

で37°C、3時間インキュベートしてMMP-1を活性化した。次に、assay bufferを添加し、遮光下で室温、1時間インキュベートした。Stop solutionを入れて反応を止め、蛍光プレートリーダーFLEX station (Molecular Devices) で蛍光強度を測定した。

16) MMP 類タンパク質量の定量

Late EPC および関連する細胞の培養上清中に含まれる MMP 類や TIMP 類の量を調べるため、Ray Quantibody™ Human MMP Array 1 (Ray Biotech) を用いた定量解析を行った。本 array は、ガラススライド上に固定した抗体で試料中の被験タンパク質を捕捉し、更にビオチン標識した二次抗体とストレプトアビジン標識 Alexa Fluor 555 を用いて、被験タンパク質を定量的に蛍光検出するものである。実験に用いた試料は 100 μ L/well である。蛍光用スキャナーは Gene® Pix (Filgen) を用いた。

C. 研究結果

C-1. AC133 陽性細胞由来 early EPC、単核球由来 early EPC、および late EPC の形態と FACS による特性解析

Fig. 1 に AC133 陽性細胞由来 early EPC、単核球由来 early EPC、および late EPC の分化・誘導法を模式的に示した。単核球由来 early EPC は AC133 陽性細胞由来 early EPC を含むヘテロな集団と考えられる。10⁸ 個の単核球の中には約 1%、すなわち 10⁶ 程度程度の AC133 陽性細胞が存在し、その数パーセントが AC133 陽性細胞由来 early EPC となる。AC133 陽性細胞由来 early EPC は TPO 刺激で増加させることができ、10⁶ 個の AC133 陽性細胞から約 10⁵ 程度程度の AC133 陽性細胞由来 early EPC を得ることができる。一方、10⁸ 個の単核球からは、約 10⁶ 個の単核球由来 early EPC が得られる。

AC133 陽性細胞を 1 週間培養した後、CD31 強

陽性細胞を FACS で分画し、FN コートディッシュ上で培養すると Fig. 2a 左に示すように紡錘状の early EPC が出現した。また、単核球由来 early EPC も同様に紡錘状の形態を示した。

1 週間培養後の AC133 陽性細胞を抗 CD45 抗体-FITC で染色してフローサイトメーターで解析すると、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 (Fig. 2b 左上)。また、単核球由来 early EPC も CD45 陽性であり (Fig. 2b 左下)、これらの細胞はともに血球系であると考えられた。Fig. 2b の中段はタイプIVコラーゲンコートプレート上で一週間培養した AC133 陽性細胞を一晩 FN コートプレート上に培養し、接着した細胞を解析した結果である。接着細胞は殆ど CD31 強陽性分画に由来する (Kanayasu-Toyoda et al., J Cell Physiol. 2003) ため、これらの細胞は AC133 陽性細胞由来 early EPC である。その結果、接着細胞は CD31 陽性であり、単核球由来 early EPC も CD31 陽性であった。CD14 の発現に関しては、単核球由来 early EPC は殆どが陽性であるのに対し、AC133 陽性細胞由来 early EPC は陽性と陰性を含むヘテロな集団であった (Fig. 2b 右)。血液から分離される AC133 陽性細胞は単核球画分に含まれるため、単核球由来 early EPC には AC133 陽性細胞由来 early EPC が含まれていると想定される。AC133 陽性細胞由来で CD14 陰性の細胞が単核球由来 early EPC で検出されていないのは、単核球由来 early EPC に含まれる CD14 陰性細胞の割合が低いためであると考えられる。

これらの結果から、CD31 および CD45 の発現と形態の点では AC133 陽性細胞 early EPC と単核球由来 early EPC は類似していると考えられた。特性指標の探索や特性解析法の検討においても、再生医療への応用においても、細胞数の確保は重要な要素であると考え、以下の実験は単核球由来 early EPC を用いて実施した。

Fig. 3a に early EPC、late EPC 及びヒト臍帯

静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の位相差顕微鏡画像を示す。HUVEC は、組織由来の成熟血管内皮細胞の例として用いた。Early EPC は紡錘状を示しているが、late EPC、HUVEC では血管内皮細胞に典型的な敷石状の形態が観察された。細胞表面マーカーを FACS で解析すると、これらの細胞はいずれも CD31 陽性であった (Fig. 3b)。一方、CD45、CD14 の発現は early EPC では陽性であるのに対し、late EPC 及び HUVEC は陰性であった。代表的な血管内皮細胞のマーカーである KDR/VEGFR2 の発現は early EPC では弱陽性、late EPC 及び HUVEC では陰性と陽性の 2 集団が観察された。Vascular endothelial cadherin (VEcad) の発現は early EPC では弱陽性、late EPC 及び HUVEC では陽性であった。これらのことから、late EPC の細胞表面マーカー発現は組織由来血管内皮細胞である HUVEC と類似していること、early EPC の細胞表面マーカー発現は late EPC や HUVEC と異なり、血球系のマーカーを発現している細胞であることが明らかとなった。

これら 3 種の細胞を免疫染色した結果を Fig. 4 に示す。Fig. 3 で示した CD45 および CD14 発現に関する解析結果は、免疫染色でも確認された。また、early EPC、late EPC 及び HUVEC はいずれも、endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 発現陽性であった (Fig. 4、2 段目)。

以上の結果から、early EPC と late EPC は、血管内皮細胞マーカーである CD31、eNOS を共通して発現していること、early EPC は CD45 および CD14 陽性の血球系の細胞であり、late EPC や HUVEC とは異なる系統の細胞であることが示された。

C-2. Early EPC の培養上清による冠状動脈内皮細胞 (HCAEC) 管腔形成・遊走促進

Early EPC は虚血性心疾患の細胞治療にも応用されようとしている。そこで、冠状動脈内皮細胞 (HCAEC) の管腔形成や遊走に対する early

EPC 培養上清 (CM) の促進効果を検討した。Fig. 5a に示すように、early EPC の CM は 10 倍希釈、5 倍希釈と濃度に依存して HCAEC の管腔形成を有意に促進した。また、HCAEC の遊走も同様に CM 添加により促進された (Fig. 5b)。

C-3. Early EPC の特性指標の探索

Fig. 5 に示したように early EPC の培養上清には血管新生に関わる細胞応答を促進する作用があることから、early EPC の特性指標候補分子を探索するため、血管新生に関わる遺伝子 84 種類について、HUVEC あるいは late EPC を対照として、多検体同時比較 Real Time PCR により発現プロファイル解析を行った。

Fig. 6 は、early EPC および HUVEC について、各細胞における被験遺伝子の発現量と β アクチン遺伝子発現量の比をプロットしたものである。グラフ上に遺伝子名が示してある点は、early EPC と HUVEC で発現量に有意差の認められた遺伝子である。Early EPC は HUVEC と比較して、CXCL9、CXCL10、CXCL3、IL-8、CCL2、IL1B、TNF、VEGFA など多くのサイトカイン・ケモカイン類の遺伝子を高発現していた。その中で IL-8、CCL2 は VEGFA と同様に直接血管内皮細胞の遊走や増殖を促進するという報告がある。従って、early EPC 自身は管腔形成をしないが、近隣の血管内皮細胞の血管新生を直接的あるいは間接的に促進する可能性が考えられる。一方、HUVEC では、LAMA5 (Laminin, alpha 5)、PECAM1 (CD31)、COL18A1 (Collagen, type X VIII, alpha 1)、ITGAV (Integrin, alpha V)、ITGB3 (Integrin, beta 3) などの細胞接着関連タンパク質の遺伝子発現が高いことが観察された。興味深いことに血管新生に重要と考えられるマトロプロテアーゼである MMP-9 は early EPC で、MMP-2 は HUVEC で、より多く発現されていた。

一方、late EPC と HUVEC では、遺伝子発現プロファイルにほとんど差が認められなかった (Fig. 7)。Late EPC と比較して HUVEC では

