

することで単核球細胞の接着に關与するVCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) の発現が促進されたと報告されている³³。また、本治療メカニズムに C 反応性蛋白 (C-reactive protein : CRP)、インターロイキン 1β (interleukin 1β : IL- 1β)、IL-6など炎症性サイトカインが關与しているとの報告もされている³⁴。これらの報告から本治療メカニズムにVEGF、bFGF、HGF、EGF、G-CSF、NO、AM、sVCAM-1、CRP、IL- 1β などの血管新生關連因子が關与している可能性が考えられる。よって、本研究ではBMIを施行した各症例におけるBMI前後の各因子における血清中濃度を測定し、経時的動向を検討した。また、移植細胞数と血管新生關連因子の分泌量との關係についてはほとんど報告例がなく、本研究では移植したBM-MNCs数、CD34⁺細胞数、CD34/CD133⁺細胞数と各因子との相關關係についても検討した。

本研究では、信州大学付属病院におけるBMIの臨床成績について報告するとともに、BMI療法有効症例における血管新生關連因子のBMI前後の変動と、移植細胞数と各因子の分泌量について検討し、BMI療法の治療メカニズムについて考察した。

方法

BMI療法を行った患者は日常生活が著しく障害されている重症末梢動脈疾患で、外科的治療困難と考えられる、原則として20歳以上75歳未満の患者で、妊娠中および妊娠の可能性のある女性、なんらかの原因により余命1年未満と考えられる患者、3ヶ月以内にアルコール・薬物依存症が見られた患者、悪性腫瘍、重症の糖尿病性網膜症、重症の虚血性心疾患、脳卒中の既往、インフォームドコンセントが得られない患者については適応外とした。信州大学における適応基準は以下の通りである。

信州大学における四肢虚血性疾患に対する自己骨髄細胞移植の適応

・日常生活が著しく障害されている重症末梢動脈疾患（慢性閉塞性動脈硬化症・バージャー

病・進行性全身性硬化症・混合性結合織病等）

・原則として20歳以上75歳未満

除外項目

1. 妊娠中および妊娠の可能性のある女性
2. なんらかの原因により余命1年未満と考えられる
3. 3ヶ月以内にアルコール・薬物依存症
4. 悪性腫瘍（有する・5年以内の既往・疑い全て）
5. 重症の糖尿病性網膜症
6. 重症の虚血性心疾患
7. 脳卒中の既往
8. インフォームドコンセントが得られない
9. その他（主治医の判断）

平成15年11月より平成18年2月までにBMI療法を20例に対し施行し、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った。

全身麻酔下、両側の腸骨より骨髄液を約600ml採取した。この時、細胞分析用に骨髄液3mlをベノジェクト[®]DK[Terumo, Japan]真空採血管を用いて保存した。採取した骨髄液をAS204 [Fresenius HemoCare, Germany]を用いて単純遠心法にてBM-MNCsを分離し、50mLに濃縮した。濃縮したBM-MNCsを虚血部の下肢または上肢30~40ヶ所（ 10^8 細胞/0.5ml/1ヶ所）に26G針を用いて筋肉内投与した。

また、特に臨床成績が良好であった12例についてBMI療法有効症例における血管新生關連因子のBMI前後の変動と、移植細胞数と各因子の分泌量について検討した。12例の内訳は、年齢は30歳から71歳で、性別は男性8例、女性4例で、疾患はBuerger病9例、ASO2例、進行性全身性硬化症1例であった（表1）。

各症例の移植肢・非移植肢の末梢静脈血を移植前、移植24時間後、移植1週間後、移植2週間後、移植1ヵ月後、移植3ヵ月後、移植6ヵ月後に採取した。血清分離はベノジェクト[®]AS[Terumo, Japan]、血漿分離はベノジェクト

表1

case	age	sex	disease	Fontaine	clinical results	Thermography	DPI	DSA	Other factors
1	62	M	Buerger	IV	effective	effective	↑	collateral	
2	30	M	Buerger	IV	effective	effective	↑	collateral *	BMI+bypass
3	71	M	ASO	III	effective	effective	↑	non	
4	41	F	PXE	III	effective	effective	↑	-	
5	46	M	Buerger	II	effective	effective	↑	non	
6	44	M	Buerger	II	effective	effective	→	non	
7	60	F	ASO	IV	effective	not effective	→	non	
8	31	M	Buerger	IV	effective	effective	↑	collateral	
9	36	F	PSS	III	effective	not effective	→	non	
10	38	M	Buerger	IV	effective	effective	→	-	
11	55	M	Buerger	IV	effective	not effective	→	-	
12	56	F	Buerger	IV	effective	effective	↑	collateral	
13	49	M	Buerger	IV	effective	effective	↑	collateral	
14	30	M	Buerger	III	effective	effective	→	non	
15	62	F	CREST	IV	not effective	-	-	-	rapid progression
16	45	M	Buerger	IV	effective	effective	→	non	rapid progression
17	64	M	Buerger	III	not effective	not effective	→	-	BMI re-do, rapid, smoking
18	49	M	Buerger	III	not effective	not effective	→	-	
19	29	F	APS	IV	not effective*	not effective*	→	-	rapid progression*
20	57	F	Buerger	IV	not effective	not effective	→	-	BMI re-do, rapid progression

®DK [Terumo, Japan] 真空採血管にて抗凝固を行い、4℃下3,000rpmで10分遠心分離し、血清・血漿を分離した。分離後は-80℃にて保存した。

FACS (fluorescence activated cell sorting) による移植細胞数の測定

採取した骨髓から FACSCalibur[BD biosciences, CA]を用いて移植した細胞中の BM-MNCs数、CD34⁺細胞数、CD34/CD133⁺細胞数を測定した。CD34⁺細胞は抗CD34モノクローナル抗体 My10 [BD biosciences, CA]をCD133⁺細胞は抗CD133モノクローナル抗体AC133 [Miltenyi Biotec, Germany]用いて識別し、解析にはCELLQuest software[BD biosciences, CA]を用いた。

CRPの測定

ラテックス免疫比濁法により CRP LT2[Wako, Japan]と各血清を抗原抗体反応させBM-2250 [JEOL,Japan] を用いて、CRP濃度を測定した。

VEGF、bFGF、EGF、HGF、HGF、G-CSFの測定

血清中VEGF、bFGF、EGF、HGF、HGF、G-

CSF濃度を Luminex® システム専用アッセイキット[BioSource International, USA]を用いて分離した血清より測定した。アッセイキットに付属するマイクロフィルタープレート (96well) に wash solution (WWS) を200 μ l入れ、15秒から30秒放置後、ミリポアバキュームマニホールド [Millipore, USA]を用いて吸引し、洗浄を2回行った。VEGF、bFGF、HGF、EGF、G-CSFの Antibody Coated Beads (ACB) を使用した。このACBをボルテックスおよびソニケーションし、すぐに各ウェルに25 μ l入れ、WWSにて洗浄を2回行った。全ウェルにIncubation bufferを50 μ l入れた、Standard のウェルには Standard を100 μ l入れ、サンプルのウェルには Assay Diluentを50 μ l、サンプル50 μ l入れた。プレートにカバーをして遮光し、2時間・室温・プレートシェーカーで振とうさせた。その後、WWSにて洗浄を2回行い、各ウェルに Biotinylated Detection Antibody (BDA) を100 μ l入れ、プレートにカバーをして遮光し、1時間・室温・プレートシェーカーで振とうさせた。その後、WWSにて洗浄を2回行い、各ウェルに Streptavidin-RPE Working Solution

(SRPE) を100 μ l入れ、プレートにカバーをして遮光し、30分・室温・プレートシェーカーで振とうさせた。その後、WWSにて洗浄を3回行い、各ウェルにWWSを100 μ l入れ、プレートシェーカーで5分ほど混ぜ、Luminex-100[Luminex, USA]にて発光強度を測定し、各検量線から各因子の濃度を測定した。

NOの測定

NOは短時間で加水分解され最終的にNO₂⁻とNO₃⁻になるため、直接測定することが不可能である。そこで、NO₃⁻を還元酵素でNO₂⁻にするNO₂/NO₃ Assay kit-FX[®][Dojindo, Japan]を用い、NO₂を間接的に測定しNO_x濃度を求めた。血清中の蛋白質は本キットの酵素反応を阻害する可能性が考えられるので、マイクロコン-3[Millipore, USA]に血清を500 μ l入れ4℃・6,000rpm・60~120分遠心分離し、蛋白質の除去を行った。マイクロプレート(96well)に蛋白質除去を行ったサンプル20 μ lとBuffer Solution 60 μ lを入れた(4倍希釈)。 $[\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-]$ のstandardにはBuffer Solution 80 μ lを入れ、20 μ mol/l NaNO₂ Standard Solution 80 μ lをプレート上で系列希釈した。各ウェルにEnzyme Cofactors Solution 10 μ lとNO₃ Reductase Solution 10 μ lを加え、よく混和し、マイクロプレートに蓋をし、37℃で30分インキュベートした。30分後、取り出し室温まで放冷後、各ウェルにFluorescence Reagent (DAN) Solution 10 μ lを加え、よく混和し、室温にて15分放置した。15分放置後、各ウェルにStop Solution 40 μ lを加え、よく混和した。CYTO FLUOR[®] Series400 [Applied Biosystems, USA]で蛍光強度($\lambda_{\text{ex}} = 360\text{nm} - 365\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450\text{nm} - 465\text{nm}$)を測定し、 $[\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-]$ の検量線からNO_x濃度を求めた。

AMの測定

イムノラジオメトリックアッセイ(Immunoradiometric assay: IRMA)の原理を利用し、血清中AMの測定が可能なAMリアシオノギ[Cosmic corporation, Japan]を使用して測定を行った。ランド・チューブ5ml[B&D, USA]に血清100 μ l、Standardには各標準AM溶液を100 μ l入れた。全チューブにビオチニル

AM抗体100 μ lと125I-AM抗体溶液100 μ lとビオチン抗体個相ビーズを1個ずつ加え、よく攪拌し、全チューブに詮をして、2~8℃・18~22時間静置した。静置後、全チューブ内の液をアスピレーターで吸引除去した後、滅菌水2mlずつ加え、吸引除去を2回繰り返して洗浄した。COBRA[™] II [PACKARD]で放射能を測定し、検量線よりAM濃度を求めた。

