

Ohno S, Watanuki Y, Kaneko T, Ishigatsubo Y. Screening of tuberculosis by interferon-gamma assay before biologic therapy for rheumatoid arthritis. *Tuberculosis* 2009

12) Takase K, Ohno S, Ideguchi H, Murakami S, Takeno M, Ishigatsubo Y. Mycobacterium tuberculosis-specific immunospot assay of pleural exudate mononuclear cells is useful for the exclusion of tuberculous pleuritis in patients with lupus pleuritis. *Lupus* 18: 175-7, 2009

13) Ideguchi H, Ohno S, Takase K, Tsukahara T, Kaneko T, Ishigatsubo Y. A case of Poncet's disease (tuberculous rheumatism). *Rheumatol Int* 29: 1097-9, 2009

14) Motohashi K, Ito S, Hagihara M, Maruta A, Ishigatsubo Y, Kanamori H. Cutaneous zygomycosis caused by *Cunninghamella bertholletiae* in a patient with chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Am J Hematol* 84: 447-8, 2009

H. 知的財産権の出願、登録状況
特になし。

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

重症末梢動脈疾患(PAD)に対する血管新生療法：DDS徐放化蛋白による 血管新生療法と自己骨髄幹細胞血管新生療法

分担研究者 宮本正章
日本医科大学大学院器官機能病態内科学

研究要旨

現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない（no optional patients）重症末梢動脈疾患（PAD）に対するDDS徐放化蛋白による血管新生療法と自己骨髄幹細胞血管新生療法の安全性・有効性評価を行った。

DDS徐放化 b-FGF ハイドロゲル筋肉内投与による血管新生療法：

2008年内閣府スーパー医療特区に採択された「難治性疾患を標的とした細胞間シグナル伝達制御による創薬」（課題22）の分担研究として、幹細胞を使用しない簡便で低侵襲な新しい血管新生療法として「DDS徐放化 b-FGF ハイドロゲル筋肉内投与による血管再生療法」を京都大学再生医科学研究所田畑グループとの共同研究で実施し、すでに治療抵抗性の閉塞性動脈硬化症（ASO）、バージャー病10例に臨床研究を実施した。全例に安全性、及び有効性を認め（著効）、さらに骨髄血管再生療法のデータを参考にして、日本医科大学付属病院倫理委員会の承認を受け、膠原病・アレルギー疾患による PAD に対しても適応を拡大し、70歳男性 PSS, 66歳女性に実施し、2例とも著効を示し、安全性にも問題は生じていない。今後さらなる症例数の増加を図る予定である。

A. 研究目的

現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない（no optional patients）治療抵抗性虚血下肢（バージャー病, ASO, 糖尿病潰瘍・壊疽, 膠原病等難治性血管炎）に対する自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法と DDS 徐放化蛋白による血管新生療法有効性, 安全性を証明する。

B. 研究方法

全身麻酔下に腹臥位にて両側腸骨より骨髄細胞液500mlを採取した。500 μ l 及び200 μ lのフィルター後、血液分離装置AS TEC 204を使用して、骨髄単核球と血小板の細胞層を採取し、最終収量は、60-80mlに濃縮された。直ちに24-

27G シリンジで虚血下肢及び debridement の潰瘍・壊疽周辺に筋注した。

（倫理面への配慮）

日本医科大学付属病院倫理委員会及び日本医科大学倫理委員会の承認を受け、その適応に関しては各科（6診療科代表者8人）よりなる血管再生療法適応評価委員会において1症例毎の適応を選択した。

C. 研究結果

1：DDS 徐放化 b-FGF ハイドロゲル筋肉内投与による血管新生療法：

2008年内閣府スーパー医療特区に採択された

「難治性疾患を標的とした細胞間シグナル伝達制御による創薬」(課題22)の分担研究として、幹細胞を使用しない簡便で低侵襲な新しい血管新生療法として「DDS徐放化b-FGFハイドロゲル筋肉内投与による血管再生療法」を京都大学再生医科学研究所田畑グループとの共同研究で実施し、すでに治療抵抗性のASO, バージャー病10例に臨床研究を実施した。全例に安全性, 及び有効性を認め(著効), さらに日本医科大学付属病院倫理委員会の承認を受け, 膠原病・アレルギー疾患による難治性末梢動脈疾患(PAD)に対しても適応を拡大し, 70歳男性PSS, 66歳女性SLE症例に実施し, 2例とも著効を示し, 安全性にも問題は生じていない。

2:重症虚血下肢(CLI)に対する自己骨髄幹細胞による血管新生療法のLimb salvageのための予後予測:

19例の自己骨髄幹細胞による血管新生療法症例をretrogradeに解析し, 有効例15例(group NA), BKA症例4例(group A), を検討した。その結果, ^{99m}Tc -TF血流シンチグラフィーでは, group NAはgroup A (0.90 ± 0.34 vs 0.42 ± 0.14 , $p < 0.02$)に対して統計学的有意差が存在し, さらに100%O₂, 5分間吸入した後の経皮酸素分圧測定(delta TcPO₂)においてもdelta TcPO₂: 17.1 ± 11.3 mmHg vs -0.75 ± 2.87 mmHg, $p < 0.02$)と統計学的有意差が存在した。しかし, ABIでは統計学的有意差は存在しなかった。 ^{99m}Tc -TF血流シンチグラフィー値と100%O₂, 5分間吸入した後の経皮酸素分圧測定(delta TcPO₂)値は, CLIに対する自己骨髄幹細胞による血管新生療法の有効限界を示唆する重要なマーカーとなり得ることが示唆された。

D. 考察

DDS徐放化b-FGFハイドロゲル筋肉内投与による血管再生療法は, 10例全例に安全性, 及び有効性を認め(著効), 膠原病にも適応拡大し, 2例で有効な結果を得た。さらに ^{99m}Tc -TF血流シンチグラフィー値と100%O₂, 5分間吸入した後の経皮酸素分圧測定(delta TcPO₂)値は, CLIに対する自己骨髄幹細胞による血管新生療

法の有効限界を示唆する重要なマーカーとなり得ることが示唆された。

E. 結論

現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない治療抵抗性虚血下肢(バージャー病, ASO, 糖尿病潰瘍・壊疽, 膠原病等難治性血管炎)に対する自己骨髄幹細胞移植による血管新生療法及びDDS徐放化b-FGFハイドロゲル筋肉内投与による血管再生療法の有効性及び安全性を示した。 ^{99m}Tc -tetrofosmine (TF)血流シンチグラフィー等による種々の評価法により, 4週後良好な血流増加を証明し(平均15%), 疼痛の消失, 緩和, QOLの著明な改善をもたらした。本治療法は, limb salvageのための新しい戦略となりうると考えられた。

F. 健康危険情報

本療法の副作用に関連して, 有害事象は認めしていない。

G. 論文発表

1. Hiroshi Mizuno, Masaaki Miyamoto, Minoru Shimamoto, et.al. Therapeutic angiogenesis by autologous bone marrow cell implantation together with allogeneic cultured dermal substitute for intractable ulcers in critical limb ischemia. Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery 2010
2. Kawanaka, Hidekazu, Takagi, Gen, Miyamoto, Masaaki, et.al., Therapeutic angiogenesis by controlled-release fibroblast growth factor in a patient with Churg-Strauss Syndrome complicated by an intractable ischemic leg ulcer. The American Journal of the Medical 2778-2783, 2009
3. Akira Katsuno, Takayuki Aimoto, Eiji Uchida, Yasuhiko Tabata, Masaaki Miyamoto, The controlled release of basic fibroblast growth factor promotes. A rapid Sciences, 338, 341-342, 2009
4. Masafumi takahashi, Atsushi Izawa, Masaaki Miyamoto, et.al. mononuclear cells in patients with connective tissue disease. Current Pharmaceutical Design 15, healing of

pancreaticojejunal anastomosis with potent angiogenesis and accelerates healing of pancreaticojejunal anastomosis with potent angiogenesis and accelerates apoptosis apoptosis in granulation tissue. J Surg Research 2009

