

果の予測がつけ難い点も指摘されており、従来行われてきた外科的加療に比べ患者個人による治療への反応性の違いが大きな問題となっている。このこともまた、虚血局所における宿主側の微小環境の差として考えられる。

したがって宿主側の微小環境を細胞接着および血管新生に適した状態にすることは、移植細胞の生着率を上げることはもちろん、それ以上に血管新生増強効果をもたらすものと思われる。これまでに骨髄細胞の生着率の向上を目的とした宿主側の微小環境改善の手段が探られてきたが、優れた補助療法は必要移植細胞数を減じ本治療法の適応拡大にも寄与するものと期待される。

これまでに骨髄細胞移植併用療法として、細胞外マトリックスや細胞接着因子などの、細胞の接着性を高める物質との併用が考えられており、Erik J. Suuronenらはin vivoでのコラーゲンタイプ I と骨髄細胞移植との併用が効果的であったと報告している^{18,19}。

今回我々は、細胞外マトリックスとして広く体内に分布し細胞接着因子のひとつとして機能しているフィブロネクチンに注目し、骨髄幹細胞移植の補助手段として試みた。

フィブロネクチンは体内に広く分布するプロテオグリカンで、細胞表面のレセプター分子であるインテグリン、コラーゲン、フィブリン、ヘパリンなどと結合して細胞の基質への接着・伸展、細胞移動の促進、細胞形態の調整など、様々な生理機能を示す。実験系では造血細胞、繊維芽細胞、内皮系の細胞培養に適し、HUVEC培養におけるフィブロネクチンコートの使用は濃度と比例して細胞の増殖能も上がることも報告されており²⁰⁻²²、血管を構成する際に必要とされている内皮細胞の接着に関わる細胞外マトリックスである。フィブロネクチンとVEGFは共同して血管内皮細胞の遊走、増殖にかかわり、VEGFによって惹起されるCD34陽性細胞の血管内皮細胞への分化はフィブロネクチン存在下でより増強されることが報告されている²³⁻²⁴。

本研究では、信州大学付属病院におけるBMIの

臨床成績について検討するとともに、フィブロネクチンが骨髄幹細胞移植にもたらす効果について検討し、フィブロネクチン/骨髄幹細胞移植併用療法の可能性を考察する目的で行われた。

第二章 方法

第1節 BMI療法の臨床成績の検討

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

・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20年2月までにBMI療法を23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、両側の腸骨より骨髓液を約600ml採取した。この時、細胞分析用に骨髓液 3 mlをベノジェット®DK[Terumo, Japan]真空採血管を用い保存した。採取した骨髓液を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。

第2節 マウス下肢虚血モデルを用いたBMI療法に対するフィブロネクチンの併用効果の検討

第1項 モデル作成法

C57BL/6マウスのオス (6-8週齢) を、3.6%抱水クロラール(400 μ L/kg)を用いて腹腔内投与と麻酔をした。腹部から下腿の消毒および除毛を行ったのち左下総大腿動脈と外腸骨動脈、膝窩動脈と伏在動脈の分岐までの動静脈を70プロリンで結紮、切除した。創内を生理食塩水で洗浄後、創を50ナイロン糸にて縫合した。(図1) 本研究における動物実験は信州大学医学部動物実験指針に沿ったものであり、信州大学医学部動物実験委員会の承認を受けている。

第2項 レーザードップラー血流計による血流測定

マウスを上記方法にて全身麻酔後、レーザードップラーイメージ[moorLDI]を用いて、マウス下肢の血流を測定した。下腿から指先までの血流を両側について定量し、患側/健側比にて表わした。血流測定はモデル作製直前、直後、1、3、5、9、14日目に行った。

第3項 骨髓細胞移植法とフィブロネクチンの投与

・骨髓細胞採取

C57BL/6マウスのオスの左右の大腿骨を切除し、大腿骨の両端を切除、骨断端に注射針を刺し、

適量のPBS(-/-)を流し込み、ディッシュにあげ、懸濁。遠心分離したのち ACKBuffe を添加し、氷上にて20分静置し血球成分を溶血させ、さらに遠心し、骨髓単核球細胞を分離・精製(4×10^6 cell/ML)した。

・フィブロネクチン投与濃度の決定

フィブロネクチン (Fibronectin, from Human plasma) [SIGMA] をPBSに溶解し、フィブロネクチン溶液を作製 (800 μ g/mL、400 μ g/mL、200 μ g/mL、100 μ g/mL) これを250 μ Lずつ虚血作成一日後のマウスの下肢筋肉 6ヶ所に投与した。(図1)

・骨髓単核球細胞移植及びフィブロネクチンの投与

フィブロネクチン単独投与群群(n=8)、骨髓細胞移植群 (n=8)、フィブロネクチン投与/骨髓細胞移植併用群 (以下併用群) (n=8)、コントロール群 (n=8) の4群を作成した。

フィブロネクチン単独投与群は、ヒトフィブロネクチン (400 μ g/mL) を虚血作製一日後に全量250 μ Lとして下肢の筋肉 6ヶ所に投与した。骨髓細胞移植群は分離された骨髓単核球細胞 (1×10^6 cell/mL) を虚血作成一日後に全量250 μ Lとして下肢の筋肉 6ヶ所に投与した。

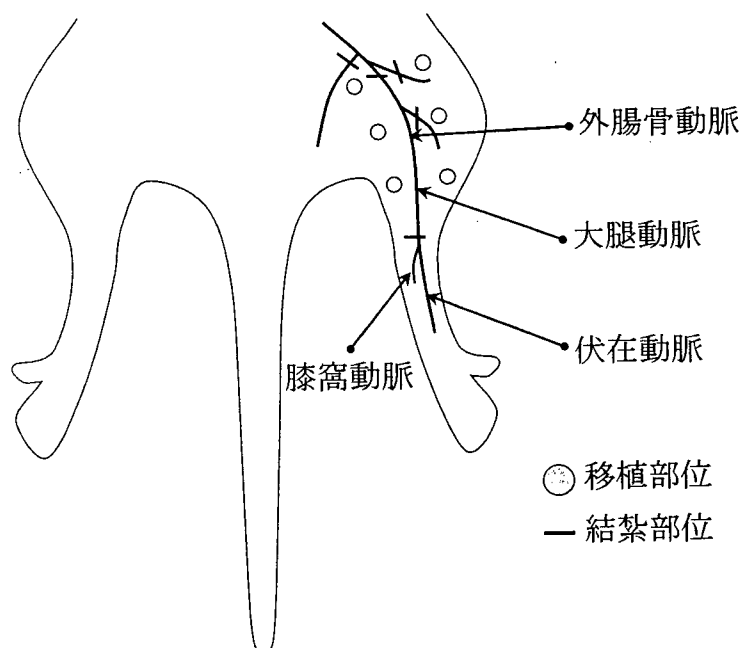


図1

併用群は、虚血モデル作成後一時間以上後にフィブロネクチン(400 μ g/mL、250 μ L)を前処置として筋肉注射にて6ヶ所に投与し、一日後に骨髓細胞(1 \times 10⁶cell/mL、250 μ L)を筋肉注射にて6ヶ所に移植した。

コントロール群はPBSを250 μ Lを筋肉注射にて6ヶ所に投与した。(図1)

第4項 組織学的解析

・摘出標本のpreparation

モデル作製後14日目に股関節からマウス両下肢を離断し、上部・中部・下部に分けた後20%中性緩衝ホルマリンにて固定後脱灰を行い、パラフィン包埋した。これを短軸方向に3 μ mの厚さに薄切し、スライドガラスにのせ24時間44℃で風乾した。

・HE染色

脱パラフィン後、ヘマトキシリンで30秒染色し流水にて10分間洗浄した後、0.5%エオジン溶液で30秒染色した。染色後脱水、透徹および封入し光学顕微鏡で観察。筋組織の変性については脱灰の影響が最も少ない大腿直筋において、図5の如くスケール化し評価した。

・免疫染色

脱パラフィン後、クエン酸溶液に浸し、電子レンジで6分間2回加熱し組織上のホルマリン架橋をはずした。PBSで洗浄後、0.3%過酸化水素水混メタノールに浸し室温にて30分間インキュベーションし内因性ペルオキシターゼ処理を行った。蒸留水およびPBSで洗浄後、blockace [大日本製薬株式会社] 5倍希釈液を用いて60分間室温でインキュベーションしblocking処理を行った。一次抗体反応は抗CD31抗体[CD31 Rabbit, SPRING BIOSCIENCE]を50倍希釈、抗VEGF抗体[A-20, Santa Cruz]を200倍希釈して4℃で一晩行った。PBSで洗浄後、二次抗体反応は抗CD31、VEGFともに抗 rabbit IgG 抗体 [VECTOR LABORATORIES]を200倍希釈で、60分間室温で行った。PBSで洗浄後、ABCキット [VECTOR LABORATORIES]を用い、ビオチン・アビジン反応を行った。PBSで洗浄後、

DABタブレット[WAKO]をPBS40mlで溶解し過酸化水素水20 μ Lを加えた後浸透し発色させた。蒸留水洗浄後、ヘマトキシリンで核染色を行った。HE染色と同様に洗浄、脱水、透徹、封入した。

