

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末梢血幹細胞（PBSC）による血管再生治療
— 臨床的検討と実験的研究 —

分担研究者 堀江 卓
研究協力者 津田一郎、川村明夫
特定医療法人北楡会 札幌北楡病院 外科

研究要旨

当院では、平成13年12月以降、四肢の末梢血管障害の患者に PBSC による血管再生治療を行ってきた。透析で糖尿病を合併した ASO の患者が多いが、SLE、MCTD およびバージャー病といった難治性血管炎の患者にも行った。今回その成績を示すとともに、当治療のメカニズムの解明とコントロールや骨髓単核球との比較を目的に実験的研究を行った。① 臨床的検討：SLE 5 例（7 回治療）、MCTD 1 例（2 回治療）、バージャー病 3 例に行った。SLE の 1 例が大切断、1 例が小切断（指）となったが、ASO の症例より明らかに良好な結果を示した。② 実験的研究：ビーグル犬を用いて急性、慢性阻血モデルを作成した。急性阻血後 4 週間で組織学的に、末梢血幹細胞群も骨髓単核球群もともに対照群に比べて有意に毛細血管数が多かった。慢性阻血モデルにおいて、末梢血幹細胞移植後 3 ヶ月しても新生血管を支持する所見をみとめた。

1. はじめに

当院では、四肢の末梢血管障害の患者に末梢血幹細胞による血管再生治療を行ってきた。今回、臨床的検討では、SLE、MCTD およびバージャー病の患者を中心に、そして実験研究の結果もあわせて報告する。

2. 臨床的検討

2.1 緒言

末梢血幹細胞移植とは G-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）の投与により血中に造血幹細胞を放出させ、それを用いて骨髓移植の代わりとする治療で、血液内科で行われてきた。造血幹細胞の表面には CD34 という抗原が発現しており、その分画中に血管内皮前駆細胞が存在し、これは骨髓に由来し虚血肢における血管新生に関与することが明らかになった^{1,4)}。そこで、CD34

陽性細胞移植による血管再生療法が行われるようになった。

2.2. 対象と方法

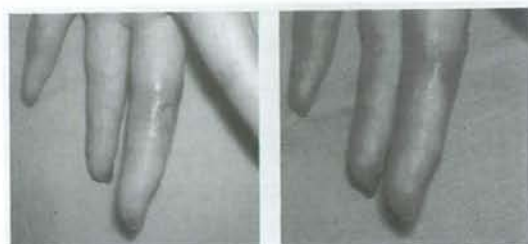
SLE、MCTD およびバージャー病の患者を対象とした。重篤な虚血性心疾患と脳血管障害のないことを、心エコー、心筋シンチ（BMIPP）、脳 CT 等で確認した。次いで、G-CSF 5 μ g/kg/day を 4 日間毎日皮下注した。4 日目に末梢血幹細胞採取（PBSCC）⁵⁾ を CS-3000 または Spectra を用いて行った。採取された CD34 陽性細胞数をフローサイトメトリー（FACScan）で計測した。同日中に採取液を患肢に 1カ所 0.5～1.0 ml ずつ 23G 針を用いて筋注した。麻酔は、上肢は全身麻酔、下肢は腰麻によった。治療効果の判定には、自覚症状、プレチスモグラフ、サーモグラフ、ABI（足関節/上腕血圧比）、3D-CT および血流シンチによった。

2-3. 結果

症例1：48才女性。結節性動脈周囲炎の診断で平成15年2月右下腿に細胞治療を行った。治療前Fontaine IV度で足趾に壊疽をみとめた。1ヶ月後の検査でサーモ、脈波上の改善をみとめた。しかし、17年7月より第1、4趾の疼痛つよく、7月21日（治療から29ヶ月後）膝下切断を行った。切断肢の腓腹筋を一部病理検査に提出したところ、壊死や血管再生像はみられなかった。また、前、後脛骨動脈に明らかな炎症像はなかった。切断肢の動脈造影では途絶をみとめ

た。その後、右大腿切断（31.5ヶ月後）、大腿再切断（55ヶ月後）と大切断を繰り返した。60ヶ月後SLE脳症を発症し入院した。

症例2：25才女性。SLEの診断で平成16年10月左前腕から手指に細胞治療を行った。治療前Fontaine IV度で手指に壊疽と潰瘍をみとめた。2ヶ月後の検査で潰瘍は消失した（図1）。平成17年2月右手指難治性潰瘍に右前腕から手指に細胞治療を行った。平成20年8月に肺高血圧を発症しているが、両手指とも潰瘍再発なし。



治療前

2ヶ月後

図1 症例73 25才 女性 SLE



治療前

1ヶ月後
〔アキレス腱切除
6ヶ月後〕

8.5ヶ月後

図2 症例96 39才 女性 SLE



治療前

1.5ヶ月後

図3 症例112 40才 女性 SLE

症例3：42才男性。SLEの診断で平成17年3月両下腿から足底に細胞治療を行った。治療前Fontaine IV度で壊疽はなかった。1ヶ月後の検査で、脈波、サーモとも改善した。41ヶ月後、左足の冷感がある。

症例4：39才女性。SLEの診断で平成17年6月両下腿と右足底に細胞治療を行った。治療前Fontaine IV度で下腿に大きな潰瘍があり、アキレス腱に壊疽がひろがっていた。1ヶ月後潰瘍は縮小、6ヶ月後、アキレス腱は外来で切除した(図2)。平成18年3月、両足、左股関節部および臀部の潰瘍に再度細胞治療を行った。平成20年11月臀部潰瘍は消失、右下腿潰瘍は2~3cm大に縮小した。

症例5：40才女性。SLEの診断で平成18年3月両側前腕から手にかけて、そして左肘に細胞治療を行った。治療前Fontaine IV度で手指に壊疽感染があり、また左肘にも潰瘍があった。1.5ヶ月で潰瘍は縮小した(図3)。20ヶ月後に左第3指を切断し、32ヶ月後SLEが再燃した。

症例6：59才女性。MCTDの診断で平成17年10月両下腿に細胞治療を行った。治療前Fontaine I度だった。平成20年9月右第5趾に潰瘍出現したため再度細胞治療を行った。壊疽はなかった。1ヶ月後潰瘍は治癒した。

症例7：61才男性。バージャー病の診断で、平成15年2月左下腿に細胞治療を行った。透析歴30年だった。治療前Fontaine III度で治療後1ヶ月で脈波、サーモ、および自覚症状が改善した。しかし51ヶ月後自殺、右足切断予定だった。

症例8：27才男性。バージャー病の診断で平成19年3月右下腿に細胞治療を行った。治療前Fontaine IV度で壊疽はなかった。1ヶ月後脈波の改善あり、18ヶ月後潰瘍は消失するも間歇性跛行が残った。