LAMA5 (Laminin, alpha 5) や ITGB3 (Integrin, beta 3) など細胞接着に関連する遺伝子の発現が高かった。また Late EPC と比較して HUVEC で発現量が高かった THBS2 (Thrombospondin 2) は、血管新生抑制因子として知られている。Fig. 8 に示すように、early EPC と late EPC の遺伝子発現を比較した場合、early EPC と HUVEC の比較と同様の結果が得られた。

これらの結果から、early EPC と late EPC では、遺伝子発現プロファイルが大きく異なること、late EPC は成熟した血管内皮細胞である HUVEC と類似した遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかとなった。

C-4. Late EPC の特性指標に関する解析

C-4-1. PCR array を用いた特性指標候補分子の探索

Late EPC が成熟血管内皮細胞である HUVEC と類似した遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかになったことから、late EPC を特徴づける分子を探索するため、上記の検討とは異なる血管内皮細胞機能関連の遺伝子 84 種類を対象として、late EPC3 株と HUVEC における発現プロファイル比較を行った (Fig. 9)。Fig. 7 で示した血管新生関連遺伝子に関する解析結果と同様、血管内皮細胞機能関連遺伝子についても、late EPC は HUVEC と類似した遺伝子発現プロファイルを示した。しかし、一部の遺伝子の発現には差異があり、HUVEC と比較して late EPC で特に発現の高い遺伝子として matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) が見出された (Fig. 10)。MMP-1 の mRNA 発現量は HUVEC と比較して S3 株では 93 倍、S2-22 株では 1105 倍、2R32 株では 634 倍と late EPC で顕著に高く、MMP-1 は late EPC に特徴的に発現している分子であると考えられた。その他に、MMP-1 と比べると差は小さいが、late EPC と HUVEC で発現量に 2 倍以上差のある遺伝子として、Chemokine ligand5、PhospholipaseA2 group IVC、Thrombomodulin、

Fibronectin 1、Fas が見出された (Fig. 10)。

さらに各細胞の管腔形成能と遺伝子発現量の比較をしたところ、occludin および caspase-1 の発現量が管腔形成能と相関していることが明らかとなり、occludin および caspase-1 が管腔形成に関与する分子である可能性が示唆された (Fig. 11)。血管内皮細胞機能関連遺伝子の他に、幹細胞関連遺伝子 84 種類についても late EPC と HUVEC で発現量を比較したが、両者で大きな差異は認められなかった。

C-4-2. Western blot による MMP-1 タンパク質の検出

遺伝子発現解析から、MMP-1 は late EPC の特徴的産生物質であると考えられた。このことをさらに検証するため、late EPC 調製の原材料である臍帯血単核球 (MNCs)、early EPC、組織由来成熟血管内皮細胞である HUVEC、ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC)、及びヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HCAEC) の培養上清中の MMP-1 を Western blot により検出した (Fig. 12)。その結果、late EPC の培養上清にのみ MMP-1 のバンドが検出された。他の細胞では MMP-1 が検出されず、late EPC に関連する細胞株の中で、MMP-1 の発現は late EPC に特徴的であることが明らかになった。MMP-1 は 450 アミノ酸残基からなる分子量約 52,000 の潜在型として細胞から分泌され、プロペプチドが切断されて 360 アミノ酸残基からなる分子量約 43,000 の活性型になることが知られている。Late EPC 培養上清中に検出された MMP-1 のバンドの泳動度から、late EPC 上清中に存在する MMP-1 は潜在型であると考えられた。

C-4-3. 培養上清中 MMP-1 の活性測定

Late EPC 培養上清中では MMP-1 タンパク質が潜在型として存在していると考えられたため、上清中の MMP-1 を APMA 処理により活性型に変換し、MMP-1 の活性を確認した。潜在型 MMP

の N 末端プロペプチド部分にはシステインスイッチと呼ばれるアミノ酸配列 (PRCGVP) が存在し、この部位のシステイン残基のチオール基が酵素活性部位の Zn と配位結合することにより潜在型としての構造が保たれている。APMA を添加することにより、システイン残基と Zn の結合が解離し、自己消化によりプロペプチドが除去されて活性型 MMP-1 となる。Fig. 13 に示すように、late EPC 上清では、APMA 処理に依存して MMP-1 活性の上昇が検出された。これに対して、late EPC 以外の細胞では APMA 処理後も活性の上昇は認められなかった。Late EPC の上清では APMA 処理していない試料中にも基質切断活性が検出されたが、本実験に用いた基質ペプチドは、MMP-1 の他に MMP-2, 3, 8, 12, 13 の基質ともなり得ることから、late EPC は MMP-1 以外のプロテアーゼも分泌している可能性があると考えられた。

C-4-4. MMP 類の定量

MMP-1 と同じく MMP ファミリーに属するタンパク質の中では、MMP-2 や MMP-9 が血管新生との関連が深いとされており、分泌された MMP 類の不活性化作用を持つ調節タンパク質である TIMP 類の存在も知られている。また、Fig. 8 で示した遺伝子発現解析結果では、early EPC と比較して late EPC では MMP-2 の発現量が高いことが示された。そこで、late EPC および関連の細胞について、MMP 類に対する抗体が固定化されたガラススライドアレイを用い、培養上清中の MMP 類の定量解析を行った (Fig. 14)。その結果、late EPC 上清中の MMP-1 の濃度は 75ng/mL (約 1.4nM) であると定量された。その他に MMP-10 が 1.8ng/mL 検出されたが、MMP-3, 8, 9 は検出限界以下であった。TIMP-1 は 27.4ng/mL (約 1nM) であった。MMP-2 に関しては、検量線が不良であり測定ができなかった。

これらの検討結果から、late EPC が分泌する MMP 類の中では、MMP-1 が主要なタンパク質

であることが明らかとなった。TIMP-1 は、MMP-1 と非可逆的に結合することにより MMP-1 を不活性することが知られている。Late EPC の分泌する TIMP-1 の量は、他の成熟血管内皮細胞 (HUVEC、HMVEC、HCAEC) とほぼ同じであり、TIMP-1 の分泌量は late EPC と成熟血管内皮細胞で差がないことが明らかとなった。

以上の結果から、MMP-1 が late EPC の特徴的産生物質であることが支持された。

C-5. Early EPC と late EPC の浸潤活性

遺伝子発現解析の結果、early EPC において MMP-9 の遺伝子発現が高かったことから、early EPC は細胞外マトリックスの分解により周囲に浸潤する活性が高いことが考えられた。そこで、early EPC のマトリゲルに対する細胞浸潤活性を、late EPC、HUVEC、HCAEC と比較した。浸潤刺激因子としては VEGF を用いた。マトリゲルは、細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含む Engelbreth-Holm-Swarm マウス肉腫から抽出した可溶性基底膜から成り、主成分は、ラミニン、コラーゲン IV、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、およびエンタクチン/ニドジェン 1,2 である。解析の結果、early EPC と late EPC は HUVEC、HCAEC に比べ高い浸潤活性を持つことが明らかになった (Fig. 15)。このことは early EPC と late EPC が投与局所において新生血管形成のために高効率に浸潤できる可能性を示しており、両細胞が細胞治療に適した細胞であることを示唆していると考えられる。

D. 考察

成体における血管形成は従来、既存の血管内皮細胞遊走・増殖により新たな血管が形成される血管新生 (angiogenesis) の機序により生じるものと考えられていたが、骨髄に由来する血管内皮前駆細胞 (endothelial progenitor cell : EPC) が成

体の循環血液中に存在することが報告され (Asahara T. et al, Science 275, 964, 1997)、胎生期にのみに認められるとされていた血管発生 (vasculogenesis) の機序を介して血管内皮前駆細胞が成体での血管形成に関わるという概念が提唱された。それ以来、EPC を用いた血管再生療法の開発が試みられ、EPC あるいは EPC の起源細胞を含む細胞画分を用いた臨床研究等が展開されている。

EPC には少なくとも 2 つのタイプがあることが知られている。1 つは増殖能が低く、自身は管腔形成能をもたないが、血管形成に関与するサイトカイン等を放出する紡錘状の形をした early EPC である。Early EPC は不均一ではあるが培養 1-2 週間で出現する。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 late EPC である。Late EPC 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、出現頻度も低い。

