

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007年度 ～ 2008年度  
 課題番号：19790530  
 研究課題名 (和文)  
 エリスロポエチンの血管内皮前駆細胞動員作用を用いた新たな血管新生療法の開発  
 研究課題名 (英文)  
 Erythropoietin administration with autologous blood donation  
 - a novel strategy to enhance mobilization of circulating progenitor cells  
 研究代表者 岩瀬 俊 (IWASE TAKASHI)  
 徳島大学医学部・歯学部附属病院 助教  
 研究者番号：10403718

## 研究成果の概要：

成人末梢血中に血管内皮前駆細胞が存在し、新たな血管の形成 (血管新生) に寄与することが知られている。赤血球増殖に関与するサイトカインであるエリスロポエチンの末梢血中への血管内皮前駆細胞増加 (動員) 作用に注目し、新たな血管新生治療への応用を検討した。自己貯血にエリスロポエチン投与を併用することにより、白血球増加や貧血の出現無しに末梢血中に血管内皮前駆細胞が動員された。またエリスロポエチンを併用した末梢血単核球細胞移植を行ったところ、末梢動脈閉塞症による重症虚血肢症状が改善した。エリスロポエチンを併用することにより細胞治療の血管新生作用を増強する可能性がある。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：循環器・高血圧、再生医学、トランスレーショナルリサーチ、臨床

## 1. 研究開始当初の背景

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、パージャー病) 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。1997年に Asahara らが成人末梢血中における血管内

皮前駆細胞の存在を報告してから、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 (Asahara T. et al. Science 1997;275:964-7)。臨床においても骨髄単核球細胞移植による血管新生療法が主に末梢動脈閉塞症症例に対して既に行われ有効と報告されている (Tateishi-Yuyama E. et al. Lancet 2002;360:427-35)。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

さい。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。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。末梢血単核球細胞を用いた細胞治療も末梢動脈閉塞症例に対して行われ、有効であると報告されている。

末梢血単核球細胞を用いた細胞移植を行う際には、血管内皮前駆細胞を末梢血中に動員するために顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を用いることが多い。しかしながらG-CSFを用いた際に心血管合併症を発症したとの報告があり、G-CSF使用の是非に関しては結論が出ていない。すなわち単核球細胞を用いた血管再生治療において、安全かつ有効性の高い細胞採取法は確立されていない。

## 2. 研究の目的

エリスロポエチンは赤芽球から赤血球への分化を刺激するサイトカインであるが、エリスロポエチンが末梢血中への血管内皮前駆細胞の動員を促進することが近年報告された。またエリスロポエチン受容体が血管内皮前駆細胞上にも発現しており、Epoは血管内皮前駆細胞の機能を強化することも明らかとなった(Heeschen et al. Blood 2003;102:1340-1346, Bahlmann et al. Blood 2004;103:921-926)。エリスロポエチンは腎性貧血症例や自己貯血症例に対して広く臨床において用いられており、エリスロポエチンの血管内皮前駆細胞動員作用を利用することにより、安全かつ効果的な血管新生治療を実現する可能性が示唆される。本研究の目的はエリスロポエチンの血管内皮前駆細胞動員作用を用いた末梢血幹細胞移植による新たな血管新生療法の開発を行うことである。

## 3. 研究の方法

### (1) エリスロポエチンを用いた血管内皮前駆細胞の効果的な動員方法の検討

自己貯血が必要とされる循環器領域以外の手術症例を対象に、エリスロポエチン投与前後の血管内皮前駆細胞動員作用について検討した。

具体的には大腿骨頭置換術を施行するに際して自己著血ならびにエリスロポエチンの単回投与(24000単位)を行った20症例を対象に末梢血中CD34+, CD34+/CD133+陽性単核細胞数を自己著血前、著血1週間後、著血2週間後の時点でフローサイトメトリにより測定し比較検討した。更には貯血前後での白血球数や赤血

球数の推移ならびに炎症反応のマーカーとしてCRPの変動を調べた。また血管内皮前駆細胞アッセイにおける血管内皮前駆細胞コロニー数に関しても、自己貯血前並びに貯血後に検討を行った。

