

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。また、人工多能性幹細胞由来MSCを確立させ、同モデルで詳細を検討する予定である。

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

- (1) Ohnaka M, Marui A, Yamahara K, Minakata K, Yamazaki K, Kumagai M, Masumoto H, Tanaka S, Ikeda T, Sakata R. Effect of microRNA-145 to prevent vein graft disease in rabbits by regulation of smooth muscle cell phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013 in press.
- (2) Nakano J, Marui A, Muranaka H, Masumoto H, Noma H, Tabata Y, Ido A, Tsubouchi H, Ikeda T, Sakata R. Effects of hepatocyte growth factor in myocarditis rats induced by immunization with

porcine cardiac myosin. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2014 Mar;18(3):300-7.

2. 学会発表

- (1) The 21st Annual Meeting Of The Asian Society For Cardiovascular And Thoracic Surgery (ASCVTS2013). 2013.4.4-7. Kobe, Japan. Novel approach to reduce systemic inflammation and lung injury following prolonged cardiopulmonary bypass using allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells in rats.
- (2) 第66回日本胸部外科学会定期学術集会(2013/10/16-19 仙台市) 卵膜由来間葉系幹細胞の他家移植による全身炎症および肺障害に対する治療の可能性～ラット人工心肺モデルを用いた検討～

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

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)

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。

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。

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。

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 2×10^6 /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

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チェックする。使用薬剤と培養施設は GMP 準拠の国立循環器病センターの細胞処理センターで行われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaida K, Ikegame K, Ikemoto J, Murata R, Irie R, Yoshihara S, Ishii S, Okada M, Inoue T, Tamaki H, Soma T, Fujimori Y, Kai S, Ogawa H. Soluble interleukin-2 receptor level on day 7 as a predictor of graft-versus-host disease after HLA-haploidentical stem cell transplantation using reduced-intensity conditioning. *Int J Hematol.* 2014 Apr;99(4):463-70.
- 2) Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K,

Ikeda T. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. PLoS One. 2014 Feb 14;9(2):e88319.

- 3) Ikegame K, Kato R, Fujioka T, Okada M, Kaida K, Ishii S, Yoshihara S, Inoue T, Taniguchi K, Tamaki H, Soma T, Ogawa H. Detection of donor-derived CMV-specific T cells in cerebrospinal fluid in a case of CMV meningoencephalitis after cord blood stem cell transplantation. Int J Hematol. 2013 Feb;97(2):287-90.
- 4) Fujioka T, Tamaki H, Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Kato R, Inoue T, Nakata J, Ishii S, Soma T, Okada M, Ogawa H. Frequency of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T-cells at early stages after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic SCT predicts the incidence of acute GVHD. Bone Marrow Transplant. 2013 Jun;48(6):859-64.

2. 学会発表

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

卵膜、臍帯由来 MSC の採取法を特許につなげたいと考えているが、未出願である

2. 実用新案登録

何らかの臍帯細胞分取ツールを申請したい。

3. その他

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

研究分担者 大西 俊介 北海道大学大学院医学研究科 消化器内科 助教

研究要旨

ラット重症腸炎モデルに対して、ヒト卵膜由来間葉系幹細胞を投与したところ、著明に改善した。その機序として、マクロファージの活性化の抑制が関与していると考えられた。現在、第I相臨床試験を開始するための準備をすすめている。

共同研究者

大西礼造 北海道大学大学院医学研究科
消化器内科 助教
山原研一 国立循環器病研究センター再生
医療部

の承認を得て行った。また、ヒト卵膜からMSCを分離・培養し、動物モデルに投与することについては北海道大学医学部「医の倫理委員会臨床研究審査専門委員会」の承認を得て行った。

A. 研究目的

炎症性腸疾患に対する新規治療法の開発へむけて、ヒト卵膜由来間葉系幹細胞(MSC)の効果およびその機序を明らかにする。

B. 研究方法

帝王切開による胎児娩出後の卵膜を、母親の同意を得て採取し、MSCを分離・培養した。7週齢の雄性SDラットに対して8% dextran sulfate sodium (DSS)を5日間経口投与し、DSS投与開始2日目にMSC(1×10^6 cells)を静注した。細胞投与後4日間の体重の変化および臨床的重症度を評価した後、屠殺して大腸の長さ、病理スコア、直腸の免疫染色を行った。また、直腸の炎症性サイトカインの発現を定量的RT-PCR法で測定した。マウスマクロファージ由来細胞株であるRAW264.7を用いて、lipopolysaccharide (LPS)やTNF- α 刺激による炎症反応応答に対するMSCの抑制効果を検討した。

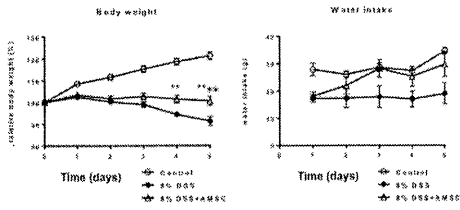
(倫理面への配慮)

ヒト卵膜の採取は天使病院の倫理委員会

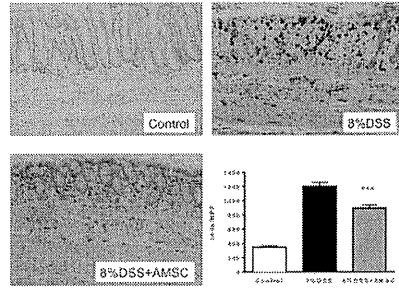
C. 研究結果

細胞投与群はコントロール群と比較して、体重減少、臨床的重症度、大腸の長さの短縮および病理スコアが有意に改善していた。直腸におけるTNF- α 、IL-1 β 、MIFなどの炎症性サイトカインの発現が有意に減少していた。さらに免疫組織染色では、単球/マクロファージのマーカーであるCD68陽性細胞の浸潤が有意に抑制されていた。RAW264.7細胞に対して、TNF- α やLPSによる刺激を加えたところ、卵膜MSCとの共培養や卵膜MSCの培養上清による培養により、炎症シグナルの活性化が抑制された。特に、培養上清による培養により、NF- κ Bの核移行が抑制されていた。

