

201229023A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業  
(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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池田 智明

平成 25 (2013) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業  
(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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池田 智明

平成 25 (2013) 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細胞治療の臨床応用を目指した環境整備」	
池田 智明 .....	7
「腎虚血再灌流障害モデルにおける卵膜由来間葉系幹細胞移植による治療効果に関する研究」	
高原 史郎 .....	11
「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 .....	15
「胎児付属物（臍帯、卵膜）由来 MSC を用いた GVHD 治療」	
相馬 俊裕 .....	17
「卵膜由来間葉系幹細胞を用いた炎症性腸疾患の新規治療法の開発」	
大西 俊介 .....	19
「胎児付属物由来間葉系幹細胞の細胞製剤化を目指した研究」	
山原 研一 .....	21

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 .....	29

# I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業  
（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」

研究代表者 名前 池田 智明 所属 国立循環器病研究センター

研究要旨：卵膜由来間葉系幹細胞(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、昨年度に引き続き、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、腎虚血再灌流、人工心肺、炎症性腸疾患モデルにおいて、卵膜 MSC による治療効果を証明し、卵膜 MSC の免疫・炎症性疾患に対する細胞治療応用の可能性を証明した。更に今年度は、胎児付属物由来 MSC の早期臨床応用を目指し、セルプロセッシングセンターでの臨床試験用胎児付属物 MSC の細胞調整、更には担当分担研究者の施設倫理委員会において、同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD に対する第一相臨床試験の計画承認を得た。

### 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・臍帯から 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・臍帯を含む他家 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、胎児付属物 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、本研究では、新たな細胞移植ソースである胎児付属物 MSC に着目し、①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・腎虚血再灌流、人工心肺、GVHD、炎症性腸疾患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。更に、胎児付属物 MSC の早期臨床応用を目指し、セルプロセッシングセンターでの胎児付属物 MSC の調整（分離、大量培養、凍結保存）を行い、同時に、先行する骨髄 MSC を用いた治験に習い、同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD に対する第一相臨床試験を立ち上げ、各関係施設倫理委員会において研究計画承認を目指した。

## B. 研究方法

昨年度に引き続き、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。

①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ならびにその作用機序を検討した。

②丸井らは、人工心肺モデルを確立し、卵膜 MSC 移植による抗炎症効果、臓器保護効果を証明した。

④大西らは、ラット炎症性腸疾患モデル、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証明した。

更に今年度は胎児付属物 MSC の早期臨床応用を目指し、特に骨髄 MSC において先行治験が行われている同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD に対する治療応用を検討した。

⑤胎児付属物 MSC（卵膜：担当池田ら、臍帯：担当相馬ら）の同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD に対する臨床試験の準備を開始した。

⑥山原らは、臨床試験使用に相応しい胎児付属物 MSC 調整を目指し、その製剤化に向けた検討を行った。

（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、各関係施設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 ( $5 \times 10^5$  細胞) 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、を認めた。更に卵膜 MSC 移植による治療効果に IL-10 増加が関与していることを、同モデルにおける中和抗体を用いた検討により確認した。これらの事から、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。

### ②ラット人工心肺モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果検討（丸井ら）

ラット人工心肺モデルを、ラット用の人工心肺回路を独自考案し、作成した。人工心肺により著明に増加した血中および肺組

織中の TNF- $\alpha$  や IL-6 濃度は、卵膜 MSC に移植により顕著に減少し、組織学的検討においてもその肺障害が移植により抑制されていた。更に、卵膜 MSC 移植による肺障害抑制メカニズムを検討したところ、KGF 発現増加が関与していることが示唆された。

#### ④ラット炎症性腸疾患における卵膜 MSC 移植による治療効果検討（大西ら）

ラット炎症性腸疾患モデルは 8%デキストラン硫酸(DSS)を 5 日間連日経口投与し作成した。投与開始 2 日目に卵膜 MSC( $1 \times 10^6$ )を経静脈的に投与し、細胞投与 4 日間の体重変化・臨床重症度検討と、4 日目の大腸の長さ、病理学的検討を行ったところ、全ての項目において、卵膜 MSC 移植による改善を認めた。組織学的検討では卵膜 MSC 移植による腸管組織におけるマクロファージ浸潤の抑制を認めた。

