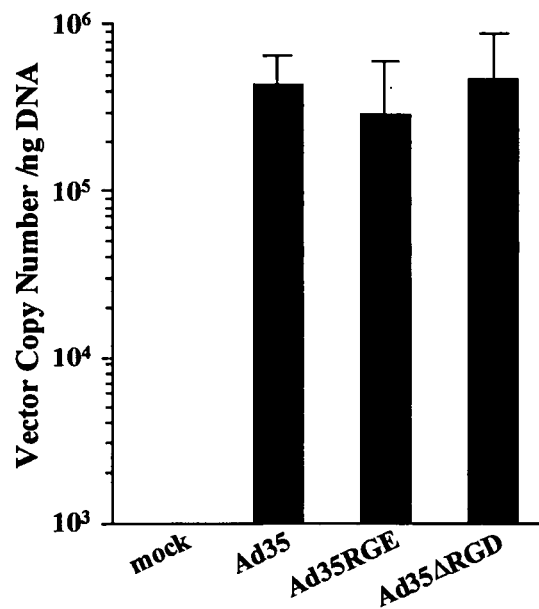
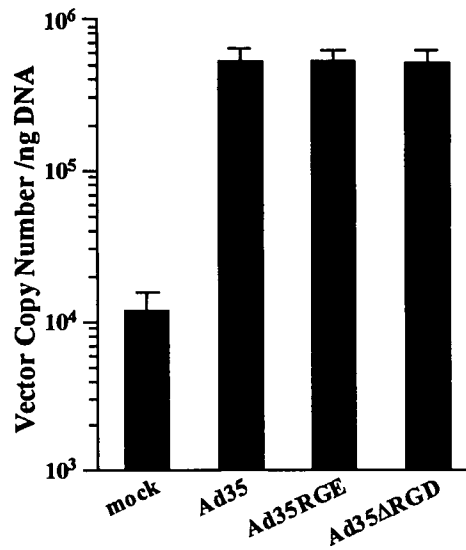


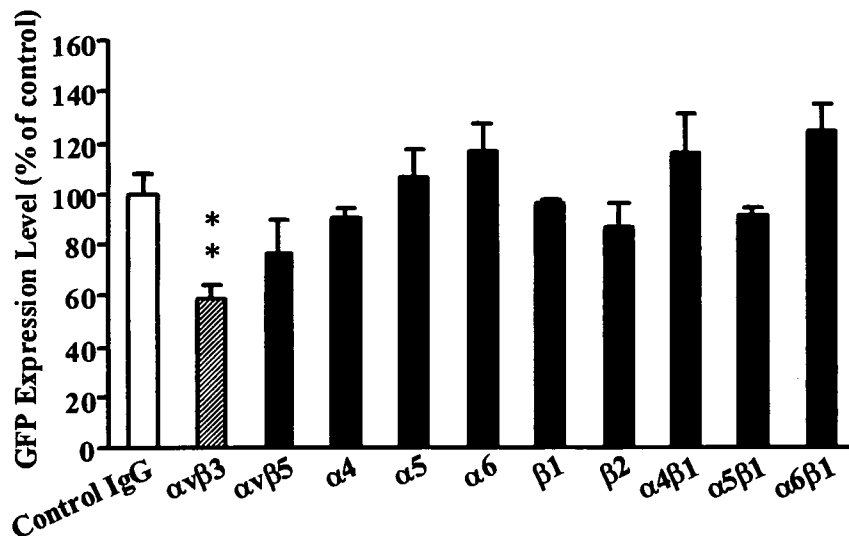
**Fig. 9** Comparison of GFP expression levels in human CD34<sup>+</sup> cells transduced with Ad35GFP, Ad35RGE<sup>+</sup>GFP, and Ad35ΔRGD<sup>+</sup>GFP. Human CD34<sup>+</sup> cells were transduced with 6000 VP/cell of Ad35GFP, Ad35RGE<sup>+</sup>GFP, and Ad35ΔRGD<sup>+</sup>GFP for 6 h at 37 °C. GFP expression levels (MFI) were measured 48 h after transduction using flow cytometry. The data are expressed as the mean ± S.D. (*n*=3) \**P* < 0.001 for comparison with the cells transduced with Ad35GFP.



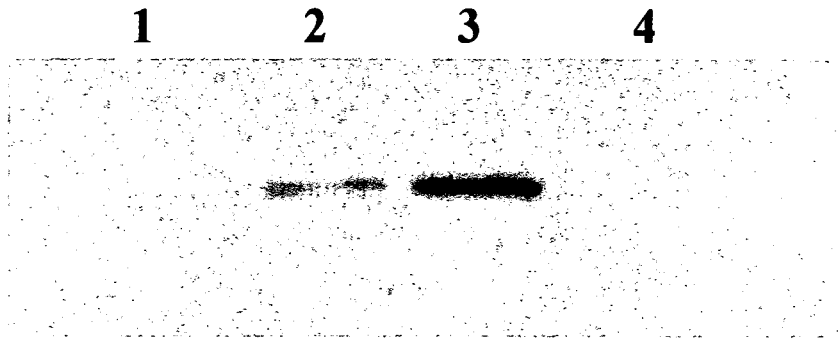
**Fig. 10** Viral uptake of several Ad35 vectors in human CD34<sup>+</sup> cells. The cells were transduced with Ad35GFP, Ad35RGE<sup>+</sup>GFP, and Ad35ΔRGD<sup>+</sup>GFP for 3 h at 37 °C. After incubation, the cells were washed five times with ice-cold PBS, and total DNA, including the Ad vector DNA, was extracted. The copy numbers of the Ad vector DNA were quantified by TaqMan PCR. The data are expressed as the mean mean ± S.D. (*n*=4)



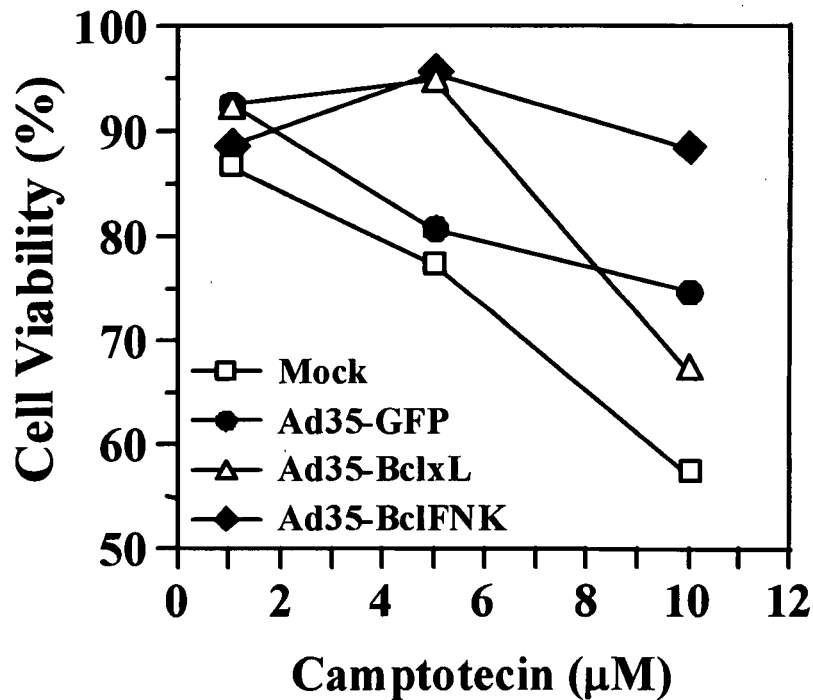
**Fig. 11 Cellular attachment of Ad35 vectors on human CD34<sup>+</sup> cells.** Human CD34<sup>+</sup> cells were incubated with Ad35GFP, Ad35RGE, and Ad35ΔRGD for 3 h at 4 °C. After incubation, the cells were washed five times with ice-cold PBS, and total DNA, including the Ad vector DNA, was extracted. The copy numbers of the Ad vector DNA were quantified by TaqMan PCR. The data are expressed as the mean mean ± S.D. (n=4)



**Fig. 12 Inhibition of Ad35 vector-mediated transduction by monoclonal anti-integrin antibodies.** Human CD34<sup>+</sup> cells were preincubated with each antibody at 50 μg/mL for 1 h at 4 °C, and then added 3000 VP/cells of Ad35GFP. The cells were incubated at 3 h at 37 °C, and then cells were washed, and resuspended in a fresh medium and incubated at 37 °C. GFP expression levels were measured 48 h after transduction using flow cytometry. The data were normalized to the GFP expression levels (MFI) in human CD34<sup>+</sup> cells in the presence of control mouse IgG. The data are expressed as the mean ± S.D. (n=3) \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 for comparison with the cells preincubated with control IgG.



