

第47回日本核医学会学術総会

『光学式マルチモダリティ画像位置合わせシステムの動物実験における有効性』

越野 一博, 渡部 浩司, 寺本 昇, 合瀬 恭幸, 山本 明秀, 樋掛 正明, 福田 肇, 大田 洋一郎, 佐藤 博司, 林 拓也, 飯田 秀博.

仙台国際センター, 2007 4-6 Nov

第47回日本核医学会学術総会

『DARG法における残存¹⁵⁰Co放射能の影響評価と検査時間短縮に関する研究』

岩西 雄大, 渡部 浩司, 林 拓也, 湊 小太郎, 飯田 秀博.

仙台国際センター, 2007 4-6 Nov

第47回日本核医学会学術総会

『ピンホールSPECTと¹²³I-IMPを用いたマウス局所脳血流定量測定』

銭谷 勉, 渡部 浩司, 林 拓也, 合瀬 恭幸, 明神 和紀, 田口 明彦, 寺本 昇, 猪股 亨, 山道 芳弘, 飯田 秀博.

仙台国際センター, 2007 4-6 Nov

理研分子イメージングセミナー

『PET研究の実際-神経科学・病態把握から治療開発まで』

林 拓也

神戸, 2007 19-Dec

分担研究報告書

脳梗塞患者末梢血中 CD34 陽性細胞数と脳神経機能に関する経時的検討

分担研究者

兵庫医科大学 医学部 教授

松山 知弘

国立病院機構大阪南医療センター 血液内科学 部長

相馬 俊裕

国立循環器病センター研究所 循環動態機能部 脳循環研究室 室長

田口 明彦

研究協力者

国立循環器病センター研究所 循環動態機能部

中込 奈美

研究要旨

血管系幹細胞を用いた心血管再生療法は四肢虚血および虚血性心疾患ですでに臨床応用がなされている。これを虚血性脳血管障害による血管性痴呆やアルツハイマー型老年痴呆に応用できれば高齢者の福音となる。脳血管再生療法あるいは血管血球系幹細胞による脳微小循環の維持が脳機能を改善し、痴呆の治療法となりうるかどうかを評価する目的で、脳血管性認知症患者やアルツハイマー型痴呆患者など認知症患者を対象に血管再生に関わる末梢血中血管系幹細胞（CD34 陽性細胞）数を測定し、虚血性脳血管障害や痴呆の予後の予測が可能であるか、について経時的な機能評価および認知症の進行に関して検討を行った。

A. 研究目的

近年の高齢社会において脳血管障害後遺症による痴呆など要介護患者の急激な増加は重大な社会問題となっている。最近注目されている血管新生療法は、循環器領域における虚血臓器障害の治療の新戦略として注目されているが、神経領域における応用を支持しうる十分な臨床データがないのが現状である。本研究では血管再生に関わる血管系幹細胞が虚血性脳血管障害患者の予後決定に関与するか、アルツハイマー型痴呆や脳血管性痴呆における痴呆進展と相関があるかどうかを検討した。

B. 研究方法

1) 研究計画書の作成および審査

国立循環器病センター、兵庫医科大学、大阪南医療センター倫理委員会およびにおいて承認を受け、十分なインフォームドコンセントに基づいた本人（本人にその能力のない時は、その代理人）の意志で同意書を得た後に検査を施行した。また、施設外に出すサンプルは採取後に完全に匿名化を行った。

2) 対象患者群および病態評価

アルツハイマー型痴呆患者、痴呆症状を伴う脳血管性痴呆症患者を対象とし、NIHSS、modified Rankin scale、Barthel Index、Mini Mental State Examination (MMSE)、Global Clinical Dementia Rating (CDR)の経時的な評価を行い、エントリー時に末梢血中 CD34 陽性細胞測定用の採血を行った。

3) 血管血球系幹細胞解析方法

解析方法によるばらつきを抑えるため、匿名化後、全ての病院のサンプルを国立病院機構大阪南医療センターに集積し、測定による変動や誤差を最小限とするために、我々が開発した非常に精度の高い測定方法にて解析した。

C. 研究結果

脳血管障害のある患者群では末梢血中 CD34 陽性細胞が少ない群では、多い群に比し、1年後の CDR および BI が有意な悪化が観察された。また、NIHSS、MMSE、mRS に関しては末梢血中 CD34 陽性細胞が少ない群で、より悪化する傾向が観察されたが統計学的には有意な差はなかった。

D. 考察

我々はすでに末梢血中の CD34 陽性細胞や CD133 陽性細胞などの血管血球系幹細胞の減少が脳梗塞の発症と強く関連していること、そしてこれらの血管血球系幹細胞の減少が単に血流低下に関与しているだけではなく、血管新生に関わる血管内皮細胞の機能の低下とも関連していることを示しているが、本年度の結果は末梢血中の血管血球系幹細胞が脳血管のメンテナンスに関与しているだけでなく、神経組織の代謝や機能にまで影響を与え高次神経機能の低下や痴呆症の発症とも関連しており、血管系幹細胞数が多ければ神経機能が改善する可能性を示唆していると考えている。

E. 結論

本研究で得られた知見は、分担研究者の丸山、秦らの知見と同様に、末梢血中血管血球系幹細胞が微小循環や各臓器機能維持と密接に関連していることを示唆していると考えている。

F. 健康危惧情報

なし。

G. 研究発表

松山 知弘

1. 論文発表

“Increase in Circulating CD34-Positive Cells in Patients with Angiographic Evidence of Moyamoya-like Vessels.”

