

この骨髄幹細胞は白血球などに変化することもできますし、また、血流の不足している筋肉などでは血管内皮細胞と呼ばれる血管の一番内側の細胞にも変化する能力も持っています。Buerger 病の患者さんの筋肉に注射された骨髄幹細胞は血管の内皮細胞になり、新しく血管を作ると考えられています。

- ② 血管の枠組みを作ることのできる細胞も含まれておりこれらの細胞は血管の支持細胞になると考えられています。
- ③ また、ホルモンの一種である血管増殖因子を分泌する細胞も含まれており、このような細胞から分泌される血管増殖因子により、血管新生が促進されます。

このように骨髄の中には様々な細胞が含まれており、それらが共同して血流の不足している手足の筋肉内で血管を新しく作ると考えています。

3. 血液中の幹細胞とは

骨髄は血管が豊富な組織であり、その中の幹細胞は血液中にも出て行きます。これらの幹細胞は細胞の表面に“CD34”と呼ばれる目印がでていることが多く、その目印を使って、血液中の幹細胞を集めてくるのが可能です。

4. 血管再生療法とは

Buerger 病は手足の血管が狭くなったり、詰まることにより起こる病気です（その原因は不明です）。血管の狭窄、閉塞により、その場所より

先の手足には十分な血流が供給されず、酸素や栄養などが足りないために痛みや潰瘍などの症状が起ります。内服薬や点滴治療は血管拡張および血管閉塞防止目的で行われますが、それだけでは十分な効果が得られない場合がしばしばあります。また、バイパス手術では狭くなった部分を迂回するように狭窄部の前と後ろの血管を自分の静脈などを使いつなぎますが、Buerger 病では手術できない症例や、手術後にバイパス血管も閉塞することなどがあり、効果は不十分なこともあります。

そのような患者さんに対して、自分の骨髄や血液中の幹細胞を使った血管再生療法が始められています。血管再生療法では血管を作るもとなる細胞（幹細胞）を自分の骨髄や血液中から採取し、その細胞を血管が必要な部位に注射します。幹細胞を血管に分化させることにより、必要な場所に新しく血管を作ることができます。そして新しく血管ができることにより、その部位での血の流れが改善し、虚血性潰瘍や激しい疼痛などの症状も軽減、消失します。

5. 実際の治療手順<図1>

私達の病院では骨髄を使った血管再生療法を行っていますので、ここでは自己骨髄幹細胞を用いた血管再生療法の実際の手順を紹介します。

- ① 手術室において全身麻酔下で骨髄細胞を採取します。この方法は通常の骨髄移植の時に行われる方法と同じであり、日本では年間1000例以上実施されています。骨髄の採取量は800ml程度が標準で、採取にかかる時間は2時間程度です。

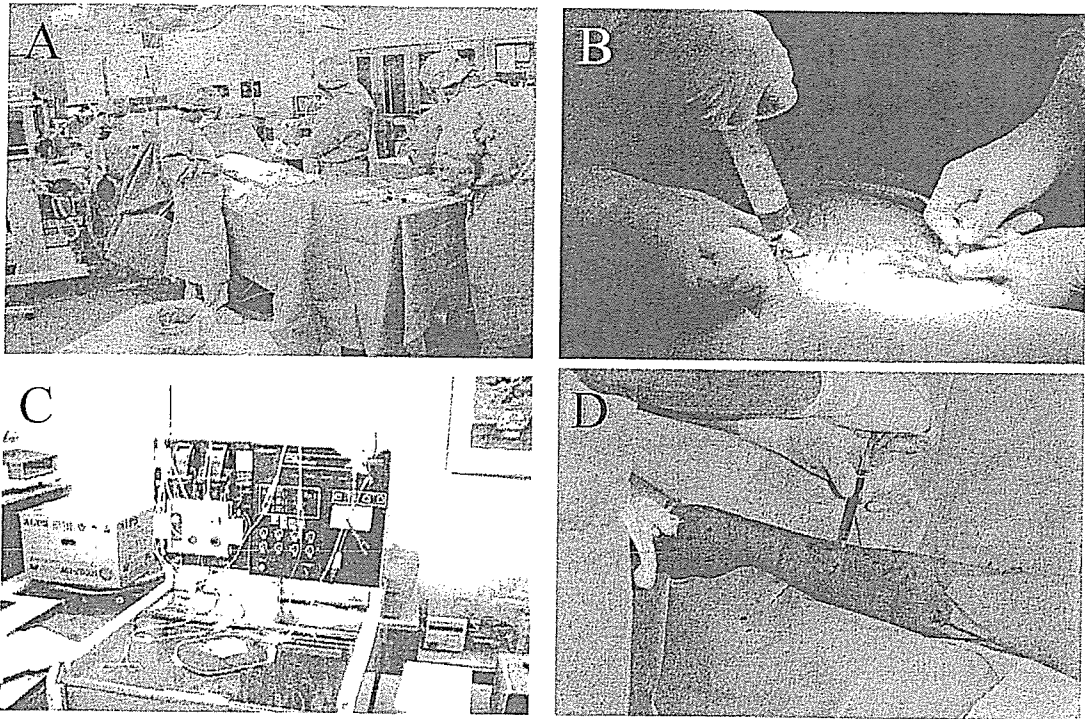


図1 A. 骨髄採取は全身麻酔下で行います
 B. 両側腸骨（腰の骨）より骨髄を500-800ml 採取します
 C. 機械で単核球（血管になる細胞）だけを分離します
 D. 血管が必要とされる部分に注射します

② 骨髄細胞の中で血管等になる細胞を分離します。分離に用いる機械は通常の骨髄移植に用いられるのと同じ機械を用い、血管新生に関係のない赤血球等の細胞を除外し、必要な細胞を取り出します。分離にかかる時間は2時間程度です。

③ 分離した細胞を患肢の筋肉に注射します。上腕や下肢のヒラメ筋、腓腹筋（ふくらはぎの筋肉）には一箇所につき0.5ml ずつ、手や足の裏、甲には0.2ml ずつ筋肉の中に注射を行います。合計で数十箇所に注射を行います。痛みの軽減のため全身麻酔下で行うこともあります。この注射にかかる時間は1時間程度です。

実際に要する時間はその他の時間を合計して

も6時間程度です。

6. 治療効果は

骨髄幹細胞や支持細胞、血管増殖因子分泌細胞等が共同して虚血部位で血管新生がおこります。移植後には血流が改善し、痛みの軽快や消失、潰瘍の治癒、およびそれに伴ない手足の切断を免れることも多い、と報告されています。

自己幹細胞による血管新生療法は治療法としては新しいため、全ての患者さんに十分な効果があるかどうかは明らかではありません。ただ、慢性動脈閉塞症の患者さんに比べて Buerger 病の患者さんでは、症状の改善が良好であることが多いと報告されています。

7. 危険性は

- ① 骨髄幹細胞や血液中の幹細胞を静脈注射することは白血病等の血液病の治療で以前より行われていますが、特に有害な副作用も報告されていません。
- ② 血流の乏しいところでは幹細胞は主として血管に変化すると考えられますが、幹細胞は血管だけでなく脂肪、軟骨、膠原線維などを作る能力もあります。動物実験やこれまでの血管再生治療後の患者さんでは血管以外のものは見つかっておりませんが、長期間後には何らかの異常が起こる可能性があります。
- ③ 他人からの細胞や臓器の移植と違い、自分自身の細胞を自分の手足に移植するため、拒絶反応はないと考えられています。
- ④ その他には骨髄採取の際の全身麻酔や血液中の幹細胞採取に伴う合併症の可能性、および足（または手）への注射に伴う痛み、浮腫および発赤等があります。

新しい治療法のため今後予期せぬ重篤な副作用が出現する可能性は否定できませんが、現在のところ自己幹細胞移植に伴う問題となるような副作用は報告されていません。

8. どの病院で治療が受けられるか

国立循環器病センターをはじめ、多くの大学病院などでも自己幹細胞移植による血管再生療法が行われています。治療にかかる費用は、各施設により異なります。

9. 実際の症例は

—国立大阪南病院（現：国立病院機構
大阪南医療センター）での症例—

病名 Buerger 病

37歳 男性

入院までの経過

平成元年頃より虚血性潰瘍のために手や足の指の切断を繰り返しており、薬物療法は無効であった。平成12年12月頃より左手の親指の感染が治らず、その部位より排膿していた。また、右手の第三指、第五指にも6ヶ月以上続く難治性の虚血性潰瘍があった。

入院後の経過

入院後、他の動脈閉塞性疾患との鑑別を行い Buerger 病と確定診断。また、血管造影検査などの結果よりバイパス手術等の手術適応はなく、院外委員を含めた症例検討委員会にて血管新生療法の適応症例であると判定。平成13年7月に骨髄細胞移植による血管新生療法を実施。

骨髄移植後5日目より、まず前腕部の皮膚の色が虚血を示す暗赤色より自然な肌色に変化を始め、徐々に指先の方にもその変化が拡がっていった。指先は10日目頃より、色の変化があり、それに伴わない6ヶ月以上も治らなかつた虚血性潰瘍も縮小を始めた。移植後3週間で潰瘍が消失した。また、移植前は箸などを長く使うと疼痛が出現したが、移植後は痛みが起こらなくなった。また、手や指の血流を反映する経皮的酸素分圧測定や皮膚灌流圧の測定値でも血流が

