

- Ise H, Hongo M, Hatake K, Motoyoshi K, Ikeda U. Bone marrow-derived CXCR4+ cells mobilized by M-CSF participate in the prevention of cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Pathol* 171: 755-766, 2007
194. Aso S, Ise H, Takahashi M, Kobayashi S, Morimoto H, Izawa A, Goto M, Ikeda U. Effective uptake of N-acetylglucosamine-conjugated liposome by cardiomyocytes in vitro. *J Control Release* 122: 189-198, 2007
195. Ogawa R, Takahashi M, Hirose S, Morimoto H, Ise H, Murakami T, Yasue T, Kuriyama K, Hongo M, Kobayashi E, Ikeda U. A novel sphingosine-1-phosphate receptor agonist KRP-203 attenuates rat autoimmune myocarditis. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 621-628, 2007
196. Ito T, Okada T, Mimuro J, Miyashita H, Uchibori R, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Takahashi M, Ikeda U, Sakata Y, Shimada K, Ozawa K. Adenoassociated virus-mediated prostacyclin synthase expression prevents pulmonary arterial hypertension in rats. *Hypertension* 50: 531-536, 2007
197. Zhao C, Hosoya A, Kurita H, Hu T, Hiraga T, Ninomiya T, Yoshida K, Yoshida N, Takahashi M, Kurashina K, Ozawa H, Nakamura H. Immunohistochemical study of hard tissue formation in the rat pulp cavity after tooth replantation. *Arch Oral Biol* 52: 945-953, 2007
198. Ito T, Okada T, Miyashita H, Nemoto T, Nonaka-Sarukawa M, Uchibori R, Maeda Y, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Takahashi M, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K. Interleukin-10 expression mediated by an adeno-associated virus vector prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res* 101: 734-741, 2007
199. Shiba Y, Takahashi M, Ikeda U. Models for the study of angiogenesis. *Curr Pharm Design* (in press)
200. Kubota K, Soeda J, Misawa R, Mihara M, Miwa S, Ise H, Takahashi M, Miyagawa S. Bone marrow-derived cell fuses with hepatic oval cells but are not involved in hepatic tumorigenesis in the choline-deficient ethionine-supplemented diet rat model. *Carcinogenesis* (in press)
201. Hirose S, Takahashi M, Ogawa R, Morimoto H, Izawa A, Sato H, Ise H, Hongo M, Ikeda U. Erythropoietin attenuates the development of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Drug Ther* 21: 17-27, 2007
202. 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
203. 高橋将文：膠原病関連血管炎に対する血管再生療法. *日本血栓止血学会誌* 18: 344-346, 2007
204. 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
205. Fujishiro J, Kudou S, Iwai S, Takahashi M, Hakamata Y, Kinoshita M, Iwanami S, Izawa S, Yasue T, Murakami T, Hashizume K, Kobayashi E. Use of sphingosine-1-phosphate(S1P) 1 receptor agonist, KRP-203, in combination with a subtherapeutic dose of cyclosporine A for rat renal transplantation. *Transplantation* 82: 804-812, 2006
206. Suzuki C, Takahashi M, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Hongo M, Hoshikawa Y, Ito T, Miyashita H, Kobayashi E, Shimada K, Ikeda U. Mycophenolate mofetil attenuates pulmonary arterial hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 781-788, 2006
207. Takahashi M. The role of endothelin-1 in vascular remodeling in vivo. *Cardiovasc Res* 71: 4-5, 2006

208. Fujishiro J, Suzuki C, Kudoh S, Yasue T, Hakamata Y, Takahashi M, Murakami T, Hashizume K, Kobayashi E. Conversion from cyclosporine A to mycophenolic acid with a sphingosine-1-phosphate receptor antagonist, KRP-203, reverses host nephrotoxicity and prevents transplant arteriosclerosis. *J Heart Lung Transpl* 25: 825-833, 2006
209. Kaneko T, Murakami T, Kawana H, Takahashi M, Yasue T, Kobayashi E. Shingosine-1-phosphate receptor agonists suppress concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 85-92, 2006
210. 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
211. 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
212. Suzuki C, Takahashi M, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Fujishiro J, Murakami T, Ishiyama J, Nakada A, Nakayama J, Shimada K, Ikeda U, Kobayashi E. Efficacy of Mycophenolic Acid Combined With KRP-203, a Novel Immunomodulator, in a Rat Heart Transplantation Model. *J Heart Lung Transpl* 25: 302-309, 2006
213. 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
214. Okada T, Uchibori R, Iwata-Okada M, Takahashi M, Nomoto T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Liu Y, Mizukami H, Kume A, Kobayashi E, Ozawa K. A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol Ther* 13: 738-746, 2006
215. Jia L, Takahashi M, Morimoto H, Takahashi S, Izawa A, Ise H, Iwasaki T, Hattori H, Ikeda U. Changes in cardiac lipid metabolism during sepsis: the essential role of very low-density lipoprotein receptors. *Cardiovasc Res* 69: 545-555, 2006
216. 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
217. 高橋将文: 骨髓細胞による血管新生・血管再生. *日本血栓止血学会誌* 17: 715-718, 2006
218. Takahashi M, Takahashi S, Suzuki C, Jia L, Morimoto H, Ise H, Iwasaki T, Hattori H, Suzuki J, Miyamori I, Kobayashi E, Ikeda U. Interleukin-1beta attenuates beta-very low-density lipoprotein uptake and its receptor expression in vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 38: 637-646, 2005
219. Kamiyoshi Y, Takahashi M, Yokoseki O, Yazaki Y, Hirose S, Morimoto H, Watanabe N, Kinoshita O, Hongo M, Ikeda U. Mycophenolate Mofetil Prevents the Development of Experimental Autoimmune Myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 39: 467-477, 2005
220. 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
221. Shimizu H, Takahashi M, Kaneko T, Murakami T, Hakamata Y, Kudoh S, Kishi T, Fukuchi K, Iwanami S, Kuriyama K, Yasue T, Enosawa S, Matsumoto K, Takeyoshi I, Morishita Y, Kobayashi E. KRP-203, a novel synthetic immunosuppressant, prolongs graft survival and attenuates chronic rejection in rat skin and heart allografts. *Circulation* 111: 222-229, 2005

