

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

骨髄幹細胞移植による難治性血管炎への血管再生医療に
関する多施設共同研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 池田 宇一

平成19（2007）年4月

目次

班員一覧

総括研究報告書	1
分担研究報告書	11
研究成果の刊行に関する一覧表	47

班員一覽

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	池田 宇一	信州大学大学院医学研究科・ 臓器発生制御医学講座	教 授
分担研究者	松原 弘明	京都府立医科大学大学院医学研究科・ 循環器病態制御学	教 授
	室原 豊明	名古屋大学大学院医学研究科・ 器官制御内科学	教 授
	簗田 清次	自治医科大学医学部・ アレルギー膠原病学	教 授
	天野 純	信州大学医学部・心臓血管外科学	教 授
	相澤 義房	新潟大学大学院医歯学総合研究科・ 器官制御医学講座	教 授
	石ヶ坪良明	横浜市立大学大学院医学研究科・ 病態免疫制御内科	教 授
	宮本 正章	日本医科大学・第一内科	助教授
	藤本 和輝	国立病院機構熊本医療センター・ 心臓血管センター	心臓血管センター 内科医長
	高橋 将文	信州大学大学院医学研究科・ 臓器発生制御医学講座	助教授

総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究報告書

「骨髓幹細胞移植による難治性血管炎への血管再生医療に関する
多施設共同研究」

主任研究者 池田 宇一
信州大学大学院医学系研究科 臓器発生制御医学講座 教授

研究要旨：

難治性血管炎患者に対する自己骨髓細胞移植による血管再生療法の有効性と安全性を多施設臨床試験により検証し、さらに、疾患モデル動物を用いた基礎的研究により本治療法の作用機序を解明して、より侵襲が少ない治療法を開発することを目的として本研究を行った。班員施設で計126例の重症虚血指趾患者（閉塞性動脈硬化症〔ASO〕 76例、バージャー病40例、膠原病14例）に本治療法を施行した。バージャー病での有効率は96.3%であり、膠原病での有効率は71.4%であった。特に、膠原病の中でも、強皮症では全例で皮膚潰瘍や疼痛などの症状の著明な改善を認めた。また、多施設臨床試験（TACT）の追跡調査によりバージャー病ではASOに比較して有効性が高く、治療効果も持続することが明らかとなった。さらに、基礎的研究では、薬剤やサイトカインの投与により骨髓採取による患者負担を減少させて効果的な血管新生や血管修復作用を誘導する可能性が示された。

分担研究者	高橋 将文	信州大学大学院医学系研究科
松原 弘明	京都府立医科大学 大学院医学研究科 循環器病態学 教授	臓器発生制御医学 助教授
室原 豊明	名古屋大学大学院医学研究科 器官制御内科学 教授	
簗田 清次	自治医科大学医学部 アレルギー膠原病学 教授	
天野 純	信州大学医学部 外科学 教授	
相澤 義房	新潟大学大学院医歯学総合研究科 器官制御医学 教授	
石ヶ坪良明	横浜市立大学大学院医学研究科 病態免疫制御内科学 教授	
宮本 正章	日本医科大学 第一内科 助教授	
藤本 和輝	国立病院機構熊本医療センター 心臓血管センター 内科医長	

A. 研究目的

難治性血管炎は、特定疾患の一つに指定されており、特定従来の治療法が無効で指趾切断に至る症例も少なくない。申請者らは、骨髓細胞移植療法が閉塞性動脈硬化症（ASO）やバージャー病による重症虚血肢に有効であることをすでに明らかとしてきた。しかし、より多くのバージャー病症例での検証が必要であり、膠原病性の難治性血管炎における本治療法の有効性についても未だ明らかではない。そこで、本研究では、臨床試験により難治性血管炎患者に対する自己骨髓細胞移植による血管再生療法の有効性と安全性を検証することを目的として研究を行った。また、その作用機序の解明や全身麻酔下での骨髓採取を必要としないより侵襲の少な

い新たな血管再生療法の開発も重要な課題であることから、基礎的研究による作用機序の解明とより侵襲の少ない新たな治療法の開発についても目的としている。

B. 研究方法

(1) 多施設臨床試験による骨髄幹細胞移植療法の有効性と安全性の検証

平成16年度から全国5施設で研究班を組織し本研究を開始した。その後、膠原病での血管再生療法を行った症例数が少ないことから、平成18年度から4施設を加えて多施設臨床試験を行った。班施設で計126例の重症虚血指趾患者（ASO 76例、バージャー病40例、膠原病14例〔強皮症（SSc）9例、CREST症候群2例、混合性結合組織病（MCTD）1例、結節性多発性動脈炎（PN）1例、抗リン脂質症候群（APS）1例〕、その他7例に自己骨髄細胞移植療法を施行した。また、TACT臨床試験におけるASOとバージャー病の本治療法の治療後2年および4年までの臨床成績を集計してそれらの臨床経過や長期予後、有害事象についての解析を行った。評価項目としては、疼痛レベル（VAS）や上下肢血圧比（ABI）、潰瘍直径、歩行距離などについて検討した。

(2) 基礎的研究による作用機序の解明とより侵襲の少ない新たな治療法の開発

マウス下肢虚血および血管傷害モデルを作製して、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）やエリスロポエチン（EPO）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）の作用を検討した。さらに、アンジオポエチン-1（Ang-1）やEPOの骨髄幹細胞移植との併用による効果についても検討を行った。骨髄幹細胞動員効果についてはフローサイトメトリー法で、治療効果についてはレーザードップラーによる血流評価や組織学的解析により検討した。

（倫理面への配慮）

本臨床研究は、すでに各研究者所属機関における倫理委員会の承認を得ている。本臨床研究に参加する患者には、十分な説明と同意によりインフォームドコンセントを得る。患者データ

の解析については、患者番号による匿名化を行う。ヒト組織・細胞を研究に用いる場合は、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」（平成10年度厚生科学審議会答申）ならびに各研究者所属機関における倫理委員会規定に基づき、同委員会の承諾と十分なインフォームドコンセントのもとに行う。また、動物実験については、各研究者所属機関における委員会規定に基づき、同委員会の承諾と十分な配慮のもとで実施する。

