

血液センターより分与された臍帯血（クエン酸添加された全血）を 2mM EDTA を含む PBS(-) で 2 倍に希釈して Lymphoprep tube（AXIS SHILD 社製）（ $\rho=1.077\text{g/ml}$ ）に重層し、18°C、1000g（日立冷却遠心機 CF7DS、ローター RT3S3、2200rpm）で 20 分間遠心した。単核球の層を新しいチューブに移し、2mM EDTA を含む PBS(-) で 2 倍に希釈して、350g（1300rpm）で 5 分遠心して、細胞を回収した。

さらに、血小板を除去する場合は、5 容量の Optiprep（AXIS SHILD 社製）と 22 容量の希釈液（0.85% NaCl, 20mM HEPES-NaOH pH 7.4, 1mM EDTA）を混合して $\rho=1.063\text{g/ml}$ に調整した Optiprep 溶液に、培地に懸濁した単核球を上層した。20°C、350g（1300rpm）で 15 分遠心し、沈澱画分として単核球を回収した。

4) 血小板の調製

全血を室温、140 x g（1000rpm）で 10 分間遠心し、Platelet Rich Plasma（PRP）を得た。PRP を 2mM EDTA を含む PBS(-) で 2 倍に希釈して、室温、1500g（3000rpm）で 10 分遠心し、血小板を沈澱として回収。2mM EDTA を含む PBS(-) に懸濁後、再度、室温、1500g（3000rpm）で 10 分間遠心した後、培地に懸濁した。血小板数は自動血球計数装置 SYSMEX F820 を用いて測定した。なお、これまでの検討では、HEPES-Tyrode buffer を用いる血小板洗浄方法を用いても、血小板の EPC 誘導促進効果は同様に見られており、洗浄法が血小板の EPC 誘導促進効果に影響する可能性は小さいようである。

5) 単核球の培養

臍帯血から調製した単核球を培地（Endothelial Basal Medium-2, 2% FCS, VEGF, bFGF, EGF, R3-IGF1, ascorbic acid,

hydrocortisone, heparin）に懸濁し、FN コート 6 ウェルプレート（ベクトン・ディッキンソン社製）に播種した。播種細胞数は、 1×10^7 cells/well 程度とした。培養開始 1 日後に、培地を除いて PBS(-) で 1 回洗浄し、新鮮培地を添加した。その後、OEC を誘導する場合は、培養開始 7 日目までは毎日培地交換を行い、以降は 1 週間に 2 回、培地を交換した。

6) EPC の同定

1,1-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate 標識したアセチル LDL（DiI-Ac-LDL, Biomedical Technologies 社製）を培地で希釈して添加（4 $\mu\text{g/ml}$ ）し、1 時間培養した。PBS(-) で洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで 1 時間固定、PBS(-) で 3 回洗浄し、1% BSA を含む PBS(-) で 4°C、1 時間ブロッキングした。FITC 標識した抗ヒト CD31 抗体（ファーマンジェン社製、No.555455）を 1% BSA を含む PBS(-) で 100 倍希釈して 4°C で 1 時間、反応させた。PBS(-) で 3 回洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510（Carl Zeiss 社製）で蛍光画像および位相差像を観察し、各ウェルについて 5 枚ずつ写真をとり、視野にある DiI-Ac-LDL 取り込みおよび抗 CD31 抗体染色陽性の細胞をカウントした。

7) 血小板の隔離培養

セルカルチャーインサート（ベクトン・ディッキンソン社製）を用い、血小板を単核球と接触しない条件で添加した場合の影響を検討した。用いたセルカルチャーインサートは、ポアサイズ 0.4 μm /ポア密度 $1.6 \times 10^6/\text{cm}^2$ のもの、ポアサイズ 0.4 μm /ポア密度 $1.0 \times 10^8/\text{cm}^2$ のもの、ポアサイズ 0.4 μm /ポア密度 $1.6 \times 10^6/\text{cm}^2$ で FN コートされたもの、の 3 種類である。

8) OEC の培養

末梢血あるいは臍帯血から単核球を分離後、2%FBS-EGM2 培地（三光純薬）に浮遊させ、FN コートした 6 穴のマルチウェルプレートに播種した。一週間、毎日培地交換し、その後週 2 回培地交換を行った。OEC のコロニーを形成後、顕微鏡画像を撮影した。

9) OEC の免疫染色

OEC の同定を行うため、コロニーをトリプシン・EDTA ではがし、FN コートの 48 マルチウェルに播種した。2 日後、細胞層を洗い、1% パラホルムアルデヒドで固定した。細胞の固定・透過性のため、20°C のエタノールを加えた。1% BSA-PBS(-) でブロッキング後、それぞれの抗体を含む 1% BSA-PBS(-) を添加し、4°C で抗原抗体反応させた。抗体は抗 endothelial NO 合成酵素 (eNOS, Cayman Chemical) 抗体、抗 CD31 抗体を用いた。接着した細胞を PBS(-) で洗浄し、抗 IgG 抗体-FITC あるいは抗 IgG 抗体-ローダミンを 4°C、1 時間反応させた。細胞は共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 で観察した。

10) OEC 及び HUVEC の IL-8 受容体発現の解析

OEC あるいは HUVEC を非酵素的にはがし、洗浄後、浮遊細胞と抗 IL-8 受容体抗体を 4°C、30 分で抗原抗体反応させた。細胞を 1% BSA-PBS(-) で洗浄し、抗 IgG 抗体-FITC を 4°C、30 分反応させ洗浄後、フローサイトメーターで解析した。

11) 細胞遊走

細胞遊走はボイデンチャンバー法を用いた。48 穴のマイクロウェルの下室に種々の濃度の IL-8 を含んだ 27 μ l の 2% EBM-2 培地を加えた。上室には 50 μ l の OEC の細胞浮

遊液を 1 ウェルあたり 2×10^4 個播種した。上室と下室の間に 0.8 μ m のポアがあるフィルターを用いた。37°C、4 時間 CO₂ インキュベーター内で遊走させた後、フィルター上部について細胞をはがし、遊走してきた下側の細胞を固定・染色し、細胞数を数えた。

12) 移植チューブを用いた HUVEC の培養と細胞の免疫染色

移植する EPC と侵入してくるであろう血管細胞を区別するため、あらかじめ移植する細胞を蛍光色素 PKH26 (Sigma) で染色することとした。今回は HUVEC を用いて試験的に行った。HUVEC を Sigma 社のプロトコールに従い、蛍光染色した。移植用チューブおよび Basement Membrane Extract (BME) として、Angioreactor Kit (Trevigen, Inc.) を用いた。BME に蛍光染色した HUVEC を混合し、1 チューブあたり 20 μ l、 1×10^4 個の細胞を播種した。37 °C で 1 時間インキュベートしてゲル化した。24 穴に 1 ml/well の 2% EGM2 培地を分注し、その中にゲル化した移植チューブを入れ 2 週間培養した。顕微鏡写真を撮影後、凍結切片を作成した。サンプルは -20° C のアセトン固定と 4% ホルマリン固定の 2 種類を免疫染色し、比較検討した。抗体は抗 CD31 抗体-FITC を用い、対照として免疫していない IgG1 分画の対照血清-FITC と比較した。

倫理面への配慮

動物実験を行う際には、動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な

倫理委員会等による審査・承認を得た上で研究を実施した。

C. 研究結果

C-1. AC133 陽性細胞由来 EPC の誘導系における TPO の効果

我々はこれまで、ヒト末梢血あるいは臍帯血から分画した AC133 陽性細胞から EPC を分化・誘導する系を確立し、AC133 陽性細胞に由来する CD31 強陽性細胞が活性の高い EPC であることを報告してきた (Fig. 3)。また、昨年度までの検討で、移植される患者の負担やリスクを軽減するため *in vitro* で EPC を増幅する物質を探索した結果、TPO が AC133 陽性細胞から分化する CD31 強陽性細胞画分を増加させることを見出した。今年度はその TPO の EPC 増幅効果を詳細に検討し、経時的变化と濃度依存性を明らかにした。

Fig. 4A は AC133 陽性細胞を 1 週間培養後、抗 CD31 抗体-FITC で免疫染色し、フローサイトメーターで解析した結果である。最上段に示すように CD31 強陽性細胞は末梢血では 0.46%、臍帯血では 0.35% の部分に相当する。SCF を添加して培養した場合、末梢血では 0.47%、臍帯血では 0.30% とあまり増加しないのに対し、TPO を添加して培養すると末梢血では 2.30%、臍帯血では 2.60% と増加する。細胞総数と FACS により示される割合から CD31 強陽性細胞の絶対数を計算すると、Fig. 4B に示すようになり、TPO を添加することで CD31 強陽性細胞が 10 倍以上増加することが明らかとなった。

