

当院における末梢動脈疾患に対する骨髄単核細胞移植術の 治療成績と治療効果予測因子

早田 輝子 鈴木 洋 磯 良崇 楠山 太郎 大森 康歳 角田 史敬
佐藤 貴俊 正司 真 木庭 新治 下司 映一 片桐 敬

要 旨：【背景】末梢動脈疾患治療法としての自己骨髄単核細胞移植の治療効果予測因子として、分離骨髄単核球分画と臨床効果指標との相関を検討した。【方法】重症下肢虚血患者13例に対し骨髄単核細胞移植術を施行した。そのうち7例で骨髄細胞分画と足関節上腕血圧比(ABI)、経皮的酸素分圧(transcutaneous oxygen pressure: TcO₂)を比較検討した。【結果】術後のABI、TcO₂はいずれも有意に改善した。ΔTcO₂は、成熟好中球比率と負の($p < 0.01$)、赤芽球比率と正の($p < 0.05$)相関を示した。【結論】骨髄単核細胞移植において、赤芽球は促進的に、好中球は抑制的に働くと考えられた。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 603-609)

Key words: bone marrow mononuclear cell implantation, cell fraction, neutrophil, erythroblast, peripheral artery disease

はじめに

薬剤抵抗性で、経皮的血管形成術やバイパス術の適応のない重症虚血下肢に対する自己骨髄単核細胞移植術が開発され、その有効性が確立されつつある¹⁻³⁾。成人における血管形成は、隣接する内皮細胞が遊走増殖することによる血管新生(angiogenesis)が唯一のメカニズムと考えられてきたが、最近、骨髄由来の多能性をもつ血管内皮前駆細胞がヒト末梢血中にも発見され血管発生(vasculogenesis)も成人における血管形成に関与することが明らかとなった。血管内皮前駆細胞は幼若な血球のマーカーであるCD34陽性細胞の中に含まれており、このCD34陽性の内皮前駆細胞が血管発生いわゆるvasculogenesisに関与すると考えられている⁴⁾。しかし、CD34陽性細胞は骨髄単核細胞の約1%にしか存在せず、また分離方法の限界により、現実的には単核細胞以外の細胞も移植細胞に多数含まれている。骨髄単核細胞のほとんどがCD34陰性細胞で、いろいろな成熟段階にあり、サイトカイン分泌作用を多く有する。これらCD34陰性細胞の役割は非常に重要であると考えら

れるが、虚血肢に対する骨髄単核細胞移植において、どの細胞成分が有効であるのかを検討した研究は少ない。本研究では、当院における骨髄単核細胞移植の治療成績を報告するとともに、分離骨髄単核細胞の細胞分画と臨床効果の指標である足関節上腕血圧比(ankle-brachial index: ABI)、経皮的酸素分圧(transcutaneous oxygen pressure: TcO₂)との関係を検討した⁵⁾。

方 法

(1) 対象

対象は、Japan Trial for Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation(J-TACT)⁶⁾に準じて以下を満たす症例とした。すなわち、末梢動脈疾患(慢性閉塞性動脈硬化症あるいはパージャー病)のうち、Fontaine分類III度およびIV度に属し、安静時疼痛または虚血性潰瘍・壊死を有する患者で、著しくQOLが障害されており血行再建術の適応がなく、将来切断が予想される患者とした。適応除外患者は、合併症により余命が1年以内と考えられる患者、悪性新生物を有する患者および5年以内にその既往のある患者、諸検査により悪性腫

Table 1 Patients characteristics

	Age	Sex	Disease	Fontaine	Therapy	HT	DM	HL	Smoking	HD
1	68	M	ASO	IV	PTA	+	+	-	-	+
2	58	M	ASO	IV	-	-	+	-	-	+
3	55	M	ASO	III	Bypass	+	-	+	+	-
4	63	M	Buerger	IV	Bypass	+	-	-	+	-
5	70	M	ASO	III	Bypass	+	+	-	-	-
6	47	M	ASO	IV	-	-	-	+	+	-
7	67	M	ASO	IV	-	+	+	-	+	+
8	65	M	ASO	IV	-	+	+	-	-	+
9	64	F	ASO	III	-	+	+	+	-	-
10	64	M	ASO	IV	-	-	+	-	-	+
11	66	M	ASO	IV	PTA	+	+	-	+	-
12	50	M	ASO	IV	Bypass	+	+	-	-	+
13	34	M	Buerger	III	-	-	-	-	+	-

ASO: arteriosclerosis obliterans, PTA: percutaneous transluminal angioplasty, HT: hypertension, DM: diabetes mellitus, HL: hyperlipidemia, HD: hemodialysis

瘍の可能性があると判断された患者，重症の糖尿病性網膜症を有する患者とした。

当院では，上記条件を満たす13例(男性12例，女性1例，平均年齢 59.3 ± 10.3 歳)に骨髄単核細胞移植を施行した(Table 1)。そのうちギムザ染色による骨髄細胞分画を測定し得た9例からバイパスによる血行再建術を併用した2例を除いた7例で(男性7例，平均年齢 61.6 ± 7.9 歳)，細胞分画と臨床効果の指標との比較を行った。本研究は昭和大学の倫理委員会の承認を得たうえ，全例インフォームドコンセントを行い同意を得て施行した。

(2) 方法

1) 骨髄単核細胞移植

骨髄単核細胞移植はこれまでの報告と同様に行った¹⁾。全身麻酔下で腸骨から骨髄液を約600cc採取し，骨髄単核細胞はCS3000-plus blood-cell separator(Baxter社製)で分離し，約60ccまで濃縮した。分離後の骨髄単核細胞を虚血下肢に約0.5mlずつ筋肉注射で移植した。

骨髄単核細胞の分画は，スミア標本をMay-Giemsa染色し，光学顕微鏡で観察し測定した。CD34陽性細胞はfluorescence-activated cell sorter(FACS)で測定した。

2) 評価項目

ABI

脈波，ABIをPWV/AB(Colin社製) (正常 > 1.0) で術前と術後4週目で測定し Δ ABIを算出した。

TcO₂

TcO₂は室温下仰臥位で，oxymonitor(tina TCM 4, Radiometer社製) (正常 > 60 mmHg) を用いて術前と術後4週で測定し Δ TcO₂を算出した。

安静時疼痛スケール(rest pain scale)

+4: 麻薬，消炎鎮痛薬(non steroidal anti-inflammatory drug: NSAID)でも改善しない痛み，+3: NSAIDが必要な中等度の痛み，+2: NSAIDは不要な軽度の痛み，+1: ごく軽度の痛み，0: 完全消失として評価した。

3) 統計学的分析

すべての値は平均 \pm 標準偏差で表した。術前から術後4週までの変化の解析には *t* 検定を用い，2変数の相関はPeasons' 単純直線回帰分析を用い， $p < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

