

200706008A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療等研究事業

間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の
基礎及び臨床研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北村 惣一郎

平成20（2008）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等研究事業

間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の
基礎及び臨床研究

目 次

I. 総括研究報告	
間葉系幹細胞を用いた心筋血管再生療法の基礎及び臨床研究	1
北村 惣一郎	
II. 分担研究報告	
1. 脂肪組織および骨髄由来間葉系幹細胞における遺伝子・分泌タンパク発現の比較検討	5
北村 惣一郎	
2. 間葉系幹細胞シートを用いた房室ブロック治療	7
永谷 憲歳	
盛 英三	
3. 同種間葉系細胞の移植研究	9
大串 始	
4. 重症末梢動脈閉塞症に対する間葉系幹細胞移植治療（微小血管造影法への応用）	13
竹下 聡	
5. 間葉系幹細胞シート、骨格筋芽細胞シートから産生される	15
清水 達也	
6. 内側絨毛膜由来間葉系幹細胞による心血管保護作用の検討	18
宮武 邦夫	
中谷 武嗣	
7. 重症心不全患者における間葉系幹細胞活性化阻止因子の探索	21
八木原 俊克	
小林 順二郎	
8. 抗酸化ストレス蛋白遺伝子を導入した間葉系細胞による細胞治療の試み： ラット心筋梗塞モデルにおける検討	23
山岸 正和	
9. 間葉系幹細胞による心筋血管再生療法 -NOGAシステムを用いた臨床成績-	25
清水 渉	
10. 多孔性高分子フィルムを用いた心筋組織・末梢血管組織の再生	27
西川 雄大	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

間葉系幹細胞を用いた心血管再生療法の基礎及び臨床研究

主任研究者 北村 惣一郎 国立循環器病センター 総長

研究要旨 拡張型心筋症や虚血性心筋症に対して自己骨髄間葉系細胞の移植による心血管再生療法の基礎および臨床研究を行った。慢性心不全に対する骨髄間葉系細胞移植に関しては、パイロット臨床試験により長期安全性と有効性を確認した。また、脂肪由来間葉系細胞シートを用いた心不全治療研究では、大動物（ブタ）を用いた前臨床試験を行い成果を挙げた。基礎的研究では皮下脂肪由来の間葉系細胞と内側絨毛膜由来間葉系幹細胞の心血管保護作用を証明した。また、今後の再生医療として注目されている他家移植の可能性に関して検討し、間葉系幹細胞は免疫抑制剤を用いることによって同種他家移植を実施できる可能性を示した。

分担研究者

永谷憲歳 国立循環器病センター研究所
再生医療部 部長

大串 始 産業技術総合研究所
セルエンジニアリング研究部門
グループ長

竹下 聡 国立循環器病センター
心臓血管内科 医長

清水達也 東京女子医科大学先端生命医科学
研究所 講師

盛 英三 国立循環器病センター研究所
心臓生理部 部長

宮武邦夫 独立行政法人国立病院機構
大阪南医療センター 院長

中谷武嗣 国立循環器病センター
臓器移植部 部長

八木原俊克 国立循環器病センター 副院長

山岸正和 金沢大学大学院医学系研究科
教授

小林順二郎 国立循環器病センター

心臓血管外科 医長

清水 渉 国立循環器病センター
心臓血管内科 医長

西川雄大 国立循環器病センター研究所
先進治療機器開発室 室長

A. 研究目的

虚血性心疾患および拡張型心筋症などによる難治性心不全は心臓移植の適応であるが、ドナーの不足により十分な移植医療ができないのが現状である。近年、骨髄間葉系細胞の中には多分化能を有する幹細胞が存在し、心筋、血管、神経、脂肪及び骨に分化することが明らかとなってきた。我々は心不全動物の心筋内へ間葉系幹細胞を移植すると心筋と血管が同時に再生され、心機能が改善されることを証明してきた。これらの基礎的検討をもとに、骨髄間葉系細胞を用いた難治性心不全治療・狭心症治療を開発し臨床応用を行った。また次世代の細胞移植治療として間葉系幹細胞＋細胞シートまたは成長因子によるハイブリ

ット再生治療による心筋再生療法の開発を行った。また、新たな細胞移植治療として同種他家移植の可能性に関して、骨髄間葉系細胞を用いて検討した。一方近年、皮下脂肪が細胞ソースとして注目されているが、骨髄由来と皮下脂肪由来の間葉系細胞の差異について詳細な検討を行い、皮下脂肪の細胞ソースとしての可能性を検討した。同時に、医療廃棄物として捨てられる卵膜の細胞ソースとしての可能性を検討した。

B. 研究方法と結果

1. 自己間葉系細胞を用いた難治性循環器疾患に対する心筋血管再生療法の臨床応用

難治性心不全患者 11 人、重症狭心症患者 2 人を臨床試験にエントリーし、難治性慢性心不全患者 8 人、重症狭心症患者 2 人に対して間葉系幹細胞移植を行った。患者自身の骨髄液 15-20mL と自己末梢血 400-600mL を採取し、末梢血から分離した血清を用いて約 3 週間培養した。細胞移植が施行できなかった 3 例の内訳は、細胞増殖不良による中止 1 例、細胞移植待機時に急性腸炎発症 1 例、術前カテーテル検査や骨髄穿刺後の心不全増悪による中止 1 例であった。心不全患者に対しては NOGA システムを用いて間葉系細胞を経カテーテル的に心内膜側より約 40 ヲ所に細胞移植を行った（北村、永谷、清水、山岸、宮武）。細胞移植 2 ヲ月後の評価では左室駆出率の有意な改善が得られた。また、細胞移植後の安全性に関しては、細胞移植 2・6・12 ヲ月後に心臓 CT や 24 時間心電図らを行ったが、致死的不整脈の増悪や心内骨形成らは認められなかった。1 例の心不全患者において細胞移植 1 ヲ月後に肺炎を起こしたが、細胞移植との因果関係はないと安全委員会で判断された。また、従来の治療法で改善困難な領域を有する重症虚血性心疾患患者を対

象として、冠動脈バイパス術による外科的血行再建と同時に、自己骨髄より採取培養された間葉系細胞の移植を行った。狭心症患者に対して冠動脈バイパス術時に心外膜より間葉系幹細胞移植を行った。細胞移植を行った部位の収縮性の改善が確認できた。一方、明らかな有害事象は認められなかった（北村、小林、中谷）。