**Fig.13** Expression of Bcl-xL and Bcl-FNK following Ad35 vector transduction in human bone-marrow CD34+ cells. Lane 1; mock, lane 2; Ad35-BclxL, lane 3; Ad35-BclFNK, lane 4; Ad35-GFP. The CD34+ cells were transduced with Ad35 vectors at 6000 VP/cell for 6 hr. Following a 48 hr-incubation, the cells were collected and expression of Bcl-xL and Bcl-FNK was assessed by Western blotting analysis. One representative experiment of three is shown.



**Fig.14** Survival of human bone-marrow CD34+ cells in the presence of Camptotecin. The CD34+ cells were transduced with Ad35 vectors at 6000 VP/cell for 6 hr. Following a 6 day-incubation, Camptotecin was added to the cells at the indicated concentrations, and incubated for 48 hrs. Viability of the cells was assessed by trypan blue exclusion assays. The results shown are mean of two experiments.

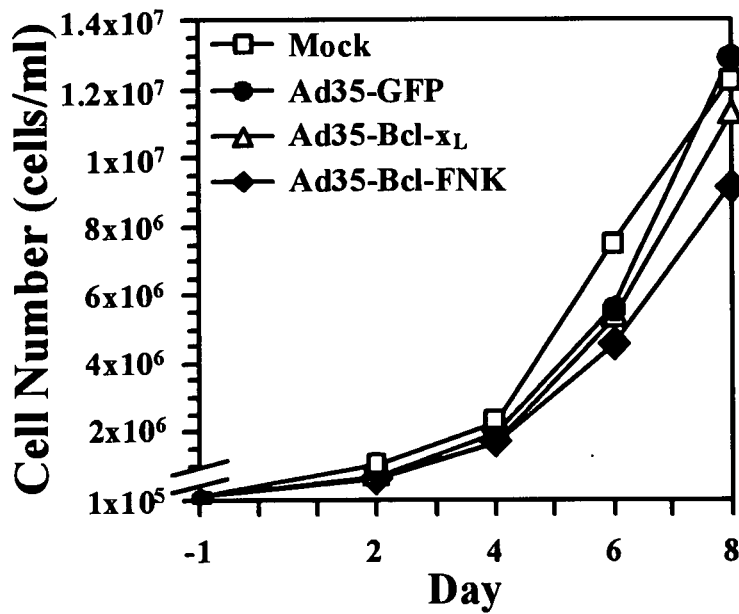


Fig.15 Growth ratio of human bone-marrow CD34+ cells following Ad35 vector Transduction. The CD34+ cells were transduced with Ad35 vectors at 6000 VP/cell for 6 hr. Cell numbers were measured at the indicated time points. The results shown are mean of 2 experiments.

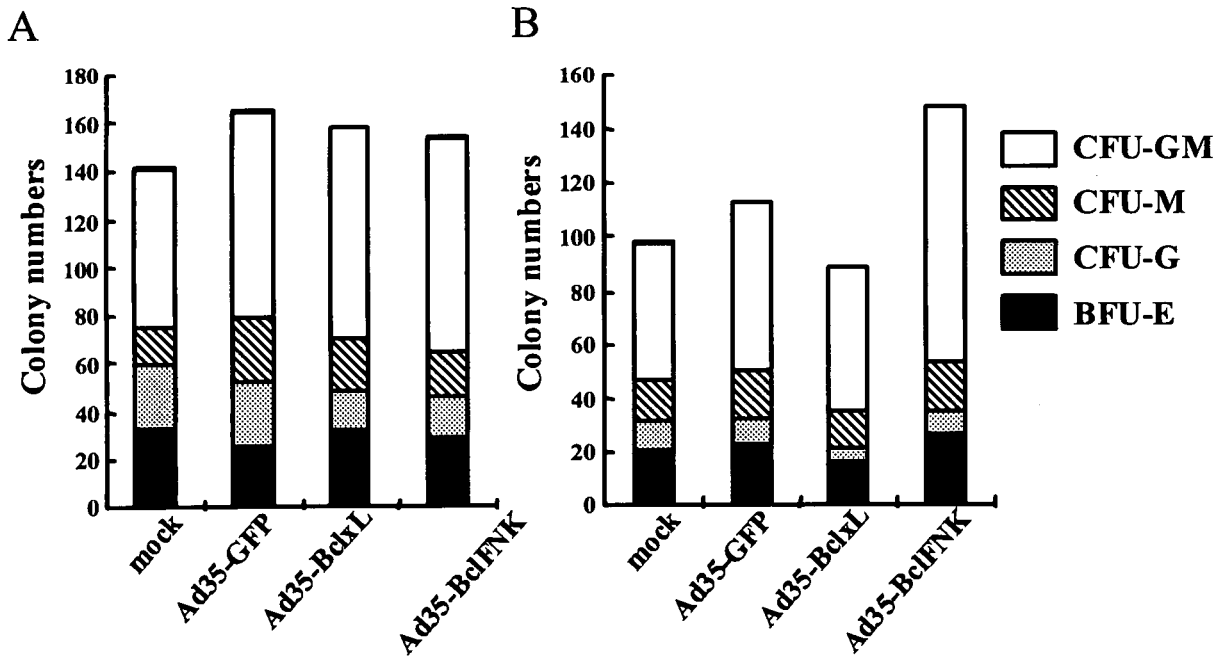
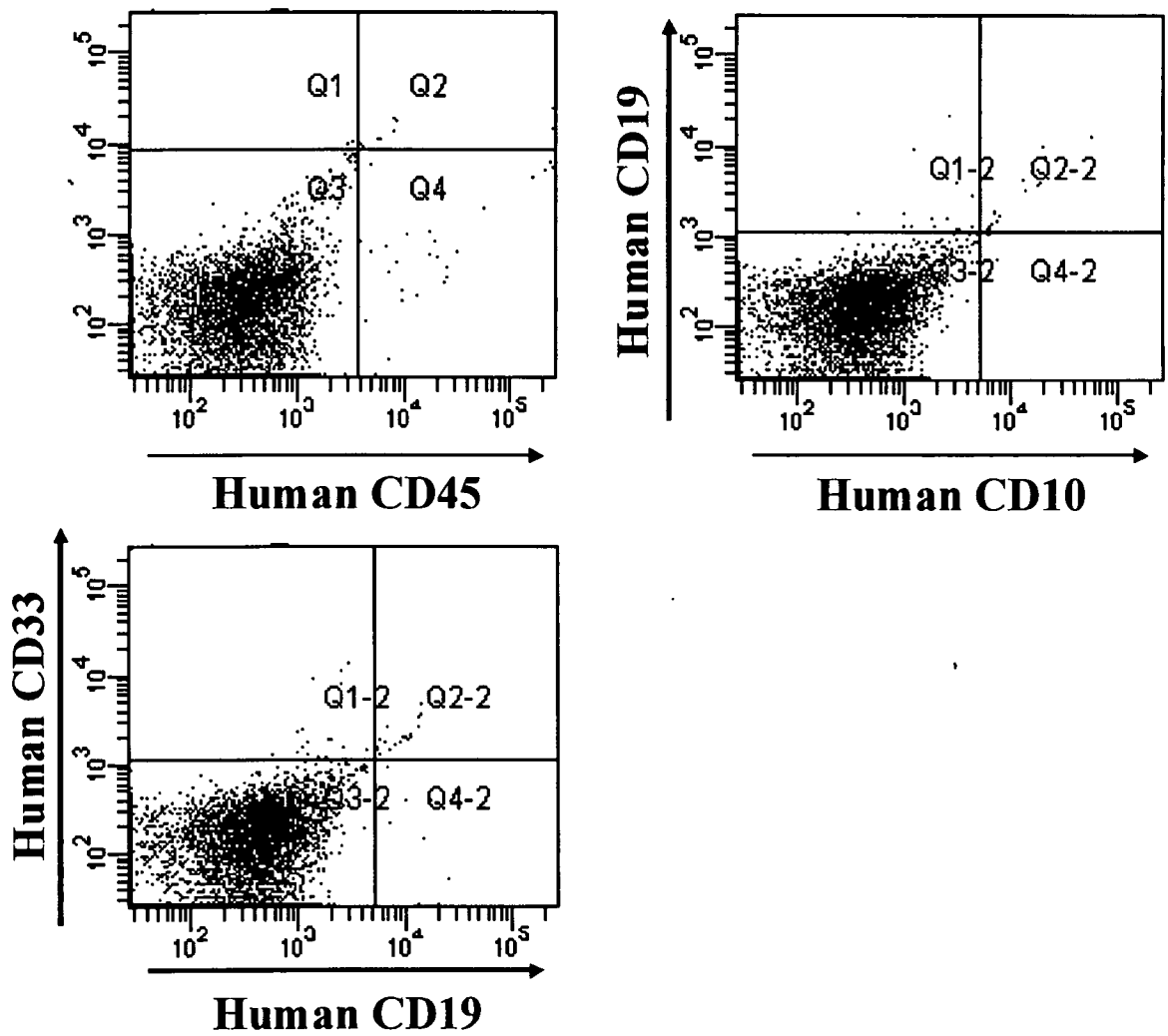