TPO を添加した際の細胞総数を経時的に検討してみると、3 日目まではほとんど変化しないのに対し、その後急速に増加する (Fig. 5A)。この時の、すなわち、AC133 陽性細胞培養 3 日後の TPO 受容体の発現を解析して

みると、末梢血 (Fig. 5B パネル上段) においても臍帯血 (Fig. 5B、パネル下段) においても CD31 陽性細胞 (Fig. 5B パネル左) と AC133 陽性細胞 (Fig. 5B、パネル右) はともに TPO 受容体を発現していることから、TPO は AC133 陽性と CD31 陽性細胞の両方から、CD31 強陽性細胞への分化を促している可能性が考えられた。

次に、添加する TPO の濃度を検討した。その結果、5ng/ml の TPO により細胞総数が約 2 倍の上昇を示した (Fig. 6 左)。TPO の濃度を 10ng/ml から 50ng/ml に上昇させても細胞総数の顕著な増加は観察されなかったが (Fig. 6 左)、CD31 強陽性細胞の絶対数を計算すると末梢血では CD31^{bright}VEcad⁺ 細胞 (Fig. 6 右上) が、臍帯血では CD31^{bright}VEcad⁺ 細胞と CD31⁺brightVEcad⁻ 細胞 (Fig. 6 右下) が、TPO の濃度に依存して増加した。VE カドヘリン (VEcad) は EPC の分化段階のマーカーであり、EPC としての分化が進むと VEcad 発現が増加すると考えられることから、末梢血では、TPO によって分化の進んだ細胞の割合が高い EPC を調製できると考えられた。今後、TPO の細胞内のシグナル伝達機構について解析する予定である。

C-2. CD31 強陽性 EPC の特性指標である IL-8 の産生および分化誘導への影響

Fig.7 は、CD31 強陽性細胞および CD31 陽性細胞をソーティング後培養し、培地中に放出される IL-8 の量を示している。CD31 強陽性細胞は CD31 陽性細胞に比べ、大量の IL-8 を産生する。そこで、IL-8 がオートクラインにより EPC の分化を促進する可能性を考え、EPC の分化に対する IL-8 の影響を抗 IL-8 抗体を用いて解析した (Fig. 8)。上段は AC133 陽性細胞に抗 IL-8 抗体を 10 μg/well 加えて一週間培養した時の光顕写真で

ある。対照群に比べて、ややコロニーが小さいように思われた。しかし、CD31 強陽性細胞数を細胞総数と FACS 解析をもとに算出すると (Fig. 8 下段)、末梢血 (Fig. 8 下段左) においても臍帯血 (Fig. 8 下段右) においても、減少する傾向にはあったが、有意ではなく、IL-8 は EPC 分化に大きな影響を及ぼさないと考えられた。

C-3. 単核球由来 EPC の誘導に対する血小板の影響

単核球から AC133 陽性細胞を分離し、EPC を誘導する我々独自の系と並行して、最も一般的な単核球画分全体からの EPC 誘導系 (Fig. 1) に関する検討も行った。臍帯血より Lymphoprep tube を用いて単核球を分離し、FN コートしたプレートに播種すると、単核球の一部の画分と共に血小板もプレートに接着し、培養開始 1 週間後ぐらいまではプレート上に存在する (Fig. 9)。血小板は血管新生に促進的あるいは抑制的に働く多くの生理活性物質を含有していることから、FN への単核球の接着あるいは EPC への分化に血小板が影響している可能性が考えられた。そこで、Lymphoprep ($\rho=1.077\text{g/ml}$) による分離で得られた単核球画分を、 $\rho=1.063\text{g/ml}$ に調整した細胞分離用高分子担体 Optiprep に上層して遠心することにより、単核球画分から血小板を除去したサンプルを用いて、血小板が EPC 分化に与える影響を解析した (Fig. 10)。

血小板除去前、除去後、および、血小板除去後に再度血小板を添加したサンプルの 3 種類について、EPC 誘導条件下で培養を行い、1 週間後に AcLDL 取り込み陽性、抗 CD31 抗体染色陽性の細胞を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、Fig. 11 に示すように、血小板を除去することにより、EPC が大幅に減少することが明らかになった。一方で、血小板

除去後に血小板を添加することにより、EPC 数が回復したことから、血小板が EPC の誘導に促進的に働いていると考えられた。

EPC 誘導系における血小板の作用が血小板由来の液性因子を介したものである可能性を検討するため、単核球と血小板が接触しないよう、単核球を FN コートプレート上に、血小板を多孔性のセルカルチャーインサート中に播種して、培養を行った。セルカルチャーインサートとしては、血小板 (直径約 $2\ \mu\text{m}$) が通過しないように、 $0.4\ \mu\text{m}$ のポアサイズのものを用い、ポア密度が通常のものより高いもの、および、ポア密度が通常で FN コートしてあるもの、の 3 種類を用いた。その結果、血小板をインサート内に隔離して培養した場合は、いずれの種類インサートにおいても EPC 出現に対する血小板の促進効果が見られず、血小板が EPC の誘導を促進するには、血小板と単核球が接触できる環境にあることが必要であると考えられた (Fig. 12)。実験に用いた培養系では、培養液の流れなど物理的刺激は与えていないが、FN コートプレート上の細胞を顕微鏡で観察すると、血小板が細かく動き、単核球に接触を繰り返す様子が観察された。血小板の動きはパラホルムアルデヒドで固定した場合も観察されたため、能動的なものではないと考えられるが、静置培養系においても単核球と血小板の接触が認められたことから、血小板との接触によって単核球内でのシグナル伝達経路が直接活性化される可能性、あるいは、血小板と単核球の接触後に、どちらか、あるいは両方から、EPC 誘導に関わる因子が放出され、EPC の誘導に関与している可能性などが考えられる。

血小板と単核球の接触により EPC の誘導が促進されていることが明らかとなったため、血小板に存在する接着タンパク質

P-selectin が、単核球由来 EPC の分化誘導促進作用を持つ可能性について検討した。P-selectin は、789 アミノ酸からなる膜貫通タンパク質で、細胞外部分にはレクチンドメインがあり、シアリルルイス X 構造を持つ糖鎖をリガンドとしている。P-selectin の細胞外ドメイン 730 アミノ酸のみを CHO 細胞で発現させた組換え P-selectin を用い、その EPC 誘導効果について検討した。

Optiprep を用いて血小板を除去した単核球を FN コートしたプレートに播種し、P-selectin を 10ng/ml、100ng/ml、1 μ g/ml、10 μ g/ml の濃度で添加して培養した。培養開始 1 週間後に、DiI-Ac-LDL の取り込み、および、抗 CD31 抗体染色陽性の細胞数を計測した結果を Fig. 13 に示す。その結果、P-selectin 濃度が 1 μ g/ml、10 μ g/ml の場合に、P-selectin を添加しない場合と比較して EPC 数が多く、P-selectin が EPC 誘導促進効果を持つことが明らかになった。

C-4. OEC 誘導に関する解析

C-4-1. 血管内皮細胞用培地に添加される heparin, hydrocortisone の OEC 誘導への影響

OEC は単核球の長期培養により得られる細胞であり、それ自身が管腔を形成し得ることから、血管再生療法への応用が期待されているが、その出現頻度は低く、幹細胞が多く含まれる臍帯血由来単核球を用いても、多い場合で、 1×10^7 個の単核球から 1 個～数個のコロニーが出現する程度である。実際の治療に用いるには、臍帯血より幹細胞の少ない末梢血から確実に OEC を誘導する必要があるため、より効率的な OEC の誘導法の確立が望まれている。

血管内皮細胞の培養には一般的に、基本培地として、MCDB131 の改変培地である Endothelial Basal Media-2 を用い、2% FCS、

VEGF, bFGF, R3-IGF1, EGF, ascorbic acid, heparin, hydrocortisone が添加される。添加されるものはいずれも血管内皮細胞の増殖や機能維持に必要であるが、heparin は血管内皮細胞の種類（由来する組織）によっては添加しない方が適している場合があり、また、heparin と hydrocortisone には血管新生を抑制する作用があることが知られている。一方、培養による EPC の誘導を初めて報告した Asahara らの方法では、上記の培地添加物から heparin と hydrocortisone を除外したものが用いられている。このような経緯によるものと思われるが、これまでに報告されている OEC に関する論文では、heparin、hydrocortisone の扱いがまちまちである。Heparin も hydrocortisone も細胞の特性に影響を与える生理活性物質であることから、OEC 誘導系における heparin および hydrocortisone の影響について、誘導効率と細胞の特性に与える影響を評価することとし、本年度は、細胞の誘導効率に対する影響を検討した。