Yoshihara T, Taguchi A, Matsuyama T, Shimizu Y, Kikuchi-² A, Soma T, Stern D.M, Yoshikawa H, Kasahara Y, Moriwaki H, Nagatsuka K, Naritomi H.
J Cereb Blood Flow Metab. in press.

“Environmental change during postnatal development alters behavior, cognitions and neurogenesis of mice.”

Iso H, Shimoda S, and Matsuyama T.
Behavior. Brain Res. 2007;179:90-98.

“Visualization of intracerebral arteries by synchrotron radiation microangiography.”

Myojin K, Taguchi A, Umetani K, Fukushima K, Nishiura N, Matsuyama T, Kimura H, Stern D.M, Imai Y, and Mori H.
Am. J. Neurorad. 2007;28:953-957.

“ORP150/HSP12A protects dopaminergic neurons against MPTP/MPP+-induced neurotoxicity.”

Kitao Y, Matsuyama T, Takano K, Tabata Y, Yoshimoto T, Momoi T, Yamatodani A, Ogawa S, and Horii O.
Antioxid. Redox Sign. 2007;9:589-595.

“Hypoxia-mediated induction of heme oxygenase type I and carbon monoxide release from astrocytes protects nearby cerebral neurons from hypoxia-mediated apoptosis.”

Imuta N, Horii O, Kitao Y, Matsuyama T, and Ogawa S.
Antioxid. Redox Sign. 2007;9:543-552.

“Granulocyte Colony-Stimulating Factor Has a Negative Effect on Stroke Outcome in a Murine Model.”

Taguchi A, Wen Z, Myojin K, Yoshihara T, Nakagomi T, Nakayama D, Tanaka H, Soma T, Stern D.M, Naritomi H, and Matsuyama T.
Eur. J. Neurosci. 2007;26:126-133.

“Circulating CD34-Positive Cells Provides a Marker of Vascular Risk Associated with Cognitive Impairment.”

Taguchi A, Matsuyama T, Nakagomi T, Shimizu Y, Fukunaga R, Tatsumi Y, Yoshikawa H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Moriwaki H, Nagatsuka K, Stern D, Naritomi H.

J Cereb Blood Flow Metab. 2007.

相馬 俊裕

1. 論文発表

“Increase in Circulating CD34-Positive Cells in Patients with Angiographic Evidence of Moyamoya-like Vessels.”

Yoshihara T, Taguchi A, Matsuyama T, Shimizu Y, Kikuchi-taura² A, Soma T, Stern.D.M, Yoshikawa H, Kasahara Y, Moriwaki H, Nagatsuka K, Naritomi H.
J Cereb Blood Flow Metab. in press.

“Circulating CD34-positive cell number is associated with brain natriuretic peptide level in type 2 diabetes patients.”

Okada S, Makino H, Nagumo A, Sugisawa T, Fujimoto M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Kikuchi-Taura A, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y.
Diabetes Care. 2007;in press.

“Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment.”

Taguchi A, Matsuyama T, Nakagomi T, Shimizu Y, Fukunaga R, Tatsumi Y, Yoshikawa H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Moriwaki H, Nagatsuka K, Stern DM, Naritomi H.”

J Cereb Blood Flow Metab. 2007.

“Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model.”

Taguchi A, Wen Z, Myojin K, Yoshihara T, Nakagomi T, Nakayama D, Tanaka H, Soma T, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T.

Eur J Neurosci. 2007;26:126-33.

“Successful remission induction by low-dose all-trans retinoic acid alone in a patient with acute promyelocytic leukemia and renal impairment.”

Matsumoto K, Tamaki H, Yamagami T, Sasaki N, Hara S, Soma T.
Leuk Res. 2007;21:in press.

“False-positive FDG-PET findings due to bone metastasis from prostate cancer in staging of non-Hodgkin’s lymphoma.”

Inoue Y, Tamaki H, Yamagami T, Iwasaki H, Nakatsuka S, Soma T.
Eur J Haematol. 2007;79:88-90.

“Development of adult T-cell leukemia in donor-derived human T-cell leukemia virus type I-infected T cells after allogeneic bone marrow transplantation.”

Tamaki H, Taniguchi Y, Kikuchi A, Yamagami T, Soma T, Matsuoka M.
Leukemia. 2007;21:1594-6.

田口 明彦

1. 論文発表

“Relationship between Detectability of Ischemic Lesions by Diffusion-Weighted Imaging and Embolic Sources in Transient Ischemic Attacks.”

Uno H, Taguchi A, Oe H, Nagano K, Yamada N, Moriwaki H, Naritomi H.
Eur Neurol. 2008;59:38-43.

“Increase in Circulating CD34-Positive Cells in Patients with Angiographic Evidence of Moyamoya-like Vessels.”

Yoshihara T, Taguchi A, Matsuyama T, Shimizu Y, Kikuchi-taura2 A, Soma T, Stern.D.M, Yoshikawa H, Kasahara Y, Moriwaki H, Nagatsuka K, Naritomi H.
J Cereb Blood Flow Metab. 2007 in press.

“Circulating CD34-positive cell number is associated with brain natriuretic peptide level in type 2 diabetes patients.”

Okada S, Makino H, Nagumo A, Sugisawa T, Fujimoto M, Kishimoto I, Miyamoto Y, Kikuchi-Taura2 A, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y.

Diabetes Care. 2007;in press.

“Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment.”

Taguchi A, Matsuyama T, Nakagomi T, Shimizu Y, Fukunaga R, Tatsumi Y, Yoshikawa H, Kikuchi-Taura A, Soma T, Moriwaki H, Nagatsuka K, Stern D.M, Naritomi H.