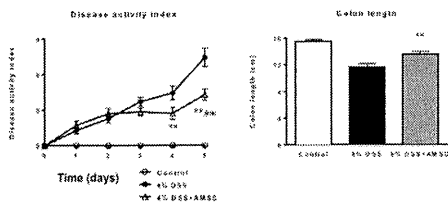
体重・飲水量の推移



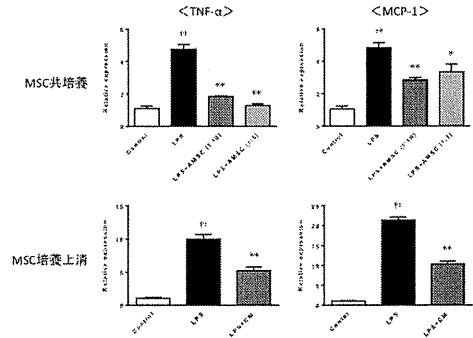
免疫染色(CD68)



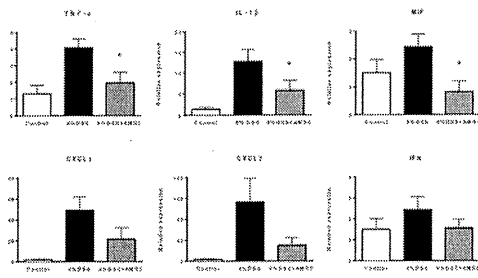
疾患活動性評価/大腸長径



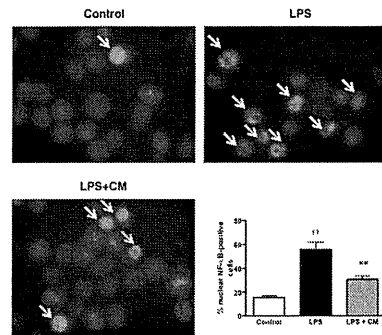
RAW264.7細胞におけるLPS刺激に対するMSCの炎症反応抑制効果



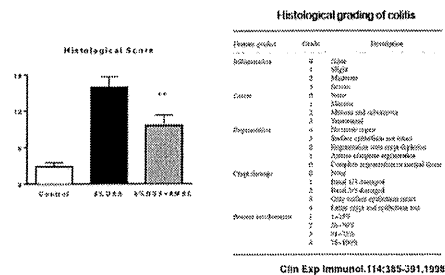
サイトカイン/ケモカインmRNAの発現



RAW264.7細胞におけるLPS刺激に対するMSCのNF-κB核移行抑制効果



病理スコア



D. 考察

本研究では、炎症性腸疾患のモデルの中でも重症腸炎モデルを用いたが、1回の細胞投与で著明な改善効果を示した。その機序としては単球・マクロファージの活性化を抑制することが考えられ、実際にマクロファージ細胞株における NF- κ B の核移行が卵膜 MSC の培養上清により抑制されていた。一方で、臨床研究への基盤が整ったため、現在北海道大学病院で第1相臨床試験を行うための準備を行っており、実際にPMDA薬事戦略相談を活用してプロトコル作成をすすめている。

E. 結論

ヒト卵膜由来 MSC の投与により、DSSによる強い腸管粘膜障害が抑制されていることが示された。その機序として、MSCによるマクロファージの活性化抑制が考えられた。卵膜は細胞治療における新たな細胞ソースとして期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Onishi R, Ohnishi S, Higashi R, Watari M, Yamahara K, Okubo N, Nakagawa K, Katsurada T, Suda G, Natsuizaka M, Takeda H, Sakamoto N. Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates dextran sulfate sodium-induced severe colitis in rats. Gut (in revision).

2. 学会発表

- (1) Onishi R, Ohnishi S, Higashi R, Watari M, Kobayashi W, Katsurada T, Takeda H, Sakamoto N. Transplantation of human fetal membrane-derived mesenchymal stem cells improves severe colitis induced by dextran sulfate sodium in rats. Digestive Disease Week 2013. Orlando. May 2013.
- (2) Ohnishi S, Onishi R, Higashi R, Yamahara K, Watari M, Kobayashi W, Katsurada T, Takeda H, Sakamoto N. Transplantation of human amnion-derived mesenchymal stem cells improves severe colitis via attenuation of macrophage activity in rats. International Society for Stem Cell Research 2013. Boston. June 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

「羊膜間葉系肝細胞の高純度簡便分離培養法、治療剤および至適凍結保存法（特願2013-170008）」について、北海道大学を含めてPCT出願予定。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

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 移植医療研究分野）

分担研究報告書

「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」

研究分担者 名前 山原 研一 所属 国立循環器病研究センター

研究要旨：胎児付属物由来間葉系幹細胞（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、品質管理法の確立を行った。更に、北海道大学病院高度先進医療支援センターの協力の元、PMDA 薬事戦略相談において、細胞製剤化における品質・安全性に関する確認を行った。

共同研究者

池田智明 三重大学医学部産婦人科
吉松 淳 国立循環器病研究センター
周産期婦人科
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
佐藤典宏 北海道大学病院
高度先進医療支援センター
大西俊介 北海道大学医学部消化器内科
荒戸照代 北海道大学大学院医学研究科
レギュラトリーサイエンス部門

り、結果、胎児付属物 MSC は骨髄 MSC と比較し、①倫理的問題が少なく、②非侵襲的に採取可能であり、③非常に多くの細胞を一度に得られ、④免疫抑制効果も高い JMCC. 2010;49:753-61, JMCC. 2012;53:420-8)。

これらを踏まえ、我々は胎児付属物 MSC を用い、各分担研究者と共同で、①同種造血幹細胞移植における GVHD、②Crohn 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の臨床応用を目指している。MSC を用いた細胞治療の特徴は、従来のステロイド、免疫抑制剤とは全く異なる機序により免疫抑制効果を発揮することであり、MSC は従来の治療法に抵抗性の難治性免疫関連疾患に対する新たな治療薬となる可能性が高い。そこで、本研究では、将来的な胎児付属物由来 MSC の製剤化を目指し、①胎児付属物 MSC のセルプロセッシングセンター（CPC）での分離、培養、凍結法の至適化、②CPC にて大量培養された胎児付属物 MSC の品質・安全性試験の確立、③胎児付属物 MSC の製剤化を見据え

A. 研究目的

近年 MSC はその免疫抑制能を有することで注目され、米国 Osiris 社は同種骨髄 MSC 「Prochymal」を用い、①造血幹細胞移植における重篤な副作用である移植片対宿主病(GVHD)、②Crohn 病など、従来の治療法ではコントロール不能な難治性免疫関連疾患を対象とした治験を行っている。

