

- myocardial infarction induced by ischemia /reperfusion. *Life Science* 80, 2076-2084, 2007
7. Takayuki Aimoto, Eiji Uchida, Akira Matsushita, Yasuhiko Tabata, Masaaki Miyamoto. Controlled release of basic fibroblast growth factor promotes healing of the pancreatico jejunal anastomosis: A novel approach toward zero pancreatic fistula. *Surgery* 142, 734-740, 2007
 8. A Shirakabe, H Tano, S Nakamura, A Kikuchi, A Sasaki, E Yamamoto, S Kawashima, G Takagi, N Fujita, S Aoki, K Asai, M Yoshikawa, K Kato, T Yamamoto, M Takayama, and T Takano. Coronary perforation during percutaneous coronary intervention: Lessons from our experiences. *Int Heart J* 48 : 1-9, 2007
 9. 宮本正章、高木 元、高野仁司、太良修平、加藤浩司、高木郁代、安武正弘、大坪春美、水野博司、高野照夫. 医療用無菌ウジ治療（マゴットセラピー）+自己骨髄幹細胞移植による血管新生療法+同種培養真皮+自家皮膚移植術併用療法により救肢しえた高齢者難治性糖尿病性壊疽の1例. *診療と新薬* 44巻6号, 659, 2007
 10. 宮本正章、高木 元、太良修平 他. *Nursing Lecture(43)*マゴットセラピー；そのメリット、ケアの実際. *月刊ナーシング* 27, No.9 (348) 78-85, 2007
 11. 高木 元、宮本正章、水野杏一. [総説] 糖尿病性潰瘍・壊疽. *看護技術* 54, 121-123, 2008
 12. 高木 元、水野杏一. [総説] 血管内皮機能と血栓症の臨床的評価. *The Circulation Frontier* 11, No 4, 2008
 13. 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. 【膠原病の合併症とその対策】 膠原病による難治性皮膚潰瘍とその対策. *リウマチ科* 39巻2号, 149-155, 2008
 14. 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. [総説] 皮膚組織の再生医療. *Medical Science Digest* 34, 3, 119-122. 2008
 15. 宮本正章、高木 元、太良修平、安武正弘、高野仁司、高木郁代、大坪春美、水野博司、川中秀和、水野杏一. 医療用ウジによる重症難治性潰瘍・壊疽治療（マゴットセラピー、Magott Debridement Therapy: MDT）診療と新薬 45巻5号, 463-464, 2008
 16. 宮本正章、高木 元、水野博司、水野杏一. 【糖尿病とフットケア わが国における治療の最前線】 重症糖尿病性足病変管理の新展開 重症糖尿病性足壊疽におけるマゴットセラピーの有効性. *Diabetes Frontier* 19巻3号, 331-339, 2008
 17. 宮本正章、高木 元、水野博司、水野杏一. 境界領域から 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巻9号, 1051-1060, 2008
 18. 宮本正章、高木 元、太良修平、高野仁司、高木郁代、安武正弘、水野杏一. 再生医療の現状と将来展望】 再生医療の現状と将来展望 治療抵抗性末梢動脈疾患（PAD）に対する再生医療を応用した先進併用療法. *日本医科大学医学会雑誌* 5 巻 1 号, 33-37, 2009
 19. 太良修平、宮本正章、高木 元、水野杏一. 血管新生療法・マゴットセラピーとサルポグレラート併用効果. *Angiology Frontier* 8巻1号, 71-75, 2009
 20. 坪井一平、平山悦之、村田広茂、高野仁司、高木 元、水野杏一、時田祐吉、田中啓治、汲田伸一郎. 症例から学ぶ 偽腔開存型急性大動脈解離に伴う慢性消費性凝固障害に対し抗線溶療法が著効した1例. *日本医科大学医学会雑誌* 5 巻 3 号, 167-171, 2009
 21. 宮本正章： 難治性創傷に対するマゴットセラピー. *日本医事新報*, No.4360, 2007
2. 著 書
 1. 高木 元、宮本正章、水野杏一. [分担] 幹細胞移植：透析患者の末梢動脈疾患とフットケア. 小林修三編、医薬ジャーナル社, 108-114, 2008
 2. 宮本正章、高木 元、水野杏一. [分担] マゴットセラピー：透析患者の末梢動脈疾患と

- フットケア. 小林修三編、医薬ジャーナル社、115-125, 2008
3. 高木 元、宮本正章、水野杏一. [分担] マゴット治療の実際：足の創傷をいかに治すか. 市岡 滋、寺師浩人 編、克誠堂、156-160, 2009
 4. 宮本正章、高木 元、水野博司、水野杏一、[分担] 【新時代の糖尿病学 病因・診断・治療研究の進歩】 特論 糖尿病性壊疽に対するマゴットセラピー. 日本臨床 66 巻増刊 9 新時代の糖尿病学(4), 700-712, 2008
 5. 宮本正章、高木 元、太良修平、水野博司、田畑泰彦、水野杏一. [分担] 患者までとどいている再生誘導治療 バイオマテリアル、生体シグナル因子、細胞を利用した患者のための再生医療の実際】 組み合わせ 足場と細胞増殖因子 皮膚真皮 皮膚真皮の再生誘導治療. 遺伝子医学 MOOK 13号, 232-236, 2009
 6. 水野博司、宮本正章. [分担] 1. 細胞増殖因子 1) 皮膚皮下組織 遺伝子医学 MOOK 13 患者までとどいている再生誘導治療 バイオマテリアル、生体シグナル因子、細胞を利用した患者のための再生医療の実際. 株式会社メディカルドゥ, 86-91, 2009
 7. 宮本正章、高木 元、水野杏一 [分担]：重症下肢虚血（CLI）に対する血管新生療法 足の創傷をいかに治すか 糖尿病フットケア・Limb Salvage へのチーム医療. 市岡 滋、寺師浩人 編著 克誠堂出版, 48-53, 2009
 8. 宮本正章、高木 元、水野杏一 [分担]：重症下肢虚血（CLI）に対する血管新生療法 足の創傷をいかに治すか 糖尿病フットケア・Limb Salvageへのチーム医療. 市岡 滋、寺師浩人 編著 克誠堂出版, 48-53, 2009
 9. 宮本正章 [分担]：足壊疽に対するマゴットセラピー カラー版 糖尿病学 基礎と臨床アップデート版 I. 西村書店, 134-142, 2009
 10. 宮本正章 [分担]：マゴットセラピー 医学大辞典 第2版 医学書院 2653, 2009

めの医療用容器」
特許出願番号：特願2007-310188 出願日：平成
19年11月30日

実用新案登録
なし

その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

名称：「医療用ハエの幼虫又は卵を収容するた

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 藤本和輝
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 循環器内科学

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。

【方法】全身麻酔下に腸骨から骨髓液を採取し、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ヶ月経過観察でしているが、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再生療法を施行し、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121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（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

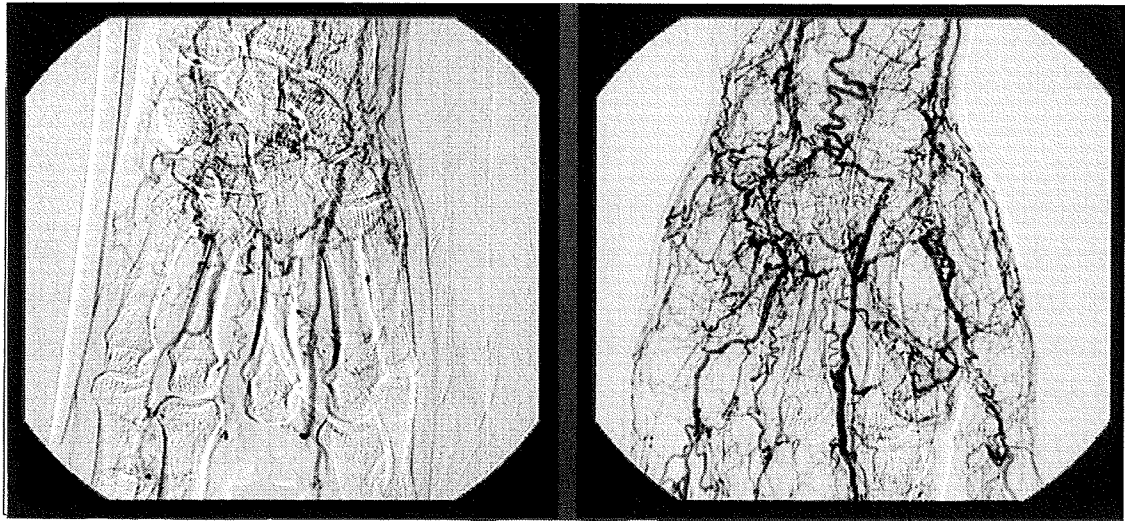
は、壊疽部の切断を行ったが、壊疽部の切断のみで完全に傷治癒した。症例6は（図3）、傷治癒し、自覚症状も消失し、非常に経過良好であったが、0ヶ月後に右下肢を受傷し、悪化したため残念ながら下腿切断となった。左下腿、左上肢は、経過良好であった。