J Cereb Blood Flow Metab. 2007.

“Neuroprotective effect of bone marrow-derived mononuclear cells promoting functional recovery from spinal cord injury.”

Yoshihara T, Ohta M, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Suzuki Y,

Taguchi A, Watanabe Y, Adachi Y, Ikehara S, Sugimoto H, Ide C.

J Neurotrauma. 2007;24:1026-36.

“Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model.”

Taguchi A, Wen Z, Myojin K, Yoshihara T, Nakagomi T, Nakayama D, Tanaka H, Soma T, Stern D.M, Naritomi H, Matsuyama T.

Eur J Neurosci. 2007;26:126-33.

“Visualization of intracerebral arteries by synchrotron radiation microangiography.”

Myojin K, Taguchi A, Umetani K, Fukushima K, Nishiura N, Matsuyama T, Kimura H, Stern D, Imai Y, Mori H.

AJNR Am J Neuroradiol. 2007;28:953-7.

2. 学会発表

Brain'07&BrainPET'07

“Isolation and characterization of injury-induced Neural stem/Progenitor cells from post-infarct Area in mice.”

Nakagomi T, Taguchi A, Saino O, Fujikawa M, Fujimori Y, Nishizaki T, Matsuyama T.

Osaka, 2007 May

第16回日本意識障害学会

『脳血管障害に対する新しい細胞治療の確立に向けて』

田口 明彦

仙台, 2007. 08. 06

3. その他 (シンポジウム・招待講演)

第4回東京脳卒中診断治療研究会

『脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球を用いた細胞治療』

田口 明彦

東京, 2008. 02. 15

日本生物工学会北日本支部 札幌シンポジウム

『骨髄細胞を用いた脳梗塞治療』

田口 明彦

札幌, 2007. 11. 21

分担研究報告書

予防法の確立に向けた探索的検討

分担研究者

名古屋大学医学部附属病院腎臓内科講師
丸山 彰一

研究要旨

近年の疫学研究で、我が国においても慢性腎臓病自体が動脈硬化性疾患（脳梗塞・脳出血・冠動脈疾患・閉塞性動脈硬化症）に対する危険因子となることが明らかとなってきた。慢性腎臓病患者の中でも特に慢性維持透析を行っている患者はハイリスク患者であり、この集団における予後規定因子の解析は透析患者のみならず非透析患者の診断・予防・治療に役立つ重要な情報が得られるものと期待される。

我々は、慢性透析患者では、①血管内皮前駆細胞や骨髄幹細胞の絶対数が減少しており、②そのことが血管事象の発病を促進し、結果として③全死亡率が上昇するという仮説を立て、このことを実証するため前向き研究を行った。

田口らが開発した方法で末梢血の CD34 陽性細胞の絶対数を測定したところ、透析患者ではコントロール群と比較して有意に減少しており、CD34 陽性細胞数低値群では CD34 陽性細胞数高値群と比較して心血管事象の新規発症と全死亡率が有意に高いことを見出した。

本研究の成果は脳および心血管事象の新たな診断・予防・治療法の開発を推し進める上で重要な知見を提供するものと考えられた。

A. 研究目的

我が国の透析患者数は 27 万人を超えなお直線的に増え続けている。透析に要する医療費は 1.2 兆円を超えており、慢性腎不全治療が我が国の医療財政に与える影響は多大なものとなっている。さらに最近の疫学研究により慢性腎臓病が血管疾患の独立した危険因子であることが明らかとなっている。本研究は、高い頻度で重篤な後遺症を残す心原性脳塞栓症患者に対し、強い微小循環保護(新生)作用を有する自己骨髄単核球の投与を行い、その治療効果および安全性に関する臨床試験を行うと共に、組織修復作用を有する細胞群を介した、全く新しい脳血管障害予防法の確立に向けた発展的な研究を行うものである。本分担研究は、脳血管障害予防法の確立に向けた探索的検討として、ハイリスク患者である透析患者における予後を幹細胞の観点から解析することを目的とする臨床研究を行う。

我々は、これまでに透析患者における血管事象に着目し各種の前向き研究を進めてきた。

透析患者では無症候性の動脈硬化性疾患が多いことが知られている。そこで、我々は全透析患者に定期的に心臓超音波検査、トレッドミルテスト、胸部XP、血管事象に関する問診を行い、脳・心血管事象の疑いのある患者に対しては冠動脈造影を含む二次精査を施行するという効率的な血管事象検出システムを作り上げた。我々はこれまでに、ハイリスク群である透析患者の冠動脈狭窄に対して積極的にインターベンション治療を行った群とインターベンション治療を行わず薬物治療のみを行った群を前向きに比較検討し、前者が有意に予後を改善することを報告した(Comparison of Percutaneous Coronary Intervention with Medication in the Treatment of Coronary Artery Disease in Hemodialysis Patients. Yasuda K, et al. J Am Soc Nephrol. 2006; 17(8): 2322-32.)。本研究でも、こうした積極的に心血管疾患を検出するスクリーニングシステムを用い、「ハイリスク群である透析患者では血管内皮前駆細胞や骨髄幹細胞が減少していて、このことが血管事象の発生を促進し死亡率を上昇させる。」という仮説を確かめるための前向き研究を行った。これまでの報告では、非透析患者では内皮前駆細胞の数が少ない者では多い者に比較して予後が不良であることが報告されている。透析患者では血中の血管内皮前駆細胞が減少するという報告と逆に増加するという報告があり、一定のコンセンサスが得られていない。また、透析患者における血中の骨髄幹細胞と疾患や予後との関連を前向き検討した研究はこれまでに報告がない。我々はこれまでに、慢性維持透析患者における末梢血 CD34 陽性細胞数が非透析患者と比較して有意に減少していることを見出し報告した(ASN 2006 Maruyama, San Diego)。今回は、登録患者の予後を2年間前向きに追跡し末梢血 CD34 陽性細胞数との関連に関し統計的解析を行った。エンドポイントは血管イベントと全死亡とした。

