

課題番号 LS113

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成 24 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	糖尿病性潰瘍に対するハイブリッド型生体外増幅血管内皮前駆細胞による新しい血管再生治療の開発
研究機関・ 部局・職名	順天堂大学医学部 形成外科学講座・准教授
氏名	田中里佳

## 1. 当該年度の研究目的

理想的な再生治療は低侵襲的（採血）に幹細胞を採取し、少量の細胞からより多くの質の高い細胞を生産、移植できることである。我々は、血管幹細胞（血管内前駆細胞：EPC）を用いてより質の高い、より多くの細胞を得るためにハイブリッド型生体外増幅培養法の開発を行っている。22年度、23年度において、ヒトの末梢血 EPC を特定の組み合わせの細胞（CD34陽性細胞とCD34陰性細胞）と混合培養することで EPC の質と数を飛躍的に改善する独自の方法（ハイブリッド型生体外増幅培養法）を実用可能な方法として確立し、その治療効果を検証した。CD34陽性細胞と陰性細胞とのハイブリッド培養は1.7%の比率で培養した場合がもっとも効果的であることが分かった。しかし、臨床応用を考慮した場合においてCD34陰性と陽性の分離は手間とコストを要する。そこで我々は、CD34陽性、陰性細胞を分離せず末梢血単核球を我々独自で開発した生体外増幅培養法にて培養を行い、その増幅効果、細胞機能改善効果、組織再生効果を検証した。平成23年度は、健常人末梢血単核球を用いて In vitro, In vivo にて検証を行った結果、従来開発した培養法に比べ有意に高く有効な組織移植効果が得られている。平成24年度は糖尿病患者における末梢血単核球のハイブリッド型生体外増幅培養法の有効性を In vitro, In vivo にて明らかにし、In vitro においては、末梢血単核球ハイブリッド型生体外増幅培養細胞の血管再生能、血管形成能、接着能、遊走能、増幅能を検証し、In vivo では潰瘍モデルマウスにて組織再生能と血管再生能を検証した。さらに昨年度から引き続き、糖尿病血管幹細胞機能障害の責任遺伝子の同定を行い、糖尿病ハイブリッド型生体外増幅培養細胞機能改善メカニズムについても解明する予定である。

## 様式19 別紙1

### 2. 研究の実施状況

本年度は①糖尿病末梢血単核球における Hybrid Quality and Quantity Culture (Hybrid QQC) 培養後の血管再生能、細胞の性質、血管形成能、遺伝子発現を検討し、Hybrid QQC の有効性を証明した。来年度からの QQC 臨床応用に向けての準備のため②糖尿病 Hybrid QQC 細胞の安全性③糖尿病 Hybrid QQC 細胞の移植効果④糖尿病 Hybrid QQC 細胞の標準化⑤自己糖尿病 Hybrid QQC 細胞移植プロトコルの確立⑥ヒト幹細胞倫理指針書類作成⑦Cell processing Center (CPC) の設立を行った。

合計 20 例の糖尿病患者から末梢血 50 cc を採取し、単核球を分離し 1 週間 Hybrid QQC にて培養を行ったところ末梢血細胞数は健常人で  $74 \pm 0.2\%$  と糖尿病で  $68\% \pm 0.1\%$  増幅した ( $p < 0.05$ )。Hybrid QQC 培養後単核球成分中の CD34 陽性細胞成分は上昇し、Regulatory T cell, Angiogenic T cell の数が増加、抗炎症効果のある M2 マクロファージの増加を認めた。本培養系において単核球成分から血管幹細胞、抗炎症細胞を培養しながら分離精製することに成功した。Hybrid QQC により血管再生能は 1.2 倍になり、糖尿病では 2.2 倍に高くなった。RT-PCR にて糖尿病 Hybrid QQC 後細胞の遺伝子発現を確認すると、血管新生遺伝子、組織修復遺伝子、抗炎症系サイトカイン遺伝子の増加をみとめ、炎症系サイトカイン遺伝子は低下を認めた。In vivo ではヌード潰瘍モデルに糖尿病患者 QQC 細胞を移植したところ糖尿病患者 Pre-QQC 細胞にくらべ有意に高い創傷治癒効果を認めた。本年度の研究結果から糖尿病患者末梢血 170 cc からの単核球を一週間 Hybrid QQC にて培養することで有効な自己末梢血単核球移植による組織再生、血管再生治療が可能であることが分かった。これらの結果を踏まえて来年度から糖尿病難治性潰瘍患者に対する自己末梢血単核球を用いた Hybrid QQC 細胞移植を計画することとした。その準備として、細胞の造腫瘍性、安全性試験を開始し現在結果待ちである。また以上の結果をもとにヒト幹細胞倫理指針の申請書類を作成している。順天堂大学においては Cell Processing Center の設備がなかったが、本年度設立することができた。ヒト幹細胞移植ができる施設として環境整備を行っている。