(1) 骨髄単核細胞移植

Fig. 1に13例の骨髄単核細胞移植前後のABIとTcO₂の

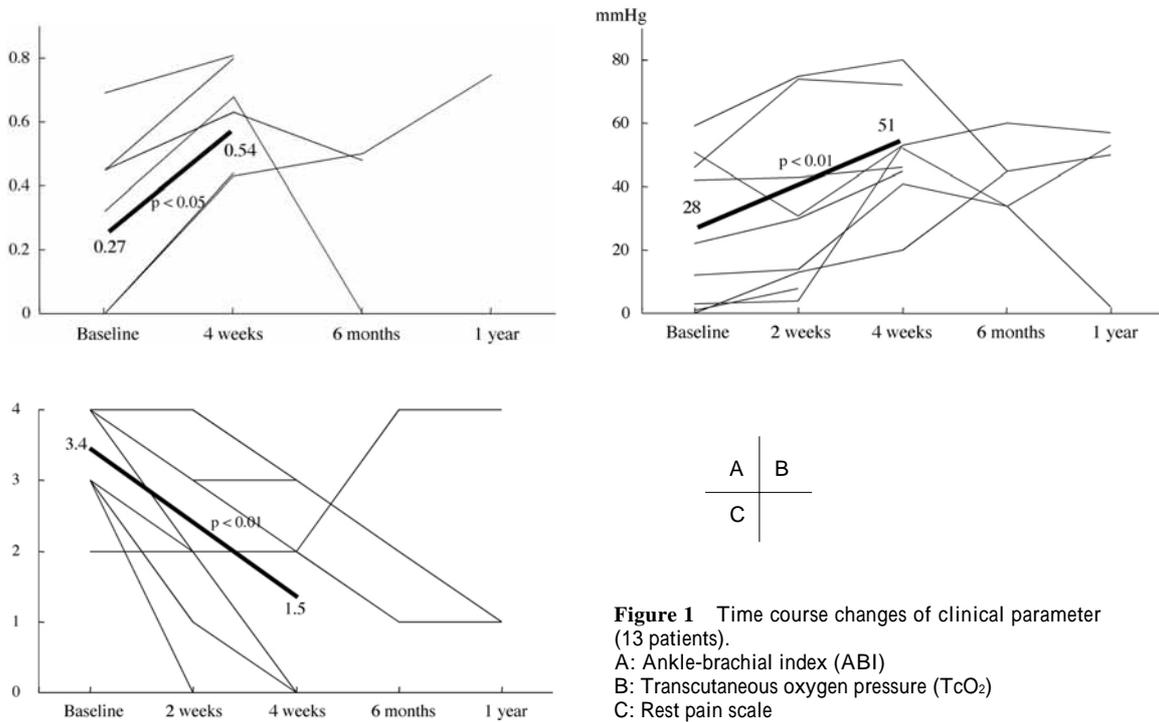


Figure 1 Time course changes of clinical parameter (13 patients).
 A: Ankle-brachial index (ABI)
 B: Transcutaneous oxygen pressure (TcO₂)
 C: Rest pain scale

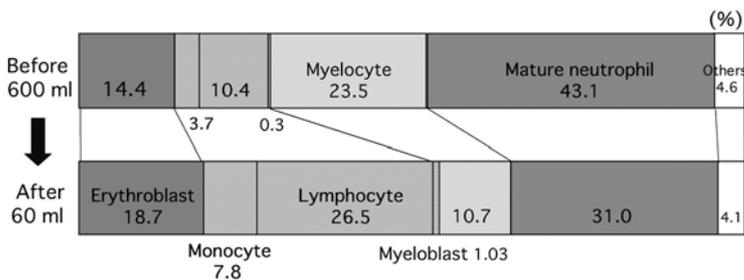


Figure 2 Change in the cell types before and after separation.

経時的変化を示す。ABI (Fig. 1A) の平均値は、術前の0.27から4週後には0.54まで有意に改善した ($p < 0.05$)。患側前脛骨部のTcO₂ (Fig. 1B) の平均値は、術前の28から4週後には51まで有意に改善した ($p < 0.01$)。また、安静時疼痛 (Fig. 1C) は術後早期 (3日目頃) より改善する例が多く、その効果は持続し、平均は術前の3.4から4週後には1.5まで有意に改善した ($p < 0.01$)。

このうち骨髓細胞分画検査を施行しえた7例についても、4週後のABIは7人中5人で術前より高値になり、平均値も有意に改善した (0.38 ± 0.4 vs 0.69 ± 0.4 , $p < 0.05$)。術後4週のTcO₂はすべての患者で改善し、平均値も著明に改善した (25.0 ± 15.6 vs 50.6 ± 24.3 , $p < 0.005$)。

(2) 移植骨髓単核球細胞

Fig. 2に単核球分離前後の組成の変化を示す。骨髓液は600mlから60mlに濃縮され、赤芽球、単球・リンパ球は割合が増え、成熟好中球、血小板数やヘマトクリット値で示される赤血球の割合は減少した。有核細胞数は 1.32×10^{10} から 3.36×10^9 に、血小板数は 8.58×10^{10} から 4.44×10^{10} に、ヘマトクリット値は26.0%から19.2%となった。分離後の平均移植細胞数 ($3.36 \pm 0.8 \times 10^9$) のうちリンパ球は $26.5 \pm 11.4\%$ 、単球は $7.8 \pm 4.6\%$ 、骨髓芽球 $1.0 \pm 0.7\%$ 、骨髓球 $10.7 \pm 6.3\%$ 、好中球 $31.0 \pm 14.0\%$ 、赤芽球 $18.7 \pm 9.3\%$ であった。FACS解析によるCD34陽性細胞数は平均 $3.1 \pm 1.4 \times 10^7$ (移植細胞の $0.87 \pm 0.3\%$) であった。

