

報 告

## 末梢動脈閉塞症に対する骨髓単核球移植療法と 血管内皮前駆細胞の定量的評価

山本 晃士<sup>1)</sup> 鈴木 哲<sup>1)</sup> 小林 昌義<sup>2)</sup> 近藤 隆久<sup>3)</sup>  
古森 公浩<sup>2)</sup> 室原 豊明<sup>3)</sup> 高松 純樹<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>名古屋大学医学部附属病院輸血部

<sup>2)</sup>同 血管外科

<sup>3)</sup>同 循環器内科

(平成 17 年 3 月 22 日受付)

(平成 17 年 5 月 23 日受理)

THERAPEUTIC ANGIOGENESIS BY BONE MARROW MONONUCLEAR  
CELL TRANSPLANTATION AND QUANTITATIVE EVALUATION OF  
ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IN PATIENTS WITH PERIPHERAL  
OBSTRUCTIVE ARTERIAL DISEASE

Koji Yamamoto<sup>1)</sup>, Satoshi Suzuki<sup>1)</sup>, Masayoshi Kobayashi<sup>2)</sup>, Takahisa Kondo<sup>3)</sup>,  
Kimihiro Komori<sup>2)</sup>, Toyoaki Murohara<sup>3)</sup>, and Junki Takamatsu<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Departments of Transfusion Medicine, <sup>2)</sup>Vascular Surgery, and

<sup>3)</sup>Cardiology, Nagoya University Hospital

We performed therapeutic angiogenesis by cell transplantation ( TACT ) for patients with peripheral obstructive arterial disease using autologous bone marrow mononuclear cells. The patients' symptom has begun to improve within several days after therapy, as did laboratory data ( i.e., ankle-brachial blood pressure index, thermography, percutaneous measurement of oxygen pressure ) We quantified the mRNA expression of endothelial progenitor cell ( EPC )-specific molecules ( e.g., Flk-1, CD133, VE-cadherin, etc. ) in bone marrow- or peripheral blood-derived mononuclear cells obtained from patients with ischemic limbs, using real time reverse transcription-PCR. The mRNA expression level of EPC markers was significantly lower in the patients than in healthy controls. We further revealed the different expression pattern of EPC markers in several sources, including bone marrow and peripheral blood obtained from healthy volunteers or recombinant G-CSF-treated donors. The finding that the expression of EPC-specific molecules was decreased in the patients' marrow and blood suggests that patients with peripheral obstructive arterial diseases may have lower angiogenic potential. However, TACT with autologous marrow mononuclear cells was effective and increased the number of circulating EPCs in the patients' blood.

**Key words** : Angiogenesis, Stem cell, Endothelial progenitor cell, Transplantation, Ischemia

## はじめに

従来、成人における血管新生は、既存の成熟血管内皮細胞の増殖と遊走によるものだけであるとされてきたが、成人の末梢血中には、血管内皮細胞(endothelial cell: EC)に分化しうる血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)が存在することが明らかになった<sup>1)</sup>。また種々の動物実験により、成人の血管新生においても、胎生期に見られるような血管発生型の血管新生(neovascularization)が関与している可能性が示唆された<sup>2)3)</sup>。これらの血管内皮前駆細胞は骨髄より動員されると考えられており<sup>4)5)</sup>、実際に骨髄細胞移植によって虚血組織の血管新生を誘導できることが相次いで報告されている<sup>6)</sup>。

以上の理論的・実践的根拠に基づき、2000年より久留米大学・関西医科大学・自治医科大学の3大学病院にて、末梢動脈閉塞症(閉塞性動脈硬化症・Buerger病)患者への自己骨髄細胞の局所輸注(虚血部への筋肉内注射)が開始され、有効な血管新生療法(TACT: therapeutic angiogenesis by cell transplantation)として報告された<sup>7)</sup>。名古屋大学においても血管外科・循環器内科・輸血部の協力により、TACTと同様なプロトコールで細胞治療が始まった(TACT-Nagoya)。以下にその概略と、実際の症例を2例、紹介する。

