

Z00500263 A

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

「体外培養の増幅血管内皮前駆細胞移植による虚血性疾患

治療に関する基礎・臨床研究」

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 浅原 孝之

平成 18 (2006) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 体外培養の増幅血管内皮前駆細胞移植による虚血性疾患治療
に関する基礎・臨床研究
浅原 孝之（先端医療振興財団 再生医療研究部） 1

II. 分担研究報告書

1. 体外培養の増幅血管内皮前駆細胞移植による虚血症疾患治療
に関する基礎・臨床研究
川本 篤彦（先端医療振興財団 再生医療研究部） 5
2. 血管幹細胞の増殖・分化培養システムの研究
増田 治史（東海大学医学部） 9
3. 血管幹細胞の増殖・分化培養システムの開発
岩畔 英樹（東海大学医学部） 11
4. 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
西村 浩美（先端医療振興財団 再生医療研究部） 13
5. 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） 15
6. 体外培養の増幅血管内皮前駆細胞移植による虚血性疾患治療
に関する基礎・臨床研究
木原 康樹（神戸市立中央市民病院） 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 21

I 總括研究報告書

研究総括報告書

体外培養の増幅血管内皮前駆細胞移植による虚血性疾患治療に関する基礎・臨床研究

代表研究者 浅原孝之

研究要旨

虚血性疾患患者を対象とした血管内皮前駆細胞(EPC)による移植療法において、自己 EPC を末梢血から採取後、患部に移植する治療法が開発され、臨床応用されているが、採取 EPC の質／量には限界がある。この研究プロジェクトでは、EPC を体外で培養増幅し、数・質の改善を図った上で移植治療する臨床研究の確立を目指す。本年度は、臍帯血より分離した未分化 EPC(CD133 陽性細胞)移植療法及び無血清培養条件下の成体外増幅 EPC 移植療法の有効性を比較検討し、増幅 EPC 移植療法の有効性を証明した。

A. 研究目的

増幅血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell: EPC）の増幅培養技術の確立と、心筋・下肢虚血組織への移植治療技術を開発する。

B. 研究方法

1. 基本培養技術の開発

主に東海大学部門において基本培養技術の開発を試みた。ヒト臍帯血単核球採取し、抗体ビーズ法を用いて、CD133 陽性細胞（未分化 EPC）を単離。CD133 陽性細胞の hflt-3, hVEGF, hSCF, hTPO, hIL-6 無血清培地での培養効率に対する、様々な増殖因子・サントカイン・ホルモンの影響について検討した。

2. 細胞移植治療技術の開発

先端医療センター部門では、特に小動物・大動物による細胞移植治療開発を試みた。

ヒト臍帯血由来の培養増幅 EPC あるいは末梢血単核球をヌードラットの急性心筋梗塞モデルへ心筋内移植し、機能・組織学的検査を施行した。さらに、新たに建設された大動物実験施設（神戸医療機器開発センター）において、アイ

ビーテック社と共同（一部業務は委託）してブタ心筋虚血モデルの確立に取り組んだ。

（倫理面への配慮）

上記の動物実験は、東海大学医学部、先端医療センターおよび理化学研究所の動物実験審査委員会から実施の承認を得た後に開始されている。

C. 研究結果

臍帯血由来 EPC の無血清培養による分化・増幅法による移植細胞の虚血性心疾患に対する有効性が示された。幾つかの因子、例えば Sdf-1, HDAC INHIBITOR, などが、EPC の増殖・分化に貢献し、増幅培養に有効なことが確認された。増幅 EPC をヌードラット心筋虚血モデルへ移植後 4 週に、心エコー図による左室機能・組織学的な血管密度の向上、左室線維化の抑制が得られることを確認した。

ブタ左回旋枝へのアメロイドコンストリクター装着による心筋虚血モデルの手術手技は十分に確立でき、術中死亡率は 10%未満であった。新たに、慢性期の虚血重症度を検証中である。

D. 考察

臍帯血由来 EPC の無血清培養による分化・増幅法による移植細胞の虚血性心疾患に対する有効性が示された。動物実験結果から、in vivo 実験成績（左室機能改善効果）は、in vitro における EPC コロニーアッセイの結果（EPC コロニー形成能）とも非常によく相関しており、本 in vitro アッセイ法の有用性が示唆された。今後は大動物実験も進め、臨床試験計画の完成に貢献していきたい。

E. 結論

体外培養の増幅 EPC が虚血組織内で著明な血管再生能力を示すことを確認した。将来の臨床適用に向けて、今後さらに安全性・有効性を高めるべく研究を推進する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, Sadamoto K, Horii M, Matsumoto T, Murasawa S, Shibata T, Suehiro S, Asahara T. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery post myocardial infarction. *Circulation*. 2006;113(10):1311-25

Murasawa S, Kawamoto A, Horii M, Nakamori S, Asahara T. Niche-dependent translineage commitment of endothelial progenitor cells, not cell fusion in general, into myocardial lineage cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005; 25(7): 1388-94.

