

1. 末梢動脈 自家骨髄単核球細胞移植による血管新生療法

東 幸仁

要 旨：既存の治療が不可能な重症虚血肢に対する細胞移植療法(自家骨髄単核球移植)は、わが国において現在までに多施設で200例以上に施行されていると推定される。同療法は高度先進医療にも指定されており、有効な血管新生、症状の改善や安全性が確認されている。しかし、移植により改善がみられない例も少なくない。細胞移植による血管新生の機序が明らかではなく、解決すべき課題も存在している。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 195-200)

Key words: angiogenesis, cell therapy, autologous bone-marrow mononuclear cell

はじめに

現在、わが国において、閉塞性動脈硬化症の患者数は500万人以上、ピュルガー病の患者数は約1万人と推定されている。近年、生活習慣病の増加に伴い閉塞性動脈硬化症の患者が急増している。閉塞性動脈硬化症患者の10~20%が増悪し、約2%の患者が切断を必要とする重症虚血肢(critical limb ischemia)へと進行する。わが国においては、毎年約1万人の患者が既存の内科的治療、外科的治療に反応せず四肢の切断を余儀なくされている。従来、このような重症例は治療不可能であったが、血管新生という概念が新たな治療の可能性を切り開いている。血管の発生と分化のメカニズムが徐々に解明され、既存の血管からの血管内皮細胞の増殖・遊走といった従来の血管形成に加え、骨髄あるいは血液より動員された血管内皮前駆細胞の分化・増殖により血管新生が生じることが明らかとなってきた^{1,2)}。最近、多くの施設において血管増殖因子を用いた遺伝子治療や細胞移植による血管新生療法が臨床応用され、有効性が示されている³⁻¹⁰⁾。本稿では、われわれの施設での成績を中心に重症虚血性末梢血管疾患に対する自家骨髄細胞を用いた細胞移植治療の有効性、問題点やこれからの課題に関して概説したい。

自家骨髄細胞移植による 血管新生療法の実際

2000年より、最初に日本で始められた重症虚血性末梢血管疾患に対する自家骨髄細胞移植の効果はJapan Trial for Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation(J-TACT) studyとして報告されており、有効性、安全性が確認されている³⁾。われわれも2002年4月よりJ-TACTのプロトコルに従って実施している。

対象：重症虚血性末梢血管疾患(慢性閉塞性動脈硬化症・ピュルガー病)で、Fontaine分類III度およびIV度、Rutherford慢性虚血肢臨床分類II度4群、III度5群および6群に属し、安静時痛または虚血性潰瘍・壊死を有しており、著しく生活の質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者を対象としている。性別は限定していないが、妊娠中および妊娠の可能性のある女性は除外している。原則として20歳以上80歳未満を対象とする。適応除外事項として合併症により余命が1年以内と考えられる者、過去3カ月以内にアルコールもしくは薬物依存の既往のある者、悪性新生物を有する者およびその既往のある者、諸検査により悪性腫瘍の可能性があると判断された者、重症の糖尿病性網膜症を有する者、インフォームドコンセントを得られない者、その他、主治医が不



Figure 1 Autologous bone-marrow mononuclear cell (BM-MNC) implantation.

適当と判断した者は本治療から除外している。

方法：全身麻酔下にて少なくとも 1.0×10^9 個の骨髄単核球を得るために患者腸骨より500~1,000mLの骨髄液採取を行い、比重遠心分離法にて骨髄細胞を骨髄単核球レベルに分離・濃縮する。骨髄液採取に引き続き全身麻酔下にて、骨髄単核球細胞 10^7 個 / 1.0 mL / 1カ所の細胞数にて26G針を用いて虚血四肢骨格筋に50カ所筋肉内注射を行う (Fig. 1)。

成績：かなりの症例で足関節上腕血圧比 (ankle brachial pressure index: ABPI) や組織酸素分圧の上昇、pain free walking timeの延長や自覚症状が改善することは明らかである。筆者らの経験でも約7割の症例 (41例中29例) で症状の改善を認めており、肢の切断に至ったものは41例中5例 (移植後6カ月~2年4カ月経過) である。Fontaine分類のIVである重症例に限定しても、上肢4例、下肢14例の検討において細胞移植後2年間経過観察したところ、上肢ではamputation例なしで、下肢ではminor amputationが2例、major amputationが3例であった。Fig. 2 に足趾潰瘍改善例を提示している。自家



Figure 2 Before and after autologous BM-MNC implantation with 4-week and 10-week of follow-up in patients with limb ischemia.

