

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 浅原 孝之

平成 19(2007)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 血管再生研究グループ）…………… 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 血管再生研究グループ）…………… 5
2. 単一血液血管芽細胞からの血管系細胞系列への運命決定
及び分化判定法の開発
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 血管再生研究グループ）…………… 13
5. 血管内皮前駆細胞の体外培養とCPCへの応用
村澤 聡（先端医療振興財団 血管再生研究グループ）…………… 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
7. 細胞培養センター(CPC)を用いた血管前駆細胞(EPIC)
体外増幅に関する研究
川真田 伸（先端医療振興財団）…………… 19
8. 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
福島 雅典（臨床研究情報センター 研究部）…………… 21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 25

IV. 研究成果の刊行物・別刷..... 29

I 総括研究報告書

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・改良する。

B. 研究方法

東海大学部門において、増田は基本培養技術の改良開発を試みた。ヒト臍帯血から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無血清培地に、様々な増殖因子・サントカイン・ホルモンを添加し、有用性を検討した。さらに培養システムの効果を高めるために、単一細胞で条件下の培養効果を判定する実験方法の開発を開始した。岩畔は、これらの開発された培養法でのEPCで、下肢虚血性疾患血モデルへの効果を判定した。

先端医療センター部門では、川本・木原らによって小動物・大動物による細胞移植治療技術開発を試みた。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してブタ心筋虚血モデルの確立に取り組んだ。西村らによって、増幅培養EPCの臨床的な検討が進められた。骨髓由来・末梢血由来・臍帯血由来のEPCを採取して、増幅培養の効果を比較した。村澤・川真田らによって、臨床研究実施のため、Cell Processing Center(CPC)でのプロトコール作製を始めた。川本らによって、臨床研究全体のプロトコール作製も検討された。(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る。

C. 研究結果

岩畔らの結果では、様々な因子の効果の中で、細胞間情報伝達物質であるストローマ細胞由来因子(SDF-1)によるEPC増幅作用は強力で、培養EPCの虚血性下肢病変に対する有効性が示された。

西村らの研究では、臍帯血、骨髓、G-CSF投与

後の末梢血アフェレーシス由来単核球から臨床応用に必要な EPC を無血清体外増殖法で増殖させ、必要数を確保出来ることが確認できた。

川本・木原の大動物実験により、増幅 EPC のカテーテル移植技術が確認できた。

村澤・川真田らの研究で、CPC におけるこの培養プロトコール作製が始まった。

福島・川本らにより、この臨床研究全体のプロトコール作製も開始された。

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。この培養法を、より科学的に定量的に評価するシステムも完成した。動物実験では、大動物実験が利用できるようになり、前臨床試験が進められている。以上の流れから、CPC の培養プロトコール、臨床試験全体のプロトコールの作成段階に入り、臨床研究計画の開始に向かって着実に進んでいる。

E. 結論

EPC の体外培養システムが完成し、虚血組織内で十分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、CPC プロトコール、臨床研究プロトコールの完成が期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表（主要）：

Iwasaki H, Fukushima K, Kawamoto A, Umetani K, Oyamada A, Hayashi S, Matsumoto T, Ishikawa M, Shibata T, Nishimura H, Hirai H, Mifune Y, Horii M, Sugimura K, Suehiro S, Asahara T.

Synchrotron radiation coronary microangiography for morphometric and physiological evaluation of myocardial neovascularization induced by endothelial progenitor cell transplantation.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; in press.

Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, Murayama T, Oyamada A, Silver M, Hulbert C, Gavin M, Hanley A, Ma H, Kearney M, Asahara T, Losordo DW.

CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization post myocardial infarction compared with total mononuclear cells.

Circulation. 2006;114(20):2163-2169.

Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, Miwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Nishimura H, Murasawa S, Doita M, Kurosaka M, Asahara T.

Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing.

Am J Pathol. 2006; 169(4): 1440-1457.

Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T, Eaton L, Masuda H, Asahara T, Losordo DW.

Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9.

Circulation. 2006; 113(12):1605-14.

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.

2. 学会発表 (主要) :

Iwasaki H, Kawamoto A, Hayashi S, Oyamada A, Horii M, Suzuki T, Kusano KF, Ii M, Suehiro S, Carmeliet P, Asahara T.

Novel therapeutic mechanism of placental growth factor in myocardial infarction: tissue repair through enhancement of proliferation, mobilization and recruitment of BM-derived stem cells for cardiac myoangiogenesis.