第3節 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。測定される変数の変化は対 t 検定を用いて分析した。結果はmean \pm 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。

第三章 結果

第1節 臨床症例の検討

2003年11月から2008年2月現在までに信州大学医学部付属病院先端心臓血管病センターにおいて自己骨髓細胞移植を施行した症例数は23例で、男性14例、女性7例、平均年齢は40.7 \pm 13.1(29-71)、平均観察期間は28ヶ月(2-47ヶ月)であった。23例のうち2例は再施行例でいずれもBuerger病であった。23例のうち14例(60%)はBuerger病で、40%が非Buerger病であった。非Buerger病の内訳は閉塞性動脈硬化症2例、PSS1例、CREST症候群2例、抗リン脂質抗体症候群3例、弾性線維性仮性黄色腫1例であった。Fonetaine II度症例は2例あった他は、III度6例、IV度15例と重症虚血肢が多く、移植対象肢は1肢11例の他は、2肢10例、3肢2例と多肢にわたる移植例も多く見られた。

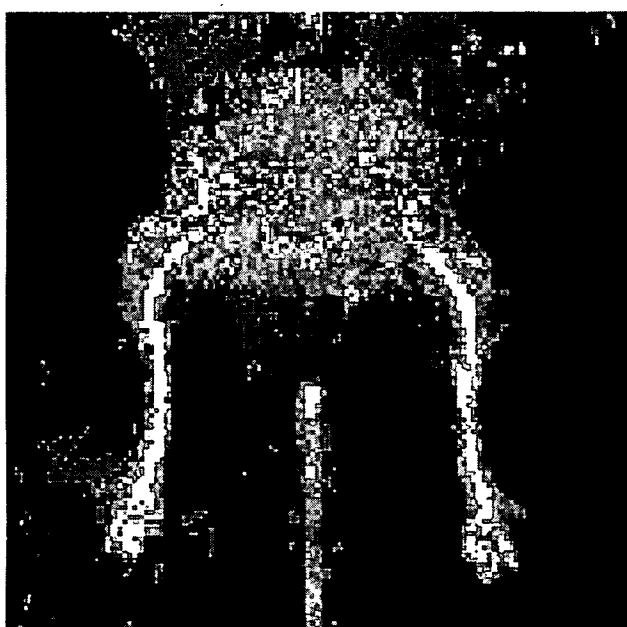
全体の奏効率は78%(有効18例、無効5例)であった。23例中14例(60%)がBuerger病症例で、Buerger病に限ると、奏効率85%(有効12例、無効2例)であった。また、閉塞性動脈硬化症、Buerger病以外の膠原病を中心とした虚血肢に移植を施行した症例は9例で、その奏効率は66%であった。移植が無効であった5例の内訳はCREST症候群1例、Buerger病にて移植後一時症状改善後に再増悪を認めた再移植例2例、および抗リン脂質抗体症候群2例であった。各種検査毎の奏効率をみると、臨床症状での奏効率が18例(78%)であったのに対し、サーモグラフィで改善が認められた症例は15例

(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例が無効症例であり、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。

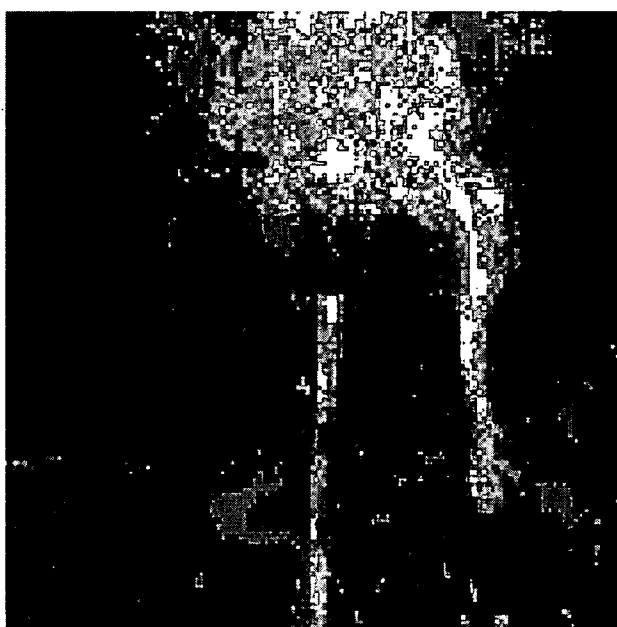
第2節 マウス下肢虚血モデルにおけるフィブロネクチン併用療法の検討

第1項 マウス下肢虚血モデルにおける経時的血流変化

マウス下肢虚血モデルの術前および術直後のレーザードップラーの写真を図2に示した。無処置の右下肢に比べ、動脈を結紮した左下肢では大腿部および下腿部の血流が低下している。



Pre Surgery



After Surgery

図2. レーザードップラーによる血流測定

図3, 4はレーザードップラーによる血流変化を定量化し健肢との比によって経時的に示したものである。患肢/健肢比は術後0.1まで低下し2週間でコントロール群においても0.6まで回復する。図には示していないが、コントロール群では術後4週間目までの観察で患肢/健肢比は0.6までの回復に留まる。

フィブロネクチンを100 μ g/mL、200 μ g/mL、400 μ g/mL、800 μ g/mLの濃度で単独投与を行った場合(図3)、有意差は見られないものの、400 μ g/mL以上の投与で血流が改善する傾向があった。フィブロネクチンの生理的血漿中濃度は約300 μ g/mLであるため、以降の実験はフィブロネクチン濃度を400 μ g/mLに調整してすすめることとした。

フィブロネクチン単独投与、骨髄細胞移植単独治療、フィブロネクチン/骨髄細胞移植併用群で比較した場合、骨髄細胞移植が行われている二群(骨髄細胞移植単独群および併用群)では術後早期(3日目)より血流の改善が認められる。フィブロネクチン単独投与を行ったものは5日目までコントロール群と同様の経過をたどるが、5日目以降改善傾向を示し、14日目に

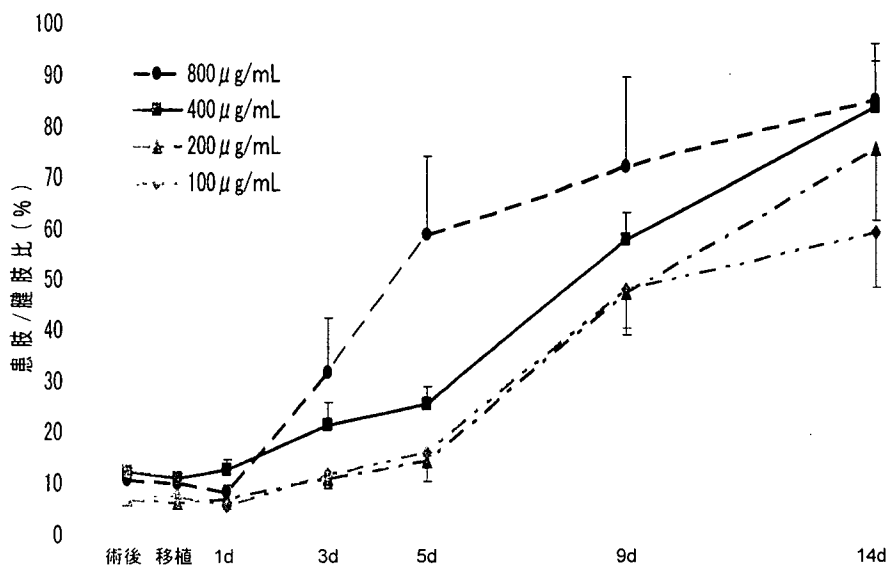


図3. フィブロネクチン単独投与における下肢血流変化

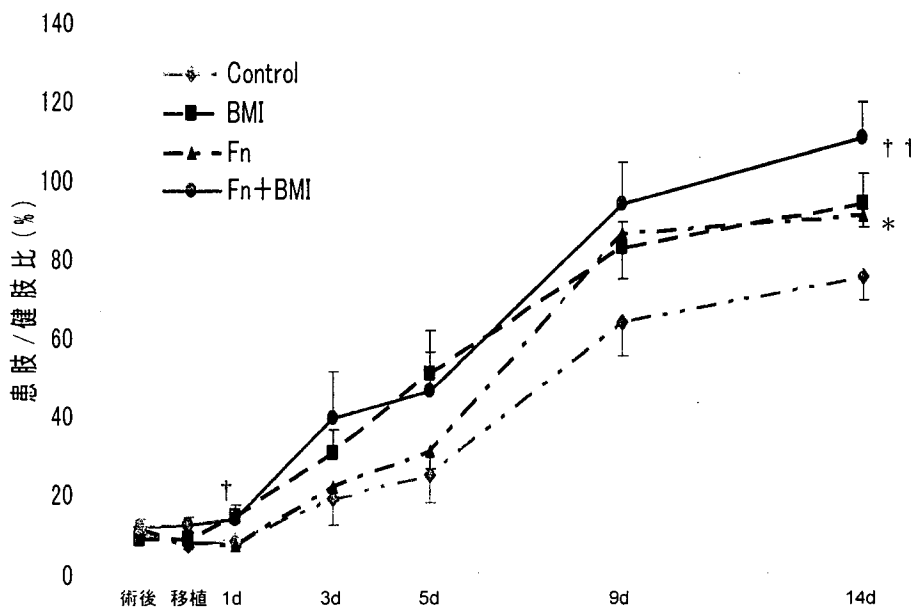


図4. 各治療群における下肢血流変化
*p<0.05 Fn vs Control
†<0.05 †† p<0.01 Fn+BMI vs Control

においては骨髄細胞単独群と同様の血流改善効果を示した。併用群の血流改善効果は最も良好で、14日目には患肢/健肢比は1.0まで回復した(図4)。

第2項 下肢筋組織における組織学的変化

大腿直筋の筋組織はコントロール群において、筋細胞数の減少および脂肪変性が多く認められる傾向にあったが、治療群(骨髄細胞移植群、フィブロネクチン群、併用群)においてはその変化は軽微であった。この変化を図5の如