症例9：72才男性。バージャー病の診断で平成20年9月両下腿に細胞治療を行った。治療前Fontaine I度で、治療後2ヶ月冷感、しびれが残っている。

2-4. 考察

Isner¹⁾、Asahara²⁾、Shintani³⁾、室原⁴⁾らは、1997年頃よりCD34陽性細胞の分画中に血管内

皮前駆細胞が存在し、これは骨髓に由来し、虚血肢における血管新生に関与することを実験的に明らかにした。さらに細胞移植による血管再生療法の臨床応用も2000年より室原⁴⁾、松原⁶⁾およびTateishi-Yuyama⁷⁾により開始された。CD34陽性細胞は末梢血より骨髓に豊富に存在することから、全麻下に自己骨髓液を500~600 ml採取し、比重遠心分離法(CS-3000)にて骨髓単核球を分離した。約 1×10^9 個を虚血肢に筋注した。経過良好で最長14ヶ月⁶⁾下肢の血流増加は保たれた。また、稲葉^{8,9)}らは、2001年頃よりCD34陽性細胞を骨髓からではなく末梢血よりPBSCCにて採取し、さらに免疫磁気ビーズ法を用いて純化して患肢に筋注した。細胞数は $1 \sim 4 \times 10^7$ 個で術後経過良好であった。症状の改善には 1×10^7 個で十分とされた。

一方、高倉¹⁰⁾らは、血管新生のメカニズムは内皮前駆細胞ばかりでなく骨髓や末梢血中の血液細胞そのものが内皮細胞に成長因子を供給して血管新生を促すとした。また、Asahara²⁾は、実験的にCD34陽性細胞と陰性細胞とを一緒に培養することでCD34陽性細胞の血管内皮細胞への分化が促進されるとした。

今回、稲葉^{8,9)}らの方法に準じてCD34陽性細胞を末梢血より採取したが、純化は行わなかった。 1×10^7 個以上採取されていれば他の血液細胞が混入していても問題はなく、また血管再生に有効と考えた^{11,12)}。

適応について室原⁴⁾らは、ASO、バージャー病で他の治療に反応しない40~75才の患者で、除外項目として悪性新生物、重症の糖尿病性網膜症、虚血性心疾患とした。

SLE、MCTDおよびバージャー病のように透析や糖尿病の合併のない症例の成績は良好である(表1)¹²⁾。動脈硬化による末梢血管の石灰化と血管炎との違いかもしれない。切断肢の病理所見で、SLE患者の腓腹筋に壊死やmyoblastがみられず、虚血性変化がなかった。一方、糖尿病を合併した透析患者の切断肢では横紋筋にmassiveな壊死とmyoblastをみとめ、中等度から高度の虚血性変化をみとめた。前者は足趾疼痛膿瘍(壊疽)、後者は足趾壊疽と肉眼的には

ともに足趾の病変で切断となったが、足趾から離れた骨格筋（腓腹筋）に虚血、壊死をみとめたのは糖尿病、透析患者で、SLEの患者はそこまで虚血が及んでいなかった。SLEは、より末梢の血管病変であるので、成績がよいのかもしれない。

難治性血管炎は対象が若く、又ステロイドを内服している人も多く、ASOとは明らかに異なる疾患である。有効性の検討は今後の課題であるが、血管再生治療の適応疾患に加えられると考える。

表1 透析、糖尿病と治療成績

	HD(+) DM(+)	HD(+) DM(-)	HD(-) DM(+)	HD(-) DM(-)	計
症例数	56	21	17	15	109
非切断 (%)	27 (48.2)	12 (57.1)	13 (76.5)	14 (93.3)	66
小切断 (%)	8 (14.3)	3 (14.3)	1 (5.9)	0 (0)	12
大切断 (%)	21 (37.5)	6 (28.6)	3 (17.6)	1 (6.7)	31

3. 実験的研究

3-1. 目的

犬の虚血肢を作成し、これにPBSCを筋注することで、血管新生が促されることを確認し、コントロールと比較検討する。虚血モデルとして急性モデルと慢性モデルを作成した。さらに、PBSCと骨髓単核球の治療効果を比較した。

3-2. 方法

3-2-1. 実験1：急性虚血モデル

ビーグル犬（雌、体重8~10 kg）の大腿動脈を結紮し、急性虚血肢モデルとした。G-CSF 2 μ g/kgを7日間皮下注後、7日目にPBACCを行った¹³⁾。使用器械は人と同じ Spectra を用いた。総頸動脈より脱血し、前肢の皮静脈に返血した。フローサイトメトリーを用いて採取液中のCD34陽性細胞数を計測した。採取されたPBSCを内転筋や薄筋に筋注した（図4）。観察項目は、①血管造影、大腿動脈結紮直後と4週間後で、血管新生が出現しているか、血管造影スコアを用いて検討した（図5）。②内転筋ないし薄筋を生検し、組織学的に血管新生があるか評価

した。

3-2-2. 実験2：慢性虚血モデル

同様のビーグル犬に対してスポンゼルを動注し、慢性阻血モデルを作成した。大腿動脈までカニューレションし、そこからホモナイズしたスポンゼルを動注した（図6）。阻血後11日後、2ヶ月後に血管造影と筋生検を行った。また両側にスポンゼルを動注後1ヶ月して右下肢にのみPBSCの筋注を行い、その1ヶ月後（動注後2ヶ月）、3ヶ月後（動注後4ヶ月）に血管造影と筋生検を行った。

3-2-3. 実験3：骨髓単核球筋注群

同様のビーグル犬の大腿骨にヒト臨床で用いられる骨髓針を直接穿刺し、骨髓液を採取（図7）、Ficollを用いた比重遠心法で単核球を分離した。フローサイトメトリーを用いて採取液注のCD34陽性細胞数を計測した。次いで対側の大腿動脈を結紮し、分離された骨髓単核球を内転筋や薄筋に筋注した。4週間後、急性虚血モデルと同じ方法で評価した。

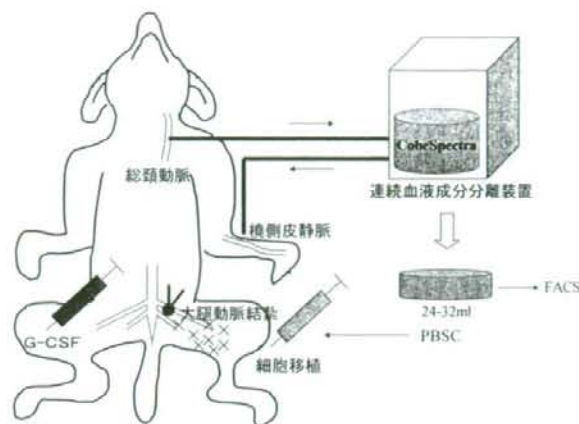


図4 急性虚血モデル実験

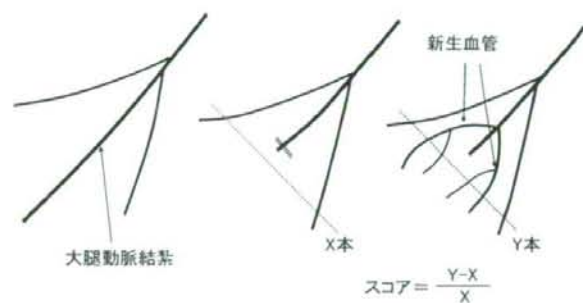
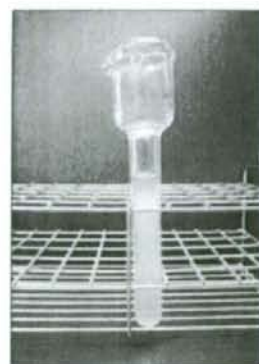


図5 血管造影による血管造成スコア



ホモジナイズする



微小血管にスポンゼルがみられる
(2日後)

