

単核球を用いた血管再生治療

館野 馨 森谷 純治 南野 徹 小室 一成

要 旨：先進国における死因・罹患率のトップである虚血性疾患の新たな治療戦略として、単核球を用いた血管再生治療が注目されている。すでに重症下肢虚血および急性・慢性期の心筋梗塞に対して、骨髓単核球移植療法が一定の有用性と安全性を持つことが報告されている。しかし血管再生治療には解決すべき重要な問題点も多く存在する。本稿ではこれらの事項について現状を概説したい。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 483-489)

Key words: ischemic diseases, growth factors, stem cells, regeneration

はじめに

動脈硬化ならびにこれによる虚血性疾患は、先進国における死因・罹患率のトップ疾患である。これらに対する治療技術に多くの進歩があったにもかかわらず、救い得ない患者が多く苦しんでいるのが現状であり、新たな治療戦略が求められていた。近年、分子生物学、発生学ならびに組織工学の急速な進歩により再生医療の道が開かれ、脚光を浴びるようになってきた。再生医療とは、病気や損傷により機能低下や機能不全に陥った組織・臓器に対して、細胞の機能・再生機能を有効に活用して、組織・臓器の機能を再生させる医療と定義されている。再生医療は多くの臓器・病態の分野において目覚ましい発展を遂げているが、虚血性疾患も例外ではない。虚血性心疾患、重症下肢虚血に対する血管再生治療が世界規模で行われており、すでにその安全性・有用性について一定のエビデンスも確立しつつある。本稿ではこの血管再生治療について概論を述べつつ、今後解決すべき問題点を提起したい。

血管再生の機序

近年、組織中に新たな血管ができる現象について詳細な分子機序や細胞の動態が解明されてきた。この機序は一般に血管新生(広義)と呼ばれている。このほか

に狭義の血管新生とよばれる重要な事項もあるが(後述)、本稿では混乱を避けるため前者を血管再生、後者を単に血管新生と記すことにする。さて、この血管再生には大きく分類して3つのメカニズムが知られている¹⁾。組織が虚血に陥ると、既存の血管内皮細胞が増殖・遊走し新しい血管が芽出する現象がみられる。これを(狭義の)血管新生(angiogenesis)と呼ぶ。また、虚血部位に至る既存の血管が再構築(remodeling)を受け太くなり、新生した血管へ血流を補給する導管となる。この機序は側副血行路形成(arteriogenesis)と呼ばれている。さらに骨髓に由来する細胞が血流を介して虚血部位に到達し、血管内皮や周皮細胞へと分化することでこれらの機序を補強するといわれている[脈管形成(vasculogenesis)]。さらに以上の細胞動態はVEGF(vascular endothelial growth factor: 血管内皮増殖因子)、FGF(fibroblast growth factor: 線維芽細胞増殖因子)など多種多様な増殖因子によって制御されることもわかっている^{2, 3)}。増殖因子は虚血により浸潤した炎症細胞や、間葉系細胞、筋細胞などから分泌され、一連の血管再生を調和させている。以上の機序に関与する細胞や増殖因子などを有効に活用することで組織の虚血を緩和することができると考えられた。これを血管再生治療[または血管新生治療(therapeutic angiogenesis)]と呼んでいる。

初期の血管再生治療

先述のとおり血管再生はVEGFやFGFなどの増殖因子によって制御されており、これらを実験動物の虚血部位へ投与すると、治療的な血管再生がもたらされる^{2,3)}。その臨床応用は1994年に遡り、米国タフツ大学で閉塞性動脈硬化症患者に対するVEGF165遺伝子治療として開始された。以来、VEGF・FGF等を用いた合成タンパク治療・遺伝子治療の臨床試験が数多く行われ^{4,5)}、phase I試験では比較的良好な結果が得られた。しかし残念なことに、増殖因子補充療法のphase II試験は、いずれも有意な臨床効果を示せずして終了してしまっている⁶⁾。その理由として、増殖因子の組織発現効率が不十分であった点や、単剤補充療法では機能的な血管再生をもたらすには不十分であった可能性が指摘されており、これらを解決すべく、現在、複数の増殖因子の組み合わせや新たな遺伝子ベクターが試みられている。また、重症虚血性疾患の患者では糖尿病・高血圧などさまざまな疾病背景を合併しており、治療に対する反応性が低下していることも治療効果が不十分であった原因であろうと考えられている^{6,7)}。

