

1. 末梢動脈 血管内皮前駆細胞移植による血管再生治療

川本 篤彦^{1,2} 浅原 孝之¹⁻³

要 旨：血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)は、骨髄から末梢血への動員、血管形成部位への生着、同部位での増殖・分化・遊走を経て、新規血管発生に貢献している。近年、虚血性疾患に対するEPC移植による血管再生治療に関する基礎・前臨床研究が発展し、現在では欧米を中心に初期段階の臨床試験も開始されている。当施設でも重症慢性下肢虚血患者を対象にしたG-CSF動員CD34陽性細胞移植による血管再生治療臨床試験を実施中で、現在、最終登録症例における有効性・安全性を評価中の段階である。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 201-207)

Key words: endothelial progenitor cell, stem cell, peripheral artery disease

はじめに

血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)とは、未分化で分化能・増殖能に富み、かつその発生運命が血管内皮細胞系列にほぼ規定された細胞、つまり血管内皮へ分化し始めた細胞(血管の幹細胞)である。1997年に成人の末梢血から初めてEPCが発見¹⁾されて以来、今年で10年目を迎えるが、この間にEPCの生理的・病理的な体内動態、EPCの治療適用等に関する研究が進み、EPCの臨床的重要性が強く認識されてきた。本稿では、EPCの生物学的特性を生かした血管再生治療のコンセプト、これまでの基礎・臨床試験成績、さらに将来の展望について、自験例を中心に概説したい。

EPCの成体内での動態

成体における血管形成は、炎症、虚血、損傷、腫瘍形成などのさまざまな生理学的・病理学的現象の際に観察されるが、その機序として成熟血管内皮細胞の増殖・遊走による血管新生(angiogenesis)が従来から提唱

され、血管内皮成長因子、線維芽細胞成長因子、肝細胞成長因子など種々の血管新生因子が同定されてきた。しかし、EPCの成人末梢血からの発見以来、成体における血管形成には、血管新生のみならず、EPCの循環血から局所への生着および同部位での分化・増殖・遊走による血管発生(vasculogenesis)現象も貢献していることが明らかになった。また、骨髄移植マウス等を用いた基礎研究によると、EPCは成体内では骨髄に多く分布しているが、虚血・炎症・創傷・腫瘍形成等の病態の存在下、またはgranulocyte colony stimulating factor(G-CSF)・granulocyte and macrophage colony stimulating factor(GM-CSF)等のサイトカインやエストロゲン等のホルモン投与により骨髄から末梢血へ強制動員され、循環血を介して血管形成部位へ辿り着き、血管形成に貢献する^{2,3)}(Fig. 1)。これらの知見は、血管再生治療のためのEPCの採取・分離法の確立にも役立っている。また、最近の臨床研究で、EPCの生理学的重要性が深く認識されるようになってきた。すなわち、糖尿病症例や動脈硬化危険因子の多数保有症例では、健常者に比して流血中のEPC数が少なく、かつその増殖能・遊走能等も低いことが報告された^{4,5)}。また、流血中のEPC数の少ない動脈硬化患者では心血管系の予後不良因子を多数保有しており、血管内皮機能も低下し