IL-1 β の測定

Quantikine[®] Human IL-1 β [R&D systems, USA]を用いて、血清中のIL-1 β 濃度を測定した。本キットに付属する、マイクロプレートウェル(96wells)全てにAssay Diluent RD1Cを50 μ L加え、スタンダードと血清を200 μ L加え、室温で2時間インキュベートした。2時間後、Wash Bufferにて洗浄を3回繰り返して、Conjugateを200 μ L加え、室温で2時間インキュベートした。2時間後、Wash Bufferにて洗浄を3回繰り返して、Substrate Solutionを200 μ L加え、遮光し室温で20分インキュベートし、20分後にStop Solutionを50 μ L加えた。30分以内にマイクロプレートリーダーM-EMAX[Wako, Japan]にて吸高度(波長450nm,補正波長540nm又は570nm)を測定し、検量線からIL-1 β 濃度を求めた。

sVCAM-1の測定

Quantikine[®] Human sVCAM-1 [R&D systems, USA]を用いて、血清中のsVCAM-1濃度を測定した。本キットに付属する、マイクロプレートウェル(96wells)全てにsVCAM-1 Conjugateを100 μ L加え、スタンダードと血清を100 μ L加え、室温で1時間半インキュベートした。1時間半後、Wash Bufferにて洗浄を4回繰り返して、Substrateを100 μ L加え、遮光し室温で20分インキュベートし、20分後にStop Solutionを50 μ L加えた。30分以内にマイクロプレートリーダーM-EMAX[Wako, Japan]にて吸高度(波長450nm,補正波長540nm又は570nm)を測定し、検量線からsVCAM-1濃度を求めた。

統計方法

統計分析はStat View-J software[version 5.0; Abacus Concepts, CA]を用いて行った。測定さ

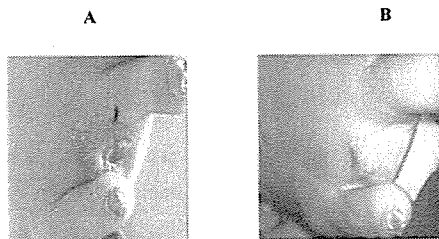


図1 症例12における下肢潰瘍
A；移植前 B；移植3ヶ月後

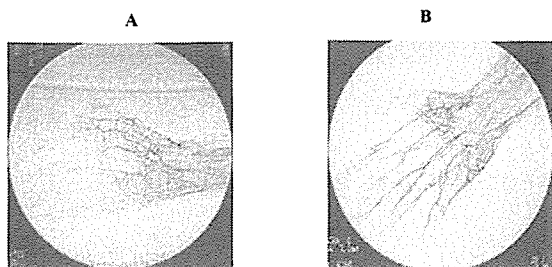


図3 症例8における動脈血管像
A；移植前 B；移植1ヶ月後

れる変数の変化は対t検定を用いて分析し、相互関係の程度はピアソンの相関係数を用いて評価した。結果はmean±SDとして表し、Pの値が0.05未満だったとき、統計学的に有意であると考えた。

結果

BMI症例20例における全体の奏効率は75%（有効15例、無効5例）であった（表1）。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。

有効群においては虚血性潰瘍を認めた8例中全例で潰瘍の治癒が見られ、安静時痛も4例中全例で改善した（図1）。サーモグラフィーを用いた画像検査によると、移植3ヵ月後に虚血部での表面温度の上昇が確認できた（図2）。動脈血管像所見によると、効果の早い症例では移植1ヵ月後に本治療にて形成されたと考えられる末梢血管が確認された（図3）。

VEGFの動向（図4）

移植肢における血清中VEGFの変動を経時的にみると、移植前(40.25±23.34pg/ml)に比べ移

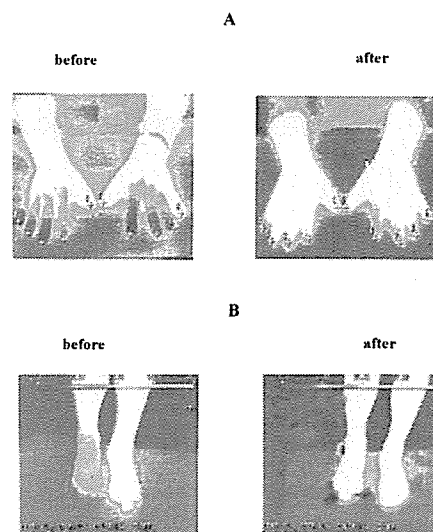


図2 BMI前後におけるサーモグラフィー像
A；症例9の左右上肢（移植前；左 移植3ヶ月後；右）
B；症例12の右上下肢（移植前；左 移植3ヶ月後；右）

植1週間後（66.44±17.43pg/ml, P<0.01）、移植2週間後（76.57±32.77pg/ml, P<0.01）、移植4週間後（72.54±28.25pg/ml, P<0.05）、移植3ヶ月後（71.18±26.15pg/ml, P<0.05）と有意な上昇を認めた（図4-a）。移植前と移植後の最高値とを比較したところ、移植後最高値（76.39±48.41pg/ml, P<0.01）は移植前に比べ有意な上昇を認めた（図4-b）。

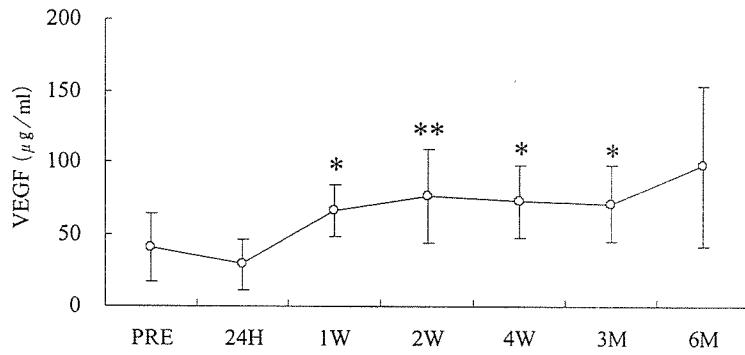
bFGFの動向（図5）

移植肢における血清中bFGFの変動を経時的にみると、移植前（27.88±5.86pg/ml）に比べ移植1週間後から3ヶ月後に上昇傾向を認めるものの、移植後に有意な上昇を認めなかった（図5-a）。移植前と移植後の最高値とを比較したところ、移植後最高値（45.86±12.47pg/ml, P<0.05）は移植前に比べ有意な上昇を認めた（図5-b）。

EGFの動向（図6）

移植肢における血清中EGFの変動を経時的にみると、移植前（101.20±37.55pg/ml）に比べ移植後に上昇傾向を認めるものの、移植後に有意な上昇を認めなかった（図6-a）。移植前と移植後の最高値とを比較したが、移植後最高値（150.83±46.76pg/ml）は移植前に比べ有意な上昇を認めなかった（図6-b）。

A



B

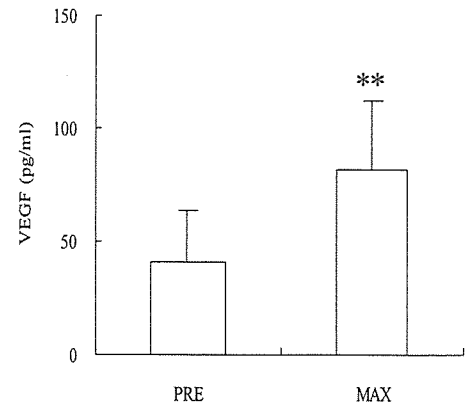
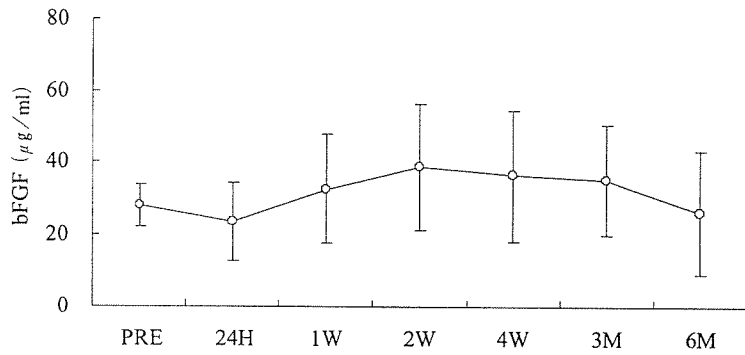


図4 BMI療法における血清中VEGF濃度の変化 (n=12)。A; BMI療法における血清中VEGFの経時的変化。B; BMI前後の血清中VEGF濃度の比較。MAX: 移植後の血清最高値。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. PRE。

A



B

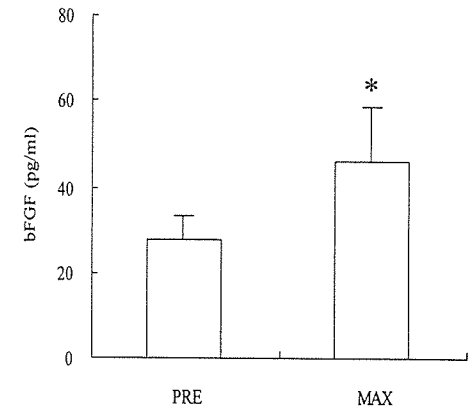
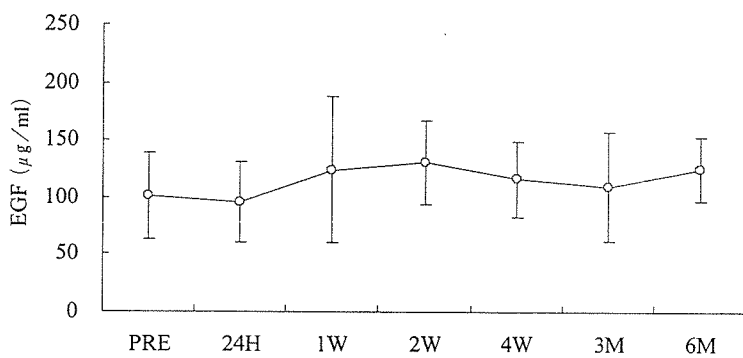


図5 BMI療法における血清中bFGF濃度の変化 (n=12)。A; BMI療法における血清中bFGFの経時的変化。B; BMI前後の血清中bFGF濃度の比較。MAX: 移植後の血清最高値。* $P<0.05$, vs. PRE。

A



B

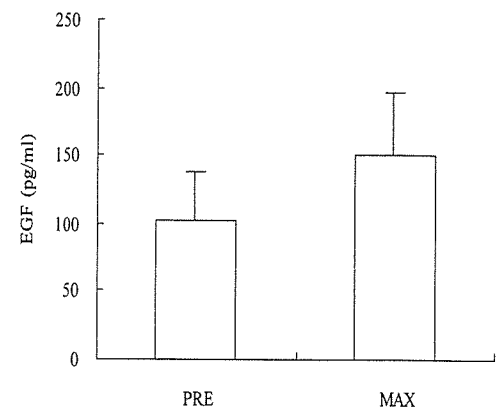


図6 BMI療法における血清中EGF濃度の変化 (n=12)。A; BMI療法における血清中EGFの経時的変化。B; BMI前後の血清中EGF濃度の比較。MAX: 移植後の血清最高値。

