

ほど VEGF 分泌が増加しやすいことが示唆される。

VSR 遺伝子について、これまでに得られている報告は次の通りである。

- VSR1 (AF4/FMR2 family, member 3) は、リンパ系組織に特異的な遺伝子として同定され、組織特異的に核転写活性化因子をコードする遺伝子であると言われている。また、通常の乳腺上皮細胞での発現よりも乳がん細胞での発現が高いとの報告があり、乳がんの発生において関与していることも示唆されている。血管新生への関与については現在のところ不明である。
- VSR2 (ataxin 1) は、神経変性疾患の一種である脊髄小脳変性症を引き起こすタンパク質をコードする遺伝子として知られている。しかし、その機能は現在のところはっきりしていない。
- VSR3 (chloride intracellular channel 3) は、胎盤において高い発現が見られることが報告されており、細胞内の塩素イオンを調整することで、様々な細胞プロセスに関与している可能性が示唆されている。血管新生への関与については不明である。
- VSR4 (cytokine-like 1) は、骨髄由来の CD34 陽性細胞を特徴付けるとして同定された遺伝子である。軟骨形成において発現が劇的に増加し、間葉系細胞の軟骨分化に関与することが示唆されている。血管新生への関与については、現在のところ不明である。
- VSR5 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) は、マイクロプロセッサ

と呼ばれるタンパク質複合体のサブユニットをコードする遺伝子であり、タンパク質をコードしない小さな RNA 分子であるマイクロ RNA の成熟に関与していると言われている。血管新生への関与については現在のところ不明である。

- VSR6 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 2) は、アミノペプチダーゼをコードする遺伝子であり、小胞体内腔画分に可溶性タンパク質として存在することが報告されている。インターフェロン γ によって誘発されることが知られており、小胞体において抗原性のペプチド生成過程に関与していることが示唆されている。

VSR6 と同じファミリーに属する他のアミノペプチダーゼに関して、血管内皮前駆細胞を VEGF で刺激した際に発現が上昇することや、発現低下時においては VEGF 刺激による血管新生が阻害されることなどが報告されており、VSR6 についても VEGF 分泌に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

- VSR7 (family with sequence similarity 101, member B) については、その発現とラット腰椎の骨密度との関連を示唆する報告が見られるが、詳細な機能については未知である。
- VSR8 (gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog) は、骨形成を抑制するタンパクをコードする遺伝子として知られているが、近年 VEGF 受容体 2 を刺激することで、VEGF と同様の血管新生効果を示すことも報告されており、VEGF 分泌との関連は不明であるが、血管新生促進因子として機能する可

能性がある。

- VSR9 (hyaluronan and proteoglycan link protein 1) は、関節軟骨で超高分子複合体を構成するリンクタンパク質をコードする遺伝子として知られている。小腸や胎盤、胚および心臓などでも発現が報告されている他、中皮腫においての過剰発現より、腫瘍化への関与も示唆されている。血管新生への関与については現在のところ不明である。
- VSR10 (inhibin, beta E) は、主に内分泌腫瘍に見られる他、扁平上皮癌においても発現が見られ、細胞の形質転換において重要な役割が示唆されているが、その詳細な機能については不明である。
- VSR11 (keratin associated protein 1-1) は、髪の毛の繊維を構築するケラチンの関連タンパク質をコードする遺伝子であるが、血管新生への関与については現在のところ不明である
- VSR12 (hypothetical LOC339290) の機能については未知である。
- VSR13 (M-phase phosphoprotein 6) は、核小体に特異的なエキソソームの補助因子として知られており、リボソーム RNA の成熟に重要な役割を果たしていることが示唆されている。血管新生への関与については現在のところ不明である。
- VSR14 (poly(A) binding protein, cytoplasmic 4-like) の機能については未知である。
- VSR15 (programmed cell death 6 pseudogene) は、アポトーシスに関係するタンパク質をコードする遺伝子として知られており、肝がんおよび肺がん細

胞において発現が上昇することが報告されている。血管新生への関与について現在のところ不明である。

- VSR16 (pellino homolog 2 (Drosophila)) は、核内転写因子 NF- κ B による活性化の中間体であることが報告されており、その情報伝達経路を構成する要素であることが示唆されている。血管新生への関与について現在のところ不明である。
- VSR17 の機能については未知である。

また、VSR 遺伝子と低酸素の関連については、HIF-1 により誘導される遺伝子として VSR10 および VSR16 に関する報告がわずかにあるものの、その関係については現在のところ不明である。VEGF 分泌への関与をはじめ VSR 遺伝子の役割については今後さらなる検討が必要と考えられる。

以上のように、虚血時の VEGF 分泌応答と相関が得られる遺伝子が複数同定された。同定された遺伝子は、全て正の相関を持つものであることから、その発現が高いほど虚血後の hMSC からの VEGF 分泌は増加する可能性が高い。

hMSC の虚血応答性 VEGF 分泌に対する VSR 遺伝子の機能的関与を明らかにすることは、hMSC の作用機序の理解や品質確保のために有用である。本研究では、hMSC からの VEGF 分泌と VSR 遺伝子の発現量との相関が明らかとなったが、因果関係の証明には至っていない。今後は RNAi 等を用い、VSR の機能的役割の検討が必要と考えられる。

E. 結論

MSC は、虚血性疾患に対して修復効果を示すことが数多く報告されている。また、MSC は虚血状態においても数日間生存する能力があることが知られている。MSC による虚血組織保護・修復については、組織細胞への分化のみならず、そのパラクリン効果が近年重要視されており、修復効果の一つである血管新生については MSC より分泌されるサイトカインが大きな役割を果たしていると考えられている。

本研究では酸素濃度 1%、グルコースなしの擬似的虚血条件を用いて、通常条件との比較により虚血状態における hMSC から放出される血管新生関連因子の種類および分泌量を検討した。遺伝子発現が有意に上昇した血管新生関連因子（サイトカイン類）を対象として ELISA により実際の分泌量を測定した結果、VEGF については有意な増加が認められ、生理的レベルに相当する分泌量が得られた。VEGF は、1) VEGF 発現プラスミドを用いた心筋虚血の遺伝子治療に効果が認められること、2) VEGF 発現量が多く見られるブタ MSC 培養上清は hMSC 培養上清と比較して、心筋症モデル動物において有意な心機能維持効果を有するとともに、VEGF を強制発現させた hMSC 培養上清はブタ MSC 培養上清と同等の心機能維持効果を示すこと、3) ラット骨髄由来 MSC の心筋虚血再還流障害に対する急性予防効果は MSC の VEGF 発現量に依存することなどから、MSC による虚血心筋保護効果において主要な役割を担っているものと考えられる。ただし、MSC の投与は VEGF 分泌量換算では、VEGF タンパク質を単独投与する場合に比べて、非常に低い用量で薬効があるとされており、他に

