

201432004A

厚生労働科学研究委託費

再生医療実用化研究事業

(委託業務題目) 「ヒト皮下脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた
重症虚血肢に対する血管新生療法」

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 室原 豊明
平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（再生医療実用化研究事業）による委託業務として、国立大学法人名古屋大学が実施した平成26年度「ヒト皮下脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括） 「ヒト皮下脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法」 に関する研究 室原 豊明	-----	1
II. 委託業務成果報告（業務項目） 「ヒト皮下脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法」 に関する研究 室原 豊明	-----	5
III. 学会等発表実績	-----	18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	19

I. 厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

「ヒト皮下脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法」 に関する研究

業務主任者 室原 豊明 国立大学法人名古屋大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

重症虚血肢に対する新たな体性幹細胞起源として期待される脂肪組織由来間葉系前駆細胞（ADRC）を用いた新規の心血管再生療法を開発するために、臨床試験を行い安全性および有効性を評価する。また、より効率的かつ効果的な幹細胞移植再生療法の実現を目指し、逆トランスレーショナル・リサーチ（基礎研究）も並行して行う。

室原 豊明 国立大学法人名古屋大学大学院医学系研究科教授

A. 研究目的

新たな体性幹細胞起源として期待される脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた新規の心血管再生療法の開発を目的とする。

B. 研究方法

1. 『ヒト脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法』の臨床試験

従来治療では患肢切断が余儀なくされると判断される Fontaine III-IV度の重症虚血肢を有する症例に対して本血管新生療法を実施する。

2. 効率的かつ効果的な幹細胞移植再生療法の実現を目的とした基礎的検討

「骨髄単核球細胞移植による血管新生療法」で認められた糖尿病や透析患者などの治療不応群が存在したことより、本血管新生療法がこれら治療不応群に効果を発揮するか否かを検討するため、本症例登録患者や糖尿病患者由来脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いて、今後、重症虚血肢の背景となる基礎疾患が、脂肪組織由来間葉系前駆細胞の機能に与える影響について検討を行う。また、人への応用が可能な大型脂肪組織由来間葉系前駆細胞シートの開発も行う。

C. 研究結果

1. 『ヒト脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法』の臨

床試験

従来治療では患肢切断が余儀なくされると判断された Fontaine IV度の重症虚血肢を有する3症例（バージャー病1症例、膠原病2症例）に対して本血管新生療法を実施し、施行後の追跡調査を行った。第一症例は強皮症に伴う末梢血管障害による右第1趾の難治性虚血性潰瘍を有する患者であった。第二症例は閉塞性動脈硬化症及び強皮症による右第2・3趾の難治性虚血性潰瘍を有する患者であった。第三症例はバージャー病に伴う左第5趾の難治性虚血性壊疽および潰瘍を有する患者であった。いずれの症例も術後6ヶ月の時点で、疼痛の軽減及び潰瘍サイズの縮小または治癒、6分間歩行可能距離の延長を認め、血管造影やレーザードップラー検査においても血流改善を示唆する所見が認められた。現時点において、3症例とも出血、感染、肺塞栓症などの想定される周術期合併症や血管新生に伴う新規悪性新生物や増殖性網膜症などの有害事象の発生を認めておらず、患肢切断も免れている。

2. 効率的かつ効果的な幹細胞移植再生療法の実現を目的とした基礎的検討

上記3症例の循環血液中の前駆細胞（CD34陽性細胞）をフローサイトメトリーで解析した結果、細胞移植後3日目から1週間にかけてCD34陽性細胞の増加傾向が認められた。また、CD34陽性細胞の増加率は、移植された脂肪組織由来間葉系前駆細胞数に依存する傾向が見られた。このことより、本血管新生療法は、移植細胞数が多いケースほど効果的である可能性が示唆された。現在、細胞移植の治療効率改善のため、細胞シート作成に関する研究を行っている。磁性ナノ粒子をリポソームにて細胞内投与することにより、外部磁力で短時間のうちに10層以上からなる三次元細胞シートを構築する方法の樹立に成功した。この細胞シート技術を用いて自己脂肪組織由来間葉系前駆細胞シートを作製し、その細胞シート特性につき基礎的検討を行った。また、ヒトへの応用が可能な大型脂肪由来間葉系前駆細胞シートの開発も行い、直径10cmの細胞シート作成に成功した。この細胞シートをマウス虚血部位に移植したところ、より効率的、効果的に血管新生作用が増強した。今後、大動物を用いて、その有効性、安全性の検討を行う予定である。また、「骨髄単核球細胞移植による血管新生療法」で認められた糖尿病や透析患者などの治療不応群が存在したことより、本血管新生療法がこれら治療不応群症例に効果を発揮するか否かを検討するため、本症例登録患者や糖尿病患者由来脂肪組織由来間葉系前駆細胞の細胞培養を開始した。今後、移植細胞の特性と細胞移植の効果との関連を詳細に検討していく予定である。