¹先端医療センター血管再生研究グループ

²理化学研究所発生・再生科学総合研究センター幹細胞医療応用研究チーム

³東海大学医学部基盤診療系再生医療科学

2007年3月27日受理

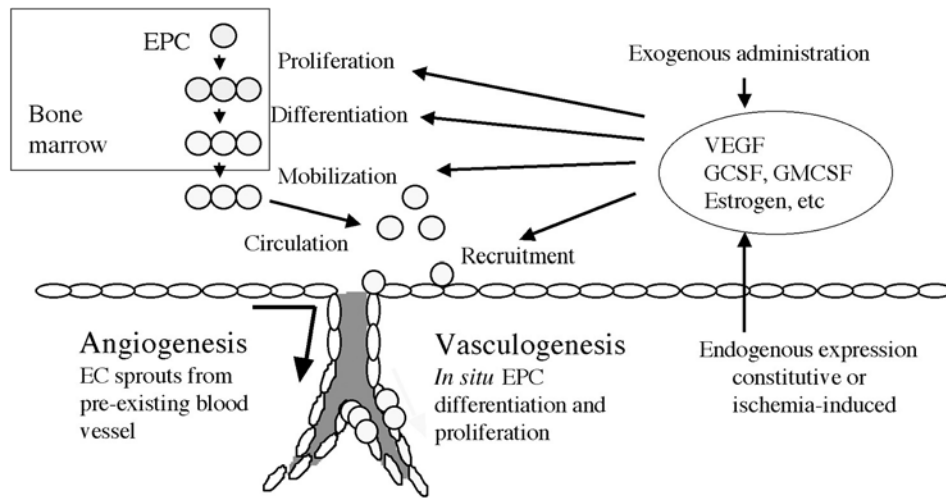


Figure 1 Kinetics of endothelial progenitor cells (EPCs) in physiological and pathological conditions.

ていることが報告⁶⁾された。つまり、EPCは動脈硬化患者の予後を規定する重要な内因性因子の一つであることが判明してきた。

虚血性疾患に対するEPC移植による血管再生治療(前臨床研究)

上記のようにEPCの体内動態が明らかになるにつれて、その治療適用に向けた研究が注目を集めてきた。Kalkaら⁷⁾は、健康人の末梢血単核球を培養して得られたEPCをヌードマウスの下肢虚血モデルに移植した。EPCを下肢虚血2日後に静脈内投与すると、移植された細胞が虚血部位に集積し、マウス由来の血管内皮細胞と共同して血管再生に貢献していることが組織学的に確認された。組織学的な毛細血管密度やレーザードプラ法による虚血肢の血液灌流も、細胞移植後に有意に改善した。この結果、重症虚血後壊死に対する下肢温存率が、対照群でそれぞれ7~8%にすぎなかったのに対し、EPC移植群では59%と著明に改善した。Muroharaら⁸⁾もヒト臍帯血から採取したEPCを下肢虚血ヌードラットに移植し、同様に良好な成績を報告している。これらの基礎研究成果をもとに、EPC移植による下肢虚血に対する血管再生治療の臨床試験が開始されている(後述)。

著者ら⁹⁾は、ヌードラットの左前下行枝結紮モデルに対して、健康人末梢血由来の培養EPCを静脈内投与

した。蛍光標識されたEPCは、心筋虚血モデルでも標的臓器に選択的に集積し、ラット由来の内皮細胞と共同して虚血部での血管再生に寄与していた。特筆すべきことに、移植されたEPCは、非虚血部心筋へはほとんど集積していなかった。EPC移植により、移植4週後での毛細血管密度の増加、左室リモデリングの抑制効果が認められた。これらの組織学的な治療効果に伴って、心エコー図による左室機能(左室内径短縮率、局所壁運動スコアなど)の改善効果も認められた。Kocherら¹⁰⁾は、G-CSFにより強制動員されたヒト末梢血CD34陽性細胞をヌードラットの心筋虚血モデルに静脈内投与した。移植されたCD34陽性細胞は、前述した培養EPC移植と同様の治療効果を示し、梗塞部周囲心筋のアポトーシスも抑制した。さらに筆者ら¹¹⁾は、前臨床研究としてブタ慢性心筋虚血モデルを用いて、自家EPCの心筋内移植を試みた。実際の手技としては、EPCを経カテーテル的にNOGA心内膜マッピングガイド下に虚血領域へ選択的に移植した。この前臨床研究でも、EPC移植による心筋虚血の軽減効果・心機能の改善効果が確認されている。

重症の虚血性心疾患に対する再生医療のアプローチとしては、血管再生だけではなく心筋再生も重要である。従来、EPC移植では血管のみが再生される(心筋は再生されない)と考えられたため、心機能の改善という面で治療効果の限界が指摘されてきた。しかし、上述

