

虚血性心疾患に対する骨髓単核球移植に all trans retinoic acid を併用した選択的冠細動脈新生療法に関する基礎的検討

古 賀 純

東京慈恵会医科大学内科学講座循環器内科

(受付 平成 16 年 6 月 15 日)

SELECTIVE ARTERIOGENESIS INDUCED BY TRANSPLANTATION OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS WITH ALL-TRANS RETINOIC ACID TO ISCHEMIC MYOCARDIUM

Atsushi KOGA

Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine

Background : Coronary arteries, but not capillaries, are essential for supplying blood flow sufficient to maintain cardiac function. A number of experimental and clinical studies have examined angiogenic therapy for ischemic heart disease, but successful selective coronary arteriogenesis has not been reported.

Aim : To examine whether selective arteriogenesis is induced by combined administration of bone marrow mononuclear cells (MNCs) and all-trans retinoic acid (ATRA) into the infarcted myocardium of dogs.

Methods : Myocardial infarction was produced by transcatheter occlusion of coronary arteries in anesthetized beagles. MNCs were separated from autologous bone marrow. Saline (control group), MNCs (MNC group), 1.5 μg ATRA (ATRA group), or MNCs with 1.5 μg ATRA (MNC+ATRA group) were selectively injected into the infarcted myocardium through a needle-tipped catheter introduced into the left ventricle. Two weeks later, the hearts were removed and the number of arterioles, venules, and capillaries per unit area ($350 \times 450 \mu\text{m}^2$) in the infarcted area were counted histopathologically and were compared among the four groups.

Results : The number of arterioles in the MNC (62.4 ± 7.3), ATRA (63.0 ± 3.4), and MNC+ATRA (92.3 ± 8.7) groups was significantly greater than that in the control group (21.7 ± 3.1 ; $p < 0.01$). In the MNC+ATRA group (92.3 ± 8.7), the number of arterioles was also significantly greater than that in the MNC group (62.4 ± 7.3 ; $p < 0.05$) or the ATRA group (63.0 ± 3.4 ; $p < 0.01$). In addition, the ratio of arterioles to capillaries was significantly higher both in the ATRA (0.33 ± 0.03) and MNC+ATRA (0.35 ± 0.03) groups than that in the control group (0.09 ± 0.03 ; $p < 0.01$) or the MNC group (0.12 ± 0.02 ; $p < 0.01$).

Conclusion : These results indicate that combined administration of MNCs and ATRA induces selective arteriogenesis in the infarcted myocardium.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2004 ; 119 : 413-9)

Key words : arteriogenesis, bone marrow mononuclear cells, myocardial infarction, all trans retinoic acid

I. 緒 言

近年、骨髓由来の血管内皮前駆細胞が末梢血液中に証明され、血管新生に関与していることが報告されている¹⁾。現在、虚血組織への骨髓細胞移植による血管新生療法は、すでに臨床応用の段階にある²⁾³⁾。しかし、これらの治療法では採取できる骨髓細胞数に限界があり、また新生血管への分化誘導は局所の虚血刺激のみに依存していることから、より効率的に血管新生をひき起こす方法の開発が望まれる。

心筋虚血に血管新生療法を血管増殖因子である basic fibroblast growth factor (basic FGF) を用いて試みたのは、Yanagisawa-Miwa らが初めてである⁴⁾。その後、他の成長因子や骨髓細胞移植による血管新生療法が試みられている。心機能を正常に保持し、運動耐容能を正常に保たせるほどの虚血心筋への十分な血液供給を行うには細動脈以上の太い血管の新生が必須であるが、いまだ毛細血管主体の血管新生にとどまっており、選択的細動脈、動脈新生に成功した報告はみあたらない。

分化誘導物質である all trans retinoic acid (ATRA) は morphogen として位置付けられ、各種細胞の分化、増殖に関与しているが⁵⁾、その血管新生に対する作用については一定の見解は得られていない。また虚血性心疾患に対する ATRA の作用を検討した報告はみあたらない。そこで梗塞心筋に自家骨髓細胞を移植し、さらに ATRA を併用し、果たして細動脈以上の太い血管新生が選択的に起こるのかどうか、その効果について検討を行った。

