

## 原 著 (第16回徳島医学会賞受賞論文)

### 末梢単核球細胞を用いた末梢動脈閉塞症に対する新たな血管新生治療の試み

岩瀬 俊<sup>1)</sup>, 黒部 祐嗣<sup>2)</sup>, 八木 秀介<sup>1)</sup>, 原 朋子<sup>1)</sup>, 長樂 雅仁<sup>1)</sup>,  
藤村 光則<sup>1)</sup>, 尾崎 修治<sup>1)</sup>, 赤池 雅史<sup>1)</sup>, 安倍 正博<sup>1)</sup>, 増田 裕<sup>2)</sup>,  
東 博之<sup>1)</sup>, 松本 俊夫<sup>1)</sup>, 北川 哲也<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体制御医学講座生体情報内科学分野

<sup>2)</sup>同器官病態修復医学講座循環機能制御外科学分野

(平成18年6月9日受付)

(平成18年6月16日受理)

近年, 重症末梢動脈閉塞症に対して自己骨髄単核球を用いた細胞移植治療が行われ虚血症状を改善することが報告されている。しかし, 侵襲が大きいため対象が限られる。我々は侵襲性の低い末梢血単核球細胞移植の末梢動脈閉塞症に対する臨床効果について検討した。既存治療抵抗性の重症末梢動脈閉塞症5症例に対して, 血液アフェレーシスにより採取した末梢血単核球細胞を虚血肢に分割投与した。5症例中4症例において安静時疼痛やしびれなどの自覚症状は改善し, 閉塞性動脈硬化症1症例においては歩行距離が著明に延長した(160mから915m)。両手に難治性皮膚潰瘍を有したバージャー病症例に対しては, 細胞移植を2回実施することにより潰瘍は治癒した。一方, 明らかな有害事象の出現はなかった。以上の結果より, 末梢血単核球細胞移植は重症末梢動脈閉塞症例に対して, 低侵襲かつ有効な血管新生治療となりうると考えられた。

社会の高齢化および食生活の欧米化に伴い, 末梢動脈閉塞症(閉塞性動脈硬化症, バージェー病)に罹患する患者数は増加の一途をたどっている。各種内科的および外科的治療の発達にも関わらず, 安静時疼痛や虚血性潰瘍を呈する重症末梢動脈閉塞症症例においては, 症状増悪に伴い虚血肢切断を余儀なくされる場合が少なからず存在する<sup>1)</sup>。近年, 成人個体の骨髄及び末梢血中における血管内皮前駆細胞の存在が報告されてから<sup>2,3)</sup>, 循環器領域における細胞治療に関する基礎研究が活発に行われている。臨床においても骨髄単核球を用いた血管新生治療法が主に末梢動脈閉塞症症例に対して既に行われてい

る<sup>4)</sup>。しかし, 骨髄単核球細胞を用いる場合, 全身麻酔下で約500mlの骨髄液採取が必要であり侵襲が大きい。閉塞性動脈硬化症においては, 冠動脈疾患や脳血管疾患を合併することが多いため, これらの症例に対する骨髄単核球細胞を用いた細胞移植は大きなリスクを伴う。また時間経過と共に治療効果が減弱することも指摘されており, 複数回にわたる実施が必要とされる場合もある。一方, 末梢血単核球細胞中にも少ない割合であるが, 血管内皮前駆細胞が含まれている。末梢血単核球細胞の採取は, 骨髄単核球細胞採取と比較して安全性が高くかつ複数回の採取が可能である。今回, われわれは末梢血単核球細胞移植の末梢動脈閉塞症に対する臨床効果について検討した。

#### 対象および方法

末梢動脈閉塞症(閉塞性動脈硬化症・バージャー病等)を原因とする重症虚血肢により日常生活が著しく障害され, 他のいかなる治療にも反応せず今後の回復が期待できない20歳以上の症例を対象とした。一方, 悪性腫瘍を有するもしくは5年以内に既往のある症例, 前増殖性又は増殖性糖尿病性網膜症を有する症例, 未治療の虚血性心疾患を有する症例, 妊娠中または妊娠の可能性のある症例ならびに担当医師が不適当と判断した症例は適応から除外した。なお本研究の実施に当たっては徳島大学病院倫理委員会の承認を受けた。

