

受理编号: S2018-YF-GHMS-0141

管理类别: 项目类

项目类别: 国际科技合作计划项目-一般项目



陕西省重点研发计划
项目申请书
(2018年度)

项目名称: 川崎病冠脉病变的干细胞疗法

申请单位: 陕西省人民医院 (盖章)

项目负责人: 焦富勇 电子邮箱: jiaofy@yeah.net

手机号码: 15398082028 联系电话: 029-85251331转3130

项目联系人: 李盼 电子邮箱: lipan@sxstemcell.com

手机号码: 15129010242 联系电话: 029-68820605

推荐部门: 陕西省卫生和计划生育委员会

申请日期: 2017年08月01日

一、项目基本信息

项目名称	川崎病冠脉病变的干细胞疗法		
经济行业领域	卫生和社会工作-卫生-医院-综合医院		
学科名称1	儿科学320.34		
学科名称2	细胞工程180.7120		
学科名称3			
项目实施地点	中国西安、俄罗斯叶卡捷琳堡		
项目起止时间	2018-01-01 至 2020-12-31		
曾列入何种科技计划	其他		
是否为曾列入政府间国际科技合作议定书项目	否		
是否曾列入科技部重大国际合作专项（含对俄专项）	否		
申请单位是否曾列入科技部国际合作基地	否		
申请单位是否曾列入陕西省国际合作基地	否		
序号	合作国别	合作机构名称	合作起止日期
1	俄罗斯	Ural Federal University	2018年01月01日 至 2020年12月31日
申请单位信息			
单位名称	陕西省人民医院	单位负责人	高敬龙
通讯地址	西安市友谊西路256号	邮政编码	710068
传真	029-85251331-3496	电话	029-85251331-2610
外方合作单位信息			
单位名称	Ural Federal University		
项目联系人	Lvova Olga	通讯地址	620219, Yekaterinburg, Repina str, 3
传真	+79222-09-32-59	电话	+7343-3723259

二、合作项目主要内容

川崎病（Kawasaki disease, KD）又称皮肤黏膜淋巴结综合征，该病以全身性中、小动脉炎为主要病理变化，冠状动脉病变是其严重并发症。近年来，川崎病发病率逐年增加，患儿心血管病变率已超过20%，川崎病成为儿童后天性心脏病的最重要原因之一，川崎病患儿因冠状动脉瘤破裂致死也时有报道。对川崎病疗法的研究愈发重要。

目前，临床上公认的川崎病治疗方法是静脉注射免疫球蛋白和口服阿斯匹林，从而控制全身非特异性血管炎，防止冠状动脉损害的发生。但临床治疗中仍存在部分病人阿斯匹林不耐受、有耐免疫球蛋白川崎病患者等问题。于是，人们把目光转向了如今炙手可热的干细胞疗法。

用脐带间充质干细胞治疗心肌梗塞、心衰等心脏疾病已是较为成熟的干细胞疗法，已有大量临床前动物实验、临床试验证实了脐带间充质干细胞治疗的安全性和有效性。因此，将干细胞疗法应用于川崎病引起的冠脉病变是合理可行的。此项目计划采用干酪乳杆菌细胞壁提取物（LCWE）诱导川崎病小鼠模型，给予脐带来源间充质干细胞治疗，观察并分析小鼠实验期间一般情况及冠状动脉病变情况，然后开展临床研究，最终评估干细胞疗法对于川崎病引起的冠脉病变的疗效。

正式版

三、合作方案、合作方式及知识产权归属

(1) 合作方案：

① 陕西省人民医院：

负责项目的总体设计、统筹安排、工作计划和实施。具体内容包括提供川崎病相关背景材料、川崎病动物模型构建技术、临床试验审批及实施、国内论外文撰写及专利申报等。

② 陕西九州生物医药科技集团有限公司：

利用现有的陕西省干细胞研究中心、细胞组织库等资源，按照GMP标准生产脐带来源间充质干细胞；通过提供的川崎病动物模型技术构建动物模型；完成脐带间充质干细胞对川崎病动物模型治疗实验；为开发间充质干细胞相关产品做临床前准备；国内论外文撰写及专利申报等。

③ 俄罗斯乌拉尔联邦大学：

利用儿科领域的研究优势，提供相关技术支持；多中心共同开展动物试验及临床试验；国内论外文撰写及专利申报等。

(2) 合作方式：

中俄双方同时开展实验，共同研究，开发出川崎病引起的冠脉病变的干细胞疗法。

(3) 知识产权归属：

本项目研究形成的论文及研究成果为三方共享，具体如下：

① 论文发表：共同通讯作者、共同第一作者均按实际研究工作贡献排序。

② 专利申请：本项目科研成果所形成的专利，由三方作为专利共同申请人共同申请，如专利申报成功，三方作为专利共同所有权人。

四、合作的预期目标、成果形态

(1) 预期目标：

本项目计划将干细胞疗法应用于儿科川崎病的临床治疗，并期待将项目成果产业化为川崎病的干细胞药品。所以，项目分步目标设定如下：

- ① 使用干酪乳杆菌细胞壁萃取物成功建立川崎病冠脉病变小鼠模型；
- ② 成功分离、培养、冻存符合质量标准的脐带来源间充质干细胞；
- ③ 动物实验中，验证脐带间充质干细胞修复动物模型病变冠脉存在积极作用；
- ④ 临床实验中，验证脐带间充质干细胞修复患者病变冠脉存在积极作用；
- ⑤ 试建立脐带间充质干细胞药品生产标准。

(2) 成果形态：

- ① 学术论文；
- ② 申请发明或实用新型专利；
- ③ 申报省级科技进步奖。

五、考核指标

本项目考核指标具体如下：

(1) 项目考核指标

① 团队考核

项目负责人负责本课题总体控制，包括课题进展情况、实验结果汇总情况、经费使用情况及论文发表情况等。项目成员负责相关文献的查阅，动物实验及临床实验的结果准确、可靠；数据整理汇总；论文撰写等。

② 动物实验考核

实验动物来源可靠；动物房规范化管理；动物实验操作规范化等。

③ 临床实验考核

筛选川崎病患者，签署本人及家属知情同意书，建立档案，各项指标入档。临床试验及复查时严谨记录，保证数据的真实可靠性。

④ 经费考核

建立财务支出报表，专款专用。

(2) 成果考核指标

① 开发出川崎病引起的冠脉病变的干细胞疗法；

② 发表学术论文1-2篇；

③ 申请发明或实用新型专利1-2项；

④ 申报省部级科技进步奖1项。

六、申报单位简况及项目人员情况（含外方人员）

申报单位简况 陕西省人民医院是陕西省人民政府举办的最大的综合性三级甲等医院，现建有儿童病院、骨科医院、神经脑科病院等13个专科医院，是陕西省临床医学研究院、国家药物临床试验机构、国家全科医生培训基地等所在单位。承担着全省及周边地区的医疗、教学、科研、预防、保健、急救等任务。主办有《中国卫生质量管理》杂志、《现代检验医学杂志》。 医院于1931年由爱国将领杨虎城将军创建，位于西安市友谊西路256号，现占地10.6万平方米，建筑面积31.5万平方米。现设74个临床医技科室，拥有国家级、省级重点学科13个，现有员工5000多人，在岗高级技术人员500多名，拥有国家和省级突出贡献专家等85人次，博士、硕士研究生800多人，拥有博士生导师、硕士生导师近80人。开设床位3000张，年门诊接诊量160万人次，年出院量12万人次，年手术量为5万余台次。医院现承担国家及省级重大科研项目556项，获得各级政府科技成果奖100余项。与美国、德国、法国、日本、俄罗斯等国家的医疗、教学机构建立了国际学术交流与合作关系。（文中数据截止2017年1月3日）					
项目负责人					
姓名	焦富勇	性别	男	出生年月	1951-01-03
学历	本科生	职务	儿童病院名誉院长	手机	15398082028
从事专业	儿科学			职称	主任医师

项目负责人简介 焦富勇，男，毕业于西安医学院医学系。现任陕西省人民医院儿童病院院长，主任医师，西安交大硕士研究生导师，世界卫生组织顾问，陕西省儿科学会副主任委员、陕西省译协医学委员会主任委员、国际小儿神经学杂志评委。曾在美国、英国、意大利等国家发表论文10余篇，出版专著5本。获国家专利两项，陕西省科技进步奖1项、陕西省医药科技进步奖1项。曾在日本东京女子医科大学、澳大利亚悉尼大学附属儿童医院等地研修学习。1998年赴日本，在国际著名川崎病专家川崎病发现者川崎富作先生指导下研究，由川崎富作先生亲自授予了川崎病诊治及研究培训证书，并共同合作中日川崎病研究项目。								
---	--	--	--	--	--	--	--	--

项目组主要参与人员								
姓名	出生年月	性别	从事专业	职称	学历	所在单位	项目分工	签名
戴博	1977-05-10	男	干细胞生物学	教授	博士研究生	陕西九州生物医药科技集团有限公司	干细胞质控	
李盼	1993-02-16	女	干细胞生物学	未取得	硕士研究生	陕西九州生物医药科技集团有限公司	动物实验	
Lvova Olga	1974-05-07	女	儿科学	教授	博士研究生	Ural Federal University	项目技术优化	
郭康合	1970-07-05	男	干细胞生物学	高级工程师	硕士研究生	陕西九州生物医药科技集团有限公司	细胞库管理	
王杰民	1962-04-29	男	儿科学	主任医师	硕士研究生	陕西省人民医院	临床实验管理	
蔺婧	1985-01-27	女	儿科学	讲师(高校)	博士研究生	西安交通大学	动物模型构建优化	

七、经费预算情况

1、经费预算

项目总投资（万元）		20.00	已完成投资（万元）			0.00
计划新增投资（万元）		20.00	申请专项经费（万元）			15.00
已完成投资来源（万元）						
合计	单位自筹	银行贷款	政府资助			其他来源
			国家	省级	市级	
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
计划新增投资来源（万元）						
合计	单位自筹	银行贷款	政府资助			其他来源
			国家	省级	市级	
20.00	5.00	0.00	0.00	15.00	0.00	0.00
计划新增投资支出情况（万元）						
支出科目		新增投资总额	专项经费		说明	
一、直接费用		19.00	15.00		\	
1、设备费		0.00	0.00		\	
（1）购置设备费		0	0			
（2）试制设备费		0	0			
（3）设备改造与租赁		0	0			
2、材料费		10.00	10.00		购买实验试剂、动物等	
3、测试化验加工费		3.00	3.00		数据分析、流式细胞术等	
4、燃料动力费		1.00	1.00		大型仪器设备能源消耗	
5、差旅费		1.00	0		参加国内外会议	
6、会议费		0.50	0		会议注册	
7、国际合作与交流费		0	0			
8、信息费（出版/文献/信息传播/知识产权事物费等）		1.00	0		论文版面费、专利申请费等	
9、专家咨询费		0.50	0		专业技术指导与支持	
10、劳务费		2.00	1.00		参与课题人员科研补助	
11、其他支出		0	0			
二、间接费用		1.00	0.00		\	
1、管理费		0.50	0		占总预算3%	
2、绩效支出		0.50	0		论文、专利等奖励	