H. 特許出願 なし

1. 実用新案登録

なし

2. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 研究報告書

分担研究者 藤本和輝
研究協力者 宮尾雄治、古賀英信、本多 剛、金澤尚徳
国立病院機構熊本医療センター 循環器内科

研究要旨

【目的】

内皮前駆細胞が発見され、末梢血行障害をきたす閉塞性動脈硬化症、バージャー病に対して、自己骨髄単核球移植を用いた、血管再生療法が臨床応用されるようになった。難治性血管炎で、他に治療法が無い末梢血行障害を認める患者に対して自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法を施行し、その有用性を検討する。

【対象】

難治性血管炎で、他に治療法が無い末梢血行障害を認める患者12例（バージャー病 8例、膠原病 4例（結節性多発性動脈炎 2例、強皮症 2例））、26肢、男性7例、女性5例、平均年齢 53.1 ± 15.6 歳。本年度は、新たに強皮症（男性、65歳、症例12）に対して血管再生療法を施行した。

【方法】

全身麻酔下に腸骨から骨髄液を採取し、幹細胞を濃縮分離し、患肢に数十箇所筋注する。

【結果】

- 1：全例翌日から、自覚症状の改善を認めた。
- 2：レイザードプラー血流計で、急性期の血流改善を認めた。
- 3：バージャー病の1例で、血管再生療法で完全に良くなったが、再度、悪化した。ただし、血管再生療法後、一切の治療を自己中止し、喫煙も再開していた。その後、再度、血管再生療法を施行し完全に良くなった。今回、その後の治療も継続し維持できている。
- 4：強皮症で術後非常に経過良好であったが、治療40ヶ月後に受傷し悪化したため下腿切断となった。
- 5：その他の症例は、平均約45ヶ月経過観察できているが、症状の悪化を認めず、維持できている。

【結語】

- 1：自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法は、難治性血管炎（バージャー病、膠原病）による末梢血行障害に対しても有効であることが示唆された。
- 2：ただし、基礎疾患に対する治療を、継続して行うことが必要である。
- 3：術後のフットケアが非常に重要である。

はじめに

内皮前駆細胞が発見され、末梢血行障害をきたす閉塞性動脈硬化症、バージャー病に対して、自己骨髄幹細胞移植を用いた、血管再生療法が臨床応用されるようになり、その有用性が報告

されている。今回、難治性血管炎（バージャー病、膠原病）で他に治療法が無い末梢血行障害による重症虚血肢を認める患者に対して血管新生療法を施行し、その有用性を検討した。

方 法

全身麻酔下に腸骨から骨髓液を採取し、単核球を濃縮分離し、患肢に数十箇所筋注する。また、必要に応じて壊疽部分の切断を行う。

対 象

難治性血管炎で他に治療法が無い末梢血行障害を認める患者12例（バージャー病 8例、膠原病 4例（結節性多発性動脈炎 2例、強皮症 2例）、26肢、男性7例、女性5例、平均年齢53.1±15.6歳。本年度は、新たに強皮症（男性、65歳、症例12）に対して血管再生療法を施行した（表1）。

結 果

全例、翌日から自覚症状（冷感、疼痛）の改善を認め、完全に消失した。

壊疽を認めた4例は、壊疽部の切断を行ったが、壊疽部の切断のみで完全に傷治癒した。

症例6は（図3）、傷治癒し、自覚症状も消失し、非常に経過良好であったが、40ヶ月後に右下肢を受傷し、悪化したため残念ながら下腿切断となった。左下腿、左上肢は、経過良好であった。

症例8は、血管再生療法で完全に良くなったが、再度、悪化した。ただし、血管再生療法後、一切の治療を自己中止し、喫煙も再開していた。その後、再度、血管再生療法を施行し完全に良くなった（症例11）。今回、その後の治療も継続し維持できている（表2）。

考 察

難治性血管炎で、他に治療法が無い末梢血行障害を認める患者は、壊疽部の切断を施行したが、全例、非常に良い結果であった。また、バージャー病だけでなく、膠原病、に対しても、非常に有効であった。

バージャー病の1例で、血管再生療法で完全に良くなったが、再度、悪化した。ただし、血管再生療法後、一切の治療を自己中止し、喫煙も再開していた。その後、再度、血管再生療法を施行し完全に良くなった。今回、その後の治療も継続し維持できている。治療効果を維持するために、バージャー病も、基礎的な治療、禁

煙は不可欠である。

膠原病に関しては、血管再生療法で原疾患が良くなるわけでないので、再発等の長期予後に関しては、まったく不明である。しかしながら、膠原病（結節性多発性動脈炎 2例、強皮症 2例）で、従来の治療はまったく無効で、もし血管再生療法を行わなければ、major amputationとなった症例を、minor amputationで回避でき、独歩退院できるような治療をできた血管再生療法は、すばらしい治療である。

ただし、わずか4例であるので、長期予後を含め今後の研究が必要である。

また、残念ながら非常に経過良好であった症例が、受傷したために下腿切断となった。受傷していない部位は経過良好である。術後のフットケアが、非常に重要である。

結 語

- 1：自己骨髓幹細胞移植による血管再生療法は、難治性血管炎（バージャー病、膠原病）による末梢血行障害に対しても有効であることが示唆された。
- 2：ただし、基礎疾患に対する治療を、継続して行うことが必要である。
- 3：術後のフットケアが非常に重要である。

文 献

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967,1997
2. Tahashi T, Kalka C, Masuda H et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5: 434-438,1999
3. Murohara T, Ikeda H, Duan J et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105: 1527-1536, 2000
4. Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103: 897-903, 2001

表1. 難治性血管炎

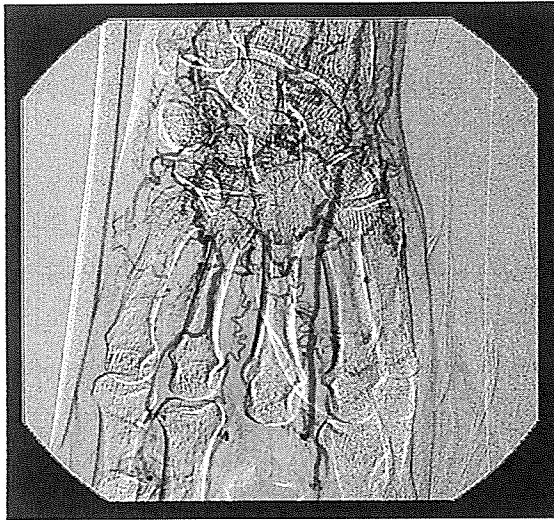
症例	性別	年齢	原疾患	治療部位
1	男性	60	バージャー病	右上肢
2	男性	21	結節性多発性動脈炎	四肢
3	男性	46	バージャー病	左下肢
4	男性	57	バージャー病	両上肢、左下肢
5	女性	41	バージャー病	四肢
6	女性	68	強皮症	左上肢、両下肢
7	男性	74	バージャー病	両下肢
8	女性	39	バージャー病	右下肢
9	男性	66	バージャー病	両下肢
10	女性	60	結節性多発性動脈炎	両上肢、右下肢
11	女性	40	バージャー病	右下肢
12	男性	65	強皮症	左上肢

