

分担研究報告

「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」

難治性血管炎（バージャ病）への自家骨髓単核球移植による血管新生医療の 長期臨床成績・安全性と多発性動脈周囲炎による血管再生医療

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

要旨)

骨髓単核球移植を難治性血管炎であるバージャ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、4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。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、自家骨髓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。難治性血管炎に対する血管再生医療後の1症例も実施した。膠原病に対する骨髓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かった。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。

緒言)

骨髓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髓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、主治医が不相当と判断した患者。

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、4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。

1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 1.5×1.5 cm)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

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

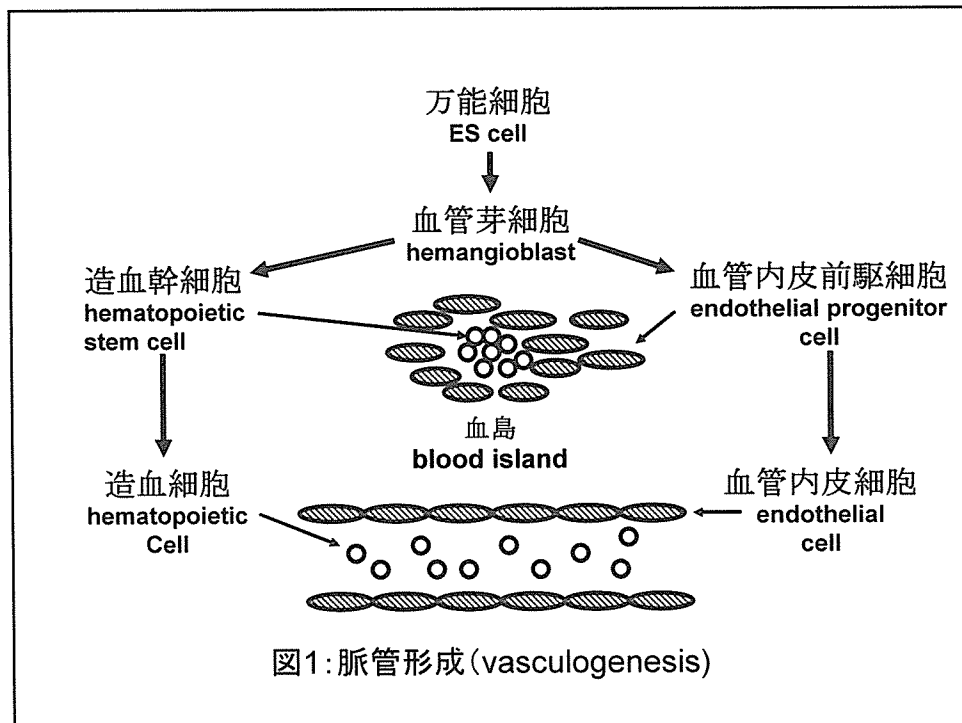
従来、成体における血管新生は、隣接する既存の毛細血管内皮細胞による増殖や遊走といういわゆる血管新生 (angiogenesis) のみであると考えられてきた。しかし、成人末梢血中から血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) が発見され、これらの細胞が虚血領域の血管新生に関与することが報告された¹⁾。この機序は、胎児期にしか認められない EPC の目的部位での分化および増殖や遊走といういわゆる血管発生 (vasculogenesis) という概念を初めて成人においてもたらしめた。我々は、末梢血と比較し未分化な EPC が多量に含まれる骨髄液の単核球分画に着目し、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 (neovascularization, 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つのタイプは、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。

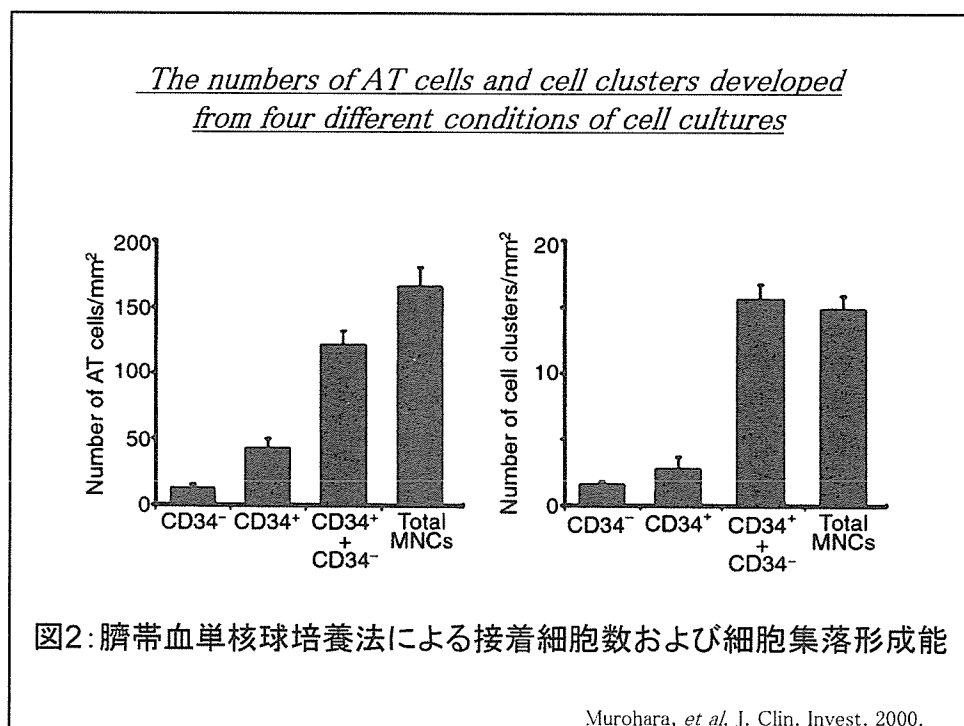
血管新生はもともと Folkmanら⁷⁾ が提唱しはじめた腫瘍発育における栄養血管の新生、つまり、悪性腫瘍の本質である増殖・浸潤・転移といった増悪機能の発現に関する研究という形で学問が進歩してきた。悪性腫瘍以外にも、増殖性糖尿病性網膜症や、様々な炎症性疾患 (たとえば慢性関節リウマチの滑膜炎)、外傷における創傷治癒過程、心筋虚血における側副血行路発達や、消化性潰瘍の再生機転にも深く関わっている。