浅原孝之, 川本篤彦. 血管内皮前駆細胞による血管再生・修復療法. *心臓*. 2006;38(2):200-204.

美船 泰, 松本知之, 岩崎弘登, 川本篤彦, 浅原孝之. ここまできている再生医療 1. 血管内皮前駆細胞を用いた再生医療. *実験医学*. 2006; 24(2): 234-240.

川本篤彦, 浅原孝之. 特集 第 69 回日本循環器学会学術集会 7. Drug-eluting stent 時代の幕開けと新技術. 血管内皮前駆細胞による血管再生・修復療法. *循環器専門医*. 2005;13(2):281-287.

鈴木崇弘, 川本篤彦, 浅原孝之. 再生医療の進歩—2005 年の総括（臨床到達分野）. 血管再生治療. *日本再生医療学会雑誌*. 2005; 4(4): 516-523.

川本篤彦, 浅原孝之. 血管再生治療 Update-虚血下肢と虚血性心臓病への適用と臨床成績-I 血管内皮前駆細胞と血管再生療法. *Pharma Medica*. 2005; 23(9): 13-17.

川本篤彦, 浅原孝之. 基礎技術の脈管病治療への応用: 血管内皮前駆細胞. *脈管学*. 2005;45(3): 131-135.

川本篤彦, 浅原孝之. 血管内皮前駆細胞を用いた血管再生. *WellVAS*. 2005; 11: 8-9.

2. 学会発表（主要）

Kawamoto A, Iwasaki H, Murayama T, Kinoshita M, Katayama M, Handa N, Okada Y, Kihara Y, Morioka S, Fukushima M, Asahara T. 70th Scientific Sessions, Japanese Circulation Society. Plenary Session 3: Cell death and

repair-Regeneration in cardiac and vascular diseases.
Concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis by
somatic stem/ progenitor cell transplantation for
functional regenerative recovery post myocardial
infarction,
March 25, 2006. Nagoya.

Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M,
Takano H, Baba R, Kuroda A, Fukushima M, Kihara
Y, Morioka S, Asahara T.

Transplantation of autologous endothelial progenitor
cells is safe, feasible and effective for vascular
regeneration in no-option patients with chronic
critical limb ischemia.

Scientific Sessions 2005, American Heart
Association.

November 15, 2005. Dallas, TX, USA.

Circulation. 2005; Suppl II 112(17):II-619.

Iwasaki H, Kawamoto A, Hayashi S, Oyamada A,

Sadamoto K, Hasegawa S, Shibata T, Suehiro S,
Carmeliet P, Asahara T.

Therapeutic myoangiogenesis by direct
intramyocardial gene transfer of naked DNA
encoding placental growth factor in acute
myocardial infarction.

Scientific Sessions 2005, American Heart
Association.

November 15, 2005. Dallas, TX, USA.

Circulation. 2005; Suppl II 112(17):II-235.

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

Ⅱ 分担研究報告書

分担研究報告書

体外培養の増幅血管内皮前駆細胞移植による虚血性疾患治療に関する基礎・臨床研究

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

増幅血管内皮前駆細胞の心筋虚血組織への移植治療技術の開発を行った。小動物実験で増幅血管内皮前駆細胞移植治療が心機能改善効果、組織学的血管密度増加効果、左室線維化抑制効果を示すことを確認した。さらに、将来の臨床適用を見据えて、大動物を用いた心筋虚血モデルの確立への取り組みも開始した。

A. 研究目的

増幅血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell: EPC）の心筋・下肢虚血組織への移植治療技術を開発する。

B. 研究方法

1. 小動物実験による細胞移植治療開発

ヒト臍帯血由来の培養増幅EPCあるいは末梢血単核球をヌードラットの急性心筋梗塞モデルへ心筋内移植し、心エコー図での左室機能、組織学的な毛細血管密度・左室線維化面積を検討する。

2. 大動物実験による細胞移植治療開発

新たに建設された大動物実験施設（神戸医療機器開発センター）において、アイビーテック社と共同（一部業務は委託）してブタ心筋虚血モデルの確立に取り組む。

（倫理面への配慮）

上記の動物実験は、先端医療センターおよび理化学研究所の動物実験審査委員会から実施の承認を得た後に開始される。

C. 研究結果

1. 小動物実験成果

増幅EPCをヌードラット心筋虚血モデルへ移植後4週に、心エコー図による左室機能・組織学的な血管密度の向上、左室線維化の抑制が得られることを確認した。また、この治療効果は、増幅細胞からさらにFACSで分離純化されたAC133+/CD34+細胞分画を移植した場合が大きく、AC133-/CD34+あるいはAC133+/CD34-細胞分画ではほとんど消失することも確認できた。