表2. 結果

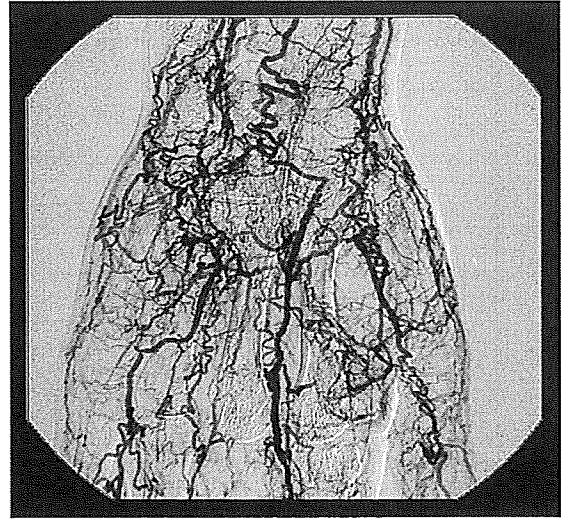
症例	性別	年齢	原疾患	治療部位	治療効果
1	男性	60	バージャー病	右上肢	自覚症状消失
2	男性	21	結節性多発性動脈炎	四肢	傷治癒、自覚症状消失
3	男性	46	バージャー病	左下肢	潰瘍治癒、自覚症状消失
4	男性	57	バージャー病	両上肢、左下肢	傷治癒、自覚症状消失
5	女性	41	バージャー病	四肢	自覚症状消失
6	女性	68	強皮症	左上肢、両下肢	傷治癒、自覚症状消失
7	男性	74	バージャー病	両下肢	自覚症状消失
8	女性	39	バージャー病	右下肢	自覚症状消失、
9	男性	66	バージャー病	両下肢	自覚症状消失
10	女性	60	結節性多発性動脈炎	両上肢、右下肢	傷治癒、自覚症状消失
11	女性	40	バージャー病	右下肢	自覚症状消失
12	男性	65	強皮症	左上肢	傷治癒傾向、自覚症状消失

長期予後

症例	性別	年齢	原疾患	治療部位	治療効果
1	男性	60	バージャー病	右上肢	維持
2	男性	21	結節性多発性動脈炎	四肢	維持
3	男性	46	バージャー病	左下肢	維持
4	男性	57	バージャー病	両上肢、左下肢	維持
5	女性	41	バージャー病	四肢	維持
6	女性	68	強皮症	左上肢、両下肢	40ヶ月後右下肢受傷し、 下腿切断となった。
7	男性	74	バージャー病	両下肢	維持
8	女性	39	バージャー病	右下肢	悪化、再施行
9	男性	66	バージャー病	両下肢	維持
10	女性	60	結節性多発性動脈炎	両上肢、右下肢	維持
11	女性	40	バージャー病	右下肢	維持
12	男性	65	強皮症	左上肢	傷治癒傾向、自覚症状消 失