しかし筆者はこのほかに、血管再生治療という言葉にも落とし穴があったのではないかと感じている。重症虚血の病態は単に血流が不足しているだけの問題ではなく、筋・神経などの脱落・変性を伴った組織全体の傷害である。もし虚血筋組織の自己再生能力が保持されていれば、血流を再開するだけで組織全体の機能回復が得られるであろう。しかし加齢等によって組織構成細胞の自己再生能力が低下した個体の場合では、血管再生のみが生じても組織再生には結びつかず、せっかく再生した血管もやがては退縮してしまい、結果として十分な臨床効果が得られなかったと考えるのは想像に難くない。つまり、血管のみを再生するというコンセプトではなく、虚血組織全体を再生するという戦略が重要であったのではないと思われる。この点を解決できる可能性を秘めたのが、次世代の血管再生治療である細胞療法であった。

次世代の血管再生治療：細胞療法の基礎研究

細胞療法による血管再生治療は、1997年の血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells: EPC)の発見が契機となった⁸⁾。EPCは骨髄に存在するが、臓器の虚血に

伴って末梢血から虚血組織へと動員され、血管内皮へと分化する。これは胎生期においてhemangioblastから血管と血球ができる現象、vasculogenesisに類似しており、成体での脈管形成(post natal vasculogenesis)と呼ばれた。さらにEPCは実験動物に投与されると虚血組織に取り込まれ、新たな血管を構成し、虚血を緩和できることが示された⁹⁾。以上の研究成果は、血球系細胞を血管再生治療の新たなツールとして応用できる可能性を示した画期的なものであった。しかしEPCは末梢血中には非常に微量にしか存在せず、臨床応用に足る数を得るためにはex vivoでの増幅が不可欠であった。一方、骨髄単核球細胞成分は末梢血に比較して数百倍以上のEPCを含んでいるのみならず、豊富な血管増殖因子を産出できることが知られている。これらの増殖因子は血管を作り出すのみならず^{10,11)}、細胞死抑制など虚血組織の保護作用を介して虚血組織自身の再生機能を間接的に増強できる可能性があった¹²⁾。これをparacrine effectと呼ぶ。また当時は、骨髄に多能性の幹細胞が存在し、心筋などの組織構成細胞へと分化する可能性が高らかにうたわれていた時期であった(myogenesis)。つまり骨髄細胞移植はvasculogenesis, myogenesis, paracrine effectの3つの効果によって、血管再生のみならず虚血組織そのものを再生する全く新しい治療法として注目を浴びることになるのである(Fig. 1)。しかも骨髄細胞の採取は技術的に確立しており、自身の細胞を用いることから倫理的問題のより少ない再生医療が可能でもある。これらのことから、骨髄単核球移植は血管再生医療の極めて重要な候補となり、すみやかに臨床へと応用されることとなった。

細胞療法の臨床応用：重症下肢虚血

世界で初の細胞移植による血管再生治療はわが国から報告された(TACT試験)¹³⁾。対象は閉塞性動脈硬化症およびバージャー病による重症下肢虚血のうち従来の内科的治療やバイパス手術の適応のない、いわゆるno optionの慢性虚血肢患者で、安静時疼痛あるいは虚血性潰瘍・壊死のある症例とされた。通常の方法で骨髄穿刺液を回収し、単核球細胞を分離後虚血下肢に筋肉注射によって移植する方法がとられ、25症例のパイロットスタディーにて安全性を確認後、両下肢に虚血がある症例(n=20)に対してそれぞれ骨髄単核球と末梢血単核球を約10⁹個移植し、その効果について比較検討し

