

総説

細胞移植と再生医療 —末梢血管病から難治性心臓病へ—

松原 弘明^{1,2}, 辰巳 哲也¹
林 宏鑑^{1,2}, 中島 規雄^{1,2}

はじめに

生活習慣の変化に伴い、我が国における糖尿病患者数は著明に増加し、現在では700万～800万人と推察され、これらの患者のうち医療機関で十分治療されている人は約半数にすぎないと報告されている。糖尿病の多くは無自覚・無症状であるが、網膜症・腎症・神経障害など糖尿病に特有の細小血管障害(microangiopathy)および虚血性心臓病・脳卒中・閉塞性動脈硬化症などの大血管障害(macroangiopathy)という合併症を招来する。細小血管の合併症は血糖コントロールの重要性が指摘されているが、大血管合併症は耐糖能が境界型のものでも、動脈硬化疾患の発症リスクは正常型に比べて高いことが報告され、カテーテルによる血管形成術や外科的血管再建手術が進歩した現在でも、治療困難な症例が数多く存在する。本稿では糖尿病患者において予後と関係の深い虚血性心臓病、閉塞性動脈硬化症に対する再生医療の現況について概説する。

心血管系における再生医療の動向

21世紀は再生医学の時代といわれ、その進展に大きな期待が寄せられている。そのなかでも心血管系の機能制御はすべての組織機能や生命維持にとって最も基本的かつ不可欠なことである。血管は全長10万kmに及び、その基本構成細胞である

血管内皮細胞が覆う面積は7000m²、重量は1kgといわれ人体最大の臓器であると考えられている。従来成人における血管新生は、既存の内皮細胞の増殖と遊走によるもののみであると理解されてきたが、成人の末梢血には骨髄から動員された血管内皮前駆細胞が存在し生後の血管新生に寄与することが最近明らかにされた¹⁾。さらに骨髄に存在する多能性幹細胞が心筋細胞や内皮細胞に分化することが報告され^{2,3)}、これらの幹細胞を用いた再生医療が循環器領域に応用されつつある。本邦では世界に先駆けて、閉塞性動脈硬化やバージャー病など虚血下肢に対する骨髄単核球細胞移植を用いた血管新生の有効性が発表され⁴⁾、この治療は再生医療としては初めて高度先進医療の保険適用を受けることになった。さらに最近では、虚血性心臓病に対する骨髄単核球細胞移植による血管新生療法の有効性が動物モデルとともに臨床的にも報告されるようになり^{5~7)}、重症狭心症や虚血性心筋症の治療に新たな展開が期待されるに至っている。このように、心血管系における再生医学は基礎的研究が飛躍的に臨床へ応用されつつある。

血管新生

血管の発生は、胎生期における循環系の形成や成人での性周期に応じた子宮内膜増殖などにみられる生理的現象だけでなく、炎症、創傷治癒、糖尿病網膜症、腫瘍の増殖などの病的な状態にも関与する重要な過程である。発生学や組織学の視点から、広義の血管新生は以下の2種類に大別される。1つは発生初期における内皮細胞の前駆細胞である血管芽細胞(angiolast)または血管内皮前駆

¹ 京都府立医科大学大学院循環器病態制御学

² 京都大学医学部探索医療センター「重症心不全への細胞移植プロジェクト」

細胞(endothelial progenitor cell : EPC)からの全く新しい脈管系の発生で、脈管形成(vasculogenesis)と呼ばれるものであり、もう1つのタイプは、すでに組織に存在する血管系からの、内皮細胞増殖および遊走を基本とした新しい娘血管枝の形成で、狭義の血管新生(angiogenesis)と呼ばれるものである。最近まで、生後の血管新生は、すべて angiogenesis によるものであると考えられてきたが、循環血液中を流れる EPC がこのvasculogenesis に関与し、虚血下肢や虚血心筋での側副血行路は vasculogenesis が初期反応であり、angiogenesis が遅れて参加すると認識されてきた。さらにこの血管新生には VEGF(vascular endothelial growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), bFGF(basic fibroblast growth factor), angiopoetin-1 などの増殖因子・血管成熟促進因子が複雑に関与し、虚血組織において血管新生を誘導することが明らかになった⁸⁾。

