
原	著
---	---

体外増幅自己赤芽球を用いた血管再生治療に関する 基礎的研究

小 田 雅 人

新潟大学大学院医歯学総合研究科 循環器学分野

(主任：相澤義房教授)

Basic Study of Angiogenesis by Ex - vivo Expanded Erythroblasts

Masato ODA

Division of Cardiology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

要 旨

【目的】重症下肢虚血患者に対する骨髓細胞移植による血管新生療法が広く行われているが、患者から 600cc の骨髓を採取するため患者への侵襲が大きく、また治療効果も不十分であるため治療法の改善が必要である。我々は BMI による血管新生において、移植骨髓中に含まれる赤芽球とマクロファージが主要な役割を果たしていることを報告した。そこで少量の骨髓中に含まれている造血幹細胞を増幅培養することで、血管新生作用に富む赤芽球とマクロファージの混合物を得るための培養条件を探索した。

【方法と結果】 1. ヒト骨髓から比重遠心法と免疫磁気ビーズ法を用いて低比重の前赤芽球/好塩基性赤芽球・中比重の多染性赤芽球・高比重の成熟赤芽球を精製し、CD34 陽性細胞と比較した。ヘモグロビン合成開始前後の未熟な赤芽球で血管増殖因子群の発現が高かった。2. 未熟赤芽球を増幅培養する条件について検討した。ヒト骨髓 MNC を rhFlt-3L・rhSCF・rhTPO の存在下で 7 日間培養し、その後 rhEPO・rhSCF・rhIGF-I の存在下で 7 日間の培養を行う 2 段階の培養法が最適の条件であった。3. この方法で得られた体外増幅赤芽球の移植による血流改善効果を、マウス下肢虚血モデルの治療実験を用いて評価し、骨髓細胞移植の効果と比較した。1 × 10⁶ コの体外増幅赤芽球の移植は、1 × 10⁶ コの骨髓細胞移植より良好な血流改善効果を示し、その作用は 1 × 10⁷ コの骨髓細胞移植に匹敵した。

Reprint requests to: Masato ODA
First Department of Internal Medicine
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学医学部第一内科学教室 小田 雅人

【結論】赤芽球のうち最も血管新生作用の強い細胞は、ヘモグロビン合成開始前後の未熟な赤芽球であった。このような未熟赤芽球を、少量の骨髓から体外増幅によって得る培養法を樹立した。体外増幅赤芽球の移植による血流改善効果は、従来の骨髓細胞移植より強力であった。本治療法は、本学に設置の倫理委員会および本病院に設置のIRBの承認を受け、第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験を開始した。これまでに本治療法を施行した2例では、良好な結果を得ている。症例数を増やして報告する予定である。

キーワード：血管再生, 慢性重症下肢虚血, 骨髓造血, 赤芽球, 体外増幅

緒 言

日米欧の先進諸国においては、心血管系・中枢神経および他の臓器における虚血性障害が死因の過半を占めており、これらの疾患が血管再生治療の潜在的な適応疾患と位置づけられる。臓器移植が困難な我が国においては血管再生治療法の開発は特に重要な課題の1つと考えられる。既に血管再生治療が循環器系虚血性疾患に対する先端的治療法として試みられ、現在では標準的治療法の開発競争の段階に至っている。血管新生療法には大きく2つの流れがある。すなわち血管新生サイトカインやその遺伝子を導入することで血管新生を促す「サイトカイン療法」と¹⁾、末梢血単核細胞や骨髓細胞を虚血局所に移植することで血管前駆細胞およびサイトカイン産生細胞を供給する「細胞療法」²⁾である。

これらの血管再生治療法の中で現在最も広く行われているものは、自家骨髓細胞移植療法(BMI)である³⁾。当施設では2001年12月を第一例目として慢性閉塞性動脈硬化症およびビュルガー病患者の虚血四肢へのBMIを開始し、これまでに40例以上に施行した。本治療は8割以上の患者に有効で、治療効果としては虚血性四肢潰瘍の改善、疼痛の軽減、無痛性歩行距離の延長などを認め、当初は画期的な治療として認識された。しかしながら症例の中には、本治療後も血流量の改善が小さく、臨床的治療効果およびQOLの改善も必ずしも十分とはいえない例が少なからず存在することが次第に明らかとなってきた。

BMIによる血管再生の機序は、当初は骨髓中に存在する血管内皮前駆細胞(endothelial progeni-

tor cells, EPC)⁴⁾が移植部位で血管新生(vasculogenesis)を起こすものと想像されていたが、実際には生体内で観察される新生血管の10%がvasculogenesisに由来することがわかった⁵⁾。このことは、ほとんどの新生血管がvasculogenesisではなく、局所に既に存在する血管からの発芽・伸長によって賄われる血管新生(angiogenesis)に由来することを意味する。我々は一連の基礎研究をおこない、BMIによる血管新生の機序を明らかにした⁶⁾。赤芽球のみを取り除いた骨髓細胞を移植すると血管新生が観察されず、骨髓から精製した赤芽球とCD14陽性細胞(骨髓マクロファージ)を移植することで血管新生が観察された。恒常的に骨髓で行われている造血において、遊走能を持たない赤血球系細胞は自力で骨髓から末梢血へ移動することが出来ないが、赤芽球は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)や胎盤増殖因子(PLGF)などの血管新生因子を豊富に産生する能力を有する⁷⁾。したがって、骨髓の赤芽球造血巣からはこれらの血管新生因子が分泌され、新生血管を造血巣に誘導し、成熟した赤血球が血管内皮下マクロファージ等の助けを得て末梢血管内へ動員されるものと考えられ、BMIによる血管新生はこのような骨髓での赤芽球造血をミミックしたものと推測された。

BMI治療では全身麻酔下に500から1,000mlの骨髓を採取するなど患者自身への侵襲が大きいこと、真に治療を必要とする重症下肢虚血患者に対する効果が不十分であることなど⁸⁾、多くの問題が存在し、より洗練された治療法の開発が望まれた。骨髓には造血幹細胞や前駆細胞が含まれ、少量の骨髓から体外増幅培養によって強い血管新

生能力を有する赤芽球とマクロファージの浮遊液を得る方法を開発すれば、新たな治療法となりうると考えた。

献血者由来の赤血球輸血には感染症の伝搬などの問題点があり、造血幹細胞を豊富に含む医療廃棄物である臍帯血などを資源として人工赤血球を生産する技術の開発が重要な課題となっており、いくつかの造血サイトカインを組み合わせる造血幹細胞から3段階の培養過程を経て成熟赤血球を生産する技術⁹⁾、および骨髓ストローマ細胞フィーダー層を用いた改良技術など¹⁰⁾、いくつかの報告がある。我々は Neildez-Nguyen らの3段階培養法を参考にして、血管新生作用の強い赤芽球の体外増幅法の検討を行った。