D. 考察

現在までに、本血管新生療法を3症例に施行し6ヶ月の追跡調査を行った。3症例と

もに自覚症状(疼痛や歩行可能距離)の改善および他覚所見の改善傾向(潰瘍縮小など)が認められた。現在までに本治療に関係した有害事象の発生はなく、本臨床試験継続の妥当性は担保されたものとする。しかしながら、「骨髄単核球細胞移植による血管新生療法」で認められた糖尿病や腎不全患者・透析患者などの治療不応群のような症例には、まだ本血管新生療法を施行できておらず、今後の検討が必要である。最終的な治療効果判定については、現状で登録症例数が少ないため評価困難であり、更なる症例の積み重ねが最重要課題であると考えている。

E. 結論

皮下脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法は、従来治療で治療選択肢がなかった症例において、有用な治療選択肢となりうる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文

- Hao CN, Shintani S, Shimizu Y, Kondo K, Ishii M, Wu H, Murohara T. Therapeutic angiogenesis by adipose-derived regenerative cells: Comparison with bone marrow mononuclear cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;307:H869-879.
- Ishii M, Shibata R, Shimizu Y, Yamamoto T, Kondo K, Inoue Y, Ouchi N, Tanigawa T, Kanemura N, Ito A, Honda H, Murohara T. Multilayered adipose-derived regenerative cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2014;175(3):545-53.

和文

- 近藤和久, 柴田 玲, 新谷 理, 室原豊明. 「血管新生治療と心血管老化」. 循環器内科 2014;76(3):270-278.
- 新谷 理, 近藤和久, 室原豊明. 「脂肪由来間葉系前駆細胞移植は重症虚血肢を救えるか?」. 循環器内科 2014;76(5):477-483.

- 林田竜、近藤和久、柴田玲、新谷理、室原豊明 脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた心血管再生医療の展望 日本臨床, 2014 印刷中

2. 学会発表

- Shintani S, Hao C, Shimizu Y, Kondo K, Murohara T. The Comparison of Adipose Derived Regenerative Cells and Bone Marrow Mononuclear Cells as Transplanted Cells for Therapeutic Angiogenesis. Basic Cardiovascular Sciences 2014 Scientific Sessions. Las Vegas, Nevada, USA.
- 第 31 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 平成 26 年 11 月 29 日 名古屋 「Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation」 新谷 理
- 第 3 回 CLINCH (Critical Limb Ischemia Network in aiChi) 平成 27 年 3 月 21 日 名古屋 「重症下肢虚血に対する脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた血管新生療法の試み」 近藤和久
- 柴田玲、室原豊明 脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた血管新生療法の開発 第 18 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、横浜、2014
- 第 31 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 平成 26 年 11 月 28 日 名古屋 「Therapeutic angiogenesis by adipose-derived regenerative cells Rei Shibata, Kazuhisa Kondo, Satoshi Shintani, Toyooki Murohara

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

膝液瘻の予防及び治療 発明者：國料俊男、山本徳則、柴田玲、横山幸宏、金子博和、後藤百万、船橋康人、松川宜久、室原豊明、金村則良 番号：2014-147173 (JP) 出願年月日：2014年7月17日

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

II. 厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

「ヒト皮下脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法」 に関する研究

業務主任者 室原 豊明 国立大学法人名古屋大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

重症虚血肢に対する新たな体性幹細胞起源として期待される脂肪組織由来間葉系前駆細胞（ADRC）を用いた新規の心血管再生療法を開発するために、臨床試験を行い安全性および有効性を評価する。また、より効率的かつ効果的な幹細胞移植再生療法の実現を目指し、逆トランスレーショナル・リサーチ（基礎研究）も並行して行う。

室原 豊明 国立大学法人名古屋大学大学院医学系研究科教授

A. 研究目的

循環器領域では、1990年代から血管再生療法に関する研究がスタートした。Asahara らにより、血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell: EPC）が成体の循環血液中にも存在し、血管新生に関与することが明らかとなり（1）、また EPC は成人では骨髄から末梢血に動員されることが証明された。我々は自己骨髄単核球細胞移植により、虚血組織に血管新生が誘導されることを示した（2、3）。さらに、循環器分野における日本初の細胞移植を用いたトランスレーショナル・リサーチとして、従来の治療法では患肢切断が免れない重症虚血肢に対して「骨髄単核球細胞移植による血管新生療法」を開発し、その効果と安全性を報告した（4）。この研究は、多くの国内外研究者から評価され、同様の臨床研究が次々に各国で追従された。しかし、末梢動脈疾患患者で血管新生療法を必要とする患者の多くが心疾患を合併している場合が多く、骨髄単核球細胞移植では全身麻酔下に大量の骨髄採取が必要となるため患者への負担が大きい。更にこの治療には糖尿病や透析患者などの治療不応群も存在することが判明したため（5、6）、血管新生療法の課題として、新たな細胞供給源の開拓や治療効率を上げる方法の開発が求められてきた。

