

細胞移植による虚血性心疾患の血管新生療法の開発に関する研究

所属機関 自治医科大学 循環器内科  
研究者名 山本 啓二

## 《研究の概要》

細胞移植による虚血性心疾患の血管新生療法の開発に関する研究については、最近、成人骨髄細胞の単核球分画に内皮前駆細胞が存在し、さらにこの細胞が虚血領域の血管新生部位に有意に組み込まれることが明らかにされている。このことから、骨髄細胞をヒトの虚血心筋へと移植して治療する試みが、米国やドイツを中心としてすでに開始されている。しかし、ヒトを含めた霊長類において移植された骨髄細胞がどのようにして血流を改善させるのか、移植細胞の運命がどうなるか、さらには安全性などについても、いまだ十分な検討がなされていない。そこで、本研究では、虚血性心疾患に骨髄細胞移植療法を応用するためのサルを用いた前臨床試験を行い、霊長類における機序および安全性の検討を行うことを目的とした。カニクイザルの骨髄細胞から CD34<sup>+</sup>細胞を単離して、レンチウイルスベクターを用いてマーカー遺伝子である GFP を遺伝子導入することにより標識した。カニクイザル冠動脈左前下行枝を結紮して心筋梗塞モデルを作製し、GFP で標識した CD34<sup>+</sup>細胞を虚血境界領域に移植した。2 週間後の虚血境界領域血流量および心機能とも生理食塩水を投与したコントロール群に比較して細胞移植群で有意に改善していた。また、免疫組織染色法により細胞移植群では毛細血管数が有意に増加していることが明らかとなったが、GFP に対する免疫染色および *in situ* PCR 法によるプロウイルス陽性細胞の解析では血管内皮細胞に分化したと考えられる移植細胞はわずかであり、また心筋へと分化したと考えられる移植細胞は認められなかった。さらに、虚血境界領域心筋における VEGF 濃度を測定したところ、細胞移植群で有意な高値を示した。以上の結果から、霊長類心筋梗塞モデルにおいて、虚血境界領域への自己骨髄 CD34<sup>+</sup>細胞移植により局所毛細血管数および血流量が増加し、心機能も改善した。この機序として、移植局所で分泌される VEGF を介した血管新生が主であり、移植細胞からの血管への分化の寄与は少ないことが示唆された。

山本 啓二	自治医科大学 医学部 循環器内科講師	研究計画の立案・総括
池田 宇一	信州大学大学院医学研究科 臓器発生制御医学教授	研究計画の立案・総括
村上 義昭	自治医科大学 医学部 循環器内科助手	心機能の解析
三澤 吉雄	自治医科大学 医学部 心臓血管外科教授	心筋梗塞の作成
伊藤 孝幸	自治医科大学 医学部 循環器内科大学院生	血管新生の解析
青木 弘貴	自治医科大学 医学部 循環器内科大学院生	移植細胞の調整

## 研究報告

### I. 研究目的

1997年に浅原らによって、成人末梢血の単核球分画に血管内皮細胞に分化しうる内皮前駆細胞が存在することが報告された。さらに、この細胞は骨髄細胞中により多く存在していることや、虚血動物モデルにおいて血管新生部位に有意に組み込まれて血管新生に寄与することが報告された。これらの報告により、成人における新生血管においても、血管内皮前駆細胞の取り込みという胎生期にみられるような血管発生型の血管新生機序が存在していることが明らかとなった。また、血管新生のもう一つの機序として、骨髄の間葉系細胞や造血幹細胞は、血管新生を誘導するさまざまなサイトカインや増殖因子を分泌するため、これらがパラクライン的に血管新生に効いている可能性も示されている。

そこで我々は、下肢切断を余儀なくされる重症末梢動脈疾患患者を対象として“自己骨髄細胞移植による血管新生療法”を国内のいくつかの施設と共同で開始し、治療効果および安全性ともに良好な結果を得ている（TACT-1 臨床試験：Lancet 360：427-435、2002）。さらに、虚血性心疾患への応用が米国やドイツを中心として始まっているが、ヒトを含めた霊長類において移植された骨髄細胞がどのように血流を改善しているか、移植細胞の運命がどうなるか、さらには安全性などについても、いまだ十分な検討がなされていない。そこで、本研究では、虚血性心疾患に骨髄細胞移植療法を応用するためのサルを用いた前臨床試験を行い、霊長類における機序および安全性の検討を行うことを目的とした。