材料と方法

骨髓細胞の分離と精製

骨髓赤芽球の各成熟段階の細胞を得る目的で、血液学的に正常な肺腫瘍患者16症例（男性12、女性4、年齢50-81才）の肺腫瘍摘出術時に廃棄された肋骨を用いた。肋骨断端より5mlのRPMI1640メディウム（NIPRO, Osaka, Japan）を注入し、骨髓液を採取した。骨髓細胞の培養には、股関節手術患者2例（女性2、年齢65および70才）の切除骨、および健康男性ドナー6人（年齢28-38才）の腸骨から骨髓穿刺によって採取した骨髓液を用いた。患者および健康人ドナーからは、文書による説明と同意を取得した。

骨髓液から単核細胞（MNC）を分離するために、Lymphoprep（比重1.077, AXIS-SHIELD, Dundee, Scotland）による比重遠心法を用いた。CD34陽性細胞はMNCから精製した。骨髓液から高比重細胞（比重1.080以上）、中比重細胞（比重1.070から1.080）および低比重細胞（比重1.070以下）を分離するために、Percoll（Amersham, Uppsala, Sweden）による比重遠心法を用いた。具体的には骨髓細胞浮遊液を塩化アンモニウム法で溶血させメディウムで洗浄したのち、細胞浮遊液を比重1.080のPercollに重層し、1,500回転30分間の遠心によりinterfaceに集まった細胞と細

胞ペレットに分離した。細胞ペレットを高比重細胞とし、interface細胞は洗浄ののち比重1.070のPercollに重層し、1,500回転30分間の遠心を行い、再度interface細胞と細胞ペレットに分離した。細胞ペレットを中比重細胞、interface細胞を低比重細胞とし、それぞれ洗浄ののち赤芽球の精製に用いた。

CD34陽性細胞および赤芽球の精製には、免疫磁気ビーズ法を用いた¹¹⁾。具体的には、PE標識抗CD34抗体（Becton Dickinson, San Diego, CA）またはPE標識抗CD235a: Glycophorin-A抗体（Immunotech, Marseille, France）を用いて細胞をラベルしたのち、さらに抗PE-MicroBeads（Myltenyi, Bergisch Gladbach, Germany）を用いて磁気ラベルし、MACS MS separation column（Myltenyi）およびSuper MACS separator（Myltenyi）を用いた精製を2回繰り返した。

細胞培養

細胞培養は、骨髓に含まれる幹細胞や前駆細胞から未熟な骨髓系細胞を増幅する第1段階の培養、そこから未熟赤芽球系細胞を増幅する第2段階の培養、さらに成熟した赤芽球を増幅する第3段階の培養を連続的におこなった。StemSpan SF Expansion Medium（Stemcell Technologies, Vancouver, BC: IMDM supplemented with 1% BSA, 10 μ g/ml rh-Insulin, 200 μ g/ml human iron-saturated Transferrin, 100 μ M 2-Mercaptoethanol, and 2 mM L-glutamine）に、1%（v/v）のPenicillin-Streptomycin（Invitrogen, Carlsbad, CA）、10% FBS（Invitrogen）、0.1%（v/v）Iron Supplement（Sigma, St. Louis, MO）、7.5 μ g/ml water-soluble Cholesterol（Sigma）、および50 μ M Hydrocortisone solution（Sigma）を添加したものを基本培地とした。第1段階の培養では、基本培地に100 ng/ml rh Flt-3 ligand（rhFlt-3L: Stemcell Technologies）、100 ng/ml rh Stem Cell Factor（rhSCF: Stemcell Technologies）および100 ng/ml rh Thrombopoietin（rhTPO: Stemcell Technologies）を添加したものをを用いた。第2段階の培養では、基本培地に3 IU/ml rh Erythropoietin

(rhEPO: Epoetin - beta, Chugai, Tokyo, Japan), 50ng/ml rh Stem Cell Factor (rhSCF: R&D Systems, Minneapolis, MN) および 50 ng/ml rh IGF - I (rhIGF - I: R&D Systems) を添加したものをを用いた. 第3段階の培養では, 基本培地に 3 IU/ml rhEPO および 50 ng/ml rhIGF - I (R&D Systems) を添加したものをを用いた. これは第2段階の培養条件から SCF を抜くことで, 赤芽球分化の抑制を解除するのが目的である. 培養はすべて 37 °C, 5 % CO₂ の条件で行った.

マウス下肢虚血の治療モデル

マウス下肢虚血モデルの治療実験にはチャールスリバー (Yokohama, Japan) より購入した雄 8 - 10 週齢の B57/BL/6N マウス (約 20g) を用いた. すべての実験手順は Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No.86 - 23; National Institute of Health, Bethesda, MD) に基づき無菌的に行った. マウスをケタミン (60mg/kg BW) およびキシラジン (6mg/kg BW) の腹腔内投与により麻酔し, 左大腿部に皮膚切開を加え, 血管を露出した後に大腿動脈起始部を結紮した.

細胞移植には同系のマウスを前記麻酔薬の致死量投与にて屠殺ののち, 両側大腿骨, 脛骨より採取した骨髓を用いた. 骨髓を RPMI1640 メディウムにて洗浄し MNC を分離したのち, 1 × 10⁶ 個または 1 × 10⁷ 個の細胞を EPO (400 IU/kg BW) を含む同メディウム 0.1ml に再浮遊させ, 虚血作成 1 時間以内に虚血部位に 23G 針と 1ml シリンジを用いて 4 箇所に分けて筋肉内投与した (BMI: B - 6 群, B - 7 群). 体外増幅マウス赤芽球は 1 × 10⁶ 個の細胞を EPO (400 IU/kg BW) を含む同メディウム 0.1ml に再浮遊させ, 筋肉内投与した (EVEETA: E - 6 群). 対照として同メディウム 0.1ml のみの筋肉内投与および EPO (400 IU/kg BW) を含む同メディウム 0.1ml の筋肉内投与を行い比較に用いた. EPO の追加投与として, 移植の 24 · 48 · 72 · 96 · 120 · 144 時間後に EPO (400 IU/kg BW) の筋肉内投与を行い, 移植細胞中に含まれる赤芽球の虚血肢内での生存