合计	20.00	15.00	\
----	-------	-------	---

2、需增添的主要仪器设备（使用专项经费购买价值5万元以上的设备）

序号	设备名称	型号	价格 (万元)	增添理由
----	------	----	------------	------

正式版

八、项目进度计划（说明项目进度，包括实施方案、实施地点等内容）

序号	时间	计划完成内容
1	第1阶段 2018年01月01日 至 2018年12月31日	脐带间充质干细胞培养、鉴定（表面抗原鉴定、无菌检测、传染病检测、流式检测等）及冻存；制备LCWE，利用LCWE诱导川崎病小鼠模型。做好前期准备工作。
2	第2阶段 2019年01月01日 至 2019年12月31日	设计动物实验方案，开展动物实验。验证脐带间充质干细胞对川崎病小鼠模型病变冠脉的修复作用，为临床试验奠定理论基础。
3	第3阶段 2020年01月01日 至 2020年12月31日	设计临床试验方案，开展临床试验。选择冠脉病变不同程度的患者进行脐带来源的间充质干细胞治疗，定期复查并记录患者各项情况。最后，整理研究资料，申请结题，申报成果。

正式版

九、项目绩效目标

一级指标类别	二级指标类别	明细指标	预期绩效目标
产出类指标	知识产权	1、专利申请数（项）	2
		（1）申请发明专利	1
		（2）实用新型	1
		（3）外观设计	0
		2、专利授权数（项）	0
		（1）授权发明专利	0
		（2）实用新型	0
		（3）外观设计	0
		3、软件著作权授权数（项）	0
		4、发表论文（篇）	2
		（1）其中SCI索引收录数	1
		（2）其中EI索引收录数	0
		5、著作（部）	0
		6、制订标准数（项）	0
		（1）国际标准	0
		（2）国家标准	0
		（3）行业标准	0
		（4）地方标准	0
		（5）企业标准	0
	其他成果	1、填补技术空白数（项）	1
		（1）国际	1
		（2）国家	0
		（3）省级	0
		2、获奖项数	1
		（1）国家奖项	0
		（2）部、省奖项	1
		（3）地市级奖项	0
		3、其他科技成果产出	0
		（1）新工艺（或新方法模式）	0
		（2）新产品（含农业新品种）	0
		（3）新材料	0
		（4）新装备（装置）	0

		(5) 平台/基地/示范点	0
		(6) 中试线	0
		(7) 生产线	0
		4、研究开发情况	\
		(1) 小试	否
		(2) 中试（样品样机）	否
		(3) 小批量	否
		(4) 规模化生产	否
	人才引育	1、引进高层次人才	0
		(1) 博士、博士后	0
		(2) 硕士	0
		2、培养高层次人才	0
		(1) 博士、博士后	0
		(2) 硕士	0
	产业化情况	新增产能（台/套/只等）	0
		新增产能利用率%	0
效果类指标	经济效益	1、新增产值（万元）	0
		2、新增销售（万元）	0
		3、新增出口创汇（万美元）	0
		4、新增利润（万元）	0
	社会效益	1、新增税收（万元）	0
		2、新增就业人数	0
		其中：本科以上就业人数	0
		3、就业培训（人次）	0
		4、带动农民增收（万元）	0
		5、农户培训（人次）	0
		6、新增产业带动情况（列举情况）	无
		7、技术集成示范（项）	0
		8、建立农业示范基地（亩数）	0
		9、节约资源能源（列举）	无
		10、环保效益（限50字）	无
其他需要说明的情况	无		

十、协议签署情况

序号	协议名称	签订时间	合作对象	备注
1	川崎病冠脉病变的干细胞疗法	2017-07-31	陕西省九州生物医药科技集团	无

正式版

十一、需要提交的附件材料

序号	附件名称	是否必备材料
1	合作协议	是
2	其他获奖材料	否

正式版

十二、审核意见

申请单位意见：

单位负责人签字：(单位盖章)

年 月 日

推荐部门审查意见：

负责人签字：(单位盖章)

年 月 日

可行性研究报告

川崎病冠脉病变的干细胞疗法

焦富勇 戴博 李盼 Lvova Olga 郭康合 王杰民 蔺婧

一、项目概述

川崎病（Kawasaki disease, KD）又称皮肤黏膜淋巴结综合征，是一种发生于小儿的急性发热性疾病。主要以全身性中、小动脉炎为主要病理变化，冠状动脉病变是其严重并发症，以冠状动脉瘤（CAA）和冠状动脉狭窄为主[1]。根据陕西省川崎病流行病学调查研究[2]：1992年1月-1997年12月，5年间陕西省共报告川崎病患者376例，年平均约75例。陕西省的川崎病发病率为2.34/10万，与全国相比偏高，川崎病为我省儿童较常见疾病。其中，376例川崎病患者中患有心脏后遗症者70例，占报告患儿数的18.62%。严晓华等[3]对2011年1月至2015年1月于陕西省人民医院儿科住院并确诊为川崎病的170例患儿的临床情况进行分析，其中冠脉扩张38例（22.4%，38/170例），冠脉瘤6例（3.5%，6/170例），巨大冠脉瘤2例（1.1%，2/170例）。近年来，川崎病发病率逐年增加，患儿心血管病变率已超过20%。目前，该病已取代风湿热成为儿童后天性心脏病的最重要原因之一。同时，川崎病还存在死亡的风险，川崎病患者因冠状动脉瘤破裂致死时有报道。如今，川崎病研究已成为儿科重要课题之一。

目前，临床上公认的川崎病治疗方法是静脉注射免疫球蛋白或称丙种球蛋白（IVIG）和口服阿斯匹林。这种联合治疗方案的广泛应用使川崎病死亡率和冠状动脉并发症明显下降，但经研究发现，丙种球蛋白耐药病例逐年增多[4]。因此，人们把目光转向了干细胞疗法。

干细胞疗法是如今炙手可热的新疗法之一。在2016年出台的“十三五”《医药工业发展规划指南》中，“要重点发展基因治疗药物以及干细胞和免疫细胞等细胞治疗产品”、“将细胞产品生产技术进行产业化”等赫然在目，这充分表现出干细胞治疗未来广阔的前景。用脐带间充质干细胞治疗心肌梗塞、心衰等心脏疾病已是较为成熟的干细胞疗法，有大量临床前动物实验证实了间充质干细胞治疗心脏疾病的有效性，也大量临床试验报道了进行脐带间充质干细胞治疗的安全性和有效性。Ishida等[5]证实自体骨髓间充质干细胞经冠脉注入治疗急性心肌

梗死是安全可靠的，患者左室射血分数得到了明显改善。田洪榛等[6]进行了动物实验及临床试验，证实经冠状动脉移植脐带间充质干细胞至少在 18 个月内能改善缺血性心衰患者左室功能，减少左心室容量，阻止或延缓左室重构，24 个月时仍能提高患者活动耐量及生活质量，且安全有效。

结合以上背景，本项目计划开展以下工作：1. 采用干酪乳杆菌细胞壁提取物（*Lactobacillus casei* cell wall extract, LCWE）注入幼年小鼠腹腔，诱导川崎病小鼠模型[7]；2. 将脐带间充质干细胞（MSC）给予川崎病模型小鼠进行治疗，观察小鼠实验期间一般情况及冠状动脉病变情况，分析实验结果；3. 设计临床试验方案，选择冠脉病变不同程度的患者进行脐带来源间充质干细胞治疗，定期复查并记录患者情况；4. 最终评估干细胞疗法对于川崎病引起的冠脉病变的疗效，整理研究资料，申请结题，申报成果。

本项目创新性地将脐带间充质干细胞应用临床上川崎病冠脉病变的治疗，为全球首次使用，项目的成功实施可大大缩短我国与发达国家在川崎病治疗方面的差距。同时，项目成果对我国儿童后天性心脏病的治疗有十分重要的意义，可挽救因心脏冠脉瘤致死的患儿，降低川崎病死亡率。全球如今已批准了 3 个干细胞药物、10 项干细胞产品技术，中国目前暂时没有这类产品面市。若本项目相关成果转化为针对川崎病的干细胞药品，还可推向市场，填补我国干细胞药品方面的空白。

二、项目优势

陕西省川崎病的流行病学调查[2]显示，1992-1997 年间，陕西省 5 年共检出川崎病例 376 例，发病率 2.34/10 万人，死亡率 20%，心脏后遗症 70 例（18.62%）。陕西省人民医院于 2011 年至 2015 年间收治的 170 人次川崎病患者[3]中，冠脉扩张及冠脉瘤为 46 例（27.1%，46/170 例）。根据 2013 年中国台湾统计资料，每 10 万人中 5 岁以下人群年平均发病率为 67.3/10 万人。到 2030 年，中国台湾有川崎病史的人口比例将达到 1/700。陕西作为人口较密集地区，川崎病发生率或将存在类似上升风险。然而，川崎病对儿童的危害并不在于发烧、皮疹、淋巴结肿大等外在症状，其真正的危险在于对心脏等脏器的危害。川崎病并发心血管损害的类型包括冠状动脉瘤、冠状动脉扩张、冠状动脉狭窄或闭塞等。动脉瘤可

单发或多发，大多可于1—2年内消退；但局部管壁的纤维化可导致冠状动脉不能有效扩张，严重者可形成血栓、管腔狭窄闭塞乃至心肌梗死。川崎病患者因冠状动脉瘤破裂致死也时有报道[8]。如何挽救因川崎病引起的冠脉瘤致死的患儿，降低川崎病死亡率是当前棘手的问题。所以，川崎病的冠脉病变应当得到重视，其治疗方法的研究十分必要。

20世纪末以来，干细胞治疗成为研究热点，以干细胞技术为核心的再生医学成为了人们治愈疾病的新希望。干细胞是一类具有自我复制能力的多潜能细胞，在体内或体外特定的诱导条件下，可分化为骨、软骨、肌肉、神经、心肌、内皮等多种组织细胞。其中，来源于健康脐带组织的脐带间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)有诸多生物学特性和优势：无伦理学障碍；来源广泛；可获取细胞数量多、活力强、易扩增；低或无侵袭性；低或无免疫原性；无致瘤性等。由于这些特性，脐带间充质干细胞进入生物体后可发挥以下作用：间充质细胞分化为功能性细胞，代替衰退、损伤的功能性细胞；可启动再生相关基因的顺序表达，使组织器官的内源性衰退、损伤修复启动；分泌多种生长营养因子，改善组织器官内部微环境；间充质干细胞的免疫调节作用可抑制免疫排斥作用，减轻局部组织器官的炎性反应[9]。脐带间充质干细胞用于治疗心肌梗塞、心衰等心脏疾病是较为成熟的干细胞疗法，已有大量临床前动物实验证实了间充质干细胞治疗心脏疾病的有效性，也大量临床试验报道了进行脐带间充质干细胞治疗的安全性和有效性。川崎病发病原因目前仍不明朗，目前认为川崎病符合感染性疾病和自身免疫病两大特征，细菌超抗原致病是引起川崎病的重要原因[10]。现在临床上公认的川崎病治疗方法是静脉注射免疫球蛋白或称丙种球蛋白(IVIG)和口服阿司匹林，从而控制全身非特异性血管炎，防止冠状动脉损害的发生；对于丙种球蛋白不敏感的川崎病患者，多采用再次给药或英利西单抗疗法；对于已形成的冠状动脉瘤，以药物溶栓、抗凝治疗及冠脉搭桥为主。但是，临床治疗中仍存在一些问題，如：部分病人阿司匹林不耐受；有耐免疫球蛋白川崎病患者；糖皮质激素治疗副作用较大；溶栓剂及抗凝剂应用后不良反应未验证等[11-12]。因此，将脐带间充质干细胞应用于川崎病引起的冠脉病变治疗，理论上是合理可行的。