FN でコーティングした 6 穴プレートに lymphoprep で調製した単核球画分を播種し、heparin および hydrocortisone の影響を調べるために両者を単独あるいは共に含む培地を調製して培養を行った。培地交換は、培養開始 1 週間後までは毎日、その後は 1 週間に 2 回行った。単核球のロット（ドナー）により差があるが、OEC コロニーは培養開始 10 日～2 週間後ぐらいから出現し始める。3 つのロットについて、培養開始 1 ヶ月後までに出現したコロニー数をカウントしたところ、Fig. 14 のような結果となり、heparin を含み、hydrocortisone を含まない培地が OEC 誘導に適している可能性が考えられた。この実験では、1 つのウェルに複数のコロニーが出現することがあり、出現した OEC が新たなコロニーの出現を起こしている可能性も考え

られたため、heparin や hydrocortisone が細胞分化に直接的に影響しているか否かについて、さらに検討を進めているところである。

C-4-2. 長期間培養後の形態の変化

OEC は増殖性の高い細胞であり、培養開始後 12 週間程度まで増殖すると報告されている (Hur J. et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 288, 2004) が、培養開始 60 日後ぐらいに増殖が停止するとの報告もある (Untergasser G. et al., *Exp. Gerontol.* 41, 600, 2006)。我々の検討でも、やはり、培養開始 60 日ぐらいで増殖が止まり、一つ一つの細胞の面積が拡大するという senescence に特徴的な形態の変化が認められた (Fig. 15)。この時点での population doubling level はおよそ 24 であった。血清濃度などの培養条件により OEC の寿命が異なる可能性については報告がなく今後の検討課題であり、細胞組織利用医薬品の品質評価指標として、培養開始後の population doubling level の他に、老化マーカーなどを解析しておくことが必要であると考えられた。

C-4-3. 目的外の細胞の出現

OEC を誘導するために、単核球を FN コートプレート上で血管内皮細胞用の培地で長期培養している際、OEC 以外の細胞が出現することがある。その頻度や量は、細胞のロット (ドナー) や細胞播種密度により異なるが、脂肪細胞様の細胞が認められることがしばしばあった。OEC 培養中に認められたこの細胞を脂肪染色に用いられる Oil Red O で染色したところ、Fig. 16 に示すように赤く染色され、脂肪細胞であると考えられた。試みに単核球培養開始時の血小板含量を高くすると、出現する細胞の heterogeneity が高くなる傾向があり、酒石酸耐性アルカリホスファターゼ活性染色陽性で多核の破骨細胞

様の細胞が認められることもあった (Fig. 16)。

純度の高い OEC を得るためには、これらの細胞の混入がない状態で細胞を調製することが重要であり、細胞の純度が品質評価の重要な項目となる。適正な播種数を設定することで heterogeneity は抑えられると思われるが、脂肪細胞様の細胞は比較的出現頻度が高いため、注意が必要であると思われた。ただし、出現した脂肪細胞の増殖はほとんど認められない。昨年度報告したように OEC 培養中に平滑筋細胞が出現することがあるが、その場合は増殖能が高く OEC を覆い尽くしてしまうほどであるため、平滑筋細胞にも注意が必要である。

C-5. IL-8 の OEC 遊走促進効果

昨年度までに我々は、CD31 強陽性 EPC が大量 (ng/ml レベル) の IL-8 を分泌することを見出し (Fig. 7)、EPC の特性指標としての IL-8 の同定に成功している。一方、生体において、EPC と OEC は協調的に働きながら血管形成を促進していると考えられるが、その機構は明らかでない。そこで、ケモカインである IL-8 が OEC の遊走を促進する可能性を考え、OEC における IL-8 受容体発現、および、OEC 遊走に対する IL-8 の効果を検討した。

臍帯血単核球を 2 週間培養すると、Fig. 17A に示すように CD31 陽性、eNOS 陽性の均一な細胞集団 OEC が得られる。この細胞を非酵素的に剥離して細胞浮遊液とし、IL-8 受容体の発現をその抗体を用いて解析した (Fig. 17B)。その結果、OEC は IL-8 受容体を発現していることが明らかとなった。IL-8 受容体は OEC のみならず、代表的な組織由来血管内皮細胞である HUVEC (臍帯静脈血管内皮細胞) でも発現しており、OEC と HUVEC で発現量に差は認められなかった。

IL-8によるOECの遊走促進効果を検討したところ、Fig. 18に示すように、0.1 ng/mlという低濃度のIL-8でOECの遊走が有意に促進され、1.0 ng/mlで最大効果を示した。10.0ng/mlでは遊走が促進されておらず、OEC遊走におけるIL-8の濃度依存性は遊走促進因子として典型的なベル・シェイプとなった。

C-6. EPC/OECのin vivoでの機能評価系確立のための予備検討

動物組織への移植によるEPC/OECの機能評価系確立のための予備検討として、*in vitro*で条件設定を行った。EPCを移植する目的でFig. 19左に示すようなチューブの中に、蛍光染色したHUVECをBasement Membrane Extract(BME)に浮遊させ、37°Cでゲル化し、2週間培地の中で培養した。右4枚の写真はチューブの外側から撮影した顕微鏡写真である。このゲルの凍結切片を作製し抗CD31抗体で免疫染色すると、Fig. 20左に示すように、予め赤く染色された細胞の一部が抗CD31抗体の緑に染色されている。移植した細胞がすべて赤く染色されていることから、今後マウスに移植した際に侵入してくる細胞と区別がつくと考えられた。一方、免疫していない対照血清を用いると全く染色されなかった(Fig. 20右)。また、凍結切片の固定法をアセトン固定とホルマリン固定で検討したところ、免疫染色はどちらも良好に染色されたが、顕微鏡画像はホルマリン固定の方が良好であった(Fig. 21)。

D. 考察

FDAの細胞治療新薬治験申請に関するガイドライン案によると、細胞組織利用医薬品を治験申請する際、その製造工程に関しては、細胞原料(組織や細胞の種類)、細胞の採取

方法、細胞誘導の方法、ドナースクリーニングの方法、細胞バンクシステム、試薬(細胞の増幅、分化、選択、精製、および、他の重要な製造工程において必須な要素であり、最終製品には含まれないもの。例：血清、トリプシン、成長因子、サイトカイン、モノクローナル抗体、抗生物質、細胞分離装置、培地、培地成分)、添加剤など、製造に用いられる全ての要素や試薬等について記載が必要であり、製造における全ての工程の妥当性を評価しておくことも必要であるとされている。製品の試験としては、微生物試験(無菌試験、マイコプラズマ試験、迷入ウイルス試験)や、確認試験、純度試験、生存率試験、力価など、製品の特性を示す試験が必要とされている。

血管内皮前駆細胞を細胞組織利用医薬品として用いることを考えると、ドナーは患者自身であると想定されるため、製造工程関連の要素としては細胞誘導の方法が特に重要であり、また、最終製品の安全性、力価、純度に影響する試薬、添加剤なども重要な要素になると考えられる。一方で、確認試験や力価などの製品の品質特性を示す規格および試験方法を設定するには、細胞誘導の方法が確立され、目的とする細胞の特性指標が明らかになっていなければならないことから、現状では、血管内皮前駆細胞の誘導方法の確立と細胞特性指標の探索が最も重要な課題であると考えられる。安全性確保上の最重要課題である細菌・ウイルス等の混入の問題については、試薬からの感染性物質の混入の他、培養の工程中に感染性物質が迷入することのないような対策を講じる必要がある。牛胎児血清の使用はBSEや糖鎖抗原の問題で安全性上の懸念事項となるが、BSE安全国由来製品の使用や患者由来血清を用いることでこの問題を避けられると考えられる場合もある。

EPC の調製においては細胞数の確保が課題であるが、本研究により造血因子 TPO が AC133 陽性細胞の増殖を促進することを見出し、EPC 増幅法の確立に向けた重要な知見を得ることができた。AC133 陽性細胞の増殖および TPO 受容体発現の解析から、AC133 陽性細胞は培養開始 3 日目までに TPO 応答性を獲得し、その後、CD31 強陽性細胞へ分化増殖していると考えられた。また、AC133 陽性細胞の増殖に必要な TPO の濃度は 5~10ng/ml であったが、特に CD31 強陽性細胞を増幅したい場合は、50ng/ml と高濃度を用いる方がよいと考えられた。