分泌される生理活性物質との協調効果も示唆されている。

ELISA において有意な増加が見られたレプチンについては、今回の実験系では十分な濃度を得ることは出来なかったが、レプチンの存在が VEGF の発現を上昇させるとの報告もあることから、今後さらなる検討を行いその意義を評価する必要があると考えられる。

複数のロットを用いて検討を行った結果、虚血後の VEGF 分泌量および虚血による分泌変化率に有意なロット差が認められる結果となった。ロット間におけるこれらの差は、hMSC 移植後に生じる血管新生の程度、ひいては治療効果に影響を及ぼす可能性が考えられる。十分な治療効果を確保するためには投与される細胞の修復能力を予め把握することが重要であり、そのための特性解析指標が必要と考えられる。そこで筆者は、虚血後の VEGF 分泌の差は hMSC の虚血前における遺伝子発現量の差に関連するという仮説を立て、虚血環境下（低酸素分圧・グルコース欠乏下）の VEGF 分泌応答と相関する遺伝子を探索・同定した。ここで同定された遺伝子を、VSR 遺伝子と名づけた。

VSR 遺伝子は、hMSC による治療効果ないし虚血部位における hMSC の VEGF 分泌能を予測するための特性指標（バイオマーカー）の候補であると考えられる。治療効果の把握により、効果が低いと予想される場合に対しては hMSC の機能を高めるなどの対策を予め立てることが可能となり、十分な治療効果を持つ hMSC を投与することにつながることを期待される。VSR 遺伝子については機能が未知なものも多く、

hMSCからのVEGF分泌に対してどのように関与しているかはさらなる検討が必要である。また、特性指標としての妥当性を評価するためには、VSR 遺伝子の発現量と *in vivo* における虚血組織保護効果との相関を検討するとともに、別に用意したロット群を用いての交差妥当性を検証するなど、詳細な検討が必要とされる。

心筋梗塞や慢性虚血性心疾患に対するMSCを用いての臨床試験が進行中であり、近い将来新たな治療法が誕生することが期待される。MSCの投与方法としては静脈内への注入あるいは心筋内への直接注入が検討されており、一方、使用するMSCとしては骨髄あるいは脂肪由来のものなどが候補として挙げられている。MSCを医薬品として使用するに当たっては、そのメカニズムを解明することを初め、高い純度および十分な量の細胞数を単離する方法や最適な投与方法の確立、細胞の供給源の確保などが必要と考えられ、検討すべき課題はまだ数多く存在している。虚血性疾患治療用の細胞・組織利用医薬品を利用した再生医療の実現のために、本研究を含め、今後さらなる研究が進められることが望まれる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療の規制等に関する欧米の動向—臨床応用に関する規制当局の支援の比較— ヒューマンサイエンス 2011;22(2):28-32.
2. 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療の規制

に関する国際動向 月刊ファームステージ 2011年3月号 PHARMSTAGE 2011;10(12):1-2.

3. Jin MH, Yokoyama U, Sato Y, Shioda A, Jiao Q, Ishikawa Y, Minamisawa S. DNA microarray profiling identified a new role of growth hormone in vascular remodeling of rat ductus arteriosus. *J Physiol Sci.* 2011;61:167-79.
4. 佐藤 陽治, 鈴木 和博, 早川 堯夫 EUにおける細胞・組織加工製品の規制動向 医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス 2011;42:142-8.
5. 西田 基宏, 斎木 翔太, 北島 直幸, 仲矢 道雄, 佐藤 陽治, 黒瀬 等 TRPCチャネルのリン酸化による心血管機能制御 YAKUGAKU ZASSHI 2010;130:1427-33.
6. Nishida M, Suda R, Nagamatsu Y, Tanabe S, Onohara N, Nakaya M, Kanaho Y, Shibata T, Uchida K, Sumimoto H, Sato Y, Kurose H. Pertussis toxin upregulates angiotensin type 1 receptors through Toll-like receptor 4-mediated Rac activation. *J Biol Chem.* 2010;285:15268-77.

G-2 学会発表

1. 吾月 遥, 佐藤 光利, 田邊 思帆里, 山口 照英, 早川 堯夫, 鈴木 和博, 佐藤 陽治 虚血環境下におけるヒト間葉系幹細胞(hMSCs)VEGF 分泌能関連遺伝子日本薬学会第131回年会(2011.3)(静岡)

2. 野田 誠, 仲矢 道雄, 佐藤 陽治, 西田 基宏, 黒瀬 等 心筋梗塞における GRK5 の役割日本薬学会第 131 回年会 (2011.3) (静岡)
3. Saiki S, Nishida M, Watanabe K, Nakaya M, Sato Y, Kurose H. Involvement of endothelial nitric oxide synthase in therapeutic vascular maturation by cilostazol. 第 84 回日本薬理学会年会 (2011.3) (東京)
4. Kitajima N, Nishida M, Watanabe K, Nakaya M, Kiyonaka S, Sato Y, Mori Y, Kurose H. Suppression of fibrosis underlies prevention of dilated cardiomyopathy by TRPC channel inhibition. 第 84 回日本薬理学会年会 (2011.3) (東京)
5. Mishima T, Nishida M, Kuwahara K, Nakaya M, Sato Y, Shibata T, Uchida K, Kurose H. Ga12/13 mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis through 4-hydroxy-2-nonenal production in cardiac fibroblasts. 第 84 回日本薬理学会年会 (2011.3) (東京)
6. Atsuki H, Satoh M, Tanabe S, Yamaguchi T, Hayakawa T, Suzuki K, Sato Y. Genes associates with VEGF secretional capacity of human mesenchymal stem cells under ischemic condition. 第 84 回日本薬理学会年会 (2011.3) (東京)
7. Toyotaka M, Nishida M, Ogushi M, Suda R, Saiki S, Nakaya M, Sato Y, Inoue K, Kurose H. Local S-nitrosylation of NF- κ B defines ATP-induced down-regulation of angiotensin type1 receptors. 第 84 回日本薬理学会年会 (2011.3) (東京)
8. 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療の実用化に関する海外の規制 第 10 回日本再生医療学会総会 (平成 23 年 3 月 1 日, 東京)
9. 安田 智, 長谷川 哲也, 細野 哲司, 佐藤 光利, 山口 照英, 鈴木 和博, 佐藤 陽治 マウス胚性癌細胞および胚性幹細胞における心筋分化マーカーの探索 第 10 回日本再生医療学会総会 (平成 23 年 3 月 1 日, 東京)
10. 吾月 遥, 佐藤 光利, 田邊 思帆里, 山口 照英, 早川 堯夫, 鈴木 和博, 佐藤 陽治 ヒト間葉系幹細胞(hMSC)の虚血条件下における VEGF 分泌能予測因子に関する検討 第 10 回日本再生医療学会総会 (平成 23 年 3 月 2 日, 東京)
11. 佐藤 陽治 再生医療の国際動向から見たわが国の目指すべき道 バイオロジクスフォーラム第 8 回学術集会 (平成 23 年 2 月 2 日, 東京)
12. 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療製品の規制に関する国際動向 アカデミアにおける臨床研究・治験に関する薬事の基本と実例講習会 (文部科学省 橋渡し研究支援推進プログラム)(平成 23 年 2 月 1 日, 大阪)
13. 斎木 翔太, 西岡 絹江, 有吉 麻里奈, 佐藤 陽治, 仲矢 道雄, 西田 基宏, 黒瀬 等 ホスホジエステラーゼ 3 阻害による PKA 依存的な TRPC6 チャンネルのリン酸化を介した血管収縮抑制効果 BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 平成 22 年 12 月 7-10 日, 神戸)
14. 北島 直幸, 渡邊 邦宏, 佐藤 陽治, 仲矢 道雄, 西田 基宏, 黒瀬 等 Suppression of myocardial dysfunction by phosphodiesterase 3 inhibition in MLP-deficient mice BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 平成 22 年 12 月 7-10 日, 神戸)
15. 吾月 遥, 佐藤 光利, 田邊 思帆里, 山口 照英, 早川 堯夫, 鈴木 和博, 佐藤 陽治 虚血条件下におけるヒト間葉系