同时，2016年11月7日，国家工信部、国家发改委、科学技术部、商务部、国家食品药品监督管理总局六部门联合发布了《医药工业发展规划指南》。《医

药工业发展规划指南》是医药工业发展的指向标，此次指出“要重点发展基因治疗药物以及干细胞和免疫细胞等细胞治疗产品”、“将细胞产品生产技术进行产业化”等。这是“干细胞”、“免疫细胞治疗”首次正式列入“十三五”《医药工业发展规划指南》，显示出干细胞治疗未来发展的利好趋势以及我国紧跟国际步伐的决心。习近平总书记在十八大中也指出：儿童健康事关家庭幸福和民族未来。本项目深入贯彻习近平总书记关于儿童发展的批示精神，同时紧随“十三五”医药科技发展方向，创新性地将干细胞疗法应用于儿科疾病川崎病的治疗，并计划将项目成果产业化为川崎病的干细胞药品，是一项具有前瞻性、先进性的工作。

参考文献

- [1] L.M, M.T Cuesta Rubio, S. Guillen Martin, et al. *Kawasaki disease: Diagnosis and treatment*. Prieto Tato, Annales de Pediatrie. 2010
- [2] 焦富勇,杨丽芳,乔荆,李月华,张拓红,柳川洋,川崎富作. 陕西省川崎病流行病学调查研究[J]. 中华流行病学杂志,2000,(02):17-19.
- [3] 严晓华, 高娜, 周南. 170 例儿童川崎病临床分析[J]. 昆明医科大学学报, 2015, 36(10):121-124.
- [4] Taek Jin Lee, Ki Hwan Kim, Jin-Kyong Chun, et al. *Low-dose Methotrexate Therapy for Intravenous Immunoglobulin-resistant Kawasaki Disease*. Yonsei Medical Journal. 2008
- [5] Ishida M, Tomita S, Nakatani T, et al. *Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy*[J]. Journal of Heart & Lung Transplantation, 2004, 23(4):436-445.
- [6] 田洪榛. 脐带华通胶间充质干细胞治疗缺血性心力衰竭长期疗效及安全性随访观察[D].中国人民解放军医学院,2016
- [7] 覃丽君. LCWE 诱导小鼠冠状动脉炎的实验研究—川崎病动物模型的建立[D]. 华中科技大学, 2006.
- [8] Kayiran S M, Dindar A, Gurakan B. *An evaluation of children with Kawasaki disease in Istanbul: a retrospective follow-up study*. Clinics (Sao Paulo). 2010
- [9] *Safety of Mesenchymal Stem Cells for Clinical Application*[J] . Stem Cells International. 2012

- [10]焦富勇,严晓华,蔺婧. 川崎病治疗新进展[J]. 中国医药科学, 2012,2(20):9-11.
- [11]Kayiran S M, Dindar A, Gurakan B. *An evaluation of children with Kawasaki disease in Istanbul: a retrospective follow-up study*. Clinics (Sao Paulo). 2010
- [12]Durongpisitkul, J. Soongswang, D. Laohaprasitiporn, A. Nana, C. Prachuabmoh, C. Kangkagate. *Immunoglobulin Failure and Retreatment in Kawasaki Disease*[J]. K. Pediatric Cardiology. 2003 (2)

三、合作条件

1、合作关系

本项目为三方合作，其中，项目申报单位为陕西省人民医院，项目合作方分别为俄罗斯乌拉尔联邦大学与陕西省九州生物医药科技集团。

陕西省人民医院是陕西省人民政府举办的最大的综合性三级甲等医院，现建有儿童病院、骨科医院、神经脑科病院等13个专科医院，承担着全省及周边地区的医疗、教学、科研、预防、保健、急救等任务。陕西省人民医院已开展川崎病研究工作多年。上世纪九十年代，川崎病发现者川崎富作医生就与陕西省人民医院开展合作了中日川崎病研究项目，合作成果发表于美国、英国、印度等国多家期刊中；川崎富作医生还与陕西省人民医院共同建立了陕西省川崎病诊疗中心，这是陕西省卫计委批准的全省唯一川崎病诊疗中心，为陕西省川崎病研究起到了极大的推进作用。陕西省人民医院也与台湾川崎病诊疗中心多次合作，促进了两岸川崎病治疗的学术交流。同时，俄罗斯作为我国一衣带水的邻国、“一带一路”成员国之一，陕西省人民医院也在2012年与俄罗斯最权威医学科学机构——俄罗斯医学科学院签署了医学科学合作协议。俄方三位教授前来交流，共同开展对儿童医疗及健康、保护的联合研究，为中国与俄罗斯的医学交流奠定了很好的基础。

乌拉尔联邦大学位于俄罗斯叶卡捷琳堡，是俄罗斯九所联邦大学之一。2014年，陕西省人民医院儿科（儿童病院）与俄罗斯乌拉尔联邦大学医学儿科签署了双方合作关系，进行了学术交流和疑难疾病的诊断治疗探讨，并共同申请开展了“中俄跨文化早产儿神经发育纵向研究项目”，双方互派人员交流学习，有效促进了我省与俄罗斯的医学合作交流。2017年5月，“一带一路”高峰论坛在北京

召开，会议提出应传承和弘扬丝绸之路友好合作精神，成员国间加强科技合作，促进科技人员交流，合作开展重大科技攻关，共同提升科技创新能力。因此，乌拉尔联邦大学医学儿科与陕西省人民医院期待能够紧随“一带一路”的潮流再次合作，开展儿童川崎病治疗项目，促进中俄两国医学研究发展，为两国青少年的健康作出贡献。

项目另一合作方陕西省九州生物医药科技集团旗下拥有陕西省干细胞应用工程研究中心和陕西省细胞组织库，它们是根据陕西省发改委批准(陕发改高技[2010]716号)设立的干细胞专业研发和存储机构，是省卫计委批准的运营的省内唯一大型细胞组织库。中心建有6个符合GMP标准的专业实验室和细胞制备室，配置流式细胞仪、生化分析仪、液质联用仪等大型仪器设备46台/套，吴祖泽院士担任首席科学家，开展项目涉及间充质干细胞培养、制备、存储、鉴定等业务，存储可达100万人份。九州集团下辖的陕西省干细胞应用工程研究中心和陕西省细胞组织库将为本项目提供坚实的技术支撑和物质保障，与陕西省人民医院共同合作探索川崎病引起的冠脉病变的干细胞疗法，并期待将相关成果转化为针对川崎病的干细胞药品。

2. 技术基础

项目负责人焦富勇教授自1998年开始川崎病研究，临床经验丰富。1998年赴日本，在国际著名川崎病专家川崎病发现者川崎富作先生指导下研究，由川崎富作先生亲自授予了川崎病诊治及研究培训证书，并共同合作了中日川崎病研究项目。2000年发表陕西省川崎病流行病学调查研究，提出川崎病是我省儿童较常见的疾病，西安地区是高发病区，3岁以下发病率高，心脏后遗症多。随后又有发表丙种球蛋白在临床应用、川崎病疗法进展等相关文章。还结合自身临床经验及最新诊疗信息，著有《川崎病》一书，介绍川崎病的临床诊断治疗及相关理论知识等。

项目主要参与者戴博教授2003年至2015年分别在美国康涅狄格大学、斯克里普斯研究院和斯坦福大学医学院攻读博士及博士后，期间主要从事人胚胎干细胞、造血干细胞、诱导多能干细胞等研究，2016年就任陕西九州集团旗下陕西省干细胞应用工程研究中心主任，主要负责骨髓或脐带间充质干细胞冻存、扩增，

抗衰老、神经保护等研发工作。曾在Stem Cells, Nature Communications等国际顶级期刊上以第一作者发表研究论文多篇,为本课题开展相关研究奠定了坚实的实验基础并积累了丰富的实验经验。

项目俄罗斯方负责人Lvova Olga教授1998年毕业于俄罗斯乌拉尔联邦医科大学,现任乌拉尔联邦大学儿童神经学部主任,乌拉尔神经科学学会委员。曾在俄罗斯、英国等国家发表关于儿童神经疾病的研究论文120余篇,出版专著6本。Lvova Olga教授热衷于推进俄中的医学交流,常邀请中方开展学术研究,促进双方共同发展。

项目主要参与者郭康合现任陕西省细胞组织库主任,在人类干细胞科研生产领域工作已有二十年,有着丰富的干细胞转化、生产和治疗经验。也从事细菌细胞培养,微生物检验鉴定,脐带干细胞库质量控制、质量检测,脐带干细胞的制备、冷冻保存、复苏,仪器设备管理及生物治疗临床应用等工作。

代表性论文

- [1] Kuo H, Li S, **Jiao F**, et al. *Genome-Wide Association Study Identifies Novel Susceptibility Genes Associated with Coronary Artery Aneurysm Formation in Kawasaki Disease*[J]. Plos One, 2016, 11(5):e0154943.
- [2] **Jiao F**, Yan X, Wu X. *The Xi'an Experience of Kawasaki Disease – Lessons Learnt over 5 years*[J]. Indian Journal of Pediatrics, 2016, 83(10):1-2.
- [3] 焦富勇,杨丽芳,乔荆,李月华,张拓红,柳川洋,川崎富作. 陕西省川崎病流行病学调查研究[J]. 中华流行病学杂志,2000,(02):17-19.
- [4] 焦富勇. 川崎病[M]. 人民卫生出版社, 2014.
- [5] **Dai, B.**, and Rasmussen, T. P. (2007). *Global epiproteomic signatures distinguish embryonic stem cells from differentiated cells*. Stem Cells 25 (10): 2567-2574. (IF=7.924)
- [6] Jung, N.*, **Dai, B.***, Gentles A. J., Majeti R.[†], Feinberg A. P.[†] (2015). *An LSC epigenetic signature is largely mutation independent and implicates the HOXA*

cluster in AML pathogenesis. Nature Communications6:8489 (IF=12.124)(*并列第一作者)

- [7] 姜夕锋, 葛林阜, 郭康合,等. 非血缘关系双份脐血移植治疗血液系统疾病 19 例分析[J]. 中华血液学杂志, 2009, 30(2):127-128.
- [8] 林令博, 王寿江, 郭康合,等. MSCT 在正常人肝门静脉系统研究中的应用[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2006, 28(6):429-430.