したように、急性・慢性心筋虚血でEPC移植後に虚血部位の血液灌流のみならず左室収縮能も改善することが明らかになっている。また、最近の研究では、*in vitro*における心筋細胞との共培養¹²⁾、*in vivo*での虚血心筋内への移植実験¹³⁾でEPCが心筋細胞にも分化し、梗塞心筋の再生に貢献し得ることが判明しており、今後の研究の発展が期待される。

臨床適用のためのEPC採取・分離法

現在、移植に必要なEPCの採取法、分離法の検討が進んでいる。方法の一つは、EPCの表面マーカー(CD34, AC133等)に対する抗体を用いて、末梢血あるいは骨髄の単核球からEPCを分離する方法(fresh isolation法)である。ただし、上記の表面マーカーはEPCと造血幹細胞に共通しているため、分離された細胞の中には造血幹細胞も混入している。今後、EPCに対するより特異的なマーカーの発見が求められている。その一方で、fresh isolation法は、造血幹細胞移植ですでに臨床適用されており、Isolex(Baxter社)、CliniMACS(Miltenyi Biotec社)などの磁気細胞分離装置を用いれば、滅菌された閉鎖回路内で細胞を簡便に分離でき、細胞の培養・加工を要さない。また、これらの装置を用いて分離されたCD34陽性細胞やAC133陽性細胞を造血幹細胞として移植した臨床経験の中では、細胞移植による副作用は報告されていない。したがって、fresh isolation法は、EPCの純度の点で若干の問題を残してはいるものの、分離技術および安全性が確立されている面から、臨床適用の初期段階に適した方法と考えられる。臨床における細胞採取源としては、骨髄または末梢血が中心になるが、これまでの基礎研究成果から、CD34陽性細胞(またはAC133陽性細胞)の有効用量は 10^6 個/kg以上と考えられるので、骨髄では全身麻酔下での大量採取、末梢血ではG-CSFなどのサイトカインを用いて骨髄細胞を末梢血に強制動員させた後にアフエーシスでより多数の細胞を採取する等の戦略が必要である。

これに対して、末梢血・骨髄の単核球やfresh isolation法で分離されたEPC分画を培養増幅し、より多数のEPCを採取する方法(*ex vivo* expansion法)もある。より多数のEPCが得られるようになれば、局所麻酔下での少量の骨髄採取や低用量のG-CSF投与による少量の末梢血幹細胞採取でも治療効果を期待できるようになり、

治療侵襲・有害事象の軽減が期待できる。*ex vivo* expansion法では、使用する細胞や培地、培養期間等によって得られるEPCの数、純度、移植時の治療効果が一様でないが、これまでに報告された範囲内では、単核球の培養では血清の使用が必須(同種移植時には不適切)であり、増幅効率・EPC純度も不十分なようである。われわれが最近確立した培養法では、fresh isolation法で得られたCD34陽性細胞あるいはAC133陽性細胞を無血清培地で効率よく増幅することを可能にした。増幅された細胞は、さらに培養を続けるとEPCコロニーを確実に形成することも観察している。いずれにせよ、*ex vivo* expansion法では、細胞の培養・加工を行うので、臨床適用に際してはcell processing center(CPC)施設の整備が必須であり、当初は限られた施設でのみ実施し得る次世代治療といえる。