2. 間葉系細胞+細胞シート、成長因子によるハイブリット再生治療の開発

間葉系細胞+細胞シートによる心筋様組織再生療法の開発を行った（清水、西川、永谷、中谷、八木原、盛、北村）。まず、種々の細胞ソースから間葉系細胞を採取し、間葉系細胞シートを作製した。これらの細胞シートから分泌される血管新生関連サイトカイン蛋白質・遺伝子の発現量を調べた。また、皮下脂肪由来間葉系細胞を温度応答性培養皿上で培養し、単層の細胞シートグラフトを作製し、心筋梗塞後 4 週間経過した慢性心不全ラットの心外膜表面に移植し、治療効果を検討した。単層の皮下脂肪由来間葉系細胞をラット慢性心筋梗塞モデルの心外膜表面に移植すると、血管再生及び心筋分化を伴いながら増殖し、厚みのある組織を構築した。更に、心不全ラットの心機能及び予後を劇的に改善させた。また、大動物（ブタ心筋梗塞モデル）を使用した脂肪組織由来の単層性間葉系細胞シート移植治療の前臨床試験を施行したが、虚血部位の血管新生を促進し、心機能を改善させる可能性が示され、さらに懸念されていた不整脈の発症もなく、同治療の安全性も示された。

3. 同種他家移植の有効性の検討

同種他家移植の可能性について動物モデルで検討した。 *In vitro* 及び *in vivo* において細胞

分化能をアルカリ・ホスファターゼ(ALP)活性で、免疫反応をリンパ球共培養と組織学的分析を行った。他家間葉系細胞を移植した場合、FK506 (タクロリムス水和物) 免疫抑制剤で処理したときのみ他家間葉系細胞は生着し細胞分化する事が分かった。つまり、免疫抑制剤を用いることによって同種他家移植を実施できる可能性を示すことができた。

4. 脂肪組織および骨髄由来間葉系細胞における遺伝子・分泌タンパク発現の比較検討

骨髄由来間葉系細胞は発生や形態形成に関与する遺伝子を多く発現していたのに対し、脂肪組織由来間葉系細胞は細胞増殖や免疫応答に関与する遺伝子を多く発現していた。分泌タンパクでは、脂肪組織由来間葉系細胞は骨髄由来間葉系細胞と比較し HGF、VEGF などの細胞保護、血管新生に関する因子をより多く分泌しており、ASC は BM-MSc 以上の組織再生効果が期待出来る移植細胞ソースと考えられた (北村、永谷)。

5. 内側絨毛膜由来間葉系幹細胞による心血管保護作用の検討

出産後に廃棄される胎盤や卵膜などの胎児付属物の、再生医療資源として可能性を検討した。ヒト卵膜から羊膜、内側絨毛膜、および外側絨毛膜それぞれに由来する間葉系幹細胞 (MSC) を分離することに成功し、3種類の卵膜由来 MSC の液性因子を介した細胞保護効果について検討した。同意を得て提供されたヒト卵膜を羊膜、内側絨毛膜、外側絨毛膜に分離し、それぞれの組織から MSC を分離・培養した。各組織由来の MSC は、その形態や表面抗原は類似し、いずれの MSC も多分化能を有していたが、増殖因子の分泌パターンは異なっていた。内側絨毛膜由来 MSC の培養上清は、

他の卵膜由来 MSC のそれと比較し、血清飢餓や低酸素のストレス刺激下において、血管内皮および心筋細胞に対しより細胞保護的な作用を示した。以上より、内側絨毛膜由来 MSC は心血管病変に対する再生医療材料としてより有用であると考えられた。

D. 考察

骨髄間葉系細胞による心血管再生治療の安全性と有効性に関して、基礎および臨床研究を引き続き行った。臨床試験において拡張型心筋症などの難治性心不全に対する1年以上の長期にわたる安全性と有効性を確認した。また、新たな治療法として温度感応性細胞シートによるハイブリット再生治療による心筋再生療法を開発し、大動物を用いた前臨床試験で安全性と有効性を確認した。脂肪由来間葉系細胞やした。細胞移植のみでは効果が不十分な症例に対する治療として期待される。さらに、脂肪組織由来間葉系細胞や内側絨毛膜由来間葉系幹細胞が新たな再生医療ソースとして使用できることを証明し、間葉系幹細胞は他家移植にも使える可能性が示された。現段階では臨床に用いることができる最も魅力的な細胞であると思われた。

E. 結論

慢性心不全患者を対象とした臨床試験で、骨髄間葉系細胞移植の長期安全性と有効性を確認した。基礎研究としては、次世代の細胞移植治療として間葉系幹細胞+細胞シートを開発し、また、脂肪組織由来間葉系細胞や内側絨毛膜由来間葉系幹細胞が新たな再生医療ソースとして使用できる可能性、間葉系幹細胞が他家移植にも使える可能性を示した。以上より間葉系細胞は現段階では臨床に用いることができる最も魅力的な細胞であると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N. Effect of Hypoxia on Gene Expression of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Cells. Stem Cells. 2007 (in press)
2. Jo JI, Nagaya N, Miyahara Y, Kataoka M, Harada-Shiba M, Kangawa K, Tabata Y. Transplantation of Genetically Engineered Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in Rats With Myocardial Infarction: Benefit of a Novel Nonviral Vector, Cationized Dextran. Tissue Eng. 2007 (in press)
3. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. J Mol Cell Cardiol. 2007; 42: 88-97.
4. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. Nat Med. 2006; 12: 459-465.