## 末梢血単核球細胞移植

末梢血単核球細胞採取は、COBE-Spectra $\alpha$  (GAMBRO)

を用いた血液アフェレーシスにより移植当日に施行した。回収した単核球細胞を虚血肢筋肉内に50~100ヵ所以上に分割して投与した(図1)。

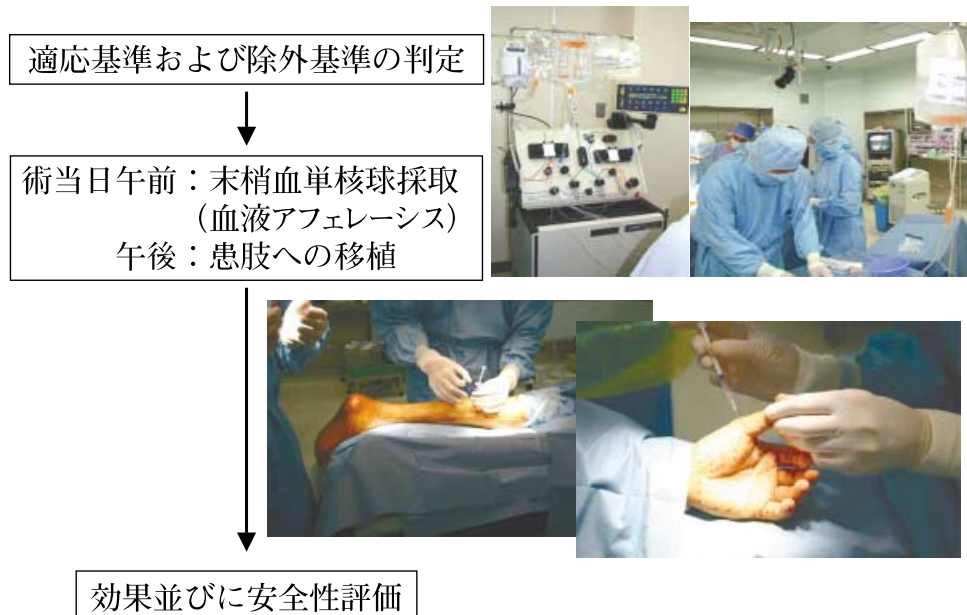


図1. 末梢血単核球細胞移植実施手順

## 効果ならびに安全性評価

細胞移植前、移植2週間後、1ヵ月後、3ヵ月後ならびに6ヵ月後に、細胞治療の効果判定ならびに安全性の評価を目的として各種検査を施行した。自覚症状、特に疼痛の評価に関しては Visual Analogue Scale (VAS) による10段階評価を用いた。潰瘍を有する場合には部位・深さ及び壊死の有無について細胞移植前後で比較した。歩行可能な症例においては、最大歩行距離を計測した。ABPI (ankle-brachial pressure index) ならびにサーモグラフィーは過去の報告に従い実施した<sup>4)</sup>。一方、虚血肢の脈波を指尖光電脈波装置 (IMEXLAB 9100, NICOLET VASCULAR, INC) を用いて測定した。血管造影に関しては、細胞移植前、移植1ヵ月後、3ヵ月後並びに6ヵ月後に実施した。安全性の評価としては、CRPを含めた各種血液検査ならびに眼底検査を行った。

## 結 果

2004年9月から2006年2月までに閉塞性動脈硬化症4

症例ならびにバージャー病1症例に対して、末梢血単核球細胞移植を実施した(表1)。全症例ともに安静時疼痛を有しており、症例4は両手に難治性皮膚潰瘍を認め、症例5は右下肢に壊疽を伴っていた。移植した末梢血単核球数は平均 $9.2 \times 10^9$ 個で、単核球細胞中のCD34陽性細胞の割合は平均0.07% (0.02~0.1%)であった(表2)。