血管新生療法

A. 骨髄細胞移植による閉塞性動脈硬化症やパージャーカー病の虚血下肢への血管新生医療

経皮的血管形成術や外科的バイパス治療に限界のある重症の虚血性心臓病や末梢性血管疾患(閉塞性動脈硬化症・パージャーカー病)に対して最近、虚血部周辺の組織からの血管新生や側副血行の発達を促し、虚血組織の血流を確保し、組織障害や壊死

を軽減させようとする試みがなされている。これらは治療的血管新生あるいは血管新生療法(Therapeutic angiogenesis)とよばれ、虚血組織や臓器の救済・機能回復という点で現在、重要な治療戦略になりつつある。骨髄単核球には血管内皮系幹細胞が存在し、内皮系幹細胞以外の造血系幹細胞は VEGF, angiopoetin-1 などの血管内皮増殖因子・血管成熟促進因子を合成・放出する(図1)。骨髄単核球の虚血下肢や虚血心筋への筋肉内投与が有効な血流増加・血管新生増加を誘導することが、我々や久留米大学の室原博士らによって動物実験で確認された^{9,10)}。これらの基礎データをもとに倫理委員会の承認を受け、ヒト虚血肢に対して vasculogenesis を利用した血管新生療法を久留米大学・自治医科大学と共同で2000年1月より開始した(Japan Trial for Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation) (J-TACT)。これをうけて2000年6月より、現在まで外科的・内科的治療によっても下肢虚血改善の認めない患者45人の虚血下肢(Fontaine 3~4度)に対して自家骨髄細胞移植を実施した。コントロール不良の糖尿病・網膜症、悪性腫瘍の合併症例は除外した。全身麻酔下で自家骨髄液約500ccを採取したのち速やかに骨髄単核球を分離し、約10億個の細胞を虚血肢の筋肉内40カ所に分割注入した。骨髄移植群ではABI(上肢・下肢血圧比)が0.097増加し、対照群のABIが0.024であり、統計学的有意な差を認めた。下肢疼

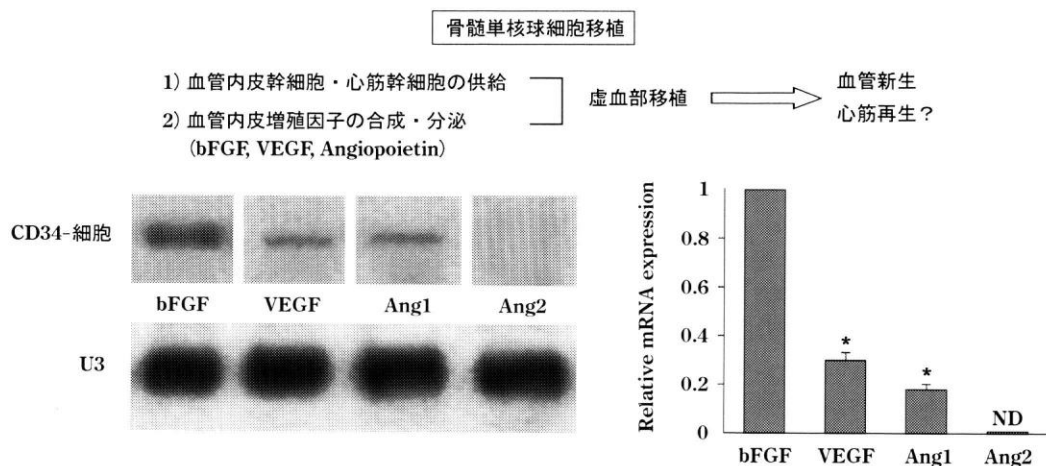
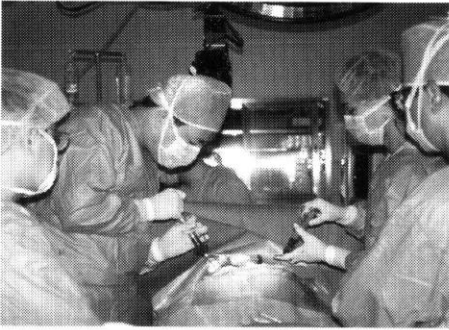