幹細胞のサイトカイン分泌プロファイリング第 31 回日本臨床薬理学会年会 (平成 22 年 12 月 12 日 1-3 日, 京都)

療交流会 / 第 5 回未来医療市民公開シンポジウム (平成 22 年 6 月 23 日, 大阪)

16. 佐藤 陽治 再生医療の実用化に向けた規制に関する国際比較 第 47 回全国衛生化学技術協議会年会 (平成 22 年 11 月 11-12 日, 神戸)

17. Satoh M, Yanagino S, Nishimaki-Mogami S, Suzuki K, Sato Y. Thyroid hormone up-regulates elastin and lysyl oxidase genes in rat aorta. WorldPharma2010 (16th IUPHAR WorldCongress of Basis and Clinical Pharmacology), Copenhagen, Denmark (2010 年 7 月 17-23 日) *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;107(Suppl.1):563.

18. Tanabe S, Sato Y, Suzuki T, Yamaguchi T, Suzuki K. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells for identification of surrogate markers for *in vitro* culture stage. WorldPharma2010 (16th IUPHAR WorldCongress of Basis and Clinical Pharmacology), Copenhagen, Denmark (2010 年 7 月 17-23 日) *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;107(Suppl.1):608.

19. 佐藤 陽治 再生医療・細胞治療製品の規制に関する国際動向 第 12 回未来医

20. Nishida M, Kitajima N, Nakaya M, Ide T, Sato Y, Kurose H. Inhibition of phosphodiesterase 5 prevents cardiac hypertrophy through phosphorylation of TRP6 at Thr69. 20th ISHR World Congress (2010 年 5 月 13-16 日, 京都)

21. Mishima T, Nishida M, Makaya M, Ide T, Sato Y, Kurose H. Galpha12/13 mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis through production of reactive oxygen species. 20th ISHR World Congress (2010 年 5 月 13-16 日, 京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得 なし

H-2. 実用新案登録 なし

H-3. その他 特記事項なし

表1 hMSC 各ロットのドナー情報

ロット番号		年齢	性別	人種*	ロット番号		年齢	性別	人種*
in house	製造元				in house	製造元			
A	4F1127	23	男	B	F	4F1560	23	女	B
B	4F0312	27	女	B	G	4F0591	32	男	C
C	5F0138	19	男	B	H	4F0760	25	女	C

*B:アフリカ系、C:コーカサス系

表2 hMSC の *in vitro* 擬似的虚血処理条件

	通常条件 (コントロール群)	擬似的虚血条件 (虚血群)
インキュベータ	通常酸素濃度 37°C, 5% CO ₂ 機種名: MCO-175 [SANYO]	酸素濃度 = 1.0% 37°C, N ₂ :O ₂ :CO ₂ = 94.0%:1.0%:5.0%; 機種名: MCO-175M [SANYO]
培地	無血清 グルコース(+) 4.5g/dL DMEM [GIBCO, Invitrogen]	無血清 グルコース(-) DMEM [GIBCO, Invitrogen]
抗生物質	100 unit/mL ペニシリン G + 100µg/mL 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]	100 unit/mL ペニシリン G + 100µg/mL 硫酸ストレプトマイシン [GIBCO, Invitrogen]

表3 RT² Profiler PCR Array で発現を測定した血管新生関連遺伝子

Angiogenic Growth Factors and Related Genes:
<u>Growth Factors:</u> ECGF1, FGF1, FGF13, FGF2, FGFBP1, FIGF, GRN, GRP, HGF, KITLG, LEP, MDK, PDGFB, PDGFD, PGF, PROK1, TGFA, VEGFA.
<u>Cytokines and Chemokines:</u> BMP2, CCL15, CCL2, CSF3, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL9, IL10, IL6, IL8, PPBP, PTN, TNF.
<u>Other Positive Regulators of Angiogenesis:</u> AGGF1, AMOT, ANG, ANGPT1, BTG1, EDIL3, EREG, FST, RHOB, RUNX1.
Angiogenesis Inhibitors and Related Genes:
<u>Cytokines, Chemokines and Growth Factors:</u> CXCL10, CXCL2, IFNG, IL12A, IL12B, IL17F, PF4, TGFB1.
<u>Other Negative Regulators of Angiogenesis:</u> ANGPT2, ANGPTL1, BAI1, CD55, CD59, CHGA, COL18A1, COL4A3, FN1, IFNA1, IFNB1, KLK3, MLLT7, NPPB, NPR1, PLG, PRL, RNH1, SERPINC1, SERPINE1, SERPINF1, SPINK5, STAB1, THBS1, TIE1, TIMP1, TIMP2, TIMP3, TNNI2, TNNI3.