Fig.16 Colony forming assay of human bone-marrow CD34+ cells following Ad35 vector Transduction. The CD34+ cells were transduced with Ad35 vectors at 6000 VP/cell for 6 hr. The cells were collected and subjected to colony forming assay at (A) 2 days or 8 days after transduction. The results shown are the mean of 4 experiments.



**Fig.17 Analysis of human hematopoietic cells in NOG recipients. The CD34<sup>+</sup> cells were transduced with Bcl-FNK-expressing Ad35 vectors at 6000 VP/cell for 6 hr. Following a 48 hr-incubation,  $1 \times 10^5$  cells were transplanted into irradiated NOG mice. Bone marrow cells were recovered and analyzed using flowcytometry 20 weeks after transplantation.**

細胞組織利用医薬品の品質・安全性確保に関する研究

分担研究者 石井明子 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第二室長

協力研究者 豊田淑江 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

細胞・組織加工利用医薬品として血管再生療法での応用が期待される血管内皮前駆細胞（early Endothelial Progenitor Cells: early EPC、および、Outgrowth Endothelial Cells: OEC）について、効率のよい誘導法の確立、ならびに、品質管理に有用な特性指標を明らかにすることを目的に、血液由来細胞からの分化誘導法と誘導された細胞の特性に関する検討を行い、研究期間内に以下の成果を得た。

Early EPC の誘導法と特性指標

- (1) AC133 陽性細胞から分化誘導される CD31 強陽性細胞が高活性な early EPC であることを見出した。さらに、CD31 強陽性細胞の誘導がトロンボポエチン（TPO）で促進されることを見出して early EPC の新たな誘導法を確立するとともに、TPO の情報伝達経路に Akt と STAT3 が関わっていることを明らかにした。
- (2) CD31 強陽性細胞 early EPC の特性指標として、IL-8、MCP-1 等の細胞遊走に関わるサイトカイン類や、TPO 受容体 Mpl が有用である可能性を示した。
- (3) 単核球由来 early EPC の分化誘導には、単核球画分に含まれる血小板が促進的に作用することを見出した。

OEC の誘導法と特性解析

- (1) 単核球からの OEC 誘導系において、OEC コロニー出現数、増殖、管腔形成能への培地組成の影響を検討して OEC 培養条件の最適化を行った。CD45 陰性画分を用いること、培養開始時に hydrocortisone 不含とすること、細胞の接着が維持される方法で培地交換を行うこと、拡大培養時の血清濃度を 2% から 10% に変更すること等が OEC 誘導/拡大の高効率化に寄与すると考えられた。
- (2) 遺伝子発現プロファイルの解析により、OEC の特性指標の候補となる遺伝子 3 つを見出した。

A. 研究目的

心筋虚血や重症下肢虚血の新たな治療法として期待され、我が国においても多くの臨床研究が行われている血管再生療法は、骨髄由来単核球や G-CSF 投与により末梢に動員した CD34 陽性細胞を局所に投与することにより血管の再生を促進するものである。これらの治療では一定の効果が認められているものの、骨髄液を採取すること

の患者への負担や、非常にヘテロな細胞集団である単核球画分を用いることに伴う副作用の懸念、G-CSF 投与の安全性、あるいは、糖尿病等の基礎疾患に伴う血管内皮前駆細胞の数および活性の低下などが解決すべき課題として挙げられている。また、投与された細胞集団のうち、どのような細胞が、どのように働いて奏功しているのかという有効性のメカニズムが不明であるという問

題がある。

細胞を用いた血管再生療法で血管形成が促進される機構としては、投与された細胞集団に含まれる血管内皮前駆細胞の起源となる細胞が局所で分化し、血管形成を促進する因子を放出することや、血管内皮細胞に分化して血管を形成すること等が考えられる。一方、*in vitro*では、血液から単核球あるいは特定の表面マーカーを持つ細胞を分離し、VEGF等の存在下で培養すると、培養開始1週間程度でearly EPC、2~3週間目からlate EPC (Outgrowth Endothelial Cells: OEC) と呼ばれる2種類の血管内皮前駆細胞が誘導されることが知られている (Fig. 1)。それぞれの細胞の特性に関して詳細は明らかになっていないが、early EPCは血管形成を促進するサイトカイン類を分泌する性質をもち、OECはそれ自身が管腔形成能を持つ細胞であるとされていることから、*in vivo*においても、early EPCやOECが血管再生に寄与していると考えられている。

したがって、患者から採取した血液細胞を原材料としてearly EPCやOECを調製し、品質・有効性・安全性の確保された細胞・組織加工医薬品として供給することができれば、現在の血管再生療法よりも低侵襲で有効性・安全性の高い方法として、血管再生療法を広く一般に提供することが可能になると考えられる。本研究では、細胞・組織加工医薬品の品質・有効性・安全性確保のための手法の確立を目標として、血管内皮前駆細胞の分化誘導法の確立と、誘導された細胞の特性解析を行った。

