

20030689

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

「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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 浅原 孝之

平成16（2004）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15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、これが第2年度の報告書となる。

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臨床研究治療の技術開発と実施を目標とする。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15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

血管内皮前駆細胞トランスレーショナルリサーチ総括 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. 虚血性疾患患者に対する自家血管内皮前駆細胞移植による血管 再生治療に関する研究 川本篤彦（先端医療振興財団 再生医療研究部）	5
3. 効率的な細胞増幅・採取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）	9
4. 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）	11
5. 血管内皮前駆細胞による血管再生治療の正否に関わる因子の検 討に関する研究 西村 浩美（先端医療振興財団 再生医療研究部）	13
6. 効率的な細胞増進・採取法の確率に関する研究 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）	15
7. 次世代の血管内皮前駆細胞を用いた遺伝子治療法の開発に関す る研究 岩畔 英樹（東海大学医学部 再生医学センター）	17

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	23
-----------------	----

総括研究報告書

血管内皮前駆細胞トランスレーショナルリサーチ総括

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。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。これらの前記成績を応用して、下肢虚血性疾患の臨床研究を開始した。

分担者名

浅原 孝之 先端医療振興財団  
再生医療研究部長  
川本 篤彦 先端医療振興財団  
主任研究員  
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  
岩畔 英樹 東海大学医学部  
再生医学センター 研究員  
西川 光郎 キリンビール株式会社  
医薬カンパニー  
医薬探索研究所  
グループリーダー

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。
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
5. EPC 治療法臨床プロトコールの研究

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。岩畔は、EPC の生体治療能力を高めるための、細胞の制御方法について研究を始めている。村澤は、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。川本は、トランスレーショナル

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

ル研究の最終段階である前臨床実験を担当し、臨床試験の最終準備を進めた。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最終検討を重ねた。

(倫理面への配慮)

上記の臨床試験は、先端医療センター再生医療審査委員会・神戸市立中央市民病院倫理委員会から実施の承認を得た後に、被験者から同意を得て開始される。

### 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。G-CSF あるいはスタチンなどで、EPC を体内増殖出来ることも確認できた。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、効率良く質の高い 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ったと考えられる。実際に臨床研究が開始され、そのフィードバックを受けたさらなるトランスレーショナルリサーチが期待される。

### 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、臨床で応用出来ると

いう安全性も確認され、初期治療が開始されている。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circ.* 2003; 107:461-468.

Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation.* 2003;107:1322-1328.

#### 2. 学会発表

- ・第 51 回日本心臓病学会学術集会  
パネルディスカッション (2003. 9. 9- 東京)
- ・第 35 回日本動脈硬化学会総会  
シンポジウム講演・座長 (2003. 9. 27- 京都)
- ・バイオフィオーラム 2003 大阪  
シンポジウム講演 (2003. 10. 23- 大阪)
- ・心血管幹細胞研究会  
講演 (2004. 1. 15- 東京)
- ・山形血管止血セミナー  
講演 (2004. 1. 21- 山形)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)  
今年度は予定無し

分担研究報告書

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および臨床研究プロトコールの開発が進められた。

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を目的とした。また、実際の臨床研究プロトコールの開発が計画された。

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。臨床計画のためのプロトコール開発では、神戸に設立されたトランスレーショナルリサーチインフォーマティクスセンター（TRI）での検討

によるプロトコール作成が進められた。

（倫理面への配慮）

上記の臨床研究プロトコールは、先端医療センター再生医療審査委員会・神戸市立中央市民病院倫理委員会から実施の承認を得た後に、被験者から同意を得て開始される。

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。

エンドポイントに関する検討も含め、臨床研究プロトコールが作成され、臨床研究に応用された。

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 の動員が優位に促進された。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ったと考えられる。

臨床研究プロトコルの開発は、臨床研究からのトランスレーショナルリサーチへのフィードバックを反映させるためにも、不可欠のものであると考える。

#### 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。

臨床研究プロトコルの綿密性は、臨床研究からのトランスレーショナルリサーチへのフィードバックに反映される。

#### 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

Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circ.* 2003; 107:461-468.

Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation.* 2003;107:1322-1328.

##### 2. 学会発表

・第51回日本心臓病学会学術集会  
パネルディスカッション (2003.9.9- 東京)

・第35回日本動脈硬化学会総会  
シンポジウム講演・座長 (2003.9.27- 京都)

・バイオフィォラム 2003 大阪  
シンポジウム講演 (2003.10.23- 大阪)

・心血管幹細胞研究会  
講演 (2004.1.15- 東京)

・山形血管止血セミナー  
講演 (2004.1.21- 山形)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

今年度は予定無し

分担研究報告書

虚血性疾患患者に対する自家血管内皮前駆細胞移植による血管再生治療

分担研究者 川本 篤彦 先端医療振興財団 主任研究員

研究要旨 重症慢性下肢虚血および虚血性心疾患患者を対象にした、自家血管内皮前駆細胞移植による血管再生治療に関する第Ⅰ・Ⅱ相臨床試験を計画した。下肢虚血に対する試験計画は、先端医療センター・神戸市立中央市民病院の倫理委員会で実施の承認を得て、2003年11月から移植治療が開始されている。現時点で重篤な有害事象は発生せず、自他覚所見の改善が得られている。虚血性心疾患患者に対する臨床試験も2004年春の開始を目指して準備を進めている。

A. 研究目的

重症慢性下肢虚血、虚血性心疾患患者に対する自家血管内皮前駆細胞（CD34陽性細胞）移植の臨床的有用性を明らかにする。

B. 研究方法

上記の細胞移植治療に関する第Ⅰ・Ⅱ相試験を計画し、施行する。科学的に臨床試験を施行するため、独立したデータセンター、登録センターと共同で研究を進める。

（倫理面への配慮）

上記の臨床試験は、先端医療センター再生医療審査委員会・神戸市立中央市民病院倫理委員会から実施の承認を得た後に、被験者から同意を得て開始される。

C. 研究結果

重症慢性下肢虚血患者に対する上記臨床試験は、上記の手続きを経て、昨年11月に開始された。顆粒球コロニー刺激因子製剤の投与により

末梢血に動員された骨髓単核球細胞をアフエーシスで採取し、磁気細胞分離により単核球から分離された血管内皮前駆細胞（CD34陽性細胞）を虚血下肢の筋肉内に移植している。現在までに2例の患者に対する移植が安全に行われ、自他覚所見の著明な改善が得られている。虚血性心疾患に対する臨床試験も2004年春の開始を目指して現在準備中である。

D. 考察

臨床試験の開始に先立って、豊富な基礎研究データの準備が重要であることは言うまでもないが、患者の倫理面に配慮し、移植治療を安全かつ有効に施行するためには、綿密に臨床試験を計画し、詳細な臨床試験プロトコルを作成することが重要である。今回、GCP規準臨床試験に準拠したプロトコルを作成することにより、臨床試験を安全にかつ科学的で、再現性の期待できる形で開始することができた。

E. 結論

重症慢性下肢虚血患者に対する自家血管内皮前駆細胞 (CD34 陽性細胞) 移植に関する第 I・II 相臨床試験を開始した。虚血性心疾患に対する同様の臨床試験も現在準備中である。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Iwakura A, Luedemann C, Kawamoto A, Shastry S, Asahara T, Losordo DW. Estrogen augments incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of myocardial neovascularization. *J Am Coll Cardiol*. 2003 ;41(6 Suppl B):542.

Yamaguchi J-I, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on *ex vivo* expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003;107(9):1322-8.

##### 2. 学会発表

Kawamoto A, Kusano K, Tkebuchava T, Shintani S, Johnson I, Murayama T, von Samson P, Hanley A, Ma H, Silver M, Kearney M, Losordo DW. Synergistic effect of bone marrow mobilization and VEGF-2 gene transfer in chronic myocardial ischemia. Scientific sessions 2003, American Heart Association. November 11, 2003. Orlando, FL, USA. *Circulation*. 2003;108 (Suppl IV): IV-144.