昨年度までに我々は、細胞特性指標探索のための細胞由来生理活性物質プロファイリング技術としてサイトカインアレイが有用であることを報告し、AC133 由来 CD31 強陽性 EPC の特性指標として IL-8 を同定した。今年度は、IL-8 の細胞機能への影響を解析し、OEC の遊走促進効果を持つことを明らかにすることができた。血液由来細胞から分化誘導した EPC と OEC を同時に投与することで、血管再生の効率を上げることができる可能性も考えられる。フローサイトメトリーによる解析で OEC が IL-8 受容体を発現していることが明らかとなったが、OEC の細胞集団の中で IL-8 受容体を発現している細胞の割合は 26.7%であったことから、IL-8 受容体陽性 OEC のみを分離して用いることで、血管再生の効率を上昇させられる可能性も考えられる。

単核球画分全体を出発材料として EPC を調製する方法においては、画分中に含まれる血小板が EPC への分化誘導を促進する効果を持つことが明らかになった。血小板の混入率が EPC への分化の変動要因の一つになると考えられるため、製品の品質特性に影響する製造工程中の要素として、血小板混入量を測定することが望ましいと思われる。マグネ

ティックソーティングなどにより単核球から特定の細胞種を分離して用いる場合、血小板の混入はほとんどなくなると思われるが、分離後の細胞に血小板を再添加することで EPC への分化を促進できる可能性が考えられる。血小板は、適切な方法を用いれば血液から容易に調製できるため、患者由来の EPC 産生促進物質として有効に利用できる可能性がある。生体内において、活性化血小板が EPC のホーミングに関与しているという報告もあり、血管再生のメカニズムの点からも血小板と EPC の相互作用に興味を持たれる。

血小板に存在する接着分子 P-selectin の細胞外ドメインのみを持つ可溶性組換え P-selectin が EPC 産生促進効果を示すことが明らかになったが、P-selectin のリガンドとしてはシアリルルイス X 構造を持つ糖鎖を有するタンパク質 PSGL1 が知られている。単核球の PSGL1 に由来するシグナルが血管内皮前駆細胞への分化を促進している可能性が考えられ、そのシグナルの解明が分化誘導の機構解明につながると思われる。EPC 調製法における有用性としては、凍結した細胞以外に材料が得られないような場合に、血小板の代替品として P-selectin を用いることが考えられる。血小板と P-selectin の効果を比較した場合、FN への接着および分化を促進される細胞の種類や、分化した EPC の特性などの差異については今後の検討課題であるため、得られる知見に基づき、目的の特性を有する細胞を得るのに適した方法を選択していく必要がある。

OEC の誘導系については、heparin および hydrocortisone の影響に関する解析を進めると共に、誘導効率を向上させる方法の探索を行う必要がある。OEC は培養用ウェルの方端の方に出現することが多いため、FN に非常に弱く接着している細胞が、培養開始 1 週間~10 日後ぐらいに何らかのシグナルを引

き金に分化増殖を始めているように思われる。特定の細胞種を分離し、培地交換を極力行わないといった方法も OEC 誘導に有効であるかもしれない。播種する細胞種を限定できれば、目的外の細胞が混入する可能性も少なくなると考えられる。しかし、OEC の分化増殖の引き金として、その他の細胞の senescence に伴い放出されている因子が必要であるような場合は、この戦略は成り立たないため、考えられる可能性をそれぞれ検証していく必要がある。OEC の senescence については、文献的にも統一した見解が得られていないことから、培養条件と各種老化マーカーの関連などを解析し、OEC としての機能を十分に維持した継代数までに十分な細胞数を得られる方法を確立していく必要がある。

社会の高齢化、あるいは、肥満や生活習慣病患者の増加などを背景に、動脈硬化に基づく虚血性疾患は今後も増加すると予想され、血管再生医療への社会的要望も高まっている。患者血液由来の細胞を分化増殖させることによって調製する血管内皮前駆細胞は、細胞採取に伴う負担が少なく、また、自己の細胞を利用するため拒絶反応など免疫系の問題も生じないことから、細胞組織利用医薬品としての有用性が高いと考えられるため、細胞組織利用医薬品の品質・安全性確保のための評価系確立のモデルとして、今後も解析を進めていく予定である。

E. 結論

細胞組織利用医薬品の製造方法や規格設定の評価方法の開発に関する研究として、血管内皮前駆細胞をモデルとした研究を行い、以下の結果を得た。

- 1) AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性 EPC の誘導系を用いた検討から、Thrombopoetin が促進効果を持つことを示し、EPC 誘導効率向上のための方策を提示した。
- 2) 単核球からの EPC 誘導系では単核球画分に含まれる血小板が EPC 誘導促進作用を持つことを明らかにした。
- 3) CD31 強陽性 EPC の特性指標である IL-8 が OEC の遊走促進作用を示すことを示し、EPC と OEC の併用により血管再生の効率が向上する可能性を示唆した。
- 4) OEC 誘導系においては、目的以外の細胞の出現する可能性があること、継代に伴い senescence に特徴的な細胞形態の変化が認められることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表、総説
 - 1) Akiko Ishii-Watabe, Toshie Kanayasu-Toyoda, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Teruhide Yamaguchi, Toru Kawanishi: Influences of the recombinant artificial cell adhesive proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells in serum-free culture. *Biologicals* (in press)
 - 2) Martin K. Ng, Jenny Wu, Edwin Chang, Bing-Yin Wang, Regina Katzenberg-Clark, Akiko Ishii-Watabe,

- John P. Cooke: A Central Role for Nicotinic Cholinergic Regulation of Growth Factor-Induced Endothelial Cell Migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(1), 106-112 (2007)
- 3) Akira Harazono, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritake Hashii, Akiko Ishii-Watabe, Toru KAWANISHI, and Takao Hayakawa: Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 348, 259-268 (2006)
- 4) 堤康夫、石井明子、早川堯夫 バイオ医薬品の品質・安全性評価 増補改訂版 機能性人工タンパク質 エル・アイ・シー 印刷中
- 5) 石井明子、鈴木琢雄、川西 徹、山口照英、早川堯夫 バイオ医薬品の品質・安全性評価 増補改訂版 植物を用いた医薬品の現状と品質・安全性の確保 エル・アイ・シー 印刷中
- 6) 内田恵理子、石井明子、山口照英 遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保 日本臨床ウイルス学会誌 印刷中
2. 学会発表
- 1) 豊田淑江、押澤正、石井明子、鈴木孝昌、山口照英: Thrombopoietin(TPO)による AC133 陽性細胞より分化する血管内皮前駆細胞(EPC)の分化促進作用 日本薬学会 第127年会 2007年3月 富山
- 2) Akiko Ishii, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Teruhide Yamaguchi, Toru Kawanishi : Influences of the recombinant extracellular matrix proteins on the behavior of human umbilical vein endothelial cells. 第20回国際生化学・分子生物学会議 2006年6月18~23日 京都
- 3) 鈴木琢雄、櫻井教美、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、川西 徹、山口照英:「小胞体ストレスとTNF- α 処理時の単一細胞内カスパーゼ 3、9 活性化の解析」日本薬学会 第127年会 2007年3月 富山
- 4) 小林 哲、鈴木琢雄、石井明子、川西 徹、山口照英: MALDI-TOF MSにおけるタンパク質のシグナル増強 Part4 日本薬学会 第127年会 2007年3月 富山
- 5) Yukimi Sakurai, Takuo Suzuki, Hiroshi Kawai, Akiko Ishii, Tetsu Kobayashi, Hisayuki Ohata, Kazuo Honda, Teruhide Yamaguchi, Toru Kawanishi : SIMULTANEOUS IMAGING OF CASPASE 9 AND 3 ACTIVATION IN ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS-INDUCED CELL DEATH. 第80回日本薬理学会年会 2007年3月 名古屋
- 6) 櫻井教美、鈴木琢雄、河合 洋、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、山口照英、川西 徹: 小胞体ストレスによるアポトーシス誘導時のカスパーゼ 3,9 活性化の解析 バイオイメーキング学会 2006年10月 盛岡
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