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1. 難治性血管炎

症例	性別	年齢	原疾患	罹患部位	治療対象病変
1	男性	60	バージャー病	右上肢	末梢循環障害
2	男性	21	結節性多発性動脈炎	四肢	虚血性潰瘍、壊疽
3	男性	46	バージャー病	左下肢	虚血性潰瘍
4	男性	57	バージャー病	両上肢、左下肢	虚血性潰瘍、壊疽
5	女性	41	バージャー病	四肢	末梢循環障害
6	女性	68	強皮症	左上肢、両下肢	壊疽
7	男性	74	バージャー病	両下肢	末梢循環障害
8	女性	39	バージャー病	右下肢	末梢循環障害
9	男性	66	バージャー病	両下肢	末梢循環障害
10	女性	60	結節性多発性動脈炎	両上肢、右下肢	壊疽
11	女性	40	バージャー病	右下肢	末梢循環障害
12	男性	65	強皮症	左上肢	壊疽

症例	細胞の由来	移植細胞数	有効性	転帰	転帰までの期間	その他有害事象
1	骨髓	6.8×10^9	著効	治癒	64ヶ月	無
2	骨髓	1.8×10^9	著効	治癒	59ヶ月	無
3	骨髓	3.4×10^9	著効	治癒	56ヶ月	無
4	男性	2.3×10^9 8×10^9	著効	治癒肢	52ヶ月	無
5	骨髓	1.8×10^9	著効	治癒	50ヶ月	無
6	骨髓	5.3×10^9	著効	治癒	40ヶ月で右下肢受傷し切断。左下肢、左上肢は、47ヶ月維持。	無
7	骨髓	11.5×10^9	著効	治癒	44ヶ月	無
8	骨髓	3.2×10^9	著効	治癒	42ヶ月	無
9	骨髓	1.5×10^9	著効 著効	治癒	35ヶ月	無
10	骨髓	2.2×10^9	著効	治癒	25ヶ月	無
11	骨髓	2.6×10^9	著効	治癒	22ヶ月	無
12	骨髓	0.8×10^9	有効	改善傾向	1ヶ月	無

