

細胞移植によるハイブリッド血管新生療法の開発

新谷 理

Shintani S: **Preclinical investigation for hybrid therapeutic angiogenesis.** J Jpn Coron Assoc 2009; 15: 193-197

I. はじめに

閉塞性動脈硬化症(arteriosclerosis obliterans; ASO)は、動脈内膜の粥状硬化と中膜の退行性変性により、特に腹部大動脈および四肢の主幹動脈に狭窄や閉塞を来し、慢性の血流障害を招来する病態を呈するものである。治療としては、虚血組織への血行再建および動脈硬化因子の管理が重要であり、経皮経管的血管形成術(percutaneous transluminal angioplasty; PTA)やバイパス術といった観血的血行再建術も積極的に行われている。しかしながら、従来治療では改善しない安静時疼痛や虚血性潰瘍および壊死を有するために、下肢切断を余儀なくされる治療抵抗性重症例もみられる。

1995年米国タフツ大学のIsnerらは、度重なる動物実験を経て、重症ASO患者の虚血組織へ血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)遺伝子を含む発現プラスミドを局所移植したところ、虚血周囲の健常組織からの血管新生や側副血行の発達が促進され、下肢切断を免れたと報告した¹⁾。このVEGF₁₆₅プラスミドによる血管新生療法は、米国FDA(食品・医薬品局)が承認した循環器領域における世界初のヒト遺伝子治療プロトコルである。

1997年には、同研究所の浅原らにより、成人末梢血中から血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell; EPC)が発見同定され、虚血領域の血管新生に関与することも確認された²⁾。この報告により、成人における血管新生は、既存の毛細血管内皮細胞の増殖や遊走のみではなく、それまで胎児初期にしか認められないとされていたEPCの目的部位での分化および増殖や遊走という概念、いわゆる血管発生(vasculogenesis)も関与している可能性が示唆された。

II. 自己骨髄単核球移植における末梢性血管疾患の治療 (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation; TACT trial)

われわれは、以前より虚血性疾患に対する治療法の開発に積極的に取り組んでいる。EPCを用いた血管新生療法の開発では、EPCが造血幹細胞と類似の表面抗原(CD34, Flk-1, Tie-2など)を有していることに着目した。つまり、成人における唯一の造血器官である骨髄から得られた単核球細胞分画中では、より未分化なEPCが豊富に含まれると考えた。そこで、片側下肢虚血を作成した実験動物に自己骨髄単核球細胞を移植したところ、虚血骨格筋において毛細血管密度の増加や皮下血流の改善がみられた。また毛細血管レベルの血管新生に伴い既存の血管床への血流が増強し、虚血/正常下肢血圧比の改善および側副血行の発達がみられ、組織壊死の軽減および機能保護につなげることが可能であることを明らかにした³⁾。これらの理論的・実験的根拠に基づき、臨床応用したものが自己骨髄単核球移植における末梢性血管疾患の治療(TACT trial)である。対象は、将来的に下肢切断が余儀なくされる重症下肢虚血患者であった。細胞移植4週間後には、歩行可能距離の延長、1日疼痛回数減少、下肢血管造影上著明な側副血行の発達(図1)、皮下血流の増加が認められた。この結果は2002年に報告され⁴⁾、わが国最初の循環器領域における再生医療として高度先進医療に認可された。

その後、TACT trialは、わが国のみならず様々な施設で行われるようになった。2008年には多施設臨床研究として長期治療効果判定が行われ、ASO患者では、バージャー病(thromboangiitis obliterans; TAO)患者と比較し治療効果が乏しい傾向にあることが明らかになった(図2)⁵⁾。これら結果を解釈するうえで興味深い報告がされている。多くの動脈硬化危険因子を有する患者^{6, 7)}、または慢性虚血性心筋症の患者⁸⁾においては健常人と比較して、骨髄より末梢血へ動員されるEPCの数的不足のみならず遊走能などのEPC自体の細胞機能が低下している。これが現行の細胞移植による血管新生療法の限界点となっている可能性は高く、様々な施設で治療効果減弱の要因を解決すべく新たな血管新生療法の開発が行われている。

名古屋大学大学院医学系研究科循環器内科学(〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65)(本論文の要旨は第22回日本冠疾患学会学術集会のシンポジウム「虚血性心疾患・心臓再生医療の展望」、2008年12月・東京で発表した)

