

3 体外増幅自己赤芽球移植を用いた重症虚血肢患者に対する血管再生治療

小澤 拓也

新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器内科

Effects of Autologous Transplantation of Immature Erythroblasts in Patients with Critical Limb Ischemia

Takuya OZAWA

Department of Cardiovascular Biology and Medicine, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

キーワード：血管新生治療, 重症下肢虚血, 骨髄, 赤芽球, 体外増幅

重症下肢虚血により下肢切断術を受けた患者は2年後30%が死亡するという悲惨な転帰をたどるため、いかに下肢を温存できるかは患者の予後、医療費節減の両面で重要な課題であるが、血行再建の適応がない重症下肢虚血患者に対する有効な治療法は確立していない。そのような状況の中、20世紀末頃、日本政府はミレニアムプロジェクトの一環として、「生物の発生等の機能の解明に基づく、拒絶反応のない自己修復能力を利用した骨・血管等の“再生医療”を実現する」と掲げ、“再生医療”は国の最重要課題のひとつとして位置づけられた。その再生医療のなかでも当時目覚ましい進歩を遂げたものがトランスレーショナルリサーチとしての「重症下肢虚血に対する血管再生医療」であり、日本全国の大学病院をはじめとする医療機関・研究機関で数多くの症例に対して血管再生治療が行われてきた。

その血管再生治療の代表格が重症虚血肢に対する自己骨髄単核細胞移植であった。1990年代に血管内皮前駆細胞(EPC)が発見され、これが骨髄中で増殖・分化後、末梢血中に遊走し局所で血管

発生を引き起こすこと、さらには骨髄中の細胞はあらゆる血管新生因子を豊富に産生していることなどから、この骨髄液そのものを虚血下肢に筋注することで血管新生を誘導し、重症虚血肢の血流改善を促すという「治療的血管新生」のコンセプトのもと「自己骨髄単核細胞移植治療(BMI)」が開発された¹⁾。血液学の知識で循環器の患者を治療することから第1内科にとってはまさに理想的な環境が整っており、2001年から当科でも循環器内科と血液内科のコラボレーションにより、積極的に自己骨髄細胞移植(BMI)に取り組んできた。その後、厚生労働省の指定する先進医療の認可も受け、すでに40例以上の主に末梢動脈閉塞症などの重症虚血肢に対し細胞移植を施行した。BMIを受けた症例では下肢血流が改善することで疼痛が軽減し、皮膚潰瘍も縮小・治癒し、下肢救済可能であった症例も多くみられ、日本全国の大学病院や研究施設でBMIもしくはこれに準じた末梢血幹細胞移植²⁾などが数多くの症例に行われてきた。

しかし症例数を重ねるにつれ、課題も浮き彫り

Reprint requests to: Takuya OZAWA
Department of Cardiovascular Biology and
Medicine, Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences,
1-754 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-754
新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器内科

小澤 拓也

になった。(1) 患者に対する侵襲が大きい、(2) 患者からは良好な骨髄が採取されない等の理由で動物モデル治療実験に比しはるかに低い治療効果しか得られず、真に血管再生を必要とする重症患者に対しての効果は不十分、といったものであった。これらを克服する目的で、我々のグループではまず BMI による血管再生の機序を明らかにしてきた。骨髄内での造血過程において赤血球系細胞は遊走能を持たず、増殖因子の分泌により新生血管を誘致して末梢へ動員されるという点に着目した。この赤芽球の作用を骨髄外で再現したのが BMI による血管再生の機序であると考え、これを証明した。すなわち、骨髄細胞のうち VEGF、PLGF 等の血管新生因子を分泌しているのは主に赤芽球であり、BMI による血管再生には赤芽球が必須であり、BMI にエリスロポエチン (EPO) 投与を併用することで赤芽球の生存を高め、血管新生効果を増強することを示した³⁾。

また BMI では全身麻酔下に 500 ~ 1,000cc の骨髄を採取するため、患者への侵襲が大きいことが問題のひとつである。さらには実際に重症虚血症例の多くの骨髄総細胞数および CD34 陽性細胞数は健康人に比し著しい低形成を示し、移植する細胞の質が不良であるため治療効果に大きく影響する^{4) - 6)}。これらの問題点を克服するための方策として、少量の自己骨髄から十分量の幼弱赤芽球を体外で増幅する培養技術、すなわち体外増幅自己赤芽球移植による血管新生治療 (Ex - Vivo Expanded Erythroblast Transplantation (Auto - logous) (EVEETA study) の開発に着手した。