C. 研究結果

(1) 多施設臨床試験による骨髄幹細胞移植療法の有効性と安全性の検証

班員施設で計126例の重症虚血指趾患者（ASO 76例、バージャー病40例、膠原病14例〔強皮症（SSc）9例、CREST症候群2例、混合性結合組織病（MCTD）1例、結節性多発性動脈炎（PN）1例、抗リン脂質症候群（APS）1例〕、その他7例に自己骨髄細胞移植療法を施行した。このうち、バージャー病40例での有効率は96.3%であり、膠原病での有効率は71.4%であった。膠原病の中でも、強皮症では治療経過の違いはあるが、全例で皮膚潰瘍や疼痛などの症状の著明な改善を認めた。他の膠原病関連血管炎症例では非改善例が多く、今後の症例の積み重ねが重要であると考えられる。また、TACT臨床試験の2年後までの追跡調査（平成17年3月）により、ASOおよびバージャー病における本治療後の予後としては、疼痛スケール（VAS）、上下肢血圧比（ABI）、潰瘍サイズ、歩行距離などの指標は、移植後に有意に改善していたが、その改善度はASOでは経過と共に低下する傾向にあるが、バージャー病では治療効果が長期持続する傾向にあることを明らかとした。有害事象については、バージャー病で3例（4.6%：心筋梗塞、膵炎、胃癌が各1例）、ASOで11例（8.8%）を認めた。さらに、TACT臨床試験の4年後までの追跡調査（平成19年3月日本循環器学会総会〔神戸〕にて発表）で計115例の重症虚血指趾（ASO 74例、バージャー病41例）を解

析した。3年目の生存率は、ASOで80%、バージャー病で100%であり指趾の非切断率はASOで53%、バージャー病で94%であった。ASOでの死亡は敗血症3例、心不全2を含む11例であり、有害事象については、バージャー病で1例（動脈血栓）、ASOで15例（急性冠症候群1例、心不全1例、狭心症1例、脳卒中3例、重症感染症4例など）を認めた。これらのことから、バージャー病ではASOに比較して有効性が高く、治療効果も持続することが明らかとなった。

(2) 基礎的研究による作用機序の解明とより侵襲の少ない新たな治療法の開発

より侵襲の少ない治療法として、G-CSFやEPOの投与が骨髄幹細胞を末梢血中に動員して血管新生作用および傷害血管への修復作用を示すことを報告した。また、臨床的にG-CSFによる血栓などの副作用が報告されていることから、低用量G-CSFの虚血部位局所への直接作用を検討し、低用量G-CSFの局所投与によって虚血部位での血管新生が誘導され、血流が改善することが示された。一方、単球系細胞の動員を誘導するM-CSFは、傷害血管の再内皮化には影響せず、新生内膜形成を促進することを明らかとし、小骨髄細胞を動員するサイトカインを用いた血管再生療法の臨床応用には注意が必要であることを報告した。さらに、Ang-1やEPOの骨髄幹細胞移植との併用が著明な血管新生効果を示すことを明らかとした。

D. 考察

本研究により、ASOに比較してバージャー病のほうが骨髄幹細胞移植療法の治療効果が高く、治療効果も持続することが明らかとなった。一方、膠原病症例では、疾患そのものが比較的稀であり本治療法の適応となる症例が少ないことや膠原病の原疾患そのものも違いがあることから、その比較は困難である。しかし、強皮症では全例で本治療法が有効であることから、強皮症による難治性皮膚潰瘍に対する有効な治療法となる可能性が示された。今後の検討すべき課題としては、症例数の増加と共に膠原病の原

疾患そのものによる違いやステロイド服用下での有効性、長期的な有効性と有害事象の解析などがある。特に、血管炎が活動期にある場合には細胞移植によりさらに炎症を増悪させる可能性があることから、どのような血管炎に、あるいはどのような炎症の状態の場合に本治療法を施行して良いのか、ステロイドはどこまで減量してから本治療法を行った方がよいのかといった問題は早急に解明する必要がある。また、基礎的研究ではG-CSFやEPO、Ang-1などによる血管新生効果が示され、今後、これらの因子を用いた治療による患者負担の減少とより効果的な血管新生治療法の確立が期待される。一方、単球系の骨髄細胞を動員させるM-CSFは血管傷害後の血管修復には影響せず、逆に新生内膜形成を促進したことから、サイトカインを用いた骨髄細胞動員療法の臨床応用にはさらに詳細な機序の解明や条件検討が必要であると考えられる。

E. 結論

バージャー病や膠原病による難治性血管炎による指趾の血行障害を有する患者に対して、自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法の多施設臨床試験を行い、その有効性と安全性を検証した。また、本治療法の作用機序の解明とより侵襲が少なく患者さんに優しい治療法の開発を目的として、サイトカイン投与による骨髄幹細胞動員療法の有効性についても検討した。本研究により、難治性血管炎に対する日本発の新たな治療法が確立されるものと期待される。

F. 研究発表（論文発表）

主任研究者：池田宇一

1. Nonaka-Sarukawa M, Yamamoto K, Aoki H, Nishimura Y, Tomizawa H, Ichida M, Eizawa T, Muroi K, Ikeda U, Shimada K. Circulating endothelial progenitor cells in congestive heart failure. Int J Cardiol (in press)
2. Shiba Y, Takahashi M, Yoshioka T, Yajima N, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Hatake K, Motoyoshi K, Ikeda U. M-CSF accelerates

- neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice: The critical role of the SDF-1 – CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 283-89, 2007
3. Koshikawa M, Shimodaira S, Yoshioka T, Kasai H, Watanabe N, Wada Y, Seto T, Fukui D, Amano J, Ikeda U. Therapeutic angiogenesis by bone marrow implantation for critical hand ischemia in patients with peripheral arterial disease: a pilot study. *Curr Med Res Opin* 22: 793-8, 2006
 4. Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PK, Ikeda U. Cardiac overexpression of MCP-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* 99: 891-899, 2006
 5. Misawa R, Ise H, Takahashi M, Morimoto H, Kobayashi E, Miyagawa S, Ikeda U. Development of liver regenerative therapy using glycoside-modified bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 432-440, 2006
 6. Yoshioka T, Takahashi M, Shiba Y, Suzuki C, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Ikeda U. G-CSF accelerates reendothelialization and reduces neointimal formation after vascular injury in mice. *Cardiovasc Res* 70: 61-69, 2006
 7. Jia L, Takahashi M, Yoshioka T, Morimoto H, Ise H, Ikeda U. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells for cardiovascular diseases. *Current Vascular Pharmacology* 4: 59-65, 2006
 8. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, Hanazono, Y. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells* 23: 355-364, 2005
 9. Eizawa T, Ikeda U, Murakami Y, Matsui K, Yoshioka T, Suzuki C, Takahashi M, Muroi K, Kamisawa O, Fuse K, Shimada K. Increase in circulating endothelial progenitor cells after aortic aneurysm repair. *Heart Vessels* 19: 107-110, 2004
 10. Eizawa T, Ikeda U, Murakami Y, Matsui K, Yoshioka T, Takahashi M, Muroi K, Shimada K. Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *Heart* 90: 685-686, 2004
 11. Muroi K, Kawano-Yamamoto C, Nagashima T, Mori M, Ozawa K, Matsui K, Murakami Y, Ikeda U. Analysis of hematopoietic progenitors in bone marrow from patients with peripheral artery disease. *Leuk Res* 28: 999-1000, 2004
 12. Ise H, Nikaido T, Negishi N, Sugihara N, Suzuki F, Akaike T, Ikeda U. Effective hepatocyte transplantation using rat hepatocytes with low asialoglycoprotein receptor expression. *Am J Pathol* 165: 501-510, 2004
 13. Yoshioka T, Takahashi M, Suzuki C, Ise H, Ikeda U. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells for ischemic cardiovascular diseases. *Recent Res Devel Physiol* 2: 289-294, 2004
- 分担研究者：松原弘明
14. Takamiya M, Okigaki M, Jin D, Takai S, Nozawa Y, Adachi Y, Urao N, Tateishi K, Nomura T, Zen K, Ashihara E, Miyazaki M, Tatsumi T, Takahashi T, Matsubara H. Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized circulating c-Kit+/Flk-1+ progenitor cells regenerate endothelium and inhibit neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:751-757, 2006
 15. Imada T, Tatsumi T, Mori Y, Nishiue T, Yoshida M, Masaki H, Okigaki M, Kojima H, Nozawa Y, Nishiwaki Y, Nitta N, Iwasaka T, Matsubara H. Targeted delivery of bone marrow mononuclear cells by ultrasound destruction of microbubbles induces both angiogenesis and arteriogenesis response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2128-2134, 2005
 16. Irie H, Okigaki M, Zen K, Takamiya M, Takahashi T, Azuma A, Tatsumi T, Matsubara H. Carbon dioxide-rich water bathing enhances collateral blood flow in ischemic hindlimb via