2001年に Zuk らにより脂肪組織中に脂肪、軟骨、骨、骨格筋などに分化誘導可能な間葉系幹細胞に類似した細胞が存在することが報告された（7）。その細胞は脂肪組織由来間葉系前駆細胞（adipose-derived regenerative cell: ADRC）と称されている。ADRC は骨髄細胞と比べ容易に大量に採取でき、また骨髄由来細胞とほぼ同等の組織再生能力を有するとされることなどから骨髄に代わる新たな体性幹細胞起源として、再生医療分野において期待

されるようになった。現在世界中で ADRC を用いたさまざまな疾患に対する細胞治療の検証、臨床試験が試みられている。これまでに外傷や手術に伴う頭蓋顔面欠損に対する骨・軟部組織再生、クローン病に伴う直腸膀胱瘻などの治療、本邦においても脂肪細胞増大治療（乳房再建術など）、放射線被爆による難治性潰瘍治療に対する効果などが報告されている。循環器領域では、欧米において急性心筋梗塞患者（APOLLO 試験、ADVANCE 試験）、慢性心筋虚血患者（PRECISE 試験）、慢性心不全患者（Athena 試験）を対象とした臨床試験が行われている。しかしながら、世界中見渡しても、重症虚血肢に対する ADRC を利用した細胞治療は、ほとんどなされていない。

我々もこの細胞の組織修復能に着目し、研究を進めてきた。我々はマウス皮下脂肪より ADRC を分離し、マウス下肢虚血モデルに移植することにより血管新生が誘導されることを報告した(8)。その後、ADRC を用いた血管新生療法の臨床導入に向け準備を進め、前臨床研究を経て平成 24 年に厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」による『ヒト皮下脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法についての研究』の実施計画の認可を得て、平成 25 年度より臨床試験を開始した。本事業では、この臨床試験を遂行し、新たな体性幹細胞起源として期待される ADRC を用いた新規の心血管再生療法の開発を目的とする。目標症例数は 3 年で 20 例を予定している。また、血管再生療法の課題としては、新たな移植細胞源の探索のみならず、治療効率を上げる方法の開発が求められており、より効率的かつ効果的な幹細胞移植再生療法の実現を目指し、逆トランスレーショナル・リサーチ（基礎研究）も並行して行う。

参考文献・特許)

- (1) Asahara, Murohara et al, *Science* 1997
- (2) 米国特許：US Patent 6,878,3713)
- (3) Shintani, Murohara et al, *Circulation* 2001
- (4) Tateishi-Yuyama et al. The TACT Study Group, *Lancet* 2002
- (5) Matoba, Murohara et al, *Am Heart J.* 2008
- (6) Kajiguchi, Murohara et al, *Circ J.* 2007
- (7) Zuk et al, *Tissue Eng.* 2001
- (8) Kondo, Murohara et al, *ATVB* 2009

B. 研究方法

1. 『ヒト脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法』の臨床試験

我々は、脂肪組織由来間葉系前駆細胞による再生療法の有効性と安全性を検証するため、

名古屋大学医学部生命倫理審査委員会および、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の承認を受け、平成 25 年度より、『ヒト皮下脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法についての研究』を開始した。本臨床研究実施計画書の概要を以下に記す。

対象疾患：閉塞性動脈硬化症、バージャー病、膠原病にともなう重症虚血肢

患者登録基準：従来治療では患肢切断が余儀なくされる Fontain III-IV度の重症虚血肢の患者で、血管新生療法が増悪因子となりうる合併症（増殖性網膜症、悪性腫瘍など）を有さないもの。

主要目的：自己皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植による血管新生療法の安全性および有効性を評価する。

本臨床研究は、個々の症例に対する血管新生療法の適応判定、術前検査、患者への説明と同意、細胞の採取および移植、血管新生療法後の評価項目による経過観察は名古屋大学医学部附属病院において、以下に示す研究実施計画に基づいて行われる。