222. Takahashi M, Shimizu H, Murakami T, Enosawa S, Suzuki C, Takeno Y, Hakamata Y, Kudou S, Izawa S, Yasue T, Kobayashi E. A novel immunomodulator KRP-203 combined with cyclosporine a prolonged graft survival and abrogates transplant vasculopathy in rat heart allografts. *Transplant Proc* 37: 143-145, 2005
223. Tahara K, Murakami T, Fujishiro J, Takahashi M, Inoue S, Hashizume K, Matsuno K, Kobayashi E. Regeneration of the rat neonatal intestine in transplantation. *Ann Surg* 242: 124-132, 2005
224. 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
225. Fujishiro J, Takeda S, Takeno Y, Takeuchi K, Ogata Y, Takahashi M, Hakamata Y, Murakami T, Okada T, Ozawa K, Hashizume K, Kobayashi E. Gene transfer to the rat kidney in vivo and ex vivo using an adenovirus vector: factor influencing transgene expression. *Nephrol Dial Transplant* 20: 1385-1391, 2005
226. Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, Kimura A, Hakamata Y, Sato Y, Kaneko T, Takahashi M, Okada T, Ozawa K, Francis J, Leone P, Kobayashi E. Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 288-295, 2005
227. 高橋将文、福井大佑、岩本雅弘、天野 純、簗田清次、室原豊明、松原弘明、池田宇一：自家骨髓単核球と血管再生療法（難治性血管炎）。 *Pharma Medica* 23: 33-36, 2005

G. 知的所有権の取得状況

特許公開 2002-171965

骨髓単核球細胞の分離、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

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 研究報告書

難治性血管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 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

研究要旨

膠原病は、全身性炎症性疾患であるが、しばしば血管の炎症に伴う臓器障害を来す。その中でも四肢虚血による疼痛、潰瘍、壊疽は、患者の苦痛の第一位に上げられ、QOLの低下も余儀なくされる。ステロイド薬や免疫抑制剤以外に交感神経節ブロックや血管拡張薬の投与も試みられているが、治療が奏功しない場合が多く、四肢の切断を余儀なくされる。

我々は、閉塞性動脈硬化症やバージャー病に対する骨髄単核球を利用した血管再生医療の安全性と有効性を世界に先駆けて報告し、国内でも保険適応を可能にした。

多施設共同研究により、骨髄単核球の筋肉内移植の有用性も報告されつつあるが、膠原病は、それぞれの疾患の病態、病期、内服治療により、血管炎の病態、進行に違いがあるため、個々の症例について詳しく検討する必要がある、さらなる症例の積み重ねが必要である。

緒言

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先進医療が認められ、日本国内での施行施設が増加し、その安全性や有効性から世界中に拡大しつつある。

バージャー病の病因も血管炎に基づくものであり、血管再生医療の著明な効果を膠原病による血管炎の患者に試みることは、四肢の難治性潰瘍や疼痛を患っている患者に朗報をもたらす可能性が高い。長期経過を観察できた結節性動脈周囲炎患者とアレルギー性肉芽腫性血管炎の2例について報告する。