7. 危険性は

- ① 骨髄幹細胞や血液中の幹細胞を静脈注射することは白血病等の血液病の治療で以前より行われていますが、特に有害な副作用も報告されていません。
- ② 血流の乏しいところでは幹細胞は主として血管に変化すると考えられますが、幹細胞は血管だけでなく脂肪、軟骨、膠原線維などを作る能力もあります。動物実験やこれまでの血管再生治療後の患者さんでは血管以外のものは見つかっておりませんが、長期間後には何らかの異常が起こる可能性があります。
- ③ 他人からの細胞や臓器の移植と違い、自分自身の細胞を自分の手足に移植するため、拒絶反応はないと考えられています。
- ④ その他には骨髄採取の際の全身麻酔や血液中の幹細胞採取に伴う合併症の可能性、および足（または手）への注射に伴う痛み、浮腫および発赤等があります。

新しい治療法のため今後予期せぬ重篤な副作用が出現する可能性は否定できませんが、現在のところ自己幹細胞移植に伴う問題となるような副作用は報告されていません。

8. どこで治療が受けられるか

国立循環器病センターをはじめ、多くの大学病院などでも自己幹細胞移植による血管再生療法が行われています。治療にかかる費用は、各施設により異なります。

9. 実際の症例は

—国立大阪南病院（現：国立病院機構
大阪南医療センター）での症例—

病名 Buerger 病

37歳 男性

入院までの経過

平成元年頃より虚血性潰瘍のために手や足の指の切断を繰り返しており、薬物療法は無効であった。平成12年12月頃より左手の親指の感染が治らず、その部位より排膿していた。また、右手の第三指、第五指にも6ヶ月以上続く難治性の虚血性潰瘍があった。

入院後の経過

入院後、他の動脈閉塞性疾患との鑑別を行いBuerger病と確定診断。また、血管造影検査などの結果よりバイパス手術等の手術適応はなく、院外委員を含めた症例検討委員会にて血管新生療法の適応症例であると判定。平成13年7月に骨髄細胞移植による血管新生療法を実施。

骨髄移植後5日目より、まず前腕部の皮膚の色が虚血を示す暗赤色より自然な肌色に変化を始め、徐々に指先の方にもその変化が拡がっていった。指先は10日目頃より、色の変化があり、それに伴わない6ヶ月以上も治らなかつた虚血性潰瘍も縮小を始めた。移植後3週間で潰瘍が消失した。また、移植前は箸などを長く使うと疼痛が出現したが、移植後は痛みが起こらなくなった。また、手や指の血流を反映する経皮的酸素分圧測定や皮膚灌流圧の測定値でも血流が

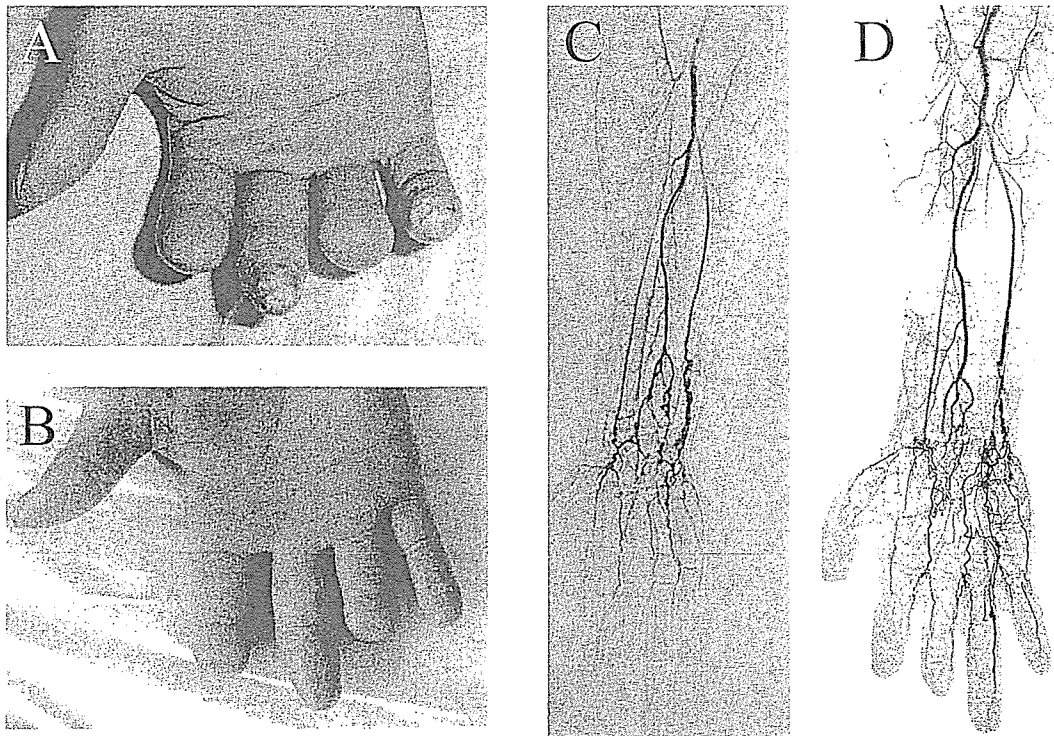


図2 A. 骨髄移植前：難治性の潰瘍が有りました
 B. 骨髄移植16週後：潰瘍は完全に消失しています
 C、D. 骨髄移植前（C）に比べて移植後（D）は血管の増加が見られます

著明に改善しており、血管造影上も血行の改善を認めている。

移植4ヶ月目の現在では潰瘍のあった場所も完全な皮膚が張っており、痛みなどの症状も全く消失している。〈図2〉

まとめ

自己骨髄細胞移植による血管新生療法は平成

12年より始められた新しい治療法です。そのためはまだ大規模な解析がなされていませんが、各施設からの報告では良好な経過をとる症例が多いようです。今後は自己幹細胞移植による血管再生療法が、難治性 Buerger 病治療の標準的な治療法になると考えています。

——痛みを軽減し、患肢の切断を防ぐ

治療法です——

4. 画像解析-微小血管造影-

知久 正明・西上 和宏・内藤 博昭・盛 英三・佐藤 英一

狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症に対する新しい治療戦略として血管再生治療^{用解1)}が期待されている。実際の臨床では、血管造影を含めた臨床検査で臨床症状の効果を十分には反映していない。これは、既存の血管造影装置の解像度は約200～300 μm であり、再生される新生血管は約100 μm 以下の微小血管であるからである。微小血管造影の先駆けとなったシンクロトロンによる微小血管造影法^{用解2)}は200～500 μm 以下の微小血管の定量と50～200 μm 以下の微小血管の可視化が可能である。さらに、臨床の場で簡便に使用できる微小血管造影装置も開発された。本稿では、再生治療後の微小血管の評価方法について概説する。

はじめに

血管再生には、一般に既存の血管から血管内皮細胞が増殖，リモデリングし，新しい血管枝が形成される狭義の血管新生 (angiogenesis) と，血管内皮前駆細胞である血管芽細胞が集合・分化して血管が形成される血管発生 (vasculogenesis) の2つが考えられている。血管発生は，主に胎生期に行われると考えられていたが，成人末梢血中のCD34陽性単核球の分画から血管内皮細胞へと分化する血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) があることが報告され，成人においても血管発生による血管再生が起こりうることが示された¹⁾。特に単核球分画中で血管内皮細胞に分化する単核球は，主に骨髓に存在するため，動物実験の虚血モデルに骨髓単核球細胞移植をすることにより，血管新生や側副血行路が発達し，下肢血流量増加作用や心機能が改善することが確認された。これに基づき，重症下肢虚血患者に対し自己

骨髓細胞移植や末梢血幹細胞移植が臨床導入され，良好な成績が報告されている²⁾。しかし，既存の血管造影装置では空間解像度が200 μm 前後で，ミリメートルオーダーの血管を主たる観察対象としている。そのため，新生血管床の構築と機能の評価には極めて不十分といわざるを得ない。そこで，微小血管を観察できる微小血管造影法に期待がもたれている。