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（閉塞性血栓性血管炎 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）。

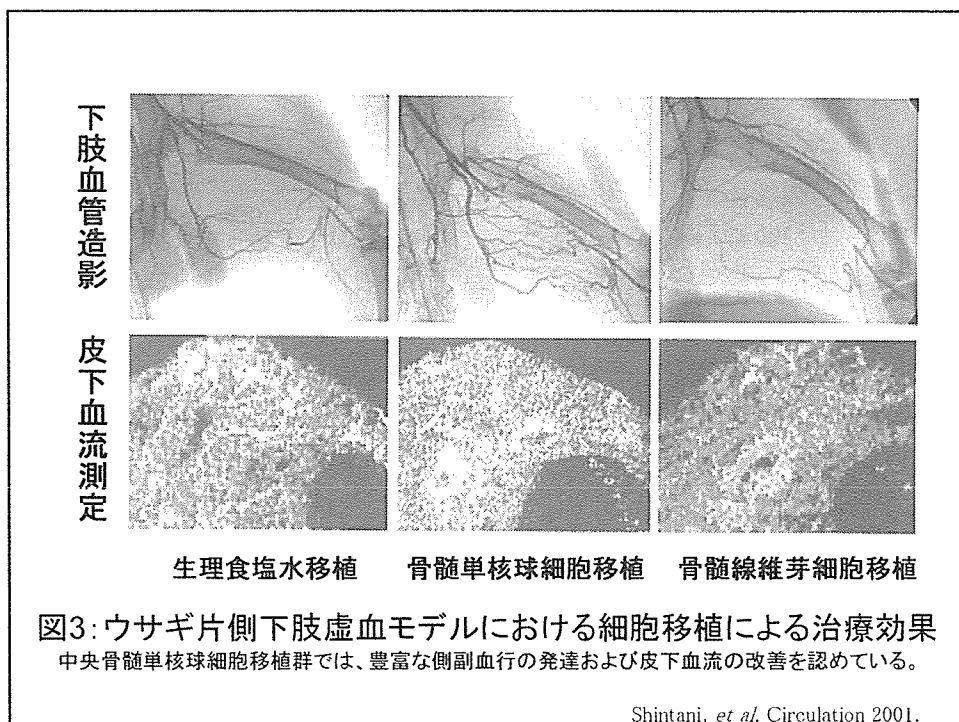


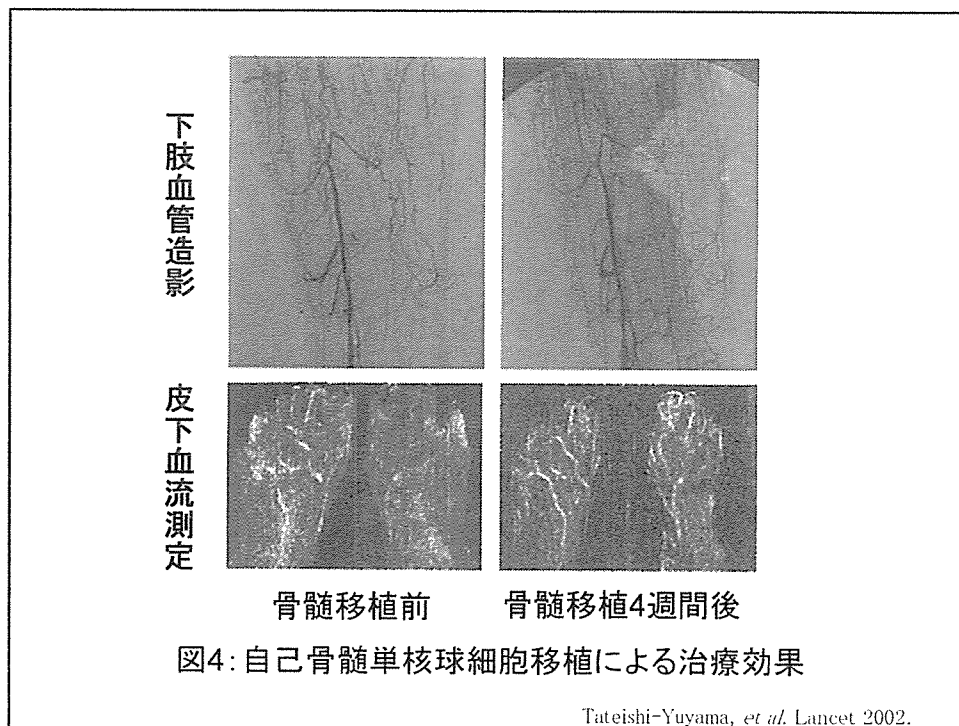
そこで我々は移植細胞群としては、手技的な煩雑さを省略でき、さらには治療効果が期待できる単核球細胞全分画を移植することとした。しかし、臨床導入を行うにあたって、現状の公的臍帯血バンクでは、他家移植しかできず、自己臍帯血を使用することは不可能である。そこで、我々は、臍帯血同様EPCが多量に含まれる骨髄単核球細胞に着目した。

2001年、我々は²⁾、骨髄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ス手術が不可能なために、今後回復が期待できない患者。さらに、説明文書にて十分に自己骨髓細胞移植で発生する合併症・効能・不利益・利益を説明し、患者自らの意志および家族の理解と承諾に基づいて、細胞移植医療を希望する場合のみ施行する。