### II. 研究計画および材料と方法

#### 1. 骨髄採取および CD34<sup>+</sup>細胞の分離

筑波霊長類センターで飼育された8匹のカニクイザルを用いた。イソフルランによる全身麻酔下に、骨髄を腸骨より50ml採取し、ACKバッファーにより赤血球を溶血した。有核細胞分画から、磁気ビーズ法によりCD34<sup>+</sup>細胞を分離した。本法によるCD34<sup>+</sup>細胞の純度は、フローサイトメトリー法により90-95%であることを確認した。

## 2. レンチウイルスベクターによる GFP 遺伝子導入

CD34<sup>+</sup>細胞 1x10<sup>6</sup> を 6 穴プレートで培養した。培養液は StemSpanSFEM (Stem Cell Technologies 社、カナダ) に TPO、SCF、Flt3L を各々100ng/ml となるように添加し、2ml/穴とした。CMV プロモーター下に GFP を発現するレンチウイルスベクターを MOI 50 で 12 時間毎に加え、合計 24 時間遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、一部の細胞をフローサイトメトリー法による遺伝子導入効率の検討や、*in vitro*での内皮細胞への分化実験に用い、残りの細胞はプログラムフリーザー (Kryo10 ; Planer Biomed 社、英国) で凍結保存した。

## 3. CD34<sup>+</sup>細胞の内皮細胞への分化実験

遺伝子導入後の CD34<sup>+</sup>細胞が内皮細胞への分化能を持つことを、*in vitro*で確認した。細胞はファイブロネクチンをコーティングしたプレートで、20%ウシ胎児血清と 25 μg/ml ウシ脳下垂体抽出物 (Invitrogen 社) を添加した M199 培地を用いて培養した。培養 7 日後に、アセチル化 LDL の取り込み能、vWF の発現を検討した。アセチル化 LDL の取り込み能に関しては、1 μg/ml の DiI ラベルされたアセチル化 LDL (Molecular Probes 社、米国) を培養上清に添加し、37°C で 4 時間培養した。vWF の発現に関しては、免疫細胞染色で評価した。まず、4%パラフォルムアルデヒドで 10 分間固定した後、抗ヒト vWF 抗体 (DakoCytomation 社、デンマーク) を室温で 1 時間反応させた。次に、テキサスレッドで標識された二次抗体 (Vector Laboratories 社、米国) を 1 時間反応させた。

## 4. 心筋梗塞モデルの作製と細胞移植

カニクイザルに対し、イソフルランによる全身麻酔下に正中切開法で開胸し、心膜を切開した後、左前下行枝を 5-0 prolene 糸で結紮した。心エコーの評価を含む 1-2 時間の経過観察後、GFP 遺伝子導入 CD34<sup>+</sup>細胞を解凍し (細胞生存度は 53.0±6.5%)、27 ゲージ針で 10 カ所に 5 μl ずつ心筋虚血境界領域に注入した。コントロールには、生理食塩水を注入した。処置を受けたカニクイザルは心電図モニター管理とし、食欲が戻るまで補液を行い、鎮痛剤としてブトルファノールを 5 日間投与した。

## 5. 心エコー法による心機能測定

Sonos 5500 system (Philips Medical Systems 社、米国) を用いた。心機能は胸骨左縁短軸像乳頭筋レベルでの左室短縮率 (%FS) で評価し、細胞移植直前と移植 2 週間後に施行した。ただし、12 週間観察した BM97080 は、12 週間後も評価を行った。

心筋コントラストエコーは、S12 プローブを用い、心収縮末期同期の間欠送信法で行った (Depth 4cm、mechanical index 0.9、focus 3cm)。コントラスト剤は、perflutren (山之内製薬、東京) を生理食塩水で 10 倍希釈し、0.01ml/kg/min の一定速度で静脈内投与した。細胞移植直前には、虚血リスク領域に違いがないことを確認する目的で、4 : 1 の間欠送信時に得られた画像での血流欠損面積を比較した。血流欠損面積は、NIH image(ver. a. 61) を用いて定量化した。細胞移植 2 週間後 (BM97080 は 12 週間後) には、心筋局所における血流量を、ORIGIN 6.0J (Lightstone 社、東京) を用いて評価した。この際、虚血境界領域の血流量を非虚血領域の血流量に対する比で示した。

