

下肢虚血に対する血管再生治療の機序に関する問題点

館野 馨 南野 徹 小室 一成

要 旨：自家細胞移植による血管再生治療は、従来no-optionと位置づけられてきた重症下肢虚血症例に対する新たな治療法として、徐々に市民権を得ている。近年、その安全性と有用性が明らかとなりつつある一方で、いくつかの問題点も表在化してきた。本稿はこれらの問題点、なかでも重症下肢虚血の病態と治療機序のミスマッチに焦点をあて、これを概説する。

(J Jpn Coll Angiol, 2008, 48: 431-435)

Key words: therapeutic neovascularization, stem cells, paracrine effect, histology

細胞移植による血管再生治療とは

伝達動脈(conducting artery)や分配動脈(distributing artery)などが閉塞し、その末梢に虚血が生じると、その代償機転として組織中に新たな血管が出来る。この現象は血管再生と呼ばれており、血管新生(angiogenesis)、側副血行路形成(arteriogenesis)、脈管再生(post natal vasculogenesis)に大別される¹⁾。血管新生とは、血管内皮細胞の増殖・遊走を介して既存の血管から新しい血管が芽出する現象をさす。側副血行路形成は、既存の血管がリモデリングすることで、より太い側副血行路を形成するメカニズムを呼ぶ。また流血中に存在する血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)が、虚血局所で血管内皮へと分化する機序は、脈管形成として知られている。これらの細胞の動態は、多様な液性因子によって制御されることも明らかとなっているが、このような細胞や液性因子を有効に活用して、虚血組織に血管再生をもたらす治療法を血管再生治療と呼ぶ。血管再生治療には、組換えタンパクや遺伝子導入技術を用いた増殖因子補充療法²⁾と、骨髄単核球等を用いた細胞移植治療³⁾とに大別される。このうち細胞移植治療は、虚血組織にEPCを供給し、また多種多様な液性因子を提供することで血管再生と組織保護をもたらすものと考えられ⁴⁾、増

殖因子補充療法と比較していっそう高い治療効果が得られるものと期待された。特に後者はパラクリン効果と呼ばれており⁵⁾、現在、治療機序の主たるメカニズムであると考えられている。

細胞移植による血管再生治療は、EPCおよびパラクリン効果に富んだ細胞の提供を意図して行われてきた。したがって治療に用いられる細胞ソースには、骨髄単核球⁶⁾、末梢血単核球⁷⁾や、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)により動員された末梢血幹細胞、ex vivoで増殖したEPCなどが用いられている。これらの細胞を重症下肢虚血(critical limb ischemia: CLI)、急性心筋梗塞、慢性心筋虚血等の虚血筋組織へ、さまざまなルートにより投与することで、虚血の緩和と臓器機能の改善が得られることが、多くの基礎研究およびトランスレーショナルリサーチの結果で明らかとなった。これらの疾患は罹患人口が多く、既存の医療技術では治療し得ないno-option症例が多数存在することもあり、細胞移植による血管再生治療は比較的速やかに臨床応用されてきた。現在までに多くの臨床研究が報告され、その有用性および安全性が明らかとなりつつある。

細胞移植による血管再生治療の実際

ここで細胞治療の実例として、筆者らの経験を紹介する。千葉大学医学部附属病院などでは、先進医療認可

千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学,
千葉大学医学部附属病院循環器内科

2009年1月14日受理

のもと、CLIに対する自家末梢血単核球細胞移植治療を行っている⁷⁾。対象は他の治療法が適応とされない、いわゆるno optionのCLI症例である。そのうち、未治療の動脈硬化性狭窄病変、増殖型糖尿病性網膜症や、5年以内に悪性疾患の既往がある症例は、血管新生により原疾患が悪化する危険があり、積極的な術前精査のうえ除外している。適応となった症例に対しては、書面による十分なインフォームドコンセントを得て治療を開始している。まず患肢あたりの単核球細胞数 5×10^9 個を目標として、自動血液成分分離装置を用いて血液アフレーションを行っている。実際の採取細胞数は、末梢血の分画および成分採血の効率に左右されるが、約4時間の行程でほぼ全例において目標細胞数が達成可能である。これらの細胞をただちに遠心濃縮し、虚血下肢に1.5~3.0cm間隔で筋注移植している。

細胞移植後は炎症反応と血管増殖因子産生が一過性に増加し、これに伴い下肢の血液灌流が増加する。筆者らは初期のパイロット研究において、短期間に細胞移植を繰り返すことでこれらの反応が増強する傾向を見出し、現在では2週間隔で計2回の移植を行い1クールとするプロトコルを採用している。治療効果を認められたresponderの場合、治療後2週以内に疼痛の軽減や良性肉芽の増成が確認されることが多い。ただし血行再建術とは異なり、皮膚潰瘍の治癒に月単位を要することがあり、長期にわたる形成外科的なフォローが必要となるケースが少なからず存在する。また、初期に治療効果が認められなかったケースのうち、特に閉塞性動脈硬化症の症例では、その後の転機は不良であることから、そのような場合はいたずらに保存的治療に固執せず、早期の下肢大切断を検討すべきと考えている。