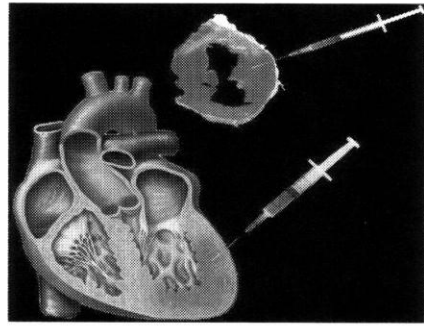
図1 骨髄単核球移植による血管新生・心筋再生医療

骨髄単核球細胞の移植は血管内皮幹細胞・心筋幹細胞の供給と VEGF・FGF・angiopoetin-1 といった血管新生因子を産生することにより血管新生・心筋再生を誘導する。

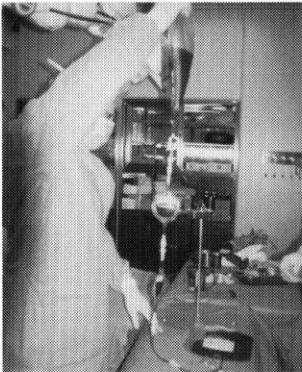
1. 腸骨より骨髓細胞採取



3. 虚血心筋部位への筋肉内投与



2. 骨髓単核細胞の単離・濃縮



4. 移植骨髓細胞の新生血管・心筋細胞への分化

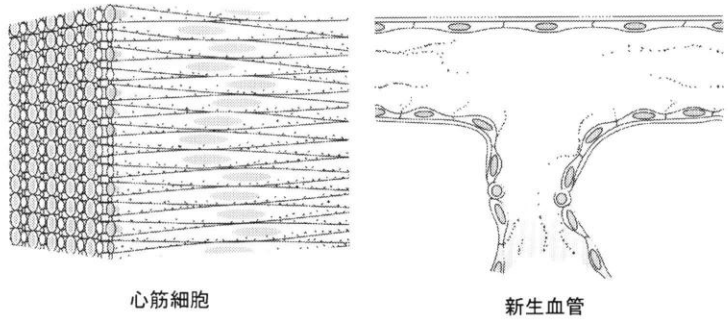


図2 概念図—骨髓単核球移植による狭心症治療—

全身麻酔下で腸骨より自家骨髓液約 500cc を採取したのち速やかに骨髓単核球を分離し、約 10 億個の細胞を虚血心筋の筋肉内に移植する。

痛完全緩和が 20 人中 18 人でみられた。トレッドミル歩行距離は約 2.6 倍以上増加した。この治療成績は Lancet に世界初の循環器病での細胞移植による血管新生治療として掲載された⁴⁾。本邦でも 24 大学病院を中心に 100 人以上の no option 虚血下肢で苦しむ患者さんが治療を受けられている。2003 年 6 月 25 日に、厚生労働省は再生医療としては初めて高度先進医療の保険適用を関西医大、久留米大学、自治医大の 3 施設に許可した。

B. 大動物狭心症モデルに対する骨髓単核球細胞移植

最近、非常に未分化な造血系幹細胞 (lin^- , $c-kit^+$, $sca1^+$) が心筋幹細胞に分化するとの報告がなされた²⁾。血管内皮系幹細胞、心筋幹細胞に加えて血管内皮増殖因子を含む骨髓単核球移植が血管再生に有効である可能性を大動物実験で我々は検討した(図2)。冠動脈結紮によるブタ急性心筋梗塞モデルを用いて自家骨髓単核球を梗塞周囲部位に開胸にて心外膜側より心筋内に移植した。3 週間後には移