【研究実施計画】

1. 本研究実施適応判定のためのスクリーニング検査

- 1.1. 血管新生療法適応基準の確認：循環器内科、血管外科、形成外科により、従来の治療により安静時疼痛や難治性皮膚潰瘍・壊死が管理困難か、もしくは患肢切断が余儀なくされるか否か血管新生療法適応の判定を行う。
- 1.2. 患者への説明と意向確認：本臨床研究の目的および方法、考えうる副作用や合併症に関して説明を行い、治療への参加意思があるか意向確認を行う。
- 1.3. 術前検査入院：血管新生療法を行うのに除外項目がないか検討する。
- 1.4. 治療への最終同意：脂肪吸引による脂肪採取、それに続いての脂肪組織由来間葉系前駆細胞の分離と虚血骨格筋への注入の説明と同意。輸血の同意、麻酔への同意。
- 1.5. 検査終了後一旦退院。検査の結果最終的に適応と判断されれば細胞治療のため再入院となる。

2. 細胞移植

- 2.1. 皮下脂肪組織の採取：局所および腰椎麻酔下に、通常形成外科領域で使用される専用シリンジで脂肪組織を吸引する。上記麻酔法で、患者にとって耐えがたき疼痛が生じた際は、鎮痛のため静脈麻酔を追加、場合によっては全身麻酔導入する。
- 2.2. 皮下脂肪組織の処理（皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞の分離）：上記で得た脂肪

組織約 250g から、脂肪分離装置（セリューション遠心分離機[®]：サイトリ・セラピューティクス株式会社）を用いて ADRC を分離する（ 1×10^8 個 / 50mL）。全ての行程において清潔環境が保たれている。

2. 3. 虚血骨格筋への脂肪組織由来間葉系前駆細胞移植：腰椎麻酔下に、50mL に分離された ADRC（約 1×10^8 個）を、23G 針注射器を用いて表在静脈を含む血管や神経の走行に留意し、各々 0.5-1.0mL ずつ虚血骨格筋内 40-60 カ所へ移植する。

本研究においては、移植細胞供給源となる皮下脂肪組織採取から移植細胞の分離、さらには虚血骨格筋への移植までの全ての行程が同一手術室内で行われるため、手術室外へ移植細胞が持ち出されることはない。

評価項目：

主要評価項目

1. 細胞移植および経過中における安全性の評価（安全性評価基準：1. 周術期及び術後 6 ヶ月間での生存率 2. 周術期合併症の有無 3. 術後 6 ヶ月までの新規腫瘍性病変の発現の有無 4. 増殖性網膜炎や関節炎などの増悪の有無）
2. 細胞移植後の救肢率：従来の観血的治療法（経皮経管的血管形成術・バイパス手術）および自己骨髄単核球細胞移植による血管新生療法との比較
3. 視診：視診可能な虚血性潰瘍は写真に撮影記録する。部位・深さ・壊死の形状などを記録する。
4. 歩行可能であれば、トレッドミル（平地歩行・2.4km/h）を用いた最大跛行距離または疼痛出現までの歩行可能距離の測定：術前、術後 4 週間後および 6 ヶ月後。
5. QOL：Visual analogue scale（10 段階評価）による症状の変化による質問紙検査：術後 1、2、3、4 週間後および 6 ヶ月後。または随時。

副次的評価項目

1. ABPI（ankle-brachial pressure index）：術前、術後 1、2、3、4 週間後および 6 ヶ月後。
2. レーザードップラーによる皮下血流または経皮的組織酸素分圧測定（TcO₂）：術前、術後 1、2、4 週間後および 6 ヶ月後。
3. DSA またはその他画像診断による血管新生の評価：術前、術後 4 週間後および 6 ヶ月後。
4. その他血管新生増強因子の測定：末梢血中 CD34 陽性細胞数および末梢血血漿中 cytokine（例 SDF-1, VEGF, bFGF, HGF）の測定：術前、術後 2、4 週間後および 6 ヶ月後。

目標症例数および研究期間：3 年間で 20 症例を目指し、各々の研究観察期間は外来を含め 6 ヶ月とする。目標症例数に到達した時点で、治療有効性や安全性についての評価を報

告する。

2. 効率的かつ効果的な幹細胞移植再生療法の実現を目的とした基礎的検討

「骨髄単核球細胞移植による血管新生療法」で認められた糖尿病や透析患者などの治療不応群が存在したことより、本血管新生療法がこれら治療不応群に効果を発揮するか否かを検討するため、本症例登録患者や糖尿病患者由来脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いて、今後、重症虚血肢の背景となる基礎疾患が、脂肪組織由来間葉系前駆細胞の機能に与える影響について検討を行う。また、人への応用が可能な大型脂肪組織由来間葉系前駆細胞シートの開発も行う。

