

原

著

## 下肢虚血モデルマウスを用いた骨髓細胞移植 (BMI) による血管新生の検討：

エリスロポエチンの併用は新生血管のサイズを大きくすることで  
BMI の効果を増強する

西 川 尚

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)

### Simultaneous Administration of Erythropoietin with Bone Marrow Implantation Augmented The Effect of Neovascularization in Lower Limb Ischemia Model in Mouse

Takashi SAIGAWA

Division of Cardiology, Niigata University  
Graduate School of Medical and Dental Sciences  
(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

#### 要 旨

【背景】再生医療の先駆けとして、末梢動脈疾患に対する自己骨髓細胞移植 (BMI) による血管再生療法が行われ有効性が確認されたが、その効果は不十分である。エリスロポエチン (EPO) は直接および間接的に血管再生を促進する効果が予測されることから、BMI による血管再生における EPO の併用効果についてマウス下肢虚血モデルを用いて検討した。

【方法】8 週齢の ICR マウスを用い、大腿動脈起始部の結紮により下肢虚血を作成した。同系マウス的大腿骨より骨髓を採取し、マウス 1 虚血下肢あたり  $1 \times 10^7$  個の骨髓有核細胞を 4 カ所にわけて筋肉内投与した。また 1 虚血下肢あたり 400IU/kg BW の EPO 同時投与を行った。下肢の壊死脱落をマーカーに下肢の生存曲線を比較した (各群 N = 13)。また虚血作成 6 日後の下肢でレーザードップラーによる血流の測定を行い、さらに大腿二頭筋標本作製し血管の数とサイズを測定し比較した (各群 N = 5-7)。

【結果】①下肢の回復および生存：虚血作成し補助を行わなかった C 群、BMI にて救助した B 群および BMI に EPO を併用した BE 群の 28 日後における下肢生存率はそれぞれ 7.7, 38.5,

Reprint requests to: Takashi SAIGAWA  
First Department of Internal Medicine  
Niigata University School of Medicine  
1-757 Asahimachi-dori,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り 1-757  
新潟大学医学部内科学第一教室 西川 尚

および 53.9 % であった。BE 群では早期にチアノーゼからの回復が観察された。Kaplan - Meier 法による生存曲線を作成し Wilcoxon 試験で下肢生存率の差を検定したところ C 群と BE 群の間に有意差 ( $p < 0.01$ ) が見られた。② 6 日後の下肢血流測定：さらに EPO のみ筋注した E 群を加えて検討した。下肢血流のマーカーである下肢 flux 比は、C 群  $0.095 \pm 0.025$ , E 群  $0.141 \pm 0.037$ , B 群  $0.159 \pm 0.044$ , BE 群  $0.227 \pm 0.043$  で、ANOVA 解析では C 群と BE 群間で有意差が見られた ( $p < 0.01$ )。③ 下肢組織の血管測定：横紋筋線維数あたりの血管数はそれぞれ C 群  $0.70 \pm 0.22$ , E 群  $0.62 \pm 0.14$ , B 群  $1.43 \pm 0.17$  ( $p < 0.05$ ), BE 群  $1.65 \pm 0.16$  ( $p < 0.01$ ) であった。また平均血管面積はそれぞれ C 群  $44.9 \pm 7.3$ , E 群  $42.3 \pm 5.5$ , B 群  $45.6 \pm 8.6$ , BE 群  $62.7 \pm 6.7$  であった。

【結論】EPO 併用により BMI の効果が増強した。BMI により血管数が増加し、EPO 併用により平均血管面積が増大した。EPO 併用による増強効果がこれによって説明されると推測した。

キーワード：再生医療, 血管新生, 下肢虚血モデル, 骨髓細胞移植, エリスロポエチン

## 緒 言

再生医療は 21 世紀の新しい治療として急速に発展を遂げつつある。基礎的研究としては、神経・肝・脾・消化管・骨・軟骨・皮膚など多臓器において精力的に行われているが、実際の臨床においては循環器系虚血性疾患の治療への応用が特に先行している。この領域では関西医科大学の松原弘明らが中心になって組織された TACT スタディー（骨髓細胞移植を用いた虚血性心疾患・末梢性血管疾患への血管新生治療）が臨床研究の中核となって世界をリードしているが<sup>1)</sup>、本施設も創設早期よりこれに参加し、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ピュルガー病患者の虚血四肢への自家骨髓細胞移植 (BMI) の経験を積み重ねてきている<sup>2)3)</sup>。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。しかしながら症例を重ねるうちに、本治療によって再生された血管で得られる血流量は健常に比し著しく少なく、また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ことが次第に明らかとなってきた。我々はこれを改善することを目的として一連の基礎研究をおこなっているが、このうち本研究はエリスロポエチン (EPO) の併用が BMI による血管再生効果を高めることをマウス in vivo で示すものである。

