

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591037

研究課題名(和文) 体外増幅赤芽球移植を用いた血管新生治療の長期予後と治療効果の予測因子の検討

研究課題名(英文) Long-term outcome of Ex Vivo Expanded Erythroblast-Transplantation 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・助教

研究者番号：70467075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：重症虚血肢に対する体外増幅自己赤芽球移植(EVEETA)による血管新生治療の第I/II相臨床試験を開始しその急性期効果および中長期予後について検討した。局所麻酔下に採取した少量の骨髓細胞を2段階培養法にて未熟赤芽球を体外増幅・培養し虚血下肢に筋肉内投与した。全13症例に対し施行し、すみやかな下肢痛の軽減、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ることができた。本法は局所麻酔下で採取骨髓も平均 71.2 ± 20.1 mLと少量ですみ、赤芽球細胞の増幅効率も平均 64.5 ± 41.3 倍と安定していた。いずれの症例においても明らかな有害事象は認めなかった。

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. 13 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 (EVEETA). 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. A small amount of bone marrow (mean amount, 71.2 ± 20.1 mL) was collected from the patients under local anesthesia. After 14 days of culture, the number of erythroblasts increased to enough level for in vivo angiogenesis therapy (64.5 ± 41.3 times from baseline). No adverse events were observed in any of the patients.

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。いずれの症例においても明らかな有害事象はなかった。しかしその治療効果は症例によって様々であり、何が治療効果を規定しているのかは不明でありその中長期予後もわかっていない。

2. 研究の目的

上記、EVEETA study の第I/II相臨床試験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の有用性を実証する。またこれまでの経験を生かし、応用治療として、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っていき、EVEETAの適応症例を拡大していく。

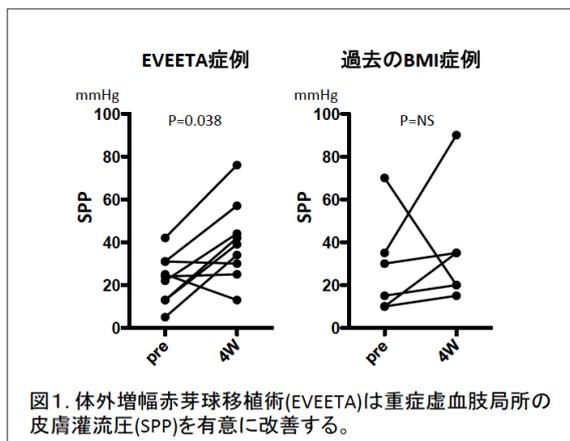
3. 研究の方法

- (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 [ピュルガー病・膠原病に伴う血管炎など]) Fontaine 分類 IIb・III度およびIV度、20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-1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13例の重症虚血肢症例を登録した。内訳はバージャー病5例、強皮症4例、SLE3例、閉塞性動脈硬化症1例であった。採取骨髄量は平均 71.2 ± 20.1 mLで、培養14日間で赤芽球細胞の増幅効率も平均 64.5 ± 41.3 倍と安定していた。
- (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) 繰り返し治療を行った症例でも有効性を確認できた。
- (4) EVEETAと過去のBMIとの治療効果を比較検討した。



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。

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えられた(図1)

- (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、目標症例数に到達していない。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済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、本研究では重症虚血肢症例に対して、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単施設無作為化並行群間比較試験において検討し、体外培養法であるEVEETAの優位性を実証し、保険収載を目指す。(厚労労働省 ヒト幹指針承認済、先進医療B申請中)

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 8 件)
1. Yanagawa T, Toba K, Suzuki T, Ozawa T, Oda M, Takayama T, Kato K, Aizawa Y. Erythropoietin induces angiogenesis in a manner dependent on the intrinsic auto/paracrine production of interleukin-6 in vitro. *Int J Cardiol.* 2013; 168: 2941-3 査読有
 2. Yanagawa T, Toba K, Kato K, Suzuki T, Minagawa S, Saigawa T, Ozawa T, Oda M, Takayama T, Hanawa H, Higuchi M, Saito H, Aizawa Y. Asialoerythropoietin exerts stronger angiogenic activity than erythropoietin via its binding affinity to tissue. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013;27:117-24. 査読有
 3. Suzuki T, Toba K, Kato K, Ozawa T, Suzuki H, Tomosugi N, Saitoh H, Aizawa Y. Effects of erythropoietin administration on iron status in patients with ST-elevation myocardial infarction who underwent successful percutaneous coronary intervention. *Int J Cardiol.* 2013; 167: 1644-5 査読有

- 有
4. Suzuki T, Toba K, Kato K, Ozawa T, Higashimura M, Kitajima T, Oda H, Tsuchida K, Tomosugi N, Saitoh H, Aizawa Y. Serum ferritin levels adversely affect cardiac function in patients with ST-elevation myocardial infarction who underwent successful percutaneous coronary intervention. *Int J Cardiol.* 2013; 167: 286-8 査読有
 5. Moriyama M, Toba K, Hanawa H, Kato K, Yanagawa T, Takayama T, Ozawa T, Kobayashi H, Higuchi M, Saito H, Aizawa Y. A novel synthetic derivative of human erythropoietin designed to bind to glycosaminoglycans. *Drug Deliv.* 2012; 19 :202-7. 査読有
 6. Ikarashi N, Toba K, Kato K, Ozawa T, Oda M, Takayama T, Kobayashi H, Yanagawa T, Hanawa H, Suzuki T, Nakazawa M, Nomoto M, Asami F, Higuchi M, Saito H, Aizawa Y. Erythropoietin, but Not Asialo-erythropoietin or Carbamyl-Erythropoietin, Attenuates Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Clin Exp Hypertens.* 2012 ;34 :575-81. 査読有
 7. Minamino T, Toba K, Higo S, Nakatani D, Ozawa T. Erythropoietin, progenitor cells and restenosis. A critique of Stein et al. *Thromb Haemost.* 2012;107 :1193. 査読有
 8. Oda M, Toba K, Kato K, Ozawa T, Yanagawa T, Ikarashi N, Takayama T, Suzuki T, Hanawa H, Masuko M, Kobayashi H, Aizawa Y. Hypocellularity and insufficient expression of angiogenic factors in implanted autologous bone marrow in patients with chronic critical limb ischemia. *Heart Vessels.* 2012 ;27 :38-45. 査読有
 9. 小澤拓也 体外増幅自己赤芽球移植を用いた重症下肢虚血に対する血管再生治療 新潟医学会雑誌 2014; 128: 574-576. 査読無

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 1件)

小澤拓也 南野徹 (株)技術情報協会「再生医療」第1章 [4] 循環器医からみた再生医療 2013年 21-25頁

〔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・医歯学系・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・准教授

研究者番号 : 40282983

小田 雅人 (ODA, MASATO)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号 : 60572724

柳川 貴央 (YANAGAWA, TAKAO)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号 : 10625586

森山 雅人 (MORIYAMA, MASATO)

新潟大学・医歯学系・助教

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