Early EPC と late EPC の定義は現在に至っても明確でなく、EPC に関する論文においても、early EPC と late EPC のどちらに関する研究であるのが表題や要旨からは明らかでなく、method の内容から読者が判断しなければならない状況にある。したがって、EPC の分化誘導に関わる基礎的研究の観点のもとより、再生医療における実用化に向けた品質管理法の観点からも、early EPC と late EPC の差異を明確にし、それぞれの特性を明らかにすることが重要である。

本研究の主な担い手である豊田および主任研究者の山口らは、EPC の発見当初から EPC に関する研究に着手し、幹細胞である AC133 陽性細胞を起源とする EPC に関する研究を進めてきた (Kanayasu-Toyoda et al., J Cell Physiol. 195, 119, 2003, J Biol Chem 282, 33507, 2007)。2000 年以降、EPC には 2 種類の細胞 (early EPC と late EPC) が存在することや (Lin Y. et al. J. Clin. Invest. 105, 71, 2000)、単核球を起源とし

て early EPC の調製が可能であることなどが明らかになり、EPC の起源細胞や調製法に関する知見は変遷してきた。また、単核球を投与する臨床研究や先進医療も多く行われるようになってきた。AC133 陽性細胞が単核球画分に含まれる細胞であること、また本年度の研究から明らかになったように AC133 陽性細胞を起源とする early EPC と単核球を起源とする early EPC は類似した性質を持つこと、単核球由来 early EPC の方が細胞数の確保が容易であること等を考慮し、early EPC については、単核球から分化誘導される細胞を用いて解析を進めることとした。

Fig. 8 に示したように、early EPC と late EPC では遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが明らかになった。Early EPC では、MMP-9、CXCL10、CXCL9、TNF、IL-1 β 、TYMP、IFN γ 、IL-8、CCL2 などの発現が高く、これらが特性指標として有用である可能性が考えられる。これらの中でも特に、IL-8 や CCL2 は血管内皮細胞の遊走や増殖を促進することが知られており、early EPC の血管新生促進作用に寄与している可能性が高い。他に興味深い知見として、early EPC が MMP-9 を高発現していたことがあげられる。MMP-9 は、基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンを分解することがよく知られているが、その他に、c-kit リガンドを切断して可溶性リガンドとして放出させることにより、骨髄由来血管内皮前駆細胞の動員に関与することが報告されている。MMP-9 の early EPC や late EPC に対する効果は未検討であるが、early EPC 由来の MMP-9 が直接あるいは間接的に EPC の機能に影響を与えるのであれば、MMP-9 が early EPC と late EPC が協調作用の一翼を担っている可能性も考えられる。

一方、late EPC は、形態および遺伝子発現プロファイルが成熟血管内皮細胞である HUVEC と非常に類似していた。しかし、血管内皮細胞機能

関連遺伝子の発現比較においては、少なくとも3種類の特性指標候補分子を見出すことができた。一つは、HUVECと比較してlate EPCで発現量が顕著に高いMMP-1である。その他に、発現はlate EPCに特異的ではないが、血管内皮細胞の管腔形成能と発現量が相関する分子として見出されたoccludinとcaspase-1である。

MMP-1は、細胞外マトリックスを分解する亜鉛要求性のコラゲナーゼで、創傷治癒、血管新生など重要な生体機能に関与することが知られている。本研究の結果、MMP-1の発現は、late EPCの起源細胞を含む単核球、early EPC、あるいは成熟血管内皮細胞(HUVEC、HCAEC、HMVEC)と比べて、late EPCで特徴的に高いことが明らかになった。MMP-1はタイプIコラーゲンなどの細胞外基質を分解することが知られていることから、late EPCから分泌され、さらに活性型に変換されたMMP-1が、late EPC周辺の細胞外基質を分解することによりlate EPCの浸潤を促進する可能性が考えられる。これは、細胞・組織加工医薬品として虚血部位に投与されたlate EPCが血管を形成していく上で有用な特性であると考えられる。

また、MMP-1には、細胞外基質のみならず、Protease-activated receptor-1 (PAR-1)の細胞外部分を切断し、PAR-1を活性化する作用があることが報告されている。一方、late EPCにはPAR-1が発現しており、PAR-1アゴニストペプチドを用いた実験で、PAR-1を介したシグナルがlate EPCの増殖や遊走促進に関わることが報告されていることから、活性型に変換されたMMP-1がPAR-1を介してlate EPC自身に作用することにより、late EPCの増殖や遊走を促進する可能性も考えられる。

本実験で評価した限りにおいては、late EPCの上清中に検出されるMMP-1はプロペプチドを持つ潜在型が主であった。潜在型MMP-1はMMP-3やプラスミンによって活性化されることが知ら

れている。In vivoにおいて、late EPCが何らかの刺激にตอบสนองしてMMP-1を活性化するタンパク質を産生するようになるのか、あるいは、他の細胞から分泌された酵素の働きでlate EPC由来のMMP-1が活性化されるのかは興味深いところである。

Occludinは、tight junction構成タンパク質であり、血管内皮細胞においては血管透過性の維持に関与しているとされている。新たに血管が形成される際にもoccludinが細胞同士の接着に関与することにより、管腔形成に必須の役割を果たしている可能性が考えられる。また、occludinは血管内皮細胞の分化マーカーとして有用である可能性も考えられる。このことは、上皮細胞におけるoccludinの発現と間葉系細胞への分化に伴う発現変動に関する知見から考察することができる。すなわち、上皮細胞がTGF β 等の刺激を受けて間葉系細胞に分化する(Epithelial mesenchymal Transition: EMT)際にoccludinの発現が低下することが知られていること、血管内皮細胞もTGF β 等の刺激を受けて間葉系細胞に分化すること(Endothelial Mesenchymal Transition: EndMT)から、血管内皮細胞が間葉系細胞に分化する際にoccludin発現が低下することが想定される。Occludinの発現量が高いほど血管内皮細胞として成熟した状態であることが検証されれば、有用な分化マーカーになるであろう。

Caspase-1はアポトーシス誘導に関ることがよく知られているシステインプロテアーゼファミリーの一つであるが、他のカスパーゼと異なり、IL-1 β やIL-18の活性化に寄与すること等により、炎症反応に関与するとされている。最近の報告では、caspase-1が細胞保護や組織再生に関連するタンパク質のプロセッシングにも関与するとされていることから、管腔形成に必要なタンパク質のプロセッシングに関与する結果、caspase-1の発現

量と管腔形成能が相関している可能性が考えられる。

Late EPCは血管内皮前駆細胞に分類される細胞であるため、未分化な細胞に含まれる分子が発現していることを予測した。しかし、幹細胞関連遺伝子について、発現量を成熟血管内皮細胞であるHUVECと比較したところ、顕著な差は認められなかった。Late EPCにおける幹細胞関連遺伝子の発現の有無を明らかにするには、評価対象とした84種類以外の幹細胞関連遺伝子についても検討する必要があると考えられる。

細胞・組織加工医薬品の品質管理においては、確認試験として、目的とする細胞・組織の形態学的特徴、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、その他の適切な遺伝型あるいは表現型の指標を選択して、目的とする細胞・組織であることを確認することが求められている（薬食発第0208003号 ヒト（自己）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保について）。本研究で明らかになった特性指標候補分子は、それぞれの細胞の機能との関連をさらに検証する必要があるが、early EPCあるいはlate EPCの確認試験や力価試験において有用である可能性が考えられる。すなわち、early EPCで高発現しているMMP-9やケモカイン類、Late EPCで高発現しているMMP-1は特徴的産生物質として、late EPCの管腔形成能と発現量が相関していたoccludinおよびcaspase-1は生化学的指標として用いることができる可能性がある。

我が国ではiPS細胞の発見やガイドラインの整備などが推進力となっていることもあり、再生医療の臨床研究が盛んに行われている。その成果を医薬品としての実用化に発展させるためには、治療効果の期待される細胞を、薬事法の規制下に細胞・組織加工医薬品として開発することにより、その品質・有効性・安全性を確保していくことが