## 6. マイクロスフェア法による心筋局所血流量の測定

局所血流量評価の第二の方法として、マイクロスフェア法を用いた。細胞移植 2 週間後 (BM97080 は 12 週間後) に、 $2 \times 10^6$  個のマイクロスフェア (直径  $15 \mu\text{m}$ ; E-Z Trac 社、米国) を 2ml の生理食塩水に懸濁し、左室内に 30 秒かけて注入した。その後、生理食塩水で還流し、心臓を採取した。組織は、梗塞領域、虚血境界領域、非虚血領域に分離した。各々の組織からマイクロスフェアを回収し、単位組織重量あたりの数を数えることにより局所血流量を求めた。この際、虚血境界領域の血流量を非虚血領域の血流量に対する比で示した。

## 7. 免疫組織染色法

組織は、OCT コンパウンドで包埋し、液体窒素で急速凍結した。切片は  $6 \mu\text{m}$  厚とし、4% パラフォルムアルデヒドで固定後、1% ウシ血清アルブミンで二次抗体の非特異的結合を阻害し、3% 過酸化水素溶液で内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行った。200 倍希釈の抗 CD31 抗体 (Beckton Dickinson 社、米国)、あるいは 1000 倍希釈の抗 TroponinI 抗体 (Biogenesis 社、英国) を室温で 1 時間反応させた。ビオチン標識二次抗体を 1 時間反応させた後、ABC 法 (ABC AP kit; Vector Laboratories 社) により反応を増幅させ、Vector Red substrate kit (SK-5100; Vector Laboratories 社) を用いて赤く、あるいは DAB を用いて茶色に染色した。GFP との二重染色では、さらに 200 倍希釈の抗 GFP 抗体 (Clontech 社、米国) を室温で 1 時間、ビオチン標識二次抗体を室温で 1 時間、ABC 法 (ABC Elite kit; Vector Laboratories 社) による増幅を 1 時間行い、Vector SG substrate kit (SK-4700; Vector Laboratories 社) で黒く染色した。ヘマトキシリンによる核染色を行い、グリセロールで封入した。

## 8. *In situ* PCR 法

移植細胞を同定する第二の方法として、*in situ* PCR 法を用いた。使用した GFP プライマーは、5'-CGT CCA GGA GCG CAC CAT CTT C-3'、および 5'-GGT CTT TGC TCA GGG CGG ACT-3' で、 $420 \mu\text{M}$  dATP、 $420 \mu\text{M}$  dCTP、 $420 \mu\text{M}$  dGTP、 $378 \mu\text{M}$  dTTP、 $42 \mu\text{M}$  ジゴキシゲニン標識 dUTP (Roche 社、ドイツ)、 $0.8 \mu\text{M}$  GFP プライマー、 $4.5 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、1xPCR バッファー ( $\text{Mg}^{2+}$  free)、4U Taq DNA ポリメラーゼ (Takara 社、東京) の PCR 反応液を、専用の枠 (slide frame; Takara 社) で囲った心筋組織切片に載せた。PCR 反応は、PTC100 thermal cycler (MJ research 社、米国) を用い、 $94^\circ\text{C}$  1 分、 $57^\circ\text{C}$  1 分、を 10 サイクル行った。*In situ* で増幅されたジゴキシゲニンを含む PCR 産物は、HRP 標識ウサギ F (ab') 抗ジゴキシゲニン抗体 (DakoCytomation 社) と反応後、Vector SG substrate kit で発色させた。最後に、ヘマトキシリン溶液で核染色を行い、グリセロールで封入した。

## 9. ELISA 法

組織中の VEGF、bFGF の発現量は、ELISA (R&D systems 社、米国) により測定した。心筋組織を均質化し、 $10 \text{mM}$  Tris-HCl (pH 8.0)、1% Nonidet P-40、 $150 \text{mM}$  NaCl、protease inhibitor cocktail tablets (Complete Mini; Roche 社) を含む溶解バッファーに懸濁し、 $4^\circ\text{C}$  にて 20 分間振動後、 $4^\circ\text{C}$  で 30 分間 16000 回転の遠心を加えて、その上清を ELISA に用