一方、我々は、胎児付属物 MSC の臨床応用を目指した研究をこれまでに行ってお

た PMDA 薬事戦略相談、を行った。

B. 研究方法

①胎児付属物MSCのセルプロセッシングセンター（CPC）での分離、培養、凍結法の至適化

国立循環器病研究センターCPC運営委員会および倫理委員会に対し、胎児付属物由来MSCの臨床試験用細胞調整に関する研究計画書を提出し、承認を受けた。同センター周産期婦人科の協力の下、母児共に健康な帝王切開例において、手術室にて無菌的に胎児付属物を採取し、同センターCPCに搬送した。CPC内で胎児付属物の羊膜(担当：山原)および臍帯(担当：相馬)を物理的に分離し、酵素処理にて組織消化した後、遠心操作にて沈殿する細胞成分を回収する、といった一連の技術の安定化を目指した検討を行った。

②CPCにて大量培養された胎児付属物MSCの品質・安全性試験の確立

臨床試験に使用する胎児付属物MSCの品質・安全性試験の確立を目指し、薬食発第0912006号「ヒト(同種)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」に基づき、下記の項目の検査を行う体制確立を目指した。

- ・ 細胞数及び生存率
- ・ 確認試験
- ・ 細胞の純度試験
- ・ 無菌試験
- ・ マイコプラズマ否定試験
- ・ エンドトキシン試験
- ・ 下記に挙げるウイルス等の試験

B型肝炎(HBV)、C型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人T

細胞白血病、パルボウイルスB19感染症、サイトメガロウイルス感染、EBウイルス感染

③胎児付属物MSCの製剤化を見据えたPMDA薬事戦略相談

将来的な胎児付属物MSCを用いた治験導入を目指すには、胎児付属物MSCのGMPグレード製剤化が必要である。そこで、北海道大学病院高度先進医療センターの協力の下、PMDA薬事戦略相談を、特に細胞製品の品質・安全性に関するPMDAとの協議を前年度に引き続き行った。

(倫理面への配慮)

ヒト胎児付属物の採取、MSC樹立・培養・保存は、「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胎児付属物MSCのセルプロセッシングセンター（CPC）での分離、培養、凍結法の至適化

(a)羊膜MSC分離工程

今年度は、絨毛膜MSCと比較し、よりMSC分離工程を簡便化できる、羊膜MSCに絞った検討を行った。から最も効率のおよび低コストにMSCを分離する至適条件を、使用酵素の種類、その濃度、および反応時間を調整し、検討を行った。結果、酵素組成を2種類とし、これら濃度および反応時間を至適化することで、目的とするMSCが卵膜1gあたり常に 10^6 個以上得られることを確認し、同内容を特許出願した。

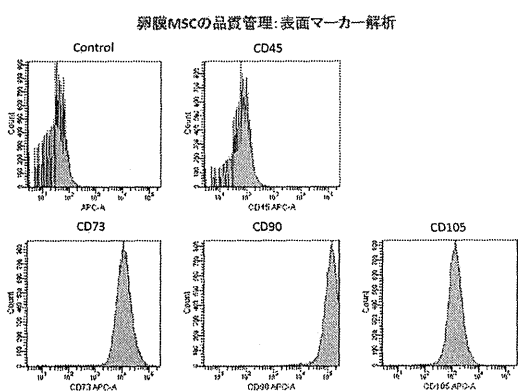
(b)胎児付属物 MSC 培養・凍結保存工程

急性 GVHD 治療に用いられる MSC は体重 kg 当たり 2×10^6 細胞であり、一回の静脈内投与に 2×10^8 細胞、計 4 回の投与とすると計算上 8×10^8 細胞と、 10^9 細胞オーダーの MSC を用意する必要がある。CPC にて実際に培養を行ったところ、市販の多段培養容器(Corning 社製セルスタック 10 チャンバー)一つで 10^8 細胞オーダーの卵膜 MSC を得られることが分かった。そこで同容器を用いて大量培養を行い、数人分の治療に用いることが可能な $>10^{10}$ 細胞数を凍結保存することが出来た。凍結保存法に関しては、通常の DMSO のみを添加する方法ではなく新たな MSC 凍結法を開発し、同内容を特許出願した。

②CPC にて大量培養された胎児付属物 MSC の品質・安全性試験の確立

CPC 内で凍結保存された臨床試験用卵膜 MSC に関する安全性試験として、

- ・ 細胞数：規格細胞数の 90%以上
- ・ 生存率：全有核細胞の 90%以上
- ・ 確認試験：形態的に紡錘形
- ・ 細胞の純度試験：FACS による表面マーカー解析にて、CD73/90/105 陽性細胞の割合：99%以上、CD45 陽性細胞 0.1%未満 (図 1)



(図 1) CPC 内大量培養羊膜 MSC の表面マーカー解析

であることを国立循環器病研究センター内で確認した。更に、

- ・ 無菌試験 (メンブレンフィルター法：陰性)
- ・ マイコプラズマ否定試験 (PCR 法・DNA 染色法：陰性)
- ・ エンドトキシン試験 (Kinetic-比色法：1.0EU/ml 以下)

に関しては、先端医療振興財団細胞療法開発事業部門細胞評価グループに外部委託し、常に試験合格であった。また、

- ・ ウイルス試験 (PCR 法：陰性)

を先端医療振興財団先端医療センター細胞治療科橋本先生および東京医科歯科大学難治疾患研究所清水先生のご協力の下行い、常に陰性であった。

③胎児付属物 MSC の製剤化を見据えた PMDA 薬事戦略相談

胎児付属物 MSC の製剤化を目指し、特に品質・安全性に関する要件を確認するため、製品標準書・作業手順書等を作成の上、前年度に引き続き、平成 25 年 12 月 19 日 PMDA 薬事戦略相談第二回対面助言を行った。結果、ドナースクリーニングの徹底、培養に使用する原材料のトレーサビリティおよびウイルスプロセスバリデーション、を指摘された。今後、指摘された問題点を解決し、協力を受けた北海道大学病院高度先進医療センターに設置された GMP 準拠 CPC での細胞製造を視野に、再度 PMDA の助言を受ける予定である。

D. 考察

本研究では、胎児付属物 MSC の細胞製

剤化をめざし、CPC での簡便且つ大量培養法の開発、培養された MSC の品質・安全性試験の確立、更には製剤化に関する行政的な問題に関し、PMDA 薬事戦略相談の対面助言によって明確化を目指した。

