

2007/6001A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業：基礎研究成果の臨床応用推進研究

「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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 浅原 孝之

平成20(2008)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） 1

II. 分担研究報告書

1. 虚血性疾患細胞治療技術開発、臨床試験の計画・施行
川本 篤彦（先端医療振興財団） 5
2. 血管内皮前駆細胞採取・増幅・分化技術開発に関する研究
増田 治史（東海大学医学部） 9
3. 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） 11
4. 体外培養血管内皮前駆細胞のCPCでの調製実現化への取組み
村澤 聡（先端医療振興財団） 13
5. 虚血性疾患細胞治療技術開発、臨床試験の計画・施行
木原 康樹（神戸市立医療センター中央市民病院） 15
6. 細胞培養センター（CPC）を用いた血管内皮前駆細胞（EPC）
体外増幅に関する研究
川真田 伸（先端医療振興財団） 17
7. 虚血性疾患細胞治療臨床試験計画・データマネージメント
福島 雅典（臨床研究情報センター 研究部） 20

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 27

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、確立した無血清培養条件下の生体外増幅培養で得られる細胞の有効性を検討し、臨床研究を開始するためのプロトコール作製・細胞培養センター標準手順書作製を進めた。

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確立し、臨床研究開始の準備をする。

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最終改良開発を行った。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 angiopoietin-1, -2 (Ang-1, Ang-2) 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 EPC 分化 assay 法を用いて EPC への細胞系列決定及び分化度の検討を行った。

先端医療センターおよび神戸中央市民病院部門では、川本・木原らによって最終的な細胞移植技術検討としてヌードマウス下肢虚血モデルに対するヒト末梢血 EPC (CD34+細胞) の移植実験を実施した。

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。開発した無血清培養で最も効率的に増殖

した 5%酸素下での培養の有益性を得られる細胞数、コロニー形性能、発現する EPC 関連表面抗原の観点からを通常の 20%酸素下での培養と比較検討した。村澤・川真田らによって、臨床研究実施のため、Cell Processing Center (CPC) での標準手順書・プロトコール作製を進めた。川本らによって、臨床研究全体のプロトコール作製も進められた。

(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

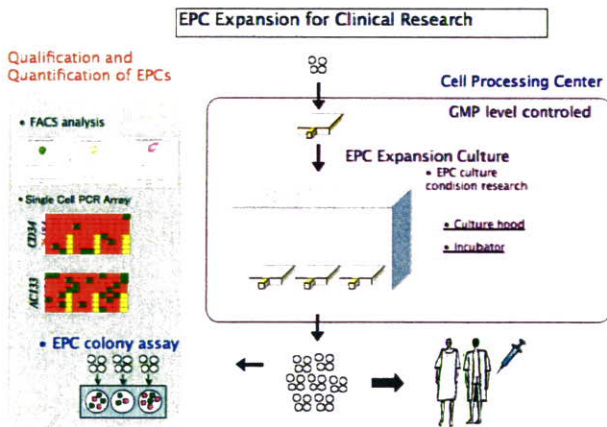
増田・西村らの研究より、hflt-3, hVEGF, hSCF, hTPO, hIL-6 を含有する無血清培地を 5%低酸素条件下で末梢血由来 CD34 陽性細胞を培養すると、臨床的条件から最も適切な細胞を採取できると判断された。川本・木原らによる研究で、培養細胞の下肢虚血・心筋虚血疾患への血管再生治療の有効性が推察された。細胞の安全性の面も確認できた。

村澤・川真田らによって、CPC における細胞加工の

ための標準手順書作製が終了した。製造管理者・品質管理者の選定も終了し、川本らによる臨床プロトコルの作製と共に、臨床研究の申請段階にはいることが可能になった。

D. 考察

臨床と同じ末梢血由来 EPC で無血清培養による分化・増幅法による移植細胞の体外培養法が完成した。細胞の質及び量は十分であり、安全性及び効果性は前臨床試験的に確認された。CPC の標準手順書、臨床試験全体のプロトコルの作成は予想以上に作業が難航したがほぼ終了し、臨床研究として医療応用に一步近づける事が出来たと考える。