いた。この際、タンパク濃度は、DC Protein Assay (Bio-Rad 社、米国) を用いて測定した。

### III. 研究成果

#### 1. レンチウイルスによる遺伝子導入と *in vitro* での内皮細胞への分化

カニクイザル自己骨髄 CD34<sup>+</sup>細胞への遺伝子導入効率、平均で 41%であった (表)。

	性別	年齢 (歳)	体重 (kg)	移植細胞数	%GFP	
					分化前	分化後
CTR01061	M	3	4.1			
CTR99056	M	3	3.4			
CTR96116	F	5	3.2			
CTR99051	M	5	5.9			
BM01052	M	3	3.9	0.47 x 10 <sup>6</sup>	49	87
BM01051	M	3	4.1	2.20 x 10 <sup>6</sup>	51	54
BM97080	M	5	3.9	1.04 x 10 <sup>6</sup>	49	67
BM90047	M	13	5.8	1.07 x 10 <sup>6</sup>	16	14
平均		5	4.3	1.20 x 10 <sup>6</sup>	41%	56%

表. 移植細胞数と遺伝子導入効率

CTR: 生食群、BM: CD34<sup>+</sup>細胞群、分化前: 遺伝子導入 48 時間後、分化後: 血管内皮細胞への分化後

遺伝子導入 CD34<sup>+</sup>細胞の培養実験では、培養 7 日後にネットワーク形成を示す紡錘形の細胞へと分化し (図 1A)、アセチル化 LDL の取り込み能を有し (図 1B)、免疫組織染色では vWF 陽性である (図 1C) ことが示され、内皮細胞に分化したことが示唆された。内皮細胞への分化後の GFP 陽性率は 56%であった (表)。

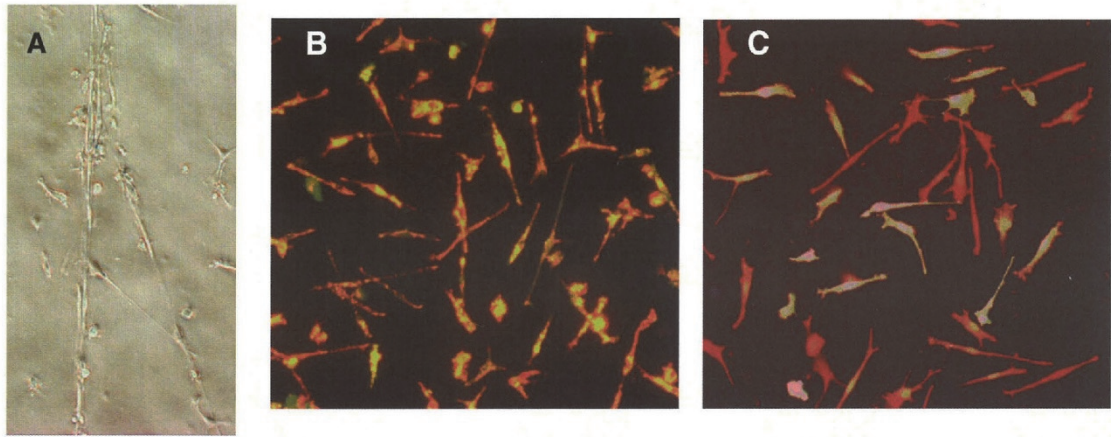


図 1. GFP 遺伝子導入後における骨髄 CD34<sup>+</sup>細胞の内皮細胞への分化

遺伝子導入後の CD34<sup>+</sup>細胞をファイブロネクチン上で内皮分化培地にて 7 日間培養した。

(A) ネットワーク形成

(B) DiI-アセチル化 LDL 取り込み能 (緑 GFP、赤 アセチル化 LDL)

(C) vWF に対する免疫組織染色 (緑 GFP、赤 vWF)

## 2. カニクイザル心筋梗塞モデルにおける CD34<sup>+</sup>細胞移植の効果

冠動脈結紮後に心筋コントラストエコーを用いて血流欠損面積を測定した結果、細胞移植群で  $13.0 \pm 2.1\%$ 、生食群で  $12.3 \pm 3.5\%$  ( $p=0.75$ ) であり、心筋梗塞モデルが両群で同等に作製されていることが確認できた。また、心筋梗塞作製 24 時間後の血清 CK 値も両群に差はなかった。

