

虚血臓器に対する自己骨髄細胞を用いた血管新生治療法

濱野 公一*

要 約

近年、骨髄中や血液中に存在する血管内皮前駆細胞による血管新生が注目されてきている。著者らは、骨髄細胞が内皮前駆細胞を含むと同時に種々の growth factor を分泌することに注目し、虚血臓器へ直接注入することにより血管新生を誘導する試みを開始した。ラット下肢虚血モデルやラット心筋梗塞モデルを用いた基礎実験において血管新生を認めると同時に組織血流の増加を認めた。さらに、ラット下肢虚血モデル、ラット心筋虚血モデルにおいて、自己骨髄細胞の虚血臓器への投与により、虚血により低下した運動耐用能の回復を認めた。これらの結果をもとに、重症虚血肢、重症狭心症の患者を対象に臨床試験を開始している。現在まで、5例の虚血肢の患者に対し2例の有効例、5例の虚血心の患者に対し3例の有効例を認めている。

Key word : 血管新生, 細胞移植, 骨髄細胞, 増殖因子, 虚血心, 虚血肢

はじめに

近年、重症虚血肢や重症心筋虚血に対する種々の growth factor の投与や遺伝子導入といった手法を用いた血管新生治療法は、多くの基礎研究の結果をもとに、臨床試験が行われている。重症虚血肢に対する Vascular endothelial growth factor (VEGF) の DNA 単体プラスミド導入という遺伝子治療の臨床試験は良好な結果が報告され¹⁾、引き続き、虚血性心疾患患者に対して臨床試験が行われている^{2,3)}。しかし、VEGF のプラスミド投与による糖尿病性網膜症の増悪、悪性腫瘍の発

生などが懸念されている。

本来血管新生 (angiogenesis) とは、既存の血管内皮細胞がプロテアーゼを産生し、血管基底膜を消化し、内皮細胞の増殖による新たな管腔形成をなすものである。一方、胎生期の血管形成 (vasculogenesis) とは、内皮前駆細胞の増殖により管腔形成が起こるものであるが、近年、成人でも vasculogenesis が起こることが確認された⁴⁾。そこで、著者らは、骨髄細胞の中には内皮細胞に分化する未熟な細胞があることと、骨髄細胞自身が、血管新生を誘導する growth factor を分泌すると考えられることから、血管新生の材料として自己骨髄細胞に注目した。基礎研究の結果^{5~8)}ならびに臨床試験の成績について述べる。

骨髄細胞における growth factor の分泌

まず、骨髄細胞が Growth factor を分泌しているか否かをラットの骨髄を用いて Growth factor の代表である VEGF と basic fibroblast growth factor (bFGF) を免疫染色にて検討したところ、比較的大型の細胞が VEGF や bFGF を分泌していた (図1)。VEGF, bFGF の発現率は骨髄に存在する全有核細胞中それぞれ16%, 4%であった。また、骨髄細胞を培養し、培養上清中に分泌される VEGF を測定したところ、20%酸素で培養するのに比し、2%酸素の低酸素で培養した方が、有意に VEGF の産生は増加した (表1)。

ラット角膜モデルでの評価

そこで、in vivo における骨髄細胞注入による血管新生を評価するためにラット角膜モデルを用いて骨髄細胞注入により血管新生が起こるか否かを検討した。DA ラットから骨髄を採取し、single cell suspension とした後、赤血球を除去した。