I. 微小血管造影法

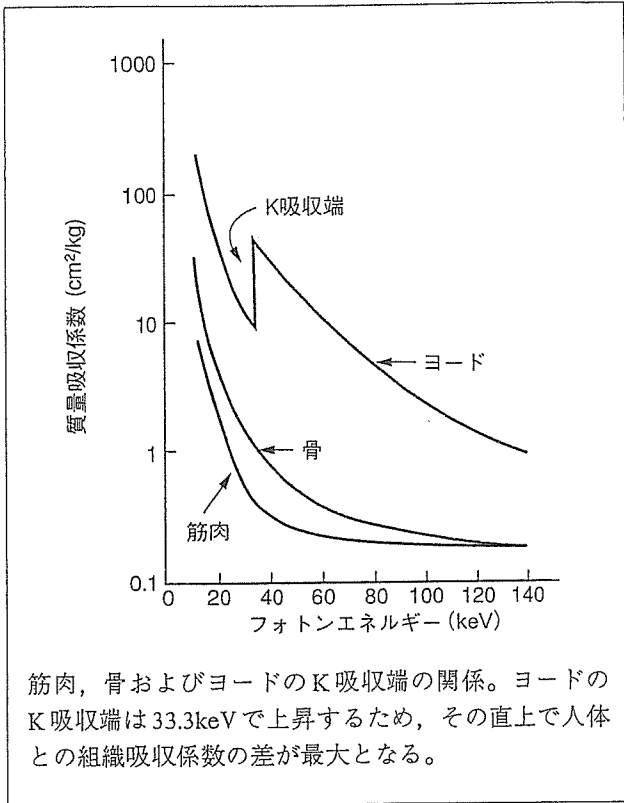
1. 放射光微小血管造影法

再生された微小血管を血管造影検査で評価するためには，微量の造影剤を検出できる装置が必要となる。その要素としてはX線の性質が高輝度で，平行性，単色性であり，なおかつ検出系が高感度，高解像度であることが重要である。これらの要素をすべて取り揃えているのが放射光施設内の微小血管造影装置である³⁾。放射光とは広域のスペクトルを持つ白色光であり，太陽光のように限りなく

key words

微小血管造影，血管再生治療，新生血管，単色X線，放射光微小血管造影法，病院設置型微小血管造影法，プラズマX線微小血管造影法，angiogenesis，vasculogenesis，endothelial progenitor cell

図① X線エネルギーと質量吸収係数



図② 病院設置型微小血管造影装置



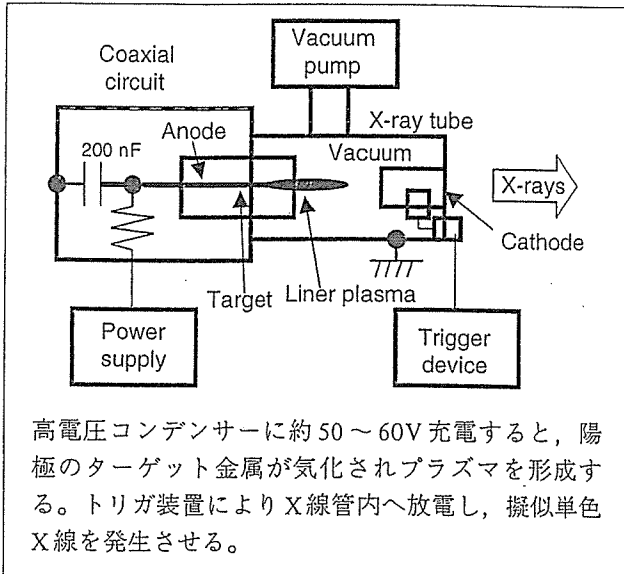
平行に近い性質がある。単色光の利点として，ヨードは33.3keVのエネルギーレベルでK吸収端を持つ。これは質量吸収係数が不連続に上昇し，X線のエネルギーをヨードのK吸収端の直上のエネルギーに変換すると，ヨードと周囲組織との質量吸収係数の差が最大となる（図①）。組織とヨードとのコントラストが最良となるため，微量のヨードを検出できやすくする効果がある。放射光のX線は，既存のX線装置より約108倍以上も輝度が高く，シリコン結晶を用いてヨード吸収端の直上に設定することにより，単色化しても十分な光子量を維持することが可能である。検出系は高解像度・高感度蛍光板で作製した蛍光像を，超高感度・高精細撮像管であるアバランシェ型ハイビジョンモノクロ新Super-HARPカメラで撮影する。これらの検出器系から高解像度微小血管造影像（50 μm）が得られる^{5)・6)}。既存の撮影装置のようにイメージンスキャナーとCCDカメラを用いた検出器では，感度と解像度が低いため，高精細画像として微小血管を描出するには限界がある。

2. 病院設置型微小血管造影法

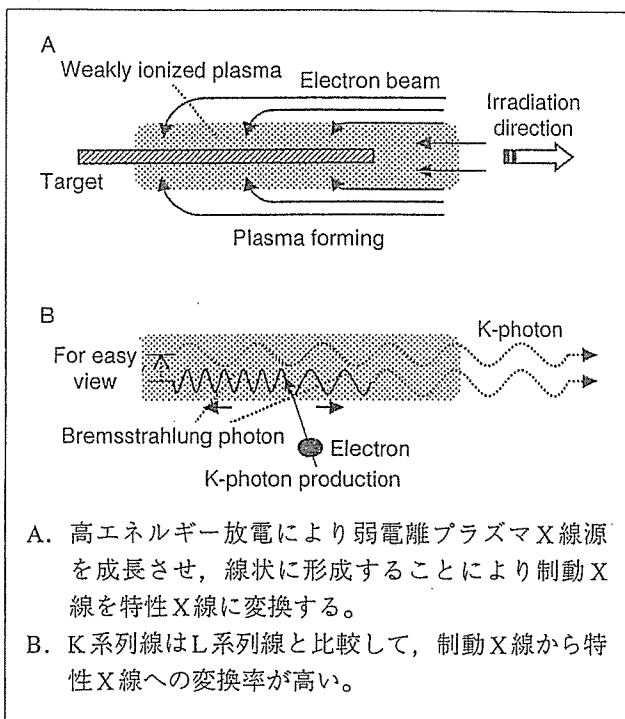
放射光施設は多額のコストと広大な敷地を必要とし，臨床導入するには時間的・空間的にも問題がある。そこで微小血管造影法が臨床応用できるように，新エネルギー・産業技術開発機構（NEDO）の支援により，病院設置型の微小血管造影装置を浜松ホトニクス・NHKエンジニアリングの協力を得て共同開発した。X線管は最大陽極熱容量が5MHUと世界最大級の大きさであるCT用管球を転用した（図②）。X線高電圧装置も大出力化し，市販の装置では不可能な70kVp・800mAで高輝度のX線を連続20秒間まで撮影できる。疑似単色化はランタノイド系の金属を複合したフィルターで，ヨードのK吸収端である33keV付近に頂点を有し，約20keVのバンド状の照射X線スペクトルに変換した。検出系は，放射光微小血管造影法と同じ，NHKの高感度・高精細撮像管であるアバランシェ型ハイビジョンモノクロ新Super-HARPカメラを用いている。

安全性の検討として，照射X線量と散乱X線量

図③ プラズマX線微小血管造影装置 (文献9より改変)



図④ プラズマX線の発生原理 (文献9より改変)



を計測した。X線発生装置から1mに検出器を設置し、管電圧70kV、管電流500mAで20秒照射した場合、0.547Sv (62.7R)であった。検査の撮影条件としては最低でも1検査あたり100R以下 (3R/sec) を目標としており、妥当な線量と考えられる。また、X線発生装置から1mの距離にファントムを置き、50cm側方で散乱X線を検出した場合の散乱X線量は0.0225mSv (2.58mR)であった。放射線医

療従事者の年間被曝量の限度は50mSvであり、許容範囲内と考えられる。本装置は、2004年3月に国立循環器病センターに設置され、医師主導のもと、臨床応用が開始される。

3. プラズマX線微小血管造影法

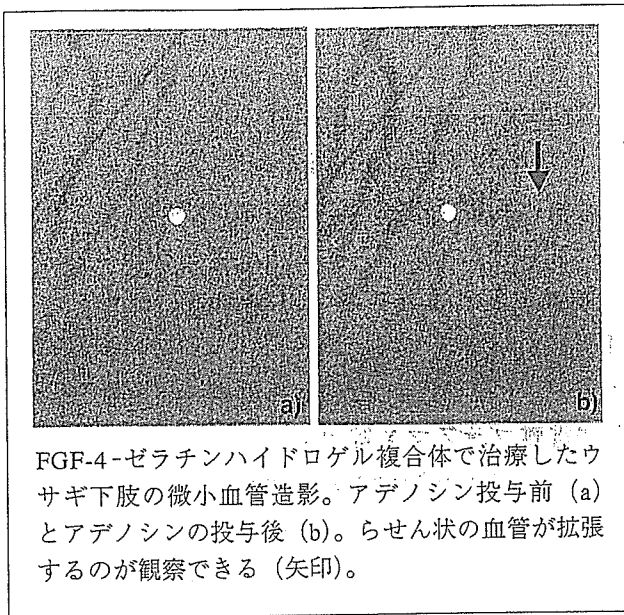
装置は高電圧電源、高電圧コンデンサー、プラズマX線管からなり、高電圧コンデンサーの容量を増すことによりX線の高輝度化が可能となる(図③)。プラズマX線はシャープなK系列特性X線であり、その発生原理は高エネルギー放電により弱電離プラズマX線源を成長させ、線状に形成することにより制動X線を特性X線に変換する。特性X線はプラズマを容易に通過するので、高線量の疑似単色X線が発生する(図④A)。さらに、K系列特性線は蛍光吸収率が高いので、L系列線と比較して制動X線から特性X線への変換率が高い(図④B)。プラズマX線は金属ターゲットの種類により、特性X線のエネルギーを任意に選択することができる。例えば、セリウムを陽極に用いると約34keVの特性X線を得られ、ヨードのK吸収端である33keV直上のエネルギーを持つ疑似単色X線での撮影が可能となる。