## B. 研究方法

### 1) 単核球細胞の分離

インフォームドコンセントを得て採取された臍帯血は、東京赤十字血液センター、臍帯血バンクより提供された。末梢血バフィーコートは、埼玉赤十字血液センターより提供された。血液サンプルは、2mMのEDTAを含むリン酸緩衝食塩水 (PBS) で希釈し、リンフォプレップ チューブ (Axis-Shield PoC AS) (密度= 1.077) に充填し、

800g、18°C、20分の遠心により、単核球細胞を集めた。細胞を磁気ビーズで標識する場合は、分画用溶液 {2mMのEDTA、0.5%のウシ血清アルブミン (BSA) -PBS} で洗浄した。

### 2) 臍帯血あるいは末梢血 AC133 陽性細胞から CD31 強陽性細胞の調製

単核球を 0.5% BSA、2mM EDTA を含む PBS(-) (分離バッファー) で洗浄し、500 $\mu$ l の分離バッファーに再浮遊させた。AC133 陽性細胞を分離するため、AC133 マイクロビーズ分離キット (Milteny Biotec) を用い抗 AC133 抗体・マイクロビーズと 4°C、30 min で抗原抗体反応させた。陽性細胞の分離は、Auto MACS (Milteny Biotec) を用いて行った。臍帯血と末梢血 AC133 陽性細胞は 20%牛胎児血清 (FBS)、50 ng/ml VEGF、50 ng/ml TPO、50 ng/ml SCF を含む EBM-2 培地に浮遊させ、タイプIVコラーゲンでコートした 24 穴のマルチウェルに分注し、1 週間培養した。細胞を回収し、洗浄後、抗 CD31 抗体-FITC (BD Biosciences PharMingen)、抗 CD110 (TPO 受容体) 抗体-APC (BD Biosciences PharMingen)、抗 CD133/2 抗体-PE (Milteny Biotec)、抗 VE-Cadherin (CD144) 抗体-PE (Beckman Coulter) 等を用いて免疫染色し、フローサイトメーターにより解析した。なお、すべての検体は 7-amino actinomycin D (7-AAD) で染色し、陽性の細胞は死細胞として、解析の際に除去した。

### 3) 接着細胞の免疫染色

FN コートディッシュ上で AC133 陽性細胞を 2 週間培養後、細胞層を PBS で 3 回洗った。冷却したエタノール (-20°C) で固定後、細胞層を PBS で 3 回洗った。1% BSA を用いて細胞を 4°C、1 時間、ブロッキングした。次に 4°C、1 時間、それぞれの第 1 抗体でインキュベートした。PBS で洗浄後に、4°C、1 時間、抗マウス IgG 抗体-FITC または抗ウサギ IgG 抗体-Rhodamin でインキュベートした。PBS で洗浄後、Zeiss LSM 510 を用いて解析した。

4) 臍帯血と末梢血の CD31 強陽性・陽性細胞における各種サイトカインの産生

培養 1 週間後の AC133 陽性細胞を抗 CD31 抗体-FITC で免疫染色後、FACS Aria (BD Biosciences) により分画した。CD31 強陽性・陽性細胞を 20% FBS-EBM2 培地に浮遊し、96 穴のマルチウェルに培養した。培養 4 日後に培養上清を集め、-20°C の冷凍庫に保存した。培養上清中のサイトカインは Bio-Plex サイトカインアッセイのプロトコールに従って測定した。

5) 細胞の可溶化サンプルの作成とイムノブロット

AC133 陽性細胞を、20%FBS-EBM2 培地に浮遊 3 日間培養し、細胞を集め、1% BSA-EBM2 培地中に 1-3 時間、培養し、血清の影響を除いた。細胞 ( $1 \times 10^6$ ) を、50ng/ml の TPO、50ng/ml の VEGF または両方で刺激した後、回収した。細胞は 1/100 (v/v) 蛋白質分解酵素阻害薬カクテルと 1/100 (v/v) ホスファターゼ抑制薬カクテル (Sigma Chemical) を含む可溶化バッファー(1% トリトン X-100、10mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ 、pH 7.5、1mM EDTA、5mM EGTA、10mM  $MgCl_2$ 、50mM  $\beta$ -グリセロリン酸)で溶解した。サンプルはウェスタンブロットにより解析した。

6) 単核球画分からの血小板除去

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  $\rho=1.063g/ml$  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。

7) 血小板の調製

全血を室温、140g (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。

8) 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  $\mu m$ /ポア密度  $1.6 \times 10^6/cm^2$  のもの、ポアサイズ 0.4  $\mu m$ /ポア密度  $1.0 \times 10^8/cm^2$  のもの、ポアサイズ 0.4  $\mu m$ /ポア密度  $1.6 \times 10^6/cm^2$  で FN コートされたもの、の 3 種類である。

9) OEC の誘導

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,  $\pm$  hydrocortisone,  $\pm$  heparin) に懸濁し、FN コート 6well 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、 $1 \times 10^7$  cells/well 程度とした。通常は、培養開始 1 日後に、培地を除いて PBS(-) で 1 回 wash し、新鮮培地を添加した。その後、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。顕微鏡による観察で OEC のコロニー数を計測し、光顕画像を撮影した。

10) 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 lectin-like oxidized-LDL



receptor (Lox-1)抗体、抗 endothelial NO 合成酵素(eNOS, Cayman Chemical)、抗 kinase insert domain protein receptor(KDR)抗体 (Santa Cruz 社)、抗 CD11b 抗体 (BD PharMingen)、抗 CD14 抗体(BD PharMingen)、VE-cadherin 抗体 (BD PharMingen)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。

#### 11) 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。

#### 12) 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  $\mu$ l の 2% EBM-2 培地を加えた。上室には 50  $\mu$ l の OEC の細胞浮遊液を 1 ウェルあたり  $2 \times 10^4$ /well 個播種した。上室と下室の間に 0.8  $\mu$ m のポアがあるフィルターを用いた。37°C、4 時間 CO<sub>2</sub>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た細胞をはがし、遊走してきた下側の細胞を固定・染色し、細胞数を数えた。

#### 13) マトリゲルを用いた管腔形成アッセイ

BD 社より購入したマトリゲルを氷上で一晩かけて融解し、冷却した 24 穴プレートに 300  $\mu$ l/well 分注した。37°Cのインキュベーター中に 30 分静置してゲル化させた。10cm ディッシュで培養していた OEC をトリプシンを用いて回収し、血清入り培地で洗浄した後、5%FCS を含む EBM-2 (増殖因子の添加なし)に懸濁した。マトリゲルをゲル化させた well に  $1 \times 10^6$  個の細胞を播種し、37°Cの CO<sub>2</sub>インキュベーターで一晩培養した。形

成された管腔の写真有位相差顕微鏡 Axiovert2000 で撮影した。一部の実験では、マトリゲル中の増殖因子含量を低下させた Growth Factor Reduced (GFR) マトリゲルを用いた。各細胞の管腔形成能は、顕微鏡写真 1 視野 (2.35mm<sup>2</sup>)にある tube の長さ和本数を顕微鏡画像解析ソフト AxioVision を用いて測定することにより定量化した (n=4)。

#### 14) OEC 特性指標の探索

特定の細胞あるいは情報伝達経路に関わる遺伝子 84 個の発現プロファイルを 1 枚の PCR プレートで測定することのできる Super Array 社の RT2 Profiler PCR Array を用い、血管内皮細胞の機能に関わると考えられている遺伝子の発現プロファイルを行った。Real-Time PCR の装置は ABI7000 を用いた。 $\beta$  アクチンを内部標準として、各遺伝子について  $\beta$  アクチンとの Ct 値の差を求め、 $2^{-\Delta Ct}$  を各遺伝子と  $\beta$  アクチンの発現量の比とした。HUVEC をコントロールとして、OEC における各遺伝子の発現量を比較した。各細胞について 3 枚のプレートを用いて解析した。プレート間での反応の一定性は、各プレートに 3well 設けられている Positive PCR Control (PPC) の Ct 値から判断したが、全てのプレートで threshold を一定にしたとき、PPC の Ct 値は全てのプレートを通じて一定していた ( $20.63 \pm 0.19$ )。