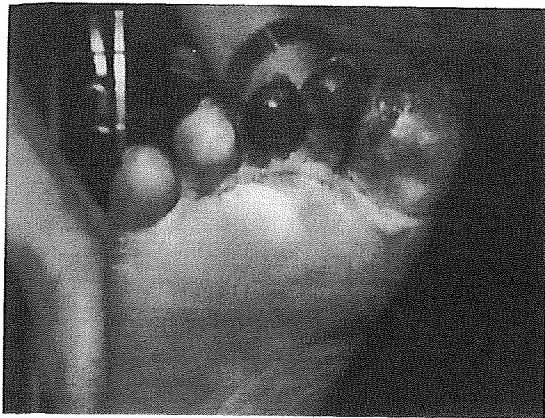


治療前

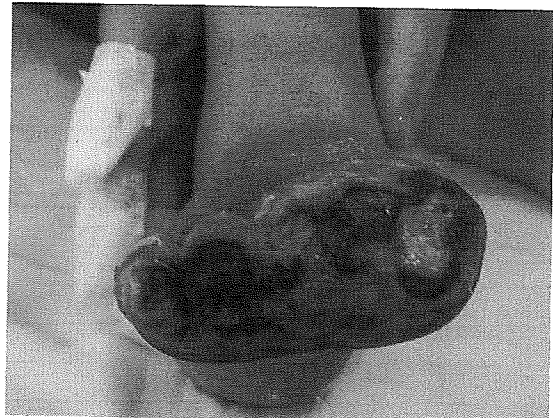
治療後

図1 バージャー病（症例1）

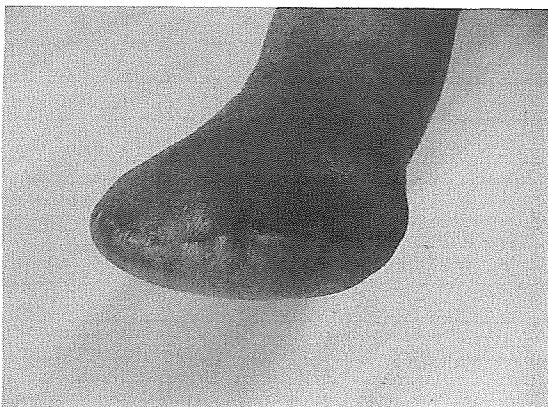
入院時



治療前



6ヶ月後



1年後

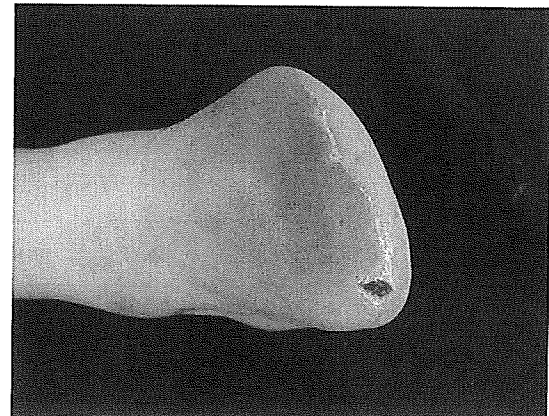


図2-1 結節性多発動脈炎（症例2）

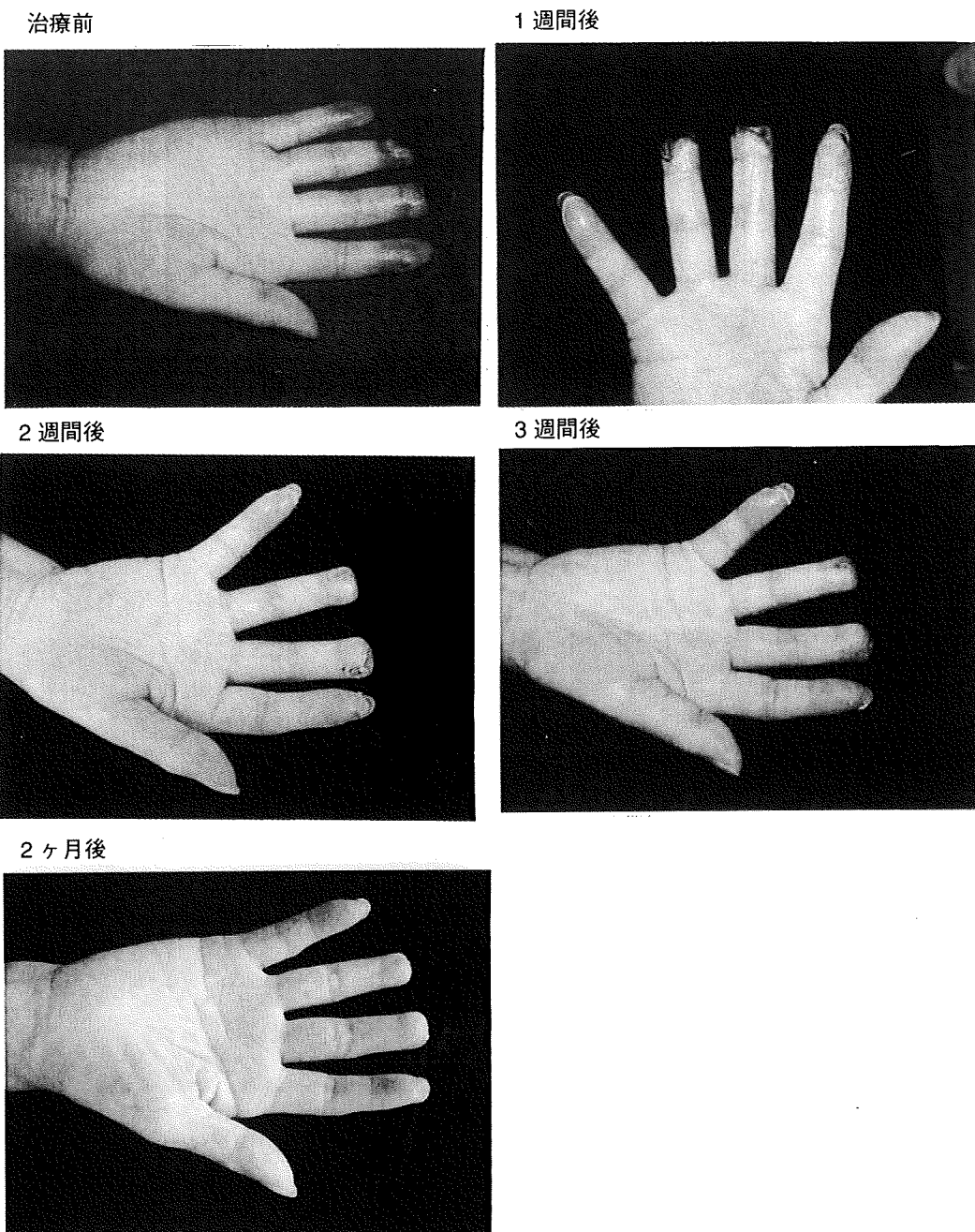


図2-2 結節性多発動脈炎（症例10）

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：図2、強皮症2例）で、従来の治療は、全く無効で、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、素晴らしい治療である。

治療前



1ヶ月後



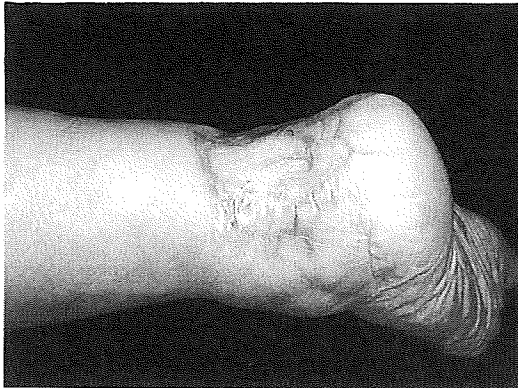
2ヶ月後



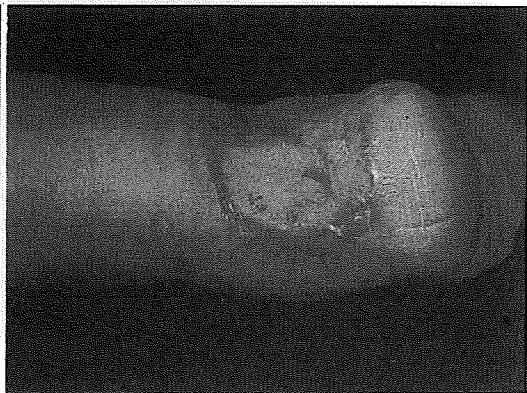
3ヶ月後



6ヶ月後



1年後



2年後



3年後

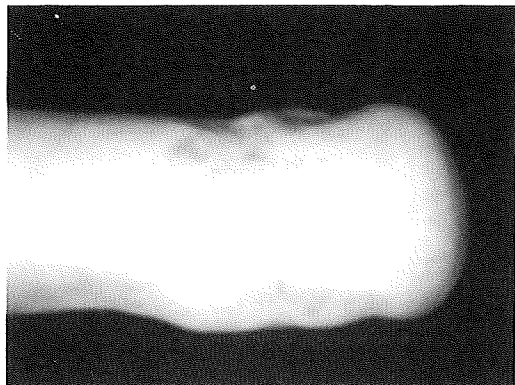
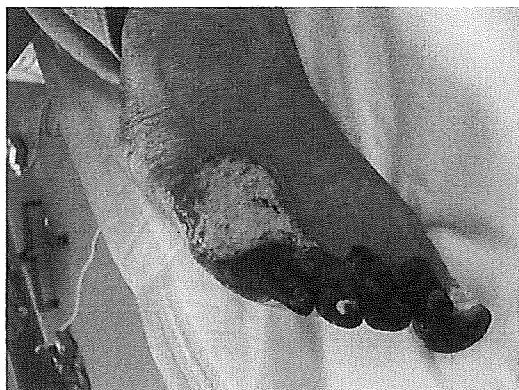
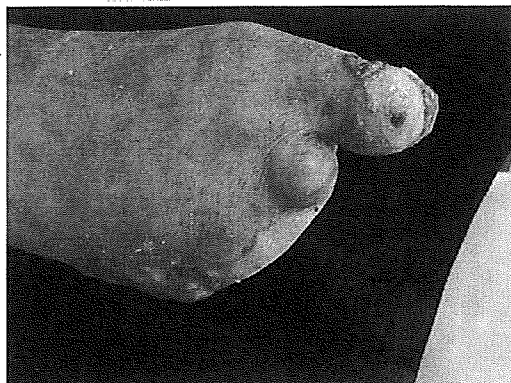


図3-1 強皮症（症例6，左下肢）

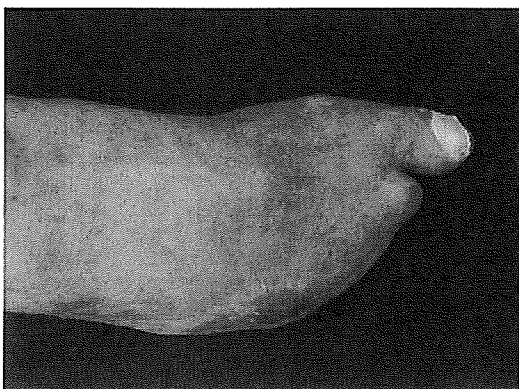
治療前



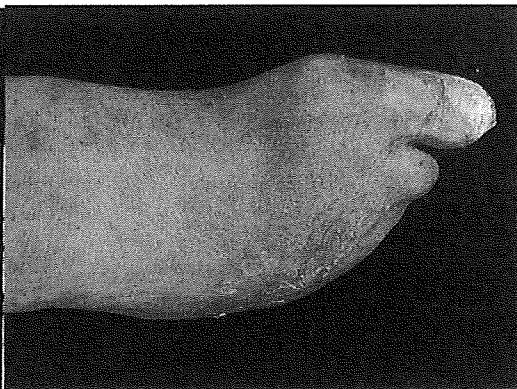
1ヶ月後



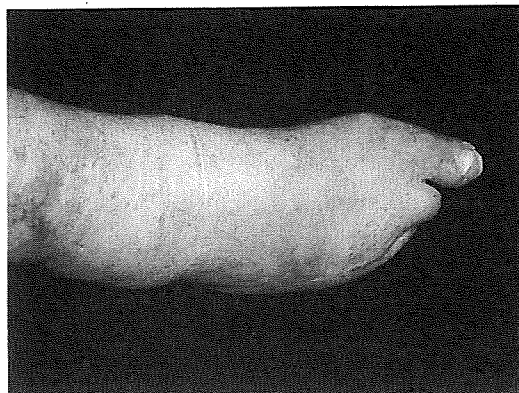
2ヶ月後



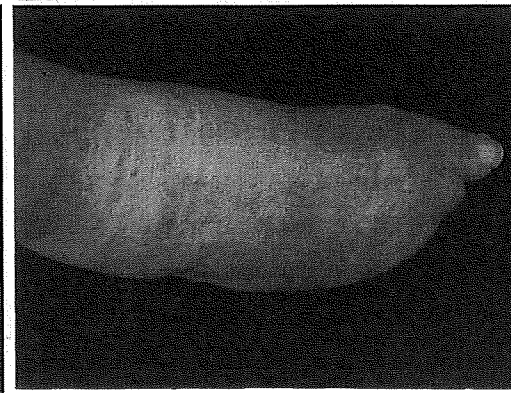
3ヶ月後



6ヶ月後



1年後



2年後



3年後

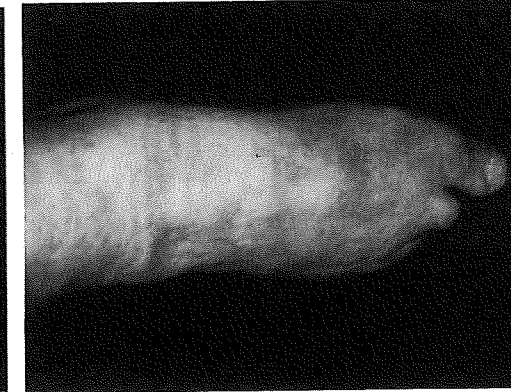


図3-2 強皮症（症例6，右下肢）

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。

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. Takahashi 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
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: 427-435, 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