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。臨床適用に向けて、臨床研究計画を申請中である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 (主要) :

1. Masuda H, Kalka C, Takahashi T, Yoshida M, Wada M, Kobori M, Itoh R, Iwaguro H, Eguchi M, Iwami Y, Tanaka R, Nakagawa Y, Sugimoto A, Ninomiya S, Hayashi S, Kato S, Asahara T. Estrogen-Mediated Endothelial Progenitor Cell Biology and Kinetics For Physiological Postnatal Vasculogenesis. *Circ Res.* 2007 Sep 14;101(6):598-606.

2. Sugimoto A, Masuda H, Eguchi M, Iwaguro H, Tanabe T, Asahara T. Nicotine Enlivenment of Blood Flow Recovery Following Endothelial Progenitor Cell Transplantation into Ischemic Hindlimb. *Stem Cells Dev.* 2007 Aug; 16(4):649-656.

3. Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Suzuki T, Oyamada A, Horii M, Yokoyama A, Nishimura H, Lee SY, Miwa M, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J Cell Physiol.* 2008 Apr;215(1):234-42.

4. 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 Jun;27(6):1326-33.

5. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina. A phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation.* 2007; 115(25):3165-3172.

6. Tei K, Matsumoto T, Mifune Y, Ishida K, Sasaki K, Shoji T, Kubo S, Kawamoto A, Asahara T, Kurosaka M, Kuroda R. Administrations of peripheral blood CD34-positive cells contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis. *Stem Cells.* 2008, in press.

2. 学会発表 (主要) :

Asahara T. et al. Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine. The 13th Annual Meeting of the International Society for Cellular Therapy. June, 2007. Sydney, NSW.

Asahara T. et al. CD34+ Progenitor Cells in Treatment of Experimental Infarction. The 4th Annual Symposium of the American Heart Association Council on Basic Cardiovascular

Sciences. November, 2007. Orlando, FL.

Asahara T. et al. Vascular Progenitor Cells and Cell Growth. AHA Scientific Sessions 2007. November, 2007. Orlando, FL.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願

2007-224782 [2007/08/30] Hematopoietic and Endothelial Lineage Commitment Assay 法 (HELIC Assay 法) の開発

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

虚血性疾患細胞治療技術開発、臨床試験の計画・施行

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、下肢虚血動物モデルを用いた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。

情報センターの福島と協力して、臨床試験実施に必要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。

B. 研究方法

1. 動物実験による細胞移植治療開発

ヌードマウス下肢虚血モデルに対するヒト末梢血 EPC（CD34+細胞）の移植実験を実施した。下記の各治療群間で下肢温存率、下肢血流改善度を比較し、組織解析も実施した。

- 1) PBS 群
- 2) 非培養 CD34+細胞（2X10E4 個）
- 3) 培養 CD34+細胞（2X10E4 個、Low）
- 4) 培養 CD34+細胞（2X10E5 個、Mid）
- 5) 培養 CD34+細胞（2X10E6 個、Hi）

（倫理面への配慮）

上記の動物実験は、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

C. 研究結果

1. 動物実験成果

上記の各治療後 28 日における足趾も含めた完全な下肢温存率は、CD34+Hi 群で約 40%ときわめて良好な成績（Mid 群 10%、Low 群 0%、非培養 CD34+群 10%、PBS 群 0%）を示した。

また、治療後 28 日における下肢血流改善度は、非培養 CD34+群では PBS 群と差がなかったが、培養 CD34+群では用量依存性に血流改善が認められた。

虚血肢における組織学的毛細血管密度も、上記の血流評価と同様の傾向を示した。さらに、心臓・肺・肝臓・脾臓・腎臓・脳等の全身臓器も組織学的に検索したが、培養、非培養を問わず、CD34+細胞移植群における明らかな副反応は認められなかった。