くスケール化し半定量化したところ、図6のように併用群では無治療群に比べて有意に筋組織の組織学的変化が少なかった。フィブロネクチン単独療法および骨髄細胞単独療法では、有意差は認められないものの、無治療群に比べその変化が軽微である傾向が認められた。

第3項 微小血管数の変化

モデル作製後14日目の組織における微小血管密度を比較するために、血管内皮細胞に対するマーカーのひとつである抗CD31抗体による免疫染色を行った。

コントロール群、治療群いずれにおいても、虚血肢の筋肉内には多数のCD31陽性細胞を認めた(図7A)。CD31陽性細胞は骨格筋細胞間に浸潤するように散在し(図7B)、

微小血管と思われる管腔構造を形成するものも観察された(図7C、D)。健肢(非虚血肢)ではCD31陽性細胞は血管を構成する血管内皮細胞にのみ認めた。(図7E、F)

この微小血管数をプレパラートあたりの血管数で比較すると図8の如く併用群はコントロール群に比べ有意に血管数が多かった。また次いで、有意差は認めないものの、フィブロネクチン群、骨髄細胞移植群の順に血管数の増加を認めた。

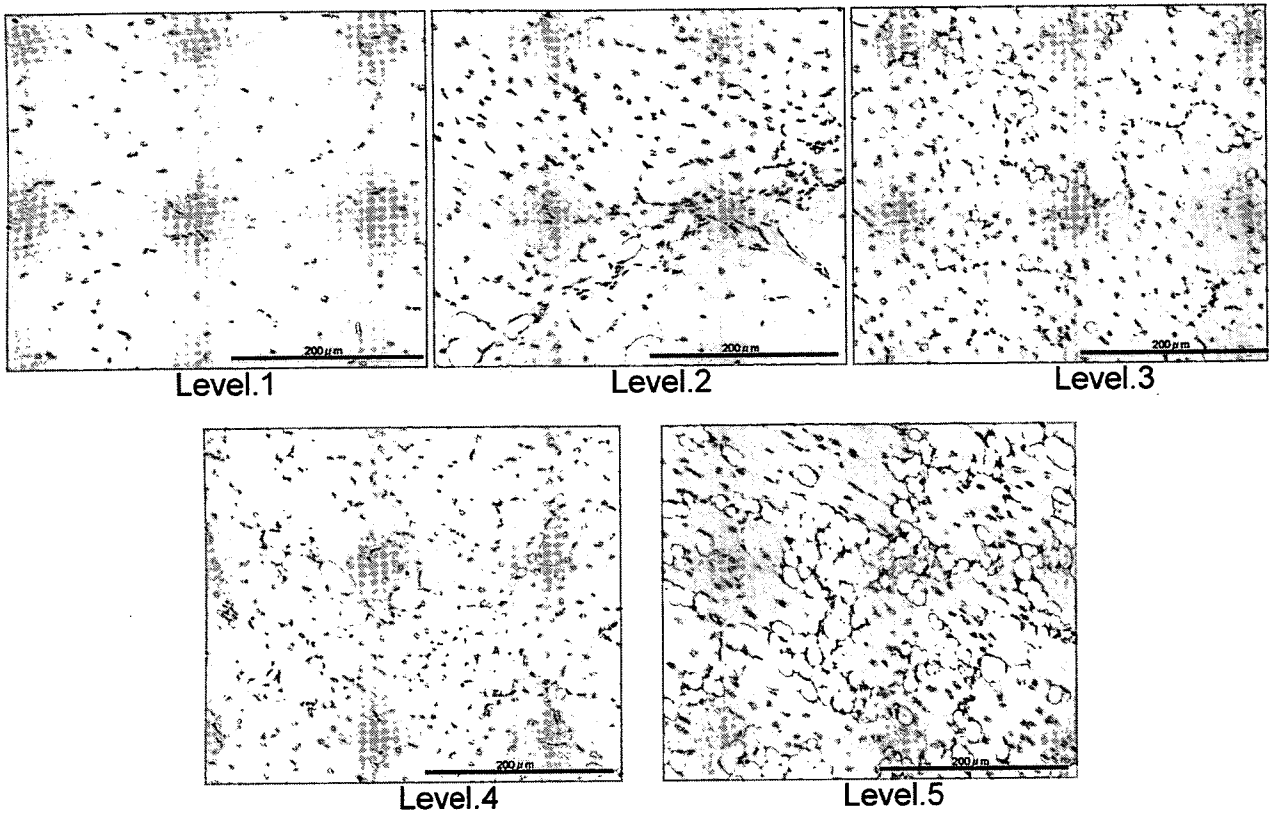


図5. 大腿直筋における筋組織の変化 HE染色像 (×200)
筋組織の組織学的変化をLEVEL.1 からLEVEL.5 の5段階にスケール化した

発現を認めた (図9C)。

第5項 安全性

HE染色での検討の結果、局所の浮腫や組織壊死などについてはフィブロネクチン投与群と非投与群の間に差を認めず、少なくとも800 µg/mlの濃度までのフィブロネクチン投与による組織障害性は観察されなかった。

第四章 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

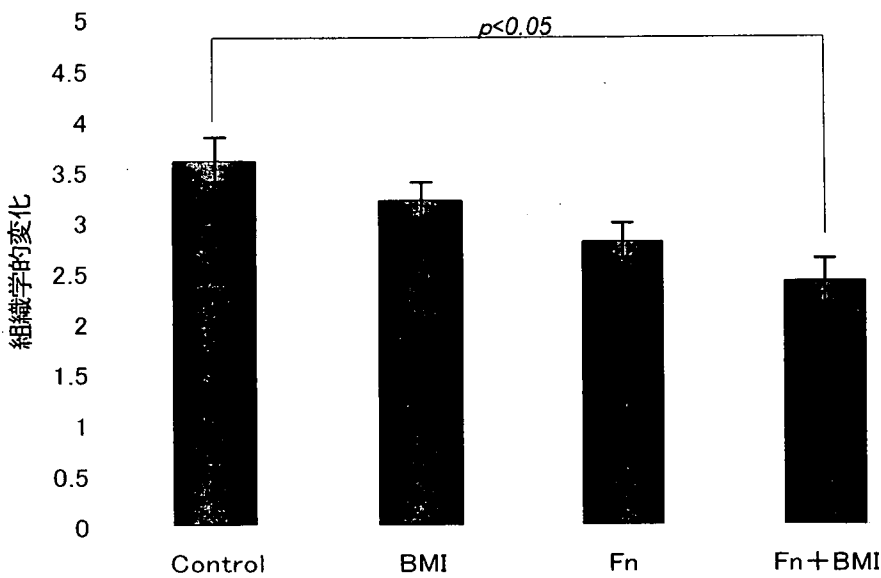


図6. 大腿直筋における筋組織の変化

第4項 VEGFの発現

健肢の骨格筋にVEGFの発現は認められず (図9A)、筋肉間に分布する血管の内皮細胞に軽度の発現を認めるのみであったが、一方、虚血肢においては骨格筋細胞にVEGFの発現を認め (図9B)、筋組織内に分布する毛細血管にも