### C. 研究結果

血管内皮前駆細胞 (EPC) の起源となる細胞には多くの種類があり、CD34、AC133、CD14 等の表面マーカーをもつ細胞と考えられている。EPC には少なくとも 2 つのタイプがあり、1 つは増殖能が低く、自身は管腔形成能をもたないが、インターロイキン-8 (IL-8)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮成長因子 (VEGF) を放出する紡錘状の形をした early EPC である。もう 1 つは、高い増殖能と管腔形成能をもち、敷石状を呈した OEC である。

OEC は多くの均一な細胞数が得られるので扱いやすいが、出現時期が2-3週間と遅く、また、出現頻度も低い。Early EPC は不均一ではあるが培養1-2週間で出現する。(Fig. 1)

移植のために十分な数の EPC を得ることは、細胞治療で非常に重要である。EPC は多くの物質、例えば G-CSF、GM-CSF、VEGF、EPO、スタチン等によって、骨髄から動員される。しかし、患者に過度に負担をかけることなく、できるだけ多くの EPC を得るためには、生体外すなわち *in vitro* で EPC を分化・増殖を促進する方法を確立することが望ましい。新たな EPC 増幅方法をあきらかにできた場合、増幅した EPC が従来の EPC と同等の性質を持っているのかの検証も必要となる。その検証が得られた場合には、解析によって得られた様々な細胞特性が、新たな EPC の品質特性となることが考えられ、細胞の品質管理の点からも有用である。

## C-1. AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性 early EPC の特性および TPO による誘導

### C-1-1. AC133 陽性細胞由来 CD31 強陽性 early EPC の特性

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 VE cadherin 陰性の early EPC であることを報告してきた (Kanayasu-Toyoda et al. J. Cell Physiology. 195, 119, 2003)。タイプIVコラーゲン上で1週間培養した AC133 陽性細胞を CD31 発現量を指標に FACS で分画し (Fig. 2a)、ファイブロネクチン上でさらに1週間培養すると、CD31 強陽性画分の細胞は CD31 陽性画分の細胞と比較して接着性が高く紡錘形の形態を示す (Fig. 2 b, c)。また、CD31 強陽性画分の細胞は KDR 陽性、eNOS 陽性である (Fig. 2 d, e)。

Early EPC は様々なサイトカインを産生することによって血管形成促進作用を示すと考えられることから、CD31 陽性細胞と CD31 強陽性細胞について、サスペンションアレイによるサイト

カイン濃度の多項目同時定量法を用いて各細胞が産生するサイトカインを比較した (Fig. 3)。その結果、末梢血と臍帯血のいずれを原材料とした場合にも、CD31 強陽性細胞が CD31 陽性細胞よりも多量のサイトカインを産生しており、特に IL-8 や MCP-1 の産生量が多いことが明らかになった。

### C-1-2. TPO による CD31 強陽性 early EPC の分化誘導

Early EPC の臨床応用に向けた課題は、移植される患者の負担やリスクを軽減するため *in vitro* での増幅法を確立することである。そこで、EPC 増幅作用を持つ物質を種々探索した結果、巨核球の分化増殖や造血幹細胞の自己複製に関与することが知られている TPO が、AC133 陽性細胞から CD31 強陽性細胞への分化誘導を促進することを見出した。

AC133 陽性細胞に VEGF のみを添加、あるいは、VEGF と TPO の両者を添加して fibronectin プレート上で2週間培養したところ、VEGF 単独群に比して、VEGF+TPO 添加群で KDR 陽性、eNOS 陽性の接着した細胞が増加した (Fig. 4)。末梢血由来細胞と臍帯血由来細胞のいずれを原材料とした場合も同様の結果が得られた。フローサイトメトリーによる解析では、TPO の添加により CD31 強陽性細胞が 0.51% から 2.80% に増加していた (Fig. 5b 参照)。したがって、TPO は AC133 陽性細胞から early EPC への分化・増殖を促進することが明らかとなった。

### C-1-3. TPO を用いて分化させた early EPC の特性

AC133 陽性細胞に VEGF 単独あるいは VEGF+TPO を添加して1週間培養後、抗 CD45 抗体-FITC で染色してフローサイトメーターで解析したところ、対照群 (VEGF のみ、Fig. 5a 上段) も TPO 処理群 (VEGF+TPO、Fig. 5a 下段) も殆どすべての細胞が白血球共通抗原である CD45 陽性であった。したがって、VEGF 処理し

た場合も TPO 処理した場合も AC133 陽性細胞から分化する細胞は全て血球系のマーカーを発現しており、我々が以前から報告してきた CD31 強陽性細胞は血球系であることが示された。これに対して、成熟した血管内皮細胞は CD45 陰性であることが知られており、OEC も CD45 陰性細胞がほとんどであるとされている (Mukai N. et al. *Exp. Cell Res.* 314, 430, 2007)。血球系細胞と血管内皮細胞は共通の母細胞 (Hemangioblast) から発生するが、血管内皮前駆細胞と言われる細胞の中でも、early EPC と OEC は分化系統が異なる細胞であることが示唆された。

Early EPC には、血球系に属する単核/マクロファージ系細胞の表面マーカーである CD14 を発現する細胞に由来するものがあると報告されている。そのため、AC133 陽性細胞由来 early EPC の CD14 発現を検討した。しかし、Fig. 5b に示すように、いわゆる transdifferentiation (分化転換) により単核/マクロファージ系から分化する early EPC とは異なり、AC133 陽性細胞由来 early EPC は CD14 陰性であった。このことから、血球系に属する EPC である early EPC には、CD14 陽性と陰性の複数の分化系統に属するものがあると考えられた。

#### C-1-4. TPO による early EPC 誘導系の特性

Fig. 6 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。この検討では、全ての群に VEGF を添加して実験を行った。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 添加では末梢血では 0.47%、臍帯血では 0.30% とあまり増加しないのに対し、TPO を加えると末梢血では 2.30%、臍帯血では 2.60% と増加する (Fig. 6a)。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. 6b のようになり、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 と VEGF を添加した AC133 陽性細胞にお

いて、細胞総数を経時的に観察すると、3 日以降に急激に上昇した (Fig. 7a)。AC133 陽性細胞を単核球から分離した直後は、CD110 (TPO 受容体) は全く発現していなかった (データは示さず)。しかし、培養 3 日後、CD31 陽性、CD110 陽性細胞が末梢血では 1.74%、臍帯血では 1.78% であり (Fig. 7b)、AC133 陽性、CD110 陽性細胞の割合は増加することから、EPC は AC133 陽性細胞から CD110 陽性細胞を経て分化していく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. 8 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. 8 左)、CD31 強陽性細胞の絶対数を計算すると末梢血では CD31<sup>bright</sup>VEcad<sup>+</sup>細胞 (Fig. 8 右上) が、臍帯血では CD31<sup>bright</sup>VEcad<sup>+</sup>細胞と CD31<sup>+</sup>brightVEcad<sup>-</sup>細胞 (Fig. 8 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。