以上のような臨床研究を行い、最終的にはこれらの研究成果を統合しより有効な診断・予防・治療法の開発をめざす予定である。

B. 研究方法

① 患者エントリー

対象患者は日中に名古屋共立病院で慢性維持透析を行っている全患者とした。研究についての十分な説明をし、同意が得られた方から血液を採取し独立行政法人国立病院機構大阪南医療センターに郵送した。田口らが独自に開発した方法で、CD34 陽性細胞数(絶対数)を測定した。

② 前向き予後追跡研究

全登録患者に対し、定期的に心臓超音波検査、トレッドミルテスト、胸部XP、血管事象に関する問診を行い、脳・心血管事象の疑いのある患者に対しては二次精査を施行するという血管事象検出スクリーニングシステムを適用し、2年間追跡した。エンドポイントは血管イベント(入院を要する脳・心血管事象)と全死亡とした。

③ 統計的解析

ROC 解析で、CD34 陽性細胞数のカットオフ値を決定し、CD34 陽性細胞数高値群と CD34 陽性細胞数低値群の 2 群に分けた。各群のエントリー時の臨床データを比較検討した。2 年間の前向き検討として、脳・心血管イベントの発症率と全死亡率を Kaplan-Meier 法で比較した。続いて、Cox 単変量解析で血管事象による死亡と全死亡に対する危険因子を見出した。さらに Cox 多変量解析を行い、独立危険因子を明らかにした。

(倫理面への配慮)

臨床研究に関しては、名古屋共立病院の倫理委員会、名古屋大学倫理委員会、および国立循環器センター倫理委員会の承認を得ている。血液を提供して頂く際には十分な説明の上にご本人に文書で同意を得ている。またすべての検体は匿名化して扱い、個人情報が出洩することがないように最大限の注意を払っている。

C. 研究結果

① 透析患者の末梢血 CD34 陽性細胞数と群分け

血管事象発生のハイリスク群である透析患者の血中の幹細胞につき検討した。名古屋共立病院の維持透析患者 216 名から同意を得て血液サンプルを採取し、CD34 陽性細胞数を測定した。平均は $0.49 \pm 0.32/\mu\text{L}$ であり、我々が以前測定した非透析患者の平均値 ($1.6 \pm 0.2/\mu\text{L}$) や田口らが報告している脳血管障害を有する患者群の平均 ($1.1 \pm 0.31/\mu\text{L}$) と比較して有意に減少していた。

追跡 1 年目の時点での脳・心血管イベントの発症率をもとに、末梢血 CD34 陽性細胞数につき ROC 解析を用いて検討したところ、 $0.37/\mu\text{L}$ (AUC 0.707) というカットオフ値が得られた。この値を用いて全患者を 2 群に分け、さらに 1 年間追跡した結果を解析した (全追跡期間は 2 年間)。低値群に属する患者は 93 名での末梢血 CD34 陽性細胞数平均は $0.23 \pm 0.08/\mu\text{L}$ 、高値群に属する患者は 123 名で末梢血 CD34 陽性細胞数平均は $0.69 \pm 0.30/\mu\text{L}$ であった。

② 登録時臨床データ解析

登録時の臨床データを表 1 に示す。CD34 陽性細胞低値群では高値群に比較して年齢が高かった (68 ± 9 歳 VS 62 ± 11 歳) ($P < 0.0001$)。白血球数は低値群で少なかった。Body mass index と CaxPi レベルもそれぞれ低値群で低値を示した。性別、透析期間、喫煙、糖尿病の有無、脳・心血管疾患の既往、エリスロポイエチン投与量はいずれも両群間に差が見られなかった。さらに動脈硬化性疾患に用いる薬剤 (スタチン、アンギオテンシン変換酵素阻害薬、アンギオテンシン受容体拮抗剤、カルシウム拮抗剤、 β 遮断薬) の使用状況にも両者で差がみられなかった。

③ 2群の前向き追跡解析

血管イベントと全死亡の発生を表2に示す。CD34陽性細胞低値群では血管イベントが93名中27名(29%)に発生し、うち5例が脳・心血管疾患のために死亡であった(5.4%)。CD34陽性細胞低値群では血管イベントが123名中16名(13%)に発生し、うち1例が脳・心血管疾患による死亡であった。全死亡に関しては、CD34陽性細胞低値群で10名(10.8%)が死亡したが、CD34陽性細胞高値群では3名(2.4%)のみであった。最初の血管イベントまでの期間をKaplan-Meier法で比較した血管イベントフリー累積生存率は、CD34陽性細胞低値群(70.6%)においてCD34陽性細胞高値群(86.8%)よりも有意に低かった($P=0.0034$) (図1)。同様に全死亡までの期間を解析した全生存率に関してもCD34陽性細胞低値群(89.2%)においてCD34陽性細胞高値群(97.5%)よりも有意に低かった($P=0.012$) (図2)。