mobilization of endothelial progenitor cells and activation of NO-cGMP system. *Circulation* 111: 1523-1529, 2005

17. Amano K, Okigaki M, Adachi Y, Fujiyama S, Mori Y, Kosaki A, Iwasaka T, Matsubara H. Mechanism for IL-1 β -mediated neovascularization unmasked by IL-1 β knock-out mice. *J Mol Cell Cardiol* 36: 459-640, 2004

18. Matsubara H. Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion and G-CSF cytokine therapy. *Lancet* 363: 746-747, 2004

19. Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Sueda T, Goto C, Matsubara H, Murohara T, Yoshizumi M. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 109: 1215-1218, 2004

分担研究者：室原豊明

20. Shintani S, Kusano K, Ii M, Iwakura A, Heyd L, Curry C, Wecker A, Gavin M, Ma H, Kearney M, Silver M, Thorne T, Murohara T, Losordo DW. Synergistic effect of combined intramyocardial CD34 cells and VEGF-2 gene therapy post-myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3(Suppl.): S123-S128, 2006

21. Numaguchi Y, Sone T, Okumura K, Morita Y, Kubota R, Yokouchi K, Imai H, Harada M, Kondo T, Murohara T. The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Circulation* 114: 114-119, 2006

22. Yokoyama S, Fukuda N, Li Y, Hagikura K, Takayama T, Kunimoto S, Honye J, Saito S, Wada M, Satomi A, Kato M, Mugishima H, Kusumi Y, Mitsumata M, Murohara T. A strategy of retrograde injection of bone marrow mononuclear cells into the myocardium for the treatment of ischemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 40: 24-34, 2006

23. Matsushita K, Yatsuya H, Tamakoshi K, Wada K, Otsuka R, Zhang H, Sugiura K, Kondo T, Murohara T, Toyoshima H. Inverse association between adiponectin and C-reactive protein in substantially healthy Japanese men. *Atherosclerosis* 188: 184-189, 2006

24. Matsushita K, Yatsuya H, Tamakoshi K, Wada K, Otsuka R, Takefuji S, Sugiura K, Kondo T, Murohara T, Toyoshima H. Comparison of circulating adiponectin and proinflammatory markers regarding their association with metabolic syndrome in Japanese men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 871-876, 2006

25. Taniguchi E, Kin M, Torimura T, Nakamura T, Kumemura M, Hanada S, Hisamoto T, Yoshida T, Kawaguchi T, Baba S, Maeyama M, Koga H, Harada M, Kumashiro R, Ueno T, Ikeda H, Imaizumi T, Murohara T, Sata M. Endothelial progenitor cell transplantation improves the outcome following liver injury in mice. *Gastroenterology* 130: 521-531, 2006

26. Kobayashi K, Kondo T, Inoue N, Aoki M, Mizuno M, Komori K, Yoshida J, Murohara T. Combination therapy using angiopoietin-1 plasmid gene and autologous bone marrow cell implantation promotes functional angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1465-1472, 2006

27. Otsuka H, Akashi H, Murohara T, Okazaki T, Shintani S, Tayama K, Sasaki K, Imaizumi T, Aoyagi S. The prostacyclin analog, beraprost sodium, augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by autologous bone marrow cells. *Ann Vasc Surg* (in press)

28. Kim W, Jeong MH, Cho SH, Yun JH, Chae HJ, Ahn YK, Lee MC, Cheng X, Kondo T, Murohara T, Kang JC. Effect of green tea consumption on endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in chronic smokers. *Circ J* 70: 1052-1057, 2006

29. Izawa H, Kondo T, Usui A, Yamamoto K, Shintani S, Inden Y, Isobe S, Unno K, Kajiguchi

- M, Noda A, Yokota M, Takamatsu J, Ueda Y, Komori K, Murohara T. Clinical protocol: Angiogenesis by intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with severe coronary artery disease. TACT-NAGOYA-HEART. *Circ J* 70: 1180-1183, 2006
30. Inoue N, Kondo T, Kobayashi K, Aoki M, Numaguchi Y, Shibuya M, Murohara T. Therapeutic angiogenesis using novel vascular endothelial growth factor-E/human placental growth factor chimera genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 99-105, 2007
31. Masuda J, Mitsuyama K, Yamasaki H, Takedatsu H, Okamura T, Andoh A, Murohara T, Asahara T, Sata M. Depletion of circulating endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with ulcerative colitis. *Int J Mol Med* 19: 221-228, 2007
32. Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi K, Yamamoto K, Shintani S, Numaguchi Y, Naoe T, Takamatsu J, Komori K, Murohara T. Efficacy of autologous bone marrow cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ J* 71: 196-201, 2007
33. Izumi Y, Kim-Mitsuyama S, Yoshiyama M, Omura T, Shiota M, Matsuzawa A, Yukimura T, Murohara T, Takeya M, Ichijo H, Yoshikawa J, Iwao H. Important role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1877-1883, 2005
34. Rookmaaker MB, Verhaar MC, Loomans CJM, Peters E, Murohara T, Staal FJT, van Zonneveld AJ, Koolwijk P, Rabelink TJ, van Hinsbergh VWM. CD34+ cells home, proliferate and participate in capillary formation and in combination with CD34- cells enhance tube formation in a 3D matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1843-1850, 2005
35. Nagashima, T, Iwamoto, M, Minota S. Semiquantitative assessment of the intestinal motility in chronic intestinal pseudo-obstruction in systemic sclerosis and mixed connective tissue disease by Sitzmarks capsule. *Mod Rheumatol* 16: 330-331, 2006
36. Watanabe, T, Masuyama, J, Sohma, Y, Inazawa, H, Horie, K, Kojima, K, Uemura, Y, Aoki, Y, Kaga S, Minota S, Tanaka, T, Yamaguchi, Y, Kobayashi, T, Serizawa I. CD52 is a novel costimulatory molecule for Induction of CD4 regulatory T cells. *Clin Immunol* 120: 247-259, 2006
37. Nara H, Okamoto H, Minota S, Yoshio T. Mouse monoclonal anti-human thrombomodulin antibodies bind to and activate endothelial cells through NF- κ B activation In vitro. *Arthritis Rheum* 54: 1629-1637, 2006
38. Yokota S, Minota S, Fujii N. Anti-HSP auto-antibodies enhance HSP-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytic cells via Toll-like receptors. *Int Immunol* 18: 573-580, 2006
39. Nagashima, T, Okazaki H, Yudoh K, Matsuno H, Minota S. Apoptosis of rheumatoid synovial cells by statins through the blocking of protein geranylgeranylation: a potential therapeutic approach for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54: 579-586, 2006
40. Okamoto H, Iikuni N, Kamitsuji S, Yoshio T, Minota S, Kamatani N. IP-10/MCP-1 ratio in CSF is an useful diagnostic maker of neuropsychiatric lupus patients. *Rheumatol* 45: 232-234, 2006
41. Iikuni N, Okamoto H, Yoshio T, Sato E, Kamitsuji S, Iwamoto T, Momohara S, Taniguchi A, Yamanaka H, Minota S, Kamatani N. Raised monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)/CCL2 in cerebrospinal fluid of patients with neuropsychiatric lupus. *Ann Rheum Dis* 65: 253-256, 2006
42. Yoshio T, Onda K, Nara H, Minota S. Association of IgG Anti-NR2 glutamate receptor antibodies in cerebrospinal fluid with