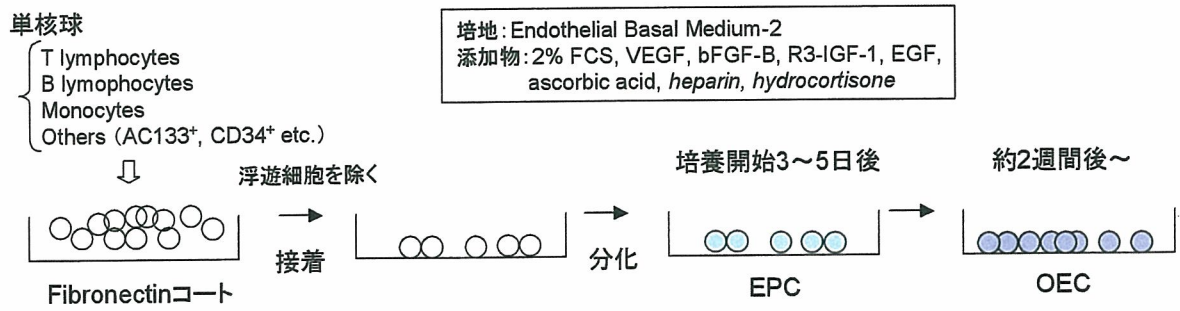


Fig.1 血液由来单核球からのEPCとOECの一般的な誘導方法


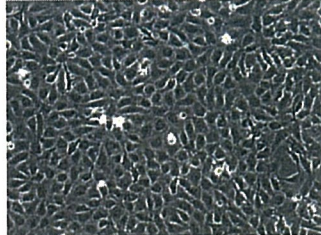
	EPC	OEC
形態	 <p>061023 B M1 DIC 50% .jpg</p> <p>Spindle shape (or round shape ?)</p>	 <p>4-A-3 061002 50%.jpg</p> <p>Cobblestone</p>
特徴	細胞のheterogeneity高い 増殖性低い	均質な細胞 増殖性高い
機能	血管形成を促進する サイトカイン等を放出	新生血管に取り込まれる
臨床応用例	あり	なし
有用性確保のための課題	増幅法の確立 特性解析	誘導効率の改善 (現状: 1コロニー/10 ⁷ MNCs程度) 特性解析

Fig.2 EPCとOECの特徴

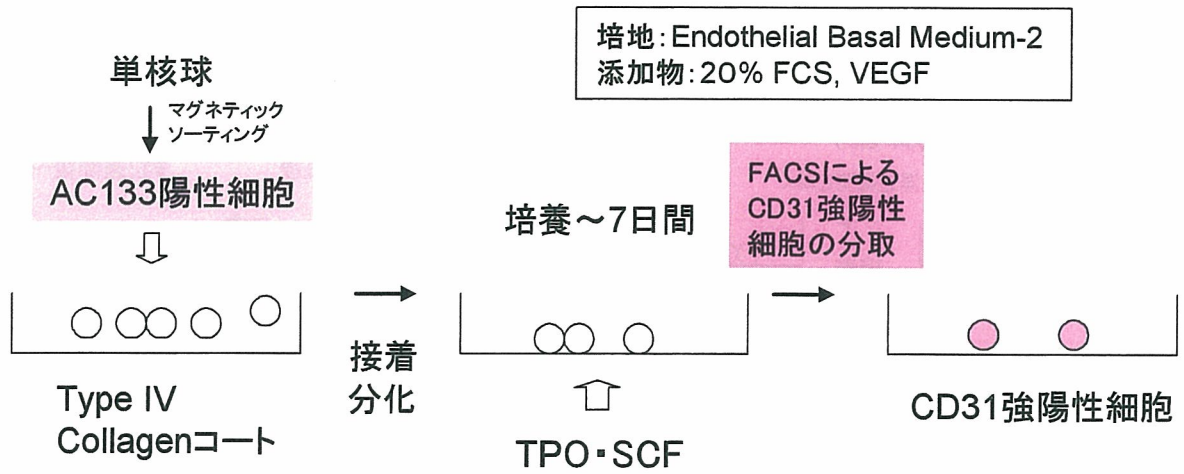
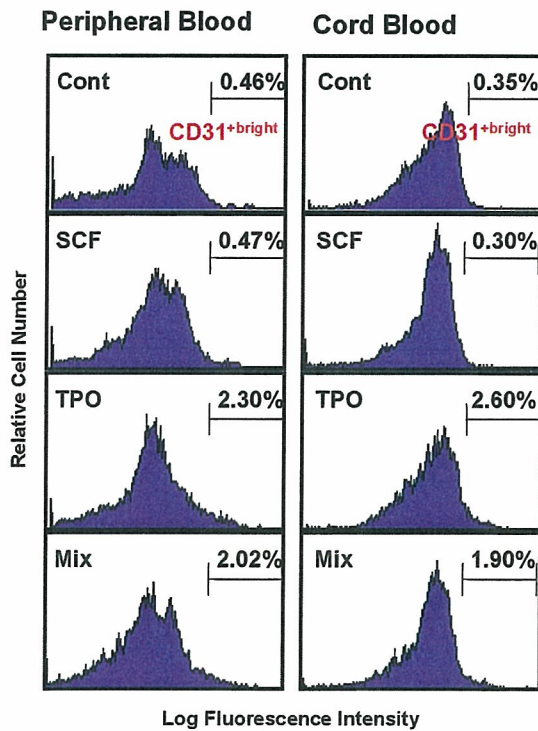


Fig.3 AC133陽性細胞からのCD31強陽性細胞の誘導

A. SCF・TPO存在下のAC133陽性細胞から出現するCD31強陽性細胞分画の変化



B. SCF・TPO存在下のAC133陽性細胞から出現するCD31強陽性細胞の絶対数

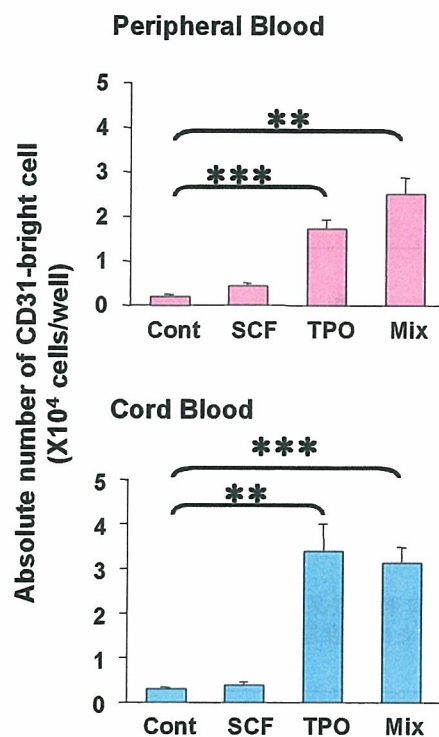


Fig.4 CD31強陽性細胞出現に対するTPOの効果(1)

A. TPO存在下のAC133陽性細胞の経時的な増殖変化

B. 培養3日目のAC133陽性細胞におけるTPO受容体、CD31、AC133の発現

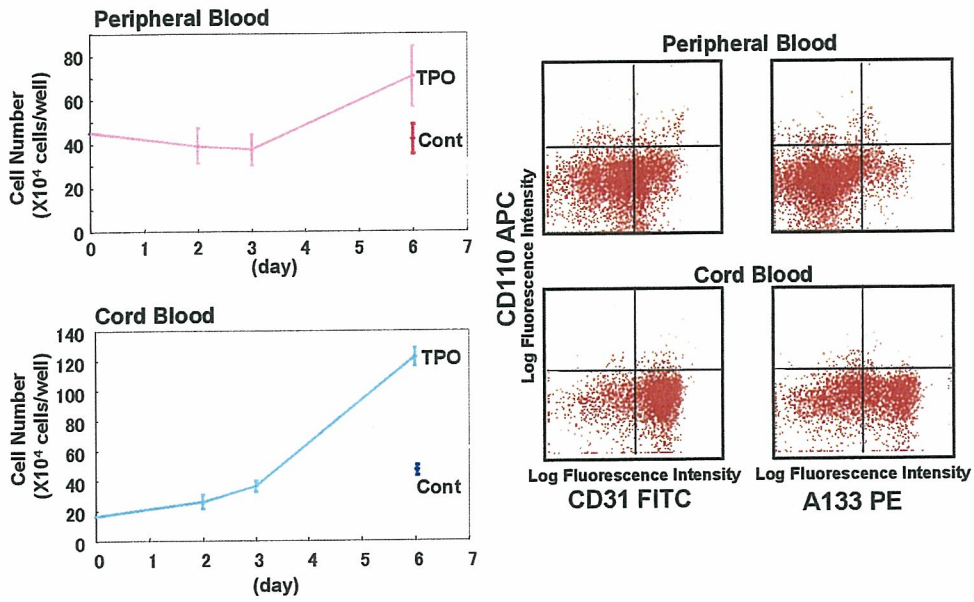


Fig.5 CD31強陽性細胞出現に対するTPOの効果(2)

