

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09117

研究課題名(和文) 体外増幅自己赤芽球移植と自己骨髄単核細胞移植による血管新生治療の比較試験

研究課題名(英文) Ex Vivo Expanded Erythroblast-Transplantation versus autologous bone marrow mononuclear cell implantation for patient with critical limb ischemia

研究代表者

小澤 拓也(Ozawa, Takuya)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：70467075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：重症虚血肢への自己骨髄細胞移植(BMI)による血管新生治療はある一定の効果はあるが、問題点が多い。我々は次世代血管新生治療として「重症下肢虚血に対する体外増幅自己赤芽球移植による血管新生治療の第I/II相臨床試験(EVEETA)」を開発し良好な結果を得た。本研究では従来法であるBMI療法と体外培養法によるEVEETA療法、この2つの血管新生療法の治療効果および安全性を検討した。いずれの治療法も急性期効果は得られたが、長期効果を検討するとBMI療法では1年以内に約半数の症例で何らかの切断術が施行された。EVEETA療法では下肢切断術を要する症例はなく、治療効果が長期間持続していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the safety and efficacy of angiogenic cell therapy by implantation of ex vivo expanded immature erythroblasts cultured from autologous bone marrow cells (EVEETA) for patient with critical limb ischemia comparing to implantation of bone marrow mononuclear cells(BMI). Freedom from major/minor amputation rate was significantly higher in EVEETA than BMI.

研究分野：医歯学系

キーワード：臨床心血管病態学 血管再生 赤芽球 細胞療法 体外増幅

1. 研究開始当初の背景

- (1) 日米欧では心血管・脳血管疾患等の虚血性臓器障害が死因の約半数を占め、これら虚血性疾患群は血管再生治療の潜在的な適応である。当施設においても高度先進医療の認可を受け重症虚血肢に対する自己骨髄単核細胞移植 (BMI) を積極的に行ってきたが、真に血管再生を必要とする重症患者に対しての効果は不十分である。
- (2) BMIでは全身麻酔下に500~1,000ccの骨髄を採取するため、患者への侵襲が大きい。またBMIの血管新生作用に影響する因子には、虚血局所の環境と、移植された骨髄の質があると考えられるが、実際にBMIを施行した閉塞性動脈硬化症等の患者骨髄総細胞数およびCD34陽性細胞数は健康人に比し、1/2ないし1/10程度であり、重症虚血患者ほど著しい低形成を示した。
- (3) これらの問題点を克服するための方策として、少量の自己骨髄から十分量の幼稚赤芽球を体外で増幅する培養技術、すなわち体外増幅自己赤芽球移植による血管新生治療 (Ex-Vivo Expanded Erythroblast Transplantation (Autologous) (EVEETA study)の開発に着手した。
- (4) 健康人骨髄から多段階比重遠心法によって各種分化段階の赤芽球を分離し、VEGF, PLGF等の血管新生因子を測定した結果、超低比重画から精製した前赤芽球から好塩基性赤芽球にかけての未熟な赤芽球が血管新生因子を圧倒的に活発に産生しており、ヘモグロビン合成の開始後すみやかに産生能が低下することが分かった。従ってこれら未熟な赤芽球を体外培養で大量に入手することを培養法開発の目的とした。
- (5) 健康ヒト骨髄を用いて培養法の試行錯誤を行った結果、TPO等3種の造血因子の存在下で7日間培養(一次培養)することで赤血球前駆細胞が増幅され、さらにこれをEPO等3種の造血因子の存在下で7日間培養(二次培養)することで、大量の未熟赤芽球が収穫された。
- (6) マウス下肢虚血モデルを用いてEVEETA治療とBMI治療を比較検討したところ、EVEETA(細胞100万個)はBMI(細胞100万個)に比し有意に下肢血流を改善させ、その効果は10倍量の細胞数を用いたBMI(細胞1000万個を移植)と同等の治療効果を示すほど強力であった。
- (7) 平成18年秋に当施設に設置の倫理委員会および臨床研究審査委員会(IRB)から当該第I/II相臨床試験の認可を受けた。当施設に設置のGMPグレード細胞培養センター(CPC)を利用し、平成19年より体外増幅自己赤芽球移植に

よる血管新生治療 (Ex-Vivo Expanded Erythroblast Transplantation (Autologous) (EVEETA study)の第I/II相臨床試験を開始した(平成19年11月、International Standard Randomized Controlled Trialに登録、ISRCTN-66803682)。平成19-20年度科学研究費補助金に記載の研究費を資金として、これまで10例の末梢血管疾患患者に対してEVEETA治療を施行し、すみやかな下肢痛の軽減及び消失、難治性皮膚潰瘍の縮小、局所組織酸素分圧や皮膚灌流圧の上昇といった非常に良好な結果を得た。