我々の検討結果から、①羊膜 MSC の CPC 内での至適分離・凍結法を樹立（特許出願済み）、②胎児付属物 MSC の品質・安全性試験の実施、③胎児付属物 MSC の製剤化に向けた必要な要件の整理、を終了できた。PMDA との協議から、胎児付属物 MSC の製剤化に必要な品質・安全性評価項目が明らかとなり、今後精力的に製剤化に向けた製品標準書・標準作業手順書（SOP）等の必要書類の整備と共に、北海道大学病院高度先進医療センターでの GMP 準拠細胞製造を行う予定である。

E. 結論

胎児付属物 MSC の細胞製剤化をめざし、その臨床試験グレードの大量培養法・品質安全性評価、治験グレードに必要な要件確認を行った。今後、北海道大学病院高度先進医療センターでの GMP グレードの細胞製剤化を目標とし、研究を進めていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K, Ikeda T. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of

human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2014;9(2):e88319.

- 2) Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34(+) cells in a mouse model of neonatal stroke. *Neuroscience*. 2014;263:148-58.
- 3) Ishikane S, Hosoda H, Yamahara K, Akitake Y, Kyoungsook J, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Miyazato M, Kangawa K, Ikeda T. Allogeneic transplantation of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets increases neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. *Transplantation*. 2013;96(8):697-706.
- 4) Kaneko M, Shintani Y, Narita T, Ikebe C, Tano N, Yamahara K, Fukushima S, Coppen SR, Suzuki K. Extracellular high mobility group box 1 plays a role in the effect of bone marrow mononuclear cell transplantation for heart failure. *PLoS One*. 2013;8(10):e76908.
- 5) Ohnaka M, Marui A, Yamahara K, Minakata K, Yamazaki K, Kumagai M, Masumoto H, Tanaka S, Ikeda T, Sakata R. Effect of microRNA-145 to prevent vein graft disease in rabbits by regulation of smooth muscle cell

- phenotype. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 in press.
- 6) Otani K, Yamahara K. Feasibility of lactadherin-bearing clinically available microbubbles as ultrasound contrast agent for angiogenesis. Mol Imaging Biol. 2013;15(5):534-41.
- 7) 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. 学会発表（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）
- 1) 津田 秀年(国立循環器病研究センター再生医療部), 山原 研一, 大谷 健太郎, 斯波 真理子, 寒川 賢治, 高原 史郎, 猪阪 善隆 急性腎障害モデルにおける抗炎症性因子を介した同種他家卵膜由来間葉系幹細胞移植の腎保護作用 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (2013.11.23)
- 2) 河嶋 秀和, 銭谷 勉, 大谷 健太郎, 福田 肇, 橋川 美子, 山原 研一, 犬伏 正幸, 飯田 秀博 心筋梗塞モデルラットに移植したhNIS発現細胞シートのSPECTイメージング 日本薬学会第133年会 (2013.3.29)
- 3) 銭谷 勉, 大谷 健太郎, 河嶋 秀和, 福田 肇, 橋川 美子, 森口 哲朗, 越野 一博, 堀 祐樹, 圓見 純一郎, 井口 智史, 山本 明秀, 山原 研一, 犬伏 正幸, 飯田 秀博 レポーター遺伝子とSPECTを用いた心筋梗塞モデルラットにおける移植細胞シートの機能定量イメージング 第8回日本分子イメージング学会総会・学術集会 (2013.5.30)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
「羊膜間葉系細胞の高純度簡便分離培養法、治療剤および至適凍結保存法」特願2013-170008号
2. 実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K, Ikeda T.	Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells.	PLoS One.	9(2)	e88319	2014
Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T.	Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34(+) cells in a mouse model of neonatal stroke.	Neuroscience.	263	148-58	2014
Ishikane S, Hosoda H, Yamahara K, Akitake Y, Kyoungsook J, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Miyazato M, Kangawa K, Ikeda T.	Allogeneic transplantation of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets increases neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction in rats.	Transplantation.	96(8)	697-706	2013
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
Kaneko M, Shintani Y, Narita T, Ikebe C, Tano N, Yamahara K, Fukushima S, Coppen SR, Suzuki K.	Extracellular high mobility group box 1 plays a role in the effect of bone marrow mononuclear cell transplantation for heart failure.	PLoS One.	8(10)	e76908	2013

Ohnaka M, Marui A, Yamahara K, Minakata K, Yamazaki K, Kumagai M, Masumoto H, Tanaka S, Ikeda T, Sakata R.	Effect of microRNA-145 to prevent vein graft disease in rabbits by regulation of smooth muscle cell phenotype.	J Thorac Cardiovasc Surg			2013 in press
Otani K, Yamahara K.	Feasibility of lactadherin-bearing clinically available microbubbles as ultrasound contrast agent for angiogenesis.	Mol Imaging Biol.	15(5)	534-41	2013
Ohnishi S, Maehara O, Nakagawa K, Kameya A, Otaki K, Fujita H, Higashi R, Takagi K, Asaka M, Sakamoto N, Kobayashi M, Takeda H.	hypoxia-inducible factors activate CD133 promoter through ETS family transcription factors.	PLoS One.	8(6)	e66255	2013
Kaida K, Ikegame K, Ikemoto J, Murata R, Irie R, Yoshihara S, Ishii S, Okada M, Inoue T, Tamaki H, Soma T, Fujimori Y, Kai S, Ogawa H.	Soluble interleukin-2 receptor level on day 7 as a predictor of graft-versus-host disease after HLA-haploidentical stem cell transplantation using reduced-intensity conditioning.	Int J Hematol.	99(4)	463-70.	2014
Ikegame K, Kato R, Fujioka T, Okada M, Kaida K, Ishii S, Yoshihara S, Inoue T, Taniguchi K, Tamaki H, Soma T, Ogawa H.	Detection of donor-derived CMV-specific T cells in cerebrospinal fluid in a case of CMV meningoencephalitis after cord blood stem cell transplantation.	Int J Hematol.	97(2)	287-90	2013
Fujioka T, Tamaki H, Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Kato R, Inoue T, Nakata J, Ishii S, Soma T, Okada M, Ogawa H.	Frequency of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T-cells at early stages after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic SCT predicts the incidence of acute GVHD.	Bone Marrow Transplant.	48(6)	859-64	2013
Obi Y, Hamano T, Ichimaru N, Tomida K, Matsui I, Fujii N, Okumi M, Kaimori JY, Yazawa K, Kokado Y, Nonomura N, Rakugi H, Takahara S, Isaka Y, Tsubakihara Y.	Vitamin D Deficiency Predicts Decline in Kidney Allograft Function: A Prospective Cohort Study.	J Clin Endocrinol Metab.	99(2)	527-35.	2014
Takahashi K, Uchida K, Yoshimura N, Takahara S, Teraoka S, Teshima R, Cornu-Artis C, Kobayashi E.	Efficacy and safety of concentration-controlled everolimus with reduced-dose cyclosporine in Japanese de novo renal transplant patients: 12-month results.	Transplant Res.	2(1)	14	2013