植部血管数が 3 倍以上増加し、血管造影で明らかな側副血管が観察された(図3)。移植骨髓細胞は新生血管の 20~30% に内皮細胞として分化していた(図4)。骨や骨芽細胞の形成、6 ヶ月週 1 回 24 時間 Holter 心電図フォローした不整脈の出現は認めなかった。また、我々の系では移植骨髓細胞の心筋細胞への分化は観察できず、一部はマクロファージへの分化が認められた¹⁰⁾。ヒトの狭心症は慢性虚血心であるため、大動物実験モデルとしてはアメイロイドコンストリクターでの冠動脈狭窄が必要である。また、カテーテルを介した経皮的注入が将来は好ましい。NOGA mapping システムは虚血冬眠心筋を同定し、経カテーテル的に細胞移植が可能な画期的な装置である。電気的活動を示す部位と機械的運動を示す部位がリアルタイムに同定可能であり、不一致領域は冬眠心筋である。経カテーテル的にブタ冬眠心筋に骨髓単核球を移植すると著しく運動低下部位が改善し、生食を注入した冬眠心筋は改善ではなくさらなる悪化を示した¹¹⁾。

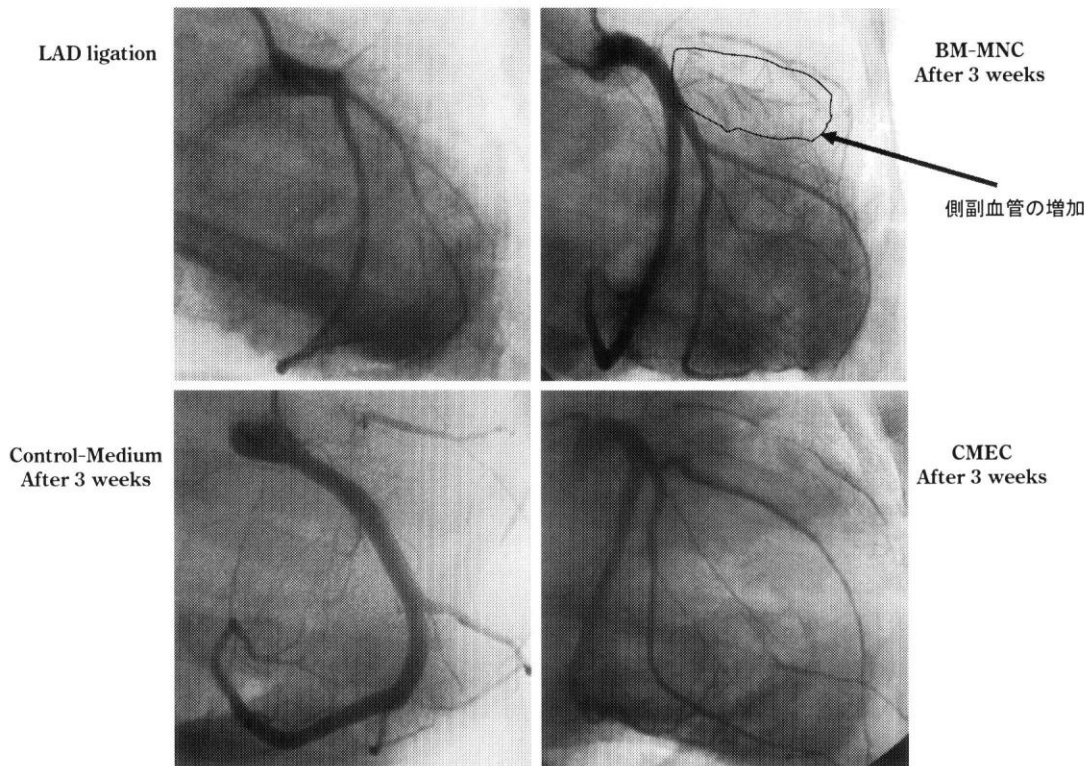


図3 急性心筋梗塞モデルにおける骨髄単核球移植

冠動脈結紮によるブタ急性心筋梗塞モデルを用いて自家骨髄単核球を梗塞周囲部位に開胸にて心外膜側より心筋内に移植した。3週間後には血管造影で明らかな側副血管が観察された。

LAD ligation；冠動脈前下行枝結紮. BM-MNC；骨髄単核球細胞移植. CMEC；冠動脈微小血管内皮細胞.

