

骨髄単核細胞移植を用いた血管新生療法の作用機序と エリスロポエチンの臨床応用

加藤 公則¹ 鳥羽 健² 小田 雅人¹ 五十嵐 登¹
皆川 史郎¹ 磯田 学³ 相澤 義房¹

要 旨: 赤血球造血因子であるエリスロポエチンには、抗アポトーシス効果、血管新生効果、血管内皮前駆細胞の動員などの作用があることが知られている。しかし、その血管新生効果は思ったほど強力ではなく、むしろ骨髄単核細胞移植と併用することで得られる赤芽球の活性化を介した間接作用が重要であることを見いだした。骨髄単核細胞移植による血管新生の機序について概説し、エリスロポエチンを用いた血管新生治療について述べる。

(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 595-601)

Key words: angiogenesis, erythropoietin, erythroblast, bone marrow implantation

はじめに

腎性貧血の治療薬として用いられているエリスロポエチンには、ほかにも虚血反応性サイトカインとしての種々の生物活性があることが分かってきた。体内で産生されるエリスロポエチンの主体は肝(胎生期)および腎から分泌され、遠隔の骨髄に赤血球造血因子として作用する内分泌物質であるが、これとは別に局所の組織で分泌され近傍の細胞に生存因子として作用するオートクライン・パラクラインのシステムが存在し、特に中枢神経や心血管系組織(血管内皮細胞・血管平滑筋細胞・心筋細胞)で一定の役割を果たしている¹⁾。これを理解するために、まず細胞の運命(cell fate)と分化・増殖の関連および増殖因子と生存因子の関係について概説し、それを血管システムの維持と虚血に対する生体防御のシステムに外挿して考察を試みる。

細胞の運命(cell fate)

増殖因子の研究とその細胞学的な意味づけは、造血制御の分野において先行した。幹細胞の静止・増殖の

制御および分化の方向の選択は、細胞の位置する環境からの外圧によって開始されるものではなく、単一の現象を多数回観察することで初めてその確率分布が明らかとなるような統計学的な現象であり、1個の細胞においてはランダムな現象として観察される(stochastic theory)²⁾。骰子を振ってある目の出る(分化方向の決定)現象のみならず、骰子を振る行為(静止期から増殖期への移行)や賭けから降りる行為(増殖期から静止期への移行)そのものも一個々個の幹細胞においてはランダムな現象である。造血因子のもつ一般的な生物作用は、その受容体を有する細胞に対する生存因子としての効果であり、1個の細胞は造血因子受容体からのシグナルが途絶したときには細胞死へ向かう。種々雑多な定義によって仮想的に規定される多種の幹細胞における相互関連的なヒエラルキーの存在およびあり方については、再生医学における基礎研究の要点の一つとして活発な議論が行われているが、少なくとも造血幹細胞は静止期から増殖期に移行したあとは赤血球や好中球などの成熟した血球に分化するまでの間に静止期をもたない。いったん増殖期に移行した造血幹細胞は増殖と分化を同時並行的に行い、一個々個の細胞は各成熟段階においてランダムに決定された分化方向と対