本研究の結果である末梢血単核球を用いた Hybrid QQC による細胞治療は、細胞を採血から簡単な分離操作で採取することができ、血管再生能、移植効果を高めた細胞を移植できるため患者に対する身体的、経済的負担を最小限にして効果を最大限にした画期的な新しい細胞治療法である。本年度は本治療法の特許申請を行い、マウス骨髄血管幹細胞(EPC)を用いた QQC の有効性を論文報告した。今後は、Hybrid QQC の有効性を論文化し、臨床研究を開始する予定である。

### 3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計6件
計8件	1. Josh F, Kobe K, Tobita M, Tanaka R, Suzuki K, Ono K, Hyakusoku H and Mizuno H .Accelerated and safe proliferation of human adipose-derived stem cells in medium supplemented with human serum.J Nippon Med Sch J Nippon Med Sch. 2013;80(2):140-7 2. Josh F, Tobita M, Tanaka R, Orbay H, Ogata K, Suzuki K, and Mizuno

	<p>H .Concentration of PDGF-AB, BB and TGF-β1 as valuable human serum parameters in adipose-derived stem cell proliferation.J Nippon Med Sch J Nippon Med Sch. 2012;79(6):444-52.</p> <p>3. Tanaka R, Masuda H, Kato S, Imagawa K, Kanabuchi K, Nakashioya C, Yoshiba F, Fukui T, Kobori M, Wada M, Asahara T, Miyasaka M. Autologous G-CSF mobilized peripheral blood CD34+ cell therapy for diabetic patients with chronic non-healing ulcer. Cell Transplantation. Cell Transplant. 2012 Oct 25. doi: 10.3727/096368912X658007. [Epub ahead of print]</p> <p>4. Tanaka R, Masuda H, Arita K, Hirano R, Sukmawati, D, Fujimura S, Mizuno H, Asahara T. Quality and Quantity Culture Restore Diabetic Endothelial Progenitor Cell Dysfunction for wound healing. Circulation (Suppl. 21):126,2012</p> <p>5. Masuda H, Tanaka R, Fujimura S, Akimaru H, Shizuno T. Horii M, Ishikawa M, Obi S, Kawamoto A, Asahara T. Development of Serum-Free Suspension Culture System of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Potentiate Vascular Regeneration. Circulation. (Suppl 21) 126.2012</p> <p>6. Ervinna N, Mita T, Yasunari E, Azuma K, Tanaka R, Fujimura S, Sukmawati D, Nomiyama T, Kanazawa A, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H: Anagliptin, a DPP-4 Inhibitor, Suppresses Proliferation of Vascular Smooth Muscles and Monocyte Inflammatory Reaction and Attenuates Atherosclerosis in Male apo E-Deficient Mice. Endocrinology 2013;154:1260-1270</p> <p>.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計2件</p> <p>7. Tanaka R, Komoto M, Mizuno H. Skin perfusion press measurements-potentially the technique for assessing tissue viability in the distal foot. Journal of Wound Technology. 16:6-10. 2012</p> <p>8. 水野 博司, 田中 里佳【形成外科領域における体性幹細胞・前駆細胞の臨床応用】幹細胞と増殖因子の臨床応用。形成外科(0021-5228)55 巻 10 号 Page1091-1097(2012.10)</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
--	--