EPO は家兎に in vivo で赤血球を増加させる活性として認識され、宮家が再生不良性貧血患者の尿から精製した EPO 標品<sup>4)</sup> のアミノ酸シーケンスをもとにクローニングされた<sup>5)</sup>。EPO は in vivo および in vitro で赤血球造血を刺激し、赤血球造血におけるもっとも重要なサイトカインである。造血臓器である骨髓において常に遊走能を有する白血球系細胞が分化増殖と同時に組織内に散布するのに対し、遊走能を持たない赤血球系細胞は分化増殖しつつ細胞集塊を形成する。In vitro コロニー形成の観察においても、白血球系コロニー (CFU - c) が散布性コロニーを形成するのに対し、赤血球系前駆細胞は遊走能を持つ前期前駆細胞 (BFU - e) が数回分裂したのち遊走能を失い後期前駆細胞 (CFU - e) となった後はヘモグロビン合成を行いつつ巨大な赤芽球集塊を形成する<sup>6)</sup>。したがって幹細胞から成熟した血球が骨髓から内皮細胞を通過して末梢血中へ移動する際には、白血球と異なり遊走能を持たない赤血球系細胞は常時みずから血管リモデリングを引き起こし、新生血管を誘致することで末梢血へ動員されることが容易に推測される。実際、成熟ヒト骨髓の赤血球系細胞が VEGF (血管内皮増殖因子) および PlGF (胎盤増殖因子) を産生分泌することで常に新生血管を誘致していることが in vivo および in vitro で証明された<sup>7)</sup>。EPO は赤血球系前駆細胞から赤芽球を誘導するだけでなく、分化途上の赤芽球にも作用して生存および分化成熟にも

必須である<sup>8)</sup>。BMIでは骨髄中の各成熟段階の赤芽球およびその前駆細胞も同時に移植されることから、EPOをBMIと併用して局所に投与することにより、投与局所での赤血球系細胞の生存および増殖を一時的に維持し間接的に血管新生を誘導する可能性を考えた。また血管内皮はEPO受容体を発現しており、EPOは血管内皮細胞に対して障害からの保護作用を有することから<sup>9)</sup>、EPOの直接作用も期待される。EPOは腎性貧血患者の治療に用いられ安全性が十分確認されていることより、EPO併用BMIは臨床応用への障害が少ないと思われる。そこでEPO併用BMIの有効性をin vivoのマウス虚血モデルを用いて検討した。

### 実験動物と方法

#### マウス下肢虚血の作成

チャールスリバー (Yokohama, Japan) より雄8週齢のICRマウス (30–35g) を購入し実験にもちいた。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われた。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た。Isnerの方法に準じ左下肢の中間部に皮膚切開を加え、血管を露出した<sup>10)</sup>。大腿動脈起始部を結紮のちその末梢の伏在動脈を結紮し、その他の側枝を剥離して本管とともに切除した。

#### 骨髄細胞移植と虚血下肢の評価

同系のマウスを前記麻酔薬の致死量投与にて屠殺のち、両側大腿骨より骨髄を採取した。骨髄をRPMI1640メディウムにて洗浄後、 $1 \times 10^7$ 個の細胞を同メディウム0.2mlに再浮遊させ、虚血作成1時間以内に虚血部位に0.05mlずつ4カ所に分けて23G針と1mlシリンジを用いて筋肉内投与した (BMI: B群)。BMIのかわりに同メディウム0.2mlを使用したものをコントロールとした (C群)。EPO (麒麟麦酒株式会社より供与) は一回投与量が400IU/kg BWとなるように同メディ

ウム0.2mlに希釈して用いた。EPO併用BMIは、 $1 \times 10^7$ 個の骨髄細胞をEPO (400IU/kg BW) を含む同メディウム0.2mlに浮遊して筋肉内投与し、さらに24・48・72・96・120時間後にEPOのみの筋注を行った (BE群)。またBMIのかわりにEPOのみの筋注を行い、さらに24・48・72・96・120時間後にEPOのみの筋注を行った (E群) と比較した。

