

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19590856
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療法の第 1・2 相試験
研究課題名 (英文) Ex vivo Expanded Erythroblast Transplantation (Autologous) for the treatment of patients with severe chronic limb ischemia (EVEETA study) : Phase I/II trial.
研究代表者
鳥羽 健 (TOBA KEN)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：60313540

研究成果の概要：重症の下肢虚血患者に対して骨髄単核細胞移植による血管再生治療が行われてきたが、全身麻酔で大量の骨髄を採取する必要があり、また最重症例には無効であった。我々は骨髄中に含まれる未熟な赤血球系の細胞が血管再生を行うことを見つけた。少量の骨髄から大量の赤血球系の細胞を増幅培養する方法を開発した。この細胞が実際に強力な血管再生作用を持つことを動物実験で確認した。倫理委員会の承認を受けて 5 例の患者に治療を行った。目立った副作用はなく、また最重症例にも有効であった。今後は他の医療施設からも患者を引き受ける予定である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：再生医療

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：血管再生治療、重症下肢虚血、幹細胞培養法

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 重症下肢虚血患者に対する血管再生治療として骨髄単核細胞移植療法 (BMT) が行われてきた。本治療法では全身麻酔下に大量の骨髄を採取するなど患者自身への侵襲が大きく、また術前 TcO<sub>2</sub> が 30 未満の最重症例では術後も下肢切断を免れ得なかった。より洗練された新しい細胞治療の開発が望まれていた。

(2) 当初は骨髄中に多く含まれる血管内皮前駆細胞による血管形成 (Vasculogenesis) を期待して BMT が始められたが、この治療に

よる血流の回復は主に既存の血管から発育する血管新生 (Angiogenesis) であることがわかり、あらたな機序の解明が必要であった。(3) われわれはマウスを用いた in vivo 実験およびヒト細胞を用いた in vitro 実験から、BMT では移植細胞に含まれている未熟赤芽球が骨髄マクロファージとの協調作用によって血管新生を起こすことを明らかにした (Ozawa, et al. JMCC, 2006)。

## 2. 研究の目的

(1) 局所麻酔によって採取した少量の骨髄細

胞に含まれる造血幹細胞・前駆細胞から、増幅培養によって強力な血管新生作用を有する未熟赤芽球を得る技術を開発する。

(2) マウスの下肢虚血モデル治療実験により、上記培養細胞が *in vivo* で優れた血管新生作用を発現することを示す。

(3) 実際の患者に本法 (EVEETA 法) を用い、その有効性と安全性を確認する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨髄細胞の分離と精製

最も血管新生因子の産生が活発な赤芽球の分化段階を知る目的で、健康人骨髄細胞から多段階比重遠心法と免疫時期ビーズ法を組み合わせて、造血幹細胞・前駆細胞 (CD34 陽性細胞)、前赤芽球・好塩基性赤芽球 (低比重 CD235a 陽性細胞)、多染性赤芽球 (中比重 CD235a 陽性細胞)、正染性赤芽球 (高比重 CD235a 陽性細胞) の 4 つの分画を得た。これらの細胞に発現する分化抗原をフローサイトメトリー法および mRNA の定量 PCR 法で測定した。各種血管新生因子の発現を ELISA 法および mRNA 量の定量 PCR 法で測定した。

#### (2) 細胞培養

細胞培養は、骨髄に含まれる幹細胞や前駆細胞から未熟な骨髄系細胞を増幅する第 1 段階の培養 (rhFlt3L・rhSCF・rhTPO を添加)、そこから未熟赤芽球系細胞を増幅する第 2 段階の培養 (rhEPO・rhSCF・rhIGF-I を添加)、さらに成熟した赤芽球を増幅する第 3 段階の培養 (rhEPO・rhIGF-I を添加) を連続的に起こした。

