

- of reduced heme oxygenase-1 with excessive Toll-like receptor 4 expression in peripheral blood mononuclear cells in Behcet's disease. *Arthritis Res Ther* 10: R16, 2008
141. Ideguchi H, Ohno S, Takase K, Hattori H, Kirino Y, Takeno M, Ishigatsubo Y. Successful treatment of refractory lupus-associated haemophagocytic lymphohistiocytosis with infliximab. *Rheumatology* 46: 1621-1622, 2007
142. Inoue S, Oshiro H, Watanuki Y, Miyazawa N, Kudo M, Goto H, Tsukiji J, Kaneko T, Ishigatsubo Y. Metastatic brain mass caused by slow-growing small-cell lung cancer: differential vascular endothelial growth factor expression in primary and metastatic tumor. *Clin Lung Cancer*. 8: 436-438, 2007
143. Miyazaki T, Fujimaki K, Shirasugi Y, Yoshida F, Ohsaka M, Miyazaki K, Yamazaki E, Sakai R, Tamaru J, Kishi K, Kanamori H, Higashihara M, Hotta T, Ishigatsubo Y. Remission of lymphoma after withdrawal of methotrexate in rheumatoid arthritis: Relationship with type of latent Epstein-Barr virus infection. *Am J Hematol*. 82: 1106-1109, 2007
144. Ideguchi H, Ohno S, Hattori H, Ishigatsubo Y. Persistence with bisphosphonate therapy including treatment courses with multiple sequential bisphosphonates in the real world. *Osteoporos Int*. 18: 1421-1427, 2007
145. Ishizawa J, Fujita H, Iguchi M, Tachibana T, Taguchi J, Ishigatsubo Y. Quantification of circulating varicella-zoster virus DNA for follow-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 *日本臨床* 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, 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: 489-497, 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髓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髓単核球導入コラ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。自己骨髓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, Kudoh 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療法の多施設共同研究

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

要 旨

3年間に膠原病に伴う難治性血管炎による重症虚血四肢（合計8症例14肢）に対し細胞移植により血管再生医療を行った。

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^{1,3)}。しかし、これまで骨髄単核球の移植した症例において、血管内皮前駆細胞のマーカーであるCD34陽性細胞数とその効果を閉塞性動脈硬化症やバージャー病、膠原病で比較検討した報告はない。そこで今回、平成19年から平成21年において当科で行った膠原病による難治性血管炎に対する骨髄単核球細胞移植の効果を検討し、膠原病による細胞治療の効果を評価した。

6ヶ月以上経過観察した初回骨髄単核球細胞移植50例のうち、心血管合併症による死亡にて経過をみられなかった5例をのぞく45例について検討した。CD34陽性細胞は男性に比べ、女性患者が有意に多く、膠原病患者全体でもバージャー病より多いことがわかった。一度の細胞移植で病変が治癒したGood responder 群 33例、再度移植し軽快した Poor responder 群 9例、下肢大切断を要した Non responder 群 3例に分けて検討した。各群で移植細胞数、CD34陽性細胞数に有意差は認めなかったが、Good responder 群でやや多い傾向があった。また、潰瘍径の変化を検討したところ、いずれの群でも著明に縮小していたが、膠原病群で改善が最も著しく、他疾患に比べ、大きな潰瘍でも効果がみられることがわかった。また、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として major amputation は、1肢も認めていない上、遠隔期死亡もなく今後再生医療の適応拡大が望ましいと考えられた。

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。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と考えられる。当科で治療した患者の効果を病態別に

検討し報告する。

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、検査として潰瘍径を検討した。

結果

1. 初回骨髄単核球細胞移植による患者数と内訳

図1に当科における初回自己骨髄単核球による血管再生医療の推移を示す。当科にては、急性心筋梗塞に対する末梢血細胞移植も施行していたため2006年まで下肢血管再生医療の患者を