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 ・

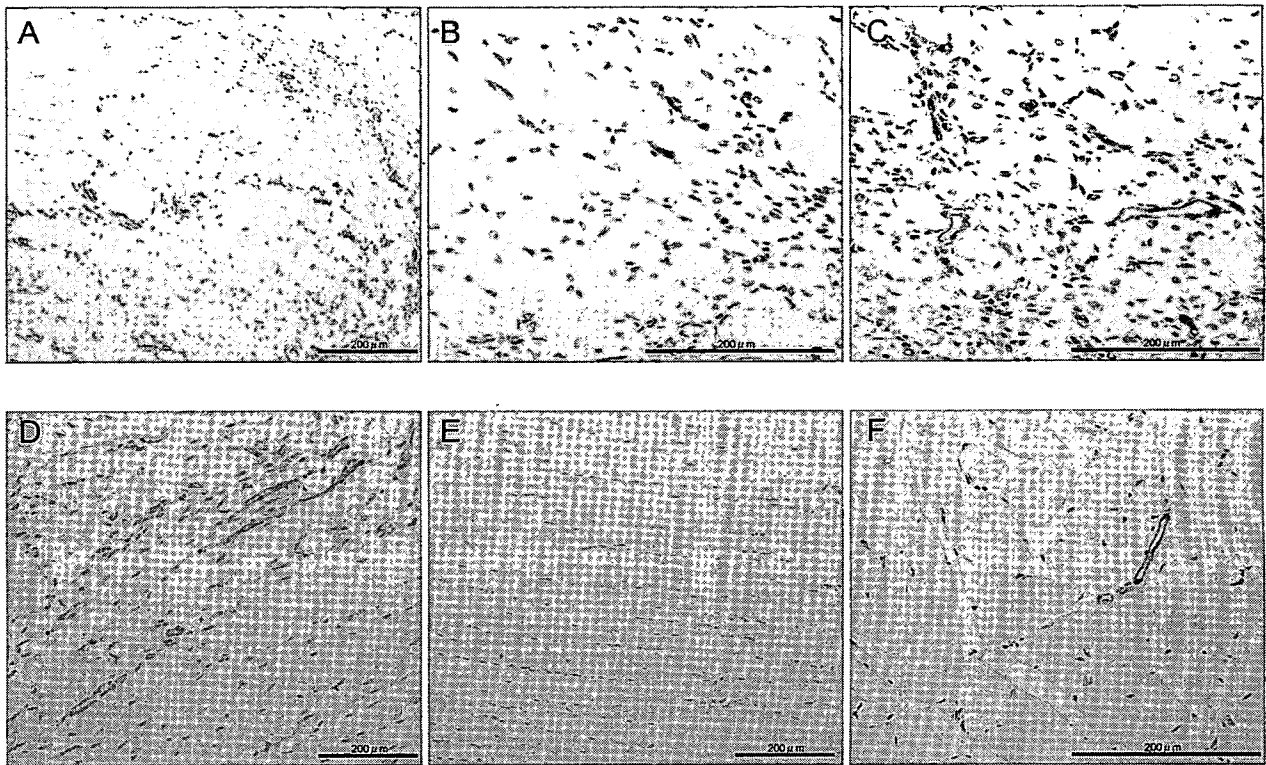


図7. CD31陽性細胞の免疫染色
 A,B,C,D;患側、E,F;健側 (A,D,E;×100、B,C,F;×200)
 組織は全て、フィブロネクチン投与/骨髄細胞移植併用群

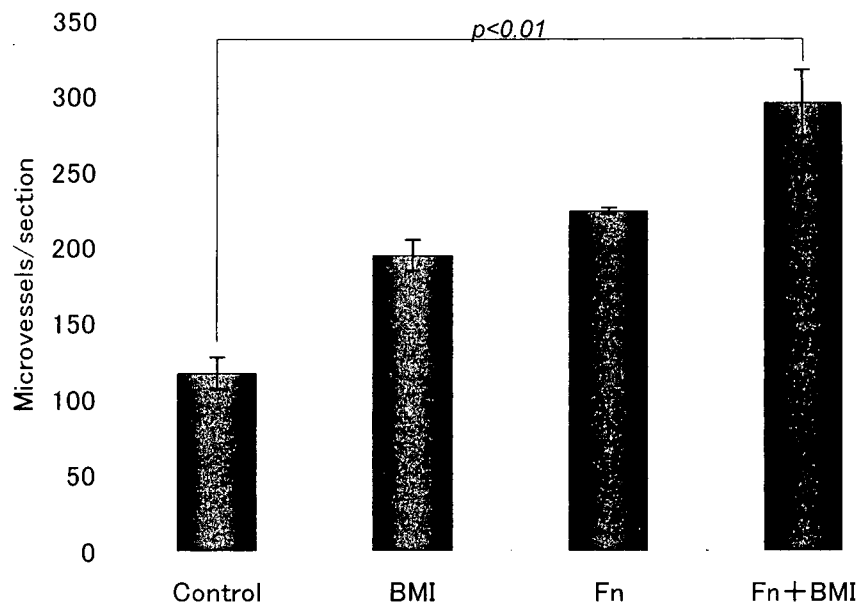


図8. 血管密度

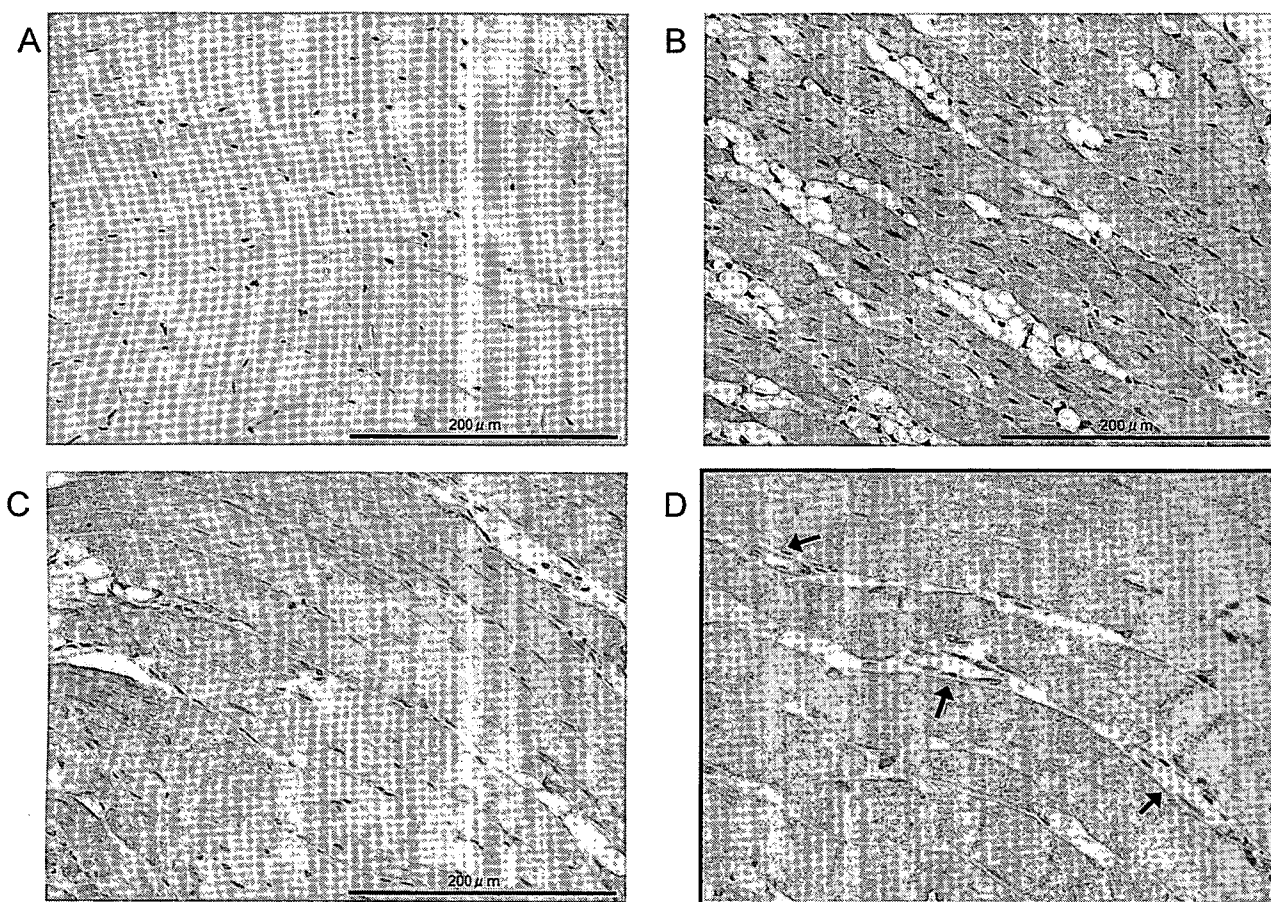


図9. VEGF免疫染色

A; 健肢 (コントロール群)、B; コントロール群、
C; フィブロネクチン投与/骨髄細胞移植併用群、D; Cの部分拡大像、矢印;微小血管 (×200)

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～18年度の班会議において報告してきた。2003年11月から2008年2月現在までの当院における全体の奏効率は78% (有効18例、無効5例) であるが、Buerger 病の奏効率は85% (有効12例、無効2例)、非 Buerger 病症例の奏効率は66%であった (図10)。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。当院ではBuerger病以外の重症虚血肢のうち、閉塞性動脈硬化症については初期の2例を除き全例に外科的血行再建およびカテーテルインターベンションを第一選択としており、また糖尿病透析合併例においては心疾患などの重症全身疾患合併のため、当院の適応項目より適応外とされることが多く、疾患内訳はBuerger病を中心に難治性血管炎がそのほとんどを占める結果とな

