

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591072

研究課題名(和文) 難治性閉塞性動脈硬化症に対するエリスロポエチン添加培養による骨髄間質細胞移植

研究課題名(英文) Implantation of erythropoietin-cultured bone marrow stromal cell in patients with intractable peripheral artery disease

研究代表者

鈴木 洋 (Suzuki, Hiroshi)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：90266106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：基礎研究においては、間葉系幹細胞(MSC)においてエリスロポエチン(EPO)受容体が発現し、培養MSCにEPOを添加することによりMSCの増殖活性が亢進した。EPOは虚血肢において一部は骨格筋における局所間葉系前駆細胞の活性化を介して血管新生を増強することを証明した。マウスでの下肢虚血実験では、EPO-MSC群は、MSC単独群と比べ、虚血肢での血流が有意に改善していたが、移植細胞の長期生着はみられなかった。臨床研究において、厚生労働省ヒト細胞臨床研究に関する審査委員会の承認を得て、閉塞性動脈硬化症に対するエリスロポエチン添加培養による骨髄間質細胞移植を開始し、すでに2例に施行した。

研究成果の概要(英文)：In experimental studies, erythropoietin (EPO) receptor was expressed in mesenchymal stem cells (MSC), and proliferation of MSC was enhanced by adding the EPO in cultured MSC. EPO enhanced angiogenesis partly through activating local MSC in skeletal muscle in ischemic limb. In vivo study of mouse limb ischemia, EPO treated MSC injection group improved limb ischemia significantly more than MSC injection group, but implanted cells have not been survived until chronic stage. In clinical studies, after approval from the committee of clinical research of human stem cells in the Ministry of Health, Labour and Welfare, study titled "Implantation of erythropoietin-cultured bone marrow stromal cell in patients with intractable peripheral artery disease" has been started, and performed in 2 patients (UMIN ID: UMIN000013820).

研究分野：循環器内科

キーワード：循環器再生医療 閉塞性動脈硬化症 間葉系幹細胞 エリスロポエチン

## 1. 研究開始当初の背景

閉塞性動脈硬化症や下肢切断が切迫している重症虚血肢に対して、薬物療法、カテーテル治療、バイパス手術が施行されてきたにもかかわらず下肢切断に至る患者が多数いることから、骨髄単核細胞移植が臨床で開始され一定の効果をあげ先進医療として現在も施行されている (Matoba S, Suzuki H, et al. *Am Heart J* 2008;156:1010-8.) (Iso Y, Suzuki H, et al. *Atherosclerosis* 2010;209:167-72.)。しかし、その効果は限定的で、全身麻酔を必要とするなど浸襲が大きくさらなる効果的な治療の開発が切望されている。

骨髄単核細胞移植の効果発現に関して、当初は骨髄単核細胞の中に含まれている血管内皮前駆細胞の血管発生作用がその主要なメカニズムと考えられていたが (Asahara T, et al. *Circ Res* 1999;85:221-8) それ以上に単核細胞に含まれる成長因子等のサイトカインが効果の主要な要因ということが明らかになってきた。我々は以前より骨髄間質細胞の血管新生、サイトカイン産生作用について研究を行い、その強力なサイトカイン産生作用を報告してきた (Iso Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354:700-6.)。また、ブタ心筋梗塞モデルを用いて骨髄間質細胞投与による血管新生効果、サイトカイン産生効果による心機能の改善を報告しており (Sato T, Suzuki H, Iso Y, et al. *Lab Invest.* 2011; 91:553-64) マウス下肢虚血モデルにおいてもその著明な虚血改善効果が報告されている (Iwase T, et al. *Cardiovasc Res.* 2005;66:543-51.)。骨髄間質細胞は少量の骨髄採取により容易に分離・培養することが可能であり、保存も可能なことより低浸襲で繰り返し利用が可能である。また、エリスロポエチンが骨髄間葉系細胞からのサイトカインの分泌を促進しその血管新生作用を増強することが報告されている (Zvezdark KJ, et al. *Exp Hematol.* 2007;35:640-52.)。

間葉系細胞は骨髄に存在し、血液ができるために必要な場を提供している間質細胞である。近年、この間葉系細胞の中には多分化能を有する幹細胞が存在し、心筋、血管、神経、脂肪及び骨に分化することが明らかとなってきた。骨髄中に存在する間葉系細胞の数は非常に少ないが、間葉系細胞は日常診療で行われている局所麻酔下の少量の骨髄採取により容易に分離・培養することが可能であり、従って患者から得た少量の骨髄液から治療に必要な量の間葉系細胞を培養することにより得ることができる。また、保存も可能なことより低浸襲で繰り返し利用が可能である。この方法では自己細胞を用いるため、拒絶反応を避けることができ、また倫理的な問題が生じる余地も限られる。