2. 研究の目的

重症虚血肢への自己骨髄細胞移植(BMI)による血管新生治療はある一定の効果はあるが、問題点が多い。われわれは次世代血管新生治療として「重症下肢虚血に対する体外増幅自己赤芽球移植による血管新生治療の第I/II相臨床試験(EVEETA)」を平成19年より開始し、良好な結果を得た。そこで本研究では従来法であるBMI療法と体外培養法によるEVEETA療法、この2つの血管新生治療の治療効果および安全性を検討した。

3. 研究の方法

従来法であるBMIと体外培養法によるEVEETA、この2つの血管新生治療の治療効果および安全性を比較検討した。

【対象患者と方法】

末梢性動脈疾患(閉塞性動脈硬化症)・難治性血管炎[ピュルガー病・膠原病に伴う血管炎など]

Fontaine分類III度およびIV度、安静時痛または虚血性潰瘍・壊死を有する患者で、著しくQOLが障害されており血行再建術の適応が無く、将来切断が予想される患者、もしくは血行再建術後も血流の改善に乏しく(皮膚灌流圧40mmHg未満)、重症虚血状態から離脱できない患者。

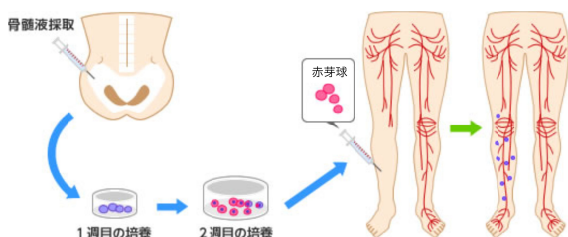
〈骨髄単核細胞移植〉



全身麻酔下に患者腸骨から500から1,000mLの骨髄採取を行う。骨髄採取方法は日本骨髄バンク骨髄採取マニュアルに準じておこない、骨髄採取手技とトラブル発生時の対処に習熟した血液内科医の協力のもと手技を行った。骨髄採取に先立ち、7日前に自己血採取を行い、骨髄採取後、自己血輸

血を行う。採取した骨髓液を比重遠心法により分離し、骨髓単核細胞分画（低比重細胞）を集め 50ml に濃縮し、同日中に虚血下肢骨格筋内の 100カ所（0.5mL/1カ所）に 27G 針を用いて投与した。投与時の麻酔には症例に応じて硬膜外麻酔または全身麻酔を用いた。

《体外増幅自己赤芽球移植》



骨髓の採取

移植の 14 日前に、病棟で局所麻酔下に 40～60mL の骨髓採取を行った。

骨髓細胞の培養

採取した骨髓を新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センターに設置の GMP グレード細胞プロセッシングルーム (CPC) に搬入し、同施設内においてすべての処理および培養を行う。作業は専属の技師によって、作業手順に従い実施される。14 日間の培養によって、患者骨髓から体外で増幅された自己赤芽球を主成分とし、他に骨髓由来間葉系細胞・マクロファージなどを混ざる血管新生作用の強い細胞混合物を得た。収穫された細胞（浮遊増殖細胞と付着増殖細胞の混和物）は、培養に用いた薬剤を十分な洗浄によって除去したのち、自己血小板血漿 50 mL に浮遊し、CPC から搬出して移植に用いた。

培養細胞移植

CPC から搬出された 50 mL の培養細胞浮遊液を虚血下肢骨格筋内の 100カ所（0.5mL/1カ所）に 27G 針を用いて投与した。投与時の麻酔には症例に応じて硬膜外麻酔または全身麻酔を用いる。当日より 5 日間、病床において同部位に 6,000 国際単位の医療用エリスロポエチン製剤を筋肉内投与した。