④ 脳・心血管イベントに対する危険因子

血管イベントの発生と相関する登録時の臨床データを解析した(表2)。Cox単変量解析では、血管イベントの発生と相関する危険因子は、末梢血CD34陽性細胞数が $0.37/\mu\text{L}$ 以下であること[HR, 2.90; 95%CI, 1.45-5.81; $P=0.0026$]、年齢[HR, 1.03; 95%CI, 1.01-1.06; $P=0.021$]、脳・心血管疾患の既往[HR, 7.85; 95%CI, 2.43-12.50; $P=0.0045$]、血清アルブミン低値[HR, 0.24; 95%CI, 0.08-0.67; $P=0.0066$]、そしてLDLコレステロール高値[HR, 1.02; 95%CI, 1.01-1.03; $P=0.0048$]であった。Cox多変量解析では、末梢血CD34陽性細胞数が $0.37/\mu\text{L}$ 以下であること[HR, 2.23; 95%CI, 1.09-4.58; $P=0.028$]、脳・心血管疾患の既往[HR, 6.19; 95%CI, 1.63 to 9.90; $P=0.014$]、アルブミン低値[hazard ratio, 0.33; 95%CI, 0.11-0.99; $P=0.049$]、LDLコレステロール高値[HR, 1.02; 95%CI, 1.01-1.03; $P=0.011$]が血管イベントの発生と相関する独立危険因子であることが判明した。

⑤ 全死亡に対する危険因子

続いて全死亡の発生と相関する登録時の臨床データを解析した(表3) Cox単変量解析では、Cox単変量解析では、全死亡と相関する危険因子は、末梢血CD34陽性細胞数が $0.37/\mu\text{L}$ 以下であること、高齢、body mass index低値、血清アルブミン低値であった。Cox多変量解析では、末梢血CD34陽性細胞数が $0.37/\mu\text{L}$ 以下であること[HR, 5.02; 95%CI, 1.08-23.25; $P=0.040$]、年齢[HR, 1.09; 95%CI, 1.02-1.15; $P=0.0082$]、そして血清アルブミン低値[hazard ratio, 0.16; 95%CI, 0.01-0.44; $P=0.0018$]が慢性維持透析患者の全死亡に対する独立危険因子であった。

D. 考察

透析患者は脳・心血管事象の発症に関して、明らかにハイリスク患者である。そのハイリスク患者の予後を解析することは、非透析患者の予後推測・診断・予防などに重要な示唆を与えてくれる。特にハイリスク患者で検討することで、より短い追跡期間で確実な結

果が得られることが期待される。

名古屋共立病院の維持透析患者 216 名から十分な説明の上に同意を得て血液サンプルを採取し、CD34 陽性細胞数を測定した。その結果、透析患者ではコントロール群および脳血管疾患を有する患者群と比較して CD34 陽性細胞数が著明に減少していることが明らかとなった。このことは、透析患者がハイリスク患者であることの結果というだけでなく、原因となっている可能性も示唆していると考え、今回 2 年間の前向き追跡研究の結果の解析を行った。ROC 解析で求めたカットオフ値 $0.37/\mu\text{L}$ (AUC 0.707) を用いて、エントリー時の CD34 陽性細胞数が多い群と少ない群の 2 群に分けたところ、ベースラインのデータでは年齢、CaxPi 値、BMI について両群の間に有意差が見られた。年齢と BMI に関しては従来の報告と矛盾のないデータであった。CaxPi 高値に関しては、従来の報告とは逆の結果であったが、CD34 陽性細胞数高値群ではより蛋白摂取量が多く栄養状態がよいことを反映した結果かもしれない。Pi 高値血管障害促進因子という面もあり、さらなる検討を要する。末梢血白血球数にも両群に差が見られたが、Cox 解析では危険因子と判明していない。このことは、CD34 陽性細胞数と末梢血白血球数の間には交絡関係があるが、予後に直接関連するのは末梢血白血球数ではなく CD34 陽性細胞数であることを示唆する。

Kaplan-Meier 法では血管イベントおよび全死亡ともに、末梢血 CD34 陽性細胞低値群で有意に高率に発生することが判明した。1 年後の解析でも同様の結果が得られていたが、2 年間の解析結果ではその差がより顕著になった。

Cox 多変量解析では、末梢血 CD34 陽性細胞数が $0.37/\mu\text{L}$ 以下であること、脳・心血管疾患の既往、アルブミン低値、LDL コレステロール高値が血管イベントの発生と相関する独立危険因子であることが判明した。従来から報告されていた危険因子の上に末梢血 CD34 陽性細胞数低値であることが独立危険因子として検出されたことは、病因論的にも CD34 陽性細胞低値が血管疾患を惹起することを強く示唆している。全死亡の発生に関しては、末梢血 CD34 陽性細胞数低値、高齢、血清アルブミン低値の 3 因子のみが慢性維持透析患者の全死亡に対する独立危険因子であった。このことは CD34 陽性細胞が、脳・心血管事象だけでなく、他の死亡を含めた患者の絶対的な予後に関連することを示唆し興味深い。

今回の結果は臨床的に大変大きな意義を有している。ひとつは、CD34 陽性細胞数が予後規定因子となることを示した点である。従来の検討では、CD34 と KDR など、いくつかのマーカーを組み合わせた測定を行い、内皮前駆細胞数を割り出していた。田口らは独自に CD34 陽性細胞数を正確に測定する技術を確立した。この方法を用いると、必ずしも他のマーカーを用いなくとも CD34 染色のみで EPC もしくは血中の骨髄系幹細胞の数を反映するデータが導き出すことが可能となった。日常的な臨床検査法としての応用を考えた場合、より単純な方法で意義のある結果が得られたことは大変重要な点であると考えられる。具体的には CD34 陽性細胞数を測定し、低値を示す患者はハイリスク患者としてより厳重な管理を行い血管事象の発生を予防するという臨床応用が可能であると思われる。もうひとつは、ハイリスク群である透析患者における検討を行ったことにより、比較的短期間で有意義な結果