*山口大学医学部外科学第一講座

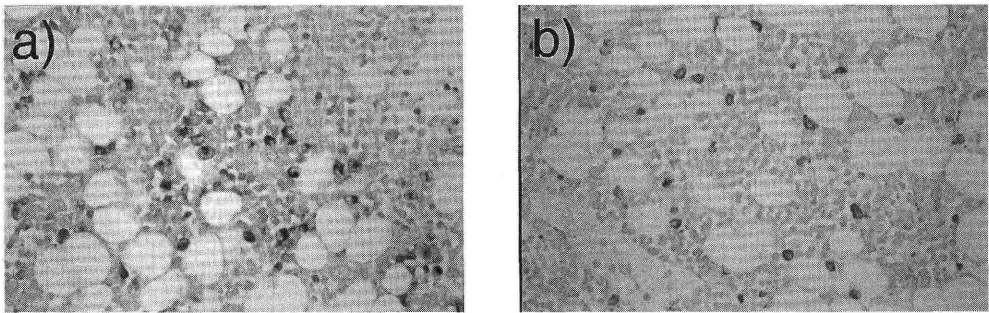


図1 ラット骨髄における VEGF および bFGF の発現。
a) VEGF 陽性細胞, b) bFGF 陽性細胞. 拡大率100倍

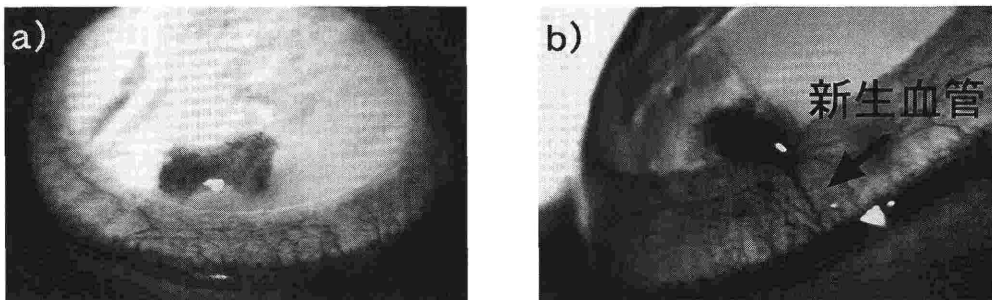


図2 ラット角膜モデルにおける血管新生。
a) コラーゲンのみ挿入, b) コラーゲンおよび骨髄細胞を挿入

表1 培養上清中に放出された VEGF

	Day 2 (pg/ml)	Day 4 (pg/ml)	Day 6 (pg/ml)
Normoxia	42.6±2.0	87.9±14.6	93.5±6.0
Hypoxia	74.0±3.8	188.0±21.1	298.4±4.5
<i>p</i>	0.0002	0.0025	<0.0001

Values are expressed as means±SD, *p*; normoxia v.s. hypoxia

同じく DA ラットを用いて角膜にポケットを作製し, 骨髄細胞をラットのコラーゲンに混入する形で, ポケット内へ挿入した. 骨髄細胞注入5日後より, 血管新生を認めるようになり, 注入1週間目には明らかな新生血管を認めた (図2).

ラット下肢虚血モデルでの評価

さらに, ラット下肢虚血モデル (大腿動脈を結紮) を用い, 血管新生の程度を評価した. 骨髄細胞は, $1 \times 10^7 / 10 \mu\text{l}$ を6ヶ所, 大腿筋内に直接注入した. 血管新生の程度は, alkaline phosphatase

染色による血管数, laser Doppler color image による組織血流量にて比較した. ラットを以下の4群に分け検討した. 皮膚切開のみ施行した Sham 群, 大腿動脈を結紮切離した Ischemia 群, 大腿動脈を結紮切離後, 骨髄細胞を浮遊させる PBS のみを大腿筋内に注入した PBS 群, 大腿動脈を結紮切離後, 骨髄細胞を大腿筋内に注入した bone marrow implantation (BMI) 群である. ラット下肢虚血モデルでの大腿筋における単位筋細胞当たりの血管数は, 骨髄細胞投与後2, 4週間後のいずれでも有意 ($p < 0.05$) に対照群に比し高値であった (図3). 骨髄細胞投与後4週間後の laser Doppler color image による組織血流量の測定では, 下肢を虚血としたままのラットでは減少しているのに比し, 骨髄細胞を注入した群ではほぼ正常に回復していた (図4).