5例中4症例において自覚症状の改善およびVASの低下を認めた(表3)。両手に難治性潰瘍を有した症例4に対しては、1回目は両手に細胞移植を行い左手の皮膚潰瘍は治癒した(図2)。一方、右手の皮膚潰瘍に関しては、移植後1ヵ月後までは潰瘍の縮小を認めたが、細胞移植3ヵ月後に潰瘍の再増悪を認めた(図3)。右手にのみ再度細胞移植を実施したところ潰瘍は治癒した。なお症例5は細胞移植後も症状の改善なく右下肢を切断した。歩行距離は、測定可能であった3症例全例において延長した。特に症例3においては、細胞移植前の最大歩行距離が160mであったが、移植1ヵ月後には280m、移植3ヵ月の時点では915mと著明に延長した。

症例1におけるサーモグラフィーでは、移植部位の皮膚温は移植直後から移植後1ヵ月においては非移植肢と

表1. 患者背景

| 年 齢  | 性 別    | 症 状         | 診 断                                   |
|------|--------|-------------|---------------------------------------|
| 症例 1 | 77歳 男性 | 痺れ, 安静時疼痛   | 閉塞性動脈硬化症<br>左大腿膝窩動脈バイパス閉塞             |
| 症例 2 | 68歳 男性 | 痺れ, 安静時疼痛   | 閉塞性動脈硬化症<br>両側浅大腿動脈閉塞<br>慢性腎不全 (血液透析) |
| 症例 3 | 66歳 男性 | 痺れ, 安静時疼痛   | 冠動脈バイパス術後<br>閉塞性動脈硬化症<br>両側浅大腿動脈閉塞    |
| 症例 4 | 48歳 男性 | 安静時疼痛, 皮膚潰瘍 | パージャー病                                |
| 症例 5 | 45歳 男性 | 安静時疼痛, 壊疽   | 閉塞性動脈硬化症<br>右大動脈浅大腿動脈バイパス閉塞           |

表2. 移植細胞数および移植部位

| 症例        | 総移植細胞数 (CD34陽性細胞)   | 移植部位 |
|-----------|---|------|
| 症例1.      | 0.5 × 10 <sup>9</sup> cells (0.1 × 10 <sup>6</sup> cells)   | 右下肢  |
| 症例2.      | 9.0 × 10 <sup>9</sup> cells (2.7 × 10 <sup>6</sup> cells)   | 右下肢  |
| 症例3.      | 16.7 × 10 <sup>9</sup> cells (5.0 × 10 <sup>6</sup> cells)  | 左下肢  |
| 症例4 (1回目) | 9.2 × 10 <sup>9</sup> cells (9.2 × 10 <sup>6</sup> cells)   | 両上肢  |
| (2回目)     | 6.9 × 10 <sup>9</sup> cells (5.5 × 10 <sup>6</sup> cells)   | 右上肢  |
| 症例5.      | 12.7 × 10 <sup>9</sup> cells (12.7 × 10 <sup>6</sup> cells) | 右下肢  |

表3. 症状・検査所見の推移

| 症例        | 症状・転帰     | Fontaine 分類 | ABPI      | 指尖脈波 | 血管造影 |
|-----------|-----------|-------------|-----------|------|------|
| 症例1.      | VAS:7 7   |             | 0.24 0.4  | 改善   | 変化無し |
| 症例2.      | VAS:10 5  |             | 0.43 0.57 | 改善   | 変化無し |
| 症例3.      | VAS:2 0   |             | 0.49 0.66 | 改善   | 変化無し |
| 症例4 (1回目) | VAS:6 3   | 判定不可        | 判定不可      | 改善   | 変化無し |
| (2回目)     | VAS:3 1   | 判定不可        | 判定不可      | 改善   | 変化無し |
| 症例5.      | VAS:10 10 |             | 実施せず      | 施行せず | 施行せず |