分担研究者：簗田清次

- neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54: 675-678, 2006
43. Iwamoto M, Toma S, Nara H, Sato H, Minota S. A case of food-dependent exercise-induced anaphylaxis by grapefruit. *Allergol Int* 54: 345-349, 2005
44. Iwamoto M, Homma Y, Asano Y, Minota S. Administration of leflunomide to a patient with rheumatoid arthritis on haemodialysis. *Scand J Rheumatol* 34: 410-411, 2005
45. Kamata Y, Nara H, Sato H, Masuyama J, Minota S, Yoshio, T. Effect of steroid pulse therapy on mixed connective tissue disease with pulmonary arterial hypertension. *Ann Rheum Dis* 64: 1236-1237, 2005
46. Kamata Y, Kamimura, T, Iwamoto M, Minota S. Comparable effects of sildenafil citrate and alprostadil on severe Raynaud's phenomenon in a patient with systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol* 30: 451, 2005
47. Yoshio T, Hirata D, Onda K, Nara H, Minota S. Antiribosomal protein antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 32: 34-39, 2005
48. Okubo H, Iwamoto M, Yoshio T, Okazaki H, Kato T, Bandoh M, Minota S. Rapidly aggravated *Mycobacterium avium* infection in a patient with rheumatoid arthritis treated with infliximab. *Mod Rheumatol* 15: 62-64, 2005
49. Kamata Y, Nara H, Kamimura T, Haneda K, Iwamoto M, Masuyama J, Okazaki H, Minota S. Rheumatoid arthritis complicated with acute interstitial pneumonia induced by leflunomide as an adverse reaction. *Intern Med* 43: 1201-1204, 2004
- 分担研究者：天野 純
50. Koshikawa M, Shimodaira S, Yoshioka T, Kasai H, Watanabe N, Wada Y, Seto T, Fukui D, Amano J, Ikeda U. Therapeutic angiogenesis by bone marrow implantation for critical hand ischemia in patients with peripheral arterial disease: a pilot study. *Curr Med Res Opin* 22: 793-798, 2006
51. 福井大祐、天野 純、下平滋隆、池田宇一：四肢虚血性疾患に対する自己骨髄細胞移植とその臨床効果。 *治療学* 39: 765-768, 2005
- 分担研究者：相澤義房
52. Ozawa T, Kato K, Sanada H, Makiyama Y, Saigawa T, Souda S, Hashimoto S, Furukawa T, Toba K, Kodama M, Fujiwara H, Namura O, Hayashi J, Yoshimura N, Aizawa Y. Marked decrease of plasma VEGF after implantation of autologous bone marrow mononuclear cells in a patient with critical limb ischemia -a case report-. *Angiology* 57: 235-239, 2006
53. Ozawa T, Toba K, Kato K, Minagawa S, Saigawa T, Hanawa H, Makiyama Y, Moriyama M, Honma K, Isoda M, Hasegawa G, Naito M, Takahashi M, Aizawa Y. Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. *J Mol Cell Cardiol* 40: 629-638, 2006
54. Mitsuma W, Ito M, Kodama M, Fuse K, Okamura K, Minagawa S, Kato K, Hanawa H, Toba K, Nakazawa M, Aizawa Y. Cardioprotective effects of recombinant human erythropoietin in rats with experimental autoimmune myocarditis. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 987-994, 2006
55. Saigawa T, Kato K, Ozawa T, Toba K, Makiyama Y, Minagawa S, Hashimoto S, Furukawa T, Nakamura Y, Hanawa H, Kodama M, Yoshimura N, Fujiwara H, Namura O, Sogawa M, Hayashi J, Aizawa Y. Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J* 68: 1189-1193, 2004
- 分担研究者：石ヶ坪良明
56. Yoshimi R, Takeno M, Yamanaka S, Shiina M, Kirino Y, Takeda Y, Sekiguchi A, Kobayashi H, Motoji K, Ohno S, Ueda A, Soga T, Ishigatsubo Y.