Scientific Sessions 2006, American Heart Association. (Young Investigator Award) November 12, 2006. Chicago, IL. Circulation, 2006,114(18)Supplement II: II-36.

Horii M, Iwasaki H, Kawamoto A, Nishimura H, Oyamada A, Ii M, Suehiro S, Asahara T. Gene deficiency of Lnk upregulates cardiac myoangiogenesis via enhancing proliferation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells and cardiac stem cells post myocardial infarction.

Scientific Sessions 2006, American Heart Association. November 15, 2006. Chicago, IL. Circulation, 2006,114(18)Supplement II: II-264.

Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Baba R, Takano H, Kihara Y, Morioka S,

Fukushima M, Asahara T.

Safety and efficacy is sustained up to one year after transplantation of autologous CD34+ cells in no-option patients with chronic critical limb ischemia.

Scientific Sessions 2006, American Heart Association. November 13, 2006. Chicago, IL. Circulation, 2006,114(18)Supplement II: II-446.

Iwasaki H, Kawamoto A, Suehiro S, Carmeliet P, Asahara T.

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

World Congress of Cardiology 2006 September 5, 2006, Barcelona, Spain. Eur Heart J. 2006, 27(Abtract Suppl), 812.

Katayama M, Kawamoto A, Kinoshita M, Handa N, Tamita K, Morioka S, Kihara Y, Asahara T. Efficacy of therapeutic neovascularization for critical limb ischemia: what is the best way to confirm new blood vessel formation? World Congress of Cardiology 2006 September 3, 2006, Barcelona, Spain. Eur Heart J. 2006, 27(Abtract Suppl), 276.

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移植の臨床適用を見据えて、大動物を用いた心筋虚血モデルと細胞移植技術の確立に取り組んだ。また、CPC 各種手順書、臨床試験プロトコルの作成も開始した。

A. 研究目的

増幅血管内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell: EPC）の虚血組織への移植治療技術を開発する。また、臨床試験実施のために CPC 各種手順書、臨床試験プロトコルを作成する。

B. 研究方法

1. 大動物実験による細胞移植治療開発

大動物実験施設（神戸医療機器開発センター）において、神戸市立中央市民病院循環器内科、アイビーテック社と共同してブタ心筋虚血モデルおよび細胞移植技術の確立に取り組んだ。

（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した。

2. CPC 各種手順書・臨床試験プロトコルの作成

先端医療センターの川真田、村澤および臨床研究情報センターの福島と協力して、臨床試験実施に必須な上記書類の作成に取り組んだ。

（倫理面への配慮）

臨床試験プロトコルは、完成後に先端医療センターの再生医療審査委員会、さらに厚生労働省での審査を受ける予定である。

C. 研究結果

1. 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、術後4週間までの慢性期死亡率も20%程度と低く、満足すべき成績であった。さらに、4週後の冠動脈造影では、ほぼ全例で左回旋枝の完全閉塞が観察され、NOGA マッピングでも左室側壁の虚血が確認された。さらに、同マッピングガイド下に生食、血管新生因子遺伝子等の経カテーテル的な注入を試み、技術的な習熟を得た。

2. CPC 各種手順書。臨床試験プロトコルの作成

これまでの基礎研究成果から、本治療の臨床適用に際しては、基本的な5種類の成長因子を用いた無血清下培養を低酸素条件下で7日間実施することに決定したが、CPC を使用した細胞

培養増幅が必須であるため、それに対応した製品標準書・製造管理基準書・衛生管理基準書・品質管理基準書などの作成を開始した。

臨床試験プロトコルの作成にあたっては、基礎・前臨床研究で移植細胞の至適用量を明確にする必要がある、このための追加動物実験を実施中である。具体的にはラット・マウス等の下肢・心筋虚血モデルでの培養増幅 EPC と非培養 EPC との効果比較試験、培養増幅 EPC の用量変更試験で、培養増幅 EPC の非培養 EPC に対する優位性およびその至適用量を明らかにする予定である（現在、結果を解析中）。さらに現在施行されている第 I/II 相下肢血管再生治療臨床試験での EPC 移植治療（細胞の採取・分離・移植時から移植後 1 年まで）の安全性、有効性データを整理し、現行試験の問題点、培養増幅 EPC 治療の適用時に期待しうる改善点等を検討している。具体的には、効率的な培養増幅により、末梢血単核球採取時に使用する G-CSF 製剤の減量が可能になり、その副作用も軽減しうることなどが期待されている。