2. 除外基準

- 合併する虚血性心疾患などのために骨髓採取の際の全身麻酔に耐えられない患者
- 合併症等により余命が1年以内と考えられる

患者

- 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過去5年以内にその既往のある患者、および諸検査により悪性腫瘍の可能性が現在あると判断された患者（血管新生療法により腫瘍の増大や転移を促進する危険性がある）
- 重度の糖尿病性網膜症を有する患者（血管新生療法により網膜症が悪化する危険性がある）
- その他インフォームドコンセントを得られない患者や主治医が不相当と判断した患者

3. 方法

(1) 治療前検査

- ① 一般検査：問診、理学所見、検便、検尿、血液生化学、全血球数、単純胸腹部レントゲン、心電図など通常の入院時諸検査
- ② 悪性疾患のスクリーニング：便潜血、腫瘍マーカー「AFP, CEA, CA19-9, PSA(男性のみ)など」、乳腺撮影（女性のみ）、上部消化管透視、腹部超音波検査
- ③ 糖尿病性網膜症のスクリーニング：眼底検査
- ④ 血液疾患のスクリーニング：全血球数、末梢血液像等
- ⑤ 冠動脈疾患のスクリーニング：ジピリダモ-

ル負荷心筋血流核医学検査、陽性であれば冠動脈造影（治療）を行う

(2) 骨髓液採取および骨髓単核球細胞の分離
骨髓液採取 2 週間前までに、400mLの自己血貯血を行う。手術室にて全身麻酔下に腸骨より500mLから800mLの骨髓液を採取し、比重遠心分離法（AS.TEC 204, Fresenius社）により骨髓単核球細胞の分離濃縮を行う（全ての清潔操作方法、および抗生物質等の投与は、すでに臨床実施されている骨髓移植法に準じる）。単核球細胞分画は最終的には30-50mlの液に濃縮する。採取する細胞数としては、骨髓単核球としては、 1×10^9 - 10^{10} 細胞、CD34陽性細胞数としては、 1×10^7 細胞を目安としている。手術後に自己血輸血（400mL）を行う。

(3) 骨格筋への骨髓または末梢血単核球細胞移植

骨髓液採取後、腰椎麻酔下に分離濃縮した単核球細胞（約 1×10^9 個）を26G針注射器を用いて虚血部下肢骨格筋に0.5mLずつ40-60カ所に分けて筋肉内に注射する。

(5) 評価項目

- ① 視診：治療前、治療1、2、3、4週間後および6ヶ月後に視診可能な虚血性潰瘍は写真に撮影記録する。部位・深さ・壊死の形状を記録する。潰瘍の大きさは、長軸および短軸方向の最大長で評価する。足趾の間などの測定不能部位では表面面積を概算する。潰瘍の深さは、下記の基準による：1=表在欠損；2=皮下病変；3=腱もしくは骨の露出；4：腱もしくは骨の壊死、また、潰瘍部の感染の有無も評価する。
- ② ABI（ankle-brachial pressure index）：治療前、治療1、2、3、4 週間後および6ヶ月後に測定する。
- ③ レーザードップラーによる皮下血流および経皮的組織酸素分圧測定：治療前、治療1、2、3、4 週間後および6ヶ月後に測定する。
- ④ DSAまたは経動脈的血管造影：治療前、治療4 週間後および6ヶ月後に実施する。
- ⑤ 歩行距離測定：治療前、治療1、2、3、4 週間後および6ヶ月後に歩行可能であれば、トレッドミルを用いて平地・2.4km/hの条件で最

大歩行距離または疼痛出現までの歩行距離を測定する。

⑥ QOL：Visual analogue scale（10段階評価）による症状の変化を治療前、治療1、2、3、4週間後および6ヶ月後に評価する。

2007年我々は¹⁰⁾、昨年までに行った9名中7名の患者に対する治療効果判定を行った。安静時疼痛などの自覚症状および皮膚潰瘍面積や上肢下肢血圧比（ankle-brachial pressure index: ABI）やサーモグラフィーにより評価した皮膚表面温度といった客観的指標の双方とも改善を認めた症例群を治療反応群とし、自覚症状および客観的指標のどちらか一方もしくは双方とも改善が見られない群を治療非反応群とした。さらに、細胞移植後の末梢血中幹細胞数およびアンジオジェニックサイトカインの継時的変化を測定した。

結果

驚くべきことに、治療反応群はすべてバージャー病患者であり、慢性血液透析中である閉塞性動脈硬化症患者はすべて治療非反応群となった（図5）。自己骨髓単核球細胞移植治療後、治療非反応群に比して治療反応群においては、末梢流血中CD34陽性細胞数およびCD133陽性細胞数つまり末梢流血中EPC数が有意に持続的に増加していた（図6）。また、アンジオジェニックサイトカインであるVEGFやbFGFの血清濃度は、治療反応群において移植前より持続的に高値であった（図7）。

考察

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）に対する血管新生療法を行ってきた。すべての患者が治療反応群となったバージャー病患者は自己骨髓単核球細胞移植治療後の、末梢血中のEPC数が持続的に増加しており、治療反応性の裏付け、或いは治療反応性を反映している可能性があると考えられた。一方、治療効果の乏しい症例は、全例慢性血液透析を受けているASO患者であり、長期間の血液透析による血管内皮機能の障害やEPC数/機能

の減弱、NOの生理活性低下などが、治療反応性や術後の血中EPC数推移の差異の一因と考えられた。さらに、VEGFやbFGFといったアンギオジェニックサイトカインの血清濃度は、治療反応群では、血管新生療法前より増加傾向がみられており、治療適応基準を決定する因子となる可能性は高い。本検討は、少人数での検討であり、より多数例での検討が必要であるが、TACT-1 multi-center study -interim report- (2000年7月から2003年10月までの全国17施設における治療成績の中間解析)で報告されているように、重症例の中には本治療でも改善困難な患者群が存在し、糖尿病患者ではABI>0.1以上の改善は46%であり、また透析患者では33%の治療有効性しかみられなかった。このことに関し、我々を含め他施設から興味深い報告がでてくる。多くの動脈硬化危険因子を有する患者^{12,13}、特に喫煙患者¹⁴)においては健常人と比較し末梢流血中のEPC数の不足のみならず細胞機能が低下していた。さらに、慢性虚血性心筋症患者¹⁵)では、健常人と比較し骨髄単核球細胞分画中のEPC数は変わらないが、EPCの内皮細胞としての機能(コロニー形成能、遊走能、血管新生能)が低下していた。これが現行の細胞移植