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 堀江 卓
北榆会札幌北榆病院 外科

要 旨

難治性血管炎による潰瘍病変に対して、血管再生療法は明らかに長期間にわたり有効であった。G-CSFを用いて末梢血幹細胞を移植する方法を主に行ってきたが、同方法によると思われる副作用はなく、安全に施行できた。2回行った患者もいるが、いずれも効果があり、症状が増悪した際に繰り返し行う意味はある。運動療法や光線療法との併用も有効であった。特に近赤外線潰瘍への治療効果は明らかで、今後も検討したい。動物実験では、末梢血幹細胞も骨髄単核球も同等の血管再生治療効果が期待できた。慢性虚血モデルでは、筋注した細胞が長期にわたり生着、機能していた。

1. はじめに

当院では、平成13年以来、四肢の末梢血管障害の患者に末梢血幹細胞（PBSC）による血管再生治療を行ってきた¹⁻⁴⁾。当研究班で対象としたSLE、MCTDおよびバージャー病の患者の予後を調査したので報告する。

2. 症例の予後調査結果（表1）

症例1：48才女性。SLEによる潰瘍に対して右足に筋注した。29ヵ月後に右膝下、31ヵ月後に右大腿切断、さらに55ヵ月後に右大腿再切断をした。60ヵ月後にSLE脳症を発症、72ヵ月後、敗血症で死亡した。

症例2（図1）：25才女性。SLE、左手指潰瘍。左手に筋注、経過良好のため、右手にも4ヵ月後に治療。両側とも潰瘍は消失し、はじめの治療から61ヵ月後経過した。一時、肺高血圧となったが、それも改善した。

症例3：42才男性。SLE。両足に筋注。56ヵ月後潰瘍は消失するも、痛みやだるさはあり。

症例4（図2）：39才女性。SLE。両足に筋注。潰瘍は縮小、アキレス腱部の創も縮小し、

外来で壊疽となった臍を切除した。9ヵ月後に両足、臀部、左股関節部の潰瘍周囲に筋注するも、はじめの治療から53ヵ月後、両足に1～2cm大の潰瘍が3カ所残る。

症例5：59才女性。MCTDでステロイドの内服はなし。もともとはFontaine I度で両足に筋注。35ヵ月後、右第5趾に潰瘍が出現したため再度両足に治療した。その後、初めの治療から49ヵ月後潰瘍は消失したが、疼痛は軽度あり。

症例6（図3）：40才女性。SLE。両上肢に治療、左肘部潰瘍周囲は皮下注となったが、14ヵ月後肘部潰瘍は治癒した。20ヵ月後左3指切断、20.5ヵ月後肺高血圧、32ヵ月後SLE再燃するもパルス療法で改善、44ヵ月後右第2指に潰瘍あり、骨が露出している。

症例7（図4）：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ヵ月後、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ヵ月後（はじめの細胞治療から2ヵ月後）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ヵ月後、潰瘍、疼痛および感染はほぼ消失し、著効を示した。

症例8：61才男性。バージャー病。安静時疼痛あり、左足に治療した。51ヵ月後自殺した。右足切断予定だった。

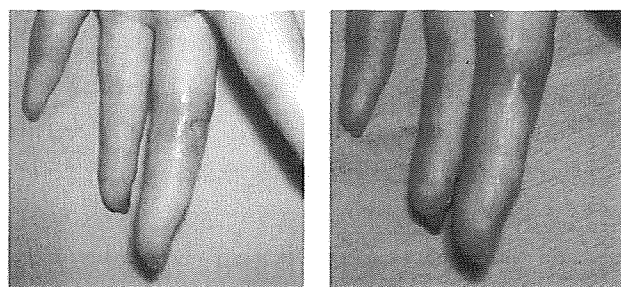
症例9：27才男性。バージャー病。右足潰瘍に対して治療した。29ヵ月後潰瘍は消失している。

症例10：72才男性。バージャー病。Fontaine I度で両足に行った。14ヵ月後運動療法とプロスタグランディンの内服で症状改善している。

症例11（図5）：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ヵ月後、潰瘍は消失、9ヵ月後、潰瘍は治っているが、体重をかけると痛む。

表1 難治性血管炎に対する血管新生療法（2009年11月現在）

症例	年齢	性	疾患名	Fontaine	CD34(+)	治療肢	効果	有害事象
1	48才	女	膠原病、SLE	4	2.3×10^7	右足	なし	なし
2	25才	女	膠原病、SLE	4	1.1×10^7 1.9×10^7	左手 右手	改善	なし
3	42才	男	膠原病、SLE	4	2.8×10^7	両足	改善	なし
4	39才	女	膠原病、SLE	4	2.5×10^7 1.6×10^7	両足 両足、他	改善	なし
5	59才	女	膠原病、MCTD	1	3.0×10^7 3.8×10^7	両足 両足	改善	なし
6	40才	女	膠原病、SLE	4	1.7×10^7	両手	不変	なし
7	53才	女	強皮症	4	1.6×10^7 G-CSF(-) 1.5×10^7 G-CSF(-)	両手、右足 両手、両足	改善	なし
8	61才	男	バージャー病	3	2.3×10^7	左足	不変	なし
9	27才	男	バージャー病	4	2.5×10^7	右足	改善	なし
10	72才	男	バージャー病	1	3.2×10^7	両足	改善	なし
11	29才	男	バージャー病	4	1.1×10^7	両足	改善	なし



