

機関番号：15501  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20390370  
 研究課題名(和文) 自己骨髄細胞移植による血管再生療法の治療効果を予測するシステムの確立  
 研究課題名(英文) Identification of Risk Factors Related to Poor Angiogenic Potential of Bone Marrow Cells from Different Patients  
 研究代表者  
 濱野 公一 (HAMANO KIMIKAZU)  
 山口大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：60263787

研究成果の概要(和文)：自己骨髄細胞移植による血管再生療法は、難治性虚血性疾患に対する治療法として世界中で既に臨床応用がなされている。しかしながら、一部の患者では本治療による明らかな改善が得られず、このような治療効果(反応性)の違いは患者背景による骨髄細胞の質の違いが一因と考えられる。本研究では、血管再生療法の治療効果を予測する因子を同定すると共に、細胞移植療法の治療効果を予測する簡易システムの構築に至った。

研究成果の概要(英文)：The implantation of autologous bone marrow cells has been used for the ischemic diseases. However, the outcomes of cell therapy obviously vary among patients. In this study, we have identified the risk factors related to poor angiogenic potential of bone marrow cells and developed a new scoring system to predict their angiogenic potential for the treatment of ischemic diseases.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：骨髄細胞、血管再生、治療効果、細胞移植、再生医療、加齢、腎不全、貧血

#### 1. 研究開始当初の背景

我々は自己骨髄細胞を用いた心血管再生治療に関する基礎研究に長年に渡り携わり、難治性虚血性心疾患および虚血肢疾患患者を対象とした世界初の臨床応用を行った(*Jpn Circ J.* 2001; 65: 845-7. *Cell Transplant.* 2002; 11: 747-52)。現在、本治療法は世界中の多くの施設で臨床応用されている。本治療により、患者の虚血組織の血流の増加や臨床症状の改善などが多く報告されており、また、明らかな副作用も認められていない。我々の5年以上の追跡調査に

においても本治療の長期間の安全性を確認した(*J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;134: 1347-9)。自己骨髄細胞移植による血管再生治療には倫理的な問題が存在しないため、将来的には難治性重症虚血性疾患患者に対する新しい有効な治療法として大きな期待が寄せられている。

しかし、大規模な臨床試験では本治療の効果に関する報告が一定しておらず(*N Engl J Med.* 2006; 355: 1199-209. *N Engl J Med.* 2006, 355: 1210-21)、本治療の有効性にコンセンサスが得られていない。本治療の有効

性が認められなかった臨床試験の報告 (*N Engl J Med.* 2006; 355: 1210-21)から抜粋した患者ごとの治療前後の心機能に関するデータによると、本治療により一部の患者では明らかな改善傾向が認められたが、残念ながら一部の患者においてはほとんど効果が認められていない。我々の行った臨床試験の結果も同様で、患者ごとの本治療に対する反応性（治療効果）に違いが認められている (*Jpn Circ J.* 2001; 65: 845-7. *Cell Transplant.* 2002; 11: 747-52)。

自己骨髄細胞移植による血管再生治療の効果が影響を及ぼす背景因子は様々であると考えられる。我々は、今までの臨床試験の経験と予備実験の結果から、患者の年齢、糖尿病の有無と重症度、高脂血症の有無と重症度などが最も重要な因子であると予測している。また、血管再生治療の効果が影響を及ぼす程度は個々の因子によって異なると考えられ、血管再生治療の効果が影響を及ぼす程度（相関関係）により、それぞれの背景因子を点数で加算させ、スコア化した評価システムを作成することができるのではないかと考えた。その背景因子のスコアにより、個々の患者の自己骨髄細胞移植による血管再生治療の効果を総合的に予測することが可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

- (1) 自己骨髄細胞を用いた血管再生療法の治療効果（反応性）に影響を及ぼす因子を同定する。
- (2) 同定された因子をスコア化することで、血管再生療法の治療効果を総合的に予測するシステムの構築を目指す。

## 3. 研究の方法

- (1) 血管再生療法の治療効果に影響を及ぼす因子の同定

様々な臨床背景をもつ患者から採取した骨髄細胞の質や血管再生能について検討することで、自己骨髄細胞を用いた血管再生療法の治療効果（反応性）に影響を及ぼす因子の同定を試みた。