2. 大動物実験成果

ブタ左回旋枝へのアメロイドコンストラクター装着による心筋虚血モデルの確立に取り組んだ。手術手技は十分に確立でき、術中死亡率は10%未満であった。現在、慢性期の虚血重症度を検証中である。

D. 考察

上記の小動物実験結果から、今後の研究ではAC133+/CD34+細胞分画を効率よく増幅することが重要と考えられた。なお、これらのin vivo

実験成績（左室機能改善効果）は、in vitro における EPC コロニーアッセイの結果（EPC コロニー形成能）とも非常によく相関しており、本 in vitro アッセイ法の有用性が示唆された。今後は大動物実験も進め、臨床試験計画の完成に貢献していきたい。

E. 結論

体外培養の増幅 EPC が虚血組織内で著明な血管再生能力を示すことを確認した。将来の臨床適用に向けて、今後さらに安全性・有効性を高めるべく研究を推進する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, Sadamoto K, Horii M, Matsumoto T, Murasawa S, Shibata T, Suehiro S, Asahara T. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery post myocardial infarction. *Circulation*. 2006;113(10):1311-25.

Kusano KF, Pola R, Murayama T, Curry C, Kawamoto A, Iwakura A, Shintani S, Ii M, Asai J, Tkebuchava T, Thorne T, Takenaka H, Aikawa R, Goukassian D, von Samson P, Hamada H, Yoon YS, Silver M, Eaton E, Ma H, Heyd L, Kearney M, Munger W, Porter JA, Kishore R, Losordo DW. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med*. 2005; 11(11): 1197-204.

Murasawa S, Kawamoto A, Horii M, Nakamori S, Asahara T. Niche-dependent translineage commitment of endothelial progenitor cells, not cell fusion in general, into myocardial lineage cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005; 25(7): 1388-94.

浅原孝之, 川本篤彦. 血管内皮前駆細胞による血管再生・修復療法. *心臓*. 2006;38(2):200-204.

美船 泰, 松本知之, 岩崎弘登, 川本篤彦, 浅原孝之. ここまできている再生医療 1. 血管内皮前駆細胞を用いた再生医療. *実験医学*. 2006; 24(2): 234-240.

川本篤彦, 浅原孝之. 特集 第 69 回日本循環器学会学術集会 7. Drug-eluting stent 時代の幕明けと新技術. 血管内皮前駆細胞による血管再生・修復療法. *循環器専門医*. 2005;13(2):281-287.

鈴木崇弘, 川本篤彦, 浅原孝之. 再生医療の進歩—2005 年の総括（臨床到達分野）. 血管再生治療. *日本再生医療学会雑誌*. 2005; 4(4): 516-523.

川本篤彦, 浅原孝之. 血管再生治療 Update-虚血下肢と虚血性心臓病への適用と臨床成績-I 血管内皮前駆細胞と血管再生療法. *Pharma Medica*. 2005; 23(9): 13-17.

川本篤彦, 浅原孝之. 基礎技術の脈管病治療への応用：血管内皮前駆細胞. *脈管学*. 2005;45(3): 131-135.

川本篤彦, 浅原孝之. 血管内皮前駆細胞を用いた血管再生. *WellVAS*. 2005; 11: 8-9.

2.学会発表（主要）

Kawamoto A, Iwasaki H, Murayama T, Kinoshita M, Katayama M, Handa N, Okada Y, Kihara Y, Morioka S, Fukushima M, Asahara T.

70th Scientific Sessions, Japanese Circulation Society. Plenary Session 3: Cell death and repair-Regeneration in cardiac and vascular diseases. Concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis by somatic stem/ progenitor cell transplantation for functional regenerative recovery post myocardial infarction, March 25, 2006. Nagoya.

川本篤彦

第16回日本心血管画像動態学会 シンポジウム
革新的治療における心血管画像動態診断
NOGA 心内膜マッピングによる心筋バイアピリ
ティの評価
2006年1月20日、大阪
第16回日本心血管画像動態学会抄録集 P.33.

片山美奈子、木下 愼、川本篤彦、馬場理江、
箕輪和士、金子祐一郎、半田宣弘、岡田行功、
木原康樹、盛岡茂文、浅原孝之

第5回日本心血管カテーテル治療学会 パネル
ディスカッション1

PAD の治療成績と問題点
血管内皮前駆細胞を用いた重症虚血下肢に対す
る血管再生治療

2005年8月26日、岐阜

Jpn J Cardiovasc Cathet Ther. 2005; 5: 80.

Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M,
Takano H, Baba R, Kuroda A, Fukushima M, Kihara

Y, Morioka S, Asahara T.

Transplantation of autologous endothelial progenitor
cells is safe, feasible and effective for vascular
regeneration in no-option patients with chronic
critical limb ischemia.

Scientific Sessions 2005, American Heart
Association.