図6 阻血用スポンゼル



図7 イヌ大腿骨穿刺による骨髓採取

3-3. 結果

3-3-1. 急性阻血モデル

4週間後の血管造影では、対照に比べ新生血管が多かったが、スコア化すると有意差はなかった(図8)。一方、組織学的には有意に一視野あたりの毛細血管数が多かった(図9)。

3-3-2. 慢性阻血モデル

11日後、さらに2ヶ月しても、壊死、炎症細胞浸潤、myoblastの増加といった虚血性変化があった。両側動注後、右下肢にのみPBSCを筋注した結果、1ヶ月後の筋生検で右は虚血像はなく、左には虚血像が残っていた(図10)。さらに、3ヶ月後では血管がめだち、周囲にCD34陽性細胞が散在、新生血管を支持する所見をみた(図11)。

3-3-3. 骨髓単核球筋注群

イヌ骨髓細胞のうち骨髓単核球を分離した(図12)。CD34陽性細胞数はPBSC群と比較して有意差はなかった(図13)。急性阻血モデルで血管造影によるスコアでは、対照群、PBSC群のいずれとも有意差はなかった(図8)。また毛細血管数は対照群と比較して有意に多かったが、PBSC群とは差がなかった(図9)。

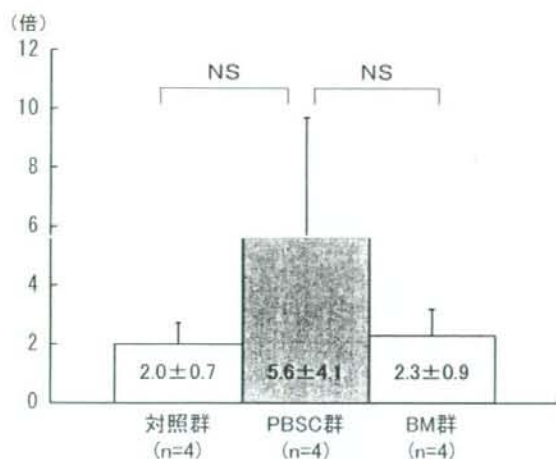


図8 血管造影による血管造成スコア

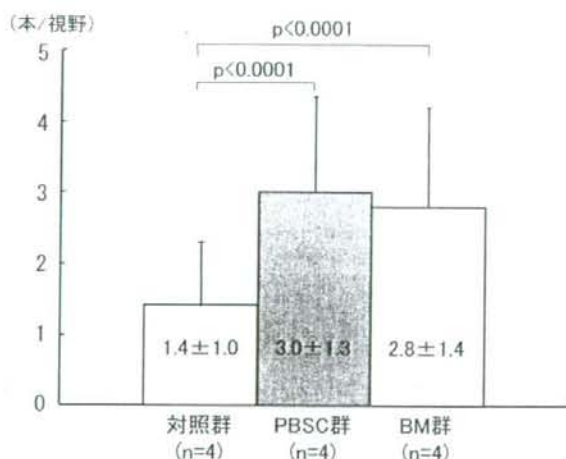
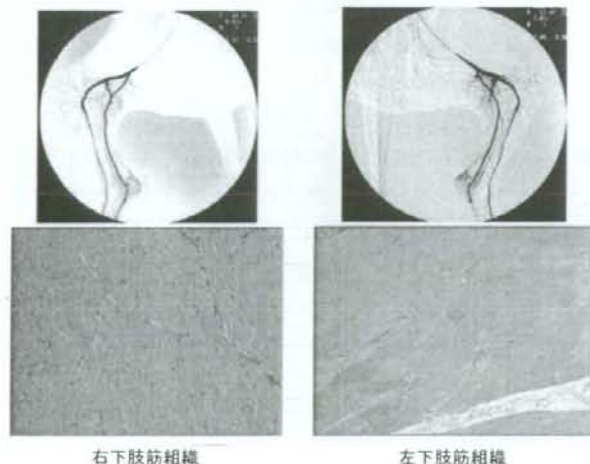


図9 毛細血管数



右下肢筋組織

左下肢筋組織

3-4. 考察

急性阻血モデルにおいて、PBSCも骨髄単核球もともに対照群に比べて毛細血管数が多かったことは、両者とも同等の血管再生治療効果が期待できる。

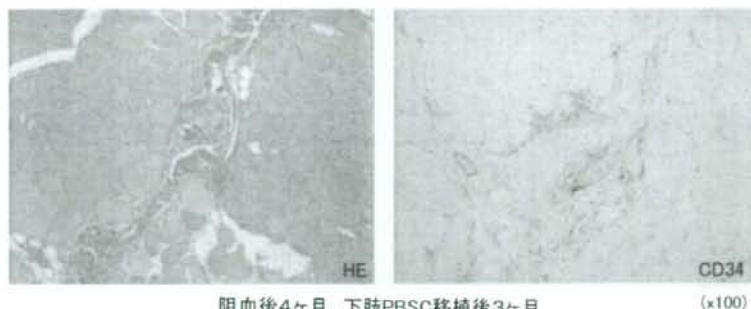
慢性阻血モデルにおいて、PBSC筋注後3ヶ月しても新生血管を支持する所見をみたことは、阻血環境下で筋注した細胞が長期にわたり生着し、機能していることを示している。ヒト臨床で、1度の細胞治療で長期に有効な例を経験するが、それを説明する所見と考える。

文 献

- 1) Inzer JM, Asahara T: Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 103: 1231-1236, 1999
- 2) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997
- 3) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103: 897-903, 2001
- 4) 室原豊明, 新谷 理, 明石英俊, 他: 細胞移植による血管新生療法. *実験医学* 19: 847-853, 2001
- 5) 関口定美, 池淵研二: 末梢血幹細胞採取. *アフエレススマニュアル*, 日本アフエレス学会編, 秀潤社, 東京, 1999, p.105-110.
- 6) 松原弘明, 正木浩哉, 湯山恵里子, 他: 閉塞性動脈硬化症への血管内皮幹細胞移植による血管再生治療. *呼と循* 50: 349-355, 2002

図10

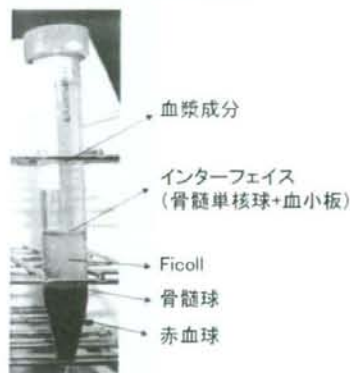
両側スポンゼル虚血に対する PBSC 移植-1
両側阻血後2ヶ月、右下肢 PBSC 移植後1ヶ月。
左に軽度の虚血像。



阻血後4ヶ月、下肢PBSC移植後3ヶ月
血管が目立ち、その周囲にCD34陽性細胞が散在
細胞治療に基づく新生血管を疑う所見である

図 11 両側スポンゼル虚血に対する PBSC 移植-2

Ficollを用いた比重遠心法



各血球成分の比重

1.032		血小板
1.063		単球
1.068		リンパ球
1.077		Ficoll
1.085		顆粒球 (骨髄球)
1.095		赤血球

図 12 骨髄単核球の分離

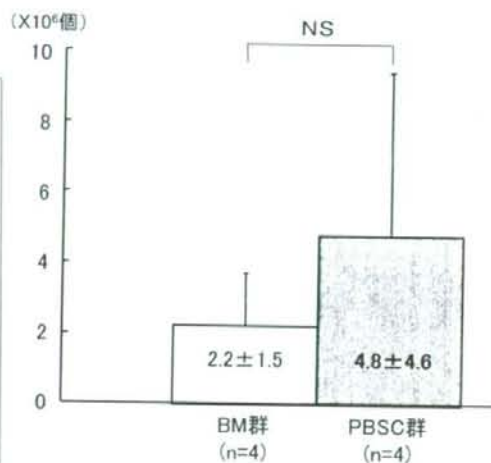


図 13 CD34 陽性細胞数

7) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, 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