また, ラット下肢虚血モデルにおいて虚血により低下した運動耐用量がどの程度回復するかをトレッドミルを用いて検討した. 骨髄細胞を注入し

た群では運動耐用能は注入後2週間目より有意 ($p < 0.05$) に改善した (図5)。

臨床試験として、虚血肢患者5人 (ASO 4例, TAO 1例) に対し、本治療法を単独で施行し、狭心症患者5人にCABGとの併用で、バイパス

不可能な領域に対して本治療法を施行した。

虚血肢患者に対する臨床試験では、5例中4例に治療後自覚症状の改善を認めた。5例中2例に皮膚温の上昇、5例中2例に血管造影検査での側副血行路の増加と新生血管を認め、5例中1例に

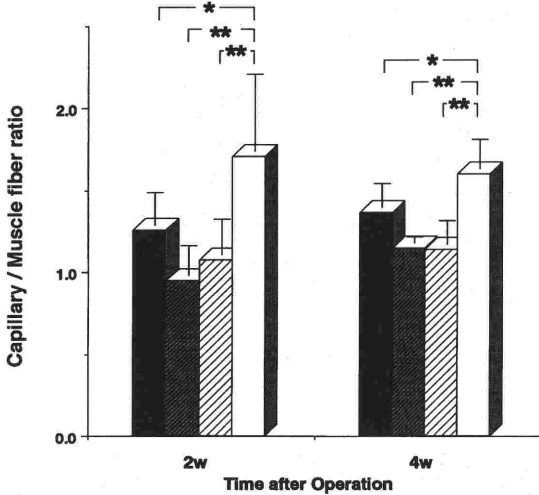


図3 大腿筋における血管数の変化。
 ■; Sham群 (n=5), ▨; Ischemia群 (n=5), ▩; PBS群 (n=5), □; BMI群 (n=5), * ; $p < 0.05$, ** ; $P < 0.01$

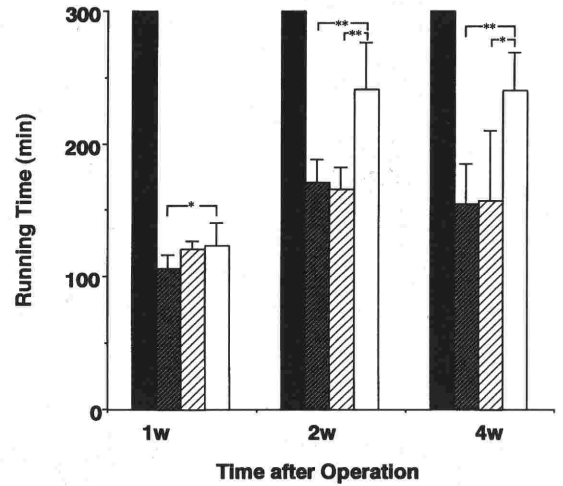


図5 トレッドミル負荷による運動耐用能の変化。
 ■; Sham群 (n=5), ▨; Ischemia群 (n=5), ▩; PBS群 (n=5), □; BMI群 (n=5), * ; $p < 0.05$, ** ; $P < 0.01$

