

課題番号 : 26指119
研究課題名 : 自己骨髄由来培養間葉系細胞移植による末梢動脈疾患に対する血管新生治療
主任研究者名 : 福田尚司
分担研究者名 : 大河内仁志

キーワード : 再生医療・血管新生・完全自家・間葉系幹細胞

【臨床研究】

<意義>

重症末梢動脈疾患患者を対象に、低侵襲的に局所麻酔下に少量の自己骨髄細胞をより高安全性の自己多血小板血漿にて培養し、下肢虚血筋肉内に投与する。血管新生を惹起することにより下肢切断を防ぐ治療法を確立すべく、その安全性と有効性を検討する。完全自家血管新生療法はNCGMオリジナルであり、世界初の試みである。

この結果をもって特定認定再生医療等委員会の承認後、ヒトへの応用を経て先進医療申請を行う。

<目的>

新しい低侵襲治療法により重症下肢虚血による下肢切断回避を目的とする。

年1万人に上る下肢切断患者のQOL低下を避けることで、波及効果として下肢切断患者に対する膨大な医療・社会福祉費の増加を抑制することができる。

<対象患者>

- 末梢動脈疾患（閉塞性動脈硬化症・バージャー病）患者 Fontaine 分類Ⅲ度およびⅣ度、Rutherford 慢性虚血肢臨床分類Ⅱ度4群、Ⅲ度5群および6群に属し、安静時疼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、下肢切断が予想される患者。
- 性別：男性および女性（妊娠中および妊娠の可能性のある女性を除く）
- 年齢：20歳以上75歳以下（ただし、75歳を超えた場合、年齢を考慮しても患者の利益が上回り、J-CHS フレイルスコアで基準値以下、かつ循環器科、心臓血管外科、血液内科の複数の研究者の合議により妥当と判断した場合はこの限りではない。また、この合議の記録は保存する。）
- 適応症例：当センター（循環器科、心臓血管外科、血液内科）および研究代表者、研究協力者で決定する。
- 除外基準
合併症により余命が著しく短いと考えられる患者
過去3ヶ月以内にアルコールもしくは薬物依存の既往のある患者
悪性新生物を有する患者および5年以内にその既往のある患者
諸検査により悪性腫瘍の可能性があると判断された患者
重症の糖尿病性網膜症を有する患者
インフォームドコンセントを得られない患者
その他、主治医が不相当と判断した患者

<方法>

- 静脈血採取
約200mlの静脈血を採取する。
- 多血小板血漿の調製
遠心分離により多血小板血漿を調製し、分注後、-30℃以下で凍結保存する。
- 骨髄液採取

局所麻酔下に患者腸骨より骨髓液を10ml程度採取する。

- 細胞培養
比重遠心分離法にて骨髓細胞を分離・濃縮し、予め凍結保存しておいた多血小板血漿を用いて調製した培地にて、目標細胞数約 $1.0 \times 10^7 \sim 8$ 個になるまで約1～2週間培養する。
- 中間評価
移植前の継代時にエンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験、無菌試験を行う。
- 細胞の移植
当センター手術室にて全身麻酔下に、培養した骨髓細胞約 $1.0 \times 10^7 \sim 8$ 個、総量約10～50mlの懸濁液を、27G針を用いて1箇所につき0.3～0.5mlずつ、虚血下肢骨格筋に約40～60箇所に分割して筋肉内注射を行う。
- 最終調製時の評価
培養して得られた細胞の一部で無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン定量を実施する。
- 細胞の保管
培養後の細胞（最終調製物）および多血小板血漿は研究用と有害事象発生時の原因究明用の二つにわけ、細胞調製室の液体窒素に凍結保管とする。研究用試料は保管期限を特に定めず、有害事象が発生した場合の原因究明用の試料は10年保管とする。その後、原因究明用試料は研究用に転用する。本研究は再生医療を受ける患者自身の骨髓及び末梢血を使用する。培養後の細胞を保管することで、患者が感染症を発症した際の原因究明は可能であるので、採取した骨髓及び末梢血の損失を避けるためにもこれらの保管は行わない。