#### C-1-5. VEGF 非存在下での TPO の効果

先の検討は対照群に VEGF を添加し、VEGF に TPO を加えて比較検討したが、次に AC133 陽性細胞から early EPC に分化・増殖する作用が TPO 単独で行われるのかどうか、また、VEGF との比較についても検討した。その結果、AC133 陽性細胞に VEGF を加えて一週間培養しても細胞総数 (Fig. 9a) は対照群と比べて増加しなかったが、フローサイトメーター (Fig. 9b) で CD31 強陽性細胞の割合を解析すると約 1.5 倍とわずかではあるが上昇しており、CD31 強陽性細胞数 (Fig. 9c) は対照群に比べて有意に増加していた。一方、TPO を加えて培養すると、細胞総数は約 2 倍増加 (Fig. 9a) し、CD31 強陽性細胞の割合は約 13 倍近く上昇しており (Fig. 9b)、CD31 強陽

性細胞数 (Fig. 9c) は 20 倍以上の増加が観察された。また、VEGF と TPO を同時に添加すると細胞総数がさらに増加し、両者の作用により CD31 強陽性細胞数は相乗的に増加していた (Fig. 9c)。

#### C-1-6. TPO の情報伝達経路

次に AC133 陽性細胞が TPO の刺激を受けた際の情報伝達経路について検討した。Fig. 7 に示すように、AC133 陽性細胞は培養 3 日以降に急激に上昇し、なおかつ培養 3 日目には TPO 受容体を発現しているため、培養 3 日後の細胞を用いた。Fig. 10a に示すように、PI3K/Akt 経路の活性化として重要な Akt の 473 番目のセリンの強いリン酸化が 15 分で観察された。また、TPO は JAK/STAT 経路を活性化することも報告されている。STAT3 の 705 番目のチロシンのリン酸化もやはり Akt と同様に 15 分で観察 (Yamaguchi, et al. 1999, Kanayasu-Toyoda, et al. 1999) されることから、PI3K/Akt 経路と JAK/STAT 経路の両経路を TPO と VEGF で刺激して 15 分後に比較検討した。その結果、Akt の 473 番目のセリンのリン酸化は VEGF より TPO のほうが強く、両者で細胞を同時に刺激するとさらに強いリン酸化が起こった。これは EPC の分化・増殖促進作用 (Fig. 9c) に一致している。また、フローサイトメーターによる解析では、Akt のリン酸化は CD31 陽性細胞でも AC133 陽性細胞でも、ともに観察された (Fig. 10b)。一方、STAT3 の 705 番目のチロシンのリン酸化は TPO で刺激した時のみ観察された。PI3K をその阻害剤であるワートマニンで抑制すると、末梢血・臍帯血ともに CD31 強陽性細胞の産生は有意に減少した (Fig. 11)。しかし、その阻害が完全でなく部分的であったことを考えると、EPC 産生促進には PI3K/Akt 経路と JAK/STAT 経路の両経路の活性化が重要と考えられた。また、TPO が VEGF より強い EPC 産生促進作用をもつのは TPO 単独で両経路の活性化ができることが一因であると考えられた。

#### C-2. 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. 12)。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。血小板除去前、除去後、および、血小板除去後に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. 12 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. 13)。実験に用いた培養系では、流れ刺激などは与えていないが、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 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ 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. 14に示す。その結果、P-selectin濃度が1 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ 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-3. OEC誘導法と特性に関する解析

#### C-3-1. 臍帯血単核球由来OECの特性指標解析

OECコロニーは、臍帯血由来単核球をFNコート上で培養すると14日目ぐらいから観察される。このコロニーは丸くひとつひとつの細胞は敷石状を呈しており、増殖能が高い。培養15日目にコロニーをトリプシン・EDTAで剥がし、48穴のマルチウェルに再播種して、蛍光免疫染色により血管内皮細胞マーカー分子の発現を解析した。その結果、このOECはCD31陽性、eNOS陽性、VE cadherin陽性、KDR陽性、CD11b陰性、CD14陰性であり、血管内皮細胞としての特徴を備えていた (Fig. 15)。また、eNOSとCD31、VE cadherin、KDRを2重染色すると、すべての細胞が2重に染色されることから均一な集団と考えられた。さらに、この細胞の内皮細胞としての機能を検討するため、マトリゲル上の3次元培養を試みた。その結果、このOECはマトリゲル上で、管腔を形成したことから、機能的にも血管内皮細胞であることが確認できた (Fig. 15)。

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、Fig. 16に示すように、非常に大きいスピンドルな形をした $\alpha$ -SMアクチン陽性の血管平滑筋細胞が観察される場合があった。また、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. 17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。単核球培養開始時の血小板含量が高いと、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. 17)。

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。平滑筋細胞は増殖能が高く OEC を覆い尽くしてしまうほどであるが、形態からの判別は比較的容易である。確認試験や純度試験における細胞形態の観察も重要であると考えられる。

### C-3-2. 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、 $1 \times 10^7$  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、誘導効率を上昇させる必要がある。また、長期培養による染色体の変化も懸念されるため、最初に多くの OEC コロニーを得て、少ない継代数で十分な細胞数を得ることが望ましい。

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う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、誘導効率に与える影響を評価した。

FN でコーティングした 6well 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。8 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. 18 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。Hydrocortisone は抗炎症作用を持ち、血管内皮に対しては接着分子の発現を抑制する作用を持つと考えられることから、hydrocortisone 不含培地を用いることで、fibronectin への細胞の接着が強められることにより接着細胞が増えることが誘導効率改善の要因であると考えられる。

### C-3-3. CD45 陰性画分を用いた OEC 誘導

OEC の起源となる細胞についてはこれまでのところ明確に同定されていないが、CD45 陰性の画分に OEC の起源となる細胞が存在することが報告された (Timmermans F. et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27, 1572, 2007)。CD45 は白血球共通抗原とも言われ、リンパ球と単球には強く発現していることから、単核球画分に含まれるほとんどの細胞は CD45 陽性である。そのため、CD45 陰性画分を用いることにより、夾雑細胞の少ない状態で OEC を誘導することが可能になると考えられた。

一方、これまで、培養開始 1 週間の間は頻繁に培地交換をする方がよいという報告を元に、培養上清中に OEC 誘導を抑制する因子が存在することも考え、最初の 7 日間、毎日全量の培地交換を実施していた。しかし、OEC コロニーは培養 well の端に出現することが多いことから、血管内皮の形質を獲得するまでの間は接着が弱く、接着し続けられた細胞が分化・増殖して OEC のコロニーを形成すると考えると、OEC の起源となる細胞が接着細胞の形質を獲得するまでの間、できるだけ静置した状態で培養を続けることが望ましいとも考えられた。そこで、CD45 陰性画分を用いた実験では、弱く接着した細胞が培地交換の際に洗浄されないよう、細胞接着を維持した状態（培地を全量交換せず、2ml 中 1.5ml を交換）での培養を試みることにした。

その結果、ロットによる差が大きいものの、1 ロットの臍帯血由来の細胞から 100 個以上の OEC コロニーが得られるというこれまでに例のない高い効率で OEC を誘導することができた (Table 1)。

その後の検討で、最適と思われる条件で実験を行っても、誘導される OEC コロニー数に関してロットによる差が非常に大きいことから、現在、OEC を効率よく誘導するための主要因は何であるか、検討を続けているところである。Table 1 の実験では、hydrocortisone を day7 以降に添加することとコロニーの高頻度の出現が関連していたため、hydrocortisone の添加のタイミングが重要である可能性が考えられた。しかし、同一ロットを用いて、hydrocortisone 非添加、添加、day7 以降のみ添加、の 3 群について比較を行ったところ (各 4well)、hydrocortisone 非添加と day7 以降の添加では差がなく、hydrocortisone の day7 以降の添加は OEC 誘導の主要因ではないと考えられた (Fig. 19)。また、CD45 陰性画分を分離する操作を行っているが、回収率が実際の CD45 陰性画分よりかなり高いことから、用いた細胞の CD45 陰性細胞としての純度は高くないと考え、細胞分画と OEC 誘導効率の関連についても検討