が得られたという事実である。今後も、まずはハイリスク群である透析患者で各種の検討を行い、それを非透析患者に拡大していくという研究の戦略は有用であることが示唆された。

以上のようにこの一年で再生医学を応用した診断・予後推定、および細胞治療・臓器再生促進治療の開発に関して、大変重要な知見を得ることに成功した。今後はこれらの結果を統合し、さらなる検討を重ねていく予定である。

E. 結論

ハイリスク群である透析患者の前向き研究で、CD34 陽性細胞の減少が脳・心血管事象の発生および全死亡に関与していることを示す結果が得られた。このことは、CD34 陽性細胞数の測定が予後不良患者を選定する上で大変有用な検査となることを示しており、臨床的な意義は大きいと考える。本研究の成果は脳および心血管事象の新たな診断・予防・治療法の開発をめざす上で大変重要なものであると考えられた。今後は引き続き、有効かつ実現可能な新たな診断・予防・治療法の開発につながる研究を推し進める予定である。

表 1. 登録時の患者背景

	All patients (n=216)	Low CD34 ⁺ group (CD34 ⁺ < 0.37/ μ L) (n=93)	High CD34 ⁺ group (CD34 ⁺ > 0.37/ μ L) (n=123)	P value
Male (%)	122 (56.4)	50 (53.7)	72 (58.5)	0.48
Age (years)	65 \pm 11	68 \pm 9	62 \pm 11	<u><0.0001</u>
Duration of HD (years)	8.1 \pm 7.1	8.7 \pm 7.7	7.8 \pm 6.7	0.39
Diabetes (%)	105 (48.6)	44 (47.3)	61 (49.5)	0.73
Hypertension (%)	157 (72.7)	67 (72.0)	90 (74.3)	0.7
Smoking (%)	64 (29.6)	32 (34.7)	32 (26.0)	0.16
Body Mass Index	20.7 \pm 3.2	19.9 \pm 2.7	21.4 \pm 3.4	<u>0.0008</u>
History of CVD (%)	94 (43.5)	46 (49.5)	48 (39.0)	0.12
CD34 ⁺ Cells (/ μ l)	0.49 \pm 0.32	0.69 \pm 0.30	0.23 \pm 0.08	<u>0.0001</u>
Hemoglobin (g/dl)	10.6 \pm 1.1	10.3 \pm 1.1	10.5 \pm 1.3	0.11
WBC (10 ³ / μ l)	5.9 \pm 1.9	5.4 \pm 1.6	6.4 \pm 1.9	<u><0.0001</u>
Albumin (mg/dl)	3.6 \pm 0.3	3.5 \pm 0.3	3.6 \pm 0.3	0.11
HDL cholesterol (mg/dl)	41 \pm 13	42 \pm 12	40 \pm 14	0.3
LDL cholesterol (mg/dl)	77 \pm 27	75 \pm 27	76 \pm 26	0.93
Ca x Pi	49.7 \pm 11.8	47.2 \pm 11.6	51.7 \pm 11.7	<u>0.0062</u>
Intact PTH (ng/ml)	122 \pm 114	116 \pm 130	126 \pm 101	0.52
C reactive protein (mg/dl)	0.42 \pm 0.86	0.45 \pm 0.78	0.36 \pm 0.83	0.41
KT/V _{urea}	1.46 \pm 0.23	1.49 \pm 0.24	1.44 \pm 0.22	0.1
Erythropoietin (U/Kg)	93 \pm 66	99 \pm 69	86 \pm 64	0.5
Statins (%)	27 (12.5)	10 (10.8)	17 (13.8)	0.49
ARB (%)	87 (40.3)	36 (38.7)	51 (41.5)	0.68
ACEI (%)	38 (17.6)	15 (16.1)	23 (18.7)	0.62
Ca antagonist (%)	133 (61.6)	60 (64.5)	73 (59.4)	0.44
β blocker (%)	45 (20.8)	24 (25.8)	21 (17.1)	0.12

KT/V_{urea}; urea clearance x time normalized by total body water

表2. 血管イベントと全死亡の発生

	All patients (n=216)	Low CD34 ⁺ group (CD34 ⁺ <0.37/μL) (n=93)	High CD34 ⁺ group (CD34 ⁺ >0.37/μL) (n=123)
Total number of CV events (%)	43 (19.9)	27 (29.0) ¹	16 (13.0)
Non-fatal			
Coronary artery disease	27	16	11
PCI	25	15	10
CABG	2	1	1
Stroke	5	3	2
PAD	5	3	2
Fatal			
Congestive heart failure	3	3	0
Stroke	1	0	1
Myocardial infarction	1	1	0
Valve disease	1	1	0
Total number of death (%)	13 (6.0)	10 (10.8) ²	3 (2.4)
Congestive heart failure	5	3	2
Stroke	3	2	1
Myocardial infarction	1	1	0
Valve disease	1	1	0
Infection	2	2	0
Ischemic colitis	1	1	0

¹; P = 0.0032 vs high CD34⁺ group, ²; P = 0.012 vs high CD34⁺ group

PAD; Peripheral artery disease, PCI; percutaneous coronary intervention, CABG; coronary artery bypass graft.