¹新潟大学教育研究院医歯学系循環器学分野

²新潟大学教育研究院医歯学系血液学分野

³新潟大学教育研究院医歯学系呼吸循環外科学分野

2006年1月5日受理

応するような複数の造血因子受容体をセットで発現する。仮に肺炎局所から分泌されるG-CSF (granulocyte colony stimulating factor) などの造血因子が血流を介して骨髄に到達すれば、その因子の造血環境における濃度が上昇することでG-CSF受容体を発現し活発に増殖する能力をもっている細胞の生存効率が増加し、結果として成熟好中球の増加が起こる。同様に貧血や血液酸素分圧の低下に呼応して腎からのエリスロポエチン分泌が亢進すれば、骨髄においてエリスロポエチン受容体を発現している赤血球系前駆細胞や未熟な赤芽球の生存が高まり、赤血球造血の亢進が観察される。腎機能の廃絶した患者では腎からのエリスロポエチン・サージが起こらないため、骨髄における反応性の赤芽球造血亢進が起こらず徐々に貧血が進行するが、骨髄内因性のエリスロポエチンがあるため赤芽球無形性にはならない。実際、エリスロポエチン製剤を使用している患者では稀に抗体が出現することがあり、内因性のエリスロポエチンまでも中和してしまうため二次性赤芽球癆(骨髄における赤芽球無形性)を合併する例があり、エリスロポエチンの生物活性の本態が未熟な赤血球系細胞の生存に必須の因子であることが分かる。このように増殖期の細胞に作用する生存因子の最終的な生物活性は増殖因子として観察される。血管内皮細胞の主たる生存因子はVEGF (vascular endothelial growth factor) であり、恒常的に組織で産生されている微量のVEGFが血管内皮細胞の生存を保証していると考えられる。血管内皮細胞に発現しているエリスロポエチン受容体からのシグナルは生存に必須ではなく、おそらくは冗長性の一つとして説明しうが、虚血環境下では一定の役割を担っていると推測される。先に述べた骨髄内因性のエリスロポエチンの少なくとも一部は幼若な赤血球系前駆細胞から分泌されており、内分泌的エリスロポエチンとは異なるオートクライン・パラクライン的なエリスロポエチン・エリスロポエチン受容体システムの実例として挙げるができる³⁾。このようなシステムは骨髄以外にも血管の分布する臓器であれば、すなわち軟骨以外のほとんどの臓器において存在し、虚血に対する反応の一部として副次的な役割を分担している可能性がある。

血管再生治療の臨床

次に血管再生治療の臨床について触れる。当初はVEGF

等を用いた蛋白治療や遺伝子治療が行われたが、実際の効果に関しては大規模二重盲検試験で否定的なものが多い⁴⁾。いわゆる血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell: EPC) の発見を契機に⁵⁾、EPCの供給源として骨髄単核細胞を利用した骨髄細胞移植 (bone marrow implantation: BMI) が考案され一定の成績をあげたが⁶⁾、後で述べるとおり骨髄細胞はEPCの供給源として血管新生に寄与するというよりも、血管増殖因子を豊富に分泌する骨髄細胞を異所性かつ一過性に虚血部位に導入することで血管新生を来すと推測される。

造血管腫瘍や他の抗癌剤感受性固形腫瘍の治療として行われている自己末梢血幹細胞移植では、G-CSFの投与によって骨髄から末梢血へ動員された幹細胞を採取して用いられるが、この際にEPCも同時に動員されることを期待したG-CSF投与による血管再生治療という考え方がある。EPCに言及した研究発表の多くは、CD34陽性細胞と体外で増殖した結果としての血管内皮細胞の量を関連づけることで計量していることが多い。この場合には、CD34陽性である成熟血管内皮細胞が同じ培養条件で増殖しうることを除外しているわけではなく、「前駆細胞」という単語の有する概念を十分に意識したうえでEPCという表現を用いているかどうか疑問がある。成熟血管内皮細胞とは異なる細胞であり、比較的に未熟な性質を示し、ある条件において増殖と分化を行い成熟した血管内皮細胞になった場合に、培養開始前の細胞をEPCとするのが適切であり、したがってEPCの数を測定するためにはサンプルから成熟血管内皮細胞を取り除いたうえでsingle cell cultureを行い、血管内皮細胞の集団を形成したもとのsingle cellの数を測定しなくてはならない。概念的な空想とは異なり、実際の血管新生に占めるEPCの役割はかなり小さく見積もられており、既存の血管の成長・伸張が主体をなす。増殖能力をもたない好中球や赤血球の場合とは異なり、血管組織を構成する細胞は成熟してもなお増殖能力を保存するため、通常の血管新生においてはEPCの必要はあまりなさそうである。G-CSFの投与が臓器虚血に対して治療効果を有することは確かと思われるが、その作用機序はEPCの動員ではなく、G-CSF受容体を発現する心血管系細胞に直接作用して効果を示す抗アポトーシス効果であるとされている⁷⁾。もしそうであれば、末梢血中のCD34陽性細胞数を測定することの意味がますます不明となる。

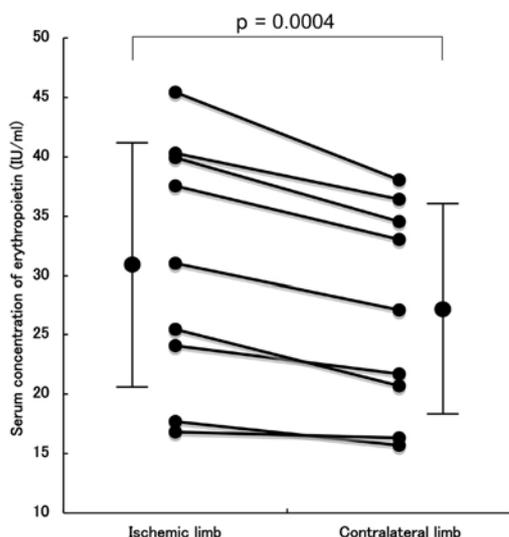


Figure 1 Serum erythropoietin levels in femoral veins obtained from patients with limb ischemia.

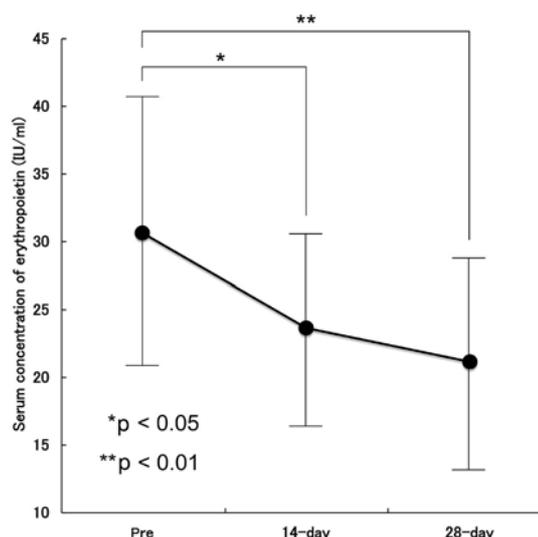


Figure 2 Time course of erythropoietin levels in femoral veins of ischemic limb after bone marrow implantation.

G-CSFは炎症性サイトカインの一つであり、その本来の作用として成熟好中球を活性化するため、虚血部位に浸潤した好中球を介した炎症反応を亢進させると思われる。肺炎などの細菌感染症においては有利な反応であるが、動脈硬化症を基盤として発症した心筋梗塞では不安定プラークの破綻を惹起することがないか懸念される。G-CSF治療患者の一部でみられた冠動脈の再狭窄・心筋梗塞の発症は⁹⁾、好中球活性化によるものである可能性がある。これに対しVEGFと同様にHIF-1の下流に位置するサイトカインの一つであるエリスロポエチンにはこのような白血球活性化の作用はなく、むしろ生物学的作用としては抗炎症の方向に向いているような印象がある⁹⁾。とはいえ、エリスロポエチンそれ自身が血管内皮に発現している受容体を介して示す直接作用としての血管新生作用は、後に述べるとおり*in vivo*でも*in vitro*でも思いの外に小さい。

エリスロポエチンの血中濃度

当施設で下肢の虚血性疾患に対して骨髄細胞移植治療を施行した患者において、両側の大腿骨静脈から採血したサンプルの血管新生因子の血中濃度を検討した。虚血下肢の大腿静脈血中エリスロポエチン濃度は、対側虚血の程度が軽いもしくはほぼ健康な下肢)のエリスロポエチン濃度に比べて有意差をもって高い

(Fig. 1)。虚血下肢に対する骨髄単核細胞移植を施行後は、エリスロポエチン濃度が減少する(Fig. 2)。VEGFやbFGF(basic fibroblast growth factor)等の他のサイトカイン濃度を同時に測定しているが、エリスロポエチン濃度以外ではこのような意味のある結果は得られなかった。下肢虚血の程度とエリスロポエチン濃度の間に負の因果関係があることを示唆する結果であるが、機序については不明である。HIF-1に反応して虚血局所で亢進したエリスロポエチン産生を反映するものだろうか。

エリスロポエチンの血管新生作用

エリスロポエチンによる血管新生効果を論じたいいくつかの論文がある¹⁾。ヒト心筋組織の小切片をシャーレ上で培養し、シャーレ表面に接着しつつ組織周辺に伸展する血管を定量した実験系ではエリスロポエチンとVEGFの血管新生効果がほぼ同等であったとしている¹⁰⁾。クルードな実験系であるため、エリスロポエチンによる血管内皮への直接作用なのか、心筋細胞などの他の細胞に作用して間接的に血管新生物質の分泌を誘導したのかは不明である。心筋梗塞の動物モデルで、エリスロポエチンの投与により梗塞範囲が約30%縮小したという報告については、エリスロポエチンによる直接あるいは間接の血管新生効果のほかに、エリスロポエ