【倫理面への配慮】

名古屋大学大学院医学系研究科および医学部では、生命倫理審査委員会および小委員会のヒト幹細胞臨床研究審査委員会による審査体制が確立されている。また、我々は重症末梢動脈疾患に対する骨髄単核球細胞を用いた血管再生療法を世界で初めて開発し、本治療法を高度先進医療として普及させた経験を持っている。本事業の「自己皮下脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた血管再生療法の臨床研究」に関しても名古屋大学医学部生命倫理審査委員会承認、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」にも承認されている。そのため、有効性及び安全性の検証、様々な規制への対応、倫理的問題の解決など、長期間にわたる経験を有しており、そのシステムも確立している。

動物実験については、名古屋大学の動物実験規程に基づき、許可されたプロトコールで実施し、動物愛護の精神と十分な配慮のもとで行う。臨床試験を実施する際には、「臨床研究に関する倫理指針」（平成 16 年厚生労働省告示第 459 号）、世界医師会「ヘルシンキ宣言」ならびに生命倫理審査委員会規程に基づき、被験者に対する十分なインフォームド・コンセントを行う（別紙 1 参照）。

個人情報および生体試料などは、研究実施者以外の医師が連結可能匿名化したうえで、研究に使用する。匿名化の対応表およびデータは、パスワードを設定したファイルに記録し、CD に保存して、同意書と共に鍵の掛かるキャビネットに保管する。匿名化された生体試料は、フリーザーに施錠して保管する。パスワードおよび全ての鍵は、データ管理責任者が保管管理する。化学的、生物学的危険性を持つ試薬などを用いる際には、名古屋大学の危険物取扱規約に基づき、実験を行い処理する。この規約およびマニュアルを関係する研究室内で周知徹底する。

C. 研究結果

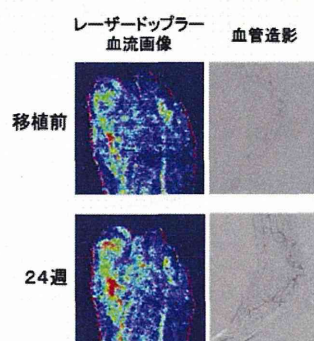
1. 『ヒト脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法』の臨床試験

従来治療では患肢切断が余儀なくされると判断された Fontaine IV度の重症虚血肢を有する3症例（バージャー病1症例、膠原病2症例）に対して本血管新生療法を実施し、施行後の追跡調査を行った。第一症例は強皮症に伴う末梢血管障害による右第1趾の難治性虚血性潰瘍を有する患者であった。第二症例は閉塞性動脈硬化症及び強皮症による右第2・3趾の難治性虚血性潰瘍を有する患者であった。第三症例はバージャー病に伴う左第5趾の難治性虚血性壊疽および潰瘍を有する患者であった。いずれの症例も術後6ヶ月の時点で、疼痛の軽減及び潰瘍サイズの縮小または治癒、6分間歩行可能距離の延長を認め、血管造影やレーザードップラー検査においても血流改善を示唆する所見が認められた。現時点において、3症例とも出血、感染、肺塞栓症などの想定されうる周術期合併症や血管新生に伴う新規悪性新生物や増殖性網膜症などの有害事象の発生を認めておらず、患肢切断も免れている。

【第一症例 64歳 女性】

病名：強皮症に伴う末梢血管障害による右第1趾難治性虚血性潰瘍

患者本人および家族からインフォームド・コンセントを取得したのち本血管新生療法を行った。全身麻酔下に腹部から脂肪吸引術を採取し、340gの皮下脂肪を回収した。セリューション遠心分離器®を用いて 1.3×10^6 個のADRCsを分離、右下腿から足趾にかけての約70か所に筋注法で移植した。術後6ヶ月の時点で、疼痛の軽減および潰瘍サイズの縮小が持続しており、夜間疼痛のため不眠に悩まされていたが、安定した睡眠が可能となった。術後6ヶ月の血管造影や非観血的血流評価検査でも改善傾向を認めた。また、周術期合併症や血管新生に伴う有害事象の発生も無く、患肢切断も免れている。

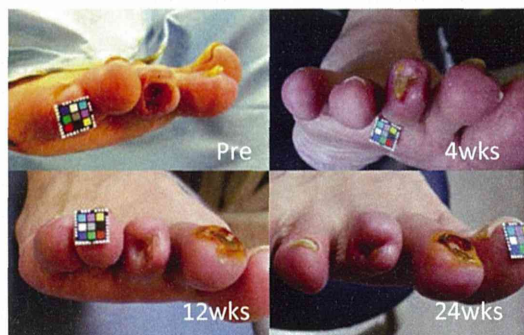


	術前	2週間後	4週間後	24週間後
VAS (安静時)	3/10	0/10	0-1/10	0-1/10
VAS (歩行時)	6/10	1-3/10	1-3/10	1-3/10
6分間歩行距離	400 m			430 m
潰瘍底サイズ	25×20 mm	16×12 mm	16×14 mm	20×8 mm
ABI	1.06/1.16	1.09/1.30	1.15/1.17	1.02/1.19
SPP (>30)				
rt. dorsal	24		24	11
rt. plantar	15		17	18
TcPO ₂ (>40)				
rt. ankle	46		43	53
rt. dorsal	33		33	42
rt. hallux	14		14	8