<評価項目>

- 主要評価項目
安全性の評価 移植後1年までにおける有害事象を「有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳 JCOG版（略称：CTCAE v4.0 - JCOG）」3)に従い評価し、Grade2以上の有害事象の発生頻度を求める。
- 副次評価項目
救肢の可否
SPP(Skin perfusion pressure)
6分間歩行距離テスト
SF-12(Physical and mental health scores)
Fontaine 分類
Rutherford 慢性虚血肢臨床分類
ABPI(Ankle brachial pressure index)
TcPO2(Transcutaneous partial pressure of oxygen)
皮膚潰瘍の大きさ(皮膚潰瘍を有している場合)
Visual analog scale(VAS)

<結果>

- 特定認定再生医療等委員会への申請・承認（27年度）
27年10月27日、東京医科歯科大学特定認定再生医療等委員会にて承認。
承認番号 RM27-003
- 関東信越厚生局への申請・承認（27年度）
27年11月12日、関東信越厚生局にて承認。
計画番号 PB3150012
- 前向き介入研究としてヒトへ実施（28年度）
目標症例数 2例
候補症例数 6例（院内2例、他病院3例、医師会1例）
研究エントリー症例数 3例（除外された3例は、それぞれカテーテル治療1例、バイパス術2例）

実施症例数 2例（エントリーした3例中1例は担癌にて逸脱）
結果 2例において有害事象は認めなかった。また、有効性が認められた。

● 先進医療への申請

当初の計画である5例に残り3例を実施することにより先進医療への申請が可能を構築した。

● 治験への可能性

先進医療を2相試験と位置づけ、治験への可能性も創出した。

<今後の展望>

- 症例の蓄積（29年度）
- 先進医療への申請（30年度）
- 治験に向けた非臨床試験実施（30年度～）
- 先進医療のデータを利用し3相試験を開始（33年度～）
- 薬事承認（38年度）

【基礎研究】

● 多血小板血漿を用いての骨髄間葉系幹細胞の増殖（26年度）

健常人ボランティアの末梢血から多血小板血漿を調整し、骨髄液から単核球を分離して、 α -MEMの培養液中で接着細胞を培養した。細胞増殖に伴い、適宜継代操作を行い、2週間で目標の細胞数108個程度まで培養することができた。（図1）

● 安全性の確認（26年度）

エンドトキシン定量、一般細菌・真菌培養同定、マイコプラズマ否定試験、染色体検査それぞれ異常は見られなかった。

細胞表面マーカーは間葉系細胞の基準とされるCD73、CD90、CD105が陽性であり、マクロファージマーカー（CD11b、CD14）、造血幹細胞マーカー（CD34）、白血球マーカー（CD45）、B細胞マーカー（CD19、CD79a）が陰性であることが確認された。

造腫瘍性の確認として免疫不全マウスに培養ヒト間葉系細胞を107移植して3ヶ月観察したが腫瘍形成は認められなかった。

● マウス骨髄由来の間葉系幹細胞の培養と移植実験（26年度）

細胞移植実験において移植された細胞の生着を確認するために、C57/BL6マウスの骨髄由来の間葉系幹細胞を10%FBS（牛胎児血清）添加DMEM培地を用いて培養し、 5×10^5 個ずつマウスヒラメ筋の3カ所に筋注した。血管内皮細胞に発現するファクターVIII(von Wilbrand factor)に対する抗体を用いて免疫組織学的に検討したところ、細胞移植群の方で筋肉内の血管が多い部分が認められた。

● 免疫不全マウスの下肢虚血モデルにヒト骨髄由来の培養間葉系幹細胞（BM-MSC）を移植（26年度）

ヒト骨髄からBM-MSCを培養し、細胞にGFPを発現させるためにGFP遺伝子ベクターを導入。サンプルはホルマリン固定後にパラフィン包埋し、各種染色を行ったところ、ファクターVIII陽性の管腔形成を認め、血管新生を確認した。（図2）

● 基礎検討の結果の投稿、掲載（26年度）

Shoji Fukuda, Shotaro Hagiwara, Satsuki Fukuda, Ryo Yakabe, Hiroko Suzuki, Shigeharu G. Yabe, Techuan Chan, Hitoshi Okochi. Safety assessment of bone marrow derived MSC grown in platelet-rich plasma. Regenerative Therapy, Volume 1, June 2015, Pages 72-79, ISSN 2352-3204, <http://dx.doi.org/10.1016/j>

Subject No.: 26-119

Title: Therapeutic angiogenesis with autologous cultured bone marrow
derived MSC grown in platelet-rich plasma against peripheral arterial
disease