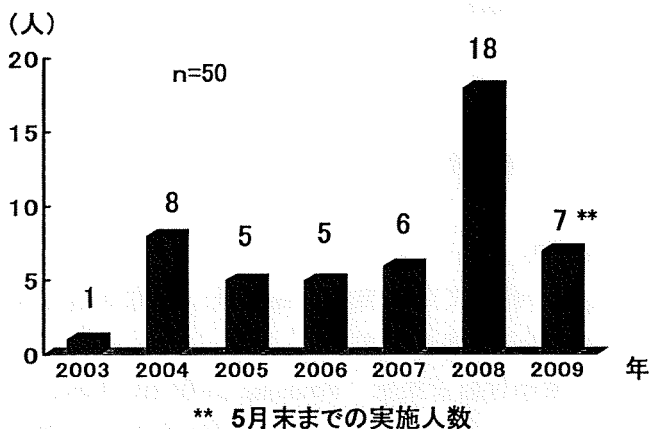


図1 6ヶ月以上経過した初回骨髄単核球細胞による血管再生療法患者数の推移

十分に受け入れることができなかったが、2008年からは、2回目以降の移植や末梢血単核球細胞移植を含めると年間30-40例の血管再生医療を行っている。今回は、初回移植の効果を検討する目的で、6ヶ月以上経過の観察できた合計50例を対象に検討した。

それらのうち、疾患別、性別症例数を表1に示すが、膠原病はこれまで8例治療しているものの、今回の検討では、末梢血細胞移植や経過の短い例をのぞいて4例における検討を行った。そのうち女性が3名である。バージャー病の治療患者が男性：女性=6:1に比べ対照的である。また、検討した4例の膠原病症例は、いずれも下肢病変に対する治療で、表中の上肢への治療は、いずれもバージャー病によるものである。

2. 疾患別の虚血性潰瘍面積

当科に初診または紹介患者で前述の除外項目に該当しないすべての患者に対して細胞治療を施行しているが、移植当日の皮膚潰瘍面積を図2に示す。我々の対象とした患者さんの潰瘍面積は、膠原病>バージャー病>閉塞性動脈硬化症(PAD)の順で大きく、その後の治療成績の判断に重要と考えられた。また、膠原病群の潰瘍面積は、PAD群に比べて有意に大きかった。

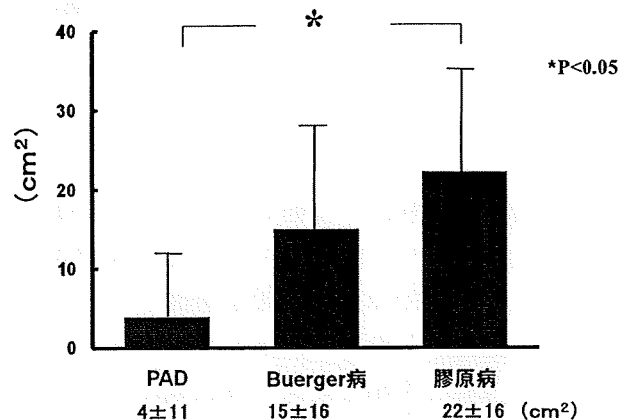


図2 疾患別移植前潰瘍面積

3. CD34陽性細胞数

これまでに、血管内皮前駆細胞の代表的マーカーとして、細胞表面上のCD34抗原が用いられているが、今回の45例の検討では、透析の有無、糖尿病の有無では、特に差を認めなかったが、図3に示すごとく女性が、男性に比べて有意に採取細胞中のCD34陽性細胞が多かった。この事は、女性患者に多い膠原病による血管炎に対する再生医療を考える上で、重要であると考えられた。性別を区別せず、全体で比べた場合は、膠原病>バージャー病>PADの順で大きく、膠原病とバージャー病の間には有意差を認めた(図4)。