II. 対 象 と 方 法

本研究は、東京慈恵会医科大学動物実験指針の倫理規定を遵守して行った。

ビーグル犬(体重 10-12 kg, 年齢 7-14 カ月, $n=23$, すべて雌)を対象とした。

Pentobarbital Sodium 25 mg/kg の静脈内投与により麻酔し、気管内挿管の後、人工呼吸下で以下の実験を行った。

1. 骨髓単核球の分離

両側大腿骨骨髓より骨髓液を計 20 ml 採取した。Ficoll 液 (リンホセパール I 免疫生物研究所)

を用いた比重遠心分離法にて骨髓単核球 (mononuclear cell: 以下 MNC) を分離した。20% FBS 加 HANKS-BSS 液 (GIBCO BRL) にて計 40 ml に希釈し、Ficoll 液に重層した後、1,500 rpm にて 30 分間遠心分離した。Ficoll 溶液直上の単核球層を採取し、得られた骨髓単核球を 20% FBS 加 HANKS-BSS 液にて希釈し、1,500 rpm, 5 分間遠心分離した後、上清を捨て、再び同様の過程にて洗浄した。回収された骨髓単核球数は、計 $1.0-2.4 \times 10^6$ cell であった。これを 20% FBS 加 HANKS-BSS 液にて計 1 ml に希釈し、心筋への移植に使用した。なお得られた骨髓単核球は、FACS 解析にて $2.5 \pm 0.5\%$ の CD34 陽性細胞を含有していた。

2. イヌ心筋梗塞モデルの作成

開胸操作による創部の炎症反応に伴う増殖因子の増加などの影響をできるだけ除外するため、すべての操作を非開胸、経皮的に施行した。すなわち右総頸動脈に 8F シースを挿入後、心室細動による死亡を予防するため lidocaine 20 mg を静脈投与した。7F カテーテルを用いて、右前斜位 30 度にて左室造影と左冠動脈造影を施行した。ついで、左冠動脈前下行枝第一対角枝分岐直後に吸水性高分子ポリマー球 (1×2 mm) を留置して完全閉塞せしめた。30 分後、再び冠動脈造影による左前下行枝の血流の途絶と、左室造影による前壁領域の収縮消失をもって梗塞とみなした。なお、冠動脈造影により非閉塞枝からの側副血行がみられた例は除外した。

3. 骨髓単核球の移植と分化誘導物質の投与

心筋梗塞作成 30 分後、7F の誘導カテーテルを用い、先端に 19G 針付きの 5F カテーテルを左心室内腔に挿入し、骨髓単核球の浮遊液 1 ml を左心室内膜側より心筋梗塞領域 1 ケ所へ注入した (MNC 群; $n=5$)。対照として、生理的食塩水 1 ml を注入した群も作成した (C 群; $n=8$)。また ATRA (シグマアルドリッチジャパン) 1.5 μ g を心筋梗塞領域に単独注入した群 (ATRA 群; $n=4$)、骨髓単核球と併用注入した群 (MNC+ATRA 群; $n=6$) を作成した。

4. 病理組織学的評価法

14 日後、再び pentobarbital sodium 25 mg/kg の静脈内投与による麻酔を行い、冠動脈造影を施

行した。その後 pentobarbital sodium の過量投与にて心停止させた後、心臓を摘出し 10% formaldehyde solution により固定した。

ついで梗塞領域の組織切片を作成し AZAN 染色を施行し、病理組織学的に検討を行った。

血管については、Yanagisawa-Miwa ら⁴⁾に従い外径が $25\ \mu\text{m}$ 以下の一層構造の血管を毛細血管、外径が $25\ \mu\text{m}$ より大きく $100\ \mu\text{m}$ 以下で三層構造の血管を細動脈、二層構造の血管を細静脈とした。血管密度の多い多数の部位 1 視野 ($350 \times 450\ \mu\text{m}^2$) 当たりの細動脈、細静脈、毛細血管の血管数を計測し、そのうち最も多い部位を選び、群間比較を行った。

5. 心機能評価法

心筋梗塞作成前、心筋梗塞作成 30 分後、心筋梗塞 14 日後の左室造影を用い、centerline 法にて左室駆出率を計測し、各群間で比較検討した。

6. 統計学的検討

すべてのデータは $\text{mean} \pm \text{SE}$ にて表記し、2 群間のデータの比較は、unpaired t -test を用いて行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

III. 結 果

1. 左室駆出率

心筋梗塞作成前および 30 分後の左室駆出率では、4 群間に有意差を認めなかったが、14 日後では、C 群 0.23 ± 0.06 に対して MNC 群では 0.50 ± 0.10 ($p < 0.05$) MNC+ATRA 群では 0.54 ± 0.03 ($p < 0.01$)、と有意に改善がみられた (Fig. 1)。

2. 血管数

Fig. 2 に代表的な細動脈、細静脈、毛細血管の病理組織像を示した。Fig. 3 に示したごとく、MNC 群では C 群と比較して、細動脈、細静脈、毛細血管いずれも有意に増加していた。すなわち細動脈 62.4 ± 7.3 vs 21.7 ± 3.1 ; $p < 0.01$, 細静脈 59.8 ± 7.0 vs 27.0 ± 2.6 ; $p < 0.01$, 毛細血管 532.4 ± 71.5 vs 300.7 ± 44.8 ; $p < 0.05$ であった。ATRA 群では C 群と比較して、細動脈と細静脈が有意に増加していた。すなわち細動脈 63.0 ± 3.4 vs 21.7 ± 3.1 ; $p < 0.01$, 細静脈 45.3 ± 2.1 vs 27.0 ± 2.6 ; $p < 0.01$ であった。MNC+ATRA 群では C 群と比較して、細動脈と細静脈が有意に増加していた。すなわち細動脈 92.3 ± 8.7 vs 21.7 ± 3.1 ; $p < 0.01$, 細静脈 58.2 ± 7.7 vs 27.0 ± 2.6 ; $p < 0.01$ であった。MNC+ATRA 群では MNC 群と比較しても細動脈が有意に増加していたが、毛細血管は有意に減少していた。すなわち細動脈 92.3 ± 8.7 vs 62.4 ± 7.3 ; $p < 0.05$, 毛細血管 275.0 ± 37.4 vs 532.4 ± 71.5 ; $p < 0.01$ であった。また ATRA 群と比較しても細動脈が有意に増加していた。すなわち 92.3 ± 8.7 vs 63.0 ± 3.4 ; $p < 0.01$ であった。Fig. 4 に示したごとく、細動脈/毛細血管の比は、MNC 群では C 群と比較して差はなかったが、ATRA 群では C 群 (0.33 ± 0.03 vs 0.09 ± 0.03 ; $p < 0.01$), MNC 群 (0.33 ± 0.03 vs 0.12 ± 0.02 ; $p < 0.01$) と比較して有意に増加し、MNC+ATRA 群でも、C 群 (0.35 ± 0.03 vs 0.09 ± 0.03 ; $p < 0.01$), MNC 群 (0.35 ± 0.03 vs 0.12 ± 0.02 ; $p < 0.01$) と比較して有意に増加していた。

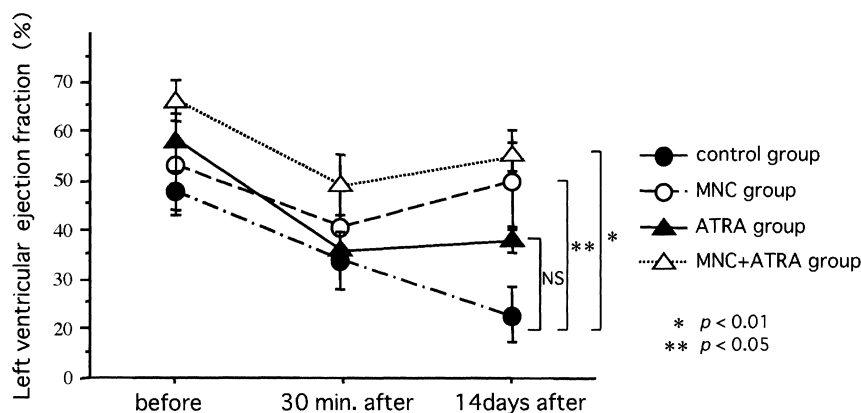


Fig. 1. Left ventricular ejection fraction before, 30 min. after and 14 days after myocardial infarction.