表 1 Primers for QRT-PCR

	Sense primer	Antisense primer
human PBGD	ccatgtctgtgtaacgcgaat	cttcaaggagtgacaaccagg
human EPOR	aactacagcttctctaccagctc	gagacgtcatgggtgtctcag
human SHP-1	cgactacatcaatgccaactacat	agacctgtaaggtagcgagttgt
human VEGF-A	atgaactttctgtctgtgggt	gctctatcttcttgggtgcat
human PLGF	gtcatgaggctgttcccttg	cagaacggatcttaggagctg
human PDGF-α	gtaggagtgaggattcttggac	tggacttctttaatttggcttc
human PDGF-β	cgagttggacctgaacatgac	ccttctaaagattggcttctcc
human FGF-2	aagcggctgtactgcaaaac	aagtttactgcccagttcggtt
human Collagen-18	gtacaaggagagattggttcc	aactgaagaagatcaaacgaaac
human HGF	aataaaggacttccattcactgc	aggatttcgacagtagtttctcg
human Ang-1	gttgacacacctaaaggaagagaa	attgacatccattatgcaaaacac
human NP-1	gttactgtggacagaaaaccagg	cccaagctacctgtatccactct
mouse γ-Actin	aagatgacgcagataatgttgaa	caacatgacacagcttctctta
mouse VEGF	gatcaagttcatggacgtctacc	ttgttctgtcttcttctgtctg
mouse PLGF	tgatcatctggatgaataccctg	gtttctactcctctctctctcc
mouse Bcl-2	cgggagatcgtgtagaagtacata	gtagcgacgagagaagatcc
mouse Bcl-XL	tacaagcttcccgaaaggatgac	atcccgaaagaggtcattcactac
mouse PECAM-1	gctccctaatggaactaagaca	tctgtctatccgagacacaacatt
mouse eNOS	gaaataacctgtgtctgacagtct	ttttcaataataaccgggatgact

を目指した.

下肢虚血作成 7 日後に下肢血流測定をレーザードップラー moorLDI (Moor Instruments, Wilmington, Delaware) を用いて行った. レーザードップラーで取り込まれたデータは, moor LDI 解析ソフトによって両側下肢 Flux を測定し, 虚血左下肢 Flux の健側右下肢 Flux に対する比を虚血下肢血流の代表値として用いた. その後屠殺して大腿四頭筋を摘出して, 各種の検討に用いた.

ELISA および定量 RT - PCR

ヒト骨髓細胞の培養上清で, VEGF, PLGF および Endostatin の ELISA によるタンパク量の測定を行った. 測定にはいずれも Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) を用いた.

mRNA 発現量を既報のとおり real-time quantitative RT - PCR (QRT - PCR) 法を用いて定量した¹²⁾. 表 1 に QRT - PCR に用いたプライマー配列を示す. 赤芽球の分化抗原としてエリスロポエチン受容体 (EPOR) を測定した. 造血幹細胞や前駆細胞が赤芽球系に分化するときに低下・消失する SHP - 1 を測定した. 血管増殖因子のうち, 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF), 胎盤増殖因子

(PLGF), 血小板由来増殖因子 (PDGF- α および PDGF- β), 線維芽細胞増殖因子 (FGF-2), 肝細胞増殖因子 (HGF), アンジオポエチン (Ang-1) およびニューロピリン (NP-1) を測定した. 血管増殖抑制因子エンドスタチンの前駆体であるコラーゲン-18 (Coll-18) を測定した. 主に血液細胞に由来する抗アポトーシス分子 Bcl-2 および主に血管内皮や結合組織で発現する抗アポトーシス分子 Bcl-XL を測定した. 血管内皮に発現する接着分子 PECAM-1 (CD31) および血管拡張物質 eNOS を血管内皮のマーカーとして測定した. internal standard としてヒト PBGD またはマウス γ -アクチンを測定した. QRT-PCR には LightCycler (Roche, Indianapolis, IN) を用い, 95 °C 5 秒, 60 °C 15 秒, 72 °C 13 秒を 1 サイクルとし計 45 サイクル施行した. RNA 1 μ g あたりの各 RNA のコピー数を計算し, 各指標のコピー数の PBGD (ヒト) または γ -アクチン (マウス) のコピー数に対する比として表示した.

統計

各群の測定値は mean \pm SD で表記し, 多群間の比較 (ANOVA) は Fisher 法により差の検定を行い, $p < 0.05$ をもって有意とした.

結 果

骨髄赤芽球の分化に伴う血管増殖因子の発現

ヒト骨髄から分離精製した CD34 陽性細胞 ($n = 8$) および各比重の赤芽球 ($n = 8$) の結果を図 1 に示す. メイ・ギムザ染色像で CD34 陽性細胞は主に骨髄芽球からなり, 一部に前赤芽球・リンパ芽球・小リンパ球様細胞を混じていた. CD235a 陽性低比重細胞 (比重 < 1.070) は主に前赤芽球および好塩基性赤芽球から, 中比重細胞 (1.070 - 1.080) は主に多染性赤芽球から, また高比重細胞 (> 1.080) は主に正染性赤芽球からなっていた. 従って, 赤芽球の成熟過程を観察するには, この順で比較することとした. EPOR は低比重赤芽球で発現し中比重赤芽球で発現が強く増強したのに対し, SHP-1 は低比重赤芽球で発現

が低下し中比重赤芽球で発現がほぼ消失していたので, この精製法および mRNA 定量法が分子生物学的にもうまく機能していることが確認された. VEGF・PLGF・PDGF・FGF-2 の血管増殖因子群は, 赤芽球の中では低比重細胞に最も強く発現していた. 図には示さないが, 他の血管増殖因子である HGF・Ang-1・NP-1 は FGF-2 とほぼ同じ発現分布を示していた. 血管増殖抑制因子であるエンドスタチンの前駆体 (Collagen-18) は EPOR とほぼ同じ発現分布を示した. このことはヘモグロビン合成開始前後の未熟な赤芽球が最も強力な血管新生作用を持つことを示唆し, この分化段階の赤芽球を体外で増幅することが培養法樹立の目的であると考えた.

3 段階の培養による赤芽球の分化と血管増殖因子の発現

ヒト骨髄 MNC から 3 段階の培養によって得られた結果 ($n = 3$) を図 2 に示す. 培養は $1 \times 10^6/\text{ml}$ で開始した. 第 1 段階で MNC を rhFlt-3L・rhSCF・rhTPO の 3 種のサイトカインの存在下で 7 日間培養し, 浮遊細胞と付着細胞を収穫して洗浄したのち, rhEPO・rhSCF・rhIGF-I の 3 種のサイトカインの存在下でさらに 7 日間の第 2 段階の培養を行った. 細胞培養の条件を良くする目的で, 第 2 段階の培養開始時には培養液の量を第 1 段階の培養開始時の 2.5 倍とし, 第 2 段階の培養開始 4 日後にはさらに同サイトカインを含む 3 倍量の培養液を追加し, 合計で第 1 段階の培養開始時の 10 倍量の培養液とした. 浮遊細胞と付着細胞を収穫して洗浄したのち, さらに rhEPO・rhIGF-I の 2 種のサイトカインの存在下で 4 日間の第 3 段階の培養を行った. 第 3 段階の培養開始時には培養液の量を第 2 段階の培養開始時の 4 倍 (第 1 段階の培養開始時の 40 倍) とした. 第 3 段階の培養に対する比較として, これに rhSCF を加えた第 2 段階と同じ条件の培養を 4 日間行った. メイ・ギムザ染色像の所見では, 第 1 段階培養の終了時には帰属不明の骨髄系芽球様形態を示す細胞とマクロファージが主な構成成分であったものが, 第 2 段階培養の終了時には主