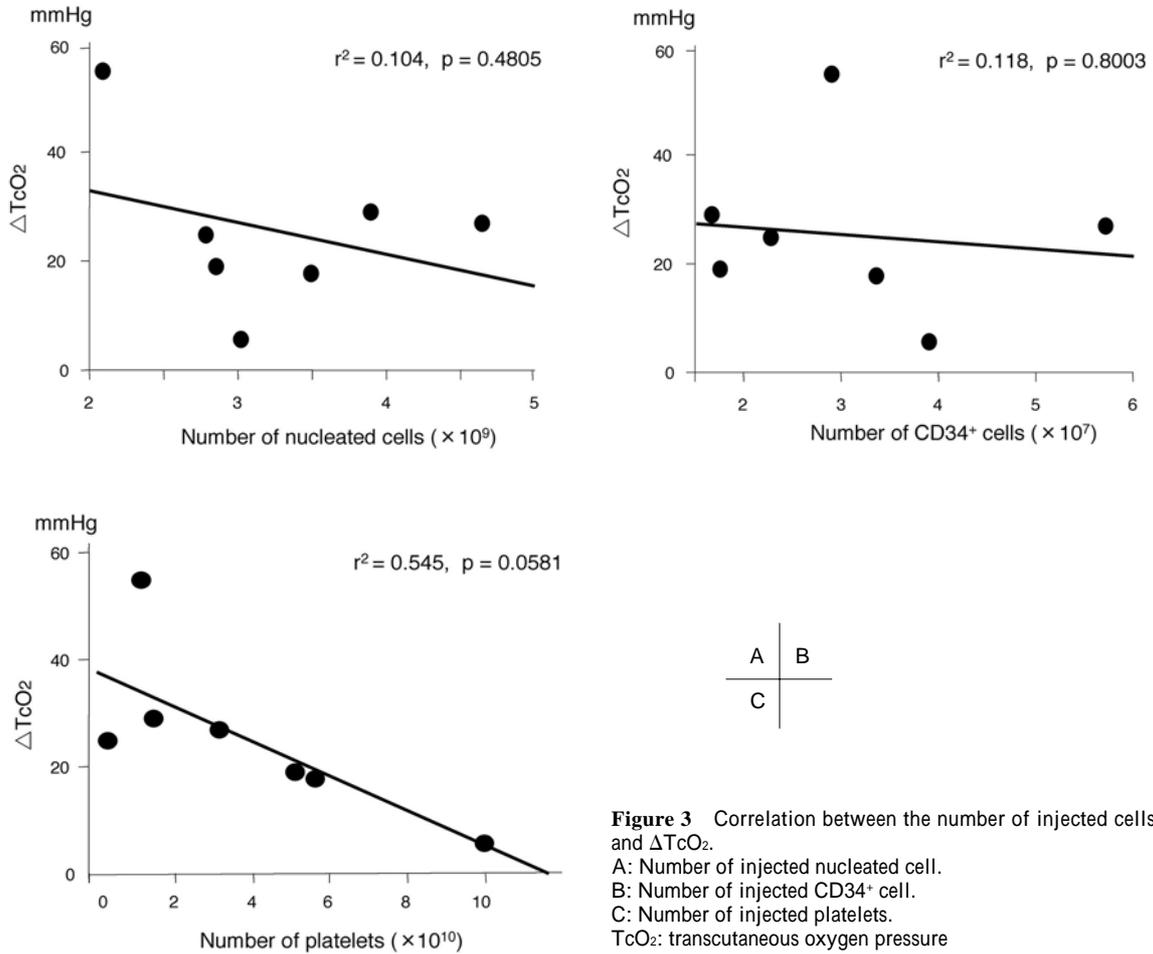


Figure 3 Correlation between the number of injected cells and ΔTcO_2 .
 A: Number of injected nucleated cell.
 B: Number of injected CD34⁺ cell.
 C: Number of injected platelets.
 TcO₂: transcutaneous oxygen pressure