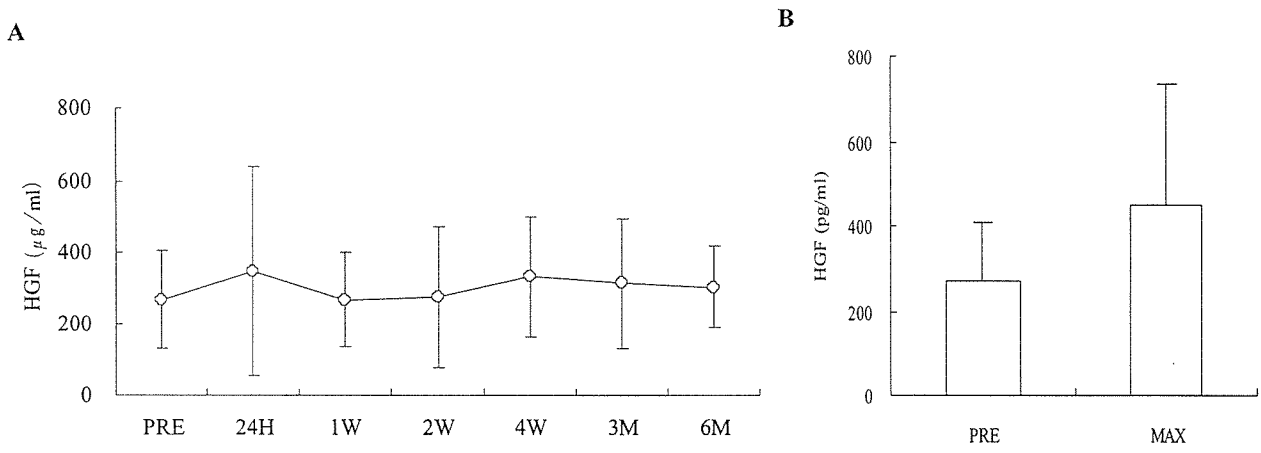


図7 BMI療法における血清中HGF濃度の変化 (n=12)。A; BMI療法における血清中HGFの経時的変化。B; BMI前後の血清中HGF濃度の比較。MAX: 移植後の血清最高値。

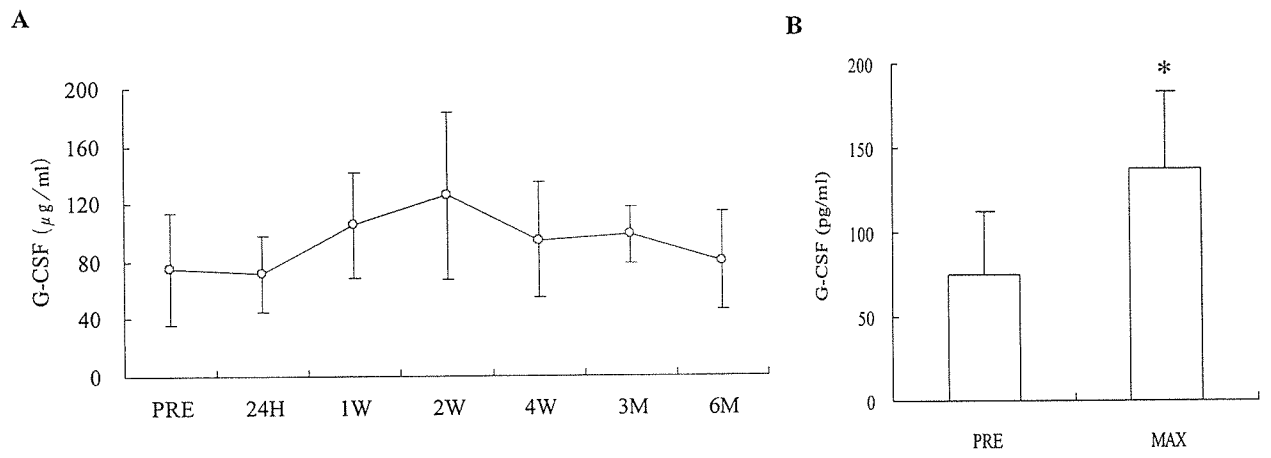


図8 BMI療法における血清中G-CSF濃度の変化 (n=12)。A; BMI療法における血清中G-CSFの経時的変化。B; BMI前後の血清中G-CSF濃度の比較。MAX: 移植後の血清最高値。* $P < 0.05$, vs. PRE。

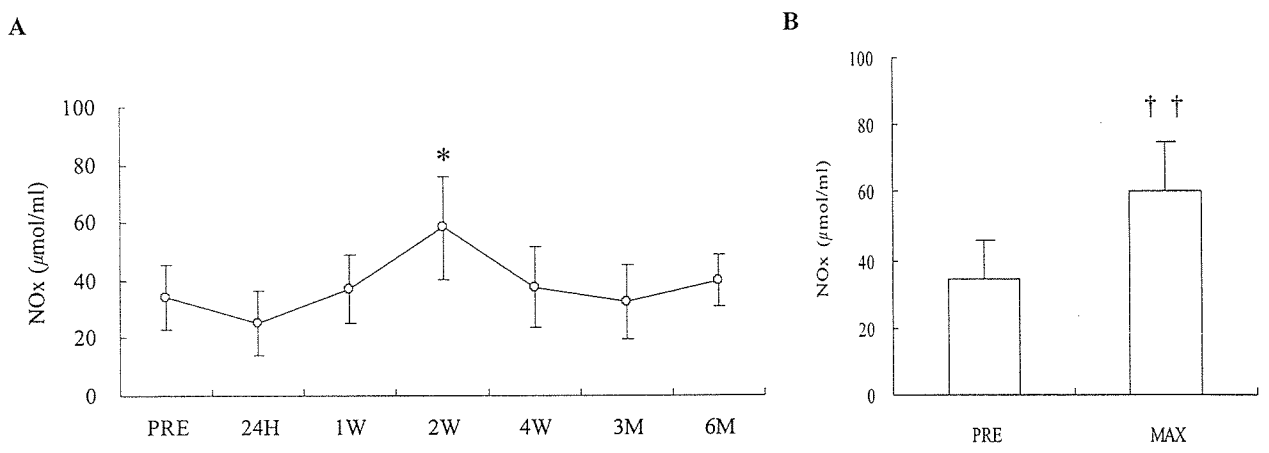


図9 BMI療法における血清中NOx濃度の変化 (n=12)。A; BMI療法における血清中NOxの経時的変化。B; BMI前後の血清中NOx濃度の比較。MAX: 移植後の血清最高値。* $P < 0.05$, †† $P < 0.001$ vs. PRE。

HGFの動向 (図7)

移植肢における血清中HGFの変動を経時的にみると、移植前 ($327.59 \pm 108.50 \text{ pg/ml}$) に比べ移植後に有意な上昇を認めなかった (図7-a)。移植前と移植後の最高値とを比較したが、移植後最高値 ($445.33 \pm 286.66 \text{ pg/ml}$) は移植前に比べ有意な上昇を認めなかった (図7-b)。

G-CSFの動向 (図8)

移植肢における血清中G-CSFの変動を経時的にみると、移植前 ($74.97 \pm 38.57 \text{ pg/ml}$) に比べ移植1週間後から3ヶ月後までに上昇傾向を認めるものの、移植後に有意な上昇を認めなかった (図8-a)。移植前と移植後の最高値とを比較

したところ、移植後最高値 ($138.38 \pm 144.87 \text{ pg/ml}$, $P < 0.05$) は移植前に比べ有意な上昇を認めた (図8-b)。

NOの動向 (図9)

移植前後の血清中NO_x濃度を経時的にみると、移植肢においては移植前 ($34.43 \pm 11.17 \mu \text{ mol/l}$) に比べ移植2W後 ($58.20 \pm 17.71 \mu \text{ mol/l}$, $P < 0.05$) に有意な上昇を認めた (図9-a)。さらに、移植前と移植後までの最高値との比較を行ったところ、移植後最高値 ($60.58 \pm 14.51 \mu \text{ mol/l}$) は移植前に比べ有意な上昇を認めた (図9-b)。

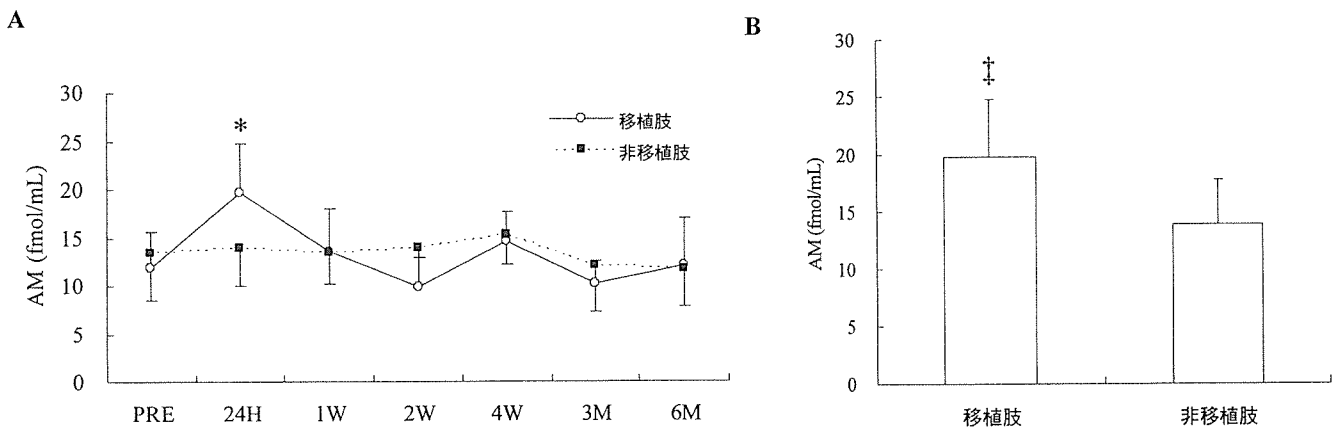


図10 BMI療法における血清中AM濃度の変化 (n=12)。a; BMI療法における血清中AMの経時的变化。b; BMI24時間後の移植肢と非移植肢における血清中AM濃度の比較。
* $P < 0.05$ vs. PRE, † $P < 0.005$ vs. 非移植肢。