### 1 対 象

日常生活が著しく障害されている重症の末梢動脈閉塞症(閉塞性動脈硬化症・Buerger病)患者で、FontaineのIII度およびIV度が対象となる。また、他の内科的・外科的治療に反応せず、今後も回復の期待ができない患者を対象とする。年齢は原則として20歳以上80歳以下で、男性・女性のいずれも対象となる。一方、適応除外項目として挙げられるのは、合併症により余命が1年未満と考えられる患者、アルコールまたは薬物依存の既往のある患者、悪性新生物を有する患者、重症の糖尿病性網膜症を有する患者、虚血性心疾患を有し、治療されていない患者などである。

### 2 方 法

全身麻酔下にて患者の後腸骨より400~500mlの骨髄液を採取し、総有核細胞数として3~10×

10<sup>9</sup>個を確保する。さらに閉鎖系にて比重遠心分離法(処理速度:50~60ml/分;遠心回転数:1,200~1,314rpm;遠心力:229~260xg;AS.TEC204, Fresenius社を使用)により骨髄単核球を分離し、1~5×10<sup>9</sup>個を確保する。さらにCD34陽性細胞の割合をFACSにて概測(0.8~1.2%程度)した後、40ml前後に濃縮する。引き続き全身麻酔下にて、虚血部位の約40~50カ所(2.5cm間隔にマーキング)に、採取した骨髄単核球を25G針にて0.5~0.8mlずつ筋肉内注射する。

### 3 治療効果判定

治療の効果判定は、以下の項目により総合的に行う。

身体的所見、歩行可能距離(疼痛出現までの歩行距離)、ABI(ankle-brachial blood pressure index)、レーザードプラー法または経皮酸素分圧測定法による下肢血流量の評価、血管造影による下肢骨格筋での血管新生の評価、QOL向上の評価

### 4 症 例

名古屋大学医学部附属病院にて自己骨髄細胞移植治療を行った症例を以下に紹介する。

<症例1>

Buerger病の37歳女性。

主訴:左第1趾足底部潰瘍。

喫煙歴:20本/日を15年間。

現病歴:2002年3月上旬、左第1趾足底部に安静時疼痛をともなう潰瘍が出現。近医受診し、血管造影などの検査を行ったところ、Buerger病と診断された。入院にて末梢血管拡張薬の投与および左腰部交感神経切除術を行うも潰瘍の改善を認めなかったため、2002年12月当院へ紹介となった。

入院時現症:血圧130/74mmHg,心音整,心雑音は聴取せず,大腿動脈は左右とも触知良好。足背動脈は,右は触知不可,左はごくわずかに触知した。ABI(足関節上腕血圧比)は右1.20,左1.09,左第1趾足底部に安静時疼痛をともなう10×15mmの潰瘍を認めた。また下肢血管造影では,左第1趾周辺にはほとんど血流は認められなかった。

骨髄単核球移植術およびその後の経過:全身麻酔下に両側後腸骨より500mlの骨髄液を採取し

た後、すみやかに単核球分離を行い、 $3.7 \times 10^9$  個の単核球を得た ( $3.0 \times 10^7$  の CD34 + cells を含む)。この単核球を約 30ml の浮遊液として調整し、左下腿屈側骨格筋内に 2.5cm 間隔で 0.7~0.8ml ずつ、計 40 力所に局注した。単核球分離後の赤血球成分は患者末梢血管より戻した。単核球移植後 3 日目から徐々に左第 1 趾足底潰瘍部の疼痛が軽減し、1 カ月後には安静時疼痛はほぼ消失して日常生活に支障のないまでに改善した。潰瘍は単核球移植後、急速に縮小し、2 カ月後にはほぼ消失した。移植半年後には局所の疼痛は完全に消失し、サーモグラフィーにより評価した皮膚表面温度も改善した。その後も現在にいたるまで、局所の疼痛や潰瘍の再発は認めていない。

#### <症例 2>

閉塞性動脈硬化症 (ASO) の 57 歳男性。

主訴：左第 3 趾潰瘍。

現病歴：1990 年 2 月、慢性腎不全にて人工血液透析の導入となる。2001 年、両下肢の間欠性跛行が出現。2002 年、右第 5 趾に潰瘍形成したが、プロスタグランジン製剤にて治癒。同年 8 月、治療抵抗性の左第 3 趾潰瘍が出現し、2003 年 2 月、細胞移植療法の適否について当院血管外科へ紹介となる。