四、研究内容

1. 主要目标

本项目计划将干细胞疗法应用于儿科川崎病的临床治疗, 并期待将项目成果产业化为川崎病的干细胞药品。所以, 项目分步目标设定如下:

- (1) 使用干酪乳杆菌细胞壁萃取物成功建立川崎病冠脉病变小鼠模型;
- (2) 成功分离、培养、冻存符合质量标准的脐带来源间充质干细胞;
- (3) 动物实验中, 验证脐带间充质干细胞修复动物模型病变冠脉存在积极作用;
- (4) 临床实验中, 验证脐带间充质干细胞修复患者病变冠脉存在积极作用;
- (5) 试建立脐带间充质干细胞药品生产标准。

2. 研究方案

(1) LCWE 诱导川崎病小鼠模型的建立

干酪乳杆菌细胞壁萃取物 (LCWE) 的制备一般选用干酪乳杆菌, 培养 1d 后在对数生长期离心收集细菌, 经裂解、消化、超声破碎及离心后, 用 PBS 配置成 1mg/mL 的终液; 取 120 只 BALB/C 品系雄性小鼠, 4-6 周大小, 重量 15-20g, 随机分为模型组、干细胞治疗组、空白组, 干细胞治疗组和模型组分别单次腹腔注射等量 LCWE (0.5mL 每只), 空白组不作处理, 10d 后可获得诱导川崎病小鼠模型[1]。

(2) 脐带来源间充质干细胞培养及鉴定

取正常足月剖宫产新生儿脐带共 20 根, 排除各种传染性疾病及家族遗传病, 并获得产妇及家属同意; 生理盐水洗去脐带残留血液, 剪成 2-3cm 的小段, 纵向剖开, 剔除一条脐静脉、两条脐动脉, 剥离华通氏胶; 用眼科剪将华通氏胶剪碎成 1mm² 小组织块; 配制含 10%FBS、100U\MI 双抗的 DMEM 混合培养基; 将组织块

与培养基混合，置入培养皿，在 5% CO₂、37℃ 的培养箱中静置培养，定期换液。待细胞长至 80%-90% 融合度时，用胰蛋白酶消化并进行传代，培养至 P3 代；分别取各代细胞进行无菌检测、传染病检测及流式细胞仪检测，合格的成熟脐带间充质干细胞应确保无传染病无菌，高度表达 CD29、CD44、CD90、CD105 等膜表面标记抗原，几乎不表达 CD14、CD34、CD45 等造血干细胞标志抗原；检测后，以 FBS 配制的 10% DMSO 溶液重悬其余成熟细胞，置入 -80℃ 冰箱，次日转入液氮罐中冷冻保存[2]。

(3) 川崎病小鼠模型注射脐带间充质干细胞疗效评价

将 LCWE 诱导的 80 只川崎病冠脉病变模型小鼠随机分为 3 个实验组及对照组，每组 20 只，根据小鼠体重分别腹腔注射脐带间充质干细胞或生理盐水治疗。实验组内分为低中高 3 个剂量组进行注射治疗（细胞数量分别为： 10^3 、 10^4 、 10^5 / 每计量组）。14d 后处死小鼠，测量其冠状动脉内径，观察其冠状动脉壁是否粗糙、有无增厚以及回音情况。记录并进行统计分析。

(4) 脐带间充质干细胞临床试验疗效评价

临床实验进行前，先将实验计划交与医院伦理委员会进行审批，审批通过后方可进行。临床试验期间，首先对在陕西省人民医院儿童病院就诊并确诊为川崎病的患者进行资料收集，按照冠脉病变情况对患者进行分级。根据冠脉病变情况及冠脉瘤情况可对冠脉病变程度进行临床分级：冠脉轻度病变（急性期冠状动脉有轻度扩张）、冠脉中度病变（单个小至中型冠状动脉瘤）、冠脉重度病变（ ≥ 1 个大的冠状动脉瘤；或一支冠状动脉内多个动脉瘤）、冠状动脉闭塞等[3]。从冠脉病变四级程度中各级选择约 5 名患者，静脉输注脐带间充质干细胞进行治疗（ 10^8 单位 / 人次）；分别于病程 1 个月、3 个月、6 个月、12 个月对患者进行跟踪复查，观察并记录各组恢复情况。临床记录资料包括：年龄、性别、临床表现、血生化指标、心电图、二维超声心动图、胸片等。记录后进行统计分析。

3. 项目创新点

脐带间充质干细胞用于治疗心肌梗塞、心衰等心脏疾病是较为成熟的干细胞疗法。已有大量临床前动物实验证实了间充质干细胞治疗心脏疾病的有效性，也大量临床试验报道了进行脐带间充质干细胞治疗的安全性和有效性。Ishida 等

[4]证实自体骨髓间充质干细胞经冠脉注入治疗急性心肌梗死是安全可靠的,患者左室射血分数得到了明显改善。田洪榛等[5]进行了动物实验及临床试验,证实经冠状动脉移植脐带间充质干细胞至少在18个月内能改善缺血性心衰患者左室功能,减少左心室容量,阻止或延缓左室重构,24个月时仍能提高患者活动耐量及生活质量,且安全有效。

脐带间充质干细胞进入生物体后可发挥以下作用:间充质细胞分化为功能性细胞,代替衰退、损伤的功能性细胞;分泌多种生长营养因子,改善组织器官内部微环境;间充质干细胞的免疫调节作用可抑制免疫排斥作用,减轻局部组织器官的炎性反应。因此,脐带间充质干细胞非常适用于免疫系统疾病及心血管系统等疾病[6]。并且,临床使用脐带间充质干细胞修复川崎病引起的冠脉病变未见报道,本项目为世界首次应用。综上,本项目创新点如下:(1)使用脐带间充质干细胞修复川崎病动物模型病变冠脉;(2)在临床试验中使用脐带间充质干细胞治疗川崎病的冠脉病变,评估其作用。

参考文献

- [1] 覃丽君. LCWE 诱导小鼠冠状动脉炎的实验研究—川崎病动物模型的建立[D]. 华中科技大学, 2006.
- [2] Deans R J, Moseley A B. *Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses*[J]. *Experimental Hematology*, 2000, 28(8):875-884.
- [3] 时艳艳, 刘芳, 吴琳,等. 川崎病冠状动脉病变严重程度临床分级及高危因素研究[J]. *中国实用儿科杂志*, 2014, 29(9):681-686.
- [4] Ishida M, Tomita S, Nakatani T, et al. *Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy*[J]. *Journal of Heart & Lung Transplantation*, 2004, 23(4):436-445.
- [5] 田洪榛. 脐带华通胶间充质干细胞治疗缺血性心力衰竭长期疗效及安全性随访观察[D]. 中国人民解放军医学院, 2016
- [6] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. *Mesenchymal stem cells in health and disease*. [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(9):726-36.

五、效益及市场风险分析

1、社会经济效益分析

陕西省川崎病的流行病学调查显示,1992-1997年间,陕西省5年共检出川崎病例376例,发病率2.34/10万人,死亡率20%,心脏后遗症70例(18.62%)。陕西省人民医院于2011年至2015年间收治的170人次川崎病患者中,冠脉扩张及冠脉瘤为46例(27.1%,46/170例)。根据2013年中国台湾统计资料,每10万人中5岁以下人群年平均发病率为67.3/10万人。到2030年,中国台湾有川崎病史的人口比例将达到1/700。陕西作为人口较密集地区,川崎病发生率或将存在类似上升风险。并且,川崎病对儿童真正的危险在于对心脏等脏器的危害。川崎病并发心血管损害的类型包括冠状动脉瘤、冠状动脉扩张、冠状动脉狭窄或闭塞等,严重者可形成血栓、管腔狭窄闭塞乃至心肌梗死,这是川崎病致死的主要原因。川崎病患儿因冠状动脉瘤破裂致死时有报道,如何挽救因川崎病引起的冠脉瘤致死的患儿,降低川崎病死亡率,是当前棘手的问题。因此,川崎病的冠脉病变治疗方法的研究十分必要。本项目有望寻找到新型方法——干细胞疗法治疗川崎病引起的冠脉病变。本项目的成功实施可缩短我国与发达国家在川崎病治疗方面的差距,对我国儿童后天性心脏病的治疗有十分重要的意义,在心血管疾病方面的研究也具有非常重要的经济和社会价值。

2、应用前景分析

20世纪末以来,以干细胞技术为核心的再生医学成为了人们治愈疾病的新希望。干细胞是一类具有自我复制能力的多潜能细胞,在体内或体外特定的诱导条件下,可分化为骨、软骨、肌肉、神经、心肌、内皮等多种组织细胞。其中,来源于健康脐带组织的脐带间充质干细胞有诸多生物学特性和优势:无伦理学障碍;来源广泛;可获取细胞数量多、活力强、易扩增;低或无侵袭性;低或无免疫原性;无致瘤性等。由于这些特性,脐带间充质干细胞进入生物体后可发挥以下作用:间充质细胞分化为功能性细胞,代替衰退、损伤的功能性细胞;可启动再生相关基因的顺序表达,使组织器官的内源性衰退、损伤修复启动;分泌多种生长营养因子,改善组织器官内部微环境;间充质干细胞的免疫调节作用可抑制免疫排斥作用,减轻局部组织器官的炎性反应。因此,脐带间充质干细胞非常适用于

免疫系统疾病及心血管系统等疾病。同时，干细胞、免疫细胞治疗也正式列入“十三五”《医药工业发展规划指南》，以干细胞技术为核心的再生医学成为了人们治愈疾病的新希望。因此，开展脐带来源的间充质干细胞治疗川崎病的研究具有重要临床价值，也具有很大产业化潜能。全球如今已批准了 3 个干细胞药物、10 项干细胞产品技术，中国目前暂时没有这类产品面市。若本项目相关成果转化为针对川崎病的干细胞药品，还可推向市场，填补我国干细胞药品方面的空白。

3、项目实施风险分析

干细胞疗法于 20 世纪末提出，临床治疗经验较普通治疗还较缺乏，远期预后资料较少，仍尚待研究。因此，不能排除干细胞治疗的风险性，如：体外培养干细胞可能造成细菌、病毒污染等，会影响干细胞的正常功能；间充质干细胞注射入体内后，其生长分化程度较难控制，治疗作用有局限性等。因此，本项目在进行时，研究人员应多参考前人治疗经验，严谨进行实验操作，确保治疗的安全性，从而真正实现干细胞治疗的价值。

六、合作双方简况

1、申请单位简况

陕西省人民医院是陕西省人民政府举办的最大的综合性三级甲等医院，是陕西省临床医学研究院、国家药物临床试验机构、国家全科医生培训基地等所在单位。承担着全省及周边地区的医疗、教学、科研、预防、保健、急救等任务。主办有《中国卫生质量管理》杂志、《现代检验医学杂志》。医院于 1931 年由爱国将领杨虎城将军创建，位于西安市友谊西路 256 号，现占地 10.6 万平方米，建筑面积 31.5 万平方米。现设 74 个临床医技科室，拥有国家级、省级重点学科 13 个，现有员工 5000 多人，在岗高级技术人员 500 多名，拥有国家和省级突出贡献专家等 85 人次，博士、硕士研究生 800 多人，拥有博士生导师、硕士生导师近 80 人。开设床位 3000 张，年门诊接诊量 160 万人次，年出院量 12 万人次，年手术量为 5 万余台次。医院现承担国家及省级重大科研项目 556 项，获得各级政府科技成果奖 100 余项。与美国、德国、法国、日本、俄罗斯等国家的医疗、教学机构建立了国际学术交流与合作关系。（文中数据截止 2017 年 1 月 3 日）