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ていたが、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に関わった。各種手順書作成に当たっては、主として臨床的観点から助言・協力を行った。

臨床試験プロトコルの作成にあたっては、上記の基礎・前臨床研究成果を基に移植細胞の至適用量を明確にすることができた。さらに先行第 I/II 相下肢血管再生治療臨床試験が終了したので、全症例における（非培養の）EPC の採取・分離・移植時から移植後1年までの安全性、有効性データを解析した。これにより、高齢者・透析患者・動脈硬化患者などでは非培養EPCの採取・分離効率が低いことが明らかになり、これらの患者群は培養増幅EPC治療のより良い適応になると考えられた。

D. 考察

上記の前臨床試験の完遂、臨床試験関連書類の作成を通して、臨床試験計画の詳細を決定しうるevidenceを集積することができた。

E. 結論

培養増幅EPC移植による血管再生治療のポテンシャルは、非培養EPC移植を凌駕しており、体内のEPC数の低下した患者においても、培養増幅を介して十分な治療効果が期待できる。今後の臨床適用が大いに期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表（主要）

Tei K, Matsumoto T, Mifune Y, Ishida K, Sasaki K, Shoji T, Kubo S, Kawamoto A, Asahara T, Kurosaka M, Kuroda R.

Administrations of peripheral blood CD34-positive cells

contribute to medial collateral ligament healing via vasculogenesis.

Stem Cells. 2008, in press.

Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Suzuki T, Oyamada A, Horii M, Yokoyama A, Nishimura H, Lee SY, Miwa M, Doita M, Kurosaka M, Asahara T.

Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing.

J Cell Physiol. 2008; 215(1):234-42.

Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD.

Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina. A phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial.

Circulation. 2007; 115(25):3165-3172.

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;27(6):1326-33.

Kawamoto A, Losordo DW.

Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration.

Trends Cardiovasc Med. 2008;18(1):33-37.

Kawamoto A, Asahara T.

Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies.

Catheter Cardiovasc Interv. 2007;70(4):477-484.

2.学会発表 (主要)

川本篤彦

下肢虚血性疾患に対する CD34 陽性細胞移植の現状と展望

第 11 回心筋・血管新生療法研究会

シンポジウム: 心血管病の実地再生医療の現状と展望

2007 年 7 月 15 日, 東京.

Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Okada Y, Kihara Y, Asahara T.

The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society

Symposium 5: Clinical Trials of Regeneration Therapy in Japan

A phase I/II, single-blind, dose-escalation, clinical trial of autologous CD34+ cell transplantation in intractable patients with chronic critical limb ischemia.

March 17, 2007. Kobe.

Circ J. 2007;71 Suppl I: 34.

堀井美希, 岩崎弘登, 権 相模, 川本篤彦, 小山田 晃, 横山歩美, 西村浩美, 伊井正明, 末広茂文, 浅原孝之.

Lnk 遺伝子欠損は、心筋梗塞後の心臓修復に関わる骨髄由来および心臓内幹細胞の働きを増強させる.

第7回日本再生医療学会総会

2008 年 3 月 14 日, 名古屋.

日本再生医療学会雑誌. 2008;7 Suppl.221.

松田剛典, Kwon Sangmo, 秋丸裕司, 川本篤彦, 村澤聡, 澤 芳樹, 浅原孝之.

マウス骨髄由来 KSL 細胞の血管形成能力における加齢の影響

第7回日本再生医療学会総会

2008 年 3 月 13 日, 名古屋.

日本再生医療学会雑誌. 2008;7 Suppl.201.

馬場理江, 蓑輪和士, 片山美奈子, 川本篤彦, 金子祐一郎.

下肢血管超音波検査法の可能性.

第48回日本脈管学会総会

2007 年 10 月 25-27 日, 松本.

脈管学. 2007;47Suppl. S174.