Kaimori JY, Iwai S, Hatanaka M, Teratani T, Obi Y, Tsuda H, Isaka Y, Yokawa T, Kuroda K, Ichimaru N, Okumi M, Yazawa K, Rakugi H, Nonomura N, Takahara S, Kobayashi E.	Non-invasive magnetic resonance imaging in rats for prediction of the fate of grafted kidneys from cardiac death donors.	PLoS One.	8(5)	e63573	2013
Danovitch GM, Chapman J, Capron AM, Levin A, Abbud-Filho M, Al Mousawi M, Bennett W, Budiani-Saberi D, Couser W, Dittmer I, Jha V, Lavee J, Martin D, Masri M, Naicker S, Takahara S, Tibell A, Shaheen F, Anantharaman V, Delmonico FL.	Organ trafficking and transplant tourism: the role of global professional ethical standards-the 2008 Declaration of Istanbul.	Transplantation.	95(11)	1306-12	2013
Nakano J, Marui A, Muranaka H, Masumoto H, Noma H, Tabata Y, Ido A, Tsubouchi H, Ikeda T, Sakata R.	Effects of hepatocyte growth factor in myocarditis rats induced by immunization with porcine cardiac myosin.	Interact Cardiovasc Thorac Surg.	18(3)	300-7	2014

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Comparison of Angiogenic, Cytoprotective, and Immunosuppressive Properties of Human Amnion- and Chorion-Derived Mesenchymal Stem Cells

Kenichi Yamahara^{1*}, Kazuhiko Harada², Makiko Ohshima¹, Shin Ishikane², Shunsuke Ohnishi³, Hidetoshi Tsuda¹, Kentaro Otani¹, Akihiko Taguchi⁴, Toshihiro Soma⁵, Hiroyasu Ogawa⁵, Shinji Katsuragi⁶, Jun Yoshimatsu⁶, Mariko Harada-Shiba^{1,7}, Kenji Kangawa², Tomoaki Ikeda^{1,6,8}

1 Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan, **2** Department of Biochemistry, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan, **3** Department of Gastroenterology and Hepatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Hokkaido, Japan, **4** Department of Regenerative Medicine Research, Institute of Biomedical Research and Innovation, Kobe, Hyogo, Japan, **5** Division of Hematology, Department of Internal Medicine, Hyogo Medical College, Nishinomiya, Hyogo, Japan, **6** Department of Perinatology, National Cerebral and Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan, **7** Department of Molecular Innovation in Lipidology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan, **8** Department of Obstetrics and Gynecology, Mie University School of Medicine, Tsu, Mie, Japan

Abstract

Although mesenchymal stem cells (MSCs) can be obtained from the fetal membrane (FM), little information is available regarding biological differences in MSCs derived from different layers of the FM or their therapeutic potential. Isolated MSCs from both amnion and chorion layers of FM showed similar morphological appearance, multipotency, and cell-surface antigen expression. Conditioned media obtained from amnion- and chorion-derived MSCs inhibited cell death caused by serum starvation or hypoxia in endothelial cells and cardiomyocytes. Amnion and chorion MSCs secreted significant amounts of angiogenic factors including HGF, IGF-1, VEGF, and bFGF, although differences in the cellular expression profile of these soluble factors were observed. Transplantation of human amnion or chorion MSCs significantly increased blood flow and capillary density in a murine hindlimb ischemia model. In addition, compared to human chorion MSCs, human amnion MSCs markedly reduced T-lymphocyte proliferation with the enhanced secretion of PGE₂, and improved the pathological situation of a mouse model of acute graft-versus-host disease. Our results highlight that human amnion- and chorion-derived MSCs, which showed differences in their soluble factor secretion and angiogenic/immuno-suppressive function, could be ideal cell sources for regenerative medicine.

Citation: Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, et al. (2014) Comparison of Angiogenic, Cytoprotective, and Immunosuppressive Properties of Human Amnion- and Chorion-Derived Mesenchymal Stem Cells. PLoS ONE 9(2): e88319. doi:10.1371/journal.pone.0088319

Editor: Atsushi Asakura, University of Minnesota Medical School, United States of America

Received: September 1, 2013; **Accepted:** January 6, 2014; **Published:** February 14, 2014

Copyright: © 2014 Yamahara et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by a Grants-in-Aid for Scientific Research, Japan Society for the Promotion of Science, and Health Labour Sciences Research Grant/Research grants for Cardiovascular Disease, The Ministry of Health Labour and Welfare. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: yamahara@ncvc.go.jp

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) residing within various tissues, including bone marrow [1] and adipose tissue [2], are reported to differentiate into various types of cells including osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes. This multipotency renders MSCs an attractive therapeutic source for regenerative medicine. However, because an invasive procedure is required to obtain autologous bone marrow or adipose tissue-derived MSCs, an alternative source of MSCs that can be obtained non-invasively is desirable.

Appendages of the fetus, which consist of the placenta, umbilical cord, and fetal membrane (FM), are normally discarded after delivery as medical waste. A large quantity of MSCs could be obtained without harm from the human FM because of its size (> 40×40 cm), which represents an advantageous characteristic as a source of cell therapy. We have previously reported the therapeutic potential of rat FM-derived MSCs using various rat

models including hindlimb ischemia, autoimmune myocarditis, glomerulonephritis, renal ischemia-reperfusion injury, and myocardial infarction [3–8]. Although the FM is composed of the amnion and chorion, and both layers contain MSCs [9], it is technically difficult to separate these membranes as well as their MSCs in rat.