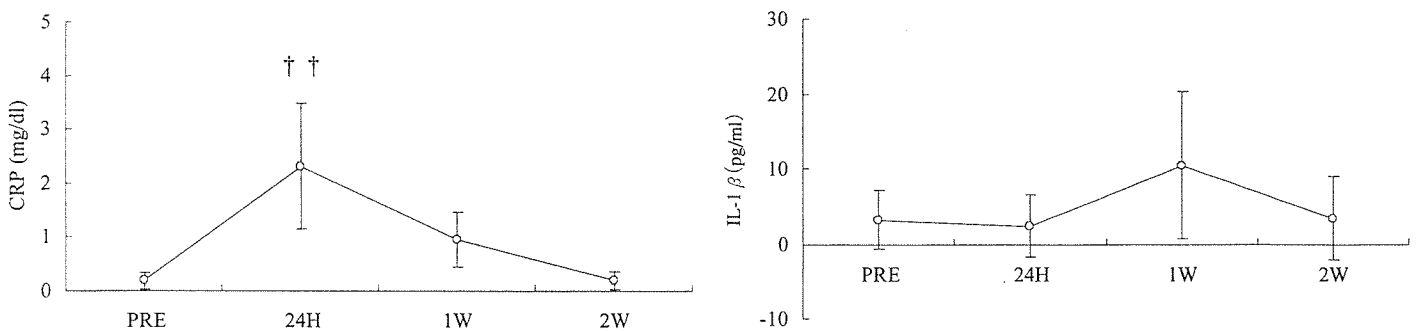


図11 BMI療法における血清中CRPの経時的变化 (n=12)。
† † $P < 0.001$ vs. PRE。

図12 BMI療法における血清中IL-1βの経時的变化 (n=12)。

AMの動向 (図10)

移植前後における血清中AM濃度を経時的にみると、移植肢においては移植前 ($11.80 \pm 3.37 \text{ fmol/ml}$) に比べ移植24時間後 ($19.72 \pm 5.09 \text{ fmol/ml}$, $P < 0.05$) に一過性の有意な上昇を認めた (図10-a)。また、非移植肢においては移植前に比べ移植後に有意な上昇を認めなかった。移植肢と非移植肢との比較を行ったところ、移植肢の移植24時間後 ($19.72 \pm 5.09 \text{ fmol/ml}$, $P < 0.05$) は非移植肢の移植24時間後 ($13.86 \pm 3.30 \mu \text{ mol/ml}$) に比べ有意な上昇を認めた (図10-b)。

表2：移植細胞数

症例	骨髓液量 (ml)	BM-MNCs ($\times 10^9$)	CD34 Cells ($\times 10^7$)	CD34/CD133 Cells ($\times 10^7$)
1	557	3.82	2.93	1.02
2	615	5.03	8.65	3.02
3	661	3.65	6.10	1.68
4	603	4.00	3.08	1.36
5	666	ND	ND	ND
6	618	4.53	5.85	2.40
7	647	4.80	4.70	2.61
8	676	3.11	3.48	1.93
9	628	3.11	3.14	1.55
10	718	4.74	6.59	3.41
11	606	4.31	4.57	1.64
12	620	3.25	2.70	1.33
mean \pm SD	634 \pm 41	4.03 \pm 0.70	4.71 \pm 1.90	2.00 \pm 0.76

ND; not detectable

CRPの動向 (図11)

移植肢における血漿中CRPの変動を経時的にみると、移植前 ($0.18 \pm 0.15 \text{ mg/dl}$) に比べ移植24時間後 ($2.31 \pm 1.16 \text{ mg/dl}$, $P < 0.001$) に一過性の有意な上昇を認めたが、移植1週以降は有意な上昇を認めなかった (図11-a)。

IL-1 β の動向 (図12)

移植肢における血清中IL-1 β の変動を経時的にみると、移植前 ($3.21 \pm 3.98 \text{ pg/ml}$) に比べ移植1週間後 ($6.11 \pm 9.82 \text{ pg/ml}$) に上昇傾向は認められたが、移植後に有意な上昇を認めなかった (図12)。

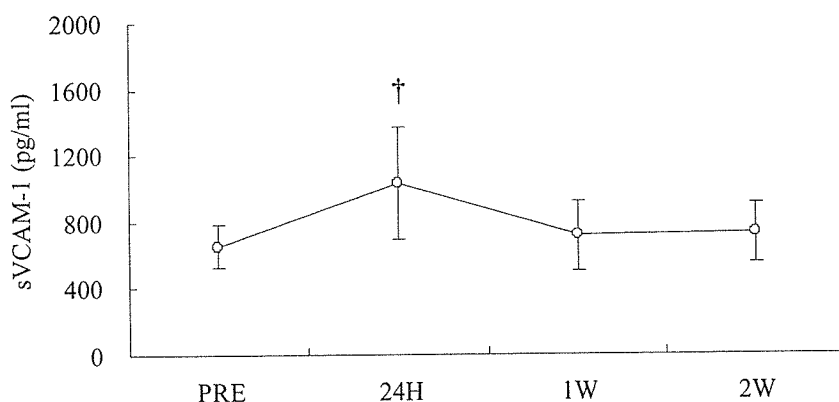
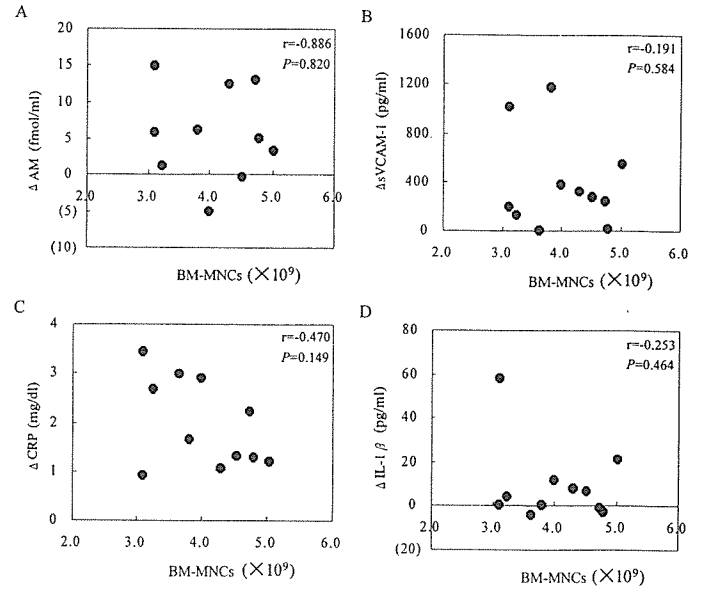
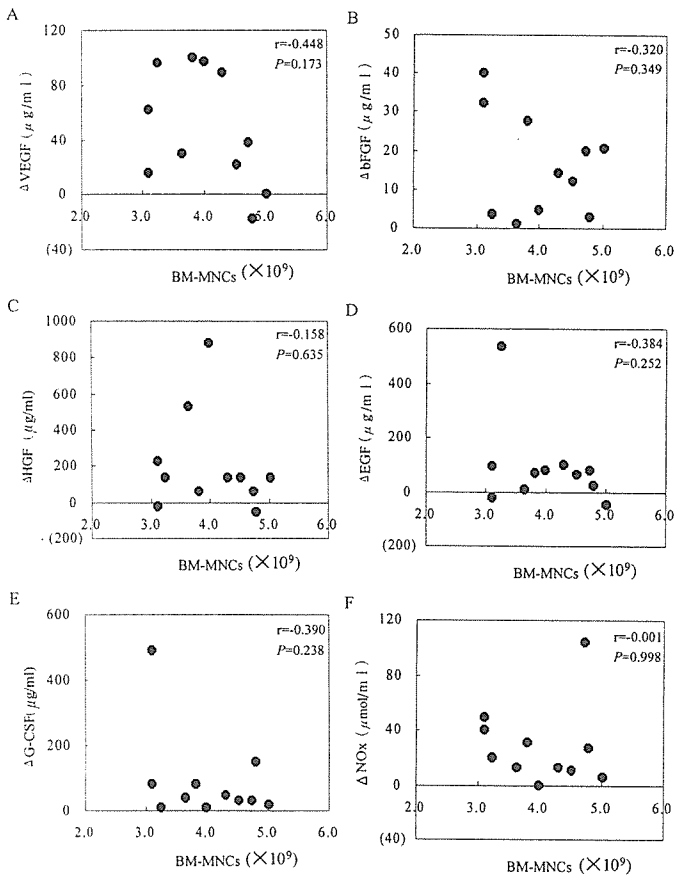


図13 BMI療法における血清中sVCAM-1の経時的変化 (n=12) † $P < 0.005$ vs. PRE。

sVCAM-1の動向 (図13)

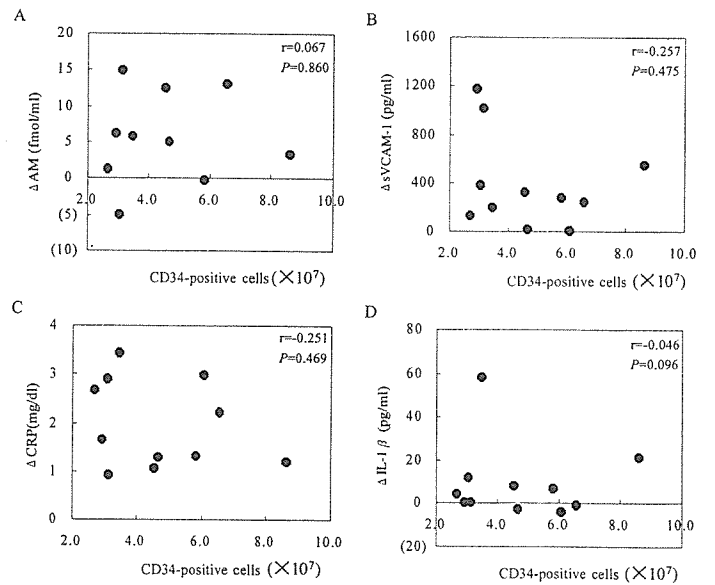
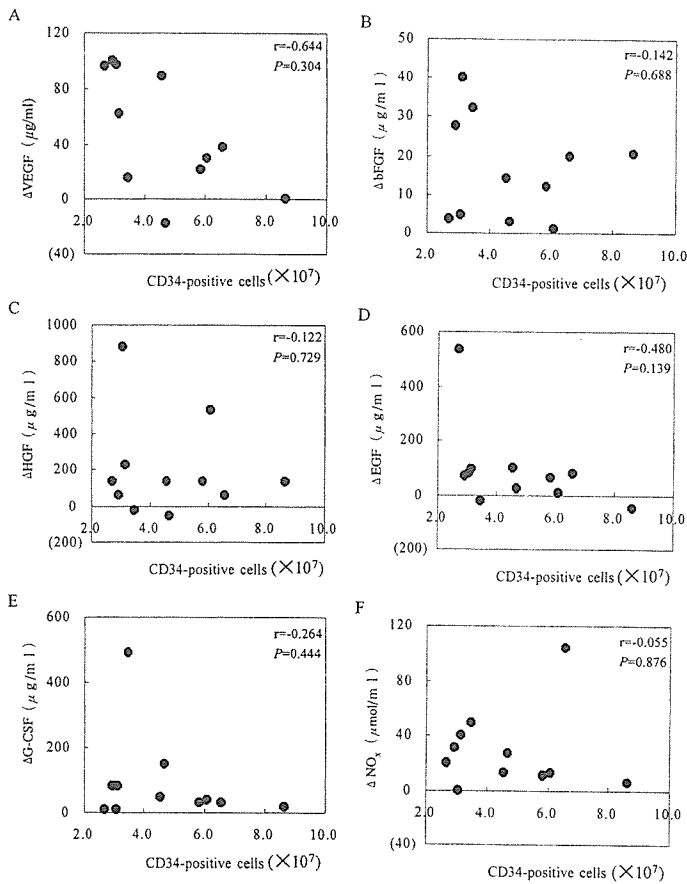
移植肢における血清中 sVCAM-1 の変動を経時的にみると、移植前 ($587.41 \pm 130.61 \text{ pg/ml}$)