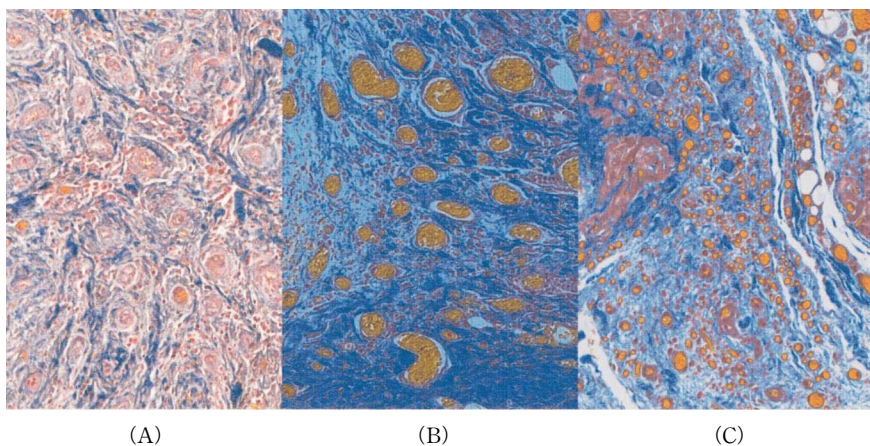


Fig. 2. Representative pictures of angiogenesis in a canine heart of MNC+ATRA group. (AZAN staining 400×)
(A) arterioles, (B) venules, (C) capillaries

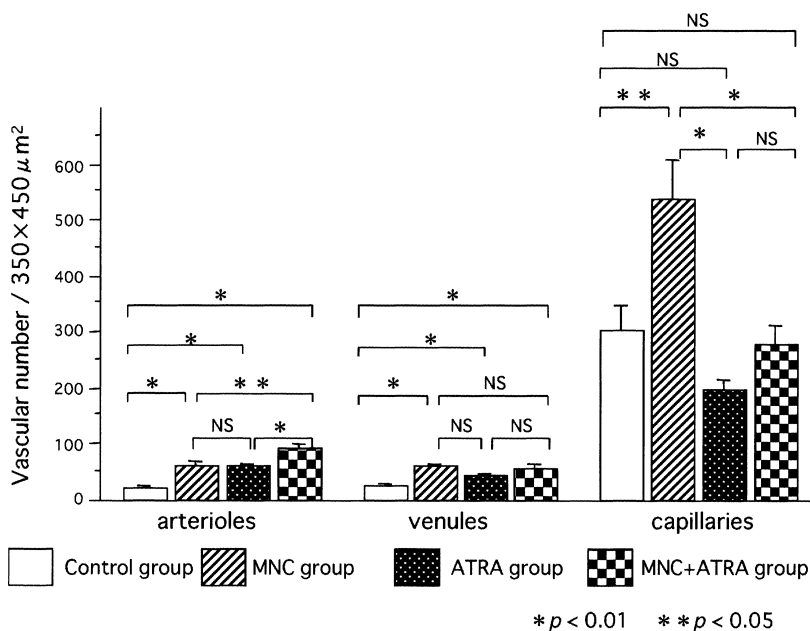


Fig. 3. Comparison of the number of vessels.

IV. 考 察

近年, 虚血性心疾患に対する新たな治療として, 血管新生療法の研究が飛躍的な進歩を遂げている。血管新生因子⁶⁾⁷⁾ やその遺伝子⁸⁾⁻¹⁰⁾ を用いたもの, 自家骨髄細胞移植によるもの²⁾³⁾ が, 現在すでに臨床応用の段階にある。

血管新生過程はいまだに不明な点が多い。従来成体の血管新生は, 既存の血管内皮細胞の分化・

増殖によってのみ成立すると考えられてきたが¹¹⁾, 最近になり末梢血液中に骨髄由来の血管内皮細胞や血管平滑筋細胞が存在し, 血管新生に関与していることが明らかになり, 従来の血管新生の概念は大きく変貌しつつある¹⁾¹²⁾¹³⁾。

骨髄単核細胞移植が血管新生に促進的に働く機序は, まだ完全には解明されていない。移植した細胞から血管内皮細胞や血管平滑筋細胞などへと分化する血管構成細胞の供給, 移植した細胞から