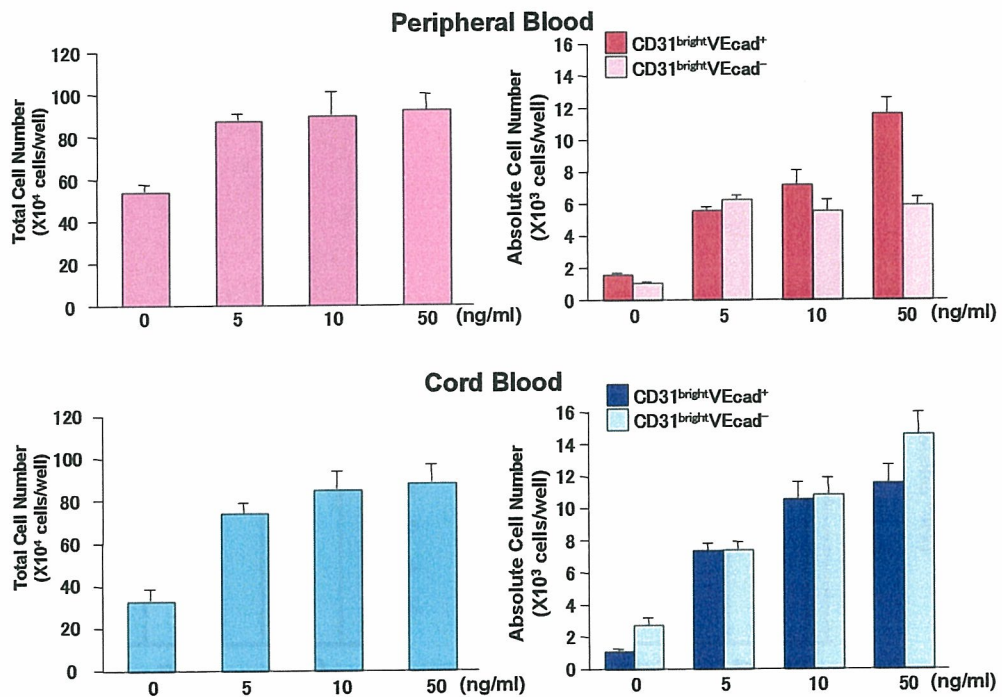


Fig.6 CD31強陽性細胞出現に対するTPOの効果(3)