FI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

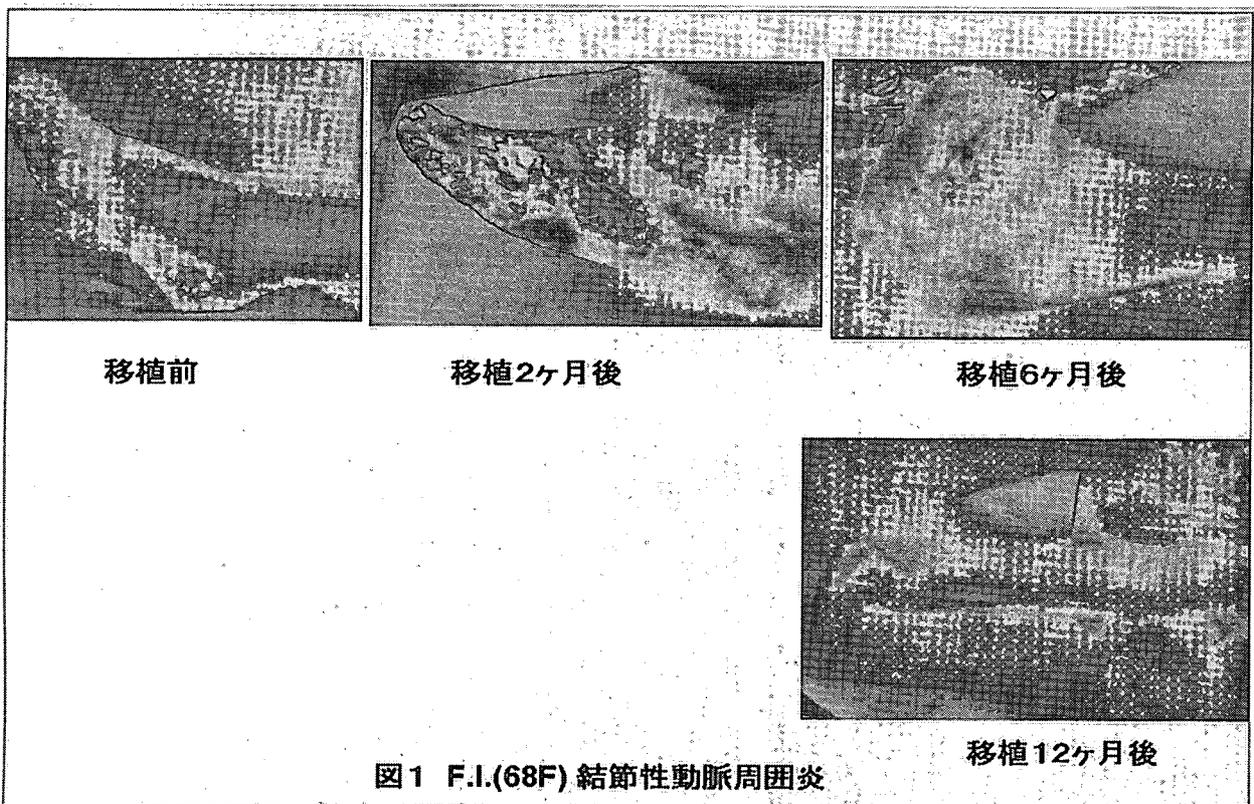
3 右鎖骨下動脈狭窄 # 4 無症候性心筋虚血の可能性

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（プレドニゾロン 5 mg/day）にて治療中。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1.5x1.5cm）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、内服薬に加えてプロスタグランジン製剤の点滴静注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。

同年11月28日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。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まで歩行可能となった。疼痛に対しては、レペタン坐薬を1日4回使用することで自製内となり、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ヶ月後では、重症虚血下肢の改善はまだ認められず、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 $2 \times 8\text{cm}$ 、径 $2 \times 10\text{cm}$)と疼痛が持続していた。左内果面は比較的保たれていた。3ヶ月後の2007年2月15日に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った。疼痛(VAS 7/10)は、6ヶ月後、12ヶ月後も持続し、鎮痛薬を継続しているが、下肢の major amputation は回避され、自宅での家事なども行えるようになっている。(図1)



結節性動脈周囲炎に対する血管再生医療後の1症例である。全身の炎症反応は落ち着いていたが、骨髄単核球細胞移植後に局所の炎症が一時的に惹起された。しかし、領域は移植前に認められた炎症領域の範囲内であり、むしろ血流増大のため、炎症修復が早くその後の皮膚移植の生着を促進したと考えられた。皮膚科との緊密な連携治療にて、血管新生治療の効果が最大限に発揮された一例である。

M.N氏 49歳 男性 病状経過

#1 重症虚血下肢： 左足趾の黒色化，左足趾潰瘍の拡大
 #2 アレルギー性肉芽腫性血管炎，
 #3 好酸球増多症
 主訴；左足趾潰瘍の悪化、壊疽の進展
 既往歴；特になし。
 現病歴；2006年3月感冒症状を契機に前医に

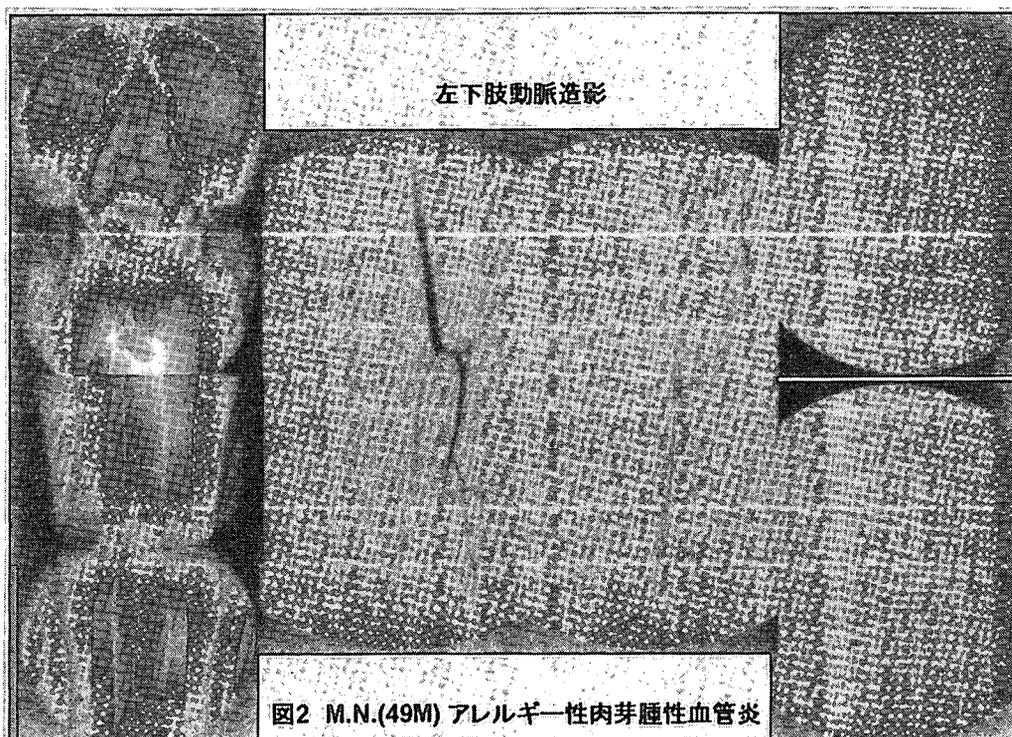
て、好酸球増多症と診断され、副腎皮質ステロイド内服中。10月より左下肢冷感と間欠性跛行が出現・進行し、下肢CTアンギオグラフィーにて両下腿の三分枝は、閉塞または途絶しており、インターベンションの適応なしと判断され、再生医療目的にて紹介となり、5月28日に入院となる。2007年4月より安静時疼痛(VAS 8/10)と左第3趾の壊疽および左第2趾尖の皮膚潰瘍が出現し持続していた。内服薬に加えてプロスタグランジン製剤の点滴を行ったが改善せず、ABIは0.58であり、foot-dorsalレベルでのskin perfusion pressure (SPP)は5 mmHgと低値であり、難治性血管炎(アレルギー性肉芽腫性血管炎)による重症虚血下肢と診断した。下肢血管造影にて左前脛骨・後脛骨の途絶・腓骨動脈の閉塞が認められ、左下肢に対する血管再生医療を行う事となった。(図2)