に比べ移植24時間後 ($968.26 \pm 337.71 \text{ pg/ml}$, $P < 0.005$) に有意な上昇を認めたが、移植1週以降は有意な上昇を認めなかった (図13)。



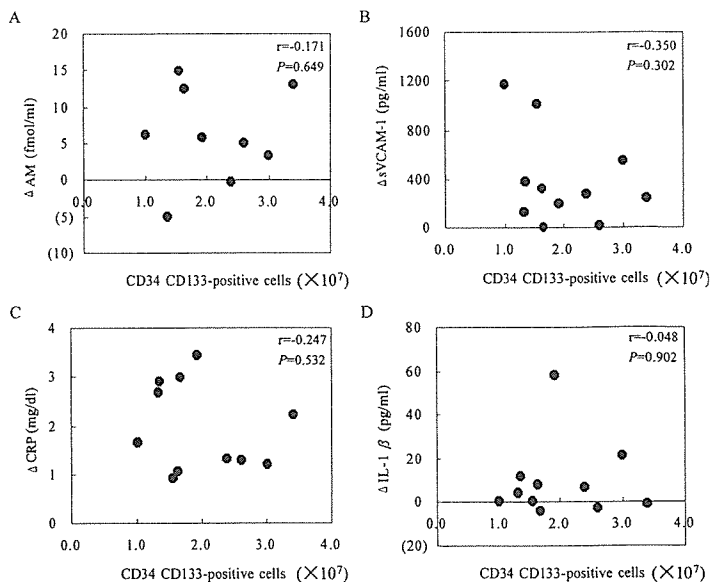
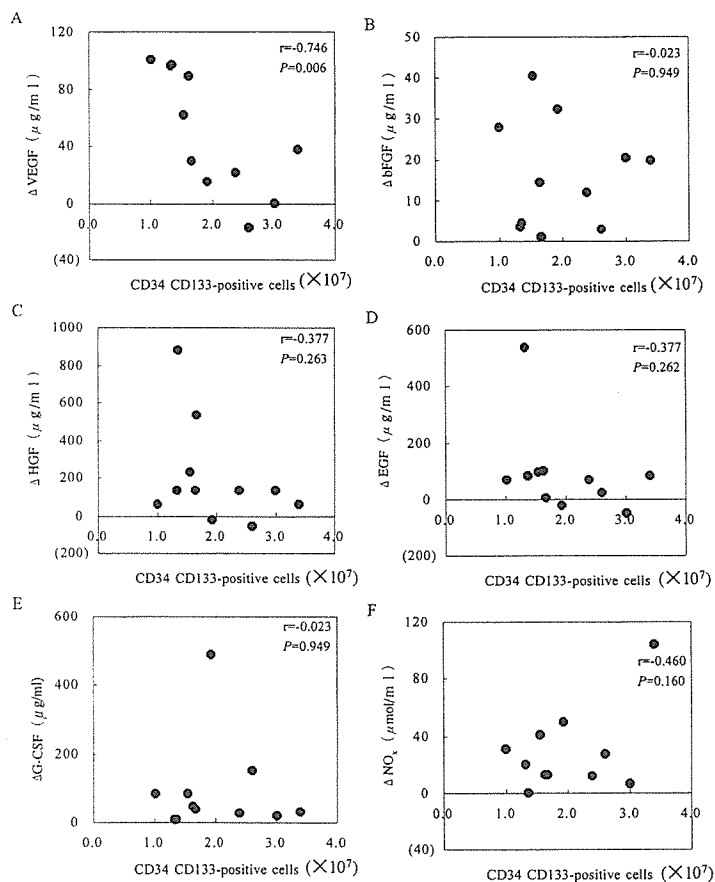
←図14 BMI療法における Δ HGF、EGF、G-CSF、VEGF、bFGFと移植したBM-MNCs数の関係 (n=11)
 Δ : 移植後血清最高値-移植前血清値

↑図15 BMI療法における Δ AM、sVCAM-1、CRP、IL-1 β と移植したBM-MNCs数の関係 (n=11)
 Δ : 移植後血清最高値-移植前血清値



←図16 BMI療法における Δ HGF、EGF、G-CSF、VEGF、bFGFと移植したCD34⁺細胞数の関係 (n=11)
 Δ : 移植後血清最高値-移植前血清値

↑図17 BMI療法における Δ AM、sVCAM-1、CRP、IL-1 β と移植したCD34⁺細胞数の関係 (n=11)
 Δ : 移植後血清最高値-移植前血清値



←図18 BMI療法におけるΔHGF、EGF、G-CSF、VEGF、bFGFと移植したCD34/CD133⁺細胞数の関係 (n=11)
Δ：移植後血清最高値-移植前血清値

↑図19 BMI療法におけるΔAM、sVCAM-1、CRP、IL-1βと移植したCD34/CD133⁺細胞数の関係 (n=11)
Δ：移植後血清最高値-移植前血清値

移植細胞数と各因子との相関

各症例の腸骨より635±42mlの骨髓液を得た。各症例に移植したBM-MNCsは4.0±0.7×10⁹個であった。BM-MNCs中のCD34⁺細胞は4.7±1.9×10⁷個で、CD34/CD133⁺細胞は平均して2.0±0.8×10⁷個であった(表2)。移植したBM-MNCs数とΔVEGFの間には有意な相関関係は認めなかった(図14-A, r=-0.448, P=0.173)。移植したBM-MNCs数とΔbFGFの間には有意な相関関係は認めなかった(図14-B, r=-0.320, P=0.349)。移植したBM-MNCs数とΔHGFの間には有意な相関関係は認めなかった(図14-C, r=-0.158, P=0.653)。移植したBM-MNCs数とΔEGFの間には有意な相関関係は認めなかった(図14-D, r=-0.384, P=0.252)。移植したBM-MNCs数とΔG-CSFの間には有意な相関関係は認めなかった(図14-E, r=-0.394, P=0.238)。移植したBM-MNCs数とΔNO_xの間には有意な相関関係は認めなかった(図14-F, r=-0.001, P=0.998)。移植したBM-MNCs数とΔAMの間には有意な相関関係は認めなかった(図15-A, r=-0.086, P=0.820)。移植したBM-MNCs数とΔsVCAM-1

の間には有意な相関関係は認めなかった(図15-B, r=-0.191, P=0.594)。移植したBM-MNCs数とΔCRPの間には有意な相関関係は認めなかった(図15-C, r=0.470, P=0.149)。移植したBM-MNCs数とΔIL-1βの間には有意な相関関係は認めなかった(図15-D, r=-0.253, P=0.464)。移植したCD34⁺細胞数とΔVEGFの間には有意な相関関係は認めなかった(図16-A, r=-0.644, P=0.304)。移植したCD34⁺細胞数とΔbFGFの間には有意な相関関係は認めなかった(図16-B, r=0.142, P=0.688)。移植したCD34⁺細胞数とΔHGFの間には有意な相関関係は認めなかった(図16-C, r=-0.122, P=0.729)。移植したCD34⁺細胞数とΔEGFの間には有意な相関関係は認めなかった(図16-D, r=-0.480, P=0.139)。移植したCD34⁺細胞数とΔG-CSFの間には有意な相関関係は認めなかった(図16-E, r=-0.264, P=0.444)。移植したCD34⁺細胞数とΔNO_xの間には有意な相関関係は認めなかった(図16-F, r=0.055, P=0.876)。CD34⁺細胞数とΔAMの間には有意な相関関係は認めなかった(図17-A, r=0.067, P=0.860)。移植したCD34⁺細胞数とΔsVCAM-1

の間には有意な相関関係は認めなかった(図17-B, $r=-0.257$, $P=0.475$)。移植したCD34⁺細胞数と Δ CRPの間には有意な相関関係は認めなかった(図17-C, $r=0.251$, $P=0.469$)。移植したCD34⁺細胞数と Δ IL-1 β の間には有意な相関関係は認めなかった(図17-D, $r=-0.046$, $P=0.096$)。移植したCD34/CD133⁺細胞数と Δ VEGFの間には有意な相関関係は認めなかった(図18-A, $r=-0.746$, $P=0.006$)。移植したCD34/CD133⁺細胞数と Δ bFGFの間には有意な相関関係は認めなかった(図18-B, $r=-0.233$, $P=0.949$)。移植したCD34/CD133⁺細胞数と Δ HGFの間には有意な相関関係は認めなかった(図18-C, $r=-0.377$, $P=0.263$)。移植したCD34/CD133⁺細胞数と Δ EGFの間には有意な相関関係は認めなかった(図18-D, $r=-0.377$, $P=0.262$)。移植したCD34/CD133⁺細胞数と Δ G-CSFの間には有意な相関関係は認めなかった(図18-E, $r=-0.023$, $P=0.949$)。移植したCD34/CD133⁺細胞数と Δ NO_xの間には有意な相関関係は認めなかった(図18-F, $r=0.460$, $P=0.160$)。移植したCD34/CD133⁺細胞数と Δ AMの間には有意な相関関係は認めなかった(図19-A, $r=0.171$, $P=0.649$)。移植したCD34/CD133⁺細胞数と Δ sVCAM-1の間には有意な相関関係は認めなかった(図19-B, $r=0.350$, $P=0.302$)。移植したCD34/CD133⁺細胞数と Δ CRPの間には有意な相関関係は認めなかった(図19-C, $r=-0.217$, $P=0.532$)。移植したCD34/CD133⁺細胞数と Δ IL-1 β の間には有意な相関関係は認めなかった(図19-D, $r=0.048$, $P=0.902$)。