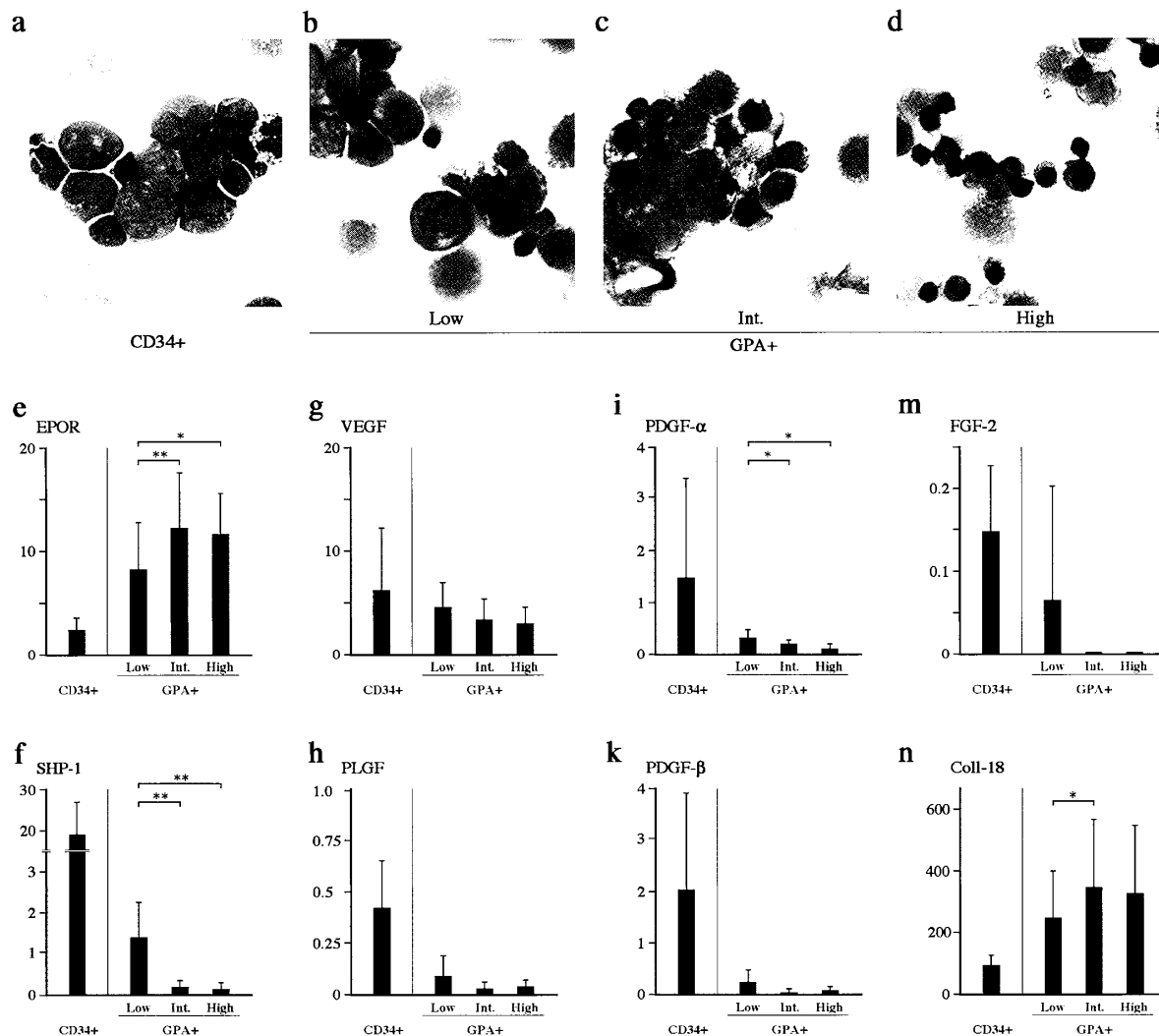


図1 ヒト骨髄赤芽球の分化と血管増殖因子の発現

ヒト骨髄細胞から低比重 (< 1.070)・中比重 (1.070 - 1.080)・高比重 (> 1.080) の赤芽球を分離し (n = 8), 骨髄 CD34 陽性細胞 (n = 8) と比較した. メイ・ギムザ染色像では, CD34 陽性細胞は芽球様細胞とリンパ球様細胞からなり (a), 低比重赤芽球は前赤芽球および好塩基性赤芽球からなり (b), 中比重赤芽球は多染性赤芽球からなり (c), 高比重赤芽球はヘモグロビン合成の進んだ赤芽球からなっていた (d). これら精製した細胞から mRNA の定量を行った. PBGD の mRNA コピー数に対する比で示す (e-n). エリスロポエチン受容体 (EPOR) の発現 (e) と関連して, SHP-1 の減少が見られた (f). VEGF (g), PLGF (h), PDGF (I, k) および FGF-2 (m) の赤芽球における発現は, 低比重赤芽球で最も高かった. エンドスタチンの前駆体の発現は低比重赤芽球で最も低かった (n).

に前赤芽球に分化するとともに一部にマクロファージを混じ, 第3段階培養の終了時にはヘモグロビン合成が進行していた. 第3段階培養に SCF を加えた条件ではヘモグロビン合成が抑制されていた. 細胞表面抗原解析では, 第1段階培養の終

了時に CD34 陽性細胞が増幅されると同時に CD33 陽性の骨髄系細胞が主体を占めるとともに多くの CD14 陽性細胞 (マクロファージ) を混じていたが, 第2段階培養の終了時には CD235a 陽性細胞 (赤芽球) が主な細胞で一部に CD14 陽性