による血管新生療法の限界点となっている可能性は高く、様々な施設で治療効果減弱の要因を解決すべく新たな血管新生療法の開発が行われている。

結語

自己骨髄単核球細胞移植による血管新生療法は、基礎疾患により治療効果に違いがみられた。細胞移植治療後の末梢血中幹細胞数の推移やアンギオジェニックサイトカインは、治療反応性の裏付け、或いは治療反応性を反映している可能性があると考えられた。重症例の中には本治療でも改善困難な患者群が存在し、また透析患者では治療抵抗性である事が判明した。今後、慢性透析合併ASO症例など多くの動脈硬化危険因子を有する治療抵抗性症例への治療適応基準の検討や新たな血管新生療法の開発が望まれる。今回、我々の検討では、末梢流血中アンギオジェニックサイトカインの血清濃度が、治療適応基準を決定する一因子となる可能性が示唆された。現在、我々は、更なる治療適応疾患の拡大を行っており、慢性虚血性心筋障害患者に対する冠動脈バイパス術とのハイブリッド治療を展開している¹⁶)。

症例	年齢	性別	診断名	ABI	自覚症状	TcO2	Thermography	Angiography
1	37	女性	Buerger病	1.09	著明改善	改善	不変	改善
2	57	男性	ASO	0.56	軽度改善	不変	不変	不変
3	58	男性	ASO	0.74	軽度改善	不変	不変	不変
4	67	男性	ASO	0.29	不変	不変	不変	NA
5	51	男性	Buerger病	0.77	著明改善	不変	改善	NA
6	57	男性	ASO	0.20	不変	改善	不変	NA
7	47	女性	Buerger病	0.00	軽度改善	改善	改善	NA

responders
non-responders

図5: 自己骨髄単核球細胞移植後の自覚症状、客観的指標の改善度

Kajiguchi, et al. Cir J. 2007.

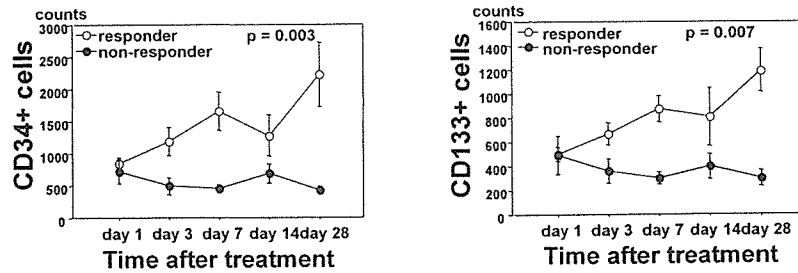


図6: 自己骨髄単核球細胞移植後の末梢流血中幹細胞数

kajiguchi, *et al.* Cir J. 2007.

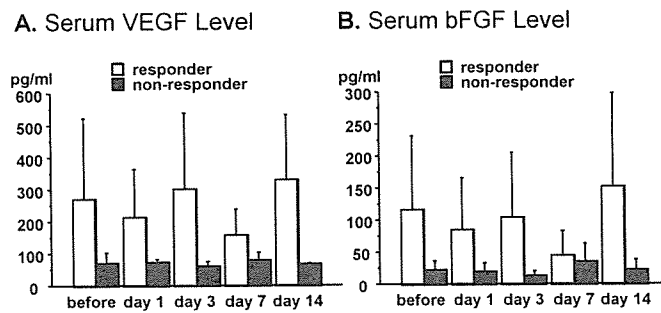


図7: 自己骨髄単核球細胞移植後の末梢血中サイトカイン濃度

Kajiguchi, *et al.* Cir J. 2007.

参考文献

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997
2. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, Imaizumi T. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103: 897-903, 2001
3. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, & Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cell: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet* 360: 427-435, 2002
4. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Ekblom P, Kemler R, Doetschman T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Development* 102: 471-478, 1988.
5. Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hemopoiesis in vitro. *Development* 116: 435-439, 1992.
6. Risau W. Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development. In : Feinberg RN, Sherer GK, Auerbach R (Eds) *The development of the vascular system* 14: 58-68, 1991
7. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med.* 133:275-288, 1971
8. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 348: 370-374, 1996
9. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105: 1527-1536, 2000
10. Fahey JL, Sarna G, Gale RP, Seeger R. Immune interventions in disease. *Ann Intern Med* 106:257,1987.
11. Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi M, Yamamoto K, Shintani S, Numaguchi Y, Naoe T, Takamatsu J, Komori K, Murohara T. Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ J* 71: 196-201, 2007
12. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease *Circ Res* 89: E1-E7, 2001
13. Hill JM, Zalos G, Halcox JPj, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk *N Engl J Med* 348: 593-600, 2003
14. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1442-1447, 2004
15. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease *Circulation* 109: 1615-1622, 2004
16. Izawa H, Kondo T, Usui A, Yamamoto K, Shintani S, Inden Y, Isobe S, Unno K, Kajiguchi M, Kato T, Nodo A, Okumura K, Naoe T, Takamatsu J, Komori K, Ueda Y, Murohara T. Clinical protocol for angiogenesis by intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells in patient with severe coronary artery disease -TACT-NAGOYA-HEART- *Circ J* 70: 1180-1183, 2006