健康ヒト骨髄の検討では、超低比重分画から精製した前赤芽球から好塩基性赤芽球にかけての未熟な赤芽球が血管新生因子を圧倒的に活発に産生しており、これら未熟な赤芽球を体外培養で大量に入手することを培養法開発の目的とした。健康ヒト骨髄を用いて培養法の試行錯誤を行った結果、TPO 等 3 種の造血因子の存在下で 7 日間培養 (一次培養) することで赤血球前駆細胞が増幅され、さらにこれを EPO 等 3 種の造血因子の存在下で 7 日間培養 (二次培養) することで、大量の未熟赤芽球が収穫されました。マウス下肢虚血モ

デルを用いて EVEETA 治療と BMI 治療を比較検討したところ、EVEETA (細胞 100 万個) は BMI (細胞 100 万個) に比し有意に下肢血流を改善させ、その効果は 10 倍量の細胞数を用いた BMI (細胞 1000 万個を移植) と同等の治療効果を示すほど強力であった⁷⁾。

平成 18 年秋に当施設倫理委員会および臨床研究審査委員会から当該第 I / II 相臨床試験の認可を受け、平成 19 年より「重症虚血肢に対する体外増幅自己赤芽球移植による血管新生治療 (Ex - Vivo Expanded Erythroblast Transplantation (Autologous) (EVEETA study) の第 I / II 相臨床試験) を開始しました。これまで 11 例の末梢血管疾患患者に対して EVEETA 治療を施行し、すみやかな下肢痛の軽減及び消失、難治性皮膚潰瘍の縮小、局所組織酸素分圧や皮膚灌流圧の上昇といった非常に良好な結果が得られた。いずれの症例においても明らかな有害事象はなく、安全性についても問題ないことを示した。このパイロット試験で得られた EVEETA 治療のデータを過去の BMI と比較すると EVEETA では有意に皮膚灌流圧の改善を得られており、EVEETA の優位性を示唆するものであった。

そこで当科では、『重症虚血肢患者に対する体外増幅自己赤芽球移植と自己骨髄単核細胞移植による血管新生治療の比較試験』を計画中である。この研究の目的は、従来法である BMI と体外培養法による EVEETA、この 2 つの血管新生治療の治療効果および安全性を単施設無作為化並行群比較試験において検討し、EVEETA の優位性を実証することにある。本臨床試験は、当院ヒト幹細胞臨床研究倫理審査委員会の審査承認後、厚生労働省の「ヒト幹細胞を用いた臨床試験に関する指針」においても 2013 年 11 月に正式に認可された。今後、従来法の BMI と当科オリジナルの体外培養法における血管新生治療を無作為比較し、EVEETA 治療の下肢血流改善効果の優位性を実証できれば、少量の骨髄採取のみでよいという低侵襲な方法でより強力な血管新生効果・下肢救済効果を有する次世代血管新生治療として広く臨床現場で用いられる可能性が高く、近い将来には先進医療申

請を目指している。

本研究の成果として、より多くの重症下肢虚血症例が下肢大切断を回避できれば、寝たきりを回避でき、患者ADLやQOLの改善が期待できる。この患者の活動性改善が運動量の増加につながり、ひいては血管内皮機能の改善から心血管イベントの減少効果が期待できる。さらには投与薬剤数の減少や日常生活の改善につながり、国民の保健・医療の向上が大いに期待できると考えている。

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 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) Moriya J, Minamino T, Tateno K, Shimizu N, Kuwabara Y, Sato Y, Saito Y and Komuro I: Long - term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv.* 2: 245 - 254, 2009.
- 3) 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 transplantation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 40: 629 - 638, 2006.
- 4) Saigawa T, Kato K, Ozawa T, Toba K, Makiyama Y, Minagawa S, Hashimoto S, Furukawa T, Nakamura Y, Hanawa H, Kodama M, Yoshimura N, Fujiwara H, Namura O, Sogawa M, Hayashi J and Aizawa Y: Clinical application of bone marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficacy and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J.* 68: 1189 - 1193, 2004.
- 5) Oda M, Toba K, Kato K, Ozawa T, Yanagawa T, Ikarashi N, Takayama T, Suzuki T, Hanawa H, Masuko M, Kobayashi H and Aizawa Y: Hypocellularity and insufficient expression of angiogenic factors in implanted autologous bone marrow in patients with chronic critical limb ischemia. *Heart Vessels.* 27: 38 - 45, 2012.
- 6) 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 for critical limb ischemia after autologous bone marrow implantation. *J Cardiol.* 50: 235 - 242, 2007.
- 7) Oda M, Toba K, Ozawa T, Kato K, Yanagawa T, Ikarashi N, Takayama T, Suzuki T, Hanawa H, Fuse I, Nakata K, Narita M, Takahashi M and Aizawa Y: Establishment of culturing system for ex - vivo expansion of angiogenic immature erythroid cells, and its application for treatment of patients with chronic severe lower limb ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49: 347 - 353, 2010.