D. 考察・結論

上記の各種動物実験の完遂を通して、臨床試験計画の詳細を決定しうる evidence を集積させ、臨床試験実施時の安全性と有効性を担保しうる手順書・プロトコルの完成に貢献していきたい。

E. 研究発表

1. 論文発表（主要）

Iwasaki H, Fukushima K, Kawamoto A, Umetani K, Oyamada A, Hayashi S, Matsumoto T, Ishikawa M, Shibata T, Nishimura H, Hirai H, Mifune Y, Horii M, Sugimura K, Suehiro S, Asahara T.

Synchrotron radiation coronary microangiography

for morphometric and physiological evaluation of myocardial neovascularization induced by endothelial progenitor cell transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; in press.

Kawamoto A, Iwasaki H, Kusano K, Murayama T, Oyamada A, Silver M, Hulbert C, Gavin M, Hanley A, Ma H, Kearney M, Asahara T, Losordo DW. CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization post myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation.* 2006;114(20):2163-2169.

Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, Miwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Nishimura H, Murasawa S, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am J Pathol.* 2006; 169(4): 1440-1457.

Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T, Eaton L, Masuda H, Asahara T, Losordo DW.

Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation.* 2006; 113(12):1605-14.

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.

川本篤彦

特集1 心臓領域における画像診断最前線
NOGA 心内膜マッピングシステム
Rad Fan 2006;4(12):25-28.

川本篤彦, 浅原孝之.

特集 PCI 治療のための Key words
1. PCI 戦略 1. 心筋血管再生療法
Heart View 2006;10(12):33-35.

川本篤彦, 岩崎弘登, 浅原孝之.

特集 第70回日本循環器学会学術集会 3. 細胞死と修復—心疾患における再生 幹細胞/前駆細胞による心血管再生治療
循環器専門医. 2006;14(2):247-253.

松本知之, 黒田良祐, 美船泰, 黒坂昌弘, 川本篤彦, 浅原孝之
新しい医療技術 末梢血CD34陽性細胞による骨・血管再生療法の可能性
整形・災害外科. 2006;49(9):1009-13.

岩崎弘登, 川本篤彦, 村澤聡, 浅原孝之
【血管新生Update】血管内皮前駆細胞(EPC)を用いた再生治療
脈管学. 2006;46(3):273-280.

岩崎弘登, 川本篤彦, 小山田晃, 林 彩子, 浅原孝之.
遺伝子・再生医学講座 成人末梢血 CD34 陽性細胞を用いた再生治療.
Angiology Frontier. 2006;5(2):145-152.

川本篤彦, 浅原孝之.

【再生医学 臨床と研究の最前線】臨床編 血管 重症下肢虚血疾患に対する血管内皮前駆細胞移植.
医学のあゆみ. 2006;217(5):403-408.

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.

2. 学会発表 (主要)

片山美奈子、木下 慎、川本篤彦、馬場理江、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回日本フットケア学会学術集会
シンポジウム1：血管再生治療の導入とフットケアの新たな展開
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
2007年2月16日、神戸
第5回日本フットケア学会学術集会プログラム p28.

川本篤彦

第26回日本アフェレシス学会学術大会
ワークショップ4：「再生医療とアフェレシス治療の接点を探る」
GSCF 動員 CD34 陽性細胞移植による下肢血管再生治療
2006年7月29日、大津

川本篤彦

第 53 回日本実験動物学会総会

公開シンポジウム I : 実験計画書の作成と動物

実験委員会による審査

ブタを用いた心臓血管再生治療研究

2006 年 5 月 11 日, 神戸.

第 53 回日本実験動物学会総会講演要旨集. 63.

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

Horii M, Suzuki T, Kusano KF, Ii M, Suehiro S,

Carmeliet P, Asahara T.

Novel therapeutic mechanism of placental growth factor in myocardial infarction: tissue repair through enhancement of proliferation, mobilization and recruitment of BM-derived stem cells for cardiac myoangiogenesis.

Scientific Sessions 2006, American Heart Association.

November 12, 2006. Chicago, IL.

Circulation, 2006,114(18)Supplement II: II-36.

Horii M, Iwasaki H, Kawamoto A, Nishimura H,

Oyamada A, Ii M, Suehiro S, Asahara T.