2. 学会発表

- ①永谷憲歳：骨髄間葉系細胞移植による心不全治療。第6回日本再生医療学会。パシフィコ横浜（横浜市）、3月14日、2007年
- ②永谷憲歳：脂肪組織・胎児付属物由来間葉系細

胞を用いた心血管保護再生治療。第6回日本再生医療学会。パシフィコ横浜（横浜市）、3月14日、2007年

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特願
2. 実用新案登録
なし

脂肪組織および骨髄由来間葉系幹細胞における遺伝子・分泌タンパク発現の比較検討

主任研究者 北村総一郎 国立循環器病センター 総長

研究要旨 心血管再生領域における細胞移植療法において、新たな細胞ソースとして脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)が注目されている。我々は、ASCと骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MS C)における差異を、遺伝子や分泌タンパク発現に関して網羅的な比較検討を行った。BM-MS Cは発生や形態形成に関与する遺伝子を多く発現していたのに対し、ASCは細胞増殖や免疫応答に関与する遺伝子を多く発現していた。分泌タンパクでは、ASCはBM-MS Cと比較しHGF、VEGFなどの細胞保護、血管新生に関する因子をより多く分泌しており、ASCはBM-MS C以上の組織再生効果が期待出来る移植細胞ソースと考えられた。

A. 研究目的

間葉系幹細胞(MSC)は骨髄や脂肪を始め多くの組織に存在する。最近、心血管再生療法における移植細胞ソースとして骨髄由来MSC(BM-MS C)が注目されているが、脂肪組織由来MSC(ASC)もまた新しい細胞ソースとして考えられている。今回、ASCとBM-MS Cにおいて、増殖能、分化能、遺伝子発現、分泌タンパク発現の相違に関し比較検討を行った。

B. 研究方法

ASCとBM-MS Cは、各々、6-8週齢Lewis系雄性ラットの鼠径部皮下脂肪と大腿骨骨髄から採取した。実験には継代数2-3の培養MSCを用い、増殖能、脂肪への分化能、およびマイクロアレイを用いて遺伝子発現の差異、ELISA法にて分泌タンパク発現の差異を検討した。

C. 研究結果

ASCは、BM-MS Cと比較して有意に高い増殖能を有していたが、脂肪への分化能に差異は認められなかった。マイクロアレイによる解析では31,099遺伝子のうち、BM-MS Cと比較してASCに3倍以上発現増加している遺伝子が571(1.8%)認められた。その中には、細胞分裂に関する遺伝子(CDK2, cyclinB1など)、免疫反応(IL-1 α , IL-6など)が含まれていた。一方、BM-MS Cにお

いて3倍以上発現増加している遺伝子は571(1.8%)あり、その中には、形態形成に関する遺伝子(cadherin13, elastinなど)や発生に関与する遺伝子(TGF β 2, Wisp2など)が含まれていた。さらに、ELISA法では、HGF、VEGFなどの増殖因子がASCにおいて有意に多く分泌されていた。

D. 考察

ASCはBM-MS Cと比較して、低侵襲的に獲得できる移植細胞ソースとして期待されている。移植に必要な細胞数を確保する上で増殖速度の速いASCは、急性疾患に対する移植細胞として適していると考えられる。また、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析では、ASCはBM-MS Cに比べ、細胞周期に関する遺伝子やSODなどの抗酸化作用を有する遺伝子、炎症性サイトカインの遺伝子発現が高く、BM-MS Cとは異なる機序で移植効果を発揮することが考えられた。また、ASCはVEGFやHGFなどの増殖因子をより多く分泌していることから、BM-MS Cと比較して細胞保護作用や血管新生作用がより多いと考えられ、虚血性疾患にするその細胞移植効果が期待される。

E. 結論

BM-MS Cと比較してASCはより増殖能が高く、HGFやVEGFなどの増殖因子をより多く分泌して

いることから、ASCは組織再生に効果が期待される再生医療材料として有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyahara Y, Ohnishi S, Obata H, Ishino K, Sano S, Mori H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Beraprost sodium enhances neovascularization in ischemic myocardium by mobilizing bone marrow cells in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 349: 1242-1249.
2. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42: 88-97.
3. Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N. Effect of Hypoxia on Gene Expression of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Cells. *Stem Cells.* 2007; 25: 1166-1177.
4. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett.* 2007; 581: 3961-3966.

2. 学会発表

中西千明、山岸正和、大西俊介、北村惣一郎、永谷憲歳

脂肪組織由来と骨髄由来間葉系幹細胞の遺伝子発現、分泌タンパク質の差異の検討

第11回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
2007年11月、東京

H. 知的財産権の出願

・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

間葉系幹細胞シートを用いた房室ブロック治療

分担研究者 永谷憲歳 国立循環器病センター研究所 再生医療部 部長
分担研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所 心臓生理部 部長

研究要旨 房室ブロックの原因として、房室結節-ヒス束における線維化、変性が最も多いとされている。間葉系幹細胞を完全房室ブロックモデルラットの房室結節周囲に直接注入したところ、房室伝導の改善を認めた。その機序として、間葉系幹細胞のパラクライン効果による房室結節周囲の線維化抑制が考えられた。間葉系幹細胞移植が房室ブロックに対する新たな治療法となる可能性がある。

A. 研究目的

従来、症候性の完全房室ブロックに対しては永久ペースメーカー植込みが唯一の治療法であった。しかし、ペースメーカー治療は必ずしも患者の quality of life を改善するとはいえない。そこで、多分化能を持つ骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の注入による刺激伝導系の興奮伝播の改善効果を検討した。

B. 研究方法

ラットの房室結節周囲にエタノールを注入し、完全房室ブロックモデルを作成した。モデル作成5日後に完全房室ブロックが維持されている持続性房室ブロック例の房室結節周囲に間葉系幹細胞 (MSC; 2×10^6 個) と MSC 培養液の注入を行った。移植後の心電図記録で房室伝導の改善度を確認し、14日後に組織学的検査を行った。

C. 研究結果

注入後14日間で、MSC群15例中5例で、完全房室ブロックから1:1伝導への改善を認めたが、コントロール (PBS) 群では伝導の改善が得られなかった (図1)。組織学的検査では、房室結節内の線維化が有意に抑制されていた (図2)。さらに、MSC群では線維化促進因子である TGF- β や MMP-2、MMP-9 の発現が抑制されていた一方、線維化抑制因子である hepatocyte growth factor (HGF) や interleukin-10 (IL-10) の発現が亢進していた。また培養実験において、MSC の培養上清は心線維

芽細胞の増殖を抑制し、線維化抑制因子である hepatocyte growth factor (HGF) や interleukin-10 (IL-10) を多く分泌していた。さらに、MSC 培養上清群15例中2例で完全房室ブロックから1:1伝導への改善を認めた。

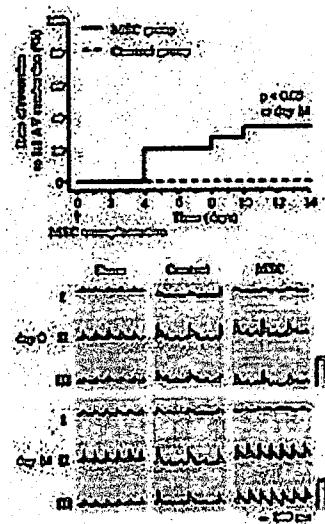
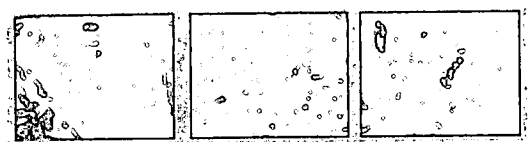