#### ⑤胎児付属物 MSC 移植（卵膜：担当池田ら、臍帯：担当相馬ら）を用いた同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD に対する臨床試験導入

卵膜・臍帯由来間葉系幹細胞 (MSC) を用いた細胞治療の早期臨床応用をめざし、骨髄 MSC を用いた治験が進んでいる、同種造血幹細胞移植後の急性 GVHD 治療を目的とした臨床試験導入を目指した。厚生労働省研究開発振興課高度医療係との事前相談を踏まえ、第一相臨床試験プロトコルを作成し、今後早期の先進医療 B 導入を目指している。現在、第一相試験に関しては、施設倫理委員会の承認を得ており、来年度から試験開始を行う予定である。

#### ⑥臨床試験使用に相応しい胎児付属物 MSC の製剤化に向けた検討

胎児付属物由来 MSC の臨床応用をめざ

し、その細胞製剤化を目指した検討を行った。結果、倫理委員会の承認の元、胎児付属物 MSC のセルプロセッシングセンター (CPC) での大量培養とその凍結保存法を確立し、品質管理を行い、更には PMDA 薬事戦略相談において、細胞製剤に必要な要件の確認を行った。

#### D. 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証明することができた。

人工心肺、腎虚血再灌流、炎症性腸疾患の各モデルにおいて、卵膜 MSC 移植が治療効果を発揮し、その効果は昨年度の *in vitro* での結果に合致し、免疫・炎症制御によるものであった。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。

更に今年度は、目標である卵膜・臍帯 MSC 移植の臨床応用を目指した整備を開始し、その細胞製剤化に向けた検討と、造血幹細胞移植後の急性 GVHD 治療をターゲットとした第一相臨床試験プロトコル作成およびその倫理委員会承認を得た。既に、米国 Osiris 社や日本ケミカルリサーチ社は骨髄 MSC を用いた治験による同様の検討を進めているが、大量・長期培養の必要性から、骨髄 MSC 製剤は高額になる可能性が高い。我々の胎児付属物 MSC の特徴は、①大量の MSC を初代培養で得られること、②結果、比較的少ない継代数で目的細胞数 ( $>10^{10}$  細胞) を確保出来ること、を特徴と

し、骨髄 MSC と比較し低コストで調整出来る。今後、将来的な治験導入を見据え、胎児付属物 MSC の細胞製剤化を考慮しており、それを旨とした議論を PMDA と継続していく予定である。また、急性 GVHD 以外では分担研究者大西らが専門とする Crohn 病に対する治療応用を目指し、北海道大学 CPC での卵膜 MSC 調整を検討中である。

#### 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、様々なモデル動物の確立に加え、作成したモデル動物に対する卵膜 MSC 移植の、免疫・炎症調整効果による病態改善を確認した。更に、卵膜・臍帯 MSC 移植の早期臨床応用を目指し、既に骨髄 MSC を用いた治験が進んでいる急性 GVHD 治療応用を検討し、その細胞調整、第一相臨床試験の整備を行った。来年度は同臨床試験の開始を予定しており、今後、GVHD や Crohn 病を含む各種難治性免疫関連疾患に対し、胎児付属物 MSC を用いた新規細胞治療を強力に推進していきたい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Tazawa K, Kamimori JY, Taguchi A, Kangawa K, Ikeda T, Takahara S, Isaka Y. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Cell transplantation*. (in press) 2013.

2. Ohshima M, Yamahara K, Ishikane S, Harada K, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Miyazato M, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Kodama M, Kangawa K, Ikeda T. Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. 53(3): 420-428. 2012.

3. Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Kanda T, Inoue T, Kasahara Y, Hirose H, Sato I, Matsuyama T, Nakagomi T, Yamahara K, Stern D, Ogawa H, Soma T. Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 14(4): 441-450. 2012.