II. 微小血管の画像による評価

1. 正常血管と再生血管の比較

Takehitaらは、放射光微小血管造影装置を用い、ラットの大腿動脈を結紮した後の再生血管と結紮処置をしていないコントロールの血管性状を比較した¹⁰⁾。結紮してから4週後に血管撮影をした結果、線状とらせん状の2種類の血管が存在したが、コントロールでは線状の血管のみであり、らせん状の血管は観察されなかった。このことから、再生される血管には線状とらせん状の2種類の構造を持つ血管があるが、線状の血管は既存の血管であった可能性もあると示唆した。しかし、らせん状の血管はコントロールでは観察されないため、少なくとも虚血により再生した結果で生じた血管であるとしている。また、血管内皮依存性の血管拡張薬であるアセチルコリンを投与した場合、線状の血管は拡張するものの、らせん状の血管は拡張しなかった。さらに、血管内皮増殖因子である

図⑤ 再生血管のアデノシン投与による反応

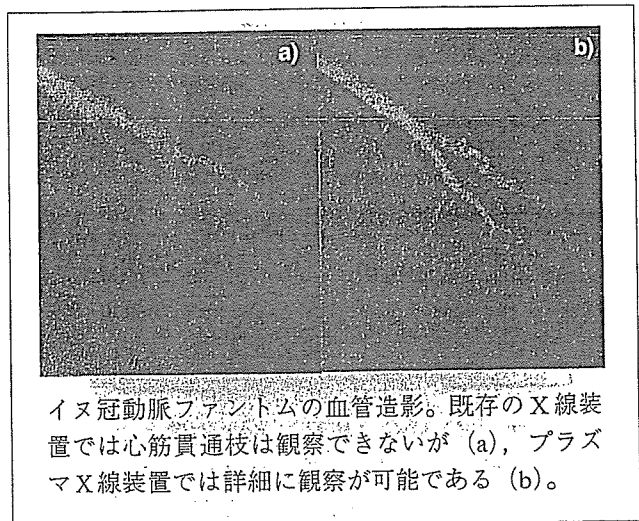


vascular endothelial growth factor (VEGF) で治療したラットで観察されたらせん状の血管も拡張せず¹¹⁾，以上のことから虚血により生じた再生血管や VEGF により再生したらせん状の再生血管は，内皮機能が備わっていない不完全な再生血管であると考えられた。一方，fibroblast growth factor 4 (FGF-4)-ゼラチンハイドロゲル複合体にて血管再生治療後のウサギの下肢虚血モデルを撮影した。観察されている血管は再生血管と考えられ，アデノシンの投与によりらせん状の血管が拡張したと報告されている¹²⁾。病院設置型の微小血管造影装置でも同様に，FGF-4-ゼラチンハイドロゲル複合体で治療した場合，アデノシンの投与によりらせん状の血管が拡張した (図⑤)。これにより，FGF-4-ゼラチンハイドロゲル複合体で治療した場合には，より成熟した血管が再生したと考えられる。

2. 病院設置型とプラズマX線微小血管造影装置

病院設置型の微小血管造影装置のX線源では，その単色X線光子数の限界から，現在は体厚が8cmの下肢の微小血管造影に対象が限られている。

図⑥ 既存のX線装置とプラズマX線装置の比較



体厚が8cm程度の被写体では微小血管を描出できるが，10cmを超えると血管像をほとんど得ることができない。一方，プラズマX線装置は，コンデンサーの容量を増加させることで，高輝度化することが可能であるため，人体を通過する疑似単色X線が得られる可能性があると考えられている。マイクロファイバーを充填したイヌ冠動脈ファントムをプラズマX線装置と既存の血管造影装置とで比較した場合，プラズマX線で撮影した場合は心筋貫通枝レベルのミクロンオーダーの微小血管が詳細に観察できたが，既存の血管造影装置では観察できなかった (図⑥)。

おわりに

微小血管造影法にて観察されている血管は，必ずしも新生血管とは限らず，側副血行路の血流の増加やあらかじめ存在していた微小血管の拡張であるかもしれないということを忘れてはならない。しかし，微小血管造影法による画像評価は，血管の種類や反応性の評価まで可能となる。今後の臨床導入により，さらに詳細に検討されることを期待している。

用語解説

1. 血管再生治療：虚血性疾患において、血行再建や薬剤治療に抵抗する症例に対し、新生血管を形成させ、血流を改善させる治療である。現在は、自己骨髄やサイトカインなどを用いて臨床応用されている。
2. 微小血管造影法：既存の血管造影装置の空間解像度は200～300 μ mであるが、100 μ m以下の解像度を持つ撮影装置にて微小血管の造影が可能となっている。血管再生治療で再生された血管の評価に期待されている。

参考文献

- 1) Asahara T, Murohara T, et al : Science 275, 964-966, 1997.
- 2) Shintani S, Murohara T, et al : Circulation 103, 897-903, 2001.
- 3) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, et al : Lancet 360, 427-435, 2002.
- 4) Mori H, Hyodo K, et al : Circulation 89, 863-871, 1994.
- 5) Tanioka K : Proc SPIE Int Soc Opt Eng 1656, 1-12, 1992.
- 6) Kubota M, Kato T, et al : IEEE Trans Broadcasting 42, 251-258, 1996.
- 7) Umetani K, Ueki H, et al : J Synchrotron Rad 5, 1130-1132, 1998.
- 8) Tanioka K, Ohkawa Y, et al : IEEE Workshop on CCD and Advanced Image Sensors, 2001.
- 9) Sato E, Hayasi E, et al : SPIE 4682, 538-548, 2002.
- 10) Takeshita S, Isshiki T, et al : Circulation 95, 805-808, 1997.
- 11) Takeshita S, Isshiki T, et al : Circulation 98, 1261-1263, 1998.
- 12) Kasahara H, Tanaka E, et al : J Am Coll Cardiol 41, 1056-1062, 2003.

図表

- *機能・代謝画像診断法と分子画像, 西村恒彦 編, 南山堂, 2003.
- *INNERVISION 17(8), 疑似X線レーザーを用いた普及型微小血管造影装置の開発, 知久正明, 西上和宏 他, インナービジョン, 2003.

ホームページ

- ・大型放射光施設 SPring-8
<http://www.spring8.or.jp/j/>
- ・高エネルギー加速器研究機構
<http://www.kek.jp/ja/index.html>

知久正明

1994年 日本大学医学部卒業後、日本大学第三内科入局
 1996年 日本大学医学部大学院入学
 2000年 大学院卒業後、国立甲府病院循環器科に勤務
 2003年 国立循環器病センター修練医
 現在は、大血管疾患から末梢血管疾患の非侵襲的診断法および血管再生治療における微小血管造影法の研究を行っている。

3. 遺伝子による血管新生

國本 聡, 笠原啓史, 福山直人, 田中越郎, 知久正明, 永谷憲歳
西上和宏, 岩畔英樹, 増田治史, 浅原孝之, 盛 英三

サマリー

1994年に行われた循環器領域における遺伝子治療開始以来, 次々にその有効性が報告されている。これら循環障害に対しての遺伝子治療は遺伝子治療全体のなかでもっとも良好な結果が得られているといっても過言ではないと思われる。近年, nakedプラスミドや骨髄単核球投与による血管新生療法も臨床において開始されており, 増え続ける虚血性疾患に対しての新たな治療法としての位置を確保しつつある。本稿においては, 新たな治療法として行われてきている遺伝子投与による血管新生療法の現況を概説し, われわれが開発中の生分解性ゼラチンを用いた遺伝子導入法とCell/Gene Hybrid Therapyについても解説する。

再生医療の現状

Folkmanにより腫瘍発育に血管新生因子による新生血管が関与していることが示されて以来¹⁾, 分子生物学の発展に伴い血管形成の機序が徐々に明らかになってきた。悪性新生物における血管新生の抑制, または虚血に対しての血管新生療法の可能性を示唆する研究報告がなされるなか, 血管新生促進因子による血管新生(再生)を得ることで虚血性疾患の治療を行う「治療的血管新生(therapeutic angiogenesis)」の概念が誕生した²⁾。そして, 1994年に米国タフツ大学のJeffrey M. Isnerらにより, 循環器領域における世界初の遺伝子治療が行われた³⁾。その後も, それ以外の血管新生促進因子を用いた治療的血管新生の検討が行われてきている。

1. 血管新生促進因子

種々の血管新生促進因子による血管新生(angiogenesis)あるいは血管形成(vasculogenesis)が報告されている(表1)。以下にその主なものについて述べる。

1) FGF (fibroblast growth factor : 線維芽細胞増殖因子)