著者らの臨床研究は、一次評価項目に下肢大切断を、二次評価項目に皮膚潰瘍・安静時疼痛・下肢/上腕血圧比・歩行可能距離を定義し、治療6カ月の時点で早期成績を評価している。有害事象は随時フォローしているが、特に治療6カ月後には再度入院のうえ、入院時と同様に動脈硬化性病変の評価と悪性疾患の検索を行っている。当院で治療対象となる症例は、閉塞性動脈硬化症とバージャー病で概ね2対1である。またRutherford grade II以上(category 4-6)相当の症例が7割を占め、血液維持透析を受けている症例が約半数、左室駆出分画が50%未満の症例が約2割存在するなど、特に重症なケースが多いのが特徴である。早期成績は比較的良好

である。一次評価項目である、下肢大切断の回避率は約90%であり、二次評価項目のいずれかに改善が得られたケースをresponderとしたところ、約70%がこれに該当した。6カ月以降の長期成績の集計では、約70%の症例は皮膚潰瘍の再発を免れており、安静時疼痛の再発率も15%以下であった。

一方、複数の有害事象の発生も認めている。成分採血に関連するものとして迷走神経反射、細胞移植後に痛風発作を認めた症例、鎮痛剤の副作用として尿閉を来した例、慢性期に筋肉内出血を来した例などを併せて数例経験している。このほか、重大な有害事象としてうっ血性心不全の発症、動脈硬化性病変の悪化イベントおよび死亡例が認められている。これらはすべて閉塞性動脈硬化症の患者であり、かつ血液透析症例が主体であった。臨床経過において、これらの重大な有害事象と本治療の間には明確な関連性は認められず、またその発生頻度を既報の自然予後と比較したところほぼ同等であったことから、本治療が有害事象の発生に悪影響を及ぼしたとは判断されなかった。しかしながら、CLI症例の管理には十分な注意が必要であることを改めて示す警鐘として厳粛に捉えるべきと考えている。

細胞移植の治療機序に関する問題点

末梢血単核球細胞移植を受けた上記症例の約30%はnon-responderであったが、治療の有効性は、他の細胞を用いた検討でも概ね同様のようである。一方、CLI症例の病状のスペクトルは、上述のように多少幅が広い。これらのことより、細胞治療の有用性を期待できる症例群、すなわち治療の適応を改めて検討すべきではないかと感ぜられる。患者背景の検証では、閉塞性動脈硬化症と血液透析症例で治療効果が低下する傾向を認めしたが、必ずしも有用性に対する特異的な予測因子ではなかった。またCLIの自然経過中、急性増悪期に治療したケースにnon-responderが多い傾向があったが、それではどの時点で治療すればよいのかも明確ではない。こういった治療効果の予測や、治療をなすべきタイムウインドウの選択を含めた、適応可能な病態の範囲についてある程度明確にしておくことが望まれる。そのためには虚血性疾患の病態と治療機序に対する理解を深めていくことが不可欠であるが、この点で現在の細胞治療が抱えるいくつかの問題点について概説したい。

まず現時点では、細胞治療の治療機序が必ずしも

明確ではない点を挙げておく必要がある。細胞治療の開発はEPCの発見に端を発しており、当初はpost natal vasculogenesis機序の追求に主眼が置かれてきた。しかしその後の研究により、治療効果全体に占める本機序の役割は必ずしも大きくない可能性が示されるようになる⁸⁾、代わってパラクリン効果の重要性が注目されるようになった。しかし最近、移植細胞の組織生着期間および生着率が極めて低いことが認識されるようになり⁹⁾、このような限局的なパラクリン効果のみで、治療機序を説明する矛盾が指摘され始めている。以上のように、細胞治療の機序の解明には、解決すべき課題がまだ残されている。

次に、治療対象である重症虚血の病態と治療機序との間に、必ずしも十分な関連性が見出されていない点も指摘しておきたい。従来、CLIの病態は、下肢虚血に伴い通常生じるべき血管再生の機序が、何らかの原因で破綻することによるものと言われてきた。しかし近年、CLIの病態の特徴はカテコラミン感受性亢進による皮膚・骨格筋組織間の血流分布異常や、血流減少に伴う内皮機能低下を契機とする血小板の活性化、血液粘度の増加と凝固線溶系の異常、さらにこれらが悪循環を形成し難治性となる点にあることが明らかとなってきた¹⁰⁾。従来の治療機序に対する理解は血管再生に主眼が注がれており、こういった病理を標的としたメカニズムについての考察は十分なされていない。