Nakahira A, Ii M, Iwasaki H, Kawamoto A, Horii M, Oyamada A, Hirai H, Sasaki Y, Suehiro S, Asahara T.

Optimization for the timing of CD34+ cell transplantation therapy in acute myocardial infarction.

Scientific Sessions 2007, American Heart Association.

November 5, 2007. Orlando, FL, USA.

Circulation. 2007;116:II_131.

Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Kihara Y, Asahara T.

A phase I/II, single-blind, dose-escalation, clinical trial of autologous CD34+ cell transplantation in intractable patients with chronic critical limb ischemia.

European Society of Cardiology Congress 2007

September 4th, 2007. Vienna, Austria.

Iwasaki H, Masuda H, Kawamoto A, Yoshida Y, Oyamada A, Akimaru H, Itoh R, Hirai H, Suehiro S, Asahara T.

Therapeutic potential of serum free expanded CD133+ cells for concurrent cardiomyogenesis and vasculogenesis with functional regenerative recovery post myocardial infarction.

European Society of Cardiology Congress 2007
September 5th, 2007. Vienna, Austria.

Horii M, Iwasaki H, Kawamoto A, Nishimura H, Oyamada A, Kwon SM, Ii M, Suehiro S, Asahara T.
Deficiency of Lnk upregulates cardiac myoangiogenesis via enhancing proliferation of endothelial progenitor cells and cardiac stem cells post myocardial infarction.

The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
March 17, 2007. Kobe.
Circ J. 2007; 71 Suppl I: 298.

Kawamoto A, Iwasaki H, Iwaguro H, Oyamada A, Hayashi S, Akimaru H, Akimaru E, Asahara T.
Therapeutic neovascularization by intramyocardial gene transfer of naked DNA encoding placental growth factor in swine chronic myocardial ischemia.

The 71st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society
March 15, 2007. Kobe.
Circ J. 2007; 71 Suppl I: 177.

岩崎弘登, 川本篤彦, 平居秀和, 末広茂文, 浅原孝之.
放射光微小血管造影装置を用いての心筋梗塞に対する血管内皮前駆細胞移植による増幅新生血管の評価
第35回日本血管外科学会学術総会
2007年5月23-25日、名古屋.
日本血管外科学会雑誌. 2007;16(2): 378.

G. 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

血管内皮前駆細胞採取・増幅・分化技術開発に関する研究

分担研究者 増田治史 東海大学医学部 准教授

研究要旨

増幅・分化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のため、単一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

単一未分化血管幹細胞（CD133 陽性細胞）から血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell= EPC）への分化・増幅法を開発する。今回、Angiopoietin-1,2 を用いて行った。

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、angiopoietin-1,-2（Ang-1, Ang-2）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 EPC 分化 assay 法を用いて EPC への細胞系列決定及び分化度の検討を行った。

（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

1) Ang-1,-2 により、EPC への系列決定頻度が有意に促進された。

2) 分化型 EPC 決定頻度が、Ang-1 で促進され、Ang-2 で抑制された。逆に、未分化型 EPC 決定頻度が、Ang-2 で促進された。

3) Ang-1 及び Ang-2 は、EPC 系列決定に促進的に作用するが、Ang-1 は分化促進作用、Ang-2 は抑制作用があることが判明した。

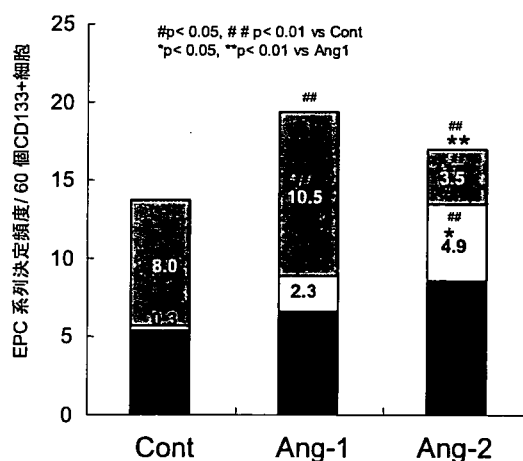


図1: Ang-1,-2による単一幹細胞から EPC系列への決定頻度
■:未分化型 EPC単独決定CD133+細胞, □:両 EPC決定CD133+細胞, ▨:分化型 EPC単独決定CD133+細胞
#p<0.05, ##p<0.01 vs Cont
*p<0.05, **p<0.01 vs Ang1