4. Takahara S, Takahashi K, Akiyama T, Uchida K, Tanabe K, Amada N, Toma H. Randomized comparative trial of mizoribine versus mycophenolate mofetil in combination with tacrolimus for living donor renal transplantation. *Clin Exp Nephrol*. 2013.

5. Tsuda H, Kawada N, Kaimori JY, Kitamura H, Moriyama T, Rakugi H, Takahara S, Isaka Y. Febuxostat suppressed renal ischemia-reperfusion injury via reduced oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 427(2): 66-72. 2012.

6. 大西礼造. ラット dextran sulfate sodium 誘発腸炎モデルに対するヒト卵膜由来間葉系幹細胞投与の効果. *日本再生医療学会雑誌*. 12(suppl): 253. 2012.

7. 村林奈緒、池田智明. 周産期心筋症(産褥心筋症). *産科と婦人科別刷*. 79(9): 1126~1129. 2012.

2. 学会発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

##### 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

4) 日本再生医療医学会 (2013/3/21-23 横浜) ラット人工心肺モデルを用いた他家卵膜由来間葉系幹細胞移植による全身炎症抑制効果の検討

5) 大西礼造, 大西俊介, 東亮佑, 山原研一, 渡利道子, 小林和夏, 桂田武彦, 武田宏司, 坂本直哉. ラット dextran sulfate sodium 誘発腸炎モデルに対するヒト卵膜由来間葉系幹細胞投与の効果 第12回日本再生医療学会総会 平成25年3月, 横浜

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. 12th Congress of the Asian Society of Transplantation, Seoul, Korea.

3) American Heart Association Scientific Sessions 2012 (2012/11/4-6 Los Angeles) Novel approach to prevent systemic inflammation following prolonged cardiopulmonary bypass using allogeneic administration of fetal

membrane-derived mesenchymal stem cells in rats

4) K. Yamahara, M. Ohshima, K. Ishikane, K. Harada, H. Tsuda, K. Otani, A. Taguchi, M. Kodama, K. Kangawa, T. Ikeda. Systemic administration of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppressed Th1 and Th17 T-cell immunity in experimental autoimmune myocarditis. European Society of Cardiology Congress 2012. European Heart Journal ( 2012 ) 33 ( Abstract Supplement ), 431. 2012.8.27

5) Kenichi Yamahara, Makiko Ohshima, Ken Ishikane, Kazuhiko Harada, Hidetoshi Tsuda, Kentaro Otani, Makoto Kodama, Kenji Kangawa, and Tomoaki Ikeda. Systemic Administration of Allogenic Fetal Membrane-derived MSC Ameliorates Experimental Autoimmune Myocarditis via Suppression of Th1/Th17 Immunity. American Heart Association 2012 Scientific Sessions. Circulation. 2012;126:A18331. 2012.11.5

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（難治性疾患等克服研究事業

（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細胞治療の臨床応用を目指した環境整備」

研究代表者 名前 池田 智明

所属 国立循環器病研究センター

研究要旨：卵膜由来間葉系幹細胞（MSC）を用いた細胞治療の早期臨床応用をめざし、急性 GVHD 治療を目的とした臨床試験導入を開始した。結果、第一相臨床試験プロトコール作成とその施設倫理委員会の承認を得た。

#### 共同研究者

山原研一 国立循環器病研究センター  
再生医療部

山本晴子 国立循環器病研究センター  
先進医療・治験推進部

相馬俊裕 兵庫医科大学血液内科

#### 員会申請

既に先行して治験が行われている骨髄 MSC を参考に、同種造血幹細胞移植後のステロイド抵抗性急性移植片対宿主病（GVHD）の症例を対象とした卵膜および臍帯 MSC を用いた細胞治療の第一相臨床試験計画を作成した（兵庫医科大学相馬先生、国立循環器病研究センター山本先生との共同研究）。

（倫理面への配慮）

ヒト卵膜 MSC の製剤化および急性 GVHD に対する細胞治療応用は、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、当センターおよび兵庫医大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。