- Systemic sclerosis and pseudomesotheliomatous adenocarcinoma of the lung. *Mod Rheumatol* 16:165-168, 2006
57. Sato T, Takeno M, Honma K, Yamauchi H, Saito Y, Sasaki T, Morikubo H, Nagashima Y, Takagi S, Yamanaka K, Kaneko T, Ishigatsubo Y. Heme oxygenase-1, a potential biomarker of chronic silicosis, attenuates silica-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 906-914, 2006
58. Kobayashi H, Takeno M, Saito T, Takeda Y, Kirino Y, Noyori K, Hayashi T, Ueda A, Ishigatsubo Y. Regulatory role of heme oxygenase 1 in inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54: 1132-1142, 2006
59. Yoshimi R, Yamaji S, Suzuki A, Mishima W, Okamura M, Obana T, Matsuda C, Miwa Y, Ohno S, Ishigatsubo Y. The gamma-parvin-integrin-linked kinase complex is critically involved in leukocyte-substrate interaction. *J Immunol* 176: 3611-3624, 2006
60. Sakai R, Fujisawa S, Fujimaki K, Kanamori H, Ishigatsubo Y. Long-term remission in a patient with hepatosplenic gammadelta T cell lymphoma after cord blood stem cell transplantation following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 37: 537-538, 2006
61. Koharazawa H, Kanamori H, Takabayashi M, Yamaji S, Taguchi J, Fujimaki K, Ishigatsubo Y. Resolution of atopic dermatitis following allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 35: 1223-1224, 2005
- 分担研究者：宮本正章
62. Tara S, Miyamoto M, Asoh S, Transduction of the anti-apoptotic PTD-FNK protein improves the efficiency of transplantaion of bone marrow mononuclear cells. *J Mol Cell Cardiol* 42: 489-497, 2007
63. 宮本正章, 高木 元, 水野博司 重症難治性潰瘍に対する医療用ウジ治療と血管再生療法 *Pharma Medica* 23: 41-47, 2005.
64. 加藤浩司, 宮本正章, 安武正弘 重症難治性虚血肢・心に対する自己骨髄幹細胞移植血管再生療法の現状. *今日の移植* 18: 259-266, 2005
65. 宮本正章 全身性強皮症の経過中に肺高血圧をきたし敗血症にて死亡した症例 膠原病に対する血管再生療法 内科 (印刷中)
- 分担研究者：藤本和輝
66. Kojima S, Funahashi T, Otsuka F, Maruyoshi H, Yamashita T, Kajiwara I, Shimomura H, Miyao Y, Fujimoto K, Sugiyama S, Sakamoto T, Yoshimura M, Ogawa H. Future adverse cardiac events can be predicted by persistently low plasma adiponectin concentrations in men and marked reductions of adiponectin in women after acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* (in press)
67. 藤本和輝、小川久雄; 心筋梗塞治療のメガトレンド: *臨床心臓病学* 207-14, 2006
68. 藤本和輝、小川久雄; 初期治療は血栓溶解療法か形成術か: *臨床心臓病学* 234-6, 2006
69. Fujimoto K, Miyagi H, Miyao Y, Kajiwara I, Oe Y, Kawano F, Hidaka M. in *Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches*(ed): Therapeutic angiogenesis for a patient with arteriosclerosis obliterans by autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells. Tokyo, Springer-Verlag Tokyo Inc. 221-225, 2004
70. 藤本和輝: 循環器病研究委託費事業13公-1 課題名：再生医療技術を用いた循環器疾患に対する組織移植及び血管新生に関する研究 分担課題名：血管の新生及び増殖に関する因子の解明及び局所導入による血管新生療法の開発に関する研究 平成15年度研究報告 2004
- 分担研究者：高橋将文
71. Shiba Y, Takahashi M, Yoshioka T, Yajima N, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Hatake K, Motoyoshi K, Ikeda U. M-CSF accelerates

- neointimal formation in the early phase after vascular injury in mice: The critical role of the SDF-1 – CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 283-289, 2007
72. Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PK, Ikeda U. Cardiac overexpression of MCP-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* 99: 891-899, 2006
73. Misawa R, Ise H, Takahashi M, Morimoto H, Kobayashi E, Miyagawa S, Ikeda U. Development of liver regenerative therapy using glycoside-modified bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 432-440, 2006
74. Sato H, Takahashi M, Ise H, Yamada A, Hirose S, Tagawa Y, Morimoto H, Izawa A, Ikeda U. Collagen synthesis is required for ascorbic acid-enhanced differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 342: 107-112, 2006
75. Yoshioka T, Takahashi M, Shiba Y, Suzuki C, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Ikeda U. G-CSF Accelerates Reendothelialization and Reduces Neointimal Formation After Vascular Injury in Mice. *Cardiovasc Res* 70: 61-69, 2006
76. Jia L, Takahashi M, Yoshioka T, Morimoto H, Ise H, Ikeda U. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells for cardiovascular diseases. *Current Vascular Pharmacology* 4: 59-65, 2006
77. Yamaguchi Y, Kubo T, Murakami T, Takahashi M, Hakamata Y, Kobayashi E, Yoshida S, Hosokawa K, Yoshikawa K, Itami S. Bone marrow cells differentiate into wound myofibroblasts and accelerate the healing of wounds with exposed bones when combined with an occlusive dressing. *Brit J Dermatol* 152: 616-622, 2005
78. Sato Y, Matsui K, Ajiki T, Igarashi Y, Takahashi M, Murakami T, Hakamata Y, Tabata Y, Kobayashi E. Can a bone marrow cell contribute to organ regeneration? In vivo analysis using transgenic rats with reporter genes. *Transplant Proc* 37: 273-275, 2005
79. Yoshioka T, Takahashi M, Suzuki C, Ise H, Ikeda U. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells for ischemic cardiovascular diseases. *Recent Res Devel Physiol* 2: 289-294, 2004
- G. 知的所有権の取得状況
- 特許公開 2002-171965 骨髄単核球細胞の分離、濃縮方法及び血管再生剤
- 特許公開 2003-250820 血管の再生方法、そのための細胞の分離回収方法及び装置
- 特許公開 2006-028085 血中コレステロール低下作用物質
- 特許公開 2006-115771 骨格筋由来の心筋幹細胞
- 特許出願 2005-183614 N-アセチルグルコサミン糖鎖認識タンパク質
- 特許照会番号 OTA02-111 心臓由来の心筋前駆細胞

分担研究報告

「骨髄幹細胞移植による難治性血管炎への血管再生医療に関する 多施設共同研究」

自家骨髄単核球移植による難治性血管炎（バージャー病、多発性動脈周囲炎）に 対する血管再生医療

分担研究者 松原弘明

研究協力者 辰巳哲也、的場聖明

京都府立医科大学大学院医学研究科 循環器内科学

骨髄単核球を利用した血管再生治療は閉塞性動脈硬化症やバージャー病への高度先進医療が認められた。我が国で世界で初めて2000年より開始された。安全性や有効性は国際的に認知され、世界中に拡大しているが、その膠原病血管炎への有効性は明らかではない。バージャー病も血管炎をその病因とする疾患であり、その長期成績を評価することは、難治性血管炎への有効性を評価するのに重要な参考資料である。また、症例数は多くはないが、結節性動脈周囲炎への重症虚血への骨髄単核球を利用した血管新生治療の経過を明らかにした。

方法)

重症虚血下肢への血管新生療法の適応基準を示す。

- 1) 末梢性血管疾患（バージャー病）：
Fontaine 分類 III度およびIV度（ABI<0.6を目安）、安静時痛または虚血性潰瘍・壊死を有する患者で、内科的・外科的に血行再建術の適応が無く、将来切断が予想される患者。
- 2) 性別：男性および女性（妊娠中および妊娠の可能性のある女性を除く）
- 3) 年齢：原則として20歳以上80歳以下
- 4) 適応除外事項：

過去3ヶ月以内にアルコールもしくは薬物依存の既往のある患者、悪性新生物を有する患者及び3年以内にその既往のある患者、別途規定の諸検査により悪性腫瘍の可能性があると判断された患者、未治療の糖尿病性網膜

