

- 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. Gal2/13 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み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. 齋木 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 月 1-3 日, 京都)
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)
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)
22. 千蔵 さつき, 仲矢 道雄, 佐藤 陽治, 小柳 悟, 大戸 茂弘, 西田 基宏, 黒瀬 等 Metoprolol の長期投与が心臓に及ぼす影響 日本薬学会 第 130 年会 (平成 22 年 3 月, 岡山)
23. 西田 基宏, 佐藤 陽治, 上村 綾, 仲矢 道雄, 黒瀬 等 圧負荷による P2Y6 受容体-G12/13 蛋白質経路を介した心臓の線維化 第 82 回日本生化学会大会 (平成 21 年 10 月 21-24 日, 神戸) 生化学 2009; 81:366
24. 佐藤 陽治 血管の『しなやかさ』と甲状腺ホルモン 日本薬学会薬理系薬学部会 生体機能と創薬シンポジウム 2009 (平成 21 年 8 月 26-27 日, 東京)
25. Nishida M, Sato Y, Nakaya M, Inoue K, Inoue R, Mori Y, Kurose H. Formation of P2Y2 receptor-TRPC5-eNOS signal complex defines ATP-stimulated anti-hypertrophic responses in rat neonatal cardiomyocytes. Fukuoka Purine 2009 (Joint with JSPS Core-to-Core Program A Satellite Symposium for IUPS2009) (July, Fukuoka, 2009)
26. Nishida M, Sato Y, Uemura A, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Inoue K, Kurose H. P2Y6 receptor-G12/13 signaling triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis. Fukuoka Purine 2009 (Joint with JSPS Core-to-Core Program A Satellite Symposium for IUPS2009) (July, Fukuoka)

27. Kurose H, Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T. Cardiac fibrosis triggered by P2Y6-G α 12/13 signaling in cardiomyocytes. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009, July, Kyoto).

28. 鈴木 孝昌, Suresh Thirupathi, 押澤 正, Ramesh Doss, 田邊 思帆里, 佐藤 陽治, 鈴木 和博 細胞・組織加工医薬品の品質評価および標準化に向けたプロテオーム解析技術の利用 日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO)第7回大会 (平成21年7月27-28日、東京)

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	p	rs	P	rs	p	rs	p
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
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

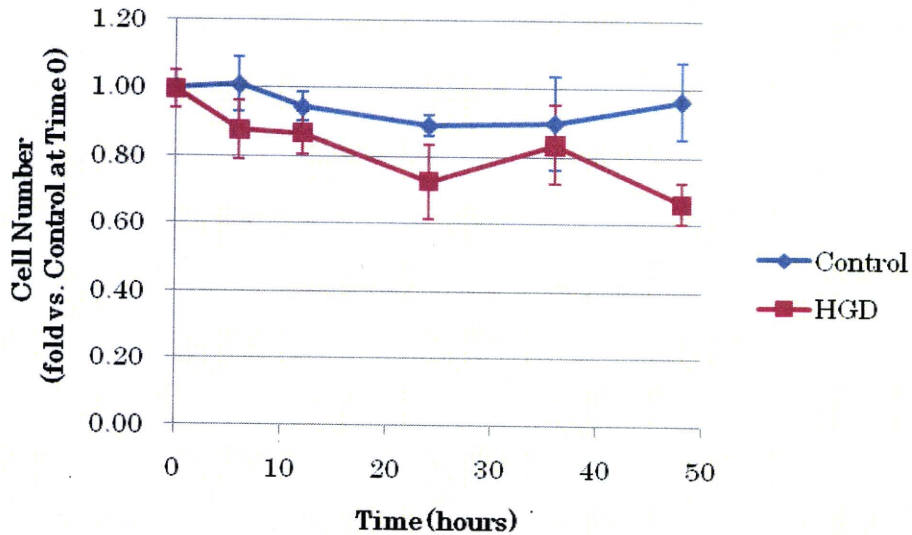


図1 hMSCの生存に対する低酸素・グルコース欠乏環境の影響

無血清培地の下で通常酸素分圧でグルコース存在する環境にある hMSC に比べ、*in vitro* 虚血 (HGD, Hypoxia-Glucose Deprivation, 低酸素・グルコース欠乏) 処理した hMSC の生存率は低かった ($P < 0.05$, Repeated Measures One-way ANOVA)。 *In vitro* 虚血による培養開始後が 48 時間になると生存率の差が明確となった。値は 6 ロットの平均値と標準誤差で示した。