#### (3) マウス下肢虚血の治療実験

マウス下肢虚血モデルの治療実験には B57/BL/6N マウスを用いた。細胞移植には同系のマウスから採取した骨髄を用いた。 $1 \times 10^6$  個または  $1 \times 10^7$  個の骨髄 MNC を EPO (400 IU/kg BW) を含むメディウム 0.1ml に再浮遊させ、虚血作成 1 時間以内に虚血部位に筋肉内投与した。体外増幅マウス赤芽球は  $1 \times 10^6$  個の細胞を EPO (400 IU/kg BW) を含むメディウム 0.1ml に再浮遊させ、筋肉内投与した。

下肢虚血作成 7 日後に下肢血流測定をレーザードップラー (MoorLDI) を用いて行った。両側下肢 Flux を測定し、虚血左下肢の健側右下肢に対する比を虚血下肢血流の代表値として用いた。その後屠殺して大腿四頭筋を摘出して、各種の検討に用いた。

#### (4) 臨床試験の策定と審査

多施設共同研究 TACT:「骨髄細胞移植を用いた末梢性血管疾患の治療」に準じ、対象患者・評価スケジュール等を定めた「慢性重症虚血下肢患者を対象とした体外増幅自己赤芽球を用いた血管再生治療に関する研究・第 I/II 相臨床試験 (EVEETA study)」の実施計画書を作成し、新潟大学医学部倫理委員会および新潟大学歯学総合病院医薬品・医療機

器等臨床研究審査委員会 (IRB) に審査の請求を行い、両者からの承認を得た。これをもとに米国に設置の国際治験登録センター (ISRCTN) に治験の登録を行った。

#### (5) 試験培養の実施

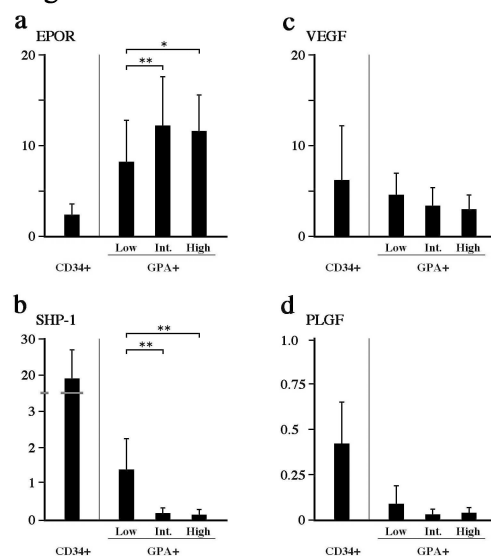
培養手順書、安全性試験手順書等の必要書類を作成し審査を受け承認された。5 名の健康人男性から説明と同意ののちに骨髄を採取し、培養プロトコルに完全に従った方法による試験培養を行い、培養プロトコルの効率・有効性および安全性の検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 赤芽球の分化段階

結果を図 1 に示す。EPOR は低比重赤芽球で発現し中比重赤芽球で発現が強く増強したのに対し、SHP-1 は低比重赤芽球で発現が低下し中比重赤芽球で発現がほぼ消失していたので、この精製法および mRNA 定量法が分子生物学的にもうまく機能していることが確認された。VEGF・PLGF・PDGF・FGF-2・HGF・Ang-1・NP-1 の血管増殖因子群は、赤芽球の中では低比重細胞に最も強く発現していた。このことはヘモグロビン合成開始前後の未熟な赤芽球が最も強力な血管新生作用を持つことを示唆し、この分化段階の赤芽球を体外で増幅することが培養法樹立の目的であると考えた。