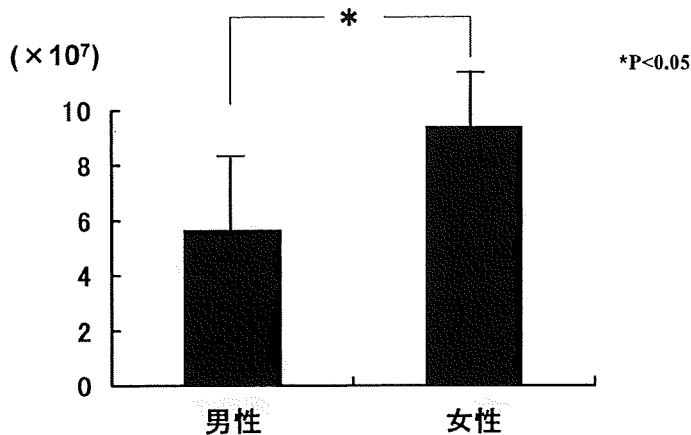


図3 性別CD34陽性細胞数

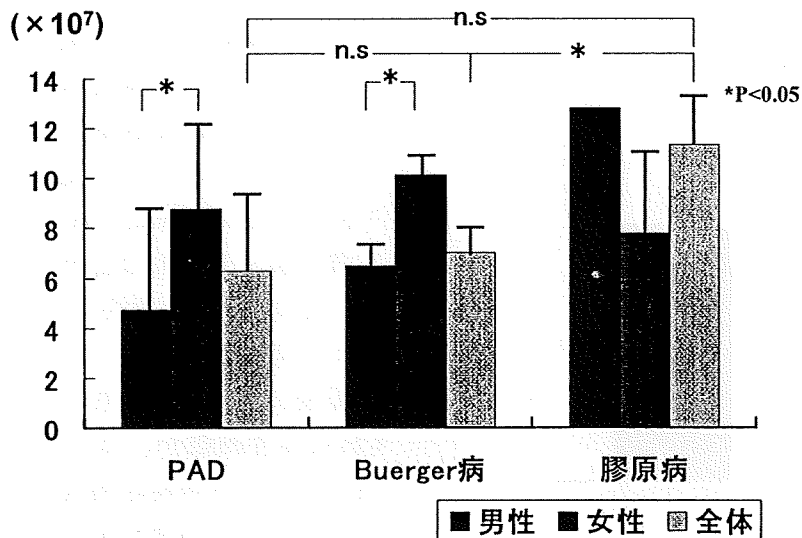


図4 疾患別CD34陽性細胞数

4. 骨髄単核球細胞による血管再生医療の臨床効果

初回移植の効果を検討する目的で、6ヶ月以上経過の観察できた合計50例を対象に検討し、6ヶ月以降に心血管合併症や感染症にて死亡された5例を除く45例について分類を行った。症例数に限りがあるため、図5に示す如く一度の細胞移植で病変が治癒したGood responder群 33例、再度移植し軽快したPoor responder群 9例、下肢大切断を要したNon responder群 3例に分けて検討した。

骨髄細胞から採取した骨髄単核球細胞数、CD34陽性細胞数の分布を図5に示す。効果別に有意差は認めなかったが、図7の如く、Good responder群でCD34陽性細胞が多い傾向にあることが、わかった。また図6からもCD34陽性細胞 8×10^7 個以上、骨髄単核球数 3×10^9 個以上の症例は、すべてGood responderであり、予後推定の指標となり得ると考えられた。

5. 疾患別における血管再生医療の臨床効果

膠原病、バージャー病、閉塞性動脈硬化症の疾患別効果をみると表2に示すように、いずれもGood responderの割合は、約70%であった。しかし、今回の対象の移植前の潰瘍径が、膠原病、バージャー病の患者では、PADに比べて大きく、より重症例であったと考えられた。各群で潰瘍径の変化を検討すると術後いずれの群でも小さくなっている(図8)が、その縮小面積は、膠原病>バージャー病>PADの順に大きく、膠原病患者は、PADの患者に比べて有意に縮小効果があった(図9)。