EPC移植の臨床適用の現況

虚血性疾患に対するEPC移植に関する基礎研究、前臨床研究に引き続いて、同細胞移植の臨床適用も開始されている。Stammら¹⁴⁾は、心筋梗塞患者に対する冠動脈バイパス手術中に自家骨髄AC133陽性細胞の心筋内移植も併用し、術後に左室機能と心筋灌流が改善したという。Assmusら¹⁵⁾は、心筋梗塞患者への急性期血行再建の後に11例に自家末梢血培養EPC、9例に自家骨髄単核球を移植した。両移植群で左室収縮能および左室viabilityが同等に改善したという。これらの成績は、虚血性疾患に対するEPC移植の臨床的有用性を示唆しているが、現時点ではパイロットスタディのレベルにとどまっている。今後、細胞培養法の改善、治療群・対照群の設定、治療効果の評価システムなどについて、さらに科学的な検証が必要である。最近になって、米国St. Elizabeth's Medical CenterのLosordoら¹⁶⁾は慢性重症虚血性心疾患患者24例に対するG-CSF動員自家CD34陽性細胞の経カテーテル的心筋内移植臨床試験(二重盲検プラセボ対照用量漸増試験)を行った。同細胞移植による重篤な有害事象は発生せず、各群の症例数が少ないため治療効果を統計学的には解析していないが、心筋虚血に関する自覚所見(狭心発作頻度、負荷心筋シンチ所見等)はプラセボ群に比してCD34陽性細胞移植群で改善度の大きい傾向が認められているという。この結果を踏まえて、さらに大規模な多施設共同研究が開始されており、その成果が注目されている。

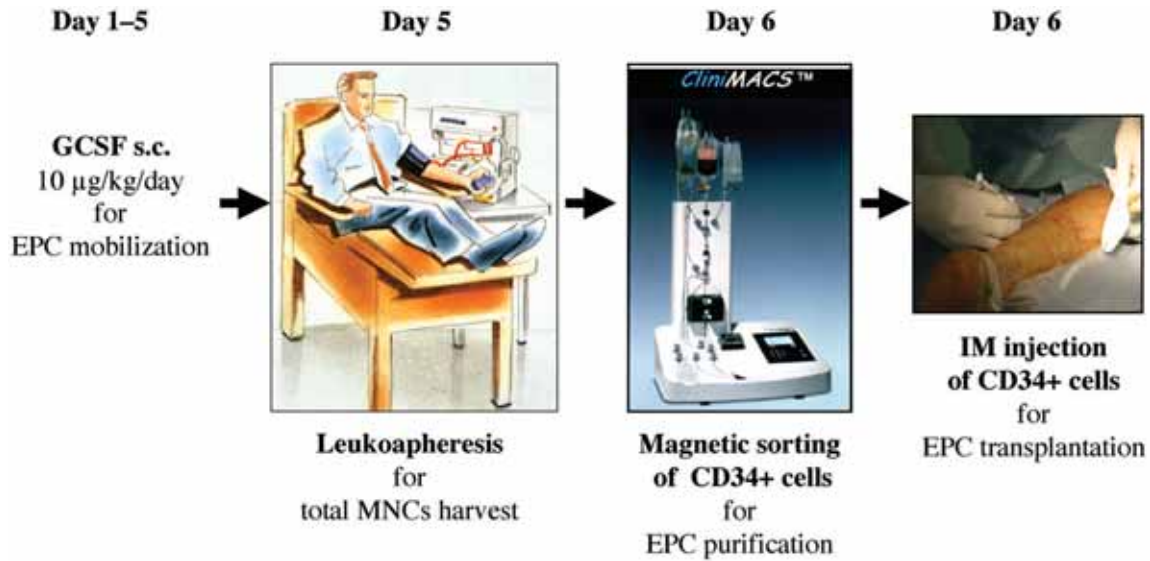


Figure 2 Methods of cell harvest, purification and transplantation of autologous CD34+ cells for patients with critical limb ischemia in our clinical trial.

当施設におけるEPC移植臨床試験

上記のように欧米でEPC移植による血管再生治療の臨床試験が開始されているが、そのほとんどが虚血性心疾患を対象にしており、著者らが調査した限りでは下肢虚血性疾患を対象とした系統的な臨床試験成績は報告されていない。

当研究室では、2003年11月から慢性重症下肢虚血に対する自家CD34陽性細胞移植による血管再生治療に関する第I/II相臨床試験を開始している。試験デザインは単盲検下での用量漸増試験である。対象はFontaine分類III度、IV度の慢性重症下肢虚血患者(閉塞性動脈硬化症、パージャー病)で、血管形成術やバイパス手術の適応にならない重症例である。EPCの採取・分離法は、GCSFの皮下投与(基本用量10µg/kg/day, 5日間)により骨髓から末梢血へ動員された単核球をアフレーションで採取した後に、磁気細胞分離法により単核球中のCD34陽性細胞をEPC分画として分離している。CD34陽性細胞の投与は腰椎麻酔下に行い、治療効率を高めるため虚血下肢筋肉内への局所投与としている(Fig. 2)。CD34陽性細胞の移植用量は、低用量(10⁵個/kg)群から開始し、順次中用量(5 × 10⁵個/kg)・高用量(10⁶個/kg)群へと移行した。各症例における試験治療の効果・