November 15, 2005. Dallas, TX, USA.

Circulation. 2005; Suppl II 112(17):II-619.

Iwasaki H, Kawamoto A, Hayashi S, Oyamada A,
Sadamoto K, Hasegawa S, Shibata T, Suehiro S,
Carmeliet P, Asahara T.

Therapeutic myoangiogenesis by direct
intramyocardial gene transfer of naked DNA
encoding placental growth factor in acute
myocardial infarction.

Scientific Sessions 2005, American Heart
Association.

November 15, 2005. Dallas, TX, USA.

Circulation. 2005; Suppl II 112(17):II-235.

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

分担研究報告書

血管幹細胞の増殖・分化培養システムの研究

分担研究者 増田治史 東海大学医学部

研究要旨

虚血性疾患患者を対象とした血管内皮前駆細胞 (EPC) による移植療法において、自己 EPC を抹消血から採取後、患部に移植する治療法が開発され、臨床応用されているが、採取 EPC の質/量には限界がある。今回、臍帯血より分離した未分化 EPC (CD133 陽性細胞) 移植療法及び無血清培養条件下の成体外増幅 EPC 移植療法の有効性を比較検討し、増幅 EPC 移植療法の有効性を証明した。

A. 研究目的；

虚血性疾患患者を対象とした血管内皮前駆細胞 (EPC) による移植療法において、自己 EPC を抹消血から採取後、患部に移植する治療法が開発され臨床応用されているが、採取 EPC の質/量には限界がある。そこで、前年度確立した EPC 増幅法未分化 EPC の無血清培養条件下生体外増幅法を確立し、その移植療法の開発を行うことを目的とした。

B. 研究方法

ヒト臍帯血単核球採取し、抗体ビーズ法を用いて、CD133 陽性細胞 (未分化 EPC) を単離。CD133 陽性細胞を hflt-3, hVEGF, hSCF, hTPO, hIL-6, TGFbeta inhibitor 添加無血清培地を用いて 2 週間培養した。培養前細胞 (EX-)、1 週間 (EX7)、2 週間 (EX14) 増幅細胞を心筋梗塞を作成したラット虚血心筋内に、低細胞数移植 (Low TX; 1×10^5 /rat)、高細胞数移植 (High TX; 5×10^5 /rat) を行った。移植 4 週目において、心臓超音波による心機能評価を行った。

(倫理面への配慮)

東海大学における「医の倫理委員会」「臍帯血バンク」「動物実験委員会」の承認を得た。

C. 研究結果

移植後 4 週目の echo 心機能評価収縮期駆出率 (%EF) にて、EX-, EX7, EX14 の各群において、control に比較して Low TX, High TX のいずれも %EF の改善が認められた。EX7, EX14 では、Low TX よりも High TX の方が %EF の改善が認められ、また、EX- High TX よりも EX7 High TX の方が %EF の改善が認められた。と心機能の改善が認められた (図 1)。

	Control	EX-	EX7	EX14
PBS	37.1%	-	-	-
Low	-	49.5%	55.8%	53.6%
High	-	57.5%	69.9%	65.2%

表 1 ; 非増幅及び増幅 EPC 移植療法による左室駆出率

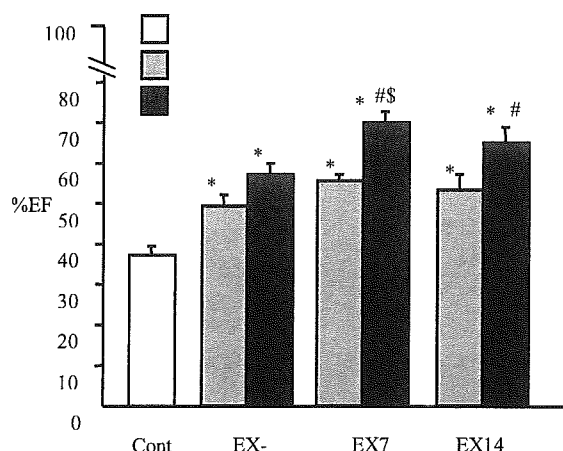


図 1 ; 移植細胞療法後ラット虚血心筋における左室駆出率の評価

* vs PBS, # vs Low-TX, \$ vs EX- High, p < 0.05

D. 考察及び結論

臍帯血由来 EPC の無血清培養による分化/増幅法による移植細胞の虚血性心疾患に対する有効性が示された。本研究により確立された技術は、新しい EPC 移植療法として臨床において非常に有意義なものになると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Hayashi S, Asahara T, Masuda H, Isner JM, Losordo DW. Functional Ephrin-B2 Expression for Promotive Interaction Between Arterial and Venous Vessels in Postnatal Neovascularization. *Circulation*. 2005;111;2210-2218.