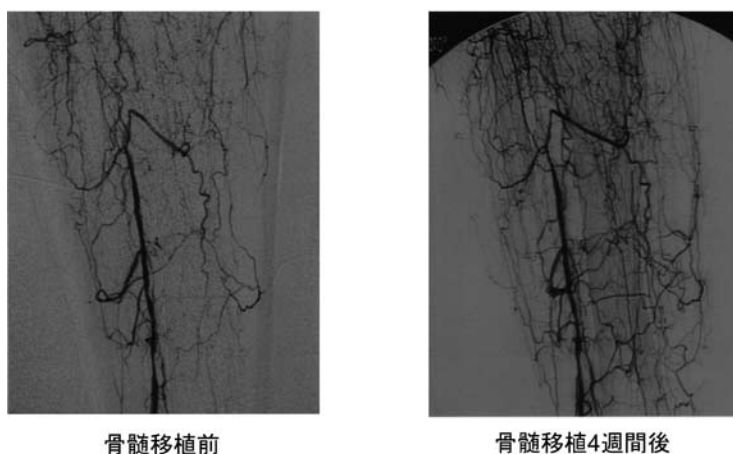


図1 自己骨髄単核球細胞移植前後の下肢血管造影写真
ASO患者(73歳女性)において、自己骨髄単核球細胞移植により、著明な側副血行の発達が見られた。文献4より改変。

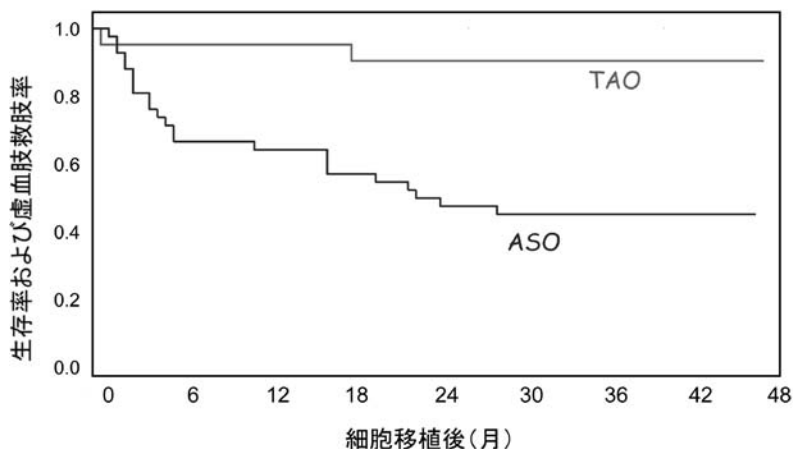


図2 TACT study における長期予後成績
TACT multi-center study より、ASO 患者では TAO 患者と比較して、生存率および虚血肢救肢率、つまり治療効果が低下している。文献5より改変。

III. TACT multi-center study から学ぶ ハイブリッド血管新生療法の開発

TACT trial で十分な治療効果が得られない症例に対する救肢治療を考えるにあたり、TACT multi-center study から問題点を抽出し、各々の問題点を解消することが重要と考えられた。

1. 病態による治療効果の違い

TACT multi-center study では、全症例における虚血肢切断回避率は88%であったが、ASO患者に限れば治療有効率は45%と低下していることより⁵⁾、今後、移植適応疾患の選定が必要なのかもしれない。しかしながら、現時点での移植適応制限は困難であり、移植細胞の細胞活性や細胞機能をあげるにより血管新生増強効果が期待できるハイブリッド治療の開発が望まれる。

われわれは、CD34陽性細胞とVEGF-Cプラスミドのハイブリッド治療による血管新生増強効果を検討した。In vitro 実験系において、アポトーシスに陥った培養EPCはVEGF-C蛋白の投与によりpAkt蛋白の増加がみられ、アポトーシスが抑制された。また、急性心筋梗塞(AMI)を作成した免疫抑制動物に低容量のCD34陽性細胞とVEGF-Cプラスミドによるハイブリッド治療を行ったところ、治療4週間後には、コントロール群およびそれぞれ低容量単独治療群と比して有意に心機能の改善、梗塞巣の縮小、血管新生の増強が認められた(図3)⁹⁾。

2. 移植細胞が十分な血管新生効果を発揮できる環境整備

AMI患者においては、発症1週間後をピークに流血中のEPCが増加しており、さらに末梢血中のVEGFと正の相関があることが知られている¹⁰⁾。VEGFは血管形成の過程で血管内皮細胞へ作用する重要な増殖因子であると

