

バージャー病に対する血管新生療法

南野 徹^{1,2}

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。すでにバージャー病を含めた重症下肢虚血に対して、骨髄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われわれの成績を含めて現状を概説したい。

(J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 67-72)

Key words: mononuclear cells, endothelial progenitor cells, angiogenic factors

治療的血管新生治療 Therapeutic angiogenesis

近年の血管形成、血管新生に関する研究は目覚ましいものがあり、その成果をもとにさまざまな臨床研究が開始されている。成人期における血管形成は、古典的には血管新生 angiogenesis や側副血行路の形成 arteriogenesis による機序のみと考えられていた(**Fig. 1**)。Angiogenesis はもともと存在している毛細血管が伸長することによって新たな毛細血管網を形成する過程であり、VEGF や FGF などの血管増殖因子によって協調的に調節されている。Arteriogenesis はいわゆる血管造影上認められる小動脈の側副血行路の形成を意味する。動脈の閉塞に伴いもともと存在する小動脈への血流が増加しメカニカルストレスが加わり、サイトカインの発現亢進と炎症細胞の浸潤が誘導されることによって arteriogenesis は促進される。

これらの基礎的な研究を背景として、治療的血管新生 Therapeutic angiogenesis という概念が確立され、ヒト下肢虚血に対する臨床研究が開始された。VEGF による重症虚血下肢の治療に関する研究では、プラスミドやリコンビナントタンパクなどを用いた Phase I 研究において有効性が示唆された^{1,2)}。しかし、多くのプラセボコントロール二重盲検試験(Phase II)では、その有用性が確認

できなかった(RAVE, GRONINGEN)^{3,4)}。一方、FGF-2 タンパクによる間欠性跛行症例に対する治療のプラセボコントロール二重盲検試験(TRAFFIC)ではその有効性が確認された⁵⁾。FGF-1 プラスミドによる重症虚血肢に対する治療についてのプラセボコントロール二重盲検試験(TALISMAN 201)において、潰瘍の改善度には変化がなかったが、治療に伴い下肢切断率が低下したことから、FGF の有効性が示唆されている⁶⁾。HGF プラスミドによる重症虚血肢に対する治療についてのプラセボコントロール二重盲検試験(HGF-STAT)では、治療群において組織酸素分圧の改善が認められたが、潰瘍や疼痛、切断率の改善はみられなかった⁷⁾。これらの治療による副作用としては、血圧低下や血管透過性の亢進とそれに伴う浮腫(VEGF と FGF)、腎機能障害(FGF)などが知られている。

細胞治療による血管新生

これまで成人における血管形成は、既存の血管から新たな血管が形成される血管新生 angiogenesis と側副血行路の形成 arteriogenesis によってなされると考えられていたが、いくつかの研究グループより新しい血管形成の概念が提唱された^{8,9)}。それは末梢血中に骨髄由来の血管内皮前駆細胞が存在し、成体においても胎児期同様に血

¹ 千葉大学大学院医学研究院循環病態医科学² 科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業さきがけ

2010年3月15日受理

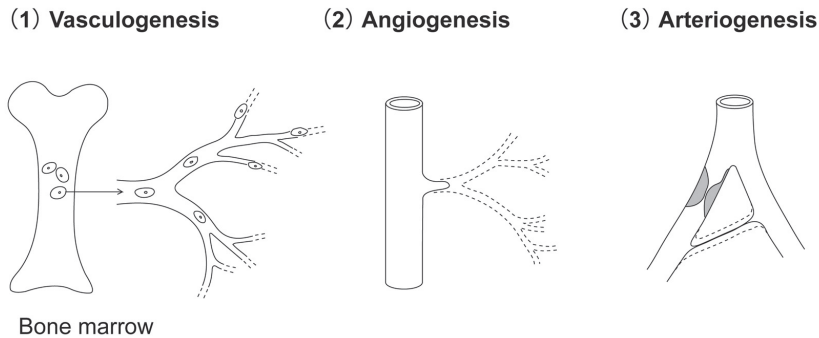


Figure 1 Mechanisms of vascular formation.