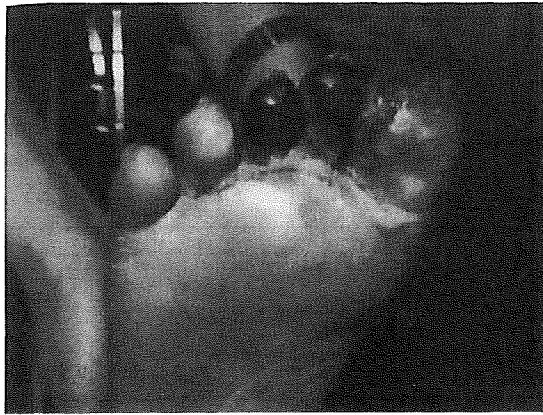
治療前



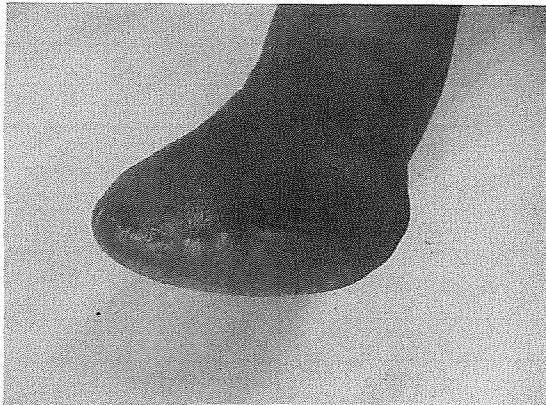
治療後

図1 バージャー病（症例1）

入院時



6ヶ月後



治療前



1年後

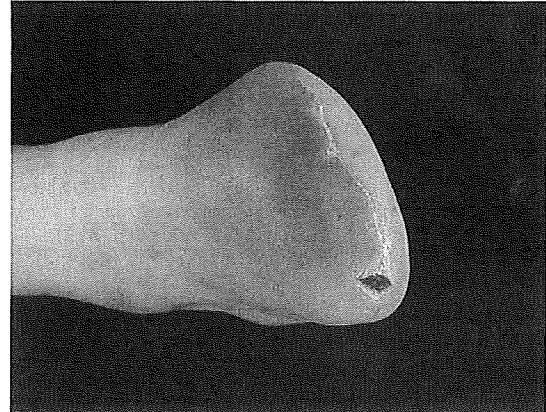


図2 結節性多発動脈炎（症例2）

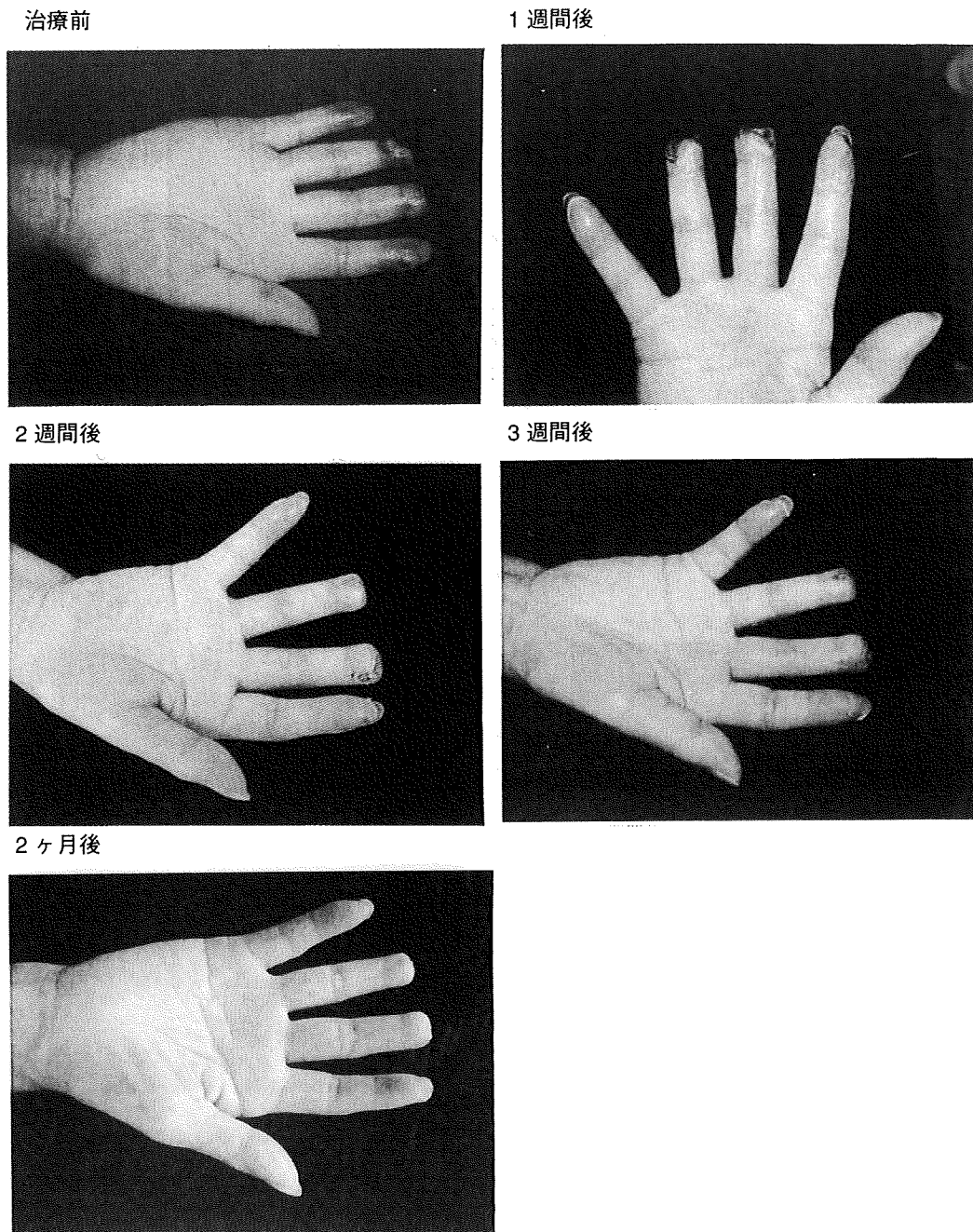


図2 結節性多発動脈炎（症例10）

5. 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 randomized controlled trial. *Lancet* 360: 27-435, 2002

6. 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

治療前



1ヶ月後



2ヶ月後



3ヶ月後



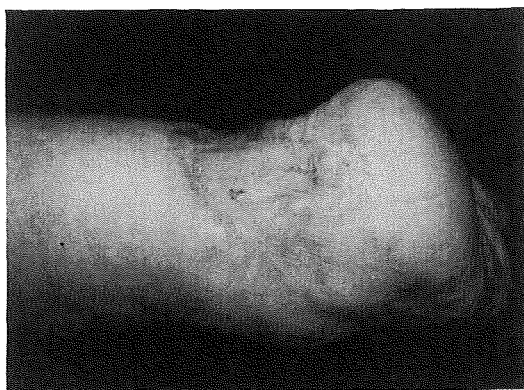
6ヶ月後



1年後



2年後



3年後

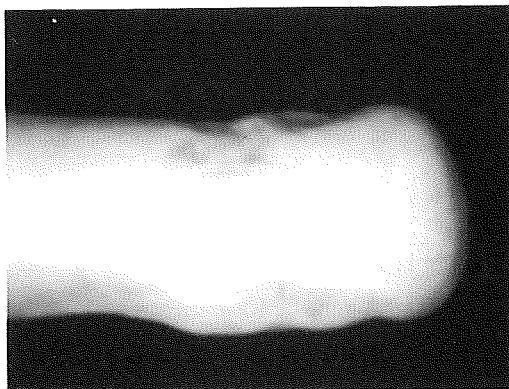
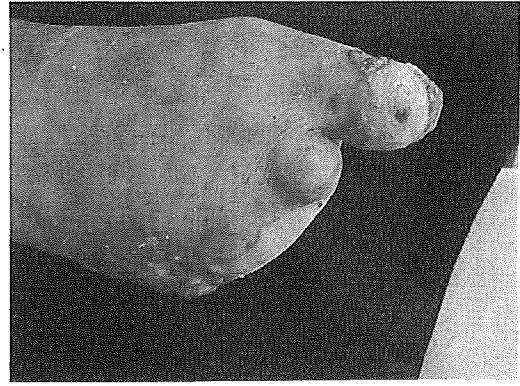