Fig 1

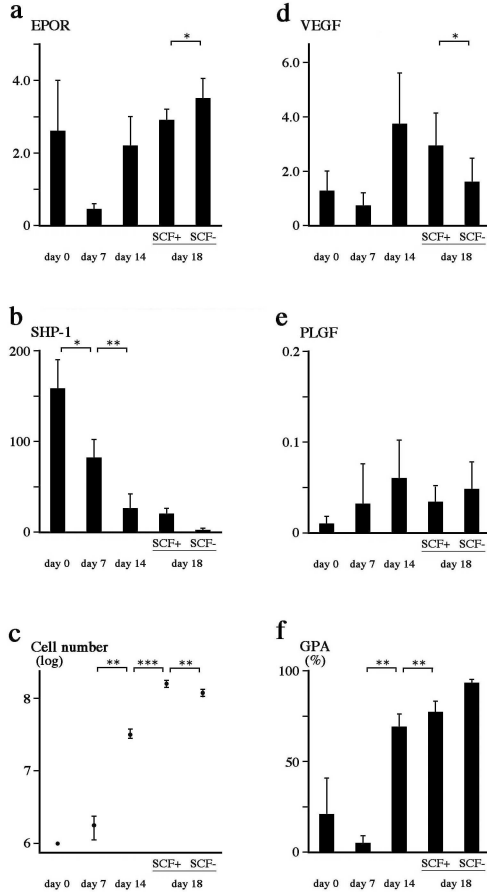


#### (2) 3 段階培養による赤芽球の分化

結果を図 2 に示す。メイ・ギムザ染色像の所見では、第 1 段階培養の終了時には帰属不明の骨髄系芽球様形態を示す細胞とマクロファージが主な構成成分であったものが、第 2 段階培養の終了時には主に前赤芽球に分化するとともに一部にマクロファージを混じり、第 3 段階培養の終了時にはヘモグロビン合成が進行していた。第 3 段階培養に SCF を

加えた条件ではヘモグロビン合成が抑制されていた。細胞表面抗原解析では、第1段階培養の終了時に CD34 陽性細胞が増幅されると同時に CD33 陽性の骨髄系細胞が主体を占めるとともに多くの CD14 陽性細胞（マクロファージ）を混じていたが、第2段階培養の終了時には CD235a 陽性細胞（赤芽球）が主な細胞で一部に CD14 陽性細胞を混じり、第3段階培養の終了時にはさらに CD235a 陽性細胞が増加していた。これはメイ・ギムザ染色像の所見と一致する。

**Fig 2**



細胞総数では第1段階培養の終了時に 1.8 倍、第2段階培養の終了時に 32 倍、第3段階培養（SCF 非存在下）の終了時に 118 倍、SCF 存在下に 163 倍に増加していた。EPOR の mRNA 量は第2段階培養の終了時に増加を示し第3段階培養でさらに増加した。一方、SHP-1 の mRNA 量は第2段階培養の終了時にかなりの減少を示し第3段階培養でさらに減少した。VEGF および PLGF の蛋白発現と mRNA 発現は第2段階培養の終了時に強く誘導され、第3段階培養で減少した。PDGF・FGF-2・HGF・Ang-1・NP-1 の mRNA 発現は第1段階培養で強く誘導されたが、第2段階培養で著しく減少した。以上のことから、2段階の培養で目的とする未熟赤芽球が得られ、第3段階の培養によって赤芽球をさらに分化させる

ことは本目的には則さないことが分かった。

(3) 培養日数の調整と CD34 陽性細胞精製

第1段階の培養日数を 7-10 日間、第2段階の培養日数を 4-7 日間として比較を行った。細胞総数では、第1段階の培養日数を延長しても大きな効果は見られず、また第2段階の培養日数を短縮すると細胞数の増加が著しく損なわれることがわかった。VEGF および PLGF の蛋白発現と mRNA 発現は、細胞総数とほぼ同様の分布を示した。このことから、第1段階の培養日数を 7 日間、第2段階の培養日数を 7 日間とすることが適切であると考えた。