表4 RT² Profiler PCR Array 使用時のサーマルサイクラーの条件

ステージ	反応温度	反応時間	サイクル数
ステージ1	95℃	10min	1Cycle
ステージ2	95℃	15sec	40Cycles
	60℃	1min	

表5 使用したサイトカイン ELISA キット

サイトカイン	ELISA Kit
レプチン	Human Leptin Immunoassay [R&D, cat# DLP00]
VEGF	Human VEGF Immunoassay [R&D, cat# DVE00]
PlGF	Human PlGF Immunoassay [R&D, cat# DPG00]
アンジオゲニン	Human ANG Immunoassay [R&D, cat# DAN00]
TGF-β1	Human TGF-β1 Immunoassay [R&D, cat# DB100B]

表6 虚血後の VEGF 分泌と正の相関関係が得られた VSR 遺伝子 ($p < 0.01$)

Gene	Gene Title	Gene Symbol
VSR1	AF4/FMR2 family, member 3	AFF3
VSR2	ataxin 1	ATXN1
VSR3	chloride intracellular channel 3	CLIC3
VSR4	cytokine-like 1	CYTL1
VSR5	DiGeorge syndrome critical region gene 8	DGCR8
VSR6	endoplasmic reticulum aminopeptidase 2	ERAP2
VSR7	family with sequence similarity 101, member B	FAM101B
VSR8	gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog	GREM1
VSR9	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	HAPLN1
VSR10	inhibin, beta E	INHBE
VSR11	keratin associated protein 1-1	KRTAP1-1
VSR12	hypothetical LOC339290	LOC339290
VSR13	M-phase phosphoprotein 6	MPHOSPH6
VSR14	poly(A) binding protein, cytoplasmic 4-like	PABPC4L
VSR15	programmed cell death 6 pseudogene	PDCD6
VSR16	pellino homolog 2 (Drosophila)	PELI2
VSR17	---	---

※VSR17 についての詳細は不明であった。

表 7 虚血後の VEGF 分泌と VSR 遺伝子発現量の相関

Gene	PS#9 遺伝子発現量		PS#9 遺伝子発現量		PS#7 遺伝子発現量		PS#7 遺伝子発現量	
	vs.		vs.		vs.		vs.	
	VEGF 分泌量		VEGF 分泌変化率		VEGF 分泌量		VEGF 分泌変化率	
	rs	<i>p</i>	rs	<i>P</i>	rs	<i>p</i>	rs	<i>p</i>
VSR1	0.844	4.46E-09	0.600	4.57E-04	0.542	1.96E-03	1.00	
VSR2	0.817	3.53E-08	0.543	1.94E-03	0.680	3.59E-05	0.600	4.57E-04
VSR3	0.518	3.40E-03	0.771	6.03E-07	0.646	1.15E-04	0.771	6.03E-07
VSR4	0.653	9.22E-05	0.771	6.03E-07	0.567	1.08E-03	0.886	7.80E-11
VSR5	0.707	1.26E-05	0.771	6.03E-07	0.707	1.26E-05	0.771	6.03E-07
VSR6	0.741	2.86E-06	0.771	6.03E-07	0.707	1.26E-05	0.771	6.03E-07
VSR7	0.817	3.53E-08	0.543	1.94E-03	0.817	3.53E-08	0.543	1.94E-03
VSR8	0.518	3.40E-03	0.771	6.03E-07	0.569	1.02E-03	0.657	7.98E-05
VSR9	0.619	2.66E-04	0.771	6.03E-07	0.757	1.32E-06	0.714	9.29E-06
VSR10	0.851	2.50E-09	0.714	9.29E-06	0.653	9.22E-05	0.771	6.03E-07
VSR11	0.757	1.32E-06	0.714	9.29E-06	0.903	8.61E-12	0.600	4.57E-04
VSR12	0.538	2.17E-03	0.543	1.94E-03	0.538	2.17E-03	0.543	1.94E-03
VSR13	0.684	3.04E-05	0.543	1.94E-03	0.903	8.61E-12	0.600	4.57E-04
VSR14	0.842	5.37E-09	0.600	4.57E-04	0.484	6.77E-03	0.771	6.03E-07
VSR15	0.538	2.17E-03	0.829	1.57E-08	0.538	2.17E-03	0.829	1.57E-08
VSR16	0.569	1.02E-03	0.714	9.29E-06	0.484	6.77E-03	0.829	1.57E-08
VSR17	0.484	6.77E-03	0.657	7.98E-05	0.518	3.40E-03	0.771	6.03E-07

rs : スピアマンの順位相関係数

p : 有意確率

表 8 虚血抵抗性と VSR 遺伝子発現量の相関

Gene	PS#9 遺伝子発現量 vs. 虚血抵抗性		PS#7 遺伝子発現量 vs. 虚血抵抗性	
	rs	<i>p</i>	rs	<i>p</i>
VSR1	-0.551	1.59E-03	-0.718	7.86E-06
VSR2	-0.696	1.97E-05	-0.585	6.82E-04
VSR3	-0.585	6.82E-04	-0.858	1.36E-09
VSR4	-0.527	2.80E-03	-0.608	3.68E-04
VSR5	-0.887	6.44E-11	-0.887	6.44E-11
VSR6	-0.736	3.52E-06	-0.887	6.44E-11
VSR7	-0.696	1.97E-05	-0.696	1.97E-05
VSR8	-0.585	6.82E-04	-0.655	8.55E-05
VSR9	-0.678	3.90E-05	-0.788	2.33E-07
VSR10	-0.666	5.82E-05	-0.527	2.80E-03
VSR11	-0.788	2.33E-07	-0.736	3.52E-06
VSR12	-0.204	2.79E-01	-0.204	2.79E-01
VSR13	-0.599	4.74E-04	-0.736	3.52E-06
VSR14	-0.707	1.26E-05	-0.736	3.52E-06
VSR15	-0.772	5.74E-07	-0.772	5.74E-07
VSR16	-0.330	7.46E-02	-0.412	2.39E-02
VSR17	-0.290	1.20E-01	-0.585	6.82E-04

rs : スピアマンの順位相関係数

p : 有意確率

▨ : *p* < 0.01 ではなかったもの

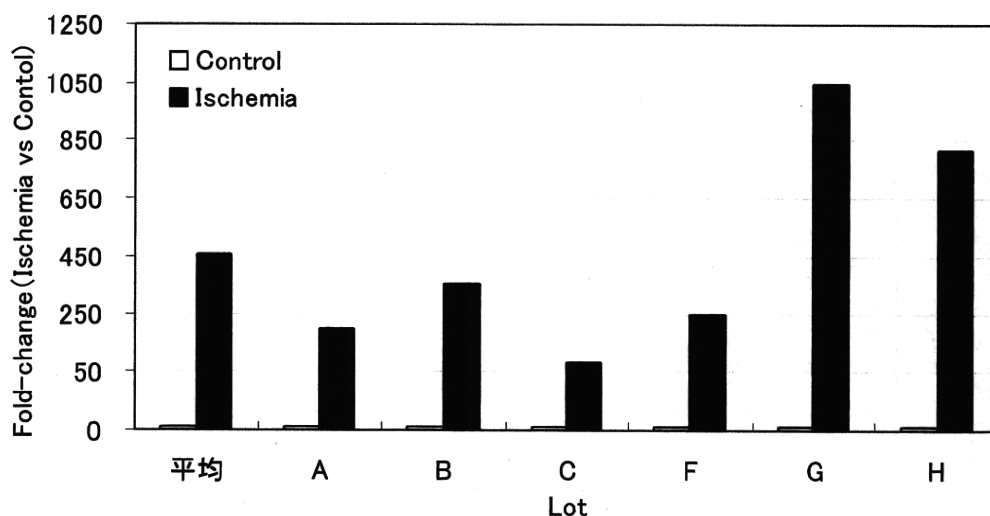


図1 虚血後におけるhMSCのレプチン遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後に回収した細胞より抽出したTotal RNAを用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群のレプチン遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後におけるhMSCでは、レプチン遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。 [各ロット1例ずつ、計6ロットの平均値] * $p < 0.01$ vs. Control