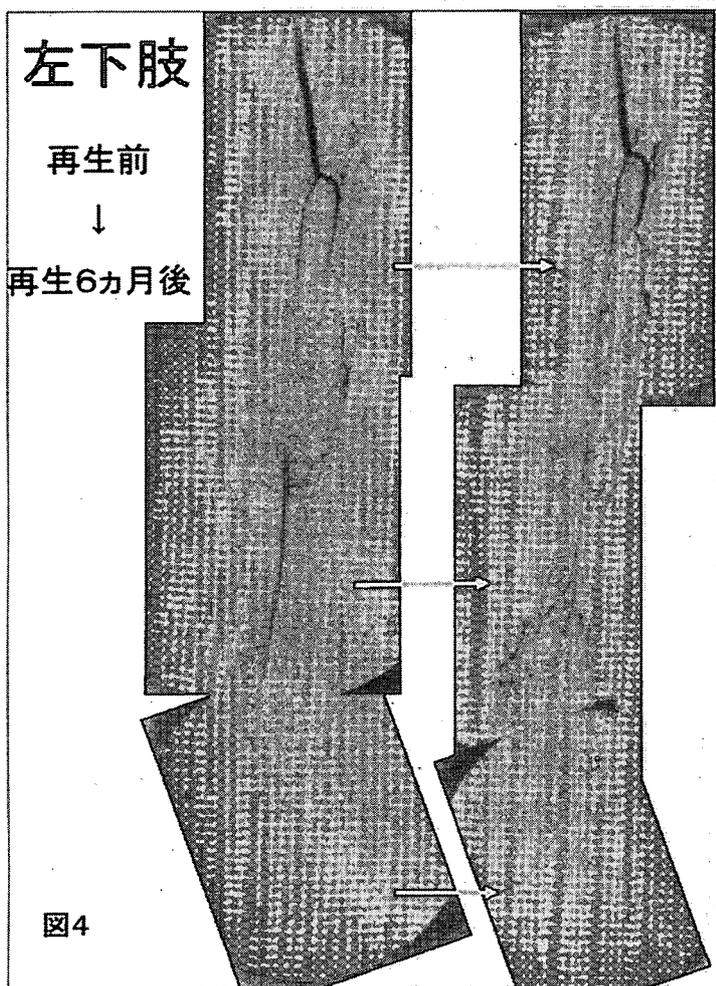
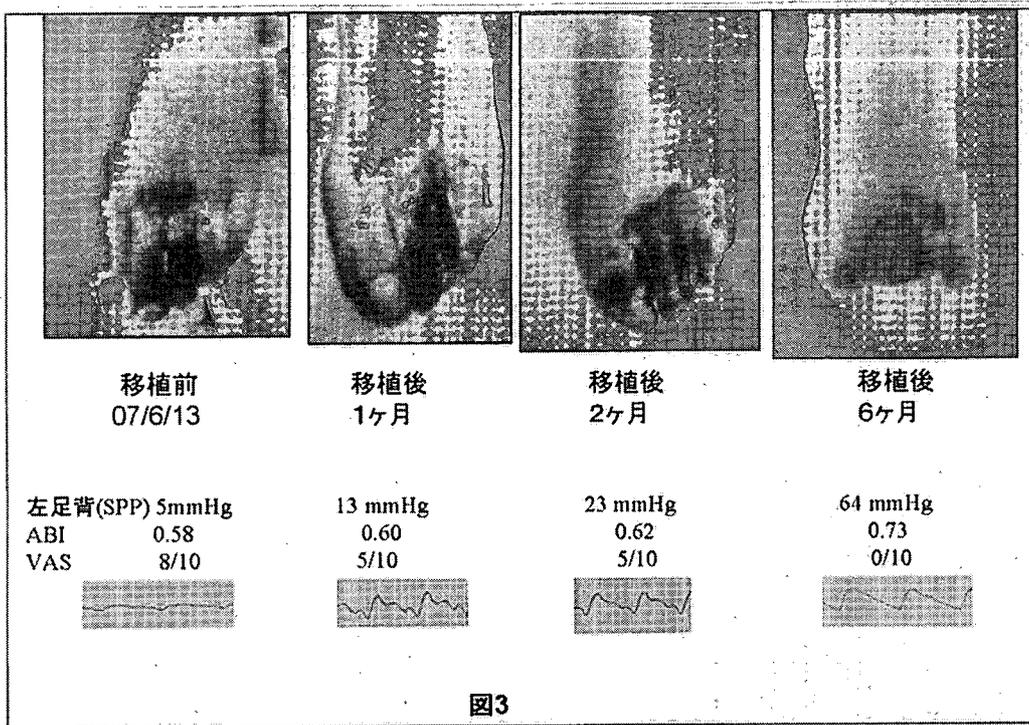
6月13日に両脛骨より骨髓単核球 2.9×10^9 個(CD34陽性細胞 2.03×10^7 個)を、既報の如く濃縮し、左下肢に筋肉注射を行った。足趾潰瘍の拡大は止まり、左足肢の冷感の改善と、脈波の出現を認め、ABI(0.58→0.73)、SPP(5→64mmHg)も改善している。(図3)6ヶ月後、足趾(I-IV趾)のminor amputation及び皮膚移植を行い、疼痛も全く認めなくなった。6ヶ月後、の下肢血

