

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2008～ 2009  
 課題番号：20890227  
 研究課題名（和文）糖尿病性潰瘍に対する生体外増幅自己血管内皮前駆細胞移植による血管再生療法の開発  
 研究課題名（英文） Ex vivo expansion endothelial progenitor cell novel therapy for diabetic non healing wounds.

研究代表者 田中 里佳（TANAKA RICA）  
 東海大学・医学部・助教  
 研究者番号 70509827

研究成果の概要（和文）：無血清生体外増幅・培養法により糖尿病患者血管内皮前駆細胞（Endothelial Progenitor Cell:EPC）の細胞数増幅と血管再生能が回復可能であり、増幅糖尿病患者 EPC 移植は非増幅糖尿病患者 EPC 移植に比べ有意に治療効果が高いことが証明された。今後、糖尿病性潰瘍に対して生体外増幅自己 EPC 移植による治療効果が期待されると考えられ、臨床応用への可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrate the ability to reverse human diabetic EPC dysfunction, and achieve supra-physiologic characteristics, by culturing these cells in our serum free ex vivo expansion system. Transplantation of ex vivo expanded diabetic EPCs to diabetic wounds may be a more effective therapeutic option for delayed wound healing in diabetic patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医薬薬学

科研費の分科・細目：形成外科

キーワード：再生医療、糖尿病性潰瘍、幹細胞移植

## 1. 研究開始当初の背景

循環器領域において 2000 年より重症下肢虚血、2007 年より心筋虚血に対して自己血管幹細胞移植による血管再生療法が臨床試験段

階に入っておりその安全性、有効性が確認されつつある。形成外科領域においても糖尿病マウス潰瘍に対する健常マウス血管幹細胞移植の有効性が報告された (Schattman, et

al 2000)。従って 2006 年度より当該施設形成外科においても、糖尿病性下肢虚血、下腿潰瘍に対する有効な治療法として本治療法が応用可能であると考え、当該施設倫理委員会承認後、臨床試験をスタートさせ、安全性は確認できている。しかしながら、糖尿病虚血性疾患の発症要因として研究者協力者のニューヨーク大学 Dr. Oren Tepper は血管幹細胞の機能異常を報告した (Tepper, et al. 2002)。我々の基礎研究においてもこれを確認している (Tanaka R et al 2007)。さらに糖尿病性潰瘍に対する自己血管幹細胞移植においても期待した効果が得られなかったという報告もある (Award, et al 2005)。すなわち、糖尿病患者を対象とした血管再生治療は糖尿病環境が大きく影響するため、今後、確実に有効な自己血管幹細胞移植血管再生療法を開発する必要がある。本研究指導者の増田と浅原は、既に虚血性疾患に対する次世代型の無血清条件下生体外増幅培養による血管幹細胞移植血管再生療法を開発しその有効性を確認している。研究代表者 (田中) は、本技法を用いて糖尿病性マウスの自己血管幹細胞を糖尿病環境から解放、再教育した結果、血管幹細胞数が正常マウス同様に数百倍にも増幅され、さらにその血管再生能が正常に戻ることを世界で初めて見出した。また増幅細胞群は増幅前細胞移植群に比べて潰瘍治癒期間が短縮することを世界で初めて突き止めた。

## 2. 研究の目的

生体外増幅による血管幹細胞移植療法の利点は、小数の血管幹細胞でも血管再生能が改善した十分量の血管幹細胞が保証されること、採取血管幹細胞の分割凍結保存により随時増幅／複数回移植療法が可能となり患者の身体的負担を軽減できることで、より効果的な血管再生療法が開発されることになる。

下肢切断の回避、患者 QOL の向上、介護費の軽減が実現可能になり社会的意義は大きい。生体外増幅血管幹細胞療法による新しい血管再生治療を臨床応用するには、ヒトの細胞においてもマウス同様の効果が得られるかを検討する必要がある。将来の臨床応用にむけて本研究では、(平成 20 年次) 糖尿病患者の血管幹細胞の細胞生物学的活性を検討し、糖尿病環境からの解放、「再教育」による血管再生能の回復機構の解明を行い、(21 年度) 糖尿病患者の成体外増幅培養自己血管幹細胞の移植療法の臨床応用への可能性を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 糖尿病患者増幅 EPC の細胞生物学的活性の評価。

本研究は当院形成外科により施行されている臨床試験である「難治性糖尿病性潰瘍患者を対象とした自己末梢血管内皮前駆細胞 (CD34 陽性細胞) 移植による血管再生治療」対象患者の末梢血を採取し使用する。

#### ① 無血清生体外増幅法による糖尿病患者末梢血 EPC の血管再生能の評価

健康人、糖尿病患者より末梢血 25ml 採取し、磁気細胞分離装置にて CD34 陽性細胞を分離する。回収した糖尿病患者 CD34 陽性細胞を体外増幅前後において血管再生能を評価する (EPC Colony Forming Assay, FACS, RT-PCR)。