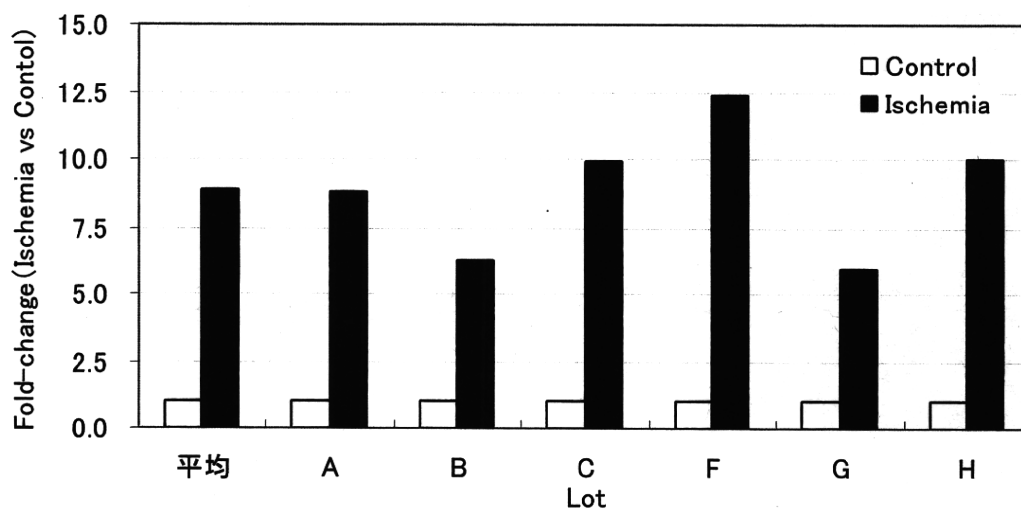


図2 虚血後におけるhMSCのVEGF遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後に回収した細胞より抽出したTotal RNAを用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群のVEGF遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後におけるhMSCでは、VEGF遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。 [各ロット1例ずつ、計6ロットの平均値] * $p < 0.01$ vs. Control

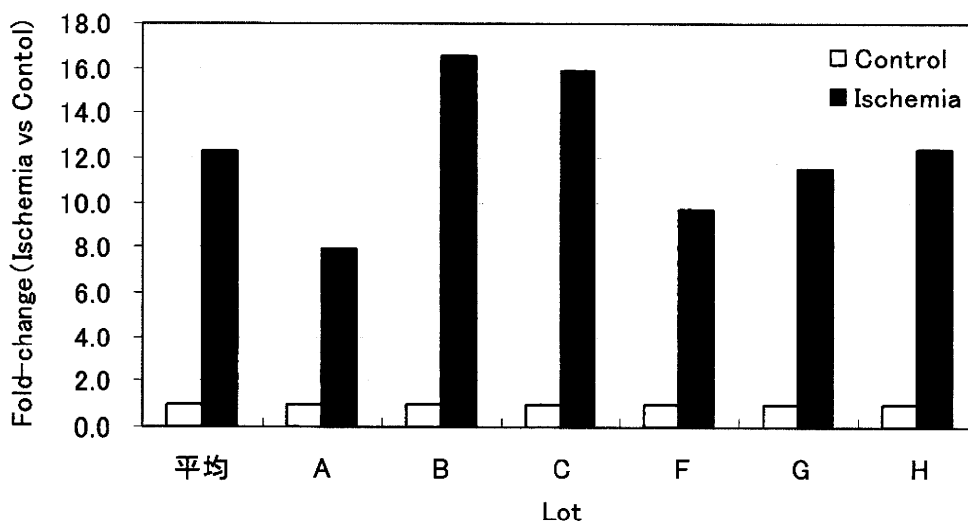


図3 虚血後における hMSC の PIGF 遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後に回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群の PIGF 遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、PIGF 遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。

[各ロット1例ずつ、計6ロットの平均値] * $p < 0.01$ vs. Control

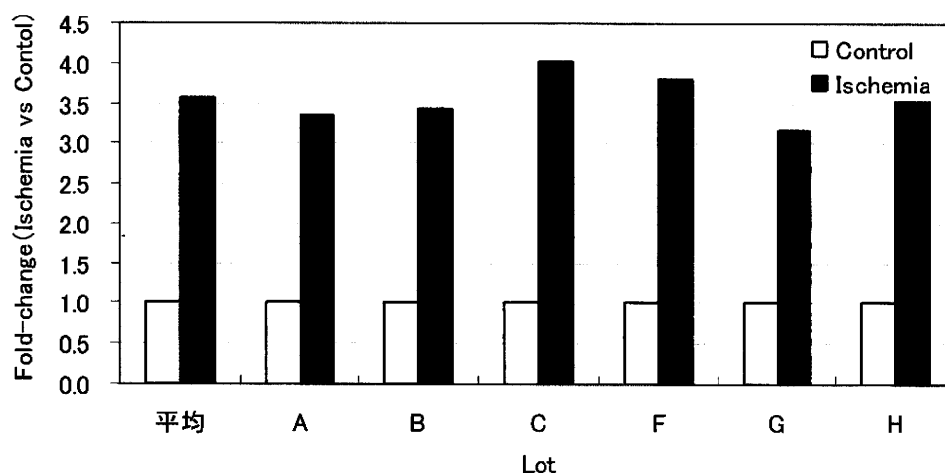


図4 虚血後における hMSC のアンジオゲニン遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後に回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群のアンジオゲニン遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、アンジオゲニン遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。[各ロット1例ずつ、計6ロットの平均値] * $p < 0.01$ vs. Control

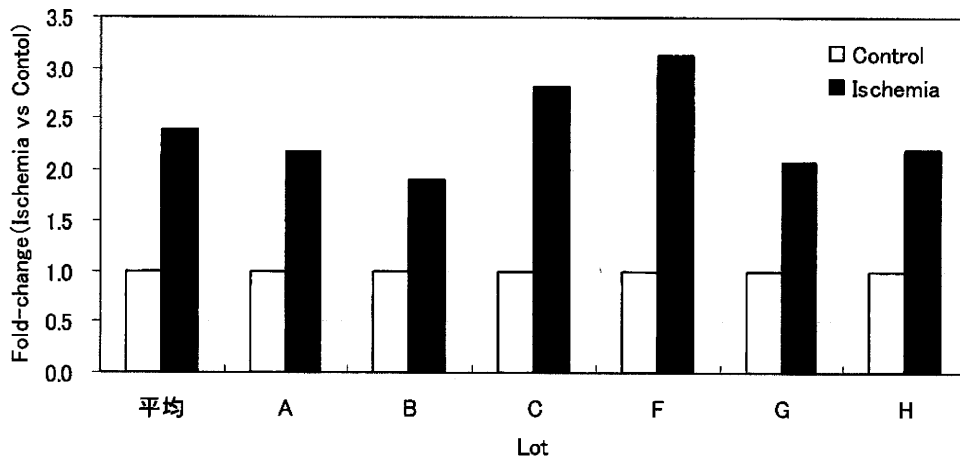


図5 虚血後における hMSC の TGF-β1 遺伝子発現変化

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後に回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。縦軸はコントロール群の TGF-β1 遺伝子発現量に対する虚血群の比率を示しており、横軸はロットを示している。