細胞移植群での平均移植細胞数は、 $1.20 \times 10^6$  個であった (表)。生食群の心筋梗塞モデルのうち 1 匹 (CTR01061) は、第 5 病日に心不全で死亡した。生食群 3 匹、細胞移植群 4 匹における、冠動脈結紮 2 週間後の心筋虚血境界領域の血流量は、心筋コントラストエコー法 (図 2A)、マイクロスフェア法 (図 2B) の両評価法で、細胞移植群で有意に多かった。また、両評価法での結果は、高い相関 (相関係数 0.93) がみられた。

一方、心機能に関しては、細胞移植前と移植 2 週後で比較した場合、生食群では 3 匹すべてで低下していたのに対し、細胞移植群では心室瘤を形成した 1 匹 (BM01051) を除いた他の 3 匹で改善していた (図 3)。

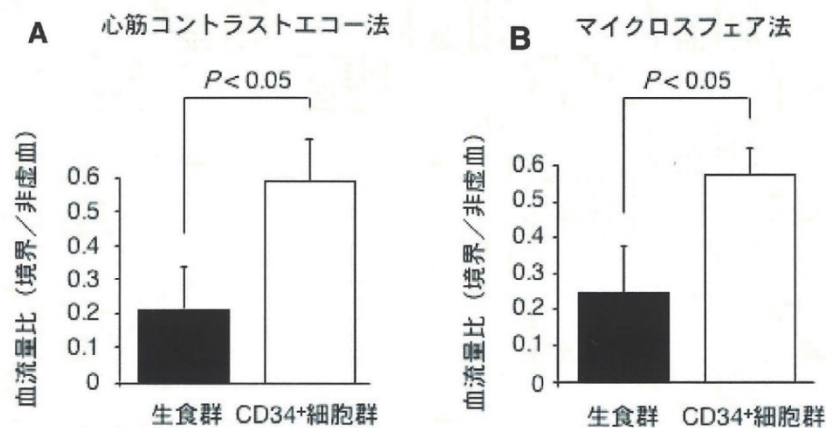


図 2. 骨髄 CD34<sup>+</sup>細胞移植による虚血境界領域血流の改善

心筋梗塞作製 2 週後における心筋血流量を心筋コントラストエコー法 (A)、マイクロスフェア法 (B) により評価した。非虚血領域に対する虚血境界領域の血流量比で示した。

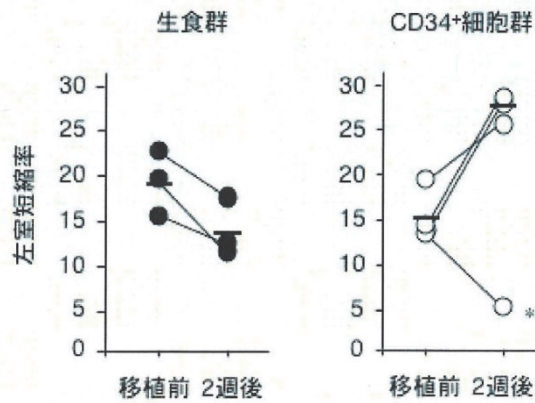


図 3. 骨髄 CD34<sup>+</sup>細胞移植による心機能の改善

心筋梗塞作製 2 週後における心機能を心エコーにより評価した。

\* : 心室瘤形成例 (BM01051)

### 3. 移植細胞の同定

はじめに、CD31 に対する免疫組織染色により毛細血管数を評価した結果、虚血境界領域では CD34<sup>+</sup>細胞群で有意に多いことが明らかになった (図 4)。