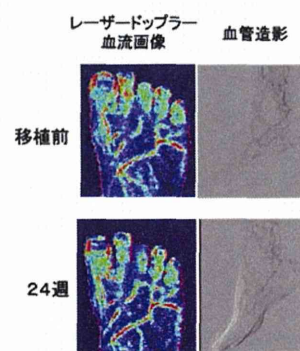
【第二症例 65 歳 女性】

病名：強皮症および閉塞性動脈硬化症に伴う右第 2・3 趾難治性虚血性潰瘍

患者本人および家族からインフォームド・コンセントを取得したのち本血管新生療法を行った。全身麻酔下に腹部から 360g の皮下脂肪を採取し、セリューション遠心分離器®を用いて 3.7×10^7 個の ADRCs を分離し、右下腿から足趾にかけて約 70 か所に筋注法で移植した。術直後から



から疼痛の軽減を認め、術後 6 ヶ月の時点においても、疼痛の軽減および潰瘍サイズの縮小が持続、使用していた鎮痛薬（オピオイド系を含む）も減量できた。また、6 分間歩行距離も延長し、現在はパートで仕事もはじめている。術後 6 ヶ月の非観血的血流評価検査においても改善傾向を認めた。また、周術期合併症や血管新生に伴う有害事象の発生も無く、患肢切断も免れている。

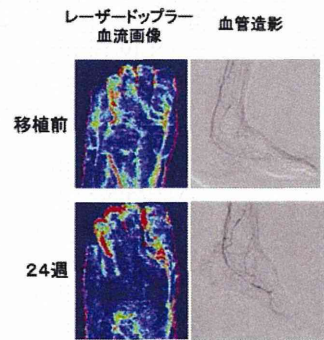


	術前	2 週間後	4 週間後	24 週間後
VAS (安静時)	2-3/10	0-1/10	0-1/10	0-1/10
VAS (歩行時)	9-10/10	0-1/10	0-1/10	0-1/10
6 分間歩行距離	—		360m	370m
潰瘍底サイズ	17×15 mm	12×10 mm	10×8 mm	5×4 mm
ABI	0.55/0.95	0.51/0.96	0.49/0.88	0.73/0.88
SPP (>30)				
rt. dorsal	20		21	38
rt. plantar	20		16	21
rt. hallux	4		4	4
TcPO ₂ (>40)				
rt. ankle	21		26	41
rt. dorsal	6		9	19
rt. hallux	5		2	9

【第三症例 49歳 男性】

病名：バージャー病に伴う末梢血管障害による左第5趾の壊死

患者本人および家族からインフォームド・コンセントを取得したのち本血管新生療法を行った。全身麻酔下に腹部から360gの皮下脂肪を採取し、セリューション遠心分離器®を用いて 5.0×10^7 個のADRCsを分離し、左下腿から足趾にかけて約60か所に筋注法で移植した。壊死部位はデブリードマンを行った。術直後から疼痛の軽減を認め、術後6ヶ月の時点において、デブリードマンした創傷部位は完全治癒し、術前に使用していた鎮痛薬（オピオイド系を含む）も使用することなく、疼痛は全くなかった。6分間歩行距離も延長し、仕事も再開し完全社会復帰された。術後6ヶ月の非観血的血流評価検査においても改善傾向を認めた。また、周術期合併症や血管新生に伴う有害事象の発生も無く、患肢切断も免れている。



	術前	2週間後	4週間後	24週間後
VAS (安静時)	0-5/10	0-1/10	0/10	0/10
VAS (歩行時)	5-7/10	0-2/10	0/10	0/10
6分間歩行距離	220m	470m		490m
潰瘍底サイズ	14×19 mm	14×13 mm	11×8 mm	治癒
ABI	1.06/1.21	1.02/1.04	1.02/1.04	1.09/1.07
SPP (>30)	48	10		26
rt. dorsal	38	16		30
rt. plantar				
TcPO ₂ (>40)	19	24		41
rt. ankle	39	28		18
rt. dorsal				