骨髄を使用することもあり移植片対宿主病などの重篤な副作用の報告はない。同療法の特徴として、術後数日といった早期より疼痛の軽減、消失がみられることが知られている。動物実験モデルでの検討より、通常、血管新生には少なくとも2週間程度を要することより、術後早期の疼痛軽減作用は血管新生による効果ではなく移植時の炎症惹起や移植された細胞からのサイトカイン放出によるものと考えられている。下肢血管造影上で術後改善例がみられるが、多くの症例では術前後で変化を認めない。細胞移植により新生された血管は非常に細径であり、通常の血管造影では確認できない。血管造影で確認できるような新たな血管像を認める例があるが、これは血管新生による新たなネットワークが形成され、血流を失って造影されなかった既存の側副血行路に血流が再開することによると考えられている。

自家骨髄細胞移植を施行しても全く効果が得られない例が20~30%程度みられるが、われわれの施設では、移植後急激に症状が悪化し、major amputationに至った1例を経験している (Fig. 3)。症例は72歳男性の糖尿病合併の閉塞性動脈硬化症の患者であるが、移植



Figure 3 Possibilities of steal phenomenon after autologous BM-MNC implantation in patients with limb ischemia.

前の状態で約半年間緩解増悪を繰り返していたが、細胞移植2週後より潰瘍の増大、急速な壊死への進行がみられた。血管造影が施行できていないので確診はできないが、プロスタグランジン製剤投与時に稀に認められるスチール現象が細胞移植後にも生じた可能性を否定できない。

自家骨髄細胞移植による血管新生の機序

最も問題となるのは、自家骨髄細胞移植による血管新生の正確な機序が解明されていない点にある。ウサギ下肢虚血モデルにおいて、自家骨髄単核球細胞移植による血管新生は移植細胞の血管内皮細胞への分化による可能性が示されている¹¹⁾。しかしながら、ヒトにおいては移植した骨髄細胞(骨髄単核球)は血管内皮細胞に直接分化するのか、分化するとすれば移植細胞のどの程度の確率で内皮細胞に分化するのかなど不明である。骨髄細胞に含まれる種々の細胞から血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)などのサイトカインを合成・放出することにより二次的に血管内皮細胞を動員する可能性も考えられる(Fig. 4)²⁾。現在、遺伝子治療同様にサイトカインによる血管内皮前駆細胞の動員が主な機序と考えられている。

自家骨髄細胞移植と血管内皮機能

単純に血管が形成されただけでは臨床的に有効な血管新生といえない。なぜなら、腫瘍血管や糖尿病性網膜症も血管新生によりもたらされた血管であるが、異常増殖あるいは易出血性や血栓形成傾向があったりであるとか正常機能を有する血管とはいえない。これら

病的血管はフィードバックして病態自体をさらに悪化させている可能性もある。したがって、血管新生療法により作られた血管が正常な機能を有するか否かは临床上重要な問題である。血管内皮機能は動脈硬化の発症・維持・進展に非常に重要な役割を果たしている。新生血管の機能を評価するうえで、血管内皮機能はそのターゲットとなり得る。これまでの内科的治療により改善がみられず、血行再建術の適応のない重症下肢虚血患者7人に対し、自家骨髄単核球細胞移植を行い、治療前後で血管内皮機能を評価した。投与した総細胞数は $1.6 \times 10^9 \pm 0.3 \times 10^9$ 個でCD34陽性細胞を $3.6 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^7$ 個含んでいた。細胞移植4週後、ABPIは 0.33 ± 0.21 から 0.39 ± 0.17 に($p = 0.06$)、組織酸素分圧は 28.4 ± 11.5 から 36.6 ± 5.2 mmHg($p = 0.03$)に上昇、pain free walking timeは 0.8 ± 0.6 から 2.9 ± 2.2 分($p = 0.02$)に延長した。細胞移植は内皮依存性血管拡張物質であるアセチルコリンに対する下肢血流量を 19.3 ± 6.8 から 29.6 ± 7.1 mL/min per 100mLに増加させたが、内皮非依存性血管拡張物質であるニトロプルシッドに対する血管拡張作用は変化させなかった(Fig. 5)³⁾。これまで、血管内皮機能障害は不可逆的なものではなく薬物治療、補充療法、生活習慣の修正などにより改善可能であるとの報告がなされている^{13, 14)}。しかし、血管内皮機能が著しく障害された段階では可逆性でないことも報告されている¹⁵⁾。重症末梢血管疾患の血管内皮機能障害も通常の薬物治療では改善不可能な最終的な段階にあると考えられる。事実、このような症例では血管内皮機能改善以前の問題として、肢自体の切断という状況に陥ることが多い。自家骨髄細胞移植により