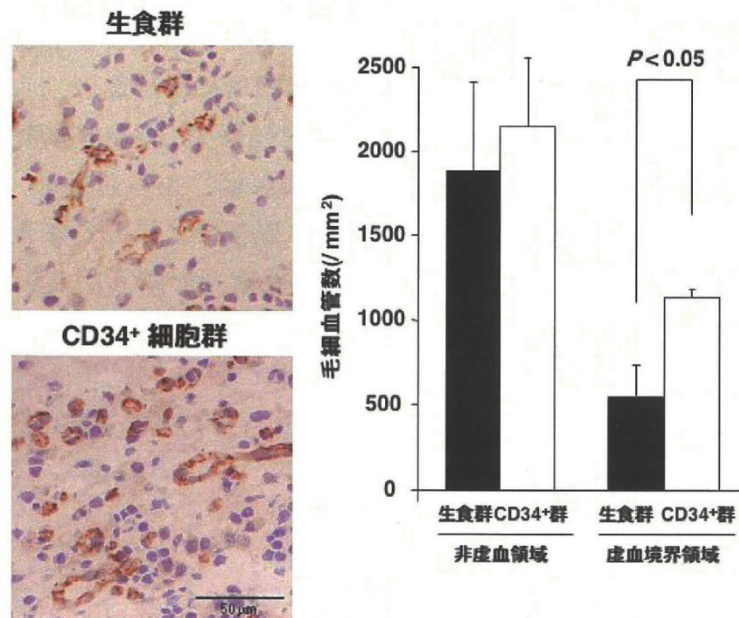


図 4. 骨髄 CD34<sup>+</sup>細胞移植による毛細血管数の増加

心筋梗塞作製 2 週後における心筋組織の毛細血管数を CD31 に対する免疫組織染色により評価した。

次に、移植 2 週間後における移植細胞の同定を、抗 GFP 抗体を用いた免疫組織染色により行った。同定された GFP 陽性細胞の数は、1 スライスあたり平均 1 つ以下であり非常に



少なかった。しかし、そのうちのいくつかは血管構造に取り込まれていることが、CD31 に対する免疫組織染色で明らかとなった（図 5）。

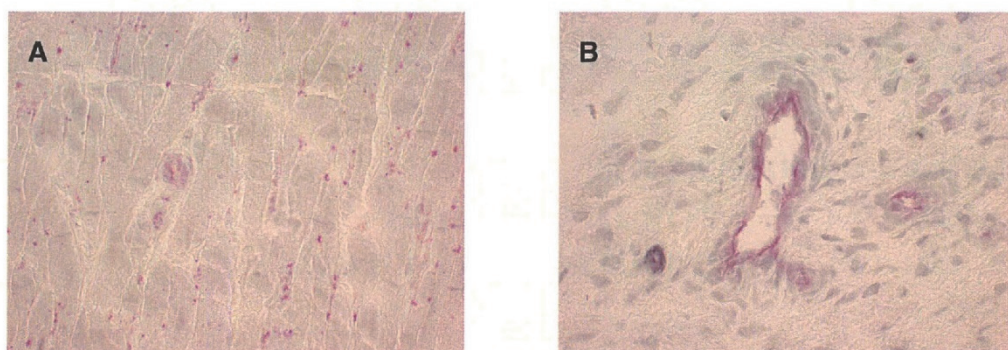


図 5. 免疫組織二重染色による移植細胞由来内皮細胞の同定

心筋梗塞作製 2 週後における心筋組織を抗 GFP 抗体（黒）、抗 CD31 抗体（紫）を用いて免疫組織二重染色した。生食群（A）、CD34<sup>+</sup>細胞群（B）

GFP 陽性細胞が少ない原因として、レンチウイルスベクターにより導入した GFP 遺伝子がサイレンシングを受けた可能性を考え、次にゲノム DNA に組み込まれたプロウイルスの同定を行った。プロウイルス陽性の細胞は、図 6A に示すように散見されたが、そのほとんどは血管構造に取り込まれておらず（図 6B）、血管内皮細胞に分化したと考えられたもの（図 7）はわずかであった。また、プロウイルス陽性の細胞は、連続切片での TroponinI に対する免疫染色で染まらず、心筋への分化は認められなかった（図 6C）。