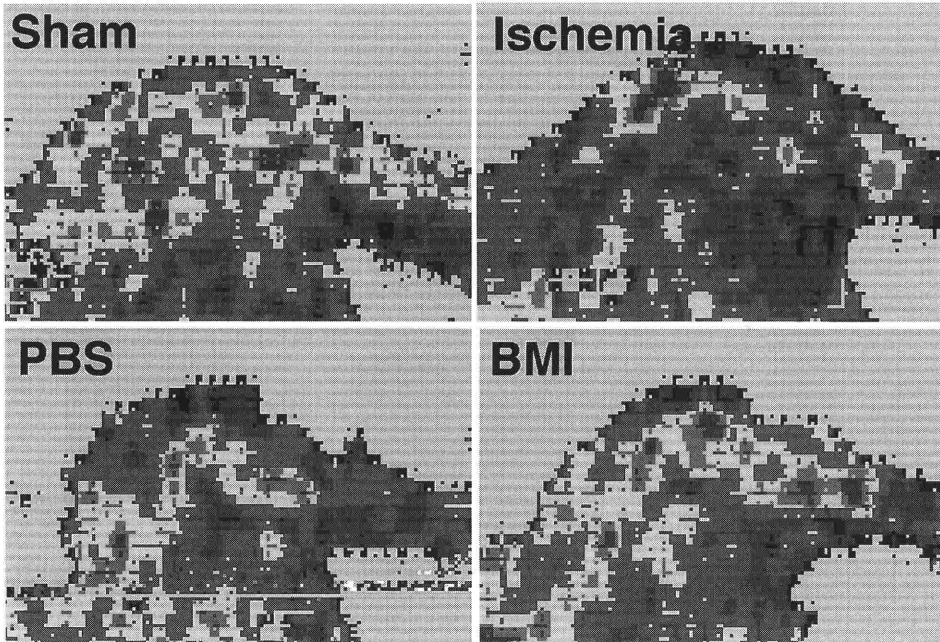


図4 Laser Doppler color image によるラット下肢組織血流量の評価

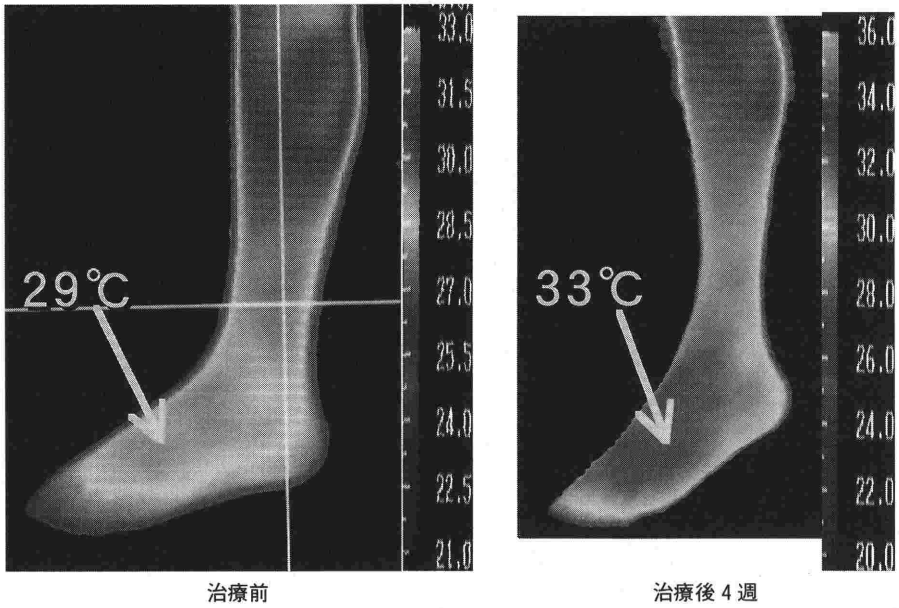


図6 下肢サーモグラフィー

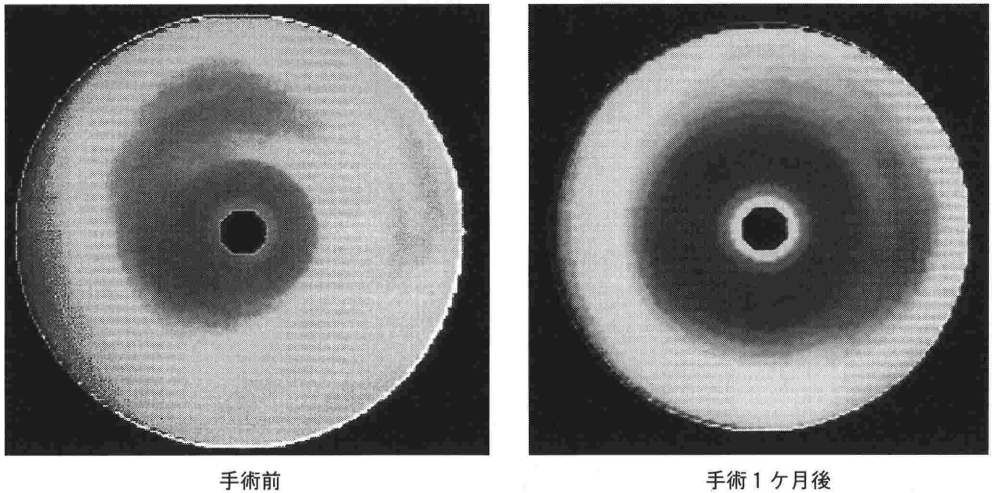


図7 TI-心筋シンチグラフィー

TcPO₂の上昇を認めた。ASO患者の1例を呈示するが、77歳の男性で過去に4回のバイパス術を受け、左足はすでに切断されている。今回右下肢の冷感が強く本治療を希望された。骨髓細胞注入後明らかな皮膚温の上昇を認め(図6)、血管造影検査上でも側副血行路の増加と新生血管を認め、自覚症状も軽快した。狭心症患者に対する臨床試験では、5例中3例に心筋シンチにて血流の改善を認めた。臨床試験開始後約1年が経過しているが、明らかな副作用は認められていない。今

後注入する細胞数、注入する細胞分画などの検討が必要であると思われる。治療後に血流が改善した狭心症患者の1例を提示する。症例は73歳、女性。3枝病変であったが、回旋枝領域は冠動脈が細くバイパス不能と判断し、LAD領域、RCA領域にはバイパスをおこなったが、Cx領域には患者の自己骨髓細胞の心筋内注入を施行した。術後のTI心筋シンチグラフィーにてCx領域の血流が改善されたことがわかる(図7)。

おわりに

近年、細胞移植による血管新生が注目されている。末梢血、臍帯血から分離した内皮前駆細胞^{9,10)}の虚血組織内への投与により血管新生を誘導する試みもなされている。著者らは、現在、骨髓細胞から、単核球分画を分離し、使用しているが、骨髓細胞中のどの細胞群が最も効率的に血管新生を誘導するかは、今後明らかにされるべきことである。また、ES細胞から血管内皮へ分化させることも可能となり¹¹⁾、今後臨床応用へ向けたさらなる研究に期待が持たれる。著者らの研究において、自己骨髓細胞の注入は虚血肢の実験動物モデルにおいて血管新生を誘導し、運動耐用能も改善した。現在、虚血肢患者や狭心症患者に対して臨床試験を行っているところである。細胞移植による血管新生治療法は、新しい手法であるが、どの程度効果があるかは、臨床試験の結果を待たなければならない。また、より効率的な血管新生を誘導する手法の確立を目指してさらなる研究が必要であると思われる。

文 献

- 1) Isner JM, Walsh K, Symes JF, et al : Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patients with ischemic limb. *Lancet* 348 : 370-374, 1996
- 2) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al : Gene therapy for

- myocardial angiogenesis. Initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 98 : 2800-2804, 1998
- 3) Symes JF, Losordo DW, Vale PR, et al : Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg* 68 : 830-837, 1999
- 4) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 : 964-967, 1997
- 5) T. Kobayashi, K. Hamano, T. Li, S. et al : Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model. *J Surg Res* 89 : 189-195, 2000
- 6) K.Hamano, T. Li, T. Kobayashi, S. et al : Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells. *Cell Transplant* 9 : 439-443, 2000
- 7) S. Ikenaga, K. Hamano, M. Nishida, et al : Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model. *J Surg Res* 96 : 277-283, 2001
- 8) K. Hamano, T. Li, T. Kobayashi, et al : The induction of angiogenesis by the implantation of autologous bone marrow cells: a novel and simple therapeutic method. *Surgery* (in press)
- 9) Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al : Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cell for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci. USA* 97 : 3422-3427, 2000
- 10) Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al : Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105 : 1527-1536, 2000
- 11) Vitti D, Prandini MH, Berthier R, et al : Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* 88 : 3424-3431, 1996