

サブテーマ名：CPC（細胞培養センター）を利用した血液・血管の再生研究

小テーマ名：血管内皮前駆細胞への分化機構の解明

テーマリーダー：(財)先端医療振興財団、グループリーダー、浅原 孝之

研究従事者：(財)先端医療振興財団、主任研究員、西村 浩美

(財)先端医療振興財団、主任研究員、村澤 聡

## ● 研究の概要

ヒトの末梢血より分離培養した自己の血管内皮前駆細胞を血管新生療法に応用するための基礎研究と臨床応用にあたっての安全性に関する検討。

### 1. フェーズI

#### (1) 研究の目標

- ① CD34 陽性細胞による、下肢および心臓虚血性疾患の血管再生治療の臨床研究準備
- ② 虚血性心疾患における CD34 陽性細胞移植による血管再生の探求

#### (2) 実施内容

- ① CD34 陽性細胞による、下肢および心臓虚血性疾患の血管再生治療の臨床研究準備

G-CSF 投与後、骨髄から末梢血へ強制動員された CD34 陽性細胞をアフレーシスによる単核球分画採取、及び磁気抗体分離法により純化し、血管内皮前駆細胞として下肢の虚血部位に局所移植するプロトコルを計画。前臨床研究を組み立てるとともに、臨床研究プロトコル作製準備を進める。

- ② 虚血性心疾患における CD34 陽性細胞移植による血管再生および心筋再生の探求

末梢血単核球を採取し、同単核球から CD34 陽性細胞を分離し、全単核球あるいは分離された CD34 陽性細胞を心筋虚血ヌードラットの心筋虚血部位に移植した。

#### (3) 成果

- ① CD34 陽性細胞による、下肢および心臓虚血性疾患の血管再生治療の臨床研究

虚血性疾患により失われた臓器機能の回復手段として細胞移植による血管再生療法や臓器再生療法が注目されている。組織の虚血あるいは G-CSF などのサイトカインの投与により骨髄から末梢血に動員される CD34 陽性細胞中に血管内皮前駆細胞が存在し、組織での血管再生に寄与することがこれまでの我々および多施設の基礎研究で明らかにされている。我々は、平成 15 年度より重症慢性下肢虚血患者に対する CD34 陽性細胞の臨床応用を当施設において開始すべく、



前臨床試験及びプロトコル作製を重ねてきた。G-CSF 投与後、骨髄から末梢血へ強制動員された CD34 陽性細胞をアフエーシスによる単核球分画採取、及び磁気抗体分離法により純化し、血管内皮前駆細胞として下肢の虚血部位に局所移植する技術の、現実性および有効性を確認した。

## ② 虚血性心疾患における CD34 陽性細胞移植による血管再生および心筋再生の探求

EPC を移植する方法の、優位性と現実性を確認するため、ヒト CD34 陽性 (CD34+) 細胞を免疫不全ラットに用量負荷して治療効果を確認した。患者に 5 日間 G-CSF 製剤を皮下投与し、5 日目にアフエーシスによる末梢血単核球を採取し、同単核球から CD34 陽性細胞を分離した。全単核球あるいは分離された CD34 陽性細胞を心筋虚血ヌードラットの虚血部に心筋内投与した。結果、CD34+細胞は全単核球細胞に比べ出血性梗塞などの合併症がなく、血管再生効果が強く、心筋梗塞の線維化が少なく、心機能の改善効果があることが確認された。

## 2. フェーズII

### (1) 研究の目標

- ① CD34 陽性細胞による、下肢および心臓虚血性疾患の血管再生治療の臨床研究
- ② 虚血性心疾患における CD34 陽性細胞移植による血管再生および心筋再生の探求
- ③ 血管再生治療の診断微少血管造影の検討
- ④ Massive single cell PCR などの診断法による CD34 陽性細胞の探索
- ⑤ 血管内皮前駆細胞の細胞培養自動化の検討

### (2) 実施内容

#### ① CD34 陽性細胞による、下肢および心臓虚血性疾患の血管再生治療の臨床研究

G-CSF 投与後、骨髄から末梢血へ強制動員された CD34 陽性細胞を apheresis による単核球分画採取、及び磁気抗体分離法により純化し、血管内皮前駆細胞として下肢の虚血部位に局所移植する臨床研究プロトコルを進行。同 CD34 陽性細胞を用いた、心臓虚血性疾患治療も計画。