管の分化形成がおこるといものである(**Fig. 1**)。その後、血管内皮前駆細胞についての研究は全世界で精力的に行われ、その結果黄体形成などの生理的血管形成だけではなく、腫瘍血管形成や心筋梗塞などの虚血に対する血管形成、創傷治癒過程における血管形成などの病態に対しても前駆細胞による血管形成が関与していることが明らかとなった。さらに動物を用いた虚血モデルにおいては、血管内皮前駆細胞を患部に直接移植する方法や、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)などのサイトカインによって前駆細胞を骨髄より動員させる方法などによって、血管形成を誘導し病態を改善しうることが多くのグループから報告された。このような骨髄由来の内皮前駆細胞の同定によって、骨髄単核球などをヒト虚血下肢に移植するという新たな治療的血管新生 Therapeutic angiogenesis の戦略が生まれた。

なかでも世界に先駆けて日本で実施された臨床研究が TACT trial である。この研究では、重症下肢虚血患者 25 症例のパイロットスタディーにて安全性を確認後、両下肢に重症虚血のある症例(n=20)に対してそれぞれ骨髄単核球と末梢血単核球を移植し、その効果について比較検討した¹⁰⁾。骨髄単核球による治療後 4 週間目の評価では、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 mmHg から 46.3 mmHg と有意な改善傾向を示し、疼痛なしでの歩行可能時間も改善した。これらの臨床効果は少なくとも 6 カ月後まで持続した。いずれの指標(ABI, 安静時疼痛, 組織酸素分圧)についても末梢血単核球による改善効果は骨髄単核球に比して小さかった。さらに長期フォローの結果では、これらの臨床効果は 2 年間維持さ

れていることが報告されている¹¹⁾。その後もこれらの結果を支持する報告が多くなされ、G-CSF によって動員した末梢血単核球、あるいは G-CSF 投与なしで回収した末梢血単核球を用いても、同等の効果が得られることが示唆されている¹²⁾。

末梢血単核球を用いた血管新生治療の臨床成績

このようななか、われわれは独自に末梢血単核球を用いた血管新生治療について基礎研究を重ねてきた。その結果、単核球は高度な血管新生効果を持つこと、その効果は骨髄由来の単核球と比較して、勝るとも劣らないことを見出した¹³⁾。サイトカインを使用せず回収された末梢血単核球には幹細胞が非常に少ないにもかかわらずこれだけの効果が得られたことや、幹細胞をのぞいた骨髄単核球でも同様の血管新生作用があることを示すデータも得られたことから、血管新生治療に幹細胞が関与するメカニズムは必ずしも必須ではないとわれわれは考えている。事実その後も、骨髄単核球移植による血管新生治療効果の大半は単核球から分泌される血管増殖因子によるものであるとの報告や骨髄単核球から血管へ分化する頻度は極めて低いとの報告が相次いでおり、われわれの考えをさらに裏付けしている¹⁴⁻¹⁷⁾。

本学倫理委員会承認のもと、重症末梢性動脈疾患を対象とした臨床研究を 2002 年 7 月より開始し、これまでに 80 例以上に対して本治療を行っている^{18,19)}。適応は既存の治療法では改善の見込めない重症下肢虚血患者とし、除外項目として増殖型糖尿病性網膜症、悪性新生物を設けた。登録された全症例において難治性皮膚潰瘍や激しい安静時疼痛が認められ、7 割以上が前医で下肢