っている。

無効症例のうち、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。

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

case	age	sex	disease	Fontaine	clinical results	Thermography	DP	DSA	
1	62	M	Buerger	IV	effective	effective	↑	collateral	
2	30	M	Buerger	IV	effective	effective	↑	collateral *	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, infection
16	45	M	Buerger	IV	effective	effective	→	non	rapid progression
17	64	M	Buerger	III	not effective	not effective	→	-	re-do, rapid, smoking
18	49	M	Buerger	III	effective	effective	↑	-	
19	29	F	APS	IV	not effective*	not effective*	→	-	rapid progression*
20	57	F	Buerger	IV	not effective	not effective	→	-	re-do, rapid progression, infection
21	58	F	CREST	IV	effective	effective	↑	-	
22	68	M	Buerger	IV	effective	effective	→	-	
23	63	M	APS	IV	not effective	not effective	→	-	rapid progression, infection

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。骨髓細胞数が少ないため、2回目の移植では術前にGCSF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。

症例19 (29歳・女性 APS) は両下肢に移植を行っているが、比較的症状の安定していた左下肢は改善が見られたが、急性増悪期にあった右下肢については移植後も増悪が続き、ついには切断となった。同じ個人において有効肢と無効肢が同時に存在することは、本治療法の効果発現の予測困難性を示しているが、同時に詳細に検討により、本治療法の効果発現のメカニズムを解明する一助となりうるだろう。

2006年度に移植を行った症例20 (57歳・女性) はBuerger病症例の再施行例であり、初回施行時にはBMIが著効した症例であるが、再施行時には感染を伴った急性増悪期にあり、二度目の移植は無効で切断に至った。2007年度に移植を行った症例23 (63歳・男性 APS) もまた感染を伴った急性増悪期にあり、移植後も現在のところ潰瘍は拡大傾向にある。

以上より、急性増悪期に移植を行った6例のうち5例が無効症例であり、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、感染合併が骨髓細胞移植の効果発現を妨げる因子であると考えられた。(図11)

BMIはその効果発現を客観的に評価しうる検査法が未だ確定しておらず、その有効性の評価は主に潰瘍径や自覚症状の改善など主観的項目に拠っているのが現状である。このことが本治療法の有効性におけるプラセボ効果の疑念を払拭できない大きな理由である。本治療法の確立のためにも臨床症状と相関する客観的評価方法の確立が急務であるといえるだろう。

当院における術後評価は、前述の

ように自覚症状の変化(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・DSAによって行っている。各種検査毎のBMI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。サーモグラフィーは外来で行うことのできる非侵襲的検査であるが、外気温や体温の影響を受けやすく、客観性にやや乏しいのが難点である。一方で本治療法が血管新生を目的とするものでありながら血管造影検査において新生血管が描出できる症例が少ないことは、現在考えられている本治療法のメカニズムに検討の余地があることを示し、評価方法の確立は治療メカニズムの解明と並行して進められるべきものであることを示唆している。

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²⁵、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²⁶。

移植細胞の低生着率にもかかわらず、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髓単核球細胞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

case	age	sex	disease	Fontaine	target	
15	62	F	CREST	IV	lower	rapid progression infection
17	64	M	Buerger	III	upper	re-do, smoking, rapid progression
19	29	F	APS	IV	lower	rapid progression
20	57	F	Buerger	IV	lower	re-do, rapid progression infection
23	63	M	APS	IV	lower	rapid progression infection

図11. 無効症例5例の検討

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²⁷⁻²⁹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、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果の予測がつけ難い点も指摘されており、従来行われてきた外科的治療に比べ患者個人による治療への反応性の違いが大きな問題となっている。このこともまた、虚血局所における宿主側の微小環境の差として考えられる。

したがって宿主側の微小環境を細胞接着および血管新生に適した状態にすることは、移植細胞の生着率を上げることはもちろん、それ以上に血管新生増強効果をもたらすものと思われる。これまでに骨髄細胞の生着率の向上を目的とした宿主側の微小環境改善の手段が探られてきたが、優れた補助療法は必要移植細胞数を減じ本治療法の適応拡大にも寄与するものと期待される。

これまでに骨髄細胞移植併用療法として、細胞外マトリックスや細胞接着因子などの、細胞の接着性を高める物質との併用が考えられており、Erik J. Suuronenらはin vivoでのコラーゲンタイプIと骨髄細胞移植との併用が効果的であったと報告している。¹⁸⁻²⁰今回我々は、細胞外マトリックスとして広く体内に分布し細胞接着因子の一つとして機能しているフィブロネクチンに注目し、骨髄幹細胞移植の補助手段として試みた。

フィブロネクチンは血漿中に約300 μ g/mLの濃度で含まれる糖たんぱく質であるが、同時に細胞外マトリックスとして組織内に広く分布し、細胞接着、分裂、細胞遊走といった様々な

機能を担う多機能たんぱく質である。VEGFと特異的に結合するHeparin-II Domainを有し、VEGF/フィブロネクチン複合体は内皮細胞の増殖過程におけるもっとも重要な因子のひとつである。³⁰ フィブロネクチンはVEGFによって誘導されるCD34陽性細胞の虚血部位への遊走、血管内皮細胞への分化を促進する。³¹ またVEGFR-2を介したErkのリン酸化はフィブロネクチンの存在下に、より低いVEGF濃度によって惹起されることが示されている。^{23, 24, 30}

さらにVEGFによって引き起こされる内皮細胞の遊走能および増殖能は、フィブロネクチンあるいはフィブロネクチンのHeparin-II Domainサイト (VEGF binding site)およびRGDサイト (integrin binding site)のフラグメント投与によって著しく増強される。³² HUVEC培養におけるフィブロネクチンコートの使用は濃度と比例して細胞の増殖能も上がることも示されており、in vitro /in vivo いずれの実験系においてもフィブロネクチンがVEGFと共同して内皮細胞の分化誘導、増殖、血管新生に関わっていることを裏付ける報告がある。³³⁻³⁵ 我々はフィブロネクチンが虚血骨格筋内で発現しているVEGFの血管新生作用を増強し、骨髄細胞移植効果を向上させるという仮説を立て、本研究を行った。

本研究で用いた虚血肢モデルは無治療においても側副血行路の発達により2週間で患肢/健肢血流比は0.6前後まで回復しこれは4週間目においても変わらない。したがって本研究は2週間までの血流回復の速さと、術後2週間での最終的な血流回復値によって評価した。術後早期(術後5日目まで)の血流回復は骨髄細胞を移植された群(骨髄細胞移植群および併用群)において高く、フィブロネクチン単独投与群は術後早期の評価ではコントロール群と同じ程度の回復しか示さない。この時点では一見単独ではもちろん、骨髄細胞移植との併用によってもフィブロネクチン投与の効果はないように見える。しかし術後7日目以降、骨髄細胞移植群の回復率は頭打ちとなり、逆にフィブロネクチン単独投与群において血流回復率は上昇し始め、最終的に骨髄細胞移植群とフィブロネクチン単独投与群とで同様の血流比(0.9前後)となる。

フィブロネクチン投与/骨髄細胞移植併用群は術後後期になっても変わらず回復し続け、最終的に患肢/健肢血流比は正常の1.0となった。このことは単独移植された骨髄細胞のほとんどが7日目までにアポトーシスに陥り死滅するとしているこれまでの報告を裏付け、かつ今回併用投与されたフィブロネクチンが何らかの形で骨髄細胞移植の効果を持続・増強させている可能性を示唆するものである。

さらにフィブロネクチン単独投与群においても一定の血流改善効果が得られていることは大変興味深い。その効果発現が骨髄細胞移植群と比べ晩期に始まり観察期間中持続していることは、この効果が炎症や血管拡張といった直接的かつ一時的な効果ではなく、間接的かつ持続的なものである可能性を示し、フィブロネクチンが血管新生を促すとする我々の仮説を裏付けると思われる。

我々は臨床検体においてもBMI後移植1週間~3ヶ月後の間にVEGFの有意な上昇を認めることを平成17年度の班会議において報告しているが、虚血骨格筋より分泌される血管新生因子やサイトカインの刺激作用が、骨髄細胞移植の効果発現の主要メカニズムであるとするTateishi-Yuyamaらの報告³⁶を裏付けるように、本研究においてもVEGFが虚血骨格筋細胞において強く発現していることが示された。これは骨髄細胞非移植群においても同様で、フィブロネクチン単独投与群においても血流改善効果が見られている事実と合わせ、フィブロネクチンは骨髄細胞の存在の有無にかかわらず、虚血骨格筋より分泌されるVEGFのパラクライン作用を増強している可能性が示唆された。

だが我々の結果ではフィブロネクチン単独投与群では骨髄細胞移植群との併用に比べ十分な血流改善は得られず、血管数、大腿直筋の組織学的変化、いずれをとってもフィブロネクチン単独投与/骨髄細胞移植併用群において最も良好な結果を得た。また骨髄細胞移植群において、術後早期における血流回復が併用群とほぼ同等に観察された一方、フィブロネクチン単独投与群では術後早期の血流回復は認められなかった。このことは移植細胞が、特に移植後早期に

において何らかの役割を担っていることを示唆するものである。従来考えられていたような、移植骨髄細胞の生着・血管内皮細胞への分化・血管形成といったメカニズムが中心を担っているとは考えにくいにせよ、骨髄細胞がアポトーシスに陥り移植局所から消滅するまでの間、局所に留まり何らかの刺激作用を発現している可能性は否定できないと思われる。