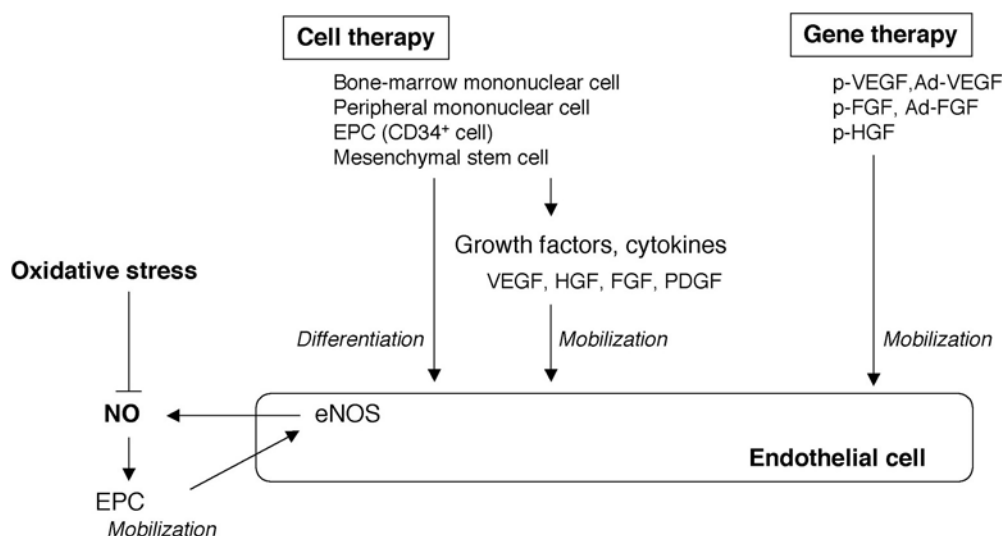


Figure 4 Relationship between EPC mobilization / differentiation and angiogenesis by cell- and gene therapy. Modified from reference 12.

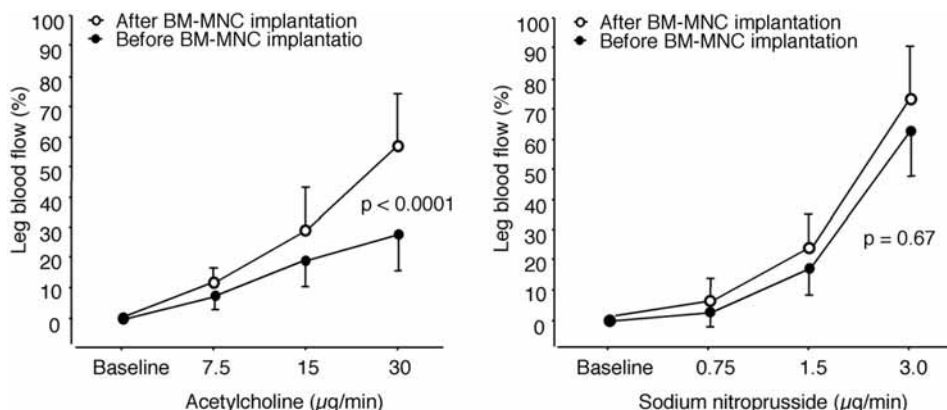


Figure 5: Endothelial function before and after autologous bone-marrow mononuclear cell (BM-MNC) implantation with 4-week follow-up in patients with limb ischemia. Modified from reference 4.