Thus, the purposes of this study were: 1) to isolate and characterize MSCs from human amnion and chorion; 2) to examine their differences in the expression profile of growth factors and cytokines; and 3) to investigate the therapeutic potential and difference of these MSCs using murine hindlimb ischemia and acute graft-versus-host disease (GVHD) models.

Materials and Methods

Ethics Statement

The study protocol and informed consent procedure were approved by the ethics committee of the National Cerebral and

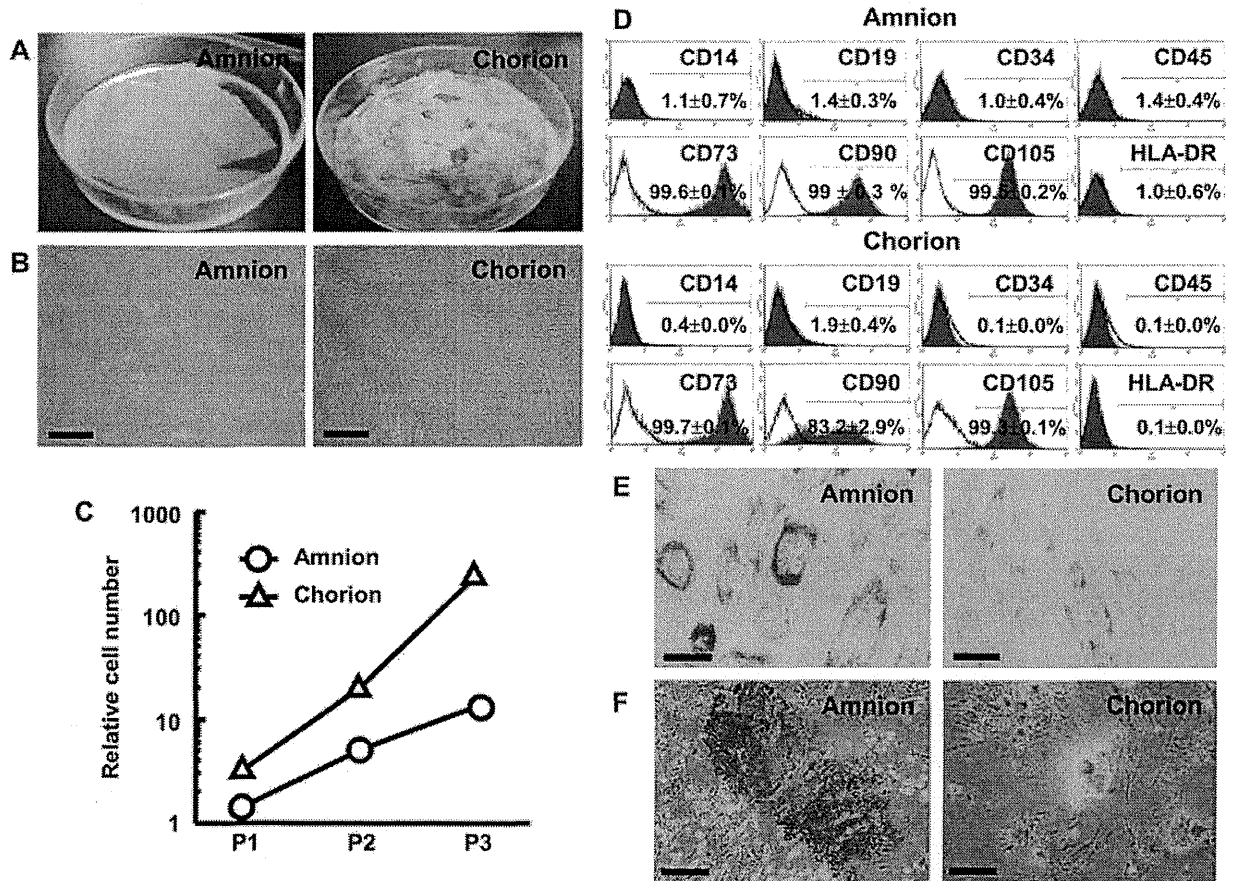


Figure 1. Characterization of human amnion- and chorion-derived MSCs. (A) Representative photographs of human amnion and chorion. (B) Photographs of cultured MSCs obtained from human amnion and chorion at passage 3. Scale bars = 500 μ m. (C) Relative cell number of amnion- and chorion-derived MSCs at each passage. (D) FACS analysis of amnion and chorion MSCs. (E, F) Differentiation of amnion and chorion MSCs into adipocytes (E) and osteocytes (F). Scale bars = 100 (E) and 50 (F) μ m. doi:10.1371/journal.pone.0088319.g001

Cardiovascular Center (Permit Number: M18-042-4). Animal protocols were approved by the Animal Care Committee of the National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute (Permit Number: 13052). Animal studies were conducted in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. All animal surgery was performed under sodium pentobarbital anesthesia and all efforts were made to minimize suffering.

Isolation and Expansion of Amnion- and Chorion-derived MSCs from Human FMs

After obtaining written informed consent, FMs were obtained following cesarean section of healthy donor mothers. Amnion and chorion were separated by mechanical peeling of the FM, and digested with type-II collagenase solution (5 ml/g tissue and 300 U collagenase/mL, Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ) for 1 h at 37°C in a waterbath shaker. After filtration with a mesh filter, cells were suspended in α -minimal essential medium (α -MEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Hyclone, Logan, UT), 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (Invitrogen), and incubated at 37°C with

5% CO₂ after plating on a dish. The adherent, spindle-shaped MSCs developed visible symmetric colonies by days 1 to 2.

Characterization of Human Amnion and Chorion MSCs

For defining FM-MSCs, we referred to the criteria proposed by the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy [10].

Cultured MSCs were analyzed by FACSCalibur (BD Biosciences). Cells were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal against human CD14 (clone M5E2), CD19 (clone HIB19), CD34 (clone 581), CD45 (clone HI30), CD73 (clone AD2), CD90 (clone 5E10), CD105 (clone 266), or HLA-DR (clone G46-6 (L243)), all purchased from BD Biosciences. Isotype identical antibodies served as controls.