4. 研究成果

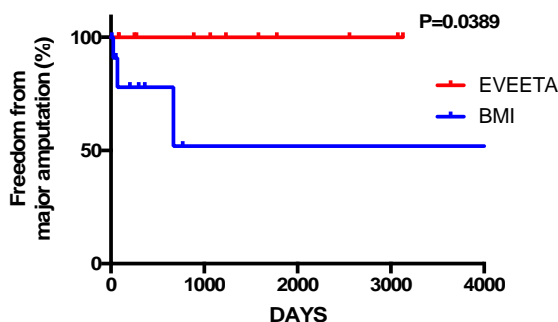
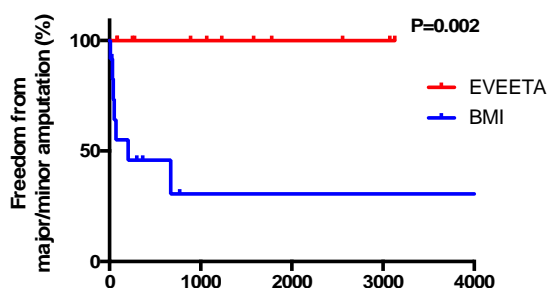
(1) 本来であれば無作為割付にて「**骨髓単核細胞移植**」、「**体外増幅自己赤芽球移植**」の 2 群に割り付けし、いずれかの細胞移植治療を施行する予定であった。しかし再生医療新法の施行に伴い、これら血管新生療法はいずれも第 2 種再生医療等に該当するため、新規に特定認定再生医療等委員会に申請、承認されるまでかなりの時間を要した。このため期間内に十分な症例を確保できず、無作為割付による前向き比較試験は本研究期間中には施行できなかったため、新規症例に加えて過去の症例も合わせて解析対象とした。

(2) これまでに 18 例に対し BMI 療法を、15

例に対し EVEETA 療法を施行した。

- (3) 解析対象は膝下病変の重症下肢虚血症例とした。膝上病変もしくは上肢虚血症例は解析対象から除外し、12 例の BMI 症例を、12 例の EVEETA 症例を解析した。
- (4) BMI 療法を施行した症例の内訳はバージャー病 4 例、閉塞性動脈硬化症 5 例、膠原病による難治性血管炎 2 例、その他 1 例であった。移植骨髓単核細胞数は平均 $2.88 \pm 1.11 \times 10^8$ 個であり、急性効果として 66.7% で有効であった。
- (5) EVEETA 療法の内訳はバージャー病 2 例、閉塞性動脈硬化症 2 例、膠原病による難治性血管炎 8 例であった。移植細胞数は平均 $5.24 \pm 2.59 \times 10^8$ 個であり、急性効果として 83.3% で有効であった。
- (6) EVEETA と BMI の長期治療効果を比較検討した。

上グラフに下肢切断術（大切断 + 小切断）からの回避率 (Freedom from major/minor amputation)、および下グラフに大切断（切断部位がかかとより中枢）からの回避率 (Freedom from major amputation) を示す。



BMI 療法では小切断も含めると 1 年以内に約半数の症例で何らかの切断術が施行された。大切断のみで見ても BMI では半数に大切断を要しているのに対し、EVEETA 療法では下肢切断術を要する症例はなく、治療効果が長期間持続していると考えられた。EVEETA 療法と BMI 療法との差は有意であり、EVEETA 療法の優位性が示唆された。

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 3 件)

Tetsuo Minamino, Shuichiro Higo, Ryo Araki, Shungo Hikoso, Daisaku Nakatani, Hiroshi Suzuki, Takahisa Yamada, Masaaki Okutsu, Kouji Yamamoto, Yasushi Fujio, Yoshio Ishida, Takuya Ozawa, Kiminori Kato, Ken Toba, Yoshifusa Aizawa, Issei Komuro. Low-Dose Erythropoietin in Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction (EPO-AMI-II): A Randomized Controlled Clinical Trial. *Circ J*. 2018;82(4):1083-1091. 査読あり、doi: 10.1253/circj.CJ-17-0889.

Takuya Ozawa, Masayoshi Suda, Ryutaro Ikegami, Toshiki Takano, Takayuki Wakasugi, Takao Yanagawa, Komei Tanaka, Kazuyuki Ozaki, Satoru Hirono, Tohru Minamino. Dual antiplatelet therapy guided by CYP2C19 polymorphisms after implantation of second-generation drug-eluting stents for management of acute coronary syndrome. *Int Heart J*. 2018;59(1):21-26. 査読あり、doi: 10.1536/ihj.17-005.

須田将吉、清水逸平、南野徹「血管老化と Men's Health」日本医師会雑誌 145(2), 239-242, 2016-05、査読なし、
URL:<https://www.med.or.jp/cme/jjma/newmag/14502/14502con.html>

[学会発表](計 10 件)

池上龍太郎、小澤拓也、須田将吉、柳川豊央、尾崎和幸、樋口浩太郎、中村裕一、松原琢、広野暁、南野徹 Effect of Osteoporosis Therapy with a Receptor Activator for NF- κ B Ligand Inhibitor on Coronary Calcifications. 第 81 回日本循環器学会学術集会 poster session、平成 29 年 3 月 17-19 日、石川県立音楽堂他(石川県金沢市)