Researchers: Shoji Fukuda, Hitoshi Okochi

Key word: Regenerative medicine, angiogenesis, autologous, mesenchymal stem cells

Basic research

The injection of endothelial progenitor cells and mononuclear cells derived from bone marrow at the ischemic region of peripheral artery disease patients is reported to be effective for therapeutic angiogenesis; however, these cell therapies require large amounts of bone marrow to obtain sufficient numbers of cells. To solve this problem, we attempted to culture bone-marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSC), which are supposed to secrete several cytokines that promote angiogenesis. We also focused on using platelet-rich plasma (PRP) as a supplement for cell culture instead of fetal bovine serum. Human BM-MSC obtained from healthy volunteers expanded rapidly when cultured with 10% PRP prepared from their own blood. FACS analysis revealed that these cultured human MSC were homogeneous populations, and chromosomal analysis showed a normal karyotype. Moreover, the angiogenic effect was apparent two weeks after human BM-MSC were injected into the ischemic muscle in SCID mice. Tumor formation was not detected three months after injection into SCID mice either subcutaneously or intramuscularly. To simulate clinical

Researchers には、分担研究者を記載する。

settings, canine BM-MSC were grown with canine PRP and injected into their ischemic muscles. We confirmed that donor cells existed in situ two and six weeks after operation without any side effects. These results suggest that cultured human BM-MSC can be a promising cell source for therapeutic angiogenesis.

Clinical research

Backgrounds:

Previous clinical studies have reported that the implantation of bone marrow (BM)-derived mononuclear cells (MNCs) or mesenchymal stem cells (MSCs) results in improvement in symptoms and healing of ulcers in patients with critical limb ischemia (CLI) up to stage IV of Fontaine's classification. However, most patients with Fontaine stage IV CLI limbs had to undergo amputation even after stem cell therapy. We report on a successful case of implantation with autologous cultured bone marrow derived MSCs grown in platelet-rich plasma against advanced chronic critical limb ischemia in patient with diabetes and hemodialysis.

Patient:

The patient was a 72-year-old male who had diabetes, class 4 CKD and CLI of the right lower limb with severe calcification in three main arteries and diffuse multiple severe stenosis of the only patent posterior tibial artery, and a large ischemic, MRSA infected foot ulcer. The ulcer

measured 71 mm in maximum diameter at the lateral aspect of the foot, exposing the gastrocnemius and Achilles tendon.

Results:

The patient was followed up at 1 week, 1 month, 2 months, 6 months and 12 months after implantation. Large ulcer 71 mm in maximum diameter had improved significantly to complete endothelialization. 6-minute walk test (0 to 300 M at 6 months after implantation), ABPI (0 to 0.37 at 6 months after implantation), TcPO₂ (1 to 54 mmHg at 6 months after implantation), VAS (85 to 0 at 12 months after implantation) and WIQ (53 /400 to 249 /400 at 12 months after implantation) had also improved.

Conclusions:

Limb salvage was possible in diabetic class 4 CKD patient with Fontaine stage IV CLI following implantation with autologous cultured bone marrow derived MSC grown in platelet-rich plasma. The procedure was safe without any adverse events.

自己骨髄由来培養間葉系細胞移植による 末梢動脈疾患に対する血管新生治療

<意義>

重症末梢動脈疾患患者を対象に、**低侵襲的**に局所麻酔下に少量の自己骨髄細胞をより**高安全性**の自己多血小板血漿にて培養し、下肢虚血筋肉内に投与する。血管新生を惹起することにより下肢切断を防ぐ治療法を確立すべく、その安全性と有効性を検討する。完全自家血管新生療法は**NCGMオリジナル**であり、**世界初**の試みである。この結果をもって特定認定再生医療等委員会の承認後、ヒトへの応用を経て**先進医療**申請を行う。

<目的>

新しい低侵襲治療法により重症下肢虚血による**下肢切断回避**を目的とする。**年1万人**に上る下肢切断患者のQOL低下を避けることで、波及効果として下肢切断患者に対する膨大な**医療・社会福祉費の増加を抑制**することができる。

研究結果【臨床】

特定認定再生医療等委員会への申請・承認(27年度)

27年10月27日、東京医科歯科大学特定認定再生医療等委員会にて承認。
承認番号 RM27-003

関東信越厚生局への申請・承認(27年度)

27年11月12日、関東信越厚生局にて承認。
計画番号 PB3150012

前向き介入研究としてヒトへ実施(28年度)