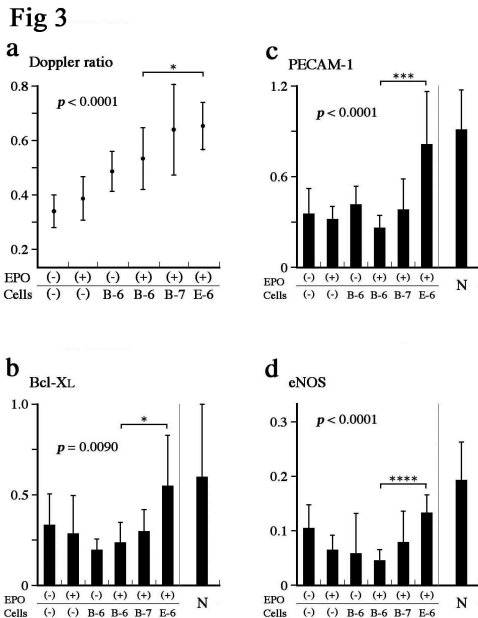
培養開始時に CD34 陽性細胞を精製する必要があるか否かを検討した。同じ骨髄サンプルから、 $1 \times 10^4$  コの CD34 陽性細胞を含む骨髄 MNC と、精製した  $1 \times 10^4$  コの CD34 陽性細胞を 2 段階（7 + 7 日）で培養した。2 段階培養終了時の細胞総数は両者でほぼ同等であったが、EPOR の mRNA 発現は MNC の方が高値を示した。VEGF の蛋白発現および mRNA 発現は MNC の方が有意に高く、PLGF の蛋白発現および mRNA 発現は両者でほぼ同等であった。PDGF・FGF-2・HGF・Ang-1・NP-1 の mRNA 発現は両者で差がなかった。このことから、培養開始前に CD34 陽性細胞を精製する必要はないと考えた。

(4) マウス下肢虚血の治療

マウスの赤芽球増幅では、第1段階 4 日間、第2段階 4 日間の合計 8 日間で培養することで体外増幅赤芽球を得た。マウス下肢虚血作成部位にメディウムのみを 7 日間筋注した群、EPO を 7 日間筋注した群、 $1 \times 10^6$  コの骨髄細胞浮遊液（B-6）を day 0 に筋注し翌日よりメディウムのみを 6 日間筋注した群、EPO を含有する  $1 \times 10^6$  コの骨髄細胞浮遊液を day 0 に筋注し翌日より EPO を 6 日間筋注した群、EPO を含有する  $1 \times 10^7$  コの骨髄細胞浮遊液（B-7）を day 0 に筋注し翌日より EPO を 6 日間筋注した群、EPO を含有する  $1 \times 10^6$  コの体外増幅赤芽球浮遊液（E-6）を day 0 に筋注し翌日より EPO を 6 日間筋注した群、および健常マウスの 7 群間で比較を行った（図 3）。

血流の回復の検討では、B-6 + EPO に比し E-6 + EPO で有意に良好な血流改善効果が得られ、体外増幅赤芽球移植の効果はその 10 倍数の骨髄細胞移植の効果に匹敵した。E-6 + EPO 群では筋組織内の Bcl-2 の mRNA 高値が観察され、Bcl-2 が主に血液細胞に発現する抗アポトーシス因子であることから、移植 7 日目においても移植された赤芽球が同部位に投与された EPO によって生存が高められた可能性が示唆される。E-6 + EPO 群で、血管内皮および組織に由来すると思われる抗アポトーシス因子である Bcl-XL が B-6 + EPO 群に比して有意に高く、血管内皮に由来する

PECAM-1 および eNOS が有意に高いことから、体外増幅赤芽球移植によって血管の生存が高まったか、および/または一旦血管が減少したあとに血管再生がおこったと考えられる。E-6 + EPO 群では組織中の VEGF の mRNA 量が有意に高かった。



#### (5) 試験培養の結果

骨髓単核細胞から培養を開始し、細胞数で約 10 倍、赤芽球の絶対数で約 30 倍、目的とする前赤芽球（ヘモグロビン合成開始前後の未熟赤芽球）の絶対数で約 500 倍の増幅効率である細胞浮遊液（未熟赤芽球 60%前後、マクロファージ 10%前後、その他未熟骨髄系細胞 30%前後）が得られた。この結果から臨床試験の本培養で患者から採取する骨髓量を試算し、患者年齢を 2 で割った値 (mL) が適当であると判断した。