図1: MSC注入による完全房室ブロックの改善



Sham ラット PBS 注入ラット 間葉系細胞移植ラット

図2: 房室結節の線維化抑制 (Masson染色)

3. その他



Sham ラット PBS 注入ラット 間葉系細胞移植ラット

図3：房室結節のTGF- β 発現抑制

D. 考察

MSCは血管内皮細胞や心筋細胞への分化能を有するのみならず、パラクライン効果により心筋血管再生作用をもたらすことが知られている。今回、動物モデルに対してMSCを移植し、15例中5例で房室伝導が改善した。また、房室結節内の線維化およびTGF- β の発現が有意に抑制されていた。更に、間葉系幹細胞の培養上清はHGFやIL-10を多く分泌していた。これらのことから、MSCのパラクライン効果による線維化抑制が房室伝導の改善に大きく寄与していると考えられた。

E. 結論

MSCの移植は動物モデルにおいて主に線維化抑制効果により房室ブロックを改善し、その進行を抑制できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohnishi S, Ohgushi H, Kitamura S, Nagaya N.

Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Int J Hematol.* 2007;86:17-21.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特願

2. 実用新案登録

なし。

同種間葉系細胞の移植研究

分担研究者 大串 始 産業技術総合研究所、セルエンジニアリング研究部門

研究要旨：

我々は、循環器系疾患患者より間葉系細胞を培養し、そして増殖した間葉系細胞を用いて再生医療技術の開発を国立循環器病センターと行なっている。現在までに、約10例の心疾患患者由来の間葉系細胞が培養増殖され移植されている。間葉系細胞の培養増殖には患者より、細胞源として骨髓穿刺による骨髓採取と、培養細胞の栄養源であり増殖因子を含む血清を得るために採血を行なっている。これらの行為は、比較的に重篤な患者が多い循環器系疾患患者には、重大な有害事象を誘引する危険性がある。また間葉系細胞の必要数を準備するのに約1ヵ月の培養期間が必要で、時間的余裕の無い重度もしくは急性疾患患者には対応できない可能性がある。今回、我々が移植に用いてきた間葉系細胞には多分化能の他に強力な免疫抑制作用が報告されているので、同種他家移植の可能性について動物モデルで検討した。*in vitro*及び*in vivo*において細胞分化能をアルカリ・ホスファターゼ(ALP)活性で、免疫反応をリンパ球共培養と組織学的分析を行なった結果、他家間葉系細胞を移植した場合、FK506（タクロリムス水和物）免疫抑制剤で処理したとき、他家間葉系細胞は生着し細胞分化する事が分かった。つまり、免疫抑制剤を用いることによって同種他家移植を実施できる可能性を示すことができた。

A. 研究目的

我々はヒト骨髓より間葉系細胞を増殖し、この増殖間葉系細胞を細胞懸濁液としたのちに心不全患者の心筋内への移植治療する再生医療を進めている。間葉系細胞は骨髓より比較的容易に大量培養が可能で、年齢を問わず得ることが知られている。その為、移植する細胞は自家細胞が用いられてきたが、心疾患患者では低血圧等の病状により骨髓採取や採血を行なう事が危険で出来ない場合がある。また採取が可能な場合でも、体調等の要素が不安定で骨髓採取と採血が同時にできない、採血を数回に分割する必要がある、投薬等で患者由来血清の成分が変化している可能性があり細胞増殖が悪い等の問題が発生している。よって同種他家細胞の移植研究を行なう事は、患者の安全性高めると共に、様々な重度又は急性疾患患者に対し非侵襲的に間葉系細胞が必要数準備でき再生医療の発展促進につながる。

間葉系細胞は、近年、免疫抑制作用を有している事が報告され同種他家移植を行なっても受入先

の免疫反応を逃れて生着が可能であるとされている。同種他家移植を行なった場合の、免疫抑制剤の必要性について免疫反応及び細胞の分化能から検証した。

B. 研究方法

間葉系細胞の調整

7週齢のF344ラット、6週齢のF344ラットの遠縁種ACIラット、および7週齢のF344ラットの近縁種LEWラットの大腿骨から骨髓を採取し、あらかじめ調製しておいた、牛胎児血清15%と抗生剤を含む液体培地と混合し、フラスコに播種した。1週間に3回、培地交換し、約2週間培養し増殖した接着細胞群を間葉系細胞とした。

間葉系細胞に対するnegative control cellとして7週齢F344ラット真皮をコラゲナーゼ処理し得られた線維芽細胞を同様に培養増殖させた。

間葉系細胞とリンパ球の共培養

リンパ球は、F344、ACI、およびLEWラットの脾臓よりFicoll-Paque PLUSを使用し密度勾配

遠心法により PBS に分離回収した。96 ウェルプレートに各ラットのリンパ球 5×10^5 cells と間葉系細胞 2×10^4 cells を播種し Mitomycin 処理を行なって細胞増殖を阻害した。この播種した細胞を抗原とし、F344 ラットのリンパ球 5×10^5 cells を細胞傷害性リンパ球として 96 ウェルプレートに播種して、各種ラットの間葉系細胞およびリンパ球細胞と共培養を行った。免疫反応が生じると細胞傷害性リンパ球は増殖することより、3 日後に増加した F344 ラットのリンパ球の細胞数を測定した。

in vitroでの分化能 (ALP 活性) 分析

F344、ACI、および LEW ラットの間葉系細胞と negative control cell である F344 ラットの繊維芽細胞を 12 ウェルプレートに細胞を 1×10^4 cells/cm² で播種した。培養培地に分化誘導因子として 10nM Dexamethasone (Dex)、10mM β -glycerophosphate (β -GP)、0.28mM L-Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt n-Hydrate を加え培養した。2 週間分化誘導を行い、間葉系細胞が骨芽細胞に分化している事をアルカリ・ホスファターゼ (ALP) 活性を指標にして Disodium 4-nitrophenylphosphate (pNPP) を基質に用いた測定を行なった。

in vivoでの分化能 (ALP 活性) 分析

F344、ACI、および LEW ラットの間葉系細胞と negative control cell である F344 ラットの線維芽細胞を培養し 1×10^7 cell/mL の細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液は、24 ウェルプレートに入れた、滅菌済みリン酸カルシウムセラミック上に播種した。細胞を播種したセラミックは、一晚培養し、無細胞のセラミックを negative control として培養培地に浸した。