「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」

膠原病に起因した阻血指趾に対する自己末梢血単核細胞を用いた 繰り返し移植による血管新生療法

分担研究者 簗田 清次

研究協力者 釜田 康行、岩本 雅弘

自治医科大学内科学講座 アレルギー膠原病学部門

背景

膠原病では、四肢末端の血流障害に伴うレイノー現象や指尖潰瘍などの虚血症状がしばしば見られる。この血流障害は、主に血管内皮の障害や細胞増生による細動脈の狭窄や閉塞に起因している。膠原病に伴う血管障害は、著しい冷感と疼痛を伴い、進行すると潰瘍や壊疽をきたし指趾切断に至ることもある¹⁾。

膠原病に伴う血管障害の治療法としては、Ca拮抗剤、prostaglandin製剤^{2,3,4)}などの血管拡張剤が用いられてきたが、奏効する例は少なく重症例に対する有効な治療法がないのが現状である。

2002年、Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation (TACT) studyにおいて、慢性動脈閉塞症患者（閉塞性動脈硬化症、バージャー病）の虚血肢に自己骨髓単核細胞分画の単回移植を行い、良好な成績が報告された⁵⁾。そこで我々は、TACT studyと同様の方法により、6症例の膠原病に起因する阻血指趾に対し、自己骨髓血単核細胞分画および自己末梢血単核細胞分画を単回移植し、1年間評価を行い、その有効性について検討した。その結果、膠原病に起因した阻血指趾に対しては、移植する細胞として自己骨髓血単核細胞分画と自己末梢血単核細胞分画との間で効果に差が無いこと、またその効果に長期間の持続性が無いことを見出した⁶⁾。

目的

膠原病に起因する難治性の阻血指趾に対して、より患者負担の少ない自己末梢血単核細胞分画を用い、より高い効果を得るべく繰り返し移植を行い、その効果と安全性について検討を行った。

症例

Case 1は、73歳男性。CREST症候群（罹病期間15年）、レイノー現象（発症後20年）、シェーグレン症候群（罹病期間2年）。血管拡張薬投与下においても四肢末端の進行性の疼痛、潰瘍を認めていた。Case 2は、65歳男性。全身性強皮症（罹病期間10年）、シェーグレン症候群（罹病期間9年）、間質性肺炎（罹病期間3年）、レイノー現象（発症後6年）。血管拡張薬投与下においても両手指の疼痛、冷感を認めていた。Case 3は、61歳男性。混合性結合組織病（罹病期間5年）、レイノー現象（発症後6年）、間質性肺炎（罹病期間7年）。血管拡張薬投与下においても両手指の疼痛、指尖に繰り返す潰瘍、壊疽を認めていた。

方法

自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植は、3ヶ月毎に計4回行った。各症例とも1回目（Case 1のみ1および2回目）の移植前日に、自己末梢血400mlを採取し、比重遠心分離

法により単核細胞分画を分離した（赤血球および血清は返血した）。移植当日、単核細胞分画を20mlのRPMI培地に懸濁したものを、0.2mlずつ両手掌に各50ヶ所ずつ筋肉内および骨膜下に注射した。2回目以降Case 1のみ3回目以降）は、採取ならびに移植する単核細胞数（CD34陽性細胞数）を増量する目的で、移植前日に自己末梢血800ml（Case 3の4回目は1600mlを2日間で採取した）を採取した（赤血球および血清は返血した）。移植は、1回目と同様に移植当日に単核細胞分画を20mlのRPMI培地に懸濁し、0.2mlずつ両手掌に各50ヶ所ずつ筋肉内および骨膜下に注射した。3回目の移植からは、1ヶ所あたりに移植する単核細胞数（CD34陽性細胞数）をさらに増量する目的で、単核細胞分画を8mlのRPMI培地に懸濁し、0.4mlずつ潰瘍や自覚症状が強い一側の手掌にのみ20ヶ所筋肉内および骨膜下に注射した（単位面積あたりの移植部位を減らした）。なお、3回目の移植は末梢血単核細胞分画の移植を、Case 1に対しては指尖潰瘍がある右手のみに、Case 2に対しては自覚症状が強い左手のみに、Case 3に対しては指尖潰瘍がより重症な右手のみに行った（表1）。

効果判定は、VAS(Visual Analog Scale)による疼痛、冷感、満足度の調査、および健康調査QOL尺度SF-36による調査を移植開始前と移植後1ヶ月毎に計13回行った。また、手足末梢皮膚表面温度をサーモグラフィーを用いて測定した。外観の評価は、移植前と移植後3ヶ月ごとに計5回写真により比較評価した。また、血管造影により描出血管の評価を移植前と移植1年後に行った。

結 果

自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植療法では、末梢血から抽出された単核細胞は平均 6.1×10^8 であり（表2）、うちCD34陽性細胞は平均 0.25×10^6 含まれていた（表3）。

疼痛の評価（Pain VAS）では、Case 1, 3では指尖潰瘍の出現や増悪と一致してVASは悪化した。移植部位を両手から潰瘍のある右手の

みにした3回目の移植以降は、潰瘍の治癒と共にVASの著明な改善を認めた（図1A）。Case 2は移植開始前から1年後の移植終了時まで疼痛を感じたことはなかった。冷感の評価（Feeling cold VAS）では、全症例で4回目の移植以降著明にVASが改善し、全ての症例で移植開始前と比較して1年後にはVASの改善を認めた（図1B）。

満足度の評価（Satisfaction VAS）では、Case 1と3に関しては、指尖潰瘍の悪化や出現と共にVAS増悪したが、指尖潰瘍改善と共にVASの改善を認めた（移植部位を両手から片手に減らした3回目の移植以降、全症例でVASの改善傾向を認めた）。健康調査QOL尺度SF-36による調査は、全症例で移植開始前と比較してQOLの上昇を認めた。