2. 効率的かつ効果的な幹細胞移植再生療法の実現を目的とした基礎的検討

上記3症例の循環血液中の前駆細胞（CD34陽性細胞）をフローサイトメトリーで解析した結果、細胞移植後3日目から1週間にかけてCD34陽性細胞の増加傾向が認められた（図1）。また、CD34陽性細胞の増加率は、移植された脂肪組織由来間葉系前駆細胞数に依存する傾向が見られた。このことより、本血管新生療法は、移植細胞数が多いケースほど効果的である可能性が示唆された。

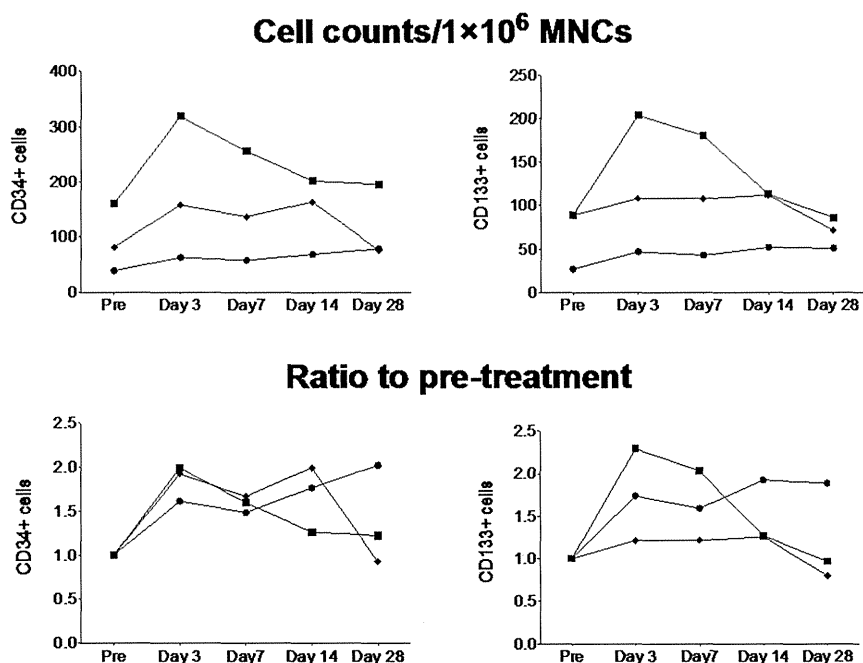


図1 本血管新生療法施行後の循環血液中内の前駆細胞の推移

本血管新生療法施行後の3例の患者を対象に、血中の様々な血管新生因子（VEGF、SDF-1など）の経時的変化を測定した。現時点では特に目立った傾向は認められなかった。また、上記結果が示すように、移植細胞数が多いケースほど効果的である可能性が示唆されるため、細胞移植の治療効率改善のため、細胞シート作成に関する研究を開始している。磁性ナノ粒子をリポソームにて細胞内投与することにより、外部磁力で短時間のうちに10層以上からなる三次元細胞シートを構築する方法の樹立に成功した。本来多層性の細胞シートは、シート中央部が低酸素になる事から、細胞壊死やアポトーシスを引き起こしてしまうため、作製不可能であった。磁気シート工学技術にコラーゲン包埋法を組み合わせることにより、細胞間に故意に隙間を作り、シート内への宿主からの血管形成を容易にした。その結果、体内に生着しうる10層以上からなる多層性ADRCsシートを開発することに成功した。この多層性ADRCsシートをマウス

心筋梗塞モデルへ移植したところ、シート生着が確認され、心筋梗塞サイズの縮小や線維化の抑制が認められた。シート移植部位では、血管新生増強作用が認められ、VEGFやbFGF等の血管新生因子の発現も増加していた(図2)。また、臨床応用可能な大型ADRCsシートの開発を行っており、現時点で、直径35mmの細胞シート作成に成功している。今後、大動物を用いて、その有効性、安全性の検討を行う予定である。