Gene deficiency of Lnk upregulates cardiac myoangiogenesis via enhancing proliferation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells and cardiac stem cells post myocardial infarction.

Scientific Sessions 2006, American Heart Association.

November 15, 2006. Chicago, IL.

Circulation, 2006,114(18)Supplement II: II-264.

Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M,

Baba R, Takano H, Kihara Y, Morioka S, Fukushima

M, Asahara T.

Safety and efficacy is sustained up to one year after

transplantation of autologous CD34+ cells in no-option patients with chronic critical limb ischemia.

Scientific Sessions 2006, American Heart Association.

November 13, 2006. Chicago, IL.

Circulation, 2006,114(18)Supplement II: II-446.

Iwasaki H, Kawamoto A, Suehiro S, Carmeliet P,

Asahara T.

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

World Congress of Cardiology 2006

September 5, 2006, Barcelona, Spain.

Eur Heart J. 2006, 27(Abstract Suppl), 812.

Katayama M, Kawamoto A, Kinoshita M, Handa N,

Tamita K, Morioka S, Kihara Y, Asahara T.

Efficacy of therapeutic neovascularization for critical limb ischemia: what is the best way to confirm new blood vessel formation?

World Congress of Cardiology 2006

September 3, 2006, Barcelona, Spain.

Eur Heart J. 2006, 27(Abstract Suppl), 276.

F. 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

単一血液血管芽細胞からの血管系細胞系列への運命決定及び分化判定法の開発

分担研究者 増田治史 東海大学医学部 助教授

研究要旨

増幅培養による移植可能な血管内皮前駆細胞の確保に当たり、効率の良い増幅法の確立が望まれる。そこで、高効率血管内皮前駆細胞増幅因子の探索に当たり、移植細胞源の一つである未分化血管幹細胞からの血管内皮前駆細胞（Endothelial Progenitor Cell = EPC）への細胞系列決定及び分化解析法を開発した。

A. 研究目的

未分化血管幹細胞のEPCへの運命決定機構の解析は、その解析法が存在しないことから、正確な検討考察は行われておらず、未知の領域である。従って、未分化血管幹細胞（CD133陽性細胞）のEPCへの細胞系列決定及び分化運命決定の解析法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

ヒト臍帯血単核球を採取し、抗体ビーズ法を用いて、CD133陽性細胞（血管幹細胞）を単離した。FACS Vantage systemを用いて96well培養プレートに単一細胞(single CD133+細胞)を播種し、VEGF存在及び非存在下で7日間培養した。増幅培養細胞について前年度までに確立したEndothelial Progenitor Cell (EPC)分化 assay法を用いて単一血液血管芽細胞のEPCへの細胞系列決定及び分化度の検討を行った。EPC分化 assay用のメチルセルロース培地添加24well培養プレートに、増幅培養細胞を播種後、18日間培養。EPCコロニー形成能を評価した。

（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

- 1) 未分化型 EPC コロニー形成 single CD133+細胞, 単独分化型 EPC コロニー形成 single CD133+細胞, 複合型 EPC コロニー形成 single CD133+細胞の存在が明らかとなった。即ち血管幹細胞の運命は、early stage EPC, moderate stage EPC, late stage EPC の3系統であることが判明した。
- 2) VEGF存在下でEPCへの細胞系列決定頻度の有意な上昇が認められた (p=0.016)。
- 3) 分化型 EPC コロニー形成 single CD133+細胞の頻度の有意な上昇が認められた (p=0.009)。(図1参照)

られた。

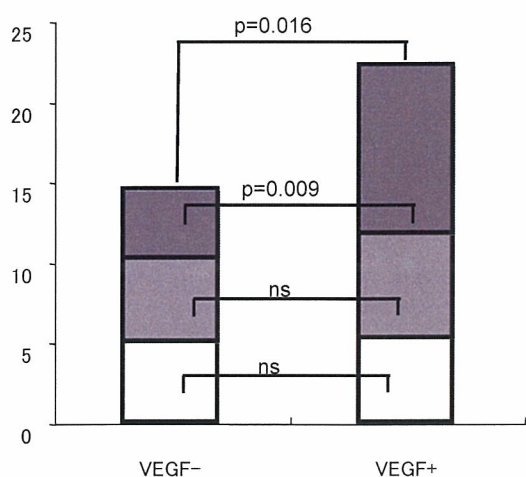


図1 ; VEGF による血管幹細胞からの EPC への細胞系列決定及び分化度の評価。Y 軸 ; 単一血管幹細胞 (CD133 陽性細胞) 60 個当たりの EPC へ運命付けられた単一血管幹細胞の頻度。

