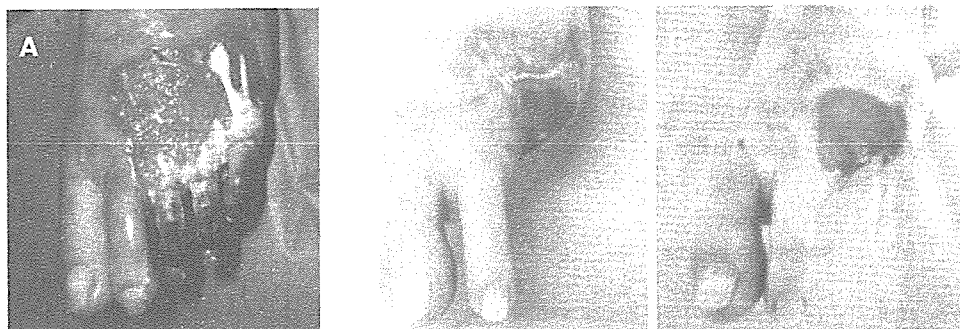


Figure 2. Skin ulcer at (A) 1 month, (B) 2 months, and (C) 4 months after cell transplantation. The patient had far-advanced gangrene, and total limb integrity could not be fully preserved. The patient received a prescheduled amputation of the distal limb at 1 month, and the skin ulcer continued to improve thereafter. At 4 months, however, the skin lesion began to enlarge.

years, patient 4 suddenly died of an unknown cause at 20 months after transplantation. This patient had previously been a smoker, but had stopped smoking before cell transplantation. He had no history of diabetes, hypertension, or hyperlipidemia. Furthermore, ²⁰¹thallium myocardial scan performed before BM-MNC transplantation showed no signs of myocardial ischemia. After cell transplantation, his limb pain disappeared within 1 week and his skin ulcer resolved by 1 month. Thereafter, he was completely free of limb symptoms. Twenty months after cell transplantation, however, he was found dead at his home. He had never experienced chest pain up to the time of his death. Because no autopsy was performed, the cause of his death remains unknown.

Patient 6 showed worsening of an ischemic ulcer at 4 months. The patient had far-advanced gangrene, and total limb integrity could not be fully preserved. The patient underwent a prescheduled amputation of the distal limb at 1 month (see Short-Term Outcome) (Figure 2A), and the skin ulcer continued to improve thereafter (Figure 2B). At 4 months, however, the skin lesion began to increase in size (Figure 2C). The patient subsequently received a second round of cell therapy.

In patient 7, despite complete healing of the skin ulcer, rest pain did not completely resolve after transplantation, with a VAS score of 3 at 1 month. At 8 months, the patient experienced worsening of rest pain (VAS score=4). After a combination of exercise training and maximal drug therapy, the pain improved and became well tolerated.

Patient 8 experienced swelling and recurrence of the skin ulcer in his foot at 7 months. Computed tomographic angiography documented an early venous return of contrast material in his right limb (Figure 3B) that was not observed at the baseline (Figure 3A). Ultrasound examination disclosed an arterialized waveform in the dorsal vein at the base of his third toe, suggesting the presence of an arteriovenous shunt. By 1 year, the swelling and skin ulcer had spontaneously regressed. The systolic pulsatile component in the venous waveform was found to be diminished on ultrasound examination, and early venous filling had disappeared on computed tomographic angiography (Figure 3C).

Discussion

In the present unblinded and uncontrolled pilot study, we documented that the transplantation of BM-MNCs was associated with an improvement in ischemic symptoms for up to 4 years. Indeed, VAS scores improved from 5.1 ± 0.7 to 2.3 ± 1.9 at follow-up. Furthermore, skin ulcers remained completely healed in 6 of 7 patients. In this regard, the present findings extend previous observations¹¹ by establishing the potential long-term benefit of BM-MNC transplantation for the treatment of arterial insufficiency.

It should be noted, however, that half of the patients suffered adverse events during follow-up. Such a high rate of adverse events cannot be explained by the natural course of the disease itself. In general, the prognosis of patients with thromboangiitis obliterans is directly related to tobacco

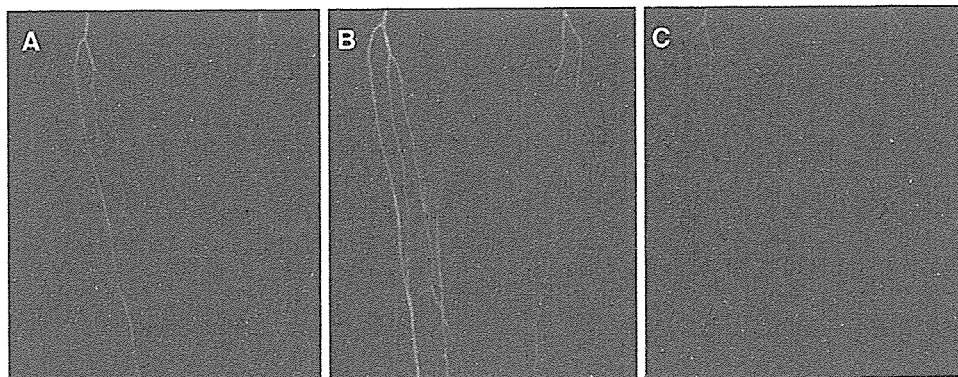


Figure 3. Computed tomographic angiography at (A) baseline, (B) 7 months, and (C) 1 year after cell transplantation. Early venous return of contrast material observed at 7 months spontaneously regressed by 1 year.

use.^{12,13} Patients who are able to stop smoking avoid the recurrence of the disease and amputation.¹⁴ In addition, unlike those with atherosclerosis of the extremities, these patients rarely show involvement of visceral vessels and do not appear to be at an increased risk of stroke or myocardial infarction. The mortality rates are thus not higher than those of age- and sex-matched populations.^{15,16} It is entirely possible that the high rate of adverse events observed in our patients may have been directly related to BM-MNC transplantation rather than to the progression of the disease itself.