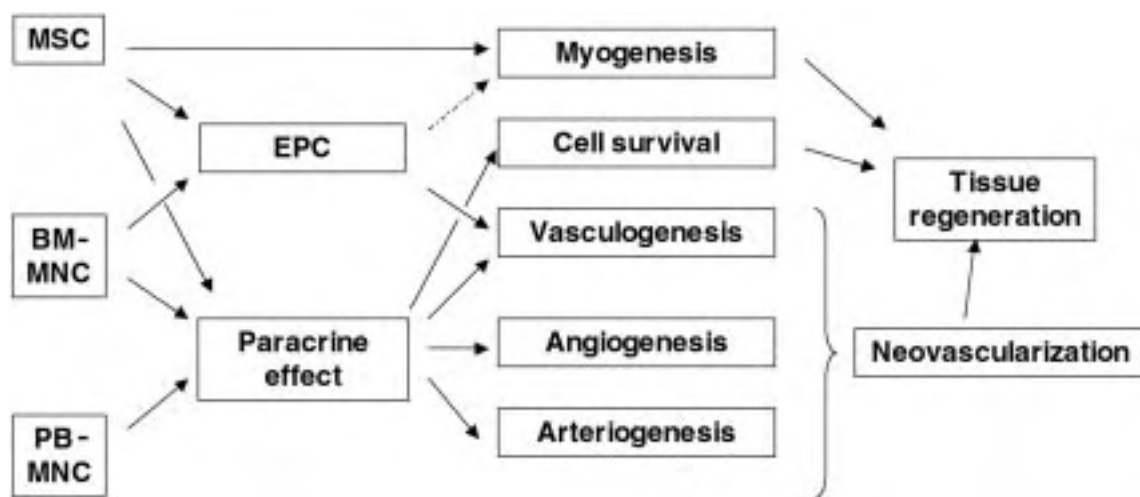


Figure 1 Mechanism of tissue regeneration by cell transplantation therapy.

It had been believed that transplanted cells incorporate into tissue components such as cardiomyocytes (myogenesis) and blood vessels (vasculogenesis) and/or release factors that enhance neovascularization (paracrine effect). However, more recent studies emphasize the essential roles of paracrine effect on tissue regeneration processes.

MSC: mesenchymal stem cell, BM-MNC: bone marrow mononuclear cells, PB-MNC: peripheral blood mononuclear cells, EPC: endothelial progenitor cells

た。骨髄単核球による治療4週間後の評価では、下肢/上肢血圧比(ankle-brachial index: ABI)の有意な改善が65%にみられ、安静時疼痛の改善は80%に認められた。組織酸素分圧は28.8~46.3mmHgと有意な改善傾向を示し、疼痛なしでの歩行可能時間も1分程度改善した。さらにこれらの臨床効果は少なくとも6カ月後まで持続した。一方で経過観察中の全45症例のうち、1例の突然死を含む3例が急性心筋梗塞により死亡したが、本治療との明らかな因果関係は認められなかった。元来、重症下肢虚血の生命予後は不良であり、自然歴との比較において本治療が死亡率を増加させたと判断されるものではなかった。以上より、重症下肢虚血に対する骨髄単核球細胞移植は一定の効果と安全性があるものと認められ、現在本法は国内一部の施設で高度先進医療として認可を受けており、さらに多施設において臨床研究が続けられている。今後は長期成績ならびに安全性についての再評価が待たれるところである。

重症下肢虚血に対しては、このほか骨髄からEPCを動員する目的でG-CSF(granulocyte colony stimulating factor: 顆粒球コロニー刺激因子)を皮下注射し、そのうえで末梢血から単核球を採取する方法、あるいはその中からEPCをより高濃度を含むCD34陽性細胞分画を

分離し投与する方法や、G-CSF単独投与にて内因性のEPCによる血管再生を期待する方法も臨床応用されており、それぞれ臨床研究が始まっている。またわれわれは慎重な基礎研究を経て、G-CSFを投与せずに自家末梢血単核球を採取し血管再生治療を行っている¹⁴⁾。この方法でこれまでに重症下肢虚血60症例に対して治療を行っているが、虚血性皮膚潰瘍で67%、安静時疼痛で72%の症例に改善が得られている。またいったん治療効果が得られた症例の85%以上は、その後のフォローアップ期間(30±10カ月)において虚血症状の再発を免れており、本治療法は長期的にも有用なものであると考えられた。TACT試験で投与された末梢血単核球に比較して、われわれは約10倍の細胞を採取・投与しており、これが高い臨床効果につながったのではないかと考えている。現在、千葉大学医学部附属病院にて高度先進医療の認可を受け治療を行っており(Fig. 2)、また重症間欠性跛行に対する二重盲検試験を設計し開始している。