管造影にて左下腿血流の著明な増加を認め(図4)、本例における骨髓単核球細胞による血管再生治療は、著明に効果があることが証明された。

内服しているプレドニゾロンは、移植当初30mg/dayであったが、好酸球の増加を認めていないことから、6ヶ月後には15mg/dayに減量できている。疼痛が消失し、歩行リハビリテーションにより制限無く歩行可能となった。当初使用していた1日4回のレパタン坐薬も、使用せず、社会復帰している。また再生医療後、感染を示唆する徴候は認められなかった。

本症例では、移植前に骨髓細胞標本にて好酸球が増加していない事を確認している。移植前に内服薬以外に血管拡張剤の長期点滴などを試みられていたが、効果が無く当院に紹介となった患者である。1例目と同じく局所における一時的な炎症反応がみられたが、移植直後から皮膚温の上昇や潰瘍部における出血などがみられ、ABIやSPPも6ヶ月間上昇している。好酸球増加を認めていないことからプレドニゾロンを30mg/dayから15mg/dayに減量できていることも血管新生の一助となっていると考えられた。





考 察

難治性血管炎に対する血管再生医療後の2症例を示した。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パージャーカー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と考えられ、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。しかし、これらの2症例のように合併症なく著明効果がみられる症例があり、6-12ヶ月後の有効性、安全性も示された。今後症例数の増加とも適応の拡大を検討する必要があると考えられた。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 研究報告書

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

研究要旨

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

血管新生は、もともと Folkman ら⁴⁾ 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ものである。それ以外にも、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⁵⁾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、虚血周囲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骨髄単核球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。

2001年、我々は²⁾、骨髄単核球細胞分画より、機能的なEPCの培養に成功し、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。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。

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。

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髄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髄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：ジピリダモー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。

(4) 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の条件で最大跛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、名古屋大学医学部付属病院で行われた患者の長期予後を含めた治療効果判定を行い報告した⁶⁾。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。自己骨髄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、末梢流液中 CD34 陽性細胞数および CD133 陽性細胞数つまり末梢流液中EPC数が有意に持続的に増加していた。また、アンギ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。

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髄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^{7,8)}、特に喫煙患者⁹⁾ においては健常人と比較し末梢流液中の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¹⁰⁾

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、末梢流液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¹¹⁾。

参考文献

- 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
- 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
- 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
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med.* 133:275-288, 1971
 - 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
 - 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
 - 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
 - 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
 - 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
 - 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
 - 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
 - Shimizu K, Ito A, Lee JK, Yoshida T, Miwa K, Ishiguro H, Numaguchi Y, Murohara T, Kodama I, Honda H. Construction of multilayered cardiomyocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnol. Bioeng.* 2007; 96: 803-809.
 - 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.* 2007; 27: 99-105.
 - Masuda J, Mitsuyama K, Yamasaki H, Takedatsu H, Okamura T, Andoh A, Murohara T, Asahara T, Sata M. Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with ulcerative colitis. *Int. J. Mol. Med.* 2007; 19: 221-228.
 - Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi K, 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.* 2007; 71: 196-201.
 - Imai H, Numaguchi Y, Ishii M, Kubota R, Yokouchi K, Ogawa Y, Kondo T, Okumura K, Murohara T. Prostacyclin synthase gene transfer inhibits neointimal formation by suppressing PPARdelta expression. *Atherosclerosis.* 2007: 195: 322-332.
 - Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Maeda K, Tsuzuki M, Kim W, Sasaki T, Liu Z, Inoue N,