下肢のチアノーゼからの回復および壊死脱落を肉眼的マーカーとして4週間観察した (C, B, BE各群  $n = 13$ )。虚血下肢の部分壊死脱落および全部壊死脱落をもって下肢の死亡と定義した。また虚血作成6日後に下肢血流測定を目的にレーザードップラー moorLDI (Moor Instruments, Wilmington, Delaware) を用いてイメージを取り込み (C, B群それぞれ  $n = 7$ , E, BE群それぞれ  $n = 5$ )、その後屠殺して大腿二頭筋を摘出し、OCTコンパウンド (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) に包埋し液体窒素で凍結し $-80^\circ\text{C}$ で保存して組織標本の作製に用いた。レーザードップラーで取り込まれたデータは、moorLDI解析ソフトによって両側下肢Fluxを測定し、虚血作成した左下肢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。

#### 標本の作製・染色および画像解析

凍結標本から厚さ $6\mu\text{m}$ の連続切片作成後シランコーティングしたスライドガラス (Matsunami Glass, Osaka, Japan) に貼付し、風乾後アセトンで10分間固定した。内因性ペルオキシダーゼを阻害したのちラット抗マウスCD31モノクローナル抗体 (Research Diagnostics, Flanders, NJ) およびワサビペルオキシダーゼ化ヤギ抗ラット二次抗体 (Amersham) と反応後、DABで発色した。核染色にヘマトキシリンを用いた。標本の状態が良好で解析を行えた個体数は、C群4個体、E, B, BE群それぞれ5個体ずつであった。顕微鏡はOlympus BX60 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて100倍で観察し、Olympus TVシステムDP50を用いてデジタル画像を作成した。筋組織 $2.4\text{mm}^2$ から1,550pixel/mmでRGB画像を作成

し、Mac SCOPE（Mitani, Fukui, Japan）を用いて画像処理を行った。茶色のドットを抽出することで CD31 陽性の血管内皮の画像を得、2 階調化ののち血管の総数と総面積を測定した。4pixel<sup>2</sup> 以下の dot cluster はノイズとして削除した。同じ画像から目視にて筋線維数の計数を行い、血管総数/筋線維数を血管数の代表値とし、血管総面積/血管総数を血管サイズの代表値とした。

### 統計

各群の測定値は mean ± SE 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。下肢の生存は Kaplan-Meier 法によって生存曲線を作成し、Wilcoxon 試験によって生存率の差の検定を行った。

## 結 果

### 下肢の回復および脱落壊死

C, B, BE 群の合計 39 個体すべてに、虚血作成 1 日後に下肢全体にわたるチアノーゼが観察された。一部の個体でチアノーゼからの回復がみられ、他は下肢の一部または全体の壊死脱落を来した（図 1, 2）。C 群では 7 日目までに 12 個体（92.3 %）で脱落壊死が見られ、1 個体は 16 日目にチアノーゼから回復した。B 群では 7 日目までに 8 個体（61.5 %）で脱落壊死が見られ、また 7 日目までにチアノーゼから回復した個体は 2 個体（15.4 %）のみであった。BE 群では 7 日目までに 6 個体（46.2 %）で脱落壊死が見られ、5 個体（38.5 %）でチアノーゼからの回復が見られた。C, B 群に比し BE 群でチアノーゼからの回復が早期に見られ、Kaplan-Meier 法による回復曲線では C 群に比し BE 群で有意（ $p < 0.05$ ）に良好な回復が観察された。また 28 日後の下肢生存率は C 群 7.7 %, B 群 38.5 %, BE 群 53.9 % で、Kaplan-Meier 法による生存曲線では C 群に比し BE 群で有意（ $p < 0.01$ ）に良好な生存が観察された。