治療前

2ヶ月後

図1 症例2 25才 女性 SLE

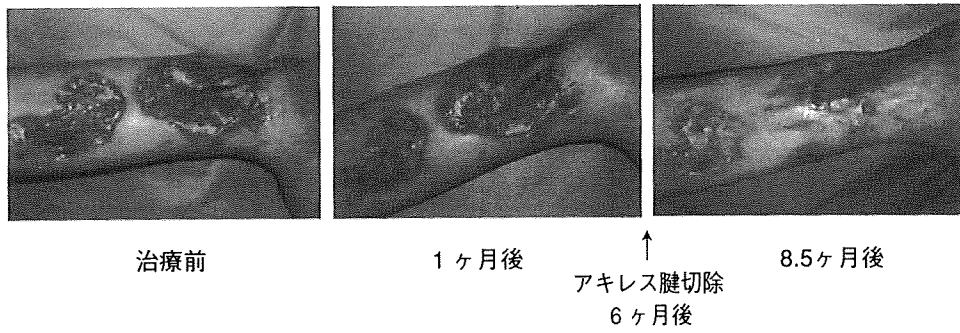


図2 症例4 39才 女性 SLE

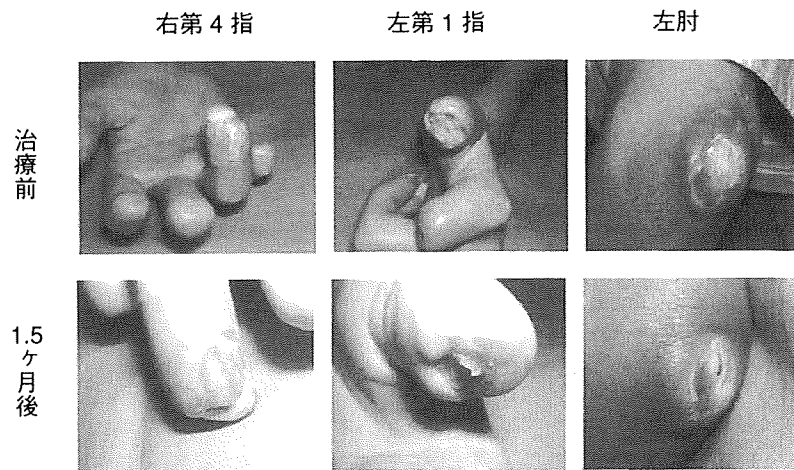


図3 症例6 40才 女性 SLE

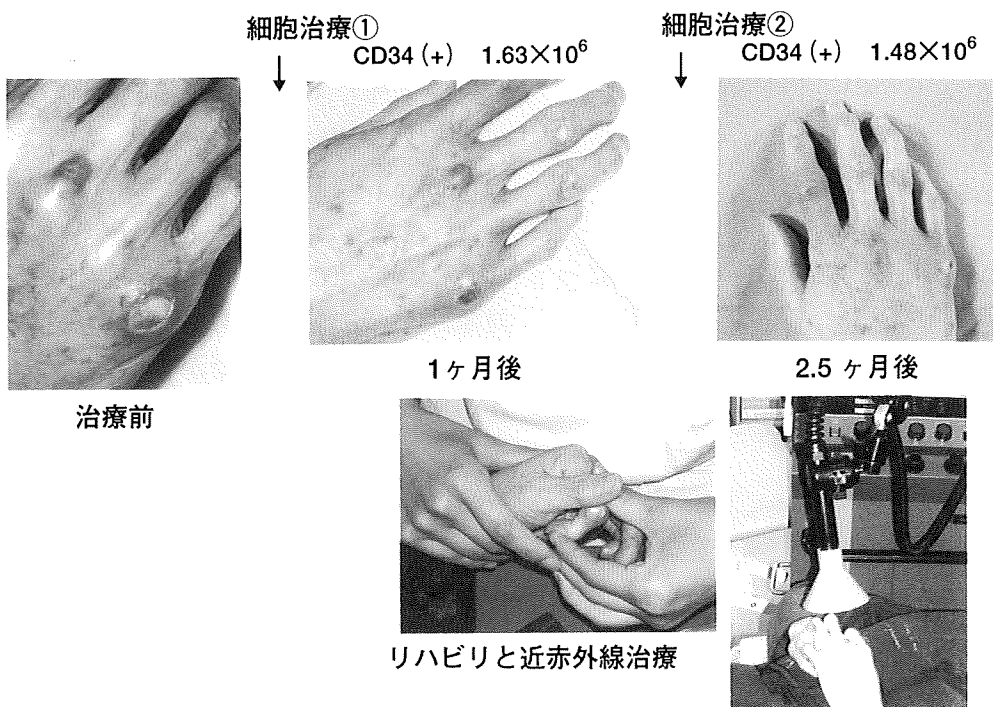
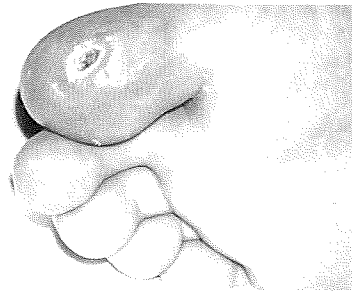


図1 症例7
53才 女性 強皮症

図4 症例7 53才 女性 強皮症



治療前



1ヶ月後



9ヶ月後

図5 症例11：29才 男性 バージャー病

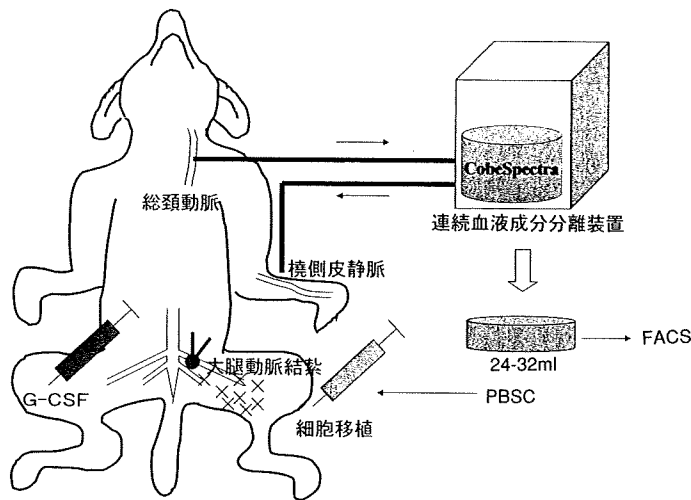


図6 急性虚血モデル実験

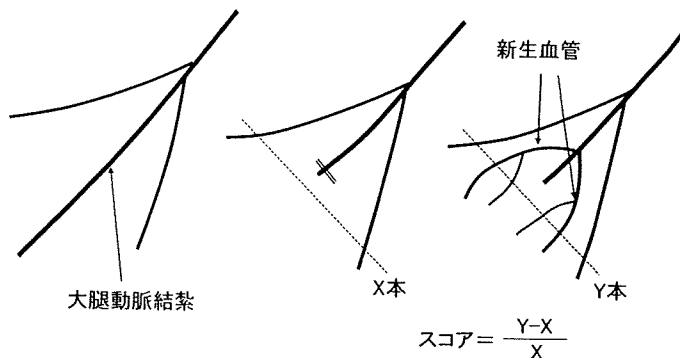


図7 血管造影による血管造成スコア

3. 考察

11例の難治性血管炎の患者にあわせて15回の再生治療を行った。内訳はSLEが5例、MCTD、強皮症が1例ずつ、バージャー病が4例で、男性5例、女性6例だった。観察期間は3ヵ月から72ヵ月で、平成21年度の新たな症例を除くと膠原病は短くても44ヵ月、バージャー病は14ヵ月と長期にわたった。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、長期成績は良好だった。2度行ったのはSLE 2例とMCTD、強皮症1例ずつのあわせて4例で、バージャー病はいずれも1回のみだった。2度行ってもそのいずれもが有効であった。したがって、増悪した場合、繰り返し行う意味はある。

1例を除く10例にG-CSFを投与した。対象が比較的若年であり、その長期安全性について検討したが、明らかな副作用はなかった。SLEの症例で肺高血圧となった例が2例あったが、パルス療法等で改善した。

運動療法や光線療法の併用は有用だった。とくに、近赤外線は患者の負担はなく、潰瘍病変を縮小治療させた。今後も積極的に使用する予定である。

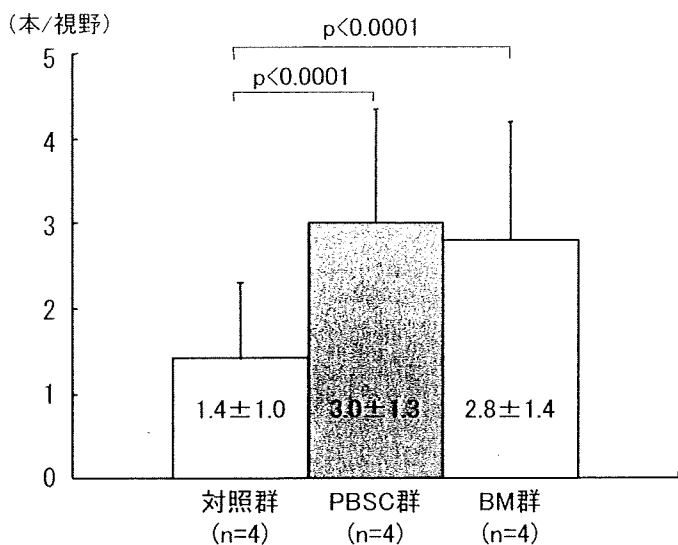
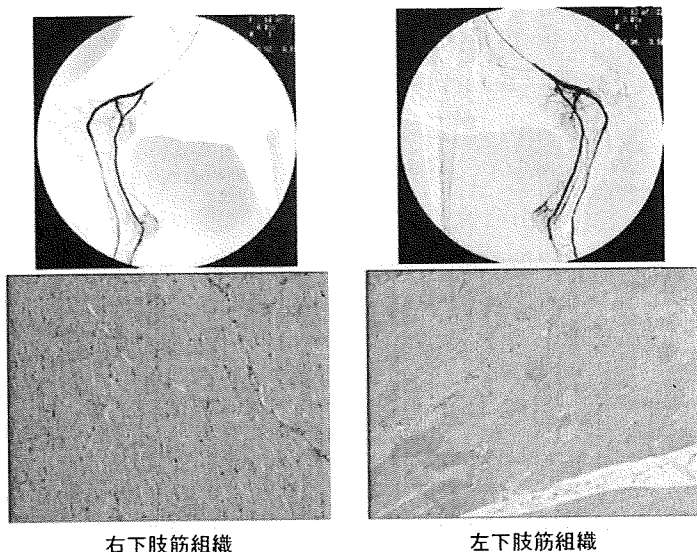