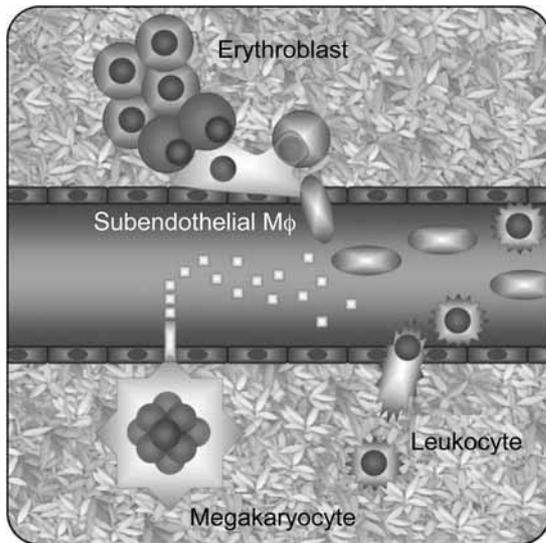


Figure 3 A scheme of matured blood cell mobilization from bone marrow to peripheral blood. White cells migrate into sinus, while platelets are segregated from cell surface projections of megakaryocytes. Since erythroblasts do not migrate, they form a packed "erythroblast island" and invite new vessels. Terminally differentiated nucleated red blood cells passively lose their nucleus and are transferred into sinus with the assistance of subendothelial macrophages.

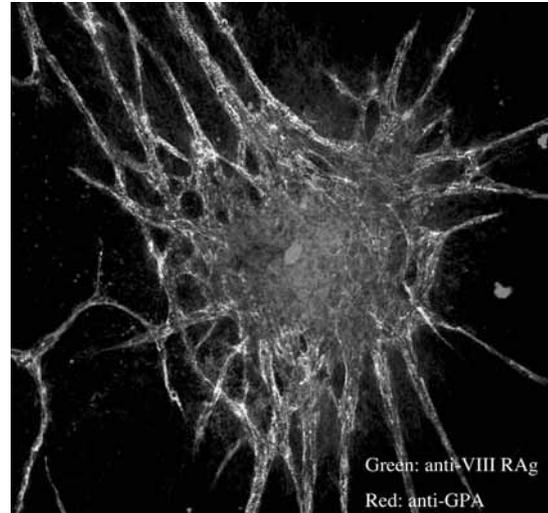


Figure 4 Capillary network formation observed in an *ex vivo* angiogenesis culture. Dens capillary networks were observed around a erythroid colony induced from human hematopoietic stem cells. The capillary network formation was consolidated in the presence of erythropoietin.

チンの生存因子としての効果(細胞死からの回避)も重要な作用として考慮される¹¹⁾。またこの報告では急性期効果以外の作用として、心筋梗塞作製の3週間後に初めてエリスロポエチンを投与した治療モデルも観察しているが、これでは梗塞範囲の縮小効果を認めず、血管新生効果によってその後の心機能が改善することを観察しており、心臓のリモデリングにエリスロポエチンが効果的に作用する可能性を示唆している。この効果は心不全治療にエリスロポエチンが有用であるという根拠につながる。

一方では、急性心筋梗塞患者の血中でVEGFとエリスロポエチンの上昇が認められ¹²⁾、心筋の虚血に対する生体防御にエリスロポエチンが一定の役割を担っていることが推測される。糖尿病性網膜症では、硝子体中の血管新生にエリスロポエチンが強く関わっているという報告もある¹³⁾。

骨髄における赤芽球の造血

赤芽球はVEGFやPLGF(placental growth factor)の産生を介して骨髄における血管の恒常的な再構築に重要な

役割を果たしている¹⁴⁾。骨髄で幹細胞から分化成熟した血液細胞は、血管内皮を通過して末梢血中へ移動する(Fig. 3)。このうち赤芽球は遊走能を持たないため、1個の前駆細胞に由来する大きな赤芽球島を形成する。終末分化しヘモグロビン合成を終えた赤芽球は、血管内皮下マクロファージによって細胞核を貪食されるとともに受動的に血管腔内へ移動させられる。赤芽球島それ自体が既存の血管へ向かって移動することはできないので、VEGFやPLGFなどの血管新生因子を分泌し、赤芽球島を中心とした血管新生因子の強い濃度勾配を形成することで新生血管を誘致すると推測される。

