

末梢動脈疾患に対する自家末梢血幹細胞移植の現状

星野 純一¹ 藤本 陽² 高市 憲明¹ 石綿 清雄² 大野 実²

要 旨：近年，従来治療に抵抗性の難治性末梢動脈疾患に対し，遺伝子や自家幹細胞を用いた血管再生療法が行われ，その有用性が報告されている。そのなかで自家末梢血幹細胞移植は倫理性・低侵襲性の点からわが国で最も多数例，とくに透析例に多く施行されている。当院を含む 162 例の全国多施設共同追跡調査では，本移植の安全性と一定の有効性が示唆された。現在，多施設前向き比較臨床試験実施の最終段階を迎えており，今後の試験結果が期待される。

(J Jpn Coll Angiol, 2010, 50: 331-336)

Key words: peripheral arterial disease, neovascularization therapy, peripheral blood mononuclear cell transplantation, randomized controlled trial, dialysis

はじめに

メタボリックシンドロームの増加に伴い，末梢動脈疾患，とくに難治性下肢血流障害は年々増加傾向である。欧米の疫学研究によれば，糖尿病・喫煙・高齢(65 歳以上)・脂質異常症が存在すると重症虚血肢(critical limb ischemia; CLI)発症リスクがそれぞれ 4 倍・3 倍・2 倍・2 倍上昇すると報告されている¹⁾。メタボリックシンドロームはわが国を含む先進国で年々増加傾向であり，末梢動脈疾患に対する治療は今後ますます重要になってくると思われる。

一方 CLI に対する治療は未だ十分でない。疫学研究によれば，CLI に対し血行再建術が施行可能な症例は 50%のみである。残りの 25%は薬物療法のみを選択であり，直ちに下肢切断が必要な症例が 25%も存在しているのが現実である。また集学的治療にかかわらず 1 年後改善例はわずか 25%であり，25%が死亡に至っている¹⁾。今後難治性下肢血流障害を克服するためには，血行再建術の進歩と同時に，細胞治療や遺伝子治療を含めた新たな血管再生療法の進歩が望まれている。やむを得ず四肢切断が必要な場合でも少しでも切断部位を遠位にす

ることが患者 QOL の維持には必要である²⁾。

もう一つ重要な CLI 関与因子として，透析患者の増加がある。臓器移植の発達していないわが国においては，慢性透析患者数は毎年 1 万人のペースで増加し，2007 年 12 月現在で 27.5 万人に至っている。さらに重要なのは，透析導入の主要原疾患の 50%以上が糖尿病もしくは腎硬化症で，メタボリックシンドロームを有する透析患者が年々増加しているという点である。その結果末梢動脈障害を有する透析患者の増加に伴い，透析患者に対する CLI 治療は無視できない重要な問題となっている。

今回，増加している透析患者の難治性末梢動脈疾患の現状を踏まえながら，自家末梢血幹細胞移植の現状を述べていきたい。

透析患者の末梢動脈疾患の特徴

透析患者の末梢動脈疾患の 4 つの特徴として，①発症頻度が高い(糖尿病・長期透析の増加)，②症状が出にくい(神経障害の存在)，③治療抵抗性(特徴的な動脈硬化・石灰化の存在)，④術後合併症が多い(低栄養，免疫不全)が挙げられる。

糖尿病・腎硬化症を原因とした透析患者は前述のとおり年々増加しており，これが透析患者の CLI 増加に関与

¹虎の門病院腎センター

²虎の門病院循環器センター

2009 年 4 月 7 日受付 2009 年 8 月 31 日受理

している。さらには透析技術や心血管治療の進歩に伴う長期透析患者の増加も重要な点である。

透析や糖尿病患者では、Fontaine II 度から突然 IV 度の壊疽を呈する場合も多い。透析患者の場合糖尿病性神経障害を有さない場合でも、*uremic neuropathy* の関与や筋力・ADL 低下のため下肢虚血症状が出にくい背景があり、日々の問診・視診・触診が重要である。

透析患者の治療抵抗性に寄与する因子として、特徴的な動脈石灰化の存在は重要である。通常メタボリックシンドロームによる動脈硬化は内膜の粥状硬化(アテローム硬化)であるが、透析患者の場合、通常加齢現象でみられる Monckeberg 型硬化(中膜石灰化)が特徴であり、メタボリックシンドローム合併透析患者の場合、これら両者の動脈硬化の特徴を有すると考えられる。またカルシウム・リン積の問題も重要である。糖尿病透析例でカルシウム・リン積 $80 \text{ mg}^2/\text{dl}^2$ 以上の場合、四肢切断リスクは約 3 倍である(2001 年日本透析医学会資料)。実際、糖尿病を合併した長期透析例で、内膜・中膜の高度な石灰化のため血行再建術ができず、透析中の血圧変動で容易に臓器虚血になる症例は多く経験するところであり、これが透析患者に四肢切断が多いおもしろい理由であると考えられる。

また透析患者は、低栄養・免疫不全の存在により術後合併症が多い。低栄養や慢性炎症は明確な予後悪化因子であることが数々の臨床試験で証明されている。さらにこれらが動脈硬化を促進し、血行再建の適応を制限している。このように栄養障害・慢性炎症状態に動脈硬化(malnutrition, inflammation, and atherosclerosis)を合併する MIA 症候群は透析患者に多い。したがって透析患者の末梢性血管疾患の管理には、循環器医のみならず、日々の透析医の積極的関与が重要といえる。

血管再生療法の現状

CLI の予後が不良で難治性 CLI が増加している現状を踏まえて、1994 年の Isner らによる血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を用いた CLI に対する遺伝子治療以降、さまざまな血管再生療法が行われてきた³⁾。大別すると血管増殖因子を用いた遺伝子療法と、自家幹細胞移植の 2 群に分類される。遺伝子療法はより *purify* された治療と考えられる反面、ウイルスベクターの使用や倫理的問題をクリアする必要がある。現在 VEGF のほかに、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)⁴⁾・肝細胞増殖因子(HGF)⁵⁾

などを用いた再生療法が行われている。

一方自家幹細胞移植は *crude* ではあるが、自己細胞を使用するため倫理的問題がなく、技術的・機器的には血液移植のノウハウを利用できる利点があり、多くの施設で行われている。自家幹細胞移植は細胞採取法の違いから自家骨髓幹細胞移植⁶⁾と自家末梢血幹細胞移植⁷⁾に大別される。骨髓幹細胞移植はより多数の CD34 陽性細胞を採取できる反面、長時間の全身麻酔や自己血輸血が必要である。一方末梢血幹細胞移植は低侵襲で施行可能な利点があり、現在わが国で多数施行されている。

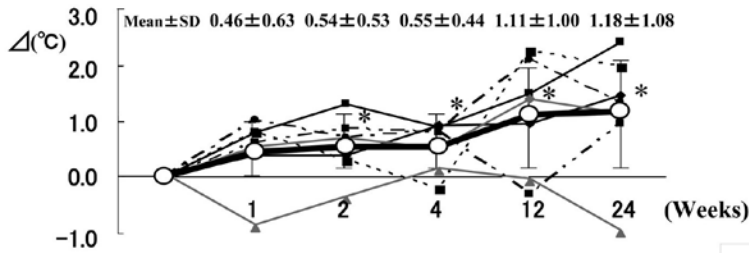
末梢血幹細胞移植は 3 つの治療法に分類される。G-CSF 動員後に単核球分画移植を行う方法(札幌北楡病院・虎の門病院・医歯大など)⁸⁻¹⁰⁾、G-CSF 動員後に CD34 陽性細胞のみを抽出して移植する方法(先端医療センター・東海大など)、G-CSF 動員せずに単核球分画移植を行う方法(千葉大など)⁷⁾である。3 種類の末梢血幹細胞移植と骨髓細胞移植のなかで、最も多数例に行われているのが G-CSF 動員単核球細胞移植である。2007 年 11 月の時点で 162 例(うち ASO 140 例)に施行された。特徴的なのはそのうちの 80% が透析例である点で、他の血管再生療法の透析患者率がほとんど 30% 以下であるのに対して特筆すべき数値である。

長期成績としては、自家骨髓単核球細胞移植の 3 年 amputation free survival が ASO で 60%、Buerger 病で 91% と報告され¹¹⁾、細胞移植の有用性が期待されるが、これら 3 種類の末梢血幹細胞移植と骨髓幹細胞移植を直接比較した試験は存在せず、またいずれの移植も十分なエビデンスレベルを持った前向き比較試験が行われていないため、どの方法が最も有効か、もしくは本当に有効なのかは未だ明らかでない。基礎データや小規模臨床試験では各治療の有用性が報告されており今後の検討が望まれる。