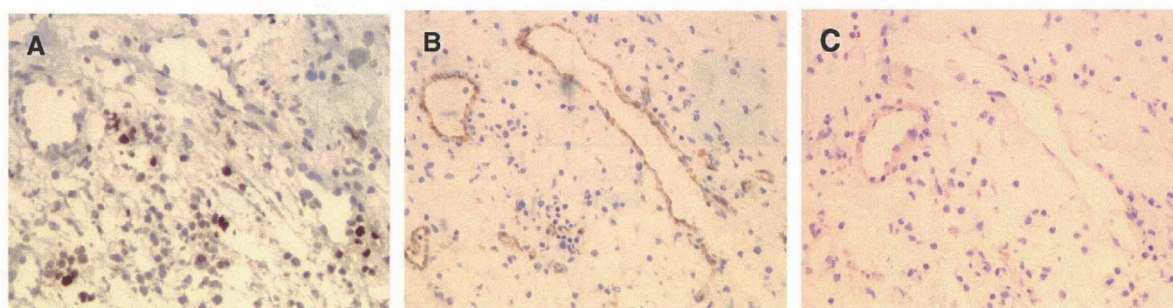


図 6. *in situ* PCR 法によるプロウイルス陽性細胞の同定と連続切片での免疫組織染色

- A. GFP プライマーを用いた *in situ* PCR（黒 プロウイルス陽性の核、青 プロウイルス陰性の核）
- B. CD31（茶）に対する免疫組織染色
- C. TroponinI（茶）に対する免疫組織染色（右上は同時に染色したポジティブコントロール）

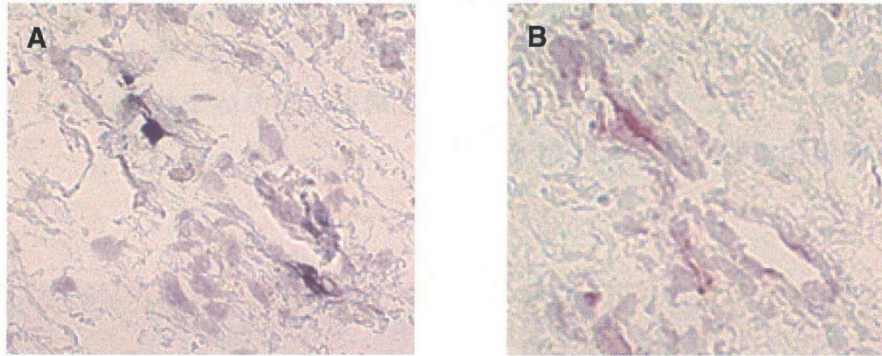


図 7. 移植細胞由来血管内皮細胞の同定

- A. GFP プライマーを用いた *in situ* PCR (黒)
- B. CD31 (赤) に対する免疫組織染色 (A との連続切片)

#### 4. CD34<sup>+</sup>細胞移植による VEGF 分泌の増加

*in vitro*での CD34<sup>+</sup>細胞から内皮細胞への分化実験で、48 時間後の培養上清を ELISA で解析すると、高濃度の VEGF が分泌されていることが明らかとなった。そこで、心筋組織（虚血境界領域）から抽出した可溶化産物中の VEGF 濃度を ELISA で測定すると、CD34<sup>+</sup>細胞群では生食群と比較し有意に高値であった。一方、bFGF の濃度には差がなかった(図 8)。

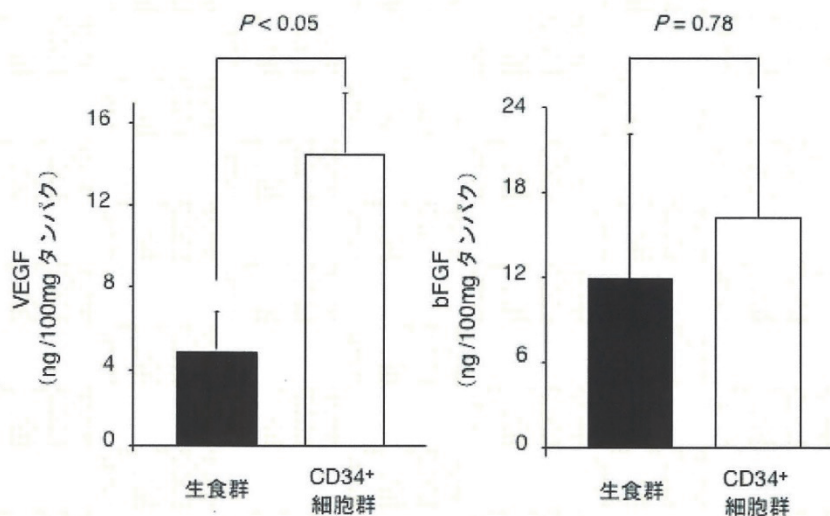


図 8. VEGF の発現増加

心筋組織（虚血境界領域）から抽出した可溶化産物中の VEGF 濃度を ELISA で測定した。

#### IV. 考察

本研究で得られた主な知見は、以下である。

1. カニクイザル心筋梗塞モデルにおいて、虚血境界領域への自己骨髄 CD34<sup>+</sup>細胞の直接注入により、局所血流と心機能が改善した。
2. その機序としては、移植した細胞から分泌される VEGF を介した血管新生が主であり、血管内皮細胞への分化はわずかであった。