- Kondo T, Jin H, Numakuchi Y, Okumura K, Yokota M, Iguchi A, Murohara T. Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in MMP-2-deficient mice. *Circ. Res.* 2007; 100: 904-913.
- Amano T, Matsubara T, Uetani T, Nanki M, Marui N, Kato M, Arai K, Yokoi K, Ando H, Ishii H, Izawa H, Murohara T. Impact of metabolic syndrome on tissue characteristics of angiographically mild to moderate coronary lesions: Integrated backscatter intravascular ultrasound study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 49: 1149-1156.
 - Ichihara S, Yamada Y, Ichihara G, Nakajima T, Li P, Kondo T, Gonzales FJ, Murohara T. A role for the aryl hydrocarbon receptor in regulation of ischemia-induced angiogenesis. 2007. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 1297-1304.
 - Nakamura T, Torimura T, Sakamoto M, Hashimoto O, Taniguchi E, Inoue K, Sakata R, Kumashiro R, Murohara T, Ueno T, Sata M. Significance and Therapeutic Potential of Endothelial Progenitor Cell Transplantation in a Cirrhotic Liver Rat Model. *Gastroenterology.* 2007; 133: 91-107.
 - Saito Y, Sasaki K, Katsuda Y, Murohara T, Takeshita Y, Okazaki T, Arima K, Katsuki Y, Shintani S, Shimada T, Akashi H, Ikeda H, Imaizumi T. Effect of autologous bone marrow cell transplantation on ischemic ulcer in patients with Burger's disease. *Circ. J.* 2007; 71: 1187-1192.
 - Yamada T, Kondo T, Numaguchi Y, Tsuzuki M, Matsubara T, Manabe I, Sata M, Nagai R, Murohara T. Angiotensin II Receptor Blocker Inhibits Neointimal Hyperplasia Through Regulation of Smooth Muscle-like Progenitor Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 2363-2369.
 - Ai S, Cheng XW, Inoue A, Nakamura K, Okumura K, Iguchi A, Murohara T, Kuzuya M. Angiogenic activity of bFGF and VEGF suppressed by proteolytic cleavage by neutrophil elastase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 364: 395-401.
 - Koga M, Kai H, Egami K, Murohara T, Ikeda A, Yasuoka S, Egashira K, Matsuishi T, Kai M, Kataoka Y, Kuwano M, Imaizumi T. Mutant MCP-1 therapy inhibits tumor angiogenesis and growth of malignant melanoma in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 365: 279-284.
 - Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, Inoue N, Murohara T. Role of bradykinin, nitric oxide and angiotensin II type 2 receptor in imidapril-induced angiogenesis. *Hypertension.* 2008 (in press).

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 研究報告書

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

研究要旨

膠原病に起因する難治性の阻血指趾に対して、自己末梢血単核細胞移植を行い、その効果と安全性について検討を行った。症例は25歳女性。基礎疾患は強皮症。四肢末端に進行性の冷感、疼痛を認めており、手足指部に多発性の潰瘍を認めていた。移植前々日と前日の午前と午後に計4回自己末梢血単核細胞分画の採取を行った。移植は手指および足趾の潰瘍周囲の骨膜下および筋肉内に単核細胞を注射した。この移植術を、3ヶ月毎に1年間で計4回行った。今回の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 1.38×10^9 であり、うちCD34陽性細胞は平均 0.97×10^6 含まれていた。疼痛、冷感、満足度のVASは、潰瘍の軽快および冷感の改善と共に改善を認めた。また、Ankle-Brachial Pressure Index およびサーモグラフィーによる指尖部皮膚表面温度は、移植前と比較して移植後に著明に改善した。外観の評価では、手足指に認められていた潰瘍は1年間で全て軽快した。MR-Angioによる右足の描出血管の評価では、移植前と比較して明らかに描出される血管が増加していた。これまでの研究により、骨髓血単核細胞分画を使用せず、末梢血単核細胞分画のみを移植することにより、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。現在までに、最長約3年間の経過観察を行っているが、単核細胞分画移植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。

緒言

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⁾。そのため、強皮症、CREST症候群、混合性結合組織病の患者に対して自己末梢血単核細胞分画の繰り返し移植を行ったところ、自覚症状および理学所見の改善、ならびに指尖潰瘍の治癒を確認することができた。本年度は、膠原病に起因する難治性の阻血指趾に対して、より高い効果を得るべく移植する自己末梢血単核細胞数を増やして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。

方法

症例は25歳女性。基礎疾患は強皮症（罹病期間12年）、レイノー現象（発症後15年）。各種理学療法や血管拡張薬投与下においても四肢末端の進行性の冷感、疼痛を認めており、手足指部に多発性の潰瘍を認めていた。特に右足第1趾尖部には骨まで達する深掘れ潰瘍を認め、NSAIDではコントロール不能な痛みがあった。移植する自己末梢血単核細胞分画の採取は、自己末梢血各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単核細胞分画分離後に速やかに患者に返血した。この過程を1クールとし、移植前々日の午前と午後および移植前日の午前と午後に計4回行った。

移植当日、単核細胞分画を16mlのRPMI培地に懸濁したものを、0.4mlずつ手指および足趾の潰瘍周囲の骨膜下および筋肉内に注射した。上記の移植術を、3ヶ月毎に1年間で計4回行った。

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、Ankle-Brachial Pressure Index（ABI）の測定、サーモグラフィーにより手足末梢皮膚表面温度の測定、外観の

評価を移植開始前と移植後1ヶ月毎に計13回行った。また、MR-Angio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

今回の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 1.38×10^9 であり、うちCD34陽性細胞は平均 0.97×10^6 含まれていた。

疼痛の評価（Pain VAS）および冷感の評価（Feeling cold VAS）では、潰瘍の軽快と共にVASの著明な改善を認めた。満足度の評価（Satisfaction VAS）でも、潰瘍の軽快および冷感の改善と共にVASの改善を認めた。健康調査QOL尺度SF-36による調査では、移植開始前と比較してQOLの改善を認めた。

Ankle-Brachial Pressure Index（ABI）は、移植前と比較して移植後に著明に改善した（図1）

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、潰瘍の認められていた手足指尖部での温度上昇を認めた（図2）。

外観の評価では、右足第1指（図3）および右手第2指に重症潰瘍が見られていたが、右足第1趾の潰瘍は1年後には著明に改善しており（図4）、疼痛は感じなくなった。右手第2指の潰瘍は3ヵ月後の第2回目の移植前には治癒した。