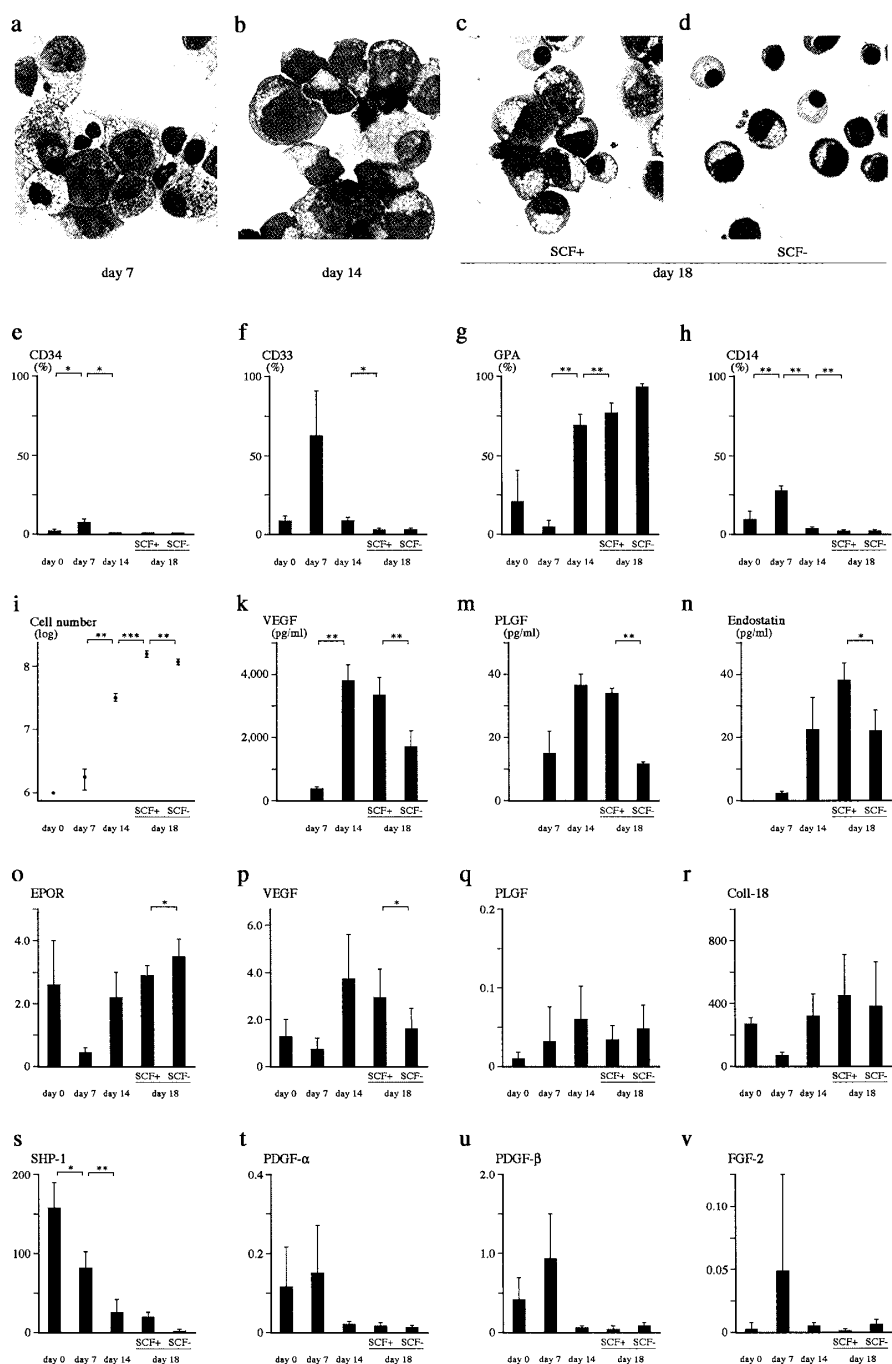


図2 ヒト骨髓細胞から3段階培養によって増幅された赤芽球の比較

ヒト骨髓MNCをrhFlt-3L・rhSCF・rhTPOの存在下で7日間培養し(第1段階),その後rhEPO・rhSCF・rhIGF-1の存在下で7日間の培養を行い(第2段階),さらにrhEPO・rhIGF-1の存在下で4日間の培養を行った(第3段階).第3段階の培養はrhEPO・rhSCF・rhIGF-1の存在下での4日間の培養と比較した.メイ・ギムザ染色像では,第1段階の培養終了時に骨髓系芽球とマクロファージからなっていたものが(a),第2段階の培養終了時には主に前赤芽球と少数のマクロファージに分化し(b),第3段階の培養終了時にはSCF非存在下にヘモグロビン合成が進行していたが(d),SCF存在下では赤芽球の成熟が抑制された(c).各培養段階での表面抗原解析(e-h),細胞数の変化(i),培養上清のELISA測定(k-n),およびmRNA量の変化(o-v)を示す.

細胞を混じ、第3段階培養の終了時にはさらにCD235a陽性細胞が増加していた。これはメイ・ギムザ染色像の所見と一致する。細胞総数では第1段階培養の終了時に1.8倍、第2段階培養の終了時に32倍、第3段階培養(SCF非存在下)の終了時に118倍、SCF存在下に163倍に増加していた。EPORのmRNA量は第2段階培養の終了時に増加を示し第3段階培養でさらに増加した。一方、SHP-1のmRNA量は第2段階培養の終了時にかなりの減少を示し第3段階培養でさらに減少した。VEGFおよびPLGFの蛋白発現とmRNA発現は第2段階培養の終了時に強く誘導され、第3段階培養で減少した。PDGFおよびFGF-2のmRNA発現は第1段階培養で強く誘導されたが、第2段階培養で著しく減少した。図には示さないが、HGF・Ang-1・NP-1はFGF-2とほぼ同じ発現分布を示した。エンドスタチンの蛋白発現およびmRNA発現は、第2段階培養で増加し、第3段階培養でさらに増加を示した。以上のことから、2段階の培養で目的とする未熟赤芽球が得られ、第3段階の培養によって赤芽球をさらに分化させることは本目的には則さないことが分かった。また、第2段階の培養を4日間延長しても赤芽球への分化が進行することが分かった。そこで2段階の培養日数を調整して、培養日数の最適化を目指した。

2段階の培養日数の調整

第1段階の培養日数を7-10日間、第2段階の培養日数を4-7日間として比較を行った結果($n=5$)を図3に示す。細胞総数では、第1段階の培養日数を延長しても大きな効果は見られず、また第2段階の培養日数を短縮すると細胞数の増加が著しく損なわれることがわかった。VEGFおよびPLGFの蛋白発現とmRNA発現は、細胞総数とほぼ同様の分布を示した。PDGF- β のmRNA発現はこれらと鏡像をなす分布を示した。図には示さないが、EPORのmRNA発現は細胞総数とほぼ同様の分布を示し、PDGF- α ・FGF-2・HGF・Ang-1・NP-1のmRNA発現はPDGF- β とほぼ同様の分布を示した。このことか

