

TACT (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation)

吉岡 徹¹ 高橋 将文¹ 笠井 宏樹⁴ 福井 大祐²
下平 滋隆³ 天野 純² 池田 宇一^{1,4}

要旨: 細胞移植による血管新生には、血管内皮前駆細胞の取り込みと増殖因子の分泌によるパラクリン効果が働いていることが明らかにされている。従来の治療法では効果のない末梢動脈疾患に対する自己骨髄単核細胞移植による血管新生療法は、多施設共同臨床試験 (TACT) により安全性と有効性が確認された。今後、細胞移植による血管新生療法をより有効な治療法とするために、移植細胞の種類や数、移植時期および作用機序に関する詳細な検討が必要である。

(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 161-165)

Key words: angiogenesis, bone marrow, endothelial progenitor cell, peripheral arterial disease, transplantation

はじめに

近年、わが国においても高齢化や食生活の欧米化、運動不足などに伴い、閉塞性動脈硬化症が増加してきている。本疾患の治療法として、まず食事、運動、禁煙などの生活習慣改善の指導や薬物治療が、また進行病変にはカテーテルを用いた血管形成術やバイパス手術が行われている。しかし、動脈硬化病変が重症でこれらの治療が無効あるいは不可能な症例も少なくない。さらに、閉塞性動脈硬化症においては、虚血肢の切断により安静時痛などを一時的に除去することはできるが、これに伴う運動機能低下が問題となり、重症虚血肢では再度切断が必要になることがしばしば認められる。また、同様の末梢動脈疾患であるBuerger病では、血栓性閉塞性病変がより末梢に存在するため、治療が困難となる場合が多い。このため、これらの疾患に対する新たな治療法の開発が求められていた。1997年の血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) の発見¹⁾がブレイクスルーとなり、その後、自己骨髄

細胞を用いた血管新生療法が臨床の場で試されて非常に良好な結果が報告された²⁾。まさに、この一連の研究成果はトランスレーショナルリサーチの代表といっても過言ではないと思われる。

細胞移植による血管新生療法とは

末梢血中に血管内皮細胞に分化し得る前駆細胞 (CD34⁺細胞分画) が存在することが1997年に報告された¹⁾。引き続き、末梢血、骨髄、臍帯血由来の単核細胞分画を虚血部位に移植すると、移植細胞が血管内皮細胞に分化し得ることが動物モデルで確認された³⁻⁵⁾。これらの報告により、成人における新生血管においても、EPCの取り込みという胎生期にみられるような血管発生型の血管新生が存在することが明らかとなった。また、血管新生のもう一つの機序として、骨髄の間葉系細胞や造血幹細胞が、血管新生を促すさまざまなサイトカインや増殖因子を分泌し、これらがパラクリン的に血管新生を誘導する可能性が示されている⁶⁻⁸⁾。実際、CD34⁻細胞は、CD34⁺細胞よりも多くの増殖因子を分泌することが明らかにされている⁹⁾。このことから、骨髄細胞移植による血管新生機序には、EPCの寄与と増殖因子などのパラクリン作用の2つの機序が想

¹信州大学大学院臓器発生制御医学循環病態学部門

²信州大学心臓血管外科

³信州大学輸血部

⁴信州大学循環器内科

2005年3月2日受理

定されている。

自己骨髄細胞移植の実際

現在、国内における多数の施設で自己骨髄細胞移植療法が行われているが、本稿ではわれわれの施設における方法について概説する。

(1) 適応と除外項目

重症の末梢動脈疾患(閉塞性動脈硬化症やBuerger病など)で、薬物療法が無効で血管形成術やバイパス手術が不可能な症例が適応となる。また、以下のような除外項目を設けている。

- ・骨髄採取の際の全身麻酔に耐えられないほど全身状態の悪化した患者。
- ・重度の糖尿病性網膜症(移植された骨髄細胞よりVEGFなどの血管増殖因子が分泌され、網膜症が悪化する可能性がある)。
- ・担癌患者(同様に血管増殖因子の分泌により、腫瘍の増大や転移を惹起する可能性がある)。
- ・治験の主旨を理解し、同意を取ることが不可能な患者(高度の痴呆など)。