FGFファミリーはヘパリンに親和性の高いポリペプチドであり, aFGF (acidic FGF : 酸性FGF=FGF-1), bFGF (basic FGF : 塩基性FGF=FGF-2), int-2 (FGF-3), hst-1 (FGF-4), FGF-5がある。FGFは内皮細胞のみでなく線維芽細胞や平滑筋細胞を増殖させる働きがある。このことは毛細血管のみでなく細小動脈の新生をきたす可能性があるが, 増殖性病変性のある可能性もある。aFGF, bFGFに関しては分泌シグナルが付いていないためにその分泌機序は詳細が不明である。一方, int-2, hst-1はシグナルペプチドをもち分泌されるタンパク質であり, VEGF産生を促進するhst-1/FGF-4は血管新生療法においてより有効である可能性があり狭心症に対しての臨床試験でも有効性が報告されている⁴⁾。また, FGF-5は脈絡膜血管新生に関与しているとの報告がある。

2) VEGF (vascular endothelial growth factor : 血管内皮増殖因子)

1つの遺伝子から5種類のアイソフォーム(121, 145, 165, 189, 206アミノ酸)が産生され, PDGF

(platelet derived growth factor : 血小板由来増殖因子)-Aあるいは-Bと似た構造をしている。in vitroでは内皮細胞の増殖促進、アポトーシスの抑制、in vivoでは血管新生、血管透過性はもちろん管腔形成促進、内皮細胞の遊走、凝固線溶系タンパク質の産生、細胞接着分子の内皮細胞上への発現等を誘導する。VEGFはシグナルペプチドをもつため、分泌されパラクリン的に血管内皮細胞に働き、低酸素状態に反応して働くという大きな特徴がある。これは、VEGFの転写開始点よりも上流に結合するHIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α : 低酸素誘導因子1 α) を介しての転写亢進が関与している。VEGF関連遺伝子群としてPlGF (placenta growth factor : 胎盤由来増殖因子)、VEGF-B、-C、-D、-Eも発見されその効果について検討がなされている。最近、生物学的活性の強いVEGF₁₆₅に特異的に結合するneuropilin-1 (NP-1) が報告された⁵⁾。これは単独では活性を示さないが、内皮細胞に発現させるとVEGF受容体に対する結合が約10倍に上昇し、活性も同程度上昇することが示された。VEGFは内皮細胞に限局的に働くが、透過性の増大による浮腫をきたす例が少なくない。

3) HGF (hepatocyte growth factor : 肝細胞増殖因子)

HGFは、肝臓の再生因子として発見されたが、腎臓、肺、消化管そして血管等さまざまな臓器に関与している。HGFは典型的なシグナル配列をもつため細胞から分泌され、受容体であるc-Metが内皮細胞に存在することから、VEGFと同様に血管平滑筋細胞には影響を与えず、内皮細胞のみを増殖させることが明らかになっている⁶⁾。HGFは虚血の状況下においてはその発現は著明に低下しており、VEGFとは異なる。しかし、受容体であるc-Metの発現は増加しており、HGFを遺伝子導入することによりその不足分を補うことが可能となり、結果としてVEGFと同等な治療効果を得ることができるとされている。現在、臨床においての投与が開始されており、その有効性が報告されている。副作用としての浮腫はVEGFと異なり報告されていない。

4) その他の血管新生促進因子

プロスタグランジン (PGE₁, PGE₂) は血管拡張作用と血管新生作用をもち、化学的安定化を図ったプロドラッグの報告がある⁷⁾。

炎症性サイトカインにはIL-1/6/8, TNF- α , イン

略語

FGF : fibroblast growth factor
(線維芽細胞増殖因子)

VEGF : vascular endothelial growth factor
(血管内皮増殖因子)

PDGF : platelet derived growth factor
(血小板由来増殖因子)

HIF-1 α : hypoxia-inducible factor-1 α
(低酸素誘導因子1 α)

PlGF : placenta growth factor
(胎盤由来増殖因子)

NP-1 : neuropilin-1

HGF : hepatocyte growth factor (肝細胞増殖因子)

PA : plasminogen activator

MMP : matrix metalloproteinase

PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule-1

G-CSF : granulocyte colony stimulating factor
(顆粒球コロニー刺激因子)

GM-CSF : granulocyte-macrophage colony stimulating factor
(顆粒球コロニー刺激因子)

PGE₁, E₂ : prostaglandin E₁, E₂

PD-ECGF : platelet derived-endothelial cell growth factor (血小板由来内皮細胞増殖因子)

TNF- α : tumor necrosis factor- α (腫瘍壊死因子- α)

EGF : epidermal growth factor (上皮成長因子)

TGF- β : transforming growth factor- β
(形質転換増殖因子)

PAF : platelet-activating factor (血小板活性因子)

ECK : epithelial cell kinase

ターフェロン等があるが、これらは炎症に際してマクロファージ、好中球等から分泌される。血管新生に関与しているものとしてはIL-8とTNF- α がある。

IL-8はC-X-Cファミリーに属する α -ケモカインの1つで血管新生を誘導する⁸⁾。TNF- α は低濃度ではIL-8, VEGF, bFGFの細胞内での転写を亢進して血

●表1 血管新生促進因子

VEGFファミリー	
<ul style="list-style-type: none"> • VEGF • VEGF-B (VEGF-related factor : VRF) • VEGF-C (VEGF-related protein : VRP) • VEGF-D (c-fos-induced growth factor : FIGF) • VEGF-E • PlGF (胎盤由来増殖因子) • HIF-1α (低酸素誘導因子) • neuropilin-1 (NP-1) 	本文参照 Flt-1と結合、内皮細胞増殖 リンパ管内皮細胞増殖、遊走促進、血管内皮細胞増殖、血管透過性亢進 血管内皮細胞増殖、心・肺・骨格筋 KDR/Flk-1とのみ結合、哺乳類では(-) 血管内皮増殖促進 低酸素により誘導、VEGF転写を誘導 KDR/Flk-1とVEGF ₁₆₅ 結合を修飾、内皮細胞遊走能亢進
FGFファミリー	
<ul style="list-style-type: none"> • FGF-1 (aFGF) • FGF-2 (bFGF) • FGF-3/int-2 • FGF-4/hst-1 • FGF-5 	本文参照 シグナル配列(-) シグナル配列(-) シグナル配列(+) シグナル配列(+), VEGF産生促進 脈絡膜血管新生に関与
HGF	本文参照
プロスタグランジン	
<ul style="list-style-type: none"> • PGE1 • PGE2 	
thymidine phosphorylase	
<ul style="list-style-type: none"> • PD-ECGF (血小板由来内皮細胞増殖因子) 	血管内皮細胞遊走能亢進
サイトカイン	
Class I/II	
<ul style="list-style-type: none"> • IL-2, 15 • エリスロポエチン • G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) • GM-CSF (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子) 	細胞増殖・走化性の亢進
IL-8	
TNF- α (腫瘍壊死因子- α)	低濃度にてIL-8, VEGF, bFGF転写の亢進
Fasリガンド (FasL)	
EGF (epidermal growth factor : 上皮成長因子)	
<ul style="list-style-type: none"> • TGF-β (形質転換増殖因子) • PAF (血小板活性因子) 	
細胞間接着因子	
<ul style="list-style-type: none"> • VEカドヘリン • PECAM-1 	
プロテアーゼ	
<ul style="list-style-type: none"> • PA (plasminogen activator) • MMP (matrix metalloproteinase) -2, 9 	血管内皮から産生 線維芽細胞, マクロファージから産生
マトリノメジュリン (AM)	
アンジオケニン (血管増生因子)	RNA分解酵素と類似
アンジオポエチン1	VEGFによる血管新生促進作用
アンジオテンシンII	
B61	ECK (epithelial cell kinase) のリガンド, TNF α により発現
ヒスタミン	
HIV-1 Tat protein	KDRの活性化
レプチン	脂肪細胞から分泌インスリン感受性ホルモン
leukotriene C4 (LTC4)	
PDGF-BB (血小板由来増殖因子)	VEGF誘導
$\alpha v \beta 3$	インテグリン

管内皮細胞の管腔形成を促進する等血管新生促進に働くが、高濃度では血管新生を抑制する⁹⁾。

内皮細胞の管腔形成を調節するため、PA (plasminogen activator), MMP (matrix metalloproteinase) といったプロテアーゼ, $\alpha v \beta 3$ といったインテグリン, VEカドヘリンとPECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) 等の細胞間接着因子が働いている。プロテアーゼは血管基底膜を融解し、内皮細胞は刺激方向への遊走を開始する。遊走の際にはインテグリンが細胞外マトリックスと接着する働きをもつ。細胞間接着因子は血管内皮細胞の管腔形成に関与している。