Patient 4 suddenly died at 20 months after transplantation at the age of 30 years. The deaths of patients receiving BM-MNC transplantation were previously reported in the TACT study, in which 2 of 25 patients died of acute myocardial infarction within 24 weeks after transplantation.¹¹ The patients' backgrounds in the TACT study, in terms of age and comorbidity, may have been totally different from those of our study, in which only patients with thromboangiitis obliterans were recruited. As mentioned above, in patients with thromboangiitis obliterans, coronary involvement is rare, and they usually do very well as long as they discontinue smoking.¹²⁻¹⁶ Patient 4 had no risk factors for atherosclerosis and stopped smoking before BM-MNC transplantation. Furthermore, ²⁰¹thallium scintigraphy performed before transplantation documented no sign of myocardial ischemia. Considering the patient's background and the natural course of the disease,¹²⁻¹⁶ the possibility that his death was related to BM-MNC transplantation cannot be excluded. In this regard, several studies have suggested the possible role of BM-MNCs in atherogenesis. A recent report by Silvestre et al,¹⁷ for example, demonstrated that the transplantation of BM-MNCs into ischemic limbs of apolipoprotein E-knockout mice led to a significant increase in atherosclerotic plaque size at a distant site. More recently, George et al¹⁸ have also shown that an intravenous injection of bone marrow cells into apolipoprotein E-knockout mice results in an increase in atherosclerotic lesion size, whereas an injection of endothelial progenitor cells influences plaque stability. These reports indicate that attempts to enhance neovascularization by using BM-MNCs could also enhance unwanted plaque growth and instability, thus suggesting the possibility that our young patient died of an acute coronary event due to accelerated atherogenesis after BM-MNC transplantation.

We also encountered the development of an arteriovenous shunt, which could be a potential consequence of BM-MNC transplantation. Indeed, concerns have been raised about the potential adverse effects of cell transplantation, ie, unregulated differentiation and proliferation. Wakitani et al¹⁹ reported that teratoma formation could occur after embryonic stem cell transplantation. Yoon et al²⁰ documented intramyocardial calcification after the transplantation of bone marrow cells in rats. Our observations may provide another cautionary example of unregulated differentiation and proliferation. Although the arteriovenous shunt in our case was self-limited, it may represent unwanted angiogenesis; thus, careful monitoring is warranted for future patients who receive BM-MNC transplantation.

Worsening or recurrence of ischemic symptoms was observed in 3 patients. The short-term outcome at 1 month was

poor in these patients except in the patient with an arteriovenous shunt. The improvement in rest pain was not substantial in 1 patient. Healing of the skin ulcer was incomplete in another. It is anticipated that a poor response 1 month after BM-MNC transplantation could result in a poor long-term outcome. It is important to note that, in the latter patient with incomplete healing of the skin ulcer, the angiographic improvement of the collateral network at 1 month remained unchanged at 5 months when worsening of the skin ulcer was observed. It is suggested that the temporal sequence of improvement in ischemic limb status does not necessarily parallel the temporal evolution of collateral development.

Conclusions

In this unblinded and uncontrolled pilot study, long-term adverse events after BM-MNC transplantation, including death and unfavorable angiogenesis, were observed in half of the patients with thromboangiitis obliterans. Given the current incomplete knowledge of the safety and efficacy of this strategy, careful long-term monitoring is required for future patients receiving BM-MNC transplantation.

Sources of Funding

This work was supported by Health and Labor Sciences Research Grants (H16-009, H16-017, H17-009), by Ministry of Health, Labor and Welfare Research Grants for Cardiovascular Disease (16C-6, 18C-4), and by grants from the New Energy and Industrial Technology Development Organization and the Japan Cardiovascular Research Foundation.

Disclosures

None.

References

1. Belch JJ, Topol EJ, Agnelli G. Critical issues in peripheral arterial disease detection and management: a call to action. *Arch Intern Med.* 2003;28:884-892.
2. Dormandy JA, Rutherford RB. Management of peripheral artery disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic InterSociety Consensus (TASC). *J Vasc Surg.* 2000;31:S1-S296.
3. Isner JM, Rosenfield K. Redefining the treatment of peripheral artery disease. *Circulation.* 1993;88:1534-1557.
4. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LO, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest.* 1994;93:662-670.
5. Isner J, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 1999;103:1231-1236.
6. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-967.
7. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-228.
8. Shi Q, Rafii S, Wu M. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998;92:362-367.
9. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:3423-3427.
10. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, Imaizumi T. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation.* 2001;103:897-903.
11. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K,