細胞療法の臨床応用：虚血性心疾患

重症下肢虚血に続いて虚血性心疾患に対する細胞移植療法も、主にヨーロッパのグループから盛んに報告されている。近年、経皮的冠動脈形成術(percutaneous

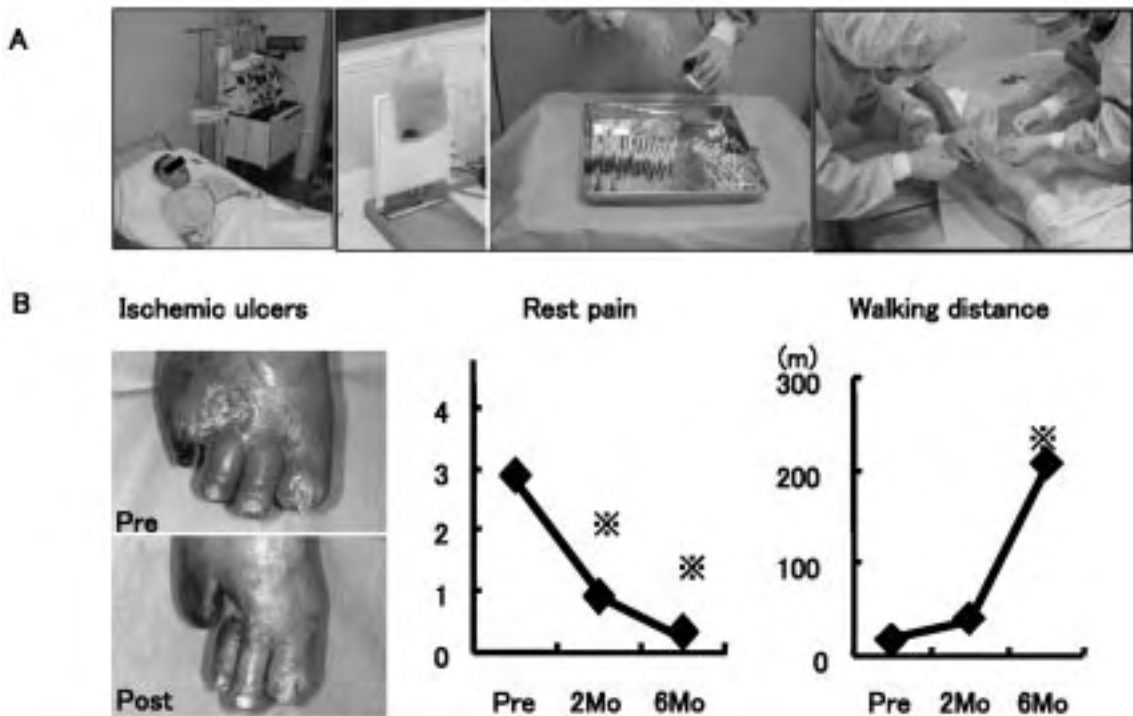


Figure 2 Clinical application of peripheral blood mononuclear cells.

A: Harvest of PB-MNC.

PB-MNC are harvested by peripheral blood apheresis and injected intramuscularly into ischemic limb.

B: Response to treatment.

PB-MNC implantation induce improvements of ischemic burden in 60–70% of the patients with critical limb ischemia.

coronary intervention: PCI)などを用いた再灌流療法の進歩により急性心筋梗塞の予後はかなり改善した。しかし閉塞した責任冠動脈病変の再疎通が成功したにもかかわらず十分な心筋サルベージが得られず、慢性期に低心機能に悩まされるケースは決して少なくない。現状ではこれらの症例は非常に予後が悪い。ここに細胞療法による利点が得られる可能性があった。これをいち早く臨床応用したのはドイツのグループであった^{15, 16)}。彼らは急性心筋梗塞症例に再灌流療法を行った数日後に骨髄細胞を冠動脈内へ直接注入したところ、半年から1年間のフォローアップ期間内に左心室の血流ならびに収縮機能の改善が安全に得られることを示し得た。これらのパイロット試験に続いて、2006年にはいくつかの二重盲検無作為割付試験の結果が報告されている。

一つはREPAIR-AMI(the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial

Infarction)試験である¹⁷⁾。彼らは先ほどのパイロット試験と同様に、再灌流療法に成功した急性心筋梗塞症例204例を骨髄細胞治療群とプラセボ群に分け、3～7日後にこれらいずれかを冠動脈内に注入し、4カ月後と1年後にフォローアップを行った。その結果4カ月の時点において、左心室駆出分画の改善がプラセボ群で $3.0 \pm 6.5\%$ であったのに対して骨髄細胞治療群では $5.5 \pm 7.3\%$ と有意に改善していた。また、サブ解析によりこの傾向は低心機能の症例でより顕著であることが判明した。さらに1年後の時点では、死亡・心筋梗塞再発・血行再建術追加の複合エンドポイント回避において、骨髄細胞治療群で有意な改善が認められた。急性期の心機能と慢性期の予後は相関することが以前から知られているが、本治療が低心機能の症例にこそ大きな効果を認めたことと、慢性期の予後改善効果を認めたことは、無関係ではないかもしれない。