安全性は、細胞移植の1年後まで追跡している。本試験は医師主導の第I/II相臨床試験ではあるが、方法・結果の科学性・再現性を担保し得る詳細な臨床試験実施計画書(プロトコル)および概要書に基づいて実施されている。症例登録・データ解析は独立したデータセンター(臨床研究情報センター)で実施し、試験成績の客観性を確保している。また、有害事象については、米国National Cancer Instituteの共通毒性基準に基づいて、重症度を客観的に評価している。さらに、治療の効果・安全性については、外部専門家で組織された独立データモニタリング委員会において最終評価を受けている。

現在までに17症例を登録し、登録した全例でCD34陽性細胞移植を実施した。第17例目を最終エントリー症例として本年1月に治療し、現在経過観察中である。中間解析を最終症例の治療3カ月以降で実施する予定であり、現状ではいまだ詳細は不明であるが、これまでに細胞の採取・移植に関連した重篤な有害事象は発生しておらず、下肢虚血性疼痛、足趾血圧、経皮的酸素分圧、最大歩行距離等の有意な改善が認められている。特筆すべき成果は、全例で下肢大切断を回避し、歩行機能を温存し得た点である。以下に代表的な1症例を提示する。



Figure 3 A clinical case with Buerger disease showing healing of toe necrosis (arrows) after CD34+ cell transplantation.

症 例：20歳，男性

診 断：バージャー病

治療前重症度：Rutherford分類III度 5 群，Fontaine分類IV度

既往歴：3～13歳 気管支喘息，11歳 左下腿裂傷

現病歴：2003年 8 月より左第 3 趾・5 趾の潰瘍のため入院し，下肢血管造影所見等からバージャー病と診断された。内服・点滴治療，硬膜外麻酔，局所治療を受けたが改善しないため，血管再生治療を目的に当センターへ転院した。

喫煙歴：20本 / 日 × 4 年

合併症：なし

治療前血管造影所見：左下肢；前脛骨動脈の途絶，後脛骨動脈のび慢性狭窄。右下肢；前脛骨動脈・腓骨動脈の途絶，後脛骨動脈のび慢性狭窄。

治療経過：

GCSF皮下注射：day 1～3；10 μ g/kg/d，day 4；5 μ g/kg/d，day 5；10 μ g/kg/d

アフエーシス(day 5)：処理血液量10L，採取単核球数 2.9 × 10¹⁰個

CD34陽性細胞磁気分離(day 6)：分離CD34陽性細胞数 2.0 × 10⁸個

CD34陽性細胞移植(day 6)：移植CD34陽性細胞数6.6 × 10⁶(10⁵/kg)個

効果判定：

各評価項目	治療前	4 週後	12週後	1 年後
下肢虚血性疼痛 (FACES pain rating scale)	2	1	0	0
Toe brachial pressure index(TBPI)	0.04	0.35	0.40	0.54
潰瘍 / 壊死サイズ				
左第 3 趾潰瘍 / 壊死(mm)	33/25	10/4	2/0	0/0
左第 5 趾潰瘍 / 壊死(mm)	20/16	10/0	2/0	0/0

有害事象：

grade 3～5(severe to death)：出現せず

grade 2(moderate)：LDH一過性上昇

grade 1(mild)：腰痛，脾腫，ALP・CRP一過性上昇，ヘモグロビン一過性低下

総 括：血管再生治療後に下肢虚血性疼痛の消失，血行障害の改善，難治性潰瘍 / 壊死の治療が認められ，下腿・足趾を温存し得た(Fig. 3)。有害事象はすべて一過性の軽度のものであり，治療を要さなかった。患者は退院後，社会生活に復帰し，肉体労働(倉庫管理)も続けている。余暇には野球等のスポーツも楽しんでいる。