サーモグラフィーによる指尖部皮膚表面温度の評価では、Case 1および3では、指尖部皮膚温度の低下と共に指尖潰瘍が出現および悪化し、指尖部皮膚温度の改善と共に指尖潰瘍が治癒した。Case 2では、指尖部皮膚温度の上昇と共に自覚症状の改善が見られ、その後指尖部皮膚温度が低下しても自覚症状の悪化は見られなかった（図1C）。

外観の評価では、Case 1では2回目の移植後に新たな指尖潰瘍が出現し（右第2指に2ヶ所）、Case 3は移植開始前より指尖潰瘍があったが（右第1、3指）、2回目の移植後に悪化した。しかし、両症例とも4回目の移植後には潰瘍は治癒した。Case 2は、明らかな潰瘍は出現しなかったが、手指の色調が3回目の移植以降に変化し始め、4回目の移植終了後には明らかな改善がみられた（白色から肌色へ）。

血管造影による評価では、Case 2で移植開始前と比べ移植1年後で描出される血管が明らかに増加した。他の症例では移植開始前と移植1年後との間で明らかな変化を認めなかった。

考 察

末梢血単核細胞分画の繰り返し移植療法の結果より、骨髓血単核細胞分画を使用せず、末梢血単核細胞分画の移植のみで指尖潰瘍、疼痛、

および冷感を改善する効果があることが確認された。また、3 回目の移植以降に自・他覚症状の明らかな改善が見られ始めたことから、繰り返し移植し続けることにより効果を発現する可能性、または1ヶ所あたりに、または1指趾あたりに移植する単核細胞の数に依存する可能性が推測された（具体的には一側の手掌あたり 4×10^8 程度以上単核細胞を移植することにより、効果が得られる可能性が推測された）。

単核細胞分画の採取は、骨髓血と比較して末梢血の場合、患者負担が極めて少なく、また骨髓血を移植した場合と同等以上の効果が得られることから、骨髓血単核細胞分画移植に代わる新たな治療法となり得る可能性が示唆された。また、最長約2年間の経過観察を行っているが、現在までに血管新生術に起因すると考えられる副作用は見られておらず、安全性が高い治療法であると考えられた。

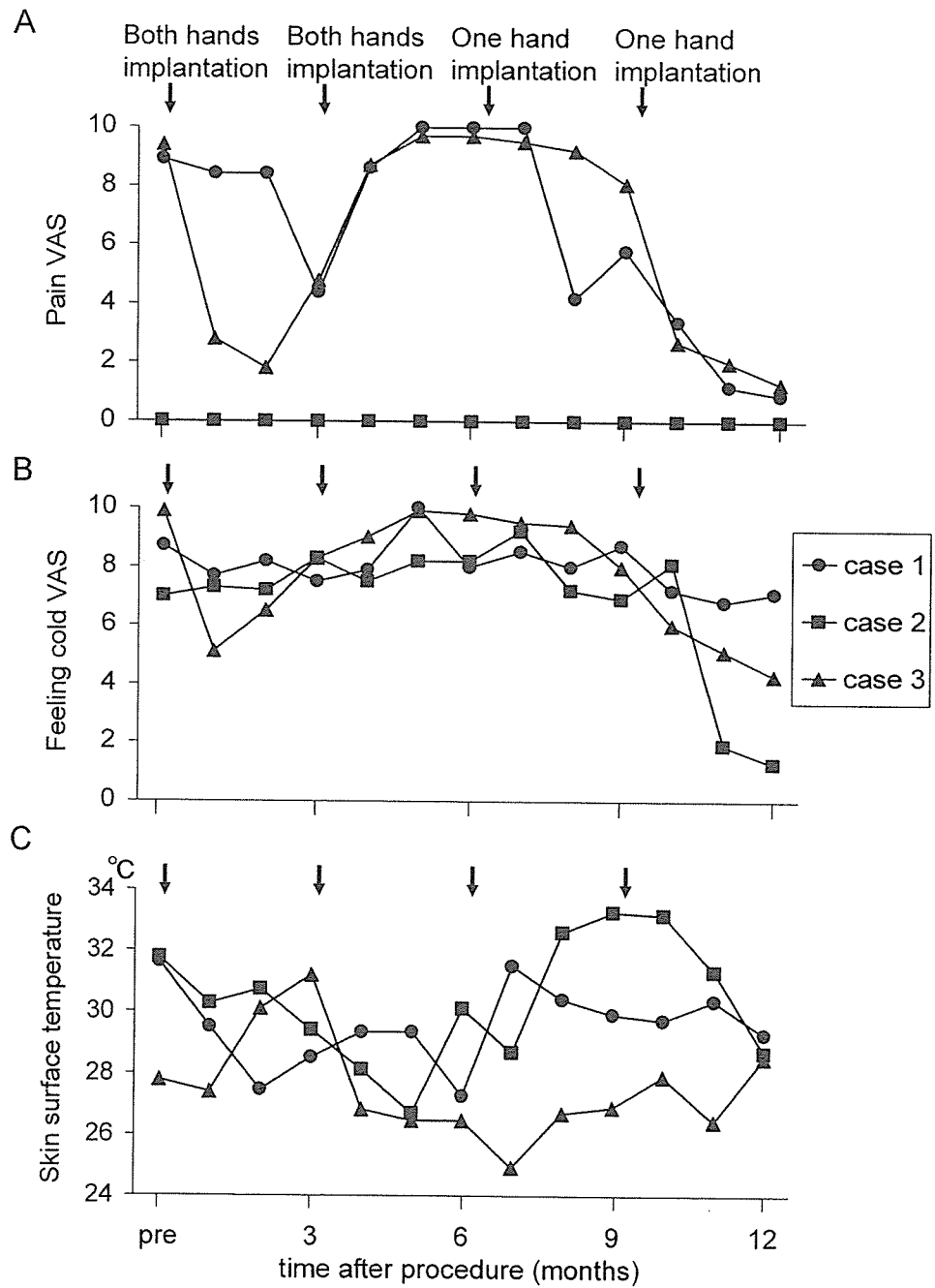
平成18年末より、自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植療法に改良を加え、より患者負担の少ない方法で現在10例目の症例について血管新生療法を施行中である。