2) 増田治史、浅原孝之、血管再生のメカニズム、人工臓器・再生医療の最先端、寺田国際事務所/先端医療技術研究所、2005:154-156.

2. 学会発表

1) 2005. 3. 19-21; 第 69 回日本循環器学会学術集会(横浜) 'Therapeutic Vasculogenesis for Myocardial Ischemia by Serum Free Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cells from Cord Blood Derived CD133+ Cells'

2) 2005. 4. 5; EXPERIMENTAL BIOLOGY:4/2/05-4/6/05& the XXXV INTERNATIONAL CONGRESS OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES: 3/31/05-4/5/05, San Diego Convention Center, San Diego, California, 'Therapeutic vasculogenesis for ischemic heart disease by serum free expanded endothelial progenitor cells'

3) 2005. 5. 12; 仙台第 17 回小児腎臓病学会、漢方研究会講演、演題;「血管内皮前駆細胞による血管再生の現状と未来」

H. 知的財産権の出願・登録状況

出願番号 特願 2005-47816

発明の名称 血管内皮前駆細胞の生体外増殖方法

出願番号 特願 2005-47422

発明の名称 血管内皮前駆細胞分化動態解析方法

分担研究報告書

血管幹細胞の増殖・分化培養システムの開発

分担研究者 岩畔 英樹 東海大学医学部 助手

研究要旨：

次世代における幹細胞を用いた移植治療の新たな応用法として、今回臍帯血より分離した未分化血管幹細胞移植療法及び無血清培養条件下の成体外増幅血管幹細胞移植療法の有効性を比較検討した。

A. 研究目的；

我々は現在抹梢血中の CD34 陽性細胞を採取し ASO などの慢性下肢虚血患者に投与する移植療法を行い良好な結果が得られている。しかし、採取血管幹細胞の質／量には限界があり、そこで前年度確立した無血清培養条件下における増幅 EPC 移植療法が下肢虚血病変に有効かを検証した。

B. 研究方法

ヒト臍帯血単核球採取し、抗体ビーズ法を用いて、CD133 陽性細胞（未分化血管幹細胞）を単離。CD133 陽性細胞を hflt-3, hVEGF, hSCF, hTPO, hIL-6, を添加無血清培地を用いて 1 週間培養した。1 週間増幅培養した細胞を、下肢虚血を作成したマウスの虚血部位に計 5 カ所、 5×10^3 - 1×10^5 個/マウス、筋肉注射した。4 - 28 日後、ドップラーによる血流測定、組織から毛細血管密度の測定を行った。

（倫理面への配慮）

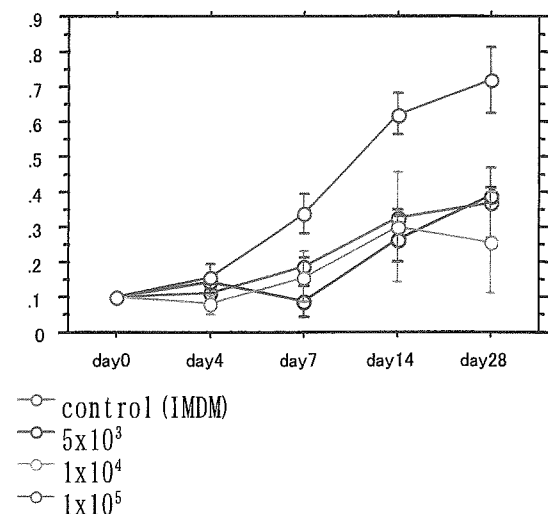
東海大学における「医の倫理委員会」「臍帯血バンク」「動物実験委員会」の承認を得た。

C. 研究結果

マウスの下肢虚血にコントロールとして

IMDM (50ul), 5×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 筋肉注射を行った。 5×10^3 , 1×10^4 投与群ではコントロール群と比べ明らかな差は認められなかった。(DAY14 平均値コントロール 0.325 ± 0.022 , 5×10^3 0.266 ± 0.068 , 1×10^4 0.299 ± 0.155 , DAY28 平均値コントロール 0.367 ± 0.099 , 5×10^3 0.390 ± 0.019 , 1×10^4 0.257 ± 0.143)、 1×10^5 投与群ではコントロールと比べて血流の改善傾向が認められた。(DAY14 平均値 コントロール 0.325 ± 0.022 , 1×10^5 0.621 ± 0.058 , DAY28 平均値コントロール 0.367 ± 0.099 , 1×10^5 0.718 ± 0.093)

図 1 マウス下肢虚血に細胞移植療法を行い血流を評価した。(N=4)



D. 考察及び結論

無血清増幅分化培養法による血管幹細胞移植細胞の虚血性下肢病変に対する有効性が示された。このような無血清増幅分化培養による血管幹細胞移植療法は、臨床的にも、非常に有意義なものになると考えられた。

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. 出版：

Iwaguro, H, and Asahara, T.
Molecular Cardiology/Methods and Protocols
P239-250: 2005 Human Press

2. 発表：

Iwaguro, H, Nishiwaki, Y, Iwami, Y, Eguchi, M,
Ishikawa, T, Masuda, H, Asahara, T.