D. 考察

本 assay 法を用いて、単一血管幹細胞の EPC 系列決定及び分化度判定が可能となった。

E. 結論

本手法により、EPC の血管幹細胞からの高効率増幅分化因子の探索が少数の血管幹細胞でも可能になると考えられ、生体外分化増幅自己血管幹細胞移植療法における自己末梢血希少血管幹細胞を用いた病態判定、または移植目的の自己 EPC の増幅効率判定への臨床応用が可能であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Masuda H, Kalka C, Asahara T, et al. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res* 2007, 101: 598-606.

Sugimoto A, Masuda H, Asahara T, et al. Nicotine enlivenment of blood flow recovery following endothelial progenitor cell transplantation into ischemic hind limb. *Stem Cells Dev* 2007, 16: 649-56.

Eguchi M, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol* 2007, 11: 18-25.

2. 学会発表

2007 アメリカ心臓病学会; 2007. 11. 3-11. 7 演題名; Functional Heterogeneity of Angiopoietin-1, 2 on Endothelial Progenitor Cell Fate Assessed by Single Cell Culture of Cord Blood CD133+cells for Endothelial Lineage Commitment Assay.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願

2007-224782 [2007/08/30] Hematopoietic and Endothelial Lineage Commitment Assay 法 (HELIC Assay 法) の開発

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、骨髓、G-CSF 動員末梢血に含まれる単核細胞の体外無血清培養を確立し、臨床応用に必要な EPC 数量を得ることが可能であることを示した。本年度の研究では、現在臨床応用されている G-CSF 動員末梢血 CD34 陽性単核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

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。しかしながら、対象患者のなかには G-CSF 投与下末梢血アフゼーシスから治療に必要とされる 1.0×10^7 個の CD34 陽性細胞が得られないことも経験されている。本研究では CD34 陽性細胞の無血清培養での体外増殖技術の確立を研究目的とする。

B. 研究方法

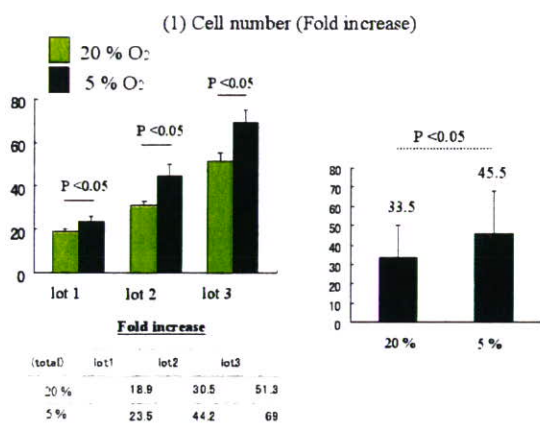
昨年度までの本研究では CD133 陽性単核細胞の無血清培養での体外増殖技術を確立した。本年度は既に臨床応用されている CD34 陽性単核細胞を対象とし、前年度に臍帯血 CD133 陽性細胞が本研究で開発した無血清培養で最も効率的に増殖した 5% 酸素下での培養の有益性を得られる細胞数、コロニー形成性能、発現する EPC 関連表面抗原の観点から通常 20% 酸素下での培養と比較検討した。