症を有する患者、インフォームドコンセントを得られない患者、その他、主治医が不適当と判断した患者。

全身麻酔下で自家骨髄液約500CCを採取したのち速やかに骨髄単核球を分離し、約10億個の細胞を虚血肢の筋肉内40箇所に分割注入した。評価項目は、ABI、潰瘍長径、痛みスケール（VAS）、歩行可能距離、である。

結果)

骨髄単核球移植を難治性血管炎であるバージャー病の虚血下肢へと実施した多施設TACT-1臨床試験が2000年1月より本邦でスタートした。実施後に2年臨床観察を経た、本邦14施設からの臨床成績を集積し多変量解析した。Fontaine 分類 3.3 クラス Buerger 病 65人（男性61人、年齢48+/-14）のABI、疼痛レベル：VAS、潰瘍直径、歩行距離を解析した。術後1年、2年後まで観察しえた患者数は20人、14人であった。有害事象の件数は、3例（4.6%：AMI 1例、肺炎1例、胃ガン1例）であった。

月後ABI上昇>0.1を基準とした多変量解析では年齢（95%CI 0.9-0.992）、バイパス経験症例（95%CI 0.049-0.532）のみが治療成績を悪化させる要因であった。Buerger 病ではABI、VAS、潰瘍直径、歩行距離は移植後有意に改善したが、時間経過とともに低下する傾向にあったが、ABIの2年後値を除いていずれの指標も2年後においても前値と比較し有意な上昇を示した。このように、自家骨髄単核球を用いた難治性血管病への血管新生療法の長期にわたる安

全性・有効性が確認された。

強皮症やその関連膠原病の中には微小血管障害や血管炎にもとづく血流障害による難治性阻血指趾や難治性皮膚潰瘍を呈する患者が存在する。指趾または四肢切断に至る重傷例も報告されているが、これらの膠原病を背景とした難治性末梢性血管疾患に対する血流改善治療は未だ確立されていない。

膠原病による末梢性血管疾患に対して自己骨髄細胞の指趾または四肢筋肉内投与が、有望な血管新生療法として臨床レベルで応用可能かどうかを検証するために臨床研究（骨髄細胞移植を用いた膠原病による末梢性血管疾患（難治性血管炎）への血管新生治療を倫理委員会の承認のもと2006年6月より開始した。これまでに、多発性動脈周囲炎による下肢潰瘍症例に再生医療を2006年11月に実施した。下記にその症例報告を述べる。

IF氏 68歳 女性 病状経過

- #1 重症虚血下肢： 左足趾の黒色化，左外果潰瘍の拡大
- #2（皮膚型）結節性動脈周囲炎，右下腿切断後
- #3 右鎖骨下動脈狭窄
- #4 無症候性心筋虚血の可能性
- #5 糖尿病 #6 高脂血症 #7 高血圧症

皮膚型結節性多発動脈周囲炎に対して副腎皮質ステロイドで治療中。2003年には右下腿壊疽にて右下腿は切断されている。2006年10月より安静時疼痛（VAS 5-7/10）と左外果（径1.5×1.5cm）および左第1趾尖の皮膚潰瘍が出現し、血管造影では左前脛骨・後脛骨・腓骨動脈の途絶が認められた。10/20より当科に入院し、内服に加えてPG製剤の点滴を行ったが改善せず、ABIは1.05だがfoot-dorsalレベルでのskin perfusion pressure（SPP）は11mmHgと低値であり、難治性血管炎（結節性動脈周囲炎）による重症虚血下肢と診断した。

11/28に当科で骨髄単核球細胞移植による血管新生治療を施行した。移植細胞数は 3.08×10^9 (CD34⁺細胞 2.77×10^7)個で左下肢へ約120箇所に移植した。術後も左足趾の黒色化や左外果潰瘍の拡大が認められ、栄養状態の悪化やうつ状態への移行が認められた。血管再生医療後、局所の熱感はなかったが、左足趾の黒色化、左

外果潰瘍の拡大、疼痛が持続し(VAS 7/10)、引き続き皮膚科での消毒・局所治療を継続した。歩行リハビリテーションにより最終的には60mまで歩行可能であった。レペタン坐薬を1日4回使用することで疼痛管理を行った。再生医療後、感染を示唆する徴候は認められなかった。

血管再生医療約2ヶ月後、重症虚血下肢の改善は認められず、左足趾の黒色化（趾球レベルまで）、左足底半分の黒色化、左外果から足背への潰瘍の拡大、左踵部への潰瘍進行（径2×8cm、径2×10cm）と疼痛の出現が認められた。左内果面は比較的保たれていた。潰瘍壊疽部と正常部の境界がはっきりしていた印象であったが、次第に左足の正常部もチアノーゼが進行しているような印象であった。血管再生医療約2ヶ月後、2/15皮膚科にて左足趾切断と足背と足底潰瘍のデブリードマンを行い、疼痛(VAS 7/10)に対しては鎮痛薬を継続している。潰瘍悪化のためABI、SPPの測定は行えていない。

考察と結語

難治性血管炎に対する血管再生医療後の1症例である。膠原病に対する骨髄単核球細胞移植の効果は、これまでに報告された閉塞性動脈硬化症やBuerger病ほど明らかではない。血管障害や閉塞の機序も膠原病では違いがある可能性が考えられるし、血管内皮前駆細胞の数や機能についても不明なことが多い。また、同じ膠原病でも強皮症と結節性動脈周囲炎では血管新生治療の奏効率に違いがあることが推察され、血管炎の病態ごとに治療戦略を変える必要があるのかもしれない。

文献

1. Tateishi-Yuyama E, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet 360: 427-435, 2002

「骨髄幹細胞移植による難治性血管炎への血管再生医療に関する 多施設共同研究」

自己骨髄単核球移植における末梢性血管疾患の治療

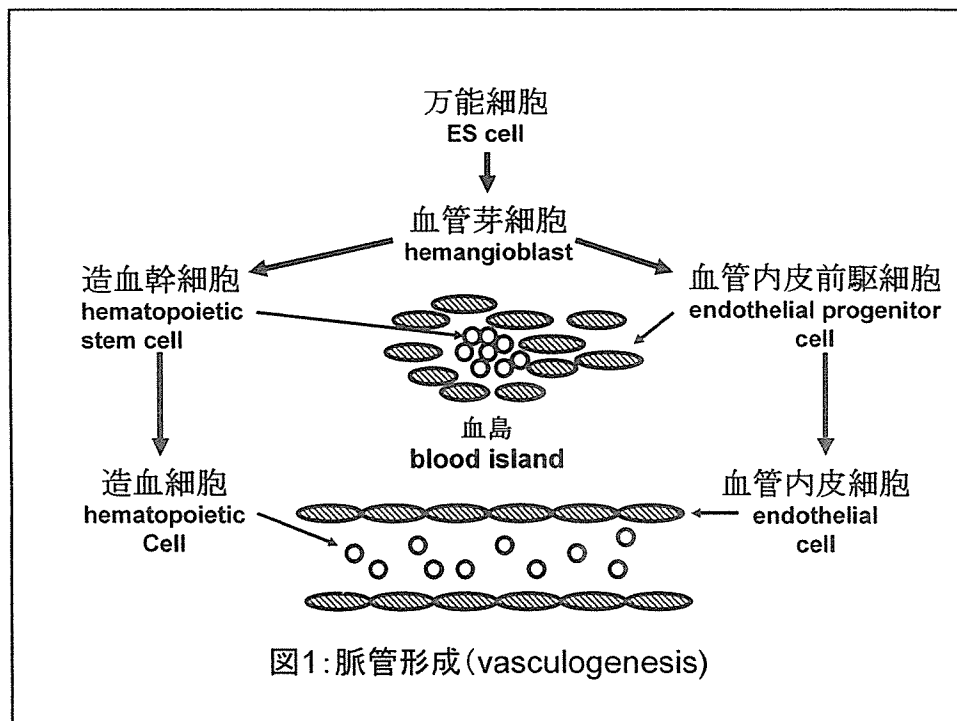
分担研究者 室原豊明¹
研究協力者 新谷 理¹、近藤隆久¹、梶口雅弘¹、古森公浩²
名古屋大学医学部附属病院循環器内科¹
名古屋大学医学部附属病院血管外科²