アンジオポエチン-1は造血幹細胞が無血管領域に進入して分泌され血管内皮細胞の遊走を誘導する¹⁰⁾。

虚血によりAT-1受容体の発現が亢進し、アンジオテンシンIIを追加することによりさらに血流改善を認めた¹¹⁾。

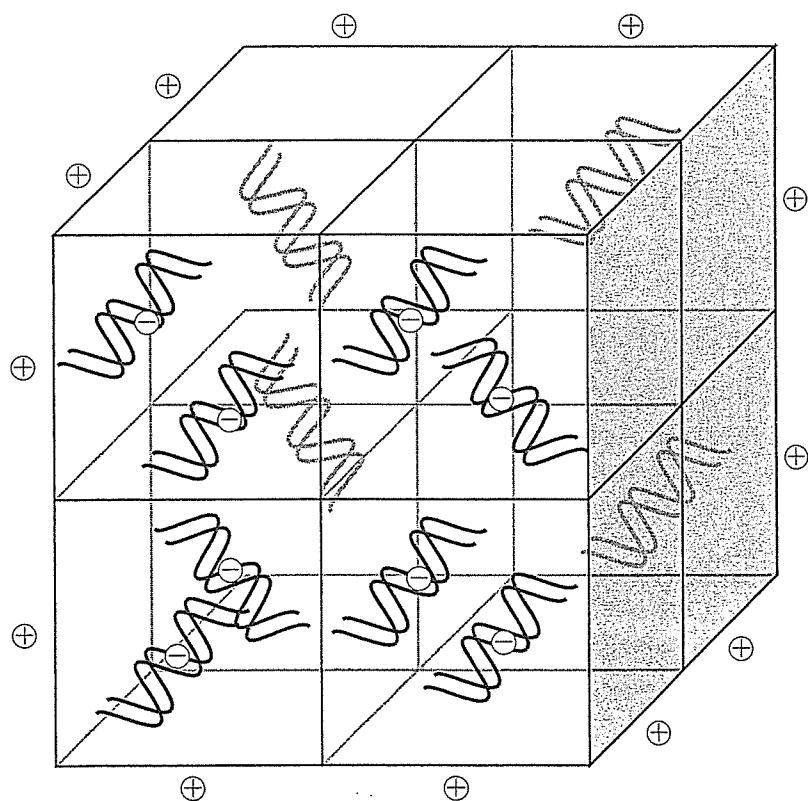
また、近年骨髓からの血管前駆細胞の動員を目的としたG-CSF, GM-CSFの投与によって虚血の改善が期待されている。

そして間接的あるいは直接的に血管新生を促進するアドレノメジュリン等数多くの因子が血管新生をきたすとの報告がある。

2. 遺伝子治療の方法・現状とその問題点

現在行われている遺伝子導入法としては、①プラスミドそのもの (naked プラスミド)、②ウイルスベクターを用いる方法 (アデノウイルス、ヘルペスウイルス等)、③リポソーム法、④ハイドロゲル法といったものがあげられる。②は、遺伝子導入効率はよいもののウイルスによる感染の問題が指摘されており、安全性の問題から①のnaked プラスミドの筋肉内導入が行われることが多い。この方法はウイルスベクターを用いないので感染の危険性は低いものの、投与したプラスミドDNAが細胞内に導入される前に生体内に存在するさまざまな核酸分解酵素によって分解され、または組織内へ拡散してしまう可能性があり、有効な治療効果を得るには大量の遺伝子が必要となる。

以上の背景をふまえて、安全かつ有効な遺伝子導



● 図1 生分解性ゼラチンの格子構造模式図

遺伝子はマイナスに荷電しており、プラスに荷電しているゼラチン内に取り込まれることにより安定となり、生体内の酵素の影響を受けにくくなる

入法として考案された生分解性ゼラチンを用いた新しい遺伝子導入法に関するわれわれの最近の知見を中心に、次世代の遺伝子治療について以下に述べていきたい。

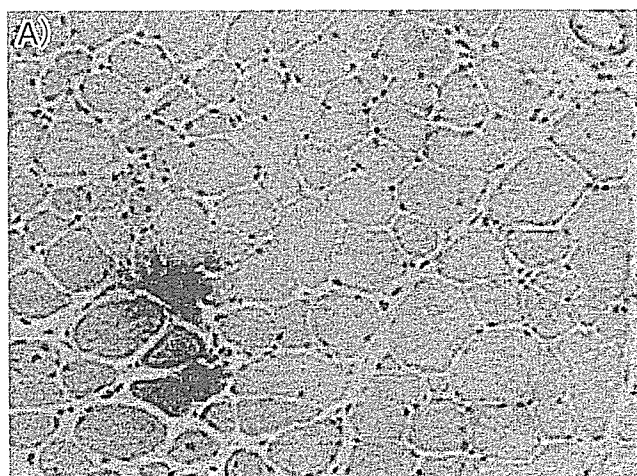
再生医療の最前線

1. ゼラチン・遺伝子複合体による遺伝子発現強化と徐放化

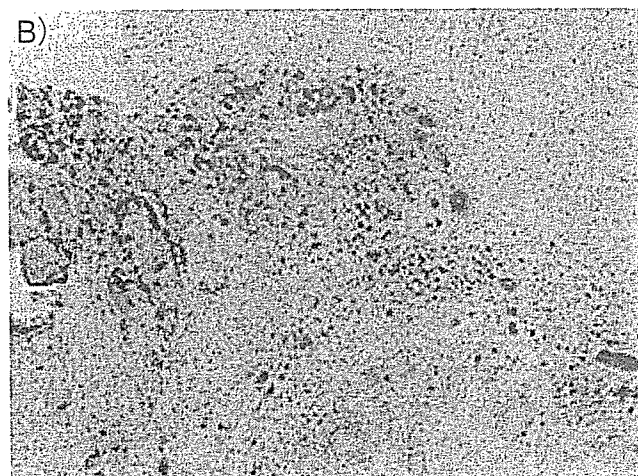
われわれはゼラチンの構造を格子状にして陰性荷電した遺伝子とイオンを結合させ、ゼラチン-遺伝子複合体を作製した(図1)。遺伝子をあらかじめゼラチンの格子構造内に封入して生体内へ投与することで核酸分解酵素による遺伝子の代謝が緩徐となり、結果として安全かつ効率的に遺伝子を導入することができる。本法は安全性の問題が指摘されているウイルスベクターを用いずに済むということに加えて、ゼラチン自体も生体内でプロテアーゼにより分解されるという点で優れた方法であると考えられる。実際に遺伝子をゼラチンと結合させて投与したところ、生体内における遺伝子の残存期間を飛躍的に延長させることに成功し、遺伝子の発現率も従来の遺伝子

の単独投与と比較して約10倍の増加が認められた。

次にわれわれは、家兎の下肢虚血モデルを用いてこのゼラチン-遺伝子複合体の治療効果を調べた。大腿動脈摘除後10日目に血管新生因子であるFGF-4やVEGF₁₆₅を虚血部位へ筋肉内投与した。動脈摘除後17日目においてLacZ遺伝子単独投与群では筋注部位にのみ発現を認める(図2A)が、ゼラチン-遺伝子複合体により投与した群では広い範囲に発現を認めている(図2B)。38日目において遺伝子非投与群と比較して通常の血管造影上有意な血管新生とこれに伴う血流量の有意な増加が観察された(図3)。遺伝子単独投与群とゼラチン-遺伝子複合体投与群の比較において既存の血管造影法では差異は認められなかった。マイクロスフェア法を用いた血流計測法(図4A)と放射光微小血管造影法(図4B)で両群の新生血管の血管拡張物質に対する反応性に有意な差異が確認された。遺伝子非投与群ではアデノシンあるいはアセチルコリンの投与による血管造影上の血管拡張(図4B)および血流量(図4A)の明らかな増大が観察された。一方遺伝子単独投与群では有意な増加が認められなかった。この事実は、ゼラチン-遺伝子複合体による治療群では血流制御能を伴う血管床の再生が実現されていることを示唆している。