7 週齢の F344 ラットを麻酔し、F344 ラット (自家) 間葉系細胞、線維芽細胞、および ACI と LEW ラット (他家) 間葉系細胞を播種したセラミックを皮下に移植した。移植後 2 週間は毎日、免疫抑制剤 FK506 (Prograf, Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd.) を投与し、その後は 1 日おきに投与した。

皮下より取り出したセラミックは洗浄後に、界

面活性剤を加え金属球により破碎した。回収した上清は、*in vitro*での ALP 活性分析で説明した pNPP を基質に用いた測定を行なった。

組織学的分析

皮下より取り出したセラミックは、ギ酸でカルシウムを脱灰し、ホルマリン緩衝液で固定処理した。その後、パラフィン包埋を行い、薄切し脱パラフィン後、ヘマトキシリンとエオシンによって染色した (HE 染色)。

C. 研究結果

in vitro での間葉系細胞の免疫抑制作用をリンパ球との共培養により図 1 の通りとなった。自家細胞である F344 ラットのリンパ球及び間葉系細胞では F344 ラットのリンパ球の増加はみられず免疫反応は起こらなかった。他家細胞である ACI 及び LEW ラットのリンパ球及び間葉系細胞では、F344 ラットのリンパ球が増加し免疫反応がみられたが、間葉系細胞では増加倍率は低く、免疫反応を抑制していた。

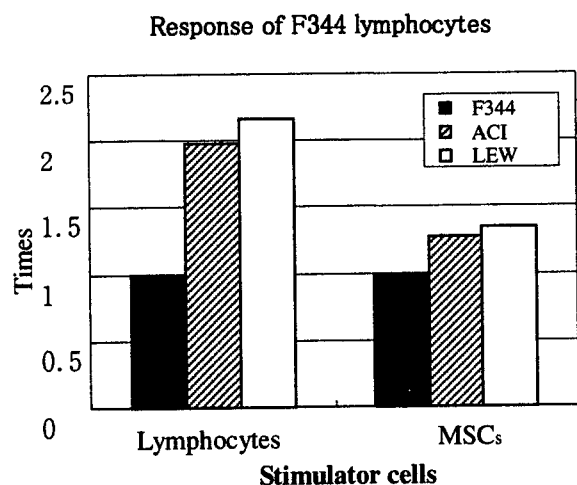


図 1 *in vitro*での免疫抑制作用

また *in vitro*での間葉系細胞の細胞分化の指標とした ALP 活性は図 2 の通りになった。分化誘導された F344、ACI 及び LEW ラットの間葉系細胞はラット間で ALP の差はあるが、どのラットも高 ALP 活性を示しており骨芽細胞に分化した事が分かった。negative control cell である F344 ラットの線維芽細胞には ALP 活性が見られなかった。以上より、

どの種類のラットの間葉系細胞も骨芽細胞に分化する能力があることを確認できた。

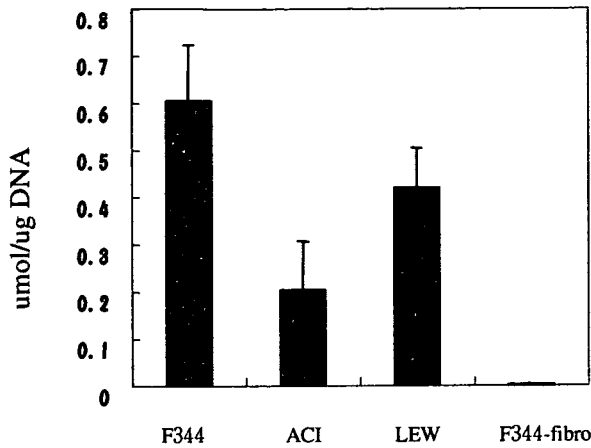


図2 In vitro ALP activity

*in vivo*での間葉系細胞の細胞分化の指標であるALP活性は図3の通りになった。FK506（免疫抑制剤）を投与していたラットではF344（自家）、ACI、LEW（他家）両方の間葉系細胞で高ALP活性を示しており、FK506を投与しなかったラットでは自家であるF344ラットの間葉系細胞しかALP活性がみられなかった。

negative control cellであるF344ラットの繊維芽細胞や、controlである無細胞からはALP活性が見られなかった。

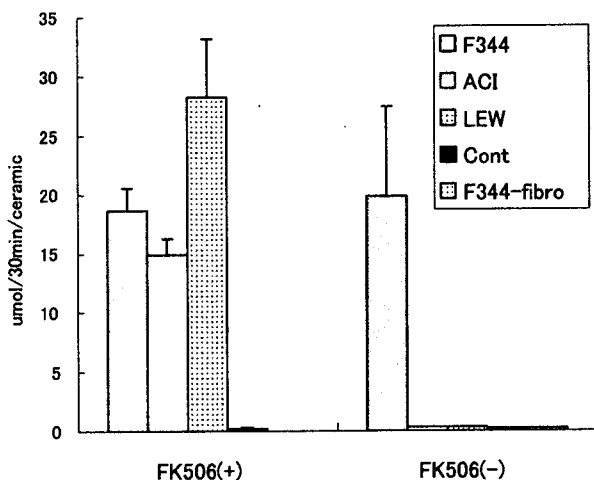


図3 In vivo ALP activity

間葉系細胞を播種したセラミックをラット皮下より摘出しHE染色した結果は図4の通りになった。FK506を投与したF344ラットではF344（自家）

及びACI、LEW（他家）両方の間葉系細胞が分化し生着していた（図4 a・b・c 黒矢印）。FK506の投与無しのF344ラットではF344（自家）の間葉系細胞だけが分化し生着していた（図4 d 黒矢印）。ACI、LEW（他家）ラットの間葉系細胞を移植した組織は炎症が見られ細胞の生着が見られなかった（図4 e・f 星印）。