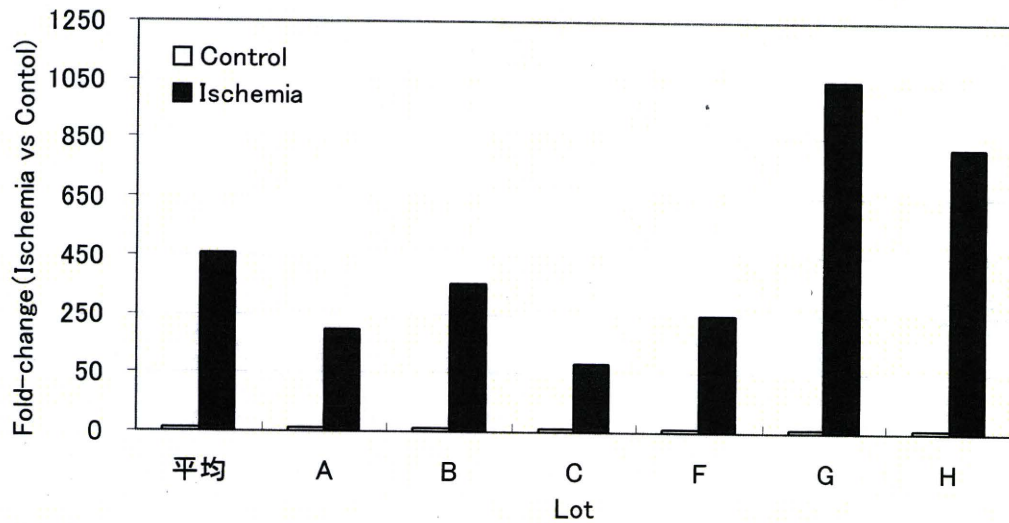


図2 虚血後における hMSC のレプチン遺伝子発現変化

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

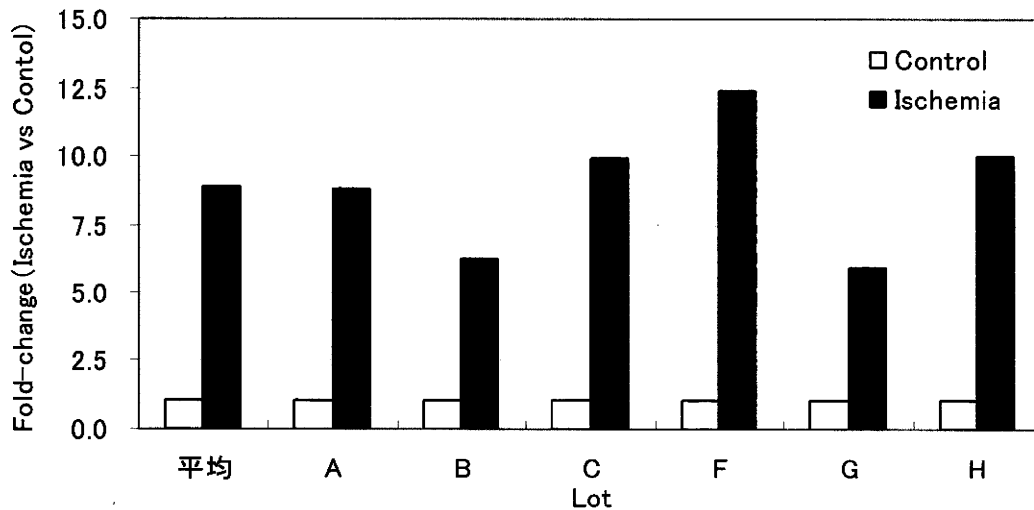


図3 虚血後におけるhMSCのVEGF遺伝子発現変化

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

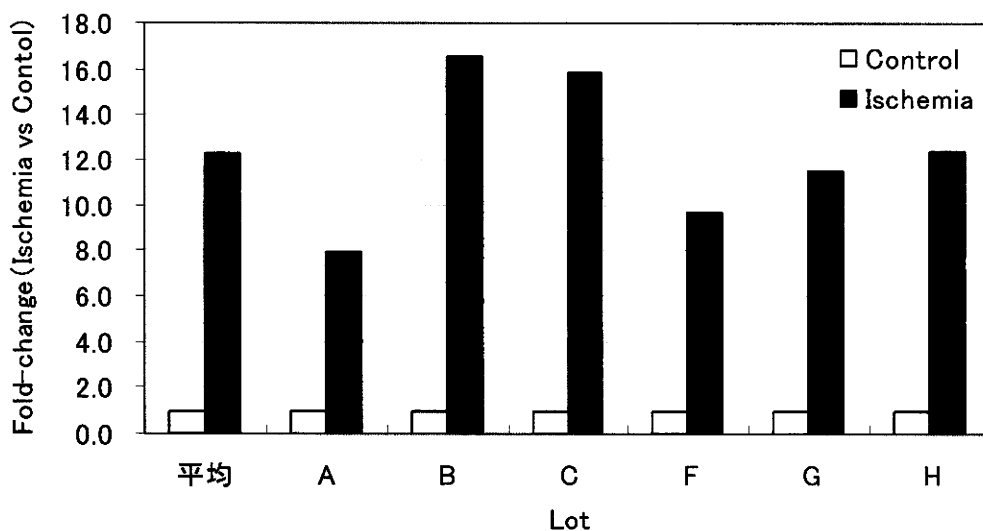


図4 虚血後におけるhMSCのPlGF遺伝子発現変化

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PlGF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、PlGF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