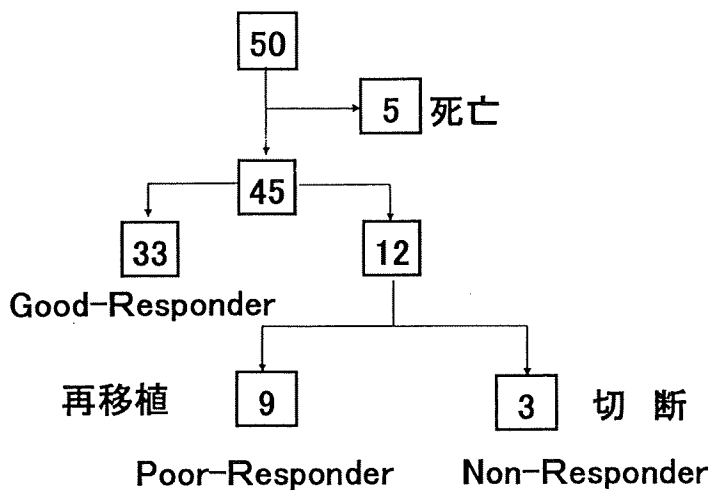


図5 初回骨髄単核球細胞による血管再生療法の臨床効果

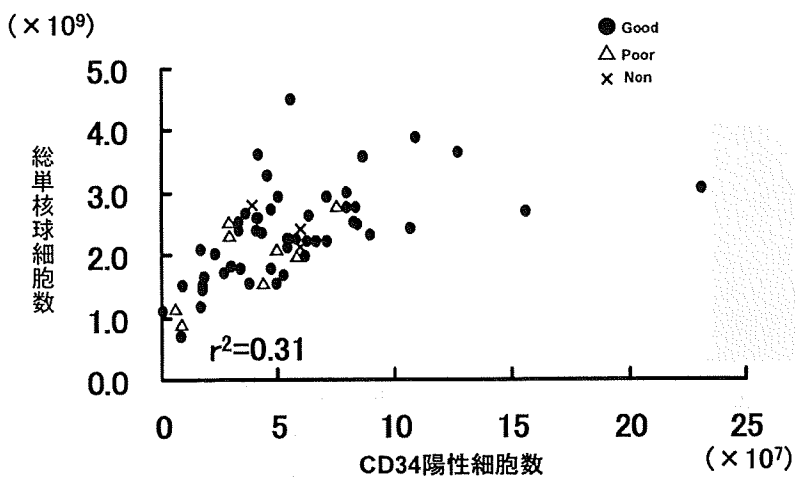


図6 総単核球細胞数およびCD34陽性細胞と臨床効果

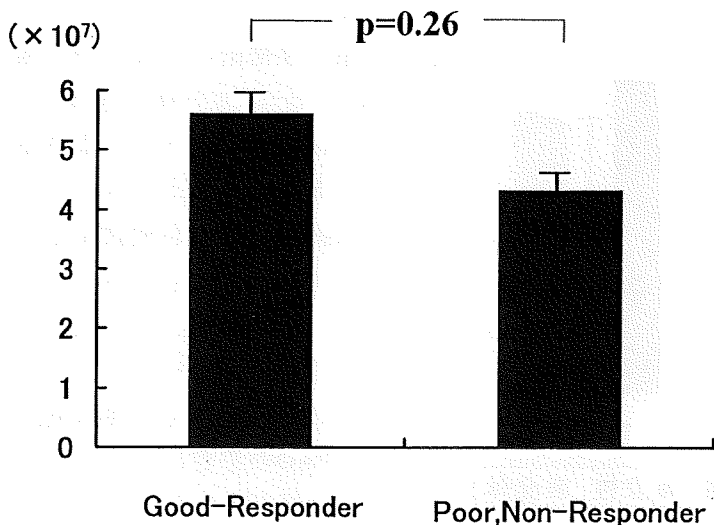


図7 臨床効果別CD34陽性細胞数

考 察

当院における初回骨髄単核球により血管再生療法を行った50名（そのうち膠原病4名）について検討した。CD34陽性細胞数を性別、年齢別、疾患別、透析の有無により比較検討したところ、PAD及びバージャー病群において男性と比較して女性が、またバージャー病群に比較して膠原病群が有意に高値であった。他の群間においては有意差を認めなかった。また、CD34陽性細胞移植数はGood Responder群とその他と比較すると有意差はなかったが、多い傾向にあった。PAD群にて有意に潰瘍径が小さいにも関わらずに死亡例が多く、潰瘍縮小面積は、膠原病>バージャー病>PADの順に多かった。また、我々の血管再生医療の術後、これまでの経過で悪性腫瘍の出現や腫瘍死は一例も認めていない。

膠原病患者では、6ヶ月以上の経過観察できた4例中good responder 3例 poor responder 1例であり、下肢切断や死亡例は認めていない。また、経過が浅いため今回の検討の対象でなかった4例を含めて膠原病患者全症例8例中（観察期間4ヶ月-3年）においては、good responder 7例 poor responder 1例であり、下肢切断や死亡例は認めておらず、安全性、本治療法の効果は、とても高いと考えられた。