虚血後における hMSC では、TGF-β1 遺伝子の発現に有意な上昇が認められた。

[各ロット 1 例ずつ、計 6 ロットの平均値] * $p < 0.01$ vs. Control

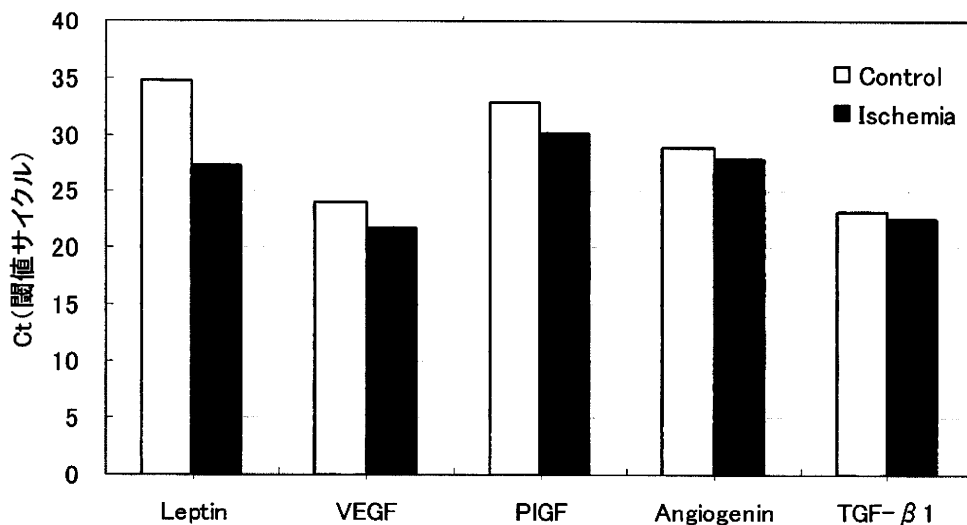


図6 虚血後の hMSC において有意な上昇が認められたサイトカイン遺伝子の Ct 値

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後に回収した細胞より抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現量を検討した。

縦軸はシグナルの閾値に到達するサイクル数 (Ct) を示しており、横軸は各サイトカインを示している。

[各ロット 1 例ずつ、計 6 ロットの平均値]

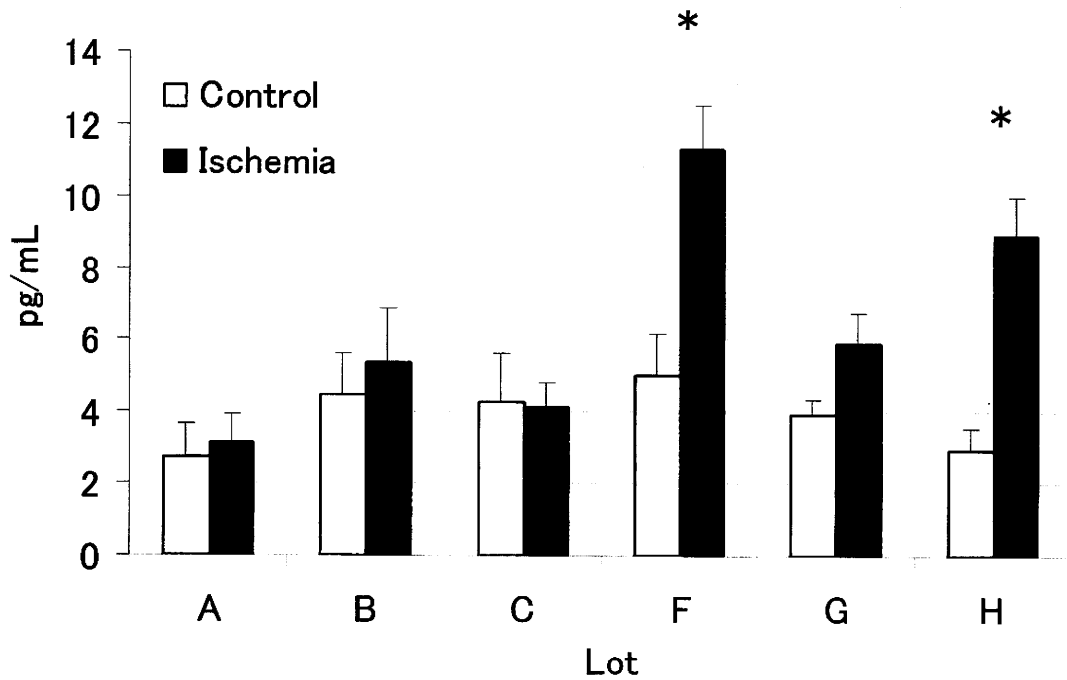


図7 虚血後における hMSC のレプチン分泌量変化

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後における培養上清を用いてレプチン分泌を検討した。縦軸はレプチン濃度を示しており、横軸はロットを示している。

Two-way ANOVA によれば、レプチン分泌量は、hMSC のロット間で有意な差が認められた ($p(\text{Lot}) < 0.05$)。

また、虚血による有意なレプチン分泌増加が認められた ($p(\text{Ischemia}) < 0.05$)。

虚血とロットとの相互作用についても有意な差が認められ ($p(\text{Lot} \times \text{Ischemia}) < 0.05$)、虚血後のレプチン分泌量にはロット間の差がみられたと同時に、ロット F および H において虚血によるレプチン分泌量の有意な増加が認められた ($p < 0.05$, Student-Newman-Keul test)。