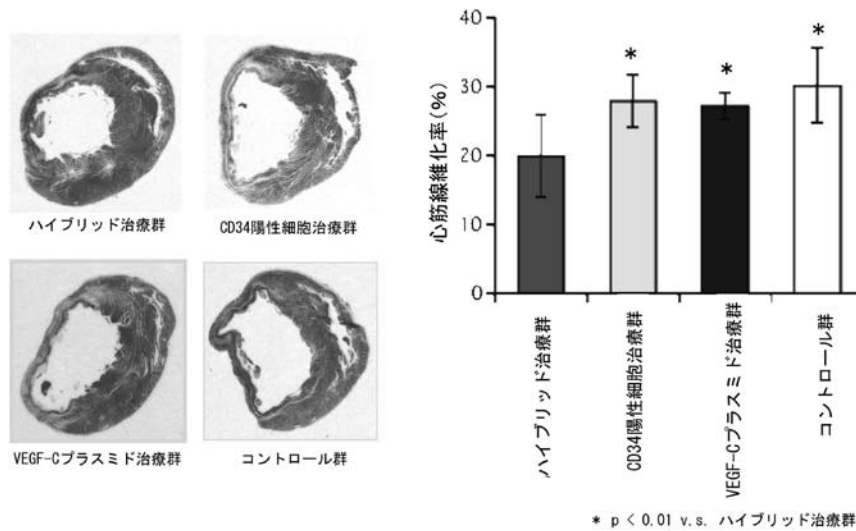


図3 ラット心筋梗塞モデルにおけるハイブリッド療法の治療効果
低容量 EPC 移植に VEGF-C プラスミド遺伝子導入を組み合わせたハイブリッド治療群では、コントロール群のみならず EPC 移植群や VEGF-C 遺伝子導入群と比較しても、心筋梗塞作成 4 週後の心筋線維化が有意差をもって抑制された。文献 9 より改変。

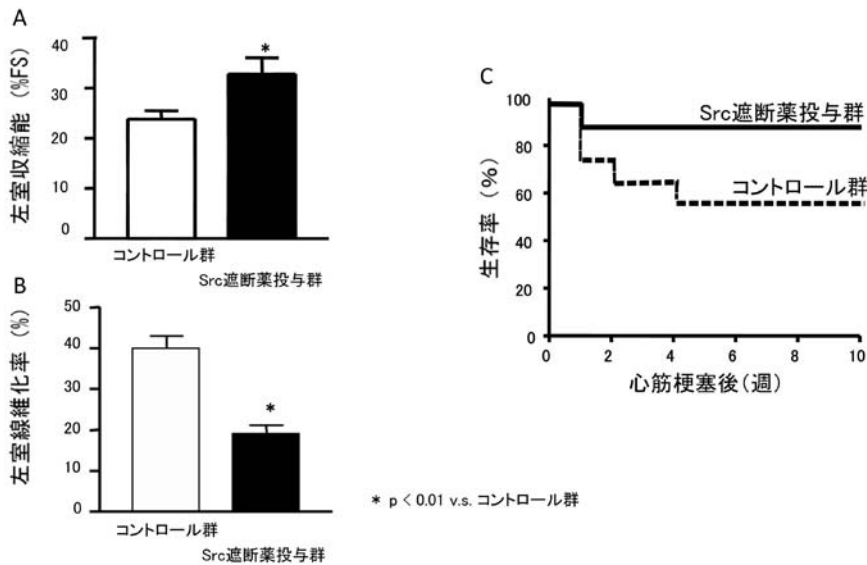


図4 心筋梗塞に対する Src 遮断薬の治療効果
ラット心筋梗塞モデル A)心筋梗塞 4 週後には Src 遮断薬投与群で著明な %FS の改善がみられた。B)エラスティックトリクロム染色による心筋線維化の評価：心筋梗塞 4 週後には Src 遮断薬投与群で線維化の抑制がみられた。
マウス心筋梗塞モデル C)Src 遮断薬投与により心筋梗塞 10 週後の生存率は 91.7%と改善している(コントロール群では 58.3%)。文献 11 より改変。

ともに、血管透過性亢進を有する 2 つの性質をもつ物質である。虚血心筋における冠動脈再還流後の心筋浮腫は、VEGF による血管透過性の亢進と考えられている。浮腫に陥った梗塞巣では、毛細血管網の破綻や血管外組織内圧の上昇を来すため梗塞領域への冠血流の低下が起これ、梗塞範囲の拡大や左心室リモデリングによる心収縮機能の低下を引き起こす。われわれは、ラット心筋梗塞モデルを用いて Src 遮断薬による心筋浮腫軽減効果を検討