Kusano K, Munger W, Curry C, Murayama T, Kawamoto A, Iwakura A, Shintani S, von Samson P, Kishore R, Yoon Y-S, Leudemann C, Hanley A, Ma H, Silver M, Eaton E, Heyd L, Kearney M, Porter JA, Losordo DW. Sonic Hedgehog gene therapy in myocardial ischemia: transient reconstitution of embryonic signaling preserves cardiac function. Scientific sessions 2003, American Heart Association.

November 11, 2003. Orlando, FL, USA. *Circulation*. 2003;108 (Suppl IV): IV-158.

Murayama T, Iwakura A, Kawamoto A, Kusano K, Hanley A, Losordo DW. Synergistic effects of combined angiogenic gene therapy and bone marrow mobilization in ischemic heart disease.

Scientific sessions 2003, American Heart Association. November 11, 2003. Orlando, FL, USA. *Circulation*. 2003;108 (Suppl IV): IV-155.

#### 川本 篤彦

血管再生医療の現状と将来展望

第 14 回生物試料分析科学会大会 教育講演  
2004 年 1 月 25 日、神戸

#### Kawamoto A.

Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Neovascularization  
Global Endovascular Therapy 2003  
December 6, 2003. Seoul, Korea.

#### 川本 篤彦

幹細胞生物学の再生医学への応用  
第19回日本小児がん学会 ランチョンセミナー  
2003年11月28日、東京

川本 篤彦  
血管内皮前駆細胞移植による心血管再生療法の  
トランスレーショナルリサーチ  
第18回近畿MMC研究会 特別講演  
2003年9月13日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得  
特記事項なし

2. 実用新案登録  
特記事項なし

3. その他  
特記事項なし

## 効率的な細胞増幅・採取法の開発に関する研究

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** 血管内皮前駆細胞（EPC）移植療法開発の根幹である自己血由来 EPC の効率的増幅法の確立に当たり、臍帯血由来未分化 EPC（AC133 陽性細胞）を材料として採取し、*ex vivo* での無血清下増幅法を検討した。2 週間の無血清培養にて未分化 EPC 及び分化過程 EPC の増幅に成功し、増幅 EPC の機能評価法をも開発し、今後、自己血由来 EPC についてもこれらの増幅法、評価法が有効であることが確認されれば、臨床治療に大きく貢献することが期待される。

### A. 研究目的

臍帯血を用いて無血清条件下における未分化 EPC の *ex vivo* 無血清下効率的増幅法を開発し、増幅後 EPC の機能評価法を確立することにより、血管内皮前駆細胞（EPC）移植療法の臨床応用を実現可能にする。

### B. 研究方法

1) 臍帯血より密度勾配遠心法により単核球を採取後、抗体ビーズ法を用いて未分化 EPC (AC133 陽性細胞) を採取した。無血清培地を用いて VEGF, SCF, TPO 等の成長因子、サイトカインの組み合わせに基づき、14 日間培養し、フローサイトメトリーによる細胞数の算出及び KDR, CD34, AC133 の EPC 細胞表面抗原を検討することにより、EPC 増幅効率を検討した。また、VEGF, Bfgf 等の血管形成促進性成長因添加 semi-solid culture system (methylcellulose 法) を用いて 14 日-18 日間培養を行い、コロニー形成アッセイを行った。

### C. 倫理面への配慮

臍帯血は厚生労働省及び東海大学医学部倫理委員会承認臍帯血バンクより提供された。

### D. 研究成果

14 日間の無血清培養により、全細胞数は、1,000 倍程度に増加した。また、増幅細胞の CD34+/KDR+陽性率 (EPC 細胞) は、10%程度あり、EPC は、100 倍に増幅された。さらにコロニー形成アッセイにより、形成された EPC コロニー能は、播種された同一細胞数当り約 2 倍、総細胞数当り 200 倍に増幅された。