本培養においては病原体に関して安全であるとされる豪州産のウシ血清を用いたが、製品出荷時の試薬残留の程度を調べる目的で、高感度 ELISA 法によるウシ血清アルブミンの測定を行った。FBS の残留率は 0.1 ppm 程度であり、十分に洗浄除去されていた。

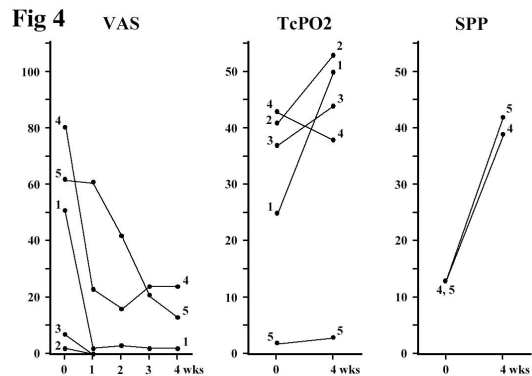
出荷サンプルを用いて、エンドトキシン濃度の測定、マイコプラズマ抗原の測定、好気性菌・嫌気性菌等の培養試験などを行った結果、培養工程での菌混入が皆無であることが確認された。これらの結果を提出し、本培養の承認を受けた。

#### (6) 患者の登録と臨床効果および安全性

登録した 5 例の患者の疼痛の程度 (VAS) および患肢の酸素分圧について移植前と移植 4 週間後の測定値を図 4 に示す。

全例で VAS の低下が認められた。症例 1 ~ 3 で TcPO2 の改善を認めた。また、症例 4 および 5 では TcPO2 の改善が明らかでなかった

が、より末梢の血流を反映する SPP 値では著明な改善が見られた。



#### (6) 考案と展望

本 EVEETA 法では全身麻酔による骨髓採取が不要で患者への侵襲が低い。また、これまで行ってきた BMI による血管再生治療では、TcPO2 が 30 未満の最重症例に対する有効性が低かったが、EVEETA 法による治療では最重症例に対しても有効であった。

今後さらに当施設での登録症例を増やすと同時に、他の施設からも患者を受け入れ、EVEETA 法の BMI 法に対する優越性の根拠を示す必要がある。

#### 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 19 件)

1. 鳥羽 健, 小澤 拓也, 相澤 義房. エリスロポエチン誘導体の血管新生作用. Angiology Frontier 8: 61-69, 2009, 査読無.
2. 鳥羽 健. 血管新生作用をもつエリスロポエチン誘導体. 医学のあゆみ 226: 1055-1060, 2008, 査読無.
3. 阿部崇, 北嶋俊樹, 本間圭一郎, 倉崎桃里, 岡塚貴世志, 柴崎康彦, 桃井明仁, 黒羽高志, 増子正義, 八木沢久美子, 古川達雄, 鳥羽 健, 相澤 義房. 骨髓移植後の骨腫瘍形成性再発にリツキサン併用化学療法が有効であった急性リンパ性白血病. 臨床血液 49: 1556-1561, 2008, 査読有.
4. Narita M, Kuroha T, Watanabe N, Hashimoto S, Tsuchiyama J, Tochiki N, Saitoh A, Satoh N, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y, Takahashi M. Plasmacytoid Dendritic Cell Leukemia with Potent Antigen-Presenting Ability. Acta Haematology 120: 91-99, 2008, 査読有.
5. Watanabe R, Hanawa H, Yoshida T, Ito M, Isoda M, Chang H, Toba K, Yoshida K, Kojima M, Otaki K, Ding L, Hao K,