MR-Angioによる右足の描出血管の評価では、移植前と比較して明らかに描出される血管が増加していた。

考察

これまでの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。その効果は移植2ヵ月後が最も顕著であった。また、末梢血単核細胞分画を繰り返し移植することにより、外科的手技を必要とするような重症潰瘍をも治療することが可能であることが確認された。

今回1箇所あたり移植する単核細胞数を昨年度

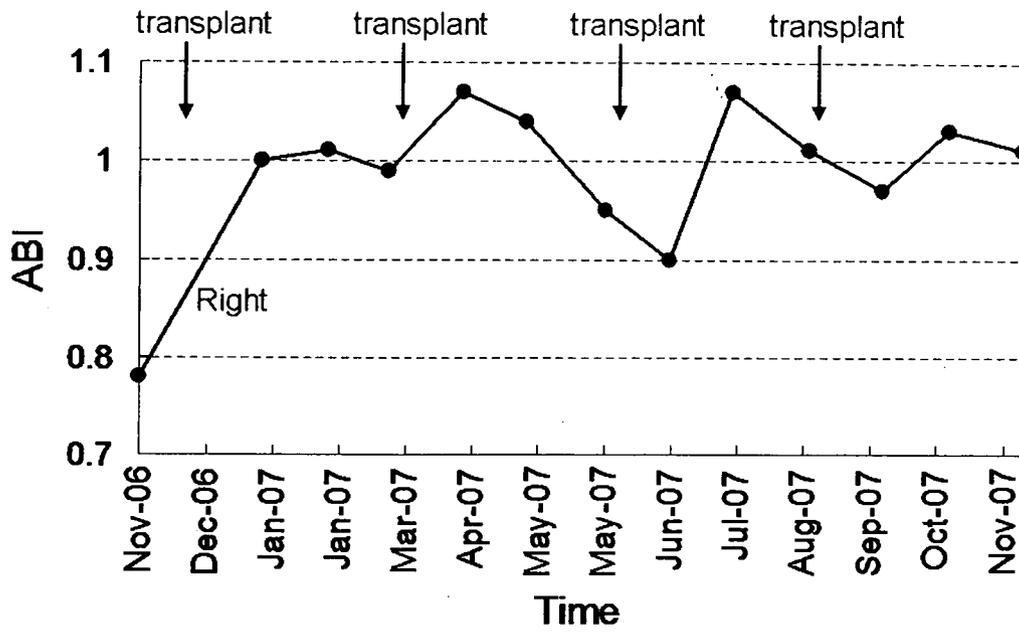


图1 Ankle Brachial Pressure Index

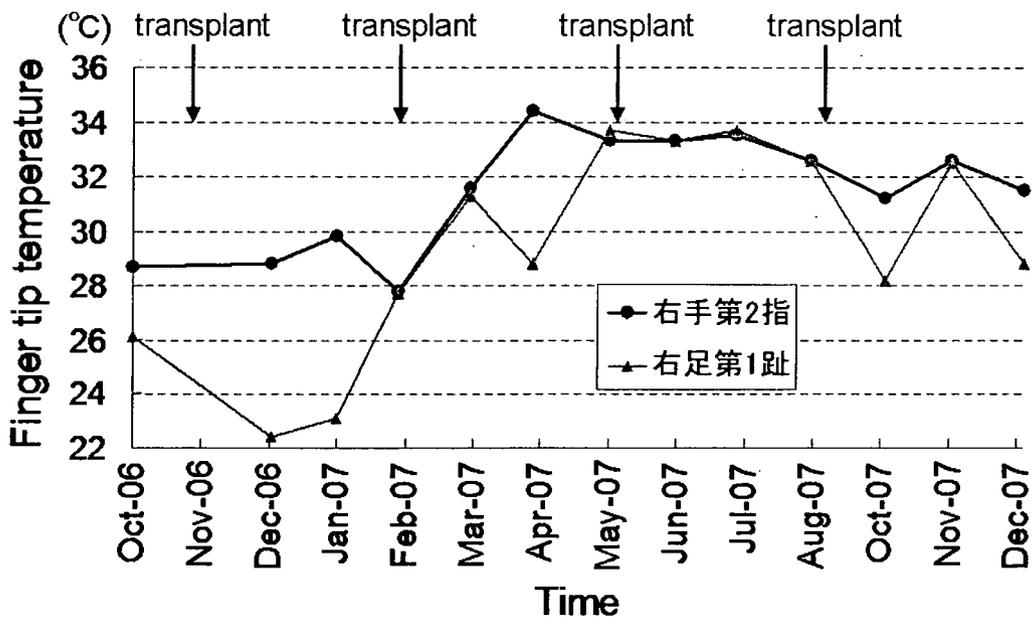


图2 Finger tip temperature

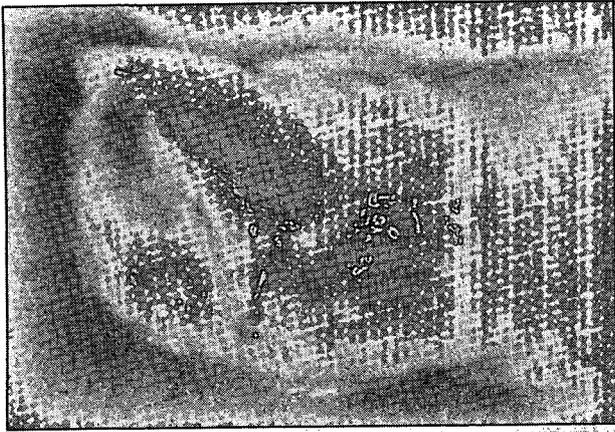


図3 右足第1趾の潰瘍（移植前）

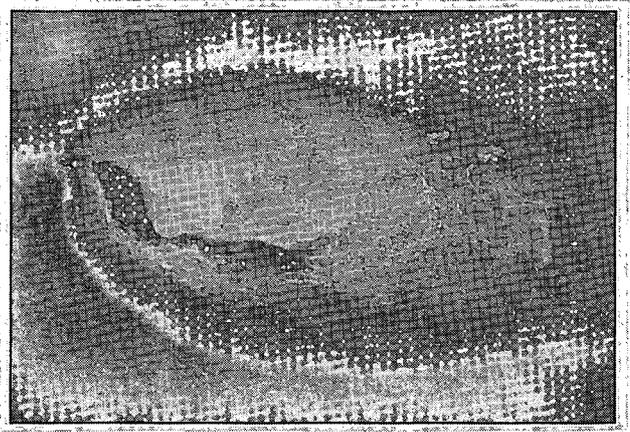


図4 右足第1趾の潰瘍（移植後1年後）

と比較して10倍以上に増量したが、明らかな副作用は現在まで認めていない。

現在までに、最長約3年間の経過観察を行っているが、単核細胞分画移植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る。

今後、さらに長期間の観察を行うことにより、長期安全性および有効性の持続期間に関して検討する予定である。また、再発患者に対して、再度末梢血単核細胞分画の繰り返し移植を行った場合の有効性についても検討する予定である。

結 語

膠原病に起因した末梢血管障害に対する単核細胞分画の移植による治療法は、安全性および有効性に優れる方法であると考えられる。さらに、移植に使用する単核細胞分画の起源として末梢血を用いることにより、患者負担は極めて減少するため、より有用であると考えられる。

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 (Oxford)* 46: 882-884, 2007

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 研究報告書

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
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

研究要旨

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20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23例に対し施行してきている。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、その治療成績について平成16年度～19年度の班会議において報告してきた。現在までに、当院にて自己骨髄細胞移植を施行した症例数は23例で全体の奏効率は78%（有効18例、無効5例）であった。23例中14例(60%)がBuerger病症例で、Buerger病に限ると、奏効率85%（有効12例、無効2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9例で、その奏効率は66%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2例であった。