様式19 別紙1

<p>会議発表  計18件</p>	<p>専門家向け 計13件</p> <p>① 田中里佳「糖尿病性潰瘍に対する末梢血血管内皮前駆細胞を用いた新血管・皮膚再生治療の開発」第42回日本創傷治癒学会シンポジウム、札幌、2012年12月2日～4日、札幌医科大学医学部</p> <p>② 田中里佳 「無血清生体外増幅ヒト末梢血血管内皮前駆細胞のケラチノサイトへの分化の検討」第42回日本創傷治癒学会 奨励賞受賞講演、札幌、2012年12月2日～4日、札幌医科大学皮膚科学講座</p> <p>③ Tanaka R, Quality and Quantity Culture Restore Diabetic Endothelial Progenitor Cell Dysfunction for wound healing. American Heart Association, Los Angeles, 2012年11月2日～8日</p> <p>④ Masuda H, Tanaka R, et al. Development of Serum-Free Suspension Culture System of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Potentiate Vascular Regeneration. American Heart Association, Los Angeles, 2012年11月2日～8日</p> <p>⑤ Tanaka R. et al. Future perspective of bone marrow derived peripheral blood stem cell therapy for non-healing diabetic foot patients. 4<sup>th</sup> Congress of the World Union of Wound Healing Societies, Yokohama, 2012年9月2日～6日</p> <p>⑥ Mizuno H, Tanaka R, et al. Therapeutic strategies for wound healing by regenerative medicine 4<sup>th</sup> Congress of the World Union of Wound Healing Societies, Yokohama, 2012年9月2日～6日</p> <p>⑦ Tanaka R, et al. Quantity and quality control culture system enforces therapeutic potential of clinical diabetic CD34+ cells for wound healing 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, Yokohama, 2012年6月13日～16日</p> <p>⑧ 田中里佳、「無血清生体外増幅ヒト末梢血血管内皮前駆細胞のケラチノサイトへの分化の検討」第21回日本形成外科学会基礎学術集会、福島、2012年10月3日～5日、福島県立医科大学形成外科学講座</p> <p>⑨ 田中里佳、「生体外増幅培養法による糖尿病マウス血管内皮前駆細胞機能改善のメカニズム解明—酸化ストレスの影響」第21回日本形成外科学会基礎学術集会、福島、2012年10月3日～5日、福島県立医科大学形成外科学講座</p> <p>⑩ 田中里佳、「末梢血血管幹細胞治療による創傷治癒」第4回日本創傷外科学会総会・学術集会、福岡、2012年7月26日～27日、久留米大学形成外科</p> <p>⑪ Tanaka R et al. 「Ex vivo expansion restores diabetic EPC function and accelerate wound healing by recovering the cells from oxidative stress」57<sup>th</sup> Annal Meeting of the Plastic Surgery Research Council、アメリカ（ミシガン）2012年6月14日～17日、</p> <p>⑫ 田中里佳、「透析足潰瘍患者の円滑な医療連携をはかるためのクリニカルパスの作成」第55回日本形成外科学会総会・学術集会、東京、2012年4月11日～13</p>
---------------------------	--

様式19 別紙1

	<p>日、北里大学医学部形成外科、</p> <p>⑬ 田中里佳、臨床医が必要とする基礎研究とは？（再生医療実用化に向けた研究開発）医療の実際とそこで期待されている技術革命第35回日本分子生物学会、福岡、2012年12月13日</p> <p>一般向け 計5件</p> <p>① 田中里佳、「フットケアをはじめよう～今日から出来るケアとは、私たちに必要な知識とは～」健康祭り、静岡、2013年2月1日、湯河原年金厚生病院、</p> <p>② 田中里佳、「糖尿病患者さんの足と命を救う最先端治療。フットケア～再生治療について」練馬市民健康医学講座、東京、2012年12月15日、順天堂大学練馬病院</p> <p>③ 田中里佳、「糖尿病患者さんの足と命を救う最先端治療。フットケア～再生治療について」石井病院市民講座、群馬、2013年3月9日、石井病院</p> <p>④ 田中里佳、「順天堂大学におけるC L I 治療に対する取り組み：フットケアパスによる地域連携から再生治療まで」足立区PAD治療講演会。東京、2013年3月12日、大塚製薬</p> <p>⑤ 田中里佳、「末梢血を用いた新血管再生治療」第4回医療介護ビジネス創造研究会、大阪、2013年3月30日、NPO法人MVCメディカルベンチャー会議</p>
<p>図書 計2件</p>	<p>1) 田中里佳。分担) 糖尿病性潰瘍患者に対する末梢血血管内皮前駆細胞移植：課題と将来の展望「幹細胞技術の標準化：再生治療への期待」。編集：田中正躬。2012.10 日本規格協会。</p> <p>2) 田中里佳【最新臨床糖尿病学 下-糖尿病学の最新動向-】糖尿病合併症・糖尿病関連疾患 各種糖尿病合併症の概念・成因・診断・治療 糖尿病性足病変とフットケア 糖尿病性足病変の治療 糖尿病性潰瘍患者に対する血管再生治療(細胞治療)日本臨床(0047-1852)70 巻増刊 5 最新臨床糖尿病学(下) Page493-498(2012.07)</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計0件</p>	<p>(取得済み) 0件 (出願済み) 0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p><a href="http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/saisentan2/index.html">http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/saisentan2/index.html</a></p> <p><a href="http://www.juntendo.ac.jp/hospital/clinic/keisei/iryo02.html">http://www.juntendo.ac.jp/hospital/clinic/keisei/iryo02.html</a></p> <p><a href="http://www.juntendo.ac.jp/hospital/clinic/keisei/nanjiseikaiyo.html">http://www.juntendo.ac.jp/hospital/clinic/keisei/nanjiseikaiyo.html</a></p>