2、合作单位简况

陕西九州生物医药科技集团公司是一个拥有多平台中心和全产业链的干细胞高科技公司。现有资源实体和技术平台分为以下五部分：(1)陕西九州干细胞科技产业园：为陕西省“十一五”重点建设项目，是陕西省发改委批复建设(陕发改产业【2011】166号)的目前国内唯一一个以干细胞技术研究和产业开发为主要功能的专业化园区。(2)陕西省干细胞应用工程研究中心：是陕西省发改委批准设立的省级细胞工程技术研究开发机构(陕发改高技【2010】716号)。主要从事干细胞深低温存储技术研究和临床干细胞应用技术开发研究，同时为园区细胞库和基因库提供所需技术支撑。(3)陕西省细胞组织库：是公司根据陕西省发改委(陕发改高技【2010】716号)批复建设，陕西省卫计委批准运营的省内唯一大型细胞组织库，主要开展脐带、胎盘等生物样本存储和间充质干细胞、成人免疫细胞、脂肪干细胞、骨髓干细胞存储、配型、制备业务。(4)陕西省院士专家工作站。(5)博士后科研工作分站。

3、外方单位简况

乌拉尔联邦大学是 2011 年初经俄罗斯教育部批准，乌拉尔国立大学与乌拉尔国立技术大学合并，组建成为乌拉尔联邦大学，成为俄罗斯九所联邦大学之一。乌拉尔联邦大学是一所国立大学，其预算的一部分来自国家投资，另一部分则通过提供有偿教育和科研服务获得资金。2013 年学校加入进入国家建设 15 所世界排名前列大学项目之列，获得国家项目财政支持。乌拉尔联邦大学主要从事自然科学、工程科学、社会科学、人文科学和经济科学领域的研究。经过近几年的发展，学校已经发展成为拥有近百个教研室、多个培养方向、上百个培养专业的一个综合性的高等教育学院。该大学由 18 个学院组成，这些学院设立了 120 多个本科专业和 80 多个研究生专业。乌拉尔联邦大学的在校生总数已经超过 57000 人，外国留学生 1000 多人。在校任职老师超过 5600 人，其中有 650 名教授，2100 名博士，30 多名国家科学院院士。

4、项目主要负责人简介

焦富勇，男，毕业于西安医学院医学系。现任陕西省人民医院儿童病院院长，主任医师，西安交大硕士研究生导师，世界卫生组织顾问，陕西省儿科学会副主任委员、陕西省译协医学委员会主任委员、国际小儿神经学杂志评委。1992 年始享受国务院特殊津贴。1996 年评为陕西省有突出贡献专家。1997 年入选陕西省“三·五”人才。

曾在美国、英国、意大利等12个国家发表论文10余篇，在英国热带儿科杂志、中华儿科杂志、中华血液病杂志、中华流行病学杂志等刊物发表有关川崎病等儿科疾病的研究论文20多篇。出版专著5本。获国家专利两项，陕西省科技进步奖1项、陕西省医药科技进步奖1项。曾在日本东京女子医科大学、澳大利亚悉尼大学附属儿童医院等地研修学习。1998年赴日本，在国际著名川崎病专家川崎病发现者川崎富作先生指导下研究，由川崎富作先生亲自授予了川崎病诊治及研究培训证书，并共同合作中日川崎病研究项目。

5、项目外方主要负责人简介

Lvova Olga，女，1998年毕业于俄罗斯乌拉尔联邦医科大学。现任乌拉尔联邦大学儿童神经学部主任，副教授，乌拉尔神经科学学会委员。曾在俄罗斯、英国等国家发表关于儿童神经疾病的研究论文120余篇，出版专著6本。

6、项目组组成简况

项目组主要参与人员						
姓名	出生年月	性别	从事专业	职称	学历	所在单位
焦富勇	1951-01-03	男	儿科学	主任医师	学士	陕西省人民医院
戴博	1977-05-10	男	干细胞生物学	教授	博士	陕西九州生物医药科技集团有限公司
李盼	1993-02-16	女	细胞生物学	未取得	硕士	陕西九州生物医药科技集团有限公司
Lvova Olga	1974-05-07	女	儿科学	教授	博士	The Ural State Medical University
郭康合	1970-07-12	男	干细胞生物学	高级工程师	硕士	陕西九州生物医药科技集团有限公司
王立民	1962-04-29	男	儿科学	主任医师	硕士	陕西省人民医院
蔺婧	1985-01-27	女	儿科学	讲师	博士	西安交通大学医学部

七、知识产权归属情况

本项目研究形成的论文及研究成果为三方共享，具体如下：

1. 论文发表：共同通讯作者，按实际研究工作贡献协商排序；共同第一作者，按实际研究工作贡献排序。
2. 专利申请：本项目科研成果所形成的专利，由三方作为专利共同申请人共同申请，如专利申报成功，三方作为专利共同所有权人。

八、计划实施进度、经费预算及经费来源

1、年度计划

2018.01-2018.12	脐带间充质干细胞培养、鉴定（表面抗原鉴定、无菌检测、传染病检测、流式检测等）及冻存；制备LCWE，利用LCWE诱导川崎病小鼠模型。做好前期准备工作。
2019.01-2019.12	设计动物实验方案，开展动物实验。验证脐带间充质干细胞对川崎病小鼠模型病变冠脉的修复作用，为临床试验奠定理论基础。
2020.01-2020.12	设计临床试验方案，开展临床试验。选择冠脉病变不同程度的患者进行脐带来源的间充质干细胞治疗，定期复查并记录患者各项情况。最后，整理研究资料，申请结题，申报成果。

2. 成果考核指标

- (1) 开发出川崎病引起的冠脉病变的干细胞疗法；
- (2) 发表学术论文 1-2 篇；
- (3) 申请发明或实用新型专利 1-2 项；
- (4) 申报省部级科技进步奖1项。

3、经费预算

项目总投资预算**16万元**，具体预算如下：

(1) 设备费 (0.00万元)

(2) 材料费 (10.00万元)

脐带 MSCs 采集、培养试剂:3000 元/份×20 份, 合计 6.00 万元

(生理盐水、DMEM 培养基、胎牛血清、10cm/15cm 培养皿、胰蛋白酶等)

脐带 MSCs 鉴定试剂: 1000 元 / 份×20 份, 合计 2.00 万元

(琼脂、CD90 及 CD105 等抗体, 抗乙肝、梅毒、艾滋表面抗原试剂等

脐带 MSCs 液氮罐存储费用: 500 元 / 份×20 份, 合计 1.00 万元

实验动物: BALB/C 小鼠 25 元/只×100 只, 合计 0.25 万元

实验耗材如枪头、吸管、试管、玻片、滤纸、酒精等合计 0.30 万元

办公耗材如打印纸、硬盘、笔、文件袋等合计 0.05 万元

(3) 测试化验加工费(3.00万元)

无菌检测: 50元×60次, 合计0.30万元

传染病检测: 100元×60次, 合计0.60万元

流式细胞术检测:200元×60次, 合计1.20万元

统计分析及数据处理:2000元×3次, 合计0.6万元

(4) 燃料动力费(1.00万元)

实验设备(如超高速离心机、低温冷冻仪等)能源消耗, 3年合计1.00万元

(5) 差旅/会议/国际合作与交流费(1.50万元)

国内外会议差旅:5000元/人次×2人次, 合计1.00万元

国内外会议注册:2000元/人次×2人次, 合计 0.40 万元

(6) 文献/信息传播/知识产权事务费(1.00 万元)

论文版面费:1000元×2篇, 合计0.20万元

文献检索费:3000元, 合计0.30万元

专利申请及其他知识产权事务费:5000元, 合计0.50万元

(7) 劳务费(2.00万元)

科研补助:约700元×1人×10月×3年, 合计约2.00万元

(8) 专家咨询费(0.50万元)

高级专业技术职称人员:1000元×1人×3天, 合计0.30万元

其他专业技术职称人员:500元×2人×2天, 合计0.20万元

(9) 绩效支出(0.50万元)

论文发表：2500元/项×2项，合计0.50万元

(10) 项目管理费(0.5万元)

不超过总经费的5%。

4、经费来源

合计申请项目经费15万元，项目配套经费暂未确定。

九、其它说明 无。

十、有关附件

1. 项目相关技术领域专利检索、查新报告

附件1——科技查新报告

2. 技术合作协议

附件2——陕西省人民医院和乌拉尔联邦大学合作协议、陕西省人民医院和陕西九州生物医药集团公司合作协议

3. 产业化项目所需相关产品生产的许可证明文件

附件3——陕西九州生物医药集团公司旗下陕西省干细胞应用工程研究中心和细胞组织库

4. 相关科研成果、专利等知识产权证明材料

附件4——3篇代表性论文首页

报告编号: 201736000Z08X400

科技查新报告

项目名称: 川崎病冠脉病变的干细胞疗法

委 托 人: 陕西省人民医院 焦富勇

委托日期: 2017年7月25日

查新机构: 教育部科技查新工作站(Z08)

(科技查新专用章)

完成日期: 2017年7月28日

查新项目 名称	中文：川崎病冠脉病变的干细胞疗法			
	英文：Stem cell therapy for coronary artery lesion caused by Kawasaki Disease			
查新机构	名称	教育部科技查新工作站(Z08)		
	通信地址	陕西省西安市咸宁西路 28 号	邮政编码	710049
	负责人	贾申利	电话	029-82667953
	联系人	张小曼	电话	029-82655067
	电子邮箱	zhangxm@mail.lib.xjtu.edu.cn		
一、查新目的 申报陕西省科技厅 2018 年度陕西省重点研发计划国际科技合作计划项目				
二、项目的科学技术要点 该项目计划采用干酪乳杆菌细胞壁提取物（LCWE）诱导川崎病小鼠模型，给予脐血来源间充质干细胞治疗，观察小鼠实验期间一般情况及冠状动脉病变情况，分析实验结果从而确定下一步的临床研究，最终评估干细胞疗法对于川崎病引起的冠脉病变的疗效。 川崎病，又称皮肤黏膜淋巴结综合征，多发于 5 岁以下儿童，其并发症冠脉病变已成为儿童后天性心脏疾病病因之一。根据 2013 年中国台湾统计资料，每 10 万人中 5 岁以下人群年平均发病率为 67.3/10 万人。到 2030 年，中国台湾有川崎病史的人口比例将达到 1/700。因此，川崎病冠脉病变的干细胞疗法项目对我国儿童后天性心脏病的治疗有十分重要的意义，可缩短我国与发达国家在川崎病治疗方面的差距，在心血管疾病方面的研究也具有非常重要的经济和社会价值，是一项十分必要的项目和工作。				
三、查新点 1. 将干细胞疗法应用于川崎病的治疗。 2. 诱导川崎病动物模型，使用间充质干细胞对其治疗，评估间充质干细胞修复动物模型病变冠脉的作用。 3. 在临床试验中对川崎病患者使用间充质干细胞治疗，评估间充质干细胞修复患者病变冠脉的作用。				