[平均値±S.E.M. (n=5)] * $p < 0.05$ vs. Control group of each lot

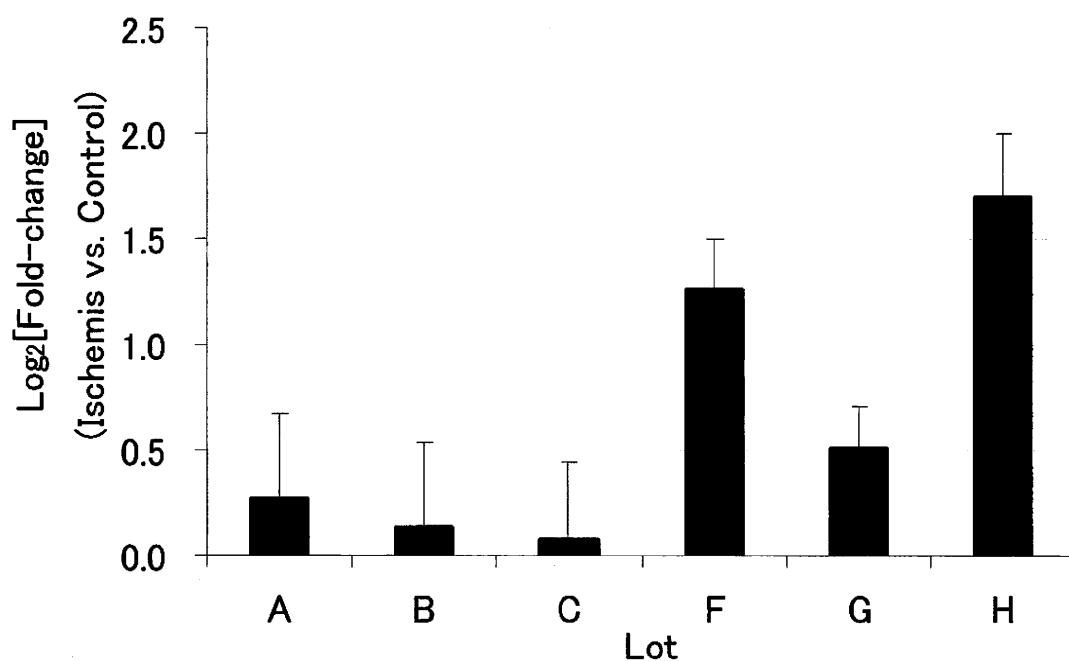


図8 虚血後における hMSC のレプチン分泌変化率

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後における培養上清を用いてレプチン分泌を検討した。縦軸はコントロール群のレプチン濃度に対する虚血群の比率の対数を示しており、横軸はロットを示している。

One-way ANOVA によれば、虚血時のレプチン分泌変化率には有意なロット差が見られた ($p < 0.05$)。

[平均値±S.E.M. (自由度=8)]

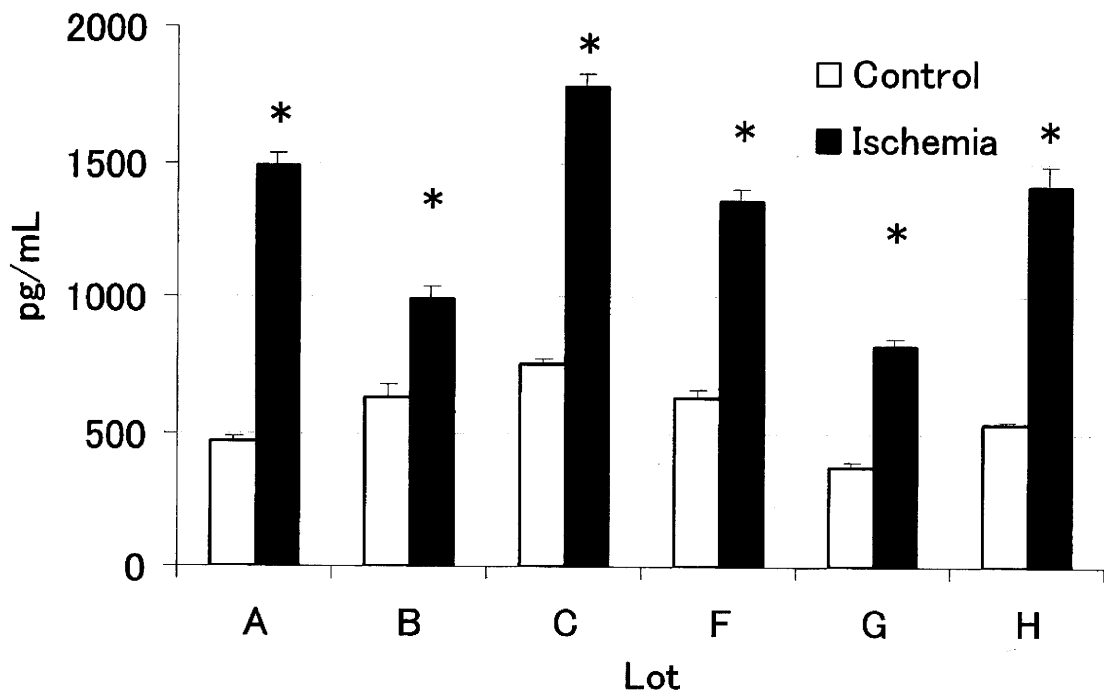


図9 虚血後における hMSC の VEGF 分泌量変化

通常条件または擬似的虚血条件培養 24 時間後における培養上清を用いて VEGF 分泌を検討した。縦軸は VEGF 濃度を示しており、横軸はロットを示している。

Two-way ANOVA によれば、VEGF 分泌量は、hMSC のロット間で有意な差が認められた ($p(\text{Lot}) < 0.05$)。

また、虚血による有意な VEGF 分泌増加が認められた ($p(\text{Ischemia}) < 0.05$)。

虚血とロットとの相互作用についても有意な差が認められ ($p(\text{Lot} \times \text{Ischemia}) < 0.05$)、虚血後の VEGF 分泌量にはロット間の差がみられたと同時に、6 ロット各々において虚血による VEGF 分泌量の有意な増加が認められた ($p < 0.05$, Student-Newman-Keul test)。