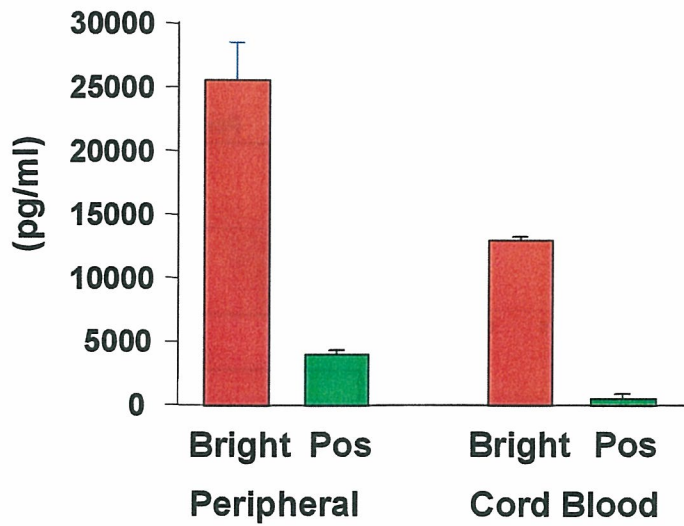


Fig.7 CD31強陽性細胞とCD31陽性細胞のIL-8産生の比較

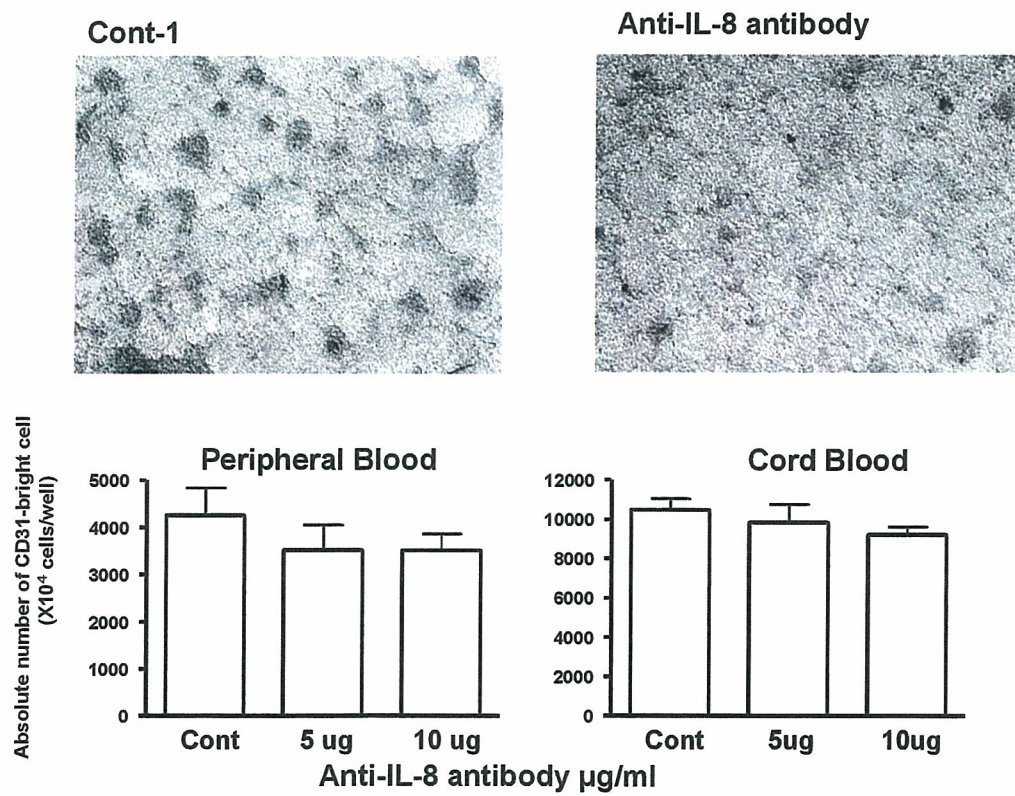


Fig.8 EPC誘導に対する抗IL-8抗体の効果

全血よりLymphoprep tube
を用いて単核球画分を分離

↓

FNコートプレート上に播種し、
培養開始

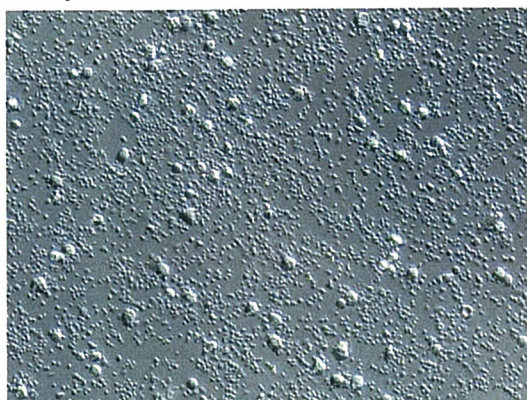
↓

Day1: 浮遊細胞を除去

↓

接着した細胞の培養を継続

Day 1



MIX-2 061205-2 50% .jpg

Fig.9 Fibronectinコートプレートに接着した細胞

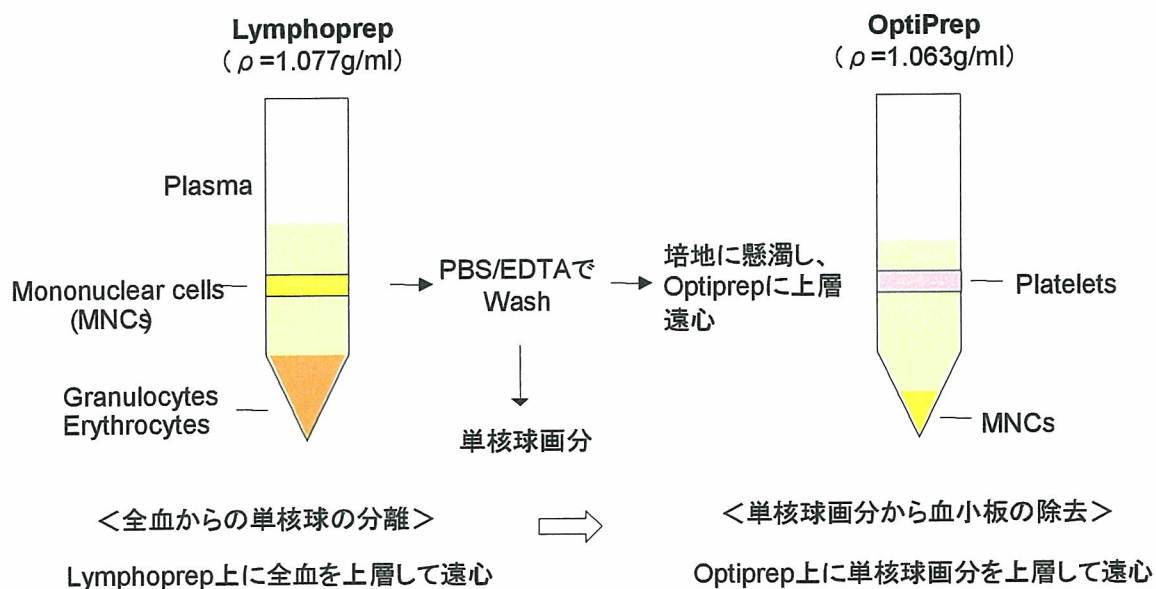


Fig.10 単核球画分の調製と血小板の除去

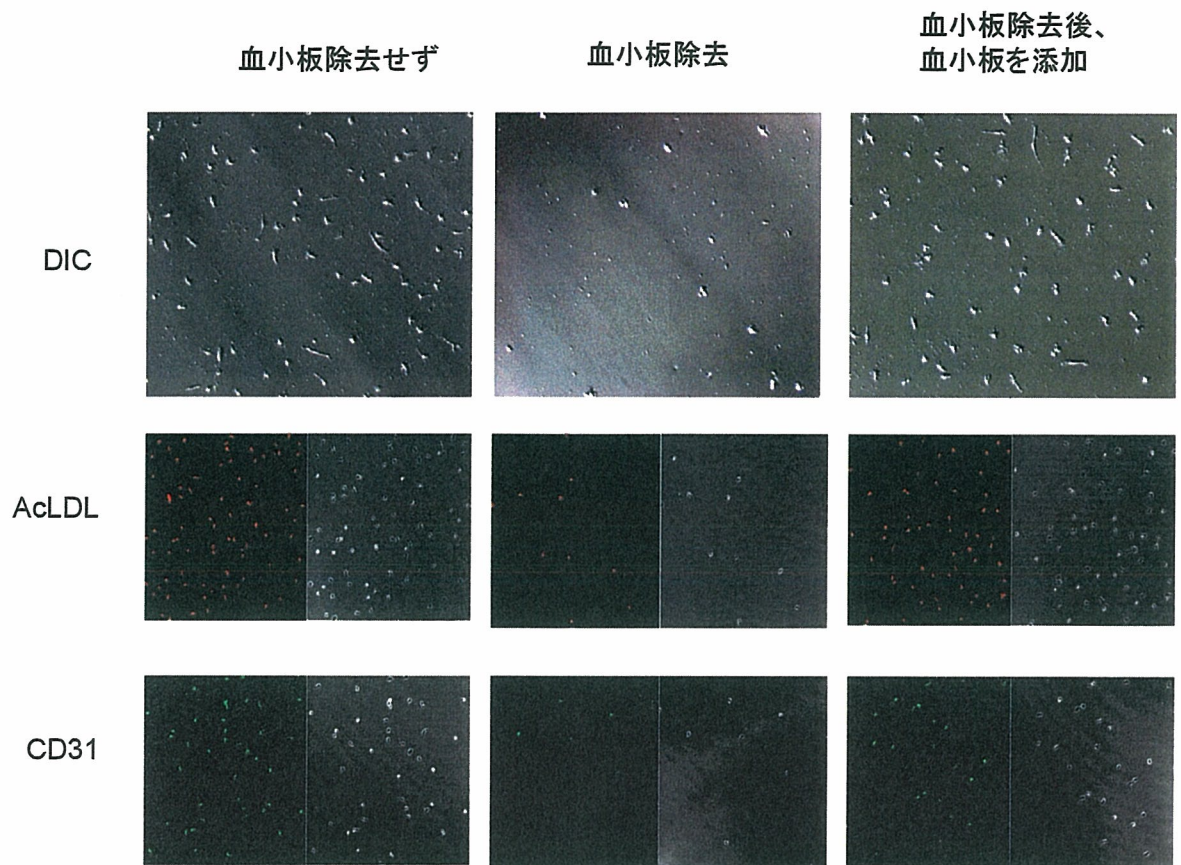


Fig.11 単核球からのEarly EPC誘導に対する血小板の影響(Day6)

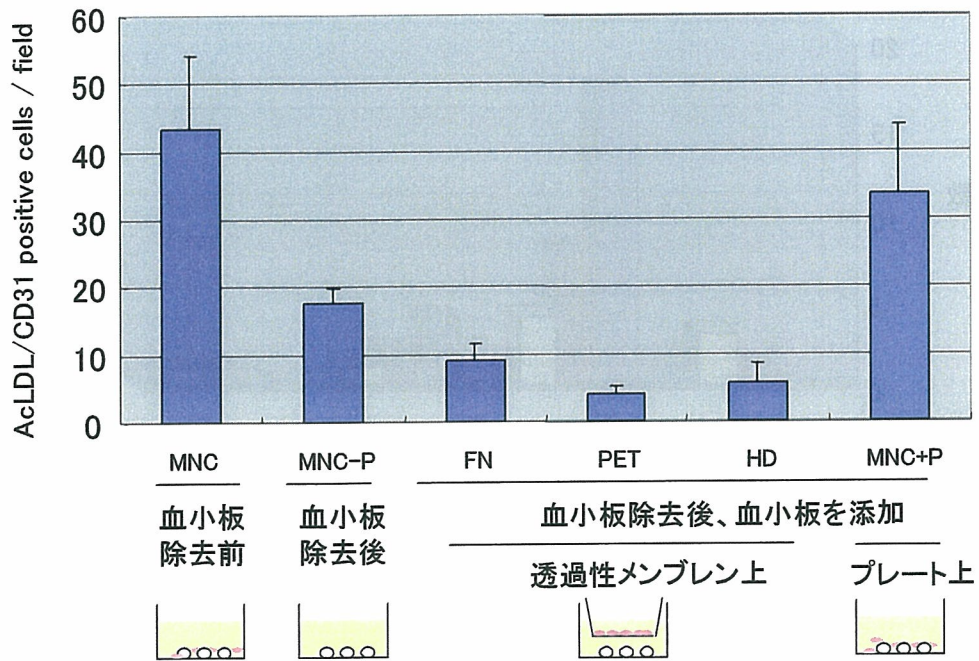


Fig.12 EPC誘導に対する血小板の影響

透過性メンブレン(ポアサイズ0.4 μ m)

