

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月30日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590888

研究課題名（和文）重症下肢虚血患者に対する体外増幅赤芽球移植による血管新生治療の有効性の検討

研究課題名（英文）Effects of Autologous Transplantation of Immature Erythroblasts in Patients With Critical Limb Ischemia

## 研究代表者

小澤 拓也（OZAWA TAKUYA）

新潟大学医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：70467075

## 研究成果の概要（和文）：

2007年より重症虚血肢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相臨床試験を開始しその有効性について検討した。局所麻酔下に採取した少量の骨髄細胞を2段階培養法にて未熟赤芽球を体外増幅・培養した。計10症例に対し、これらの培養細胞を虚血肢局所に移植し、自覚症状の軽減、皮膚潰瘍の治癒・軽快を得られた。治療効果は慢性期まで維持され、いずれの症例においても明らかな有害事象はなかった。

## 研究成果の概要（英文）：

We investigated the efficacy of a novel cell therapy by implantation of ex vivo expanded immature erythroblasts cultured from hematopoietic stem/precursor cells. 10 patients with severe chronic limb ischemia accompanied by peripheral artery disease, Burger's disease or collagen arteritis were enrolled in a pilot clinical trial of the novel cell therapy by transplantation of ex-vivo expanded immature erythroid cells. In the clinical trial, most clinical symptoms such as rest pain and skin ulcers improved in 4 weeks, and did not recur in the one-year follow-up. No adverse events were observed in any of the patients.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学臨床医学・循環器内科学

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。

## 2. 研究の目的

- (1) 2007年より重症下肢虚血患者に対

し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 (ISRCTN-66803682)。本治療法の有効性を確立すべく、さらに症例数を蓄積し、慢性期予後について検討する。

- (2) さらには、当院では過去に虚血肢に対するBMI等の細胞治療の実績が46例あり、これら従来の細胞移植症例をhistorical controlとして後ろ向き研究にてBMIとEVEETAを比較検討し、EVEETAの有用性を実証する。

## 3. 研究の方法

- (1) 対象は末梢性血管疾患 (慢性閉塞性動脈硬化症・難治性血管炎 [ビュルガー病・膠原病に伴う血管炎など]) Fontaine分類IIb・III度およびIV度、200メートル未満の間欠性跛行を有するか、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。年齢：20歳以上80歳未満。臨床試験計画書に基づき、当該試験の適応を判断し、入院加療を行った。患者の人権や安全性に十分配慮し、説明と同意の後に試験への参加を許可した。
- (2) 移植の14日前に患者腸骨より局所麻酔下に採取した少量の骨髄細胞を当院設置のGMPグレード細胞プロセッシング室に搬入し速やかに細胞数を計測し、不十分な場合には対側腸骨より局所麻酔によって不足分の骨髄を採取する。採取された骨髄細胞を当院設置のGMPグレード細胞プロセッシング室に搬入し、rhFlt-3L・rhSCF・rhTPOの存在下で7日間培養し、その後rhEPO・rhSCF・rhIGF-Iの存在下で7日間の培養を行う2段階培養法にてヘモグロビン合成前の未熟赤芽球とマクロファージの混合細胞浮遊液を得た。
- (3) 増幅された大量の培養細胞を十分に洗浄したのち、50ccの血小板濃厚液に浮遊させ、虚血肢局所への移植を行った。移植は細胞を患部に筋肉内注射により投与する。移植当日を含む5日間、移植部位局所にEPO 6000国際単位を連日筋肉内投与した。
- (4) 定法に従い、自覚症状・歩行距離と疼痛の定量化・アンギオグラフィー、シンチ等による血流の評価・温度や組織酸素分圧、皮膚灌流圧の測定等によって、治療効果を客観的に評価した。入院期間は最低5週間とし、入院中に体外増幅自己赤芽球投与との因果関係が疑われる有