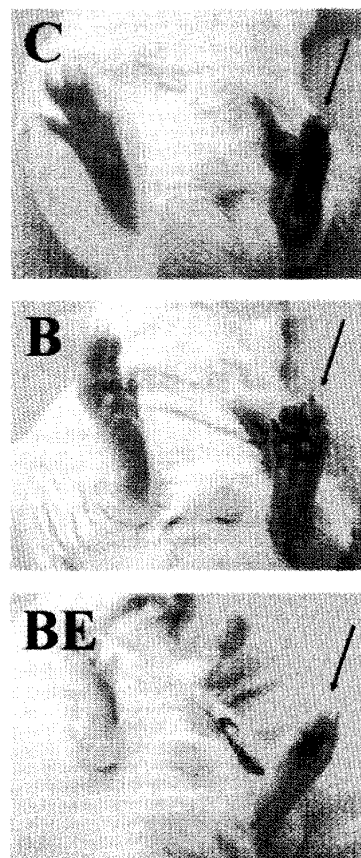


図 1 下肢虚血作成 7 日後の下肢の所見

C 群（メディウムのみ筋注したもの）では 92.3 % で下肢の壊死脱落が見られ、B 群（BMI で救助したもの）では壊死脱落が 61.5 % と改善したもののチアノーゼからの回復が悪く、BE 群（BMI に EPO を併用したもの）では早期にチアノーゼからの回復が観察された。

### レーザードップラーによる血流の評価

下肢虚血作成 6 日後にレーザードップラーによって flux 比を測定した（図 3, 5）。C 群（ $n = 7$ ）、E 群（ $n = 5$ ）、B 群（ $n = 7$ ）は flux 比がそれぞれ  $0.095 \pm 0.025$ ,  $0.141 \pm 0.037$ ,  $0.159 \pm 0.044$  で有意差がなかったが、BE 群（ $n = 5$ ）では  $0.227 \pm 0.043$  で有意（ $p < 0.05$ ）な血流の増加が認められた。

### 組織標本での血管の観察

下肢虚血作成 6 日後にレーザードップラー測定後作成した大腿二頭筋組織のうち良好な組織標本の得られたもので観察した。C 群（ $n = 4$ ）と E 群

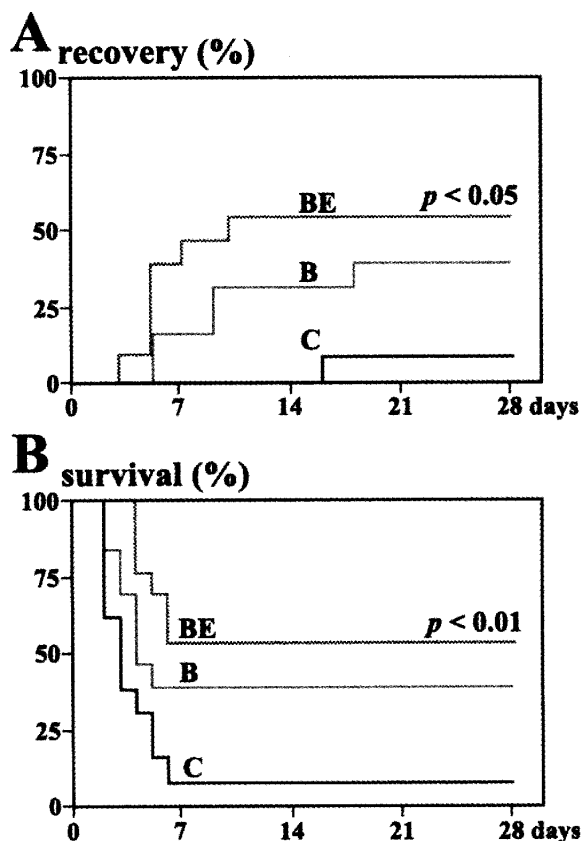


図2 虚血作成下肢のチアノーゼからの回復(パネルA)および下肢の壊死脱落(パネルB)のKaplan-Meier法による回復/生存曲線

C群に比しBE群で有意に回復率の改善および生存の延長が見られた。C群: メディウムのみ筋注したもの、B群: BMIで救助したもの、およびBE群: BMIにEPOを併用したもの。各群n=13。

(n=5)では血管の分布に違いはみられず、B群(n=5)で血管数の増加が見られ、BE群(n=5)ではさらに大きい血管が観察された(図4)。画像処理によって測定した血管数(筋線維数に対する比)と平均血管面積( $\mu\text{m}^2$ )を図5に示す。血管数はC群( $0.70 \pm 0.22$ )とE群( $0.62 \pm 0.14$ )で差が見られなかったが、B群( $1.43 \pm 0.17$ )で明らかな増加( $p=0.0106$ )が見られ、BE群( $1.65 \pm 0.16$ )ではこの差がさらに顕著であった( $p=0.0017$ )。さらに平均血管面積は有意差が得られな