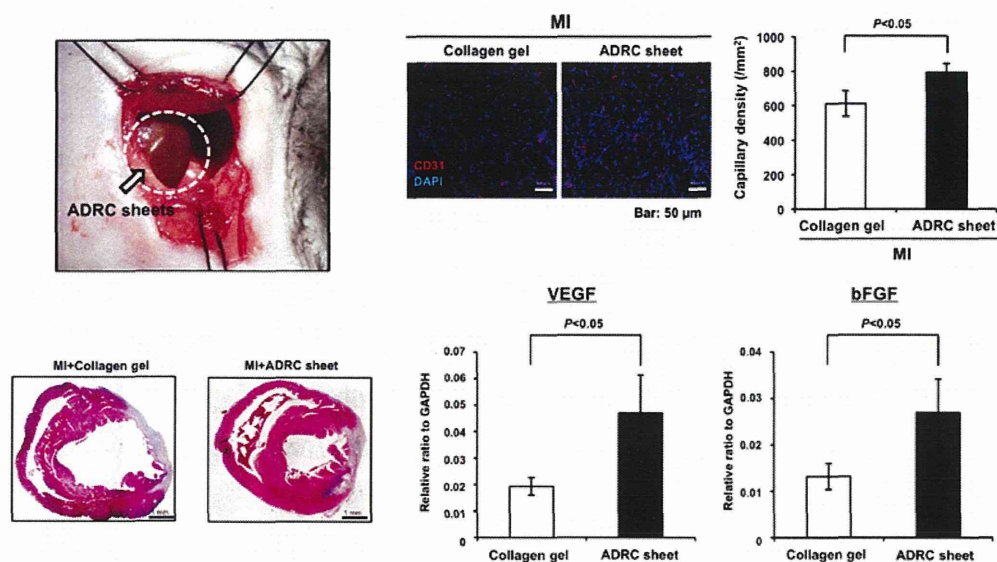


図2 ADRCsシートの血管新生増強作用

「骨髄単核球細胞移植による血管新生療法」で認められた糖尿病や透析患者などの治療不応群が存在したことより、本血管新生療法がこれら治療不応群症例に効果を発揮するか否かを検討するため、本症例登録患者や糖尿病患者由来脂肪組織由来間葉系前駆細胞の細胞培養を開始した。今後、移植細胞の特性と細胞移植の効果との関連を詳細に検討していく予定である。

D. 考察

現在までに、本血管新生療法を3症例に施行し6ヶ月の追跡調査を行ったが、3症例ともに自覚症状(疼痛や歩行可能距離)の改善および他覚所見の改善傾向(潰瘍縮小など)が認められた。現在までに本治療に関係した有害事象の発生はなく、本臨床試験継続の妥当性は担保されたものと考えている。しかしながら、「骨髄単核球細胞移植による血管新生療法」で認められた糖尿病や腎不全患者・透析患者などの治療不応群のような症例には、まだ本血管新生療法を施行できておらず、今後の検討が必要である。いずれにせよ最終的な治療効果判定については、現状で登録症例数が少ないため評価困難であり、更なる症例の積み重ねが最重要課題であると考えている。

E. 結論

皮下脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた重症虚血肢に対する血管新生療法は、従来治療で治療選択肢がなかった症例において、有用な治療選択肢となりうる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

英文

- Hao CN, Shintani S, Shimizu Y, Kondo K, Ishii M, Wu H, Murohara T. Therapeutic angiogenesis by adipose-derived regenerative cells: Comparison with bone marrow mononuclear cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;307:H869-879.
- Ishii M, Shibata R, Shimizu Y, Yamamoto T, Kondo K, Inoue Y, Ouchi N, Tanigawa T, Kanemura N, Ito A, Honda H, Murohara T. Multilayered adipose-derived regenerative cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2014;175(3):545-53.

和文

- 近藤和久, 柴田 玲, 新谷 理, 室原豊明. 「血管新生治療と心血管老化」. 循環器内科 2014;76(3):270-278.
- 新谷 理, 近藤和久, 室原豊明. 「脂肪由来間葉系前駆細胞移植は重症虚血肢を救えるか?」. 循環器内科 2014;76(5):477-483.

2. 学会発表

- Shintani S, Hao C, Shimizu Y, Kondo K, Murohara T. The Comparison of Adipose Derived Regenerative Cells and Bone Marrow Mononuclear Cells as Transplanted Cells for Therapeutic Angiogenesis. Basic Cardiovascular Sciences 2014 Scientific Sessions. Las Vegas, Nevada, USA.
- 第 31 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 平成 26 年 11 月 29 日 名古屋 「Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation」 新谷 理

- 第3回 CLINCH (Critical Limb Ischemia Network in aiChi) 平成27年3月21日 名古屋 「重症下肢虚血に対する脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた血管新生療法の試み」近藤和久
- 柴田玲、室原豊明 脂肪組織由来間葉系前駆細胞を用いた血管新生療法の開発 第18回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、横浜、2014
- 第31回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 平成26年11月28日 名古屋 「Therapeutic angiogenesis by adipose-derived regenerative cells Rei Shibata, Kazuhisa Kondo, Satoshi Shintani, Toyooki Murohara

H. 知的財産権の出願・登録状況

4. 特許取得

膝液瘻の予防及び治療 発明者：國料俊男、山本徳則、柴田玲、横山幸宏、金子博和、後藤百万、船橋康人、松川宜久、室原豊明、金村則良 番号：2014-147173 (JP) 出願年月日：2014年7月17日

5. 実用新案登録

該当なし

6. その他

該当なし