（倫理面への配慮）

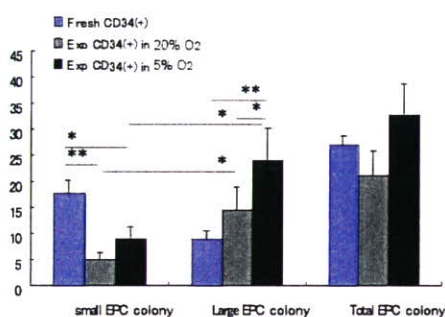
細胞治療に関わる基礎研究として、倫理面では先端医療センター倫理委員会での研究計画の承認を得た。

C. 研究結果

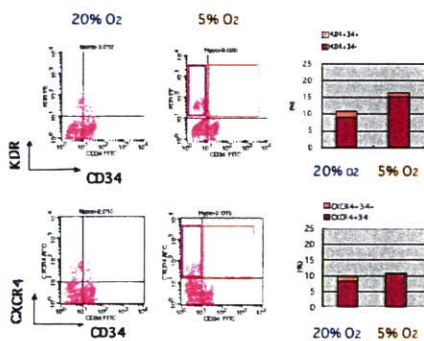
本研究で開発した無血清培養で G-CSF 投与下末梢血アフゼーシスにより得られた CD34 陽性細胞（由来の異なる 3 検体）を 7 日間培養したところ、すべての検体が 20% 酸素下の培養に比べて 5% 酸素下培養で有意に増加した（図 1）。増殖にて得られた CD34 陽性単核細胞の増殖能を colony assay で比較検討したところ、両群間で総コロニー数では有意差がなかったが、5% 酸素下培養群では Large EPC colony が多く得られる傾向を示した（図 2）。FACS による KDR や CXCR4 の発現解析や RT-PCR による血管新生関連因子の発現に関して有意差は両群間に見られなかった（図 3、4）。



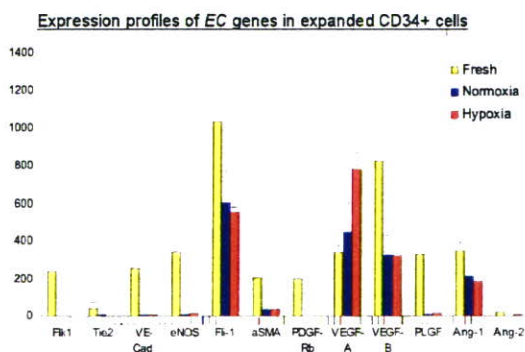
(2) EPC colony forming capacity



(3) FACS analysis; Expression of EPC surface markers



(4) RT-PCR analysis



D. 考察

G-CSF 投与下末梢血アフェレーシスにより得られた CD34 陽性細胞を 5%酸素下無血清培養でより効率的に expand することができた。得られた細胞の性状は 20%培養群と同等で、動物の虚血モデルに対する治療効果においても差は認められなかった (data not shown)。これらは投与細胞数依存性がある血管再生療法の臨床効果の向上に寄与するものと考えられる。

E. 結論

G-CSF 投与時末梢血アフェレーシス由来 CD34 陽性単核細胞を 5%酸素下無血清体外増殖法で効率的に増殖させる方法が確立された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Suzuki T, Oyamada A, Horii M, Yokoyama A, Nishimura H, Lee SY, Miwa M, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J Cell Physiol.* 2008 Apr;215 (1):234-42.

2. 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 Jun;27 (6):1326-33.

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

体外培養血管内皮前駆細胞のCPCでの調製実現化への取り組み

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

これまでに確立した末梢血由来 CD34 陽性細胞を用いた体外増幅法をもとに、CPC (Cell Processing Center) を利用した臨床研究への準備を進めるために必要なGMP基準適合書類の作成を遂行した。

A. 研究目的

これまでの検討から無血清培養下における末梢血由来 CD34 陽性細胞を体外培養する方法を、CPC を利用した臨床研究に最適な細胞源と培養条件と確定し、CPC 利用のための準備を行う。