#### ② 虚血性心疾患における CD34 陽性細胞移植による血管再生および心筋再生の探求

CD34 陽性細胞移植治療を想定し、CD34 陽性細胞の用量負荷の投与を心筋梗塞モデルに試みる。投与細胞の、血管分化および心筋分化の有無を確認する。

#### ③ 血管再生治療の診断微少血管造影の検討

血管内皮前駆細胞治療により再生された新規血管を微小血管造影で解析を施行。SPring8 の BL28B2 ビームラインにおいて、ヒト末梢血に存在する骨髄由来血管内皮前駆細胞治療による心筋梗塞モデルの心機能・血行改善の評価をランゲンドルフ灌流下で行い、評価方法として 20~200  $\mu\text{m}$  レベルの冠動脈描出と血管形成範囲、左室造影による左心室壁運動の評価を行った。

#### ④ Massive single cell PCR などの診断法による CD34 陽性細胞の探索

臨床研究の進む CD34 陽性細胞が様々な再生に関係することを確認するために、その細胞の分化様式をタイムラプス顕微鏡で確認すると共に、massive single cell PCR などの診断法を開発し、細胞群の patterning を探索する。

### ⑤ 血管内皮前駆細胞の細胞培養自動化の検討

事業化に関する取り組みとしては、当初より開始した先端医療センターと、大阪大学基礎工学研究科 紀ノ岡正博助教授、(株)アポロメック(神戸市 東灘区)の研究協力を得て、既に開発された繊維芽細胞の自動培養器の原理を応用し、血管内皮前駆細胞の安全かつ効率的な培養の自動化することを計画した。

## (3) 成 果

### ① CD34 陽性細胞による、下肢および心臓虚血性疾患の血管再生治療の臨床研究

虚血性疾患により失われた臓器機能の回復手段として細胞移植による血管再生療法や臓器再生療法が注目されている。組織の虚血あるいは G-CSF などのサイトカインの投与により骨髄から末梢血に動員される CD34 陽性細胞中に血管内皮前駆細胞が存在し、組織での血管再生に寄与することがこれまでの我々および多施設の基礎研究で明らかにされている。平成 15 年度より、我々は重症慢性下肢虚血患者に対する CD34 陽性細胞の臨床応用を当施設において開始している。G-CSF 投与後、骨髄から末梢血へ強制動員された CD34 陽性細胞を apheresis による単核球分画採取、及び磁気抗体分離法により純化し、血管内皮前駆細胞として下肢の虚血部位に局所移植した。現在まで実施された 14 例において、短期成績ではあるが、重篤な有害事象は出現せず、虚血に関連した自覚症状(疼痛、歩行障害など)および他覚所見(壊死・潰瘍、足趾血圧など)の改善を確認している。

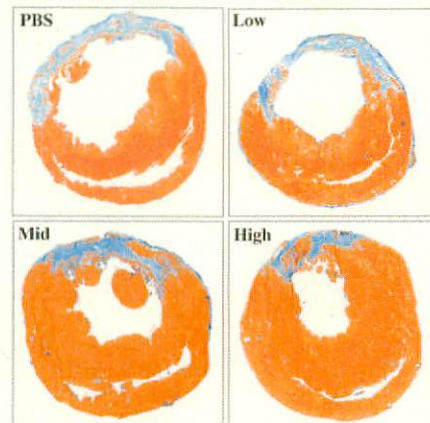


### ② 虚血性心疾患における CD34 陽性細胞移植によるの血管再生および心筋再生の探求

EPC を移植する方法の、優位性と現実性を確認するため、ヒト CD34 陽性 (CD34+) 細胞を免疫不全ラットに用量負荷して治療効果を確認した。患者に 5 日間 G-CSF 製剤を皮下投与し、5 日目にアフエレーシスによる末梢血単核球を採取し、同単核球から CD34 陽性細胞を分離した。全単核球あるいは分離された CD34 陽性細胞を心筋虚血ヌードラットの虚血部に心筋内投与した。結果、CD34+細胞は全単核球細胞に比べ出血性梗塞などの合併症がなく、血管再生効果が強く、心筋梗塞の線維化が少なく、心機能の改善効果があることが確認された。

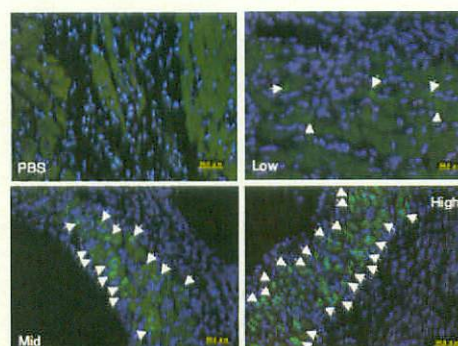
さらに、CD34 陽性細胞移植治療を想定し、CD34 陽性細胞の用量負荷の投与を心筋梗塞モデルに試みた。PBS 投与群、低用量群 (1X10<sup>3</sup> 個/kg)、中用量群 (1X10<sup>5</sup> 個/kg)、および高用量群 (5X10<sup>5</sup> 個/kg) を設定した。28 日後心臓を取り出してみると、移植後心筋梗塞の線維化部分は用量負荷依存性に改善していることが判明した。治療を受けた動物の心機能改善の評価は、超音波診断および micro-tip conductance カテーテル検査で、判定したところ、CD34 陽性

