

2. 冠動脈 虚血性心疾患に対する骨髄細胞移植による心血管再生療法

李 桃生 濱野 公一

要 旨：近年の研究により骨髄細胞はさまざまな血管新生因子を産生すること、内皮細胞などへ分化することが明らかになった。また、さまざまな虚血性心不全モデルにおいて、骨髄細胞移植治療により治療後の心筋血流増加と心機能改善効果が認められた。これらの結果により、骨髄細胞移植による心血管再生療法は難治性虚血性心疾患に対する有効な治療法として期待されている。当施設では冠動脈バイパス手術時にバイパス不能な虚血心筋領域に自己骨髄単核球細胞を心筋内へ移植する骨髄細胞移植治療法を8症例に行った。治療後5年間の追跡調査で本治療法による副作用は認められなかった。他施設での虚血性心疾患症例を対象とした自己骨髄細胞移植治療法でも良好な結果が報告されている。今後、大規模臨床試験により自己骨髄細胞移植治療法の長期成績を明らかにする必要がある。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 241-246)

Key words: angiogenesis, ischemic heart disease, bone marrow cells

はじめに

最近の10年間で細胞を利用した血管再生療法は顕著に進歩した。これまでも、骨髄、末梢血、脂肪組織などに由来する幹細胞、さらには胚性幹細胞が心血管再生治療の細胞ソースとして研究に用いられてきた。骨髄細胞を用いた心血管再生治療は最も一般的で、さまざまな心筋虚血モデルにおいて同治療による虚血心筋の血流量増加と心機能の改善効果が証明されている。骨髄細胞を用いた再生治療の利点として、細胞の採集が容易であること、造血幹細胞は自己複製能が高いこと、臨床応用における倫理的問題が少ないことなどが考えられる。現在、難治性虚血性心疾患に対する自己骨髄細胞移植治療法は世界中で広く試されている。

骨髄細胞移植による 心血管再生治療法の作用機序

虚血性心疾患に対する骨髄細胞移植治療後の血流増加と心機能改善に関する作用機序は、いまだ十分に解明されていない。これまでの基礎研究により、骨髄

細胞はvascular endothelial growth factor(VEGF), basic fibroblast growth factor(bFGF), platelet-derived growth factor(PDGF), insulin-like growth factor-1(IGF-1), angiopoietinなどの心血管再生に深く関わっている因子を産生することが明らかとなった¹⁻³。また、骨髄細胞中には造血幹細胞の他に、内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、多能性幹細胞などが多く存在し、これら骨髄由来の幹細胞は血管内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞などへ分化しうることが報告されている⁴⁻⁶。それらの研究成果から、骨髄細胞移植後の血流増加と心機能改善に関する作用機序は図のごとく推察されている(Fig. 1)。まず、移植した骨髄細胞からVEGF, bFGF, PDGF, angiopoietin, IGF-1などさまざまな液性因子が産生される。これらの液性因子は血管新生(VEGF, bFGF)および動脈形成(PDGF, angiopoietin)を誘導し、虚血心筋に新たな側副血行路の形成を促進させ、血流増加により心機能を改善する。また、われわれの最近の研究により、骨髄細胞から産生された液性因子(IGF-1 など)は心筋細胞の保護作用と収縮機能の改善作用を有することが明らかとなった⁷。次に、間葉系幹細胞や内皮前駆細