### (2) 糖尿病環境からの解放、再教育による血管再生能の回復機構の解明

① 糖尿病患者血管幹細胞 (CD34 陽性細胞) 及び Expansion 後血管幹細胞の microarray による血管形成能を生じる責任遺伝子を探索する。

② 責任遺伝子制御因子による糖尿病患者自己血管幹細胞の「再教育」過程を解析しその機序を解明する。

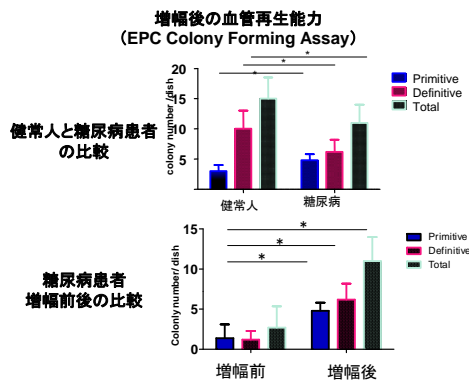
3) Ex vivo expansion したEPCの移植療法の有効性を検討する

増幅前後の健常人 CD34 陽性細胞と糖尿病患者 CD34 陽性細胞を採取し、潰瘍モデルヌードマウスにその細胞を移植する。移植していないマウス群とその効果を比べ下記の方法にて評価する。有効性は、潰瘍の大きさ、治癒期間、capillary density、コラーゲン形成を調べる。

4. 研究成果

(1) 糖尿病患者増幅EPCの細胞生物学的活性の評価。

①細胞数：増幅後の細胞数は健常人と糖尿病患者ともに平均2.5倍であった。  
 ②血管再生能力：EPC-Colony Forming Assay法にて増幅前は糖尿病患者において有意に血管再生能力が低下していた(1.2±0.2 vs 3.5±0.6 p<0.001)。しかし、増幅後糖尿病患者と健常人とでは、コロニー数に差はなく、糖尿病患者において血管再生能力が回復したと考えられた(8±1 vs 6.6±1.6)。糖尿病患者においても生体外増幅培養にて血管再生能力の有意な改善を認めた。(図1)



③RT-PCRにて糖尿病患者において増幅前に比べvWF, VEGF, Ang2, HGFの発現が増幅後上昇していることを確認した。増幅することにより、血管新生、組織修復能を高める因子の分泌が盛んになることを証明した。

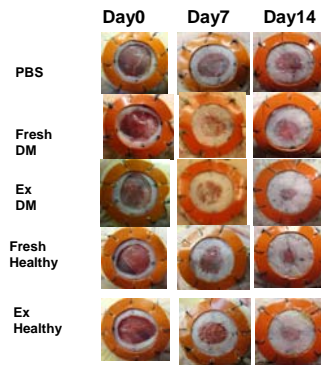
(2) 糖尿病環境からの解放、再教育による血管再生能の回復機構の解明

①マイクロアレーの結果：増幅前の糖尿病EPCと健常人EPCを比較すると、TSP-1, IntegrinB1などの発現が低下し、増幅後これらが上昇する。また、抗酸化酵素(Catalase, SOD)の発現が増幅前に健常マウスに比べ低下している。糖尿病環境は酸化ストレス下であり、その環境がこれらの遺伝子発現を抑制することによる血管新生、組織修復能力が低下していたのではないかと推測された。

3) Ex vivo expansion したEPCの移植療法の有効性を検討する

移植 Host にヌードマウスを選択し、背部にステント付きの潰瘍を作成した後、増幅前糖尿病患者EPC, 増幅後糖尿病患者EPC, 増幅前健常人EPC, 増幅後健常人EPCを潰瘍底に1 x 10<sup>3</sup>個の細胞を移植した。健常人EPC<sub>Low</sub>(500個), Middle(1000個), High(5000

Expanded / Freshly Isolated EPCs to Wild Type Wounds

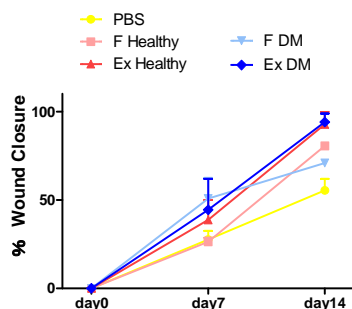


個)で検討したところ、Middle群にて最も効果が認められた。

図2

増幅糖尿病EPC移植群と増幅健常人EPC移植群が優位に創傷治癒を促進した。

図3



潰瘍縮小率をグラフ化した図である。増幅後糖尿病 EPC 移植群が PBS, 増幅前糖尿病 EPC に比べ優位に治癒が早いことがわかる。

組織学的評価では増幅細胞移植群において高い成熟肉芽の形成 (granulation thickness mm; A 群  $276 \pm 40$  vs B 群  $170 \pm 70$ , C 群  $58 \pm 20$  vs;  $p < 0.05$ ) と組織内血管形成 (CD31 cell counts; A 群  $210 \pm 50$  vs B 群  $150 \pm 55$ , C 群  $114 \pm 39$  ;  $p < 0.05$ ) を認めた。