G-CSF 動員自家末梢血幹細胞移植の概要

当院では、院内倫理委員会の承認のもと、G-CSF 動員自家末梢血幹細胞移植を以下の症例を対象に行っている。年齢が 20~80 歳で、下肢血管造影など画像検査にて大腿動脈以下末梢の動脈の 90% 以上の狭窄が確認され、血管形成術やバイパス手術の適応がない Fontaine II~IV の末梢動脈疾患の患者である。除外基準としては、糖尿病性増殖性網膜症の患者、虚血性心疾患・脳血管障害を有し、専門医が G-CSF 使用不適当と判断した患者、悪

Lower legs



Toes

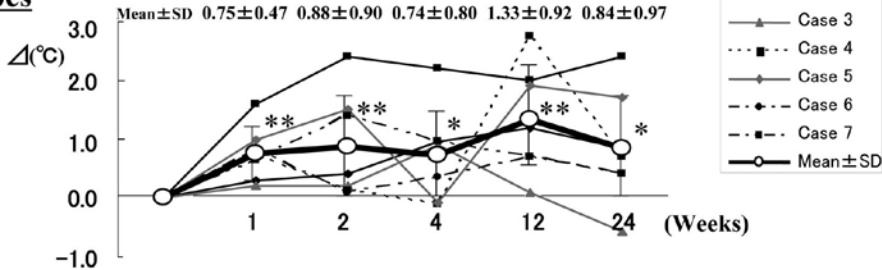


Figure 1 Adjusted thermographical change after the treatment.

Skin temperature improved in 6 of 7 patients. Skin temperature in the lower legs and toes significantly improved at each observational point, even at 1 and 2 weeks after the treatment. The peak elevations of skin temperature were observed at 6 months after the treatment (end of the observation period) in the lower legs (+1.18±1.08°C) and 3 months, in the toes (+1.33±0.92°C). *p<0.05 **p<0.01, vs control (before the treatment)

性腫瘍を有する患者、G-CSFにアレルギーを有する患者などがある。HillらはG-CSF 10 μg/kgを5日間投与することにより、重症心血管障害患者に心筋梗塞が引き起こされる危険性を報告¹²⁾した。その後の研究では心血管障害患者へのG-CSF投与は安全で認容性ありとする報告が多数であるが¹³⁻¹⁶⁾、これらのリスクを有する症例の検討は慎重に行われた。

方法は、G-CSF 5 μg/kg/dayを4日間連日皮下注射し、4日目に血液成分採取装置を用いてPBSCH(末梢血幹細胞採取)を行う。ここで採取された単核球数とCD34陽性細胞数をフローサイトメトリーで計測する。CD34陽性細胞数1×10⁷個以上を目標に採取するが、万が一CD34陽性細胞が1×10⁷個未満となった場合でも、患者が治療継続を希望した場合には治療継続とした。さらに採取当日、全身麻酔もしくは腰椎麻酔下に、採取した幹細胞液を、下肢の場合は腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋、短指屈筋等に、上肢の場合は橈側手根屈筋・尺側手根屈筋・浅指屈筋・深指屈筋・円回内筋・方形回内筋・長掌筋等に、2~3 cm間隔で70~140カ所それぞれ0.5 mlずつ筋肉移植する。

当院では2008年10月までに23名(男性15例)のCLI患者に対して同移植を施行した。対象患者は、Fontaine III度4名・IV度19名であり、原疾患はASO 18例・Diabetic foot 3例・SLE 1例・PSS 1例であった。74%(17例)が透析例(平均透析歴9.4±9.1年)であり、74%(17例)が糖尿病合併、30%(7例)が心疾患の既往を有していた。治療後評価項目は、Fontaine III度ではSF-36もしくはWong Baker FACES pain rating scale¹⁷⁾によるpain scoreの推移とした。Fontaine IV度では潰瘍・壊疽範囲の推移として検討した。その結果、複数の専門医による治療後臨床評価では、Fontaine III度では75%(3/4例)で疼痛の改善を認め、Fontaine IV度(潰瘍)例では70%(7/10例)で改善もしくは悪化進展抑制(不変)を示した。ただしFontaine IV度(壊疽)例での壊疽進展阻止もしくは切断レベルを下げた症例は44%(4/9例)にとどまった。以上の結果より早期治療介入が望ましく、また非急速進行性の病変が適応と考えられた。また糖尿病透析例の長期検討では、皮膚温度・疼痛スコアの早期からの改善効果が示唆された(Fig. 1, 2)。当院からの報告も含め、さまざまな施設より自家末梢血幹細胞移植の治療効果が報告され