### D. 考察

適切な成長因子、サイトカインの組み合わせを考慮することにより無血清培養条件下において機能性 EPC の増幅が可能であることが示唆された。

### E. 結論

無血清培養により機能性 EPC の分化・増幅が

可能であることが示され、今後、さらに効率的無血清培養法を検討した後、臨床応用を考えて、患者の身体的負担及び倫理的問題を解決するために末梢血についても適切な成長因子、サイトカインの組み合わせによる無血清培養法を検討する。また、虚血性疾患動物モデルを用いて、増幅後細胞移植の有効性を検討する。

なし

#### I. その他

特記事項なし

#### F. 健康危機情報

本研究においては、臨床成体応用を目指した無血清培養であり特に有害物質は使用していない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res.* 2003, 58(2):390-398.

2) Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation.* 2003, 107(9):1322-1328.

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

分担研究報告書

血管内皮前駆細胞分化動態に関する研究

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** 虚血性疾患患者に対して、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開始された。血管内皮前駆細胞が虚血領域で内皮細胞への分化のみならず、心筋においては心筋細胞への分化を起こす可能性が示唆され、今年度は共培養系を用いてこの現象を明らかにするための検討を行った。

A. 研究目的

血管内皮前駆細胞が心筋細胞との共培養にて心筋細胞に分化するかどうかについて検討した。

B. 研究方法

ヒト由来血管内皮前駆細胞とラット由来心筋芽細胞の共培養系を確立し、ヒト特異的心筋マーカーを用いて、血管内皮前駆細胞が心筋細胞に分化しうるかどうかについて検討した。

C. 研究結果

ヒト由来血管内皮前駆細胞とラット由来心筋芽細胞の共培養系からのサンプルを用いて、RT-PCRを行ったところ、ヒト特異的心筋マーカーの発現を認めた。また固定共培養細胞の蛍光染色を行ったところ、ヒト特異的心筋抗体に陽性の細胞を認めた。

D. 考察

これまでの研究で、免疫不全ラットに心筋梗塞を作成したモデルにヒト末梢血由来血管内皮前駆細胞移植を施したところ、虚血境界領域において血管再生が認められ、心機能が改善することが示されてきた。今回の検討にて、血管内皮前駆細胞が血管内皮細胞のみならず心筋細胞へも分化しうるということが培養細胞レベルで明らかになった。しかし、今回の検討では心筋細胞への分化の割合は比較的 low、この結果からは心筋再生が心機能に関与している可能性は低いと考えられる。今後は動物モデルに細胞移植を行い、心筋再生の頻度を確認する必要があると思われる。

E. 結論

血管内皮前駆細胞は、細胞周囲の微小環境 (Niche) によって、血管内皮細胞のみならず心筋細胞へも分化しうる。

F. 健康危険情報

ヒトへの応用に関して、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開始されたが、現在のところ細胞移植に伴い、問題となるような健康危険情報は認められていない。

G. 研究発表

[1. 論文発表]

1. Yamaguchi J, Kusano K, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, et al.

Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization.

Circulation, 107(9): 1322-8, 2003

[2. 学会発表]

1. 第45回日本老年医学会学術集会  
若手企画シンポジウム発表  
(2003.6.20---名古屋)

2. 第10回日本遺伝子診療学会大会  
シンポジウム発表(2003.7.24---大阪)

3. Molecular Mechanism of---Heart Failure

、 American Heart Association,ポスター発表  
(2003.8.14---Salt Lake City, USA)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

今年度は予定なし。

分担研究報告書

血管内皮前駆細胞による血管再生治療の成否に関わる因子の検討

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** 血管内皮前駆細胞（EPC）については血管再生への利用を含め多くの臨床応用の可能性が検討されている。自己末梢血由来 EPC は、密度勾配遠心法により分離された単核球成分を培養することにより分離しているため、全ての細胞の性質が等しいとは考えられていない。本研究では個別の細胞の動態と遺伝子発現を組み合わせることで検討することにより、より血管再生に適した EPC の subpopulation を同定するためのシステム確立とその同定に関する検討を行った。

A. 研究目的

細胞一個単位で、EPC の動態と遺伝子発現を組み合わせることで検討し、より血管再生に適した EPC の subpopulation を同定するためのシステム確立とその同定。