これらの溝を埋め、治療機序の理解に関する問題を解決するためには、細胞治療後の臨床経過や組織像を詳細に検証することが有用であろう。これまでの報告では、骨髄単核球移植後の組織像として、対照例と比較して虚血骨格筋の浮腫および新生血管の増生、伝達動脈の血管壁内での異常な血管新生が確認されている¹¹⁾。しかしこれらの報告の多くは、治療効果が得られずに下肢切断となった症例のサンプルである。したがって、これらの結果が治療機序を説明したものであるかどうか、確認し得るものではない。血管再生治療は、vasa vasorumの新生により動脈粥腫の破綻をもたらすものと従来から危惧されてきた。その意味では、本所見はむしろ、治療効果が得られなかったことを支持するものであるかもしれない。いずれにせよ、CLIの組織像に関する報告は限られており、更なるデータの蓄積が望まれる。

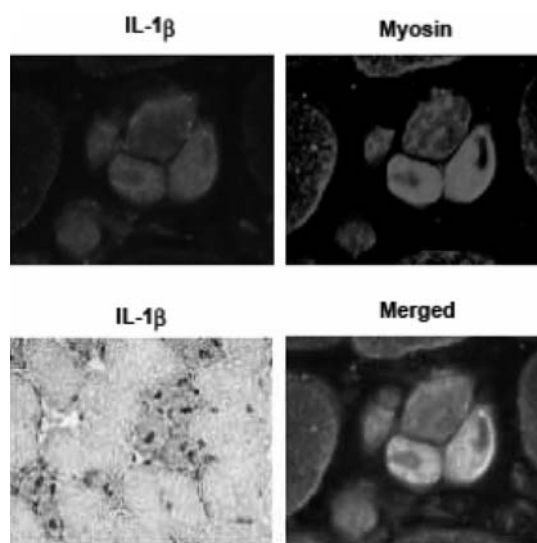


Figure 1 Role of muscle cells in therapeutic neovascularization. Immunohistochemical co-staining of muscle tissue with myosin and IL-1 β . PBMNC induces enhancement of IL-1 β production by myocytes. Note that such cells have centrally located nuclei, suggesting that they are in their regeneration process.

新しい治療機序の探求

以上の問題点を認識しつつ、著者らはbedside to bench 研究に、そのブレイクスルーを求めた。まず治療効果の有無に関連してさまざまな臨床データを検証したところ、細胞移植後にVEGFおよびIL-1 β が一過性に上昇すること、これが臨床効果と強く相関することを見出した。そこでこの臨床データを基礎研究に持ち帰ることとし、IL-1 β ノックアウト(KO)マウスを用いた下肢虚血・細胞治療実験を行った。その結果、細胞治療による血管再生にはIL-1 β の存在が必須であること、およびその産生源は移植細胞ではなく、再生した骨格筋細胞であることが明らかとなった(Fig. 1)¹²⁾。その後の研究で、細胞移植が筋芽細胞の増殖を顕著に促進すること、その結果として虚血組織内に大量の再生骨格筋細胞群が形成されること、これらの筋細胞が多様な血管増殖因子を豊富に産生することが治療効果には不可欠であることを見出した。これらの結果は、移植細胞によるパラクリン効果の標的の少なくとも一部が筋細胞の増殖であること、およびその後の血管新生因子の産生は移植細胞ではなく、虚血組織に内在する自己再生過程が担っていることを示している

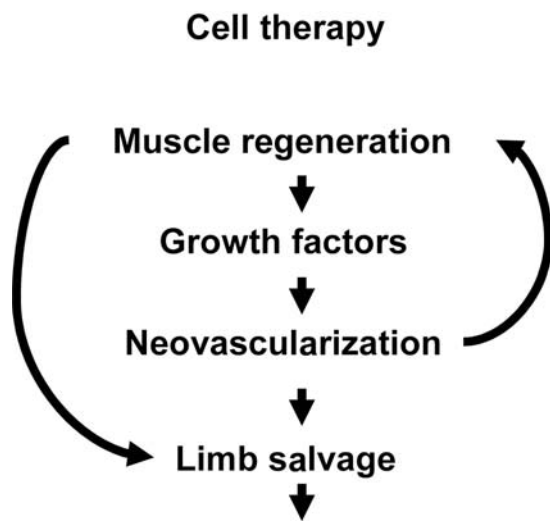


Figure 2 Association between muscle regeneration and neovascularization. PBMNC enhances the muscle regeneration process. Growth factors are secreted throughout these processes to induce therapeutic neovascularization, which is sufficient to elicit a limb salvage effect.