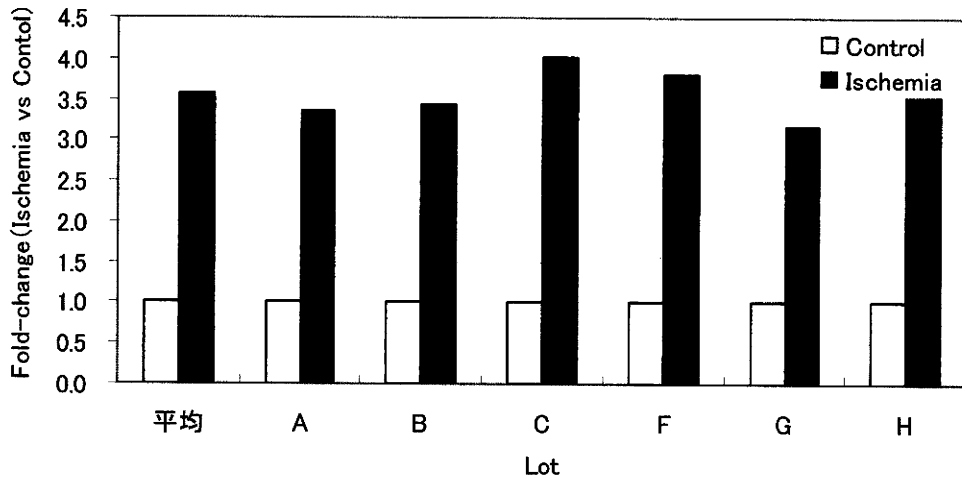


図5 虚血後における hMSC のアンジオゲニン遺伝子発現変化

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

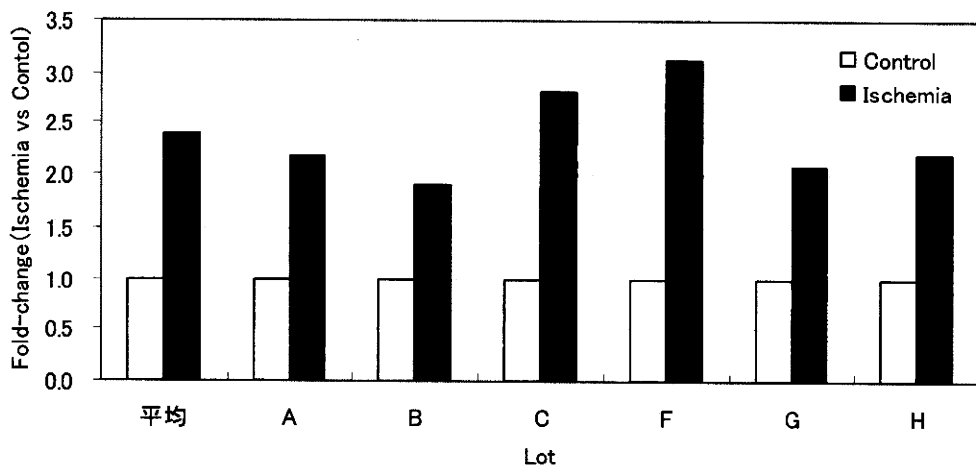


図6 虚血後における hMSC の TGF-β1 遺伝子発現変化

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

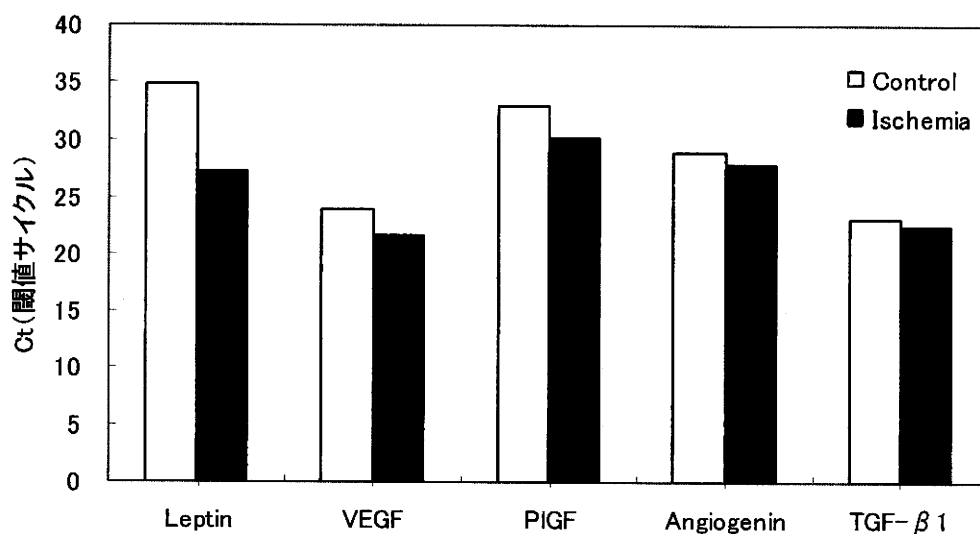


図7 虚血後のhMSCにおいて有意な上昇が認められたサイトカイン遺伝子のCt値
 通常条件または擬似的虚血条件培養24時間後に回収した細胞より抽出したTotal RNAを用
 いて遺伝子発現量を検討した。

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]