- Kato K, Kodama M, Aizawa Y. Gene expression profiles of cardiomyocytes in rat autoimmune myocarditis by DNA microarray and increase of regenerating gene family. *Transplantation Research* 152: 119-127, 2008, 査読有.
6. Makiyama Y, Toba K, Kato K, Hirono S, Ozawa T, Saigawa T, Minagawa S, Isoda M, Asami F, Ikarashi N, Oda M, Moriyama M, Higashimura M, Kitajima T, Otaki K, Aizawa Y. Imatinib mesilate inhibits neointimal hyperplasia via growth inhibition of vascular smooth muscle cells in a rat model of balloon injury. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 215: 299-306, 2008, 査読有.
  7. Ozawa T, Kato K, Toba K, Oda M, Saigawa T, Minagawa S, Makiyama Y, Isoda M, Higuchi M, Ikarashi N, Moriyama M, Higashimura M, Kitajima T, Otaki K, Hirono S, Okura Y, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y. Serum erythropoietin level as a marker of limb ischemia. *International Journal of Cardiology* 130: 106-108, 2008, 査読有.
  8. Saitoh A, Narita M, Watanabe N, Tochiki N, Satoh N, Takizawa J, Furukawa T, Toba K, Aizawa Y, Shinada S, Takahashi M. Anti-tumor cytotoxicity of gammadelta T cells expanded from peripheral blood cells of patients with myeloma and lymphoma. *Medical Oncology* 25: 137-147, 2008, 査読有.
  9. Chang H, Hanawa H, Yoshida T, Hayashi M, Liu H, Ding L, Otaki K, Hao K, Yoshida K, Kato K, Toba K, Kodama M, Maruyama H, Miyazaki J, Aizawa Y. Alteration of IL-17 related protein expression in experimental autoimmune myocarditis and inhibition of IL-17 by IL-10-Ig fusion gene transfer. *Circulation Journal* 72: 813-819, 2008, 査読有.
  10. Tochiki N, Narita M, Zheng Z, Lu C, Saitoh A, Watanabe N, Satoh N, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y, Takahashi M. Induction of recipient cell-specific donor T-cell anergy by UV-C-irradiated recipient immature monocyte-derived dendritic cells. *Bone Marrow Transplantation* 41, 1037-1045, 2008, 査読有.
  11. Yamazaki K, Suzuki K, Ohkoshi S, Yano M, Kurita S, Aoki Y, Toba K, Takamura M, Yamagiwa S, Matsuda Y, Aoyagi Y. Temporal treatment with interferon-beta prevents hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-X gene transgenic mice. *Journal of Hepatology* 48: 255-265, 2008, 査読有.
  12. Oda M, Kato K, Toba K, Otaki K, Kitajima T, Ikarashi N, Yanagawa T, Higashimura M, Asami F, Isoda M, Ozawa T, Moriyama M, Hirono S, Okura Y, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y. Prognostic factors for critical limb ischemia after autologous bone marrow implantation. *Journal of Cardiology* 50: 235-242, 2007, 査読有.
  13. 加藤 公則, 鳥羽 健, 相澤 義房. エリスロボエチンを用いた循環器疾患治療. *呼吸と循環* 55: 991-996, 2007, 査読無.
  14. Saito A, Narita M, Yokoyama A, Watanabe N, Tochiki N, Satoh N, Takizawa J, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y, Shinada S, Takahashi M. Enhancement of Anti-tumor Cytotoxicity of Expanded gammadelta T Cells by Stimulation with Monocyte-derived Dendritic Cells. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 47: 61-72, 2007, 査読有.
  15. 鳥羽 健. 血液細胞における細胞周期の解析法とその応用. *血液フロンティア* 17: 1693-1702, 2007, 査読無.
  16. Okazuka K, Masuko M, Seki Y, Hama H, Honma N, Furukawa T, Toba K, Kishi K, Aizawa Y. Successful all-trans retinoic acid treatment of Acute Promyelocytic Leukemia with a rare variant NPM/RAR  $\alpha$  translocation. *International Journal of Hematology* 86: 246-249, 2007, 査読有.
  17. Izumi N, Furukawa T, Sato N, Okazuka K, Tsukada N, Abe T, Yano T, Kurasaki T, Masuko M, Toba K, Takahashi M, Aizawa Y. Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: retrospective analysis of 73 patients who received cyclosporin A. *Bone Marrow Transplantation* 40: 875-880, 2007, 査読有.
  18. Takahashi H, Furukawa T, Yano T, Sato N, Takizawa J, Kurasaki T, Abe T, Narita M, Masuko M, Koyama S, Toba K, Takahashi M, Aizawa Y. Identification