胸骨正中切開による手術を受けた成人患者（25例）から本研究の同意を得て、手術前に患者の病歴および血液生化学検査により各患者の背景因子を調べた。また、手術の際に切開した胸骨より採取した約 10 ml の骨髄液から単核球細胞を単離後、*in vitro* および *in vivo* での解析にて各患者の骨髄細胞の血管再生能を評価した。*in vitro* での解析では、骨髄細胞の c-kit と CD34 陽性細胞率をフローサイトメトリー法にて定量した。また、細胞培養を行い、ELISA 法による VEGF 産生量

の測定や colony-forming units 形成の評価を行った。*in vivo* での解析では、骨髄細胞の血管再生能を判定するために、SCID マウスの虚血下肢へ細胞移植を行い、レーザードップラー法による血流量の測定や clinical score の評価を行った。

- (2) 血管再生療法の治療効果を予測するシステムの構築

治療効果に有意に影響を及ぼす因子をスコア化することにより、血管再生療法の治療効果の簡易予測システムを構築することを目指した。なお、高価な特殊検査を必要とせず、市中病院で利用可能な因子のみを抽出することとした。

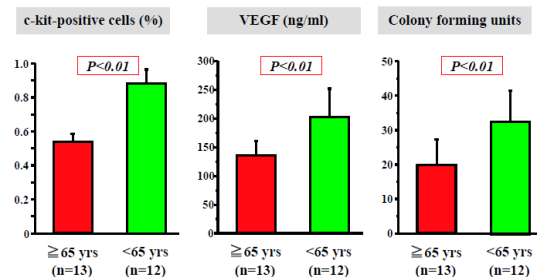
患者の一般背景（年齢や全身併発疾患など）や一般的な臨床検査データ（Hb, CRP など）から自己骨髄細胞の血管再生効果（SCID マウス虚血下肢における血流量）に有意な影響を及ぼす因子を多変量解析により抽出した。抽出した因子は P 値に応じてスコアを振り分け（P 値：スコア、 $P < 0.10$  : 1、 $P < 0.05$  : 2、 $P < 0.025$  : 3、 $P < 0.01$  : 4）、各患者の総合スコアを計算した。さらに、統計分析により、各患者の総合スコアが骨髄細胞の血管再生効果を正確に反映（予測）できるか否かを確認した。

## 4. 研究成果

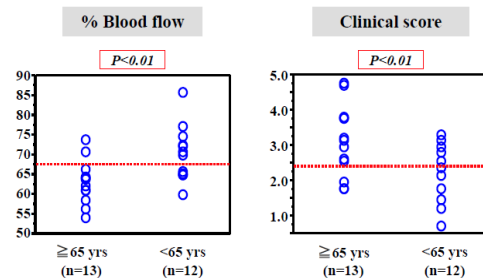
- (1) 血管再生療法の治療効果に影響を及ぼす因子の同定

### 加齢による影響

#### 骨髄細胞の質



#### 血管再生治療効果



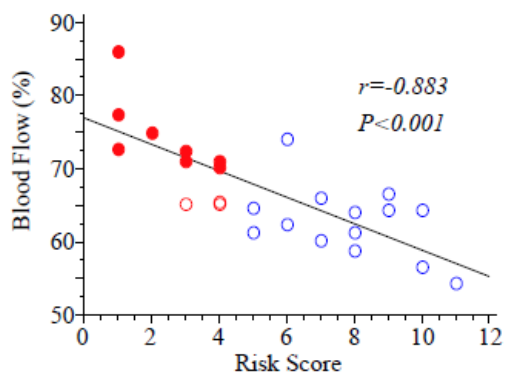
各対照患者と比較して、加齢（ $\geq 65$ 歳、上図）、腎不全（透析患者）、貧血を有する患者由来の骨髄細胞では、c-kitとCD34陽性細胞率が低く（ $P < 0.05$ ）、VEGF産生量やcolony-forming unitsも低値を示した（ $P < 0.05$ ）。また、SCIDマウス虚血下肢への細胞移植により評価した血管再生能も低下してした（ $P < 0.05$ ）。一方で、高血圧や糖尿病の患者由来の患者では、各対照患者と比較して、有意な差は認められなかった。