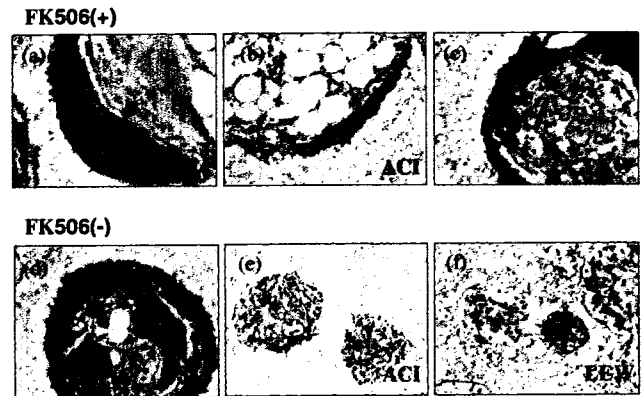


図4 組織染色

D. 考察

我々の目標の1つはとして同種他家間葉系細胞を再生医療分野で適用できるようにすることである。現在の移植には自家間葉系細胞の非凍結細胞を使用しているが、骨髄採取や採血による患者への負担、細胞増殖能が低い場合の培養期間長期化等の問題がある。他家間葉系細胞では、患者の負担は無く培養期間の短縮が可能である。これは、慢性症だけでなく急性症や重度疾患患者でも間葉系細胞を移植できることを意味する。

今回の結果より、他家間葉系細胞は *in vitro* において、リンパ球増殖を抑制する（免疫反応を抑制する）ことが確認できたものの、*in vivo* では免疫反応による炎症がみられ細胞が死滅しており免疫抑制剤の必要性が示された。*in vitro* でのリンパ球共培養実験では、*in vivo* での免疫反応の予測が出来ないことが分かった。また、F344の近縁種であるLEWラットの間葉系細胞を移植しても、細胞の生着、分化に免疫抑制剤が必要であった。この結果より、患者の近縁者から移植行う場合でも、免疫による拒絶反応が生じることを示している。

免疫抑制剤を使用すれば、様々な再生医療の臨

床応用に同種他家間葉系細胞が使用できる可能性がある。

E. 結論

我々の研究で、間葉系細胞が *in vivo* で同種他家細胞移植が可能になるほどの免疫抑制作用を有していないことを確認した。しかし、同種他家細胞は移植後、免疫抑制剤を使用することで、生着し分化することを証明した。よって免疫抑制剤を併用するとき同種他家の間葉系細胞移植が可能であると判断した。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Noriko Kotobuki, Yoshihiro Katsube, Youichi Katou, Mika Tadokoro, Motohiro Hirose*, and Hajime Ohgushi

In vivo survival and osteogenic differentiation of allogeneic rat bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Transplantation, in press

2. 学会発表

2007 International Workshop on Biomaterials and Nanomaterials (Feb.22, 2007, Gwangju, Korea) Ohgushi H. Cell-based therapy using tissue engineering technology. -Patient's mesenchymal stem cells/biomaterials composites for tissue regeneration

Bioceramics 20(20th International Symposium on Ceramics in Medicine) (Oct.25, Nantes, France) N Kotobuki, M Hirose, H Ohgushi, K Ioku, A Sakaguchi, A Iwama, M Harada, H Yamamoto

Development of measurement and assessment technology for evaluation of bone regeneration

The 7th Asian BioCeramics Symposium 2007 (Sep. 25, Osaka Japan) A Matsushima, N Kotobuki, H Ohgushi, In Vivo Osteogenic Property of Cultured Bone Derived from Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

重症末梢動脈閉塞症に対する間葉系幹細胞移植治療（微小血管造影法への応用）

分担研究者 竹下 聡 国立循環器病センター心臓血管内科

研究要旨 重症下肢虚血症例に対する「末梢血単核球移植とアドレノメデュリンによる複合的血管新生療法」を骨髄単核球細胞移植不応1例を含む3例に試行し、良好な治療結果を得た。治療前後における血管数の改善と、臨床所見との相関はなく、本療法の作用機序として血管新生以外の要因が関与していると推察される。

A. 研究目的

本研究の目的は、末梢血単核球移植とアドレノメデュリン投与による低侵襲な血管新生療法を開発し、病院設置型微小血管造影装置による微小新生血管の評価を行うことである。

B. 研究方法

血行再建術が困難な Fontaine III 度または IV 度の末梢動脈閉塞症患者を対象とし、末梢血単核球移植とアドレノメデュリンによる複合的血管新生療法を行う。アフエレーシスにより末梢血単核球(50ml)を採取し、0.5ml ずつ虚血肢に筋注後、アドレノメデュリンを 0.01 μ g/kg/min で持続皮下注した。

病院設置型微小血管造影装置は、高出力の CT 用 X 線源と高感度なハイビジョン撮像系により構成されており、50 μ m の解像度を有する。本装置を用いて血管新生療法の前後で血管造影を施行し、微小血管レベルにおける血管新生について評価していく。

（倫理面への配慮）

倫理委員会の審議・承認を得、本検査の合併症・効能・不利益・利益を説明し、本人及び家族の同意の元に施行した。

C. 研究結果

末梢血単核球移植とアドレノメデュリンによる複合的血管新生療法を3例に施行した。1例は骨髄単核球細胞移植の無効例であった。全例で難治性皮膚潰瘍や安静時疼痛の消失を得、最長3.5年のフォローアップにおいて潰瘍の再燃を認めない。重篤な有害事象はなかった。

一般の血管造影は200 μ m前後の解像度であるが、病院設置型微小血管造影装置は50 μ mであった。ヒトに対する臨床応用として、下肢末梢動脈閉塞症の患者を対象に、これまでに合計8回の微小血管造影を施行した。造影に伴う被曝線量は通常の血管造影と同レベルであることが判明した。微小血管造影によって通常の造影では描出困難な100 μ m以下の微小血管が鮮明に描出された。DSAに比較して少なくとも1-2分枝末梢側の血管が描出可能であった。1ヶ月から1年の間隔を置いて施行した造影検査における微小血管の再現性は良好であった。血管新生療法後に明らかに微小血管数の増加が認められた症例は3割に過ぎなかった。

D. 考察

重症末梢動脈閉塞症に対する血管新生療法として、骨髄単核球移植の有効性が報告されているが、大量の骨髄液採取など、その侵襲性は決して低くない。末梢血単核球移植とアドレノメデュリンによる複合的血管新生療法は、骨髄単核球細胞移植に代わる新しい低侵襲血管新生療法として期待される。特に、今回施行した3例中1例は骨髄単核球移植の無効例であり、骨髄単核球細胞移植無効例に対する救済療法としての応用も期待される。一方、カテーテル技術の進歩により、このような再生医療を必要とする下肢虚血患者は減少傾向にある。本療法の適応や安全性について更なる検討が必要と思われる。