骨髄単核球移植術およびその後の経過：全身麻酔下に両側後腸骨より 450ml の骨髄液を採取した後、単核球分離を行い、 $1.2 \times 10^9$  個の単核球を得た ( $1.35 \times 10^7$  の CD34 + cells を含む)。この単核球を約 30ml の浮遊液として調整し、左下腿屈側骨格筋内に 2.5cm 間隔で 0.8ml ずつ、計 35 力所に局注した。単核球分離後の赤血球成分は患者末梢血管より戻した。単核球移植後翌日から徐々に左第 3 趾潰瘍部の疼痛は軽減したが、潰瘍の治癒にはいたらず、最終的に患肢の切断を余儀なくされた。

#### 血管内皮前駆細胞の定量的評価

我々は、より治療効果の高い血管新生細胞治療を少ない侵襲で行うため、骨髄および末梢血に含まれる EPC の質的・量的評価と血管新生治療を受けた患者における EPC の動態に関する基礎的な検討を行った<sup>8)</sup>。具体的には、未分化な EPC の

マーカーとされる vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor (Flt-1, Flk-1), CD133, VE-cadherin, さらに成熟血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand factor (vWf) や PECAM-1 等の遺伝子発現を、real time RT-PCR 法により mRNA レベルで定量的に解析する系を確立した。以下に、健常人ボランティアや血液疾患寛解期の患者、G-CSF 投与を受けた末梢血幹細胞移植ドナー、および血管新生治療施行患者の末梢血および骨髄における、EPC/EC マーカー分子の遺伝子発現解析結果について述べる。

【方法・結果】インフォームド・コンセント取得後に上記の種々の検体を採取して単核球を分離し、STAT60 を用いて Total cellular RNA を抽出した。それぞれの RNA および内部基準となる standard control RNA を用いて EPC/EC マーカーにつき real time RT-PCR を行い、各分子の mRNA 発現量を定量した。その結果を Table 1~3 に示す。G-CSF 投与後末梢血や骨髄での EPC マーカー分子 (Flk-1, CD133, VE-cadherin) の mRNA 発現は、健常人末梢血の約 10 倍以上であり、はるかに多くの EPC を含んでいることが確認された (Table 1)。また下肢虚血病変に対する血管新生治療の対象となった末梢動脈閉塞症患者では、末梢血、骨髄単核球ともに治療前は健常人より EPC マーカー分子の発現量が有意に低い傾向にあった (Table 2)。これらの患者では血管新生治療 (局所への自己骨髄単核球輸注) 後 1~3 日目に、末梢血で EPC/EC マーカー分子の mRNA 発現量の増加を認めた (Table 3)。

#### 【考察】

今回の検討により、G-CSF 投与後末梢血や骨髄から得られた単核球では Flk-1, CD133, VE-cadherin といった分子の発現レベルが高く、より未熟なステージの血管内皮前駆細胞が多く含まれていることが、表面マーカー分子の発現量という点からも確認された。また、Flt-1, PECAM-1 などの発現レベルが高い、血管内皮への分化がある程度方向づけられた段階の細胞群も、G-CSF 投与後末梢血や骨髄中には豊富に存在することも証明された。一方、ASO や Buerger 病などの末梢動脈閉

Table 1 Quantitative evaluation of EPC/EC-specific molecules in different stem cell sources.

	Normal PB (n = 6)	G-CSF-PB (n = 5)	BM (n = 5)
Flk-1	< 1.0 × 10 <sup>5</sup> *	< 1.0 × 10 <sup>5</sup>	20.0 (3.9) × 10 <sup>5</sup>
CD133	1.5 (0.29) × 10 <sup>5</sup>	17.5 (4.2) × 10 <sup>5</sup>	15.0 (2.8) × 10 <sup>5</sup>
VE-cadherin	1.3 (0.22) × 10 <sup>5</sup>	100 (26.0) × 10 <sup>5</sup>	39.0 (7.4) × 10 <sup>5</sup>
Flt-1	3.5 (0.68) × 10 <sup>7</sup>	15.0 (3.7) × 10 <sup>7</sup>	38.0 (7.6) × 10 <sup>7</sup>
PECAM-1	6.5 (1.2) × 10 <sup>9</sup>	26.0 (6.4) × 10 <sup>9</sup>	42.0 (9.2) × 10 <sup>9</sup>
vWf	7.5 (1.6) × 10 <sup>7</sup>	7.3 (1.8) × 10 <sup>7</sup>	42.0 (8.5) × 10 <sup>7</sup>

\* All data are presented as the average number and (SD) of mRNA molecules per 100 ng total RNA of mononuclear cells in each sample.  
PB : peripheral blood ; BM : bone marrow

Table 2 Quantitative evaluation of EPC/EC-specific molecules in patients with ischemic limbs and in healthy (disease-free) volunteers.