Dose-dependent inhibition of LV remodeling following CD34+ cell transplantation



細胞移植用量依存性に改善していることが確認できた。組織学的検索では、ラットの心筋梗塞部位組織にヒト CD34+細胞由来の血管細胞が容量依存性に確認できたが、これだけでなくヒト CD34+細胞由来の心筋細胞も容量依存性に存在していることが判明した (iwasaki Circ in press)。これらの結果より、CD34+細胞が血管再生療法として強力な効果を有し、虚血性疾患治療としての可能性を確認できた。さらに、心筋虚血部位では CD34 陽性細胞は血管再生だけでなく心筋再生も促すため、この移植療法が、血管・心筋再生療法として期待できることも判明した。

Myocardiogenesis by CD34+ cells



同じ動物モデルを用いて、健常人血管内皮前駆細胞 (CD34 陽性細胞) の心筋内への移植も試みた。移植した細胞数は、上述の静脈内移植時の 10 分の 1 であったが、同等に良好な治療効果を示した (図 11)。細胞移植法は、直視下で 26G 針を用いて、虚血部心筋の 5 か所に 1 か所あたり  $2 \times 10^4$  個の CD34 陽性細胞 (20  $\mu$ l の PBS に溶解) を移植した (ラット 1 匹あたり総計で、100  $\mu$ l の PBS に溶解した 105 個の CD34 陽性細胞を移植)。

### ③ 血管再生治療の診断微少血管造影の検討

血管内皮前駆細胞治療により再生された新規血管を微小血管造影で解析を行った。我々は Spring8 の BL28B2 ビームラインにおいて、ヒト末梢血に存在する骨髓由来血管内皮前駆細胞治療による心筋梗塞モデルの心機能・血行改善の評価をランゲンドルフ灌流下で行い、評価方法として 20~200  $\mu$ m レベルの冠動脈描出と血管形成範囲、左室造影による左心室壁運動の評価を行った。ラットの心筋梗塞を作成し、その後、15 分後に CD34 陽性細胞、CD34 陰性細胞、PBS を心筋内投与し、ランゲンドルフ灌流下 microangiography 装置で 1 週目、4 週目に評価を行った。移植後 1 週目の心エコーによる心機能評価は各群有意差が見られなかったが (内腔短縮率: CD34 陽性細胞群  $21.0 \pm 0.05$ 、CD34 陰性細胞群  $20.9 \pm 0.46$ 、PBS 群  $19 \pm 0.54\%$ )、マイクロ血管造影上、CD34 陽性細胞治療群は PBS、CD34 陰性細胞治療群に比べ 20  $\mu$ m レベルの血管が発達・増殖し、側副血行路の血管形成範囲が拡大する傾向がみられ、また移植後 4 週目の CD34 陽性細胞治療群は 20  $\mu$ m レベルの血管だけでなく 200  $\mu$ m レベルの血管まで有意に発達・増殖し、その側副血行路により左冠動脈前下行枝が描出され、左室造影による左心室壁運動評価においても前壁・中隔の壁運動が改善する傾向がみられた。心エコーによる心機能の評価は CD34 陽性細胞群が有意に改善しており、ランゲンドルフ灌流下 microangiography の結果と相関していた (1) 内腔短縮率: CD34 陽性細胞群  $28.0 \pm 0.05$ 、CD34 陰性細胞群  $22.9 \pm 0.46$ 、PBS 群  $21.2 \pm 0.54\%$  (2) 局所左心室壁運動スコア: CD34 陽性細胞群  $20.8 \pm 1.8$ 、CD34 陰性細胞群  $26.3 \pm 1.2$ 、PBS 群  $26.8 \pm 0.9$  ( $P < 0.05$ )。

以上の結果から、血管内皮前駆細胞による新規血管の血管形成を画像上証明 [血管形成による冠動脈血流 (心筋への灌流) の改善、側副血行路の発達] し、評価方法の一つとして Spring-8 の放射光を用いた microangiography の有用性を強く示すことができた。

これらの結果から得られた知見をもとに、血管内皮前駆細胞治療によるラット心筋梗塞標本を作成し、大視野高解像度 3 次元 CT へ適用する。3 次元的に評価することにより、立体的でさらに詳細な検討が可能になると期待される。また、画像解析ソフトを用いることにより、新生血管の形成範囲・体積などを定量的に評価する事ができ、新たな評価方法の一つとして確立されることが期待できる。