四、查新范围要求

要求查新机构对查新项目综合进行国内外文献对比分析,证明有无相同或类似的文献报道。

五、文献检索范围及检索策略

中文数据库检索范围

- | | |
|--|-------------------|
| 1. 中国学术期刊网络出版总库 | 1915 年—2017 年 7 月 |
| 2. 中国博士学位论文全文数据库 | 1984 年—2017 年 7 月 |
| 3. 中国优秀硕士学位论文全文数据库 | 1984 年—2017 年 7 月 |
| 4. 中国重要会议论文全文数据库 | 1953 年—2017 年 7 月 |
| 5. 中国专利全文数据库 | 1985 年—2017 年 7 月 |
| 6. 国家科技成果数据库 | 1978 年—2017 年 7 月 |
| 7. 重庆维普中文科技期刊数据库 | 1989 年—2017 年 7 月 |
| 8. 万方期刊论文数据库 | 1998 年—2017 年 7 月 |
| 9. 万方学位论文数据库 | 1980 年—2017 年 7 月 |
| 10. 万方会议论文数据库 | 1985 年—2017 年 7 月 |
| 11. 万方成果资源数据库 | 1978 年—2017 年 7 月 |
| 12. 万方专利技术数据库 | 1990 年—2017 年 7 月 |
| 13. 中国知识产权局中国专利数据库 | 1985 年—2017 年 7 月 |
| 14. 中国生物医学文献数据库 (CBM) | 1978 年—2017 年 7 月 |
| 15. 百度学术 (http://xueshu.baidu.com/) | 网络检索 |

外文数据库检索范围

- | | |
|---|----------------|
| 1. Ei Compendex® | 1969-2017/July |
| 2. SCI | 1900-2017/July |
| 3. ISTP | 1996-2017/July |
| 4. INSPEC | 1898-2017/July |
| 5. Derwent Innovations Index | 1963-2017/July |
| 6. PQDT-- ProQuest Dissertations and Theses | 1980-2017/July |

7.	NTIS (National Technical Information Service)	1964-2017/July
8.	Technology Research Database	1963-2017/July
9.	Engineering Research Database	1966-2017/July
10.	Abstracts in New Technology & Engineering	1981-2017/July
11.	Engineered Materials Abstracts	1986-2017/July
12.	Materials Research Database	1965-2017/July
13.	scopus	1960-2017/July
14.	European Patents Fulltext	1978-2017/July
15.	JAPIO (Japan Patent Information Organization)	1976-2017/July
16.	U.S. Patents Fulltext	1976-2017/July
17.	PubMed	1950-2017/July
18.	Web of Science	1950-2017/July

检索词

中文：川崎病、皮肤黏膜淋巴结综合征、冠脉病变、干细胞疗法、间充质干细胞

英文：Kawasaki disease (KD)、Mucocutaneous lymphnode syndrome (MCLS)、
Coronary artery lesion、Stem cell therapy、Mesenchymal stem cells (MSCs)

检索式

中文：

1. (川崎病 OR 皮肤黏膜淋巴结综合征) AND (干细胞疗法 OR 间充质干细胞)
2. (川崎病 OR 皮肤黏膜淋巴结综合征) AND 冠脉病变 AND (干细胞疗法 OR

间充质干细胞)

外文：

1. (Kawasaki disease OR Mucocutaneous lymphnode syndrome) AND (Stem cell therapy OR Mesenchymal stem cells)
2. (Kawasaki disease OR Mucocutaneous lymphnode syndrome) AND Coronary artery lesion AND (Stem cell therapy OR Mesenchymal stem cells)

六、检索结果

依据上述文献检索范围和检索式，共检索到密切相关文献 6 篇：

密切相关文献的题录和主要内容如下：

1. 王化锋.内皮祖细胞 Notch4 信号通路在川崎病模型冠脉损伤及修复中作用的研究[D].导师：龚方威.浙江大学,2015

[相关内容] 本研究通过干酪乳杆菌细胞壁萃取物(LCWE)免疫刺激构建小鼠川崎病冠状动脉病变模型，在其不同病程阶段探究骨髓 EPCs 含量、Notch4 的表达和 EPCs 功能的改变及 Notch4-RBP-J κ 信号通路在川崎病冠脉损伤及修复中的作用。

2. 陈植,刘俊峰,杜忠东等.粒细胞集落刺激因子对川崎病小鼠模型内皮祖细胞及其冠状动脉损伤的影响[J].中华儿科杂志,2012,50(10):788-792.

[相关内容]制备酪乳杆菌细胞壁提取物(LCWE)诱导的小鼠的川崎病模型,研究评价粒细胞集落刺激因子(G-CSF)治疗对川崎病小鼠模型内皮祖细胞(EPC)数量和功能以及冠状动脉损伤的影响。

3. 李雅娇.脐血间充质干细胞治疗急性心肌梗死的研究[D].导师：张明.辽宁中医药大学,2013.

[相关内容] 研究经冠状动脉内注射人脐血间充质干细胞(MSCs)治疗急性心肌梗死(AMI)的疗效。

4. Endothelial progenitor cell transplantation ameliorates elastin breakdown in a Kawasaki disease mouse model.

Chen Z, DU ZD, Liu JF, Lu DX, Li L, Guan YQ, Wan SG.

Chin Med J (Engl). 2012 Jul;125(13):2295-301.

[相关内容] 建立干酪乳杆菌细胞壁提取物(LCWE)诱导的川崎病小鼠模型。模型小鼠静脉注射骨髓来源的体外扩增的 EPCs。在第 56 天检查组织学评估，循环 EPCs 数目和骨髓 EPCs 的功能。本研究的目的是评估 EPCs 移植在 KD 模型中的治疗效果，研究川崎病(KD)的冠状动脉损伤与内皮祖细胞(EPCs)的功能障碍密切相关。

5. 标题：miR-483 Targeting of CTGF Suppresses Endothelial-to-Mesenchymal Transition Therapeutic Implications in Kawasaki Disease

作者：He, M (He, Ming); Chen, Z (Chen, Zhen); Martin, M (Martin, Marcy); Zhang, J (Zhang, Jin); Sangwung, P (Sangwung, Panjamaporn); Woo, B (Woo, Brian);

Tremoulet, AH (Tremoulet, Adriana H.); Shimizu, C (Shimizu, Chisato); Jain, MK (Jain, Mukesh K.); Burns, JC (Burns, Jane C.); Shyy, JYJ (Shyy, John Y. -J.)

来源出版物: CIRCULATION RESEARCH 卷: 120 期: 2 页: 354-+ 2017

[相关内容] 本研究观察了结缔组织生长因子 (CTGF) 的 miRNA 调控和内皮间质转化 (EndoMT) 在川崎病 (KD) 发病机制中的调控作用。同是, 研究了他汀类药物调节治疗方法。探讨 miR-483 靶向 CTGF 抑制内皮细胞间质转化治疗川崎病的治疗意义。

6. 标题: Transcriptional Analysis of Intravenous Immunoglobulin Resistance in Kawasaki Disease Using an Induced Pluripotent Stem Cell Disease Model

作者: Ikeda, K (Ikeda, Kazuyuki); Mizoro, Y (Mizoro, Yasutaka); Ameku, T (Ameku, Tomonaga); Nomiya, Y (Nomiya, Yui); Mae, SI (Mae, Shin-Ichi); Matsui, S (Matsui, Satoshi); Kuchitsu, Y (Kuchitsu, Yuki); Suzuki, C (Suzuki, Chinatsu); Hamaoka-Okamoto, A (Hamaoka-Okamoto, Akiko); Yahata, T (Yahata, Tomoyo); Sone, M (Sone, Masakatsu); Okita, K (Okita, Keisuke); Watanabe, A (Watanabe, Akira); Osafune, K (Osafune, Kenji); Hamaoka, K (Hamaoka, Kenji)

来源出版物: CIRCULATION JOURNAL 卷: 81 期: 1 页: 110-+ 出版年: JAN 2017

[相关内容] 通过应用诱导性多能干细胞病模型对川崎病静脉免疫球蛋白耐药的转录分析, 探讨使用诱导多能干细胞 (iPSC) 疾病模型, 阐明了川崎病 (KD) 中静脉注射免疫球蛋白 (IVIG) 抗药性的机制。

七、查新结论

综合分析检索的国内外相关文献，并与委托项目的查新点进行对比分析，得出以下结论：

关于《川崎病冠脉病变的干细胞疗法》：

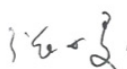
国内可见内皮祖细胞 Notch4 信号通路、粒细胞集落刺激因子对川崎病小鼠模型内皮祖细胞及其冠状动脉损伤作用的研究报道^[1-2]、可见脐血间充质干细胞治疗急性心肌梗死的研究报道^[3]。

国外可见内皮祖细胞移植改善川崎病小鼠模型的疗效评价^[4]以及 miR-483 靶向结缔组织生长因子抑制内皮细胞间质转化治疗川崎病的评价研究^[5]、可见使用诱导多能干细胞疾病模型研究川崎病中静脉注射免疫球蛋白抗药性机制的研究报道^[6]。

与本项目相比，国内外仅见内皮祖细胞、粒细胞集落刺激因子以及结缔组织生长因子等改善川崎病小鼠模型的疗效评价研究报道，国内外未见“川崎病冠脉病变的干细胞疗法”的文献报道；未见临床中用干细胞治疗川崎病引起的冠脉损害文献报道。

从综合分析比较可以看出：

国内外尚未见与本项目创新点治疗方法相同的研究文献报道。

查新员:张小曼 (签字): 

查新员职称: 副研究馆员

审核员:翟中会 (签字): 

审核员职称: 副研究馆员

(科技查新专用章)

2017 年 7 月 28 日



八、查新员、审核员声明

1. 查新报告中所陈述的内容均以客观文献为依据；
2. 我们按照科技查新规范进行查新、文献分析和审核，并做出上述查新结论；
3. 我们获取的报酬与本报告中的分析、意见和结论无关，也与本报告使用无关；
4. 本报告仅用于申报陕西省科技厅 2018 年度陕西省重点研发计划国际科技合作计划项目。

查新员（签字）：张永强

2017 年 7 月 28 日

审核员（签字）：[Signature]

2017 年 7 月 28 日

九、附件清单

附 6 篇密切相关文献文摘。

十、备注

1. 西安交通大学科技查新工作站是教育部认定的科技查新单位；
2. 本查新报告无“科技查新专用章”无效；
3. 本查新报告无查新员和审核员签名无效；
4. 本查新报告涂改、复印无效；
5. 本查新报告的检索结果及查新结论仅供参考；
6. 查新报告有效期六个月。

科研项目合作协议书

甲方（负责单位）：陕西省人民医院

乙方（合作单位）：陕西九州生物医药科技集团有限公司

本协议双方就共同参与《2018 年度陕西省重点研发计划国际科技合作与交流项目——川崎病冠脉病变的干细胞疗法》事项，经平等协商，在真实、充分表达各自意愿的基础上，根据有关法律、法规和本项目下达部门的相关规定，达成如下协议，并由合作双方共同恪守。

一、合作内容及分工

甲方：负责项目的总体设计、统筹安排、工作计划和实施，具体内容包括提供川崎病相关背景材料；川崎病动物模型构建技术；临床实验医疗资源。

乙方：利用现有的细胞组织库资源、生物科技公司及博士后流动站优势，按照 GMP 标准生产脐血来源间充质干细胞；通过负责方提供的川崎病动物模型技术构建动物模型并完成间充质干细胞对川崎病导致的冠脉病变的治疗潜能验证；为开发间充质干细胞相关产品做临床前准备；国内论外文撰写及专利申报。