害事象が出現した場合には入院期間を延長し十分な観察と処置を行う。その後は適時外来へ移し、観察期間を2年とした。

#### 4. 研究成果

- (1) これまでに合計10例の重症虚血肢症例を登録した。内訳はバージャー病4例、強皮症4例、SLE1例、閉塞性動脈硬化症1例であった。平均採取骨髄量70.8mLで、培養14日後の細胞数は平均6.15倍まで増幅させることが出来た。
- (2) 移植後、疼痛の軽減及び消失、難治性皮膚潰瘍の治癒、皮膚灌流圧の上昇、血管造影での側副血行増加などといった非常に良好な結果を得られた。いずれの症例においても明らかな有害事象はみられず、移植後の治療効果は慢性期まで維持された。
- (3) さらに当院では難治性血管炎に対する骨髄単核細胞移植治療(BMI)の実績が11例あり、今回EVEETAを施行し2年後まで追跡し得た6症例と比較検討した。全17症例のうち、急性期効果は著効例、有効例あわせて15症例と有効率は88%であった。バージャー病症例は全例で有効であった。血管炎症例は5例中3例で有効であった。
- (4) EVEETAと過去のBMIとの治療効果の比較であるが、これまでのEVEETA症例のうち閉塞性動脈硬化症は1例しかないため、難治性血管炎に限定して検討した。
  - ① BMI例でも急性期効果は良好であり、大切断術にいたるほどのイベントはなかった。しかし中には慢性期再発による再治療例や末梢側切断症例が一部存在した。
  - ② 一方、EVEETA症例では、移植細胞数が少ない症例では治療効果も少ないが、十分量の細胞数を移植できた症例では非常に良好な治療効果が得られた。疼痛改善効果、潰瘍の治癒、血管造影所見の改善といった点ではBMIよりも優れた治療効果を得られている印象がある。
- (5) 今後の展望

研究開始当初に比し、重症下肢虚血をきたした閉塞性動脈硬化症に対してはカテーテルによる血管内治療の適応となる症例が増加したため、EVEETAによる細胞治療は主にバージャー病や膠原病による血管炎を対象として行うことになった。このため想定していたよりも本研究への症例登録が思っていたほど進まず、目標の20症例の半数にとどまることとなった。EVEETA治療の症例数が10例と少ないため、統計学的なBMI治

療との比較検討は不可能であった。しかし本研究中、カテーテルによる血管内治療でも改善せず、EVEETAによる血管再生治療で救肢しえた閉塞性動脈硬化症例もあり、潜在的なニーズはまだ大きいと考えられる。

今後はこれまでの良好な結果を踏まえ、さらに症例数を増やし、急性期効果だけでなく中長期予後の点からもEVEETAの有用性を実証していく。またこれまでの経験を生かし、効果不十分であった症例に対し繰り返しEVEETAを追加治療することも応用治療として積極的に行う。さらには血管内治療やバイパス手術など血行再建術とのハイブリッド治療もオプションとして積極的に行き、EVEETAの適応を拡大し、重症下肢虚血症例での新たな治療オプションとしての地位を確立したい。

#### 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)

- ① Oda M, Toba K, Kato K, Ozawa T, 他 Hypocellularity and insufficient expression of angiogenic factors in implanted autologous bone marrow in patients with chronic critical limb ischemia. Heart Vessels. 査読あり 27巻 2012. 38-45
- ② Oda M, Toba K Ozawa T, 他 Establishment of culturing system for ex-vivo expansion of angiogenic immature erythroid cells, and its application for treatment of patients with chronic severe lower limb ischemia Journal of Molecular and Cellular Cardiology 査読あり 49巻 2010. 347-353
- ③ 鳥羽健, 加藤公則 エリスロポエチンの心・血管系への応用 循環器科 査読なし 66巻 2009. 424-432

[学会発表] (計6件)

- ① Oda M, Ozawa T, Toba K, 他 Long-Term Effects of EVEETA therapy in patients with severe peripheral artery disease. 第75回日本循環器学会総会 2011. 8. 3 横浜
- ② Oda M, Ozawa T, Toba K 他 Long-Term Effects of Autologous Transplantation of Immature Erythroblasts in Patients With Severe Peripheral Artery Disease

AHA 2010 2010.11.18 シカゴ

- ④ Yanagawa T, Toba K, Takayama T, 他  
The angiogenic effects of erythropoietin-derivatives 第73回日本循環器学会総会学術集会 平成22年3月6日 国立京都国際会館
- ⑤ 小澤拓也, 鳥羽健, 加藤公則, 他 重症下肢虚血患者に対する体外増幅自己赤芽球移植を用いた血管新生治療の第I/II相臨床試験 第57回日本心臓病学会学術集会平成21年9月19日 ロイトン札幌
- ⑥ 小澤拓也, 鳥羽健, 加藤公則, 他 重症下肢虚血患者に対する体外増幅自己赤芽球移植を用いた血管新生治療の第I/II相臨床試験 第106回日本内科学会総会 平成21年4月9日 東京国際フォーラム

[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://www.med.niigata-u.ac.jp/in1/godo/project/saisei.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小澤拓也 (OZAWA TAKUYA)

新潟大学医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：70467075

### (2) 研究分担者

鳥羽 健 (TOBA KEN)

新潟大学医歯学総合病院・講師

研究者番号：60313540

埴 晴雄 (HANAWA HARUO)

新潟大学医歯学系・講師

研究者番号：40282983

### (3) 連携研究者

鈴木 洋 (SUZUKI HIROSHI)

昭和大学・准教授

研究者番号：9026616