図3-1 強皮症（症例6，左下肢）

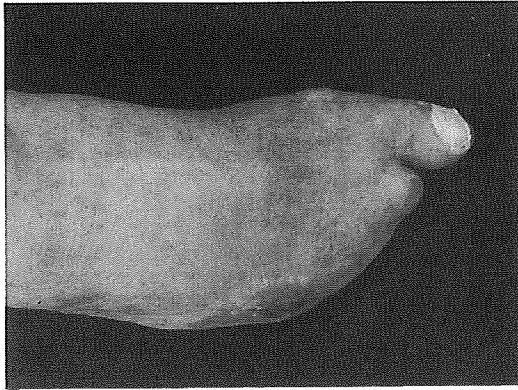
治療前



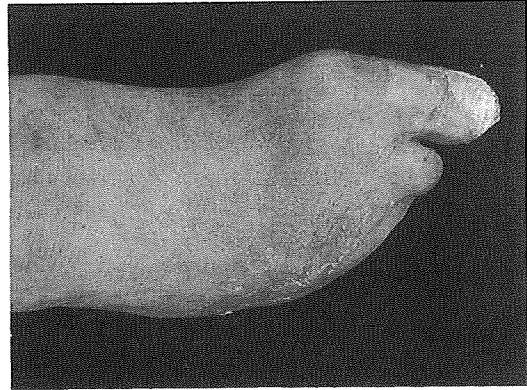
1ヶ月後



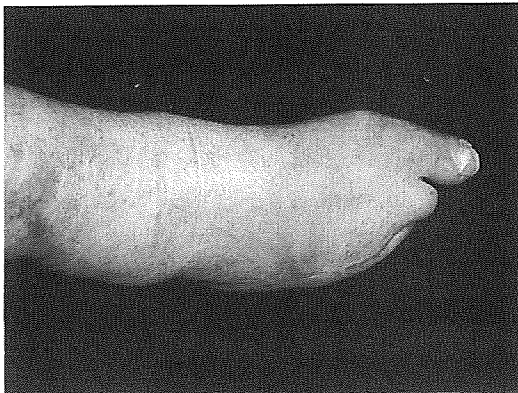
2ヶ月後



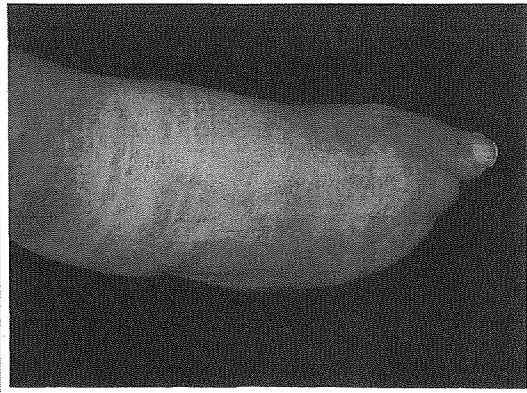
3ヶ月後



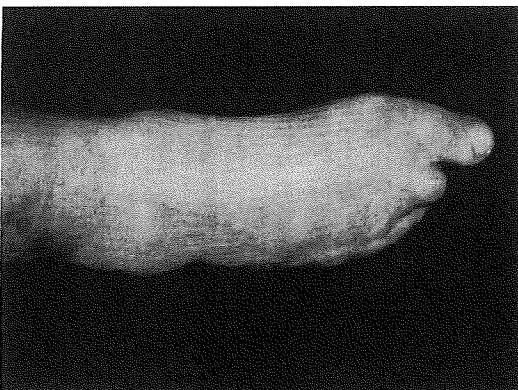
6ヶ月後



1年後



2年後



3年後

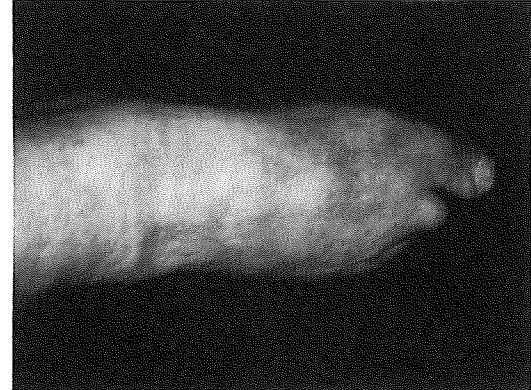


図3-2 強皮症（症例6，右下肢）

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

分担研究者 堀江 卓
北榆会 札幌北榆病院 外科

研究要旨

平成21年度は新たに2例を経験した。1例は強皮症による四肢難治性潰瘍例で、もう1例はバージャー病による足趾潰瘍だった。いずれも有効で、また有害事象はなかった。以前の症例の予後調査も行ったが、長期成績、安全性ともに良好であった。

1. はじめに

当院では、平成19年度より参加させていただいた。方法¹⁾⁴⁾については変わらないため、新たな症例について報告する。また、今までの症例の予後調査もあわせておこなった。なお、今年度は実験研究は行わなかった。

2. 強皮症による手足の難治性潰瘍

53歳女性、強皮症の診断でステロイドを使用中。多発性骨髄腫の既往があるため、G-CSFを用いなかった。したがって、血液成分分離装置（COBE Spectra：ガンプロ）を用いて末梢血単

核球を採取し、採取液を両手、両足に筋注した。採取液中のCD34陽性細胞数は 1.63×10^6 個だった。1ヶ月後、局所の潰瘍と疼痛、感染は残っていたので、近赤外線治療（スーパーライザー：東京医研⁵⁾）を開始した。さらに、その1ヶ月後（はじめの細胞治療から2ヶ月後）に、再度G-CSFを用いなくて血管再生治療を行った。その際のCD34陽性細胞数は 1.48×10^6 個で、両手、両足に行った。その後の経過は良好で、はじめの治療から3ヶ月後、潰瘍、疼痛および感染はほぼ消失し、著効を示した（図1）。

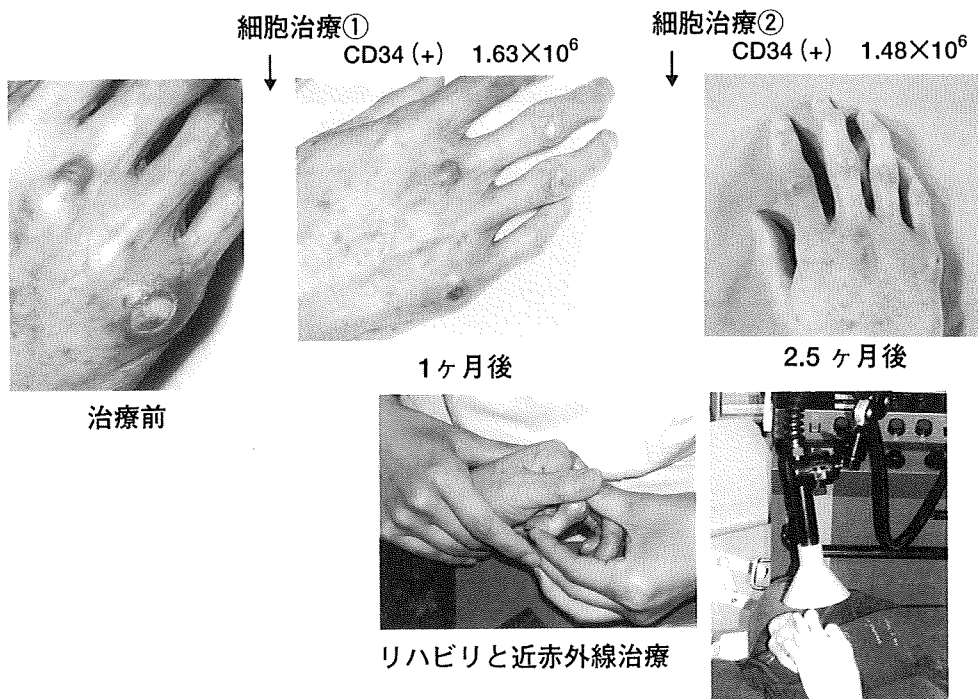


図1 症例7
53才 女性 強皮症

強皮症による難治性潰瘍に対して、血管再生治療は有効であった。また、近赤外線治療の併用により、潰瘍の治癒が促進されたと考える。近赤外線は鎮痛以外にも、潰瘍、壊疽、褥瘡に有効との報告⁵⁾があり、当科でも積極的に使用している。

3. バージャー病による足趾潰瘍

29歳男性、右第1趾潰瘍あり。G-CSFを用いSpectraにより細胞を採取し、両足に筋注した。採取液注のCD34陽性細胞数は 1.05×10^8 個と多かった。3ヶ月後、潰瘍は消失、9ヶ月後、潰瘍は治っているが、体重をかけると痛む(図2)。

バージャー病にも血管再生治療は有効で、長期にわたり効果が持続する。若年者にG-CSFを投与したが、明らかな副作用はなかった。



図2 症例11：29才 男性 バージャー病

表1 平成21年以前の症例

症例	疾患名	Fontaine	効果	副作用	その他
1	48才女 膠原病 SLE	4	なし	なし	ステロイド(+), 治療29ヶ月で大切断(右膝下)、31ヶ月右大腿切断、55ヶ月右大腿再切断、60ヶ月SLE脳症、72ヶ月後敗血症で死亡
2	25才女 膠原病 SLE	4	改善	なし	ステロイド(+), ①左手治療後61ヶ月経過良好(潰瘍消失)、 肺高血圧改善、 ②右手も左手治療後4ヶ月に治療、潰瘍なく経過良好
3	42才男 膠原病 SLE	4	改善	なし	ステロイド(+), 治療後56ヶ月、潰瘍は消失するも、痛み、だるさはある
4	39才女 膠原病 SLE	4	改善	なし	ステロイド(+), 両足に治療、潰瘍は縮小、アキレス腱部も改善、外来時に壊疽の腱は切除、9ヶ月後に両足、臀部、左股関節部の潰瘍に再度行うも、53ヶ月後両足に1~2cm大の潰瘍が3ヶ所残る
5	59才女 膠原病 MCTD	1	改善	なし	ステロイド(-), 35ヶ月後右第5趾潰瘍出現、再度細胞治療、49ヶ月後潰瘍消失、軽度疼痛はあり
6	40才女 膠原病 SLE	4	不変	なし	ステロイド(+), 両上肢に行い、14ヶ月後肘部潰瘍は治癒、20ヶ月後左3指切断、20.5ヶ月後肺高血圧(+), 32ヶ月後SLE再燃、パルス療法で肺高血圧も改善、44ヶ月後右第2指に潰瘍あり、骨露出
7	61才男 バージャー病	3	不変	なし	51ヶ月後自殺 右足切断の予定だった
8	27才男 バージャー病	4	改善	なし	右足にのみ行った 29ヶ月後潰瘍消失
9	72才男 バージャー病	1	改善	なし	14ヶ月後運動療法とプロスタグランジン内服継続中