B. 研究方法

末梢血由来CD34陽性細胞の体外培養による細胞をCPCにて調製するために必要な各種手順書の作成にとりかかる。

C. 研究成果

CPC 管理規定のもとに製造、品質および衛生管理基準書を作成した。さらに製品標準書のもとに、原材料、資材、中間体、製品についての規格書を作成した。また、製造、品質、衛生各項目について標準作業手順書、および各工程における指図書、記録書を作成した。これらの中には、バリデーション、自己点検、

教育訓練および苦情回収処理に関する文書も含まれている。

D. 考察

最終年度はGMP基準のもとでCPCにおいて細胞の体外増幅を行うための書類作成に重点をおいた。今後これらの書類に基づいた細胞調製をCPCにおいて実際に再現し、確実に稼働するかどうかを検討した上で臨床研究に移行する予定である。

E. 結論

これまでの検討で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た。最終年度ではCPCを用いた同細胞による培養システムの実用化に必須の各種作業手順書を中心とした書類作成に焦点をあて、その大部分の準備を遂行した。

F. 研究発表

書籍

1. Murasawa S, Asahara T

「再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価
と安全性」

第8章 心・血管筋再生

3 末梢血幹細胞を用いる心・血管再生評価

シーエムシー出版 187-198 2007. 6. 29 発行

2. Murasawa S, Asahara T

「バイオ医薬品の品質・安全性管理」

第2部 細胞・組織利用製品、遺伝子治療用
医薬品、その他

第1章 細胞・組織利用製品の品質・安
全性確保

第2節 血管

エルアールシー 485-497 2007. 10. 25 発行

G. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし。

分担研究報告書

虚血性疾患細胞治療技術開発、臨床試験の計画・施行

分担研究者 木原 康樹 神戸市立医療センター中央市民病院 内科部長

研究要旨

増幅血管内皮前駆細胞の下肢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、至適移植細胞数等を明らかにした。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

動物実験による細胞移植治療開発

先端医療センター血管再生研究グループと共同して、ヌードマウス下肢虚血モデルに対するヒト末梢血 EPC（CD34+細胞）の移植実験を実施した。下記の各治療群間で下肢温存率、下肢血流改善度を比較した。

- 1) PBS 群
- 2) 非培養 CD34+細胞 (2X10E4 個)
- 3) 培養 CD34+細胞 (2X10E4 個、Low)
- 4) 培養 CD34+細胞 (2X10E5 個、Mid)
- 5) 培養 CD34+細胞 (2X10E6 個、Hi)

(倫理面への配慮)

上記の動物実験は、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した。

C. 研究結果

動物実験成果

上記の各治療後 28 日における大腿壊死の頻度は、

PBS 群で約 70%の高率であったが、非培養 CD34+群および培養 CD34+Low 群で約 15%に、培養 CD34+Mid および Hi 群ではさらに 0%に低下した。足趾も含めた完全な下肢温存率は、CD34+Hi 群で約 40%ときわめて良好な成績(Mid 群 10%、Low 群 0%、非培養 CD34+群 10%、PBS 群 0%)を示した。

また、治療後 28 日における下肢血流改善度は、非培養 CD34+群では PBS 群と差がなかったが、培養 CD34+群では用量依存性に血流改善が認められた。

D. 考察

上記動物実験は、臨床試験で移植可能な細胞数を考慮して、マウス体重当たりの用量が決定された。培養増幅後の EPC、特に高用量群で血流改善効果が顕著であったことは、本治療法の意義を強く支持する結果である。

E. 結論

EPC の培養増幅は、同細胞による下肢血管再生治療効果を増強する効果がある。

F. 研究発表

1.論文発表（主要）

Iwanaga Y, Kihara Y, Niizuma S, Noguchi T, Nonogi H, Kita T, Goto Y.

BNP in overweight and obese patients with heart failure: an analysis based on the BNP-LV diastolic wall stress relationship.

J Card Fail. 2007 Oct;13(8):663-7.

Tani T, Tanabe K, Kureha F, Katayama M, Kinoshita M, Tamita K, Oda T, Ehara N, Kaji S, Yamamuro A, Morioka S, Kihara Y.