文 献

1. Wollersheim H, VanZwieten PA: Treatment of Raynaud's phenomenon. *Euro Heart J* 14: 147-149, 1993
2. Malamet R, Wise RA, Ettinger WH, Wigley FM: Nifedipine in the treatment of Raynaud's phenomenon. *Am J Med* 78: 602-608, 1985
3. Martin MF, Dowd PM, Ring EF, Cooke ED, Dieppe PA, Kirby JD: Prostaglandin E1 infusions for vascular insufficiency in progressive systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 40: 350-354, 1981
4. Vayssairat M: Controlled multicenter double blind trial of an oral analog of prostacyclin in the treatment of primary Raynaud's phenomenon. French Microcirculation Society Multicentre Group for the Study of Vascular Acrosyndromes. *J Rheumatol* 23: 1917-1920, 1996
5. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K,

Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaki T, Imaizumi T: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360: 427-435, 2002

6. Kamata Y, Takahashi Y, Iwamoto M, Matsui K, Murakami Y, Muroi K, Ikeda U, Shimada K, Yoshio T, Okazaki H, Minota S: Local implantation of autologous mononuclear cells from bone marrow and peripheral blood for treatment of ischaemic digits in patients with connective tissue diseases. *Rheumatology* (in press)



↑ 図の説明

図1: Aは単核細胞分画を移植した両手または片手の疼痛 (Pain VAS) の移植開始前から移植1年後までの変化、Bは単核細胞分画を移植した両手または片手の冷感 (Feeling cold VAS) の移植開始前から移植1年後までの変化、Cは単核細胞分画を移植した両手または片手のサーモグラフィーによる指尖部皮膚表面温度の移植開始前から移植1年後までの変化を示したグラフである。

表 1 自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植療法における1~4回目の移植時の末梢血単核細胞分画移植部位

	第1回目移植	第2回目移植	第3回目移植	第4回目移植
Case 1	両手掌 100ヶ所	両手掌 100ヶ所	右手掌 20ヶ所	右手掌 20ヶ所
Case 2	両手掌 100ヶ所	両手掌 100ヶ所	左手掌 20ヶ所	左手掌 20ヶ所
Case 3	両手掌 100ヶ所	両手掌 100ヶ所	右手掌 20ヶ所	右手掌 20ヶ所

表 2 自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植療法において移植した総単核細胞数

	第1回目移植	第2回目移植	第3回目移植	第4回目移植
Case 1	$3.16 \times 10^8 / 400\text{ml}$ $0.0316 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$4.80 \times 10^8 / 400\text{ml}$ $0.0480 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$11.04 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.552 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$5.3 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.265 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$
Case 2	$8.90 \times 10^8 / 400\text{ml}$ $0.089 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$6.60 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.066 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$9.40 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.470 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$6.44 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.322 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$
Case 3	$2.20 \times 10^8 / 400\text{ml}$ $0.022 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$3.78 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.0378 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$4.54 \times 10^8 / 800\text{ml}$ $0.227 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$	$6.46 \times 10^8 / 1600\text{ml}$ $0.323 \times 10^8 / 1\text{ヶ所}$

表 3 自己末梢血単核細胞分画を用いた繰り返し移植療法において移植したCD34陽性細胞数

	第1回目移植	第2回目移植	第3回目移植	第4回目移植
Case 1	$0.06 \times 10^6 / 400\text{ml}$ $0.0006 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.309 \times 10^6 / 400\text{ml}$ $0.0031 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.379 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0190 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.154 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0077 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$
Case 2	$0.270 \times 10^6 / 400\text{ml}$ $0.0027 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.260 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0026 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.387 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0194 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.351 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0176 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$
Case 3	$0.110 \times 10^6 / 400\text{ml}$ $0.0011 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.195 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0019 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.278 \times 10^6 / 800\text{ml}$ $0.0139 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$	$0.290 \times 10^6 / 1600\text{ml}$ $0.0145 \times 10^6 / 1\text{ヶ所}$

「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」

分担研究者 天野 純¹

研究協力者 福井大祐¹、和田有子¹、越川めぐみ³、下平滋隆³、池田宇一²
信州大学附属病院 先端心臓血管病センター
心臓血管外科¹、循環器内科²、輸血部³

要 旨

信州大学では、内科的・外科的治療法では症状改善が困難と判断される重症虚血肢に対し、平成15年11月より平成18年2月現在までに自己骨髓細胞移植による血管再生療法を20例に対し施行してきた。移植後の臨床効果判定は、自覚症状の変化（無痛歩行時間、疼痛スケール、四肢潰瘍面積）・ABI・DPI・サーモグラフィ・動脈造影検査等を用いて行い、その治療成績について平成16年度～18年度の班会議において報告してきた。現在までに、当院にて自己骨髓細胞移植を施行した症例数は20例で全体の奏効率は75%（有効15例、無効5例）であった。20例中14例がBuerger病症例で、Buerger病に限ると、奏効率82%（有効14例、無効3例）であった。また、閉塞性動脈硬化症、Buerger病以外の膠原病を中心とした虚血肢に移植を施行した症例は4例で、その奏効率は50%であった。移植が無効であった5例の内訳はCREST症候群1例、Buerger病にて移植後一時症状改善後に再増悪を認めた再移植例2例、および抗リン脂質抗体症候群疑い1例であった。また、血管新生関連因子の発現は、炎症又はBM-MNCsの移植によりAMやVCAM-1の発現が亢進され、移植細胞のアポトーシスの抑制や細胞接着に関する移植細胞による直接作用であると考えられる早期反応群と、新生血管の構築に関与するVEGF、bFGF、NOやG-CSFなどの血管新生因子の分泌に関する移植細胞による間接的なパラクライン作用であると考えられる後期反応群の