一方、エリスロポエチンはそれ自体で血管新生作用を持つことが報告されており、我々も骨髄単核細胞移植で赤芽球分画を多く含

む方がその治療効果が高いことをみいだしており (Iso Y, Suzuki H, et al. *Atherosclerosis* 2010;209:167-72)、血管新生療法のソースとして非常に期待されている。また、エリスロポエチンが骨髄間葉系細胞からのサイトカインの分泌を促進しその血管新生作用を増強することが報告されており (Zvezdark KJ, et al. *Exp Hematol.* 2007;35:640-52.)、in vivo ではラット心筋梗塞モデルで骨髄間質細胞単体投与のみよりエリスロポエチンで培養した骨髄間質細胞投与の方が有意に血管新生を増強し心筋梗塞サイズを減少させることが報告されている (Zhang D, et al. *Cardiology* 2007;108:228-36.)。

## 2. 研究の目的

本研究は、エリスロポエチン添加の下に培養した骨髄間質細胞をマウス下肢虚血モデルに投与しその至適培養法を確立し、その後、臨床試験として閉塞性動脈硬化症 (重症下肢虚血) 患者に投与しその安全性と有効性を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 基礎研究

1) エリスロポエチンによる間葉系幹細胞 (MSC) の活性化: MSC におけるエリスロポエチン受容体発現を免疫染色で確認し、培養系において、エリスロポエチン添加による MSC の増殖活性を検証した。

2) 下肢虚血モデルへの MSC 移植: MSC 単独移植とエリスロポエチンによる前処置を加えた MSC 移植 (エポ MSC 群) の 2 群での効果の比較を行った。

3) エリスロポエチンの骨格筋における局所間葉系前駆細胞の刺激作用: エリスロポエチン 5000U/kg をラット虚血肢に局所投与し、虚血肢におけるエリスロポエチンによる血管新生誘導のメカニズムを検討した。

### (2) 臨床研究

#### 1) 対象

閉塞性動脈硬化症の Fontaine II 以上の患者で、薬物治療にも反応せずカテーテル治療やバイパス手術が不可能な患者 10 例。

#### 2) 方法

自己細胞の採取: 自己骨髄 20ml を局所麻酔下に患者の腸骨より採取し、ヘパリン入り PBS 溶液に混和する。また、自己末梢血を約 200ml 採血し、遠心管に入れる。

細胞培養: 検体は採取後すみやかに冷蔵し分担研究施設である国立成育医療センター研究所へ搬送する。血液より血清を分離して、血清入りの液体培地を調整する。用いる培地は MEM (phenol red -) で抗生物質 (penicillin, streptomycin) を添加する。間葉系細胞は自己の骨髄液 (20mL) と自己の血液 (約 200mL) からの血清約 100ml を用いて、接着系の細胞を培養する事により増殖す

る。その際エリスロポエチンを添加して行う。最後に搬送当日に培養細胞をフラスコより剥離しPBSに懸濁させる。以上の培養操作は国立成育医療センター研究所において無菌的に行う。

細胞移植：細胞は治療予定日に昭和大学藤が丘病院に搬送する。細胞は硬膜外麻酔下に患者の下腿のすでに虚血が証明されている箇所合計約  $1 \times 10^7$  個の細胞を移植する。虚血の証明は血管造影、血管エコー、CT、皮膚還流圧等で行う。

安全性、有効性の評価：細胞移植7日、1か月、3か月、6ヶ月に安全性の評価とともに、visual analogue scale (VAS)による自覚症状の評価、生命予後、下肢温存率、下腿上腕血圧比、足趾上腕血圧比、皮膚還流圧等を検討する。

主要評価項目は、登録時 Fontaine 分類に応じて「改善」を以下のように定義したときの改善率。

・Fontaine IIb 度の被験者：ICD、ACD の 20% 以上の改善。

・Fontaine III 度の被験者：VAS が開始前値から 2cm 以上の減少。

・Fontaine IV 度の被験者：潰瘍の大きさが開始前値の 75% 以下に減少。

上記の改善率を、当院も参加した TACT Study での骨髄単核細胞移植群と比較する (Matoba S, Suzuki H, et al. Am Heart J 2008;156:1010-8.)。尚、TACT Study と本研究の対象患者の inclusion criteria は同一である。