ら、第1段階の培養日数を7日間、第2段階の培養日数を7日間とすることが適切であると考えた。

CD34陽性細胞の精製の可否

培養開始時にCD34陽性細胞を精製する必要があるか否かを検討した。同じ骨髓サンプルから、 1×10^4 コのCD34陽性細胞を含む骨髓MNCと、精製した 1×10^4 コのCD34陽性細胞を2段階(7+7日)で培養した結果($n=5$)を図4に示す。2段階培養終了時の細胞総数は両者でほぼ同等であったが、EPORのmRNA発現はMNCの方が高値を示した。VEGFの蛋白発現およびmRNA発現はMNCの方が有意に高く、PLGFの蛋白発現およびmRNA発現は両者でほぼ同等であった。PDGFのmRNA発現およびFGF-2のmRNA発現は両者で差がなかった。図には示さないが、HGF・Ang-1・NP-1のmRNA発現も両者で差がなかった。このことから、培養開始前にCD34陽性細胞を精製する必要はないと考えた。

マウス下肢虚血の治療モデル

ヒト造血コロニー形成法では、後期前駆細胞(CFU-e, CFU-c)の培養に7日間、後期前駆細胞(BFU-e, CFU-GM)の培養に14日間を要するが、マウスではそれぞれ4日間および8日間を要する。そこでマウスの赤芽球増幅では、第1段階4日間、第2段階4日間の合計8日間で培養することで体外増幅赤芽球を得た。マウス下肢虚血作成部位にメディウムのみを7日間筋注した群($n=8$)、EPOを7日間筋注した群($n=9$)、 1×10^6 コの骨髓細胞浮遊液(B-6)をday 0に筋注し翌日よりメディウムのみを6日間筋注した群($n=9$)、EPOを含有する 1×10^6 コの骨髓細胞浮遊液をday 0に筋注し翌日よりEPOを6日間筋注した群($n=8$)、EPOを含有する 1×10^7 コの骨髓細胞浮遊液(B-7)をday 0に筋注し翌日よりEPOを6日間筋注した群($n=8$)、EPOを含有する 1×10^6 コの体外増幅赤芽球浮遊液(E-6)をday 0に筋注し翌日よりEPOを6日間筋注した群($n=8$)、および健常マウス($n=5$)の7群間で比較を行った(図5)。

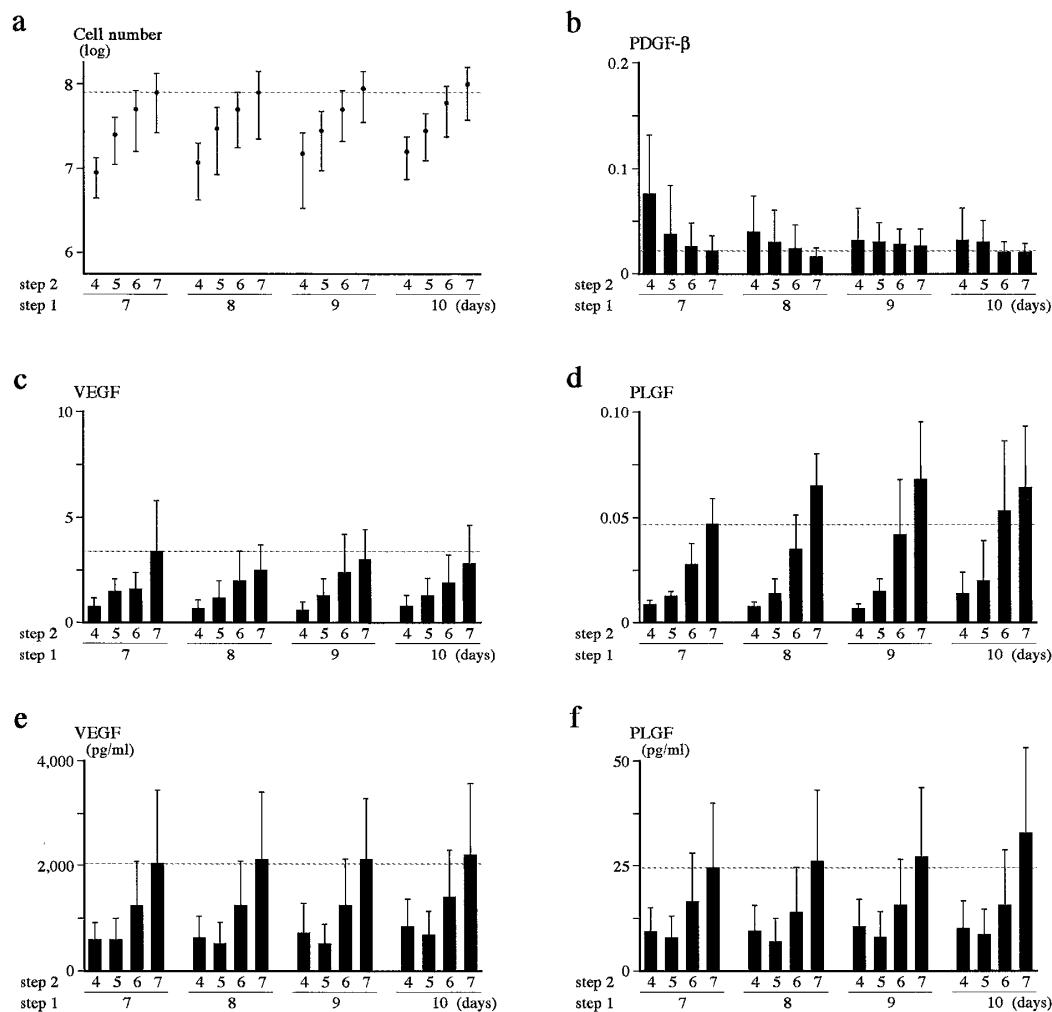


図3 ヒト骨髓細胞を2段階で増幅培養したときの培養日数による変化

ヒト骨髓MNCをrhFlt-3L・rhSCF・rhTPOの存在下で7-10日間培養し(第1段階),その後rhEPO・rhSCF・rhIGF-Iの存在下で4-7日間の培養を行った(第2段階).細胞数(a),mRNA量(b-d),および培養上清のELISA測定(e,f)結果を示す.