■; Late stage EPC, ■; Moderate stage EPC, □; Early stage EPC

D. 考察及び結論

本 assay 法を用いることにより、単一血管幹細胞の細胞系列決定及び分化度判定が可能となった。この手法により、EPC の血管幹細胞からの高効率増幅分化因子の探索が可能になると考え

E. 研究発表

1. 雑誌 :

Masuda H, Asahara T et al. Estrogen Mediated Endothelial Progenitor Cell Biology and Kinetics For Physiological Postnatal Vasculogenesis. Circ Res, Mar accept, 2007

2. 発表 :

第 71 回日本循環器学会学術集会

[A single cell evaluation of endothelial progenitor cell, hematopoietic stem cell and hemangioblast in cord blood CD133 positive cells.]

F. 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再考察し、更なる増幅効果を検討した。

A. 研究目的

近年、我々は CD34 陽性細胞を用いた慢性下肢虚血患者に投与する移植療法を行いその有効性を証明し、また、無血清培養条件下における増幅 EPC 移植療法の開発にも成功し、虚血性下肢病変に対する有効性を示す事が出来た。そこで更に、この増幅で得られた細胞に対しケモカイン増強作用を用いて細胞移植療法の検討を行った。

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, らの添加無血清培地を用いて 1 週間培養した。更に、この 1 週間増幅培養した細胞に対し、細胞間情報伝達物質でケモカインの 1 種であるストローマ細胞由来因子 (Stromal cell-derived factor-1:SDF-1) を用いて細胞作用増強を促し、下肢虚血を作成したマウスの虚血部位に計 5 カ所、細胞数 1×10^5 個/マウス、筋肉内投与した。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。

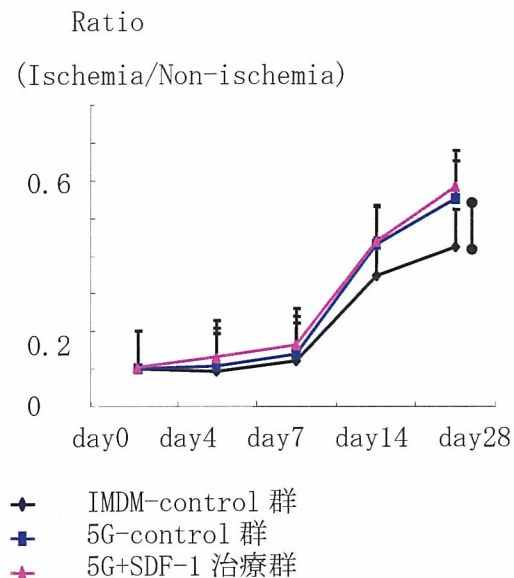
（倫理面への配慮）

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

細胞移植後 4. 7. 14. 28 日後にレーザードップラー血流計を用いてマウスの下肢虚血部の測定を行った。IMDM 溶液コントロール群 (50ul)、前処置として 5G を用いたコントロール群 (50ul)、前処置として 5G 及び SDF-1 による細胞作用増強を促した治療群 (1×10^5 投与) の 3 群で比較とした。結果、投与 14 日後の 3 群では明らかな差は認められなかったが (DAY14 : IMDM-control 群 0.35 ± 0.07 、5G-control 群 0.45 ± 0.13 、治療群 0.46 ± 0.21)、投与 28 日後の 3 群では、コントロール群と比較し治療群において明らかな血流の改善傾向が認められた。(DAY28 : IMDM-control 群 0.42 ± 0.19 、5G-control 群 0.56 ± 0.17 、治療群 0.59 ± 0.21)。

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=6)



D. 考察及び結論

無血清増幅分化培養法を用いて細胞間情報伝達物質であるストローマ細胞由来因子(SDF-1)による細胞作用増強を促した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。このような血管幹細胞移植療法は、臨床的にも今後非常に有意義なものになると考えられる。

E. 研究発表

1. 雑誌 :

Nishiwaki, Y. Yoshida, M. Iwaguro, H. Isobe, M. Endothelial E-selectin potentiates neovascularization via endothelial progenitor cell-dependent and -independent mechanisms.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Mar;27(3):512-8. Epub 2006 Dec 14.