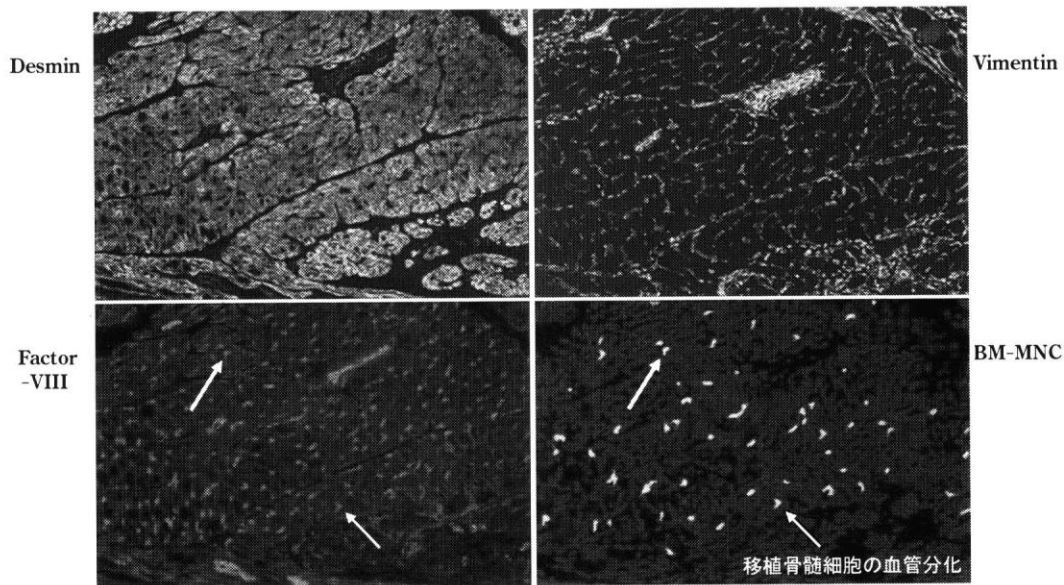


図4 急性心筋梗塞モデルにおける移植骨髄細胞の分化

冠動脈結紮によるブタ急性心筋梗塞モデルを用いて自家骨髄単核球を梗塞周囲部位に開胸にて心外膜側より心筋内に移植した。3週間後には移植骨髄細胞の心筋細胞への分化は観察されなかったが移植部血管数が3倍以上増加した。

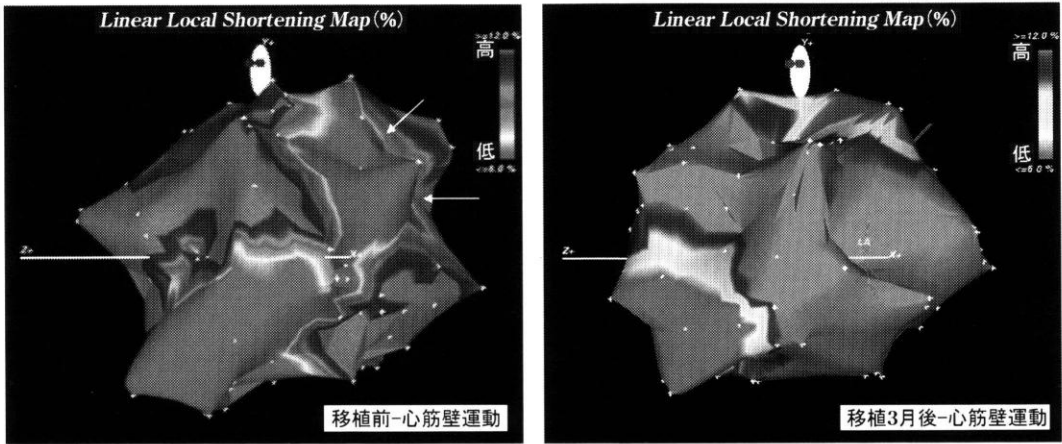


図5 NOGA マッピングシステムによる狭心症患者への骨髄単核球移植の効果

NOGA システムにより電気活動陽性(紫: viability), 壁運動低下(赤: wall motion)の虚血冬眠部位(矢印)に約30カ所骨髄単核球を移植した. No-option 狭心症患者への骨髄細胞移植後3月後には壁運動は著しく改善し(赤から紫色: 右図), 左心室収縮率(EF)は22%から49%へと増加した.