血流の回復の検討では、B-6 + EPO に比し E-6 + EPO で有意に良好な血流改善効果が得られ、体外増幅赤芽球移植の効果はその10倍数の骨髓細胞移植の効果に匹敵した。E-6 + EPO 群では筋組織内のBcl-2のmRNA高値が観察され、Bcl-2が主に血液細胞に発現する抗アポトーシス因子であることから、移植7日目においても移植された赤芽球が同部位に投与されたEPOによって生存が高められた可能性が示唆される。E-6 + EPO 群で、血管内皮および組織に由来すると思わ

れる抗アポトーシス因子であるBcl-XLがB-6 + EPO 群に比して有意に高く、血管内皮に由来するPECAM-1およびeNOSが有意に高いことから、体外増幅赤芽球移植によって血管の生存が高まったか、および/または一旦血管が減少したあとに血管再生がおこったと考えられる。E-6 + EPO 群では組織中のVEGFのmRNA量が有意に高かった。図には示さないが、E-6 + EPO 群では組織中のEPORのmRNA量が有意に高かった。

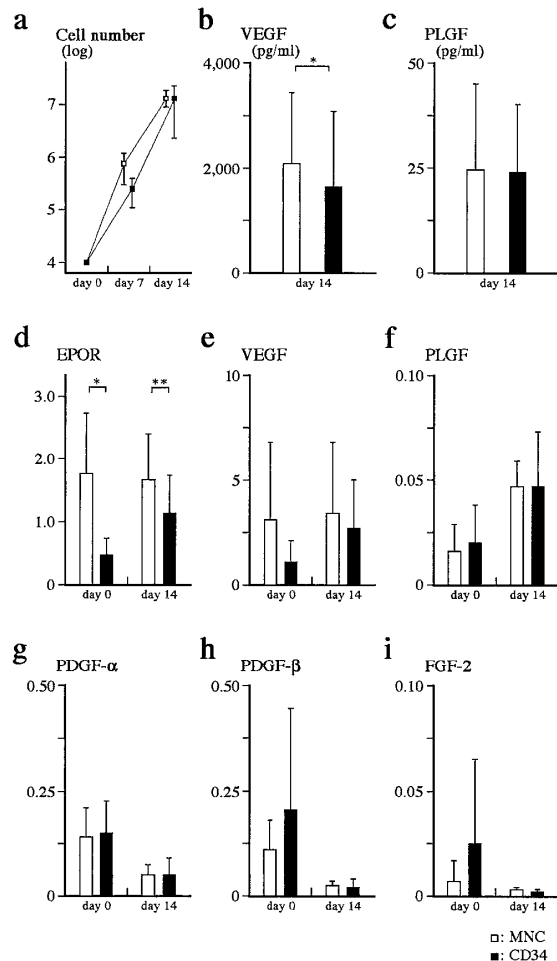


図4 ヒト骨髄 MNC とヒト骨髄 CD34 陽性細胞の比較

1 × 10⁴ コの CD34 陽性細胞を含むヒト骨髄 MNC および骨髄から精製した 1 × 10⁴ コの CD34 陽性細胞を, rhFlt-3L・rhSCF・rhTPO の存在下で 7 日間培養し (第 1 段階), その後 rhEPO・rhSCF・rhIGF-I の存在下で 7 日間の培養を行った (第 2 段階). 細胞数 (a), 培養上清の ELISA 測定 (b, c), および mRNA 量 (d-i) の測定結果を示す.

考 察

ヒト骨髄中に存在する赤芽球のうち最も血管新生作用の強い細胞は, ヘモグロビン合成開始前後の未熟な赤芽球であった. このような未熟赤芽球を, 少量の骨髄から体外増幅によって得る培養法

を樹立した. 体外増幅赤芽球の移植による血流改善効果は, 従来の骨髄細胞移植より強力であった. 本治療法は本学に設置の倫理委員会および本病院に設置の IRB の承認を受け, 第 I / II 相臨床試験を開始し, これまでに本治療法を施行した 2 例では良好な結果を得ている. また本治療法は米国に設置の臨床試験登録センター “IRSCN” に公開されている (<http://www.controlled-trials.com/ISRCTN66803682>).

これまで広く行われてきた血管再生治療としての, 骨髄細胞移植療法の問題点を克服するための研究がいくつか行われている. 骨髄には間葉系幹細胞も含まれており, これを体外で増幅培養したものを移植するラットを用いた血管再生実験¹³⁾, 体外増幅した血管内皮前駆細胞の移植を用いたマウスの実験¹⁴⁾, および培養によって脱分化させた脂肪細胞の応用は¹⁵⁾, いずれも前臨床段階の研究であり, 今後の臨床応用の報告が待たれる.

血管再生治療のための方策としては, これら「細胞療法」の他に, 「サイトカイン療法」がある. VEGF を用いた遺伝子治療は小規模 phase-I trial で成功をおさめたが¹⁶⁾, その後おこなわれた randomized placebo-controlled trial での結果では無効とされた¹⁷⁾. FGF-2 タンパクを用いた大規模試験では有効であったとするものと無効であったとするものがあり評価が分かれているが, いずれであっても有意差が出るか出ないかというレベルの効果と言える¹⁸⁾¹⁹⁾. HGF を用いた遺伝子治療は少数例の検討で今のところ有効とされているが, 強い血管新生を誘導する画期的な治療薬としては限界がある²⁰⁾. これに対し我々は, 赤血球系造血因子エリスロポエチン (EPO) のアシアロ体 (AsEPO) に強い血管新生作用があることを見出した (国際特許). マウス下肢虚血モデルの治療実験で, AsEPO は造血活性を欠き, 骨髄細胞移植に匹敵する血管新生作用を示した (投稿準備中). また, 急性心筋梗塞の治療モデルとして用いたラットの冠動脈閉塞再環流実験では, 自然型 EPO にも梗塞縮小および心機能改善効果があったが, AsEPO の効果は自然型 EPO の数倍高かった (投稿準備中). 一方, EPO の血管内皮障害治