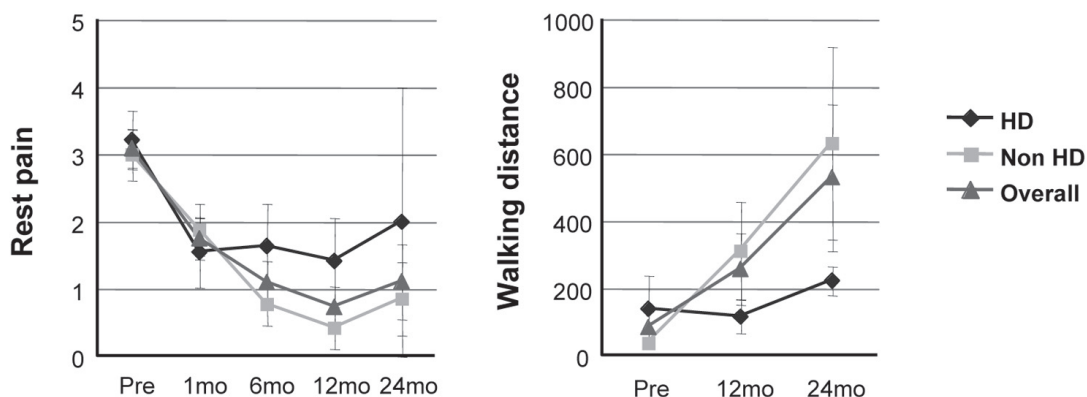


Figure 2 Effect of PB-MNC injection.

The effect of therapeutic revascularization with PB-MNC was estimated by improvement of the rest pain scale (A) and walking distance (B) during a 2-year follow-up period (1 mo, 6 mo, 12 mo, and 24 mo).

HD, hemodialysis

A | B

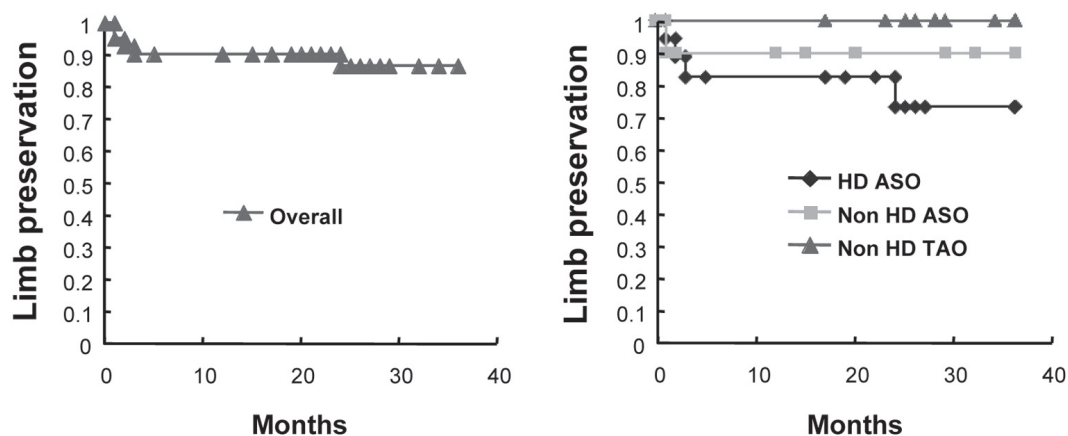


Figure 3 Limb preservation during a 3-year follow-up period.

HD, hemodialysis; ASO, arteriosclerosis obliterans; TAO, thromboangiitis obliterans

切断が必要と診断されていた。長期フォローを完了した症例の平均年齢は 61.2 歳、臨床診断は 66.7% が閉塞性動脈硬化症、残りがバージャー病であった。約半数が血液透析患者で、80% 以上の症例が複数の冠動脈リスクファクターを持っていた。われわれは連続成分採血によりこれらの患者から単核球細胞 $1 \sim 2 \times 10^{10}$ 個と若干の血小板成分を採取し、虚血患肢へ筋注により移植している。プロトコル上移植は 2 回行っており、施行前と施行後に自覚症状の評価、潰瘍の改善度、血流の改善度、合併症の評価を行っている。その結果、移植後 2 カ月目ですでに効果がみられ、6 カ月目の時点では、さらに有