また、筆者らは重症慢性心筋虚血患者に対しても、自家末梢血EPC移植治療に関する第I/II相臨床試験を計画中である。本試験でも、下肢虚血患者への治療の場合と同様に、G-CSF製剤によるEPCの強制動員・アフェレーシスによる末梢血単核球採取・磁気細胞分離システムによるCD34陽性細胞分離を行う。心筋虚血例での細胞移植は、NOGAマッピングガイド下に虚血部位へ経カテーテル的に行う予定である。これらの臨床試験は、神戸医療産業都市構想の一環として設立された先端医療センター(開発・治療部門)・臨床研究情報センター(データ管理部門)・神戸市立中央市民病院 治療部門および岡山大学循環器内科との共同プロジェクトとして施行されている。

おわりに

EPC移植による血管再生治療について、背景となる細胞生物学的知見から前臨床試験成果、さらに臨床試験成績まで概説した。今後は、本治療の有効性・安全性を大規模試験(多施設・ランダム化対照試験)でさらに科学的に検証していく必要がある。その一方で、動脈硬化患者、糖尿病患者等では循環血液中のEPC数とその機能低下が知られており、自家細胞を用いた治療に限界があることも示唆される。今後は、EPCの培養増幅や遺伝子導入による機能回復等の新しい治療の開発も切に望まれ、その基礎データとしても、現行のCD34陽性細胞移植治療の試験成績は非常に興味深い。

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) Asahara T, Masuda H, Takahashi T et al: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, **85**: 221–228.
- 3) Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 1999, **5**: 434–438.
- 4) Tepper OM, Galiano RD, Capla JM et al: Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, 2002, **106**: 2781–2786.
- 5) Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A et al: Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 2001, **89**: E1–E7.
- 6) Hill JM, Zalos G, Halcox JP et al: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 2003, **348**: 593–600.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H et al: Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 2001, **103**: 634–637.
- 10) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ et al: Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 2001, **7**: 430–436.
- 11) Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J et al: Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*, 2003, **107**: 461–468.
- 12) Murasawa S, Kawamoto A, Horii M et al: Niche-dependent translineage commitment of endothelial progenitor cells, not cell fusion in general, into myocardial lineage cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**: 1388–1394.
- 13) Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M et al: Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation*, 2006, **113**: 1311–1325.
- 14) Stamm C, Westphal B, Kleine HD et al: Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*, 2003, **361**: 45–46.
- 15) Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al: Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 2002, **106**: 3009–3017.
- 16) Losordo DW, Kearney M, Patel S et al: Randomized, double blind, placebo controlled pilot trial of intramyocardial autologous CD34 cell therapy for intractable angina. Scientific Session, American Heart Association, 2006, Abstract.

Transplantation of Endothelial Progenitor Cells for Vascular Regeneration

Atsuhiko Kawamoto^{1,2} and Takayuki Asahara¹⁻³

¹Vascular Regeneration Research Group, Institute of Biomedical Research and Innovation, Hyogo, Japan

²Laboratory for Stem Cell Translational Research, RIKEN Center for Developmental Biology, Hyogo, Japan

³Department of Regeneration Medicine Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

Key words: endothelial progenitor cell, stem cell, peripheral artery disease

Endothelial progenitor cells (EPCs) contribute to postnatal vasculogenesis through mobilization from bone marrow into circulation, recruitment into sites of neovascularization and differentiation/proliferation/migration at the recruited region. Following promising results of the preclinical studies regarding EPC transplantation for therapeutic vasculogenesis, several pilot clinical trials started for ischemic patients. In our institution, a phase I/II clinical trial of CD34+ cell transplantation in patients with critical limb ischemia has launched and the enrollment and treatment (cell therapy) for the last patient has been just completed. Final results of the ongoing trial are expected to be out in the near future. (J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 201–207)