2つの時期が存在することが確認された。さらに、今回の検討では、一定レベル以上の骨髓液（現在適容量：600ml）を移植すれば、移植細胞数に関わらず十分な治療効果が得られるものと考えられた。

緒 言

現在、人口の高齢化や食生活の欧米化に伴い、わが国でも四肢末梢動脈閉塞性疾患の患者は年々増加傾向にある。動脈硬化により、四肢の慢性血流障害を起こす閉塞性動脈硬化症（ASO）や末梢動脈に閉塞性の内膜炎を起こすBuerger病や膠原病等は、間歇性跛行、安静時痛、虚血性潰瘍などの症状がみられ、患者のクオリティ・オブ・ライフは大きく障害される。これら四肢末梢動脈閉塞性疾患の治療方法として生活習慣の改善、薬物治療、カテーテル治療、バイパス手術などが行われているが、特にBuerger病や膠原病等による難治性血管炎による四肢末梢の虚血肢が進行した場合、これらの治療が不可能な重症虚血患者は四肢切断を余儀なくされていることが多い。

従来、成人における血管新生（angiogenesis）は既存の内皮細胞（Endothelial cells：ECs）の増殖によると考えられていた。Isnerら¹はその概念に基づき1994年に、ウサギ下肢虚血モデルに対する組み換え血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor：VEGF）蛋白を経動脈的に投与し、血流の改善と虚血部での血管新生を認めたことを報告した。さらに彼らは1996年

にVEGF遺伝子をヒト虚血肢筋肉内に直接注入し、虚血性潰瘍の治癒や安静時疼痛の改善を認めたことを報告した²⁰。この報告は重症虚血肢に対する血管新生療法の実験的根拠となり、その後様々な研究がされてきた。これまでにVEGF以外にも塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor) による遺伝子治療の臨床試験が行われ、初期の検討では有効性と安全性が報告されたが³、その後の無作為割付による臨床試験においては一貫した治療効果を認めなかったと報告されている^{4,5}。また、1997年にAsaharaら⁶は骨髄に由来する内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPCs) が未分化な状態で血液単核球中に含まれ、末梢血に動員され血管発生 (vasculogenesis) に関与することを報告した^{7,8} (CD34, CD133, VEGFR2^{9,10})。このことは遺伝子治療と異なり、自己細胞を用いた細胞治療という新しい治療法を導くきっかけとなった。2000年にKalkaら¹³はマウス下肢虚血モデルに対するヒトEPCsを虚血肢に筋肉注射し、EPCs移植治療の有効性を報告した。同年、Muraharaら¹⁴はラット下肢虚血モデルに対して臍帯血より採取したEPCsを虚血肢に筋肉注射し、その有効性を報告した。しかし、現状では自己臍帯血を使用することは不可能であったため、彼らは2001年にウサギ下肢虚血モデルに対し、ウサギ骨髄単核球細胞 (bone marrow mononuclear cells : BM-MNCs) を虚血肢に筋肉注射し、その有効性を報告した¹⁵。その後、日本においては2002年にTateishiら¹⁶により重症虚血患者に対する自己骨髄細胞移植(BM-MNC implantation : BMI)の有効性と安全性が報告された。

信州大学附属病院先端心臓血管病センターにおいても、2003年よりBMIによる血管新生療法を行っており、臨床的に比較的良好な臨床成績を収めている。しかし、その一方で本治療メカニズムについては未だ解明されているとはいえない。当初、本治療メカニズムとしては、EPCsを中心としたBM-MNCsがECsに分化し、新生血管を構築することで血流が改善すると考えられていた^{11,17}。最近の報告では、移植された細胞のうちECsに分化するものは少なく、骨髄細胞

のほとんどは新生血管を構築せず、血管新生因子やサイトカインを分泌するパラクライン作用により血管新生に寄与している可能性が高いとの報告が相次いでいる^{18,19}。また、移植したBM-MNCs中のCD34⁺細胞数と臨床効果に相関関係を認めた²⁰との報告がある一方で、移植細胞数は臨床効果と相関しないとの報告もされている^{21,22}。このように本治療法のメカニズムについては様々な報告があるものの、未だその治療効果の作用機序について議論の余地を残しているのが現状である。さらに、本治療法のメカニズムについてはマウスやラットなどを用いた基礎研究による報告が多く、臨床検体を用いて検討した報告例は少ない。よって本研究では当施設にてBMI療法を施行し、特に治療効果が顕著であったBMI有効症例 (n=12) を対象に本治療メカニズムについて検討した。

これまでに、マウス下肢虚血モデルに対するBMIにおいて、BMI後の虚血筋肉内でVEGFとbFGFの発現が亢進されていたと報告されている¹⁹。また、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF)、上皮細胞増殖因子 (Epidermal Growth Factor : EGF)、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor : G-CSF) などは血管新生又は血管発生において重要な役割を担っている血管新生因子である。一酸化窒素 (nitric oxide : NO) は強力な血管拡張因子として発見されたが^{23,24}、最近では虚血後の血流回復に内皮型NO合成酵素 (endothelial NOS : eNOS) が重要な役割を担っているとの報告が相次いでおり²⁵⁻²⁸、NOの血管新生作用が注目されている。アドレノメデュリン (adrenomedullin : AM) も血管拡張因子として発見されたが²⁹、ラットECsを用いた検討ではAMはECsに対しアポトーシスの抑制作用を示したことから、AMの抗アポトーシス作用が報告されている³⁰。最近ではマウス下肢虚血モデルにおいて、虚血部へのAM投与は血流の改善を示したことから、AMの血管新生作用も報告されている^{31,32}。さらに、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVECs) を使用したin vitroの検討では、上清中にAMを添加