様式19 別紙1

<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>① 田中里佳、「将来、世界をリードすることが期待される若手研究者の研究紹介」 順天堂大学オープンキャンパス 東京、2012年8月25日、順天堂大学本郷</p> <p>② 田中里佳、順天堂大学最先端・次世代研究開発支援プログラム 第2回シンポジウム ～最先端のアレルギー治療と再生治療の開発研究～東京、2012年12月21日、順天堂大学本郷</p> <p>③ 田中里佳、「フットケアをはじめよう～今日から出来るケアとは、私たちに必要な知識とは～」健康祭り、静岡、2013年2月1日、湯河原年金厚生病院、</p> <p>④ 田中里佳、「糖尿病患者さんの足と命を救う最先端治療。フットケア～再生治療について」練馬市民健康医学講座、東京、2012年12月15日、順天堂大学練馬病院</p> <p>⑤ 田中里佳、「糖尿病患者さんの足と命を救う最先端治療。フットケア～再生治療について」石井病院市民講座、群馬、2013年3月9日、石井病院</p> <p>⑥ 田中里佳、「末梢血を用いた新血管再生治療」第4回医療介護ビジネス創造研究会、大阪、2013年3月30日、NPO法人MVCメディカルベンチャー会議</p> <p>上記の市民講座、公開講座、オープンキャンパス講演を実施し、国民に最先端次世代支援プログラム助成による本研究成果を公開、発表、報告を行った。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載計1件</p>	<p>媒体名：上毛新聞 掲載日：2013年03月18日</p> <p>群馬県の伊勢崎市文化会館で医学部卒業生の田中里佳氏（順天堂大学准教授）が、医療講演会で『糖尿病の最先端治療』について講演した要旨を伝える記事が掲載された。</p>
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	119,000,000	51,014,000	35,000,000	32,986,000	0
間接経費	35,700,000	15,304,200	10,500,000	9,895,800	0
合計	154,700,000	66,318,200	45,500,000	42,881,800	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	5,227,676	35,000,000	0	40,227,676	39,681,413	546,263	0
間接経費	14,643,751	10,500,000	0	25,143,751	24,979,872	163,879	0
合計	19,871,427	45,500,000	0	65,371,427	64,661,285	710,142	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	23,779,810	インテリジェント顕微鏡、マウス等消耗品 他
旅費	1,683,428	形成外科学会、創傷治癒学会、米国デトロイト等
謝金・人件費等	12,536,593	研究補助者人件費 他
その他	1,681,582	解析費用、サンプル等郵送代 等
直接経費計	39,681,413	
間接経費計	24,979,872	
合計	64,661,285	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
インテリジェント顕微鏡	DM4000B	1	5,250,000	5,250,000	2012/5/31	順天堂大学形成外科学講座
ニコン 研究用倒立顕微鏡	TI-U 本機セット	1	2,238,138	2,238,138	2012/6/12	順天堂大学形成外科学講座
高精細カラーカメラ	DS-Fi1-L3標準セット	1	505,512	505,512	2012/6/12	順天堂大学形成外科学講座