To induce differentiation into osteocytes, MSCs were cultured in α -MEM with MSC osteogenesis supplements (Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka, Japan) according to the manufacturer's instructions. After 14–17 days of differentiation, cells were fixed and stained with Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

To induce adipocyte differentiation, MSCs were cultured with adipocyte differentiation medium: 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-

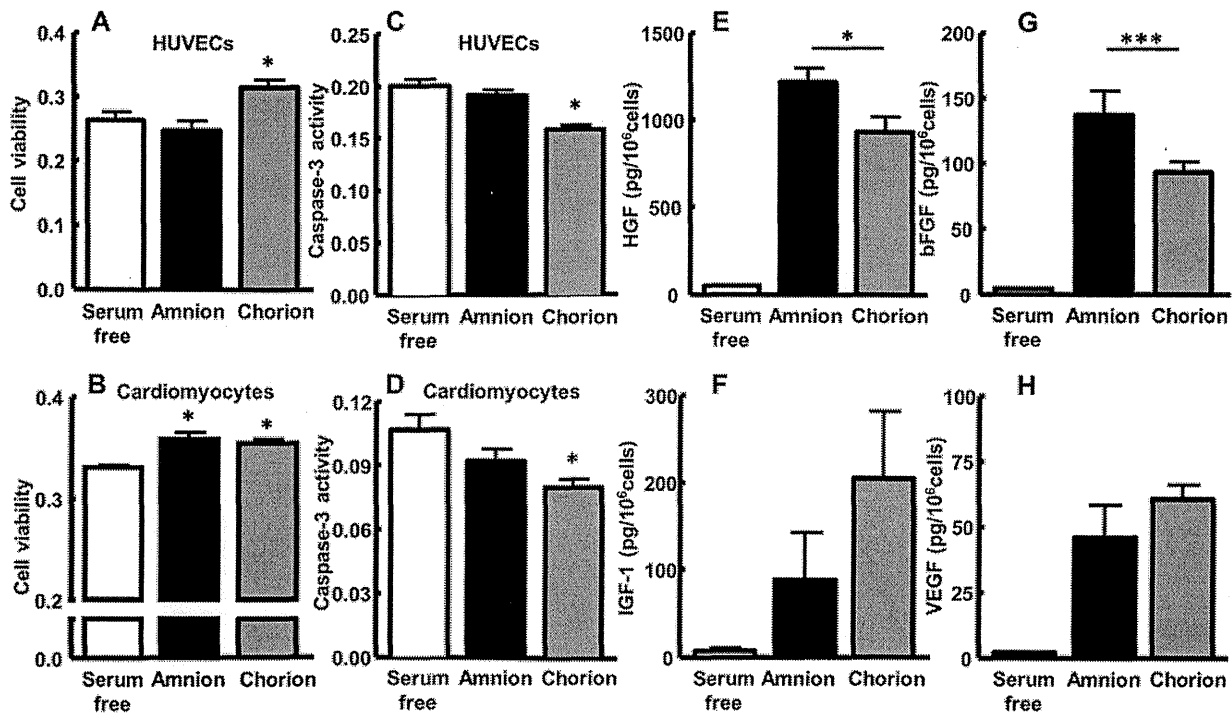


Figure 2. Growth factor secretion and the cytoprotective effect of amnion and chorion MSCs. (A–D) Cytoprotective effect of FM MSC-derived conditioned medium was analyzed by the MTS assay (A, B) and caspase-3 activity (C, D) in HUVECs (A, C) and cardiomyocytes (B, D). Values are mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. serum-free. (E–H) Conditioned medium obtained from FM-derived MSCs was collected after incubation for 24 h. The concentration of HGF (E), IGF-1 (F), bFGF (G), and VEGF (H) in serum free conditioned medium was measured by ELISA. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0088319.g002

xanthine (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), 1 μ M dexamethasone (Wako), 50 μ M indomethacin (Wako), and 10 μ g/mL insulin (Sigma-Aldrich) in α -MEM supplemented with 10% FCS. After 21 days of differentiation, adipocytes were stained with Oil Red O (Sigma-Aldrich).

Conditioned Medium Analysis of FM-MSC-associated Cytoprotective Function

Human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs; Lonza, Basel, Switzerland) were seeded onto a collagen-coated plate and incubated in medium 199 (Invitrogen) supplemented with 20% FCS for 24 h. Neonatal rat cardiomyocytes were isolated from Lewis rats on postnatal day 1, as described previously [11], and seeded onto a laminin-coated plate followed by incubation in α -MEM supplemented with 10% FCS for 24 h. Cells were then subjected to serum deprivation with/without hypoxia (1% O₂) by culturing with serum-free medium or serum-free conditioned medium obtained from FM-MSCs cultured for 24 h. The cellular level of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS), indicative of cell viability, as well as caspase-3 activity, was measured with a CellTiter96 AQueous One Solution Kit (Promega, Madison, WI) and a CaspACE™ Assay System Kit (Promega), according to the manufacturer's instructions.

Analysis of FM-MSC Production of Growth Factors and Prostaglandin E2

Conditioned media were collected from MSCs cultured in α -MEM with/without 10% FCS for 24 h ($n = 4-6$). The concentra-

tions of the following growth factors were measured using ELISA kits: hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and prostaglandin E2 (PGE2), according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN).

FM-MSC Transplantation in the Hindlimb Ischemia Model

Six-week-old male KSN nude mice were anesthetized with pentobarbital, and the right common iliac artery was resected. After surgery, amnion MSCs (1×10^6 cells/50 μ L PBS), chorion MSCs (1×10^6 cells/50 μ L PBS), or PBS (50 μ L PBS) was injected into the ischemic muscle with a 30-gauge needle at five different sites ($n = 15$ in each group). A laser Doppler perfusion image (LDPI) analyzer (Moor Instruments, Devon, UK) was used to measure serial hindlimb blood flow for 7 days, as previously described [12].

Five and seven days after MSC transplantation, ischemic hindlimb tissues were obtained and snap-frozen. Frozen tissue sections were stained with anti-mouse CD31 antibody (BD Biosciences) to detect capillary endothelial cells. Ten fields were randomly selected to count the number of capillaries. The adjusted capillary number per muscle fiber was used to compare the differences in capillary density between the three groups.