した。心筋梗塞後に Src 遮断薬を全身投与したところ、MRI により心筋浮腫の縮小を認めた。Src 遮断薬は、VEGF に直接作用するのではなく Flk/Cadherin 複合体を安定化させる、つまり、VEGF による血管新生の抑制効果ではなく VEGF を仲介する血管透過性の亢進を抑制することにより、心筋梗塞後の心筋浮腫および組織傷害を軽減させ、心機能の温存や心筋線維化の減少、さらには生命予後の改善につながるということが明らかになった(図 4)。わ

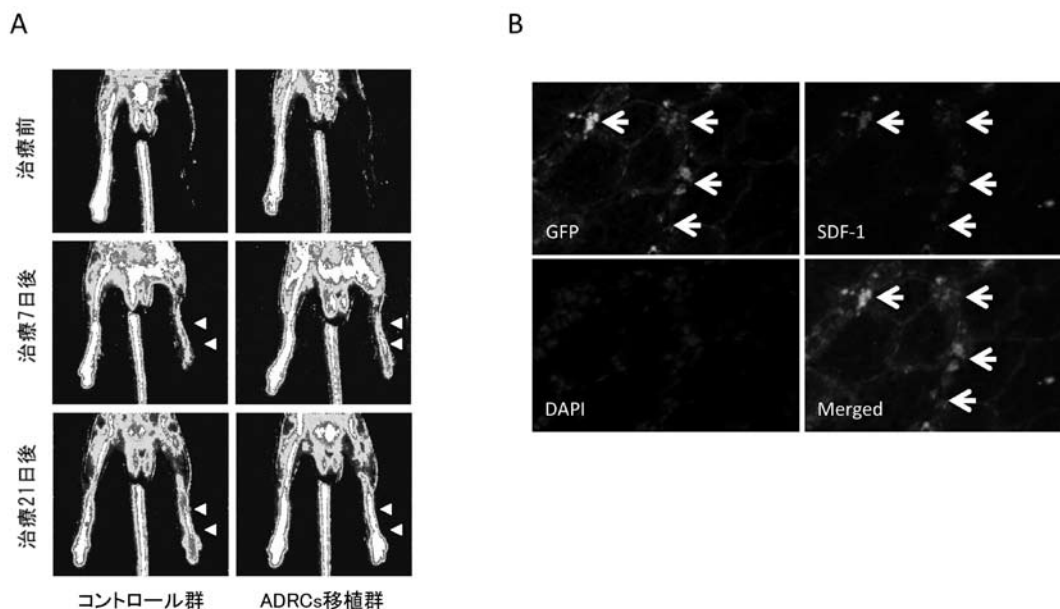


図5 ADRCs 移植による血管新生療法

A) レーザードプラによる皮下血流測定: ADRCs 移植によりマウス下肢虚血部での皮下血流が増加した。
B) 蛍光免疫染色(緑 GFP, 赤 SDF-1, 青 DAPI): 虚血骨格筋において GFP マウス由来 ADRCs は SDF-1 を放出している。文献 14 より改変。

われわれは、Src 遮断薬が心筋梗塞後の生命予後改善のための新たな治療戦略だけでなく、今後展開される心筋梗塞に対する細胞移植、つまり血管および心筋再生療法において、移植細胞の生着率を上昇させる有益な治療手段のひとつに成り得ると考えた¹¹⁾。

3. 新たな細胞供給源の検索

われわれは以前より新たな細胞供給源として臍帯血に注目していた。臍帯血単核球分画中の CD34 陽性細胞含有率は、成人末梢血と比して有意に増加しており、片側下肢虚血モデルの免疫抑制動物に臍帯血由来 EPC を筋注法で移植したところ、虚血下肢の血管新生に組み込まれレーザードプラによる皮下血流および毛細血管密度の増加、つまり血管新生の増強効果を有することが明らかになった¹²⁾。一般的に健康産婦より得られる臍帯血由来 EPC は、骨髄細胞由来 EPC に比較してより強力な血管新生効果を発揮する可能性は高いと考えられるが、現在の公的臍帯血バンクのシステムでは同種移植しか行えず、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) を初めとしたレシピエントに不利に働く免疫反応が惹起される可能性は否定できない。そこで、血管が豊富な組織である皮下脂肪組織に着目した。脂肪組織由来間葉系前駆細胞 (adipose-derived regenerative cells; ADRCs) は、2001 年 Zuk ら¹³⁾ が同定した多様性分化能を有する細胞である。われわれは、C57BL/6J マウス皮下脂肪組織より ADRCs を抽出し得た。FACS により ADRCs 表面抗原は、Sca-1 抗原陽性であったが、CD31, CD34, c-kit, flk-1 など血管内皮系抗原は陰性であることが明らかになった。また培養過程におい