(3) ABI と細胞分画

移植有核細胞数と ΔABI は有意な相関を示さず、移植CD34陽性細胞数と ΔABI も一定の傾向を示さなかった。CD34陽性細胞比率も含め、いずれの骨髄細胞分画比率も ΔABI と相関しなかった。

(4) TcO_2 と細胞分画

移植有核細胞数 (Fig. 3A) とCD34陽性細胞数 (Fig. 3B), CD34陽性細胞比率は ΔTcO_2 と相関しなかった。また、血小板数が増加すると TcO_2 の改善度が低下する傾向にあったが、有意差はみられなかった (Fig. 3C)。

骨髄細胞分画を検討すると、移植細胞中の単球・リンパ球比率と ΔTcO_2 は一定の傾向を示さなかったが (Fig. 4A), 成熟好中球比率は ΔTcO_2 と著明な負の相関を認め

($p = 0.013, r^2 = 0.740$, Fig. 4B), 顆粒球比率も同様であった ($p = 0.048, r^2 = 0.575$)。一方で赤芽球比率は ΔTcO_2 と有意な正の相関を認めた ($p = 0.046, r^2 = 0.580$, Fig. 4C)。

考 察

当院における、末梢動脈疾患に対する骨髄単核細胞移植の短期成績は、 TcO_2 , ABI, 疼痛スケールの有意な改善を認め有効であった。

移植有核細胞数やCD34陽性細胞数は ΔTcO_2 や ΔABI との相関はなく、骨髄細胞分画では、 ΔTcO_2 が成熟白血球比率と正の、赤芽球と有意な負の相関を認めた。