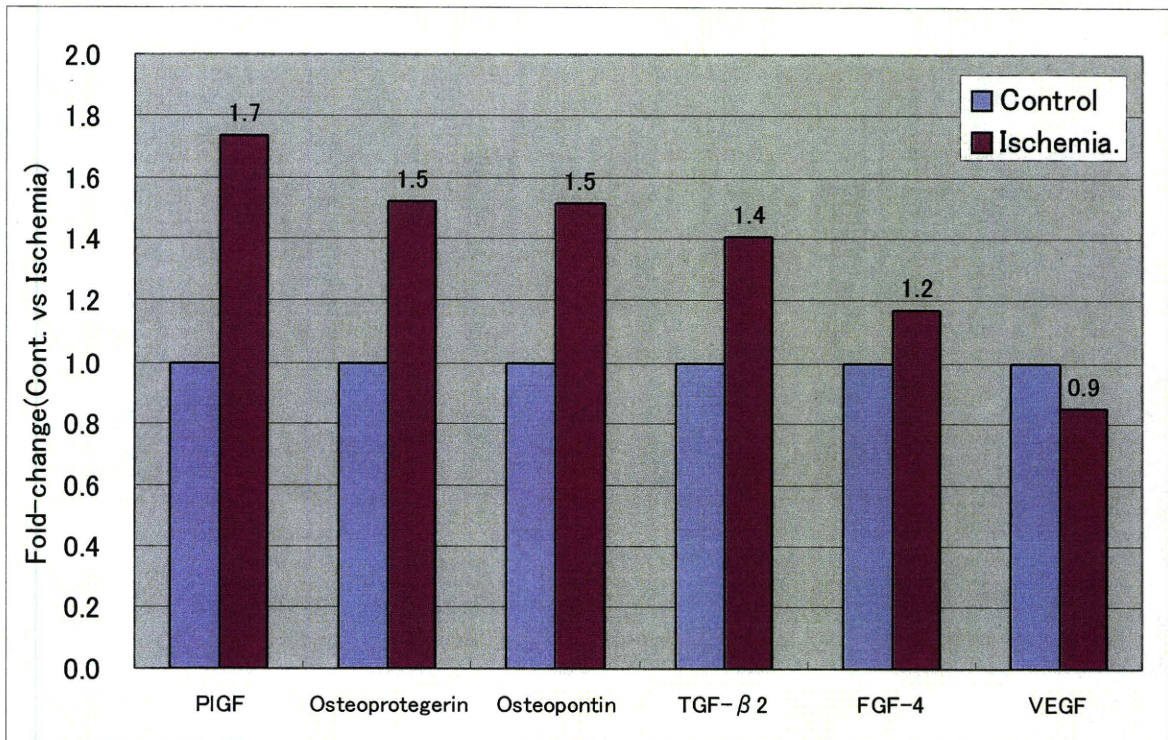


図8 サイトカイン抗体アレイを用いたhMSC由来サイトカイン類の分泌測定

無血清培地の下で通常酸素分圧でグルコース存在する環境にある hMSC のコンディションドメディウムと、低酸素・グルコース欠乏の条件 (Ischemia=HGD, Hypoxia-Glucose Deprivation) に暴露した hMSC のコンディションドメディウムとの間で、含有される各種サイトカイン濃度を、サイトカイン抗体アレイを用いて比較した。6 ロットの hMSC に関して Paired t-test を行い、有意差 (P<0.05) の認められたものは以上の 6 分子であった。値は平均値を表す。