FN: Fibronectinコート

PET: 通常のメンブレン

HD: ポア高密度

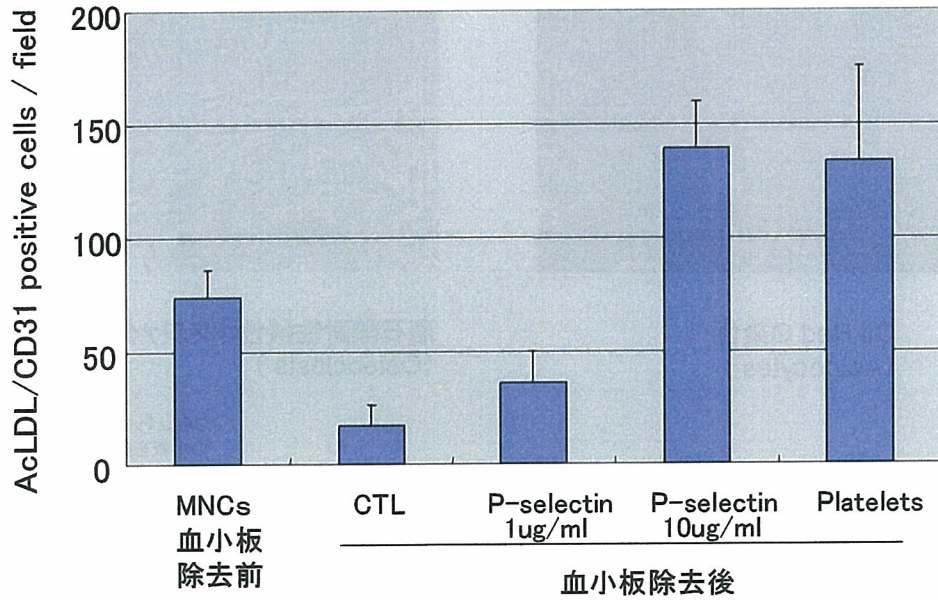


Fig.13 EPC誘導に対する組換えP-selectin(可溶型)の効果

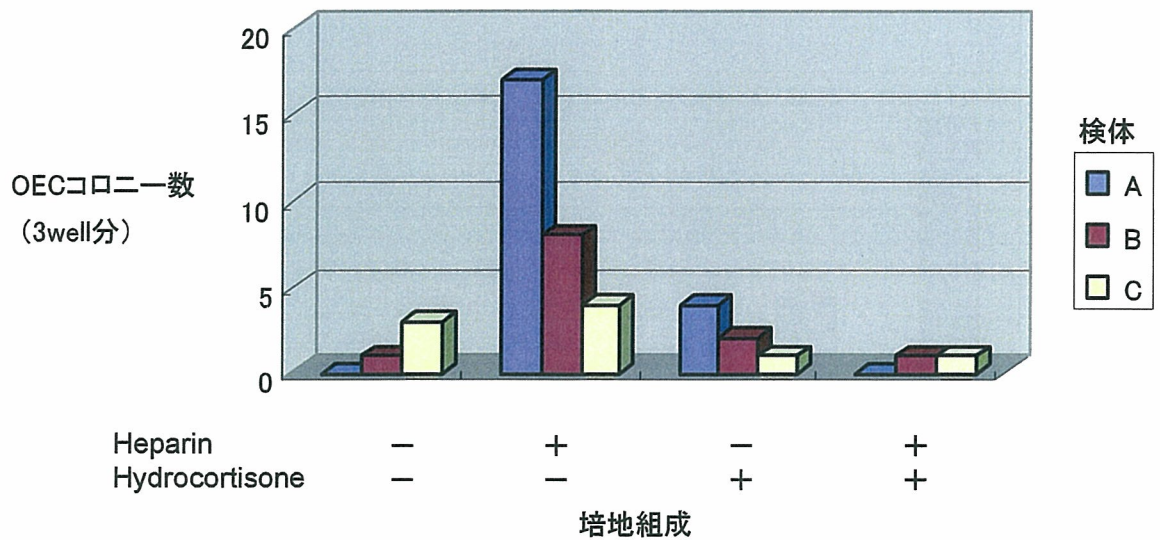
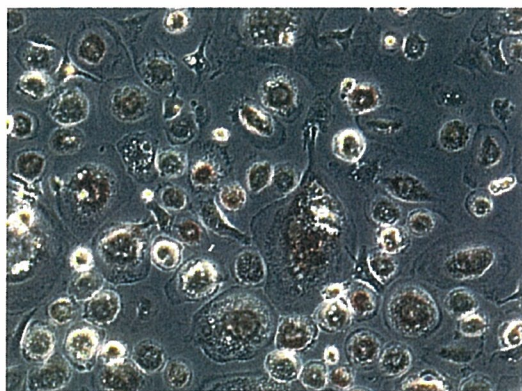
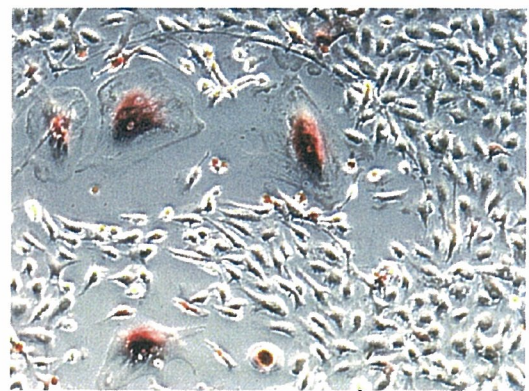


Fig.14 OEC出現に対する培地組成の影響(6wellプレートでの検討、3バッチ)



Oil Red O染色
(Adipocytes)



酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性染色
(Osteoclasts)

OECバッチ4
血小板を多量に添加したwell

Fig.16 単核球の長期培養で出現したOEC以外の細胞

Day0 単核球を播種
(6wellプレート)

Day13 OECコロニー出現

Day26 6cm dishに継代

Day33 10cm dishに継代

Day36 10cm dish3枚に継代

Day46 ストックをとり、10cm dishに継代(写真A)

Day50 10cm dish3枚に継代

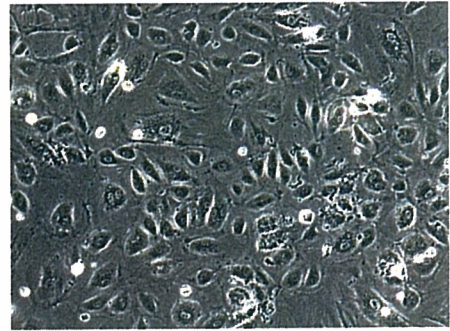
Day57 ストックをとり、10cm dishに継代(写真B)

Day60 10cm dish3枚に継代

(増殖停止)

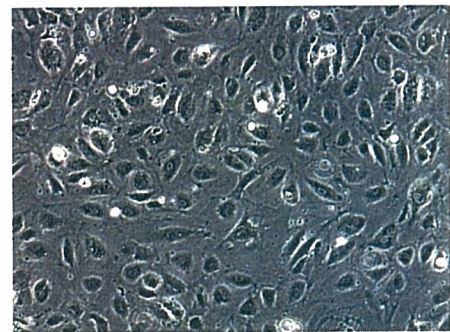
Day71 ストック(写真C)

A) Day 46



2R-3-2-060828

B) Day 57



2R-3-2-060908

C) Day 71



2R-3-2-060922

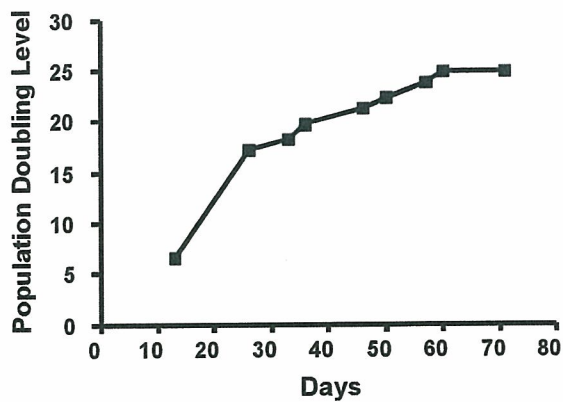
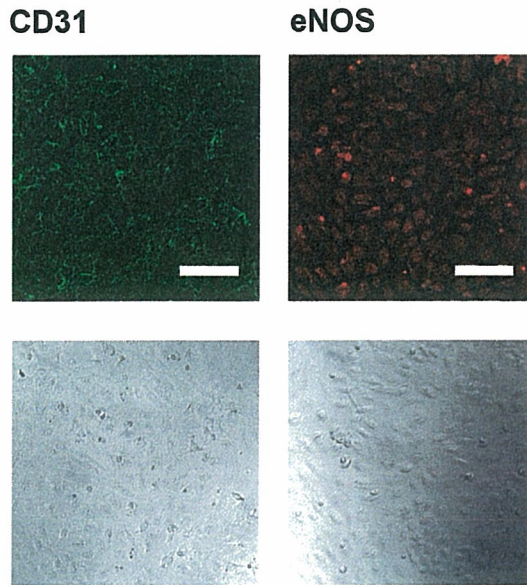


Fig.15 OECの増殖と形態の変化

A. 血管内皮細胞である同定



B. IL-8受容体発現

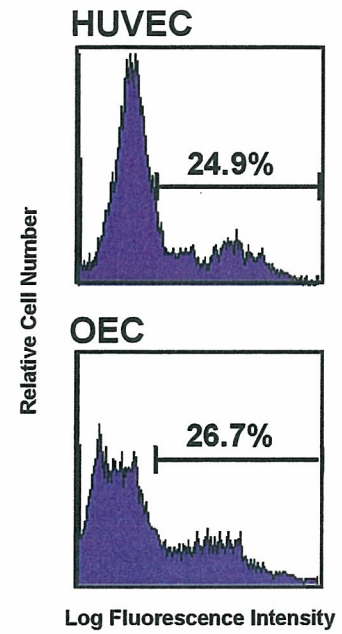


Fig.17 臍帯血由来OECが血管内皮細胞である同定とIL-8受容体発現

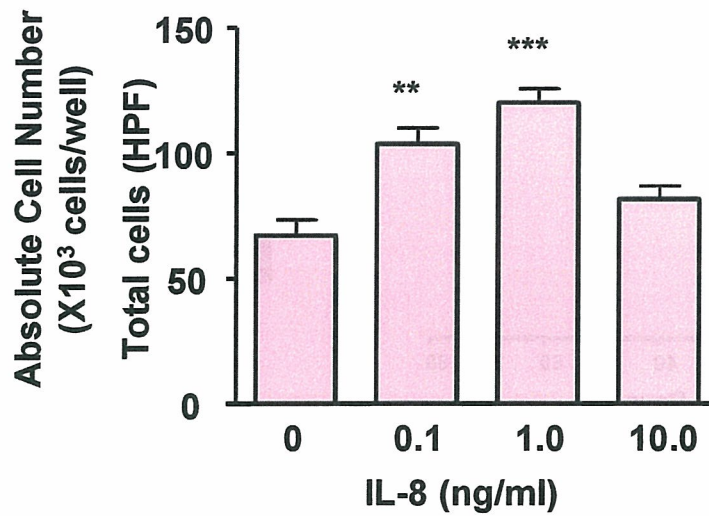


Fig.18 OECにおけるIL-8の遊走促進効果