右下肢切断

比較して高値を示した(図4)。しかし, 移植3ヵ月以降の評価では移植肢と非移植肢での皮膚温に違いは認めなかった。ABPIは移植後6ヵ月後の評価において, 移植前より高値を示した。

細胞移植前の指尖光電脈波測定では, 検査を実施した4例中3例で虚血肢の脈波は検出できず高度の虚血の存在が示唆された(図2, 図4)。移植1ヵ月後より移植肢において脈波が検出され, 移植3~6ヵ月後の時点でも検出できた。両手に同時に細胞移植を実施した症例4において, 左手では移植1ヵ月後より脈波が明確に検出された。一方, 右手においては1回目の移植後には移植3ヵ月後の時点でも脈波の出現は認めなかった(図3)。血管造影検査所見は細胞移植前後で明らかな変化を認めな

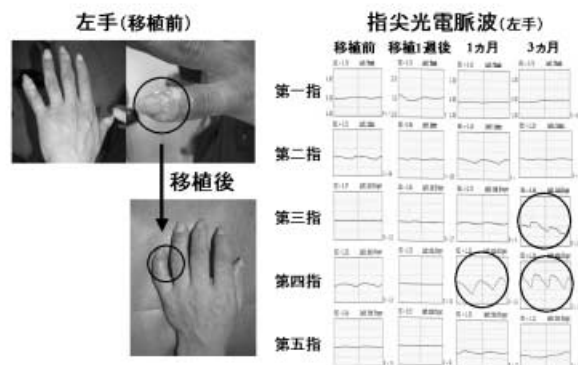


図2. 症例4の左手皮膚潰瘍所見および指尖光電脈波検査. 細胞移植前には左手第五指に皮膚潰瘍を認めたが, 移植1ヵ月後の時点で潰瘍は治癒した。指尖光電脈波において移植前には脈波が検出できなかった左手第三指, 第四指の脈波が, 移植1ヵ月後の時点から明瞭に検出された。

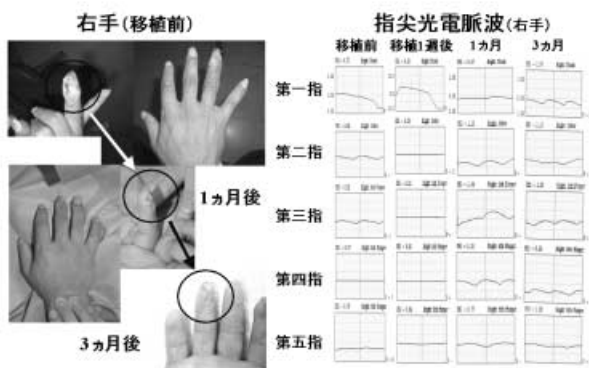


図3. 症例4の右手皮膚潰瘍所見および指尖光電脈波検査. 細胞移植前には右手第四指に皮膚潰瘍を認めた。細胞移植後に潰瘍は治癒傾向を示したが, 移植3ヵ月後の時点で潰瘍は再度増悪した。指尖光電脈波において右手第一指から第五指にかけての脈波検出困難であり, 移植後も新たな脈波の出現は認めなかった。

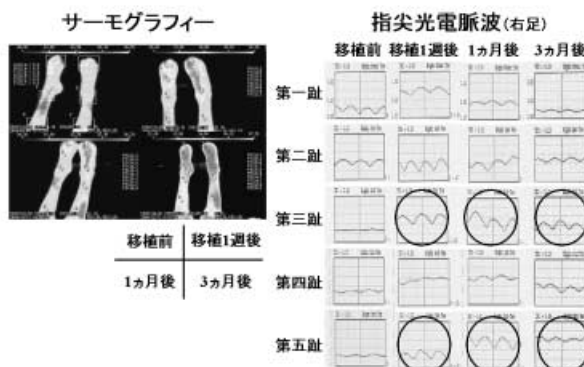


図4. 症例1のサーモグラフィおよび指尖光電脈波検査所見. 細胞移植を実施した右下肢において皮膚温上昇を細胞移植1週間より認めたが, 3ヵ月後には左右差は消失した。指尖光電脈波検査では, 移植前には右足第三趾, 第五趾の脈波は検出されなかった。移植1週後の時点から右足第三趾, 第五趾に明瞭な脈波が検出された。3ヵ月後の評価でも脈波は検出できており, 細胞移植の効果持続が示唆された。