最後に、膠原病患者においてCD34陽性細胞が、多い傾向にあることから今後症例数を増やして検討する価値があると考えられた。

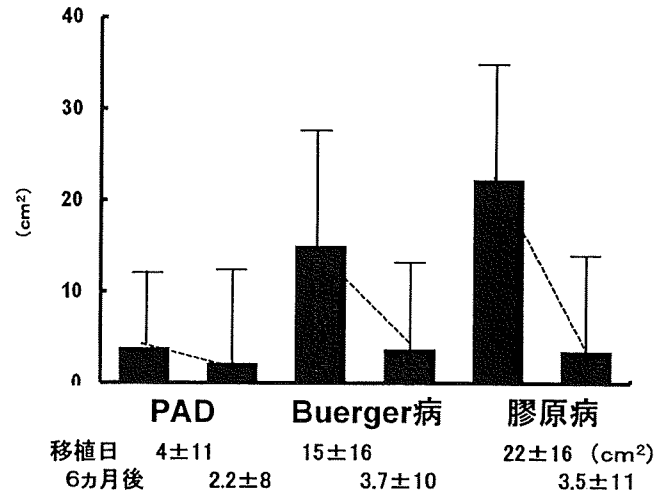


図8 疾患潰瘍面積の推移（移植6ヶ月前後）

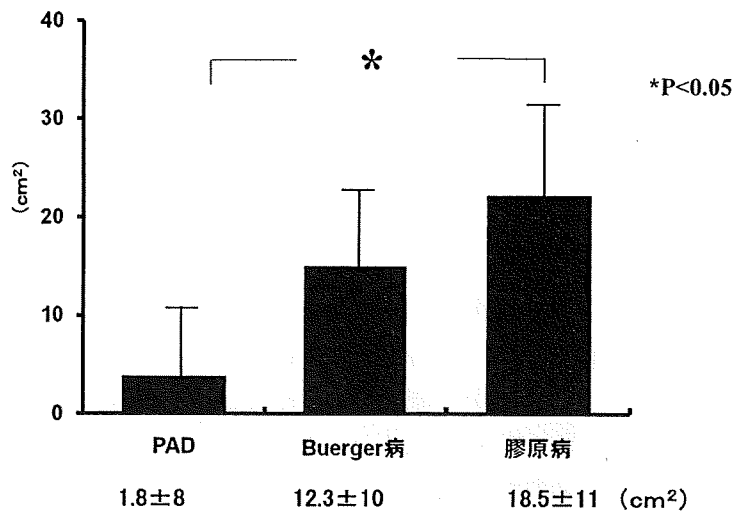


図9 疾患別移植後 潰瘍縮小面積

表1 対象

		総数	男性	女性
血管再生療法患者数 (年齢)		50	32 (60±13)	18 (66±10)
疾患	PAD	32	19	13
	Buerger病	14	12	2
	膠原病	4	1	3
移植部位	下肢	46	28	18
	下肢+上肢	3	1	2

表 2 疾患別 骨髄単核球細胞移植の効果

	PAD	Buerger 病	膠原病
再移植	5/32(15%)	3/14(21%)	1/4(25%)
下肢切断	2/32(6.2%)	1/14(7.1%)	0/4(0%)
再移植・切断	7/32(22%)	4/14(28%)	1/4(25%)
移植前潰瘍面積(cm ²)	4±11	15±16	22±16
死亡	4/36(11%)	1/15(6.7%)	0/4(0%)
Good responder(%)	25/36(70%)	10/15(67%)	3/4(75%)
透析患者数	3 (good1, poor1 non1)	0	0

結 語

膠原病に伴う難治性血管炎による重症虚血四肢に対し合計 8 症例14肢を細胞移植により血管再生医療により治療した。これまで私達が治療している PAD、バージャー病と比べても、膠原病の患者の治療反応は良く、安全かつ効果的であった。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。

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療法の多施設共同研究

分担研究者 室原豊明
研究協力者 新谷 理、清水優樹、小椋康弘、近藤和久
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

要 旨

血管病分野における再生医療の進展は著しい。我々は以前、世界で初めて自己骨髄単核球細胞を用いた血管再生治療を重症虚血肢患者（バージャー病、閉塞性動脈硬化症）140人へ本邦27施設で実施している。本治療法の有効性は、世界初の細胞移植血管再生医療として2002年の Lancet 誌（360: 427-360）に発表され、2003年6月には厚生労働省から再生医療分野では初めて高度先進医療保険適応を承認されている。これ以降、この細胞移植による血管再生療法は本邦のみならず世界中に広まり、欧米およびアジア諸国においても多くの重症虚血肢患者が四肢切断から救済されている。