表3 Cox解析による血管イベントに対する危険因子の同定

	Univariate		Multivariate	
	HR (95%CI)	P value	HR (95%CI)	P value
CD34 ⁺ cells < 0.37/ μ l	2.90 (1.45-5.81)	<u>0.0026</u>	2.23 (1.09-4.58)	<u>0.028</u>
Male	0.87 (0.39-1.45)	0.4		
Age (years)	1.03 (1.01-1.06)	<u>0.021</u>	1.01 (0.97-1.04)	0.77
Duration of HD (years)	1.01 (0.95-1.04)	0.93		
Diabetes	1.76 (0.90-3.43)	0.099		
Hypertension	1.05 (0.54-2.17)	0.89		
Smoking	1.38 (0.74-2.59)	0.31		
Body Mass Index	0.90 (0.80-1.01)	0.075		
History of CVD	7.85 (2.43-12.50)	<u>0.0045</u>	6.19 (1.63-9.90)	<u>0.014</u>
Hemoglobin (g/dl)	0.93 (0.72-1.21)	0.57		
WBC ($10^3/\mu$ l)	1.02 (0.87-1.19)	0.81		
Albumin (mg/dl)	0.24 (0.08-0.67)	<u>0.0066</u>	0.33 (0.11-0.99)	<u>0.049</u>
HDL cholesterol (mg/dl)	0.99 (0.97-1.02)	0.59		
LDL cholesterol (mg/dl)	1.02 (1.01-1.03)	<u>0.0048</u>	1.02 (1.01-1.03)	<u>0.011</u>
Ca x Pi	1.01 (0.92-1.11)	0.74		
Intact PTH (ng/ml)	1.00 (0.99-1.01)	0.37		
C reactive protein (mg/dl)	1.18 (0.89-1.56)	0.26		
KT/V _{urea}	0.81 (0.22-2.98)	0.75		
Erythropoietin (U/Kg)	1.00 (0.99-1.01)	0.34		
Statins	1.20 (0.46-3.23)	0.7		
ARB	0.96 (0.38-8.40)	0.93		
ACEI	1.47 (0.63-3.45)	0.37		
Ca antagonist	0.91 (0.57-2.11)	0.78		
β blocker	1.08 (0.42-2.02)	0.84		

Multivariate model includes variable with $p < 0.05$ by univariate analysis.

表 4 Cox 解析による全死亡に対する危険因子の同定

	Univariate		Multivariate	
	HR (95%CI)	P value	HR (95%CI)	P value
CD34 ⁺ cells < 0.37/ μ l	6.17 (1.34-18.57)	<u>0.019</u>	5.02 (1.08-23.25)	<u>0.04</u>
Male	0.92 (0.28-3.02)	0.88		
Age (years)	1.11 (1.04-1.18)	<u>0.0009</u>	1.09 (1.02-1.15)	<u>0.0082</u>
Duration of HD (years)	1.03 (0.94-1.10)	0.63		
Diabetes	1.86 (0.54-6.32)	0.32		
Hypertension	1.03 (0.27-3.86)	0.96		
Smoking	1.32 (0.43-4.04)	0.62		
Body Mass Index	0.73 (0.57-0.92)	<u>0.0087</u>	0.79 (0.62-1.01)	0.054
History of CVD	2.35 (0.72-7.69)	0.15		
Hemoglobin (g/dl)	0.86 (0.52-1.42)	0.56		
WBC ($10^3/\mu$ l)	1.07 (0.83-1.37)	0.62		
Albumin (mg/dl)	0.19 (0.08-0.58)	<u>0.0006</u>	0.16 (0.01-0.44)	<u>0.0018</u>
HDL cholesterol	0.99 (0.97-1.04)	0.69		
LDL cholesterol	1.01 (0.99-1.03)	0.33		
Ca x Pi	1.02 (0.98-1.07)	0.75		
Intact PTH (ng/ml)	1.00 (0.99-1.02)	0.48		
C reactive protein	1.04 (0.51-2.08)	0.91		
KT/V _{urea}	0.56 (0.07-4.78)	0.6		
Erythropoietin	1.01 (0.99-1.02)	0.34		
Statins	1.80 (0.38-8.40)	0.45		
ARB	0.32 (0.07-1.51)	0.66		
ACEI	0.60 (0.08-4.80)	0.63		
Ca antagonist	0.73 (0.46-4.08)	0.56		
β blocker	0.57 (0.17-1.87)	0.36		

Multivariate model includes variable with $p < 0.05$ by univariate analysis.