	Peripheral blood		Bone marrow	
	ASO, Buerger (n = 5)	Healthy donors (n = 6)	ASO, Buerger (n = 4)	Healthy donors (n = 5)
Flk-1	< 1.0 × 10 <sup>5</sup> *	< 1.0 × 10 <sup>5</sup>	1.1 (0.20) × 10 <sup>6</sup>	2.0 (0.39) × 10 <sup>6</sup>
CD133	< 1.0 × 10 <sup>5</sup>	1.5 (0.29) × 10 <sup>5</sup>	0.61 (0.14) × 10 <sup>6</sup>	1.5 (0.28) × 10 <sup>6</sup> ***
VE-cadherin	< 1.0 × 10 <sup>5</sup>	1.3 (0.22) × 10 <sup>5</sup>	2.0 (0.37) × 10 <sup>6</sup>	3.9 (0.74) × 10 <sup>6</sup> **
Flt-1	1.2 (0.27) × 10 <sup>7</sup>	3.5 (0.68) × 10 <sup>7</sup> ***	1.4 (0.29) × 10 <sup>8</sup>	3.8 (0.76) × 10 <sup>8</sup> **
PECAM-1	3.8 (0.71) × 10 <sup>9</sup>	6.5 (1.2) × 10 <sup>9</sup> ***	9.6 (2.0) × 10 <sup>9</sup>	42.0 (9.2) × 10 <sup>9</sup> ***
vWf	2.5 (0.43) × 10 <sup>7</sup>	7.5 (1.6) × 10 <sup>7</sup> ***	3.4 (0.57) × 10 <sup>8</sup>	4.2 (0.85) × 10 <sup>8</sup>

\* All data for EPC/EC-specific molecules are presented as the average number and (SD) of mRNA molecules per 100 ng total cellular RNA of mononuclear cells ; \*\*  $p < 0.04$  ; \*\*\*  $p < 0.02$ .

Table 3 Quantitative evaluation of EPC/EC-specific molecules in peripheral blood of patients (1 ASO and 1 Buerger disease) before and after receiving mononuclear cell transplantation.

	Buerger disease		ASO	
	before	after 3 days	before	after 1 day
Flk-1	< 1.0 × 10 <sup>5</sup> *	< 1.0 × 10 <sup>5</sup>	< 1.0 × 10 <sup>5</sup>	< 1.0 × 10 <sup>5</sup>
CD133	< 1.0 × 10 <sup>5</sup>	1.3 × 10 <sup>5</sup>	< 1.0 × 10 <sup>5</sup>	1.1 × 10 <sup>5</sup>
VE-cadherin	< 1.0 × 10 <sup>5</sup>	8.4 × 10 <sup>5</sup>	< 1.0 × 10 <sup>5</sup>	1.3 × 10 <sup>5</sup>
Flt-1	1.2 × 10 <sup>7</sup>	2.9 × 10 <sup>7</sup>	0.38 × 10 <sup>7</sup>	1.3 × 10 <sup>7</sup>
PECAM-1	3.1 × 10 <sup>9</sup>	5.8 × 10 <sup>9</sup>	9.5 × 10 <sup>9</sup>	9.7 × 10 <sup>9</sup>
vWf	2.5 × 10 <sup>7</sup>	8.8 × 10 <sup>7</sup>	0.73 × 10 <sup>7</sup>	3.2 × 10 <sup>7</sup>

\* All data for EPC/EC-specific molecules are presented as the number of mRNA molecules per 100 ng total cellular RNA of mononuclear cells.