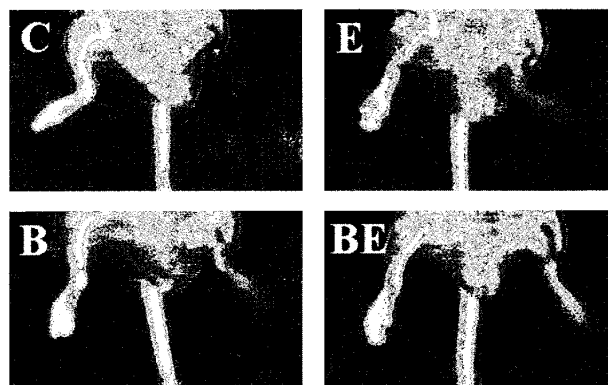


図3 下肢虚血作成6日後のレーザードップラーによる血流分布  
メディウムのみ筋注したもの(C)、EPOのみ筋注したもの(E)、BMIで救助したもの(B)、およびBMIにEPOを併用した個体(BE)。

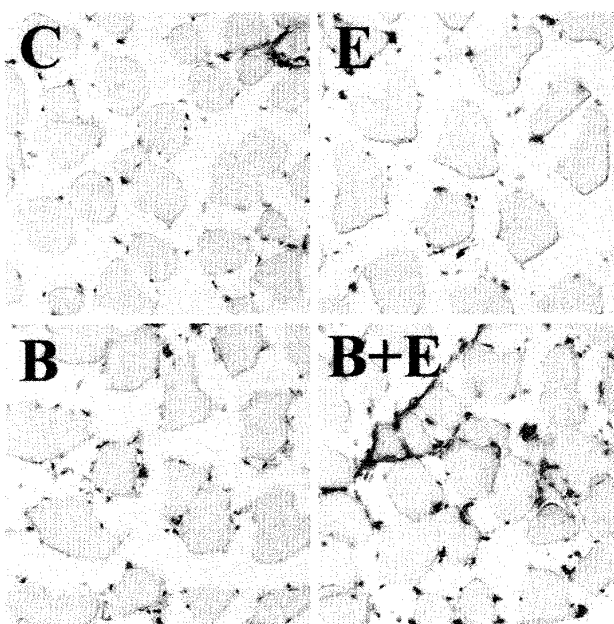


図4 下肢虚血作成6日後の大腿二頭筋組織像

メディウムのみ筋注したもの(C)、EPOのみ筋注したもの(E)、BMIで救助したもの(B)、およびBMIにEPOを併用した個体(BE)。血管は抗CD31抗体を用いて染色し(茶色)、後染色にヘマトキシリンを用いた(倍率 $\times 200$ )。Bで血管数の増加が、BEではさらに血管サイズの増大が観察された。