### (2) エリスロポエチン併用末梢単核球細胞移植の臨床効果の検討

既存の治療に抵抗性を示す重症虚血肢を伴う末梢動脈閉塞症例に対して、エリスロポエチン併用末梢単核球細胞移植を行い臨床効果ならびに安全性を検討した。

## 4. 研究成果

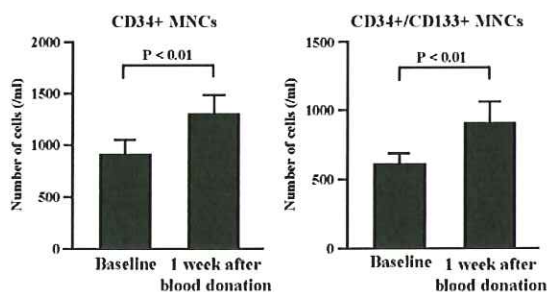
### (1) エリスロポエチンを用いた血管内皮前駆細胞の効果的な動員方法の検討

#### ① 対象症例

対象の内訳は19例が男性で、平均年齢は55±13歳。7例が高血圧を有し、5例に脂質異常症を認めたと、スタチン系薬剤を内服していなかった。喫煙歴を有する症例は認めなかった。20症例中7症例に対して自己貯血時にエリスロポエチン投与が行われた。

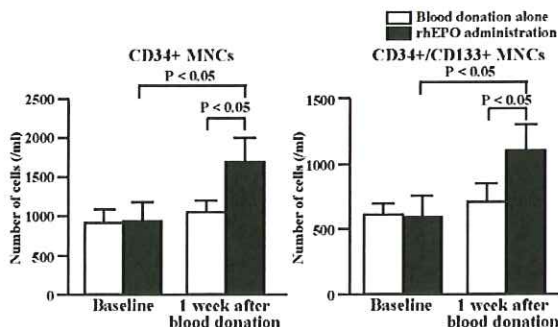
#### ② 末梢血中のCD34+, CD34+/CD133+陽性単核細胞の変動

貯血前と比較して貯血後1週間目の末梢血中CD34+, CD34+/CD133+陽性細胞数は有意に高値を示した(図1)。



(図1)

エリスロポエチン投与を行った症例においては、自己貯血単独と比較してより顕著に末梢血中CD34+, CD34+/CD133+陽性細胞数は増加した(図2)。

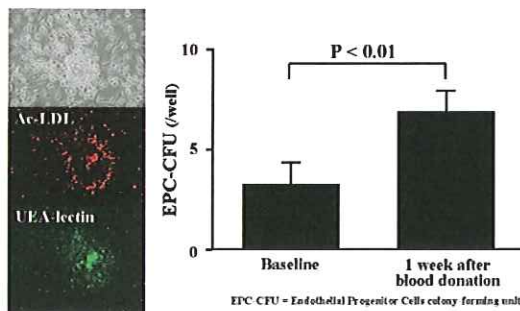


(図2)

一方、貯血後 2 週間の時点では末梢血中 CD34+, CD34+/CD133+陽性細胞数は貯血前と明らかな変化を認めなかった。

③ 血管内皮前駆細胞アッセイ

フィブロネクチンでコートした培養皿上で末梢血単核球細胞を 1 週間培養すると、紡錘型もしくは楕円形の接着細胞を認めた。これらの接着細胞はアセチル化 LDL を取り込むことおよびレクチンが付着することなどより血管内皮前駆細胞であると判断した。これらの接着細胞がコロニーを形成した数を定量的に評価したところ、貯血前と比較して貯血およびエリスロポエチン投与 1 週間後の時点では、有意に多数のコロニー形成が認められた (図 3)。



(図 3)

④ 自己貯血前後の赤血球、白血球数、炎症反応の変化

貯血前と比較して、貯血後 1 週間の時点で有意な赤血球数の減少、ヘモグロビン濃度の有意な低下を認めた。エリスロポエチン併用投与群では、赤血球数やヘモグロビン濃度は著変なく、白血球数や血小板数も貯血前後で有意な変化はなかった。また炎症反応のマーカである CRP は貯血前後で明らかな変化は認めなかった (表)。