本研究で用いたレンチウイルスベクターの特徴は、第一に非分裂細胞にも遺伝子が導入可能で、遺伝子導入に要する期間 (*ex vivo* で培養する期間) が短いこと、すなわち幹細胞に対しても遺伝子導入が可能で、その未分化性を損なうことを最小限に抑えることが出来ることである。第二には、ゲノムに遺伝子が組み込まれるため、長期に遺伝子の発現が持続されることである。*In vitro* での検討で、CD34<sup>+</sup>細胞はレンチウイルスベクターを用いた GFP 遺伝子導入後にも内皮細胞への分化能を保持していること、また内皮細胞への分化後にも GFP 陽性率は維持されていることが確認できた。このような *in vitro* の結果は、レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入された CD34<sup>+</sup>細胞を *in vivo* に用い、移植後の運命を追跡する系として有用であることを意味していると考えられた。

移植 2 週間後の組織評価により、血管内皮に分化した移植細胞はわずかであり、また心筋には分化していないと考えられた。GFP 遺伝子のサイレンシングの可能性については、心筋組織に存在する移植細胞のゲノムに組み込まれたプロウイルスを *in situ* PCR 法を用いて検出したが、同様の結果であった。また、異種蛋白である GFP が免疫的に排除された可能性については、文献的に 2 週間では起こりにくいことが示唆されている。一方、2 週間という観察期間については、げっ歯類を用いた骨髄幹細胞から心筋細胞や血管内皮細胞への分化実験が 10 日間から 2 週間で行われていたことと、サイレンシングや免疫学的排除が起こりうることを考慮して、2 週間という期間を選択した。なお、n=1 ながら 12 週間の経過を追ったモデルでは、心筋組織には GFP 陽性の移植細胞は存在しなかった (心筋組織から抽出した DNA を用いた PCR 法による) ことより、移植細胞は長期に生存し得ず、2 週間での評価は妥当であったと考えた。

本研究では、血管内皮前駆細胞や造血幹細胞を含むとされる骨髄 CD34<sup>+</sup>細胞が、血管内皮細胞や心筋細胞へ分化することはわずかであったが、移植細胞から分泌される増殖因子により心筋局所血流が増加し、心機能が改善することが示唆された。また、サル の 症 例 数 が 少 ない ながら も、その有効性と安全性を確認することができた。以上の成果をもとに、自治医科大学附属病院及び信州大学医学部附属病院においてヒト臨床試験を実施する予定である。

## V. 研究成果の発表

1. K. Matusi, U. Ikeda, Y. Murakami, T. Yoshioka, K. Muroi, H. Kasuda, M. Shimpo, M. Takahashi, H. Toei, O. Kamisawa, K. Takeuchi, K. Ozawa, K. Shimada. Therapeutic angiogenesis by transplantation of autologous bone marrow and peripheral blood mononuclear cells in patients with peripheral arterial disease. *Int J Angiol* 12: 155-161, 2003
2. T. Eisawa, Y. Murakami, K. Matsui, M. Takahashi, K. Muroi, K. M. Amemiya, R. Takano, E. Kusano, Shimada, U. Ikeda. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in hemodialysis patients. *Curr Med Res Opin* 19: 627-633, 2003
3. T. Eizawa, U. Ikeda, Y. Murakami, K. Matsui, T. Yoshioka, C. Suzuki, M. Takahashi, K. Muroi, O. Kamisawa, K. Fuse, K. Shimada. Increase in circulating

endothelial progenitor cells after aortic aneurysm repair. *Heart Vessels* 19: 107-110, 2004

4. T. Eisawa, U. Ikeda, Y. Murakami, K. Matsui, T. Yoshioka, M. Takahashi, K. Muroi, K. Shimada. Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *Heart* 90: 685-686, 2004
5. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, Hanazono Y. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells* 23: 355-64, 2005