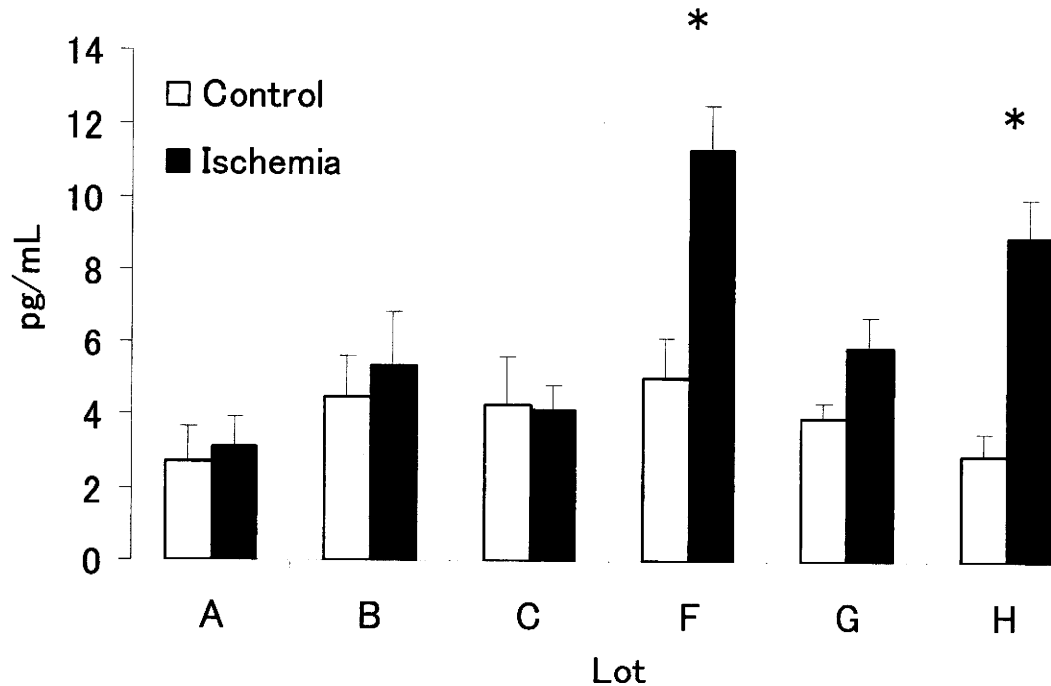


図9 虚血後におけるhMSCのレプチン分泌量変化

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

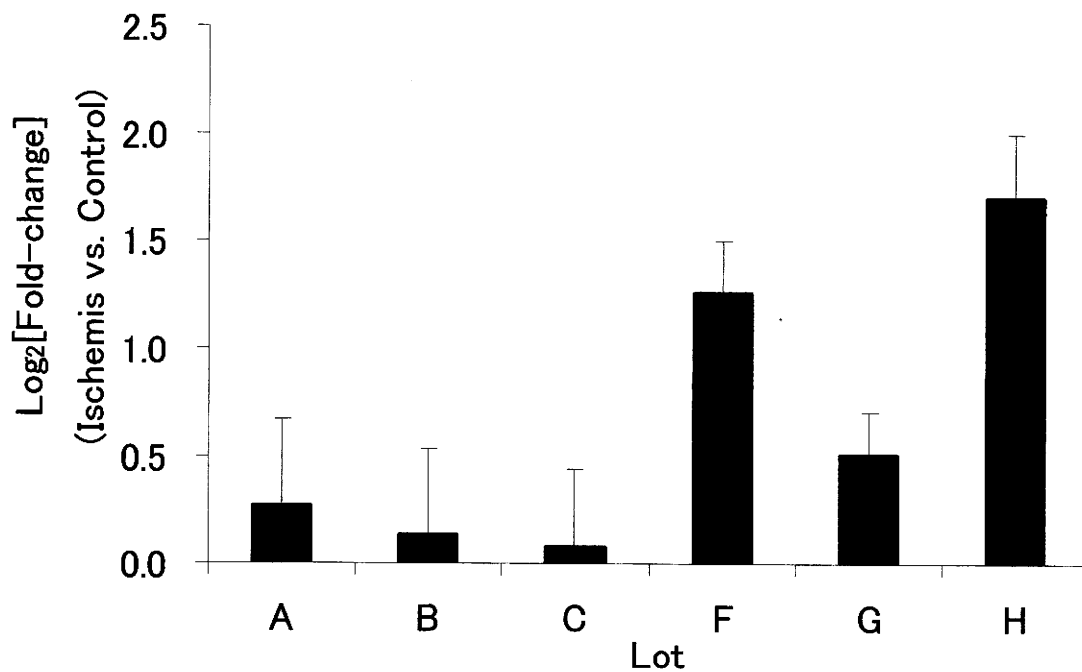


図10 虚血後におけるhMSCのレプチン分泌変化率

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)]