(2) 方法

i) 術前検索および準備

問診、足関節/上肢血圧比(ankle brachial pressure index: ABI)、サーモグラフィー、経皮的酸素分圧(transcutaneous oxygen pressure: TcPO₂)、血管造影などで重症度を評価する。血管造影にて、カテーテル治療やバイパス手術による血管形成術が可能と判断した場合はそちらを優先する。また、各種の薬物療法で症状が改善するかどうか確認し、改善が認められた場合は薬物治療を継続して観察する。閉塞性動脈硬化症の患者は同時に冠動脈に病変を有する場合も多いので、ジピリダモール負荷心筋シンチグラフィで狭心症に対するスクリーニングを行う。もし、心筋シンチグラフィで陽性所見を得た場合は心臓カテーテル検査を行い、冠動脈病変に対する治療を優先して行う。以上により、自己骨髄細胞移植が可能と判断された場合、糖尿病性網膜症や悪性腫瘍の有無を検索する。また、全身麻酔の術前検索に準じて、肺機能検査や血液ガス分析などを行う。なお、骨髄採取時に使用する自己血400mLの採取、保存を、骨髄採取7日前までに完了しておく。

ii) 自己骨髄細胞移植

骨髄採取は、手術室で全身麻酔下に行う。腸骨より骨髄を約600mL採取する。この際、採取速度は500mL/30分を超えないようにする。採取開始後、自己血の輸血を開始する。採取した骨髄から比重遠心分離法によって単核細胞分画のみを単離する。単離された単核細胞分画は20mLの培養液(RPMI培地)に懸濁し、注射器(1mL, 26ゲージ針)40本に0.5mLずつ分注する。血管の走行や虚血部位を考慮して移植部位を決定し、マーキングする。その部位に単核細胞分画を筋注する(Fig. 1A)。ただし、手指への移植の場合は、容積が小さいため、半量の0.25mLとしている。

iii) 術後検査

治療前、1週後、2週後、1カ月後、6カ月後、1年後にABI、TcPO₂、サーモグラフィー(Fig. 1B, C)を施行して、細胞移植に伴う血流改善を評価する。下肢の痛みに関しては10段階スケールにより評価する。1カ月後に下肢血管造影(IADSA)を施行する。

TACT(Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation)研究

末梢動脈疾患患者に対して施行した自己骨髄細胞移植の治療結果は、TACT臨床研究として報告された²⁾。本研究では、関西医科大学、久留米大学、自治医科大学における末梢動脈疾患患者45症例を対象とした。はじめの25症例(Group A)は、本治療法の有効性と安全性を評価するため、重症虚血肢に骨髄細胞単核分画を移植し、より軽症である対側虚血肢に生理食塩水を注入した。後の22症例(Group B)は、両側に重症病変を有する患者群で、無作為二重盲検法にて選択した一側に骨髄単核細胞分画を、対側に末梢血単核細胞分画を移植した(骨髄採取時に末梢血は10%程度混入すること、末梢血単核細胞分画にはEPCが骨髄単核細胞分画の500分の1程度しか含まれないことより、コントロールとして生理食塩水よりも、末梢血単核細胞分画を用いた方が、より適していると考えた)。移植細胞数は、Group Aで0.7–2.7×10⁹個、Group Bで0.88–2.8×10⁹個であり、その中には、リンパ球69%、赤芽球8%、単球8%、顆粒球15%が含まれていた。EPCを含む分画とされるCD34⁺細胞は、主に血管新生因子bFGF(basic fibroblast growth factor)、VEGF(vascular endothelial growth



Figure 1 Autologous bone marrow cell transplantation. An ischemic limb underwent transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells (A) and was examined with thermography before (B) and after (C) the treatment. The left leg had amputated.
 ⇔: sites of transplantation

factor), Ang-1(angiopoietin-1)の受容体を発現しており, CD34⁺細胞は, 主に増殖因子自体を発現していることが明らかとなった。

ABIによる評価では, 骨髓単核細胞分画を移植した虚血肢は4週間の経過で, Group Aでは0.34から0.47に(Fig. 2A), Group Bでは0.37から0.46に(Fig. 2B)改善しており, Rutherfordの基準(ABI 0.1以上の改善を治療効果ありとする)で効果判定をすると, Group Aは25症例中17症例で, Group Bは20症例中13症例で効果ありと判定された。一方, Group Aの生理食塩水を注入した下肢においては, ABIに変化は認められず(Fig. 2A), Group Bの末梢血単核細胞分画を移植した虚血肢においては, わずか0.02だけABIが改善したにすぎなかった(Fig. 2B)。TcPO₂も同様の傾向を示した(Fig. 2)。Group Bでは, 骨髓単核細胞分画を移植した20虚血肢中16虚血肢で安静時痛が消失したのに対し, 末梢血単核細胞分画を移植した20虚血肢中17虚血肢で安静時痛が残存した。無疼痛歩行距離は, Group Aで約3分, Group Bで約1分延長した(Group Bで効果が少ないのは, 両側病変を有するにもかかわらず, 一側にしか骨髓単核細胞分画を移植していないためと考えられた)。このような症状や所見の改善は, 24週間のフォローアップ期間中維持された。虚血肢切断が回避されて救肢された症例は20症例中15例であった。また, 骨髓移植に伴う局所の炎症反応, 浮腫は出現せず, 移植細胞から骨への