一方、急性期のみならず慢性期の心筋梗塞に対す

る、細胞治療の有効性も示されている。急性期の再灌流療法受療の機会を逸した症例、またはその効果が得られなかったような症例では、やはり予後が悪い。これら心筋梗塞慢性期症例に対する細胞療法の意義を検証したのがTOPCARE-CHD(Transplantation of Progenitor Cells and Recovery of Left Ventricular Function in Patients with Chronic Ischemic Heart Disease)試験である¹⁸⁾。彼らは3カ月以上経過した心筋梗塞慢性期の症例75例に対してコントロール群23例、EPC投与群24例、骨髄細胞投与群28例に分け、いずれかを冠動脈の心筋梗塞責任病変へ注入し、さらに3カ月後に骨髄細胞またはEPCを受けるクロスオーバー試験を行った。その結果、初期3カ月またはクロスオーバー後3カ月間いずれにおいても、骨髄細胞投与群において有意な左心室収縮機能の改善が認められた。

以上2つの臨床試験は、骨髄細胞移植療法が急性期・慢性期心筋梗塞の心機能を改善し、従来予後不良であった症例に対する有力な治療法になりうることを示唆している。

血管新生治療の問題点

虚血性疾患に対する骨髄単核球の応用によって、血管再生治療の有用性がかなり明らかとなってきた。しかし、実際にはこれから解決すべき問題点がいくつも存在する。まず血管再生治療の治療効果に、改善の余地が大きく残されている点が挙げられる。重症下肢虚血の症例に対する治療効果は60~70%程度であり、本治療の恩恵を受けられない症例がまだ多く存在する。虚血性心疾患に対する治療効果も有意ではあるが微弱であり、これが本当に患者のADL(activities of daily living)や予後を改善するのかについてさらなる検討が必要と思われる。また細胞移植の効果が不十分なものであったとする報告も若干数存在し、その原因として採取する細胞分画の微妙な差や投与時期、対象症例の違いなどがあったのではないかと考察されている¹⁹⁾。以上のことは、細胞移植治療の治療ウィンドウがそれほど大きくない可能性を示している。この治療ウィンドウがどのようなものなのか、またこれを広げるためにはどうしたらよいのか、検討していかななくてはなるまい。

血管再生治療がもたらしうる重大な副作用についても指摘が必要である。理論上最も懸念されるのは、全

身性の病的血管新生によって糖尿病性網膜症、悪性腫瘍、動脈硬化性病変などが悪化する可能性である²⁰⁾。実際の臨床試験でも、治療後に心筋梗塞や脳梗塞を発症したり、悪性腫瘍の出現をみたりしたとの報告が若干存在する^{13, 21, 22)}。そもそも治療対象がこういった病気を発症しやすい層の患者であり、細胞治療とこれらの有害事象との因果関係は必ずしも明確とはなっていないが、だからこそ、より一層厳重な注意が不可欠なのである。最低限、血管再生治療に先立って、全症例において悪性腫瘍のスクリーニングならびに冠動脈造影検査等を含めた動脈硬化性病変の検索を行い、その後も長期間にわたりフォローアップしていくことは必須事項であろう。

さて血管再生医療の有用性と安全性をさらに高めるためには、臨床データのさらなる蓄積と、治療メカニズムのより詳細な解明が必要であることは言うまでもない。臨床データの蓄積については他稿に譲るとして、本稿では3つ目の問題点として治療メカニズム解明の方向性を挙げておきたい。先に、虚血性疾患の再生治療は血管再生に留まるものではなく、虚血組織全体の再生を視野に入れたものであるべきだと述べた。また細胞療法はpost natal vasculogenesis, myogenesis, およびparacrine effectによって虚血組織そのものを再生する可能性があると考えられてきた点も紹介した。しかし最近になって、これらの仮説に問題があることが分かってきた。光学顕微鏡の性能向上や細胞トラッキング技術の改善によって、移植細胞の組織構成細胞への直接分化を否定する報告が、ここ数年の間に相次いでおり、現在では多くの研究者が細胞移植によるvasculogenesisおよびmyogenesisの存在を否定的か、仮にあって非常に稀であると考えようになっている^{23~25)}。一方、細胞移植療法の治療効果が比較的長期間にわたる一方で、移植細胞の局所生存率が極めて低いことが明らかとなってきているが、移植細胞によるparacrine effectのみではこの現象を説明することはできない。この矛盾を説明する新たな機序としてわれわれは最近、移植細胞による虚血組織再生への直接作用に着目し報告した²¹⁾。単核球移植は成熟筋細胞による血管増殖因子産生を促すとともに、筋組織に内在する幹細胞・前駆細胞を活性化・増殖させ、筋細胞の増殖・分化を促す。その後成熟した筋細胞は血管増殖因子を豊富に産生し、これが血管再生をもたらすが、これがさらに筋再生を増強するpositive feed-