中である。

#### C-3-4. OEC 誘導後の培養条件の最適化

本研究開始当初の検討において、単核球から出現した OEC コロニーを拡大していく際に、早期に増殖が停止するコロニーが高頻度に見られた (Fig. 20a)。培養ディッシュのコートイングタンパク質や継代方法を変更しても改善はみられなかったが、培地に添加する血清を組織由来血管内皮細胞である HUVEC 用に至適化された培地 (EGM-2) に含まれる 2% から 10% に変更することで、拡大の成功率が 12% から 83.3% に改善された (Fig. 20b)。その後の検討でも、10% 血清入り培地ではほぼすべての OEC 株が問題なく拡大できている。

血清濃度の変更が細胞の特性に与える影響を調べるため、2% 血清を含む条件下で継代培養していた OEC 株について、血清濃度を 2%、5%、10%、20% にして培養したところ、2% 血清で培養している細胞では、細胞老化の特徴である増殖停止と細胞の肥大化が最も早く見られ、増殖が停止した細胞では老化マーカーである senescence associated- $\beta$ -galactosidase の活性染色陽性となった (Fig. 21)。血清濃度 2% で培養している細胞の増殖が停止した時点でも、血清濃度 5% 以上では増殖能が維持された (Fig. 21)。また、膜透過性の亢進した死細胞を検出する 7-AAD による染色で細胞の viability に対する血清濃度の影響を調べたところ、細胞の生存率も血清濃度が高い方がよいという結果となった (Fig. 22)。

細胞の増殖能と機能はしばしば逆相関すると言われていることから、OEC の機能の指標としてマトリゲル上での管腔形成アッセイにより、OEC の機能に対する血清濃度の影響を調べた。2%、5%、10%、20% の血清濃度で培養した OEC のマトリゲル上での管腔形成能を比較したところ、管腔形成能に顕著な差はなく、培養中の血清濃度は OEC の管腔形成能に影響しないと考えられた (Fig. 23)。

これらの結果に基づき、OEC の拡大培養にお

いては血清濃度を 10%とすることとした。OEC 誘導時の血清濃度については、血清濃度が低い方がよいという報告 (Gulati R. et al. *Circ. Res.* 93, 1023, 2003) に基づき、これまでのとおり 2%としている。

### C-3-5. OEC の特性指標の探索

臍帯血単核球の培養により取得した OEC 株 6 種類について、長期培養における増殖特性とマトリゲル上での管腔形成能を評価した (Figs. 24, 25)。Fig. 25 に示すように、組織由来血管内皮細胞であるヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 HUVEC と同程度の管腔形成能を示す株が 1 つ (2R-3-2)、中程度の管腔形成能を示す株が 4 つ (S5, S2-12, S2-22, S2-31)、管腔形成能がほとんどない株が 1 つ (S3) であった。

FACS により血管内皮細胞の代表的なマーカーである CD31、KDR、eNOS の発現を調べたところ、全ての細胞株でその発現が陽性であった (Fig. 26)。管腔形成能を持たない S3 株においても、低いながら CD31、KDR、eNOS の発現は認められた。

これらの OEC 株の中から、管腔形成能が高い 2R-3-2、管腔形成能が中程度の S2-22、管腔形成能が低い S3 を選び、OEC 3 株と HUVEC について、特性指標候補遺伝子の発現比較を行った。用いた 4 種類の細胞のマトリゲル上の管腔形成能について、形成された tube の長さおよび本数を顕微鏡画像解析ソフト AxioVision を用いて顕微鏡の視野 (2.35mm<sup>2</sup>) ごとに定量した結果を Fig. 27 に示す。

血管内皮細胞に発現している 84 個の遺伝子について、4 種類の細胞における発現量を Real Time PCR により定量比較した。各細胞における  $\beta$  アクチンの発現量と各遺伝子の発現量の比を、HUVEC をコントロールとして比較したところ、細胞の管腔形成能と相関すると考えられる遺伝子が 2 つ (Gene1, 2)、管腔形成能と逆相関すると考えられる遺伝子が 4 つ (Gene3~6)、管腔形成能との相関はないものの HUVEC と比較して

OEC で顕著に発現の高い遺伝子が 1 つ (Gene7)、見出された (Fig. 28)。また、Gene7 ほど発現量の差が顕著でないものの、HUVEC に対して OEC3 株で共通して発現が高い遺伝子が他に 7 つ見出された。Gene1, 2, 7 の 3 つは、OEC の特性指標として有用である可能性が高いと考え、OEC の機能との関連を検討中である。

我々は先の検討で、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. 3)、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。

臍帯血単核球由来 OEC を非酵素的にプレートから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. 29a)。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. 29b 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。

これらの結果から、AC133 由来 CD31 強陽性 EPC の特性指標として IL-8 を同定すると共に、IL-8 が 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 early 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と考えられる。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。

#### D. 考察

血管再生療法をより安全に有効性の高いものとして一般に提供していくためには、血管内皮前駆細胞を*in vitro*で増幅し、品質・有効性・安全性の確保された細胞・組織加工医薬品として開発していくことが望まれる。血管内皮前駆細胞を細胞組織・加工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。

Ex vivoで調製した血管内皮前駆細胞を細胞・組織加工医薬品として用いるための製法・品質関連の課題には、以下のようなものがあると考えられる。

#### Early EPC 関連

- ・増幅法の確立
- ・CD31強陽性細胞の分取法の確立
- ・管腔形成促進能の評価系の確立（OECとの共培養によるアッセイ等）
- ・管腔形成促進能と関連する特性指標の同定
- ・少数の細胞で実施可能な品質試験の開発

#### OEC 関連

- ・誘導効率の改善
- ・管腔形成能と関連する特性指標の同定

#### ・培養期間と細胞特性の関連

本研究ではこれらの課題解決に向けて有用な知見を得ることができた。Early EPCでは得られる細胞数が限られていることから、実用化に向けては増幅法が最重要課題である。巨核球の分化増殖因子、あるいは造血幹細胞の自己複製を促進する因子として知られているTPOがearly EPCの増幅に有効であったという知見は、血液細胞の分化に関する生物学の分野でも重要な発見である。これまでの検討では、TPOにより増幅したearly EPCとVEGF単独で増幅したearly EPCの特性に違いは認められておらず、early EPCとしての性質を保持した細胞をTPOにより増幅することが可能であると考えている。本研究により明らかになったTPO受容体の発現やTPOへの応答性は、early EPCの新たな特性指標としても有用であろう。また、Early EPCではCD31、MCP-1、IL-8の発現が特徴的であり、これらが特性指標として有用である可能性を示した。この中でも特に、MCP-1やIL-8は細胞遊走促進作用を持つため、early EPCの機能すなわち有効性と関連した特性指標として有用であると考えられる。

Early EPCは現在のところ継代培養ができないため、得られる細胞は貴重である。品質管理試験に用いることのできる細胞が限られるため、特性解析した結果をもとに、少数の細胞で評価が可能な品質試験法を確立することも重要である。

OECの分化誘導においては、培地交換法と血清濃度という極めて基本的な点での改良ながら、誘導効率と拡大効率を改善することができた。CD45陰性画分の利用の有用性に関しては、分画された細胞の純度を測定するなど、検討を続けているところである。

最近、OECの培養中には高頻度に染色体変異が起こることが報告された（Corselli M. et al. *Exp. Hematol.* 36, 340, 2008）。我々の系でも同様のことが起こっているかどうかは確認していないが、培養期間は短い方が染色体変異の懸念は