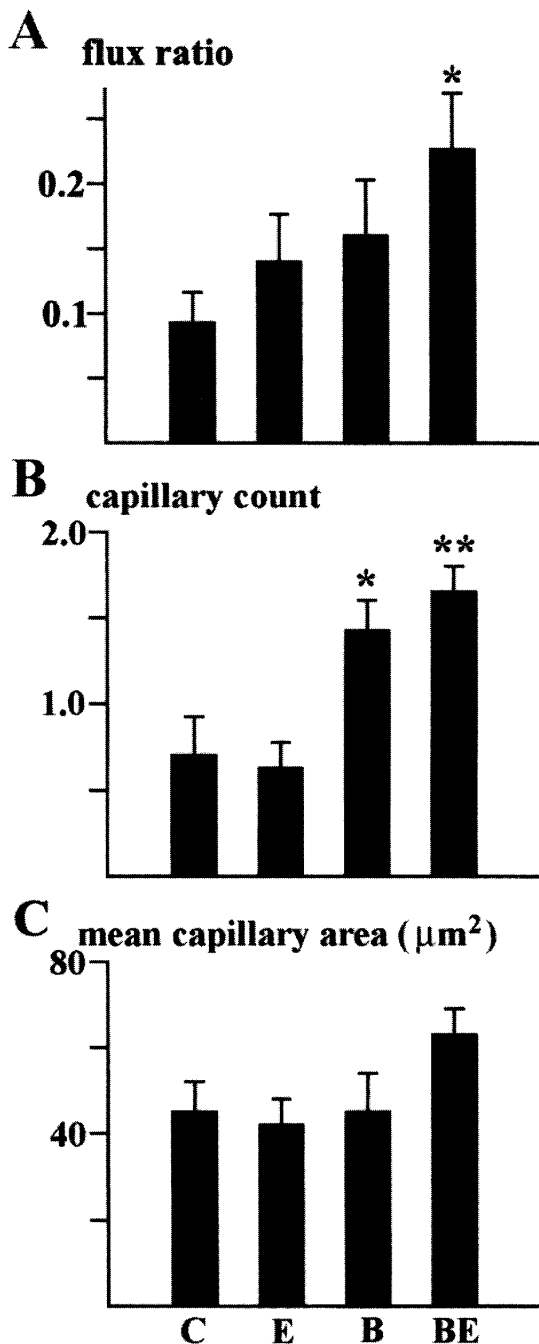


図5 下肢虚血作成6日後の下肢血流 (flux比, パネルA), 筋線維数に対する血管の相対数 (パネルB) および血管の平均面積 (パネルC)

メディウムのみ筋注したもの (C), EPOのみ筋注したもの (E), BMIで救助したもの (B), およびBMIにEPOを併用した群 (BE). レーザードップラー法による血流の評価を行い, 大腿二頭筋組織における血管を画像解析によって測定した.

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ .

かったものの, C群 ( $44.9 \pm 7.3$ ), E群 ( $42.3 \pm 5.5$ ), B群 ( $45.6 \pm 8.6$ ) ではほぼ同じ値であったが, BE群 ( $62.7 \pm 6.7$ ) では高い値をとり, EPO併用によって血管のサイズが増大することが推測された.

## 考 察

系統発生的にも個体発生の過程においても造血と血管形成は空間的かつ時間的に密接な関連を示す. 胎児造血は卵黄嚢で始めて観察されるが, 卵黄嚢内胚葉の間葉細胞から発生する血島と呼ばれる細胞集塊の内側が血球に, 外側が血管内皮になり, これらが相互に連結して最初の循環が始まる<sup>11)</sup>. この一次造血は有核赤血球の産生が主体であり, 赤血球造血と血管内皮の間の増殖分化向性サイトカイン群とその膜型受容体を介したクロストーク・システムの存在を推測させる. ついで二次造血がAGM (aorta gonad mesonephros) 領域で開始され, これは胎児肝をへて骨髓へ移動し出生後の造血をまかなうが, この過程においても盛んに増殖する造血幹細胞が周囲に血管を形成しつつ移動し, また臍帯動脈においては逆に血管内皮細胞から盛り上がるようにして造血細胞が観察される (血管内造血クラスター). この観察を説明する系としてAGM領域に含まれる幹細胞をin vitroで分化誘導あるいはin vivoで移植実験することで造血と血管の共通前駆細胞であるヘマンギオブラストの存在が推測された. ヘマンギオブラストは増殖に伴い一部が造血細胞に残りが血管内皮に分化し, その両者がさらに相互接触を介して増殖分化するが, そのメカニズムの少なくとも一部としてアンギオポエチンとその受容体Tie-2/TEKの相互作用が関わっていることが示唆された<sup>12)</sup>. これらのことから造血, 特に赤血球系造血と血管系増殖の間には膜型リガンドとその膜型受容体を介した直接接着および・あるいは可溶性リガンドとその膜型受容体を介した近接的パラクラインが1つまたはそれ以上関わっていることが想像される.

血管形成は新たに血管が形成される Vasculo-

genesis と、形成された血管が発芽などによって伸長・分岐する Angiogenesis の2段階で行われる<sup>13)</sup>。出生後の創傷の治癒過程・悪性腫瘍・子宮粘膜などで見られる血管新生はこれまで Angiogenesis によるものと考えられていたが、成人末梢血に骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cells, EPC) が常時存在すること<sup>14)</sup>、動物モデルで新生血管の約10%が Vasculogenesis に由来することが見いだされ<sup>15)</sup>、BMI の理論的根拠となった<sup>1)</sup>。細胞療法としての EPC の供給源を自家末梢血単核細胞にした場合にはその臨床効果がかなり低下し、その理由として CD34 陽性細胞比率で代表される幹細胞の濃度が末梢血では骨髄の1/500程度であることがあげられている<sup>1)</sup>。また BMI では幹細胞の供給のみならず、同時に移植される骨髄 CD34 陰性細胞からの VEGF・PIGF・アンジオポエチン群などの血管増殖分化向性サイトカイン群の産生が重要な働きをしていることが推測されている。