本研究において骨髄幹細胞移植の効果発現が術後ごく早期から現れたことは、移植翌日から疼痛の軽減、皮膚温の上昇といった効果がみられるとする臨床報告とも合致しており、血管新生の速度を鑑みても、骨髄細胞移植の効果が、特にごく早期においては血管新生によるのみもたらされるものではないとする予想を裏付ける。興味深いことに術後のCRP、IL-1 β の変化が臨床症状の改善と相関しているとする臨床報告があり、³⁷これは骨髄細胞移植の効果発現のある部分は、移植細胞によって惹起される炎症性サイトカインの影響によるものだとする仮説を支持している。

臨床症例の中で骨髄細胞移植の効果が術後早期のみ一過性に現れ、遠隔期にはその効果が減じたとされる報告があるが、これらもまた、骨髄細胞移植の効果が炎症性サイトカインを通じて発揮されているという仮説を裏付けるものである。

フィブロネクチンは、オプソニン作用や線維芽細胞、単球・マクロファージ系細胞の遊走促進作用などの生物活性を通じ、炎症過程での初期の局所反応、損傷部位での有害物質の除去、創傷治癒などと深く関係しており、炎症が発生した場合、血中のフィブロネクチン濃度が変動することが臨床的、基礎的に確認されている。また、炎症性サイトカインであるIL-1 β の刺激によって線維芽細胞からフィブロネクチンが産生されること³⁸や、あるいはIL-1 β がヒト単球のIL-6産生を誘導し、IL-6はさらにフィブロネクチンの産生を誘導することが知られている。^{39,40}

2001年のHamanoら⁴¹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³⁷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関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、IL1- 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ている。これらの報告は細胞移植に炎症が関与している可能性を示唆している。

我々は平成17年度の班会議で、本治療法のメカニズムが炎症性サイトカインを中心とした早期反応群と、血管増殖因子の発現を中心とした後期反応群に分けられることを示し、後期反応群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ることを示唆した

術後ごく早期の骨髄細胞移植群における血流増加、後期におけるフィブロネクチン投与群の血流増加、そして両者併用によるそれぞれの効果の増強という我々の結果は、骨髄細胞移植によって刺激されたIL-1 β 、IL-6といった炎症性サイトカインが、一方で局所の一時的な血流増加をもたらし、一方でフィブロネクチン産生を促すことにより血管新生を惹起しているという仮説を支持するものと思われる。

虚血肢に対する骨髄細胞移植療法の問題点のひとつである効果発現の不安定さ、患者個人による応答性の違いの理由のひとつとして、移植された骨髄細胞に対する炎症の強さの違いを考えるならば、フィブロネクチン併用投与はこの部分における不安定さがある程度解決するだろう。炎症性サイトカインが血管新生や創傷治癒を促す一方、局所の浮腫やうっ血といった負の作用を持っていることを鑑みれば、フィブロネクチン併用投与は理にかなっていると思われ

る。

創傷治癒過程においても、フィブロネクチンは創傷内に強発現し、創部への細胞の遊走を促し創傷治癒を助けると言われており、眼科領域においては自己血液より採取されたフィブロネクチン点眼薬による創傷治癒が試みられている。^{42,43}

今回の研究では潰瘍形成をきたすような虚血肢に対しての実験は行っていないが、骨髄細胞移植療法を必要とする患者の多くが難治性潰瘍を合併していることを考えれば、フィブロネクチンを併用投与薬剤として用いるメリットは大きいと思われる。また点眼薬といった形であれ、すでに臨床応用されているといった点で安全性が確立しており、また自己血液からの精製手段が確立している点においても、十分臨床応用可能な治療法であると考えられる。本研究において用いたフィブロネクチンは最高800 μ g/mLという高濃度のものであるが、組織学的にフィブロネクチン投与部位に組織壊死や浮腫などの細胞障害性は認められなかった。

本研究の限界として、側副血行路の発達が起こりやすいマウスを実験動物に用いたため、コントロールにおいても14日で虚血がある程度改善してしまい治療効果を明らかな差として示しえなかったこと、また短期間での検討しか行っていないことがあげられる。今後、より虚血の強い脱落肢モデルあるいは大動物を用いた検討を加えていく必要がある。

また今回、フィブロネクチンの組織内投与量を測定していないため、投与したフィブロネクチンがどの程度の期間局所に留まり効果を発揮するのか未解決のままである。今回の研究ではフィブロネクチン単回投与のみ検討したが、骨髄細胞移植後フィブロネクチンの繰り返し投与も念頭におき、フィブロネクチンの組織内量を測定する必要があると考えている。

今回の検討では800 μ g/mL濃度までのフィブロネクチンを使用した。今後さらに高濃度での検討を行い、移植骨髄細胞量の減量あるいはフィブロネクチン単回投与療法の可能性も探っていきたい。

本治療法の如き血管新生療法の進歩と同時

に、カテーテルインターベンション、外科的血行再建の技術も年々進歩を遂げており適応疾患も拡大傾向にある昨今、血管新生療法の適応となる症例はますます重症化する傾向にある。当院においても2003年の開始当時に比し、症例の多肢化、重症化、ハイリスク化が進んでおり、特に広範囲潰瘍を伴った非 Buerger 病症例が増えつつある。これに伴い、適応に苦慮する症例が増えつつあることと相俟って、奏効率は年々低下傾向（平成16年の当院の本報告では奏効率100%）にある。疾患別、症例別の有効性の予測のためにも、本治療法のメカニズムのより詳細な解明が急務であるとともに、重症例における効果増強を目し本研究のごとき併用療法を探索していく必要があると思われる。

第五章 結語

当科におけるBMIの短・中期の奏効率は78%であったが、非 Buerger 病症例および re-do 症例のBMI 成績は Buerger 病の初回施行例に比し明らかに不良であり、また急性増悪経過中にBMI を施行した6例の奏効率は17%、感染を合併していた3例の奏効率は0%といずれも不良であった。

当科で行っている各種検査のうち、症状と最も相関していた検査はサーモグラフィーであった。

重症虚血肢に対する自己骨髄細胞移植に対するフィブロネクチンの併用投与は、自己骨髄細胞移植の効果を増強し持続させる可能性が示唆された。

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.* 1994 93(2):662-70.
- 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.* 1996 10; 348

(9024):370-4.

- 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.* 2000 36(4):1239-44.
- 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.* 2002 15; 359(9323):2053-8.
- 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.* 2003 145(6):1114-8.
- 6) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, et al. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science.* 1997 14; 275(5302):964-7.
- 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* 1999 5:434-8.
- 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.* 2006 4:59-65.
- 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. *2000 Blood* 95:952-8.
- 10) Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, et al. In vivo differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *2000 Blood* 95:3106-12.
- 13) 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. 2000 28; 97(7):3422-7.
- 14) 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. 2000 105(11):1527-36.
- 15) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. Circulation. 2001 13; 103(6):897-903.
- 16) 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 2002 10; 360(9331):427-35.
- 17) Tateno K, Minamino T, Miyauchi H, et al. Application of hematopoietic cells to therapeutic angiogenesis. Curr Pharm Des. 2006;12(5):557-63.
- 18) Suuronen EJ, Veinot JP, Wong S, et al. Tissue-engineered injectable collagen-based matrices for improved cell delivery and vascularization of ischemic tissue using CD133+ progenitors expanded from the peripheral blood. Circulation. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I138-44.
- 19) Ryu JH, Kim IK, Cho SW, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium. Biomaterials. 2005 Jan;26(3):319-26.
- 20) Storck J, Del Razek A, Zimmermann ER. Effect of polyvinyl chloride plastic on the growth and physiology of human umbilical vein endothelial cells. Biomaterials. 1996 Sep;17(18):1791-4.
- 21) Ingber DE, Prusty D, Frangioni JV, Cragoe EJ Jr, Lechene C, Schwartz MA. Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. J Cell Biol. 1990 May;110(5):1803-11.
- 22) Ingber DE. Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 May;87(9):3579-83.)
- 23) Wijelath ES, Rahman S, Namekata M, et al. Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism. Circ Res. 2006 Oct 13;99(8):853-60. Epub 2006 Sep 28.
- 24) Wijelath ES, Rahman S, Murray J, et al. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34 cell differentiation into endothelial cells. J Vasc Surg. 2004 Mar;39(3):655-60.
- 25) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. Circulation 2001 103: 897-905.
- 26) 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. 2005 66:543-51.
- 27) 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. 2003 9:1370-6
- 28) 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. 2004 19; 94(5):678-85.
- 29) 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. 2004 30; 109(12):1543-9.
- 30) Wijelath ES, Murray J, Rahman S, et al. Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular

- endothelial growth factor biological activity. *Circ Res.* 2002 Jul 12;91(1):25-31.
- 31) Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, et al. Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci.* 1997 Mar 1;2:d126-46
- 32) Krzyzanowska-Glab D, Lemanska-Perek A, Katnik-Prastowska I. Fibronectin as an active component of the extracellular matrix. *Postepy Hig Med Dosw(Online).* 2007 Nov 5;61:655-63.
- 33) Nicosia RF, Bonanno E, Smith M. Fibronectin promotes the elongation of microvessels during angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol.* 1993 Mar;154(3):654-61.
- 34) George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO: Defects in mesoderm, neural tube, and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119:1079, 1993
- 35) Enis DR, Shepherd BR, Wang Y, et al. Induction, differentiation, and remodeling of blood vessels after transplantation of Bcl-2-transduced endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 11;102(2):425-30. Epub 2004 Dec 29.
- 36) 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* 2002 10; 360(9331):427-35
- 37) Tateno K, Minamino T, Toko H, Akazawa H, Shimizu N, et al. Critical Roles of Muscle-Secreted Angiogenic Factors in Therapeutic Neovascularization. *Circ Res.* 2006 12; 98(9):1194-202.
- 38) Kubo K, Setoguchi K, Matuyama K et al. The Japanese Society of Periodontology. Effects of Lipopolysaccharide from Periodontopathic Bacteria and Interleukin-1 on Fibronectin Synthesis in Cultured Human Fibroblasts The Japanese Society of Periodontology. Vol.34, No.3(19920928) pp. 654-664
- 39) Hagiwara T, Suzuki H, Kono I, et al. Regulation of fibronectin synthesis by interleukin-1 and interleukin-6 in rat hepatocytes. *Am J Pathol.* 1990 Jan;136(1):39-47.
- 40) David A. Vesey, Catherine W.Y. Cheung, Leila Cuttle, et al. Interleukin-1 β induces human proximal tubule cell injury, α -smooth muscle actin expression and fibronectin production. *Kidney Int.* 2002 Jul;62(1):31-40.
- 41) 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.* 2001 130(1):44-54.
- 42) Fukuda M, Fullard RJ, Willcox MD, et al. Fibronectin in the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996 Feb;37(2):459-67.
- 43) Kimura K : Hattori A, Usui Y, Kitazawa K, et al. Stimulation of corneal epithelial migration by a synthetic peptide (PHSRN) corresponding to the second cell binding site of fibronectin : *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48(3):1110-1118 2007.3

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

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
研究協力者 鳥羽 健、加藤公則
新潟大学医歯学総合研究科

研究要旨

【目的】

重症下肢虚血患者に対する BMI による血管新生療法が行われてきたが、患者への侵襲が大きく治療効果も不十分であった。我々は BMI による血管新生において、移植骨髄中に含まれる赤芽球とマクロファージが主要な役割を果たしていることを報告した。少量の骨髄中に含まれている造血幹細胞を増幅培養することで、血管新生作用に富む赤芽球とマクロファージの混合物を得るための培養条件を探求した。【方法と結果】

1. ヒト骨髄から前赤芽球/青染性赤芽球・多染性赤芽球および成熟赤芽球を精製し、CD34陽性細胞と比較した。ヘモグロビン合成開始前後の未熟な赤芽球で血管増殖因子群の発現が高かった。2. 未熟赤芽球を増幅培養する条件について検討した。ヒト骨髄MNCをrhFlt-3L・rhSCF・rhTPOの存在下で7日間培養し、その後rhEPO・rhSCF・rhIGF-Iの存在下で7日間の培養を行う2段階の培養法が最適であった。3. この方法で得られた体外増幅赤芽球の移植による血流改善効果を、マウス下肢虚血モデルの治療実験を用いて評価し骨髄細胞移植の効果と比較した。体外増幅赤芽球の移植は同数の骨髄細胞移植より良好な血流改善効果を示し、その作用は10倍数の骨髄細胞移植に匹敵した。【展望】本治療法は本学に設置の倫理委員会および本病院に設置のIRBの承認を受け、第I/II相臨床試験を開始した。これまでに本治療法を施行した2例では良好な結果を得ている。症例数を増やして報告する予定である。

緒言

血管再生治療法の中で現在最も広く行われているものは、自家骨髄細胞移植療法（BMI）である¹。当施設ではこれまでにBMIを40例以上に施行した。BMIは8割以上の患者に有効であるものの、症例の中には治療後も血流量の改善が小さく、臨床的治療効果およびQOLの改善が十分でない例が少なからず存在することが明らかとなってきた。

BMIによる血管再生の機序は、骨髄中に存在

する血管内皮前駆細胞が移植部位で血管再生を起こすものと想像されていたが²、実際にはほとんどが局所に既存する血管からの発芽・伸長によって賄われる血管新生に由来することがわかった³。我々は一連の研究をおこない、BMIによって移植される赤芽球と骨髄マクロファージが、恒常的に骨髄で行われている血管新生を髓外でミミックしていることを明らかにした⁴。

BMI治療では全身麻酔下に大量の骨髄を採取するなど患者自身への侵襲が大きいこと、真に

治療を必要とする重症下肢虚血患者に対する効果が不十分であることなど多くの問題が存在し⁵、より洗練された治療法の開発が望まれた。骨髓には造血幹細胞や前駆細胞が含まれ、少量の骨髓から体外増幅培養によって強い血管新生能力を有する赤芽球とマクロファージの浮遊液を得る方法を開発すれば、新たな治療法となりうると考えた。

方法

骨髓細胞の分離と精製

骨髓赤芽球の各成熟段階の細胞を得る目的で、血液学的に正常な肺腫瘍患者16症例の廃棄肋骨から採取した骨髓を用いた。骨髓細胞の培養には、股関節手術患者2例の切除骨および健康男性ドナー6人の腸骨から採取した骨髓を用いた。

骨髓液から高比重細胞（比重1.080以上）、中比重細胞（比重1.070から1.080）および低比重細胞（比重1.070以下）を分離するために、Percollによる比重遠心法を用いた。CD34陽性細胞および赤芽球の精製には、免疫磁気ビーズ法を用いた。

細胞培養

細胞培養は、骨髓に含まれる幹細胞や前駆細胞から未熟な骨髓系細胞を増幅する第1段階の培養（rhFlt3L・rhSCF・rhTPOを添加）、そこから未熟赤芽球系細胞を増幅する第2段階の培養（rhEPO・rhSCF・rhIGF-Iを添加）、さらに成熟した赤芽球を増幅する第3段階の培養（rhEPO・rhIGF-Iを添加）を連続的に起こった。

マウス下肢虚血の治療モデル

マウス下肢虚血モデルの治療実験にはB57/BL/6Nマウスを用いた。ケタミンおよびキシラジンの腹腔内投与により麻酔し、左大腿部に皮膚切開を加え、血管を露出した後に大腿動脈起始部を結紮した。

細胞移植には同系のマウスを前記麻酔薬の致死量投与にて屠殺ののち、両側大腿骨、脛骨より採取した骨髓を用いた。1×10⁶個または1×10⁷個の骨髓MNCをEPO (400 IU/kg BW)を含む

メEDIUM0.1mlに再浮遊させ、虚血作成1時間以内に虚血部位に23G針と1mlシリンジを用いて4箇所に分けて筋肉内投与した。体外増幅マウス赤芽球は1×10⁶個の細胞をEPO (400 IU/kg BW)を含むメEDIUM0.1mlに再浮遊させ、筋肉内投与した。対照としてメEDIUM0.1mlのみの筋肉内投与およびEPO (400 IU/kg BW)を含むメEDIUM0.1mlの筋肉内投与を行い比較に用いた。EPOの追加投与として、移植の24・48・72・96・120・144時間後にEPO (400 IU/kg BW)の筋肉内投与を行い、移植細胞中に含まれる赤芽球の虚血肢内での生存を目指した。

下肢虚血作成7日後に下肢血流測定をレーザードップラー (MoorLDI)を用いて行った。両側下肢Fluxを測定し、虚血左下肢の健側右下肢に対する比を虚血下肢血流の代表値として用いた。その後屠殺して大腿四頭筋を摘出して、各種の検討に用いた。

ELISAおよび定量RT-PCR

ヒト骨髓細胞の培養上清で、VEGF, PLGFおよびEndostatinのELISAによるタンパク量の測定を行った。mRNA発現量を既報のとおりQRT-PCR法を用いて定量した。internal standardとしてヒトPBGDまたはマウスγ-アクチンを測定した。各指標のコピー数のPBGD (ヒト) またはγ-アクチン (マウス) のコピー数に対する比として表示した。

結果

生体内での赤芽球の分化

ヒト骨髓から分離精製したCD34陽性細胞および各比重の赤芽球の結果を図1に示す。メイ・ギムザ染色像でCD34陽性細胞は主に骨髓芽球からなり、一部に前赤芽球・リンパ芽球・小リンパ球様細胞を混じていた。CD235a陽性低比重細胞は主に前赤芽球および青染性赤芽球から、中比重細胞は主に多染性赤芽球から、また高比重細胞は主に正染性赤芽球からなっていた。従って、赤芽球の成熟過程を観察するには、この順で比較することとした。EPORは低比重赤芽球で発現し中比重赤芽球で発現が強く増強