図8 毛細血管数



右下肢筋組織

左下肢筋組織

両側阻血後2ヶ月、右下肢PBSC移植後1ヶ月
左に軽度の虚血像

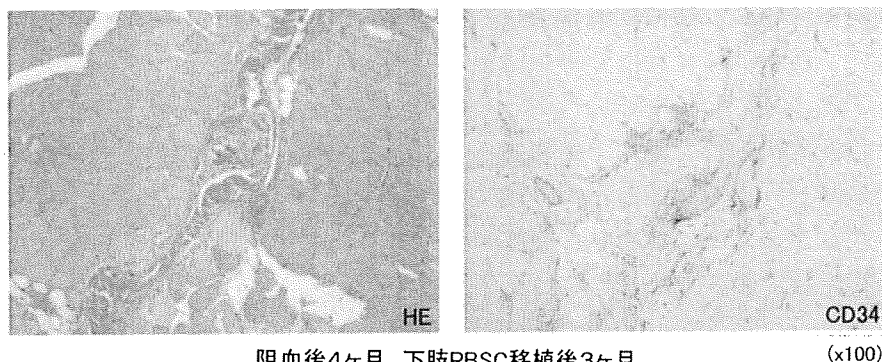
図9 両側スポンゼル虚血に対するPBSC移植-1

4. 実験的研究

犬の虚血肢を作成し、これにPBSCを筋注することで、血管新生が促されることを確認し、コントロールと比較検討した。さらに、PBSCと骨髄単核球の治療効果を比較した。

実験1. 急性虚血モデル：ビーグル犬（雌、体重8～10kg）の大腿動脈を結紮し、急性虚血肢モデルとした。G-CSF 2 μ g/kgを7日間皮下注後、7日目にPBSC採取を行った⁶⁾。使用器械は人と同じSpectraTM（自動血液採取装置）を用いた。総頸動脈より脱血し、前肢の皮静脈に返血した。フローサイトメトリーを用いて採取液中のCD34陽性細胞数を計測した。採取されたPBSCを内転筋や薄筋に筋注した（図6）。観察項目は、①血管造影、大腿動脈結紮直後と4週間後で、血管新生が出現しているか、血管造影スコアを用いて検討した（図7）。②内転筋ないし薄筋を生検し、組織学的に血管新生があるか評価した。4週間後の血管造影では、対照に比べ新生血管が多かったが、スコア化すると有意差はなかった。一方、組織学的には有意に一視野あたりの毛細血管数が多かった（図8）。

実験2. 骨髄単核球筋注群：同様のビーグル犬の大腿骨にヒト臨床で用いられる骨髓針を直接穿刺し、骨髓液を



阻血後4ヶ月、下肢PBSC移植後3ヶ月

血管が目立ち、その周囲にCD34陽性細胞が散在
細胞治療に基づく新生血管を疑う所見である

図10 両側スポンゼル虚血に対するPBSC移植-2

採取、Ficoll を用いた比重遠心法で単核球を分離した。フローサイトメトリーを用いて採取液注の CD34 陽性細胞数を計測した。次いで対側の大腿動脈を結紮し、分離された骨髓単核球を内転筋や薄筋に筋注した。4週間後、急性虚血モデルと同じ方法で評価した。イヌ骨髓細胞のうち骨髓単核球を分離した。CD34 陽性細胞数は PBSC 群と比較して有意差はなかった。急性虚血モデルで血管造影によるスコアでは、対照群、PBSC群のいずれとも有意差はなかった。また毛細血管数は対照群と比較して有意に多かったが、PBSC 群とは差がなかった (図8)。

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

実験3. 同様のビーグル犬に対してスポンゼルを動注し、慢性虚血モデルを作成した。11日後、さらに2ヵ月しても、壊死、炎症細胞浸潤、myoblast の増加といった虚血性変化があった。両側動注後、右下肢にのみ PBSC を筋注した結果、1ヵ月後の筋生検で右は虚血像はなく、左には虚血像が残っていた (図9)。さらに、3ヵ月後では血管がめだち、周囲に CD34 陽性細胞が散在、新生血管を支持する所見をみた (図10)。これは、虚血環境下で筋注した細胞が長期にわたり生着し、機能していることを示している。ヒト臨床で、一度の細胞治療で長期に有効な例を経験するが、それを説明する所見と考える。

5. 結 語

平成13年以来当院で経験した難治性血管炎11例について検討した。PBSC による血管再生治療は有効だった。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。動物実験では PBSC と骨髓単核球とを比較したが、効果に違いはなかった。また長期にわたり、筋注した細胞が生着、機能している所見を認めた。

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*

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） 研究報告書

難治性血管炎に対する血管再生療法の多施設共同研究

細胞移植による新たな血管新生療法の開発

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
バイオイメージング研究部 教授

研究協力者 柴 祐二、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】

細胞移植による、より治療効果の高い血管新生療法を開発するため、血球細胞に発現するケモカイン受容体である CXCR4 と 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 細胞に着目して研究を行った。まず、CXCR4 を利用した血管新生療法の開発では、培養により骨髄細胞の CXCR4 発現が有意に増強すること、この CXCR4 発現の増強された培養骨髄細胞は新鮮骨髄細胞と比較してマウス下肢虚血モデルにおける血流改善を有意に促進することを明らかとした。さらに、この血流改善機序として、虚血部位へと移植した骨髄細胞がそこで発現している SDF-1 (CXCR4 リガンド) と相互作用してより局所に留まりやすくなることと、CXCR4 高発現の骨髄細胞が IL-1 β や VEGF などの血管新生作用を有するサイトカインや増殖因子をより多く産生することを示した。一方、Th17 細胞における研究では、IL-17 ノックアウト (KO) マウスを用いて虚血モデルを作製し、IL-17-KO マウスでは、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ることを明らかとした。さらに、骨髄由来の IL-17 産生細胞が重要であること、Th17 細胞そのものが虚血後血管新生の促進作用を有することを明らかとした。今後、SDF-1/CXCR4 システムや Th17 細胞の血管新生における役割が解明されることにより、より効果の高い血管新生療法が開発されることが期待される。

【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 (Therapeutic 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パーリソン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的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。その研究の過程で、血管傷害後の新生内膜形成および心筋梗塞後の血管新生、心室リモデリングにおいて骨髄から動員される CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) 陽性細胞とそのリガンドであるケモカイン Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1: CXCL12) との相互作用、つまり SDF-1 / CXCR4 システムが重要な役割を果たしていることを見出した。一方、虚血部位には CD4 陽性リンパ球 (T細胞) の集簇が認められるが、その役割は不明であった。そこで、本研究では、第一部として、SDF-1 / CXCR4 システムを利用した新たな血管新生療法の開発を、第二部として、虚血後血管新生における新たに発見された CD4 陽性 T 細胞サブセットである Th17 細胞の役割について研究を行った。

第1部: SDF-1/CXCR4 システムを利用したより治療効果の高い血管新生療法の開発

1. 実験プロトコール

C57BL / 6 (♂、8-12週齢:野生型 [WT] マウスとして使用)、ヌードマウス (BALB/c-nu/nu mice:日本SLC)、CXCR4 ヘテロノックアウト (CXCR4^{fl}) マウス (京都大学再生医科学研究所・長澤丘司教授より供与) を用いた。