*ex vivo*で再現した赤芽球による 新生血管の誘導

健康人から採取した骨髄細胞を赤芽球とそれ以外の細胞に分離して血管新生因子の分泌量を測定したところ、VEGFは赤芽球によって最も強く分泌されており、PLGFは赤芽球によって特異的に分泌されることが分かった。また、ヒト造血幹細胞をセミソリッドの条

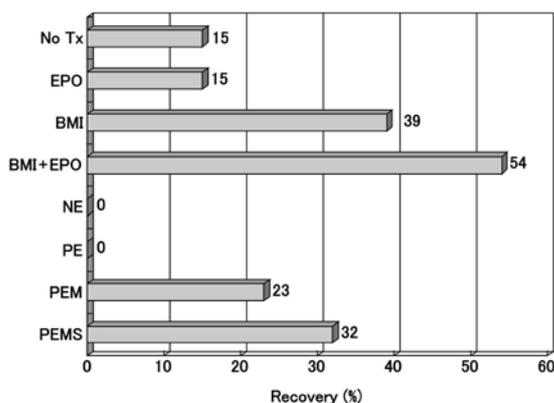


Figure 5 Recovery from cyanosis of mouse ischemic limbs after bone marrow cell implantation. Erythropoietin administration alone (group EPO) failed to rescue ischemic limbs, while simultaneous administration of erythropoietin supported the effect of bone marrow implantation (BMI). Both the erythroid-depleted bone marrow cells (NE) and purified erythroid cells (PE) failed to rescue limbs, however simultaneous implantation of erythroid cells with bone marrow CD14-positive cells recovered the angiogenic effects (PEM). Further addition of CD34-positive bone marrow cells with erythroblasts and macrophages (PEMS) expressed small cumulative effect.

件で培養して得られた赤芽球コロニーをHUVEC (human umbilical vein endothelial cells)の培養系に加えただと、コロニーを中心とした密な血管ネットワークの形成が観察された(Fig. 4)⁵⁾。この赤芽球集団による血管ネットワークの形成は、培養系にエリスロポエチンを添加することで強く増強された。骨髄において増殖・分化を行う未熟な血液細胞にとっては、骨髄外の組織や体外での培養系は生存に適した環境ではなく、細胞の寿命が著しく短縮するが、このうち赤芽球についてはエリスロポエチンの存在下で生存が延長するため、血管新生がより強く誘導されるのであろう。

マウスの下肢虚血モデル

下肢虚血マウスを作製し、骨髄細胞移植とエリスロポエチンの局所投与による*in vivo*血管新生実験を行った。すべての個体で24時間以内に下肢のチアノーゼが出現し、チアノーゼから回復しない下肢は壊死に陥る。28日目での下肢の回復率(Fig. 5)では、エリスロポエチン単独の効果はなく、併用によって骨髄細胞移植の効果を増強している。赤芽球のみを除いた骨髄細胞

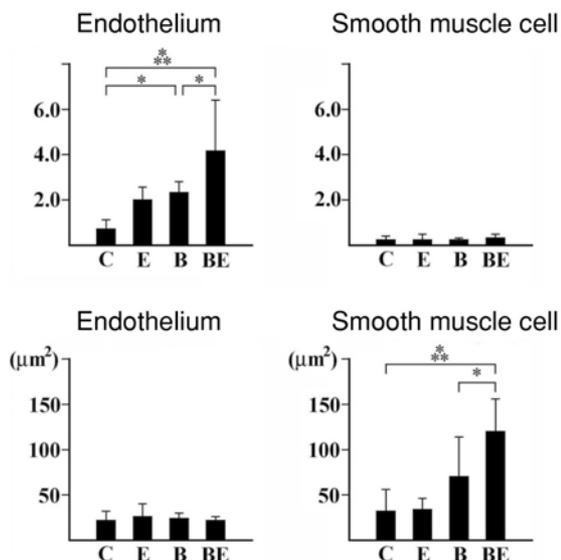


Figure 6 Histological analysis blood vessels in the ischemic biceps muscles at 6 days of arterial ligation.