Molecular Mechanisms of Vascular
Regeneration using Transcriptional Factor
(2005 Experimental Biology)

Iwaguro, H, Tono, K, Onodera, N, Wada, M, Iwami, Y,
Eguchi, M, Kwon, S, Masuda, H, Asahara, T.
New application of novel analysis for tissue
regeneration using progenitor cells.

(第82回日本生理学会)

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

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。我々の施設においては下肢虚血患者に対して EPC を直接、虚血組織に移植し、良好な血管再生が得られている。しかしながら、EPC の虚血改善効果には投与細胞数依存性が有ることが知られている。本研究では EPC 投与による血管再生療法をより安全かつ効果的なものとするために、無血清培養での体外増殖技術の確立を目的としており、当分担研究においては最近確立された臍帯血 CD133 陽性単核球の体外無血清培養システムで増殖せしめた細胞の虚血改善効果に関連する機能に関する検討を行った。

A. 研究目的

臍帯血 CD133 陽性単核球の体外無血清培養システムで増殖し、得られた細胞の虚血改善効果に関連する機能に関して、*in vitro* および *in vivo* で解析を実施する。

B. 研究方法

ヒト新鮮臍帯血から密度勾配遠心法にて単核球を採取し、磁気ビーズ結合の抗 CD133 抗体により、CD133 陽性細胞を分離。無血清培地に recombinant growth factor を添加し、1 週間の培養後に細胞数を測定し、次いで、得られた細胞について、各種血管内皮系細胞のマーカー発現に関して FACS 解析を行った。更に得られた細胞を CD34/CD133 の発現の有無の組み合わせにより 4 群にソーティングし、血管内皮系細胞用の半固形培地でのコロニー系性能とヌードラット心筋梗塞モデルへの投与を実施し、心機能回復に及ぼす影響に関して比較検討した。

（倫理面への配慮）

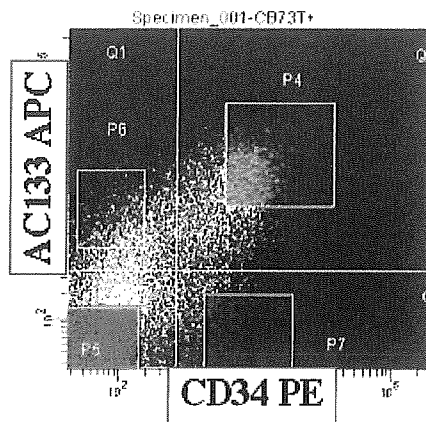
細胞治療に関わる基礎研究として、倫理面では先端医療センター倫理委員会での研究計画の承認を得たうえで、研究は実施されている。

C. 研究結果

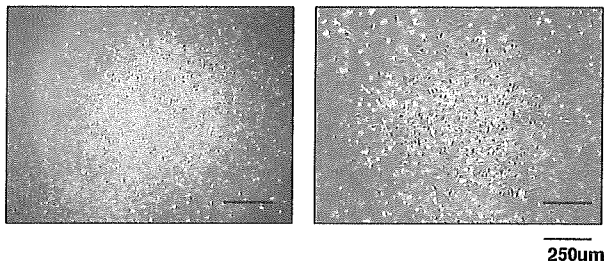
CD133 陽性細胞を VEGF, SCF, TPO 等の至適化された growth factor を用いた 7 日間の無血清培養で 50-80 倍程度に増殖させることが可能となった。これらの細胞を CD34/CD133 発現にて 4 分画に分類し（図 1）、半固形培地で約 3 週間培養すると、CD133+/CD34+ あるいは CD133-/Cd34- の分画からは比較的小さな細胞より構成されるコロニー（図 2 左）と大きな細胞から構成されるコロニー（図 2 右）、2 種類が得られた。次いで、Day 7 expanded cell, CD133+/CD34+, CD133-/CD34-, mononuclear cell をヌードラット心筋梗塞モデルに投与したところ、mononuclear cell 投与群以

外は生存率と心機能回復において有意な改善効果を認めた。3 群間において有意差はなかった。

(図 1)



(図 2)



D. 考察

今回は検体の availability と増幅 potential に鑑み、EPC の無血清体外増殖法の確立に必要な基礎データを得た。決定された至適状態での増幅効率は 50-80 倍であり、その後の血管内皮系コロニー形成能は保たれており、さらに虚血性心疾患モデルにおいても心機能回復能を確認した。倫理的／生物学的安全性において有利な本手法が、患者より得られる末梢血／骨髄由来細胞と同様の効果が再現できるかを次年度にかけて確認し、早期の臨床応用につなげたい。

E. 結論

臍帯血 CD133 陽性単核球の体外無血清培養システムで増殖し、得られた細胞の虚血改善効

果に関連する機能に関して、その機能は従来の培養法で分離されていた細胞と同様であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ii M, Nishimura H, Iwakura A, Wecker A, Eaton E, Asahara T, Losordo DW. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via “imported” nitric oxide synthase activity. *Circulation*. 2005 Mar 8;111 (9) :1114-20.