4. 平成21年度以前の予後調査（表1）

平成21年度以前の症例は、SLE 5例、MCTD 1例、バージャー病 3例で、観察期間は膠原病で短くても44カ月、バージャー病で14ヶ月と長期となった。前者では6例中4例が改善、後者では3例中2例が改善し、成績は良好だった。またG-CSFを投与したことによる明らかな副作用はなく、安全であった。

5. 終わりに

難治性血管炎に対する末梢血幹細胞を用いた血管再生治療は有効で、またG-CSF投与に伴う明らかな副作用はなく、安全に施行できた。

文 献

- 1) 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. *日本アフエレス学会雑誌* 25:172-182,2006
- 2) Kawamura A, Horie T, Tsuda I, et al: Prevention of limb amputation in patients with limbs ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation. *Therapeutic Apheresis & Dialysis* 9: 59-63, 2005
- 3) Kawamura A, Horie T, Tsuda I, et al: Clinical Study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs. *Journal of Artificial Organs* 9: 226-233, 2006
- 4) Horie T, Onodera R, Akamatsu M, et al: Long-term clinical outcomes for patients with lower limb ischemia implanted with G-CSF-mobilized autologous peripheral blood mononuclear cells. *Atherosclerosis*, (in press)
- 5) 小川節郎: Super Lizer (直線偏光赤外線治療器). *医科器械学* 68: 567-571,1998

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

新規 CD4 陽性 T 細胞サブセットである Th17 細胞の血管新生誘導作用

分担研究者 高橋将文
自治医科大学分子病態治療研究センター
協力研究者 羽田健紀
信州大学大学院臓器発生制御医学講座

【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ージャ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 細胞のサブセットとして新たに発見された Th17 細胞の虚血後血管新生誘導作用について検討した。Th17細胞はインターロイキン-17 (IL-17) を産生する CD4 陽性 T 細胞であることから、IL-17ノックアウト (KO) マウスに虚血モデルを作製した。IL-17-KOマウスでは、野生型 (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、虚血組織での血管新生因子の産生も抑制されていた。また、IL-17-KOマウスの骨髄をWTに移植した骨髄移植マウスでは、WTからWTへの骨髄移植マウスと比較して、虚血後血流回復が減少していた。さらに、T細胞の欠損しているヌードマウスに IL-17-KO マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を移植したところ、WTマウス由来 CD4 陽性 T 細胞移植と比較して虚血後血流回復が減少しており、Th17 細胞そのものが血管新生に重要であることが明らかとなった。今後、Th17細胞の詳細な解析が行われることで、リンパ球を介した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ージャ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な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ージャ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されている。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。先の我々の研究で、CD4陽性細胞除去により、虚血後血流回復が減少することから、この血管新生にはCD4陽性細胞が必要であることが示された。最近、CD4陽性T細胞にTh1やTh2以外にもサブセットが存在することが明らかとされ、インターロイキン-17（IL-17）を産生する分画であるTh17細胞が大きな注目を集めている。これまでTh17細胞は、自己免疫性疾患や炎症性疾患の病態に関与していることが報告されているが、Th17の血管新生への役割は現在のところ、全くわかっていない。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-17ノックアウト (-KO) マウス（C57BL/6 background：東京大学医科学研究所・岩倉洋一郎教授より供与）、ヌードマウス（BALB/c-nu/nu mice：日本SLC）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IL-17の役割

まず、Th17細胞の役割を検討するため、IL-17-KO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-17-KO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1）。

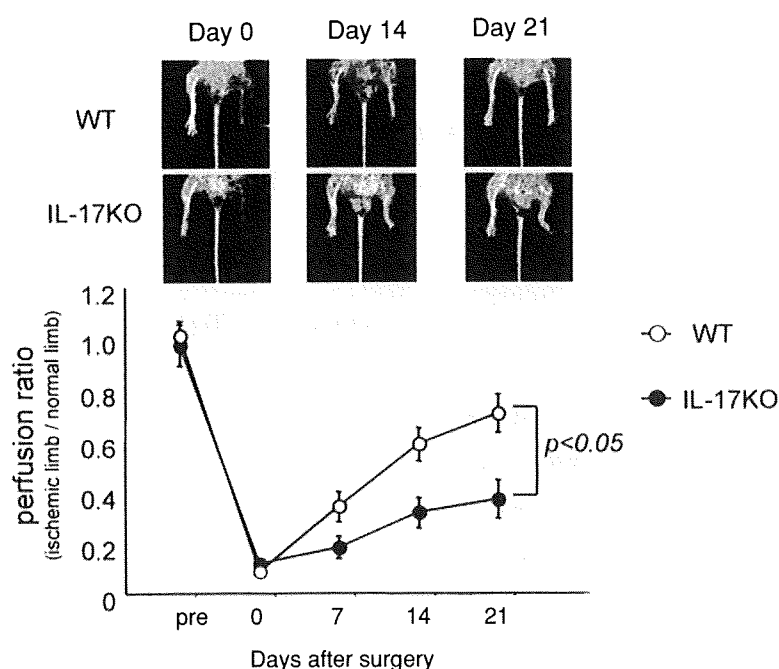


図1 IL-17KOマウスにおける虚血後血流回復への影響

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-17-KO

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2）。

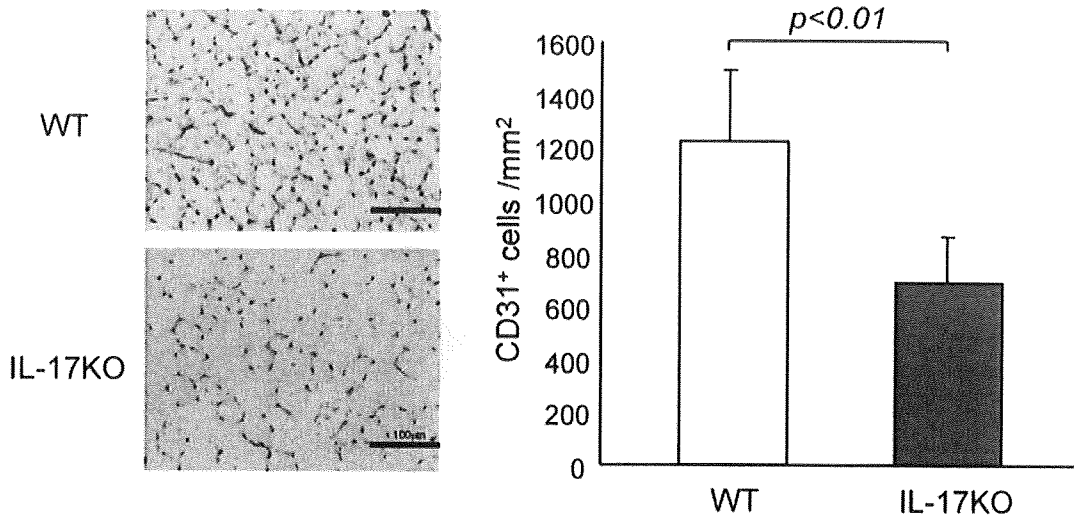


図2 IL-17KOマウスにおける毛細血管形成への影響

3. 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-17-KOマウスではこれら炎症性細胞の浸潤が減少していた(図3)。