分化や, 細胞移植部位における異常な線維化は認められなかった。なお, 2年間の経過の間に2症例が心筋梗塞により死亡したが, 本治療との関連は明らかでない。

TACT研究の結果より考えられる今後の展望

末梢動脈疾患への自己骨髓細胞移植による血管新生療法は, その有効性, 安全性が確立しつつある。しかし, 本治療の効果は, 個々の症例により異なることから, より効果の期待される病態や移植細胞の種類の詳細な検討が必要である。また, 本治療法は, 骨髓採取に全身麻酔を必要とするため, より低侵襲の治療法の開発が期待されるとともに, その機序についても, 今後詳しく検討する必要がある。

(1) 移植細胞

骨髓は末梢血と比べ, CD34⁺細胞を約100倍多く含むことから, 骨髓がEPCの供給源として末梢血以上に有用と考え, われわれは骨髓細胞を用いている。また, 前述したように, 細胞から分泌されるサイトカインや増殖因子によるパラクリン作用を期待して, 単核細胞分画全体を患部に注入している。われわれは, 末梢血由来の単核細胞分画であっても, VEGFやbFGFといった増殖因子を多量に産生する能力を持つことを報告したが, 実際に末梢血単核細胞分画を虚血下肢に移植し

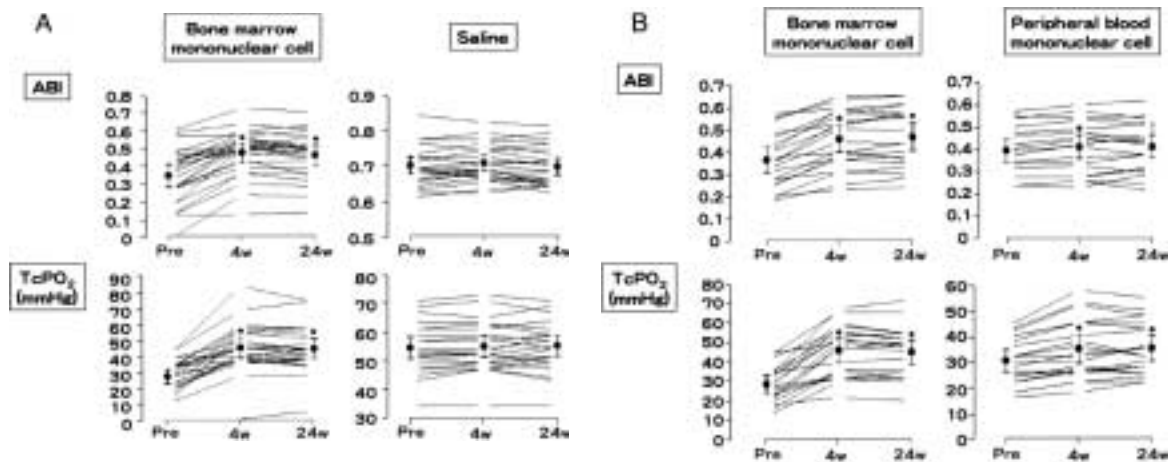


Figure 2 Results of TACT.

た場合には、TACTの結果と同様に、骨髄単核細胞分画と比べて、虚血改善に対する効果は弱かった¹⁰⁾。今後、より血管新生に適した細胞分画の同定、すなわち、より純粋な血管内皮前駆細胞分画や、増殖因子をより多く分泌する細胞分画について、至適移植細胞数や移植時期とともに、詳細な検討が必要である。

(2) 治療法の低侵襲化

現在行われている自己骨髄細胞移植治療は、全身麻酔下に骨髄を採取する必要があるため、侵襲が比較的大きい。そこで、薬剤やサイトカインを用いて、血管内皮前駆細胞の骨髄からの動員(mobilization)および虚血局所へのホーミング(homing)を誘導することにより、血管新生療法を行う可能性が検討されている^{11,12)}。