目標症例数	2例
候補症例数	6例(院内2例、他病院3例、医師会1例)
研究エントリー症例数	3例(除外された3例は、それぞれカテーテル治療1例、バイパス術2例)
実施症例数	2例(エントリーした3例中1例は担癌にて逸脱)

先進医療申請への基盤作り

残り3例を実施することにより先進医療申請が可能。

治験への可能性

先進医療を2相試験と位置づけ、治験3相試験への道筋をつけた。

細胞移植後の足潰瘍の変化

術前: 最大径71mm



術1月目: 最大径60mm



術2月目: 最大径 54mm



術4月目: 最大径 34mm



術6月目: 最大径 7mm



術12月目: 上皮化



【症例】

72歳 男性

【診断】

ASO・右CLI・

MRSA骨髄炎および菌血症

【既往歴】

糖尿病・人工透析中(DM腎障害)

研究結果【基礎】

多血小板血漿を用いての骨髄間葉系幹細胞の増殖(26年度)

健常人ボランティアの末梢血から多血小板血漿を調整し、骨髄液から単核球を分離して、 α -MEMの培養液中で接着細胞を培養した。細胞増殖に伴い、適宜継代操作を行い、2週間で目標の細胞数108個程度まで培養することができた。

安全性の確認(26年度)

エンドトキシン定量、一般細菌・真菌培養同定、マイコプラズマ否定試験、染色体検査それぞれ異常は見られなかった。

細胞表面マーカーは間葉系細胞の基準とされるCD73、CD90、CD105が陽性であり、マクロファージマーカー(CD11b、CD14)、造血幹細胞マーカー(CD34)、白血球マーカー(CD45)、B細胞マーカー(CD19、CD79a)が陰性であることが確認された。

造腫瘍性の確認として免疫不全マウスに培養ヒト間葉系細胞を107移植して3ヶ月観察したが腫瘍形成は認められなかった。

マウス骨髄由来の間葉系幹細胞の培養と移植実験(26年度)

細胞移植実験において移植された細胞の生着を確認するために、C57/BL6マウスの骨髄由来の間葉系幹細胞を10%FBS(牛胎児血清)添加DMEM培地を用いて培養し、 5×10^5 個ずつマウスヒラメ筋の3カ所に筋注した。血管内皮細胞に発現するファクターVIII(von Wilbrand factor)に対する抗体を用いて免疫組織学的に検討したところ、細胞移植群の方で筋肉内の血管が多い部分が認められた。

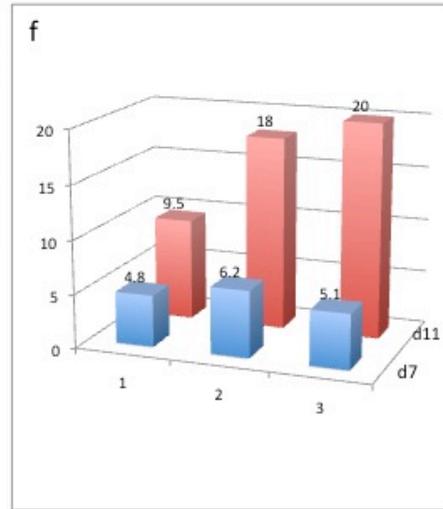
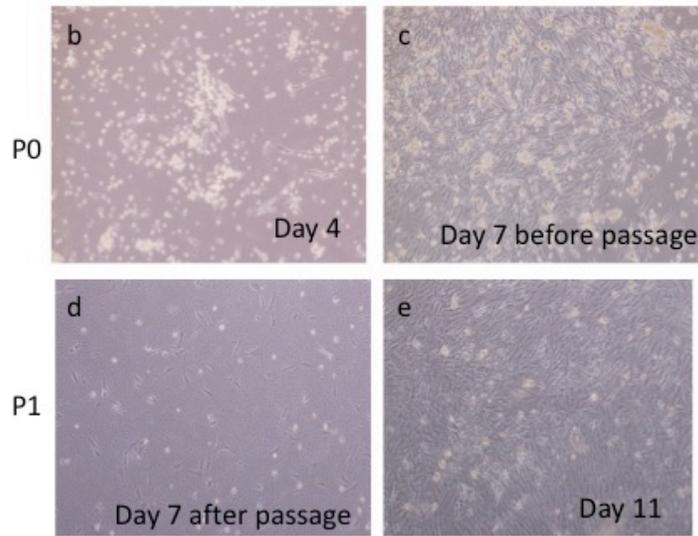
免疫不全マウスの下肢虚血モデルにヒト骨髄由来の培養間葉系幹細胞(BM-MSC)を移植(26年度)