#### A. 研究目的

これまで間葉系幹細胞（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。しかしながら、その先行性から骨髄MSCを用いた臨床試験が最も進んでいる。そこで我々は、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のメリットを生かした臨床試験の早期開始を目指した環境整備を開始した。特に骨髄MSCにおいてその治験が最も進行している移植片対宿主病（GVHD）をターゲットとした臨床試験の早期開始を目指した。

#### B. 研究方法

胎児付属物 MSC を用いた細胞治療の第一相臨床試験プロトコール作成および倫理委

#### C. 研究結果

胎児付属物 MSC を用いた細胞治療の第一相臨床試験プロトコール作成および倫理委員会申請

既報および米国 Osiris 社の同種造血幹細胞移植に伴うステロイド抵抗性急性移植片

対宿主病(急性 GVHD)に対する骨髄 MSC 移植治療プロトコール(Biol Blood Marrow Transplant. 2009;15: 804-11)を参考に、卵膜 MSC 細胞移植の第一相臨床試験計画書を作成した。対象は、同種造血幹細胞移植後に急性 GVHD を発症した患者で、初回細胞投与日に II 度以上(HLA 不適合の造血幹細胞移植を受けた場合は I 度以上)のステロイド抵抗性急性 GVHD と診断された者とした。細胞投与は一回あたり  $2 \times 10^6$  個/kg の卵膜および臍帯 MSC を週 2 回 4 週連続(計 8 回)点滴静注することとし、主要評価項目は安全性評価として、細胞投与後 24 時間までの輸注毒性に伴う事象とした。本研究計画書は兵庫医大倫理委員会にて平成 25 年 1 月承認を受けた。

#### 考察

本研究は、胎児付属物 MSC を用いた①同種造血幹細胞移植における GVHD、② Crohn 病、③膠原病、などの難治性免疫関連疾患を対象とした細胞治療研究の早期確立を目指している。我が国でも、Osiris 社からライセンスを受け、骨髄 MSC を用いた GVHD 治療を目的とした治験が行われているが、ソースである骨髄を米国から輸入するなどオリジナル性に乏しい。そこで、我が国発の新しい細胞治療法の開発を目指し、骨髄 MSC と比べて、①低コスト、②高い治療効果、という特徴を持つ胎児付属物 MSC を用いた細胞治療の早期臨床試験導入を目指す。従来医療廃棄物として遺棄されていた胎児付属物が免疫抑制能に優れた MSC を多く含有することに着目した本研究は、高いオリジナル性と共に将来的な治療応用の可能性を期待させるものである。

今年度は、先行する骨髄 MSC 治験にならない、胎児付属物 MSC を用いた急性 GVHD 治療の第一相臨床試験プロトコールを作成し、その倫理委員会承認を得た。来年度からは本プロトコールに基づいた臨床試験を兵庫医大と共に開始する予定である。また、Crohn 病に関しても分担研究者である北海道大学消化器内科大西先生と共に第一相臨床試験開始を検討中である。

今年度の本研究で特に印象的であったのが、胎児付属物 MSC を用いた急性 GVHD に対する本研究は、MSC による免疫抑制を期待したものであり、研究対象が病気やけがで失われた臓器や組織の再生を目的とするものであるヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成 22 年厚生労働省告示第 380 号)に該当しない点である。しかしながら、本研究において MSC を用いることは事実であり、同指針の趣旨を踏まえた臨床試験を今後進めていきたい。

#### E. 結論

卵膜 MSC を用いた細胞治療の早期臨床試験開始を目指し、その環境整備を行った。結果、先行する骨髄 MSC を用いた GVHD 治療の治験をモデルに、卵膜 MSC を用いた第一相臨床試験プロトコールの作成とその倫理委員会承認を得た。今後、本研究の強力な推進を進め、卵膜 MSC を用いた細胞治療を他の難治性免疫関連疾患への治療応用につなげたい。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Yazawa K, Kaimori JY,

Taguchi A, Kangawa K, Ikeda T, Takahara S, Isaka Y. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. Cell Transplant. 2013 *in press*.

2. Ohshima M, Yamahara K, Ishikane S, Harada K, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Miyazato M, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Kodama M, Kangawa K, Ikeda T. Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. J Mol Cell Cardiol. 2012 Sep;53(3):420-8.

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業  
（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

腎虚血再灌流障害モデルにおける卵膜由来間葉系幹細胞移植による  
治療効果に関する研究

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 教授

研究要旨

ラット腎虚血再灌流障害モデルに卵膜由来間葉系幹細胞を移植し、組織保護および炎症調節作用を有することが明らかとなった。また、この改善効果の機序としてインターロイキン 10 が関与していることが示唆された。

共同研究者

津田秀年 国立循環器病研究センター再生医療部

A. 研究目的

近年、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、それに伴う移植待機患者数も増加し続け深刻な問題となっている。臓器移植において虚血再灌流傷害は避けることができない重要な問題であり、Delayed graft function（移植後腎機能発現遅延）や慢性移植腎症の発症に関与するため、できるだけ軽減する必要がある。虚血再灌流障害は病態進展に炎症が重要な役割を果たしていることが報告されており、その要である T 細胞やマクロファージ制御が治療につながると考えられる。我々は免疫・炎症抑制効果をもつ卵膜由来間葉系幹細胞（MSC）移植による虚血再灌流障害に対する有効性を検討した。

B. 研究方法

6 週齢雄 Lewis ラットに対して右腎を摘出後、

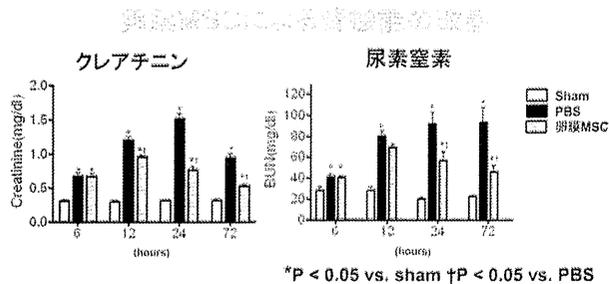
左腎動脈を動脈クリップにて 60 分間遮断することにより虚血再灌流障害モデルを作成した。再灌流時に MHC ハプロタイプの異なる ACI ラット由来卵膜 MSC ( $5 \times 10^5$  個) を尾静脈より投与した。その後、6,12,24,72 時間後に生化学的・病理学的評価、更に各種サイトカイン測定を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」等に従い、動物実験委員会に研究計画書を提出、承認を受け、動物愛護に配慮して実施した。

C. 研究結果

再灌流24時間後、PBS投与群において腎機能のマーカーである血清クレアチニン( $1.45 \pm 0.24 \text{mg/dl}$ )、BUN( $92.5 \pm 10.5 \text{mg/dl}$ )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( $0.80 \pm 0.11 \text{mg/dl}$ ,  $58.5 \pm 8.6 \text{mg/dl}$ )。(図1) またその効果は再灌流72時間後においても同様に見られた。

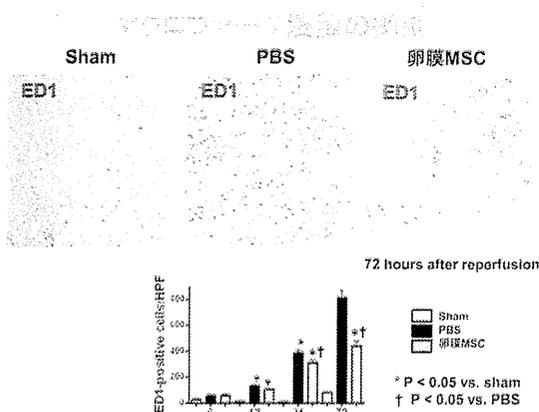


(図1)卵膜MSC移植による腎機能の改善

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逸脱、刷子縁の消失、円柱形成といった尿細管障害が見られた。一方、卵膜MSC移植群においては、それらが軽減されており、尿細管のアポトーシスについても同様に抑制されていた。

本モデルでは再灌流後早期からT細胞浸潤が起き、24時間後には消失することが報告されている。T細胞浸潤を評価するため抗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細胞浸潤は卵膜MSC移植により有意に減少した。

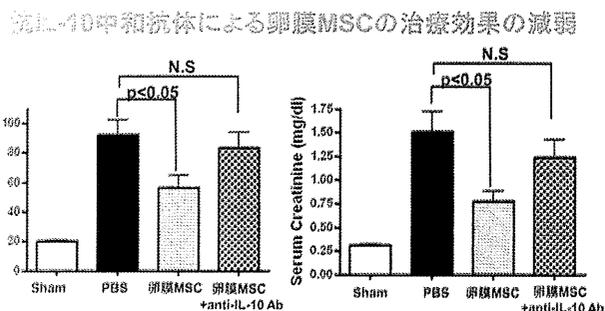
一方、マクロファージは再灌流後中期から後期に生じることが知られている。同様に、マクロファージ浸潤の評価のため抗ED-1抗体を用いて免疫染色を行ったところ、間質におけるマクロファージ浸潤は、卵膜MSC移植により再還流12、24および72時間後において有意に抑制された。(図2)



(図2)卵膜MSC移植によるマクロファージ浸潤の抑制

また、腎組織よりRNAを抽出し、定量的リアルタイムPCR法にて解析を行ったところ、虚血再灌流障害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発現が亢進されており、卵膜MSC移植群にて有意に抑制されていた。

以前、我々は卵膜MSCがプロスタグランジンE2を分泌していることを確認している。プログランジンE2は腎構成細胞であるメサンギウム細胞に対して抗炎症作用を発揮することが知られている。さらにマクロファージに作用して抗炎症性サイトカインであるインターロイキン-10(IL-10)の分泌を促すことが報告されている。そこで、血清IL-10量を測定したところ卵膜MSC移植群にのみIL-10が確認された。また抗IL-10中和抗体を卵膜MSCと同時に投与したところ、その治療効果は減弱した。(図3)



(図3)抗IL-10中和抗体による卵膜MSCの治療効果の減弱

#### D. 考察

本モデルにおいて、卵膜MSC移植は腎機能を改善し、尿細管細胞におけるアポトーシスを含む尿細管障害を抑制した。また、T細胞浸潤やマクロファージ浸潤は卵膜MSC移植により抑制された。これらのことより、炎症抑制による腎機能お

よび組織障害の改善が示唆され、それには IL-10 が重要な因子の 1 つであることが示唆された。今後は他の因子の特定を含む腎保護機序を明らかにしていく予定である。

## E. 結論

卵膜 MSC 移植は虚血再灌流による腎障害を抑制し、組織保護および炎症調節作用を有すること明らかにした。今後、本治療が腎移植時における虚血再灌流障害を減弱し、かつ免疫抑制剤の減量の一助となり得ると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tsuda H, Yamahara K, Otani K, 他 7 名、10 番目. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protect against ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. Cell transplantation. 2013, (in press)
- 2) Takahara S, Takahashi K, Akiyama T, 他 4 名、1 番目. Randomized comparative trial of mizoribine versus mycophenolate mofetil in combination with tacrolimus for living donor renal transplantation. Clin Exp Nephrol. 2013, (in press)
- 3) Tsuda H, Kawada N, Kaimori JY, 他 5 名、7 番目. Febuxostat suppressed renal ischemia-reperfusion injury via reduced oxidative stress. Biochem Biophys Res Commun. 2012, 427(2): 66-72.

### 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.  
12th 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

研究分担者 氏名 丸井 晃 所属 京都大学大学院医学研究科心臓血管外科

研究要旨 心臓血管外科領域の種々の疾患において、全身炎症から臓器不全に陥ることが知られている。我々は小動物人工心肺モデルを作成し、卵膜由来間葉系幹細胞の移植治療がどのように抗炎症効果、臓器保護効果を発揮するのかを検討した。

共同研究者

瀧 智史 京都大学大学院医学研究科

心臓血管外科

坂田隆造 京都大学大学院医学研究科

心臓血管外科

池田智明 三重大学産婦人科

山原研一 国立循環器病研究センター

再生医療部

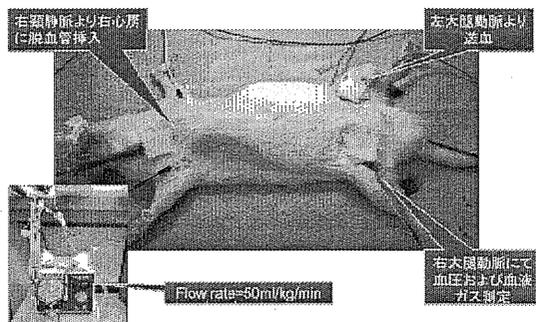
(図 1) ラット人工心肺モデル

A. 研究目的

人工心肺 (CPB) を用いた心臓手術後の強い全身炎症は種々の臓器障害を招くことが知られており、原因の一つが高サイトカイン血症とされている。特に全身炎症に伴う急性肺障害は未だに高い死亡率につながり、有効な治療法がないのが現状である。我々はこれまでに心筋炎や腎炎において、他家卵膜由来間葉系幹細胞 (FM-MSC) 移植が、その抗炎症効果により臓器保護に働くことを証明しており、今回ラット CPB モデルを用いて、FM-MSC による全身炎症ならびに肺障害抑制効果の検討を行った。

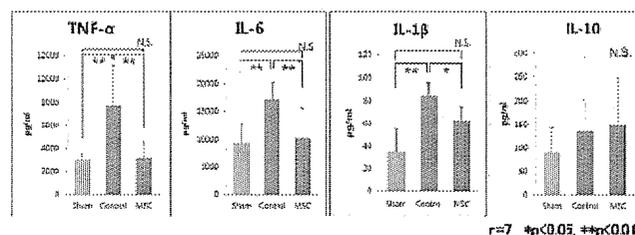
B. 研究方法

Lewis ラットを Sham 群 (カニューレーションのみ)、Control 群 (CPB のみ)、MSC 群 (CPB + FM-MSC) に分け、CPB はオリジナルに作成した回路システムを用いて 50ml/kg/min の flow で 30 分間維持した (図 1)。MSC 群は、Lewis ラットと MHC ハプロタイプ異なる ACI ラット由来 FM-MSC を CPB 開始前に  $1 \times 10^6$  個経静脈的に移植した。

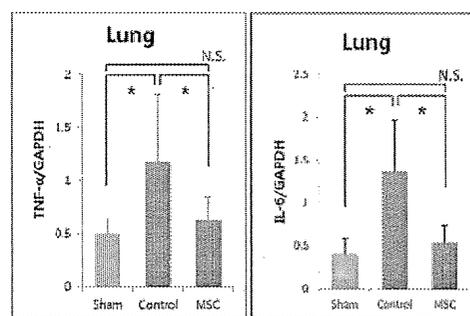


C. 研究結果

FM-MSC 群では、CPB 後 1 時間の血清サイトカイン値 (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) が Control 群に比し有意に減少し (図 2)、肺における TNF- $\alpha$  および IL-6 mRNA 発現も有意に低かった (図 3)。病理組織学的検討では、FM-MSC 移植による肺胞形態の維持と好中球浸潤の抑制が認められた (図 4)。また、FM-MSC の移植により、肺における TGF- $\beta$ , KGF の mRNA 発現促進が認められた (図 5)。



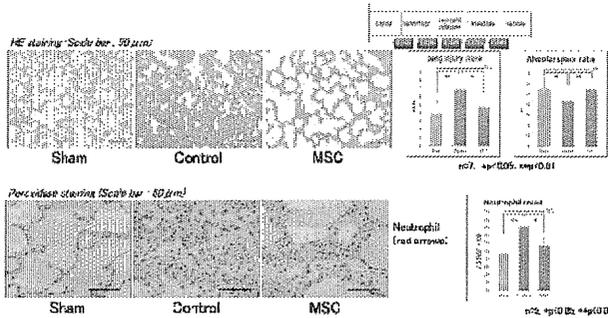
(図 2) 人工心肺終了 1 時間後の炎症性サイトカイン値



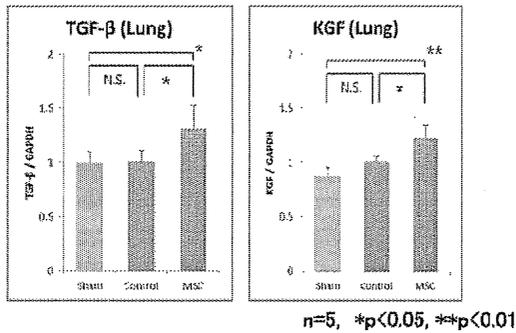
(図 3) 肺における炎症性サイトカインの mRNA 発現

Novel approach to prevent systemic inflammation following prolonged cardiopulmonary bypass using allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells in rats

2) 日本再生医療医学会 (2013/3/21-23 横浜) ラット人工心肺モデルを用いた他家卵膜由来間葉系幹細胞移植による全身炎症抑制効果の検討



(図 4) 人工心肺後の肺障害スコア/好中球浸潤数



(図 5) 肺における TGF-β, KGF (mRNA) の発現

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

#### D. 考察

われわれが独自に開発したラット用人工心肺回路を用いて、ラットモデルにおいて全身性に強い炎症が起こっていることが確認でき、FM-MSC の移植により炎症性サイトカインの産生抑制ならびに肺障害が抑されることが証明された。また、肺障害抑制のメカニズムのひとつとして、KGF の mRNA の発現促進による肺胞上皮細胞の保護・修復が関与していると示唆された。今後、24 時間以上生存モデルを用いた全身炎症・肺障害の時間的推移を追跡し、メカニズムの詳細も検討していく予定である。

#### E. 結論

ラット人工心肺モデルにおける FM-MSC 移植は全身炎症ならびに肺障害を抑制した。FM-MSC の他家移植が長期人工心肺使用心臓手術に伴う合併症の回避および生存率の向上に期待できる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) American Heart Association Scientific Sessions 2012 (2012/11/4-6 Los Angeles)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業  
（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

胎児付属物（臍帯、卵膜）由来 MSC を用いた GVHD 治療

研究分担者 相馬俊裕 兵庫医科大学 血液内科 臨床准教授

研究要旨

胎児付属物の臨床応用へ向けて2つのことを行った。一つは臍帯由来 MSC の大量採取、大量培養の方法の確立、2つ目は先行している卵膜由来 MSC の臨床使用である。この二つの現状を報告する。

共同研究者

田口 明彦（先端医療センター）

小川 啓恭（兵庫医科大学 血液内科）

A. 研究目的

MSC（組織間質細胞）はその特異な免疫抑制能に着目し従来対策の乏しかった各種重症免疫疾患の新規治療薬として期待されている。従来の MSC 材料は骨髄由来あるいは脂肪組織の MSC であるが供給に難があり、我々は無限に供給可能でかつ医療廃棄物である胎児付属物に注目し、臨床材料として開発する。

B. 研究方法

卵膜あるいは臍帯を酵素処理、拡大培養し臨床使用可能な量（1例あたり  $2 \times 10^6$ /kg を8回分（予備を含む）、5例量）を得、その状態で十分な品質を持っていることを確認する。

（倫理面への配慮）

採取に関する配慮:採取に関して倫理委員会に申請し承認を得た。一方提供者にも同意を得、同意書にサインをいただいた。

使用に関する配慮:プロトコールに関して倫理

委員会の承認を得、該当する患者に説明し同意を得る。

C. 研究結果

卵膜由来 MSC の培養に成功し、現在臨床材料としての量を蓄積中である。また臍帯由来 MSC に関しても大量採取、及び培養法を開発し、確認中である。

D. 考察

臨床使用に先立ち、さまざまな品質管理項目の設定が必要であり、また、MSC の機能のチェック方法に定まった方法がないので、今後、臨床研究を進めつつ、臨床結果を反映する検査方法の樹立が必要である。

E. 結論

卵膜、臍帯とも臨床使用に十分な材料の確保方法が確立され、臨床応用に進めることを得た。

F. 健康危険情報

MSC を介した感染防止のため臍帯血バンクと同様の基準を採用し、また培養後細胞の染色体異常も