A: Number of vessels

B: Mean area of vessels

Groups C, E, B, and BE: injected with control medium, erythropoietin (2,400 IU/kg), bone marrow cells (1×10^7), and both, respectively.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

を移植すると効果が消失することから、血管新生に赤芽球が必須であることと、骨髄中に含まれる幹細胞のみでは有効な血管新生が起こらないことが同時に分かる。精製した赤芽球のみを移植しても効果がないことから、赤芽球以外のアクセサリー細胞との協調が必要であることが分かるが、それはCD14陽性のマクロファージであった。精製した赤芽球とマクロファージにCD34陽性細胞を加えると、有効率の上昇が観察されたが、これはEPCとして作用するのではなく、やはりCD34陽性細胞による血管新生因子の分泌に起因すると考えている。これらの観察は、骨髄における恒常的な血管の再構築のシステムをよく再現している。やはり血管新生の主役を演じる赤芽球が異所性の環境で生存するのをエリスロポエチンがサポートしている。

虚血作製の6日後の下肢大腿筋で組織学的に観察される新生血管を画像解析によって定量した(Fig. 6)。エリスロポエチンの単独投与によって、動脈の発達を伴わない毛細血管数の増加が観察されたが、このような血管は28日目までに廃用萎縮によって消失すると推測

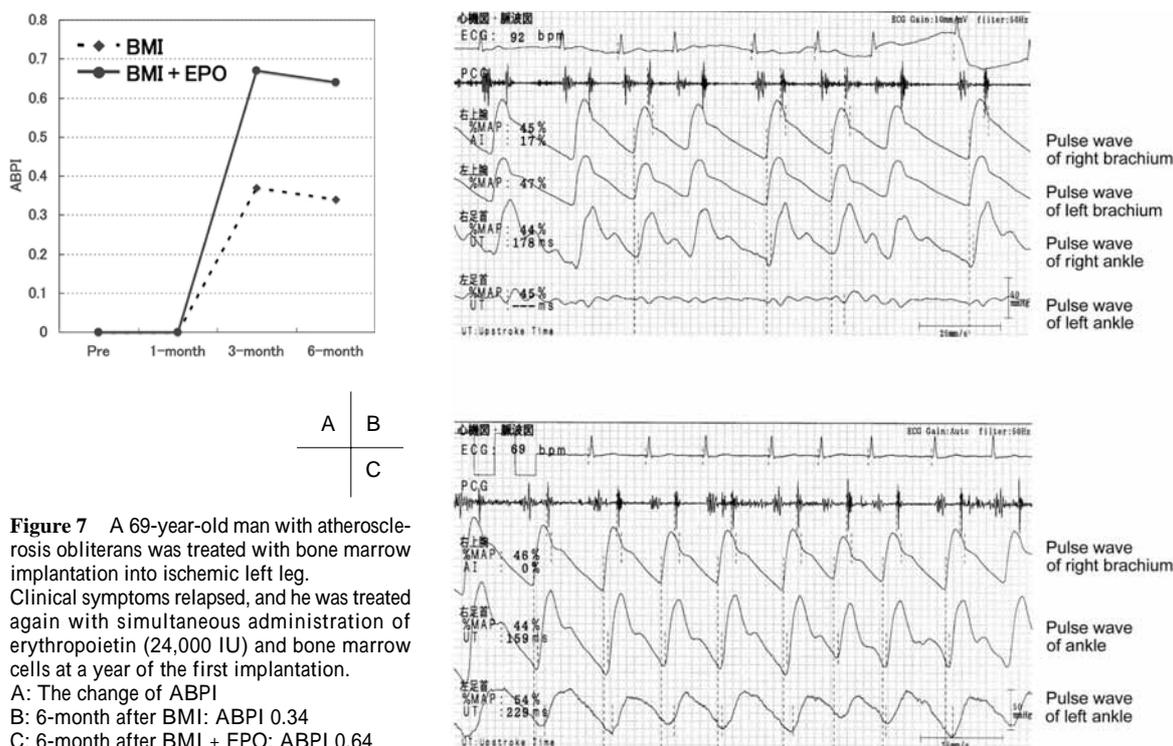


Figure 7 A 69-year-old man with atherosclerosis obliterans was treated with bone marrow implantation into ischemic left leg. Clinical symptoms relapsed, and he was treated again with simultaneous administration of erythropoietin (24,000 IU) and bone marrow cells at a year of the first implantation.
 A: The change of ABPI
 B: 6-month after BMI: ABPI 0.34
 C: 6-month after BMI + EPO: ABPI 0.64