新生血管が成熟し生理的に機能するためには血管内皮増殖に伴って、これを取り巻く平滑筋やペリサイトが解剖学的バランスを保って同時に発育する必要がある。Isner によって“angiotherapeutics”と命名された血管治療の戦略には BMI を代表とする「細胞療法」と、サイトカインの遺伝子を患者体内で発現させる「遺伝子治療」の2つの大きな流れがある<sup>16)</sup>。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<sup>17)</sup>、その後おこなわれた randomized placebo-controlled trial での結果は不十分であった<sup>18)</sup>。患者虚血肢に VEGF 遺伝子治療後、一部の患者で患肢の浮腫が認められたが、これは VEGF によって平滑筋やペリサイトの裏打ちを伴わない血管内皮のみの非生理的な増殖がおこった可能性が推測され、従って単一のサイトカインの発現ではなく多種のサイトカインが正しい時系列でハーモニックに発現することが生理的に機能する血管の新生に重要であるという考え方が現在では広く受け入れられている。実際、PIGF は in vivo で VEGF に匹敵する血管新生作用があり、しかも VEGF との併用で平滑筋やペリサイトの裏打ちを伴った太くて分岐の豊

富な血管が誘導され、また VEGF 単独投与で見られる浮腫や異常血管の出現を阻止した<sup>19)</sup>。このように VEGF 受容体群やアンジオポエチン受容体群に作用する多種多様のサイトカインが総合的に作用して有効な血管の新生に寄与するものと現在では考えられている。

我々は本研究を含む一連の基礎検討として、正常ヒト骨髄・ヒト末梢血由来造血前駆細胞・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の in vitro 研究をおこなった。骨髄非赤芽球成分は VEGF を産生し、赤芽球成分は VEGF の他に PIGF をも産生していた。この赤芽球成分によるサイトカイン産生は in vitro で EPO 添加によってさらに強く誘導された。In vitro で HUVEC から angiogenesis による血管網を形成する培養を行った。ヒト末梢血由来造血前駆細胞から in vitro で作成した白血球コロニー (CFU-c) および赤芽球コロニー (BFU-e) をそれぞれ angiogenesis 系に加えると BFU-e との接触部位に血管網形成が著しく誘導されたが、抗 PIGF 中和抗体の添加によってもキャンセルされず、また CFU-c にはこのような生物活性がみられなかった (投稿準備中)。このことから骨髄 CD34 陰性分画のうち赤芽球が血管新生に特に重要で、その作用機序としてはやはり膜型リガンドとその膜型受容体を介した直接接着および・あるいは可溶性リガンドとその膜型受容体を介した近接的パラクラインが重要であると推測される。この現象を説明する分子の候補の一つとして、我々は血球系細胞膜に発現するニューロピリン1 (NP-1) に注目している<sup>19)</sup>。この分子は VEGF との結合により二量体化し、血管内皮の VEGF 受容体 (Flk-1) に対し VEGF 単独の場合よりも遙かに強い活性化シグナルを誘導する分子で、赤芽球は NP-1 を膜上に発現すると同時に VEGF と PIGF をパラクライン的に産生分泌することで、in vitro で赤芽球コロニーとの直接接着部位に血管網が強く誘導される現象をよく説明する。これについて現在検討中である。