副次評価項目は生命予後、下肢温存率、下腿上腕血圧比、足趾上腕血圧比、皮膚還流圧等とする。

#### 4. 研究成果

##### (1) 基礎研究

1) エリスロポエチンによる間葉系幹細胞 (MSC) の活性化：本研究により MSC におけるエリスロポエチン受容体発現を免疫染色で確認した。また、培養系において、エリスロポエチン添加は、MSC の増殖活性を有意に亢進した。増殖活性以外に、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析では、血管内皮増殖因子・肝細胞増殖因子などの血管新生サイトカインの発現増強を認めた。

2) 下肢虚血モデルへの MSC 移植：これまでの報告同様、MSC 移植がラット下肢虚血モデルにおいて血管新生を促進することを、生理学的にも組織学的にも確認した。次に、上記培養実験の結果を踏まえ、MSC 単独移植とエリスロポエチンによる前処置を加えた MSC 移植 (エポ MSC 群) の 2 群での効果の比較を行った。移植 2 週間後、エポ MSC 群は、MSC 単独群と比べ、有意に虚血肢での血流改善を促進した。両群において、移植細胞の長期生着はみられなかった。よって、エリスロポエチンによる pretreatment は、MSC の向血管新生能・パラクライン効果を向上させることが確

認された。

3) エリスロポエチンの骨格筋における局所間葉系前駆細胞の刺激作用：

エリスロポエチンが虚血刺激に対する組織修復を改善させることが報告されているが、そのメカニズムは未だに明らかではないため、虚血肢におけるエリスロポエチンによる血管新生誘導のメカニズムを検討した。エリスロポエチン 5000U/kg をラット虚血肢に局所投与した。エリスロポエチン投与群は対照群に比して血流が有意に回復し血管数も増加した。また、血管周囲組織における Ki67 陽性細胞数も有意に増加していた。増殖している細胞は間葉系前駆細胞のマーカーである PDGF- とエリスロポエチン受容体に免疫陽性であった。一方、invitro 研究において、エリスロポエチンはラット骨格筋から単離した培養間葉系前駆細胞を有意に増殖させ Akt と STAT3 のリン酸化を増強したが、血管内皮細胞は増殖させなかった。骨格筋間葉系前駆細胞の conditioned medium は、ラット骨格筋芽細胞や骨髄間葉系前駆細胞に比して VEGF 濃度は有意に高値であった。

##### (2) 臨床研究

本プロトコールは、厚生労働省ヒト細胞臨床研究に関する審査委員会で平成 25 年 4 月 25 日了承され、平成 25 年 11 月 25 日に厚生労働大臣の承認を受けた。シミュレーションを施行し、患者登録を開始している。すでに 2 例に施行し、これまでのところ安全性に問題はなく、観察期間を終了した 1 例ではその有効性が認められた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

(1) Usui S, Iso Y, Suzuki H, et al. Kisspeptin-10 Induces Endothelial Senescence and Impaired Endothelial Growth. Clinical Science 2014;127:47-55

(2) Usui S, Iso Y, Suzuki H, et al. Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow Enhance Neovascularization and Stromal Cell Proliferation in Rat Ischemic Limb in the Early Phase after Implantation. Showa Univ J Med Sci 2014;26:121-129

[学会発表](計 5 件)

(1) Iso Y, Suzuki H, et al. Erythropoietin enhances pro-angiogenic and anti-inflammatory properties in mesenchymal stem cells. 第 77 回日本循環器学会学術集会(横浜、2013.3.16)

(2) 磯 良崇, 鈴木 洋ら：骨髄間葉系幹細胞を用いた抹消動脈疾患の治療戦略。第 12 回日本再生医療学会総会(横浜、2013.3.22)

(3) 笹井正宏、磯良崇、鈴木洋ら：  
Kisspeptin-10 による血管内皮増殖抑制および細胞老化誘導。第 13 回日本再生医療学会総会（京都、2014.3.4）

(4) 水上拓也、磯良崇、鈴木洋ら：エリスロポエチンによる間葉系幹細胞における向血管新生能の修飾効果。第 55 回日本脈管学会総会（倉敷、2014.10.31）

(5) 水上拓也、磯良崇、鈴木洋ら：エリスロポエチンは間葉系幹細胞の向血管新生能を修飾する。第 14 回日本再生医療学会総会（横浜、2015.3.20）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.f-circ.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 洋 (SUZUKI, Hiroshi)  
昭和大学・医学部・教授  
研究者番号：90266106

### (2) 研究分担者

梅澤明弘 (UMEZAWA, Akihiro)  
独立行政法人国立成育医療センター・生殖  
医療研究部・部長  
研究者番号：70213486

### (3) 連携研究者

磯良崇 (ISO, Yoshitaka)  
昭和大学・医学部・准教授