される。いっぽう骨髓細胞移植によって動脈の発達を伴った毛細血管数の増加が見られ、この効果はエリスロポエチンの同時投与によって増強された。やはり赤芽球の骨髓外での生存を延長した効果であると思われる。赤芽球から分泌されるVEGFは主に血管内皮の増殖に寄与し、PLGFは主に血管平滑筋の増殖と動脈の成熟に寄与すると考えられる。

臨床応用

これらの結果をもとに、当施設で「重症下肢虚血患者に対するエリスロポエチン併用骨髓単核細胞移植」を開始した。まず移植する骨髓単核細胞浮遊液に6,000国際単位のエリスロポエチンを混入し虚血部に投与した。治療法の安全性は確認されたものの、血管再生治療の効果としてはエリスロポエチン併用による上乗せ効果を認めなかったため、現在ではエリスロポエチンの量を24,000国際単位の増量して検討を進めている。エリスロポエチンの併用によって骨髓単核細胞移植による血管新生効果の増強が確認された症例もあり(Fig. 7), さらに症例を重ねて検討を行っている。

おわりに

血管新生治療について、主にエリスロポエチンとの関連で考察を行った。自然型のエリスロポエチンには、副作用としての多血症・高血圧の誘導効果が予測されるなど、いくつかの問題点が存在する。われわれは血管新生作用が数倍高く、かつ造血活性を欠くエリスロポエチン誘導体の開発や、組織親和性が強く血管新生効果がさらに増強される別のエリスロポエチン誘導体の開発などを行っており、一定の成果を上げている。今後、これらの新しい知見について発表する予定である。

文献

- 1) Maiese K, Li F, Chong ZZ: New avenues of exploration for erythropoietin. JAMA, 2005, 293: 90-95.
- 2) Ogawa M: Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood, 1993, 81: 2844-2853.
- 3) Sato T, Maekawa T, Watanabe S et al: Erythroid progenitors differentiate and mature in response to endogenous erythropoietin. J Clin Invest, 2000, 106: 263-270.

- 4 YIla-Herttua S, Alitalo K: Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med*, 2003, **9**: 694–701.
- 5 Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964–967.
- 6 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.
- 7 Harada M, Qin Y, Takano H et al: G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med*, 2005, **11**: 305–311.
- 8 Kang HJ, Kim HS, Zhang SY et al: Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*, 2004, **363**: 751–756.
- 9 Agnello D, Bigini P, Villa P et al: Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res*, 2002, **952**: 128–134.
- 10 Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M et al: Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res*, 2002, **64**: 326–333.
- 11 van der Meer P, Lipsic E, Henning RH et al: Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **46**: 125–133.
- 12 Heeschen C, Aicher A, Lehmann R et al: Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*, 2003, **102**: 1340–1346.
- 13 Watanabe D, Suzuma K, Matsui S et al: Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, 2005, **353**: 782–792.
- 14 Tordjman R, Delaire S, Plouet J et al: Erythroblasts are a source of angiogenic factors. *Blood*, 2001, **97**: 1968–1974.
- 15 Ozawa T, Toba K, Kato K et al: Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, **40**: 629–638.

Mechanism of the Angiogenesis by Bone Marrow Implantation, and an Application of Erythropoietin for Angiogenic Therapy

Kiminori Kato,¹ Ken Toba,² Masato Oda,¹ Noboru Ikarashi,¹
Shiro Minagawa,¹ Manabu Isoda,³ and Yoshifusa Aizawa¹

Divisions of ¹Cardiology, ²Hematology, and ³Thoracic and Cardiovascular Surgery, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

Key words: angiogenesis, erythropoietin, erythroblast, bone marrow implantation

Erythropoietin, a growth factor firstly found as an erythropoietic cytokine, has recently been known to have biological effects of anti-apoptosis, angiogenesis, and mobilization of endothelial progenitor cell. However, the direct effect of erythropoietin itself on angiogenesis is found to be unexpectedly weak, and the major mechanism of the cytokine on angiogenesis was an indirect effect through activation of erythroblasts when combined with bone marrow implantation. We present the mechanism that underlie the angiogenesis by bone marrow implantation, and an application of erythropoietin for angiogenic therapy. (*J Jpn Coll Angiol*, 2006, **46**: 595–601)