(1) CD34陽性細胞と骨髄単核細胞移植の効果

初期の報告では、骨髄単核細胞移植の効果に関して

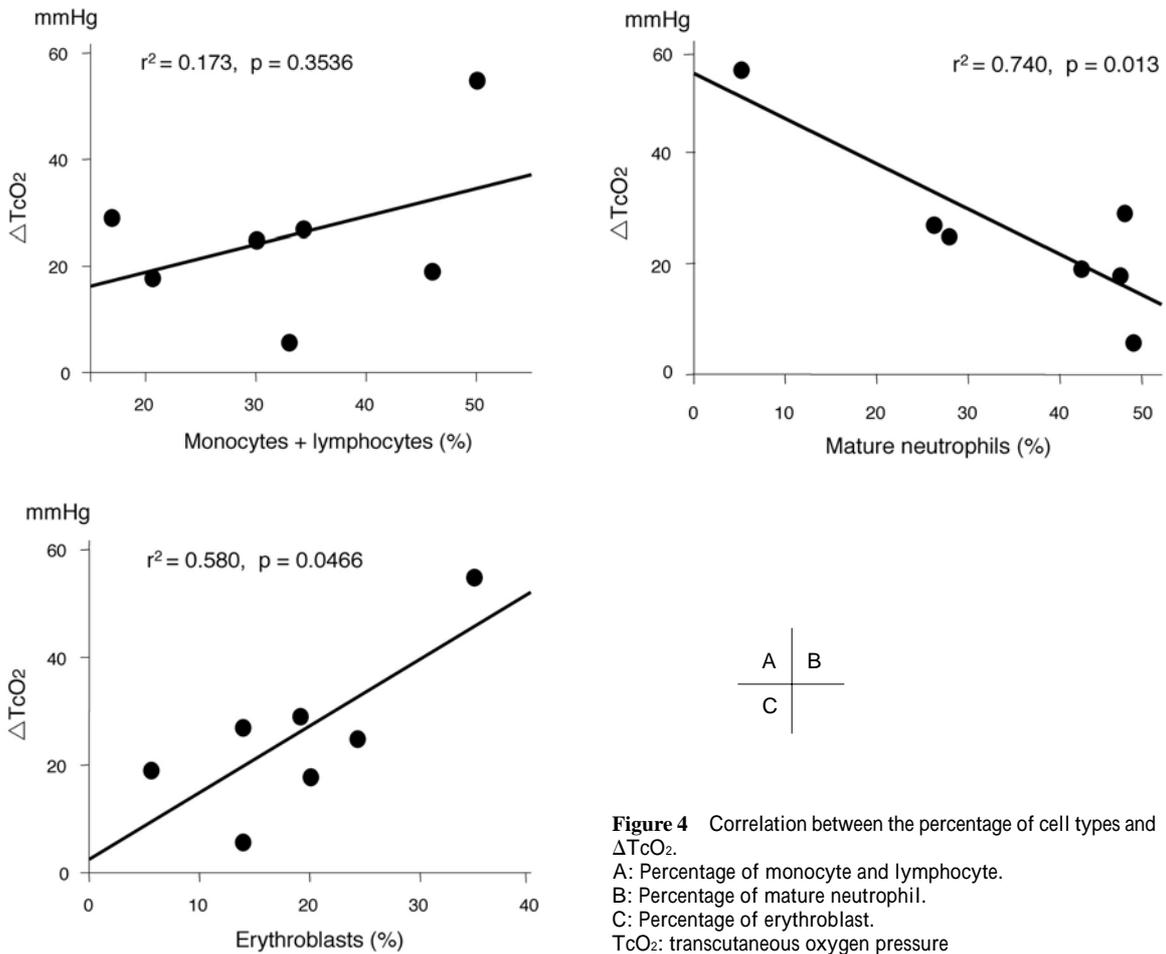


Figure 4 Correlation between the percentage of cell types and ΔTcO_2 .
 A: Percentage of monocyte and lymphocyte.
 B: Percentage of mature neutrophil.
 C: Percentage of erythroblast.
 TcO₂: transcutaneous oxygen pressure

CD34陽性細胞数と ΔABI とに強い相関があり、CD34陽性細胞数が骨髄単核細胞移植術において最も重要な因子の一つであると考えられていた³⁾。しかしながら、われわれの結果では、CD34陽性細胞数やその有核細胞中の比率は ΔTcO_2 や ΔABI と相関しなかった。この結果の相違の原因は明確ではないが、われわれの結果からは骨髄単核細胞移植術の効果はCD34陽性細胞数のみに依存するのではなく、CD34陰性細胞から産生されるさまざまなサイトカインが関与していると考えられる。浅原ら^{4, 6)}によるとヒトCD34陽性単核細胞とCD34陰性単核細胞とを共培養すると、前者を単独で培養するより数多くの内皮前駆細胞が得られた。このことは、CD34陽性単核細胞とCD34陰性単核細胞との細胞間の相互作用が内皮前駆細胞への分化増殖に重要な役割を

果たしていることを示唆している。骨髄単核細胞移植の基礎実験の報告によれば⁷⁾、内皮前駆細胞を含むと考えられている単球とリンパ球分画は⁸⁾、分離した骨髄単核細胞中に49%しか認められなかった。われわれのデータでも、分離後の単球とリンパ球の割合は34.3%であり、CD34陰性細胞が本治療において重要な役割を果たしていると考えられる。

(2) 好中球と骨髄単核細胞移植

好中球は血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)を含み⁹⁾、angiogenesisを促す¹⁰⁾と考えられていたが、その一方で活性化された好中球はリソソーム蛋白を放出したり、酸素代謝物を生成したりすることで内皮傷害を引き起こす可能性を有している。今回

の臨床試験では、移植骨髄単核細胞中の好中球の割合が ΔTcO_2 と負の相関関係を示しており、これがangiogenesisの治療効果を減弱させる重要な要因であると示唆される。Ibaら¹¹⁾も好中球がangiogenesisに抑制的に働き、好中球エラスターゼは酸素代謝よりもangiogenesis抑制作用があると報告している。したがって、好中球エラスターゼのような好中球に含まれる血管新生に抑制的な因子を抑制することで、骨髄単核細胞移植はより効果的になると予測される。