C. 陳旧性心筋梗塞・梗塞後狭心症に対する骨髄細胞移植治療

動物を用いた基礎的研究に基づき, 我々はこれまでに, 本邦において4例(関西医科大学3例・京都府立医科大学1例)の重症狭心症の方に外科バイパスと併用しない経カテーテル的(NOGA mapping システム)あるいは開胸下での虚血冬眠心筋への骨髄細胞移植のみの治療を行った. 提示する症例は64歳の男性で, 心筋梗塞発症後8年を経過し, バイパス手術2回, 冠動脈形成術5回受けられている. CCS class IVの重症狭心症であり, 安静時狭心痛が頻発し, 1日15回程度のニトログリセリンスプレーを使用している. 肋間小切開にてNOGA mapping システムで同定された虚血冬眠心筋に心外膜側より, 自家骨髄単核球を30カ所に移植した. 紫>青>黄が良好に活動・運動を示す部位であり, 赤が活動・運動低下部位である. 経カテーテル的に冬眠心筋に骨髄単核球を移植した部位は著しく運動低下部位が改善した(赤から紫)(図5). 14日以内に狭心痛は全く消失した. 4ヵ月間, 週1回24時間Holter心電図フォローした不整脈の出現は認めなかった. CPK, Troponinで評価される心筋傷害は最小限であり, 4日以内に正常域に復帰した. 左心室収縮率は43%から52%へと増加した. 心筋シンチでは負荷後再分布現象は消失し, 運動対応能は3倍も充進した(図6). その他の症例も胸痛の消失, 心機能の改善がみられている. 特異的

な副作用は出現していない.

これまでに報告された虚血性心臓病に対する細胞移植再生医療を表1に示す. Stammらは心筋梗塞発症後3ヵ月以内の6人の患者に他の領域へのバイパス手術と併用して 1.5×10^6 個のAC133⁺自家骨髄単核球細胞を梗塞境界領域に移植し, 心筋血流分布とともに左室駆出率による心機能の改善がみられたことを報告した⁵⁾. またTseらは8人の狭心症患者にNOGA mapping システムを用いて経カテーテル的に自家骨髄単核球細胞を移植し, 我々と同様に狭心痛の軽減, MRIで評価した心筋血流分布や局所壁運動の改善を報告している⁶⁾. 米国では同じく経カテーテル的に重症の虚血性心不全患者21人に自家骨髄単核球を移植する治療が行われ, 安全性とともに虚血部血流増大や心機能の改善が認められている⁷⁾. このように心筋梗塞, 虚血性心筋症, 狭心症に対して骨髄細胞移植が行われ, いずれも冠灌流や心機能の改善がみられている.

D. 急性心筋梗塞に対する骨髄細胞移植治療

急性心筋梗塞の際には急性期7日目をピークとして骨髄から末梢血に血管内皮前駆細胞が動員されることや⁸⁾, 幹細胞のhoming factorであるstromal cell-derived factor 1(SDF-1)が心筋に発現し, SDF-1をtransfectionした線維芽細胞を移植しておくで梗塞心に骨髄幹細胞のhomingが促進され, 血管新生効果と心機能改善効果が増強されることが