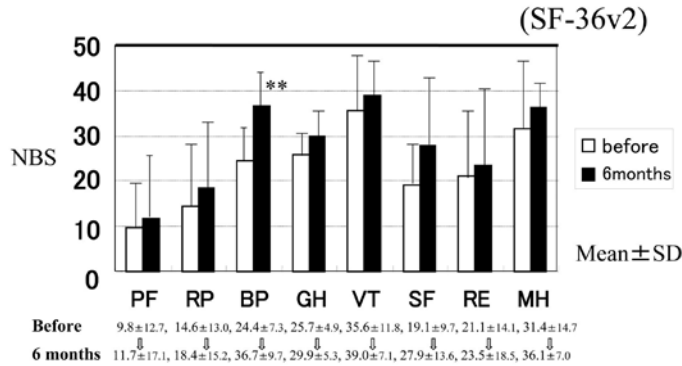


Figure 2 Health related quality of life changes.

All HR-QOL parameters before the treatment were significantly lower than the Japanese standard population; physical functioning, physical role, and social functioning were all less than 20. These data clearly show how ASO patients with DM on HD have poor HR-QOL, and PBMNC transplantation improve their HR-QOL, especially bodily pain improved with significance ($p < 0.01$).

** $p < 0.01$

PF, physical functioning; RP, role physical; BP, bodily pain; GH, general health perceptions; VT, vitality; SF, social functioning; RE, role emotional; MH, mental health; NBS, norm-based scoring

ている。しかし少数例の retrospective study が多く、疾患の性質上、さまざまな交絡因子が臨床成績に影響を及ぼしている可能性がある。実際、細胞移植の治療効果に批判的な意見として、細胞移植以外の効果(入院安静・局所処置・禁煙などリスクファクターの除去)の交絡を指摘する声もある。実際の臨床報告では、禁煙などのリスクファクターの除去や安静局所処置を十分に施行したうえで、なおかつ治療抵抗性である症例を対象にしており、安静時疼痛の改善や潰瘍縮小効果は細胞移植による効果と考えられているが、真に有効であることを示すためには、安全性を証明した後、他の治療法との比較や多施設でのランダム化比較試験が必要である。しかし血管再生療法のエビデンスが確立していない現状において、わが国で GCP に則った質の高い臨床研究を行うためには、血行再建術との直接比較臨床試験やプラセボを用いた臨床試験は倫理的問題が生じる可能性があり、従来治療に細胞移植を上乘させた多数例での検討が現実的であろう。

エビデンスの構築に向けて

いかなる新たな技術であっても、多数例・多施設において安全かつ有効に施行できなければ「新しい治療法」ということはできない。自家末梢血幹細胞移植のエビデン

スを明らかにすべく、平成 18 年より札幌北楡病院川村理事長を中心に国内 8 病院(当時)による研究会を立ち上げ、臨床情報研究センターの支援のもと、G-CSF 動員自家末梢血幹細胞移植の臨床効果と安全性に対する全国レトロスペクティブ調査を施行した。全国 162 例(うち ASO 140 例、透析 108 例)を検討した結果、本移植による重篤な合併症は認められず、本移植の安全性が明らかとなった¹⁸⁾。またほとんどが Fontaine IV の透析例が対象となっているにもかかわらず、従来治療を上回る amputation free survival が観察され、本移植の治療効果が示唆された。

これらの結果をもとに、現在わが国初の再生医療第 III 相臨床試験「末梢動脈疾患患者に対する G-CSF 動員自家末梢血単核球細胞移植治療のランダム化比較試験 (IMPACT STUDY)」(全国 19 施設参加予定)が計画され、現在臨床研究開始最終段階となっている。この比較試験は、従来の推奨療法群と推奨療法 +G-CSF 動員自家末梢血単核球細胞移植併用療法の 2 群にランダム化し、無増悪生存期間を primary endpoint として 1 年間比較検討するデザインとなっている。これらの比較検討試験を通じて自家末梢血幹細胞移植の有用性が明らかになることが望まれる。また本研究は先進医療の枠組みで行われるわが国初の多施設共同臨床試験であり、この臨床試験を通

じた先進医療技術の広がり と 保険医療化が期待される。

謝 辞

今回の研究にあたり、札幌北楡病院川村明夫先生・堀江卓先生、東京医科歯科大学金子英司先生、千葉東病院岩下力先生、板橋中央総合病院赤松真先生、神奈川県立循環器呼吸器センター市川由紀夫先生、慶応義塾大学石田明先生、北野病院塚本達雄先生、臨床研究情報センター福島雅典先生・手良向聡先生・小野寺理恵先生・大野隆之先生、虎の門病院循環器センター成瀬好洋先生、形成外科大原鐘敏先生をはじめ多くの先生方のご協力に深謝いたします。

文 献

- Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA et al: Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*, 2007, **45**: S1A–S67A.
- Hoshino J, Ubara Y, Ohara K et al: Change in the activities of daily living (ADL) in relation to the level of amputation of patients undergoing lower extremity amputation for arteriosclerosis obliterans (ASO). *Circ J*, 2008, **72**: 1495–1498.
- Isner JM, Baumgartner I, Rauh G et al: Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg*, 1998, **28**: 964–973.
- Schumacher MD, Pecher MD, von Sprecht BU et al: Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors; first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation*, 1998, **97**: 645–650.
- Morishita R, Aoki M, Hashiya N et al: Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension*, 2004, **44**: 203–209.
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: for the Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells; a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet*, 2002, **360**: 427–435.
- Inaba S, Egashira K, Komori K: Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 2002, **360**: 2083.
- Kawamura A, Horie T, Tsuda I et al: Prevention of limb amputation in patients with limb ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation. *Ther Apher Dial*, 2005, **9**: 59–63.
- Hoshino J, Ubara Y, Hara S et al: Quality of life improvement and long-term effects of peripheral blood mononuclear cell transplantation for severe arteriosclerosis obliterans in diabetic patients on dialysis. *Circ J*, 2007, **71**: 1193–1198.
- Kawamura A, Horie T, Tsuda I et al: Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs. *J Artif Organs*, 2006, **9**: 226–233.
- Matoba S, Tatsumi T, Murohara T et al: Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation [TACT] trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J*, 2008, **156**: 1010–1018.
- Hill JM, Syed MA, Arai AE et al: Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in Patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **46**: 1643–1648.
- Kuethle F, Figulla HS, Herza M et al: Treatment with granulocyte colony-stimulating factor for mobilization of bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*, 2005, **150**: 115.e1–7.
- Ince H, Petzsch M, Kleine HD et al: Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by granulocyte colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI) trial. *Circulation*, 2005, **112**: 1–73–80.
- Zohlhofer D, Ott I, Mehili J et al: Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction. *JAMA*, 2006, **295**: 1003–1010.
- Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y et al: Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: results of the double-blind, randomized placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEM-MI) trial. *Circulation*, 2006, **113**: 1983–1992.
- Wong DL, Hockenberry-Eaton M, Wilson D et al: Whaley and Wong's nursing care of infants and children. Mosby, 1999, 1153.
- Horie T, Onodera R, Akamatsu M et al: Long-term clinical outcomes for patients with lower limb ischemia implanted with G-CSF-mobilized autologous peripheral blood mononuclear cells. *Atherosclerosis*, in press.

Autologous Peripheral Blood Mononuclear Cell Transplantation for Peripheral Arterial Disease

Junichi Hoshino,¹ Yo Fujimoto,² Kenmei Takaichi,¹ Sugao Ishiwata,² and Minoru Ohno²

¹Nephrology Center, Toranomom Hospital, Tokyo, Japan

²Cardiovascular Center, Toranomom Hospital, Tokyo Japan

Key words: peripheral arterial disease, neovascularization therapy, peripheral blood mononuclear cell transplantation, randomized controlled trial, dialysis

Recently, neovascularization therapy using angiogenic peptide or autologous cell transplantation has been performed for patients with intractable peripheral arterial diseases. Autologous peripheral blood mononuclear cell (PBMNC) transplantation is one of the most widely performed neovascularization therapies in Japan, because of its technical reliability and less invasiveness. This therapy is considered safe and effective, according to our analysis of 162 cases in a multicenter study in Japan, including our hospital. Based on this survey, a multicenter prospective randomized controlled trial is planning to start this year, in order to further investigate PBMNC transplantation. (J Jpn Coll Angiol, 2010, **50**: 331–336)