(3) 赤芽球と骨髄単核細胞移植

骨髄由来の赤芽球は、VEGF-Aや胎盤増殖因子(placental growth factor: PIGF)といった血管新生因子を産生しており、単球/マクロファージあるいは内皮細胞に作用している¹²⁾。また、赤芽球系細胞はVEGFやPIGFの活性化により血管新生を促進し、エリスロポエチンがその作用を増強させると報告されている¹³⁾。すなわち、エリスロポエチンは移植細胞中の赤芽球系細胞の活性化と成長を促すことで骨髄単核細胞移植の効果を増強させると考えられている¹³⁾。本研究では移植細胞中の赤芽球は18.7%にのぼり、この比率は ΔTcO_2 と正の相関を示した。したがって、赤血球系細胞より分泌されるVEGFやPIGFといった血管新生に促進的な因子の増強により、骨髄単核細胞移植の効果はより改善される可能性がある。

結 論

末梢動脈疾患に対する骨髄単核細胞移植は有効であった。骨髄単核細胞移植術において、移植細胞数やCD34陽性細胞数は効果発現の予測因子とはならず、移植細胞中の成熟好中球比率が効果の抑制因子、赤芽球比率が促進因子である可能性が示唆された。

文 献

- 1) 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.
- 2) Higashi Y, Kimura M, Hara K et al: Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation*, 2004, **109**: 1215–1218.
- 3) Saigawa T, Kato K, Ozawa T et al: Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J*, 2004, **68**: 1189–1193.
- 4) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964–967.
- 5) Scheffler A, Rieger H: A comparative analysis of transcutaneous oximetry (tcPO₂) during oxygen inhalation and leg dependency in severe peripheral arterial occlusive disease. *J Vasc Surg*, 1992, **16**: 218–224.
- 6) 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.
- 7) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, **103**: 897–903.
- 8) Asahara T, Takahashi T, Masuda H et al: VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 1999, **18**: 3964–3972.
- 9) Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V et al: Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood*, 1997, **90**: 4153–4161.
- 10) Yasuda M, Shimizu S, Tokuyama S et al: A novel effect of polymorphonuclear leukocytes in the facilitation of angiogenesis. *Life Sci*, 2000, **66**: 2113–2121.
- 11) Iba O, Matsubara H, Nozawa Y et al: Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation*, 2002, **106**: 2019–2025.
- 12) Tordjman R, Delaire S, Plouet J et al: Erythroblasts are a source of angiogenic factors. *Blood*, 2001, **97**: 1968–1974.
- 13) 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.

Efficacy and the Regulatory Factor of Bone-marrow Mononuclear Cell Implantation in Peripheral Artery Disease

Teruko Soda, Hiroshi Suzuki, Yoshitaka Iso, Taro Kusuyama, Yasutoshi Omori, Fumiyoshi Tsunoda, Takatoshi Sato, Makoto Shoji, Shinji Koba, Eiichi Geshi, and Takashi Katagiri

Third Department of Internal Medicine, Showa University School of Medicine, Tokyo, Japan

Key words: bone marrow mononuclear cell implantation, cell fraction, neutrophil, erythroblast, peripheral artery disease

Background: Efficacy of autologous bone marrow-mononuclear cell (BM-MNC) implantation has been reported in patients with severe peripheral artery disease. No studies have yet to elucidate what types of injected cells influence the clinical appearance in BM-MNC implantation. We investigated the early results of this therapy and the correlations of morphologically classified cell types of sorted BM-MNCs with changes in the ankle brachial index (ABI) and transcutaneous oxygen pressure (TcO₂).

Patients and Methods: Thirteen patients with severe peripheral artery disease who were not candidates for angioplasty or surgical operation underwent BM-MNC implantation. Seven patients whose cell types of sorted BM-MNCs measured were included in the study.

Results: Mean ABI ($p < 0.05$) and mean TcO₂ ($p < 0.01$) from baseline to 4 weeks significantly increased in 13 patients. The numbers of total injected cells and CD34⁺ cells did not correlate with Δ ABI and Δ TcO₂ from baseline to 4 weeks. Among the cell types, Δ TcO₂ showed significantly negative correlations with the percentage of mature neutrophils ($p < 0.01$) and significantly positive correlations with the percentage of erythroblasts ($p < 0.05$).

Conclusions: BM-MNC implantation was effective for peripheral artery disease. Neutrophils could work as an inverse regulator while erythroblasts could serve as a positive regulator in clinical BM-MNC implantation.

(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 603–609)