意な安静時疼痛の改善、歩行距離の延長が認められた (Fig. 2)。その効果は少なくとも 2 年後の時点でも持続していた。安静時疼痛の改善は 69.7%、皮膚潰瘍の改善は 61.3% において認められた。前医で下肢切断が必要と診断されていた症例におけるの救肢率は 80% 以上であったが、全体では大切断に至った症例も年間約 10% の割合でみられた (Fig. 3)。重症下肢虚血の大切断率 (1 年間) は約 30~50% とされていることから、本治療の切断回避に対する有効性が示唆された。透析患者においては、安静時疼痛や歩行距離の改善率が低い傾向があった (Fig. 2)。また、大切断に至るケースのほとんどは閉塞

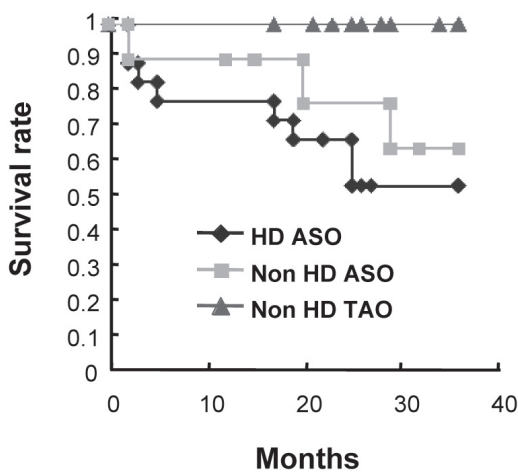


Figure 4 Survival rate after treatment. HD, hemodialysis; ASO, arteriosclerosis obliterans; TAO, thromboangiitis obliterans

性動脈硬化症の透析患者であり、パージャー病患者では認められなかった(**Fig. 3**)。本研究の治療群での1年生存率は88.1%であったが、死亡原因は本治療と因果関係のない敗血症や肺炎、肝障害などであった。また重症下肢虚血を持つ患者の生存率は75%程度と報告されていることから、本治療が生存率を低下させることはないと考えられた。透析症例では、非透析症例に対して著しく予後は不良であったが、一般的に報告されている重症下肢虚血を持つ透析患者の3年生存率(20~30%)と比較して悪化傾向はなかった(**Fig. 4**)。これに対して、パージャー病の症例において死亡例はなかった(**Fig. 4**)。

治療後の心血管系の有害事象として、脳梗塞発症が7例、既存の冠動脈病変が軽度進行した例が7例あったが、本治療法との明確な因果関係は不詳であった。なお、心血管系イベントが認められた症例の多くは、閉塞性動脈硬化症の透析患者であり、パージャー病患者においてはこれらの有害事象を認めなかった(**Fig. 5**)。われわれは本治療経過中に進行性の動脈硬化病変が悪化する可能性を充分配慮する必要があると考えており、全症例において、冠動脈造影検査・頸動脈エコーをフォローしている。しかし心筋 SPECT による評価にて、むしろ全体では血流低下領域の縮小がみられることが明らかとなった。また、70歳以下の症例では、治療効果がみられた群において予後が改善する傾向にあったことから、本

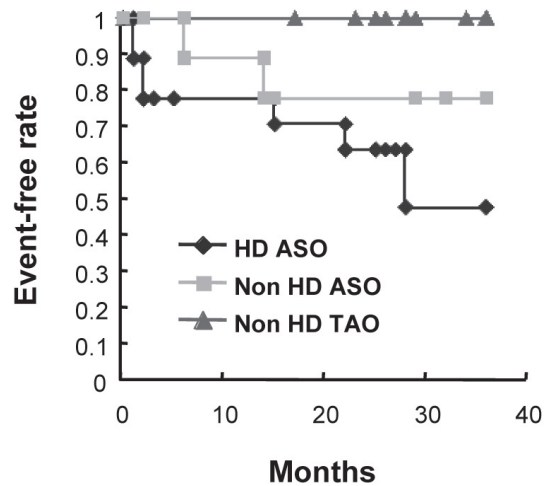


Figure 5 Cardiovascular events after treatment. HD, hemodialysis; ASO, arteriosclerosis obliterans; TAO, thromboangiitis obliterans