本治療法での臨床成績（140人）を解析してみると、閉塞性動脈硬化症での有効性は54%と低いが、バージャー病では95%と非常に高い有効性を示すことが明らかとなった。このことから、バージャー病では、血管における炎症反応の存在がその有効性の向上に寄与している可能性が示唆される。つまり、血管炎患者では局所における幹細胞遊走・活性化因子の発現が亢進していることが、その作用機序の一つとして考えられる。本研究では、血管によりターゲットを絞った多施設臨床試験を行い、難治性血管炎における骨髄幹細胞移植療法の有効性と安全性を明らかとするとともに、本治療法の機序を解明する。また同時に臨床で問題になった点、今後改善すべき点などが発生した場合、積極的に基礎研究を用いたいわゆる逆 TR 研究（臨床-基礎検証実験）も行うものである。

目 的

本研究の目的は、臨床試験によりバージャー病、さらに強皮症、MCTDをはじめとする各種膠原病に伴う難治性血管炎患者に対する自己骨髄単核球細胞移植による血管再生療法（TACT protocol）の有効性と安全性を検証するとともに、基礎的研究により本治療法の機序を解明し、骨髄単核球細胞移植に比してより侵襲が少なく有効性の高い新たな治療法の可能性も探索することである。

バージャー病、強皮症などによる難治性血管炎では、病変が末梢に存在し、従来のカテーテ

ル治療や外科的バイパス手術治療が無効で指趾切断に至る症例も少なくない。申請者らは、自己骨髄単核球細胞移植療法がこのような重症虚血肢例にも有効であることを既に明らかとしてきたが、本治療法をさらに広めるためには、より多くの症例による多施設臨床試験で有効性と安全性を検証する必要がある。また、本治療法の正確な機序についてはいまだ明らかではないことから、血管炎・血管閉塞モデル動物を用いた基礎的研究によりその機序を解明する必要がある。さらには、本治療法では全身麻酔下で400-600 mlの骨髄液採取を要することから、よ

り侵襲の少ない新たな血管再生療法の開発も重要な課題である。

バージャー病や強皮症は若年者での発症が多く、指趾の切断はQOLを大きく損なう。本研究により難治性血管炎患者における幹細胞移植による血管再生療法の有効性と安全性が検証できれば、日本発の新たな治療法として世界中の下肢虚血を有する難治性血管炎患者の救済に大きく貢献する。また、幹細胞移植療法は、他の疾患の治療にも臨床応用を目指して研究されており、本研究での成果は難治性血管炎のみならず様々な難治性疾患の病態の解明や治療法の開発にも役立つものと確信する。

申請者らのグループは以前、久留米大学医学部、自治医科大学、関西医科大学の3施設において重症虚血肢患者への骨髓幹細胞移植による血管再生療法の臨床試験（TACT-1臨床試験、Lancet 2002）を世界で初めて成功させている。これに関連して、我々はこれら患者における四肢虚血の病態解明と骨髓幹細胞移植による血管再生機序について臨床と基礎の両面から研究を行ってきた。

一方、骨髓細胞以外の移植細胞の可能性および幹細胞移植による血管以外の組織再生療法についても研究を行っている。皮下脂肪組織にも間葉系幹細胞が含まれることから、これらを分離／自家移植すると血管再生が增強されることを確認している。

結 果

臨床研究

自己骨髓単核球細胞移植による血管再生療法を継続し、現在骨髓細胞移植による TACT 治療者は通算15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。

この3年間の間に2例の膠原病患者に対して自己骨髓細胞移植療法を行った。

症例①：73歳女性。主訴は左母指の安静時疼痛および難治性潰瘍。既往歴：全身性硬化症、甲状腺機能低下、高血圧、慢性心房細動、喫

煙：一日に45本を30年間、8年前より禁煙。飲酒：焼酎50mlとウイスキー30ml。家族歴は父胃がん、母に脳溢血、妹に大腸がん。現病歴：2003年末より間欠性跛行出現し、近医で保存的加療。2004年2月総合病院血管外科紹介。MRAで下肢3分枝以下の狭窄のため手術適応なしと判断され、以後、近隣の大学附属病院循環器内科で内服加療。2008年4月、本人の希望により関東地区総合病院へ紹介受診。PTA（左膝下動脈不通過、左浅大腿動脈へステント留置、右膝下動脈へステント留置。2009年1月 PTA（左浅大腿動脈ステント内再狭窄に対しPTA、右膝下動脈ステント留置末梢部完全閉塞）。1週間後左浅大腿動脈に急性閉塞をおこし、近隣市民病院血管外科受診。パルクス点滴等で下肢切断は回避したがその後悪化を認め、2009年2月血管新生療法適応決定のため当院へ紹介となった。