求められる。スーパー特区の選定など、実用化推進に向けた枠組みも作られ、研究成果の医薬品開発への反映が期待されることである。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。有効成分となる細胞の特性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、EPCの品質試験法に有用な特性指標の探索と機能解析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必要とされる確認試験法や力価試験法の確立に資する研究として、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) 単核球由来 early EPC の分化系を確立した。形態と細胞表面マーカーCD45 および CD31 発現の観点から、AC133 陽性細胞由来 early EPC が単核球由来 early EPC と類似した性質を示すことを明らかにした。
- 2) Early EPC と late EPC の遺伝子発現プロファイルが大きく異なっていることを明らかにし、MMP-9 や CXCL9、CXCL10、IL-8 といったケモカイン類等が early EPC の血管形成促進作用に寄与している可能性を示した。
- 3) Late EPC の遺伝子発現プロファイルは組織由来の血管内皮細胞である HUVEC と類似していたが、late EPC では MMP-1 の発現が顕著に高いことを見出した。
- 4) 細胞外マトリックスに対する浸潤活性が、組織由来の血管内皮細胞と比較して early EPC と late EPC でともに高いことを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表、総説

- 1) Takuo Suzuki, Norimasa Tamehiro, Yoji Sato, Tetsu Kobayashi, Akiko Ishii-Watabe, Youichi Shinozaki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Kazuhide Inoue, Yasuo Ohno, Teruhide Yamaguchi, and Toru Kawanishi: The novel compounds that activate farnesoid X receptor: the diversity of their effects on gene expression. *J. Pharmacol. Sci.* 107, 285-294 (2008)
- 2) 山口照英、石井明子 早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品質・安全性確保 臨床評価 2009 (印刷中)
- 3) 川崎ナナ、石井明子、荒戸照世、山口照英 抗体医薬品の構造及び品質特性解析 抗体医薬品製造の留意点～承認申請をふまえて～サイエンス&テクノロジー社 2009 (印刷中)
- 4) 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 PHARMASTAGE 7, 1-6, 2008

2. 学会発表

- 1) 鈴木琢雄、石井明子、多田 稔、小林 哲、豊田淑江、川西 徹、山口照英: 抗体医薬品および Fc ドメイン融合タンパク質医薬品の Fc 受容体 FcRn との結合親和性比較 日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 東京
- 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 の特性指標の探索と機能解析 第 8 回日本再生医療学会総会 2009 年 3 月 東京
- 3) 豊田淑江、石井明子、鈴木 浩子、李 勤、田村悦臣、森田育男、山口照英: 血管内皮前駆細胞である Early EPC と Outgrowth

Endothelial Cell の特性解析 第 81 回日本生化学会大会 2008 年 12 月 神戸

- 4) Takuo Suzuki, Akiko Ishii-Watabe, Tetsu Kobayashi, Toshie Kanayasu-Toyoda, Minoru Tada, Toru Kawanishi and Teruhide Yamaguchi : Affinity of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins to neonatal fc receptor (FcRn) 日本薬物動態学会 第 23 回年会 2008 年 10 月 熊本

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

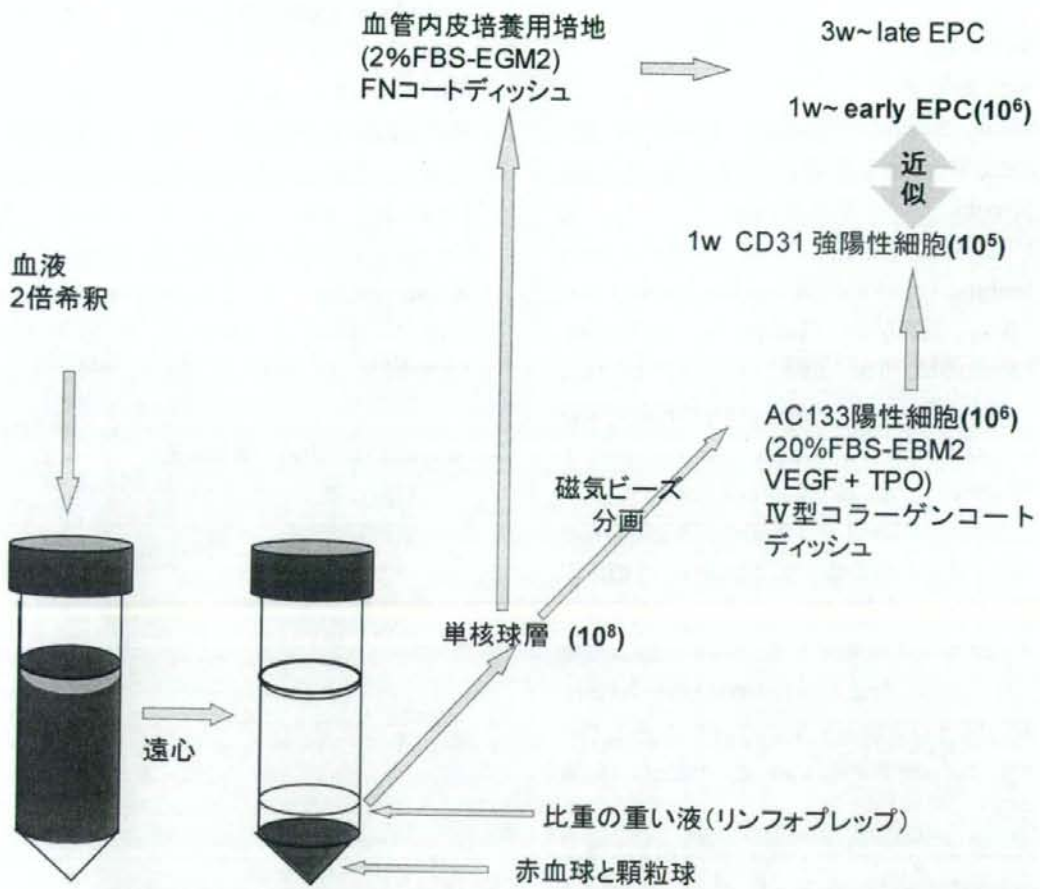
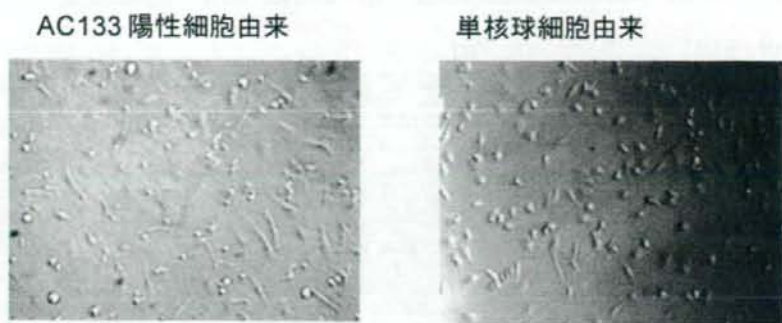