SPECT-sestamibi 心筋シンチ

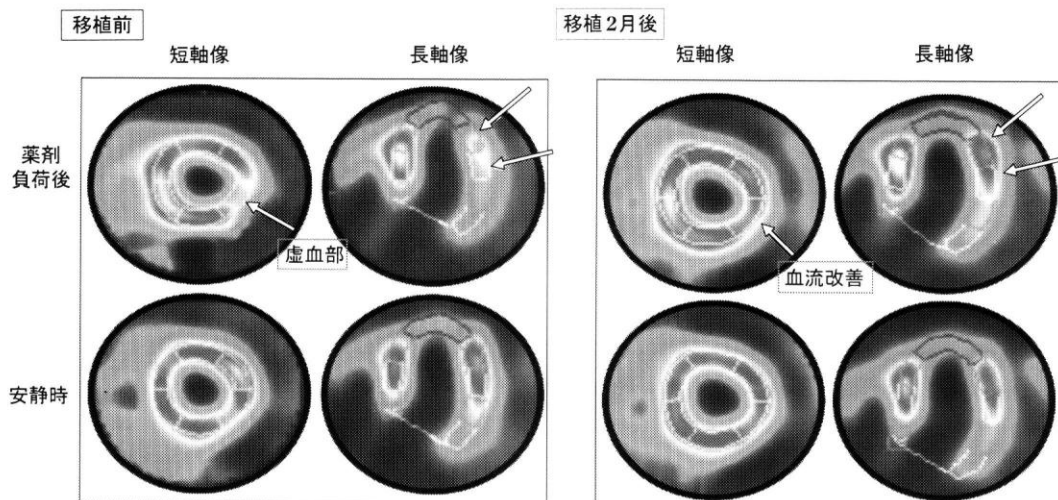


図6 SPECT-sestamibi 心筋シンチによる狭心症症例への骨髄単核球移植効果の評価
左室下壁側壁の負荷後再分布領域(矢印)は骨髄単核球移植の3月後には消失している。

表1 虚血性心臓病への細胞移植再生医療

著者	移植方法	移植細胞	疾患	移植日時	結果	掲載論文
Strauer BE, et al.	Intracoronary transplantation	BMCs	AMI	5~9日	冠血流, 心機能の改善	Circulation 2002; 106: 1913
Assmus BA, et al.	Intracoronary transplantation	BMCs	AMI	4.3日	冠血流, 心機能の改善	Circulation 2002; 106: 3009
Perin EC, et al.	Catheter (NOGA)-based transplantation	BMCs	ICM	-	冠血流, 心機能の改善	Circulation 2003; 107: 2294
Stamm C, et al.	Transplantation with CABG	BMCs	MI	10日~3ヵ月	冠血流, 心機能の改善	Lancet 2003; 361: 45
Tse HF, et al.	Catheter (NOGA)-based transplantation	BMCs	AP OMI	-	冠血流, 心機能の改善	Lancet 2003; 361: 47
Kang HJ, et al.	Intracoronary transplantation	Peripheral blood stem cells mobilized with G-CSF	AMI OMI	6日以後	冠血流, 心機能の改善	Lancet 2004; 363: 751
Wollert KC, et al.	Intracoronary transplantation	BMCs	AMI	4.8日	心機能の改善	Lancet 2004; 364: 141

示されている¹²⁾。最近、心筋梗塞急性期に骨髄単核球細胞または末梢血内皮前駆細胞を採取し、さらに梗塞責任冠動脈より注入移植することで心筋血流分布、冠予備能や左室駆出率が改善されるという興味ある結果が報告された^{13,14)}。我々もこれまでの再生医療に加え、急性心筋梗塞に対する骨髄と末梢血由来単核球を用いた血管新生治療の臨床研究を開始している(図7)。表1にみられるように、急性心筋梗塞に対してはStrauer¹⁵⁾やAssmus¹³⁾、Kang¹⁶⁾、Wollert¹⁷⁾らが我々と同様に冠動脈よりカテーテルを介して骨髄単核球、末梢血か

らの内皮系前駆細胞(培養液で増殖後)、G-CSF投与後に採取した末梢血単核球の移植を行い、心機能の改善を報告している。但し、最近のKangらの報告(G-CSF投与後に採取した末梢血単核球)では再生治療によりPCI後の再狭窄率が高まったという注意すべきデータが提示された。急性心筋梗塞に対して幹細胞移植を行うことで心機能が良くなるメカニズムとしては、細胞移植により血管新生や心筋細胞の抗アポトーシス効果が生じる結果、心筋の保護が促されたり、血管新生や線維芽細胞からのコラーゲン産生が梗塞巣のexpansionを抑制