骨髄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、局所におけるサイトカイン/増殖因子の発現は免疫組織染色法や real-time RT-PCR法、ELISA 法にて解析した。

2. 培養による骨髄由来CXCR4発現増強

骨髄細胞上の CXCR4 発現がその血管新生能を増強する可能性があることから、まず骨髄細胞 CXCR4 発現に影響を与える因子のスクリーニングを行ったところ、37度で10%ウシ胎児血清 (FCS) / DMEMでの培養条件により CXCR4 発現が24-36時間にかけて有意に増強することを明らかとした (CXCR4 陽性率:24時間培養 80.1±5.8%、新鮮骨髄細胞2.1±0.9%) (図1A)。この発現増強作用は骨髄細胞に発現している他の分子 (CCR7、Gr-1、CD3、Mac-1、CD34、Sca-1、Flk-1) では認められず、CXCR4に特異的な作用であると考えられた (図1B)。また、この発現増強はGr-1 (顆粒球)、Mac-1 (単球・顆粒球)、CD3細胞 (リンパ球) 系のそれぞれの細胞で認められた (図1C、D)。そこで、新鮮骨髄細胞および24時間培養骨髄細胞をそれぞれ CXCR4^{Cl}と CXCR4^{Fr}として以下の検討を行った。

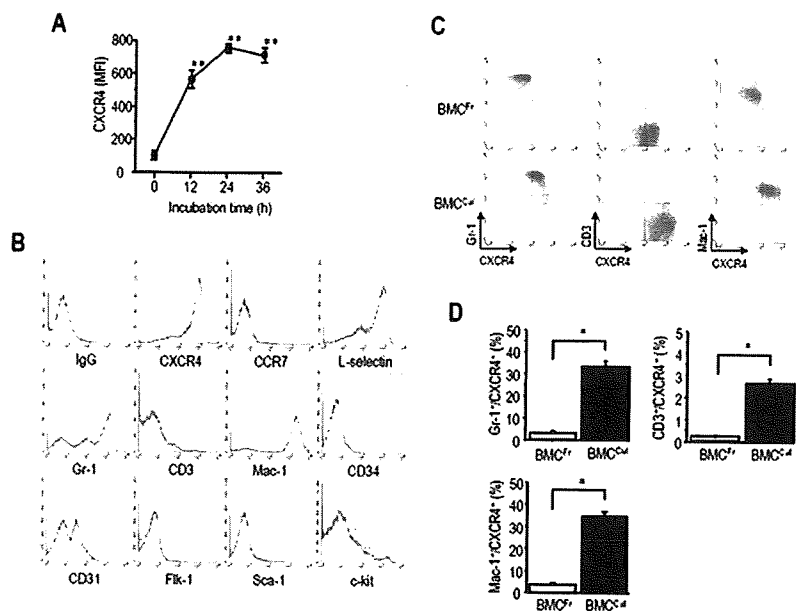


図1 培養による骨髄細胞におけるCXCR4発現への影響

3. マウス下肢虚血モデルにおけるCXCR4⁺骨髄細胞移植の効果

マウス下肢虚血モデルを作製して、以下の3群に分けて血流や血管新生について検討した。(1) Control (生理食塩水) 群、(2) CXCR4^{Fr}群 (WTマウス新鮮骨髄細胞) (3) CXCR4^{Cul}群

(WTマウス培養骨髄細胞)。CXCR4^{Cul}群では、Control およびCXCR4^{Fr}群に比較して血流の改善が有意に促進された (図 2 A,B)。また、CD31 およびVE-cadherin抗体を用いた免疫組織染色により、CXCR4^{Cul}群では他群に比較して毛細血管形成も有意に促進されていることがわかった (図 2 C,D)。

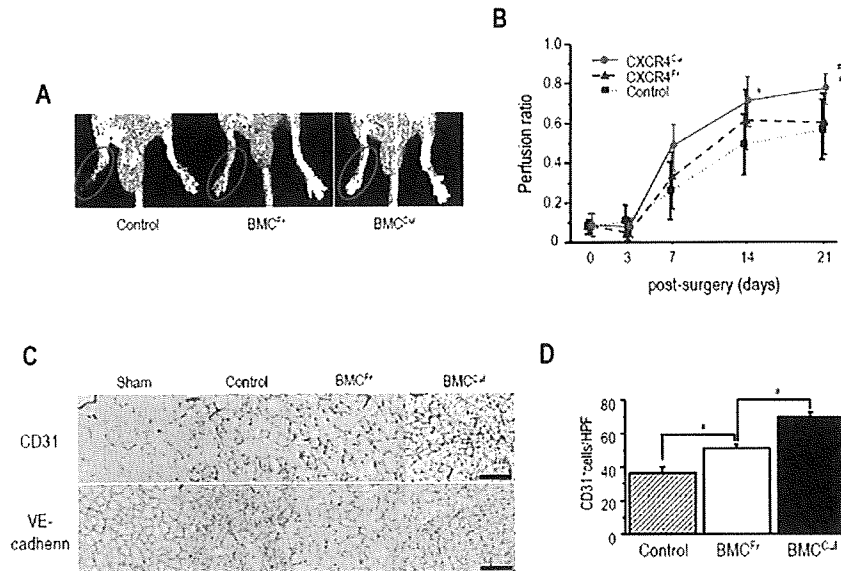


図2 CXCR4⁺骨髄細胞移植による虚血の改善と血管新生作用

この血流改善効果が骨髄細胞CXCR4発現に関わっているかを検討するため、CXCR4^{+/-}マウス (CXCR4^{-/-}マウスは胎生致死となる) の骨髄細胞を用いて検討したところ、wild-typeマウス由来CXCR4^{Cul}骨髄細胞移植群と比較して、CXCR4^{+/-}マウス由来CXCR4^{Cul}骨髄細胞移植群では、その血流改善効果が有意に低下していた (図 3)。

4. 移植骨髄細胞の虚血部位への停留

CXCR4^{Cul}骨髄細胞による血流改善促進効果の機序としては、以下の2つが考えられる。(1) CXCR4リガンドであるSDF-1は虚血により発現が亢進することから移植骨髄細胞が局所により長く留まり (停留) して血管新生作用を示す可能性と (2) CXCR4^{Cul}骨髄細胞がより多く

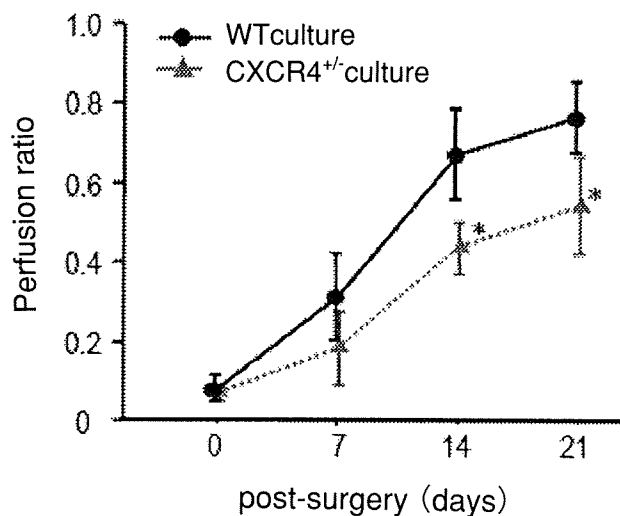


図3 CXCR4^{+/-}マウス由来骨髄細胞による虚血改善効果の減弱

のサイトカイン・増殖因子を産生する可能性である。

まず、マウス下肢虚血モデルにおいてSDF-1が発現しているかどうかを検討した。Real-time RT-PCR法および免疫組織染色法により、マウス虚血部位ではSDF-1の発現亢進が認められた (図4)。

さらに、移植骨髓細胞が停留しているかどうかを検討するため、GFPマウス由来CXCR4^{Cul}骨髓細胞を虚血部位へと移植し、1、3、21日目に移植部位の骨格筋を採取してコラゲナーゼ処理してGFP⁺細胞をフローサイトメトリー法で解析した。CXCR4^{Cul}群では、CXCR4^{Fr}群と比較して移植後1日目での移植骨髓細胞の有意な停留の増加を認めた (図5 A,B)。しかしながら、この増加は3~21日目において消失しており、特に移植21日目では移植骨髓細胞はほとんど認められなかった。