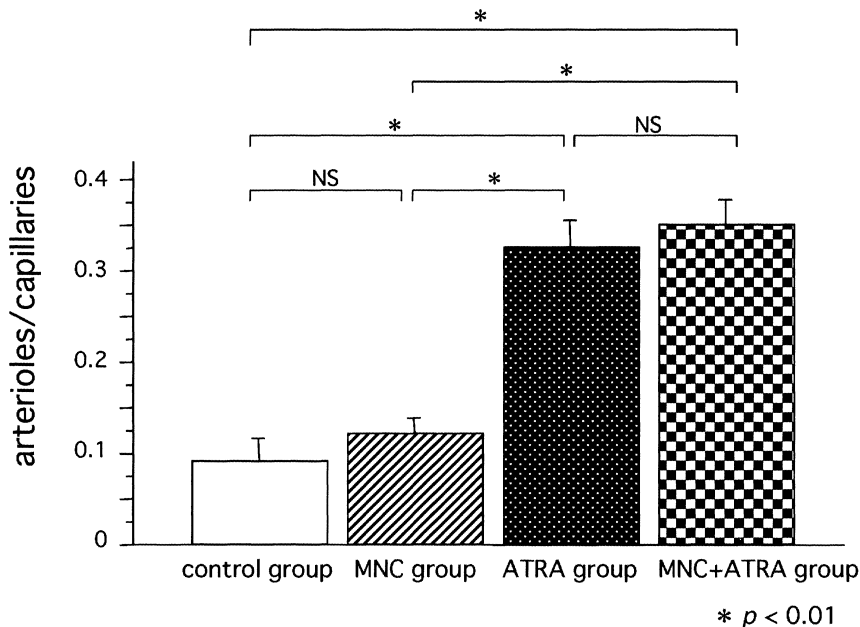


Fig. 4. Comparison of arterioles/capillaries ratio.

のサイトカイン分泌などの可能性が推測されている¹⁴⁾¹⁵⁾。Kobayashi らは、骨髄細胞そのものを精製せずに梗塞心筋へ移植する事により毛細血管の血管新生が得られ、その理由を basic FGF や vascular endothelial growth factor (VEGF) によらない interleukin- 1β (IL- 1β) や他の炎症性サイトカインによるものであるとしている¹⁴⁾。Kamihata らは、虚血心筋への骨髄単核細胞移植により basic FGF, VEGF, angiopoietin 1, IL- 1β , tumor necrosis factor- α の mRNA 発現が亢進したとしている¹⁵⁾。われわれは、すでに骨髄単核球移植に basic FGF と VEGF を併用投与した効果について検討を行ったが、骨髄単核球移植単独と比較して、さらなる血管新生効果は得られなかった¹⁶⁾。この事から、移植した骨髄単核細胞から、十分な血管新生因子が分泌されている可能性が考えられた。

骨髄単核細胞移植による血管新生療法のみでは、採取できる細胞数に限界があること、新生血管への分化誘導は局所の虚血刺激のみであることから、より効率よく血管新生をひき起こす方法の開発が望まれる。そこで分化誘導物質である ATRA を併用した効果について検討した。

ATRA は morphogen として位置づけられ、各

種細胞の分化、増殖に関与している⁵⁾。その作用は、投与量やその他の条件によって大きく異なってくる。血管新生に対する作用についても、一定の見解は得られていない。血管平滑筋細胞の増殖に対しては、抑制的に作用するという報告が多いが、その機序として platelet-derived growth factor BB の作用に拮抗¹⁷⁾、endothelin に拮抗¹⁸⁾のほかに、*bcl-2* などの遺伝子を発現させてアポトーシスを誘導する¹⁹⁾などが考えられている。また、血管新生に促進的に働く機序としては、血管内皮細胞に作用して FGF-2 の産生を促す事²⁰⁾や、血管平滑筋細胞に作用して α -平滑筋アクチンの産生を促す事^{21)~24)}が推測されている。

虚血性心疾患における ATRA の効果を検討した報告は見あたらない。本研究での ATRA の投与量は、 5×10^{-6} mol/l (1.5 μ g/ml) としたが、 $5 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-6}$ mol/l での予備実験にて、最も血管新生効率がよかったものを採用した (データは示していない)。今回の研究により、ATRA は毛細血管数を増加することなく細動静脈の増加を引き起こし、さらに細動脈/毛細血管の比を増加させたことから、毛細血管から細動脈へと分化誘導した可能性が示唆された。また、骨髄単核細胞移植との併用により、相乗的、選択的に細動脈レベルの血管

新生 (arteriogenesis) を引き起こし得ることが判明した。

組織、とくに心筋が生理的機能を果たすためには、毛細血管による血液供給では不十分であり、細動脈以上の太い血管による血液供給が必須である。しかしながら、細動脈以上の太い血管を選択的に新生させる方法は、いまだ見出されていない。細動脈や動脈の新生の機序については、既存の毛細血管に平滑筋細胞がとりまき、それらが内皮細胞と共に分裂し、成長して形成され、支配組織が必要とする十分な血流を供給するようになると考えられている²⁵⁾。今回、ATRA と骨髄単核細胞の併用により細動脈が選択的に増加することを認めたが、ATRA が平滑筋を選択的に増殖させたのか、毛細血管への平滑筋の遊走を促進せしめたのか、または他の作用によるのかについては今後の検討を要する。