要 旨：従来、成体における血管新生は、隣接する既存の毛細血管内皮細胞による増殖や遊走といういわゆる血管新生（angiogenesis）のみであると考えられてきた。しかし、成人末梢血中から血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell: EPC）が発見され、これらの細胞が虚血領域の血管新生に関与することが報告された¹⁾。この機序は、胎児期にしか認められないEPCの目的部位での分化および増殖や遊走といういわゆる血管発生（vasculogenesis）という概念を初めて成人においてもたらしめた。我々は、末梢血と比較し未分化な EPC が多量に含まれる骨髄液の単核球分画に着目し、実験動物において、自己骨髄単核球細胞移植が虚血組織の血管新生を促進させ、組織壊死の軽減および機能保護につなげることが可能であることを報告した²⁾。これら理論的・実験的根拠に基づき、臨床応用したものが自己骨髄単核球移植における末梢性血管疾患の治療（Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation : TACT study）³⁾ である。2002年から、名古屋大学医学部附属病院においても、従来の薬物治療、血管形成術やバイパス手術では治療困難な症例に対し、新たな治療手段として臨床導入を行っている。

緒 言：循環器・脈管系は脊椎動物の個体発生過程において、胚（embryo）の急速な成長に必要とされ、最初に機能しはじめる器官である。したがって、脈管形成（neo-vascularization,

vascular formation）は、胎生前期の心臓をはじめとする循環器・脈管系の形成や各組織の形態形成に密接に関与する。ヒトにおいては、身体の成長とともに血管系も増殖・進展するが、思春期以降、男性では恒常的な血管新生は観察されない。しかし、女性においては性周期に伴う卵巣の黄体形成や子宮内膜の発育の際に、一過性の強い血管新生が認められる。さらに、妊娠の際に胎児と母胎の接点として作られる胎盤は、両者の血管系のネットワークともいえる組織であり、劇的な血管新生と維持、物質交換の場である。したがって、生理的な条件においてもさまざまな時期、組織において、血管新生はダイナミックに行われているといえる。

発生学や組織学の視点から、広義の血管新生は以下の2種に大別される。その1つとして、胎児初期、血管形成は造血幹細胞（hematopoietic stem cell）と血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell: EPC）から構成された血島（blood island）から始まる。これらは互いに融合し外側が血管に、内側が血液細胞に分化していくことから、造血幹細胞と血管内皮前駆細胞は共通の幹細胞（hemangioblast）を有すると考えられてきた（図1）。つまり、血管内皮前駆細胞が未分化のまま増殖、分化することで血管構築するまったく新しい脈管系の発生で、脈管形成（vasculogenesis）と呼ばれるものであり、もう1タイプは、すでに組織に存在する隣接血管系の血管内皮細胞からの増殖、遊走を基



本とした新しい血管枝の形成で、狭義の血管新生 (angiogenesis) と呼ばれるものである⁴⁻⁶⁾。

1997年、Asaharaら¹⁾により成人末梢流血中の単核球分画にEPCが存在することが報告されるまで、胎生期の後期以降および生後すべての時期における血管新生は、既存の血管内皮細胞の増殖と遊走によるもの (angiogenesis) のみと考えられてきた。ヒト末梢血単核球細胞は、培養過程で spindle 型接着性細胞となり、血管内皮細胞でみられる acetylated LDL の取り込みを認め、フローサイトメーターや免疫組織染色法で、血管内皮細胞特異的抗原 (CD34、CD31、von Willbrand Factor、Ulex-1 lectin、Flk-1、Tie-2、E-selectin、ecNOS) を発現し、RT-PCR法で CD31、Flk-1、Tie-2、ecNOSなどの遺伝子発現も確認された。つまり培養過程で出現してきた spindle型接着性細胞こそがEPCであると考えられた。また標識されたこれらの細胞は、ヒト血管内皮細胞とともに培養すると、マトリゲル上で管腔形成に組み込まれ、さらに、免疫抑制動物に経静脈的に投与すると、虚血下肢骨格筋での血管新生に組み込まれることが明らかになった。以上より成人における血管新生には、既存の毛細血管内皮細胞の増殖や遊走のみではな

く、流血中のEPCの分化という脈管形成 (vasculogenesis) 型の血管新生も関与する可能性があることが示唆された。

血管新生はもともと Folkmanら⁷⁾ が提唱しはじめた腫瘍発育における栄養血管の新生、つまり、悪性腫瘍の本質である増殖・浸潤・転移といった増悪機能の発現に関する研究という形で学問が進歩してきた。悪性腫瘍以外にも、増殖性糖尿病性網膜症や、様々な炎症性疾患 (たとえば慢性関節リウマチの滑膜炎)、外傷における創傷治癒過程、心筋虚血における側副血行路発達や、消化性潰瘍の再生機転にも深く関わっている。