8) 稲葉頌一, 古森公浩, 江頭健輔: 末梢血幹細胞を利用した血管内皮前駆細胞治療の経験. *日本アフェレシス学会雑誌* 21: 93, 2002

9) Inaba S, Egashira K: Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet* 360: 2083, 2002

10) 高倉伸幸: 血液細胞と血管新生. *最新医学* 56: 1722-1727, 2001

11) Kawamura A, Horie T, Tsuda I, et al: Prevention of limb ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 9: 59-63, 2005

12) 堀江 卓, 川村明夫, 津田一郎, 他: 末梢血幹細胞による血管再生治療. *日本アフェレシス学会雑誌* 25: 172-182, 2006

13) 山口悦子: 末梢血造血細胞 (peripheral blood stem cell) の採取条件に関する研究: 犬を用いた実験. *阪市医誌* 28: 127-142, 1999

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

虚血後血管新生における CD4 陽性 Th17 細胞の役割

分担研究者 高橋将文

協力研究者 羽田健紀

信州大学大学院医学系研究科 循環器病態学分野

【研究要旨】

骨髄および末梢血単核球の虚血部位への移植がバジュー病や膠原病による指趾虚血に有効であることから、CD4陽性のhelper T細胞のサブセットの一つであるTh17細胞の虚血後血管新生における役割について検討した。CD4陽性細胞を中和抗体で除去すると、虚血後の血流回復が抑制されることから、この血管新生にはCD4陽性細胞が機能していることが示された。Th17細胞のないインターロイキン-17 (IL-17) ノックアウト (KO) マウスに虚血モデルを作製したところ、ワイルドタイプ (WT) マウスと比較して虚血後の血流回復が障害されており、虚血部位での毛細血管形成や炎症細胞浸潤も抑制されていることが示された。さらに、IL-17KOマウスでは、虚血組織でのIL-1 β の産生も抑制されていることから、Th17細胞が虚血後血管新生において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今後、虚血後血管新生におけるTh17細胞の詳細な解析が行われることで、新たな血管新生機序の解明とTh17細胞を利用した血管新生療法開発が期待される。

はじめに

近年、幹細胞移植による心血管再生療法が研究・臨床応用されてきている。特に、血管分野における再生医療の発展は著しく、重症虚血に対する骨髄幹細胞を用いた血管再生療法は、現在数多くの施設で行われている。この治療法は、国内の多施設共同研究TACT-1 (Theapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation) によって、その有効性と安全性が報告され、2003年には閉塞性動脈硬化症およびバジュー病に対する高度先進医療として保険認可された。骨髄幹細胞移植を用いた血管新生療法では、自己骨髄細胞を使用するため免疫学および倫理的問題が少ないという利点があるが、全身麻酔下で400-600mLの骨髄液を採取する必要があることから、全身状態の不良な患者や高齢者などではその適応に限界があり、また、再移植における安

全性も確立されていない。このような問題点の克服と、患者さんにより優しい治療法の開発を目的として、これまで我々は、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF: Granulocyte Colony-stimulating Factor) やマクロファージCSF (M-CSF: Macrophage CSF) による骨髄細胞の動員およびケモカインSDF-1 (Stromal cell-derived factor-1: CXCL12) /CXCR4システムを利用した新たな血管新生療法の開発について検討を行ってきた。一方、本研究班では、末梢血単核球の移植がバジュー病や膠原病による指趾虚血に有効であることも明らかとしてきている。末梢血単核球細胞には主に単球とT・B細胞 (リンパ球) が含まれており、さらに末梢血T細胞はCD4およびCD8陽性分画に分けられる。最近、CD4陽性の helper T 細胞の新たなサブセットの1つとして Th17 細胞が発見された。Th17 細胞

は、サイトカインであるインタロイキン-17 (IL-17) を産生する能力を有しており、自己免疫性疾患の病態に深く関与していることが報告されている。しかし、Th17の血管新生への役割はところほとんどわかっていない。そこで、本研究では、虚血後血管新生におけるTh17細胞の役割の解明を目的として研究を行った。

方法と結果

1. 実験プロトコール

C57BL/6 (♂、8-12週齢：ワイルドタイプ [WT] マウスとして使用)、IL-17KOマウス (C57BL/6：東京大学医科学研究所・岩倉洋一郎教授より供与) を用いた。細胞膜表面上分子の発現はフローサイトメトリー法を用いて評価した。虚血モデルとしてはマウス右大腿動脈結紮による下肢虚血を作製して、レーザードップ

ラー法により血流を評価し、局所における血球細胞の浸潤、サイトカインの発現、毛細血管数 (CD31) については免疫組織染色法やELISA法にて解析した。

2. 虚血後血管新生におけるCD4陽性細胞の役割

虚血後血管新生におけるCD4陽性細胞の役割を検討するため、マウス下肢虚血モデルにマウスCD4に対する中和抗体を投与して検討した。抗CD4モノクローナル抗体はマウスに虚血作製の1週間前に腹腔内投与し、その後週1回間隔で投与した。マウス血中のCD4陽性細胞をフローサイトメトリー法で評価したところ、コントロール群では術後7日目、21日目の血中CD4陽性細胞はそれぞれ48.8%、45.4%であったが、抗CD4抗体投与群 (CD4 Ab) ではそれぞれ0.8%、0.9%と著明に減少していた (図1)。

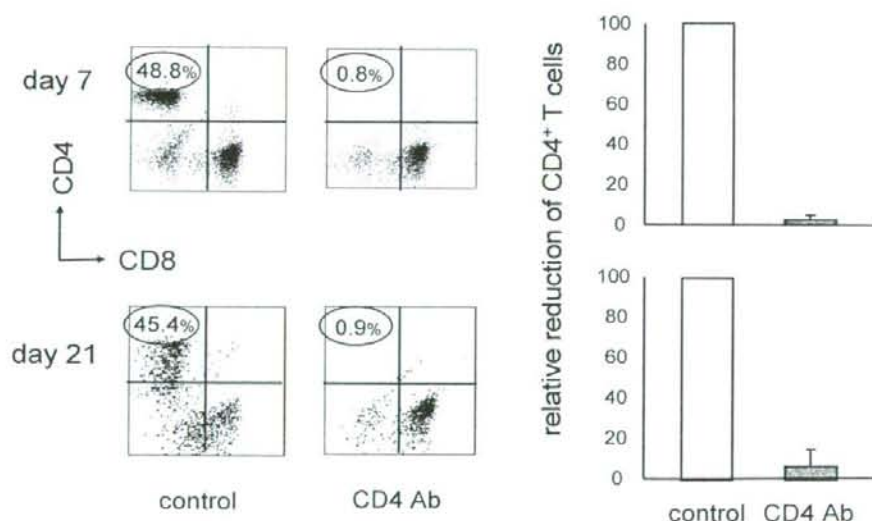


図1 抗CD4抗体投与による末梢血中CD4陽性細胞の変化

次に、抗CD4抗体投与によるCD4陽性細胞の減少が、虚血後血管新生に及ぼす影響をマウス大腿動脈結紮による下肢虚血モデルにより検討した。レーザードップラー法で評価した下肢血流の程度は、C57BL/6マウスにおいては虚血誘導後に徐々に回復して来るが (コントロール群)、抗CD4抗体投与群 (CD4 Ab) ではその回