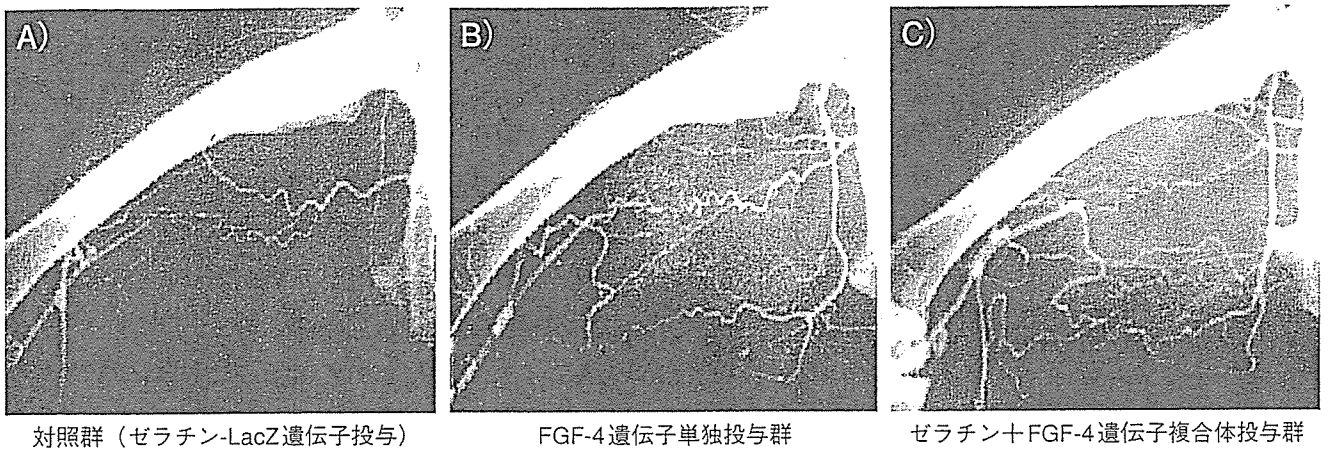


LacZ遺伝子単独投与

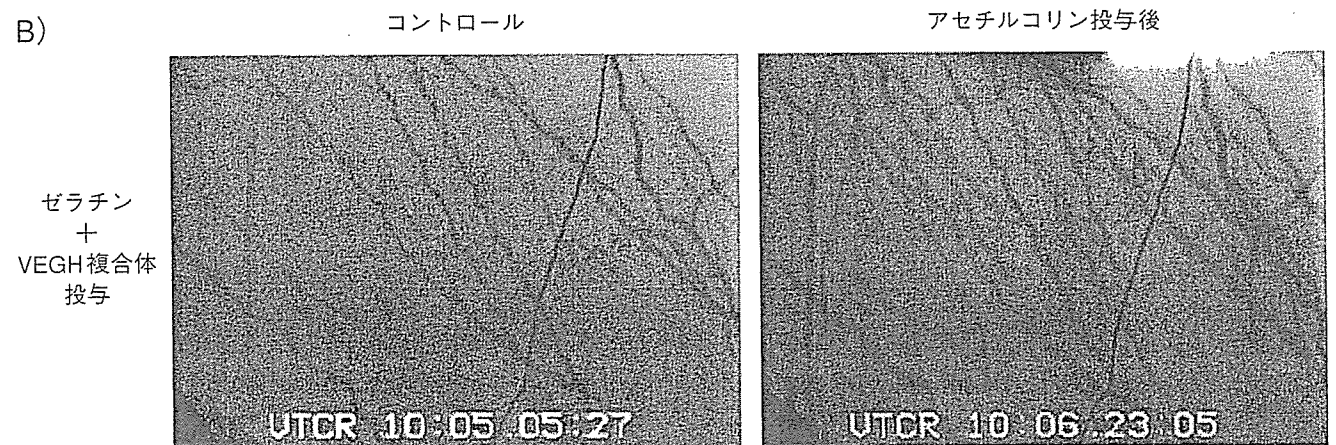
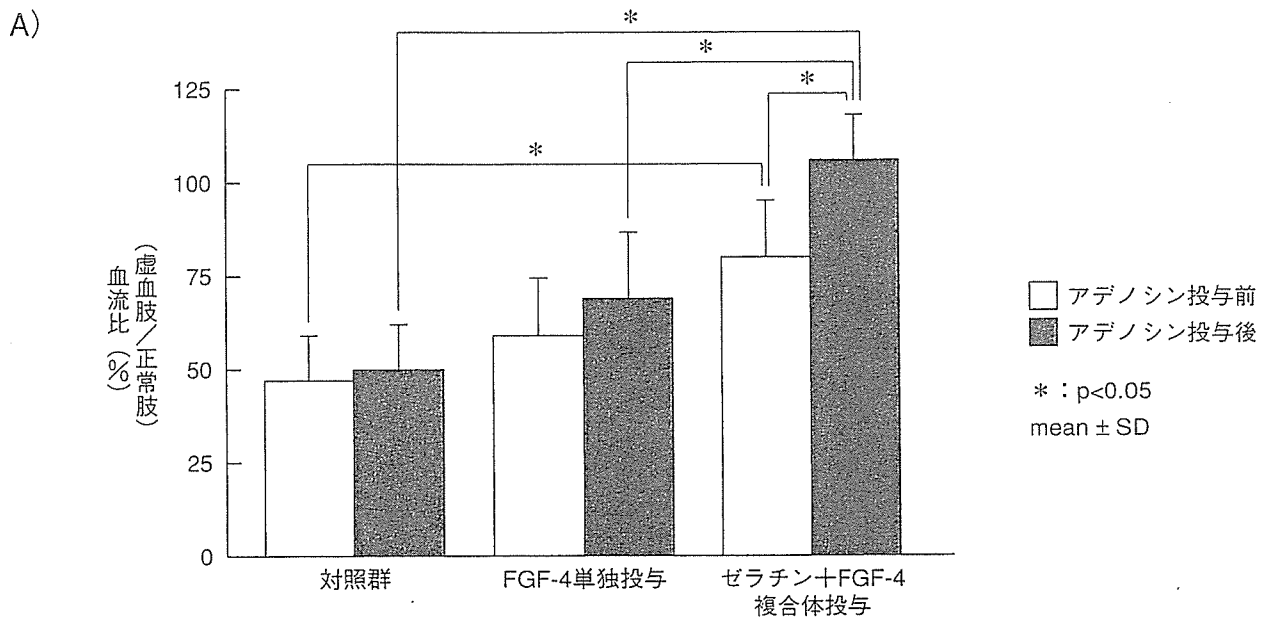


ゼラチン-LacZ遺伝子複合体投与

●図2 家兎下肢虚血モデルの筋肉内LacZ発現(虚血作製後17日目,筋注後7日目)(巻頭カラー6参照)
LacZ単独投与(A)において刺入部のみに発現を認めているが、ゼラチンと複合体での投与例(B)では周囲組織内での発現を認めている



◎ 図3 下肢虚血モデル家兎の遺伝子治療後38日目における新生血管
家兎虚血モデルの血管造影においてコントロール例 (A) に比較して、FGF-4 遺伝子投与群 (BおよびC) において有意な新生血管の増加を認めた



◎ 図4 A) 下肢虚血モデルに対する遺伝子治療の効果とアデノシンに対する反応性 (マイクロスフェア法による). B) アセチルコリンに対する新生血管の反応性 (放射光微小血管造影法)

遺伝子治療汎用化への展望

1. 現行の遺伝子治療に求められる改良点

VEGFやbFGFの組換えタンパクあるいはプラスミドDNA・ウイルスベクターを用いた組換え遺伝子の投与による血管新生療法には問題や限界がある。VEGFを例にとると、虚血部位での周皮細胞の不足した未成熟な新生血管が発生し、結果として易出血性を示し、透過性亢進による浮腫が生じやすくなってしまふ。そうした問題に対してBlauらは、調和のとれた再生血管床を得るために以下の3つの概念を述べている¹²⁾。

- ①持続期間を調節する機能をもったベクターとともに投与して、至適な量と持続時間で血管成長因子が作用するようにする。
- ②内皮細胞を安定化させるアンジオポエチン-1や周皮細胞を動員するPDGF-BB等補足的な効果をもつ調節因子を血管成長因子とともに投与する。
- ③虚血時に分泌される血管成長因子、PDGF-BB、アンジオポエチン-2を血管内皮細胞から分泌させるHIF-1 α のような多面発現性をもった因子を投与する。または、HIF-1 α の代謝を抑制するPR39といったさらに上流の調節因子を投与することによって、最終的にはバランスのとれた複数の調節因子を作用させる。

2. 細胞を基地とした遺伝子治療 (Cell-based gene therapy)

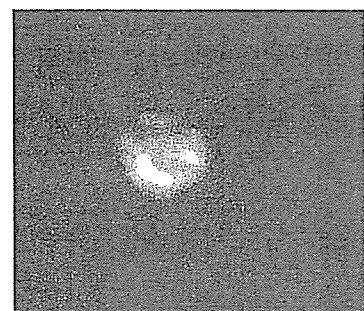
遺伝子または調節因子の投与のみでは代謝による影響があり、必要とされる局所への有効量の到達の面で限界がある。目的としている臓器にある細胞の中に遺伝子を発現させてから投与し、細胞内での持続的遺伝子産生によって長期的に局所に遺伝子を発現させる方法がCell-based gene therapyである。血管においては内皮細胞・平滑筋細胞・線維芽細胞、心筋においては骨格筋筋芽細胞等が用いられ、細胞投与後2週間以上の遺伝子発現持続が認められ良好な効果が得られている¹³⁾。

3. 細胞/遺伝子ハイブリッド型治療 (Cell/Gene Hybrid therapy)

Cell-based gene therapyでは細胞は遺伝子発現の元としての機能しか果たしていない。われわれはBlauらの主張をふまえて、今後の遺伝子治療としてCell/Gene Hybrid-therapyという概念を提案する。

最近の血管新生療法においては、骨髄単核球や血管内皮前駆細胞を経管的に移植する方法が試みられており、細胞移植による血管新生療法の可能性が示唆されている。これらの細胞移植の長所に加えて細胞内で遺伝子を発現させることによって、細胞と遺伝子の相乗作用で血管床を再生するという概念がハイブリッド遺伝子治療法である。われわれは生分解性ゼラチンを用いた細胞内遺伝子導入法を考案した。貪食能をもつ細胞（マクロファージや血管内皮前駆細胞）は遺伝子を吸着させたゼラチンを高率に貪食するため、細胞内への導入が可能となる（図5）。走化性をもつマクロファージや単球に血管成長因子の遺伝子を導入し、この細胞を経管的に投与して血管再生治療を行う。これらの細胞は傷害部位に特異的に集まるために、局所の遺伝子発現効率が高まる。しかも、線維芽細胞や平滑筋細胞と異なり血管内へ投与しても凝集することがなく、血管内投与が可能となる。