Transthoracic Doppler echocardiographic assessment of left anterior descending coronary artery and intramyocardial artery predicts left ventricular remodeling and wall-motion recovery after acute myocardial infarction.

J Am Soc Echocardiogr. 2007 Jul;20(7):813-9.

Tamita K, Katayama M, Takagi T, Akasaka T, Yamamuro A, Kaji S, Morioka S, Kihara Y.

Impact of newly diagnosed abnormal glucose tolerance on long-term prognosis in patients with acute myocardial infarction.

Circ J. 2007 Jun;71(6):834-41.

Kawai J, Tanabe K, Yamaguchi K, Hosoi Y, Watanabe M, Tani T, Yagi T, Fujii Y, Konda T, Sumida T,

Nakamura H, Ui K, Yoneyama A, Morioka S, Kihara Y.

Left ventricular volume and ejection fraction by the axis auto ejection fraction method: comparison with manual trace method and visual assessment of ejection fraction. J Cardiol. 2007 Mar;49(3):125-34.

2.学会発表（主要）

Kawamoto A, Katayama M, Handa N, Kinoshita M, Kihara Y, Asahara T.

A phase I/II, single-blind, dose-escalation, clinical trial of autologous CD34+ cell transplantation in intractable patients with chronic critical limb ischemia.

European Society of Cardiology Congress 2007

September 4th, 2007. Vienna, Austria.

G. 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

細胞培養センター（CPC）を用いた血管内皮前駆細胞（EPC）体外増幅に関する研究

分担研究者 川真田 伸 先端医療振興財団 先端医療センター 研究所 専門役

研究要旨

GMP基準に適合するEPCの体外増殖培養技術確立と製造・品質及び衛生に関わる基準書・標準書・手順書・記録書等の管理文書類作成。

A. 研究目的

治療用の細胞を安全に患者様に、投与するためには、GMP基準に従った細胞製剤の製造・品質管理が要求されている。今回の分担研究ではCPCを用いた治療用の細胞の製造が可能となる施設の要件を記した衛生管理基準書とその付随標準作業手順書（SOP）、製造に関する要件を記した製造管理基準書とその付随SOP、と品質管理に関する品質管理基準書とその付随SOPなどの管理文書類を作成し、今後の細胞製剤製造手順の手引き書となることを目指す。

B. 研究方法

実際にCPC内で入室し、EPCの細胞を培養する。感染症などの安全性・細胞増殖率・生存率等を検定し、それに応じ出荷可能かどうかの品質管理と出荷判定基準を策定する。使用後の清掃を行いCPCの衛生管理基準を参照しながら達成可能な清浄度及び清掃頻度・方法を策定する。

C. 研究結果

EPCの細胞培養を通じて下記のCPC製造・品質・衛生管理文書類を策定した。

衛生管理基準書

目的
適用範囲
衛生管理部門に関する業務
作業室、構造設備、機器、器具の衛生管理
作業室等の清浄度区分に関する事項
作業室の清浄度管理に関する事項
作業服装
健康管理の把握
手洗いに関する規定
衛生管理に関する注意事項
衛生管理の技術的評価及び措置
作業室の入室制限
搬入物、搬出物の衛生管理
原料、資材、製品の保管場所の衛生管理
廃棄物、汚物の処理
昆虫、鼠等の侵入防止に関する事項
付帯設備の衛生管理
衛生管理教育
記録の保存
衛生管理基準書の改廃

手順書

浮遊菌測定手順書
浮遊菌測定頻度ポイント
浮遊菌測定ポイント
浮遊菌作業室別測定結果
付着菌測定手順書
付着菌測定頻度ポイント
付着菌測定ポイント
付着菌作業室別測定結果
防虫防鼠管理手順書
昆虫捕捉報告書
捕虫ライトトラップ・トラップ設置図

昆虫捕捉報告書（トラップ）
昆虫捕捉報告書（ライトトラップ）

殺虫施工報告書
搬入搬出手順書