考察

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髄細胞移植による血管再生療法を20例に対し施行し、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・サーモグラフィー・動脈造影検査等を用いて行い、比較的良好な結果を得た。現在までに、当院にて自己骨髄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。ともに後半期に移植を行った症例で、前半期に移植を施行してきた症例に比べ移植適応の判断に苦慮する症例であった。

信州大学における閉塞性動脈硬化症の治療症例は、初期にBMIを施行した2例を除いて全例とも血管内治療ないし外科的治療にて治療され、自己骨髄細胞移植を施行した症例はなかった。このため、自己骨髄細胞移植を施行した7例は、Buerger病を含めた難治性血管炎症例のみとなった。この傾向は今後も続くものと考えられ、閉塞性動脈硬化症に比べ症例数は少ないものの難治性血管炎に対する治療としての自己骨髄幹細胞移植治療の重要性は今後さらに高まるものと考えている。

信州大学における自己骨髄細胞移植の適応は2003年の自己骨髄細胞移植開始当初より変わっていない。この中で、自己骨髄細胞移植適応の除外項目9「その他(主治医の判断)」として、透析症例における重症虚血肢が挙げられる。平成17年度から透析重症例の紹介患者が増加しているが、紹介された時点で足指壊疽に陥っている症例が多く、表2の適応基準に当てはまる症例であっても、自己骨髄細胞移植により症状の改善の見込みが低いと想定される透析症例に対し、自己骨髄細胞移植治療を勧めていない現状である。

平成16年度の班会議において、平成16年度までに信州大学において自己骨髄細胞移植を行い、その効果を評価し得ていた10例全例に症状の改善を得たことを報告した。自己骨髄細胞移植の効果は、これまで同様に潰瘍の縮小や治癒、安静時痛の消失などの症状の変化およびサーモグラフィーの変化、DPIの変動、動脈造影検査所見などの他覚的検査により行っている。平成17

～18年度は、効果を評価し得ている移植症例10例中5例で有効、5例で無効であった。無効であった5例はともにこれまでに自己骨髄細胞移植行ってきた症例と比べると適応に苦慮する症例であった。今後、症例の蓄積とともに無効症例の検討も重要になってくるものと考えられる。

症例15(62歳・女性 CREST症候群)は、虚血により足底部を中心に広範囲の壊疽および潰瘍形成を認め色調不良な足底筋が露出した状態であった。短期間に潰瘍の増悪を認めており、術前より救肢困難と判断されたが、本人の治療希望強く、状態の改善が得られれば皮膚移植の可能性も考えられた。移植後、露出した足底筋組織の経時的变化の観察が可能であったが、自己骨髄細胞移植により、CREST症候群の血管病変による潰瘍の増悪傾向を止めることはできなかった。また、症例17(65歳・男性 Buerger病)は、信州大学における第1例目の自己骨髄細胞移植症例であり、症状の増悪のため2回目の自己骨髄細胞移植を施行した。初回の移植により安静時痛は明らかに改善したが、消失は得られず、さらに移植後1年後頃より徐々に安静時痛の再増悪を認めていたため本人が再移植を強く希望した。安静時痛の改善により移植は有効と判断したが、有効群の中で比べると、最も移植効果の低い症例であった。骨髄細胞数が少ないため、2回目の移植では術前にG-CSFを併用した。2回目の移植による安静時痛の改善は、ほとんど得られなかった。信州大学の経験では、BMIのre-do症例および症状の増悪期にBMIを行った症例で治療成績が不良な傾向にあった。

当初、BMI療法は血管新生療法として開発されたが、その後移植されたBM-MNCsが移植の7日後までに虚血筋肉から消えることや¹⁷、移植したBM-MNCsのアポトーシスがBMI後に虚血筋肉で起こることが報告された³⁵。さらに、in vitroにおいて骨髄細胞におけるVEGFの発現は正常酸素状態に比べ低酸素状態のほうが多く発現されることや³⁶、BMI2週間後の虚血組織においてVEGFやbFGFなどの血管新生因子が発現していたことが報告されており¹⁹、BMI療法の治療メカニズムとしては血管新生因子を分泌するパラクライン作用が重要であると考えられている。臨

床検体を用いた本研究においてもBMI後にVEGFとbFGFの有意な上昇を認めた。特に、VEGFは移植1週間～3ヶ月後の間で有意な上昇を認めた。bFGFは上昇時期が各症例で異なるものの、移植1週間～3ヶ月後の間で上昇傾向を示した。よって、今回の症例においてはこれまでの報告同様にBMIの1週間～3ヶ月後の間でVEGFとbFGFが分泌され、パラクライン作用が本治療メカニズムに関与しているものと考えられた。

G-CSFはCD34⁺細胞を骨髄から末梢血へ動員するサイトカインである³⁷。血管発生(vasculogenesis)において、CD34⁺細胞(EPCs)の動員が重要であることは証明されている⁶。また、最近G-CSFの筋肉注射は血管新生を増加させ、そのメカニズムとしてEPCsの動員とは無関係であることが報告された³⁸。本研究にてG-CSFはBMI後の上昇を認めた。G-CSFの上昇時期は各症例で異なるもののVEGFやbFGFと同様に移植1週間～3ヶ月後の間で上昇傾向を示した。よって、G-CSFもVEGFとbFGF同様にパラクライン作用として本治療メカニズムに関与している可能性が考えられた。また、BMI後にG-CSFがEPCsを動員している可能性も考えられた。

NOは内皮型NO合成酵素(endothelial NO synthase : eNOS)より産生され、血管新生、血管緊張や血圧の規制などの血管生物学において重要役割をしている血管拡張因子である³⁹。これまでにVEGFとbFGFはeNOSの発現を促進させることは証明されおり^{40,41}、それら増殖因子によるNOの分泌は血管新生作用には不可欠である。Muroharaら⁴²は四肢虚血における血管新生がeNOSノックアウトマウスはワイドタイプマウスに比べて正常に機能しないことを示した。Amanoら⁴³はeNOS過剰発現遺伝子組み換えマウスを用いて、eNOSが虚血組織において新生血数を増すことを報告した。Nambaら⁴⁴はウシeNOSプラスミドの筋肉注射はラット下肢虚血モデルにおいて治療的血管新生を増加させたと報告した。Junら²⁵はeNOS(-/-)の下肢虚血モデルにEPCsを移植したところ、虚血肢での血流の改善は認めなかったが、eNOSを発現するアデノウイルスを投与したところ血流の改善を認めた報告している。さらに、eNOSの基質であ

るL-アルギニンの投与⁴⁵や虚血肢への温熱療法²⁸はeNOSの発現を増強し、虚血肢の血流の改善に参与していると報告している。したがってNOは組織虚血に反応する血管新生に重要な調整分子である。また、EPCs又は骨髄由来の幹細胞は下肢虚血における血管新生において重要な役割を担っているが、Aicherら⁴⁶はeNOSがEPCsや幹細胞の動員において重要な役割を担っていることを証明した。本研究でもNOxは移植2週間後に有意な上昇を認め、BMIへの関与を示唆した。さらに、本研究ではNOxの上昇がVEGF、bFGF、G-CSFの上昇時期と一致していた。よって、BMI療法においてNOは血管新生因子の発現や血液由来の細胞の動員に参与しているかもしれない。また、今回の症例における移植後の動脈血管像所見によると、移植前に確認できなかった血管が確認されている。BMIの効果の早い症例においては移植1ヶ月後から確認でき、移植細胞が血管新生に参与しているものと仮定しても治療効果に見合う血管が同時期に新たに構築されるとは考えにくい。このためBMIにより虚血部で誘発されたNOによる血管拡張作用が参与している可能性も考えられた。本研究では最近、血管新生因子として注目され、抗アポトーシス作用³⁰も示すと報告されているAMについての検討も行った。AMは1993年に強力な血管拡張作用を有する血管作動性ペプチドとして発見されたが²⁹、AMノックアウトマウスでは胎生致死であると報告されたことから血管新生因子として注目を浴びた⁴⁷⁻⁴⁹。2001年にShindoら⁴⁷は、AMは血管拡張作用以外にも細胞間の接着を強固にして基底膜を安定化させ、浮腫を防止し、血管を維持する働きをしていると報告している。さらに、彼らは2004年にマウス下肢虚血モデルを用いた実験ではAM投与群はVEGF投与群と同様の血流の改善を見せ、HUVECsを用いたin vitroの実験ではVEGFの発現亢進とVEGFによるPI3K-Akt-eNOS経路の増強を示したと報告している³¹。Iwaseら³³は、ラット下肢虚血に対するBMIにおいてAMの局所投与は移植24時間後におこるBM-MNCsのアポトーシスの抑制を認め、治療効果の向上を認めたと報告した。さらに彼らはin vitroにて

HUVECs上でAMの添加はVCAM-1やICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) などの細胞接着因子の発現を強化し、BM-MNCsのHUVECsへの接着率を高めたと報告した。本研究では移植24時間後にAMの一過性の有意な上昇を認めた。さらに、同時期にsVCAM-1の有意な一過性の上昇を認めた。VCAM-1はBM-MNCsのECsへの接着を用意することが示されている⁵⁰。つまり、AMは移植24時間後に起こる移植細胞のアポトーシスを抑制し、移植細胞の接着に参与するVCAM-1の発現の強化に参与している可能性を示唆した。