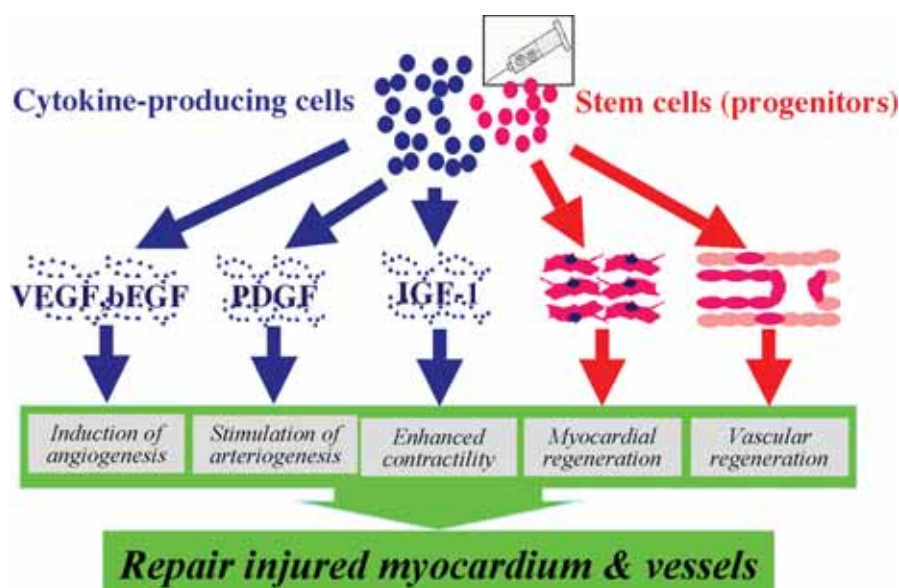


Figure 1 Probable mechanisms of bone marrow cells for myocardial repair.

胞など一部の骨髄細胞は移植後心筋内に長期生着し、血管内皮、平滑筋細胞、心筋細胞などへ分化することが報告されている。血管内皮や平滑筋細胞に分化した細胞は血管再生に寄与し、心筋細胞に分化した細胞は心筋再生に働くことが考えられる。虚血心筋内で分化と長期生存した骨髄由来の細胞は細胞成分として直接に血管再生と心筋再生に関与することにより、心機能の改善をもたらす可能性が考えられる。これらの観点から、骨髄細胞は心血管再生治療に適していると思われる。

当施設での冠動脈バイパス術患者への自己骨髄細胞移植治療の試み

大動物モデルを用いて虚血性心不全に対する骨髄細胞移植治療の有効性と安全性を確認した後、われわれは山口大学医学部生命倫理委員会の承認を得て、1999年から冠動脈バイパス術との併用で自己の骨髄細胞移植による血管再生治療の臨床試験を開始した⁸⁾。

(1) 症例選択基準

骨髄細胞移植による血管再生治療の有効性と安全性は確立されていない。そのため、冠動脈バイパス術予定で、バイパスや経皮的冠動脈インターベンション

(percutaneous coronary intervention: PCI) 不能な虚血領域を有する症例に限定した。すなわち自己骨髄細胞移植は冠動脈バイパス術と同時に、バイパス不能な狭窄冠動脈の灌流区域(虚血心筋)のみに行った。除外基準としては、骨髄機能に異常を認める患者、心室性不整脈を有する患者、中等度以上の糖尿病性網膜症を合併した患者、担癌患者あるいは癌の手術後の患者とした。

(2) 骨髄細胞の分離採集と細胞移植の手技

冠動脈バイパス時に、骨髄単核球細胞を直視下に心筋内に注入する⁸⁾。その詳しい手技としては、まず全身麻酔下に腸骨より400~600mlの骨髄液を採取し、冠動脈バイパス術を行う間に、COBE Spectra Apheresis System遠心分離装置を用いて単核球細胞を分離した。冠動脈バイパス術が終了した直後に、無菌操作で採集した新鮮な骨髄単核球細胞をバイパスが不可能な虚血心筋内に直接注入した(Fig. 2)。注入は1ml注射器と26G注射針を用いて1箇所あたり細胞浮遊液5~10×10⁷cells/0.1mlを約1cm間隔で行った。

(3) 有効性と安全性の遠隔期成績

冠動脈バイパス術に骨髄単核球細胞移植を併用した8症例で治療後5年以上が経過した。バイパス術との

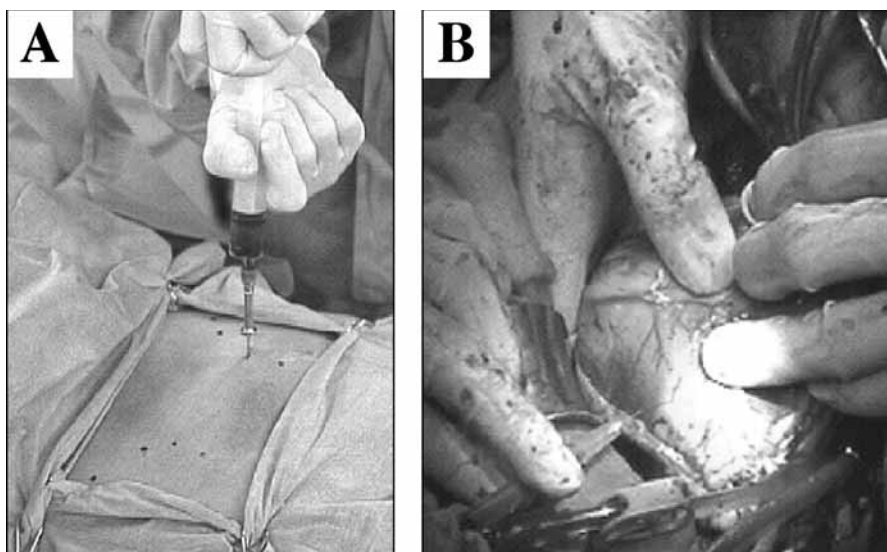


Figure 2 Collection (A) and intramyocardial injection (B) of bone marrow cells.