復が障害されており、血流の回復が有意に低下していた (図2)。CD4陽性細胞はそのほとんどがリンパ球であるCD4陽性T細胞であることから、虚血後血管新生においてCD4陽性T細胞が血管新生作用を有していることが明らかとなった。

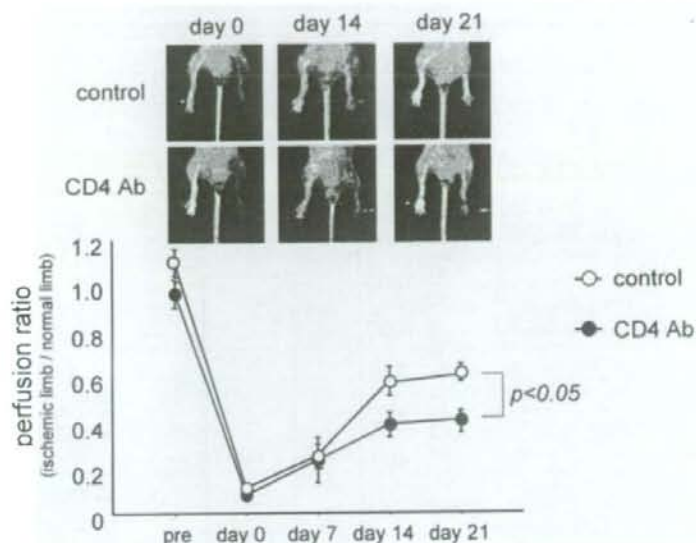


図2 マウス下肢虚血モデルにおける抗CD4抗体投与による虚血後血流回復への影響

3. 虚血後血管新生におけるIL-17の役割

最近、CD4陽性helper T細胞のサブセットとしてTh17細胞が発見され、自己免疫性疾患などの炎症性疾患に重要な役割を果たしていることが示されている。そこで、Th17細胞の役割を検

討するため、IL-17KOマウスに大腿動脈結紮による下肢虚血モデルを作製して検討を行った。WTマウスに比較して、IL-17KOマウスでは虚血後血流回復が障害されていることが明らかとなった(図3)。

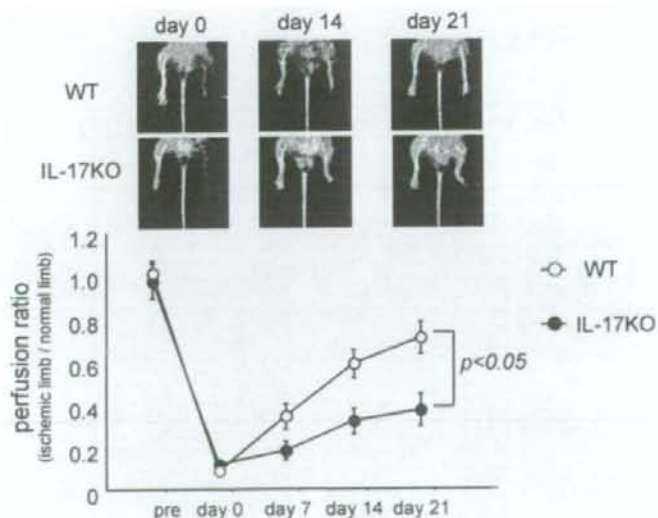


図3 IL-17KOマウスにおける虚血後血流回復への影響

また、血管内皮細胞のマーカーであるCD31抗体を用いて虚血組織における免疫組織染色を行ったところ、WTマウスに比較してIL-17KO

マウスではCD31陽性細胞数が有意に減少しており、毛細血管形成も障害されていることが示された(図4)。

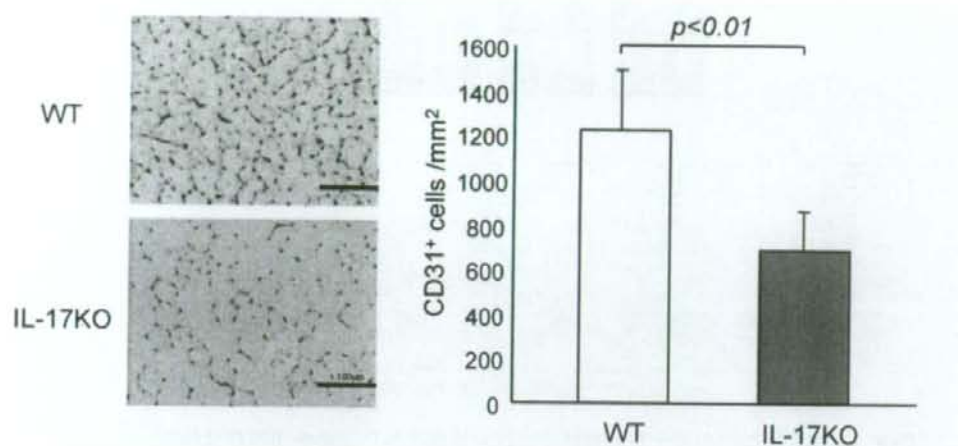


図4 IL-17KOマウスにおける毛細血管形成への影響

4. 虚血後炎症性細胞浸潤・サイトカイン産生におけるIL-17の役割

我々は以前に、マウス下肢虚血モデルにおいて虚血後に浸潤してくる炎症性細胞とそこから産生されるサイトカインが虚血後血管新生に重要な役割を果たしていることを報告している。そこで、顆粒球と単球/マクロファージ、CD4陽性T細胞について免疫組織染色法によりその

浸潤を評価した。顆粒球および単球/マクロファージは、それぞれのマーカーであるGr-1、F4/80抗体で染色を行った。虚血後1日目と3日目で顆粒球および単球/マクロファージの虚血部位への浸潤が認められたが、IL-17KOマウスではこれら炎症性細胞の浸潤が減少していた(図5)。

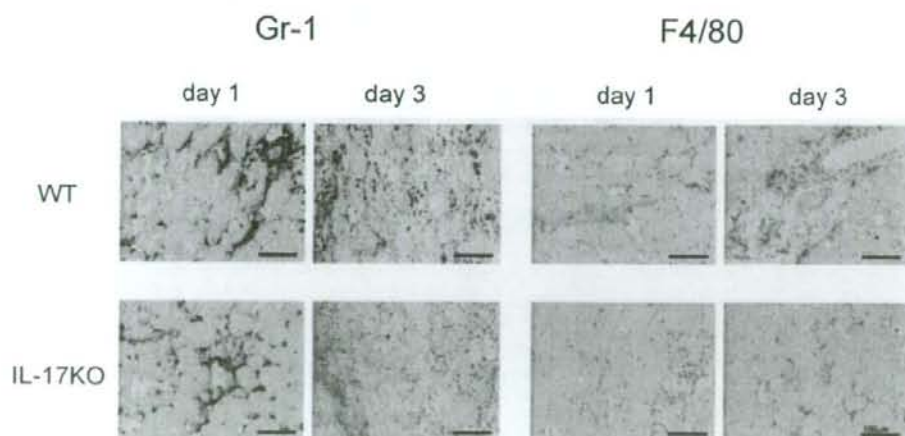


図5 IL-17KOマウスにおける顆粒球や単球/マクロファージの浸潤への影響(1)

さらに、虚血部位への浸潤細胞を詳細に検討するため、虚血部位の骨格筋を採取してコラゲナーゼ処理し、浸潤細胞についてフローサイトメトリー法を用いて解析した。汎白血球マーカーであるCD45の陽性細胞はWTマウスと比較し

てIL-17KOマウスで有意に減少しており、顆粒球と単球/マクロファージの浸潤も免疫組織染色での結果と同様にIL-17KOマウスで有意に少ないことが明らかとなった(図6)。

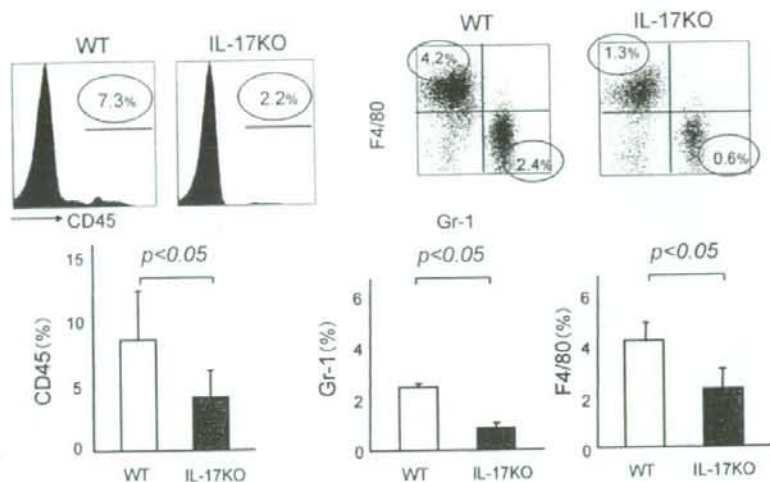


図6 IL-17KOマウスにおける顆粒球や単球/マクロファージの浸潤への影響(2)

CD4陽性T細胞についても同様に免疫組織染色およびフローサイトメトリー法で評価した。CD4陽性T細胞の浸潤は虚血後早期である1日目、3日目には認められなかったが、その後の7日目で認められ、CD4陽性T細胞が顆粒球や単

球/マクロファージと比較して虚血後には遅れて浸潤してくることがわかった。また、このCD4陽性T細胞の浸潤は、WTマウスと比較してIL-17KOマウスでは有意に抑制されていることが明らかとなった(図7)。

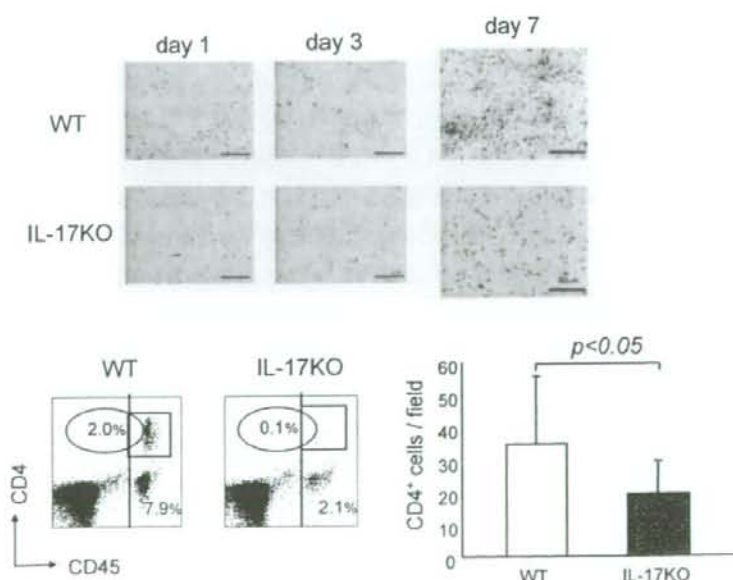


図7 IL-17KOマウスにおける虚血部位へのCD4陽性細胞浸潤への影響

虚血組織へと浸潤してきた炎症細胞は様々なサイトカインや増殖因子を発現・産生して血管新生を促進する。我々や他の研究者による検討により、炎症性サイトカインであるIL-1 β の重要性が示されていることから、虚血後2日目、5日目の虚血組織におけるIL-1 β の産生について組織をホモジナイズしてELISA法で測定した。虚血2日目では、対側の非虚血肢においてIL-1

β はほとんど認められなかったが、虚血肢では著明なIL-1 β の産生が認められた。一方、IL-17KOマウスではこのIL-1 β の産生が有意に抑制されていた。さらに、虚血5日目では2日目と比較してIL-1 β の産生が低下してくるが、ここでもWTマウスと比較してIL-17KOマウスでは虚血肢におけるIL-1 β の産生が有意に抑制されていた(図8)。

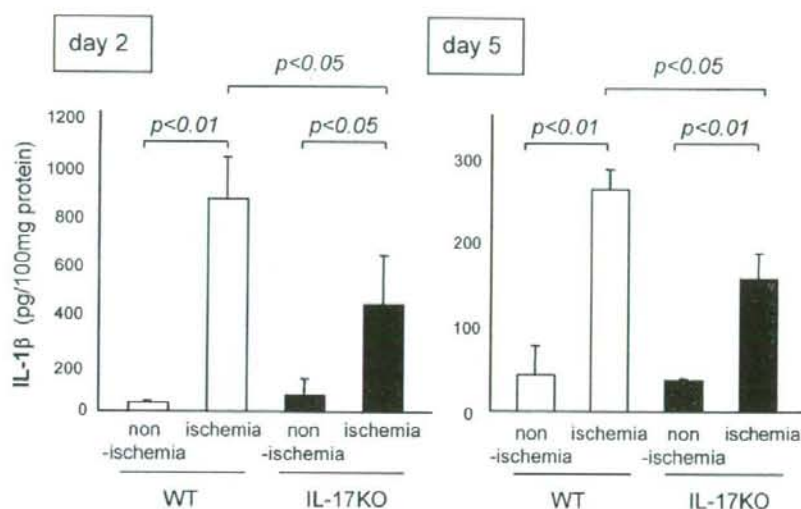


図8 IL-17KOマウスにおける虚血後IL-1 β 産生への影響

考 察

我々は、これまでG-CSFやM-CSFによる骨髄細胞動員による血管新生療法やSDF-1/CXCR4システムに着目した細胞移植による血管新生療法の研究を継続して行ってきた。本研究により、虚血後血管新生におけるCD4陽性Th17細胞の役割が明らかとされたことから、今後、新たな血管新生療法のための細胞ソースとしてのTh17の可能性について研究を行っていく予定である。すでに、T細胞の欠損しているヌードマウスの下肢虚血モデルにWTマウス由来あるいはIL-17KOマウス由来の細胞を移植したところ、WTマウス由来細胞と比較してIL-17由来細胞では血流の回復能が低下していることを見出してお

り、T細胞の新しいサブセットであるTh17細胞が新たな細胞ソースとなりえるとの手がかりを掴んでいる。また、本研究では、虚血部位で産生される血管新生因子としてIL-1 β を検討したが、今後、他のサイトカインや血管新生因子についても検討を行っていく予定である。さらに、Th17細胞から産生されるIL-17が一体どのように血管新生を誘導していくのか、という機序の解明も今後の課題である。

近年、心血管疾患への治療法は長足の進歩を遂げているにもかかわらず、現在でも重症の虚血性心疾患や末梢動脈疾患では有効な治療法もなく、救命できなかつたり、四肢の切断に至る症例も少なくない。今後、虚血後血管新生にお

けるCD4陽性細胞ならびにTh17細胞の詳細な解析が行われることで、新たな血管新生機序の解明とTh17細胞を利用した血管新生療法の開発が期待される。

文 献

1. Yoshioka T, Takahashi M, Shiba Y, Suzuki C, Morimoto H, Izawa A, Ise H, Ikeda U. Granulocyte colony-stimulating factor accelerates reendothelialization and reduces neointimal formation after vascular injury in mice. *Cardiovasc Res* 70: 61-69, 2006
2. 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
3. Morimoto H, Takahashi M, Shiba Y, Izawa A, 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
4. Shiba Y, Takahashi M, Hata T, Murayama H, Morimoto H, Ise H, Nagasawa T, Ikeda U. Bone marrow CXCR4 induction by cultivation enhances therapeutic angiogenesis. *Cardiovasc Res* 81: 169-177, 2009
5. Hata T, Takahashi M, Kawaguchi T, Kashima Y, Shiba Y, Ise H, Hida S, Iwakura Y, Taki S, Ikeda U. Critical role of Th17-CD4⁺ T cells in angiogenic response to hindlimb ischemia in mice. *American Heart Association Scientific Sessions*, New Orleans, 2008

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻 号	ページ	出版年
Yajima N, Takahashi M, Morimoto H, Shiba Y, Takahashi Y, Masumoto J, Ise H, Sagara J, Nakayama J, Taniguchi S, Ikeda U.	Critical Role of Bone Marrow Apoptosis-Associated Speck-Like Protein, an Inflammasome Adaptor Molecule, in Neointimal Formation After Vascular Injury in Mice.	Circulation	117	3079-3087	2008
Murayama H, Takahashi M, Takamoto M, Shiba Y, Ise H, Koyama J, Tagawa Y, Iwakura Y, Ikeda U.	Deficiency of tumor necrosis factor- α and interferon- γ in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury.	Cardiovasc Res	80	175-180	2008
Morimoto H, Hirose M, Takahashi M, Kawaguchi M, Ise H, Kolattukudy PE, Yamada M, Ikeda U.	MCP-1 induces cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury: role of reactive oxygen species.	Cardiovasc Res	78	554-562	2008
Shiba Y, Takahashi M, Ikeda U.	Models for the Study of Angiogenesis.	Curr Pharm Design	14	371-377	2008
Tagawa M, Ueyama T, Ogata T, Takehara N, Nakajima N, Isodono K, Asada S, Takahashi T, Matsubara H, Oh H.	MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is the regulation of skeletal myogenesis.	Am J Physiol Cell Physiol	295	C490-C498	2008
Asada S, Takahashi T, Isodono K, Adachi K, Imoto H, Ogata T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H.	Downregulation of Dicer expression by serum withdrawal sensitizes human endothelial cells to apoptosis.	Am J Physiol Heart Circ Physiol	295	H2512-H2521	2008
Ogata T, Ueyama T, Isodono K, Tagawa M, Takehara N, Kawashima T, Harada K, Takahashi T, Shioi T, Matsubara H, Oh H.	MURC, a Muscle-Restricted Coiled-Coil Protein That Modulates the Rho/ROCK Pathway, Induces Cardiac Dysfunction and Conduction Disturbance.	Mol Cell Biol	28	3424-3436	2008
中川裕介、足立淳郎、的場聖明、池田宏二、松原弘明	重症虚血肢に対する血管再生療法	日内会誌	97	364-369	2008
井本裕子、安達淳郎、小出正洋、王 英正、松原弘明	心不全への心筋再生医療の将来展望	Heart View	12	847-852	2008
浦岡真季、西澤信也、中西直彦、赤壁佳樹、中岡幹彦、的場聖明、池田宏二、松原弘明	II 血管再生療法の有用性と現状の問題点 閉塞性動脈硬化症への骨髄細胞を用いた血管再生医療	Diabetes Frontier	19	340-345	2008

	～適応・有用性・課題				
Tateishi K, Asahara E, Takehara N, Nomura T, Honsho S, Nakagami T, Morikawa S, Takahashi T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H.	Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by Sca-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration.	J Cell Science	120	1791-1800	2007
Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, Inoue N, Okumura K, Murohara T.	Role of Bradykinin, Nitric Oxide, and angiotension II Type 2 Receptor in Imidapril-Induced Angiogenesis.	Hypertension	51	252-258	2008
Shibata R, Skurk C, Ouchi N, Galasso G, Kondo K, Ohashi T, Shimano M, Kihara S, Murohara T, Walsh K.	Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function.	FEBS Lett	582	1607-1612	2008
Cheng XW, Kuzuya M, Natamura K, Maeda K, Tsuzuki M, Kim W, Sasaki T, Liu Z, Inoue N, Kondo T, Jin H, Numaguchi Y, Okumura K, Yokota M, Iguchi A, Murohara T.	Mechanisms Underlying the Impairment of Ischemia-Induced Neovascularization in Matrix Metalloproteinase 2-Deficient Mice.	Circ Res	100	904-913	2007
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 Buerger's Disease.	Circ J	71	1187-1192	2007
Yamada T, Kondo T, Numaguchi Y, Tsuzuki M, Matsubara T, Manabe I, Sata M, Nagai R, Murohara T.	Angiotension II Receptor Blocker Inhibits Neointimal Hyperplasia Through Regulation of Smooth Muscle-Like Progenitor Cells.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	27	2363-2369	2007
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
Kitamura T, Asai N, Enomoto A, Maeda K, Kato T, Ishida M, Jiang P, Watanabe T, Usukura J, Kondo T, Costantini F, Murohara T, Takahashi M.	Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin.	Nat Cell Biol	10	329-337	2007
Inoue N, Kondo T, Kobayashi K, Aoko M,	Therapeutic Angiogenesis Using Novel Vascular Endothelial	Arterioscler Thromb Vasc	27	99-105	2007

Numaguchi Y, Shibuya M, Murohara T.	Growth Factor-E/Human Placental growth Factor Chimera Genes.	Biol			
Nagashima T, Aoki Y, Onishi S, iwamoto M, Okazaki H, Minota S.	Steroid-refractory severe hepatic failure in adult onset Still's disease responding to cyclosporine.	Clin Rheumatol	27	1451-1453	2008
Nagashima T, matsumoto K, Yamamoto R, Iwamoto M, Minota S.	Polyarthritis induced by nonepisodic angioedema associated with eosinophilia.	Rheumatol Int	28	1065-1066	2008
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	46	882-884	2008
池ノ谷紘平、簗田清次	ANCA 関連血管炎	Medicina	45	134-137	2008
Tachi Y, Fukui D, Wada Y, Koshikawa M, Shimodaira S, Ikeda U, Amano J.	Changes in angiogenesis-related factors in serum following autologous bone marrow cell implantation for severe limb ischemia.	Expert Opin Biol Ther	8	705-712	2008
下平滋隆、福井大祐、越川めぐみ、池田宇一、天野 純.	エリスロポエチンの造血以外の作用 (2) 末梢動脈の保護作用	臨床透析	24	63-68	2008
Chang H, Hanawa H, Yoshida T, Hayashi M, Liu H, Ding L, Otaki K, Hao K, Yoshida K, Kato K, Toba K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Aizawa Y.	Alteration of IL-17 related protein expressions in experimental autoimmune myocarditis and inhibition of IL-17 by IL-10-Ig fusion gene transfer.	Circ J	72	813-819	2008
Makiyama Y, Toba K, Kato K, Hirono S, Ozawa T, Saigawa T, Minagawa S, Isoda M, Asami F, Ikarashi N, Oda M, Moriyama M, Higashimura M, Kitajima T, Otaki K, Aizawa Y.	Imatinib mesilate inhibits neointimal hyperplasia via growth inhibition of vascular smooth muscle cells in a rat model of balloon injury.	Tohoku J Exp Med	215	299-306	2008
Ramadan MM, Tachikawa H, Kodama M, Okawara A, Mitsuma W, Ito M, Kashimura T, Ikrar T, Hirono S, Okura Y, Suzuki K, Aizawa Y.	A pilot-controlled study of myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (MPO-ANCA) in the coronary circulation.	Int J Cardiol	128	114-116	2008
Watanabe R, Hanawa H, Yoshida T, Ito M, Isoda M, Chang H, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Ding L, Hao K, Kato K,	Gene expression profiles of cardiomyocytes in rat autoimmune myocarditis by DNA microarray and increase of regenerating gene family.	Transl Res	152	119-127	2008

Kodama M, Aizawa Y.					
鳥羽 健.	血管新生作用をもつエリスロポエチン誘導体.	医学のあゆみ	226	1055-1060	2008
Koharazawa H, kanamori H, Sakai R, Hashimoto C, Takemura S, Yamazaki E, Hattori M, Taguchi J, Fujimaki K, Tomita N, Fujita H, Fujisawa S, Harano H, Ogawa K, Motomura S, Maruta A, Ishigatubu Y.	Long-term outcome of L86 and L97 protocols for adults acute lymphoblastic leukemia.	Leukemia Lymphoma	49	2133-2140	2008
Inoue S, Oshiro H, Watanuki Y, Miyazawa N, Kudo M, Goto H, Tsukiji J, Kaneko T, Ishigatubu Y.	Metastatic Brain Mass Caused by Slow-Growing Small-Cell Lung Cancer: Differential Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Primary and Metastatic Tumor.	Lung Cancer	8	436-438	2007
井畑 淳、石ヶ坪良明	関節超音波検査における骨膜炎スコアリング	リウマチ科	38	7-12	2007
岳野光洋、村上修司、石ヶ坪良明	TNF 阻害薬の臨床—わが国における臨床成績を中心に— 主な副作用とその対策 感染症 結核	日本臨床	65	1308-1313	2007
Aimoto T, Uchida E, Matsushita A, Tabata Y, Takano T, Miyamoto M, Tajiri T.	Controlled release of basic fibroblast growth factor promotes healeng of the pancreaticojejunal anastomosis: A novel approach toward zero pancreatic fistula.	Surgery	142	734-740	2007
Tara S, Miyamoto M, Asoh S, Ishii N, Yasutake M, Takagi G, Takano T, Ohta S.	Transduction of the anti-apoptotic PTD-FNK protein improves the efficiency of transplantation of bone marrow mononuclear cells.	J Moll Cell Cardiol	42	489-497	2007
Arakawa M, Yasutake M, Miyamoto M, Takano T, Asoh S, Ohta S.	Transducyion of anti-cell death FNK protects isolated rat hearts from myocardial infraction induced by ischemia/reperfusion.	Life Sciences	80	2076-2084	2007
宮本正章、高木 元、太良修平、安武正弘、高野仁司、高木郁代、大坪春美、水野博司、川中秀和、水野杏一.	マゴットセラピー；そのメリット、ケアの実際	月刊ナーシング	27	78-85	2007
宮本正章、高木 元、高野仁司、川中秀和、大坪春美、水野博司、松田範子、秋丸琥甫、徳永 昭、高橋将文、池田宇一、水野杏一.	膠原病による難治性皮膚潰瘍とその対策	リウマチ科	39	149-155	2008

宮本正章、高木 元、高野仁司、川中秀和、大坪春美、水野博司、田畑泰彦、水野杏一。	皮膚組織の再生医療	Medical Science Digest	34	119-122	2008
宮本正章、高木 元、水野博司、水野杏一。	治療抵抗性壊疽に対するマゴットセラピー	皮膚病診療	30	1051-1060	2008
宮本正章、高木 元、水野博司、水野杏一。	新時代の糖尿病学(4) - 病因・診断・治療研究の進歩 -	日本臨床	66	700-712	2008
宮本正章、高木 元、水野博司、水野杏一。	I 重症糖尿病性足病変管理の新展開 重症糖尿病性足壊疽におけるマゴットセラピーの有効性	Diabetes Frontier	19	331-339	2008
安武正弘	重症冠動脈疾患に対する骨髄由来単核球細胞を用いたハイブリッド治療	Angiology Frontier	7	259-264	2008
藤本和輝、宮尾雄治、古賀英信、原田恵実、金澤尚徳	血管再生療法が非常に有効であった Buerger 病の 1 症例	Angiology Frontier	7	183-187	2008
宮尾雄治、田中朋子、福嶋隆一郎、原田恵実、藤本和輝。	心不全例におけるカルベジロール導入クリティカルパスの有用性	呼吸と循環	56	953-956	2008
Kojima S, Funahashi T, Otsuka F, Maruyoshi H, Yamashita T, Kajiwara I, Shimomura H, Miyao Y, Fujimoto K, Sugiyama S, Sakamoto T, Yoshimura M, Ogawa H.	Future adverse cardiac events can be predicted by persistently low plasma adiponectin concentrations in men and marked reductions of adiponectin in women after acute myocardial infarction.	Atherosclerosis	194	204-213	2007
Matsukawa M, Kaikita K, Soejima K, Fuchigami S, Nakamura Y, Honda T, Tsujita K, Nagayoshi Y, Kojima S, Shimomura H, Sugiyama S, Fujimoto K, Yoshimura M, Nakagaki T, Ogawa H.	Serial Changes in von Willebrand Factor-Cleaving Protease (ADAMTS13) and Prognosis After Acute Myocardial Infarction.	Am J Cardiol	100	758-763	2007
米川元樹、堀江 卓、津田一郎、川村明夫	透析患者の幹細胞治療	臨床透析	23	489-495	2007
Kubota K, Soeda J, Misawa R, Mihara M, Miwa S, Ise H, Takahashi M, Miyagawa S.	Bone marrow-derived cells fuse with hepatic oval cells but not involved in hepatic tumorigenesis in the choline-deficient ethionine-supplemented diet rat model.	Carcinogenesis	29	448-454	2008
高橋将文、小林英司	自己免疫性疾患に対する新しい S1 受容体アゴニストの効果	今日の移植	21	193-199	2008
高橋将文	膠原病関連血管炎に対する血管再生療法	血栓止血誌	18	344-346	2007
高橋将文	細胞移植による心筋再生療法	信州医誌	55	299-300	2007