入院時身体所見：ABIは右0.58、左0.74とともに低下。疼痛および潰瘍のある左下肢に対し今回治療を行う。来院時の左下肢は、左第1指は、白色壊死、第3指は先端黒色壊死（ミイラ化）、第5指は潰瘍を伴う黒色壊死を認めた。ヨードアレルギーの既往があり、下肢血管造影の代用としてMRAを施行した。左の浅大腿動脈はステント部で閉塞。またその末梢の大腿動脈完全閉塞を認めた。右下肢は下腿の主要3分枝が閉塞していた。左下肢に対して自己骨髓単核球細胞移植術を施行した。2009年4月9日、全身麻酔下に450 mlの骨髓液を採取し、比重遠心分離器にて 1.87×10^9 個の骨髓液単核球細胞（MNCs）を分離し、左下腿へ54カ所に分け局所移植した。FACS解析では、 1.9×10^7 個のCD34陽性細胞が含まれていた。本例は重症症例であったが、術後2ヶ月間の病状を改善させるまでの効果を得ることができなかった。その後感染の合併から敗血症に陥り下肢切断を施行。はじめは膝下切断を行ったが、それでも創傷治癒が遅延して、また再度創部感染を発症して膝上切断後に退院した。

症例②：70歳男性。主訴は両側の難治性潰瘍お

よび色素沈着。既往歴：30歳の時にバージャー病と診断された。また、その後の経過で糖尿病、脂質異常症、高血圧などを発症。現在は慢性心房細動も有している。現病歴：1980年にバイパス術を施行。その後経過は良好であったが、2005年症状再燃し、交感神経切除術、さらに2007年11月右第5指切断された。2009年8月、切断端の再潰瘍化があり、血管新生療法目的で紹介となった。入院時身体所見：ABIは右が0.77と低下。下肢静脈エコーで表在静脈のうっ滞および逆流の所見を認めた。来院時の右下肢は、先端の切断部潰瘍、その他足は内側に1つ、外側に2つの潰瘍を認めた。また下腿の末梢側2/3は色素沈着を認めた。（表在静脈の逆流と合わせて、うっ滞性皮膚炎の所見と考えられた。）下肢血管造影では、右浅大腿動脈で閉塞。またその末梢側で完全閉塞を認めて側副血行路が発達していた。その後、右下肢に対して自己骨髄細胞移植術を施行した。2009年9月17日、全身麻酔下に600 mlの骨髄液を採取した。比重遠心分離器にて 1.1×10^9 個の骨髄液単核球細胞（MNCs）を分離し、右下腿へ40ヶ所局所投与した。FACS解析にて 2.1×10^7 個のCD34陽性細胞が含まれていた。術後経過：色素沈着は改善した。また疼痛も軽度軽減したが、検査上の下肢血流および末梢の潰瘍の改善は認められなかった。興味深いことに、動脈系の循環はあまり改善しなかったが、静脈系のうっ滞性潰瘍は細胞治療により改善した。

以上のように2例の血管炎に伴う症例を経験したが、base lineが重症例では必ずしも骨髄細胞移植の効果は現れにくいことが、改めて確認された。今後、血管炎に対しても適応症例の選択が重要であることが示唆された。

基礎研究

<サマリー>

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。

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徴を 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 数の定量評価を行った。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日後の流雪中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。