わずかではあるが血管内皮機能を改善できることは、本来の血管内皮機能を取り戻すという意味でも臨床に非常に重要である。自家骨髄細胞移植が血管内皮機能を改善する詳細な機序に関しては不明である。

自家骨髄細胞移植：今後の課題

自家骨髄細胞移植は、血管新生の機序が明確でない、無効例が20～30%存在する、移植によりさらに増悪する可能性を否定できないという事実はあるが、同療法の適応となる全例が既存治療の限界から major amputa-

tionの絶対適応とされているにもかかわらず、細胞移植を受けた患者の70%に症状の軽快が認められ、major amputationとなるのは約10%であることも事実である。自家骨髄細胞移植は臨床現場において、十分に重症虚血性末梢血管疾患の治療戦略の一つとなり得る。しかし、今後、解明すべきあるいは解決すべき課題が存在している。

大量の骨髄液採取：これまで重症虚血性末梢血管疾患に対する自家骨髄単核球細胞移植の有用性は明らかになっているものの、大量の骨髄採取を必要とす

るため採取時に全身麻酔あるいは腰椎麻酔を必要としてきた。従来の骨髄単核球細胞移植では、患者負担や手技の問題から移植が1回程度に限定されていた。症例によっては追加移植、あるいは定期的な移植が効果的と考えられる例がある。これらの課題に対して、われわれは、患者負担軽減のため少量の骨髄液を採取して血管内皮細胞に分化すると考えられる骨髄間葉系幹細胞を取り出し培養増殖して移植に用いることを試みている。最近、非常に効果的で安全な自家骨髄間葉系幹細胞増殖法を確立しており、同時に、実用化に向け自動培養増殖装置を開発し稼働させている。これは、5mL程度の骨髄採取であれば、約2週間で一般的に必要な 1×10^6 個の細胞に急速増殖可能な方法であり、最初に細胞を培養器に入れた後は無菌的に目標細胞数まで培養・増殖を自動的に装置の中で完結できる。本法はリスクの軽減につながるばかりではなく骨髄単核球細胞移植よりも有効である可能性がある。さらに、骨髄間葉系幹細胞をバンク化することにより、必要な時に移植可能となる。胚性幹細胞がまだ臨床応用されていない現況では、安全かつ大量に得られる自家骨髄間葉系幹細胞の利用が期待される。負担の少ない効果的な移植への道を開くことは重要である。

至適細胞数の設定：動物実験モデルの結果から、ヒトでの移植骨髄単核球数が推定されて投与されているが、十分な血管新生のための至適移植細胞数は明らかでない。移植細胞数が多ければ、血管新生効果が大きくなることが期待される。現行の方法で骨髄細胞を採取するのであれば、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 個程度の骨髄単核球を得るのが限界である(500~700mLの骨髄液採取では 1×10^{10} 個の骨髄単核球を得るのは不可能である)。では、少ない数の細胞の移植で現在得られている効果を再現できるのであるか。ヒトでの細胞数/血管新生効果の検討は検討されていないため不明であるが、 1×10^6 個程度の骨髄単核球しか得られなかった例でも良好な経過をたどっている例を経験している。細胞移植の際、安全性を加味した至適細胞数の検討も必要である。

対象の選択：現在、われわれの施設でも、既存治療に反応しない肢切断例を移植対象としているが、さらに早期の段階(Fontaine IIやFontaine IIIの早期)で移植を行ったほうが有効である可能性が考えられる。適応拡大等再考する必要性がありそうである。

遺伝子治療との比較：これまで肢の切断しか治療

の選択肢がなかった重症虚血性末梢血管疾患にとって、自家骨髄細胞移植や血管増殖因子のプラスミドなどを用いた遺伝子治療は、血管新生という新たな治療を可能とした。細胞治療と遺伝子治療のどちらが優れているかとの比較検討はなされていない。さらに、両治療のハイブリッドは非常に期待されるが、いずれの治療法も個々の治療の有効性、安全性や長期予後を検討しきれていない状況にあるために、これらの検討もなされていない。今後、血管新生に関するさらなる知見が集積されることにより解答が得られるものと期待する。また、レニン・アンジオテンシン系阻害薬、スタチン、抗血小板薬、5-HT_{2A}拮抗薬、PGE₁誘導体、PGI₂誘導体、PDE阻害薬などの薬剤が新生された血管を保護、維持するのに有効であることが確認されている。これらの組み合わせは新しい重症虚血性末梢血管疾患の治療戦略となり得る。