ヒト骨髄からBM-MSCを培養し、細胞にGFPを発現させるためにGFP遺伝子ベクターを導入。サンプルはホルマリン固定後にパラフィン包埋し、各種染色を行ったところ、ファクターVIII陽性の管腔形成を認め、血管新生を確認した。

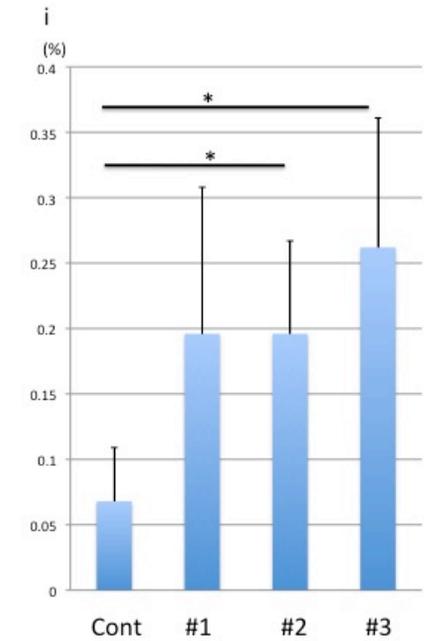
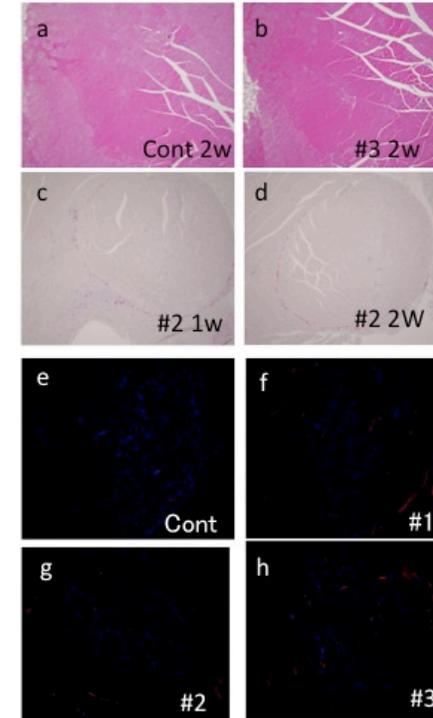
基礎検討の結果の投稿、掲載(26年度)

Shoji Fukuda, Shotaro Hagiwara, Satsuki Fukuda, Ryo Yakabe, Hiroko Suzuki, Shigeharu G. Yabe, Techuan Chan, Hitoshi Okochi. Safety assessment of bone marrow derived MSC grown in platelet-rich plasma. Regenerative Therapy, Volume 1, June 2015, Pages 72-79, ISSN 2352-3204, <http://dx.doi.org/10.1016/j>.

Cell growth of human BM-MSC in the PRP containing media



human MSC transplantation into ischemic limb model mice



今後の展望

- 症例の蓄積(29年度)
- 先進医療への申請(30年度)
- 治験に向けた非臨床試験実施(30年度～)
- 先進医療のデータを利用し3相試験を開始(33年度～)
- 薬事承認(38年度)

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 26指119

研究課題名： 自己骨髄由来培養間葉系細胞移植による末梢動脈疾患に対する血管新生治療

主任研究者名： 福田尚司

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Safety assessment of bone marrow derived MSC grown in platelet-rich plasma.	Shoji Fukuda, et. al.	Regenerative Therapy	Volume 1	2015

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
多血小板血漿を用いて培養した自己骨髄由来間葉系細胞の投与により著効した重症虚血肢に対する血管新生療法の1例	福田尚司	日本再生医療学会	仙台	2017年3月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
「再生医療講演会」 自己骨髄由来培養間葉系細胞移植による末梢動脈疾患に対する血管新生治療	福田尚司	新宿医師会会員	新宿区医師会館	2016年11月25日
新宿区民医療公開講座 『足を救いたい！ 自己骨髄由来幹細胞移植による血管新生療法について』	福田尚司	新宿区民	新宿区民ホール	2017年5月20日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと