

201126033A

厚生労働科学研究費補助金  
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する  
新規移植再生療法の開発

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池田 智明

平成 24 (2012) 年 3 月



厚生労働科学研究費補助金  
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する  
新規移植再生療法の開発

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池田 智明

平成 24 (2012) 年 3 月

# 目 次

---

## I. 総括研究報告書

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する新規移植再生療法の開発に関する研究」 池田 智明	1
---	---

## II. 分担研究報告書

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた循環器領域疾患に対する細胞治療に関する研究」 池田 智明	7
--	---

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する新規移植再生療法の開発に関する研究」 高原 史郎	13
---	----

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた心臓血管外科領域における全身炎症抑制療法に関する研究」 丸井 晃	17
--	----

「卵膜由来間葉系幹細胞による炎症性消化器疾患に対する新規治療法の開発」 大西 俊介	21
--	----

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた循環器領域疾患に対する細胞治療に関する研究」 山原 研一	23
--	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	31
-----------------	----

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

総括研究報告書

## 「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する 新規移植再生療法の開発に関する研究」

研究分担者 名前 池田 智明 所属 国立循環器病研究センター

研究要旨：卵膜間葉系幹細胞(MSC)移植による各種難治性疾患に対する新たな治療法確立を目指し、モデル動物の確立と、作成したモデル動物に対する卵膜 MSC 移植による病態改善効果検証を行った。結果、心筋炎、腎虚血再灌流、肺高血圧モデルにおいて、卵膜 MSC による治療効果を証明した。これら卵膜 MSC 移植による治療効果は、少なくとも一部は、T細胞の分化制御によるものであることを明らかにし、卵膜 MSC の特に免疫・炎症性疾患に対する細胞治療応用の可能性を証明した。

### A. 研究目的

近年、骨髄や脂肪組織などに存在する間葉系幹細胞（MSC:mesenchymal stem cells）を用いた再生医療応用研究が行われている。我々は自己骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)移植の難治性心不全に対する基礎および臨床応用研究（臨床試験登録:UMIN00000656）を行い、その効果をヒトを含め証明してきた。しかしながら、自己骨髄 MSC は、その樹立に侵襲を伴い重病人には不適である、培養時間を要するため迅速対応が困難である、白血病など骨髄疾患では不適である、といった問題点がある。これら問題を解決すべく、最近我々は通常破棄され、侵襲性がなく、倫理的問題の少ない胎児付属物である卵膜から MSC の樹立に成功し、その細胞移植による組織再生効果を確認している。

このように組織再生を目的とした研究が進んできた MSC 移植であるが、最近ではその免疫調節作用が注目され、骨髄移植における GVHD 予防、クローン病、敗血症などに効果のある可能性が示され、臨床応用も開始されつつある。しかしながら、上記

再生医療同様、自己骨髄 MSC を中心とした研究が主体であり、卵膜を含む他家 MSC による免疫調節作用の可能性を指摘し、その臨床応用を目指した研究は進んでいない。即ち、卵膜 MSC は他家移植であり、骨髄を含む自己 MSC と比較し、ホスト側の免疫応答反応により免疫調節作用効果が異なる可能性が考えられる。

そこで、本研究は、新たな細胞移植ソースである卵膜 MSC に着目し、1)卵膜 MSC の免疫調節作用に関し、主に T 細胞に対する影響を中心に、細胞レベルでの検証を行う、2)免疫調節作用を利用した卵膜 MSC 移植に関し、その治療効果、他家移植による免疫応答反応、安全性評価を、心筋梗塞、心筋炎、肺高血圧症、腎炎、心・腎虚血再灌流、人工心肺、GVHD、好酸球性食道炎、放射線性消化器粘膜障害などの各種難治性疾患モデルにおいて総合的な観点から詳細な検討を行い、各種難治性疾患に対する新規細胞移植療法開発を目指した前臨床応用研究を進めた。

### B. 研究方法

本年度は、卵膜 MSC による免疫・炎症調節機能解析、並びに各分担研究者の専門分野においてその治療が問題となっている難治性疾患のモデル動物確立と卵膜 MSC 移植による治療効果検討を行った。

①in vitro実験として、卵膜MSCによる免疫・炎症調節機能解析として、Tリンパ球に着目し、Tリンパ球分化における卵膜MSCによる効果検討を行った（池田ら）。

②高原らは、ラット腎虚血再灌流障害モデルを用い、卵膜 MSC 移植による病態改善効果を検討した。

③丸井らは、ラット心虚血再灌流障害モデルおよび人工心肺モデルを確立し、炎症の程度、炎症性サイトカインの動態を経時的に評価した。

④大西らは、ラット炎症性腸疾患モデル、放射線腸炎モデル、急性膵炎モデルを確立し、病理学的評価並びに局所における炎症性サイトカイン分泌の検討、更には卵膜 MSC 移植による治療効果を評価した。

⑤山原らは、ラット自己免疫性心筋炎モデル、肺高血圧症モデルを用い、卵膜 MSC 移植による効果検討を行った。

（倫理面への配慮）

ヒト胎児付属物の採取は、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、当センターの倫理委員会の審査により承認後、提供者本人による書面での同意を得て実施した。また、提供者に対するインフォームド・コンセントは書面で行った。

## C. 研究結果

①Tリンパ球分化における卵膜MSCによる効果検討（山原ら）

市販ヒト CD4 陽性 T 細胞に Th1 誘導：抗 CD28 抗体、抗 CD3 抗体、抗 IL-4 抗体、IL-2、IL-12 を添加、Th17 誘導：抗 CD28 抗体、抗 CD3 抗体、TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-23 を添加し、同時にヒト卵膜 MSC あるいはヒト骨髄 MSC との共培養にて 5 日間培養した。浮遊している T 細胞数を計測したところ、Th1・Th17 誘導共に、卵膜・骨髄 MSC との共培養による細胞数の著明な減少を認めた。更に FACS にて IFN- $\gamma$ ・CD4 陽性 Th1 細胞、IL-17・CD4 陽性 Th17 細胞を計測したところ、Th1・Th17 誘導共に卵膜・骨髄 MSC との共培養により、顕著な Th1・Th17 分化の誘導抑制が認められた。

②ラット腎虚血再灌流障害モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討（高原ら）

ラット腎虚血再灌流障害モデルは、Lewis ラットの右腎を摘出後、左腎動脈を 60 分間結紮することで作成した。再灌流時に卵膜 MSC ( $5 \times 10^5$ ) を経静脈的に投与した。再灌流後の評価から、卵膜 MSC 移植により、血中 BUN・クレアチニンの改善、病理学的所見における T 細胞・マクロファージ浸潤の改善、腎組織における MCP-1 や IL-6 の発現減少、を認め、卵膜 MSC 移植が腎虚血再灌流モデルにおいて、治療効果を発揮することが明らかとなった。

③ラット心虚血再灌流障害モデル及び人工心肺モデルとその炎症評価系の確立（丸井ら）

ラット虚血再灌流障害モデルは Lewis ラットに気管内挿管をし、左開胸下に冠動脈前下行枝を 30 分間結紮することとした。再灌流 3 時間後、24 時間後に生理学的・病理学的評価を行うこととした。現在のところ、

再灌流3時間後における心筋TNF- $\alpha$ 発現の増加を確認している。

ラット人工心肺モデルは、ラット用の人工心肺回路を独自考案した。人工心肺により血中TNF- $\alpha$ 濃度は著明に増加し、肺・心・脾臓におけるTNF- $\alpha$ 濃度も顕著に増加した。現在、人工心肺設定条件を決定し、今後MSCを移植し、その効果を検証する予定である。

#### ④ラット炎症性腸疾患・放射線腸炎・急性膵炎モデルとその炎症評価系の確立（大西ら）

ラット炎症性腸疾患モデルは4%デキストラン硫酸(DSS)を7日間連日経口投与し作成した。投与開始2日目に卵膜MSC( $5 \times 10^5$ )を経静脈的に投与したところ、7日後には、卵膜MSC移植により、体重減少、大腸の長さにおいて改善傾向を認めた。

放射線腸炎モデルは腹部に放射線を8Gy照射することで作成し、同時に卵膜MSC( $5 \times 10^5$ )を経静脈的に投与した。5日目において、体重減少や病理学的所見の改善傾向を認めた。

急性膵炎モデルは肝門部胆管をクリッピングの後、3%タウロコール酸(TCA)を胆膵管内に逆行性注入することで、作成を試みたが、現在条件検討を行っている。

#### ⑤ラット自己免疫性心筋炎モデル、肺高血圧症モデルにおける卵膜MSC移植による治療効果検討（山原ら）

ラット自己免疫性心筋炎モデルは、ブタ心筋ミオシンをLewisラットに皮下注射し、作成した。誘導後10、14日目に卵膜MSC( $5 \times 10^5$ )を経静脈的に移植した群では、有意な心機能改善、心臓におけるマクロファージ浸潤抑制の他、血中における

Th1/Th17誘導が抑制された。

ラット肺高血圧症モデルはWisterラットにモノクロタリン(60mg/kg)を皮下投与することにより作成し、同時に卵膜MSC( $5 \times 10^5$ )を経静脈的に移植した。3週間後における血行動態評価では、卵膜MSC移植により、肺動脈圧の有意な減少、病理学的評価による心不全の改善および肺血管壁の肥厚改善が認められた。

#### 考察

今年度は、各分担研究者が得意分野とする各種難治性疾患モデルを確立し、卵膜MSC移植による治療効果を免疫調節・炎症抑制の観点から検証する体制作りを目指した。

心筋炎、腎虚血再灌流、炎症性腸疾患モデルにおいて、卵膜MSC移植が治療効果を発揮し、その効果はin vitro実験の結果からも、免疫・炎症制御によるものである可能性が高い。我々は卵膜MSCの臨床応用を想定し、他家移植にこだわって検討を行ったが、既報の骨髄MSCを用いた検討同様、自家・他家を問わずMSCは免疫・炎症抑制に働くことが証明された。今後、他家移植でも免疫・炎症抑制に働くメカニズムを特に液性・接着因子を中心に検証していきたい。

今後は、本研究班の目標である卵膜MSC移植の臨床応用を目指した研究を加速させていきたい。平成24年度は、兵庫医大血液内科小川教授・相馬准教授に入っただき、GVHDに対する胎児付属部MSC移植治療の臨床応用研究を開始する予定である。更には、SLEを始めとする膠原病に対する治療法としての検証も行っていきたい。そ

れは、安定した卵膜 MSC の供給環境の整備が必要であり、分離・培養・保存法の標準化などの整備も現在行っているところである。

#### E. 結論

卵膜 MSC 移植による各種難治性疾患に対する新たな治療法確立を目指し、モデル動物の確立と、作成したモデル動物に対する卵膜 MSC 移植による病態改善効果検証を行った。結果、卵膜 MSC の各種難治性疾患に対する治療効果を、免疫・炎症制御の観点から明らかにし、細胞治療応用の可能性を証明した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Katsuragi S, Ueda K, Yamanaka K, Neki R, Kamiya C, Sasaki Y, Osato K, Niwa K, Ikeda T. Pregnancy-associated aortic dilatation or dissection in Japanese women with marfan syndrome. *Circ J.* 75(11): 2545-2551, 2011.
2. Neki R, Fujita T, Kokame K, Nakanishi I, Waguri M, Imayoshi Y, Suehara N, Ikeda T, Miyata T. Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol.* 94(2): 150-155, 2011.
3. Neki R, Fujita T, Kokame K, Nakanishi I, Waguri M, Imayoshi Y, Suehara N, Ikeda T, Miyata T. Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol.* 94(2):150-155, 2011.
4. Kamiya CA, Kitakaze M, Ishibashi-Ueda

H, Nakatani S, Murohara T, Tomoike H, Ikeda T. Different characteristics of peripartum cardiomyopathy between patients complicated with and without hypertensive disorders. -Results from the Japanese Nationwide survey of peripartum cardiomyopathy-. *Circ J.* 25; 75(8):1975-81, 2011.

5. Kanayama N, Inori J, Ishibashi-Ueda H, Takeuchi M, Nakayama M, Kimura S, Matsuda Y, Yoshimatsu J, Ikeda T. Maternal death analysis from the Japanese autopsy registry for recent 16 years: significance of amniotic fluid embolism. *J Obstet Gynaecol Res.* 37(1):58-63, 2011.
6. Harada K, Yamahara K, Ohnishi S, Otani K, Kanoh H, Ishibashi-Ueda H, Minamino N, Kangawa K, Nagaya N, Ikeda T. Sustained-release adrenomedullin ointment accelerates wound healing of pressure ulcers. *Regul Pept.* 2011 Jun 7;168(1-3):21-6.
7. Jin D, Otani K, Yamahara K, Ikeda T, Nagaya N, Kangawa K. Adrenomedullin reduces expression of adhesion molecules on lymphatic endothelial cells. *Regul Pept.* 2011 Jan 17;166(1-3):21-7.

2. 学会発表（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
（予定を含む。）

1. 特許取得



なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

分担研究報告書

「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた  
循環器領域疾患に対する細胞治療に関する研究」

研究分担者 名前 池田 智明 所属 国立循環器病研究センター

研究要旨：動物由来卵膜MSCを用い、各種難治性循環器疾患モデルにおいて卵膜MSC移植による治療効果を免疫調節・炎症抑制の観点から検証した。即ち、ラット自己免疫性心筋炎モデルにおいて経静脈的卵膜MSC移植を行い、①細胞移植のタイミングにより治療効果が大きく異なること、②卵膜MSCはヘルパーT細胞分化、特にTh17やTh1細胞の分化に大きく影響を与え、治療効果を発揮する、ことを見いだした。また、ラット肺高血圧症モデルにおいて経静脈的卵膜MSC移植を行い、①我々が開発した細胞分散フィルターを用い、効率的に肺全体にMSCを移植することができ、②移植による肺高血圧の改善が認められ、③病理学的検討においても、血管壁肥厚の改善が認められた。

A. 研究目的

これまでMSCは、主に骨髄由来を用いた研究が報告されているが、骨髄採取による侵襲性や培養期間の必要性などの問題を有している。そこで非侵襲的で一度に多くの細胞数を確保可能な卵膜由来MSCを用い、各種難治性循環器疾患モデルにおける細胞移植治療効果を検討した。特に、卵膜由来MSCにおいて、骨髄由来MSCと比較しあまり検討されていない免疫調節能や抗炎症能に着目した治療効果メカニズム解析を行った。

B. 研究方法

①ラット自己免疫性心筋炎モデルにおける卵膜MSC移植による治療効果メカニズム解析

自己免疫性心筋炎（EAM）モデルはラットにブタ心筋ミオシン（4mg/匹）を皮下注することで作成した。心筋炎発症初期～極期のさまざまな時期に卵膜MSC（ $5 \times 10^5$ /匹）を経静脈的に移植し、至適な移植のタイミン

グおよび予防～治療効果を検証した。心筋炎極期における心機能評価、病理学的検討、および心臓・末梢血・脾臓等におけるリンパ球やマクロファージなど炎症細胞の動態を検討した。特に本モデルを含む心筋炎において、ヘルパーT細胞分化がその病態生理に深く関与していることが明らかとなっていることから、Th1およびTh17分化を検討した。更に複数の移植時期を設定し、至適なMSC移植タイミングの検証を行った。

②ラット肺高血圧症モデルにおける卵膜MSC移植による治療効果メカニズム解析

肺高血圧症モデルはWisterラットにモノクロタリン（60mg/kg）を皮下投与することにより作成した。同時に卵膜MSC（ $5 \times 10^5$ /匹）を経静脈的に移植し、その3週間後に血行動態評価、病理学的検討を行った。MSCは細胞懸濁液では容易に凝集するため、その経静脈的移植には、我々が開発した細胞分散フィルターを用いた。

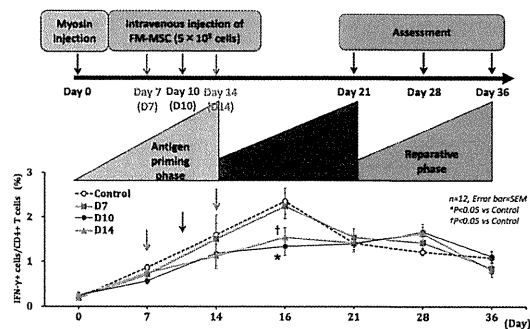
（倫理面への配慮）

ヒト胎児付属物の採取は、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、当センターの倫理委員会の審査により承認後、提供者本人による書面での同意を得て実施した。また、提供者に対するインフォームド・コンセントは書面で行った。

### C. 研究結果

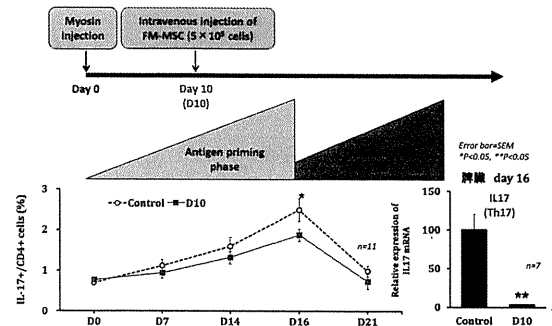
#### ①ラット自己免疫性心筋炎モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果メカニズム解析

ブタ心筋ミオシンを Lewis ラットに皮下注射した自己免疫性心筋炎 (EAM) 群、EAM 誘導 7、10、14 日目に MHC ハプロタイプが異なる ACI ラット由来卵膜 MSC を経静脈的に移植した MSC-D7 群、MSC-D10 群、MSC-D14 群を作成した。FACS による解析では EAM 誘導後 16 日目において、EAM 群では Th1 が最も増加し、MSC-D10・D14 群では顕著に Th1 分化が抑制された (図 1)。



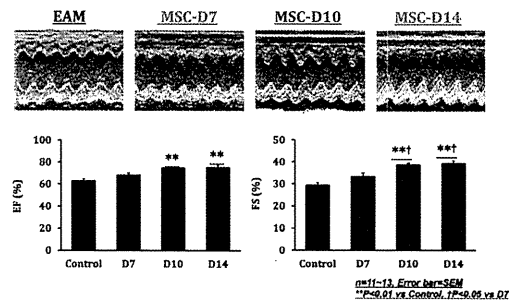
(図 1)ラット EAM モデルにおける卵膜 MSC 移植による Th1 誘導抑制

また、Th17 も同じ 16 日目で最も増加し、MSC-D10 群ではその増加が有意に抑制された (図 2)。



(図 2)ラット EAM モデルにおける卵膜 MSC 移植による Th17 誘導抑制

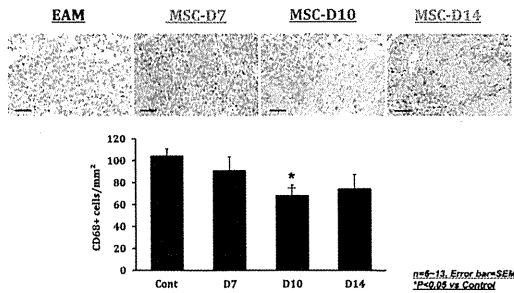
EAM 誘導後 21 日目におけるエコーによる心機能評価では、MSC-D10・D14 群で有意な改善が認められた(心駆出率: EAM 群 60%、MSC-D10 群 74%、MSC-D14 群 73%、図 3)。



(図 3)ラット EAM モデルにおける卵膜 MSC 移植による心機能改善

同 21 日目の免疫組織学的検討では、EAM 群において顕著に認められた心筋における Th17 及び心筋炎の程度を示すマクロファージの浸潤が、MSC-D10 群では有意に抑制された (図 4)。





(図4) ラット EAM モデルにおける卵膜 MSC 移植による心筋内 CD68 陽性マクロファージ浸潤の改善

②ラット肺高血圧症モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果メカニズム解析

蛍光標識色素 DiI にてラベルした ACI ラット由来卵膜 MSC( $1 \times 10^6$ )を Lewis ラットに経静脈的に移植したところ、移植した MSC 凝集塊によるものと思われる肺塞栓所見が確認できた (図5)。

**卵膜MSC( $1 \times 10^6$ 、赤色蛍光標識)  
経静脈移植後の肺組織**



欠損部

移植細胞が凝集した結果、肺動脈が閉塞し、肺循環を悪化させる。

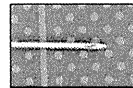
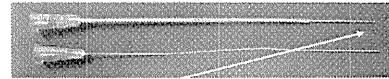
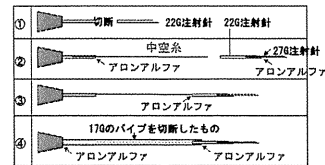


細胞分散フィルターの使用

(図5) 蛍光標識卵膜 MSC 経静脈移植後の肺切片の蛍光顕微鏡写真

そこで、移植 MSC の凝集塊を分散させることが可能な細胞分散フィルターを作成した (特願 2008-267265) (図6)。

**細胞分散フィルター**



(図6) 細胞分散フィルターの構造

本フィルターを用いて、蛍光標識した卵膜 MSC を同様にラットに移植したところ、肺組織に均一に分散していることを確認した (図7)。

**卵膜MSC( $1 \times 10^6$ 、赤色蛍光標識)  
経静脈移植後の肺組織**

細胞分散フィルターなし

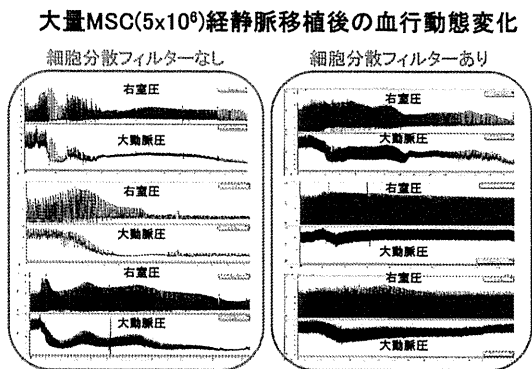
細胞分散フィルターあり



→肺組織全体に分布

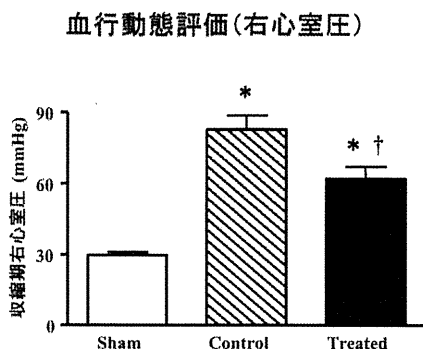
(図7) 蛍光標識卵膜 MSC 経静脈移植後の肺切片の蛍光顕微鏡写真

また、Lewis ラットにおいて、右室・大動脈カテーテル留置下に卵膜 MSC を大量 ( $5 \times 10^6$ ) に経静脈的に bolus 投与したところ、右室・大動脈圧の急激な低下を認め、急性肺塞栓の病態を呈した (図8)。一方、細胞分散フィルターを用いて同様の bolus 投与をしたところ、右室・大動脈圧共に維持されることを確認した (図8)。



(図 8) 卵膜 MSC 大量 bolus 移植後の血行動態変化

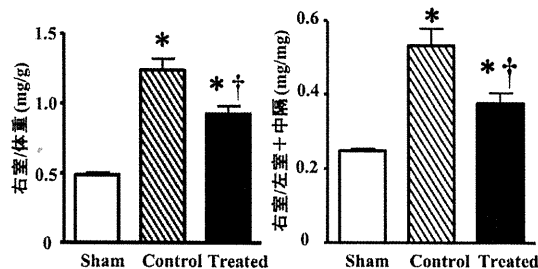
これらの結果を踏まえ、卵膜 MSC 5x10<sup>5</sup> を細胞分散フィルターにて経静脈的に移植した。移植 21 日目に血行動態評価として右心室圧を測定したところ、モノクロタリン投与により肺高血圧となるため、右心室圧は正常の 30mmHg から約 80mmHg まで上昇した。一方 FM-MSC 移植では 60mmHg 前後まで低下した (図 9)。



(図 9) 肺高血圧モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果：血行動態

組織重量による移植 21 日目における評価でも、右室重量は肺高血圧群で有意に増加したものの、卵膜 MSC 移植により著明に減少していた (図 10)。

血行動態評価(組織重量)

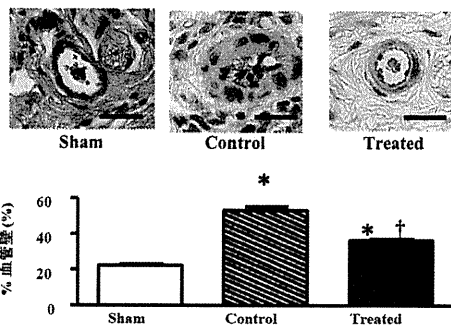


(図 10) 肺高血圧モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果：組織重量

病理学的評価においても肺高血圧群では、その血管壁の著明な肥厚が認められたが、卵膜 MSC 移植により、その抑制が認められた (図 11)。

(図 11) 肺高血圧モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果：病理組織

病理学的評価



考察

今年度は、動物由来卵膜 MSC を用い、下記の様な各種難治性循環器疾患モデルにおいて卵膜 MSC 移植による治療効果を免疫調節・炎症抑制の観点から検証し、各種難治性疾患に対する新規細胞移植療法開発を目指した基礎的研究を行った。

1.ラット自己免疫性心筋炎モデルにおいて経静脈的卵膜 MSC 移植を行い、①細胞

移植のタイミングにより治療効果が大きく異なることを見いだした(in revision)。

2. ラット肺高血圧症モデルにおいて経静脈的卵膜 MSC 移植を行い、①我々が開発した細胞分散フィルターを用い、効率的に肺全体に MSC を移植することができ、②移植による肺高血圧の改善が認められ、③病理学的検討においても、血管壁肥厚の改善が認められた (submitted)。

このように、各種難治性循環器疾患において、卵膜 MSC の経静脈内投与は主に免疫や炎症抑制を介し、疾患治癒に働くことが明らかとなった。既に骨髄 MSC は GVHD や膠原病など、重篤な炎症性疾患においてその有用性が指摘されており、我々の卵膜 MSC も同様の効果を持つ可能性が高いと考えており、将来的には有望な細胞治療の候補として、実用化が期待できる。

#### E. 結論

卵膜 MSC を用いた難治性循環器疾患の新たな治療ターゲットとして、急性心筋炎モデルおよび肺高血圧症モデルにおける卵膜 MSC 移植による病態改善効果検証を行った。結果、卵膜 MSC の各種難治性循環器疾患に対する治療効果を、免疫・炎症制御の観点から明らかにし、細胞治療応用の可能性を証明した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Katsuragi S, Ueda K, Yamanaka K, Neki R, Kamiya C, Sasaki Y, Osato K, Niwa K, Ikeda T. Pregnancy-associated aortic dilatation or dissection in Japanese women with marfan syndrome. *Circ J*.

75(11): 2545-2551, 2011.

2. Neki R, Fujita T, Kokame K, Nakanishi I, Waguri M, Imayoshi Y, Suehara N, Ikeda T, Miyata T. Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol*. 94(2): 150-155, 2011.
3. Neki R, Fujita T, Kokame K, Nakanishi I, Waguri M, Imayoshi Y, Suehara N, Ikeda T, Miyata T. Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol*. 94(2):150-155, 2011.
4. Kamiya CA, Kitakaze M, Ishibashi-Ueda H, Nakatani S, Murohara T, Tomoike H, Ikeda T. Different characteristics of peripartum cardiomyopathy between patients complicated with and without hypertensive disorders. -Results from the Japanese Nationwide survey of peripartum cardiomyopathy-. *Circ J*. 75(8):1975-81, 2011.
5. Kanayama N, Inori J, Ishibashi-Ueda H, Takeuchi M, Nakayama M, Kimura S, Matsuda Y, Yoshimatsu J, Ikeda T. Maternal death analysis from the Japanese autopsy registry for recent 16 years: significance of amniotic fluid embolism. *J Obstet Gynaecol Res*. 37(1):58-63, 2011.
6. Harada K, Yamahara K, Ohnishi S, Otani K, Kanoh H, Ishibashi-Ueda H, Minamino N, Kangawa K, Nagaya N, Ikeda T. Sustained-release adrenomedullin ointment accelerates wound healing of pressure ulcers.

Regul Pept. 2011 Jun 7;168(1-3):21-6.

7. Jin D, Otani K, Yamahara K, Ikeda T, Nagaya N, Kangawa K. Adrenomedullin reduces expression of adhesion molecules on lymphatic endothelial cells. Regul Pept. 2011 Jan 17;166(1-3):21-7.

2. 学会発表（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし



卵膜由来間葉系幹細胞を用いた難治性疾患に対する新規移植再生療法の開発に関する研究

研究分担者 高原 史郎 大阪大学大学院医学系研究科 先端移植基盤医療学 寄附講座教授

研究要旨

腎虚血再灌流障害モデルを用いた検討により、卵膜由来間葉系幹細胞移植が、免疫・炎症調節作用により、その病態を改善することを明らかとした。

A. 研究目的

我が国における腎疾患患者数は増加の一途をたどっており、今後も糖尿病性腎症の増加や高齢化により、患者数の増加が予想される。そのため腎機能低下を防止し、人工透析導入を阻止する有効な治療法を確立することが求められている。

近年、既存の治療法では治癒し得ない様々な難治性疾患に対して、体性幹細胞・前駆細胞移植による再生医療研究が行われている。我々は、これまで分化能・増殖性に優れた間葉系幹細胞（MSC：mesenchymal stem cell）を中心とした細胞移植研究を行ってきた。しかし、自己MSCは、その樹立には身体への侵襲を伴うこと、また移植に必要な細胞数を得るまでに培養期間を要することから急性期に適用が困難であること、更に、骨髄由来MSCであれば白血病などの骨髄疾患では採取不適であること、といった問題点が指摘されている。そこで、我々は自己MSCに代わる新たなMSCとして、出産時に廃棄されることから非侵襲的で倫理的な問題も少ない胎児付属物である卵膜に着目し、卵膜由来MSC（FM-MSC）の樹立に成功した。また我々は他家卵膜由来MSCが自己骨髄由来MSC同様、下肢虚血モデルラットにおいて移植細胞のパラクライン効果により血管新生を誘導すること、ラット糸球体腎炎モデルにおいて他家卵膜由来MSC移植による腎保護効果を発揮することを確認している（Stem cells. 2008）（Am J Physiol. 2010）。

最近、MSC移植は骨髄移植後GVHDやクローン病など免疫破綻を伴う難治性疾患に対する新たな治療法として報告されており、その免疫調節能が注目されている。しかし、免疫調節能の検討に関しても骨髄由来MSCがほとんどであり、卵膜由来MSCによる免疫制御に関する検討はほとんど行われていない。我々は、病態の進展に炎症が重要となるラット腎虚血

再灌流障害モデルに対して免疫制御・抗炎症作用の要であるT細胞やマクロファージを中心とした機序解明を行うことで、卵膜由来MSCの免疫・炎症調節効果をより明らかにし、難治性腎疾患への適応を目指すことが目的である。

B. 研究方法

腎虚血再灌流障害モデルは6週齢雄Lewisラットの右腎を摘出後、左腎動脈を60分間結紮することにより作成した。再灌流時にMHCハプロタイプの大きく異なるACIラット由来卵膜MSCを $5 \times 10^6$ 個経静脈的に移植した。その後、6, 12, 24時間後に生化学的・病理学的評価、さらに各種サイトカイン測定を行った。

方法

移植細胞：

ACI rat 由来 FM-MSC (MHC haplotype : RT1A<sup>a</sup>)

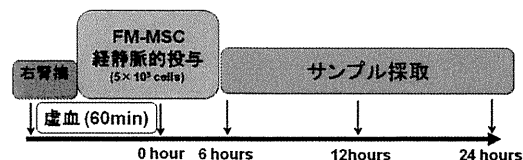
腎虚血再灌流(I/R)障害モデル：

Lewis rat (MHC haplotype : RT1A<sup>b</sup>) 6wk old ♂ (各群n=8)

1) sham群：片腎摘のみ

2) PBS群：片腎摘+I/R障害+PBS投与(PBS 200 $\mu$ l)

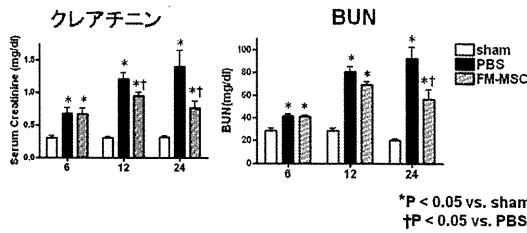
3) FM-MSC群：片腎摘+I/R障害+FM-MSC投与( $5 \times 10^6$  cells/200 $\mu$ l)



C. 研究結果

再灌流24時間後に尿細管障害のマーカーである血清クレアチニン(1.45 $\pm$ 0.24mg/dl)、BUN(92.5 $\pm$ 10.5mg/dl)の顕著な増加がみられたが、卵膜由来MSC移植群ではその増加は有意に抑制された(0.80 $\pm$ 0.11mg/dl, 58.5 $\pm$ 8.6mg/dl)。(図1))

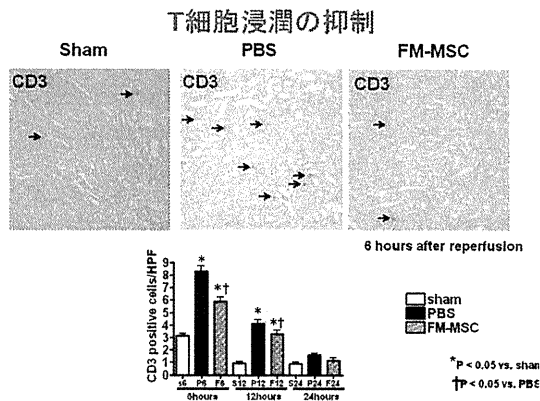
## 卵膜由来MSC移植による腎機能の改善



(図1)卵膜由来MSC移植による腎機能の改善

次に組織学的検討を行ったところ、虚血再灌流障害により尿細管細胞の壊死や刷子縁の消失、円柱形成といった尿細管障害が見られたのに対し、FM-MSC移植した群においては、それらが軽減されていた。また腎尿細管のアポトーシスも有意に抑制されていた。

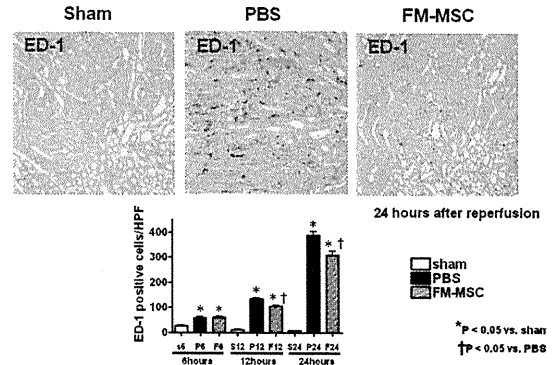
本モデルでは再灌流後早期からT細胞浸潤が起き、24時後には消失する“hit-end-run”現象が知られている。抗CD3抗体を用いて免疫染色を行ったところ、再灌流後6時間から12時間後において病態群でみられたT細胞浸潤はFM-MSC移植により有意に減少した。(図2)



(図2)卵膜由来MSC移植によるT細胞浸潤の抑制

マクロファージは再灌流後中期から後期に生じることが知られている。同様に抗ED-1抗体を用いて免疫染色を行ったところ、腎実質におけるマクロファージ浸潤は、FM-MSC移植により再灌流12および24時間後において有意に抑制された。(図3)

## マクロファージ浸潤の抑制



(図3)卵膜由来MSC移植によるマクロファージ浸潤の抑制

また、それに伴いマクロファージの走化因子であるMCP-1や炎症性サイトカインであるIL-6の腎mRNA発現が卵膜由来MSCを移植した群にて有意に抑制されていた。

## D. 考察

本モデルにおいて、卵膜由来MSCによる腎機能の改善が見られ尿細管アポトーシスも抑制されており、卵膜由来MSCの腎組織保護効果が認められた。また、障害誘導後早期からみられたT細胞浸潤や後期にみられたマクロファージ浸潤の抑制もみられた。それには、MCP-1やIL-6といった炎症性サイトカイン・ケモカインの発現低下が関係していると考えられ、今後は他のサイトカインの発現や血清中の量を経時的に測定し炎症抑制機序を明らかにしていく予定である。

## E. 結論

本実験により卵膜由来MSCは組織保護、免疫・炎症調節作用を有することが明らかとなり、他の難知性疾患に対しても効果的な新規療法となりうると考える。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takabatake Y, Li XK, Mizui M, 他10名 9番目. A superagonistic monoclonal antibody for CD28 ameliorates crescentic glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats. *Mol Med* 2011; 17:686-96.
- 2) Xie L, Li X-K, Takahara S. Curcumin has bright prospects for the treatment of multiple sclerosis. *Int Immunopharmacology*. 2011; 11:323-3

30

3) Miyasato K, Takabatake Y, Kaimori J, 他8名 9番目. CD28 superagonist-induced regulatory T cell expansion ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. Clin Exp Nephrol 2011; 15: 50-57.

4) Okumi M, Kawada N, Ichimaru N, 他10名、13番目. Safety and efficacy of administering the maximal dose of candesartan in renal transplant recipients. Clin Exp Nephrol. 2011 Dec;15(6):907-15.

## 2. 学会発表

### 国内学会

1) 津田秀年、山原研一、他7名、9番目 腎虚血再灌流障害における卵膜由来間葉系幹細胞を用いた治療効果の検討 第54回日本腎臓学会学術総会 2011

2) 津田秀年、山原研一、他6名、8番目 卵膜由来間葉系幹細胞移植による腎虚血再灌流障害に対する治療効果の検討 第37回日本臓器保存生物医学会学術集会 2011

3) 津田秀年、山原研一、他4名、6番目 腎虚血再灌流障害に対する卵膜由来間葉系幹細胞移植による治療効果の検討 第46回日本移植学会学術集会 2011

### 国際学会

1) H Tsuda, K Yamahara, et al.: Allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuate renal ischemia reperfusion injury in rats. American Transplant Congress 2011, Philadelphia, USA.

2) H Tsuda, K Yamahara, et al.: Renoprotective effect of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells in renal ischemia reperfusion injury. 12<sup>th</sup> Congress of the Asian Society of Transplantation, Seoul, Korea.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

現時点では該当事項はない。

### 2. 実用新案登録

現時点では該当事項はない。

## 3. その他

現時点では該当事項はない。

## 卵膜由来間葉系幹細胞を用いた心臓血管外科領域における 全身炎症抑制療法に関する研究

所 属 京都大学大学院医学研究科心臓血管外科  
研究者 丸井 晃、坂田 隆造

研究要旨 卵膜由来間葉系幹細胞の移植治療が心臓外科領域においてどの程度、どの期間、どんなメカニズムで抗炎症効果、臓器保護効果を発揮するのかを、心筋虚血再灌流モデル、人工心肺モデル、MRSA 敗血症モデル、急性大動脈解離モデルを用いて証明する。さらに新しい治療法として臨床応用に展開するための基礎的研究を行う。

<実験 1：ラット心筋虚血再灌流モデルに対する卵膜由来間葉系幹細胞の抗炎症療法の研究>

### A. 研究目的

高齢化および食生活の欧米化に伴い、心血管病の罹患数は年々増加しているが、デバイスの開発などにより、経皮的冠動脈形成術や心臓血管手術の治療成績は向上してきた。しかし心血管治療の際に血流再開に伴う臓器の虚血再灌流障害が惹起されることは不可避であり、虚血再灌流障害へと至る発生過程においては好中球や各種サイトカインをはじめ炎症性メディエーターが複雑に関与しているとされている。

一方で間葉系幹細胞 Mesenchymal Stem Cell (MSC) は再生医療において ES 細胞、iPS 細胞と並ぶ有望な多能性幹細胞である。MSC は当初骨髄から分離されたものであるが、その後の研究で脂肪や卵膜により豊富に存在することが分かり、その倫理的ハードルの低さ、安定供給性の面、増殖効率の良さ、毒性の低さなどから、臨床応用に向けた細胞移植ソースとして期待されている。MSC は心血管領域においては、まず心筋細胞や新生血管への分化能に注目され、すでに心筋梗塞後の慢性不全心に対する改善効果が数多く証明されている。最近では MSC が持つ免疫調節作用に注目が集まり、これにはマクロファージや好中球機能の制御が関与していると考えられている。

今回の研究は、ラット心筋虚血再灌流モデルに対して MSC が「抗炎症」という側面からどの

ように再灌流障害を抑制できるのかを検討することが目的である。

### B. 研究方法

Lewis ラット (300-400g) に気管内挿管をして人工呼吸麻酔管理とした後、左開胸下に冠動脈左前下行枝 (LAD) を確認する。6-0 モノフィラメント糸にて LAD を 30 分間結紮し、再灌流する。結紮の確認は、心尖部の壁運動低下、色調変化にて確認する。再灌流後、不整脈のないことを確認して閉胸し、麻酔覚醒させる。

心筋虚血再灌流後、3 時間、24 時間で犠牲死するグループに分け、心筋組織と血清を採取。組織学的評価および組織内、血清内の炎症性サイトカイン濃度を測定した。

MSC 移植群においては、冠動脈の虚血前に経静脈に移植する。

### C. 研究結果

虚血再灌流の群において、3 時間、24 時間ともに、血清中の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-6) の上昇を認めなかった。虚血再灌流後 3 時間の心筋組織内の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ ) は、control 群に比し、左室前壁で有意に上昇しており、左室後壁では有意差を認めなかった。(図 1)

組織学的評価および MSC 移植群の作成は、現在遂行中である。