て、これらの細胞から VEGF や SDF-1 といった血管新生サイトカインの放出が確認された。片側下肢虚血作成の動物へ ADRCs 移植を行ったところ、移植 3, 7 日後に末梢血中に EPC の増加が確認され、細胞移植 3 週間まで、皮下血流および毛細血管密度の増加といった血管新生増強効果が有意にみられた (図 5A)。さらに、移植部骨格筋および末梢血中においては SDF-1 の分泌の増加が有意にみられ (図 5B)、抗 SDF-1 中和抗体投与により細胞移植による血管新生増強効果は消失した。つまり、ADRCs 移植は、移植部骨格筋において血管新生サイトカインを分泌し、虚血組織における側副血行の発達を増強し得ることがわかった。特に、SDF-1 は骨髄から EPC を動員し、虚血組織における血管新生を規定する重要な因子である可能性が示唆された¹⁴⁾。われわれは、ADRCs 移植による血管新生療法が、次世代の再生医療のひとつとなり得ると考えており、現在、TACT study に次ぐ新たな血管新生療法としての臨床導入を準備している。

IV. まとめ

TACT multi-center study により、新たな血管新生療法の開発が必要であることが示唆された。現在、細胞移植による血管新生には、虚血組織における炎症や血管新生サイトカインの増加が重要であると考えられている。また、虚血骨格筋における血管新生には骨格筋再生が重要であるとの報告もあり¹⁵⁾、虚血骨格筋と虚血心筋における血管新生は全く異なった機序で起こっているかもしれない。今後、さらなる研究成果が待たれる分野である。

文 献

- 1) Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996; **348**: 370–374
- 2) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**: 964–967
- 3) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, Imaizumi T: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 2001; **103**: 897–903
- 4) 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, Imaizumi T: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cell: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet* 2002; **360**: 427–435
- 5) Matoba S, Tatsumi T, Murohara T, Imaizumi T, Katsuda Y, Ito M, Saito Y, Uemura S, Suzuki H, Fukumoto S, Yamamoto Y, Onodera R, Teramukai S, Fukushima M, Matsubara H: Long-term clinical outcome after intramuscular implantation of bone marrow mononuclear cells (Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation: TACT trial) in patients with chronic limb ischemia. *Am Heart J* 2008; **156**: 1010–1018
- 6) Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S: Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; **89**: E1–E7
- 7) Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; **348**: 593–600
- 8) Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S: Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004; **109**: 1615–1622
- 9) Shintani S, Kusano K, Ii M, Iwakura A, Heyd L, Curry C, Wecker A, Gavin M, Ma H, Kearney M, Silver M, Thorne T, Murohara T, Losordo DW: Synergistic effect of combined intramyocardial CD34+ cells and VEGF2 gene therapy after MI. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; Suppl 1(S1): S123–S128
- 10) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T: Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; **103**: 2776–2779
- 11) Weis S*, Shintani S*, Weber A, Kirchmair R, Wood M, Cravens A, McSharry H, Iwakura A, Yoon Y-s, Himes N, Burstein D, Doukas J, Soll R, Losordo D, Cheres D: Src blockade stabilizes a Flk/Cadherin complex reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest* 2004; **113**: 885–894. *These authors contributed equally to this work.
- 12) Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T: Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000; **105**: 1527–1536
- 13) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; **7**: 211–228
- 14) Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, Imaizumi M, Kitagawa Y, Murohara T: Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. Role of SDF-1 and endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 61–66
- 15) Tateno K, Minamino T, Toko H, Akazawa H, Shimizu N, Takeda S, Kunieda T, Miyauchi H, Oyama T, Matsuura K, Nishi J, Kobayashi Y, Nagai T, Kuwabara Y, Iwakura Y, Nomura F, Saito Y, Komuro I: Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res* 2006; **98**: 1194–1202