今回の研究結果は、虚血性心疾患に対して動脈新生 (arteriogenesis) 療法という新たな可能性を提供し得ると考えられる。

V. 結 語

自家骨髄単核細胞移植のみと比較して、自家骨髄細胞移植と ATRA を併用投与する事により、イヌ心筋梗塞域の選択的細動脈新生が認められ、新たな選択的冠動脈新生療法の可能性が示唆された。

本稿を終えるにあたり、御校閲いただきました望月正武教授および直接御指導いただきました内田康美教授に深謝いたします。また御協力いただきました関口博仁助手、小川崇之助手、青木和弘助手、松山明正助手、実験動物センター長岩城隆昌先生、ならびに本研究に対して研究助成をしていただきました日本循環器学研究振興財団に深謝いたします。

文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Zee RVD, Isner JM, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7.
- 2) Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-6.

- 3) The HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003; 361: 47-9.
- 4) Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kido H, Ito H, et al. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* 1992; 257: 1401-3.
- 5) Thaller C, Eichele G. Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. *Nature* 1987; 327: 625-8.
- 6) Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Chronos NA, et al. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 2002; 105: 788-93.
- 7) Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, McCluskey ER, et al. The VIVA trial: vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis. *Circulation* 2003; 107: 1359-65.
- 8) Grines CL, Watkins MW, Mahmarian JJ, Iskandrian AE, Rade JJ, Kleiman N, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1339-47.
- 9) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98: 2800-4.
- 10) Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Kuntz RE, et al. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002; 105: 2012-8.
- 11) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-4.
- 12) Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Nagai R, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002; 8: 403-9.

- 13) Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 2002 ; 106 : 1199-204.
- 14) Kobayashi T, Hamano K, Li TH, Katoh T, Kobayashi S, Esato K, et al. Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model. *J Surg Res* 2000 ; 89 : 189-95.
- 15) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001 ; 104 : 1046-52.
- 16) 古賀 純, 松山明正, 青木和弘, 小川崇之, 関口博仁, 望月正武 ほか. イヌ心筋梗塞モデルにおける自家骨髓単核球移植の血管新生療法に関する検討. 第 2 回心血管再生医学研究会抄録集 2001 : p 3
- 17) Miano JM, Topouzis S, Majesky MW, Olson EN. Retinoid receptor expression and all-trans retinoic acid-mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1996 ; 93 : 1886-95.
- 18) Chen S, Gardner DG. Retinoic acid uses divergent mechanisms to activate or suppress mitogenesis in rat aortic smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1998 ; 102 : 653-62.
- 19) Nagy L, Thomazy VA, Chandratna R, Heyman RA, Davies PJA. Retinoid-regulated expression of *bcl-2* and tissue transglutaminase during the differentiation and apoptosis of human and apoptosis of human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Leuk Res* 1996 ; 20 : 499-505.
- 20) Gaetano C, Catalano A, Illi B, Felici A, Minucci S, Palumbo R, et al. Retinoids induce fibroblast growth factor-2 production in endothelial cells via retinoic acid receptor [alpha] activation and stimulate angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res* 2001 ; 88 : E38-47.
- 21) Haller H, Lindschau C, Quass P, Distler A, Luft FC. Differentiation of vascular smooth muscle cells and the regulation of protein kinase C- α . *Circ Res* 1995 ; 76 : 21-9.
- 22) Blank RS, Swartz EA, Thompson MM, Olson EN, Owens GK. A retinoic acid-induced clonal cell line derived from multipotential P19 embryonal carcinoma cells expresses smooth muscle characteristics. *Circ Res* 1995 ; 76 : 742-9.
- 23) Suzuki T, Kim HS, Kurabayashi M, Hamada H, Fujii H, Aikawa M, et al. Preferential differentiation of P19 mouse embryonal carcinoma cells into smooth muscle cells: use of retinoic acid and antisense against the central nervous system-specific POU transcription factor Brn-2. *Circ Res* 1996 ; 78 : 395-404.
- 24) Wiegman PJ, Barry WL, McPherson JA, McNamara CA, Gimple LW, Sanders JM, et al. All-trans-retinoic acid limits restenosis after balloon angioplasty in the focally atherosclerotic rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 ; 20 : 89-95.
- 25) Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation* 2003 ; 10 : 83-97.