#### 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 5 件)

- ① 田中里佳、宮坂宗男、浅原孝之、難治性糖尿病性潰瘍に対する自己末梢血血管内皮前駆細胞移植、PEPARS、査読なし、39 巻、2010、67-73
- ② 田中里佳、宮坂宗男、糖尿病性潰瘍患者、虚血性潰瘍患者を形成外科に紹介するときのコツ、治療、査読なし、92 巻、2010、1190-1195
- ③ 田中里佳、浅原孝之、糖尿病血管新生療法、からだの科学、査読なし、261 巻、2009、166-170
- ④ 田中里佳、浅原孝之、糖尿病の新しい展望、糖尿病性潰瘍に対する血管内皮前駆細胞移植療法、糖尿病カレントライブラリー、査読なし、10 号、2009、95-100
- ⑤ Lin C, Allori A, Tanaka R, Topical negative progenitor cell therapy for diabetic wounds. Plastic and Reconstructive Surgery, 査読有、122 巻、2009、1341-1351

[学会発表] (計 13 件)

- ① 田中里佳、増田治史、加藤俊一、宮坂宗男、浅原孝之、難治性糖尿病性潰瘍患者に対する自己末梢血血管内皮前駆細胞移植療法、2010 年 3 月 18 日、日本再生医療学会、広島国際会議場 (広島県)

- ② 小林めぐみ、田中里佳、宮坂宗男、慢性潰瘍外来通院中の SPP 低値患者に対するトラフェルミン (フィブラスTRスプレー) 治療症例の検討、日本フットケア学会学術集会、2010 年 2 月 28 日、都市センターホテル (東京都)
- ③ 田中里佳、増田治史、伊藤理恵、宮坂宗男、浅原孝之、糖尿病性潰瘍に対する生体外増幅血管内皮前駆細胞移植による血管再生治療の開発、日本バイオマテリアル学会、2009 年 11 月 15 日、京都テレサ (京都)
- ④ Tanaka R, Masuda H, Ito R, Kobori M, Asahara T, Miyasaka M, Adoptive Endothelial Progenitor Cell Therapy to Restore Vasculogenic Potential in Diabetes, American Society of Plastic Surgeons, 2009 年 10 月 27 日、Seattle, USA
- ⑤ 田中里佳、増田治史、伊藤理恵、小堀みちる、他、生体外増幅血管幹細胞移植による新しい血管再生療法の臨床応用に向けての開発、第 17 回日本形成外科基礎学術集会、2009 年 10 月 2 日、都市センターホテル (東京都)
- ⑥ Tanaka R, Masuda H, Tanaka R, Wada M, Masuda H, Ito R, Kobori M, Asahara T, Miyasaka M, The biological activity of circulating endothelial progenitor cell is the putative key factor to determine the efficacy of autologous G-CSF mobilized EPC therapy for diabetic patients with chronic non healing ulcer, Plastic Surgery Research Council, 2009 年 5 月 30 日、Pittsburg, USA
- ⑦ 田中里佳、今川孝太郎、浅原孝之、宮坂宗男、難治性糖尿病性潰瘍患者を対象とした自己末梢血血管内皮前駆細胞移植の追加報告、第 52 回日本形成外科学会総会・学術集会、2009 年 4 月 23 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑧ 田中里佳、和田美夏、増田治史、伊藤理恵、小堀みちる、浅原孝之、宮坂宗男、生体外増幅を行った糖尿病血管再生移植療法の有効、再生医療学会、2009 年 3 月 7 日、東京国際フォーラム (東京)
- ⑨ 田中里佳、和田美夏、増田治史、伊藤理恵、小堀みちる、浅原孝之、宮坂宗男、難治性糖尿病性潰瘍患者に対する自己末梢血血管内皮前駆細胞移植療法、日本フットケア学会、2009 年 2 月 27 日、神奈川県民ホール (神奈川県)
- ⑩ 田中里佳、備前篤、鈴木沙知、花井潮、福井剛志、大隈聡、赤松正、宮坂宗男、慢性潰瘍治療における形成外

科の役割、第1回創傷外科学会、2008年1月16日、霞ヶ関館（東京）

- ⑪ 田中里佳、和田美夏、増田治史、伊藤理恵、小堀みちる、赤松正、浅原孝之、宮坂宗男、糖尿病性潰瘍のEPC血管再生能力と自己末梢血血管内皮前駆細胞移植効果の関係、第17回日本形成外科基礎学会、2008年10月3日、リーガロイヤルホテル（東京）
- ⑫ Tanaka R, Masuda H, Tanaka R, Wada M, Masuda H, Ito R, Kobori M, Asahara T, Miyasaka M、The effect of flap ischemia on normal and diabetic endothelial cell function、Plastic Surgery Research Council, 2009年5月30日、Illinois, U.S.A
- ⑬ 田中里佳、今川孝太郎、備前篤、福井剛志、増田治史、浅原孝之、宮坂宗男、難治性糖尿病性潰瘍患者を対象とした自己末梢血血管内皮前駆細胞移の追加報告、第51回日本形成外科学会総会、2008年4月11日、名古屋国際会議場（名古屋）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 里佳 (TANAKA RICA)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：70509827

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：