併用であるため、細胞移植の効果判定が困難な点もあるが、治療1カ月後において、8例中5例で細胞移植領域の心筋血流が治療前と比べ著明に改善し、そのうち2症例では治療後の左室造影で細胞移植領域の心筋壁運動の改善が認められた。それらの所見は治療後に大きな変化もなく5年以上継続している。

安全性については、明らかな副作用症例はなかった。治療後の早期および遠隔期において、冠動脈バイパス術単独施行例と細胞移植併用例とを比較したところ、いずれの血液検査項目においても両群間で有意差がなく、細胞移植による全身への影響は少ないものと思われた。また、治療前と比較して新たな不整脈の出現も認められなかった。心エコーおよびCT検査で、骨髄細胞注入部位に石灰化や異常組織の形成などは認められておらず、局所に対する副作用は認められなかった。

虚血性心疾患に対する骨髄細胞移植による血管新生治療法の臨床応用の現状

虚血性心疾患に対する自己の骨髄細胞移植治療法の臨床試験は2000年ころから世界中で広く行われるようになった。これまでの臨床試験では治療に用いる骨髄細胞はすべて患者本人から採集されている。しかし、細胞の採集と分離方法、投与する細胞の量と分画、細胞の投与経路とタイミングについては施設ごとに異

なっており、いまだにコンセンサスは得られていない (Table 1)。各施設で独自の基準により症例を選択し臨床試験が行われているのが現状である。

(1) 臨床応用のパターン

これまでの臨床試験での自己骨髄細胞の投与方法は以下の3つに分類できる (Table 1)。

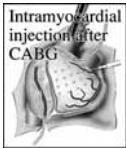
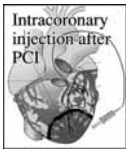
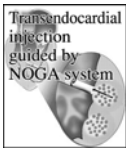
冠動脈バイパス術を行う患者に、バイパス直後に直視下に心筋内へ注入する。

PCI治療を行う患者に、PCI治療数日後に経カテーテル的に冠動脈内へ投与する。

冠動脈バイパス術やPCI治療の困難な患者に、単独治療としてNOGA Mapping Systemガイド下で経カテーテル的に虚血心筋内へ注入する。

自己の骨髄液の採集や単核球細胞などの分離は手技が比較的簡単で、日常診療でよく行われている。また、細胞投与の方法として、直視下での心筋内注入とカテーテルによる冠動脈内注入では特殊な装置を必要としない。そのため、冠動脈バイパス術やPCI治療と細胞移植を併用する方法は世界各国の一般医療機関で広く採用されている。しかし、骨髄細胞移植を単独で行う場合には、より低侵襲に行わなければならないため、特殊な装置 (NOGA Mapping System) と熟練した操作技術が求められる。

Table 1 Clinical trial patterns of bone marrow cell (BMC) implantation for the treatment of ischemic heart disease