塞症患者群では、健常者に比べ、末梢血、骨髓単核球ともにEPCマーカー分子の発現量が有意に低く、血管内皮前駆細胞の含有量が少ないことが疾患の発症および進行に関わっている可能性が示

唆された。また、自己骨髓単核球投与後の末梢血EPC/ECマーカー分子発現量の増加の程度はASO患者でより低く、このことが病変部の予後に影響した可能性も否定できない。ただし、今回検

討したような末梢血中の EPC 表面マーカー分子発現量の追跡だけでは、局所投与された骨髄単核球が実際の血管新生にどの程度貢献したのか、はっきりとは証明されえないことも認識しておく必要がある。

虚血部位への骨髄単核球細胞移植により新生血管が形成される過程においては、いわゆる血管発生( vasculogenesis )と狭義の血管新生( angiogenesis )の両者の過程が進行していると考えられる。血管発生とは、血管内皮前駆細胞からまったく新しい血管が形成される過程である。一方、狭義の血管新生は、すでに組織に存在する成熟血管からの娘血管枝の発芽を意味し、VEGF などの血管増殖因子やサイトカインなどの刺激により引き起こされる基底膜の消化や血管内皮細胞の増殖・遊走によって新たな血管が枝分かれをしていく過程である。今回経験した当院での症例の術後経過を見てみると、患者の自覚症状は術後早期より改善傾向が認められており、血管発生というよりは狭義の血管新生によって病態が改善したという考え方のほうが理解しやすい。というのも、骨髄単核球分画中には、VEGF だけでなく angiopoietin や platelet derived growth factor ( PDGF ) 等を分泌する細胞群が豊富に含まれていると考えられるからである。術後 1~3 日における患者の自覚症状の改善には、これらのサイトカインによる(血管拡張効果も含めた)局所血流の改善が関与していた可能性がある。しかし症例 1 で見られたように、1~2 カ月経過した時点で血流の改善によると考えられる潰瘍の治癒が認められることから、長期的には局所に投与した骨髄単核球からの vasculogenesis も病態の改善に寄与していると考えられる<sup>9)</sup>。この点、投与する幹細胞ソースにおける EPC 表面マーカー分子の発現解析には、臨床的意義があると言える。また、骨髄単核球細胞移植後 1~3 日目に患者末梢血中での EPC 表面マーカー発現量が増加しており、これは局注した骨髄液中の EPC/EC の一部が末梢血へ移行し循環している可能性だけでなく、投与された骨髄単核球から分泌される angiogenic cytokines により骨髄から末梢へ EPC が動員された可能性もあると考えら

れる。今回は、患者血中、および投与した骨髄液中の angiogenic cytokines の発現量は測定していないが、これらの液性因子が実際の血管新生に寄与しているであろうことは想像にかたくない。これについてはいくつかの報告もあり<sup>10)-12)</sup>、事実、血管増殖因子として期待される hepatocyte growth factor ( HGF )<sup>3)</sup>や basic fibroblast growth factor ( b-FGF )<sup>4)</sup>の発現ベクターを虚血部位に局所投与するという遺伝子治療の臨床試験が進行中である。今後は、いかに侵襲の小さい方法で確実な血管新生効果を得られる治療を施行できるかが課題となる。我々もさらに解析症例をふやしてデータを集積し、血管新生治療症例あるいは幹細胞移植症例における血管新生ポテンシャルおよび治療効果の評価に用いると同時に、EPC を含む血液幹細胞を効率よく確保する手法の確立に寄与したいと考える。

## 文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275 : 964-967, 1997.
- 2) Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al : Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 5 : 434-438, 1999.
- 3) 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.
- 4) Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, Matsumoto A. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nat Med*, 2 : 90-93, 1996.
- 5) Shi Q, Rafii S, Wu MH-D, et al : Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 92 : 362-367, 1998.
- 6) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al : Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 103 : 897-903, 2001.
- 7) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al : Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation ( TACT ) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb

- ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells : a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 360 : 427-435, 2002.
- 8 ) Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, et al : Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs : therapeutic effect by stem cell transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24 : e192-e196, 2004.
- 9 ) Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al : Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 85 : 221-228, 1999.
- 10 ) Asahara T, Chen D, Takahashi T, et al : Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res*, 83 : 233-240, 1998.
- 11 ) Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al : VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 18 : 3964-3972, 1999.
- 12 ) Kamihata K, Matsubara H, Nishiue T, et al : Implantation of autologous bone marrow cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side-supply of angioblasts, angiogenic ligands and cytokines. *Circulation*, 104 : 1046-1052, 2001.
- 13 ) Morishita R, Aoki M, Hashiya N, et al : Therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor ( HGF ) *Curr Gene Ther*, 4 : 199-206, 2004.
- 14 ) Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, et al : Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia : acceleration of limb loss by over-expression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res*, 90 : 966-973, 2002.
-