Fig.1 AC133 陽性細胞由来 early EPC、単核球細胞由来 early EPC および late EPC の分化誘導

a. AC133陽性細胞及び単核球細胞由来early EPCの光顕画像



b. AC133陽性細胞及び単核球由来early EPCのフローサイトメーターによる解析

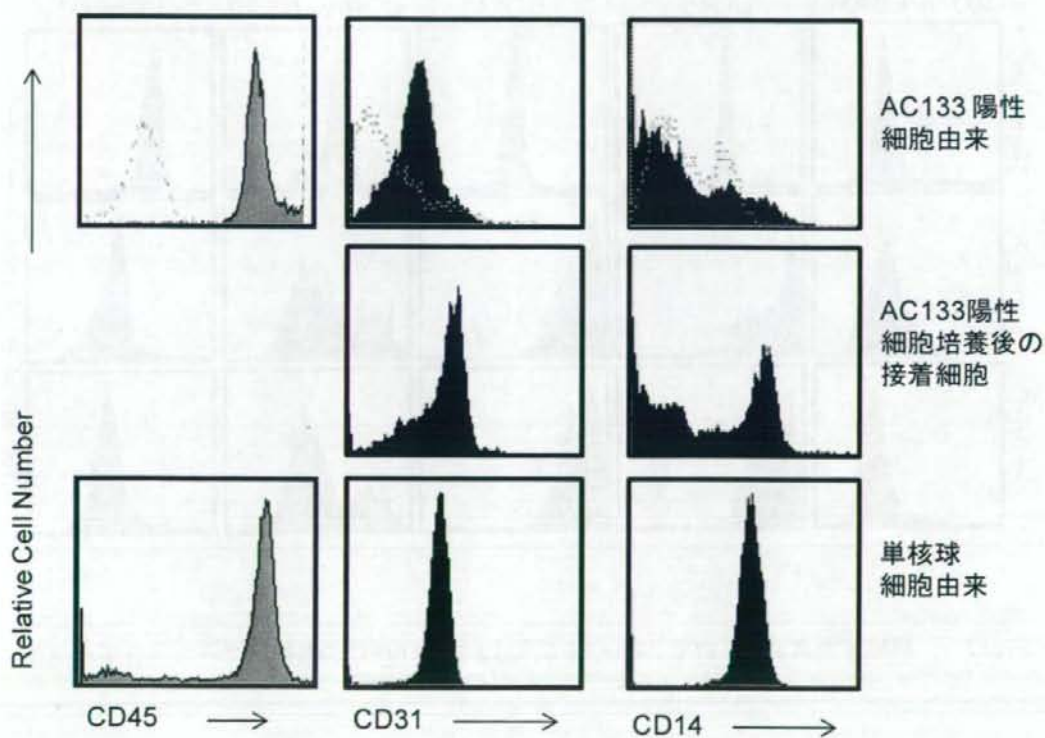


Fig. 2 AC133 陽性細胞及び単核球由来 early EPC の形態と細胞表面マーカーの発現

a. 単核球細胞由来early EPC、Late EPCおよびHUVECの位相差顕微鏡画像



b. 単核球由来early EPC、Late EPCおよびHUVECのフローサイトメーターによる解析

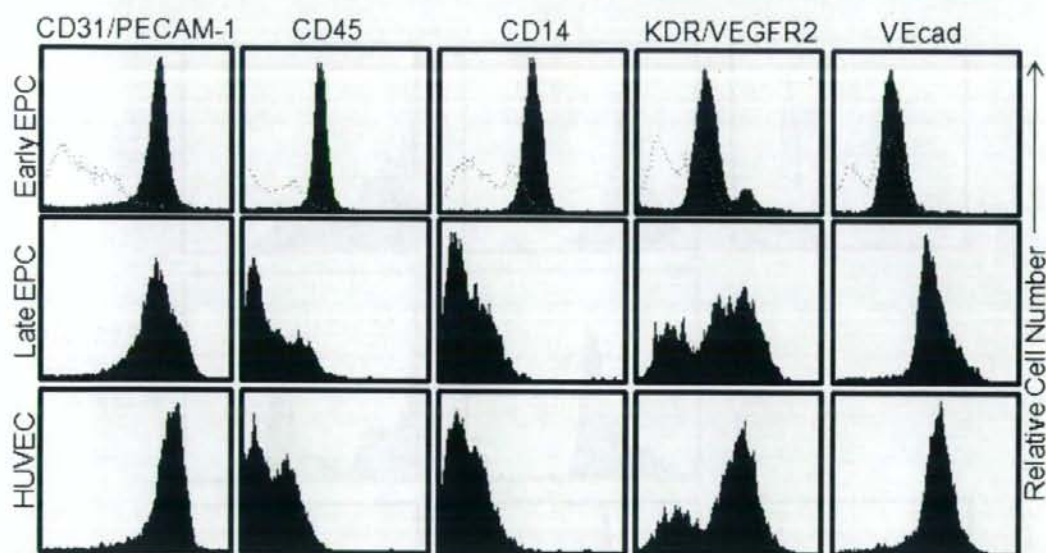


Fig. 3 単核球由来 early EPC、late EPC、および HUVEC の形態とマーカー分子の発現

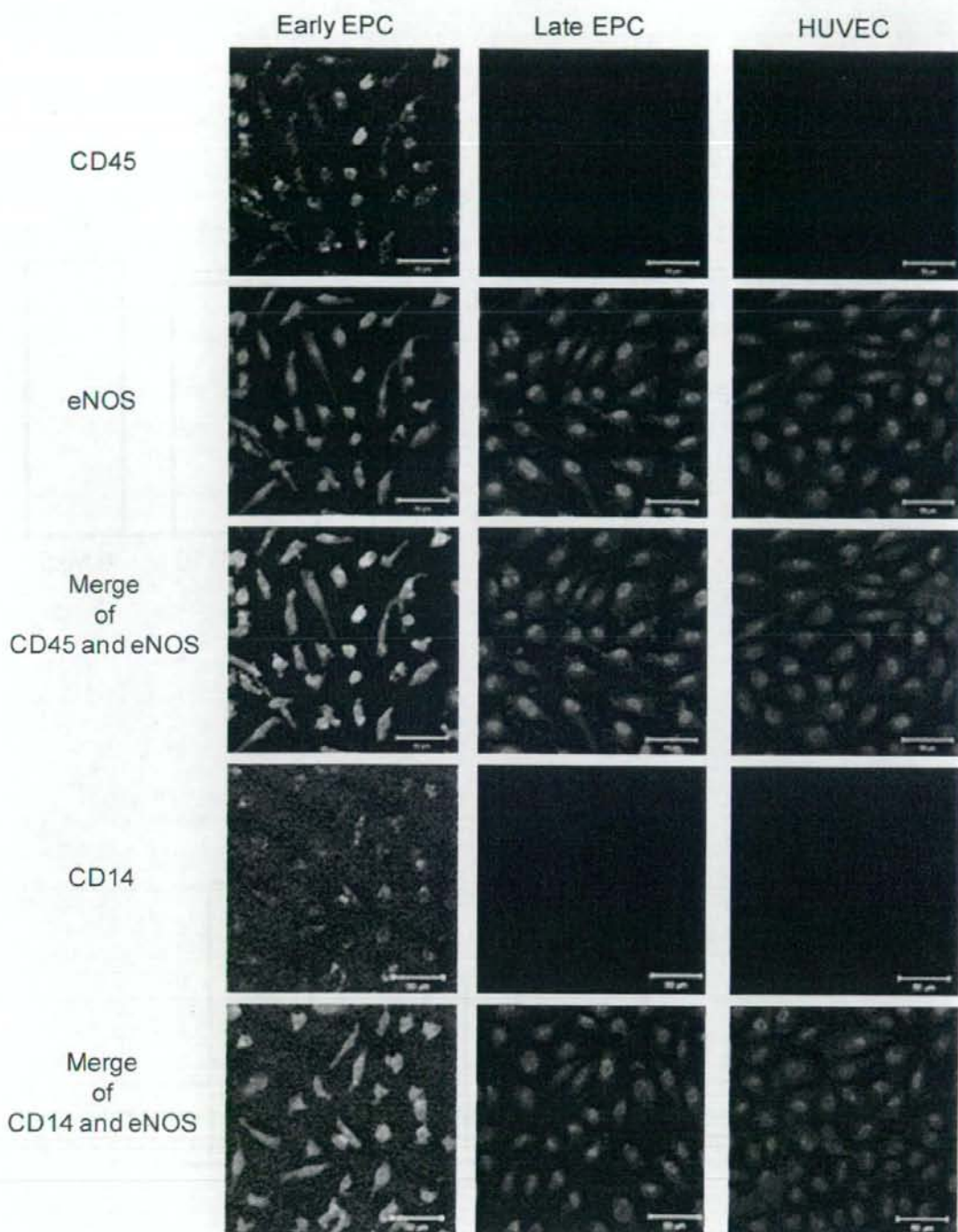


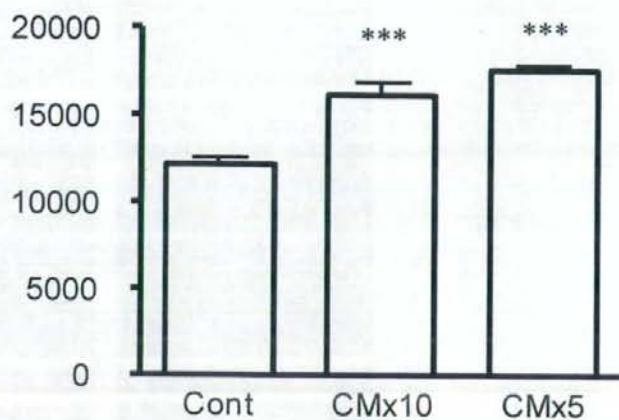
Fig. 4 単核球細胞由来 early EPC、Late EPC および HUVEC の免疫染色による解析