2. 発表 :

Iwaguro, H, Tono, K. Eguchi, M. Kwon, S. Tanaka, R. Nakagawa, Y. Wada, M. Ito, R. Kobori, M. Masuda, H. Asahara, T.

A new candidate of novel analysis for therapeutic neovascularization (2006 Experimental Biology)

F. 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いる。昨年度までの当分担研究において臍帯血 CD133 陽性単核球の体外無血清培養を確立し、増殖にて得られた細胞の虚血改善効果はラット心筋梗塞モデルにおいて増殖前と同等であることが確認された。本年度の研究では臨床応用への技術的な最終課題である、末梢血／骨髄由来の単核球細胞の無血清培養での体外増殖の効率化に関する検討を行った。

A. 研究目的

我が国で急速に進行しつつある高齢化社会において、脳血管性認知症や虚血性心疾患による身体機能障害は、多大な社会的負担をもたらす。虚血改善による身体機能回復に有望な EPC 投与による血管再生療法の効果には、投与細胞数依存性が有ることが知られている。臨床応用への技術的な課題である、EPC の無血清培養での体外増殖技術の確立および安全性の確認を研究目的とする。

B. 研究方法

昨年度までの本研究では臍帯血由来の単核球細胞の無血清培養での体外増殖技術を確立した。本年度は臨床応用への汎用性を安全性／倫理性の側面から高めるため自己の末梢血／骨髄由来の単核球細胞の無血清培養での体外増殖の効率化を実施した。市販あるいは患者／同意者より提供されたヒト骨髄、末梢血、G-CSF 投与時末

梢血アフェレーシスからの単核球を用いて、前年度に臍帯血で確立した無血清培養にて体外増幅し、臨床的に採取可能な検体量から治療に必要なとされる 1.0×10^7 個の CD133 陽性細胞が分離可能であるか検討した。さらに、平行して臍帯血由来単核球細胞を用いて、無血清培養での体外増殖時の至適酸素濃度に関する検討を行った。

（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。

C. 研究結果

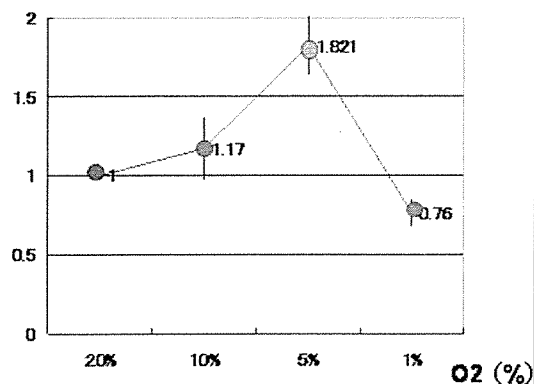
無血清培養での体外増殖技術を用いて治療に必要なとされる 1.0×10^7 個の CD133 陽性細胞を臨床的に採取可能な検体量を臍帯血、骨髄、G-CSF 投与時末梢血アフェレーシスから得ることは十分に可能であることが確認されたが、末

梢血からは得ることができなかった。(表1)

	検体採取量 単核球細胞数	CD133陽性率 陽性細胞数	増幅倍率 増幅後細胞数	CD133陽性率 陽性細胞数
臍帯血	50 ml 1.0×10^8	0.5 % 5.0×10^5	100倍 5.0×10^7	36 % 1.8×10^7
骨髓	400 ml 5.0×10^8	2.0 % 1.0×10^7	30倍 3.0×10^6	58 % 17×10^7
末梢血	200 ml 1.8×10^9	0.2 % 3.6×10^5	10倍 3.6×10^6	61 % 2.2×10^6
アフエーシス	10 L 2.8×10^{10}	0.3 % 1.0×10^6	10倍 1.0×10^6	63 % 63×10^7

平行して実施した、臍帯血由来の単核球細胞の無血清培養時の至適酸素分圧の検討については、従来の20%の酸素濃度に比べて酸素濃度5%条件下での培養で、約1.8倍の増殖効率が得られることが判明した。酸素濃度5%条件下で増殖した細胞をヌードラット心筋梗塞モデルに投与したところ、従来の酸素濃度20%条件下で増殖した細胞と比較して、生存率と心機能回復において有意な差を認めず、コントロール群に比べて有意な改善効果を認めた。

(図1)