病院設置型微小血管造影装置は、通常の血管造影と同等の安全性を有している。その血管描出能は通常装置に比し優れていることは明白で、ヒトの微小血管評価に用いることが可能な新しい検査法である。造影検査を繰り返し施行し得た症例に

における微小血管の再現性は良好で、血管新生療法前後における新生血管の評価を、本装置によって行うことが可能と思われた。

E. 結論

難治性末梢動脈閉塞症に対する末梢血単核球移植とアドレノメデュリンによる複合的血管新生療法は低侵襲かつ有用性の高い治療法である。微小血管造影装置は、ヒトの微小新生血管の評価を行うに十分な安全性と血管描出能とを有している。血管新生療法後に明らかな血管数の増加が認められる症例は全体の3割程度であり、臨床所見の改善に、血管新生以外の作用機序が関与している可能性が少なくないと思われた

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kamiya C, Sakamoto S, Tamori Y, Yoshimuta T, Higashi M, Tanaka R, Akutsu K, Takeshita S: Long-term outcome after percutaneous peripheral intervention versus medical treatment for patients with superficial femoral artery occlusive disease, *Circ J* (in press)
- ② Yoshimuta T, Akutsu K, Okajima T, Tamori Y, Kubota Y, Takeshita S: Corkscrew Collaterals in Buerger's Disease, *Can J Cardiol* (in press)
- ③ Takigawa M, Akutsu K, Kasai S, Tamori Y, Yoshimuta T, Higashi M, Takeshita S: Angiographic documentation of the process of aortoiliac occlusion in Leriche's syndrome, *Can J Cardiol* (in press)
- ④ 竹下聡：末梢動脈：内科的治療、血管無侵襲診断テキスト 197-199 (血管診療技師認定機構/血管無侵襲診断法研究会 編、南江堂、東京) 2007

2. 学会発表

- ① Takeshita S, Miyamoto K, Nishigami K, Chiku M,

Akutsu K, Yokoyama N, Tamori Y, Higashi M, Nagaya N, Nonogi H : Long-term Outcome of Autologous Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells in Patients with Thromboangiitis Obliterans (American College of Cardiology 56th Annual Scientific Session, March 24, 2007, New Orleans, Louisiana)

② Amaki M, Akutsu K, Kasai S, Tamori Y, Yokoyama N, Nonogi H, Takeshita S : Differences in Clinical Profiles of Patients with Non-Ascending vs. Ascending Thoracic Aortic Aneurysms (American College of Cardiology 56th Annual Scientific Session, March 24, 2007, New Orleans, Louisiana)

③ Sakamoto S, Yokoyama N, Kasai S, Tamori Y, Akutsu K, Hashimoto H, Nonogi H, Takeshita S : Long-term Clinical Outcome of Supervised Exercise Rehabilitation Among Patients with Peripheral Arterial Disease (American College of Cardiology 56th Annual Scientific Session, March 24, 2007, New Orleans, Louisiana)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

研究協力

坏宏一	国立循環器病センター	心臓血管内科
横山直之	国立循環器病センター	心臓血管内科
田守唯一	国立循環器病センター	心臓血管内科
笠井智司	国立循環器病センター	心臓血管内科

間葉系幹細胞シート、骨格筋芽細胞シートから産生される サイトカイン・ケモカイン量の比較

分担研究者 清水達也 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

研究要旨

今回、種々の組織（骨髄、脂肪組織、子宮内膜）に由来する間葉系幹細胞シートおよび骨格筋芽細胞シートから産生されるサイトカイン・ケモカイン量を比較検討した。さらに、通常の培養皿で培養した細胞と、温度応答性培養皿から低温処理により脱着させた細胞シートから産生されるサイトカイン・ケモカイン量も比較した。温度応答性培養皿から脱着した細胞シートから産生される VEGF および HGF 量は、産生が認められた全ての例で脱着前の細胞に比べ高かった。特に、子宮内膜由来幹細胞シートでは、VEGF 産生の増加は約 5 倍であった。また、脱着前の幹細胞を低酸素（5%）状態で培養することでも、VEGF の産生量は約 5 倍に増加し、一方脱着後の細胞シートでは、1.4 倍の増加にとどまった。VEGF、HGF とは逆に、SDF-1 α の場合、産生が認められた全ての細胞で細胞シートにすることにより産生量の減少が認められた。VEGF は骨髄由来幹細胞が、HGF は骨格筋芽細胞が、また SDF-1 α は脂肪組織由来幹細胞が、それぞれ最も高い産生量を示した。bFGF の産生量は、全ての細胞で検出の限界以下であったが、脱着後の hAMSC シートではその産生量が増加し、検出されるようになった。一方、IGF-1 の産生は全ての細胞および細胞シートで、検出の限界以下であった。今回調べた細胞種の中で、骨髄由来幹細胞が VEGF、HGF、SDF-1 α とともに比較的高い産生量を示し、また細胞シートにすることにより VEGF、HGF 産生量が増強された。これらの結果は、心不全治療の細胞ソースとして骨髄由来幹細胞を用い、さらに細胞シート化することにより、より効果的な心機能改善につながる可能性を示している。

A. 研究目的

我々はこれまでに、温度応答性培養皿を用いた様々な細胞シートの作製に成功している。温度応答性培養皿から回収した間葉系幹細胞シートあるいは骨格筋芽細胞シートの心筋梗塞動物モデルへの移植実験では、心機能の改善が認められた。間葉系幹細胞から血管新生関連あるいはアポトーシスを抑制するサイトカイン・ケモカインが分

泌されていることが報告されている。また骨格筋芽細胞シートの移植部分において、これらのサイトカイン・ケモカイン RNA の高い発現が認められることも報告されている。細胞シートの移植による心機能改善効果は、移植細胞シートから産生されるこれらのサイトカイン・ケモカインが一つの原因と考えられている。すなわちこれらのサイトカイン・ケモカイン産生の高い細胞を移植する

ことにより、治療効果はより高まるものと考えられる。そこで今回、種々の組織に由来する間葉系幹細胞、骨格筋芽細胞およびそれらの細胞シートから産生されるサイトカイン・ケモカイン量を比較検討し、より効果的な移植法を開発する事を目指し実験を行った。