BMI による in vitro 虚血救出実験の結果、B 群、BE 群とも壊死固体と回復個体がみられたが、これはマウスの個体差、特に下肢血管走行の違いに

より、虚血作成の程度にばらつきがあったこと、また BMI 筋注部位等、救出操作にばらつきがあったことが原因と推測される。

本研究の結果では BMI に EPO を併用することで血管新生の強い増強が *in vivo* で見られたことになるが、この機序として我々は BMI で移植された赤芽球および赤芽球前駆細胞が EPO の存在下にそれぞれ活性化・増殖および赤芽球コロニーの誘導が一過性に起こったものと想定している。これを証明するため以下の検討が必要である。1. 骨髓非赤芽球成分（Ter119 陰性細胞）の移植による血管新生効果の減弱、2. EPO 併用 BMI 後の大腿二頭筋組織における赤芽球系髓外造血の観察、3. 二頭筋標本における赤芽球系特異的転写因子 GATA-1 や赤芽球系特異的蛋白グロビン  $\beta$  鎖の mRNA の発現、および同組織での VEGF・PIGF・NP-1 の mRNA の発現増強について、現在検討を行っている。また EPO は水溶性サイトカインで組織からのクリアランスが速いため、今回の研究では比較的少量を 6 回にわけて連日投与したが、臨床応用を視野にいれ大量一回投与で十分な効果を得る目的で 1. ヒアルロン酸加 EPO、および 2. PIGF のヘパリン結合ドメインを導入した EPO キメラ蛋白の作成の基礎検討を開始した。

## 結 論

BMI による虚血下肢での血管新生効果が EPO の併用により強く増強された。BMI により血管数が増加し、EPO 併用により平均血管面積が増大した。EPO 併用による増強効果がこれによって説明されると推測した。現在この効果の分子細胞学的メカニズムを検討中である。

## 謝 辞

最後に、本研究においてご指導を賜りました新潟大学医学部第一内科相澤義房教授、鳥羽 健講師、加藤公則助手、小澤拓也先生、ならびに第二病理学教室藤 眞教授、長谷川 剛講師、青山 崇技官に心から御礼申し上げます。

## 参 考 文 献

- 1) 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.
- 2) 土田圭一, 加藤公則, 小澤拓也, 真木山八城, 池主裕子, 渡辺律雄, 西川 尚, 宗田 聡, 樋口 渉, 古川達雄, 鳥羽 健, 小玉 誠, 相澤義房, 橋本 剛, 藤原 浩, 名村 理, 林 純一, 吉村 宣彦: 骨髓細胞移植を行なった難治性 Buerger 病の一症例—当科における TACT trial 第一例目の経験—. *新潟医学会雑誌* 117: 195 - 206, 2003.
- 3) 加藤公則, 小澤拓也, 西川 尚, 相澤義房: 末梢動脈疾患に対する骨髓単核球移植術—血中血管新生因子の変化—. *血管の発生と新生—基礎と臨床—* 109 - 118, 2003.
- 4) Miyake T, Kung CK and Goldwasser E: Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252: 5558 - 5564, 1977.
- 5) Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neili SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, Kawakita M, Shimizu T and Miyake T: Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806 - 810, 1985.
- 6) Gregory CJ, Tepperman AD, McCulloch EA and Till JE: Erythropoietic progenitors capable of colony formation in culture: response of normal and genetically anemic W - W - V mice to manipulations of the erythron. *J Cell Physiol* 84: 1 - 12, 1974.
- 7) Tordjman R, Delaire S, Plouet S, Ting S, Gaulard P, Fichelson S, Romeo PH and Lemarchandel V: Erythroblasts are a source of angiogenic factors. *Blood* 97: 1968 - 1974, 2001.
- 8) Koury MJ and Bondurant MC: Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents pro-



- grammed death in erythroid progenitor cells. *Science* 248: 378 - 381, 1990.
- 9) Chong ZZ, Kang JQ and Maiese K: Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* 106: 2973 - 2979, 2002.
  - 10) Couffignal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzembichler B and Isner JM: Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 152: 1667 - 1679, 1998.
  - 11) Gilbert SF: Lateral plate mesoderm and endoderm: in "Developmental Biology (6<sup>th</sup>)", SINAUER associates, Sunderland, MA: 482, 2000.
  - 12) Takakura N, Huang XL, Naruse T, Hamaguchi I, Dumont DJ, Yancopoulos GD and Suda T: Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. *Immunity* 9: 677 - 686, 1998.
  - 13) Risau W: Mechanism of angiogenesis. *Nature* 386: 671 - 674, 1997.
  - 14) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzembichler B, Schatteman G and Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964 - 967, 1997.
  - 15) 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.
  - 16) Isner JM and Asahara T: Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 103: 1231 - 1236, 1999.
  - 17) 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.
  - 18) 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.
  - 19) Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ and Carmeliet P: Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nature Med* 8: 831 - 840, 2002.
  - 20) Yamada Y, Oike Y, Ogawa H, Ito Y, Fujisawa H, Suda T and Takakura N: Neuropilin-1 on hematopoietic cells as a source of vascular development. *Blood* 101: 1801 - 1809, 2003.

(平成16年1月7日受付)