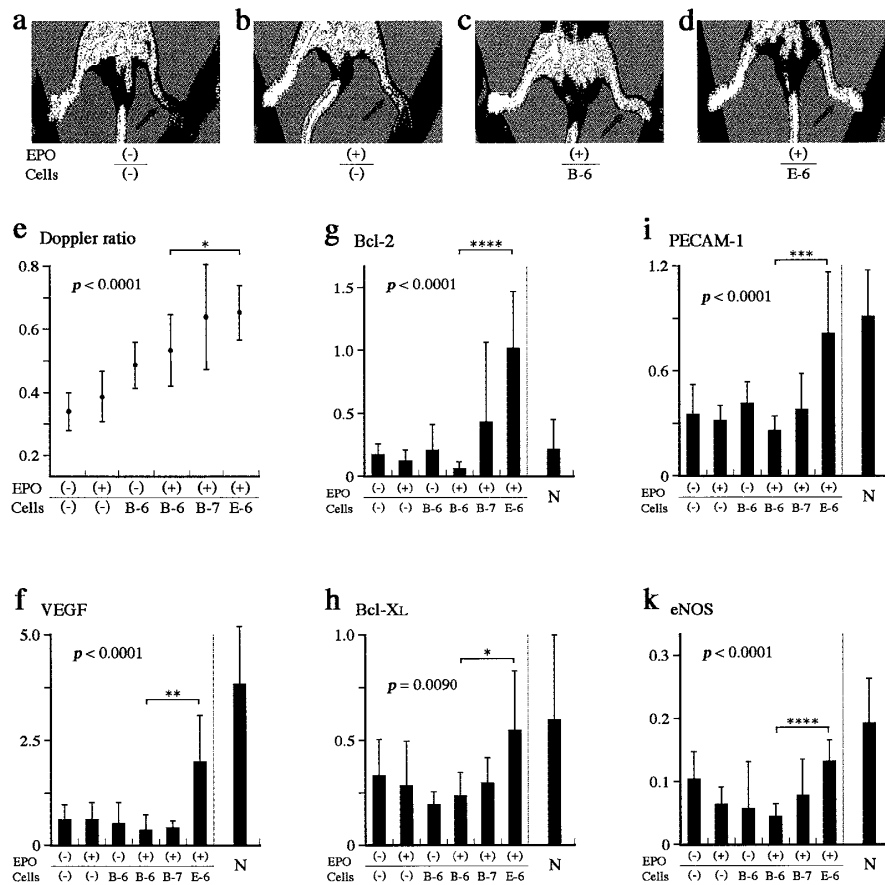


図5 マウス下肢虚血モデルの治療実験の結果

マウス骨髄 MNC を rhFlt-3L · rhSCF · rhTPO の存在下で 4 日間培養し (第 1 段階), その後 rhEPO · rhSCF · rhIGF-I の存在下で 4 日間の培養を行い (第 2 段階), 体外増幅赤芽球を得た. 下肢虚血の治療は, rhEPO の 7 日間連続筋注および/または細胞移植によって行った. 細胞移植は day 0 に筋注することで行い, 1×10^6 コの骨髄 MNC (B-6), または 1×10^7 コの骨髄 MNC (B-7), または 1×10^6 コの増幅赤芽球 (E-6) を移植した. レーザー・ドップラーによる血流測定の写真 (a-d), 測定結果のまとめ (e), および摘出した虚血下肢筋組織の mRNA 量 (f-k) の測定結果を示す.

療薬としての応用を目指し, モノクロタリン誘発ラット肺血管障害の治療実験を行ったが, 自然型 EPO に比し AsEPO の効果は低かった (投稿準備中). これを克服する目的で, 血管内皮親和性 EPO の合成を行い, 開発に成功した (特許出願準備中).

血管を標的とした治療法および治療薬の開発には複数の方策があり, 目的を明確に意識した上で

の治療法の開発が必要である.

謝 辞

本研究においてご指導を賜りました第一内科学教室講師 鳥羽健先生, 同助教 加藤公則先生, 同講師 埴晴雄先生, 第二病理学教室教授 内藤眞先生, および同准教授 長谷川剛先生に深謝いたします. また本研究は, 平成 17 年度—平成 18 年度 科学研究費補助金 課題

番号 17590714「体外増幅赤芽球を用いた血管新生治療の基礎研究と臨床治験」, および平成19年度-平成20年度 科学研究費補助金 課題番号 19590856「重症下肢虚血患者に対する体外増幅赤芽球移植療法の第I/II相試験」を研究資金として行われました.

文 献

- 1) Yla-Herttuala S and Alitalo K: Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med*. 9: 694 - 701, 2003.
- 2) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y and Imaizumi T: Augmentation of postnatal neo-vascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103: 897 - 903, 2001.
- 3) Tateishi - Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T and Imaizumi T: 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.
- 4) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G and Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964 - 967, 1997.
- 5) Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA and Bowen-Pope DF: Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res* 87: 728 - 730, 2000.
- 6) Ozawa T, Toba K, Kato K, Minagawa S, Saigawa T, Hanawa H, Makiyama Y, Moriyama M, Honma K, Isoda M, Hasegawa G, Naito M, Takahashi M and Aizawa Y: Erythroid cells play essential roles in angiogenesis by bone marrow cell implantation. *J Mol Cell Cardiol* 40: 629 - 638, 2006.
- 7) Tordjman R, Delaire S, Plouët J, Ting S, Gaulard P, Fichelson S, Roméo PH and Lemarchandel V: Erythroblasts are a source of angiogenic factors. *Blood* 97: 1968 - 1974, 2001.
- 8) Oda M, Kato K, Toba K, Otaki K, Kitajima T, Ikarashi N, Yanagawa T, Higashimura M, Asami F, Isoda M, Ozawa T, Moriyama M, Hirono S, Okura Y, Hanawa H, Kodama M and Aizawa Y: Prognostic factors of critical limb ischemia after autologous bone marrow implantation. *J Cardiol* 50: 235 - 242, 2007.
- 9) Neildez - Nguyen TM, Wajcman H, Marden MC, Bensidhoum M, Moncollin V, Giarratana MC, Kobari L, Thierry D and Douay L: Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nat Biotechnol*. 20: 467 - 472, 2002.
- 10) Kobune M, Kawano Y, Kato J, Ito Y, Chiba H, Nakamura K, Fujimi A, Matsunaga T, Hamada H and Niitsu Y: Expansion of CD34+ cells on telomerized human stromal cells without losing erythroid-differentiation potential in a serum-free condition. *Int J Hematol*. 81: 18 - 25, 2005.
- 11) Toba K, Hanawa H, Fuse I, Sakaue M, Watanabe K, Uesugi Y, Higuchi W, Takahashi M and Aizawa Y: Difference in CD22 molecules in human B cells and basophils. *Exp Hematol* 30: 205 - 211, 2002.
- 12) Yoshida T, Hanawa H, Toba K, Watanabe H, Watanabe R, Yoshida K, Abe S, Kato K, Kodama M and Aizawa Y: Expression of immunological molecules by cardiomyocytes and inflammatory and interstitial cells in rat autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res* 68: 278 - 288, 2005.
- 13) Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, Kangawa K and Kitamura S: Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* 66: 543 - 551, 2005.
- 14) Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka - Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM and Asahara T: Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3422 - 3427, 2000.

- 15) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J and Mugishima H: Mature adipocyte - derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* in press, 2007.
- 16) Rajagopalan S, Trachtenberg J, Mohler E, Olin J, McBride S, Pak R, Rasmussen H and Crystal R: Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the vascular endothelial growth factor cDNA (CI-1023) to patients with claudication. *Am J Cardiol* 90: 512 - 516, 2002.
- 17) Rajagopalan S, Mohler ER, 3rd, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS and Annex BH: 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* 108: 1933 - 1938, 2003.
- 18) Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T and Chronos NA: Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor - 2: double - blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 105: 788 - 793, 2002.
- 19) Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, Hillegass WB, Rocha - Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ and Annex BH: TRAFFIC Investigators: Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor - 2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 359: 2053 - 2058, 2002.
- 20) Makino H, Aoki M, Hashiya N, Azuma J, Kurinami H, Takeya Y, Kaneda Y, Morishita R and Ogihara T: Two years follow - up of clinical trial of human gene therapy for peripheral arterial disease using hepatocyte growth factor gene transfer. *Circ J* 69, supplement I : 104, 2005.

(平成 19 年 12 月 27 日受付)