	Baseline	After blood donation	P value
<b>All patients</b>			
Hemoglobin level (g/dl)	12.1 ± 1.4	10.8 ± 1.7	< 0.01
Erythrocyte count (× 10 <sup>9</sup> /μl)	4.0 ± 0.5	3.6 ± 0.4	< 0.01
Hematocrit level (%)	36.0 ± 3.6	32.9 ± 4.4	< 0.05
Leukocyte count (× 10 <sup>9</sup> /μl)	5.8 ± 1.1	6.0 ± 2.3	NS
Thrombocyte (× 10 <sup>9</sup> /μl)	302 ± 72	286 ± 83	NS
<b>Patients with rhEPO administration</b>			
Hemoglobin level (g/dl)	11.0 ± 0.7	10.0 ± 1.5	NS
Erythrocyte count (× 10 <sup>9</sup> /μl)	4.0 ± 0.6	3.6 ± 0.2	NS
Hematocrit level (%)	34.0 ± 2.4	31.4 ± 3.4	NS
Leukocyte count (× 10 <sup>9</sup> /μl)	6.0 ± 1.2	6.6 ± 1.2	NS
Thrombocyte (× 10 <sup>9</sup> /μl)	311 ± 107	321 ± 114	NS

(表)

(2) エリスロポエチン併用末梢単核球細胞移植の臨床効果の検討

既存治療抵抗性の重症末梢動脈閉塞症 4 症例に対して、エリスロポエチンを前投与した後、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。4 症例中 3 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。

(3) 考察並びに今後の展望

今回の検討において、明らかとなったのは以下の点である。1) 自己貯血にエリスロポエチン投与を併用することにより CD34+, CD34+/CD133+陽性細胞 (血管内皮及び血球系に分化する前駆細胞成分) が末梢血中に動員された, 2) 末梢血中への動員作用は自己貯血、エリスロポエチン投与 1 週間後が最も顕著であった, 3) エリスロポエチン投与による白血球数増加および炎症反応の出現は認めなかった。4) エリスロポエチンで前投与を行ったのちに末梢血単核球細胞移植を実施したところ、末梢動脈閉塞症における重症虚血肢症状が改善した。

現在、末梢動脈閉塞症に伴う重症虚血肢に対して末梢血単核球細胞移植が行われている。末梢血中の CD34 陽性細胞 (血管内皮前駆細胞成分が含まれると考えられている) の割合は骨髄中の 1/100 以下と非常に少ない。そのため多くの施設において顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) を用いられている。しかしながら G-CSF は白血球数を増加させ、炎症反応を誘導すると考えられている。実際、心筋梗塞などの心血管合併症を発症したとの報告があり、高齢化に伴い動脈硬化を基盤とした末梢動脈閉塞症が増加している現状においては G-CSF 使用の妥当性には疑問が投げかけられている。今回のように自己貯血にエリスロポエチンを併用することにより、白血球増加や炎症反応の誘導無しに血管内皮前駆細胞を末梢血中に動員することが可能となり、末梢血単核球細胞を用いた細胞治療における効果増強作用が期待される。実際、少数例での検討ではあるが、エリスロポエチン併用下で末梢血単核球細胞移植を行ったところ、臨床症状の改善を認めた。