Masayoshi Suda, Ippei Shimizu, Yohko Yoshida, Yuka Hayashi, Goro Katsuami, Hiromi Kayamori, Ryutaro Ikegami, Takayuki Wakasugi, Takuya Ozawa, Tohru Minamino A crucial role for Senescence-associated glycoprotein (SAGP) in vascular senescence and angiogenesis. 第 81 回日本循環器学会学術集会、平成 29 年 3 月 17-19 日、石川県立音楽堂他(石

川県金沢市)

Masayoshi Suda, Ippei Shimizu, Yohko Yoshida, Yuka Hayashi, Goro Katsuami, Hiromi Kayamori, Ryutaro Ikegami, Takayuki Wakasugi, Takuya Ozawa, Tohru Minamino. A crucial role for senescence-associated glycoprotein in the maintenance of vessel homeostasis. 欧州心臓病学会(ESC)2016、平成 28 年 8 月 26 日~9 月 1 日、ローマ(イタリア)

Masayoshi Suda, Ippei Shimizu, Yohko Yoshida, Yuka Hayashi, Goro Katsuami, Hiromi Kayamori, Ryutaro Ikegami, Takayuki Wakasugi, Takuya Ozawa, Tohru Minamino. A crucial role for senescence-associated glycoprotein in the maintenance of vessel homeostasis. 19th International Vascular Biology Meeting、平成 28 年 10 月 29 日~11 月 4 日ボストン(アメリカ)

Masayoshi Suda, Ippei Shimizu, Yohko Yoshida, Yuka Hayashi, Goro Katsuami, Hiromi Kayamori, Ryutaro Ikegami, Takayuki Wakasugi, Takuya Ozawa, Tohru Minamino. A Crucial Role of Senescence-associated Glycoprotein (SAGP) in the Maintenance of Vessel Homeostasis. AHA2015、平成 27 年 11 月 11 日、オーランド(アメリカ)

Masayoshi Suda, Ippei Shimizu, Yohko Yoshida, Yuka Hayashi, Goro Katsuami, Hiromi Kayamori, Ryutaro Ikegami, Takayuki Wakasugi, Takuya Ozawa, Tohru Minamino. A crucial role for senescence-associated glycoprotein in the maintenance of vessel homeostasis. 第 80 回日本循環器学会学術集会(平成 28 年 3 月 20 日)

Masayoshi Suda, Ippei Shimizu, Yohko Yoshida, Yuka Hayashi, Goro Katsuami, Hiromi Kayamori, Ryutaro Ikegami, Takayuki Wakasugi, Takuya Ozawa, Tohru Minamino. A crucial role for senescence-associated glycoprotein in the maintenance of vessel homeostasis. 仙台第 17 回関東心・血管フォーラム(平成 28 年 6 月 4 日、東京)新規血管老化関連タンパク質による老化制御メカニズムの解明

Masayoshi Suda, Ippei Shimizu, Yohko Yoshida, Yuka Hayashi, Goro Katsuami, Hiromi Kayamori, Ryutaro Ikegami, Takayuki Wakasugi, Takuya Ozawa, Tohru

Minamino. A Crucial Role of Senescence-associated Glycoprotein (SAGP) in the Maintenance of Vessel Homeostasis. 第3回 Premium Hypertension Conference (平成27年8月1日, 東京)

須田 将吉、清水逸平、吉田陽子、林由香、勝海悟郎、萱森裕美、池上龍太郎、若杉嵩幸、小澤拓也、南野徹 新規血管老化関連糖タンパク質 (SAGP) による血管老化抑制機構の解明 脳心血管抗加齢研究会 2015 / アンチエイジングフェスタ 2015 (平成27年11月27日, 大阪)

Masayoshi Suda, Ippei Shimizu, Yohko Yoshida, Yuka Hayashi, Goro Katsuomi, Hiromi Kayamori, Ryutaro Ikegami, Takayuki Wakasugi, Takuya Ozawa, Tohru Minamino. A Crucial Role of Senescence-associated Glycoprotein (SAGP) in the Maintenance of Vessel Homeostasis. 第32回 International Society for Heart Research (ISHR) 日本部会総会(平成27年12月11日, 神戸)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bmrctr.jp/saisei/public/public3>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 拓也 (OZAWA, TAKUYA)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号: 70467075

(2) 研究分担者

柳川 貴央 (YANAGAWA, TAKAO)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号: 10625586

森山 雅人 (MORIYAMA, MASATO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 30598131

増子 正義 (MASUKO, MASAYOSHI)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授
研究者番号: 70397115

須田 将吉 (SUDA, MASAYOSHI)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号: 70714509