(Fig. 2)。もし、このような機序が臨床においても成立しているのであれば、これまで考えられてきたような、限局的なパラクリン効果では説明できなかった矛盾を解消することができる。実際に、重症間歇性跛行に対する運動療法により再生筋細胞が認められたとの報告もあり、著者らの仮説を裏付けるものである可能性もあり、興味深いと考えている。

このほか著者らは、重症虚血の病態に関連した、新しい治療機序の解明にも力を入れている。著者らはこれまで、CLIでは慢性的な炎症反応が認められること、細胞移植によって炎症反応がさらに増強するとともに血管増殖因子の産生が惹起され、下肢の血液灌流が増加すること、しかる後に炎症反応が消失することを報告してきた⁷⁾。これらの反応は、CLIの詳細な病態と、これに対する治療効果を反映しているものと考えられる。そこで、これを説明するいくつかの候補分子と、動物実験モデルの解析を進めている。また多施設間の共同研究で、血管再生治療後の組織像の検証も進められている(Fig. 3)。これらのような研究によって、虚血の病態と治療機序との間に横たわる溝が少しでも埋められるのではないかと期待している。

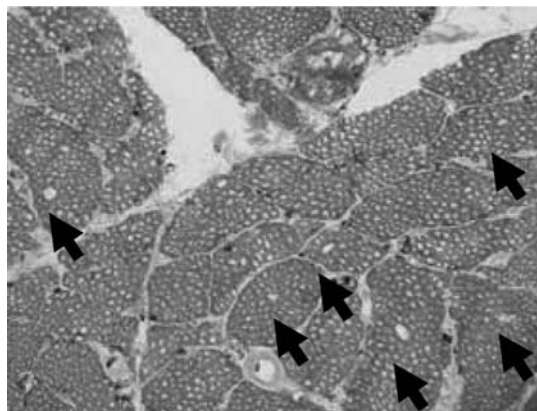


Figure 3 HE staining of skeletal muscle tissue samples obtained from an amputated ischemic leg of a patient who received autologous PBMNC implantation. Although the section reveals the presence of regenerating myotubes (arrows), it is difficult to interpret such histological findings as a mechanism of the therapy because they had been obtained from a patient who responded poorly to the treatment.

将来の展望

CLIの病態と、細胞治療の詳細な治療機序が明らかとなれば、Responder症例の予測や、治療をなすべきタイムウィンドウ、併用すべき薬剤等の選択が可能となるものと予想される。また、それぞれの病態に応じた細胞と増殖因子の使い分けや、移植細胞の修飾による治療効果の増強も可能となってくるのではと期待される。臨床、基礎、病理の各分野の有機的な融合によって、これらの問題を少しでも解決していければと願っている。

文 献

- 1) Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW et al: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 2000, **407**: 242–248.
- 2) Losordo DW, Dimmeler S: Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation*, 2004, **109**: 2487–2491.
- 3) Losordo DW, Dimmeler S: Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*, 2004, **109**: 2692–2697.
- 4) 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.
- 5) Kinnaid T, Stabile E, Burnett MS et al: Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*, 2004, **94**: 678–685.
- 6) 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.
- 7) Inaba S, Egashira K, Komori K: Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 2002, **360**: 2083.
- 8) 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.
- 9) Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR et al: Role of interleukin-1 β in acute inflammation and graft death after cell transplantation to the heart. *Circulation*, 2004, **110**: II219–II224.
- 10) Coats P, Wadsworth R: Marriage of resistance and conduit arteries breeds critical limb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, **288**: H1044–H1050.
- 11) Van Huyen JP, Smadja DM, Bruneval P et al: Bone marrow-derived mononuclear cell therapy induces distal angiogenesis after local injection in critical leg ischemia. *Mod Pathol*, 2008, **21**: 837–846.
- 12) Tateno K, Minamino T, Toko H et al: Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res*, 2006, **98**: 1194–1202.

Problems Regarding the Mechanistic Link between the Pathology of Critical Limb Ischemia and the Cell Therapy

Kaoru Tateno, Tohru Minamino, and Issei Komuro

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

Key words: therapeutic neovascularization, stem cells, paracrine effect, histology

Autologous cell transplantation therapy is recognized as an effective strategy to treat patients with otherwise incurable critical limb ischemia (CLI). Cell therapy was initially thought to bring about its efficacy through two major mechanisms: post natal vasculogenesis and paracrine effect. However, results from recent investigations have challenged the mechanistic link between these experimental phenomena and the real-world pathology of CLI. This brief review summarize concepts that substantially claim these mismatches, and will look for a clue to understand this deep gap.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2008, **48**: 431–435)