2001年のHamanoら⁵¹のラット下肢虚血モデルに骨髄細胞を筋肉注射した検討では、移植後にbFGFとIL-1 β の発現量の増加が確認できたと報告している。さらに、2006年にTatenoら³⁴による末梢血単核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells : PB-MNCs) を末梢血管疾患対象に移植した臨床報告では、治療有効群は無効群に比べ移植後に血漿中のCRP、IL-1 β 、IL-6、VEGFが有意な上昇を認め、細胞移植の治療メカニズムに炎症性のサイトカインが参与していると報告した。そして彼らは、IL-1 β が骨格筋より発現されていることを確認し、IL-1 β (-/-)マウスなどを用いた検討で、本治療メカニズムは移植細胞がなんらかの形で骨格筋組織を刺激することで非移植組織由来の血管新生因子を持続的に誘導分泌していると報告した。これらの報告は細胞移植に炎症が参与している可能性を示唆している。本研究では移植24時間後にCRPの一過性の上昇は認めた。本研究において移植24時間後に上昇を認めたAMとsVCAM-1は炎症性因子などにより分泌を調整されている^{53,53}。よって、BMIへの炎症の関与を示唆し、この炎症によりAMとsVCAM-1の分泌が誘導された可能性が考えられた。また、IL-1 β は有意な上昇は認めなかったが、IL-1 β などの炎症性サイトカインは今回有意な上昇を認めたVEGFなどの血管新生因子を誘導するとの報告もあり⁵⁴、BMI後に分泌されるVEGFやbFGFなどはBMIによるなんらかの機序による炎症が起因している可能性も考えられる。

本研究結果は早期反応群と後期反応群に分け

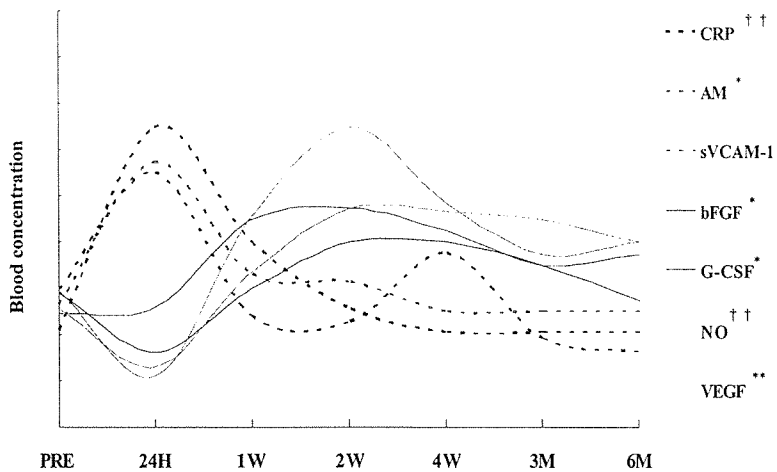


図20 BMI療法における血管新生関連因子の動向。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, † $P < 0.005$, †† $P < 0.001$ vs PRE.

て考えることができる (図20)。早期反応群は移植24時間後に一過性の上昇を示したAM、CRP、sVCAM-1である。後期反応群は移植1週間～3ヶ月後の間で上昇していたVEGF、bFGF、G-CSF、NOである。早期反応群は、CRPの有意な上昇を認めたことからBM-MNCsを虚血部に移植することで生体内において何らかの炎症反応が起こっていることを示唆した。そしてそれは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。後期反応群は新生血管の構築に参与する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た。

移植細胞数と治療効果の関係については、2004年のKatoら²⁰のBM-MNCsを末梢動脈閉塞性疾患に移植した臨床報告では、移植するBM-MNC又はCD34⁺細胞が新生血管の構築に最も重要な役割を担うことから、移植したBM-MNCs中のCD34⁺細胞数と移植後の Δ ABPI (ankle-brachial pressure index) は相関していたと報告している。Kinnairdら¹⁸のマウス下肢虚血モデルにおけるBMIにおいても移植した骨髄ストローマ細胞数と治療効果の関与を報告した。一方では、2005年にNizankowskiら²²はBM-MNCs中のCD34⁺細胞数と臨床効果に相関は認めなかったと報告している。我々は2006年に末梢閉塞性疾患における上肢虚血患者を対象にしたBMIにおいて、移植したBM-MNCs中の

CD34⁺細胞数、CD34/CD133⁺細胞数は Δ DBI (digital/brachial pressure index) と Δ VAS (Visual analogue scale) とは相関していなかったと報告した²¹。2006年のTatenoraら³⁴によるPB-MNCsを移植した検討では、PB-MNCs中のCD34⁺細胞と臨床効果は相関していなかったと報告し、BM-MNCsとPB-MNCsを下肢虚血マウスに移植した検討では、BM-MNCsに比べEPCが少ないPB-MNCsにおいてもBM-MNCsと同様の血流の改善を認めたと報告した。さらに、PB-MNCsにおけるVEGFR⁺細胞群と非VEGFR⁺細胞群を下肢虚血マウスに

移植した検討では、VEGFR⁺細胞群と非VEGFR⁺細胞群は同様の血流の改善を認め、本治療法においてEPCs数は関係しないのではないかと報告している。そして、彼らはむしろBM-MNCsに比べ多くの血管新生因子やサイトカインを多く生産するPB-MNCs⁵⁵⁻⁵⁶の方が血管新生では重要ではないかと報告している。その他にも、BMIにはCD117⁺細胞⁵⁷又は赤血球系細胞⁵⁸が最も重要な役目を担っている、との報告もされており移植細胞の種類や移植細胞数、治療効果についての因果関係は解明されていない。本研究では移植したBM-MNCs、CD34⁺細胞、CD34/CD133⁺細胞数と血管新生関連因子の分泌量の関係について検討したが、移植したBM-MNCs、CD34⁺細胞、CD34/CD133⁺細胞数と血管新生関連因子の分泌量には相関関係を認めなかった。今回の症例に関しては634 \pm 41mlの骨髓液から4.0 \pm 0.7 \times 10⁹個のBM-MNCs、4.7 \pm 1.9 \times 10⁷個のCD34⁺細胞、2.0 \pm 0.8 \times 10⁷個のCD34/CD133⁺細胞を得ており、この量は今回の症例全てにおいて治療効果を得るには十分な量であった為、相関関係を認めなかったのかもしれない。これらについては今後さらに検討していく必要があると考えられる。

これまでに、欧米を中心にVEGF⁵、FGF⁴、HGF⁵⁹の単独因子による末梢閉塞性疾患に対する血管新生療法として臨床試験が行われているが、無作為割付による臨床試験では一貫した治

療効果を認めないのも、本結果でも示したように血管新生は多数のサイトカインにより複雑に作用しあうことより成り立っているからではないかと考える。最近では動物モデルにおいて、VEGFとbFGFの併用⁶⁰、PDGF-BBとbFGFの併用⁶¹、HGFとbFGFの併用⁶²、VEGFとアンジオポエチン1の併用など、血管新生因子の併用が虚血の改善に有効であると報告されている。これらの報告も様々な幹細胞を含むBM-MNCsを移植するBMI治療と同様に、相互的に作用し合う血管新生因子を併用することで、良好な改善を得ているのではないかと考えられる。

BMI療法は四肢末梢閉塞性疾患における重症虚血患者に対する再生医療として脚光を浴び、本国においては2001年より5年程施行されてきた。しかし、最近の臨床報告では、BMI療法はBuerger病に対しては治療効果が期待できるが、ASOを中心にその他の疾患に対しては大きな治療効果はあまり期待できないといった意見が増えてきている。本施設においても、Buerger病全14症例中で有効11例、無効3例、その他の疾患（ASO2症例、弾性繊維性仮性黄色腫が1症例、強皮症が1症例、クレスト症候群が1症例、抗リン脂質抗体症候群1症例）全6症例中で有効4例、無効2例で、Buerger病に有効症例が多かった。本施設においてはBMI無効群が少ないことから、有効群との比較・検討は出来なかったが、今後これらの因果関係については検討する必要があると考えられる。また、末梢動脈閉塞性疾患に対する血管新生療法としてVEGF、bFGFやHGFなど増殖因子による補充療法と、骨髄又は末梢血由来単核細胞を用いた細胞療法の研究が積極的に行われているが、1996年にIsnerら⁴⁶がVEGF遺伝子を虚血肢筋肉への筋肉注射による局所投与して以来、その投与法は未だ進歩していないのが現状である。2004年にHosakaら⁴⁵は虚血組織の微小血管に集積が可能な大きさに加工した酸性ゼラチンハイロゲル粒子をbFGFと結合させ、ウサギ下肢虚血モデルの動脈より投与し、筋肉注射群と比したところ筋肉注射群に比べ側副血行路の有意な発達を確認したと報告し、新しい投与法を提案した。現在の血管新生療法における研究はより

効果の見込まれる血管新生因子や細胞の特定などの研究が盛んに行われているが、今後は虚血部の組織細胞全体にデリバリーが可能な新たな投与法の研究開発も望まれる。

また、今後、症例の蓄積とともに無効症例の検討も重要になってくるものと考えられる。一方、閉塞性動脈硬化症患者は、当院ではほとんどの症例が血管内治療ないし外科的治療にて治療され、自己骨髄細胞移植の適応となることは稀であった。この傾向は今後も続くものと考えられ、Buerger病を含め膠原病などの難治性血管炎に対する治療としての自己骨髄幹細胞移植治療の重要性は今後さらに高まるものと考えている。

結語

本研究を要約すると、BMI療法の臨床成績は、Buerger病を中心としたFontaineⅢ～Ⅳ。で潰瘍病変の小さい比較的症状の安定した慢性症例の初回治療として有用な治療法と考えられた。また、治療メカニズムとして、BMI後の血管新生関連因子の発現が認められた。そして、それら血管新生関連因子の発現時期には移植24時間後（早期反応群）と移植1週間～3ヶ月後（後期反応群）の2つの時期が存在することが認められた。早期反応は炎症又は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た。後期反応は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た。また、一定レベル以上の骨髄液（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。

文献

1. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, 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* 93:662-70, 1994

2. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 348: 370-374, 1996
3. Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE, Stine A, Arevalo JL, et al. Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J Am Coll Cardiol* 36:1239-44, 2000
4. Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 359: 2053-8, 2002
5. Rajagopalan S, Mohler E 3rd, Lederman RJ, Saucedo J, Mendelsohn FO, et al. Regional Angiogenesis With Vascular Endothelial Growth Factor trial. Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in peripheral arterial disease: Design of the RAVE trial. *Am Heart J* 145: 1114-1118, 2003
6. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, et al. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997
7. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5:434-438, 1999
8. Jia L, Takahashi M, Yoshioka T, Morimoto H, Ise H, et al. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells for cardiovascular diseases. *Curr Vasc Pharmacol* 4:59-65, 2006
9. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95:952-958, 2000
10. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, et al. In vivo differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95:3106-3112, 2000
11. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3422-3427, 2000
12. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105:1527-36, 2000
13. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103:897-903, 2001
14. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, et al. 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
15. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103: 897-905, 2001
16. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 94:678-685, 2004
17. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109: 1543-1549, 2004
18. Saigawa T, Kato K, Ozawa T, Toba K, Makiyama Y, et al. 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
19. Koshikawa M, Shimodaira S, Yoshioka T, Kasai H, Watanabe N, et al. 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
20. Nizankowski R, Petriczek T, Skotnicki A, Szecklila A. The treatment of advanced chronic lower limb ischaemia with marrow stem cell autotransplantation. *Kardiol Pol* 63: 351-60, 2005
21. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role