a. 管腔形成

Control



Conditioned Mediumx5



b. 遊走

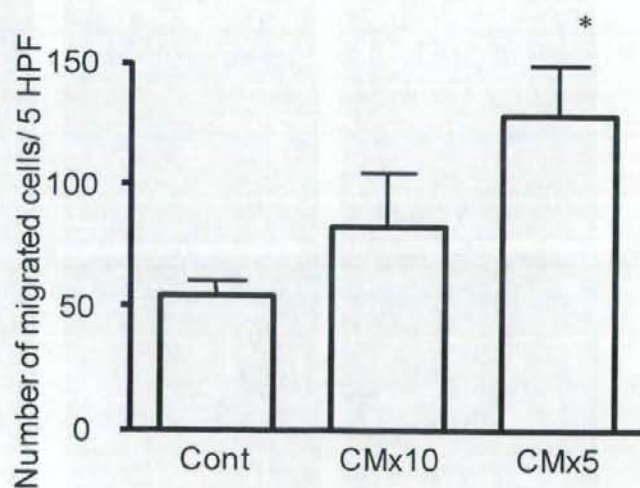


Fig. 5 冠状動脈内皮細胞の管腔形成・遊走における単核球細胞由来 early EPC の培養上清による促進効果

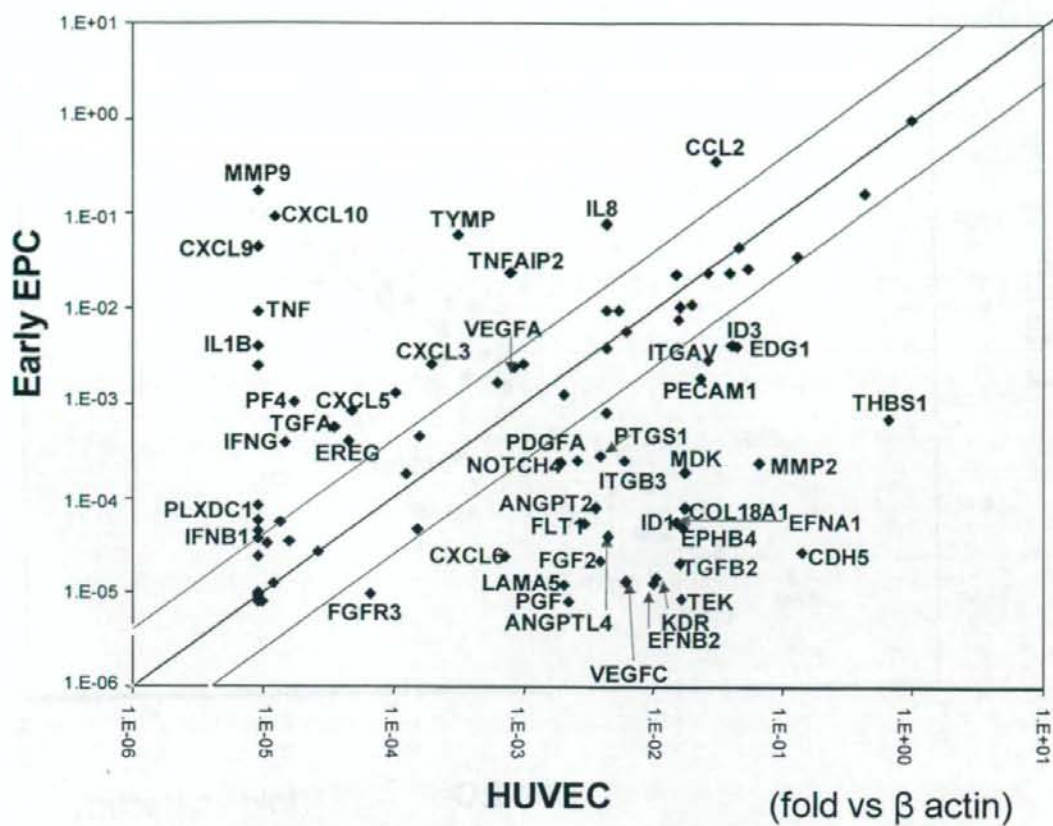


Fig. 6 単核球細胞由来 early EPC と HUVEC における血管新生関連遺伝子の発現比較

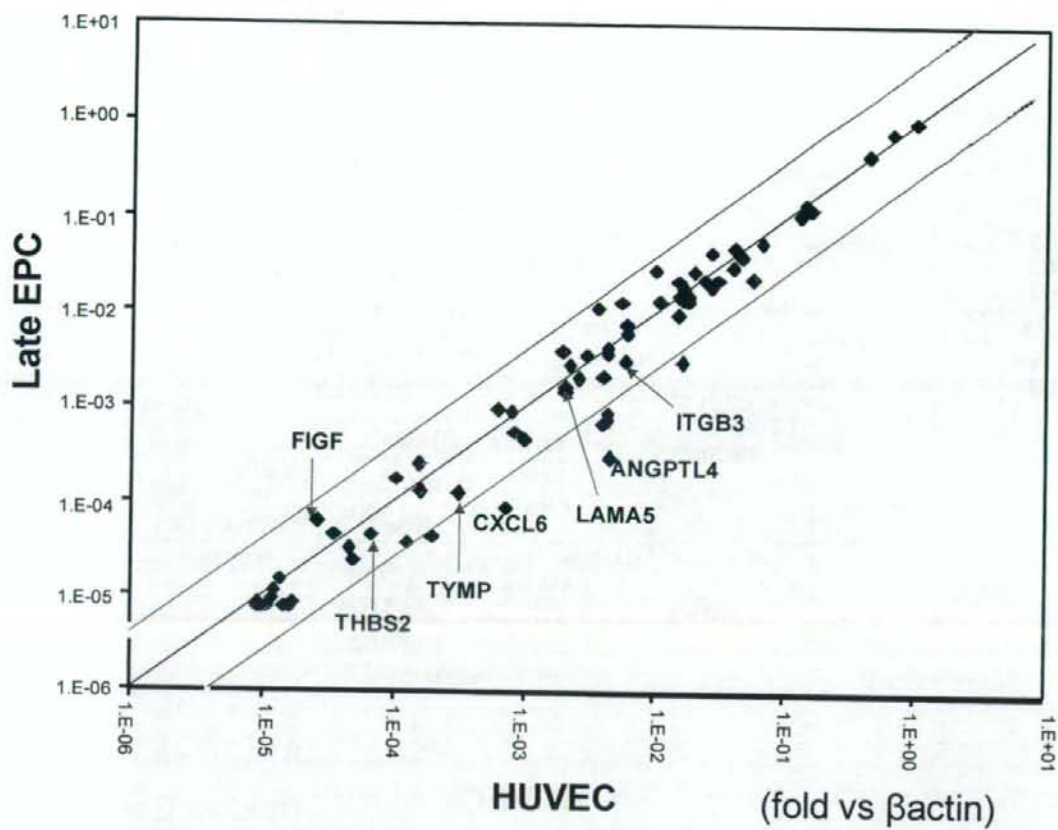


Fig. 7 Late EPC と HUVEC における血管新生関連遺伝子の発現比較

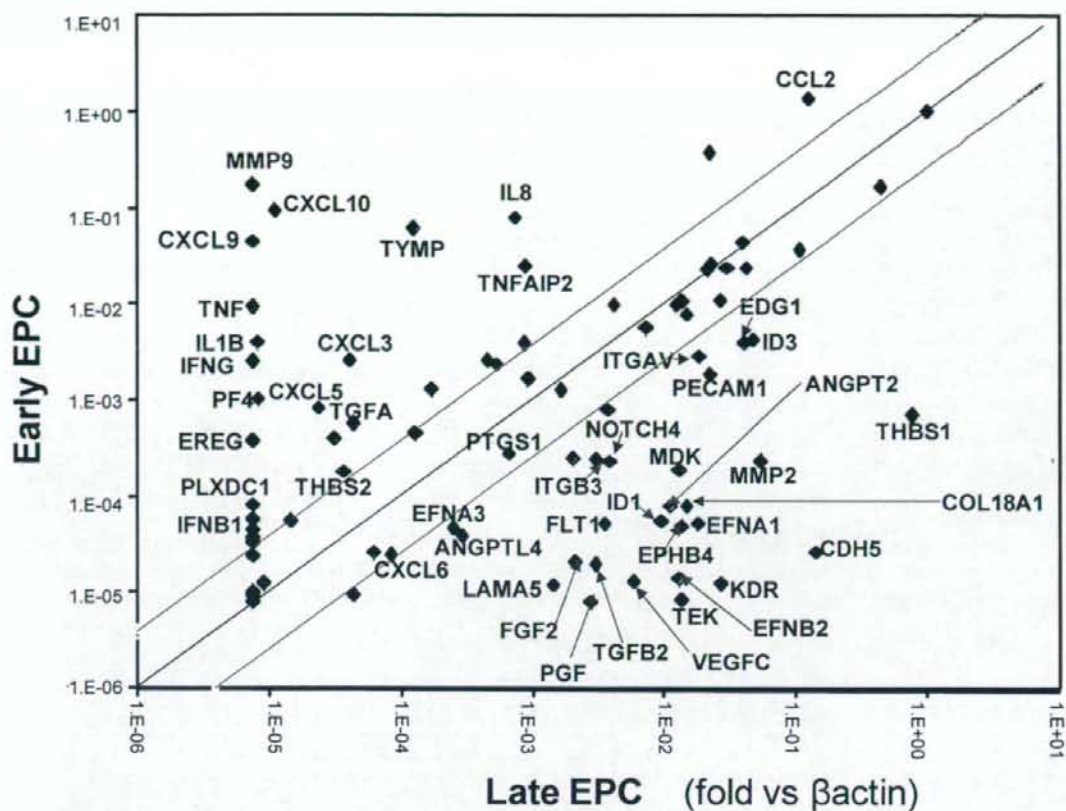
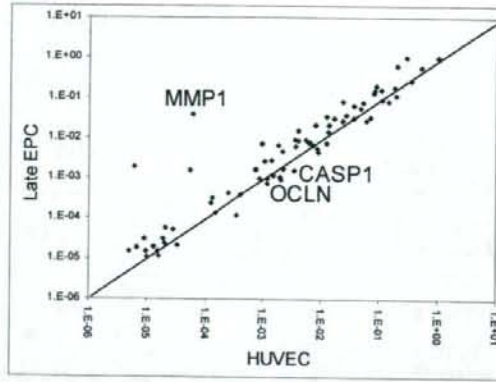
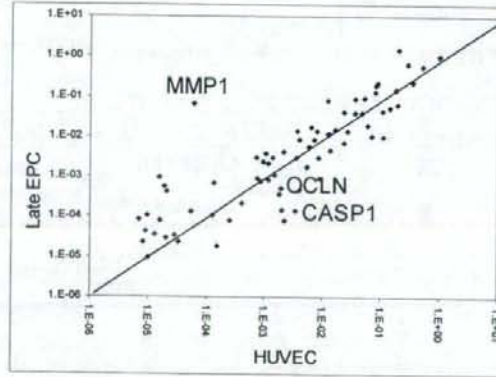