[平均値±S.E.M. (n=5)] * $p < 0.05$ vs. Control group of each lot

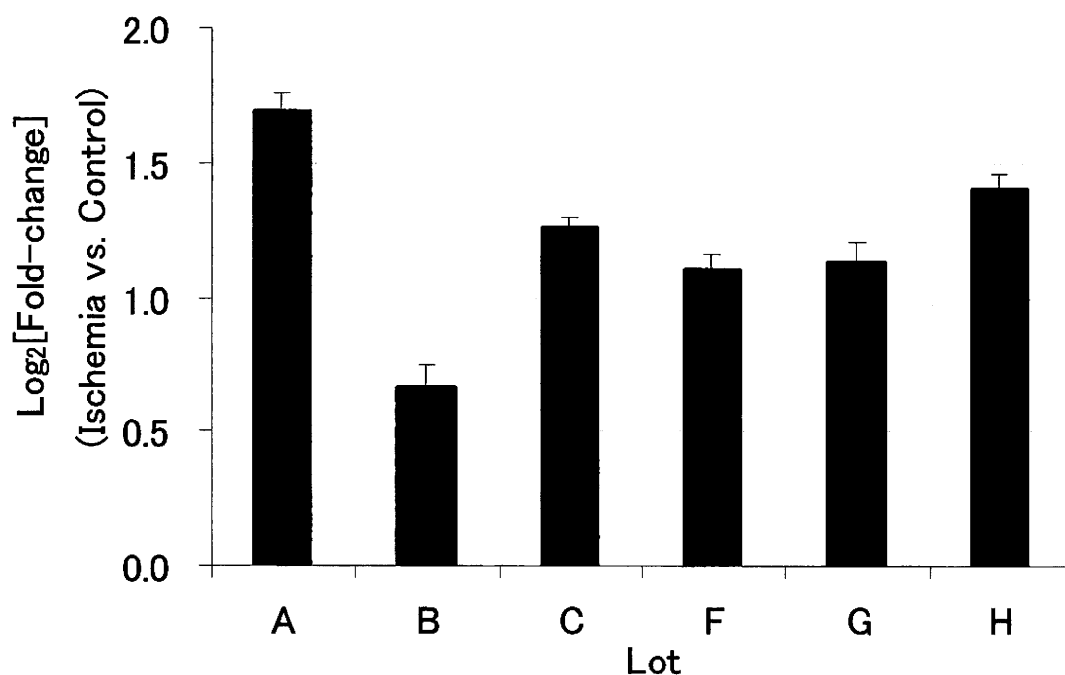


図10 虚血後におけるhMSCのVEGF分泌変化率

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後における培養上清を用いてVEGF分泌を検討した。縦軸はコントロール群のVEGF濃度に対する虚血群の比率の対数を示しており、横軸はロットを示している。

One-way ANOVAによれば、虚血時のVEGF分泌変化率には有意なロット差が見られた ($p < 0.05$)。

[平均値±S.E.M. (自由度=8)]

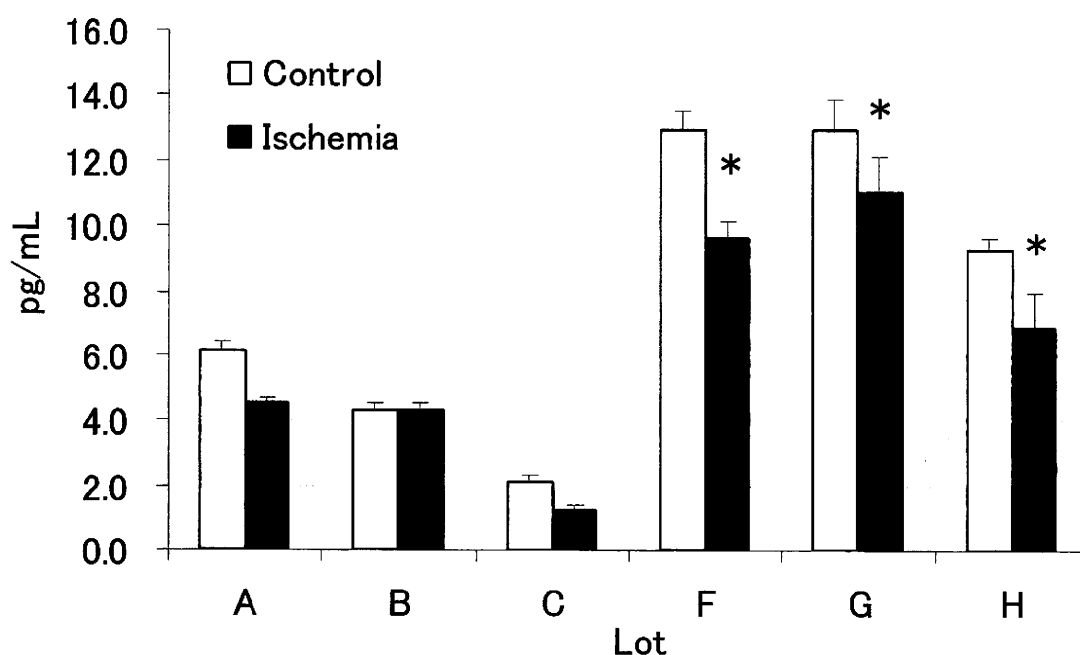


図11 虚血後におけるhMSCのPIGF分泌量変化

通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後における培養上清を用いてPIGF分泌を検討した。縦軸はPIGF濃度を示しており、横軸はロットを示している。

Two-way ANOVAによれば、PIGF分泌量は、hMSCのロット間で有意な差が認められた($p(\text{Lot}) < 0.05$)。

また、ロットF、ロットGおよびロットHについては虚血による有意なPIGF分泌減少が認められた($p(\text{Ischemia}) < 0.05$)。

ただし、虚血とロットとの相互作用については有意な差は認められなかった($p(\text{Lot} \times \text{Ischemia}) = 0.117$)。

[平均値±S.E.M.(n=5)] * $p < 0.05$ vs. Control group of each lot

細胞組織加工医薬品の特性解析・品質管理に関する研究

研究分担者 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
研究協力者 豊田淑江 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
研究協力者 北川博子 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

細胞・組織加工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（Endothelial Progenitor Cells : EPC）には、early EPC と late EPC の 2 種類が存在することが知られており、それぞれの特性の解明、品質評価法の確立等が実用化に向けた課題となっている。本年度は、early EPC について、遊走に関するシグナル伝達機構の解析を行い、血球系細胞に特有の p110 PI3K δ の活性化が重要であることを明らかにした。また、ヌードマウスへの移植による *in vivo* 評価系を構築し、early EPC が宿主由来の血管内皮細胞から構成される血管の形成を促進することを示した。Late EPC に関しては、遺伝子発現プロファイルから管腔形成能と相関することを独自に見出したオクルディンについて、管腔形成における機能的役割について検討し、オクルディンが管腔の形成・維持に寄与する機能的特性指標であることを明らかにした。

A. 研究目的

虚血部位周辺組織の再生を目的として末梢血 CD34 陽性細胞や骨髄単核球を局所に投与する血管再生療法は、我が国でも精力的に臨床研究や先進医療としての治療が行われている再生医療の一つである。これまで蓄積された臨床研究から、バジャー病等では血管再生療法は有効と考えられているが、心血管合併症に加えて動脈硬化が進行している閉塞性動脈硬化症では治療効果が十分でないとされている。細胞治療不応症例や脳虚血、心筋虚血など治療の対象が広がるなか、移植する細胞の更なる開発と品質確保が重要と考えられる。

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 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。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持ち、late EPC はそれ自身が新生血管に取り込まれる性質を持つ細胞であるとされており、*in vivo* においてもこれらの細胞が血管再生に寄与していると考えられる。

これまで我々は、early EPC の培養上清に冠状動脈血管内皮細胞の遊走や管腔形成促進活性があること、遺伝子発現プロファイルから、early EPC は血球由来の細胞と考えられること、さらに、early EPC の細胞表面にメタロプロテイナーゼ (MMP) -9 及び MMP-2 が存在し、高い浸潤活性を示すことを明らかにしてきた。浸潤には細胞遊走が深く関与し、投与された early EPC が虚血部位に到達するために重要な機構であると考えられる。今年度は、early EPC の遊走に関するシグナル伝達機構の解析を行い、early EPC の遊走