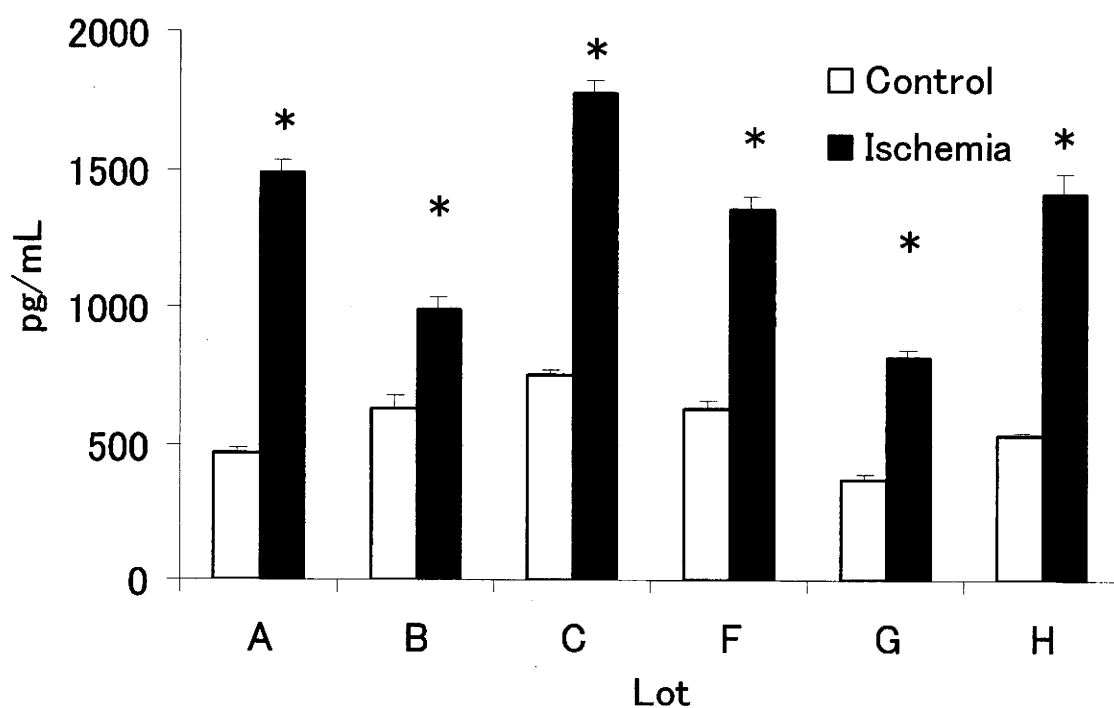


図11 虚血後におけるhMSCのVEGF分泌量変化

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

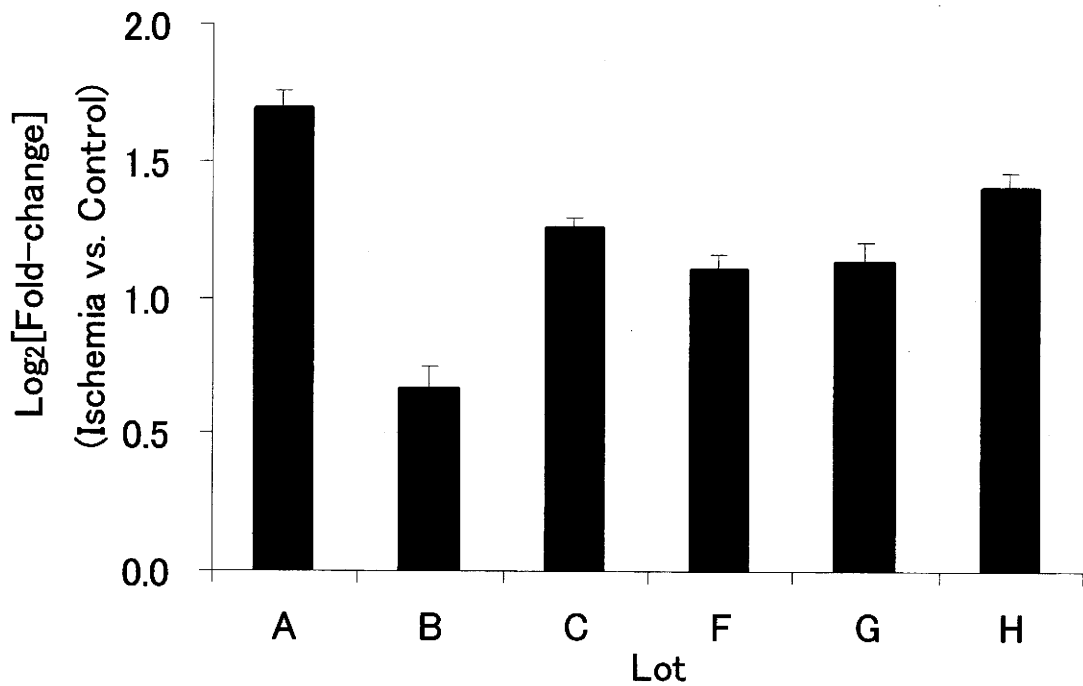


図12 虚血後におけるhMSCのVEGF分泌変化率