### ④ Massive single cell PCR などの診断法による CD34 陽性細胞の探索

上記の如く臨床面の研究の成果が順調に推移している一方で、更なる基礎検討についてもすすめている。治療細胞の有効性を基礎的に診断するために、この G-CSF の投与によって重症慢性下肢虚血患者より得られた CD34 陽性細胞の FACS による表面抗原の詳細な解析を行った。CD34 陽性細胞集団には分化した血管内皮特異的のマーカの発現は顕著に認められなかったが、さらに未分化なマーカーとされる AC133 による解析では強発現、および弱発現している分画の存在が示された。一方、これらの細胞を血管内皮細胞への分化誘導を目的としメチルセルロース培養を行うと、いくつかの異なるタイプのコロニーを形成することが明らかになった。タイムラプスシステムによる生細胞の観察データからも CD34 陽性細胞集団におけるいくつかの分画がそれぞれのコロニーを反映している可能性が示唆された。

本方法により投与されている細胞の表面抗原である CD34 は、血液幹細胞とも共通に発現していることから、CD34 陽性細胞集団には何種類かの細胞が混在していると推定される。将来的によりいっそう効率的かつ安全に血管形成を実施していくためには、CD34 陽性細胞の中でいかなる分画が血管形成に関与しているか明らかとすることが重要である。生細胞を長時間経時的に顕微鏡観察可能なタイムラプスシステムを稼働させ、血管内皮前駆細胞の解析を開始した。その結果、従来あまり意識されていなかった *in vitro* 下の動きにおいて、様々な運動パターンが認められた。この細胞の運動様式や形態的特徴より、血管内皮前駆細胞には 4 種類程度の分画が存在すること、さらには、細胞同士の interaction が想像以上に行われていることが示唆された。

さらに我々は、CD34 陽性細胞集団において、遺伝子機能におけるクラスターリングを目的とした single cell PCR を行い、様々な lineage の early marker の発現を調べた。興味深いことに、表面抗原レベルでは均一にみえた CD34 陽性細胞集団が、転写因子を含む、様々な lineage の early marker を発現するいくつかの subpopulation より構成されることが判明した。検索する発現マーカーの種類を増やし、クラスターリングを行うことによって、均一の細胞集団と考えられていた CD34 陽性細胞集団中の血管内皮前駆細胞の subpopulation を遺伝子レベルにおいて同定することが可能と考える。さらには、成体における hemangioblast の存在を証明する一つのツールとなりうる可能性もある。

これらのデータから、興味深いマーカーの一つとしてある増殖因子の受容体が候補として考えられ、症例間において CD34 陽性細胞中の発現頻度が異なる傾向を示していた。single cell PCR は感度も高く、また、比較的少ないサンプル量から、情報を得ることができるので患者の負担が少ない。今後、臨床成績と相関を示す因子が single cell PCR によって明らかになれば、治療効果予測の優れたツールになると考えられる。

今後は、バイオインフォマティクスのアプローチを用い、より多数の marker の発現を統計的に解析することによってクラスターリングを行い、遺伝子レベルでの血管内皮前駆細胞の同定を試みるとともに、治療効果の予測手段の確立のための詳細な検討を行う予定である。

#### ⑤ 血管内皮前駆細胞の細胞培養自動化の検討

事業化に関する取り組みとしては、当初より開始した先端医療センターと、大阪大学基礎工学研究科紀ノ岡正博助教授、(株)アポロメック(神戸市 東灘区)の研究協力を得て、既に開発された繊維芽細胞の自動培養器の原理を応用し、血管内皮前駆細胞の安全かつ効率的な培養の自動化することを計画した。現在、細胞の培養状態の画像診断装置の開発も順調に進み(日刊工業新聞 04-2-10 報道)、当研究部でその確認が進められた。本装置により培養フラスコに定着する細胞の形態や動きを画像情報化し、細胞培養状態を把握することが可能となり、細胞の自動培養装置の開発の基盤となる。これらが開発されると、末梢血からの EPC 培養が自動化することができ、より多くの医療機関で EPC を用いた血管新生

療法等を実施できる。

### 3. 今後の展望

今後は、この CD34 陽性細胞群の patterning により、より安全で効果的な目的指向性の再生治療を計画できるようになると考えられる。とくに massive single cell PCR の開発は、この基礎的基盤確立に不可欠であると考え。これらの発展と共に、CD34 陽性細胞の様々な血管再生が関連する疾患への臨床応用を進めることが出来るだろうと考える。