したのに対し、SHP-1は低比重赤芽球で発現が低下し中比重赤芽球で発現がほぼ消失していたので、この精製法およびmRNA定量法が分子生物学的にもうまく機能していることが確認された。VEGF・PLGF・PDGF・FGF-2・HGF・Ang-1・NP-1の血管増殖因子群は、赤芽球の中では低比重細胞に最も強く発現していた。このことはヘモグロビン合成開始前後の未熟な赤芽球が最も強力な血管新生作用を持つことを示唆し、この分化段階の赤芽球を体外で増幅することが培養法樹立の目的であると考えた。

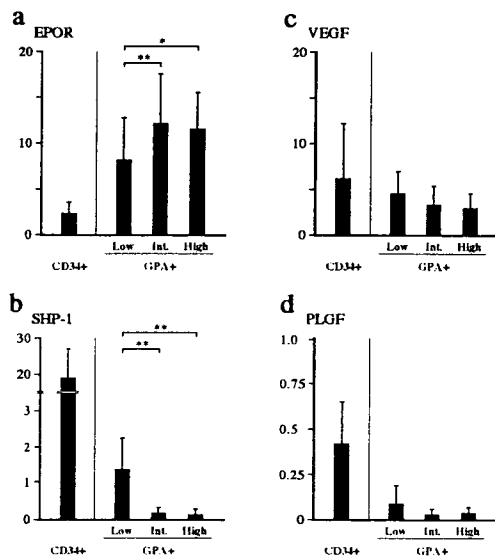


Fig 1

3 段階の培養による赤芽球の分化

ヒト骨髄MNCから3段階の培養によって得られた結果を図2に示す。メイ・ギムザ染色像の所見では、第1段階培養の終了時には帰属不明の骨髄系芽球様形態を示す細胞とマクロファージが主な構成成分であったものが、第2段階培養の終了時には主に前赤芽球に分化するとともに一部にマクロファージを混じり、第3段階培養の終了時にはヘモグロビン合成が進行していた。第3段階培養にSCFを加えた条件ではヘモグロビン合成が抑制されていた。細胞表面抗原解析では、第1段階培養の終了時にCD34陽性細胞が増幅されると同時にCD33陽性の骨髄系細胞が主体を占めるとともに多くのCD14陽性

細胞（マクロファージ）を混じていたが、第2段階培養の終了時にはCD235a陽性細胞（赤芽球）が主な細胞で一部にCD14陽性細胞を混じり、第3段階培養の終了時にはさらにCD235a陽性細胞が増加していた。

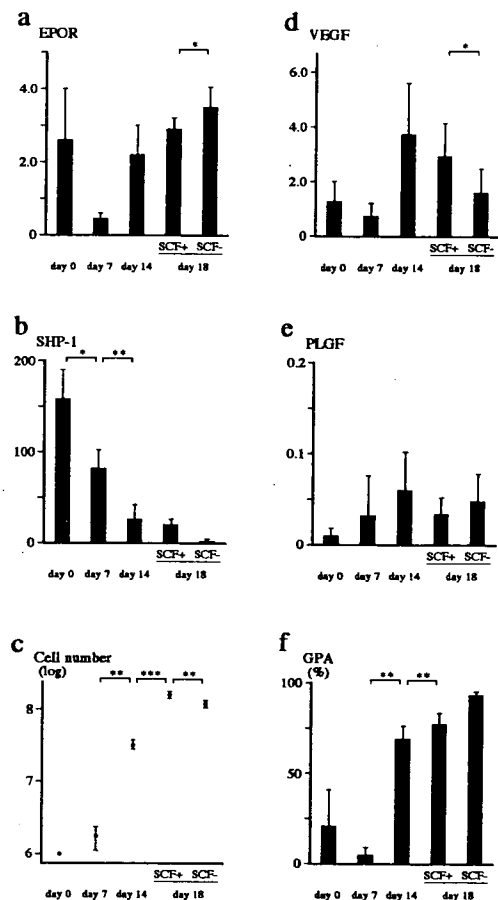


Fig 2

これはメイ・ギムザ染色像の所見と一致する。細胞総数では第1段階培養の終了時に1.8倍、第2段階培養の終了時に32倍、第3段階培養（SCF非存在下）の終了時に118倍、SCF存在下に163倍に増加していた。EPORのmRNA量は第2段階培養の終了時に増加を示し第3段階培養でさらに増加した。一方、SHP-1のmRNA量は第2段階培養の終了時にかなりの減少を示し第3段階培養でさらに減少した。VEGFおよびPLGFの蛋白発現とmRNA発現は第2段階培養の終了時に強く誘導され、第3段階培養で減少

した。PDGF・FGF-2・HGF・Ang-1・NP-1のmRNA発現は第1段階培養で強く誘導されたが、第2段階培養で著しく減少した。以上のことから、2段階の培養で目的とする未熟赤芽球が得られ、第3段階の培養によって赤芽球をさらに分化させることは本目的には則さないことが分かった。また、第2段階の培養を4日間延長しても赤芽球への分化が進行することが分かった。そこで2段階の培養日数を調整して、培養日数の最適化を目指した。

2段階の培養日数の調整

第1段階の培養日数を7-10日間、第2段階の培養日数を4-7日間として比較を行った。細胞総数では、第1段階の培養日数を延長しても大きな効果は見られず、また第2段階の培養日数を短縮すると細胞数の増加が著しく損なわれることがわかった。VEGFおよびPLGFの蛋白発現とmRNA発現は、細胞総数とほぼ同様の分布を示した。このことから、第1段階の培養日数を7日間、第2段階の培養日数を7日間とすることが適切であると考えた。

CD34陽性細胞の精製の可否

培養開始時にCD34陽性細胞を精製する必要があるか否かを検討した。同じ骨髄サンプルから、 1×10^4 コのCD34陽性細胞を含む骨髄MNCと、精製した 1×10^4 コのCD34陽性細胞を2段階(7+7日)で培養した。2段階培養終了時の細胞総数は両者でほぼ同等であったが、EPORのmRNA発現はMNCの方が高値を示した。VEGFの蛋白発現およびmRNA発現はMNCの方が有意に高く、PLGFの蛋白発現およびmRNA発現は両者でほぼ同等であった。PDGF・FGF-2・HGF・Ang-1・NP-1のmRNA発現は両者で差がなかった。このことから、培養開始前にCD34陽性細胞を精製する必要はないと考えた。

マウス下肢虚血の治療モデル

ヒト造血コロニー形成法では、後期前駆細胞(CFU-e, CFU-c)の培養に7日間、後期前駆細胞(BFU-e, CFU-GM)の培養に14日間を要するが、マウスではそれぞれ4日間および8日間を要する。そこでマウスの赤芽球増幅では、第1段階4日間、第2段階4日間の合計8日間で

培養することで体外増幅赤芽球を得た。マウス下肢虚血作成部位にメEDIUMのみを7日間筋注した群、EPOを7日間筋注した群、 1×10^6 コの骨髄細胞浮遊液(B-6)をday 0に筋注し翌日よりメEDIUMのみを6日間筋注した群、EPOを含有する 1×10^6 コの骨髄細胞浮遊液をday 0に筋注し翌日よりEPOを6日間筋注した群、EPOを含有する 1×10^7 コの骨髄細胞浮遊液(B-7)をday 0に筋注し翌日よりEPOを6日間筋注した群、EPOを含有する 1×10^6 コの体外増幅赤芽球浮遊液(E-6)をday 0に筋注し翌日よりEPOを6日間筋注した群、および健常マウスの7群間で比較を行った(図3)。

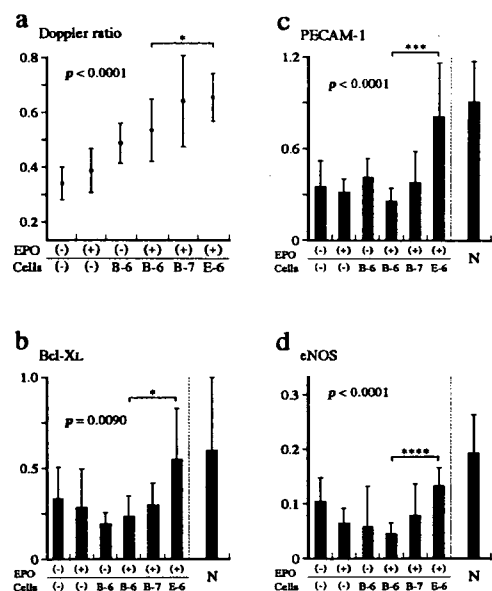


Fig 3

血流の回復の検討では、B-6 + EPOに比しE-6 + EPOで有意に良好な血流改善効果が得られ、体外増幅赤芽球移植の効果はその10倍数の骨髄細胞移植の効果に匹敵した。E-6 + EPO群では筋組織内のBcl-2のmRNA高値が観察され、Bcl-2が主に血液細胞に発現する抗アポトーシス因子であることから、移植7日目においても移植された赤芽球が同部位に投与されたEPOによって生存が高められた可能性が示唆される。E-6 + EPO群で、血管内皮および組織に由来すると思われる抗アポトーシス因子であるBcl-XLがB-6 + EPO群に比して有意に高く、血管内皮に由