かった。

細胞移植に伴うと考えられる有害事象の出現は認めなかった。細胞移植後に一過性のCRP上昇を認めたが、全例が2週間以内に陰転化した。

## 考 察

今回、重症末梢動脈閉塞症5症例に対し末梢血単核球細胞移植を行い、4症例において自覚症状の改善を認めた。両上肢に難治性潰瘍を有したバージャー病症例においては3ヵ月間に2回の細胞移植を実施し潰瘍は治癒した。細胞移植を実施した症例は全例が重度の虚血症状を有する症例であり、症状が進行すると難治性潰瘍形成ひいては虚血肢切断を余儀なくされることが予想されていた。このような重症の末梢動脈閉塞症例に対しては、海外では血管新生因子である VEGF (vascular endothelial growth factor) 遺伝子や FGF (fibroblast growth factor) 遺伝子による血管新生治療の臨床応用が進められてきた<sup>5)</sup>。しかしながらウイルスベクターを用いることに対する懸念が以前から指摘されており、日本においては普及しにくいのが実情である。骨髄単核球細胞を用いた血管新生治療の有効性が2002年に報告されてから、骨髄単核球細胞を用いた細胞移植治療が末梢動脈閉塞症症例に対して行われている<sup>4)</sup>。しかしながら、骨髄単核球細胞を用いる場合、全身麻酔下で約500mlの骨髄液採取が必要で侵襲が大きい。一方、末梢単核球細胞は採取が低侵襲かつ比較的容易に行うことができる。末梢動脈閉塞症例に対する末梢血単核球細胞移植治療については2002年より日本の施設から報告されており<sup>6,8)</sup>、細胞採取方法に関して若干の違いを認めるが、虚血に伴う症状の改善効果を認めている。今回の結果をふまえると、末梢血単核球細胞移植は虚血症状の改善に有効であると考えられる。

一方、客観的な指標の中で細胞移植前後に変化したのは、ABPI および指尖光電脈波のみであった。骨髄単核球細胞移植に関する報告では下肢安静時酸素分圧、ABPIの増加に加えて血管造影における側副血行路の増加を認めている<sup>4)</sup>。しかし今回の検討では移植前後における血管造影所見の明らかな変化は認めなかった。ABPIに関しては測定可能であった症例においては増加傾向を認めたが、高度動脈硬化病変におけるABPIは過大評価されることが知られており、客観的指標として使いづらい。指尖光電脈波は皮膚、皮下組織に分布する微小血管の容積変化を評価するものである。今回の検討では、自覚症

状の改善を認めた4症例中3症例においては細胞移植前には認めなかった脈波の出現が移植後確認された。また両手指に難治性皮膚潰瘍を有したバージャー病症例の場合、1回目の細胞移植において皮膚潰瘍が治癒した左手においては移植後に脈波出現を認めたが、潰瘍が移植後悪化した右手に関しては、1回目の移植後には脈波の出現は認めなかった。以上の結果をふまえると、現時点では指尖光電脈波検査が治療効果を最も鋭敏に反映しているものと考えられた。