In vitro CD4+ T cell Proliferation Assay

Peripheral blood mononuclear cells were prepared from buffy coats obtained from healthy donors by centrifugation through Ficoll-Paque (GE healthcare, Uppsala, Sweden). CD4+ T cells were isolated by magnetic bead depletion of CD8, CD14+,

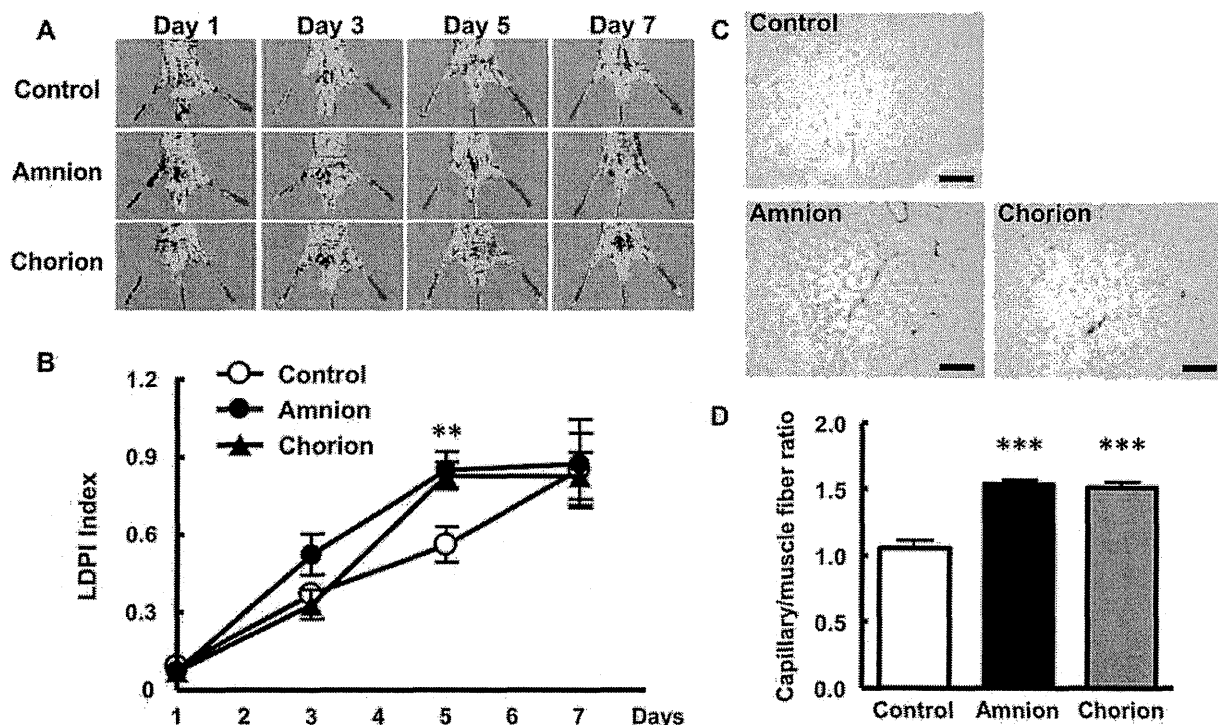


Figure 3. Angiogenic potential of amnion and chorion MSCs against hindlimb ischemia. (A) Representative images of serial hindlimb blood perfusion. Blood perfusion of ischemic hindlimb increased in the amnion and chorion MSC groups at day 5. (B) Quantitative analysis of hindlimb blood perfusion with the LDPI index, the ratio of ischemic to non-ischemic hindlimb blood perfusion. (C) Representative photographs of immunohistochemistry with anti-CD31 antibody. Scale bars = 100 μ m. (D) Quantitative analysis of capillary density in ischemic hindlimb muscle at day 5 among the control, amnion, and chorion MSC groups. Capillary density is shown as the capillary-to-muscle-fiber ratio. Data are mean \pm SEM. ** p <0.01 and *** p <0.001 vs. control. doi:10.1371/journal.pone.0088319.g003

CD15+, CD16+, CD19+, CD36+, CD56+, CD123+, T cell receptor-gamma/delta, and glycoprotein A-positive cells (CD4+ T Cell Isolation Kit) on an AutoMACS instrument (Miltenyi Biotec). CD4+ T cells (5×10^5 cells/well) were cultured with X-VIVO medium (Lonza, Walkersville, MD) containing 2% FBS and 5 μ g/ml anti-CD28 antibody (clone CD28.2, BioLegend, San Diego, CA) in anti-CD3-precoated 24-well culture plates (clone OKT3, BioLegend). During in vitro proliferation of CD4+ T cells, human amnion-, chorion-, or bone marrow-derived (Lonza) MSCs were co-cultured at 5×10^4 cells/well. After 5 days of co-culturing, T cells were separated from the monolayer MSCs and counted with an automated cell counter (Countess, Invitrogen).

FM-MSC Transplantation into the Acute GVHD Model

Seven- to eight-week-old female B6C3F1 (recipient; C57BL/6 \times C3H/He; H-2^{b/h}) and BDF1 (donor; C57BL/6 \times DBA/2; H-2^{b/d}) mice were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan). Recipient mice were lethally irradiated with 15 Gy total body irradiation (TBI; X-ray) split into two doses separated by 2 h. On the following day, donor-derived cells (1×10^7 bone marrow cells and 3×10^7 spleen cells) were suspended in 0.2 mL RPMI-1640 medium (Invitrogen) and transplanted via the tail vein into the post-irradiation recipient mice. On days 14, 17, 21, and 25 after hematopoietic stem cell transplantation, 1×10^5 amnion or chorion MSCs in 0.1 mL RPMI medium were transplanted via the tail vein. In the control group, the same amount of RPMI was infused

via the tail vein. The severity of GVHD was evaluated by measuring the body weight of mice.

Statistical Analysis

All values are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M). Comparisons of parameters for more than three groups were made by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls' test. Comparisons of the time-course of the LDPI index were made by two-way ANOVA for repeated measures, followed by Bonferroni tests. A p value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Characterization of Amnion and Chorion MSCs

From each human FM, 23.5 ± 3.7 g amnion and 37.6 ± 2.5 g chorion could be separated ($n=5$ and $n=3$, respectively) (Figure 1A). By enzymatic digestion, over one million cells per gram of the amnion ($1.9 \pm 0.2 \times 10^6$ /g, $n=5$) or chorion ($1.3 \pm 0.3 \times 10^7$ /g, $n=3$) were obtained. At passage 3, cultured cells from both layers were fibroblast-like, spindle-shaped cells, and there was no difference in morphology according to the origin of layers (Figure 1B). Cell-doubling time of amnion MSCs (32.2 ± 1.13 h) was equal to that of chorion MSCs (34.1 ± 1.94 h) (Figure 1C).

Both amnion- and chorion-derived MSCs expressed CD73, CD90, and CD105, but not CD14, CD19, CD34, CD45, or HLA-