Fig. 8 単核球細胞由来 early EPC と late EPC の血管新生関連遺伝子の発現比較

Late EPC株: 2R32



Late EPC株: S222



Late EPC株: S3

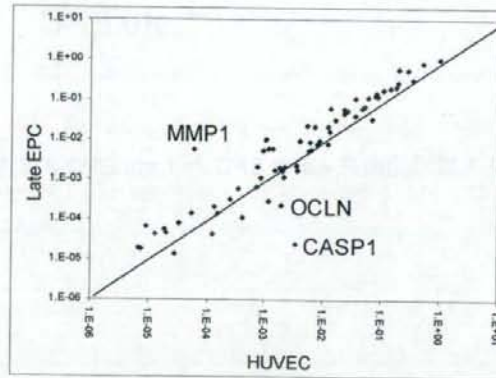


Fig. 9 Late EPC と HUVEC における血管内皮細胞機能関連遺伝子の発現比較

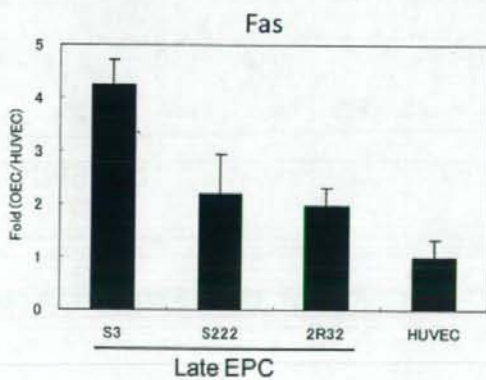
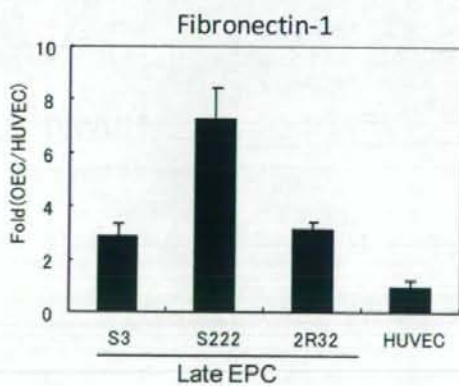
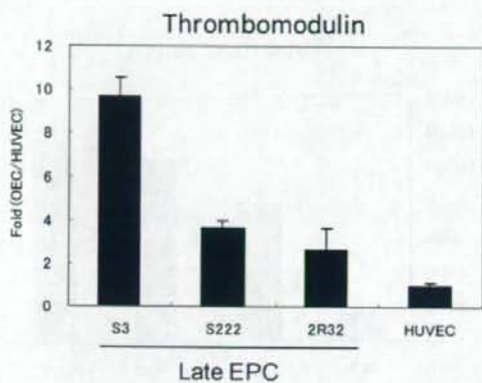
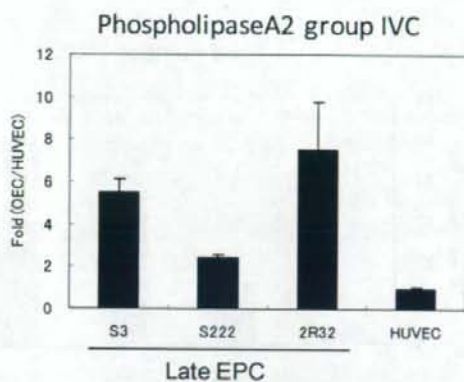
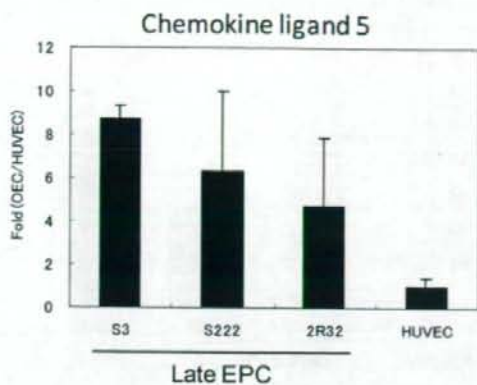
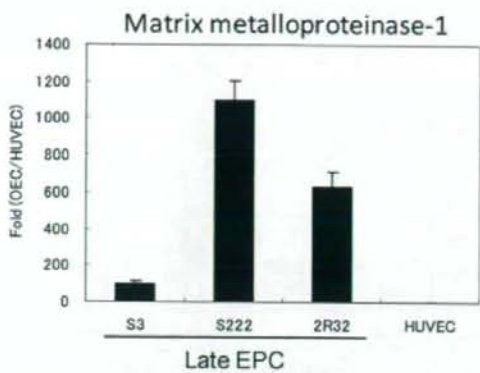