B. 研究方法

FACS system と Single cell PCR system と Time-laps system を用いた細胞の cell characteristics の解明と血管内皮前駆細胞への分化誘導法の確立および血管再生能との相関を検討する。

（倫理面への配慮）

細胞治療に関わる基礎研究として、倫理面では先端医療センター倫理委員会での研究計画の承認を得たうえで、研究は実施されている。

C. 研究結果

培養に必要な恒温設備と加湿器を備えた密

閉空間で顕微鏡の観察台を囲み、最長2週間に渡る生細胞の経時的観測が可能な Time-laps system を作成した。本システムによる培養 EPC の観察により、EPC の初期培養の細胞は3種類の動態を示すことが明らかとなった。それぞれの分画からの細胞を培養し、mRNA 発現を細胞個別に検討中である。

D. 考察

細胞動態、表面抗原、発現 mRNA を解析することにより、より効率的に血管再生を誘導する EPC の subpopulation を同定／分離することが可能と考えられ、より安全かつ効果的な血管再生を臨床現場において実施するための有用な治験が今後、明らかになると考えられる

E. 結論

FACS system と Single cell PCR system と Time-laps system を用い、細胞一個単位で、EPC の動態と遺伝子発現を組み合わせることで検討

し、より血管再生に適したEPCのsubpopulationを同定するためのシステムを確立した。

「血管内皮前駆細胞と血管再生について」  
実験医学 21 (8) p1056-1061, 2003.

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hiroshi Nishimura, Takayuki Asahara. Bone marrow derived endothelial progenitor cells for neovascular formation. Mechanism of Angiogenesis. (in print)

西村浩美、浅原孝之

「血管内皮前駆細胞と血管再生」  
病理と臨床 21 (7) p16-21, 2003.

西村浩美、浅原孝之

「血管内皮前駆細胞の臨床応用」  
最新医学 58(1) p85-90, 2003.

西村浩美、浅原孝之

##### 2. 学会発表

血液／血管オルビス  
神経幹細胞による協調的血管発生と神経再生について  
2003, 9. 12.

京都私立病院協会 学術講演  
再生医療 基礎と臨床  
2003, 12. 3.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 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

分担研究報告書

効率的な細胞増進・採取法の確立

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** 効率的な細胞増進・採取法の確立のために必要となる、サイトカインの作製および動物評価系の確立を実施した。

A. 研究目的

効率的な血管内皮前駆細胞の増進および採取法を開発し、治療に有効な細胞を充分量得ることを目的とする。

B. 研究方法

本年度は、増進・採取した血管内皮前駆細胞の治療における有効性を判断するためにヌードマウスを用いた下肢虚血モデルの確立を行った。本モデルは、すでに他の分担研究者により実施されているが、細胞の血管再生能をより詳細に検出できることを目指し、検討を実施した。また、血管内皮前駆細胞の増進に必要なサイトカインを作製し、他の分担研究者への提供を実施した。

（倫理面への配慮）

ヒト由来血液を用いる実験については、キリンビール株式会社群馬地区研究倫理委員会において承認を受けており、血液の採取時にはインフォームドコンセントを得ている。動物実験については、キリンビール株式会社群馬地区動物実験倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

血管内皮前駆細胞の血管再生能をより詳細に評価するため、ヌードマウス下肢虚血モデルの確立を行った。ブリーダーや結紮位置など、詳細な検討を実施した。その結果、同様な手術を行っても、ブリーダーにより下肢の壊死脱落の割合に違いがあることが判明した。また、大腿動脈の結紮位置において、腹膜に近いところを結紮すると壊死脱落する割合が増加し、下流を結紮するとその割合は減少した。また、血管走行はレーザー血流計では組織の浅い部分しかわからないため、X線による血管造影方法の検討を行い、側副血行路の走行が確認できるまでの造影条件（造影剤、灌流方法）を決定した。