以上の結果から、加齢、腎不全、貧血といった背景因子が骨髄細胞の質や血管再生能の低下と相関することが示され、血管再生療法の治療効果を予測する因子であることが示唆された。

### (2) 血管再生療法の治療効果を予測するシステムの構築

患者背景因子、および臨床検査データから自己骨髄細胞の血管再生効果に有意な影響を及ぼす因子を多変量解析により抽出してRisk ratioに応じてスコアを振り分けた結果、スコア4（加齢）、3（貧血・血中crosslinked N-telopeptide of type I collagen; NTX）、2（血中IL-6）、1（腎不全・血中トリグリセリドおよびCRP）となった。また、各患者の総合スコアと骨髄細胞の血管再生効果について分析した結果、強い相関が認められ（ $r = -0.883$ ,  $P < 0.001$ ）、その予測精度は80%であった（下図）。

以上の結果から、血管再生療法の治療効果



を予測する簡易システムの構築は可能であると考えられる。

### (3) 総括

本研究成果として、加齢、腎不全、貧血といった背景因子が血管再生療法の治療効果に影響を及ぼす因子として同定できた。また、治療効果に影響を与える因子をスコア化することによって、自己骨髄細胞移植による血管再生療法の治療効果を簡易的に予測するシステムを構築することができた。

今後は、特殊検査のデータを加えて、より

精度の高い標準予測システムを再構築することも可能と思われる。本研究で構築された簡易予測システム、および、標準予測システムの妥当性と正確性を臨床試験にて証明できれば、世界中で臨床応用されている自己骨髄細胞移植による血管再生療法の適応患者の選択基準として有用と考えられる。

### 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 Li TS, Kubo M, Ueda K, Murakami M, Mikamo A, Hamano K. Impaired angiogenic potency of bone marrow cells from patients with advanced age, anemia, and renal failure. J Thorac Cardiovasc Surg. 2010; 139(2): 459-65. (査読有)
- ② Li TS, Kubo M, Ueda K, Murakami M, Ohshima M, Kobayashi T, Tanaka T, Shirasawa B, Mikamo A, Hamano K. Identification of risk factors related to poor angiogenic potency of bone marrow cells from different patients. Circulation. 2009; 120(11 Suppl): S255-61. (査読有)
- ③ Kamota T, Li TS, Morikage N, Murakami M, Ohshima M, Kubo M, Kobayashi T, Mikamo A, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Ischemic pre-conditioning enhances the mobilization and recruitment of bone marrow stem cells to protect against ischemia/reperfusion injury in the late phase. J Am Coll Cardiol. 2009; 53(19): 1814-22. (査読有)
- ④ Qin SL, Li TS, Kubo M, Ohshima M, Furutani A, Hamano K. Transient increase of cytokines in the acute ischemic tissue is beneficial to cell-based therapeutic angiogenesis. Circ J. 2008; 72(12): 2075-80. (査読有)
- ⑤ Li TS, Takahashi M, Ohshima M, Qin SL, Kubo M, Muramatsu K, Hamano K. Myocardial repair achieved by the intramyocardial implantation of adult cardiomyocytes in combination with bone marrow cells. Cell Transplant. 2008; 17(6): 695-703. (査読有)

[学会発表] (計2件)

① 濱野公一.

心血管再生治療の現状と展望

第21回北海道MMC研究会

2009.11.28 札幌、京王プラザホテル札幌

② Li TS, Kubo M, Ueda K, Murakami M, Ohshima M, Kobayashi T, Tanaka T, Shirasawa B, Mikamo A, Hamano K.

Identification of risk factors related to poor angiogenic potency of bone marrow cells from different patients.

American Heart Association 2008 Scientific Sessions

2008.11.11 New Orleans, Ernest N. Morial Convention Center, USA

[図書] (計1件)

① 久保正幸, 李桃生, 濱野公一

虚血性心疾患に対する心血管再生治療の現状と未来

「びまん性冠動脈病変の臨床－基本的病態理解から治療の選択・実際」

メジカルビュー社 2010年刊行 133-140

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱野 公一 (HAMANO KIMIKAZU)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60263787

### (2) 研究分担者

原田 規章 (HARADA NORIAKI)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70116747

美甘 章仁 (MIKAMO AKIHITO)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30372709

### (3) 連携研究者

なし