Patterns	Patients/ control	Cell fractions	Cell numbers	Outcomes	References
 Intramyocardial injection after CABG	5/0	BM-MNCs	$3-22 \times 10^6$	Perfusion	Jpn Circ J, 2001, 65: 845-847.
	6/0	CD133+ cells	$0.1-1.5 \times 10^6$	Perfusion LVEF	Lancet, 2003, 361: 45-46.
	14/0	Nucleated cells	??	LV wall motion	Cell Transplant, 2004, 13: 7-13.
	10/10	CD34+ cells	22×10^6	Perfusion LVEF	J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 130: 1631-1638.
	10/0	BM-MNCs	$3.4 \pm 1.2 \times 10^6$	Perfusion	J Nucl Med, 2005, 46: 1610-1617.
 Intracoronary injection after PCI	10/10	BM-MNCs	$2.8 \pm 2.2 \times 10^7$	Perfusion Infarction size	Circulation, 2002, 106: 1913-1918.
	11/9	CD34+ cells	$7.35 \pm 7.31 \times 10^6$	Perfusion LVEF	Circulation, 2002, 106: 3009-3017.
	30/30	Nucleated cells	$24.6 \pm 9.4 \times 10^8$	LVEF	Lancet, 2004, 364: 141-148.
	34/35	BM-MNCs	$8-10 \times 10^6$	Perfusion LVEF	Am J Cardiol, 2004, 94: 92-95.
	20/17	BM-MNCs	$78 \pm 41 \times 10^6$	LVEF	Circ Res, 2004, 95: 742-748.
 Transcatheter injection guided by NOGA system	8/0	BM-MNCs	??	Symptom Perfusion LVEF	Lancet, 2003, 361: 47-49.
	14/7	BM-MNCs	$25.5 \pm 6.3 \times 10^6/\text{inj}$	Symptom Perfusion LVEF	Circulation, 2003, 107: 2294-2302.
	10/0	Nucleated cells	$32.6 \pm 27.5 \times 10^6/\text{ml}$	Symptom Perfusion LVEF	J Am Coll Cardiol, 2003, 41: 1721-1724.
	5/0	BM-MNCs	??	Symptom Perfusion LVEF	Tex Heart Inst J, 2004, 31: 214-219.
	25/0	BM-MNCs	$84.1 \pm 28.7 \times 10^6$	Symptom Perfusion LVEF	J Nucl Med, 2006, 47: 574-580.

(2) 骨髄細胞移植の有効性と安全性

骨髄細胞移植による心血管再生療法の臨床試験の有効性に関する報告は一定していない。われわれの臨床研究を含め、初期の小規模Phase I, II試験では一部の患者で臨床症状の改善, 心筋血流量の増加, 心機能の改善が報告されている(Table 1)。しかし, それらの臨床試験の大半はPCIや冠動脈バイパス術との併用で行われているため, その血流量と心機能の改善効果が単なるPCIや冠動脈バイパス術によるものか否かについての判定が困難である。単独治療で行われた臨床試験はいずれも小規模で, さらに対照症例がほとんどないため, 治療効果の判定に客観性を欠いている。昨年には, カテーテルによる自己骨髄細胞の冠動脈内投与の二重盲検試験 Phase III の成績がいくつか報告された。これらの試験から有効性の有無について全く異なった結果が報告された⁹⁻¹²⁾。理由として, 本治療法の有効性は治療前の左室心機能, 骨髄細胞の投与数や投与タイミングの違いなどに左右されることが考えられる¹⁰⁾。したがって, 本治療法の有効性を結論するには, 一定の方法に基づいた, より大規模な二重盲検試験の実施が必要である。

安全性については, 本治療法自体が自己の骨髄から

無菌的に細胞を採取するもので, 長時間の培養増殖などの操作が加わっていないため問題は少ないと思われる。しかし, 骨髄細胞はheterogeneousな集団であり, 細胞移植後の局所炎症反応, 異種組織の形成, 不整脈の誘発, 動脈硬化症の促進, 冠動脈ステント部位の再狭窄の促進¹³⁾などが懸念されている。幸いにも, 比較的大規模な試験で冠動脈ステント部位の再狭窄の促進は認められず¹⁴⁾, 細胞移植治療に直接関連した死亡事故や不整脈の誘発など重篤な合併症や副作用は報告されなかった。われわれの5年以上の長期追跡調査でも骨髄細胞投与による心筋内血腫, 奇形腫, 石灰化など異種組織の形成は認められなかった。現時点で安全面に大きな障害はないが, さらなる追跡調査が必要と思われる。

問題点と将来展望

骨髄細胞移植による心血管再生療法には作用機序の解明や安全性の確認など解決すべき課題が多数残されている。最も重要な課題としては本治療法の有効性の検証である。前述したように, 今までの臨床試験では適応患者の選択基準, 自己骨髄細胞の採取と投与方法などが統一されていない。そのため, 異なるプロト

コールで実施された比較的大規模なPhase III二重盲検試験で有効性において全く異なる成績を生む結果となった⁹⁻¹²⁾。今後は、基礎研究のデータに基づいた、より統一されたプロトコールで臨床試験が実施され、本治療の有効性が正しく検証されるべきである。

骨髄細胞移植をPCIと併用した場合、治療前の左室機能が不良な症例において、より有効であると報告された¹⁰⁾。しかし、局所的な因子(虚血の範囲、程度、期間など)のみならず、全身的な因子^{15,16)}(年齢、生活歴、糖尿病、高脂血症、高血圧の有無など)も本治療の効果に影響を及ぼすことが予測される。これらの因子の影響を総合的に考慮したうえで症例選択基準を定める必要がある。