甲方委派焦富勇为本项目负责人，乙方委派戴博为本项目负责人。

二、成果分配

本项目研究形成的论文及研究成果双方共享，甲方为主持单位，乙方为协作单位。具体如下：

1) 论文发表

- ① 焦富勇、戴博（共同通讯作者，按实际研究工作贡献协商排序）；
- ② 共同第一作者按实际研究工作贡献排序。

2) 专利申请

本项目科研成果所形成的专利，由甲乙双方作为专利共同申请人共同申请，如专利申报成功，甲乙双方作为专利共同所有权人。

3) 成果转化及转让

本项目形成的治疗川崎病的干细胞产品成果转化(包括但不限于专利、专有技术等)向第三方转让的,收益按照甲方 51%、乙方 49%进行分配。

三、协议的生效变更与解除

1) 本协议生效期间为项目获得之日起至项目结题申请通过之日;本项目如未获得批准,本协议将自动终止;

2) 协议双方中任何一方欲变更,解除本协议,必须采取书面形式,并由双方的授权代表签字,口头无效;解除协议需提前一个月向对方提出;

3) 甲乙双方中任何一方未履行本协议条款,导致协议不能履行或不能完全履行,对方有权变更,解除协议,并承担相应违约责任;

4) 在没有事先获取甲方书面同意的情况下,乙方不得转让,抵押,收费或以其他方式让渡本协议中的任何权利和义务;

5) 执行合同中如遇不可抗拒的因素,如战争,自然灾害,地震等导致协议不能顺利履行时,双方各自承担自己的损失,均不承担违约责任,双方应尽快通知对方以将损失控制在最小范围并共同协商变更或者解除本协议;

6) 本协议与国家法律相抵触时,应依照国家法律法规,变更本协议;

7) 本协议的备忘录或者附件与本协议拥有同等的法律效力,同时取代之前的所有口头或书面协定,以及与该协定主要事项相关的担保;

8) 本合同未尽事宜,双方应本着互惠互利,友好协商的原则另行约定,并以备忘录或附件的形式体现。

四、违约及争议解决

如在履行本合同的过程中发生任何争议,由双方协商解决,如协商不能解决,则提交西安市或陕西省仲裁委员会仲裁,必要时诉诸法律。

五、其他

1) 甲方需向乙方提供一份包含从项目主持单位获得的与该项目相关的所有信息和材料副本;



2) 本协议一式 2 份, 甲乙双方各持 1 份, 具有同等效力;

3) 未经对方许可, 甲乙双方都不得将本协议内容透露给第三者。

甲方(签章): 陕西省人民医院
科研处

项目负责人(签字): 贾晓飞 07/31/17

法定代表人/

委托代理人(签字): _____

联系电话: 15398082028

传 真: 029 -85236987

E-mail: jiaofy@yeah.net

通讯地址: 西安市友谊西路 256 号

乙方(签章): 陕西九州生物医药科技
集团有限公司

项目负责人(签字): 戴博 07/31/17

法定代表人/

委托代理人(签字): _____

联系电话: 18292169261

传 真: 029-88318303

E-mail: daibo@sxstemcell.com

通讯地址: 西安高新区科技六路 196 号



**Ural Federal
University**

named after the first President
of Russia B.N.Yeltsin

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Professional Education
«Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin» (UrFU)

19 Mira St., 620002, Ekaterinburg, Russia

TIN 6660003190

fax: +7 (343) 375-97-78, phone: +7 (343) 374-38-84

e-mail: rector@urfu.ru, urfu.ru

Contact center: +7 (343) 375-44-44

中华人民共和国科学技术部

Reference № 04-06/123

Date 18.02.2018

尊敬的中国科技部的领导您好!

首先衷心祝愿全部中国人民春节快乐身体健康!

我们是俄罗斯叶卡捷琳堡市乌拉尔联邦大学,我们十分高兴地给你们汇报有关我们乌拉尔联邦大学与中国陕西省人民医院(西安交通大学第三附属医院)去年12月双方共同申请的“Longitudinal research of neurocognitive development in preterm children: cross cultural differences”/“中俄跨文化早产儿神经发育纵向研究项目”。

我们还准备3-5年以后下一步申请共同研究“地震后儿童与青少年心理问题治疗与干预项目”。

我们双方十分高兴能够申请此项目为两个国家的儿童与青少年造福!

乌拉尔联邦大学医学儿科教授与陕西省人民医院的儿科教授于2014-2015进行了学术交流和疑难疾病的诊断治疗的探讨,签署了双方合作项目。这对于以后的合作奠定了基础!

我们衷心感谢中国科技部对此项目的重视和支持!

希望此项目为两国儿童的健康做出贡献!

维克托尔·科克沙夫

乌拉尔联邦大学校长



附件3——陕西九州生物医药集团公司旗下陕西省干细胞应用工程研究中心和细胞
组织库生产许可证明

正式版

陕西省发展和改革委员会文件

陕发改高技〔2010〕716号

关于组建陕西省干细胞应用 工程研究中心的批复

陕西九州生物科技股份有限公司：

你单位报来关于组建陕西省干细胞应用工程研究中心文件收悉。我委于2010年6月2日组织由第四军医大学孙秉中教授为组长的专家组，对陕西省干细胞应用工程研究中心项目进行了评审。

专家组一致认为，该工程研究中心组建目标明确，方案科学可行，申报资料齐全，符合组建要求。经研究，同意依托陕西九州生物科技股份有限公司组建陕西省干细胞应用工程研究中心。现批复如下：

- 1 -

一、同意“陕西省干细胞应用工程研究中心”以你单位为主体组建，建设地点为陕西九州生物医药科技园内（西安高新区科技六路196号）。

二、建设目标和任务：主要开展脐带血造血干细胞体外诱导、扩增和技术产品开发，深低温保存技术研究和推广，定向脐血移植术的研究与推广，细胞治疗技术与推广，为我省脐血库细胞采集、检测、制备、深低温冷冻提供一流技术服务，成为西北最大的细胞治疗和干细胞移植技术中心。

三、建设内容：主要建设脐血干细胞技术研究室，深低温脐带血造血干细胞/间充质干细胞保存研究室，HLA组织配型研究室，干细胞移植研究室，干细胞抗体研究室，工艺流程设计研究室，细胞治疗GLP实验室，陕西省脐带血造血干细胞库等，建筑面积3600平方米；新增大型仪器设备，完善部分基础设施，装饰5个万级洁净实验室。建设期两年。

四、该工程研究中心在组建过程中，要围绕为行业技术进步服务，加快科技成果转化的宗旨，提出切实可行的运行机制和管理模式以及量化的考核目标，以促使中心更好地为我省经济建设和社会进步服务。

五、请你单位抓紧工程研究中心的组建工作，进一步落实建设方案、环保、土地使用、城市规划、投资等建设条件。在建设

过程中切实加强项目的组织、实施和管理，确保项目建设质量，
使该工程研究中心发挥应有的作用。



主题词：高技术 工程研究中心 批复

陕西省发展和改革委员会办公室

2010年6月9日印发

共印10份

- 3 -



陕西省发展和改革委员会

陕发改高技函〔2013〕1291号

关于同意调整陕西省干细胞应用 工程研究中心有关建设内容的函

陕西九州生物科技股份有限公司：

你公司报来《关于请求调整陕西省干细胞应用工程研究中心有关建设内容的报告》（陕九股字〔2013〕006号）收悉。为加强我省生命科学研究，构建医疗健康产业发展平台，经研究，同意陕发改高技〔2010〕716号文件批复中建设“陕西省脐带血造血干细胞库”，调整为建设“陕西省细胞组织库”。

陕西省发展和改革委员会

2013年12月16日



STEM CELLS®

EMBRYONIC STEM CELLS

Global Epiproteomic Signatures Distinguish Embryonic Stem Cells from Differentiated Cells

BO DAI,^{a,b} THEODORE P. RASMUSSEN^{a,b,c}^aCenter for Regenerative Biology, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA; ^bDepartment of Animal Science, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA; ^cDepartment of Molecular and Cell Biology, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA**Key Words.** Embryonic stem cells • Chromatin • Epigenetics • Pluripotency • Proteomics • Epiproteomics • Nucleosome Post-translational modification

ABSTRACT

Complex organisms contain a variety of distinct cell types but only a single genome. Therefore, cellular identity must be specified by the developmentally regulated expression of a subset of genes from an otherwise static genome. In mammals, genomic DNA is modified by cytosine methylation, resulting in a pattern that is distinctive for each cell type (the epigenome). Because nucleosomal histones are subject to a wide variety of post-translational modifications (PTMs), we reasoned that an analogous “epiproteome” might exist that could also be correlated with cellular identity. Here, we show that the quantitative evaluation of nucleosome PTMs yields epiproteomic signatures that are useful for the investigation of stem cell differentiation, chromatin function, cellular identity, and epigenetic responses to pharmacologic agents. We have developed a novel enzyme-linked immunosorbent assay-based method for the quantitative evaluation of the

steady-state levels of PTMs and histone variants in preparations of native intact nucleosomes. We show that epiproteomic responses to the histone deacetylase inhibitor trichostatin A trigger changes in histone methylation as well as acetylation, and that the epiproteomic responses differ between mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts (MEFs). ESCs subjected to retinoic acid-induced differentiation contain reconfigured nucleosomes that include increased content of the histone variant macroH2A and other changes. Furthermore, ESCs can be distinguished from embryonal carcinoma cells and MEFs based purely on their epiproteomic signatures. These results indicate that epiproteomic nucleosomal signatures are useful for the investigation of stem cell identity and differentiation, nuclear reprogramming, epigenetic regulation, chromatin dynamics, and assays for compounds with epigenetic activities. *STEM CELLS* 2007;25:2567–2574

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

INTRODUCTION

Many biological processes of keen interest are profoundly controlled or influenced by epigenetics. In broad terms, epigenetics is concerned with influences on gene expression that are independent of DNA sequence per se. Complex multicellular organisms contain a plethora of specialized cell types that are assembled into three-dimensional configurations, thus forming tissues and organs. Yet this remarkable complexity and organization must arise from the developmentally regulated proliferation of progenitor cells that arise from a single totipotent zygote. Although humans contain over 200 distinct cell types, all somatic cells contain essentially the same content of genes. Therefore, the specification of cell type must be controlled by the regulated expression (or silencing) of sets of genes present within an otherwise fixed genome, suggesting a major role for epigenetic mechanisms in developmental processes. For these reasons, epigenetics has been an area of intense interest in the field of stem cell research, since directed stem cell differentiation procedures attempt to recapitulate development in vitro. Recent successes demonstrate that terminally differentiated mammalian

cells can be reprogrammed to a pluripotent state using a variety of approaches [1]. Mammalian reprogramming was first demonstrated by transfer of differentiated nuclei into oocytes from which the nuclear DNA was removed [2, 3] but has now been shown to occur by many other mechanisms such as fusion of somatic cells with ESCs [1, 4], introduction of transgenes with pluripotency function into somatic cells [5], and the use of reprogramming extracts and cocktails [6]. All of these reprogramming processes are thought to involve epigenetic reconfigurations. Epigenetics is also of major importance in disease etiologies. For instance, aberrant silencing of tumor-suppressor genes is thought to be a common mechanism leading to neoplastic transformations, and alterations of centric heterochromatin can lead to chromosomal instability. Finally, the loss of epigenetic checks on gene expression is thought to be an important mechanism of aging.