一方、血管内皮前駆細胞増進法の検討を他の分担研究者と実施しており、そこで用いるサイトカイン（TPO, SCF, IL-3, IL-6, PEG-MGDF）を作製、提供した。そこでの検討で得られた血管内皮前駆細胞の血管再生能評価を今年度確立した動物評価系で実施の予定である。

D. 考察

今回の検討により、血管結紮位置を調節することで、モデルとしての寛厳を調節できる

可能性が見出され、また、再生された血管走行の造影が可能となった。今後、増進・採取した血管内皮前駆細胞のより詳細な評価が可能となると期待される。

#### E. 結論

効率的な細胞増進・採取法の確立のために必要となる、サイトカインの作製および動物評価系を確立した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし

##### 2. 学会発表

特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

分担研究報告書

次世代の血管内皮前駆細胞を用いた遺伝子治療法の開発

分担研究者 岩畔 英樹 東海大学医学部再生医学センター 助手

研究要旨：次世代における血管内皮前駆細胞(EPCs)を用いた移植治療の新たな応用  
法として、Hif1-alpha の血管新生性遺伝子導入した血管内皮前駆細胞移植療法の虚  
血性疾患に対する治療有効性を検討し、有効性を示した。

A. 研究目的

虚血性疾患における自己血由来 EPC 移植療法の開発において、血管新生促進遺伝子導入 EPC 移植療法の開発が望まれる。VEGF 遺伝子の GHG による導入 EPC の有効性を示したが、さらに、大動物遺伝子導入実験にてその血管再生への応用が示された hypoxia inducible factor1-alpha (Hif1-alpha) の遺伝子導入 EPC 療法の有効性を検討した。

B. 研究方法

- 1) 成人末梢血由来 EPCs の採取；末梢血より密度勾配遠心法を用いて単核球を分離し、血管内皮細胞用培地を用いて単核球中 EPCs を ex vivo にて7日間、分化・増幅培養した。
- 2) Hif1-alpha 遺伝子導入；上記培養 EPCs にアデノウイルスベクターを用いて Hif1-alpha 遺伝子を導入した。
- 3) 上記遺伝子導入された EPCs の増殖能・遊走能の検討；増殖能は MTS assay kit により、basic FGF に対する遊走能を modified Boyden chamber により行った。
- 4) Hif1-alpha 遺伝子導入 EPC 移植療法の有効性の検討；上記 ex vivo にて培養した EPCs を重

傷下肢虚血マウスモデルに静脈内投与し、  
Laser Doppler Analysis により4週後に評価した。

(倫理面への配慮)

末梢血はボランチアに十分なインフォームドコンセントを施し採血した。また、動物実験は東海大学医学部動物倫理委員会の承認を得て、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針及び動物愛護に基づき施行した。

C. 研究結果

Hif1-alpha 遺伝子導入 EPCs の増殖能・遊走能はコントロール遺伝子導入 EPCs に比し有意に上昇していた。また虚血組織内の新生血管数は、有意に増加しており、Laser Doppler Analysis では Hif1-alpha 遺伝子導入 EPC 移植群において有意に血流の改善が認められた。

D. 考察

Hif1-alpha 遺伝子導入 EPC 移植により、マウス重症下肢虚血部位において機能的な新生血管、血流の改善が認められた。Hif1-alpha は血管再生候補遺伝子として有用であると考えられた。

## E. 結論

血管新生促進遺伝子導入による EPC 移植療法を開発する上で、VEGF とともに Hif1-alpha 遺伝子も有効なものと考えられる。今後は更に効率の良い移植方法や安全性の検討も進めて行く予定である。

## F. 健康危険情報

現時点では特に問題は無いが、更に検討を行う。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon Y, Milliken C, Uchida S, Masuo D, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo D, Isner J, Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia

Circulation 2003; 107: p461-468

### 2.学会発表

Iwaguro H, Iwami Y, Masuda H, Akita GY, Kunimoto S, Nakazawa I, Ishikawa T, Gregory R, Asahara T. Hypoxia inducible factor-1a gene transduction of endothelial progenitor cells for vascular regeneration

(第 67 回日本循環器病学会)

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 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