自己骨髄細胞移植においてはその効果判定に有効とされる客観的評価が定まっていないのが問題点であるが、当院で行っている各種検査での奏効率をみると、臨床症状での奏効率が18例（78%）であったのに対し、サーモグラフィーで改善が認められた症例は15例（68%）、DPIでは10例（45%）、DSAでは5例（41%）と順に減少し、これと臨床症状との相関をみた場合、それぞれの検査のsensitivityはサーモグラフィー83%、DPI 56%、DSA 41%とサーモグラフィーが最も臨床症状と相関していることが示された。無効症例5例の検討の結果、急性増悪期に移植を行った6例のうち5例が無効であり、また再移植例2例はともに初回施行時有効であったにも関わらず再施行時は無効であった。局所に感染を伴っていた3例はどれも無効であった。以上から非Buerger病症例および再施行症例、急性増悪期にあるもの、感染合併が骨髄細胞移植の効果発現を妨げる因子であると考えられた。また、マウス下肢虚血モデルを用いた基礎実験では、接着分子のひとつであるフィブロネクチンの併用投与により自己骨髄細胞移植の効果が増強された。この効果増強は移植早期よりも後期に著明となり、虚血筋肉内に観察される新生血管数もフィブロネクチン投与によって増加することから、フィブロネクチン投与は骨髄細胞移植の併用療法として有用である可能性が示唆された。

第一章 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²。この報告は重症虚血肢に対する血管新生療法の先駆けとなり、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ききっかけとなった。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、本治療の対象となる患者背景は、狭心症や脳梗塞など他の動脈硬化疾患の合併、高齢、慢性腎不全の合併などハイリスクであることが多いため、全身麻酔下での大量の骨髄細胞採取 (当院においては600ml以上) が適応拡大の制限となっている。

実際大量の骨髄細胞 (一般に $3-5 \times 10^9$ 個、うちCD34陽性細胞 27×10^7 個) を移植しているにも関わらず、48時間以内にその80%がアポトーシスに陥り、組織内に留まり血管新生に寄与するのは全移植細胞の数%にすぎないと予測されており、さらに最終的に血管内皮細胞に分化すると思われる血管内皮前駆細胞は骨髄CD34陽性細胞の1%以下ともいわれている。

移植細胞の低生着率にも関わらず、本治療法が一定の効果をあげている理由として、本治療法における血管新生が、従来考えられていたような移植骨髄単核球の血管内皮細胞への分化および血管構築というメカニズムによるだけではなく、血管新生因子やサイトカインを分泌する移植細胞のパラクライン作用により間接的にもたらされている可能性が示唆されるようになってきた。移植された細胞により刺激された虚血骨格筋組織が、多様な血管新生因子・サイトカインを大量かつ持続的に産生することが本治療の主要なメカニズムであると示唆する報告すらあり¹⁷この場合局所において血管内皮細胞に分化し血管新生に直接関与するのはレシピエント血液中を循環する血管内皮前駆細胞であると思われる、移植細胞はレシピエント細胞が局所に定着、分化する微小環境を整える役割を担うものといえるだろう。

また本治療法においては基礎疾患、症例によってその効果発現が一定でなく現状では治療効