Though the importance of epigenetics is now widely appreciated, few methods exist that can expediently assess the overall epigenetic status of cells. Nucleosomes are the smallest macromolecular complex that can be isolated from cells in which histones are preserved in their native modification states in contact with cognate genomic DNA. Indeed, much evidence

Correspondence: Theodore Rasmussen, Ph.D., Center for Regenerative Biology, University of Connecticut, Storrs, Connecticut 06269-4243, USA. Telephone: 860-486-8339; Fax: 860-486-8809; e-mail: theodore.rasmussen@uconn.edu Received February 19, 2007; accepted for publication July 6, 2007; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* July 19, 2007. ©AlphaMed Press 1066-5099/2007/\$30.00/0 doi: 10.1634/stemcells.2007-0131

STEM CELLS 2007;25:2567–2574 www.StemCells.com

ARTICLE

Received 2 Jun 2015 | Accepted 27 Aug 2015 | Published 7 Oct 2015

DOI: 10.1038/ncomms9489

OPEN

An LSC epigenetic signature is largely mutation independent and implicates the *HOXA* cluster in AML pathogenesis

Namyoung Jung^{1,2,*}, Bo Dai^{3,*}, Andrew J. Gentles⁴, Ravindra Majeti³ & Andrew P. Feinberg^{1,2}

Acute myeloid leukaemia (AML) is characterized by subpopulations of leukaemia stem cells (LSCs) that are defined by their ability to engraft in immunodeficient mice. Here we show an LSC DNA methylation signature, derived from xenografts and integration with gene expression that is comprised of 71 genes and identifies a key role for the *HOXA* cluster. Most of the genes are epigenetically regulated independently of underlying mutations, although several are downstream targets of epigenetic modifier genes mutated in AML. The LSC epigenetic signature is associated with poor prognosis independent of known risk factors such as age and cytogenetics. Analysis of early haematopoietic progenitors from normal individuals reveals two distinct clusters of AML LSC resembling either lymphoid-primed multipotent progenitors or granulocyte/macrophage progenitors. These results provide evidence for DNA methylation variation between AML LSCs and their blast progeny, and identify epigenetically distinct subgroups of AML likely reflecting the cell of origin.

¹ Center for Epigenetics, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205, USA. ² Department of Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205, USA. ³ Department of Medicine, Division of Hematology, Cancer Institute, and Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, School of Medicine, Stanford University, Stanford, California 94305, USA. ⁴ Department of Radiology, and Center for Cancer Systems Biology, School of Medicine, Stanford University, Stanford, California 94305, USA. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.M. (email: rmajeti@stanford.edu) or to A.P.F. (email: afeinberg@jhu.edu).

The Xi'an Experience of Kawasaki Disease – Lessons Learnt over 5 years

Fuyong Jiao¹ · Xiaohua Yan¹ · Xiaofang Wu²

Received: 17 January 2016 / Accepted: 21 March 2016
© Dr. K C Chaudhuri Foundation 2016

Abstract Kawasaki disease (KD), also well known as mucocutaneous lymph node syndrome, is an acute febrile disease in children with systemic vasculitis as its main pathological change, and usually occurs in children under the age of 5. KD is now the commonest cause of acquired heart disease in children in Japan, Europe and North America. Although KD is now being increasingly diagnosed in mainland China, there is paucity of data on this condition. To provide clinical basis for the treatment of KD, the authors report their experience on 170 children with KD at Shaanxi People's Hospital, Xi'an, China in this research. This also is one of the largest single centre experiences from China so far.

Keywords Kawasaki disease · Xi'an experience · 170 children

Introduction

Kawasaki disease (KD) is a common vasculitis of young children that is still not being diagnosed as frequently as it should be in developing countries. If left untreated, children with KD can go on to develop coronary artery abnormalities (CAAs) in 20–25 % cases [1]. KD is now the commonest cause of

acquired heart disease in children in Japan, Europe and North America [1, 2]. KD incidence has gone up in several Asian countries like Japan, Korea, Taiwan and India [3, 4].

Although KD is now being increasingly diagnosed in mainland China, there is paucity of data on this condition [5, 6]. The authors report their experience on 170 children with KD at Shaanxi People's Hospital, Xi'an of China. To the best of authors' knowledge, this is one of the largest single centre experiences from China.

Material and Methods

One hundred and seventy children were diagnosed with KD during the period, January 2008 – December 2012 at the Shaanxi People's Hospital. This hospital serves as a referral centre for children from the region. Diagnosis of KD was based on American Heart Association guidelines. Typical KD was diagnosed when there was fever for at least 5 d and presence of 4 or more criteria. Incomplete KD was diagnosed when there was fever for at least 5 d and less than 4 criteria. On echocardiography, coronary arteries were said to be dilated if the internal diameter was ≥ 2.5 mm in children of 3-y-old or below; ≥ 3.0 mm in children of 4–9 y old; ≥ 3.5 mm in children above 9-y-old. A diagnosis of coronary artery aneurysm was given if the coronary artery diameter was ≥ 4 mm and if transverse diameter exceeded the longitudinal by 1.5 times. Giant coronary aneurysm was diagnosed if the diameter exceeded 8 mm. Echocardiography was carried out by trained echocardiographers.

Treatment included intravenous immunoglobulin (2 g/kg) as a single infusion along with aspirin, initially in high doses and, thereafter, in antiplatelet doses [1]. Children with giant coronary aneurysms were kept on long-term aspirin along with anticoagulants [7].

Xiaohua Yan and Xiaofang Wu were both first co-author

✉ Fuyong Jiao
jiaofy@yeah.net

¹ Children's Hospital, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, People's Republic of China

² Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, People's Republic of China

科研项目合作协议书

甲方（负责单位）：陕西省人民医院

乙方（合作单位）：陕西九州生物医药科技集团有限公司

本协议双方就共同参与《2018 年度陕西省重点研发计划国际科技合作与交流项目——川崎病冠脉病变的干细胞疗法》事项，经平等协商，在真实、充分表达各自意愿的基础上，根据有关法律、法规和本项目下达部门的相关规定，达成如下协议，并由合作双方共同恪守。

一、合作内容及分工

甲方：负责项目的总体设计、统筹安排、工作计划和实施，具体内容包括提供川崎病相关背景材料；川崎病动物模型构建技术；临床实验医疗资源。

乙方：利用现有的细胞组织库资源、生物科技公司及博士后流动站优势，按照 GMP 标准生产脐血来源间充质干细胞；通过负责方提供的川崎病动物模型技术构建动物模型并完成间充质干细胞对川崎病导致的冠脉病变的治疗潜能验证；为开发间充质干细胞相关产品做临床前准备；国内论外文撰写及专利申报。

甲方委派焦富勇为本项目负责人，乙方委派戴博为本项目负责人。

二、成果分配

本项目研究形成的论文及研究成果双方共享，甲方为主持单位，乙方为协作单位。具体如下：

1) 论文发表

- ① 焦富勇、戴博（共同通讯作者，按实际研究工作贡献协商排序）；
- ② 共同第一作者按实际研究工作贡献排序。

2) 专利申请

本项目科研成果所形成的专利，由甲乙双方作为专利共同申请人共同申请，如专利申报成功，甲乙双方作为专利共同所有权人。

3) 成果转化及转让

本项目形成的治疗川崎病的干细胞产品成果转化(包括但不限于专利、专有技术等)向第三方转让的,收益按照甲方 51%、乙方 49%进行分配。

三、协议的生效变更与解除

1) 本协议生效期间为项目获得之日起至项目结题申请通过之日;本项目如未获得批准,本协议将自动终止;

2) 协议双方中任何一方欲变更,解除本协议,必须采取书面形式,并由双方的授权代表签字,口头无效;解除协议需提前一个月向对方提出;

3) 甲乙双方中任何一方未履行本协议条款,导致协议不能履行或不能完全履行,对方有权变更,解除协议,并承担相应违约责任;

4) 在没有事先获取甲方书面同意的情况下,乙方不得转让,抵押,收费或以其他方式让渡本协议中的任何权利和义务;

5) 执行合同中如遇不可抗拒的因素,如战争,自然灾害,地震等导致协议不能顺利履行时,双方各自承担自己的损失,均不承担违约责任,双方应尽快通知对方以将损失控制在最小范围并共同协商变更或者解除本协议;

6) 本协议与国家法律相抵触时,应依照国家法律法规,变更本协议;

7) 本协议的备忘录或者附件与本协议拥有同等的法律效力,同时取代之前的所有口头或书面协定,以及与该协定主要事项相关的担保;

8) 本合同未尽事宜,双方应本着互惠互利,友好协商的原则另行约定,并以备忘录或附件的形式体现。

四、违约及争议解决

如在履行本合同的过程中发生任何争议,由双方协商解决,如协商不能解决,则提交西安市或陕西省仲裁委员会仲裁,必要时诉诸法律。

五、其他

1) 甲方需向乙方提供一份包含从项目主持单位获得的与该项目相关的所有信息和材料副本;



2) 本协议一式 2 份, 甲乙双方各持 1 份, 具有同等效力;

3) 未经对方许可, 甲乙双方都不得将本协议内容透露给第三者。

甲方(签章): 陕西省人民医院
科研处

项目负责人(签字): 贾晓飞 07/31/17

法定代表人/

委托代理人(签字): _____

联系电话: 15398082028

传 真: 029 -85236987

E-mail: jiaofy@yeah.net

通讯地址: 西安市友谊西路 256 号

乙方(签章): 陕西九州生物医药科技
集团有限公司

项目负责人(签字): 戴博 07/31/17

法定代表人/

委托代理人(签字): _____

联系电话: 18292169261

传 真: 029-88318303

E-mail: daibo@sxstemcell.com

通讯地址: 西安高新区科技六路 196 号



**Ural Federal
University**

named after the first President
of Russia B.N.Yeltsin

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Professional Education
«Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin» (UrFU)

19 Mira St., 620002, Ekaterinburg, Russia

TIN 6660003190

fax: +7 (343) 375-97-78, phone: +7 (343) 374-38-84

e-mail: rector@urfu.ru, urfu.ru

Contact center: +7 (343) 375-44-44

中华人民共和国科学技术部

Reference № 04-06/123
Date 18.02.2018

尊敬的中国科技部的领导您好!

首先衷心祝愿全部中国人民春节快乐身体健康!

我们是俄罗斯叶卡捷琳堡市乌拉尔联邦大学,我们十分高兴地给你们汇报有关我们乌拉尔联邦大学与中国陕西省人民医院(西安交通大学第三附属医院)去年12月双方共同申请的“Longitudinal research of neurocognitive development in preterm children: cross cultural differences”/“中俄跨文化早产儿神经发育纵向研究项目”。

我们还准备3-5年以后下一步申请共同研究“地震后儿童与青少年心理问题治疗与干预项目”。

我们双方十分高兴能够申请此项目为两个国家的儿童与青少年造福!

乌拉尔联邦大学医学儿科教授与陕西省人民医院的儿科教授于2014-2015进行了学术交流和疑难疾病的诊断治疗的探讨,签署了双方合作项目。这对于以后的合作奠定了基础!

我们衷心感谢中国科技部对此项目的重视和支持!

希望此项目为两国儿童的健康做出贡献!

维克托尔·科克沙夫

乌拉尔联邦大学校长