2. Ii M, Nishimura H, Kusano K, Qin G, Yoon Y, Wecker A, Asahara T, Losordo DW. Neuronal nitric oxide synthase mediates statin-induced restoration of vasa nervorum and reversal of diabetic neuropathy. *Circulation*. 2005 Jul 5;112 (1) :93-102.

2. 学会発表

第 4 回再生医療学会「血管再生と幹細胞による臓器機能回復に関する検討—神経幹細胞による協調的血管発生」発表&シンポジスト

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

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

G-CSFにより骨髄から動員された末梢血中 CD34 陽性細胞は虚血部位への移植によって血管再生に貢献することが示され、現在この細胞を用いた臨床研究が進められている。しかし将来的には、さらに効率良く目的の細胞を得るために体外増幅技術の応用が必須である。このため臍帯血由来 CD133 陽性細胞を用いた体外増幅法が最近確立されたが、この増幅効率の改善に寄与する因子の1つとして今回、抗酸化剤による検討を行った。

A. 研究目的

無血清培養下における CD133 陽性細胞の体外増幅が次世代の移植療法における技術として開発が進んでいる。一方、細胞は人工的な体外培養環境では過剰な活性酸素により酸化ストレスが生じ“細胞老化のマーカー”の1つであるテロメアの短縮に伴って容易に細胞老化を起こすことが知られている。そこで体外培養過程においてあらかじめ抗酸化剤を添加することにより細胞増幅効率に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

ヒト臍帯血由来CD133陽性細胞を無血清培地内で1週間培養する。その過程で抗酸化剤の1つであるNAC(N-acetyl-L-cystein)を添加し1.細胞数(細胞数カウント)、2.血管系/血球系コロニーの出現能(コロニーアッセイ)、3.細胞分画の変化(FACS)に及ぼす効果について検討した。NACの添加は0.1mM, 1mMの2種類で行った。

C. 研究成果

抗酸化剤(NAC)無添加では CD133 陽性細胞は培養1週目において50-100倍に増幅されるが、今回 NAC の添加によって細胞数の増幅について有意差を認めなかった。またメチルセルロースを用いたコロニーアッセイにおいても血管系コロニーの出現能に関して NAC の添加は影響を及ぼさなかった。細胞分画については、G-CSF 受容体あるいは SDF-1 の受容体である CXCR4 のそれぞれの陽性分画が NAC の濃度依存的に減少する結果が得られたが、再検にて有意差は証明されなかった。

D. 考察

細胞老化に酸化ストレスが関与することが報告されているが細胞の senescence に及ぼすメカニズムについてその詳細はまだ十分に解明されていない。我々が虚血性疾患患者への細胞治療に用いている CD34 陽性細胞は比較的未分化な状態を保っていると考えられるが、実際は前年度の検討からも明らかのように、高齢者や動脈硬化性疾患を有した患者末梢血由来 CD34 陽性

細胞では、健常若年者由来 CD34 陽性細胞に比べ明らかにテロメラーゼ活性が低下しており個々の細胞活性が低下していることが示唆される。今回の抗酸化剤の検討では体外細胞増幅の改善を認めなかったが、今後テロメラーゼ遺伝子導入などによって細胞老化を遅延させる手法などを検討する必要があると思われる。

E. 結論

臍帯血由来 CD133 陽性細胞の体外培養増幅率および細胞分画に抗酸化剤 NAC は影響を及ぼさない。

F. 研究危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Murasawa S., Asahara T.

Endothelial Progenitor Cells Potential for Vasculogenesis and Cardiomyogenesis “Progress in Stem Cell Research”

Stem Cells (in press), 2006

2. Murasawa S., Kawamoto A., Asahara T., et al.

Niche-dependent Trans-lineage Commitment of Endothelial Progenitor Cells, not Cell Fusion in general, into Myocardial Lineage Cells

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (ATVB), 25: 1388 – 1394, 2005

3. 村澤 聡、浅原 孝之

遺伝子治療による血管新生療法 1

心筋虚血における血管新生療法

治療学 vol.39, no.7, 34-37, 2005

学会発表

Murasawa S. et al.