Fig. 10 HUVEC と比較して Late EPC で発現量の高い遺伝子

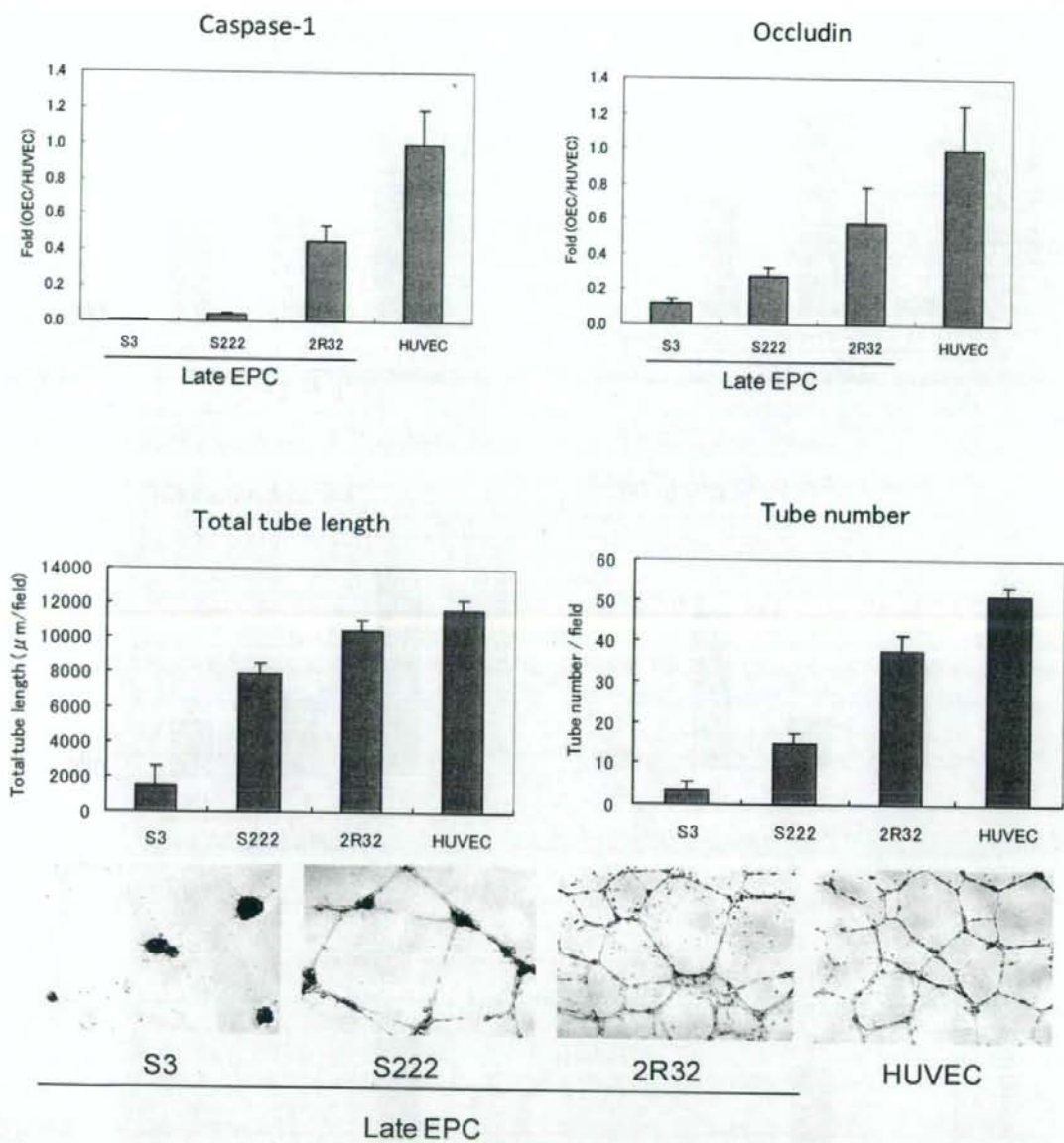


Fig. 11 発現量と管腔形成能に相関のある遺伝子 (CASP1,OCLN)

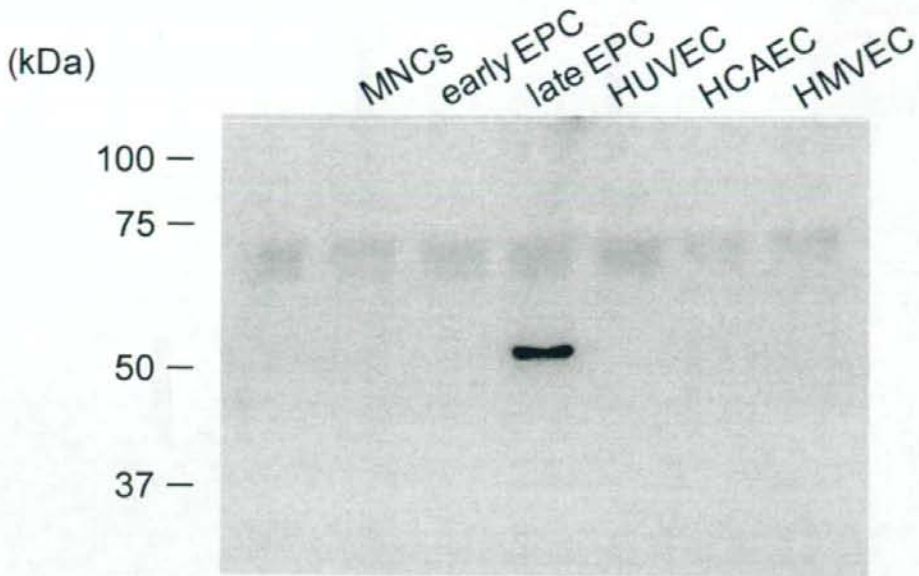


Fig. 12 細胞培養上清中 MMP-1 の Western blot による検出

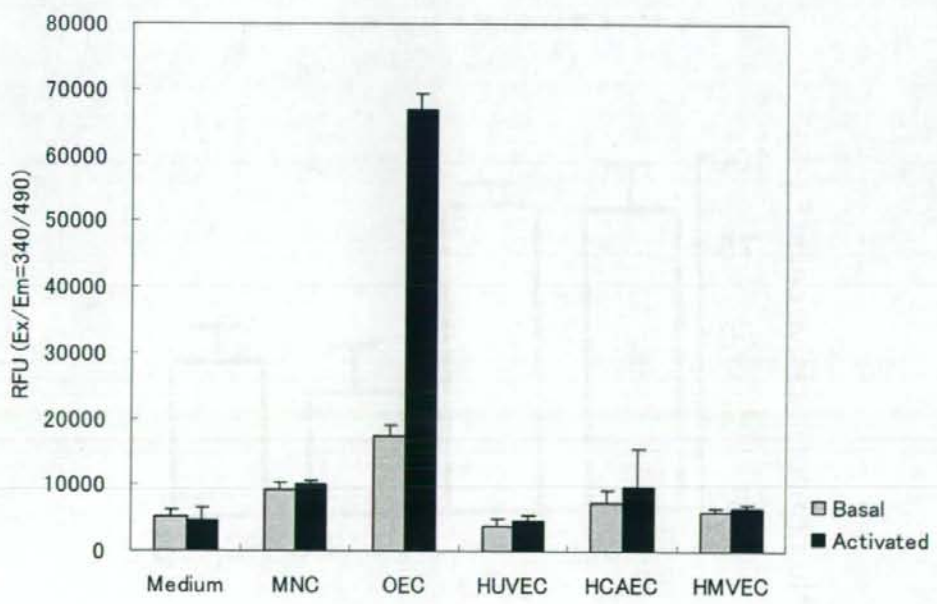


Fig. 13 細胞培養上清中 MMP-1 の活性測定