B. 研究方法

1. 用いた細胞：ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (hAMSC)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBMSC)、ヒト子宮内膜由来間葉系間葉系幹細胞 (hEMSC)、ヒト骨格筋芽細胞 (hSMM)

2. 細胞シートの調製およびサイトカイン・ケモカイン産生量の測定：それぞれの細胞を温度応答性培養皿あるいは通常の培養皿に播種した。そして3-4日間培養後、培養皿を20℃で低温処理することによりシート状に細胞を脱着させ、細胞シートを得た。得られた細胞シートを通常の培養皿に再播種し、24時間後に培養上清を回収しELISAによりVEGF、HGF、bFGF、IGF-1およびSDF-1 α の産生量を測定した。また、通常の培養皿に播種した場合、3-4日後に培地交換を行い、さらに24時間培養後、上清を回収しELISAによりサイトカイン・ケモカインの産生量を測定した。

3. 低酸素培養：通常の培養皿で培養したhEMSCあるいはhEMSCシートを低酸素(5%)で24時間培養後、上清を回収しELISAでVEGFの産生量を測定した。

C. 研究結果

1. 各細胞から産生されるVEGF量の比較：脱着前の細胞では、hBMSCから産生されるVEGF量が最も高く、hEMSC細胞が最も低く、hBMSCの約1/2であった(表1)。一方、温度応答性培養皿から脱着させた後の細胞シートから産生されるVEGF量は全ての細胞で増加した(表1)。hEMSCの場合、脱着後の細胞シートから産生される

VEGF量は約5倍高く、結果としてhEMSCシートが最も高いVEGF産生能を示すようになった(表1)。

2. 各細胞から産生されるHGF量の比較：脱着前の細胞の場合、hSMMから産生されるHGF量が最も高く、hBMSCではその約1/3、hAMSCではその約1/20であり、またhEMSCは検出の限界以下であった(表1)。HGF産生量も、温度応答性培養皿から脱着することにより増加した。しかし、最も高い上昇率を示したhAMSCの例でも約1.8倍であった(表1)。

3. 各細胞から産生されるSDF-1 α 量の比較：脱着前の細胞の場合、hAMSCから産生されるSDF-1 α 量は最も高く、hBMSCではその約3/4、hSMMではその約1/20、hEMSCは検出の限界以下であった(表1)。SDF-1 α 産生量の場合、逆に温度応答性培養皿から脱着することにより、検出された全ての例で約1/2-1/3に減少した。

4. 各細胞から産生されるbFGF、IGF-1量の比較：脱着前のhAMSC、hBMSC、hEMSC、hSMMから産生されるbFGF量は全て検出の限界(1pg/ml)以下であった。一方、脱着後のhAMSCの場合、細胞シートにすることによりbFGF産生量は増加し、検出できるようになった(約2pg/ml)。一方、他の細胞シートでは検出の限界以下であった。また、IGF-1は全ての細胞、細胞シートで検出の限界以下(90pg/ml以下)であった。

5. 低酸素培養によるVEGF産生量の増加効果：低酸素(5%)状態で培養することにより、脱着前のhEMSCでは、約5倍のVEGF産生の増加が認められた。一方、脱着後のhEMSCシートでは、1.4倍の増加にとどまった(表2)。

表1 各細胞および各細胞シート間のサイトカイン・ケモカイン産生量の比較

細胞	サイトカイン産生量 (pg/ml)		
	VEGF	HGF	SDF-1 α
脱着前			
hAMSC	690 \pm 10	160 \pm 20	2,100 \pm 330
hBMSC	770 \pm 20	1,300 \pm 80	1,500 \pm 110
hEMSC	440 \pm 30	<125	<5
hSMM	650 \pm 20	3,400 \pm 180	110 \pm 30
脱着後 (細胞シート)			
hAMSC	1,300 \pm 170	270 \pm 20	990 \pm 150
hBMSC	1,100 \pm 110	1,800 \pm 230	440 \pm 10
hEMSC	2,100 \pm 240	<125	<5
hSMM	790 \pm 90	3,900 \pm 180	30 \pm 10

表2 幹細胞から産生される VEGF 量の低酸素培養による影響

細胞	酸素濃度 (%)	VEGF 産生量 (pg/ml)
脱着前		
hEMSC	5	2,000 \pm 180
hEMSC	20	440 \pm 30
脱着後 (細胞シート)		
hEMSC	5	2,900 \pm 100
hEMSC	20	2,100 \pm 240

D. 考察および結論

今回示された脱着後の細胞シートのサイトカイン・ケモカイン産生の変化は、細胞を培養皿から脱着させることにより、細胞の培養環境・遺伝子発現等の変化からもたらされることが考えられる。その一つとして考えられるのが、低酸素による影響である。細胞を低酸素刺激することにより低酸素誘導因子が誘導され、遺伝子発現の変化をもたらすことが報告されている。低

酸素刺激が VEGF、HGF 産生を増加させることがすでに報告されており、また今回、子宮内由来幹細胞でも低酸素刺激により VEGF 産生が増加されることが確かめられた。培養皿から脱着させることにより細胞シートの直径は 1/3-1/4 に縮み、結果的に脱着した細胞シートは培養皿に接着している細胞に比べて厚さを増す。細胞シートの組織学的観察から、脱着後の細胞シートの横断面像は 2-3 層の細胞から成り立っていることが確かめられている。これが培養皿側の細胞に低酸素状態をもたらしている可能性がある。もし、細胞シートで低酸素状態が生じているとすると、脱着により細胞から産生される VEGF や HGF 量が増加することを説明できる。しかし、脱着した細胞シートにおける VEGF や HGF 産生の増加を低酸素と結び付け説明するには更なる実験が必要である。今回、心不全治療における心筋細胞の代替細胞として期待されている数種類の細胞を調べ比較した結果、骨髄由来幹細胞が VEGF、HGF、SDF-1 α ともに比較的高い産生量を示し、また細胞シートにすることにより VEGF、HGF 産生量が増強されたことから、心不全治療の細胞ソースとして骨髄由来幹細胞シートを用いることが、サイトカイン産生の見地からより効果的な治療につながる可能性が考えられる。今後、これらの結果と in vivo 移植実験の結果を比較検討し、より効果的な移植法につなげていきたいと考えている。

E. 健康危険情報 なし。

F. 研究発表 なし

G. 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