血管内皮幹細胞移植を用いた急性心筋梗塞への血管新生治療

対象

急性心筋梗塞：ST上昇型の左冠動脈近位部閉塞による急性心筋梗塞で発症24時間以内にPCIを施行され、TIMI分類IIIの開通に成功した症例(100例予定)

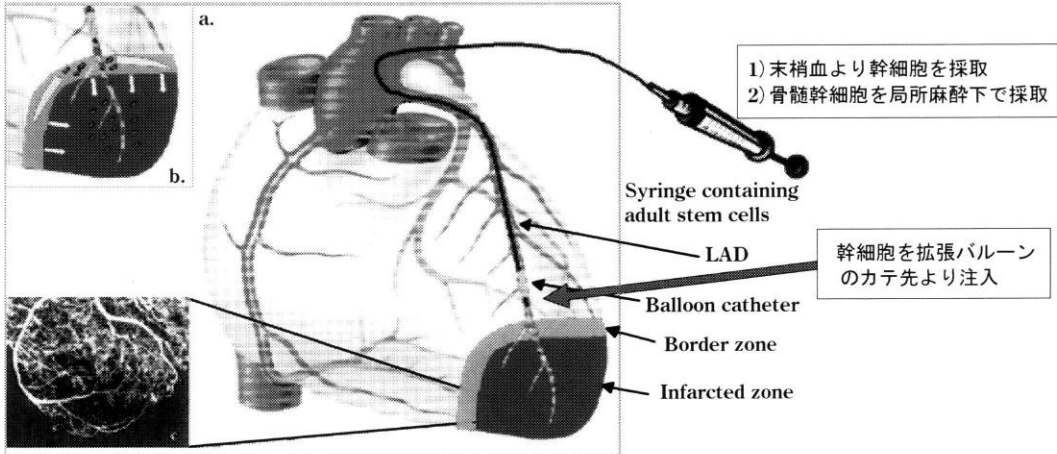


図7 概念図—内皮系幹細胞を用いた血管新生治療—

対象はST上昇型の急性心筋梗塞で発症24時間以内にPCIを施行されTIMI IIIを確保した症例で、移植する細胞は骨髄または末梢血単核球細胞を用い、移植する方法は冠動脈からバルーンカテーテルを介して移植する。症例を骨髄細胞移植群、末梢血細胞移植群、PCI単独群に分け、評価項目として移植後3ヵ月、6ヵ月後の心機能をLVG、MRI、心エコーで評価する。

することで、梗塞心のリモデリングが抑制され心機能が改善する可能性が考えられている¹⁸⁾。移植骨髄細胞からの心筋再生の可能性については未だ明らかではないが、骨髄細胞のtransdifferentiationやfusionの問題とともに今後解明されなければならない課題が残っていると見える。

このように骨髄細胞を用いた幹細胞移植は急性あるいは慢性の虚血心筋や閉塞性動脈硬化症に対する治療手段の可能性をさらに広げているが、骨髄細胞が心筋へ分化し得る可能性も含めて今後さらに移植する幹細胞の数や移植方法、幹細胞の虚血組織への生着ならびに分化・増殖の分子メカニズムを含めた研究が虚血性心臓病や重傷下肢虚血の有効な治療法に結びつき糖尿病の予後改善につながると考えられる。

文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7.
- 2) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-5.
- 3) 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: 430-6.
- 4) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-35.
- 5) Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al: Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-6.
- 6) Tse HF, Kwong YL, Chan JKF, et al: Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003; 361: 47-9.
- 7) Perin EC, Dohmann HFR, Borojevic R, et al: Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 2294-302.
- 8) Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, et al: Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation* 2002; 106: 2019-25.

- 9) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001; 103: 897-903.
- 10) 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: 1046-52.
- 11) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue N, et al: Improvement of collateral perfusion and regional function by catheter-based implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1804-10.
- 12) Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al: Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003; 362: 697-703.
- 13) Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al: Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-17.
- 14) Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, et al: Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): Mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003; 108: 2212-8.
- 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: 1913-8.
- 16) Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al: Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751-6.
- 17) 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: 141-8.
- 18) Forrester JS, Price MJ, Makkar RR: Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians. *Circulation* 2003; 108: 1139-45.