少ない。短い培養期間で临床上必要とされる細胞数を得るためには、最初に多くのコロニーを得ることが必須である。また、品質評価の観点からは、継代数に依存した細胞特性の変化を明らかにし、品質面から許容される PDL の範囲を明らかにしていく必要があると考えている。

OEC は均質な細胞であるとされているが、これまで樹立した株を見ていると、出現するコロニーごとに形態が多少異なり、増殖特性や管腔形成能にもばらつきがあるようである。そのため、特性指標としては機能と関連のあるものを選択することが望ましいと考え、管腔形成能の異なる OEC 株の遺伝子発現プロファイルと比較した。管腔形成能との相関がある Gene1,2 および OEC で高発現している Gene 7 は特性指標として有用であると考え、OEC の機能との関連を検討中である。管腔形成能とは相関がないものの、OEC で顕著に発現量が高い Gene7 は、管腔形成能以外の点で、組織由来血管内皮細胞である HUVEC との特性の違いを反映したものである可能性もある。

先端的な医療では特に、安全性の点では未知・未経験の要素が多いことから、治療の実施に際して、少なくとも一定の有効性を担保し、リスク・ベネフィットを明らかにする必要がある。有効性のメカニズムが明らかでない血管再生医療ではこの点の課題解決が特に求められていることから、細胞・組織加工医薬品の品質・安全性確保のための評価系確立のモデルとして、有効性と関連する特性指標の探索や安全性評価法の開発を継続していきたいと考えている。

## E. 結論

細胞・組織加工医薬品の品質管理において有用な特性指標の探索および品質試験法の開発に関連する研究として、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 陽性細胞から分化誘導される CD31

強陽性細胞が高活性な early EPC であることを見出した。また、CD31 強陽性細胞の誘導がトロンボポエチン (TPO) で促進されることを見出し、CD31 強陽性細胞の誘導率向上に TPO が有用であることを示した。

2) TPO の early EPC 分化・増殖促進作用は VEGF よりも強く、VEGF 非存在下でも有効であった。TPO と VEGF を AC133 陽性細胞に同時に添加すると EPC は相乗的に増加した。TPO と VEGF の細胞内伝達を比較すると VEGF が Akt のリン酸化のみを促進するのに対して、TPO は Akt のリン酸化のみならず、STAT3 のリン酸化も促進したことから、TPO が PI3K/Akt と JAK/STAT 経路を介して EPC の分化・増殖を促進していると考えられた。

3) CD31 強陽性細胞のタンパク質発現プロファイル解析により、early EPC の特性指標として、IL-8、MCP-1 等の細胞遊走に関わるサイトカイン類や、TPO 受容体 Mpl が有用である可能性を示した。また、IL-8 が OEC の遊走促進作用を持つことを明らかにし、early 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) 単核球由来 early EPC の分化誘導には、単核球画分に含まれる血小板が促進的に作用することを明らかにした。

5) 単核球からの OEC 誘導系において、OEC コロニー出現数、増殖、管腔形成能への培地組成の影響を検討して OEC 培養条件の最適化を行った。CD45 陰性画分の利用、細胞播種時に hydrocortisone 非添加により OEC 誘導効率が改善された。また、10%血清入り培地を利用することで誘導された OEC コロニー拡大の成功率を高めることができ、得られた OEC コロニーを確実に拡大することが可能

になった。

- 6) OEC の遺伝子発現プロファイルの解析により、管腔形成能を反映した特性指標の候補となる遺伝子を2つ、管腔形成能との相関はないが、HUVECと比較してOECで顕著に発現量の高い特性指標候補遺伝子1つを見出した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表、総説

- 1) Nana Mukai, Taichi Akahori, Motohiro Komaki, Qin Li, Toshie Kanayasu-Toyoda, Akiko Ishii-Watabe, Akiko Kobayashi, Teruhide Yamaguchi, Mayumi Abe, Teruo Amagasa, Ikuo Morita: A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res.* 314, 430-440 (2008)
- 2) Toshie Kanayasu-Toyoda, Akiko Ishii-Watabe, Takayoshi Suzuki, Tadashi Oshizawa, and Teruhide Yamaguchi: A new role of thrombopoietin enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133 positive cells. *J. Biol. Chem.* 282, 33507-14 (2007)
- 3) 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* 35 (4), 247-257 (2007)
- 4) Kawai H, Suzuki T, Kobayashi T, Ishii-Watabe A, Sakurai H, Ohata H, Honda K, Momose K, Hayakawa T, Kawanishi T. Caspase Cascade Proceeds Rapidly after Cytochrome c Release from Mitochondria in Tumor Necrosis Factor-alpha-Induced Cell Death. *J Pharmacol Sci.* 103(2), 159-67 (2007)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 山口照英、石井明子 細胞・組織加工医薬品の品質と安全性確保への提言 *PHARMSTAGE* 7, 1-6, 2008
- 8) 山口照英、石井明子 次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験について -TGN1412 が薬の開発に与えたインパクト- 毒性質問箱 第10号 p.1-p.33 サイエントリスト社、2007
- 9) 石井明子、鈴木琢雄、川西 徹、山口照英、早川堯夫 バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保 P.702-718 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、2007
- 10) 堤康夫、石井明子、早川堯夫 バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保 p.369-378 機能性人工タンパク質 エル・アイ・シー、2007
- 11) 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 臨床とウイルス 35, 278-290, 2007

2. 学会発表

- 1) 豊田淑江、石井明子、山口照英：トロンボポエチン (TPO) の血管内皮前駆細胞(EPC)増幅作用における新しい役割 第7回 日本再生医療学会総会 2008年3月
- 2) 鈴木浩子、石井明子、豊田淑江、田村悦臣、山口照英：ヒト臍帯血単核球由来 Outgrowth Endothelial Cell の誘導法確立と特性解析 日本薬学会 第128年会 2008年3月
- 3) 豊田淑江、石井明子、鈴木孝昌、押澤正、山口照英：トロンボポエチン(TPO)による、*in vitro* での血管内皮前駆細胞(EPC)の増幅作用 第80回日本生化学会大会 2007年12月
- 4) 石井明子、豊田淑江、鈴木琢雄、小林 哲、山口照英：細胞組織利用医薬品としての血管内皮前駆細胞の誘導法確立と特性解析 第51回日本薬学会関東支部大会 2007年10月
- 5) 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：カスパーゼ 3,9(8)活性化の単一細胞内同時測定による小胞体ストレスと TNF- $\alpha$  誘導アポトーシスの比較 バイオイメーjing学会 2007年10月
- 6) 豊田淑江、石井明子、鈴木孝昌、押澤正、山口照英：トロンボポエチン (TPO) による *in vitro* での血管内皮前駆細胞 (EPC) の増幅作用 第28回日本炎症・再生医学会 2007年8月
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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- $\alpha$  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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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jing学会 2006年10月
- 13) 石井明子、鈴木琢雄、小林 哲、山口照英、川西 徹：細胞接着活性を持つ組換え人工タンパク質の有用性評価 日本薬学会 第126年会 2006年3月
- 14) 小林 哲、鈴木琢雄、石井明子、川西 徹：MALDI-TOF MS におけるタンパク質のシグナル増強 Part3 日本薬学会 第126年会 2006年3月
- 15) 鈴木琢雄、櫻井教美、河合 洋、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、川西 徹：Bioimaging of caspase activation during ER stress-induced cell death. 第79回 日本薬理学会年会 2006年3月
- 16) 鈴木琢雄、櫻井教美、河合 洋、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、川西 徹：小胞体ストレスによるカスパーゼ活性化のイ