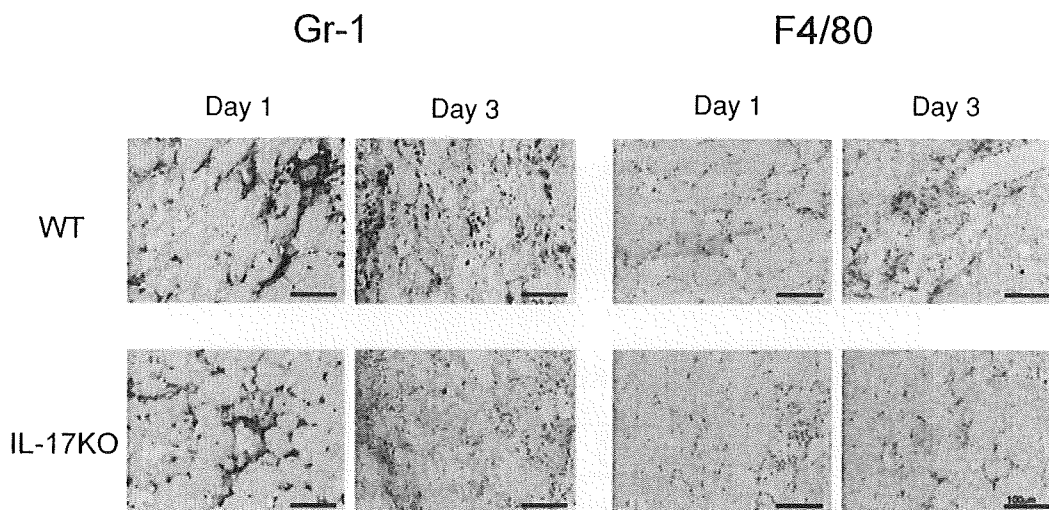


図3 IL-17KOマウスにおける顆粒球や単球/マクロファージの浸潤への影響(1)

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-17-KO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-17-KOマウスで有意に少ないことが明らかとなった(図4)

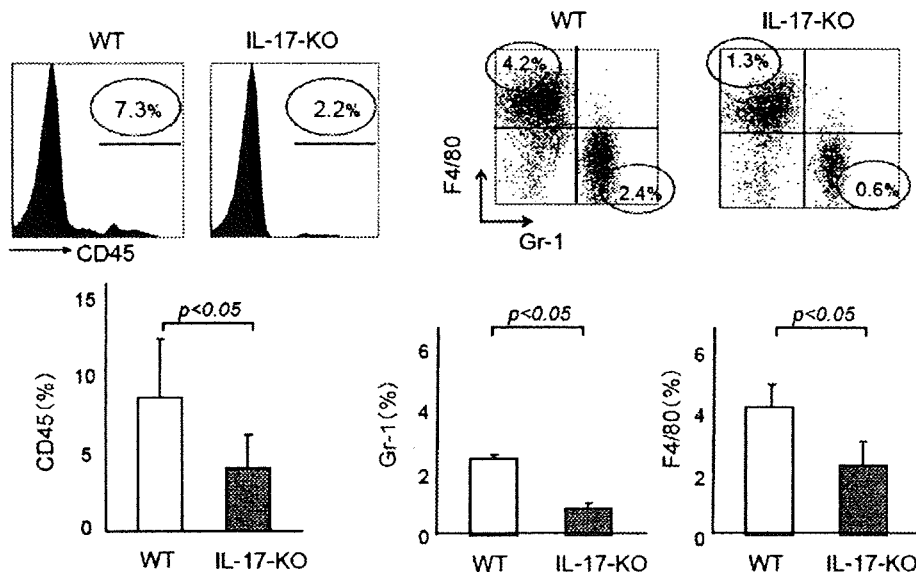


図4 IL-17KOマウスにおける顆粒球や単球/マクロファージの浸潤への影響(2)

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-17-KO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5)。

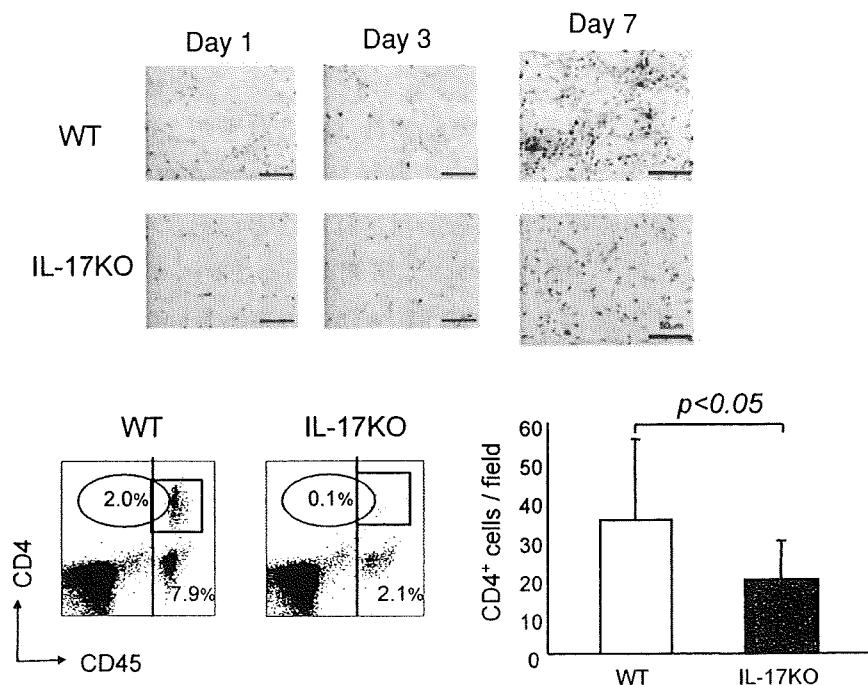


図5 IL-17KOマウスにおける虚血部位へのCD4陽性細胞浸潤への影響

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、虚血後血管新生における血管内皮細胞増殖因子（VEGF）や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日目の虚血組織におけるこれら因子の産

生について組織をホモジナイズしてELISA法で測定した。VEGF およびIL-1 β とも、虚血組織において有意に産生が亢進していたが、IL-17-KOマウスでは、WTマウスに比較して、この虚血肢におけるVEGFおよびIL-1 β の産生亢進が有意に低下していた（図6）。