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)]

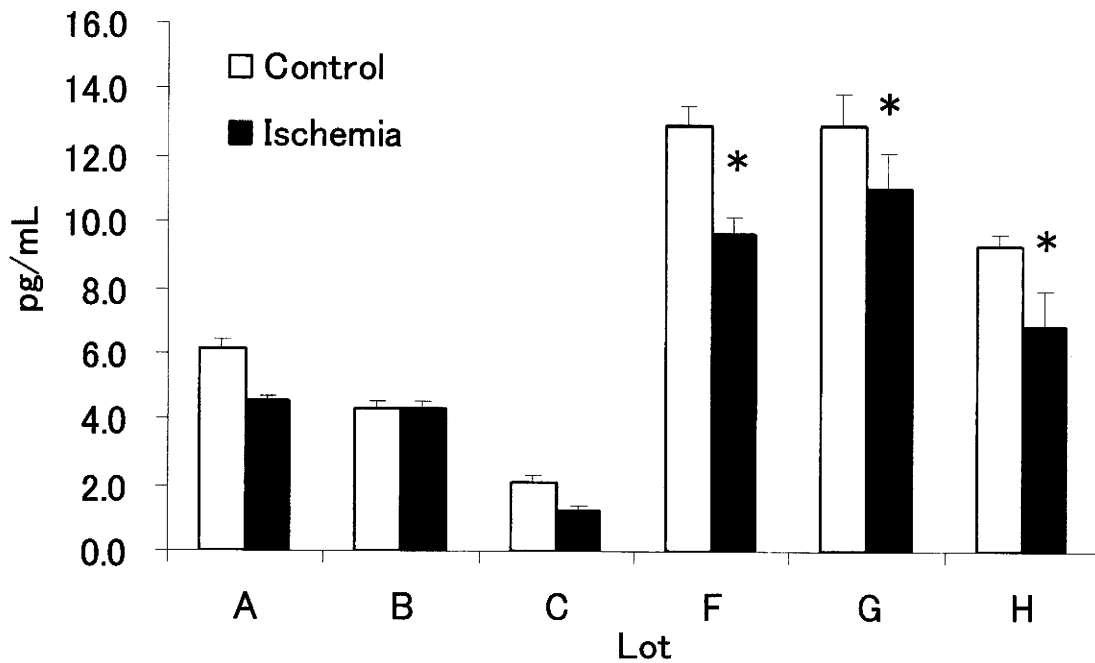


図13 虚血後におけるhMSCのPIGF分泌量変化

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
研究協力者 鈴木浩子 慶応義塾大学大学院薬学研究科／国立衛研生物薬品部