back loopを作り出して調和の取れた組織再生をもたらしている可能性がある。今後の研究成果によって治療メカニズムがより深く追求されることで、治療ウィンドウの実態解明とその拡大方法が得られると同時に、より安全な治療法が開発できるのではないかと期待される。

おわりに

血管再生治療は、虚血性疾患の新たな治療法として確立しつつある。しかし同時に、現時点での限界も明らかとなってきた。血管再生治療の進歩にはまだ時間を要すると予想される一方で、病に苦しむ多くの患者がいる。本稿では詳しく述べなかったが、現状の血管再生治療と既存の内科的・外科的治療の併用療法によってもう少し治療成績が改善する道が開かれるのではないかと考えている。この意味で、本治療をより多くの医療関係者に知ってもらい、活かしてもらうために本稿が少しでも役に立てば幸甚である。

文 献

- 1) Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997, **386**: 671–674.
- 2) Hanahan D: Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*, 1997, **277**: 48–50.
- 3) Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW et al: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 2000, **407**: 242–248.
- 4) Henry TD, Annex BH, McKendall GR et al: The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*, 2003, **107**: 1359–1365.
- 5) Grines CL, Watkins MW, Helmer G et al: Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation*, 2002, **105**: 1291–1297.
- 6) Simons M, Bonow RO, Chronos NA et al: Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: an expert panel summary. *Circulation*, 2000, **102**: E73–E86.
- 7) Ylä-Herttua S, Alitalo K: Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med*, 2003, **9**: 694–701.
- 8) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964–967.
- 9) 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.
- 10) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of post-natal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, **103**: 897–903.
- 11) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T et al: Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*, 2001, **104**: 1046–1052.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) Minamino T, Toko H, Tateno K et al: Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 2002, **360**: 2083–2084.
- 15) Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al: Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 2002, **106**: 1913–1918.
- 16) Wollert KC, Meyer GP, Lotz J et al: Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*, 2004, **364**: 141–148.
- 17) Schächinger V, Erbs S, Elsässer A et al: Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006, **355**: 1210–1221.
- 18) Assmus B, Honold J, Schächinger V et al: Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006, **355**: 1222–1232.
- 19) 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.
- 20) Epstein SE, Kornowski R, Fuchs S et al: Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects. *Circulation*, 2001, **104**: 115–119.
- 21) Tateno K, Minamino T, Toko H et al: Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res*, 2006, **98**: 1194–1202.
- 22) Epstein SE, Stabile E, Kinnaird T et al: Janus phenomenon: the interrelated tradeoffs inherent in therapies designed to

- enhance collateral formation and those designed to inhibit atherogenesis. *Circulation*, 2004, **109**: 2826–2831.
- 23) Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S et al: Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res*, 2004, **94**: 230–238.
- 24) 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.
- 25) Rehman J, Li J, Orschell CM et al: Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 2003, **107**: 1164–1169.

Mononuclear Cell Transplantation for Therapeutic Neovascularization

Kaoru Tateno, Junji Moriya, Tohru Minamino, and Issei Komuro

Division of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

Key words: ischemic diseases, growth factors, stem cells, regeneration

Despite considerable efforts, progress has been made in the practice of modern cardiology, yet cardiovascular disease remains the leading cause of deaths in the industrialized communities. Our recent knowledge in molecular biology enabled us to treat such patients with critical limb or myocardial ischemia by therapeutic angiogenesis. This brief review outlines the history of basic and clinical investigations that realized therapeutic angiogenesis with the benefit of autologous-cell transplantation. Further, we focus on the pros and cons of cell transplantation therapy, followed by a solution that would make this new therapeutics safer, more efficacious, and a more prevalent strategy.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2007, **47**: 483–489)