of an overexpressed gene, HSPA4L, the product of which can provoke prevalent humoral immune responses in leukemia patients. *Experimental Hematology* 35: 1091-1099, 2007, 査読有.

19. Masuko M, Ito M, Kurasaki T, Yano T, Takizawa J, Toba K, Aoki S, Fuse I, Kodama M, Furukawa T, Aizawa Y. Plasma brain natriuretic peptide during myeloablative stem cell transplantation. *Internal Medicine* 46: 551-555, 2007, 査読有.

[学会発表] (計 7 件)

1. Suzuki H, Kato K, Ozawa T, Toba K, Akutsu Y, Iso Y, Kobayashi Y, Takeyama Y, Kobayashi N, Yokoyama S, Fukuda N, Akazawa K, Aizawa Y. Evaluation of the Prospective Observation of erythropoietin-administration for the treatment of Acute Myocardial Infarction (EPO-AMI). 第73回日本循環器学会総会学術集会. 平成21年3月21日, 大阪国際会議場.
2. Ikarashi N, Toba K, Kato K, Takayama T, Oda M, Ohtaki K, Yanagawa T, Asami F, Ozawa T, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y. The effects of erythropoietin-derivatives on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. 第73回日本循環器学会総会学術集会. 平成21年3月21日, 大阪国際会議場.
3. Ozawa T, Oda M, Toba K, Kato K, Takayama T, Yanagawa T, Ikarashi N, Asami F, Hanawa H, Aizawa Y. Phase I/II clinical study of angiogenesis by Ex-Vivo Expanded Erythroblast transplantation (Autologous) (EVEETA) for the treatment of patients with chronic severe limb ischemia. 第73回日本循環器学会総会学術集会. 平成21年3月21日, 大阪国際会議場.
4. 鳥羽健, 加藤公則. シンポジウム5 重症下肢虚血の治療、最前線. 赤芽球の血管新生作用と臨床への応用. 第14回日本血管内治療学会総会. 平成20年7月25日, アルカディア市ヶ谷.
5. Kitajima T, Masuko M, Kurasaki T, Shibasaki Y, Furukawa T, Toba K, Aizawa Y. Human osteoblast as well as mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cells. *International Society for Experimental Hematology*. 平成20年7月10日, Renaissance Boston Waterfront Hotel.

6. Ikarashi N, Kato K, Toba K, Takayama T, Oda M, Ohtaki K, Yanagawa T, Asami F, Ozawa T, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y. Intravenous erythropoietin administration attenuated monocrotaline-induced rat pulmonary hypertension. 第72回日本循環器学会総会学術集会. 平成20年3月30日, アクロス福岡.
7. Oda M, Kato K, Toba K, Takayama T, Ohtaki K, Yanagawa T, Ikarashi N, Asami F, Ozawa T, Hirono S, Hanawa H, Aizawa Y. Ex vivo expanded erythroblast-transplantation (Autologous) therapy, EVEETA, a novel remedy for severe limb ischemia. 第72回日本循環器学会総会学術集会. 平成20年3月30日, アクロス福岡.

[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:

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/inl/godo/project/saisei.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥羽 健 (TOBA KEN)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号: 60313540

(2) 研究分担者

加藤 公則 (KATO KIMINORI)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号: 00303165

埜 晴雄 (HANAWA HARUO)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号: 40282983

相澤 義房 (AIZAWA YOSHIFUDA)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 50143780

(3) 連携研究者

該当者無し