

## 論 文 要 旨

**Waon Therapy Mobilizes CD34+ Cells and Improves Peripheral Arterial Disease**

和温療法は CD34 陽性細胞を動員し、末梢動脈疾患を改善させる

新里拓郎

**【序論および目的】**

末梢動脈疾患は、身体機能を低下させ、生活の質をも低下させる疾患である。カテーテルインターベンションやバイパス手術などの血行再建術の適応とならない重症下肢虚血患者に対して、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) を用いた血管新生療法や、自家骨髄細胞移植による血管新生療法が、効果があったとの報告がある。

一酸化窒素 (NO) は内皮依存型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) によって産生される血管新生因子であるが、我々は、下肢虚血モデルマウスにおいて和温療法が eNOS の発現を亢進させ、NO を増加させ血管新生を惹起することをすでに報告した。また、和温療法が末梢動脈疾患患者において、下肢の疼痛や歩行距離、下肢の血流を改善させる事、虚血性皮膚潰瘍を改善、治癒させる事を報告した。本研究の目的は、和温療法の末梢動脈疾患に対する効果の確認と効果発現の機序を検討する事である。

**【材料および方法】**

対象は、すでに標準的な薬物治療を行われている間歇性跛行を有する末梢動脈疾患患者、連続 21 例である。コントロール群 (n=10) と和温療法群 (n=11) とにランダムに割り付けを行い、コントロール群は従来の薬物治療を 6 週間継続し、和温療法群は従来の薬物療法に加え 1 日 1 回の和温療法を週 5 回、6 週間施行した。和温療法は、遠赤外線均等乾式サウナ装置を用いて、60°C・15 分のサウナ浴と出浴後 30 分の安静保温を行った。両群において、治療開始前と 6 週間後で、1) visual analogue scale (VAS) での下肢疼痛、2) 6 分間歩行距離、3) 足関節/上腕血圧比 (ABPI)、4) 血管内皮前駆細胞のマーカーとしてリアルタイム PCR 法を用いた末梢血単核球中の CD34mRNA 発現量、5) NO 代謝物である硝酸イオン (NO<sub>3</sub>) と亜硝酸イオン (NO<sub>2</sub>) の総和、6) VEGF を測定し、両群での差異を比較検討した。

## 【結果】

VAS で評価した下肢疼痛は、和温療法群で有意に改善したが、コントロール群では有意な変化を認めなかった (和温療法群 :  $8.1 \pm 0.7 \rightarrow 2.8 \pm 1.1$ ,  $P < 0.05$ ; コントロール群 :  $8.4 \pm 0.8 \rightarrow 8.2 \pm 1.1$ , NS)。歩行距離は和温療法群で有意に改善したが、コントロール群では有意な変化を認めなかった。ABPI は和温療法群で有意に改善したが、コントロール群では有意な変化を認めなかった。CD34 陽性細胞の mRNA 発現量は、和温療法群で約 2 倍に有意に増加したが、コントロール群では有意な変化を認めなかった [和温療法群 :  $2.0 \pm 1.2 (x10^4) \rightarrow 3.9 \pm 1.9 (x10^4)$ ,  $P = 0.015$ ; コントロール群 :  $1.8 \pm 1.8 (x10^4) \rightarrow 1.2 \pm 0.9 (x10^4)$ , NS]。NO 代謝物は和温療法群で有意に増加したが、コントロール群では有意な変化を認めなかった (和温療法群 :  $29.6 \pm 17.6 \rightarrow 36.0 \pm 17.7 \mu\text{mol/ml}$ ,  $P < 0.05$ ; コントロール群 :  $34.4 \pm 9.4 \rightarrow 38.3 \pm 8.8 \mu\text{mol/ml}$ , NS)。VEGF は両群とも有意な変化を認めなかった (和温療法群 :  $70.2 \pm 46.3 \rightarrow 40.2 \pm 40.5 \text{ pg/ml}$ , NS; コントロール群 :  $39.2 \pm 21.7 \rightarrow 42.5 \pm 21.6 \text{ pg/ml}$ , NS)。

## 【考察】

我々は、下肢虚血モデルマウスを用いた実験で、eNOS を介して血管新生が惹起されることを報告した。NO は血管新生因子の 1 つであり、和温療法による血管新生の鍵を握っていると考えている。末梢動脈疾患患者の NO 活性は低下している特徴がある。また eNOS 欠損マウスでは、血管内皮前駆細胞の動員が阻害されること、骨髄での eNOS の発現が骨髄幹細胞や血管内皮前駆細胞の放出に影響していること、eNOS を介して血管内皮前駆細胞が、骨髄から末梢血中に動員されることが報告されている。本研究では、和温療法によって NO が増加し、この eNOS を介した経路で、骨髄から末梢血中へ血管内皮前駆細胞を誘導した可能性が示唆された。