費用：新たな治療を行う際、費用の面は避けて通れない。血管新生治療を受けるために入院して精査(一般検査、血管造影や癌の有無をはじめとした全身チェックなど)し、細胞移植治療を受けた場合、自己負担であれば200~400万円程度の費用を要する。自家骨髄細胞移植による血管新生療法は、ある程度の症例数を経験することで、高度先進医療への申請が可能である。今後、同療法の安全性、有効性が確認できれば、一般保険で診療できることを期待する。

おわりに

これまで肢の切断しか治療の選択肢がなかった重症虚血性末梢血管疾患にとって、自家骨髄細胞移植による細胞治療は、血管新生という新たな治療を可能とした。さらに、自家骨髄細胞移植は既存の治療では回復不可能と考えられていた重症の血管内皮機能障害を改善できることが明らかとなった。動脈硬化の発症・維持・進展に重要な役割を果たしている血管内皮機能を改善する臨床的意義は大きい。いずれにせよ、細胞移植療法が開始されて7年程度であり、長期予後に関してもまだ十分な報告が得られていない。今後も注意深く経過を観察し、有効性や安全性を考慮する必要がある。さまざまな課題をクリアしたうえで、細胞移植治療が、これまで肢切断しかなく、日々疼痛に苦しむ重症虚血性末梢血管疾患患者の治療戦略のひとつとして確立されることを願ってやまない。

文 献

- 1) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science*, 1987, **235**: 442–447.
- 2) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964–967.
- 3) 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*, 2002, **360**: 427–435.
- 4) 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.
- 5) Umemura T, Nishioka K, Igarashi A et al: Autologous bone marrow mononuclear cell implantation induces angiogenesis and bone regeneration in a patient with compartment syndrome. *Circ J*, 2006, **70**: 1362–1364.
- 6) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R et al: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet*, 1996, **348**: 370–374.
- 7) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O et al: Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 1998, **97**: 1114–1123.
- 8) Makinen K, Manninen H, Hedman M et al: Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther*, 2002, **6**: 127–133.
- 9) Shyu KG, Chang H, Wang BW et al: Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. *Am J Med*, 2003, **114**: 85–92.
- 10) Comerota AJ, Throm RC, Miller KA et al: Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J Vasc Surg*, 2002, **35**: 930–936.
- 11) Rajagopalan S, Shah M, Luciano A et al: Adenovirus-mediated gene transfer of VEGF (121) improves lower-extremity endothelial function and flow reserve. *Circulation*, 2001, **104**: 753–755.
- 12) Higashi Y, Nishioka K, Umemura T et al: Oxidative stress, endothelial function and angiogenesis induced by cell therapy and gene therapy. *Curr Pharm Biotechnol*, 2006, **7**: 109–116.
- 13) Celermajer DS: Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol*, 1997, **30**: 325–333.
- 14) Higashi Y, Yoshizumi M: Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacol Ther*, 2004, **102**: 87–96.
- 15) Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K et al: Severity of hypertension affects improved resistance artery endothelial function by angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, **39**: 668–676.

Therapeutic Angiogenesis with Autologous Bone-marrow Mononuclear Cell Implantation

Yukihito Higashi

Department of Cardiovascular Physiology and Medicine, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima, Japan

Key words: angiogenesis, cell therapy, autologous bone-marrow mononuclear cell

Autologous bone-marrow mononuclear cell (BM-MNC) implantation increases collateral artery formation, thereby improving limb ischemic symptoms in patients with critical limb ischemia who have no other treatment option. Interestingly, a drastic change in endothelial function is observed in these patients after BM-MNC implantation. BM-MNC implantation therapy is likely to provide a new aspect of therapeutic angiogenesis. This review presents 1) the background of cell therapy, 2) its safety and feasibility, 3) putative mechanisms of BM-MNC implantation, and 4) its limitations in patients with critical limb ischemia. (J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 195–200)

Online publication June 8, 2007