文 献

1. Inoue N, Kondo T, Kobayashi K, Aoki M, Numaguchi Y, Shibuya M, Murohara T. Therapeutic angiogenesis using novel vascular endothelial growth factor-E/human placental growth factor chimera genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 99-105, 2007
2. Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi K, Yamamoto K, Shintani S, Numaguchi Y, Naoe T, Takamatsu J, Komori K, Murohara T. Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ J* 71: 196-201, 2007
3. Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Maeda K, Tsuzuki M, Kim W, Sasaki T, Liu Z, Inoue N, Kondo T, Jin H, Numakuchi Y, Okumura K, Yokota M, Iguchi A, Murohara T. Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in MMP-2-deficient mice. *Circ Res* 100: 904-913, 2007
4. Ichihara S, Yamada Y, Ichihara G, Nakajima T, Li P, Kondo T, Gonzales FJ, Murohara T. A role for the aryl hydrocarbon receptor in regulation of ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1297-1304, 2007
5. 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
6. Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, Inoue N, Murohara T. Role of bradykinin, nitric oxide and angiotensin II type 2 receptor in imidapril-induced angiogenesis. *Hypertension* 51: 252-258, 2008
7. Urano T, Ito Y, Akao M, Sawa T, Miyata K, Tabata M, Morisada T, Hato T, Yano M, Kadomatsu T, Yasunaga K, Shibata R, Murohara T, Akaike T, Tanihara H, Suda T, Oike Y. Angiopoietin-related growth factor enhances blood flow via activation of the ERK1/2-eNOS-NO pathway in a mouse hind-limb ischemia model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 827-834, 2008
8. 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, 2008
9. Sugiura T, Kondo T, Kureishi-Bando Y, Numaguchi Y, Yoshida O, Dohi Y, Kimura G, Ueda R, Rabelink TJ, Murohara T. Nifedipine

- improves endothelial function: role of endothelial progenitor cell. *Hypertension* 52: 491-498, 2008
10. 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* 156: 1010-1018, 2008
 11. 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* 29: 61-66, 2009
 12. 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* 18: 533-543, 2009
 14. 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* 284: 1718-1724, 2009
 15. Murohara T. Autologous adipose tissue as a new source of progenitor cells for therapeutic angiogenesis. *J Cardiol* 53: 155-163. (Review), 2009
 16. 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* 73: 1324-1329, 2009
 17. Murohara T, Shintani S, Kondo T. Autologous adipose-derived regenerative cells for therapeutic angiogenesis. *Curr Pharm Des* 15: 2784-2790, 2009
 18. 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* 55: 69-75, 2009
 19. Murohara T. Cord blood-derived early outgrowth endothelial progenitor cells. *Microvasc Res* (in press)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 研究報告書

難治性血管炎に対する血管再生療法の多施設共同研究

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 箕田清次
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

要 旨

【目 的】

膠原病では、レイノー現象や血管炎などにより指趾の血流障害をきたすことが多い。血流障害をきたした指趾では、疼痛や冷感、さらには潰瘍を生じやすく重症例では壊疽に至ることもある。先に行った研究により、自己骨髓血と末梢血の単核細胞分画を、膠原病に伴う血流障害をきたした別々の指趾に単回移植した結果、移植する細胞として骨髓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。そこで、膠原病に伴う阻血四肢に対し、自己末梢血単核細胞分画の繰り返し移植を行うことにより、阻血部位の血管新生を図り、血流を改善させることを目的とする。

【方 法】

症例は膠原病に伴う四肢の血流障害、潰瘍、壊死を有する6症例。移植前、自己末梢血を400～1600ml採取し、比重遠心分離法を用いて単核細胞分画を分離した。分離した単核細胞分画は、RPMI培地に懸濁して8～16mlに調整し、0.2～0.4mlずつ20～80カ所手掌および/または足底の骨格筋ないし骨膜下へ移植した。この移植術を、3ヶ月ごとに半年～1年間繰り返し行い、その有効性および安全性について評価を行った。

【結 果】

疼痛、冷感、満足度に関するvisual analog scaleは、全ての症例で移植後に改善がみられた。サーモグラフィーにより測定した皮膚表面温度は、2例で上昇傾向が見られた。外観の評価では、治療前5例に潰瘍がみられていたが、移植後全例治癒した。angiographyでは、4例で治療後に移植部位の描出血管が増加した。血清学的には、血清VEGF濃度が移植後増加し、血清thrombospondin-1濃度が血清VEGF濃度と短期的には相関し、長期的には逆相関した。

【考 察】

末梢血単核細胞分画の繰り返し移植により、潰瘍、血流および疼痛改善効果があることが確認された。これらの効果は、移植後数週間で見られ始めたことから、移植後早期にみられる効果は血管拡張によるものと考えられた。長期的には、angiographyで描出血管が増加したことから、angiogenesisによる効果と考えられた。また、単核細胞の採取を末梢血から行うことにより、患者負担が少なく、短期間での繰り返し移植が可能であり、難治かつ再発が多い膠原病に伴う末梢血管障害に対しては、より適した方法であると考えられた。これまで最長3年間の経過観察を行っているが、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。