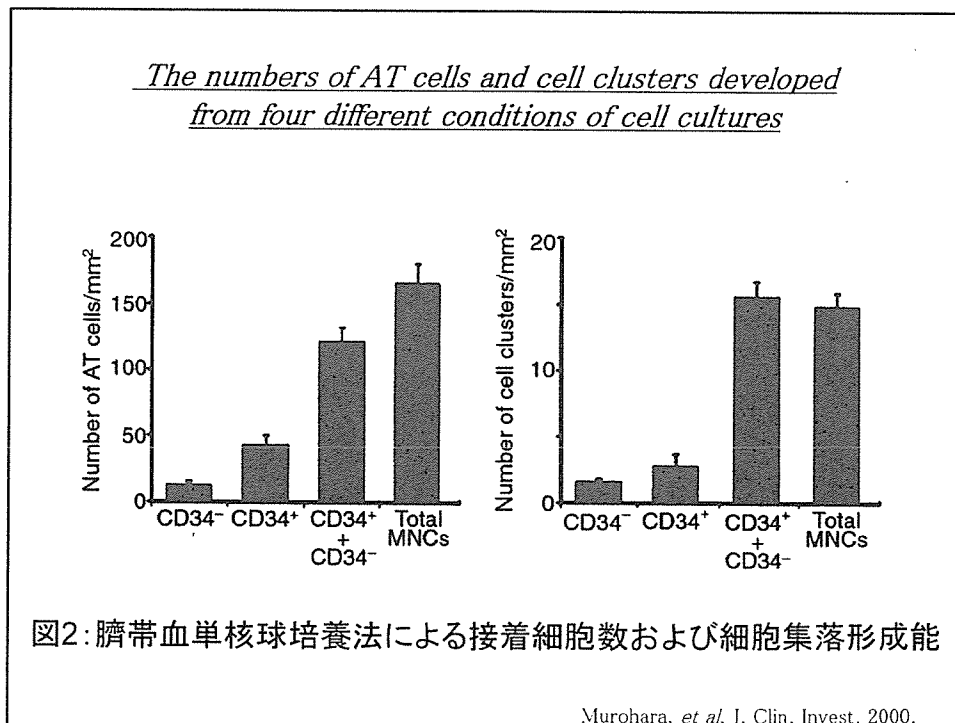
近年、我が国においても食生活の欧米化・高齢化社会に伴い、動脈硬化を基礎とする閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterans: ASO) 患者数は増加している。また、原因不明であるが、その発症・増悪に喫煙が強く関与している四肢末梢血管の炎症に起因するバージャー病 (閉塞性血栓血管炎 thromboangiitis obliterans; TAO) 患者も依然みられている。そのような末梢性血管疾患では、四肢の動脈が狭窄、閉塞することにより、冷感やしびれ感、間歇性跛行、安静時疼痛、潰瘍形成、壊死など虚血症状が出現する。

現在、循環器病（心血管病）領域においては、治療としては禁煙のうえ、抗血小板製剤や血流改善薬、抗凝固薬などの薬物療法を行う。重症症例に関しては高圧酸素療法や交感神経節ブロックや切除術、さらには経皮経管的血管形成術（percutaneous transluminal angioplasty: PTA）やバイパス手術等の血行再建手術が行われている。これらの方法は確立された有効な治療法であるが、PTAの場合、一定の率（30-40%）で拡張した血管の再閉塞がみられ、繰り返し経血管的な血管拡張術を施行する患者も多くみられ、現在の臨床上の限界と考えられている。各種治療法が無効の場合は、四肢切断を余儀なくされQOLの低下をきたす症例もみられる。1995年、米国タフツ大学のIsnerら⁸⁾は、度重なる動物実験を経て、このような重症下肢虚血患者に対し、血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF）遺伝子を投与し、虚血周辺の健常組織からの血管新生や側副血行の発達を人為的に促進し、虚血組織の傷害・壊死を軽減させ、組織もしくは臓器の機能保護をしようとする試みを行った。これら一連の戦略は治療的血管新生（Therapeutic Angiogenesis）と呼ばれ、虚血組織の機能を回復する面においても大

変重要であると思われる。

我々はこれまで虚血性疾患の治療の研究に積極的に取り組んでおり、特に、既存の治療法では下肢切断を余儀なくされる重症末梢性血管疾患患者に対する自己幹細胞を用いた血管新生療法の開発について検討している。生体におけるEPCの存在部位としては末梢血、骨髓液、臍帯血がある。2000年、我々は、末梢血と比較し未分化な細胞が多量に含まれる臍帯血単核球分画由来のEPCが実験動物において虚血領域の血管新生を増強することを報告した⁹⁾。また、同研究においてCD34陽性細胞単独培養に比してCD34陽性細胞とCD34陰性細胞の混合培養や全単核球分画細胞培養の方が、接着細胞や細胞集落の形成能が優れていることが証明した（図2）。そこで我々は移植細胞群としては、手技的な煩雑さを省略でき、さらには治療効果が期待できる単核球細胞全分画を移植することとした。しかし、臨床導入を行うにあたって、現状の公的臍帯血バンクでは、他家移植しかできず、自己臍帯血を使用することは不可能である。そこで、我々は、臍帯血同様EPCが多量に含まれる骨髓単核球細胞に着目した。

2001年、我々は²⁾、骨髓細胞単核球分画より、



機能的なEPCの培養に成功した後に、ウサギ片側下肢虚血モデル作成後の虚血骨格筋に自己骨髄単核球細胞を移植した。結果、移植した骨髄単核球細胞は、虚血組織で毛細血管床に取り込まれて血管新生を促進させ、その結果、組織壊死の軽減および機能保護につなげることが可能であることを報告した(図3)。骨髄単核球細胞移植はウイルスベクターなどを使用する遺伝子治療に比べ、安全性が高いと考えられ、悪性腫瘍の増殖・転移の促進、糖尿病性網膜症などの潜在的な疾患の増悪などの副作用の心配もないと考えられる。また、骨髄移植に伴って起こる重篤な合併症のひとつである移植片対宿主病についても、自己骨髄移植のため免疫反応は完全に無視できる。加えて自己の幹細胞を用いるため生着が早いと考えられる。また、骨髄移植に伴って起こる重篤な合併症のひとつに移植片対宿主反応(graft-versus-host reaction:GVHR)に基づく移植片対宿主病(graft-versus-host disease:GVHD)がある。これは、ドナー骨髄細胞に含まれるT細胞を中心とする免疫担当細胞が、宿主を異物として認識し、攻撃することによって起こる免疫反応である。T細胞は障害が強く臓器障害を、B細胞は障害が弱く抗体産生を引き起こす。ドナー骨髄よりT細胞を除去すると、明らかにGVHDの発症頻度が低下するが、

生着不全も高頻度にみられる¹⁰⁾。しかし、自己骨髄を移植することにより同種移植とは異なり、ドナーは不要であり、免疫反応は完全に無視できGVHDを防ぐことも可能である。

これら理論的・実験的根拠に基づき、臨床応用したものが“自己骨髄単核球移植における末梢性血管疾患の治療(Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation: TACT study)”である³⁾。このclinical trialは、久留米大学、関西医科大学、自治医科大学の3施設共同研究で開始され、我が国で最初の循環器領域の再生医療療法として高度先進医療として認可された(図4)。

方法：2002年より名古屋大学医学部附属病院において、従来の治療法では下肢切断の回避が不可能である重症末梢閉塞性動脈疾患(閉塞性動脈硬化症・バージャー病)9名に対し、以下に示すプロトコルに従ってTACT studyを行った。

TACT studyプロトコルによる血管新生療法の実際

1. 適応

重症末梢閉塞性動脈疾患(閉塞性動脈硬化症・バージャー病)のために日常生活が著しく障害され、従来からの薬物療法など他のいかなる治療にも反応せず、かつ血管形成術やバイパ