細胞移植治療の作用機序に関しては未だに不明な点が多い。骨髄単核球細胞移植における血管新生の機序としては、骨髄単核球に含まれる血管内皮前駆細胞によるものと、他の造血系細胞からの血管新生因子の放出によるものが想定されている。末梢血単核球細胞に含まれる血管内皮前駆細胞の割合は非常に少なく、今回の検討でも採取した単核球細胞中のCD34陽性細胞は0.1%未満と非常に少なかった。一方、移植細胞成分中の総単核細胞数やCD34陽性細胞数と臨床効果には相関がないとの報告もあり<sup>8)</sup>、作用機序に関しては今後更なる検討が必要である。

血管新生は糖尿病性網膜症や悪性腫瘍の進行に関与することが知られており<sup>9)</sup>、細胞移植はこれらの病的な血管新生も惹起すると懸念されていた。しかしながら現時点では、糖尿病性網膜症の増悪や悪性腫瘍の出現などの報告はなく、本検討でも有害事象に該当するイベントは認めなかった。以上より、長期成績を含めた有効性・安全性の更なる検討が必要であるが、末梢血単核球細胞移植は重症末梢動脈閉塞症に対して、低侵襲かつ有効な血管新生治療となる可能性があると考えられた。

## 文 献

1. Dormandy, J. A., Rutherford, R. B.: Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). J. Vasc. Surg., 31: S1-S296, 2000
2. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., *et al.*: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science., 275: 964-7, 1997
3. Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., *et al.*: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. Circ.

- Res., 85 : 221 8 , 1999
- 4 . Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., *et al.*: 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 35 , 2002
  - 5 . Losordo, D. W., Dimmeler, S.: Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I : angiogenic cytokines. *Circulation.*, 109 : 2487 91 ,2004
  - 6 . Minamino, T., Toko, H., Tateno, K., Nagai, T., *et al.* : Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet.*, 360 : 2083 4 , 2004
  - 7 . Kawamura, A., Horie, T., Tsuda, I., Ikeda, A., *et al.* : Prevention of limb amputation in patients with limbs ulcers by autologous peripheral blood mononuclear cell implantation. *Ther. Apher. Dial.*, 9 : 59 63 ,2005
  - 8 . Tateno, K., Minamino, T., Toko, H., Akazawa, H., *et al.*: Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ. Res.*, 98 : 1194 202 , 2006
  - 9 . Carmeliet, P. : Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.*, 9 : 653 60 , 2003

### ***Peripheral blood-derived mononuclear cell implantation for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral arterial disease***

***Takashi Iwase<sup>1)</sup>, Hirotsugu Kurobe<sup>2)</sup>, Shusuke Yagi<sup>1)</sup>, Tomoko Hara<sup>1)</sup>, Masahito Choraku<sup>1)</sup>, Mitsunori Fujimura<sup>1)</sup>, Shuji Ozaki<sup>1)</sup>, Masashi Akaike<sup>1)</sup>, Masahiro Abe<sup>1)</sup>, Yutaka Masuda<sup>2)</sup>, Hiroyuki Azuma<sup>1)</sup>, Toshio Matsumoto<sup>1)</sup>, and Tetsuya Kitagawa<sup>2)</sup>***

*<sup>1)</sup>Department of Medicine and Bioregulatory Sciences, and <sup>2)</sup>Department of Cardiovascular Surgery, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan*

#### **SUMMARY**

Earlier studies have shown that bone marrow-derived mononuclear cell ( BM-MNC ) implantation induces therapeutic angiogenesis in patients with peripheral arterial disease ( PAD ) However, the invasiveness of bone marrow collection limits clinical application of BM-MNC implantation. We performed peripheral blood-derived mononuclear cell ( PB-MNC ) implantation in ischemic limbs of five patients with PAD. After implantation, clinical symptoms such as rest pain and numbness were relieved in four patients. Maximal walking distance markedly increased from 160 m to 915 m in one patient. Non-healing ulcers were cured after repeated cell implantation in one patient with Burger disease. There was no adverse event. These findings suggest that PB-MNC implantation is a safe and noninvasive strategy for therapeutic angiogenesis for the treatment of severe PAD.

Key words : peripheral arterial disease, mononuclear cell, cell therapy, therapeutic angiogenesis