投与すべき細胞数、細胞分画、タイミングなどについては基礎研究で十分な比較検討が行われていない。冠動脈バイパス術との併用や単独治療の場合は細胞投与のタイミングについて議論する必要はないが、PCIとの併用では細胞投与のタイミングが本治療法の効果に差を生じたと報告された¹⁰⁾。すなわち、PCI施行後5日目ころの細胞投与が最も効率的であると報告された。しかし、本治療の効果が投与細胞数に依存しているか否かについても謎のままである。さらに、個々の症例の骨髄細胞の質、心筋虚血の範囲や程度に応じた至適投与細胞数についても不明である。そのうえ、臨床試験では主に単核球細胞、CD34陽性細胞、間葉系幹細胞の3種類の細胞分画が用いられているが、3者間での治療効果の違いについても十分な比較検討が行われていない。

これまでに列挙した点から見れば、本治療法は問題だらけである。その主な原因は一般の薬物治療と比べ、本治療法が非常に複雑な要素を含んでいるからである。そのため、一つの単純な問題の解決も簡単ではない。また、本治療法の研究開発から臨床試験までの時間が短いことも原因の一つとして挙げられよう。

これらの問題点の解決に向けて、現在では臨床試験と並行して、さまざまな基礎研究が世界中で行われている。それらにより、本治療法に関する課題は十分に解決が可能と思われる。その他に、本治療法における効果を促進する方法の探索や心筋再生の可能性についても研究が行われている^{17,18)}。そして将来、自己骨髄細胞移植による心血管再生療法は難治性虚血性心疾患に対する新しい有効な治療法として期待される。

文 献

- 1) Hamano K, Li TS, Kobayashi T et al: Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis. *Cell Transplant*, 2000, **9**: 439-443.
- 2) 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.
- 3) Fuchs S, Baffour R, Zhou YF et al: Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 2001, **37**: 1726-1732.
- 4) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964-967.
- 5) Jackson KA, Majka SM, Wang H et al: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001, **107**: 1395-1402.
- 6) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, **410**: 701-705.
- 7) Takahashi M, Li TS, Suzuki R et al: Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **291**: H886-H893.
- 8) Hamano K, Nishida M, Hirata K et al: Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J*, 2001, **65**: 845-847.
- 9) Lunde K, Solheim S, Aakhus S et al: Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006, **355**: 1199-1209.
- 10) Schachinger V, Erbs S, Elsasser A et al: Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006, **355**: 1210-1221.
- 11) Assmus B, Honold J, Schachinger V et al: Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006, **355**: 1222-1232.
- 12) Rosenzweig A: Cardiac cell therapy—mixed results from mixed cells. *N Engl J Med*, 2006, **355**: 1274-1277.
- 13) 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.
- 14 Meyer GP, Wollert KC, Lotz J et al: Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*, 2006, **113**: 1287–1294.
- 15 Heeschen C, Lehmann R, Honold J et al: Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation*, 2004, **109**: 1615–1622.
- 16 Li TS, Furutani A, Takahashi M et al: Impaired potency of bone marrow mononuclear cells for inducing therapeutic angiogenesis in obese diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **290**: H1362–H1369.
- 17 Li TS, Hamano K, Suzuki K, et al: Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, **283**: H468–H473.
- 18 Li TS, Hayashi M, Ito H et al: Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of *ex vivo* transforming growth factor- β —preprogrammed bone marrow stem cells. *Circulation*, 2005, **111**: 2438–2445.

Therapeutic Angiogenesis Induced by Bone Marrow Cell Implantation for the Treatment of Ischemic Heart Disease

Tao-Sheng Li and Kimikazu Hamano

Department of Surgery and Clinical Science, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Yamaguchi, Japan

Key words: angiogenesis, ischemic heart disease, bone marrow cells

It has been found that bone marrow cells (BMCs) can produce various angiogenic factors, and some stem cells in bone marrow can differentiate into endothelial cells. The implantation of BMCs has also demonstrated its capability to improve myocardial perfusion and cardiac function in various experimental myocardial infarction models. After performing intramyocardial injection of BMCs in combination with surgical bypass grafting in eight selected patients, we did not detect any adverse effect related to cell therapy during at least five-year follow-up. Many other clinical trials also suggest that the delivery of autologous BMCs improved regional perfusion and cardiac function in patients with ischemic heart diseases. Further extended clinical trials are required to confirm the long-term efficacy and safety of this new therapy. (J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 241–246)