図1

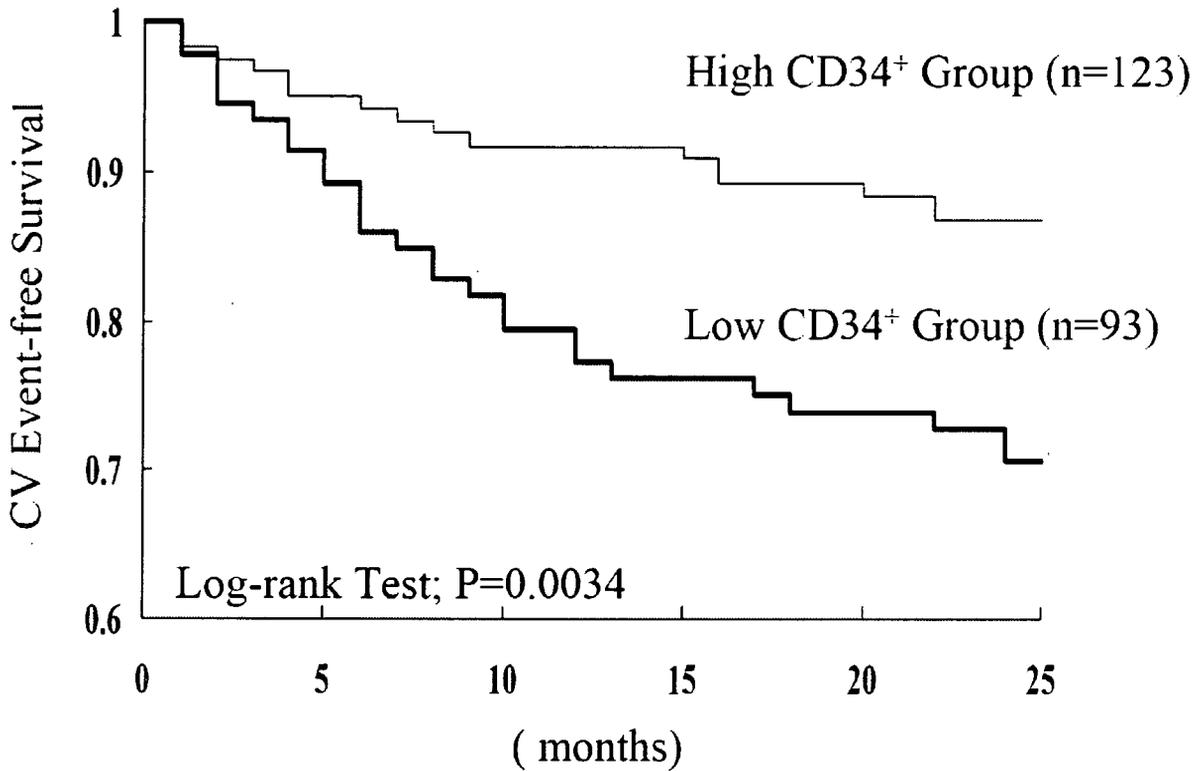


図1. 血管イベントフリー生存率

登録患者はROC解析で求めたカットオフ値を用いてCD34陽性細胞数低値群(CD34⁺ cells < 0.37/ μ L, n = 93)と高値群(CD34⁺ cells > 0.37/ μ L, n = 123)の2群に分けて、初回の血管イベントまでの期間と定義した血管イベントフリー生存率を解析した。低値群では有意にイベントの発生率が高かった。

図2

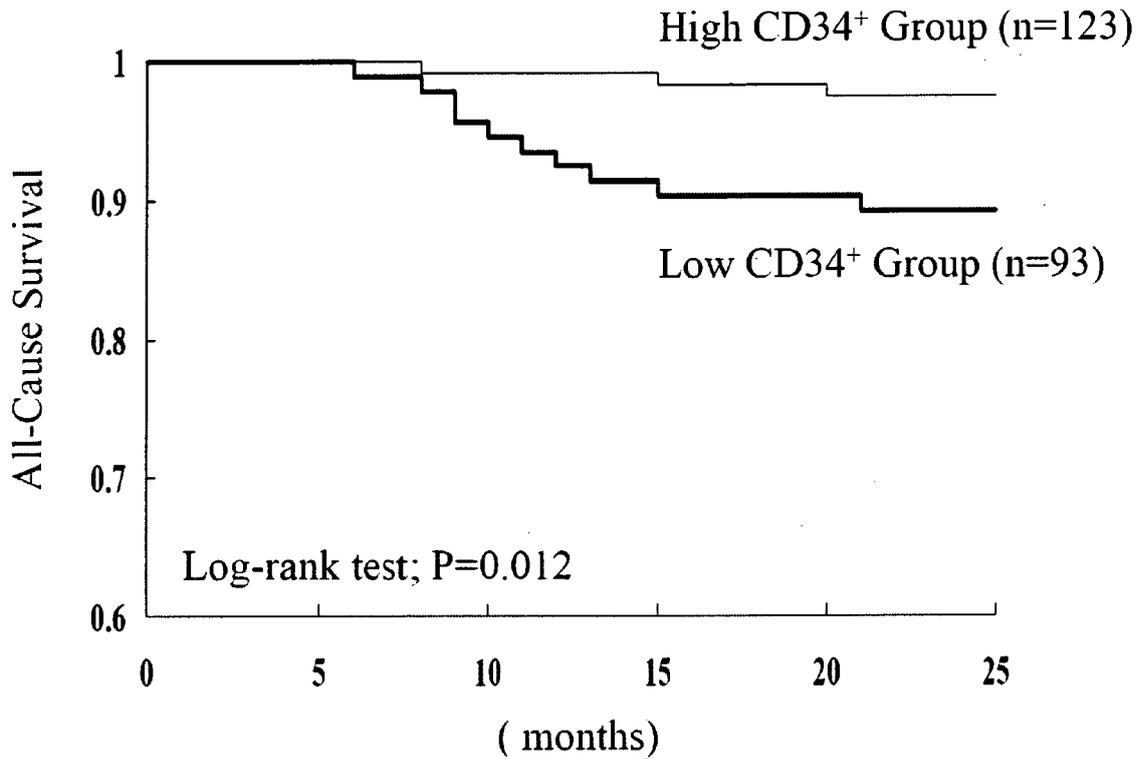


図2. 全死亡に関する生存率

CD34陽性細胞数低値群(CD34⁺ cells < 0.37/ μ L, n = 93)と高値群(CD34⁺ cells > 0.37/ μ L, n = 123)を比較した。低値群では有意に死亡率が高かった。