NO は VEGF の下流で血管新生に関与しているとの報告があり、eNOS 欠損マウスでは、VEGF を投与しても血管新生が阻害されることが報告されている。また、eNOS を過剰発現させたマウスでは、下肢虚血状態において VEGF の発現が抑制されることが報告されている。

下肢虚血モデルマウスを用いた実験で、和温療法は VEGF の発現を亢進させないが、下肢虚血によって増加した VEGF の存在下で、eNOS の発現を亢進させて血管新生を引き起こすことを、我々は報告した。それゆえ、下肢虚血による VEGF の発現が亢進している末梢動脈疾患患者において、和温療法により CD34 陽性細胞は末梢血中に動員されると考えている。本研究において、和温療法群で治療後に VEGF の低下が見られた。これは、和温療法によって下肢虚血が改善したために、下肢虚血によって和温療法前に増加していた VEGF が減少したことが示唆される。

本研究においては、CD34 陽性細胞と NO、VEGF の間に明らかな相関関係は認めなかった。それぞれの因子の発現に時間差があることも予想され、今後いくつかのポイントで測定し、それらの関係を検討する必要がある。

## 【結論】

和温療法は、血管内皮前駆細胞を末梢血中に動員し、末梢動脈疾患の下肢虚血を改善させる。和温療法は、末梢動脈疾患患者にとって有用な治療法と言える。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 132号		学位申請者	新里 拓郎
審査委員	主査	井本 浩	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	川平 和美	副査	橋口 照人
	副査	竹中 俊宏	副査	新村 英士

### Waon Therapy Mobilizes CD34+ Cells and Improves Peripheral Arterial Disease

(和温療法は CD34 陽性細胞を動員し、末梢動脈疾患を改善させる)

一酸化窒素 (NO) は内皮依存型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) によって産生される血管新生因子である。これまで、下肢虚血モデルマウスにおいて和温療法が eNOS の発現を亢進させ、NO を増加させ血管新生を惹起すること、また、和温療法が末梢動脈疾患 (PAD) 患者において、下肢の疼痛や歩行距離、下肢の血流を改善させること、虚血性皮膚潰瘍を治癒させることが報告されている。そこで、学位申請者は和温療法の PAD に対する効果と効果発現の機序を検討した。間歇性跛行を有する PAD 患者、連続 21 例をコントロール群 (n=10) と和温療法群 (n=11) とにランダムに割り付けを行い、コントロール群は従来の薬物治療を 6 週間継続し、和温療法群は従来の薬物療法に加え 1 日 1 回の和温療法を週 5 回、6 週間施行した。両群において、治療開始前と 6 週間後で、1) visual analogue scale (VAS) での下肢症状、2) 6 分間歩行距離、3) 足関節/上腕血圧比 (ABPI)、4) 血管内皮前駆細胞のマーカースとしてリアルタイム PCR 法を用いた末梢血単核球中の CD34mRNA 発現量、5) NO 代謝物である血清中の硝酸イオン (NO<sub>3</sub>) と亜硝酸イオン (NO<sub>2</sub>) の総和、6) 血清中の vascular endothelial growth factor (VEGF) を測定し、両群での差異を比較検討した。

その結果、以下の知見が明らかにされた。

- 1) VAS で評価した下肢症状、6 分間歩行距離、ABPI は、和温療法群において有意に改善した。コントロール群ではこれらの値は有意な変化を認めなかった。
- 2) 末梢血単核球中の CD34mRNA 発現量は、和温療法群で約 2 倍に増加したが、コントロール群では有意な変化を認めなかった。
- 3) NO 代謝物は和温療法群で有意に増加した。コントロール群では有意な変化を認めなかった。
- 4) VEGF は両群とも有意な変化を認めなかった。

以上の結果から、和温療法は血管新生因子である NO を増加させ、CD34 陽性細胞、すなわち血管内皮前駆細胞を動員することによって PAD を改善させることが示唆された。

本研究は、和温療法が PAD に対して、血管内皮前駆細胞を動員することによって血管新生を発現・増強させる可能性を示し、PAD に対する効果発現機序の 1 つを明らかにした。これまでの報告された和温療法の心血管に対する効果を考え併せると、和温療法は、血管機能を改善し、かつ血管新生も惹起することで、PAD を包括的に治療することが出来る革新的な治療法となり得る可能性がある。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 132 号		学位申請者	新里 拓郎
審査委員	主査	井本 浩	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	川平 和美	副査	橋口 照人
	副査	竹中 俊宏	副査	新村 英士
<p>主査および副査の5名は、平成23年7月26日、学位申請者 新里 拓郎 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p><b>【対象】</b></p> <p>質問1) コントロール群と和温療法群で性差があるが、高齢の男女で和温療法の効果に差異があるのか。  (回答) 年齢と男女において和温療法の効果に差があるかどうかは検討していない。これまで心不全の患者に対して和温療法をしてきた経験から、高齢の男女間には効果に差はないと思われる。今回の研究に関しては、コントロール群と和温療法群で性に有意差があり、エストロゲンの影響は考慮する必要があるが、両群とも平均年齢は75歳、女性も閉経後であり、エストロゲンの血管内皮に対する影響は考えなくて良いと考える。</p> <p>質問2) VEGF からみると和温療法群の baseline が高い傾向にあり、和温療法群の方が下肢虚血の程度が強いという印象を受けるが、一方、ABPI でみると和温療法群の方が高い。これに関してどのように考えているか。  (回答) PAD における下肢虚血の状態を何で評価するかは難しい。機能的な下肢虚血を見るには運動負荷後のABPIの低下の程度と回復時間などを見る方がよいと思われる。今回の研究でのABPIは安静時のABPIであり、機能的な下肢虚血を反映しているとは言い難い点もある。VEGFは虚血によって上昇するので、VEGFで評価した虚血は、和温療法群が高い可能性はある。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>質問3) 対象は両群とも6週間入院での施行か？  (回答) 和温療法群に関しては6週間入院で和温療法を施行した。コントロール群に関しては週末の外泊を2回ほど挟んだ上で基本的には入院して頂いた。コントロール群に関しては入院期間中にPADの重大な合併症である、心・脳血管障害のスクリーニングを行うなど不利益を生じないように配慮した。</p> <p>質問4) 運動療法の施行の有無はどうだったか。  (回答) 監視下でのトレッドミルを用いた運動療法は両群共に施行していない。</p> <p><b>【結果についての考察】</b></p> <p>質問5) 和温療法により血流の増加する機序、和温療法の利点についてどのように考察しているのか。  (回答) 局所の温浴と違って、和温療法は全身を温めて心拍出量を増やすことで全身の血管に作用し、ずり応力を介してeNOS、NOを増加させる。これが和温療法の最大の利点であると考えており、局所の温浴では和温療法と同等の効果は得られないと考えられる。</p> <p>質問6) 和温療法は体を温めるわけであるから、温熱を感知するレセプターであるバニロイドレセプターについては、どのように考察しているのか。  (回答) バニロイドレセプターに関しては、これまで動物実験等でも検討していない。バニロイドレセプターを含めた、異なる経路での和温療法の効果発現機序に関しては、今後の研究課題である</p> <p>質問7) 和温療法がCD34陽性細胞を増加させて、血管新生に関与していることは確かであると考えられる。しかし、ABPIが改善するとなると、既存の導管動脈の内皮機能の改善が必要と考えられるが、和温療法がPADを改善させる、その主な機序はどこにあると考えているか。  (回答) 和温療法がPADを改善させる主な機序は、温熱の血管拡張作用により既存の血流量が低下した血管がずり応力等で内腔が拡張し、血管構造が正常化し血流が回復すること、すなわち動脈形成であると考えている。また、今回の研究では和温療法によりCD34陽性細胞、すなわち血管内皮前駆細胞(EPC)が動員されることが示唆された。EPCによる全く新しい脈管系の発生、脈管形成が起こっている可能性があり、さらに既存の血管内皮細胞の増殖および遊走による血管新生が加わって、総合的に虚血肢の血流を改善させると考えている。</p> <p>質問8) 健常人におけるCD34mRNA/GAPDHmRNAの比は検討したのか。  (回答) 健常人の検体は測定していない。</p>				

## 最終試験の結果の要旨

質問 9) 血管内皮前駆細胞に、より特異的な表面マーカー、CD133 や CD306 の測定は今回行っていないのか。

(回答) 今回は CD34 のみ測定をしており、今後の研究課題である。

質問 10) CD34mRNA が増えたことは、本当に CD34 陽性細胞数が増えたことを意味するのか、それとも一つの CD34 陽性細胞の表面に発現している CD34 の数が増えたのか、厳密に鑑別するのは困難だと思うが、どういう見解を持っているか。

(回答) 本来はフローサイトメトリーで CD34 陽性の細胞数をカウントすべきところではあるが、末梢血中の幹細胞は 0.01% 程度と数が非常に少ないため、今回は real-time PCR で mRNA を定量評価した。mRNA の増加量＝細胞数の増加、すなわち mRNA の発現量が 2 倍になったからといって末梢血中の CD34 陽性細胞数が 2 倍になったとは厳密には言えない。しかし、G-CSF 投与後に末梢血中の CD34mRNA の発現量が増加し、かつ CD34 陽性細胞数が増加するとの報告がある。このことから、mRNA の発現が亢進したということは、末梢血中の CD34 陽性細胞数が増えたということと等しいのではないかと考え、この測定系を用いた。

質問 11) VEGF の正常人での値はどのくらいか。

(回答) 今回の測定系での基準値は、35pg/ml となっている。

質問 12) コントロール群に比べて、和温療法群で baseline の VEGF が有意に高く、この VEGF が高値であることによって、和温療法群で有意に CD34 陽性細胞が動員された可能性はないか。

(回答) VEGF の高値が持続して、CD34mRNA の発現も亢進していれば VEGF によって CD34mRNA の発現が亢進した可能性が高くなると思うが、今回の研究では、和温療法群では VEGF の変化に有意差は無いものの、低下する傾向がみられて CD34mRNA の発現が亢進している。また、baseline の VEGF と baseline の CD34mRNA の発現量に相関が見られず、さらに、VEGF の変化量と CD34mRNA の発現量の変化量にも相関関係は認めなかった。このことから、今回の研究において、CD34mRNA の発現量の亢進は、VEGF の直接的な作用によるものではないと考えている。ただし、baseline で和温療法群の VEGF がコントロール群に比べて高値なので、VEGF からみた虚血に関しては差があると言わざるを得ない。これが両群間での CD34mRNA の発現量の差に影響を与えた可能性に関しても否定は出来ない。

質問 13) GAPDH を internal control として、CD34mRNA と GAPDHmRNA の ratio を見ているが、GAPDH の発現は和温療法で変化しないのか。

(回答) baseline と 6 週間後で両群とも GAPDH の発現量に変化は見られていない。

質問 14) 和温療法で一時的に下肢の痛みが増すのは何故か。

(回答) 機序に関しては不明である。温熱刺激による痛み物質の一時的な増加など、何かしら関与していると思われるが、今後の研究課題である。

質問 15) 6 週間和温療法が終わった後、和温療法を継続しないと悪化するのか？悪化した患者は再度和温療法をすると改善するのか？

(回答) 和温療法を外来で継続できずに、症状や ABPI の悪化で再入院してくるケースを経験する。そういうケースで再入院して和温療法を再開すると、また症状の改善が見られる。諸事情により外来で和温療法を継続できている患者は少なく、現在 4、5 例であるが、継続できているケースでは ABPI の著しい悪化や症状の悪化は見られていない。週 2-3 回の和温療法の継続が望ましいと考えられる。

質問 16) 運動療法の位置づけはどうか。和温療法と運動療法との併用で効果が上がるのか。

(回答) 運動療法により EPC が増加し、新生血管が促進されるとの報告がある。また、歩行距離が延長することも広く知られている。さらに、下腿の筋肉量が増加することも PAD の改善の大きな要因になっている。和温療法と運動療法を組み合わせることは効果的であり、QOL の改善にも大きく寄与する。

質問 17) 1 回の和温療法で CD34 陽性細胞は動員されるのか。急性効果について検討したのか。

(回答) 急性効果に関しては、今回検討していない。今後の検討課題である。

質問 18) 和温療法の中の時期に CD34 陽性細胞が増えるのか。

(回答) 今回の研究では、前と 6 週間後の比較のみで、その間の経時的な測定はしていない。和温療法で症状改善が見られるのが、概ね 1 ヶ月くらいであることから、早くても 4 週間前後経過してから増加するのではないかと考えているが、今後の検討課題にしたい。

質問 19) 和温療法が骨髄に作用して CD34 陽性細胞が動員されたのか。

(回答) CD34 陽性細胞は骨髄から動員される幼弱な細胞なので、今回の研究でも骨髄から動員されたと考えられる。機序に関しては、幹細胞の動員には、骨髄内で NO が関与していることが言われている。従って、和温療法により増加した NO が骨髄内で作用して CD34 陽性細胞を動員したと推測しているが、どういうメカニズムで骨髄に和温療法が作用するかの詳細については、今後研究する必要がある。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。