"G-CSF Mobilized CD34+ Cells Augment

Functional Potential via High Telomerase Activity"

(Recipient of New Investigator Awards)

2nd Annual Symposium of the American

Heart Association Council on Basic

Cardiovascular Sciences - Targeting Heart

Failure: New Science, New Tools, New

Strategies, at the Keystone Conference Center,

Keystone, CO, USA, July 24-27, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし。

分担研究報告書

体外培養の増幅血管内皮前駆細胞移植による虚血性疾患治療に関する基礎・臨床研究

分担研究者 木原 康樹 神戸市立中央市民病院 部長

研究要旨

増幅血管内皮前駆細胞の心筋虚血組織への移植治療技術の開発を行った。同治療の将来の臨床適用を見据えて、大動物を用いた心筋虚血モデルの確立への取り組みを開始した。

A. 研究目的

増幅血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell: EPC）の心筋・下肢虚血組織への移植治療技術を開発する。

B. 研究方法

大動物実験による細胞移植治療開発

新たに建設された大動物実験施設（神戸医療機器開発センター）において、先端医療センター血管再生研究グループおよびアイビーテック社と共同（一部業務は委託）してブタ心筋虚血モデルの確立に取り組む。

（倫理面への配慮）

上記の動物実験は、先端医療センターの動物実験審査委員会から実施の承認を得た後に開始される。

C. 研究結果

大動物実験成果

ブタ左回旋枝へのアメロイドコンストリクター装着による心筋虚血モデルの確立に取り組んだ。手術手技は十分に確立でき、術中死亡率は10%未満であった。現在、慢性期の虚血重症度を検証中である。

D. 考察

今後は上記の大動物心筋虚血モデルを確立させ、同モデルを用いた細胞移植治療技術の開発を通して、臨床試験計画の完成に貢献していきたい。

E. 結論

将来の臨床適用に向けて、今後さらに安全性・有効性を高めるべく、経カテーテル的移植等の治療法の開発を推進する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1 Tani T, Tanabe K, Tani M, Ono F, Katayama M, Tamita K, Kaji S, Yamamuro A, Nagai K, Shiratori K, Morioka S, Kihara Y. Quantitative assessment of harmonic power doppler myocardial perfusion imaging with intravenous Levovist in patients with myocardial infarction: comparison with myocardial viability evaluated by coronary flow reserve and coronary flow pattern of infarct-related artery. *Cardiovasc Ultrasound* 3:22, 2005.

2 Niimi A, **Kihara Y**, Sumita Y, Okano Y, Tambara K, Fujita M. Cough reflex by ventricular premature contractions. *Int Heart J* **46**:923-936, 2005.

3 Iwanaga Y, Nishi I, Furuuchi S, Noguchi T, Sase K, **Kihara Y**, Goto Y, Nonogi H. B-type natriuretic peptide strongly reflects diastolic wall stress in patients with chronic heart failure: comparison between systolic and diastolic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, **21**:742-748, 2006.

4 Yamaguchi K, Tanabe K, Tani T, Yagi T, Fujii Y, Konda T, Kawai J, Sumida T, Morioka S, **Kihara Y**. Left atrial volume in normal Japanese adults. *Circ J*, **70**:265-288, 2006.

5 Takeda T, Akao M, Matsumoto-Ida, Takenaka H, **Kihara Y**, Kume T, Akaike A, Kita T. Serofendic acid, a novel substance extracted from fetal calf serum, protects against oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes. *J Am Coll Cardiol*, in press, 2006.

6 Iwanaga Y, Takenaka H, **Kihara Y**. Down-Regulation of Cardiac Apelin System in Hypertrophied and Failing Hearts: Possible Role of Angiotensin II - Angiotensin Type 1 Receptor System. *J Mol Cell Cardiol*, in press, 2006.

2. 学会発表 (主要)

Kawamoto A, Iwasaki H, Murayama T, Kinoshita M, Katayama M, Handa N, Okada Y, **Kihara Y**, Morioka S, Fukushima M, Asahara T. 70th Scientific Sessions, Japanese Circulation Society. Plenary Session 3: Cell death and repair-Regeneration in cardiac and vascular diseases. Concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis by somatic stem/ progenitor cell transplantation for functional regenerative recovery post myocardial

infarction, March 25, 2006. Nagoya.

片山美奈子、木下 慎、川本篤彦、馬場理江、箕輪和士、金子祐一郎、半田宣弘、岡田行功、木原康樹、盛岡茂文、浅原孝之
第5回日本心血管カテーテル治療学会 パネルディスカッション1
PADの治療成績と問題点
血管内皮前駆細胞を用いた重症虚血下肢に対する血管再生治療
2005年8月26日、岐阜
Jpn J Cardiovasc Cathet Ther. 2005; 5: 80.

Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Takano H, Baba R, Kuroda A, Fukushima M, **Kihara Y**, Morioka S, Asahara T. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells is safe, feasible and effective for vascular regeneration in no-option patients with chronic critical limb ischemia. Scientific Sessions 2005, American Heart Association. November 15, 2005. Dallas, TX, USA. *Circulation*. 2005; Suppl II 112(17):II-619.

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