今後は詳細な作用機序の解明や細胞移植の至適タイミングを検討することにより、より安全で効果的な血管新生治療の実現につながるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Aihara K, Azuma H, Akaike M, Kurobe H, Sumitomo Y, Yoshida S, Ise T, Iwase T, Ishikawa K, Sata M, Kitagawa T, Matsumoto T. Heparin Cofactor II Is an Independent Protective Factor Against Peripheral Arterial Disease in Elderly Subjects With Cardiovascular Risk Factors. *J Atheroscler Thromb* 2009 in press. 査読有
- 2) Ikeda Y, Aihara K, Yoshida S, Sato T, Yagi S, Iwase T, Sumitomo Y, Ise T, Ishikawa K, Azuma H, Akaike M, Kato S, Matsumoto T. Androgen-Androgen Receptor System Protects against Angiotensin II-Induced Vascular Remodeling. *Endocrinology* 150(6):2857-2864, 2009. 査読有
- 3) Yagi S, Akaike M, Fujimura M, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Ikeda Y, Iwase T, Aihara K, Azuma H, Kurushima A, Ichikawa Y, Kitagawa T, Kimura T, Nishiuchi T, Matsumoto T. Infective endocarditis caused by lactobacillus. *Intern Med* 47(12):1113-6, 2008. 査読有
- 4) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Sumitomo Y, Yoshida S, Ise T, Iwase T, Ishikawa K, Azuma H, Akaike M, Matsumoto T. Pitavastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Exerts eNOS-independent Protective Actions against Angiotensin II-Induced Cardiovascular Remodeling and Renal Insufficiency. *Circ Res* 102(1):68-76, 2008. 査読有
- 5) Aihara K, Azuma H, Akaike M, Ikeda Y, Sata M, Takamori N, Yagi S, Iwase T, Sumitomo Y, Sato T, Nakamichi Y, Yamamoto Y, Yoshimura K, Watanabe T, Nakamura T, Oomizu A, Tsukada M, Hayashi H, Sudo T, Kato S, Matsumoto T. Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II-deficient mice. *J Clin Invest* 117:1486-9, 2007. 査読有

[学会発表] (計 19件)

- 1) Iwase T, Kurobe H, Akaike M, Nakano S, Yoshida S, Sumitomo Y, Yagi S, Aihara K, Ozaki S, Abe M, Yasui N, Matsumoto T, Kitagawa T, Sata M. A Combination of Erythropoietin Administration with Autologous Blood Donation for Therapeutic Angiogenesis. 73<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Osaka, 2009. 3. 20-22.
- 2) Yoshida S, Aihara K, Ise T, Sumitomo Y, Yagi S, Iwase T, Kurahashi K, Endo I, Fujinaka Y, Akaike M, Sata M, Matsumoto T. :

- Dehydroepiandrosterone Sulfate is an Antivascular Remodeling Factor. 73<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Osaka, 2009. 3. 20-22.
- 3) Yagi S, Akaike M, Aihara K, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Ikeda Y, Iwase T, Soeki T, Matsumoto T, Sata M. Pitavastatin exerts eNOS-independent protective action against angiotensin II-induced atrial remodeling through attenuating Rac1-mediated oxidative stress. 73<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Osaka, 2009. 3. 20-22.
- 4) Sumitomo Y, Aihara K, Ise T, Yoshida S, Yagi S, Iwase T, Akaike M, Sata M, Matsumoto T. : Heparin Cofactor II-deficient Mice Exert Exacerbation of Angiotensin II-induced cardiac Remodeling through Enhancement of NADPH oxidase -TGF- $\beta$ 1 Pathway. 73<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Osaka, 2009. 3. 20-22.
- 5) Yagi S, Akaike M, Aihara K, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Ikeda Y, Iwase T, Soeki T, Matsumoto T, Sata M. A novel eNOS-independent protective action of statin against angiotensin II-induced atrial remodeling via attenuating Rac-1-mediated oxidative stress. American Heart Association 2008. New Orleans, America, 2008. 11. 8-12
- 6) Iwase T, Kurobe H, Akaike M, Nakano S, Yoshida S, Sumitomo Y, Yagi S, Aihara K, Ozaki S, Abe M, Yasui N, Matsumoto T, Kitagawa T, Sata M. Erythropoietin administration with autologous blood donation - a novel strategy to enhance mobilization of circulating progenitor cells. American Heart Association 2008 New Orleans, America, 2008. 11. 8-12.
- 7) Yagi S, Akaike M, Aihara K, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Ikeda Y, Iwase T, Soeki T, Matsumoto T, Sata M. Pitavastatin exerts eNOS-independent protective effects against angiotensin II-induced atrial remodeling via attenuating Rac-1-mediated oxidative stress. 第31回日本高血圧学会総会、札幌市、2008. 10. 9-11.
- 8) 赤池雅史、八木秀介、栗飯原賢一、石川カズ江、池田康将、吉田守美子、住友由佳、岩瀬 俊、阿部純一、松本俊夫、佐田政隆。ピタバスタチンはERK5-KLF2経路の活性化を介して血管内皮細胞での一酸化窒素合成酵素の発現を亢進する。第31回日本高血圧学

会総会、札幌市、2008.10.9-11.