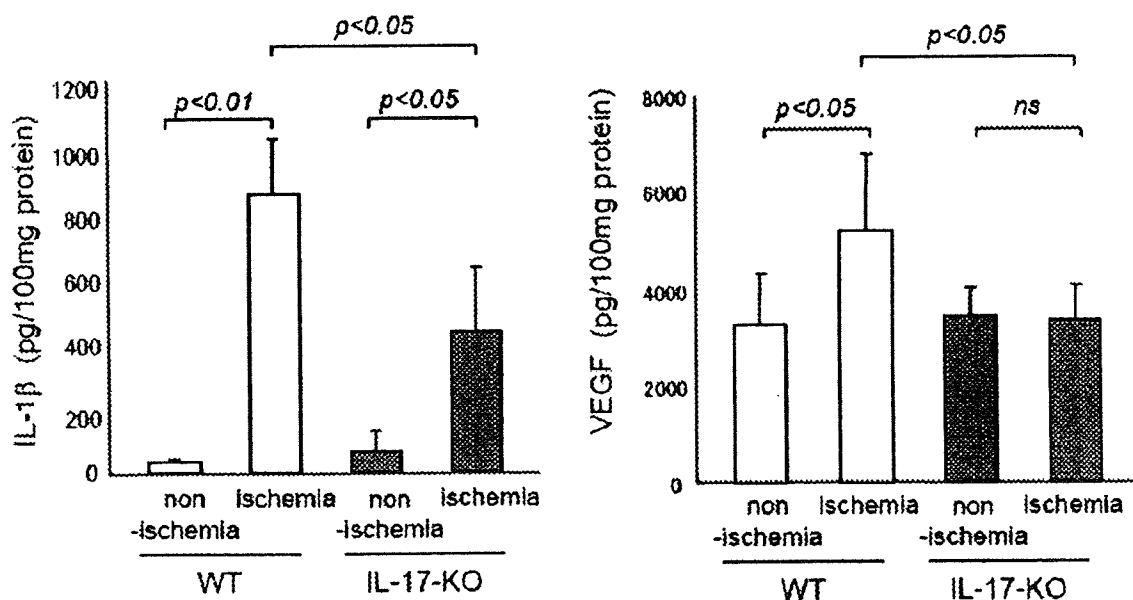


図6 IL-17-KOマウスにおける虚血後VEGFおよびIL-1 β 産生への影響

4. 虚血後血管新生における骨髓由来IL-17産生細胞の役割

虚血後血管新生における骨髓由来IL-17産生細胞の役割を明らかとするため、3種類の骨髓移植マウス（WT \rightarrow WT、WT \rightarrow IL-17-KO、IL-17-KO \rightarrow WT）を作製して検討した。WT \rightarrow WTマウスと比較して、骨髓由来細胞でのIL-17の欠損しているIL-17-KO \rightarrow WTマウスでは、虚血後血流回復が有意に低下していた（図7）。また、興味深いことに、骨髓以外の細胞でのIL-17の欠損しているWT \rightarrow IL-17-KOマウスにおいても血流回復の部分的な低下が認められた。これらの結果より、骨髓由来IL-17産生細胞の虚血後血管新生における重要性は示された。

5. 虚血後血管新生におけるTh17細胞の役割

Th17細胞はT細胞サブセットの一つであるこ

とから骨髓細胞由来である。しかし、ごく最近、Th17細胞以外のIL-17産生細胞が報告されている。そこで、Th17細胞の役割をより詳細に明らかとするため、全てのT細胞が欠損しているヌードマウスにCD4陽性細胞を移植して、その血管新生能を検討した。つまり、ヌードマウスではT細胞が欠損しているため、その虚血部位にTh17細胞を含むWTマウス由来CD4陽性細胞とTh17細胞を含まないIL-17-KOマウス由来CD4陽性細胞を移植してTh17細胞の有無による血管新生作用を検討した。IL-17-KOマウス由来CD4陽性細胞群ではコントロールと比較して血流回復傾向を認めたものの、WTマウス由来CD4陽性細胞移植群と比較すると有意にその血流回復作用は低下しており、Th17細胞の移植が虚血後血流回復を促進することが明らかとなった（図8）。

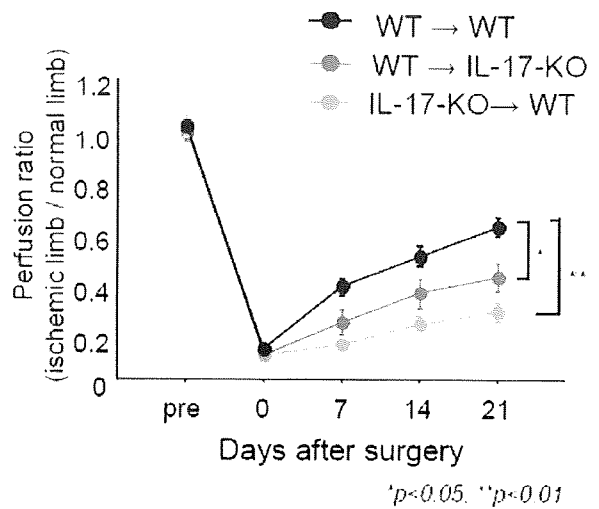
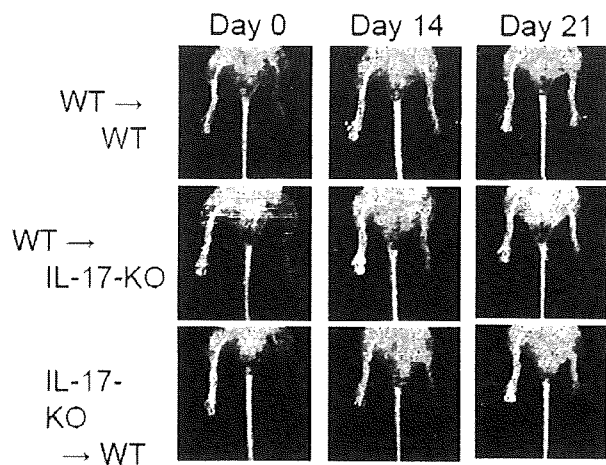


図7 虚血後血管新生における骨髄由来IL-17産生細胞の役割

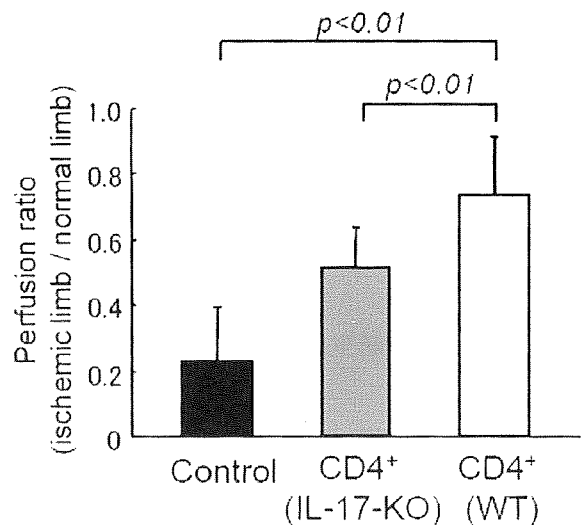
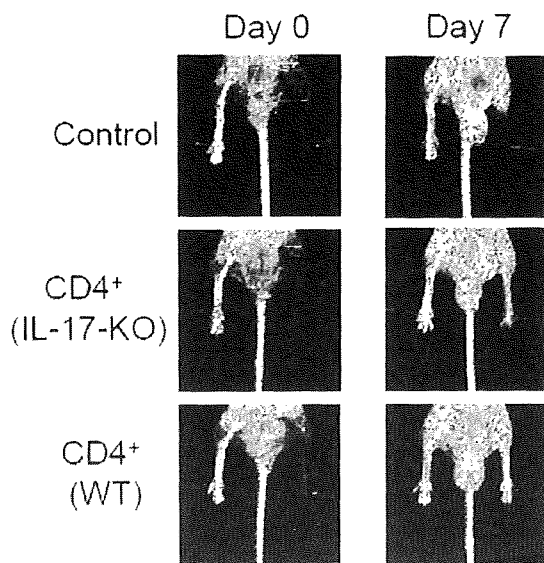


図8 虚血後血管新生におけるTh17細胞の役割

【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、新規CD4陽性T細胞サブセットであるTh17細胞の虚血後血管新生における役割が示されたこと

から、このTh17細胞も血管新生治療のための新たな細胞ソースとなり得ることが明らかとなった。今後は、血管新生の細胞ソースとしてのTh17の可能性についてさらに検討していく予定である。また、Th17細胞がどのようにして血管新生を誘導するのかについても、より詳細な機序の解明も今後の課題である。