D. 考察

臍帯血、骨髓およびG-CSF投与時末梢血アフエーシスからの単核球が、当グループで確立した無血清培養増幅を用いることで、十分な臨床応用の条件を備えていることが確認できた。末梢血からの単核球からは現時点で、十分な細胞量が得られなかったが、酸素分圧を20から5%に至適化することにより、増幅効率の改善が期待されることから、今後の研究成果を持って評価すべきである。

E. 結論

臍帯血、骨髓、G-CSF投与時末梢血アフエーシス由来単核球から臨床応用に必要なEPCを無血清体外増殖法で増殖させ、必要数を確保することが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, Miwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Nishimura H, Murasawa S, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. Am J Pathol. 2006 Oct;169(4):1440-57.

2. 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 after myocardial infarction. Circulation. 2006 Mar 14;113(10):1311-25.

2. 学会発表

G. 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

血管内皮前駆細胞の体外培養と CPC への応用

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

臍帯血由来 CD133 陽性細胞を用いた体外増幅法をもとに基礎検討を行い、臨床研究に用いる細胞源と細胞培養条件を確定すると共に、CPC(Cell Processing Center)を利用した臨床研究への準備を進める。

A. 研究目的

無血清培養下における臍帯血由来 CD133 陽性細胞の体外増幅法をもとに末梢血および骨髓由来 CD34 陽性細胞を体外培養し、CPC を利用した臨床研究に最適な細胞源と培養条件を確定し、CPC 利用のための準備を行う。

B. 研究方法

臍帯血由来CD133陽性細胞、骨髓由来CD34陽性細胞、末梢血由来CD34陽性細胞について1週間増殖培地において培養を行い、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)を用いて評価を行った。CPC利用に関しては当センター内CPC管理部門との連携により手順書の作成にとりかかる。

C. 研究成果

臨床で採取可能な各細胞源から予想される細胞数を検討した結果、G-CSF 動員末梢血由来 CD34 陽性細胞が最も優れていることが明らかになった。また、従来の無血清培養下における臍帯血由来 CD133 陽性細胞の体外増幅法のプロトコールに加え、低酸素条件での培養が増幅を促進することが確認された。これらの検討をもとに、

CPC での再現実験を行うために必要書類（手順書）の作成を現在進めている。

D. 考察

臨床研究に移行するためには、今年度までに検討された細胞の種類と、培養条件の下で CPC 施設において再現実験を行う必要がある。そのために細胞の増幅率や、増幅後の細胞の品質について詳細に検討することが求められる。CPC 内での無菌操作は必須であるが、CPC への細胞搬入、CPC からの細胞出荷に関して無菌的な輸送方法についても今後検討する必要がある。

E. 結論

G-CSF 動員末梢血由来 CD34 陽性細胞を低酸素条件で体外培養した増幅細胞が CPC を用いた臨床研究に適していると考えられる。最終年度では CPC を用いた同細胞による培養システムの確立に焦点をあてる。

F. 研究発表

論文発表

1. Murasawa S., Asahara T.

Gene Modified Cell Transplantation for Vascular regeneration

Current Gene Therapy, 7: 1-6, 2007

2. Murasawa S., Asahara T.

Endothelial Progenitor Cells Potential for Vasculogenesis and Cardiomyogenesis

“New Developments in Stem Cell Research”

NOVA Publishers, 59-71, 2006

3. Hamada T, Murasawa S., Asahara T

Simple screening method for differentially methylated regions of the genome using a small number of cells.

Biochemical and Biophysical Research

Communications, 9; 353(2): 275-279. 2007.

4. Matsumoto T, Kawamoto A, Kuroda R, Ishikawa M, Mifune Y, Iwasaki H, Miwa M, Horii M, Hayashi S, Oyamada A, Nishimura H, Murasawa S., Doita M, Kurosaka M, Asahara T.

Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing.

Am J Pathol, 169(4): 1440-1457, 2006.

5. 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 after myocardial infarction.

Circulation, 113: 1311-25, 2006

6. 村澤 聡、浅原 孝之

糖尿病マクロアングリオパシー

2)血管内皮再生療法

日本臨床, Vol.64, No.11,2135-2141, 2006

7. 岩崎 弘登、川本 篤彦、村澤 聡、浅原 孝之

血管内皮前駆細胞(EPC)を用いた再生医療
脈管学、vol.46, No.3, 273-279, 2006

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。