5. サイトカイン・増殖因子の関与

最後に、移植部位でのIL-1 β とVEGF-Aの発現をreal-time RT-PCR法で評価した。Sham群に比較して、Control群でもこれら因子の有意な発現亢進を認めた。CXCR4^{Fr}群ではIL-1 β の発現が増加傾向にあり、CXCR4^{Cul}群ではIL-1 β およびVEGF-AともSham群とCXCR4^{Fr}群に比較して増加していた (図6 A)。さらに、これら因子の産生細胞を明らかとするため、骨髓細胞を採取・培養してその発現を検討したところ、培養によりIL-1 β は3時間をピークとして、またVEGF-Aは6-48時間にかけて徐々に発現が増加していた (図6 B)。また、これらIL-1 β とVEGF-Aの発現はCXCR4^{+/+}マウス由来の骨髓細胞では低下していた。

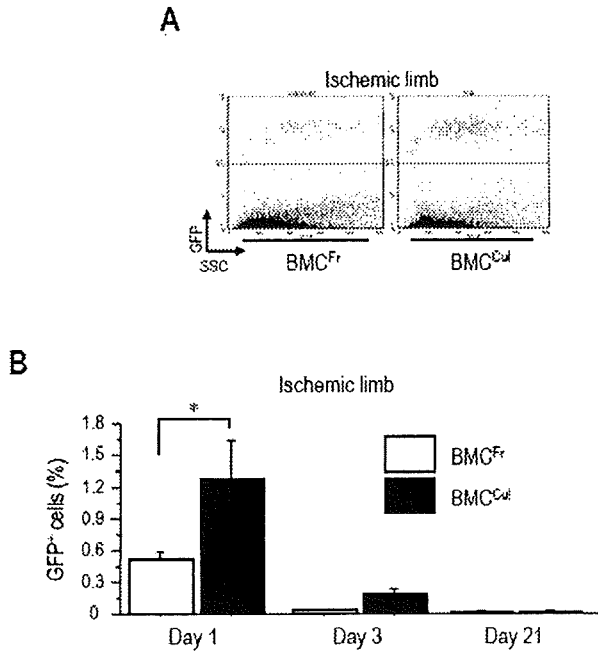


図4 虚血部位におけるSDF-1の発現

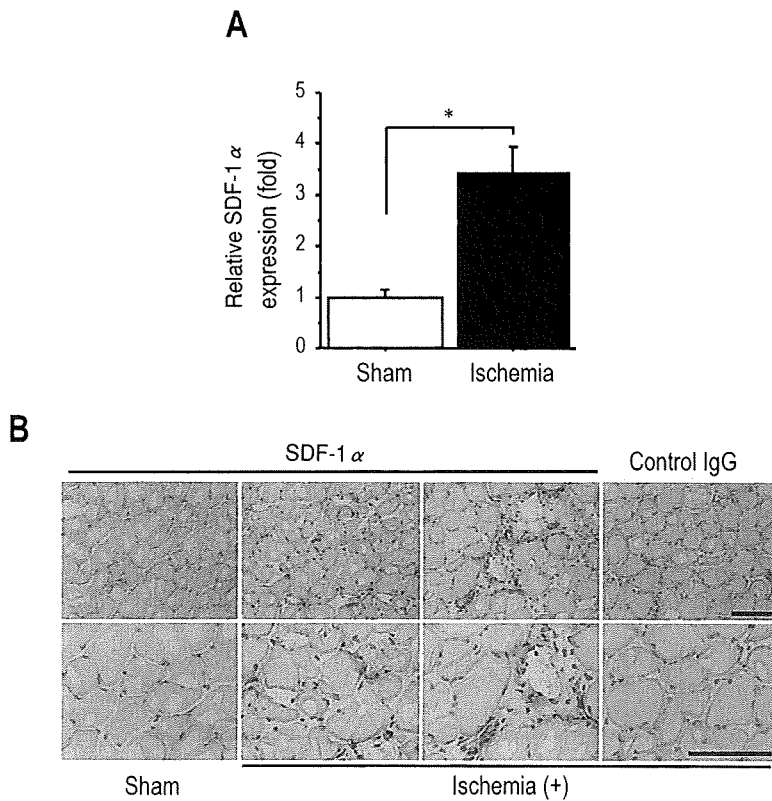


図5 移植骨髓細胞の虚血部位への停留

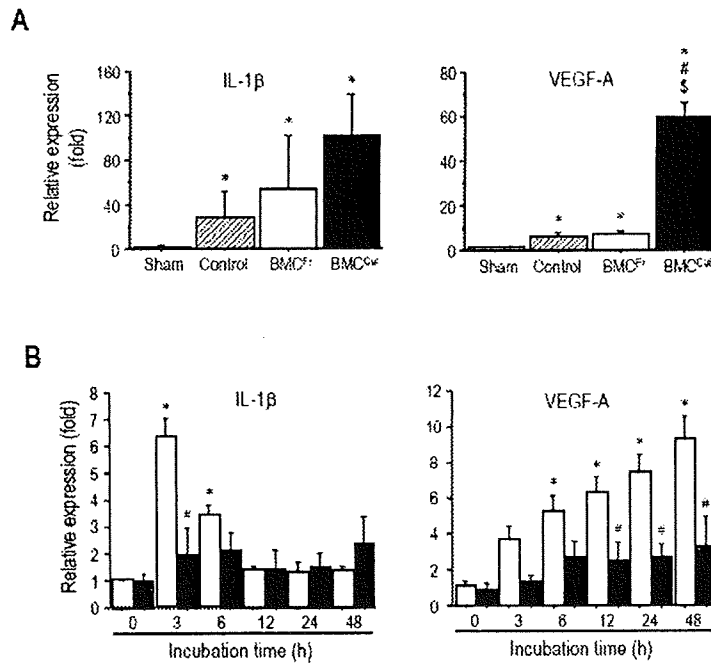


図6 骨髄細胞移植部位 (vivo) および培養骨髄細胞 (vitro) におけるIL-1 β とVEGF-Aの発現

第2部：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

【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:東京大学医学研究所・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7)。

また、血管内皮細胞のマーカーであるCD31抗体を用いて虚血組織における免疫組織染色を行ったところ、WTマウスに比較してIL-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8)。

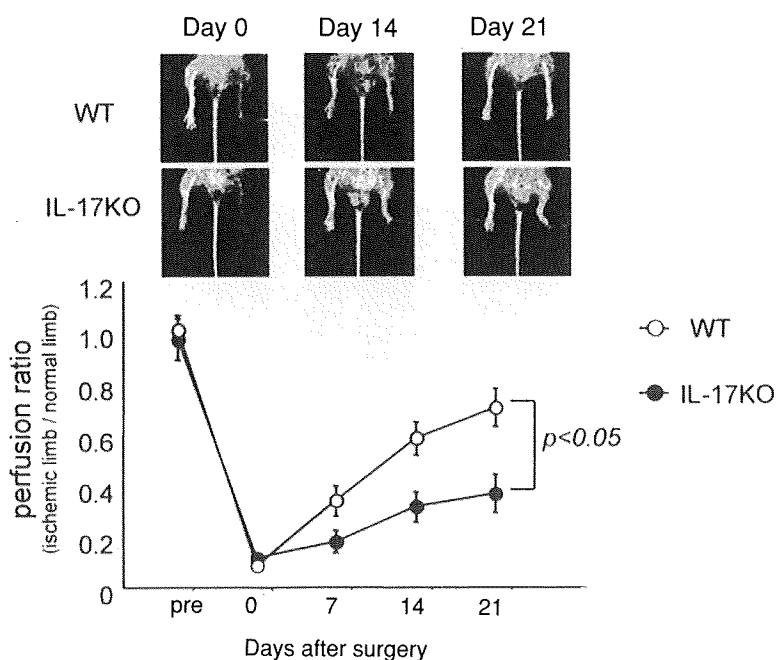


図7 IL-17KOマウスにおける虚血後血流回復への影響