さらに、血管内皮前駆細胞の有するvasculogenesis, angiogenesisと補完的な作用を有する遺伝子を導入することで、より成熟した血管床を再構築することを目指しており、本法の難治性の循環障害（心筋梗



●図5 ゼラチン-GFPを貪食しGFPが細胞質内で発現しているマウス・マクロファージ

塞，下肢虚血，原発性肺高血圧症等)の治療への適応を検討中である。血管発生能を有する血管内皮前駆細胞に強い血管拡張作用を有するアドレノメジュリンを組合せることにより，毛細血管再生にとどまらず，上流にあたる細小動脈のリモデリングを含めた総包括的な血管再生が期待されている。

これからの 基礎医学研究に望むこと

循環器領域における遺伝子治療，再生医療が，初期からその有効性が報告され臨床応用が進んでいるなかで，遺伝子治療としての臨床応用はわが国としては米国に大きく後れをとっている。しかし，近年，骨髄単核球投与による血管新生療法が世界に先駆けての臨床応用が開始され，その有効性が報告されている。

臓器レベルの循環障害を血管再生医療で克服するには安全性と有用性の両面で一層の基礎医学における進歩が求められている。作用を患部にとどめること，そして十分に機能的な血管系の再構築が求められており，細胞機能の強化を図るハイブリッド治療が必要部位に限局したより大きな効果を生むものとして，新たな遺伝子治療の展開をみせていくものとして期待される。

文 献

- 1) Folkman, J. : n Engl. J. Med., 285 : 1182-1186, 1971
- 2) Hockel, M. et al. : Arch. Surg., 128 : 423-429, 1993
- 3) Isner, J. M. et al. : Lancet, 348 : 370-374, 1996
- 4) Cindy, L. G. et al. : Circulation, 105 : 1291-1297, 2002
- 5) Soker, S. et al. : Cell, 92 : 735-745, 1998
- 6) Nakamura, Y. et al. : J. Hypertens., 14 : 1067-1072, 1996
- 7) Igarashi, R. et al. : J. Controlled Release, 71 : 157-164, 2001
- 8) Koch, A. E. et al. : Science, 258 : 1798-1801, 1992
- 9) Fajardo, F. L. et al. : Am. J. Pathol., 140 : 539-544, 1992
- 10) Takakura, N. et al. : Cell, 102 : 199-209, 2000
- 11) Tateishi-Yuyama, E. et al. : Lancet, 360 : 427-435, 2002
- 12) Blau, H. M. et al. : Nature Med., 7 : 532-534, 2001
- 13) Suzuki, K. et al. : Circulation, 104 [Suppl I] : I 207- I 212, 2001

●筆頭著者プロフィール●

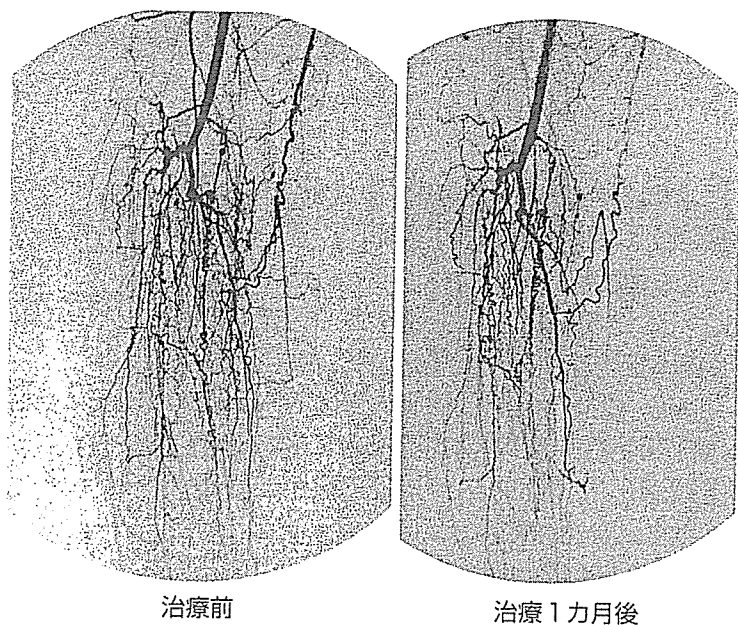
國本 聡：1989年日本大学医学部卒業，'95年日本大学大学院卒業，'96年から'98年まで米国ノースカロライナ大学循環器科に留学，Leonard S. Gettes教授のもと虚血性心疾患に伴う致死的不整脈の原因について研究。帰国後，虚血性疾患の遺伝子治療の研究に従事し，東海大学医学部生理科学教室浅原孝之教授のもとで血管内皮前駆細胞について研究指導を受けた後，現在国立循環器病センター研究所においてさらなる展開を目指して研究中。

再生医療分野では、自己幹細胞および遺伝子導入による再生血管治療が臨床応用されつつあり、すでに末梢動脈閉塞症に対する骨髄単核球移植では良好な臨床成績が報告されている。しかし、通常の血管撮影では200 μm 以下の微小血管は描出できず、再生血管治療の効果判定は依然として困難とされている。一方、シンクロトロン放射光はヨードのK吸収端のエネルギーレベル(33keV)で単色化することにより、周囲組織とのコントラスト効果を最適化し、100 μm 以下の微小血管を描出し、評価することが可能である。また、実際の臨床に導入することを目的として、既存の医療用の高出力X線源装置を用いた普及型(病院設置型)微小血管造影装置も開発中で、新たな再生血管治療の評価および診断方法として期待されている。

1. 背景

近年、動脈硬化性の疾病が増加しつつある。特に狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患、微小循環障害による多発性脳梗塞症、下肢動脈病変を代表する閉塞性動脈硬化症などは豊かな高齢化社会を実現するために、是非とも解決されるべき問題となっている。これらの既存の治療法としては薬物治療やカテーテル治療、また外科的バイパス術などが主に施行されている。しかし、糖尿病合併症例などでは、びまん性微小血管病変が高頻度にみられ、血行再建が困難な難治性症例も少なくなく、既存の治療法では解決できないことも多い。このような症例に対し、新しい治療戦略として血管再生治療による効果が期待されている。循環器領域における再生医療は、血管再生治療と心筋再生療法に大きく分けられており、前者は末梢動脈の閉塞性疾患に対し自家骨髄単核球治療や末梢血幹細胞治療などがすでに臨床導入されており、高率に臨床症状が改善していることが報告されている¹⁾。後者は今のところ一部を除き研究段階であるが、臨床応用が広く開始されれば、動脈硬化疾患以外にも先天性や後天性心疾患の治療を含めた広範な応用に期待が持てる。

臨床における血管再生治療を行った下肢血管の他覚的評価方法として、一般に血管造影法(DSA)が施行される。しかしながら、臨床症状の改善に比し、血管造影上の有意な改善が見られないことが多い(図Ⅲ-70)。ときに血管数の増加が見られることもあるが、側副血行路の発達(arteriogenesis)と考えられており、再生した血管そのものが造影されているわけではない。微小血管を評価するためには微量の造影剤を検出することができる微小血管造影法が必要になる。微小循環の検出には、高輝度のX線をヨードのK吸収端直上のエネルギーレベルで単色化する方法、X線を平行化し血管端を鮮明に描出する方



パージャー病の患者に自家骨髄細胞移植治療前と治療1カ月後に下肢血管造影(DSA)を施行した。治療前後では明らかな血管造影像の変化を認めない。

図Ⅲ-70 下肢血管造影 (DSA)

法、さらに検出系を高感度、高解像度化するなどの方法がすべて実現される必要がある。

現在のところ、放射光を利用した施設で行われる微小血管造影法がこれらのすべてを可能としている²⁾。放射光とは広域のスペクトルを持つ白色光であり、シリコン結晶を用い単色化することにより微量のヨードを検出し、微小血管を描出することが可能となる。しかし、放射光施設はシンクロトロン加速器が必要であり、高額で広い敷地を要するため、微小循環造影を臨床へ普及する上で大きな障害となる。現時点で微小血管造影の臨床応用を実現した唯一の放射光施設が高エネルギー加速器研究機構であり、筑波大学のグループと共に経静脈的冠動脈造影を多くの臨床例に行っている。世界最大の放射光施設であるSPring-8では、医学利用の候補の1つとして微小血管造影の可能性が検討されている。微小血管造影法の臨床への導入の近道としては装置を小型化し、コストを低下させる必要がある。そこで既存の高出力のX線源を用い微小血管を造影する装置も開発されている(後出)。

2. 微小血管の描出を実現するための要素

a. 高輝度

輝度はイメージングプレートに像を映し出すために非常に重要な要素であり、単位面積あたりのX線の光子量を表している。血管撮影などでX線は被写体にあたったときに吸収を受けかつ散乱し、イメージングプレートまでたどり着くのに顕著に減衰してしまう。血管造影などで境界が鮮明な像を得るには、X線の輝度を十分保つ必要がある。既存のX線源では白色光のまま撮影するしかなかった。一方、放射光から得られる輝度は非常に高輝度であり、従来のX線発生装置と比べ約 10^8 倍も明るく、人体による減衰を受けた後でも、撮像装置に有意なコントラストを結像できる十分な光子数を残すことができる。それ故にX線を単色化させるという著しい光子数の減