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、それぞれの起源細胞や特性の解明、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。本研究では、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 と単核球由来 early EPC が類似した性質を示し、両者は血球由来であることを明らかにした。また、early EPC が MMP-9 や CXCL9、CXCL10、IL-8 といったケモカイン類を高発現していること、early EPC の細胞表面に MMP-9 及び MMP-2 が存在し、early EPC が高い浸潤活性を示すこと、浸潤との関連が深い遊走に関するシグナル伝達物質として血球に特有に発現している p110 PI3K δ が重要であることを明らかにした。さらに、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、血管内皮細胞の機能に関連する遺伝子の発現プロファイルの観点から、early EPC とは特性が大きく異なる一方で、組織由来血管内皮細胞である HUVEC と類似した特性を示すことを明らかにした。Late EPC はそれ自身が管腔形成能を持つが、その程度には樹立した細胞株ごとに差異が認められた。管腔形成能と発現量が相関している遺伝子として見出されたオクルディンについて siRNA を用いたノックダウン実験を行い、オクルディンが late EPC の管腔形成に関わる機能的特性指標であることを示した。これらの知見は、early EPC および late EPC の品質管理において、確認試験や力価試験における評価指標の選定に有用であると考えられる。

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。したがって、患者から採取した血液細胞や iPS 細胞等を原材料として early EPC あるいは late EPC 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・組織加工医薬品として有用と考えられる血管内皮前駆細胞をモデルとして、確認試験や力価試験に必要な特性指標に関する検討を行った。

B. 研究方法

1) 試薬

TPO は、キリン・アムジェン社より提供された。VEGF は、Strathmann Biotec 社より購入した。AC133 細胞分離キット及び CD14 細胞分離キットは Miltenyi Biotec から購入した。抗 CD31 抗体・フルオレッセインイソチオシアネート (FITC) あるいは・フィコエリスリン (PE)、抗 CD34 抗体・FITC、抗 CD45 抗体・FITC、抗 CD44 抗体・PE、抗 VE cadherin(CD144)抗体は、BD Biosciences PharMingen より購入した。抗 VEGFR-2 (Flk-1/KDR) 抗体、抗 p110 PI3K β 抗体、抗 p110 PI3K δ 抗体は Santa Cruz Biotechnology, Inc. より得た。抗 MMP-9 抗体は第一ファインケミカル社より購入した。抗 MMP-2 抗体、抗 p110 PI3K α 抗体は Cell Signaling Technology より購入した。抗 IL-8 受容体抗体は R&G System 社より得た。抗オクルディン抗体は Sigma 社より購入した。

p110 PI3K α の阻害剤である PI-103 は Calbiochem 社より購入した。抗ヒト内皮 NO 合成酵素 (eNOS) 抗体は Cayman Chemical より購入した。フィブロネクチン (FN) あるいは IV 型コラーゲンでコーティングされたプレートは、イワキ社から購入した。抗 CD14 抗体-FITC は、Dako Cytomation から購入した。RT2 Profiler PCR Array は Supper Array 社から購入した。培地は内皮細胞用基礎培地 (EBM-2)、血管内皮細胞用増殖培地 (EGM-2、2% FCS、VEGF、bFGF、EGF、R3-IGF、アスコルビン酸、ヒドロコチゾン、ヘパリン) (三光純薬) を用いた。マトリゲルは BD Biosciences 社より購入した。

2) 単核細胞の分離

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。献血用に採取された血液 (液量不足等による規格外品) 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) を含む PBS} で洗浄した。

3) AC133 陽性細胞及び CD14 陽性細胞の分離

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を用い抗 AC133 抗体・マイクロビーズと 4°C、30 min で反応させた。陽性細胞の分離は、Auto MACS (Miltenyi 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、を含む EBM-2 培地に浮遊させ培養した。FN コートディッシュは接着細胞として解析する際に、IV 型コラーゲンコートディッシュはフローサイトメーターによる解析を行う際に用いた。