さらに、遺伝子治療と細胞治療の併用療法も治療の低侵襲化に有用となる可能性がある。すなわち、移植細胞にあらかじめVEGFなどの増殖因子遺伝子を導入してから移植するという方法である¹³⁾。動物実験レベルでは、有効性が証明されているが、これらの治療法を臨床で用いるには、遺伝子治療の十分な安全性の検証が必要である。

(3) 虚血性心疾患への応用

動脈硬化病変が重症で、従来の治療法が無効あるいは不可能な虚血性心疾患患者への応用も報告され始めている。この際重要なのは、移植細胞から骨などの異所性組織への分化は致死性不整脈を引き起こす可能性

があり、十分に検討されるべきである。また、細胞移植のアプローチ法(経カテーテル的、冠動脈バイパス術併用下など)の選択も重要な問題である。

(4) 機序の解明

近年、EPCの血管新生誘導機序が徐々に明らかにされつつある。Urbichら¹⁴⁾は、虚血部位に血管新生が起こるためには、EPCが細胞外マトリックスを分解して浸潤する必要があるため、そのためにはプロテアーゼであるcathepsin Lが必須であることを報告している。驚いたことに、成熟血管内皮細胞である臍帯静脈血由来血管内皮細胞(human umbilical vein-derived endothelial cell: HUVEC)にcathepsin Lを遺伝子導入した後に虚血部位に移植すると、血管新生能力を獲得することが示されている。今後、血管新生におけるおのおののステップ(EPCの骨髄からの動員、血管新生部位での接着、虚血領域への浸潤、内皮細胞への分化や生存、パラクリン作用など)での詳細な機序が明らかにされることにより、血管新生療法が飛躍的に前進することが期待される。

おわりに

細胞移植による血管新生療法は、自己の細胞を用いることから、免疫学的および倫理的問題が比較的少ない。本治療法に関する研究の発展によって、ほかに治療法のない多くの患者に福音となることが期待される。

文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964–967.
- 2) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002, **360**: 427–435.
- 3) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, **103**: 897–903.
- 4) Kalka C, Masuda H, Takahashi T et al: Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**: 3422–3427.
- 5) Murohara T, Ikeda H, Duan J et al: Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 2000, **105**: 1527–1536.
- 6) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS et al: Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, 2004, **109**: 1543–1549.
- 7) Takakura N, Watanabe T, Suenobu S et al: A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell*, 2000, **102**: 199–209.
- 8) Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J et al: Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34⁺ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*, 2001, **97**: 3075–3085.
- 9) Rutherford RB, Flanigan DP, Gupta SK et al: Suggested standards for reports dealing with lower extremity ischemia. *J Vasc Surg*, 1986, **4**: 80–94.
- 10) Matsui K, Murakami Y, Yoshioka T et al: Therapeutic angiogenesis by transplantation of autologous bone marrow and peripheral blood mononuclear cells in patients with peripheral arterial disease. *Internal Journal of Angiology*, 2003, **12**: 1–7.
- 11) Dimmeler S, Aicher A, Vasa M et al: HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*, 2001, **108**: 391–397.
- 12) Levadot J, Murasawa S, Kureishi Y et al: HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 2001, **108**: 399–405.
- 13) Wajuguro H, Yamaguchi J, Kalka C et al: Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, 2002, **105**: 732–738.
- 14) Urbich C, Heeschen C, Aicher A et al: Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nature Medicine*, 2005, **11**: 206–213.

TACT: Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation

Toru Yoshioka,¹ Masafumi Takahashi,¹ Hiroki Kasai,⁴ Daisuke Fukui,²
Shigetaka Shimodaira,³ Jun Amano,² and Uichi Ikeda^{1,4}

¹Department of Organ Regeneration, Institutes of Organ Transplants, Reconstructive Medicine and Tissue Engineering, Graduate School of Medicine, Shinshu University, Nagano, Japan

²Division of Cardiovascular Surgery, Shinshu University, Nagano, Japan

³Department of Transfusion, Shinshu University, Nagano, Japan

⁴Division of Cardiology, Shinshu University, Nagano, Japan

Key words: angiogenesis, bone marrow, endothelial progenitor cell, peripheral arterial disease, transplantation

Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells into ischemic limbs increases collateral vessel formation. TACT study demonstrated the efficacy and safety of this therapy in a clinical setting through the ability of marrow cells to supply endothelial progenitor cells and to secrete various angiogenic factors and cytokines. To determine the most suitable strategy of this novel cell-based therapy, further experimental and clinical studies are necessary such as investigating the optimal cell type and its number as well as verifying the precise mechanisms of this therapy.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2005, **45**: 161–165)