

20020828

厚生労働科学研究研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用研究事業

「虚血性疾患に対する血管内皮前駆細胞移植の基礎・臨床応用」

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 浅原 孝之

平成15(2003)年3月

この研究業績報告書は、厚生労働科学研究補助金、基礎研究成果の臨床応用研究事業「虚血性疾患に対する血管内皮前駆細胞移植の基礎・臨床研究」における平成14年度の研究成果をまとめたものである。本研究補助金は平成14年度に開始されたため、これが最初の報告書となる。

本研究では、慢性虚血性心疾患患者および下肢閉塞性動脈硬化症患者に対して、G-CSFの投与により血管内皮前駆細胞を骨髄から末梢血へ強制動員した後、apheresisにより単核球分画を採取し、CD34陽性細胞を血管内皮前駆細胞として分離し、虚血部位に局所移植する臨床研究治療を目標とする。虚血性心疾患例では、経カテーテル的に虚血心筋内へ移植する予定である。それぞれの過程の中で、さらに精密でスケールアップが可能な技術の開発研究も、計画されている。本報告書は、以上の内容の研究における平成14年度の業績を各分担者ごとに報告しまとめあげたもので、各関係者の参考になれば幸いである。

目 次

I. 総括研究報告書

虚血性疾患に対する血管内皮前駆細胞移植の基礎・臨床に関する研究

浅原 孝之（先端医療振興財団 再生医療研究部）…………… 1

II. 分担研究報告

1. 血管内皮前駆細胞トランスレーショナルリサーチに関する研究
浅原 孝之（先端医療振興財団 再生医療研究部）…………… 3

2. 遺伝子導入による機能強化EPCを用いた血管再生療法の開発に関する研究

増田 治史（東海大学医学部 再生医学センター）…………… 5

3. 血管内皮前駆細胞分化動態に関する研究

村澤 聡（先端医療振興財団 再生医療研究部）…………… 7

4. 自己血管内皮前駆細胞の移植技術の開発に関する研究

西村 浩美（先端医療振興財団 再生医療研究部）…………… 9

5. 血管内皮前駆細胞の採取・培養に関する技術的検討に関する研究

西川 光郎（キリンビール株式会社 医薬カンパニー医薬探索研究所）… 1 1

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 1 3

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 1 7

虚血性疾患に対する血管内皮前駆細胞移植の基礎・臨床

主任研究者 浅原 孝之 先端医療振興財団 再生医療研究部長

研究要旨 慢性虚血性心疾患患者および下肢閉塞性動脈硬化症患者に対する、自己血管内皮前駆細胞(EPC)移植治療法の開発を進めている。G-CSF の投与により血管内皮前駆細胞を骨髓から末梢血へ強制動員した後に、apheresis により単核球分画を採取し、CD34 陽性細胞を血管内皮前駆細胞として分離し、虚血部位に局所移植する治療が検討されている。本年度は、血管内皮前駆細胞の動員・採取法・増幅効率の向上、および移植技術の開発が検討された。

分担者名

浅原 孝之 先端医療振興財団
再生医療研究部長
増田 治史 東海大学医学部
再生医学センター 研究主任
村澤 聡 先端医療振興財団
主任研究員
西村 浩美 先端医療振興財団
主任研究員
西川 光郎 キリンビール株式会社
医薬カンパニー
医薬品探索研究所
グループリーダー

3. 心筋虚血改善に必要なEPC投与数に関する検討。

4. EPCのカテーテル移植法の開発

B. 研究方法

西川は、各種増殖因子を投与した場合のEPCの生体内増幅・採取技術の開発を進めている。増田は、各種増殖因子を用いてEPCの生体外増幅を研究している。村澤は、化学製剤であるスタチン製剤で生体内増幅をはかり、臨床的にEPCを活用する方法を検討している。西村は、細胞移植方法の改善とその評価方法の確立を目指し、臨床研究の体制を確立している。浅原は、各開発技術が臨床応用出来るように、研究全体を把握し改善することで、前臨床研究を実際の臨床研究に結びつける検討を重ねている。

A. 研究目的

これまでの研究で細胞移植法では十分な臨床効果を得るための細胞準備・移植方法が検討されていなかった。

そこで、以下の項目について検討がなされた。

1. より多くのEPCを得るための採取法の検討。
2. 得られたEPCの体外での増幅法に関する検討。

C. 研究結果

EPCは、各種方法で有意に増幅出来ることが確認された。動物実験の結果、安全に細胞は心筋に移植され、虚血心筋内の血管形成は著名に促進された。虚血心臓の機能回復も細胞治療を受けた群だけが著名に改善

を遂げた。

D. 考察

臨床治療に必要な EPC の数を確保することは困難であり、効率良く EPC を採取することが必須となってくる。これまでの検討で、G-CSF で EPC の動員が有意に促進された。この結果を、上記診断治療カテーテルによる細胞移植と組み合わせ、精密で効果的な治療効果を得る技術の確立出来るめどがたつたと考えられる。

E. 結論

EPCの生体内・生体外増幅が可能である。カテーテルによる心筋虚血部位への細胞移植方法は、安全かつ効果的に治療出来ることが判明した。

F. 健康危険情報

ヒトへの応用に関して、臨床で応用出来るよう、検討を重ねている。

G. 研究発表

[1. 論文発表]

1. Kawamoto Atsuhiko, Heon-Cheol Gwon, Hideki Iwaguro, Jun-Ichi Yamaguchi, Shigeki Uchida, Haruchika Masuda, Marcy Silver, Hong Ma, Marianne Kearney, Jeffrey M. Isner, Takayuki Asahara. Therapeutic Potential of *Ex Vivo* Expanded Endothelial Progenitor Cells for Myocardial Ischemia. *Circ.*2001;103:634-637.

2. Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002; 11: 171-178.

3. Asahara T, Kawamoto A, Kalka C, Masuda H. Therapeutic potential of bone marrow-derived endothelial progenitor cell for cardiovascular ischemic diseases. *Gene Ther Reg.* 2002; 4(4):395-402.

4. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T. Endothelial progenitor cell VEGF gene transfer for vascular regeneration. *Circ.* 2002; 105: 732-738.

5. Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Asahara T, et al. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circ.* 2002; 106: 1133-1139.

6. Murayama T, Asahara T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *Curr Opin Mol Ther.* 2002; 4(4): 395-402.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今年度は予定なし。

血管内皮前駆細胞トランスレーショナルリサーチ

分担研究者 浅原 孝之 先端医療振興財団 再生医療研究部長

研究要旨 慢性虚血性心疾患患者および下肢閉塞性動脈硬化症患者に対する、自己血管内皮前駆細胞(EPC)移植治療法の開発を進めている。G-CSF の投与により血管内皮前駆細胞を骨髄から末梢血へ強制動員した後に、apheresis により単核球分画を採取し、CD34 陽性細胞を血管内皮前駆細胞として分離し、虚血部位に局所移植する治療が検討されている。今年度はカテーテルを用いた細胞移植法に関する基礎研究が進められた。

A. 研究目的

これまでの研究で細胞移植法では十分な臨床効果を得るための細胞の移植場所を同定することが困難であった。特殊診断治療カテーテルを用いた細胞移植法に関する基礎研究が進められた。

B. 研究方法

カテーテルの位置、接触組織の生体反応と壁運動をセンサーで同定し、実際の虚血部位を診断する装置（NOGA system）を豚の心筋梗塞モデルに用いた。虚血部位と診断された箇所、カテーテル先端から細胞移植用の針が挿入され、用意した血管内皮前駆細胞EPCを移植した。血管内皮前駆細胞は、心筋梗塞病巣が確立後4週目に、自己血液から採取され、病巣に移植され、4週間後に機能検査・組織検査など施行された。

C. 研究結果

動物実験の結果、安全に細胞は心筋に移植され、虚血心筋内の血管形成は著明に促

進された。虚血心臓の機能回復も細胞治療を受けた群だけが著明に改善を遂げた。

D. 考察

臨床治療に必要な EPC の数を確保することは困難であり、効率良く EPC を採取することが必須となってくる。これまでの検討で、G-CSF で EPC の動員が有意に促進された。この結果を、上記診断治療カテーテルによる細胞移植と組み合わせ、精密で効果的な治療効果を得る技術の確立出来るめどがたつたと考えられる。

E. 結論

カテーテルによる心筋虚血部位への細胞移植方法は、安全かつ効果的に治療出来ることが判明した。

F. 健康危険情報

ヒトへの応用に関して、本カテーテルはすでに臨床で使用されているので安全性については確認されている。

G. 研究発表

[1. 論文発表]

1. Kawamoto Atsuhiko, Heon-Cheol Gwon, Hideki Iwaguro, Jun-Ichi Yamaguchi, Shigeki Uchida, Haruchika Masuda, Marcy Silver, Hong Ma, Marianne Kearney, Jeffrey M. Isner, Takayuki Asahara. Therapeutic Potential of *Ex Vivo* Expanded Endothelial Progenitor Cells for Myocardial Ischemia. *Circ.*2001;103:634-637.
2. Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002; 11: 171-178.
3. Asahara T, Kawamoto A, Kalka C, Masuda H. Therapeutic potential of bone marrow-derived endothelial progenitor cell for cardiovascular ischemic diseases. *Gene Ther Reg.* 2002; 4(4):395-402.

4. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T. Endothelial progenitor cell VEGF gene transfer for vascular regeneration. *Circ.* 2002; 105: 732-738.
5. Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Asahara T, et al. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circ.* 2002; 106: 1133-1139.
6. Murayama T, Asahara T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *Curr Opin Mol Ther.* 2002; 4(4): 395-402.

H. 知的財産権の出願・登録状況
今年度は予定なし。

遺伝子導入による機能強化 EPC を用いた血管再生療法の開発

分担研究者 増田 治史 東海大学医学部 再生医学センター 研究主任

研究要旨 虚血性疾患を有する高齢患者の自己血由来 EPC 機能が低下しているため、自己 EPC 移植治療においては、EPC への血管新生促進遺伝子の導入や臍帯血由来 EPC の使用などの EPC 機能強化を図る必要がある。本年度は、VEGF（血管内皮細胞成長因子）の遺伝子を導入することによる機能強化 EPC 移植療法の有効性を証明した。

A. 研究目的

虚血性疾患の EPC による治療的血管再生において、自己血由来 EPC の採取における患者負担の軽減と高齢患者での効果を期待して、VEGF 遺伝子を導入した強化 EPC 移植による血管再生療法の有効性を評価した。

B. 研究方法

1) 成人末梢血単核球を採取後、ex vivo にて培養し、EPC の増殖・分化誘導を施行した。7 日目にアデノウイルスベクターにより VEGF 遺伝子を培養 EPC に導入した。

2) in vivo において重症下肢虚血モデルをマウスにおいて作製し、同日、VEGF 遺伝子導入 EPC を尾静脈より移植（ 1.5×10^4 /mouse）した。経日的に Laser Doppler による血流測定(LD)、肉眼的下肢機能評価、組織学的評価を行った。

C. 倫理面への配慮

基礎実験に伴うヒトからの EPC の採取においては、患者又はボランティアにその使用目的等につき十分にインフォームドコンセントを行った。また動物実験は愛護規則に従って行った。

D. 研究成果

細胞移植後、4 週間後の LD による評価において、非遺伝子導入 EPC、コントロール遺伝子導入 EPC 移植群に比較し、VEGF 遺伝子導入 EPC 移植群は、有意に約 2 倍の血流改善が認められた。肉眼的下肢 salvage 評価において、VEGF 遺伝子導入 EPC 移植群では、約 60% 認められたのに対し、非遺伝子導入 EPC、コントロール遺伝子導入 EPC 移植群では、全く認められなかった。

E. 考察

治療に用いる移植 EPC 数は VEGF 遺伝子を EPC に導入することにより、非遺伝子導入 EPC 数の約 3% の数量で同等の有効性が示された。これは、機能強化 EPC 移植療法により患者の自己血由来 EPC の採取において、患者負担を軽減させる意義があるものと考えられる。

F. 結論

虚血性疾患に対する遺伝子導入/機能強化 EPC による血管新生療法の有効性、患者負担軽減における意義が示された。

G. 健康危険情報

アデノウイルスベクターの危険性が指摘されているが、米国において臨床使用例が報告されており(Laham R et al., Expert Opin Biol Ther 2001)副作用は認められなかった。本邦では、非ウイルス性ゼラチンハイドロゲルによる代替遺伝子導入法が開発されている(Yamamoto M et al., J Biomater Sci Polym Ed. 2001)。

H. 研究発表

1. 論文発表

Iwaguro H, Masuda H, Asahara T et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. Circulation. 2002, 105:732-738.

2. 学会発表

Iwaguro H, Masuda H, Asahara T et al., 第66回日本循環器学会学術集会. 2002/4/25. Incorporation of ex vivo expanded VEGF-expressing EPCs into foci of neovascularization.

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

1. その他

特記事項なし

血管内皮前駆細胞分化動態

分担研究者 村澤 聡 先端医療振興財団 主任研究員

研究要旨 慢性虚血性心疾患患者および下肢閉塞性動脈硬化症患者に対して、G-CSF の投与により血管内皮前駆細胞を骨髓から末梢血へ強制動員した後に、apheresis により単核球分画を採取し、CD34 陽性細胞を血管内皮前駆細胞(EPC)として分離し、虚血部位に局所移植する治療が検討されている。今年度は効率の良い移植技術を開発するための研究を行った。具体的には、G-CSF 以外にスタチン製剤が EPC 動員に関与し、血管再生に有効であるかどうかについて検討を行った。

A. 研究目的

これまでの研究で細胞移植単独では十分な臨床効果を得るための細胞の数を確保することが困難であった。G-CSFがEPCを動員することが明らかになっているが、スタチン製剤が同様に有効かどうかについて検討した。

B. 研究方法

スタチン製剤を投与したマウスを用いてEPCによる血管新生を角膜モデルで検討する。体外培養されたヒトEPCをスタチン製剤で刺激し、EPCの増殖、移動を確認する。

（倫理面への配慮）

細胞治療としての倫理面での配慮は、公的機関・私的機関（先端医療センター倫理委員会）と密接な検討を加える予定で、文書による説明と同意を取得するべく準備を進めている。

C. 研究結果

動物実験の結果、スタチン製剤を投与したマウスにおいてコントロール群に比べ角

膜のEPCによる血管新生が明らかに亢進していた。またin vitroの実験の結果、スタチン製剤はEPCの増殖、および移動を亢進させた。

D. 考察

臨床治療に必要な EPC の数を確保することは困難であり、効率良く EPC を採取することが必須となってくる。これまでの検討で、G-CSF が1つの候補として挙がっているが、今回スタチン製剤が EPC の動員に関与することが明らかになった。虚血性疾患患者は背景に高コレステロール血症を合併していることが多くすでに同薬剤が投与されている場合が多いが、EPC による細胞治療の際により良い効果を発揮する可能性が示唆された。

E. 結論

スタチン製剤が骨髓から末梢血へのEPCの動員に関与し、虚血性疾患に対する細胞治療において、より効率良く細胞採取が行えることが期待される。

F. 健康危険情報

ヒトへの応用に関して、スタチン製剤はすでに臨床で広く使用されているので安全性については確認されている。

G. 研究発表

[1. 論文発表]

1. **Murasawa S**, Llevadot J, Kureishi Y, et al.
HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells.
J Clin Invest, 108(3): 399-405, 2001
2. **Murasawa S**, Llevadot J, Silver M, et al.
Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells.
Circulation, 106(9): 1133-1139, 2002
3. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C,
Murasawa S, et al.
Endothelial progenitor cell VEGF gene transfer for vascular regeneration
Circulation, 105(6): 732-738, 2002

[2. 学会発表]

1. 軽井沢 (軽井沢プリンスホテル)
International Vascular Biology Meeting (IVBM) 2002 (2002.5.13)
2. フランス (Nice Acropolis)
13th International Congress (2002.6.19)
3rd International Symposium on Angiogenesis and Direct Myocardial Revascularization
3. 神戸 (神戸国際会議場)
第34回日本動脈硬化学会総会 (2002. 7. 19)

H. 知的財産権の出願・登録状況

今年度は予定なし。

自己血管内皮前駆細胞の移植技術の開発

分担研究者 西村 浩美 先端医療振興財団 主任研究員

研究要旨 虚血性心疾患や下肢閉塞性動脈硬化症の血管再生に自己の末梢血から分離される血管内皮前駆細胞（以下 EPC）を利用する治療法はドナーを必要とせず、拒絶反応・倫理面の問題もなく有望であるが、得られる EPC の数により治療できる虚血領域は制限されている。本研究分担ではより広い虚血領域の血管再生を行うために、以下の技術確立・安全性に関する検討を行う。

A. 研究目的

これまでの動物実験で、血管内皮前駆細胞（以下EPC）の投与が虚血の改善に有効であることが判明したが、臨床効果を得るための細胞数を確保することが困難であった。

本研究分担はより広い虚血領域の血管再生を行うために、以下の技術確立・安全性確認を目的とする。

1. より多くのEPCを得るための採取法の検討。
2. 得られたEPCの体外での増幅法に関する検討。
3. 心筋虚血改善に必要なEPC投与数に関する検討。

B. 研究方法

課題1については対象患者にG-CSF（顆粒球増殖因子）の事前投与にて骨髓から末梢血へEPCを動員した後、アフエレーシスを行う。EPCの表面抗原であるCD34が陽性の細胞の収量を検討する。

課題2についてはEPCを自己血清と増殖因子を使用し、至適条件の検討を行う。

課題3については既に米国にて行って来た豚心臓虚血モデルにおいて、NOGAシステムにて虚血部を同定し、経カテーテル的に局所投与する方法の有効性を血流の改善度、梗塞範囲、毛細血管密度、左室壁運動の観点より検証する。

（倫理面への配慮）

細胞治療としての倫理面での配慮は、公的機関・私的機関（先端医療センター倫理委員会）と密接な検討を加える予定で、文書による説明と同意を取得するべく準備を進めている。

C. 研究結果

課題1の臨床研究については15年4月に開院する先端医療センターにて開始するため現在のところ結果は得られていない。

課題2については各種の増殖因子を用いて条件検討中である。課題3については200mlの末梢血から得られるCD31陽性単核球成分100万個を心内膜から投与することで、梗塞範囲縮小、毛細血管密度増加、左室壁運動改善が得られた。

D. 考察

課題3において豚 CD34 を認識する抗体が無い場合、CD31 陽性の浮遊細胞を CD34 陽性細胞のかわりに用いた。両者ともに EPC と考えられるが、採取法が異なる点を留意しておく必要がある。著明な合併症は認められなかったが、NOGA 術中に生じる心室性期外収縮については注意を要する。

E. 結論

豚狭心症モデルにおいて自己末梢血より得られた EPC を心内膜から経カテーテル的に虚血部に局所投与することで、血管新生・血管発生が促進され、心機能は有意に改善する。この結果は今日までマウスやラット等の小動物で確認されて来た EPC の虚血性心疾患治療への有効性を、大動物でも実証するものであり、臨床応用への橋渡しの役割を果たした。

F. 健康危険情報

ヒトへの応用には、G-CSF 投与、アフエーシス、NOGA システムは個々には既に臨床的に実施されているが、一連の流れで組み合わせておこる危険性については更に検討を加えて実施する必要がある。

G. 研究発表

[1. 論文発表]

1. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, **Nishimura H**, et al.

Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells.

Circulation. 2002 Jun 25; 105(25):3017-24.

2. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, **Nishimura H** et al.

Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia.

Circulation. 2003 Jan 28; 107(3):461-8.

[2. 学会発表]

1. 日本循環器病学会

学術集会 シンポジウム

(札幌：平成14年4月24日)

Co-operative vasculogenesis and neurogenesis from adult neural stem cells.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

血管内皮前駆細胞の採取・培養に関する技術的検討

分担研究者 西川 光郎 キリンビール株式会社 医薬探索研究所

研究要旨 G-CSF 動員末梢血中に循環血管内皮前駆細胞と考えられる、CD34+AC133+KDR+細胞が存在することを確認した。

A. 研究目的

G-CSFの動員により、血管再生能力のある血管内皮前駆細胞を得られることを検証する。

B. 研究方法

G-CSFにより動員した後に得られた末梢血CD34+細胞を用い、表面抗原をFACSにより解析し、血中循環している血管内皮前駆細胞の存在を確認する。

（倫理面への配慮）

提供者へのインフォームドコンセントが医療機関において行われている。またこれらの実験については、キリンビール株式会社群馬地区研究所研究倫理委員会で審査の上使用が認められた細胞である。

C. 研究結果

G-CSFにより動員した後に得られた末梢血CD34+細胞を用い、表面抗原をFACSにより解析した。その結果、血液中を循環している血管内皮前駆細胞と考えられているCD34+AC133+KDR+細胞の存在を認め、その存在比率は総CD34+細胞のうち、0.6%であった。

D. 考察

G-CSF で動員される末梢血 CD34+細胞に血管内皮前駆細胞の存在が示唆された。

G-CSF の動員により、血管再構築能を有する細胞が大量に得られる可能性を示したと考えられ、実際の血管再生医療を目指す上で、その足がかりになると思われる。

E. 結論

G-CSFによる動員末梢血CD34+細胞中に血管内皮前駆細胞の存在が示唆された。

F. 健康危険情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表
とくになし
2. 学会発表
とくになし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
とくになし
2. 実用新案登録
とくになし
3. その他
とくになし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Murayama T., Tepper O.M., Asahara T. et al	Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo	Experimental Hematorogy	30	967-972	2002
Iwaguro H, Yamaguchi J, Asahara.T et al	Endothelial Progenitor Cell Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transfer for Vascular Regeneration	Circulation	105	732-738	2002
Murasawa S, Llavadot J, Asahara.T et al	Constitutive Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression Enhances Regenerative Properties of Endothelial Progenior Cells	Circulation	106	1133-1139	2002
Murayama T, Tepper O.M., Asahara T. et al	Intramyocardial Transplantation of Autologous Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Neovascularizaion of Myocardial Ischemia	Circulation	107	461-468	2003

20020828

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.15の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。