9) Yagi S, Aihara K, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Ikeda Y, Iwase T, Soeki T, Akaike M, Matsumoto T. Pitavastatin prevents angiotensin II-induced atrial remodeling in eNOS knockout mice through attenuating Rac-1-mediated oxidative stress. 22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension Berlin, Germany, 2008. 6. 14-19.

10) Akaike M, Aihara K, Yagi S, Ikeda Y, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Iwase T, Matsumoto T. Pitavastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, Prevents Glucocorticoid-induced Hypertension through Increased Nitric Oxide Production as a Pleiotropic Effect on Vascular Endothelial Cells. 22nd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension Berlin, Germany, 2008. 6. 14-19.

11) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Iwase T, Akaike M, Matsumoto T. An eNOS-independent Protective Action of Pitavastatin against Angiotensin II-induced Cardiorenal Damage through Attenuating Rac-1-mediated Oxidative Stress. 72<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2008. 3. 28-30.

12) Akaike M, Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Ishikawa K, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y, Iwase T, Abe J, Matsumoto T. HMG-CoA Reductase Inhibitor Pitavastatin Increases the Expression of Endothelial NOS through Activation of ERK5-KLF2 Pathway in Vascular Endothelial Cells. 72<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2008. 3. 28-30.

13) 住友由佳、栗飯原賢一、伊勢孝之、八木秀介、岩瀬俊、赤池雅史、松本俊夫。レニン・アンジオテンシン活性下におけるヘパリンコファクターIIの心筋リモデリングへの影響。第30回日本高血圧学会学総会、宜野湾市、2007.10.25-27.

14) 八木秀介、栗飯原賢一、池田康将、伊勢孝之、住友由佳、岩瀬俊、赤池雅史、松本俊夫。Pitavastatinはangiotensin IIによる心腎障害をeNOS非依存性にrac1抑制による酸化ストレス抑制を介して改善する。第30回日本高血圧学会学総会、宜野湾市、2007.10.25-27.

15) 赤池雅史、栗飯原賢一、八木秀介、池田康将、石川カズ江、住友由佳、岩瀬俊、松本俊夫。グルココルチコイド誘発性高血圧に対

するピタバスタチンの効果とその機序の検討。第30回日本高血圧学会学総会、宜野湾市、2007.10.25-27.

16) Akaike M, Aihara K, Ikeda Y, Yagi S, Ishikawa K, Sumitomo Y, Iwase T, Azuma H, Matsumoto T. Glucocorticoid-induced Vascular Endothelial Dysfunction and Hypertension is Ameliorated by vastatin, a HMG-CoA Reductase Inhibitor, through Increased Nitric Oxide Production. 71<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Kobe, 2007. 3. 15-17.

17) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Sumitomo Y, Iwase T, Akaike M, Matsumoto T. Pitavastatin ameliorates angiotensin II-induced cardiorenal insufficiency in eNOS Knockout mice through attenuating rac-1-mediated oxidative stress. American Heart Association Sessions 2007. Orland, USA. 2007. 11. 3-7.

18) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, Sumitomo Y, Iwase T, Akaike M, Matsumoto T. Pitavastatin protects the cardio-renal system against angiotensin II-induced organ damage through eNOS-independent actions. AHA Annual High Blood Pressure Research Conference. Tucson, USA. 2007. 9. 26-29.

19) Yagi S, Aihara K, Akaike M, Ikeda Y, Sumitomo Y, Iwase T, Matsumoto T. A Novel eNOS-Independent Protective Action of Statin Against Angiotensin II-Induced Cardiovascular Remodeling and Renal Injury. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2007. Chicago USA, 2007. 4. 19-21.

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 岩瀬 俊 (IWASE TAKASHI)  
徳島大学医学部・歯学部附属病院 助教

研究者番号：10403718