治療の安全性が示唆された。

再生医療の問題点と今後の課題

これまで行われた再生医療に関する臨床研究では、その安全性が証明され、有効性について肯定的な結果も多い。しかし、現在行われている多くのトランスレーショナルリサーチの問題点として、その作用メカニズムを十分解明せずに大規模トライアルが進められていることが挙げられる。その作用メカニズムとして、移植細胞が心筋細胞や血管内皮細胞へ直接分化することの重要性は、その確率から考えると高いものではない。また、移植後の単核球の局所生存率も低いことが観察されており、移植細胞から分泌される増殖因子のみでその効果を説明するのも困難である。したがって、現在われわれが提唱している「移植された組織の内因性の修復機転を活性化する」という機序についても考慮すべきである。

多くの薬物治療(例えばアスピリンなど)は、その有効性が確立した時点では作用機序の不明なものが多かったことから、現在行われている細胞治療も同様に考えることができるかもしれない。しかし細胞治療の場合、使用している細胞がきわめて多様であること、同様のプロトコルでも結果に大きく相違が認められることなどから、作用メカニズムの解明は必須であろう。

おわりに

末梢血管疾患に対する細胞治療による再生療法の進歩について概説した。本治療は、バージャー病による重症虚血肢には有効性・安全性ともに高いことが示唆されたのに対して、閉塞性動脈硬化症の透析患者においては、効果が低いことが明らかとなった。骨髓に含まれている血管内皮前駆細胞が内皮に直接分化して血管形成に関与するという発見は新しい再生療法の先駆となったが、そのメカニズムについての研究は転換期にある。今後基礎研究と臨床研究を同時に進めていくことによって、治療のメカニズムを解明し、一層効果の高い治療法を開発できるものと考えられる。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Rajagopalan S, Mohler ER 3rd, Lederman RJ et al: Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation*, 2003, **108**: 1933.
- 4) Kusumanto YH, van Weel V, Mulder NH et al: Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum Gene Ther*, 2006, **17**: 683.
- 5) Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD et al: Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet*, 2002, **359**: 2053.
- 6) Nikol S, Baumgartner I, Van Belle E et al: Therapeutic angiogenesis with intramuscular NVIFGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Mol Ther*, 2008, **16**: 972.
- 7) Powell RJ, Simons M, Mendelsohn FO et al: Results of a double-blind, placebo-controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 2008, **118**: 58.
- 8) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964.
- 9) Shi Q, Rafii S, Wu MH et al: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998, **92**: 362.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Lachmann N, Nikol S: Therapeutic angiogenesis for peripheral artery disease: stem cell therapy. *Vasa*, 2007, **36**: 241.
- 13) Minamino T, Toko H, Tateno K et al: Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet*, 2002, **360**: 2083.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) Jackson KA, Majka SM, Wang H et al: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001, **107**: 1395.
- 18) Tateno K, Minamino T, Toko H et al: Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res*, 2006, **98**: 1194.
- 19) Moriya J, Minamino T, Tateno K et al: Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv*, 2009, **2**: 245.

Therapeutic Angiogenesis for Buerger's Disease

Tohru Minamino^{1,2}

¹Department of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

²PRESTO, Japan Science and Technology Agency

Key words: mononuclear cells, endothelial progenitor cells, angiogenic factors

Our recent knowledge in molecular biology enabled us to treat patients with critical limb or myocardial ischemia by therapeutic angiogenesis. It has been reported that therapeutic angiogenesis is safe and effective for the treatment of limb ischemia due to thromboangiitis obliterans and arteriosclerosis obliterans. However, a number of issues remain to be solved for this treatment. Here we review the history and recent progress of therapeutic angiogenesis, including the long-term results of our therapeutic angiogenesis, and we discuss potential problems of cell transplantation therapy.

(J Jpn Coll Angiol, 2011, **51**: 67–72)