- of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980
22. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61: 866-879, 1987
 23. Yu J, deMuinck ED, Zhuang Z, Drinane M, Kauser K, et al. Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment, and blood flow reserve. *PNAS* 102: 10999-11004, 2005
 24. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101: 2567-2578, 1998
 25. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9: 1370-1376, 2003
 26. Akasaki Y, Miyata M, Eto H, Shirasawa T, Hamada N, et al. Repeated thermal therapy up-regulates endothelial nitric oxide synthase and augments angiogenesis in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circ J* 70: 463-470, 2006
 27. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, et al. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 553-560, 1993
 28. Kato H, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y. Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells. *Endocrinology* 1997 138: 2615-2620, 1997
 29. Iimuro S, Shindo T, Moriyama N, Amaki T, Niu P, et al. Angiogenic effects of adrenomedullin in ischemia and tumor growth. *Circ Res* 95: 415-423, 2004
 30. Abe M, Sata M, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, et al. Angiogenic effects of adrenomedullin in ischemia and tumor growth. *Circ Res* 95: 415-423, 2004
 31. Esato K, Hamano K, Li TS, Furutani A, Seyama A, et al. Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease. *Cell Transplant* 11: 747-752, 2002
 32. Tateno K, Minamino T, Toko H, Akazawa H, Shimizu N, et al. Critical Roles of Muscle-Secreted Angiogenic Factors in Therapeutic Neovascularization. *Circ Res* 98: 1194-1202, 2006
 33. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, et al. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* 66: 543-551, 2005
 34. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Kobayashi S, Matsuzaki M, et al. Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis. *Cell Transplant* 9:439-443, 2000
 35. Bussolino F, Ziche M, Wang JM, Alessi D, Morbidelli L, et al. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colonystimulating factors. *J Clin Invest* 87:986-995, 1991
 36. Lee M, Aoki M, Kondo T, Kobayashi K, Okumura K, et al. Therapeutic angiogenesis with intramuscular injection of low-dose recombinant granulocyte-colony stimulating factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2535-2541, 2005
 37. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol* 43: 109-42, 1991
 38. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 274: 1054-1058, 1998
 39. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Monge JC, Mohamed F, Bendeck MP, et al. Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 82: 1007-1015, 1998
 40. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, et al. Nitric oxide modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J. Clin Invest* 101: 2567-2578, 1998
 41. Amano K, Matsubara H, Iba O, Okigaki M, Fujiyama S, et al. Enhancement of ischemia-induced angiogenesis by eNOS overexpression. *Hypertension* 41: 156-162, 2003
 42. Namba T, Koike H, Murakami K, Aoki M, Makino H, et al. Angiogenesis induced by endothelial nitric oxide synthase gene through vascular endothelial growth factor expression in a rat hindlimb ischemia model. *Circulation* 108:

- 2250-7, 2003
43. Napoli C, Williams-Ignarro S, de Nigris F, de Rosa G, Lerman LO, et al. Beneficial effects of concurrent autologous bone marrow cell therapy and metabolic intervention in ischemia-induced angiogenesis in the mouse hindlimb.. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 17202-17206, 2005
 44. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9: 1370-1376, 2003
 45. Sindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, et al. Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 104: 1964-1971, 2001
 46. Caron KM, Smithies O. Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional Adrenomedullin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16; 98: 615-619, 2001
 47. Shimosawa T, Shibagaki Y, Ishibashi K, Kitamura K, Kangawa K, et al. Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage. *Circulation* 105: 106-111, 2002
 48. Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, et al. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34 (+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest* 104: 1199-1211, 1999
 49. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Tanaka N, Kobayashi S, et al. The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells: a novel and simple therapeutic method. *Surgery* 130: 44-54, 2001
 50. Masinovsky B, Urdal D, Gallatin WM. IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule-1. *J Immunol* 145: 2886-2895, 1990
 51. Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, et al. Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys Res Commun* 207:25-32, 1995
 52. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61: 866-879, 1987
 53. Tateno K, Minamino T, Miyauchi H, Kunieda T, Komuro I. Application of hematopoietic cells to therapeutic angiogenesis. *Curr Pharm Des* 12: 557-563, 2006
 54. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107: 1164-1169, 2003
 55. Li TS, Hamano K, Nishida M, Hayashi M, Ito H, et al. CD117⁺ stem cells play a key role in therapeutic angiogenesis induced by bone marrow cell implantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: 931-937, 2003
 56. Ozawa T, Toba K, Kato K, Minagawa S, Saigawa T, et al. Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. *J Mol Cell Cardiol* 40: 629-638, 2006
 57. Morishita R, Aoki M, Hashiya N, Makino H, Yamasaki K, et al. Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension* 44: 203-209, 2004
 58. Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92: II365-11371, 1995
 59. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 9: 604-613, 2003
 60. Marui A, Kanematsu A, Yamahara K, Doi K, Kushibiki T, et al. Simultaneous application of basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor to enhance the blood vessels formation. *J Vasc Surg* 41: 82-90, 2005
 61. Hosaka A, Koyama H, Kushibiki T, Tabata Y, Nishiyama N, et al. Gelatin hydrogel microspheres enable pinpoint delivery of basic fibroblast growth factor for the development of functional collateral vessels. *Circulation* 110: 3322-3328, 2004

「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」

骨髄細胞移植による血管再生の機序の解明および治療効果の 改善に関する研究

分担研究者 相澤義房¹

研究協力者 鳥羽 健²、加藤公則²

新潟大学医歯学総合研究科¹、新潟大学医歯学総合病院²

研究要旨

骨髄細胞移植による血管再生治療が行われているが、再生の機序は不明点が多い。我々体外での血管新生培養を用いた共培養実験では、造血幹細胞から得られた赤芽球コロニーの強い血管新生作用を認めた。マウス下肢虚血モデルを用いた骨髄細胞移植による治療実験でも、赤芽球が血管再生に重要であった。骨髄細胞移植にエリスロポエチンを併用すると血管再生効果は向上した。誘導体であるアジアロエリスロポエチンは多血症誘発作用が低く、骨髄細胞移植との併用効果が高かった。その単独投与でも強い血管新生作用が認められ、臨床応用に期待が持てる物質言えた。

A. 研究目的

骨髄での赤血球系造血において、その成熟過程で遊走能を失うことから、末梢血管に動員されるためには特別なシステムが存在すると推測される。このため、細胞集塊表面へ向けて新生血管がこの発育することが想定される。そこで、赤芽球による新生血管の誘導能と、エリスロポエチンおよびその誘導体の血管新生作用を検討した。

B. 研究方法

1. 健康人骨髄細胞を赤芽球およびそれ以外の細胞に分離し、血管増殖因子群の発現プロファ

イルを観察した。

- 健康人末梢血造血幹細胞よりセミソリッド培養でGM系白血球コロニーおよび赤芽球コロニーを作成し、これをHUVECを用いた血管新生培養系に添加/共培養することで、骨髄造血に伴う血管新生を再現し観察した。
- マウス下肢虚血モデルの骨髄細胞移植治療実験を用いて血管新生に必要な骨髄細胞分画の同定を行った。
- 同じモデルを用い、エリスロポエチンおよびアジアロエリスロポエチンの単独投与またはBMIとの併用による血管新生効果を観察した。健康マウスを用いてエリスロポエチンおよびアジアロエリスロポエチンの造血作用を比較した。

C. 研究結果

- de novoのヒト骨髄細胞にはPLGF 以外の因子が恒常的に発現していたが、PLGFは赤芽球にのみ発現していた。ヒト末梢血幹細胞よりセミソリッド培養で作成したCFU-GMおよびBFU-eでも、PLGFはBFU-eでのみ発現していた。骨髄細胞でVEGFを主に産生しているのは赤芽球であり、PLGFは赤芽球から分泌されていた。
- コンフルエントな線維芽細胞上でのHUVECによる血管チューブの形成を観察すると、ヒト末梢血幹細胞より作成したBFU-eには強い血管新生作用があったがCFU-GMにはこの作

用がなかった。BFU-eの血管新生効果は可溶性VEGFR1およびVEGFR2の添加によって阻害され、VEGF-A/PLGFの分泌による作用が重要であった。

3. マウス下肢虚血モデルを作成し、骨髄細胞移植 (BMI) および EPO の *in vivo* 作用を、血流の改善・虚血筋の組織・虚血下肢の生存を指標として観察した。6日後の血流改善効果、組織血管数では BMI+EPO > BMI単独 = EPO単独 > 無治療であった。骨髄細胞から赤芽球のみを除いて移植すると下肢の生存効果は消失した。
4. 健常マウスにEPOまたはアジアロEPO (AsEPO) を投与すると、EPOには用量依存性の造血作用があるが、アジアロEPOは造血作用を示さず血管新生作用を示した。

D. 考察

骨髄細胞のうち、血管新生を誘導する主たる細胞は骨髄赤芽球であり、おそらく血管増殖因子の分泌を介した作用であると推測された。しかし赤芽球による血管新生において、骨髄CD14陽性細胞が果たす役割などは不明である。また、エリスロポエチンは165個のポリペプチドからなる糖タンパクで、3つのN型および1つのO型付加による炭水化物を結合している。生体内において分子の疲労・老化の結果としてアジアロエリスロポエチンが生じるが、シアル酸が脱落してガラクトースが露出すると等電点の逆転により陽性荷電を生じ、エリスロポエチン受容体 (陰性荷電) との親和性が著しく上昇する。人工的に作成したアジアロエリスロポエチンは、その標的臓器の1つである骨髄組織内に到達しがたく造血活性を欠いた。しかしアジアロエリスロポエチンは強い血管新生作用を示し、この点において臨床上有用であると思われる。その利点の追求と外部投与した場合の抗原性などを検討する必要がある。

E. 結論

骨髄細胞移植による血管新生の機序に、赤芽球がCD14陽性細胞の補助により、血管増殖因

子を分泌することが推測された。アジアロエリスロポエチンは、血管新生用新薬としての期待を抱かせるものではあるが、その臨床応用には慎重な検討が必要である。

F. 健康危険情報

CPVT運動制限が重要で、さもないと致死的な不整脈を発生する危険がる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし