

- up in a case of visceral varicella-zoster infection ameliorated with intravenous acyclovir. *Int J Hematol* 85: 242-245, 2007
146. Kobayashi N, Yang J, Ueda A, Suzuki T, Tomaru K, Takeno M, Okuda K, Ishigatsubo Y. RanBPM, Muskelin, p48EMLP, p44CTLH, and the armadillo-repeat proteins ARMC8alpha and ARMC8beta are components of the CTLH complex. *Gene* 15;396: 236-247, 2007
147. Okamura M, Yamaji S, Nagashima Y, Nishikawa M, Yoshimoto N, Kido Y, Iemoto Y, Aoki I, Ishigatsubo Y. Prognostic value of integrin beta1-ILK-pAkt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 38: 1081-1091, 2007
148. Ideguchi H, Ohno S, Ishigatsubo Y. Risk factors associated with the cumulative survival of low-dose methotrexate in 273 Japanese patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 13: 73-78, 2007
149. Tomita N, Motomura S, Hyo R, Takasaki H, Takemura S, Taguchi J, Fujisawa S, Ogawa K, Ishigatsubo Y, Takeuchi K. Comparison of peripheral T-cell lymphomas and diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer* 109: 1146-1151, 2007
150. Ideguchi H, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y. Catastrophic antiphospholipid syndrome associated with malignancies. *Lupus* 16: 59-64, 2007
151. Kirino Y, Takeno M, Murakami S, Kobayashi M, Kobayashi H, Miura K, Ideguchi H, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y. Tumor necrosis factor alpha acceleration of inflammatory responses by down-regulating heme oxygenase 1 in human peripheral monocytes. *Arthritis Rheum* 56: 464-475, 2007
152. Ideguchi H, Ohno S, Ishigatsubo Y. A case of pure red cell aplasia and systemic lupus erythematosus caused by human parvovirus B19 infection. *Rheumatol Int* 27: 411-414., 2007
153. 井畑 淳、石ヶ坪良明。関節超音波検査における滑膜炎スコアリング。 *リウマチ科* 38: 7-12, 2007
154. 岳野光洋、村上修司、石ヶ坪良明。TNF阻害薬の臨床：我が国における臨床成績を中心に。 *日本臨床* 65: 1308-1313, 2007
155. Sakai R, Fujimaki K, Yamazaki E, Sakamoto H, Kanamori H, Miura I, Ishigatsubo Y. Acute myelomonocytic leukemia with dysplastic bone marrow eosinophils showing t(5;17)(q13;q11) and a secondary chromosomal aberration, inv(16)(p13q22). *Int J Hematol* 84: 417-20, 2006
156. Sato T, Takeno M, Honma K, Yamauchi H, Saito Y, Sasaki T, Morikubo H, Nagashima Y, Takagi S, Yamanaka K, Kaneko T, Ishigatsubo Y. Heme oxygenase-1, a potential biomarker of chronic silicosis, attenuates silica-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 15;174: 906-914, 2006
157. Takeno M, Ishigatsubo Y. Behcet's disease and familial Mediterranean fever. *Intern Med* 45: 805-806, 2006
158. Ohno S, Ishigatsubo Y. The incidence of Lofgren's syndrome in Japanese: the number of patients affected, number of patients diagnosed and number of cases reported. *Intern Med* 45(12):745-6, 2006
159. Takeno M, Ishigatsubo Y. Intestinal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Intern Med* 45: 41-42, 2006
160. 石ヶ坪良明、岳野光洋、上田敦久、井畑淳、小林 弘、大野 滋。ひと目でわかるリウマチ画像診断：PETによるリウマチ性疾患診断。 *分子リウマチ* 3: 346-361, 2006
161. 石ヶ坪良明、石ヶ坪 潤。 Sjogren症候群。 *Medicina* 43: 462-465, 2006
- 分担研究者：宮本正章
162. 宮本正章、高木 元、高野仁司、川中秀和、大坪春美、水野博司、田端泰彦、水野杏一。皮膚組織の再生医療。 *MSD*. 34: 25-28, 2008
163. 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
164. 宮本正章、高木 元、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
165. 高木 元、宮本正章、水野 杏一. 透析患者の末梢動脈疾患とフットケア108-114, 2008. 幹細胞移植 (医薬ジャーナル社)
166. 宮本正章. 糖尿病性壊疽に対するマゴットセラピー *日本臨牀* 700-712, 2008
167. 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 Mol Cell Cardiol.* 42: 489-97, 2007
168. Aimoto T, Uchida E, Matsushita A, Tabata Y, Takano T, Miyamoto M, Tajiri T. Controlled release of basic fibroblast growth factor promotes healing of the pancreaticojejunal anastomosis: A novel approach toward zero pancreatic fistula. *Surgery* 142: 734-740, 2007
169. Arakawa M, Yasutake M, Miyamoto M, Tanaka T, Aso S, Ohta S: Transduction of anti-cell death protein FNK protects isolated rat hearts from myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion. *Life Sci* 80: 2076-2084, 2007
170. Tara S, Miyamoto M, Asoh S, Ishii N, Yasutake M, Yakagi G, Takano T, Ohta S: Transduction of the anti-apoptotic PTD-FNK protein improves the efficiency of transplantation of bone marrow mononuclear cells. *J Mol Cell Cardiol* 42: 489-497, 2007
171. 宮本正章、高木 元、太良修平: マゴットセラピー: 透析患者の末梢動脈病変とフットケア: 早期発見と治療戦略. *医薬ジャーナル* (印刷中)
172. Takagi I, Nejima J, Takagi Genand Takano T. Chronic direct stimulation of adenylyl cyclase induces cardiac desensitization to catecholamine and beta-adrenergic receptor downregulation in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 48: 223-229, 2006.
173. 高木 元、宮本正章、安武正弘、水野 博司、高木郁代、高野仁司、加藤浩司、太良修平、高野照夫. 難治性虚血肢に対する自己骨髄幹細胞移植血管再生治療. *リウマチ科* 35: 276-281, 2006
174. 藤本啓志、宮本正章、高木 元: 医療用ウジを用いた多剤耐性緑膿菌(MDRP)合併糖尿病壊疽の治療. *日本糖尿病学会雑誌* 49: 517-521, 2006
175. 水野博司、赤石諭史、宮本正章: 虚血性難治性皮膚潰瘍に対する骨髄単核球導入コーゲンマトリックスの臨床応用. *日本形成外科学会会誌* 26: 726-731, 2006
176. 宮本正章. 今なぜ医療用ウジ治療 (MDT) か? *Pharma Medica* 24: 61- 62, 2006
- 分担研究者: 藤本和輝
177. 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: 63-67, 2008
178. 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
179. 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* (in press)
180. The Japanese Coronary Artery Disease (JCAD) Study Investigators. Current status of the background of patients with coronary artery disease in Japan. The Japanese Coronary Artery Disease Study (The JCAD Study). *Circ J* 70:

- 1256-1262, 2006
181. 藤本和輝、小川久雄. 心筋梗塞治療のメガトリアル. *臨床心臓病学* 207-214, 2006
182. 藤本和輝、小川久雄. 初期治療は血栓溶解療法か形成術か. *臨床心臓病学* 234-236, 2006
- 分担研究者：堀江 卓
183. 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
- 分担研究者：高橋将文
184. Kobayashi S, Ise H, Takahashi M, Goto M, Akaike T, Ikeda U. Surface coating of bone marrow cells with N-acetylglucosamine for bone marrow implantation therapy. *Biomaterials* 30: 574-582, 2009
185. 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
186. Koshikawa M, Aizawa K, Kasai H, Izawa A, Tomita T, Kumazaki S, Tsutsui H, Koyama J, Shimodaira S, Takahashi M, Ikeda U. Elevated osteopontin levels in patients with peripheral arterial disease. *Angiology* 60: 42-45, 2009
187. Murayama H, Takahashi M, Takamoto M, Shiba Y, Ise H, Koyama J, Tagawa Y, Iwakura Y, Ikeda U. Deficiency of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury. *Cardiovasc Res* 80: 175-180, 2008
188. Yajima N, Takahashi M, Morimoto H, Shiba Y, Takahashi Y, Masumoto J, Ise H, J Sagara, Nakayama J, Taniguchi S, Ikeda U. Critical role of bone marrow-derived ASC, an inflammasome adaptor molecule, in neointimal formation after vascular injury in mice. *Circulation* 117: 3079-3087, 2008
189. Morimoto H, Hirose M, Takahashi M, Kawaguchi M, Ise H, Kolattukudy PE, Yamada M, Ikeda U. MCP-1 induces cardioprotection against ischemia/reperfusion injury: Role of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 78: 554-562, 2008
190. Shiba Y, Takahashi M, Ikeda U. Models for the study of angiogenesis. *Curr Pharm Design* 14: 371-377, 2008
191. 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* 29: 448-454, 2008
192. Shiba Y, Takahashi M, Ikeda U. Models for the study of angiogenesis. *Curr Pharm Design* 14: 371-377, 2008
193. 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* 29: 448-454, 2008
194. 高橋将文、石ヶ坪良明、藤本和輝、宮本正章、堀江 卓、相澤義房、天野 純、簗田清次、室原豊明、松原弘明、池田宇一. 自己骨髄細胞移植による難治性血管炎に対する血管新生治療. *脈管学* (印刷中)
195. 高橋将文. 自己免疫性疾患に対する新しいS1Pアゴニストの効果. *今日の移植* 21: 193-199, 2008
196. Shiba, 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
197. 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
198. 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
199. 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
200. 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
201. 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
202. 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
203. 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
204. 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
205. 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
206. 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
207. 柴 祐司、高橋将文、池田宇一. 細胞治療・遺伝子治療. 我が国の虚血性心臓病: 心筋梗塞と狭心症の診療の進歩. *臨床と研究* 84: 67-72, 2007
208. 高橋将文. 細胞移植による心筋再生療法. *信州医学雑誌* 55: 299-300, 2007
209. 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
210. 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
211. 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
212. 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
213. Takahashi M. The role of endothelin-1 in vascular remodeling in vivo. *Cardiovasc Res* 71: 4-5, 2006
214. 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
215. 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
216. 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
217. 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
218. 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
219. 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
220. 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
221. 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
222. 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
223. 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

7. 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、現在骨髄単核球と末梢血単核球を用いて治療を続けている。

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が、これまでに膠原病による重症虚血下肢に対する血管新生治療の効果を8例14肢に施行し、いずれも症状の改善を認め、major amputationは、1肢も認めていない。閉塞性動脈硬化症やバージャー病においてこれまで認められた背景や採取細胞数と比較し、血管再生医療の効果、安全性を報告する。

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、アレルギー性肉芽腫性血管炎、混合性結合組織病と全身性エリテマトーデスの症例を含め8症例14肢について報告する。

方法

私達が行っている重症虚血下肢への血管新生療法の適応基準を示す。

1) 末梢性血管疾患：

Fontaine分類III度およびIV度（ABI<0.6を目安）、安静時痛または虚血性潰瘍・壊死を有する患者で、内科的・外科的に血行再建術の適応が無く、将来切断が予想される患者。

2) 性別：

男性および女性（妊娠中および妊娠の可能性のある女性を除く）

3) 年齢：

原則として20歳以上80歳以下

4) 適応除外事項：

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3年以内にその既往のある患者、別途規定の諸検査により悪性腫瘍の可能性があると判断された患者、未治療の糖尿病性網膜症を有する患者、インフォームドコンセントを得られない患者、その他、主治医が不相当と判断した患者。

膠原病と診断された症例で、上記の基準を満たした患者に対し、自己骨髄単核球または、自己末梢血単核球細胞を用いて血管新生治療を行った。手技はこれまでの我々の報告1-3)と同様で、術前術後のfollow upとして、死亡率、下肢切断を主要評価項目とし、検査として潰瘍径、安静時痛、歩行距離、ankle-brachial index (ABI), tissue oxygen concentration (TcO₂), skin perfusion pressure (SPP) を検討した。

結 果

術後2年以上経過した2症例と他6症例に対する効果を示す。

F.I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 糖尿病、#5 高脂血症、#6 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5mg/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1.5×1.5cm)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、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、同年11月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、レパタン坐薬を1日4回使用することで自制内となり、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ヵ月後では、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2×8cm、径2×10cm)と疼痛が持続していた。3ヵ月後の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ヵ月後、12ヵ月後も持続し、鎮痛薬を継続していたが、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た。

2年後に、再度血管撮影を施行しDSAにて血管の増生を著明に認めた。足尖部の下肢痛が残存していたが潰瘍は消失し、下肢切断を免れた。しかし、2009年2月潰瘍が再燃し局所血流改善目的で2回目の骨髄細胞による再生医療を施行し、潰瘍の縮小をみた。しかし、2009年12月現在、潰瘍は残存しており12月中旬に末梢血単核球による再生医療を施行し経過観察中である。再生医療で下肢切断を免れたが、潰瘍の再燃を2年後に認め、今後も経過観察が必要な1例である。

M.N氏 49歳 男性 病状経過

- #1 重症虚血下肢：左足趾の壊疽、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、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、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、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。

2006年6月13日に骨髓単核球 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→64 mmHg) も改善している。6ヵ月後、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ヵ月後の下肢血管造影にても左下腿血流の著明な増加を認め、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ヵ月後には 15 mg/dayに減量できた。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、社会復帰された。また、同年11月からみられた右I趾潰瘍に対して再び骨髓単核球細胞を12月25日に移植し3ヵ月後に、潰瘍の消失をみた。その後も下肢の虚血症状なく著効したと考えている。

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。移植後に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 skin perfusion pressure (SPP) も上昇した。好酸球増多症のためプレドニゾロンを15~30

表 1. 膠原病全症例の採取細胞数及び経過

| | Disease | Symptom | Age SEX | Total Cell Number ($\times 10^9$) | CD34+ Number ($\times 10^7$) | Outcome | |
|------|----------|-------------------|------------|---|--------------------------------------|---|----------|
| 2006 | PN | Ulcer Gangrene | 68 F | 3.08 | 2.3 | Improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂ , AOG | 3years |
| 2007 | AGA (Lt) | Ulcer Gangrene | 49M | 2.6 | 6.34 | Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂ , AOG | 2.5years |
| 2007 | AGA (Rt) | Ulcer | 49M | 1.77 | 4.72 | Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂ , | 2year |
| 2007 | MCTD | Ulcer Gangrene | 45F | 2.2 | 2.9 | Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size No improvement in ABI, TcO ₂ , | 2year |
| 2008 | SLE (Lt) | Rest pain | 51F | <u>6.05*</u> | <u>0.20*</u> | Remarkable improvement in VAS, walking time, | 1year |
| 2008 | SLE (Rt) | Rest pain | 51F | <u>4.8*</u> | <u>0.10*</u> | Remarkable improvement in VAS, walking time, | 1year |
| 2008 | PSS | Ulcer Gangrene | 65F | 1.76 | 3.43 | Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂ , | 1year |
| 2009 | RA | Ulcer | 78F | 2.6 | 4.23 | Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂ , | 9M |
| 2009 | PSS | Ulcer | 54F | 2.8 | 8.41 | Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂ , | 6M |
| 2009 | RA | Ulcer | 54F | 2.8 | 8.41 | Remarkable improvement in VAS, walking time, ulcer size Improvement in ABI, TcO ₂ , | 6M |

*本症例のみ末梢血単核球細胞を使用

mg/day使用しているが、骨髄単核球細胞移植による血管新生の効果を著明に認めた。ただし、2009年5月に経過観察先の病院でワーファリンの休薬後に左上肢急性動脈塞栓症を発症し、当科に緊急入院となり、外科と相談の後、ウロキナーゼの点滴加療にて軽快し、現在特に症状もなく外来通院中である。再生医療後も原病に対する嚴重な管理が重要と考えられた1例である。

他6症例の経過

臨床経過が、1年未満の他の3症例を含めて8症例14肢の採取細胞数、CD34陽性細胞数及び臨床経過を表1に示す。

SLE 症例は、症状は安静時痛のみで、潰瘍、壊疽を認めず両足に症状を認めたことから、末梢血単核球による血管新生治療を行ったが、いずれも安静時痛の改善のみでなく、足趾の運動能力改善をみとめており、ADLの向上から復職された。またMCTDの1例、強皮症（PSS）の2例、関節リウマチの2例も潰瘍の縮小、安静時痛の軽快、歩行距離の大幅改善を認めており、再生医療の効果を著明に認めたと考えられる。

考 察

難治性血管炎に対する血管再生医療後の8症例14肢を治療した。膠原病に対する骨髄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バージャ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。今後症例数の増加と多施設共同研究による長期効果を検討する必要はあるが、本治療の適応を膠原病患者への拡大を検討する必要があると考えられた。

結 語

膠原病による重症虚血下肢において骨髄単核球細胞移植は、安全かつ効果的であった。

文 献

1) 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 using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators.: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360: 427-435, 2002.

2) Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, Saito Y, Uemura S, Suzuki H, Fukumoto S, Yamamoto Y, Onodera R, Teramukai S, Fukushima M, Matsubara H, TACT Follow-Up Study Investigators. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (TACT Trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J* 156:1010-1018, 2008

3) Matoba S, Matsubara H. Therapeutic angiogenesis for peripheral artery diseases by autologous bone marrow cell transplantation. *Current Pharmaceutical Design* 15:2769-2777, 2009

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 室原豊明
研究協力者 新谷 理、清水優樹
名古屋大学大学院医学系研究科
病態内科学講座 循環器内科学

研究要旨

血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cells: EPCs）やその関連細胞を用いた血管新生療法の臨床では、自己骨髄単核球細胞移植による重症虚血肢に対する血管新生療法（TACT trial）によりその有用性と安全性が確認され、現在臨床応用されている。しかしながら、糖尿病や維持血液透析患者、超重症閉塞性動脈硬化症などの患者の中には、十分な治療効果が期待できない症例が含まれていることも明らかになった。また重症虚血肢を有する患者は一般に全身状態は芳しくなく、TACTに必要な多量の自己骨髄液（500-1000ml）を採取するのがしばしば困難になる。また骨髄の採取は全身麻酔を必要とし、侵襲的である。

近年、Zukらは皮下脂肪組織から間葉系幹細胞に類似した細胞集団の存在を報告し、その細胞集団は脂肪組織由来組織再生細胞（Adipose-derived regenerative cells: ADRCs）と呼ばれ、間葉系の多系統への分化能を有している。そこで我々はこのADRCsの血管新生効果に着目し、新しい血管新生療法目的の自己細胞ソースとして利用できるかどうかを検討した。マウス皮下脂肪組織をそけい部より抽出し、培養したADRCsを下肢虚血組織に筋肉内移植し、移植後の血管新生効果を検討した。その結果、ADRCs移植により下肢虚血モデル作製後の血管新生効果は増強した。また、ADRCs移植に伴う血管新生増強効果の機序として、ケモカインSDF-1（間質細胞から分泌されるCXCケモカインサブファミリー）を介した骨髄からのEPCの動員の寄与が考えられた。

脂肪組織由来幹細胞は、次世代血管新生療法の新しい細胞供給源となりうる可能性が示唆された。自己脂肪組織由来幹細胞を用いた上記治療法は、現在、名古屋大学倫理委員会の承認を得て、臨床試験施行予定にある。

1. 背景

閉塞性末梢動脈疾患（閉塞性動脈硬化症・バージャー病・膠原病に伴う難治性血管炎）の患者は、間欠性跛行・安静時疼痛・皮膚潰瘍・壊死などの症状を呈し、quality of life（QOL）が著しく低下するだけでなく、四肢切断に至るケースも多い。治療法としては、生活習慣の改善、運動療法（軽症の場合）、薬物療法、カテーテルによる血管拡張術やバイパス術などの血行再

建術が行われてきたが、動脈硬化病変が重症でありまた病変が末梢にあるなどのためにこれら従来の治療法が無効あるいは不可能な症例も少なくない。特にバージャー病や膠原病に伴う難治性血管炎患者では、通常病変は末梢にあり、外科的治療や血管内治療の適応になりにくい。このような症例に対して最近、虚血周囲の比較的健全な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、虚血組織の修復・壊死を軽

減させようとする試みがなされている。これらの一連の戦略は治療的血管新生（therapeutic angiogenesis）と呼ばれ、組織の虚血を改善するのみならず、機能を回復させる観点からも大変重要である。

2. 血管新生治療

現在虚血組織に対する血管新生療法としては、大きく2種類存在している。すなわち1) 血管新生因子の蛋白や遺伝子治療を虚血部位あるいは静脈投与して血管新生を促す方法（血管増殖因子を用いた治療）と、2) 骨髄あるいは末梢血中に存在している幹細胞や前駆細胞を用いた細胞治療である。1994年米国タフツ大学のIsnerらが血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor）を用いた臨床応用が開始し治療的血管新生（therapeutic angiogenesis）という概念を提唱して以来、虚血組織に対する血管新生治療の研究・開発が急速に進歩しはじめた。最近では大阪大学の森下らが、HGF（Hepatocyte Growth Factor）を用いた血管再生療法の臨床研究を行っている。

さらに、成体において末梢血中に血管内皮細胞のもととなる血管内皮前駆細胞がCD34陽性細胞分画に多く存在すること、またこれらの細胞が骨髄細胞由来であることが報告されて以来、血管内皮前駆細胞あるいは前駆細胞を多く含む骨髄単核球細胞を用いて血管新生治療が行えることを我々は明らかにし、2000年より世界に先駆けて骨髄単核球細胞移植による重症下肢虚血治療（Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation: TACT）が有効であることを報告してきた。その後、骨髄単核球細胞移植による治療は、現在高度先進医療として特定の認定施設では保険適応治療として行えるようになっている。

末梢血中や骨髄細胞中に存在している血管内皮前駆細胞は、もともと自己の細胞であり、安全性や特許などの問題点が少ない。更に、我々はラットやウサギを用いた動物実験を繰り返し、骨髄単核球細胞移植が虚血部位の血管新生を促進し組織の虚血を改善することを確認して

きた。そこで、自己骨髄単核球細胞移植は、従来の方法では血行再建不可能な重症下肢虚血の虚血を改善し機能の回復が期待できると判断し、倫理委員会に申請・承認後、2000年より継続して自己骨髄単核球細胞移植による末梢閉塞性動脈疾患患者の血管新生療法に関する多施設臨床試験（TACT Study Group）を行っている。

本治療では、骨髄単核球細胞中に含まれる血管内皮前駆細胞（CD34陽性細胞など）の移植の効果のみならず移植される細胞からはVEGFやbFGFなどの血管増殖因子が分泌される。つまり、血管の基盤となる前駆細胞の移植に加えて、血管新生因子も大量に虚血部位で放出されるため、両方の作用の相乗効果が得られることとなる。

また最近我々は、自己骨髄単核球細胞移植以外の方法として自己脂肪組織由来間葉系幹細胞（Adipose-derived regenerative cell: ADRC）移植による血管再生療法も基礎的な検討を行っている。この治療法は自己細胞で免疫拒絶反応がなく、また、閉鎖系の機器で細胞が分離できるため、早期の臨床応用が可能であると考えている。

3. 自己脂肪組織由来間葉系幹細胞（Adipose-derived regenerative cell: ADRC）移植による血管再生療法

脂肪組織は我々人間の体重の約10%以上を占める臓器である。2001年Zuk、Hedrickらはこの脂肪組織から間葉系幹細胞に類似した細胞集団の存在を証明した。その細胞集団はAdipose-derived stem cells（ASCs）、あるいはAdipose-derived regenerative cell（ADRC）と呼ばれ、間葉系多系統細胞への分化能を有していると考えられ、分化誘導培地で培養すれば2-3週間で骨、軟骨、脂肪などに分化誘導可能で、更にin vivoにおいて心筋、神経、腱へ分化誘導できるという可能性も示された。そこで我々はこのADRCsの血管新生効果に着目し、新しい血管新生療法の細胞ソースとして利用できるかどうかを検討した。

まず我々はADRCsを用いた血管新生療法の治療効果を検討、さらに、治療効果が認められ

た場合は、その治療効果増強の機序につき検討することにした。血管新生評価モデルとしてマウス下肢虚血モデルを作製した。そけい部より皮下脂肪組織を抽出、培養したADRCsを下肢虚血骨格筋組織に移植し、移植後の血管新生効果を検討した。

ADRCsの培養に関しては、マウスより皮下脂肪組織を摘出し、コラゲナーゼ処理をした後、フィルターでろ過し、遠心沈殿した細胞 (Stromal Vascular Fraction: SVFs) を培養した。培養1日目には線維芽細胞様の接着細胞を認め、1週間で約10倍に増殖した。培養したADRCsは免疫染色にて大部分が間葉系マーカーでの1つである α SMA陽性を示した。またADRCsを分化誘導すると、成熟脂肪細胞への分化を認めた。脂肪滴の貯留といった形態的特長をOil-red O染色にて確認した。培養したADRCsをフローサイトメトリーにより解析を行ったところ、表面抗原はSca-1陽性、Lin陰性と未分化細胞と考えられる特徴を示した。しかしながら、内皮前駆細胞に認められるようなCD31, c-kit, flk-1などの内皮系表面抗原は認められなかった。

このADRCsを下肢虚血領域に移植したところ、レーザードップラー法による解析にて、コントロールと比較しADRCs移植群は、1週目より有意な血流改善を示し、その効果は3週まで持続した。一方、成熟脂肪細胞 (Mature adipocyte: MAs) を移植しても血管新生改善効果は認めなかった。同様に、虚血組織中の毛細血管密度をCD31による免疫染色法により検討したが、ADRCs移植群はMA群、control群と比較し、有意な Capillary density の増加を示した。

次にADRCs移植に伴う血管新生増強効果の機序を検討した。我々はASCs移植の治療効果とEPCとの関係に注目、特に血管新生増強効果に強く関係しているといわれている EPC 動員への関与を検討した。そこで、骨髄及び末梢血の単核球培養法を行い、骨髄および末梢血中のEPC数の定量評価をおこなった。骨髄中では虚血作製3日後にコントロール群と比較しADRCs移植群では有意な増加を示した。また、末梢血でも3日後・7日後において、コントロール群と

比較し流血中 EPC の有意な増加を示した。さらに、Sca-1陽性/flk-1陽性単核球を EPC と定義し、フローサイトメトリーによる EPC の解析を行ったところ、骨髄及び末梢血中の単核球の EPC 数は同様に、骨髄中で3日後、末梢血中で7日後にコントロールと比較し有意な増加を認めた。

以上の結果より、マウス下肢虚血モデルにおけるADRCs移植は、骨髄から末梢血中へのEPC動員を増加させ、血管新生を増強することが確認された。そこで、我々はその機序のひとつとして間質細胞から分泌されるCXCケモカインサブファミリーに属するSDF-1と血管新生増強作用を有するサイトカインの1つであるVEGFに注目した。

まず、in vitroにおける予備実験を行ったところ、培養成熟脂肪細胞 (MAs) に比べてADRCsでは個々の細胞より得られたmRNAレベルにおいてSDF-1が多く発現しており、これらの培養液中においてもSDF-1蛋白濃度は高値を示していた。VEGF蛋白に関しては両群に差を認めなかった。

そこでin vivo 虚血組織においてADRCs移植に伴い血管新生促進因子であるSDF-1およびVEGFの放出が増強するか否かを検討した。ADRCs移植によりSDF-1は下肢虚血作成後3日目に、VEGFは3日および7日目に mRNA の発現が増強していた。また、同様に血中濃度をELISA法にて測定したところ、術後3日目にSDF-1、VEGFともにコントロール群と比較し有意に増加していた。

次に、移植後のADRCsがin vivoにおいてどのような役割をしているかを確認するために、GFPトランスジェニックマウス由来のADRCsを下肢虚血作成後に移植し、免疫染色法にて評価した。抗SDF-1抗体による免疫染色にて下肢虚血3日後にはADRCsは筋線維周囲に存在し、その一部はSDF-1を分泌していることが確認された。また、ADRCsからのVEGFの直接の分泌は確認されなかったが、ADRCsの周囲の筋線維にVEGFが発現している事が確認された。

また、虚血作成28日後にADRCsの内皮細胞への分化を評価するために、CD31による蛍光

免疫染色を行ったところ、ADRCsは血管構造周囲または、毛細血管周囲に存在していることは確認されたが、内皮細胞への直接の分化は確認できなかった。しかし、周皮細胞マーカーであるCD140bは陽性を示した。

以上より我々は、ADRCs移植による血管新生増強効果には、ケモカインSDF-1が重要な役割を果たしていると考え、これらを確認するため下肢虚血モデルへのADRCs移植後にSDF-1中和抗体の腹腔内投与を行い、その血管新生効果およびEPCs動員への影響につき検討した。その結果、SDF-1中和抗体投与群ではADRCs移植に伴う血管新生増強効果は解除され、培養法、FACS解析いずれにおいても虚血作成7日後の流血中EPCsの減少を認めた。

以上より、ADRCs表面抗原にはEPCに認められるような内皮特異的な抗原は認められなかった。にもかかわらず、ADRCs移植により血管新生効果は増強した。ADRCs移植に伴う血管新生増強効果の機序として、SDF-1を介した骨髄からのEPC動員が考えられた。虚血部位への自己脂肪組織由来幹細胞移植は、次世代血管新生療法の新しい細胞供給源となりうる可能性が示唆された。

4. 当施設における治療実績

現在自己骨髄単核球細胞移植による血管再生療法を継続している。現在骨髄細胞移植によるTACT治療者は、通算11例である。また、上記の新しい自己脂肪組織由来幹細胞移植は、厚生労働省ヒト幹細胞治療指針への申請準備中であり、早ければ今年内に臨床研究をスタートする。

文 献

1. Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, Imaizumi T, Kitagawa S, Murohara T. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 61-66.
2. Iwashima S, Ozaki T, Maruyama S, Saka Y, Kobori M, Omae K, Yamaguchi H, Niimi T, Toriyama K, Kamei Y, Torii S, Murohara T, Yuzawa Y, Kitagawa Y, Matsuo S. Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 533-543.
3. Kondo M, Shibata R, Miura R, Shimano M, Kondo K, Li P, Ohashi T, Kihara S, Maeda N, Walsh K, Ouchi N, Murohara T. Caloric restriction stimulates revascularization in response to ischemia via adiponectin-mediated activation of eNOS. *J Biol Chem*. 2009; 284: 1718-1724.
4. Murohara T. Autologous adipose tissue as a new source of progenitor cells for therapeutic angiogenesis. *J Cardiol* 2009; 53: 155-163. (Review).
5. Ishii M, Numaguchi Y, Okumura K, Kubota R, Ma X, Murakami R, Naruse K, Murohara T. Mesenchymal stem cell-based gene therapy with prostacyclin synthase enhanced neovascularization in hindlimb ischemia. *Atherosclerosis* 2009; 206: 109-118.
6. Miura M, Numaguchi Y, Ishii M, Kubota R, Takeuchi T, Imamura A, Murakami R, Kondo T, Okumura K, Murohara T. Differentiation capacity of endothelial progenitor cells correlates with endothelial function in healthy young men. *Circ J* 2009; 73: 1324-1329..
7. Murohara T, Shintani S, Kondo T. Autologous adipose-derived regenerative cells for therapeutic angiogenesis. *Curr Pharm Des*. 2009; 15: 2784-2790.
8. Kawamura Y, Ishii H, Aoyama T, Tanaka M, Takahashi H, Kumada Y, Toriyama T, Murohara T. Nitinol stenting improves primary patency of the superficial femoral artery after percutaneous transluminal angioplasty in hemodialysis patients: A propensity-matched analysis. *J Vasc Surg*. 2009; 50: 1057-1062.
9. Li P, Shibata R, Unno K, Shimano M, Furukawa M, Ohashi T, Cheng X, Nagata K, Ouchi N, Murohara T. Evidence for the importance of adiponectin in the cardioprotective effects of

- pioglitazone. *Hypertension* 2009; 55: 69-75.
10. Murohara T. Cord blood-derived early outgrowth endothelial progenitor cells. *Microvasc Res* 2010 (in press)
11. Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, Saito Y, Uemura S, Suzuki H, Fukumoto S, Yamamoto Y, Onodera R, Teramukai S, Fukushima M, Matsubara H; TACT Follow-up Study Investigators. Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J* 2008; 156: 1010-1018.
12. 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* 2008; 10: 329-337.

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の 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

【目的】

これまで4例の強皮症および混合性結合組織病に対して血管新生療法を行ってきたが、本年度は2例の血管炎による阻血に起因する重症潰瘍および壊疽に対して、自己末梢血単核細胞の繰り返し移植による血管新生療法を行い、その効果と安全性について検討を行った。

【症例および方法】

症例5は66歳女性。基礎疾患は、罹病歴半年の顕微鏡的多発血管炎。両手指、左母趾に進行性の壊疽がみられていた。症例6は58歳男性。基礎疾患は罹病歴4年の顕微鏡的多発血管炎。右下腿外側に進行性の深掘れ潰瘍がみられていた。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。移植は四肢の潰瘍・壊疽部周辺の骨膜下および筋肉内に単核細胞を注射した。症例5ではこの移植術を、3ヶ月毎に1年間（計4回）行い、症例6では3ヶ月毎に半年間（計2回）行った。

【結果】

疼痛、冷感、満足度のVASは、壊疽進行の停止および潰瘍の軽快と共に改善を認めた。サーモグラフィ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上昇を認めた。外観の評価では、四肢に認められていた潰瘍は全て治癒した。digital subtraction angiography またはMR-Angiographyによる描出血管の評価では、移植治療により移植部位およびその周辺の描出血管が増加した。

【考察】

自己末梢血単核細胞分画を繰り返し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、潰瘍治癒および壊疽の進行停止が血管炎においてもみられることが確認された。また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

膠原病では指趾の冷感やレイノー現象がみられることが多い。レイノー現象を認める指趾においては、光学顕微鏡では、毛細血管の内皮細胞腫大に伴う血管内腔の狭小化が観察される。

この腫大した内皮細胞は、電子顕微鏡では細胞質内にフィラメントやWeibel-Palade bodyの増生と様々な基底膜の変化が観察される⁽¹⁾。このような血管の器質的変化により血流障害が生じている指趾に、寒冷刺激が加わると血管が攣縮

し阻血の悪循環が惹起される。また、血管障害を有する指趾では血流障害に伴う潰瘍を生じやすく、激しい疼痛を生じる。さらに、膠原病では四肢の皮膚や脂肪織の血管炎により、血流障害を生じ難治性の潰瘍を形成することがある。このような症例では免疫抑制療法だけでは軽快し難く、難治性である。これら血流障害に伴う潰瘍が進行すると、病変が骨まで達して骨髓炎を併発したり、壊疽に至って切断を余儀なくされることがありactivity of daily lifeの著しい低下を招いている。

膠原病に伴う血流障害の治療法としては、Ca拮抗薬⁽²⁾、prostaglandin E1⁽³⁾、prostaglandin I2⁽⁴⁾などの血管拡張薬が用いられているが、これらの治療法では、奏功することは少なく新たな治療方法の開発が切望されていた。

2000年にアデノ随伴ウイルスをベクターとしてvascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子をラットの心筋および骨格筋へ導入することにより、生理活性のあるVEGFが産生・分泌され、血管新生が促進されることが報告された^(5,6)。さらに、生体末梢血中の単核球分画に内皮前駆細胞が存在し、この細胞は下肢虚血モデルにおいて血管新生部位に有意に組み込まれることが明らかにされた⁽⁷⁾。2002年には、TACT studyにおいて慢性動脈閉塞症患者の虚血肢に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ている⁽⁸⁾。

このような背景の下、膠原病に伴う血流障害を有する6症例に対し、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、自覚症状、手足末梢の血流、手足末梢の皮膚表面温度、新生血管の形成について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、移植する細胞として骨髓血単核細胞と末梢血単核細胞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⁽⁹⁾。

そこで、より患者への負担を軽減させるべく、自己末梢血から単核細胞分画を採取し移植することとした。なお、G-CSF製剤の投与により多発性硬化症や関節リウマチなどの自己免疫性疾

患が増悪したという報告があることから⁽¹⁰⁾、G-CSF製剤を投与せずに末梢血から単核細胞を採取した。移植は難治性や再発性の病変にも対応できるように、また効果を持続させる目的で繰り返し移植を行い、その効果と安全性について研究した。なお、これまで4例の強皮症および混合性結合組織病に対して末梢血単核細胞分画を用いた血管新生療法を行ってきたが、本年度は2例の血管炎による阻血に起因する重症潰瘍および壊疽に対して、同様の方法で血管新生療法を行った。

方 法

症例は、血管炎に合併した難治性潰瘍、指趾壊疽を有する2例。症例5は66歳女性。基礎疾患は、罹病歴半年の顕微鏡的多発血管炎。レイノー現象は半年前から出現していた。治療前、左示指および左中指のDIP関節より遠位、右中指および右小指のDIP関節より遠位、ならびに右環指尖部に径1cm、左母趾尖部に径2cmの進行性の壊疽がみられていた。これらの壊疽部の進行は、免疫抑制薬に抵抗性であり、範囲が急速に拡大しつつあった。症例6は58歳男性。基礎疾患は罹病歴4年の顕微鏡的多発血管炎。レイノー現象は4年前から出現していた。治療前、右下腿外側に6x3.5cmの急速に拡大しつつある深掘れ潰瘍がみられていた。なお、プレドニゾロンは、治療開始時、症例5で10mg/day、症例6で17.5mg/day投与中であった。

移植に用いる単核細胞は、以下の手順で採取した。移植の前々日の午前に前腕から400mlの全血を採取し、比重遠心分離法により単核細胞分画を分離した。単核細胞分画分離後の血液は速やかに患者に返血した。同日の午後にも同様にして400mlの全血から単核細胞分画を採取した。これら一連の操作を移植前日にも行い、計1600mlの全血から単核細胞分画を採取した。翌日（移植当日）に分離した単核細胞分画をRPMI培地に懸濁して最終量8mlに調整したものを、0.4mlずつ20カ所、症例5では手掌および足底、症例6では下腿の潰瘍およびその周囲の骨格筋ないし骨膜下へ注入した。

上記の移植術を、症例5では3ヶ月ごとに1年間、計4回繰り返して行い、評価を行った。症例6では3ヶ月ごとに計2回繰り返して移植を行い、6ヶ月後の評価の時点で潰瘍が完治していたため、6ヶ月で治療を終了とし、評価を行った。評価は、冷感、疼痛および満足度のvisual analog scale (VAS) を用いたアンケート調査、サーモグラフィーによる手指または足趾尖部皮膚表面温度の測定 (症例5のみ)、皮膚組織灌流圧 (skin perfusion pressure (SPP)) の測定 (症例5のみ)、外観の視診による評価、指尖毛細血管顕微鏡による指尖部毛細血管の状態の観察 (症例5のみ)、およびdigital subtraction angiography (DSA) (症例5) またはMR-angiography (症例6) による血流の評価を行った。さらに、血清VEGFをELISA法で測定した。

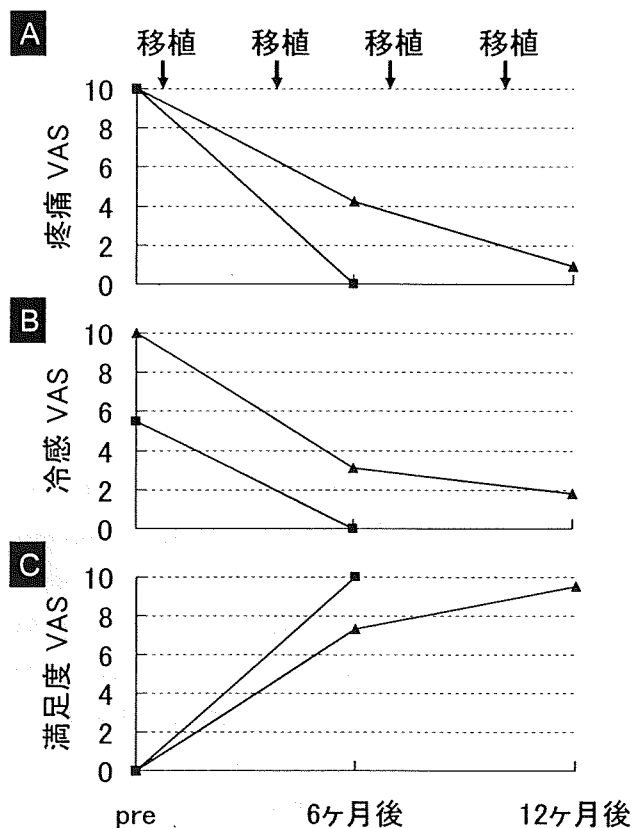


図1 Aは疼痛、Bは冷感、Cは満足度のVASの経時的変化を示す。痛みが強いほど、冷感が強いほど、および本治療に対する満足度が高いほどVAS値は高値を示す。
▲：症例5、■：症例6

結果

移植した単核細胞数は症例5では平均 9.34×10^8 、CD34陽性細胞数は平均 0.70×10^6 であった。症例6では、単核細胞数は平均 8.89×10^8 、CD34陽性細胞数は平均 0.64×10^6 であった。

疼痛、冷感、満足度に関するVASは、症例5で1年後、症例6で6ヶ月後に、治療前と比較して著明に改善した (図1A-C)。

3ヶ月毎にサーモグラフィーにより測定した両手手指皮膚表面温度の平均値は、症例5では、治療開始前31.7度であったのが、1年後32.7度に上昇していた。また、症例5では潰瘍と壊疽を有する左母趾の温度が治療前他の4趾と比較して最も低温であったが、重点的に単核細胞の移植を行った結果、1年後にはこの趾が他の4趾と比較して最も温度が高くなっていた。

SPPは、壊疽がみられた症例5の左手掌で測定したところ、治療前70mmHgと低下していたが、移植半年後には79mmHgまで上昇した。

外観の評価は、症例5では、治療前左手示指および中指に2ヶ所、右手母指尖、中指尖および小指尖に3ヶ所 (図2A, B)、さらに左母趾尖 (図2F) に1ヶ所壊疽が見られていた。移植前は免疫抑制薬、prostaglandin製剤などの血管拡張薬を投与したにもかかわらず壊疽は進行し続けていた。しかし、移植後壊疽の進行は停止した。また、移植2週間後には、移植を行った手指 (図2C) に血流改善を示唆する著明な腫脹が見られた (図2D)。半年後までに左手示指と左手中指の壊疽部は自然に脱落し、1年後には壊疽部脱落後の指尖部は完全に上皮化した (図2E)。また、左母趾尖の壊疽部は自然に脱落し、壊疽部より深層にあった潰瘍も治癒し上皮化した (図2G)。症例6では、治療前右下腿外側に進行性の深掘れ潰瘍がみられていたが (図2H)、移植4ヶ月後には肉芽組織の隆起と上皮化を認め治癒した (図2I)。

症例5はDSAにより、症例6はMR-angiographyにより、治療前と1年後に可視血管の評価を行ったところ、単核細胞移植を重点的に行った症例5の右手で描出される血管が移植前 (図3A) と比較して増加していた (図3B)。また、症例

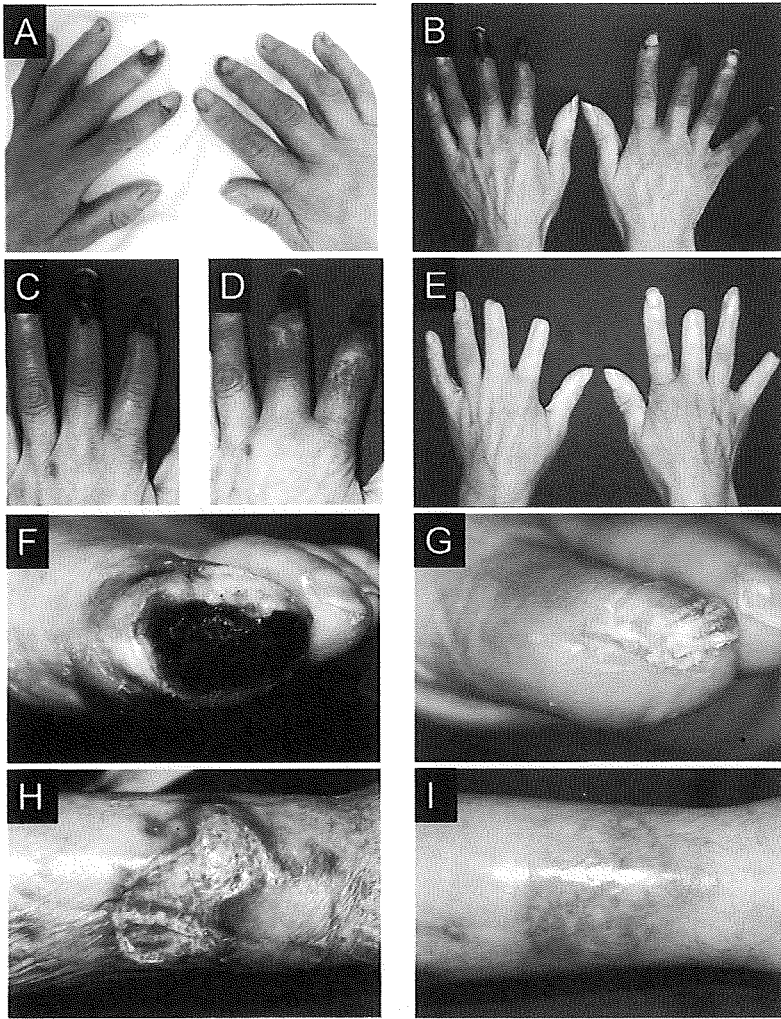


図2
治療前に見られた潰瘍・壊疽および治療後の同部位の状態を示した写真を示す。
Aは症例5の治療開始2ヶ月前の両手指尖潰瘍の状態を示す。
Bは症例5の治療開始直前に同潰瘍が進行し、手指が壊疽した状態を示す。
Cは症例5の治療前の左手示指と中指を示す。
Dは症例5の治療2週間後の同指が腫脹した状態を示す。
Eは症例5の治療1年後の改善した両手指の状態を示す。
Fは症例5の治療前の左母趾の趾尖潰瘍および壊疽を示す。
Gは症例5の治療1年後の同部位を示す。
Hは症例6の治療前の右下腿外側の潰瘍を示す。
Iは症例6の治療4ヶ月後の同部位を示す。

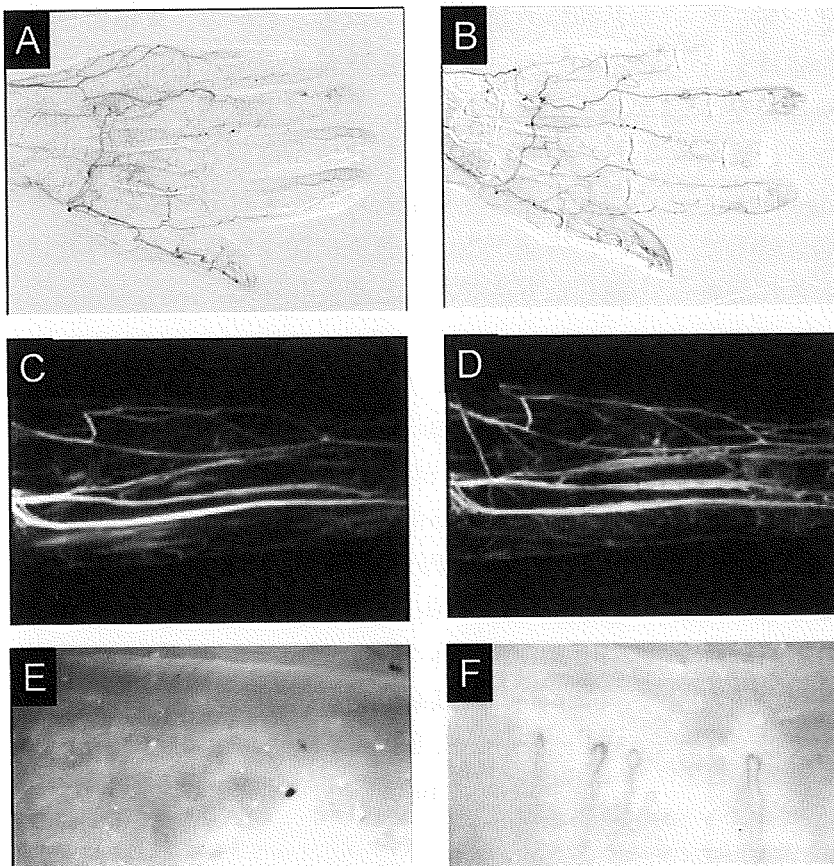


図3
治療前後では可視血管が増加した状態を示す。
Aは症例5の治療前の右手のDSA像を示す。
Bは治療1年後の同部位のDSA像を示す。
Cは症例6の治療前の右下腿のMR-Angiography像を示す。
Dは治療3ヶ月後の同部位のMR-Angiography像を示す。
Eは症例5の治療前の左環指の指尖毛細血管顕微鏡写真を示す。
Fは1年後の同部位の指尖毛細血管顕微鏡写真を示す。

6の右下腿で描出される血管も移植前（図3C）と比較して増加していた（図3D）。

症例5で指尖毛細血管顕微鏡による爪境界部毛細血管観察を行ったところ、治療前は観察不能であった毛細血管が（図3E）、移植半年後の時点で観察可能となっていた（図3F）。

血清学的には、血清VEGFを測定したところ、両症例とも移植1ヶ月後まで増加を示しピークに達した。症例5では移植前と比較して1ヶ月後に33%増加し、症例6では移植前と比較して1ヶ月後に50%増加した。

移植した単核細胞数やCD34陽性細胞数と、VAS、サーモグラフィー、血清学的データなどとの間に、一定の相関関係を見出すことはできなかった。

考 察

末梢血単核細胞分画移植による効果は、移植後約2週間頃から自覚的および他覚的に確認することができた。移植当日は注射部位の軽度の疼痛がみられたが、移植2日後には注射部位の疼痛は消失した。その後2週間程経過したところから潰瘍や壊疽部を有する指の疼痛や冷感が軽減しはじめた。特に症例5では、移植から約2週間後に手指の腫脹が見られた。これは、著しく低下していた血流が、単核細胞分画の移植を行うことで血管拡張が起こり、血流が増加したことによって起こった徴候と考えられた。これら移植後早期にみられる効果は、angiogenesisによるものではなく、移植した単核細胞が局所で産生したサイトカインや二次的に産生された血管拡張物質などによる血管拡張作用、除痛作用が主体であると考えられた。

疼痛、冷感については、経過中に潰瘍の悪化や再発はなく、VASは順調に改善していった。また、サーモグラフィーによる指尖部表面温度の評価では、症例5ではほぼ一定の傾向で温度上昇していった。また、重点的に移植を行った症例5の潰瘍ないし壊疽がみられていた左母趾は、移植前5本の趾の中で最も温度が低かったにも関わらず、1年後には5本の趾の中で最も温度が高くなっていた。この結果および前年度ま

での結果を総合的に評価すると、移植部位の表面温度を上げるほどの血流改善を得るためには、局所に重点的に移植する必要がある、移植する単核細胞数またはCD34陽性細胞数は一定のレベルよりも多いほうがより効果的である可能性が示唆された。

症例5のDSA、症例6のMR-Angiography、症例5の指尖毛細血管顕微鏡で、治療前と比較して治療後に明らかに可視血管の増加が見られた。このような長期効果は、単核細胞分画移植に伴う血管拡張効果に加えて、angiogenesisによる血管新生が起こったためと考えられた。安全性については、軽微なものを含め副作用は見られておらず、安全性の高い治療方法であると考えられた。

結 論

末梢血単核細胞分画の繰り返し移植により、血管炎に伴う末梢血管障害に起因する指尖潰瘍の改善効果、血流改善効果、疼痛改善効果があることが確認された。

単核細胞分画の採取は、骨髓血と比較して末梢血の場合、患者負担が極めて少なく、また末梢血由来の単核細胞分画でも骨髓血由来のものと同等の効果が得られることから、末梢血単核細胞分画を用いた血管新生療法は有用な方法であると考えられた。さらに末梢血を使用することにより、繰り返し移植が可能となり、難治性病変、再発性病変に対しても対応することができ、再発が多い血管炎に伴う血流障害には特に適した方法であると考えられた。

参考文献

- 1) Vajda K, Kádár A, Káli A, Urai L. Ultrastructural investigations of finger pulp biopsies: a study of 31 patients with Raynaud's syndrome. *Ultrastruct Pathol* 3: 175-186, 1982
- 2) Smith CD, McKendry RJ. Controlled trial of nifedipine in the treatment of Raynaud's phenomenon. *Lancet* 11: 1299-301, 1982
- 3) Langevitz P, Buskila D, Lee P, Urowitz MB. Treatment of refractory ischemic skin ulcers in