

201335006A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

(再生医療関係研究分野)

「再生アソシエイト細胞による iPS 細胞移植時の免疫寛容治療研究」

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 浅原 孝之

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

「再生アソシエイト細胞による iPS 細胞移植時の免疫寛容治療研究」に関する研究総括
浅原 孝之（東海大学医学部 基盤診療学系 再生医療科学）

II. 分担研究報告

1. 「再生アソシエイト細胞培養開発」に関する研究

増田 治史（東海大学医学部 基盤診療学系 再生医療科学）・・・5

2. 「再生アソシエイト細胞の免疫寛容」に関する研究

福嶋 五月（大阪大学医学部 循環器外科）・・・・・・・・・・15

3. 「臨床再生アソシエイト細胞」に関する研究

田中 里佳（順天堂大学医学部 形成外科学）・・・・・・・・・・20

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・23

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I . 総括研究報告

「再生アソシエイト細胞による iPS 細胞移植時の免疫寛容治療研究」

研究代表者 浅原 孝之 (東海大学医学部 基盤診療学系 再生医療科学 教授)

研究要旨: 再生アソシエイト細胞の免疫寛容効果を確認・最適化し、iPS 細胞由来組織移植時における再生環境治療法を開発し、iPS 細胞由来心筋細胞シート (拠点大阪大学: 澤グループ) 治療への応用を目指すプロジェクトである。東海大学・大阪大学・順天堂大学それぞれの研究進捗を調整し、製品再生アソシエイト細胞を用いた前臨床研究を目標とする。

本年度の大きな目標である、ヒト・マウス再生アソシエイト細胞培養法およびその評価法の再現性確立の点においては、目標は達成された。同種同系移植実験では、マウス再生アソシエイト細胞の血管再生・抗炎症効果は確認されつつあり、同種異系移植へと展開して、iPS 細胞移植実験に繋げていく予定である。

研究分担者名

増田治史 (東海大学医学部基盤診療学系 再生医療科学 准教授)

福嶋五月 (大阪大学医学部心臓血管外科 助教)

田中里佳 (順天堂大学医学部形成外科学 准教授)

培養法・評価法を項目化・文章化し、他大学の培養に対する指導を、班会議・メール・電話により進めた。

(A-2) 同種同系移植試験: マウス下肢虚血モデルへの同種同系マウス再生アソシエイト細胞移植実験を進めた。

(B) 大阪大学

(B-1) マウス・ヒト再生アソシエイト細胞の培養・評価法の確立: 東海大学からの情報を元に、マウス・ヒト再生アソシエイト細胞の培養を試み、その確認を進めた。免疫寛容作用の *in vitro* 評価法として、マウス脾臓からのリンパ球を採取しリンパ球混合培養試験を試みた。

(B-2) 同種同系移植試験: 実験系確立のために、マウス心筋梗塞モデル作製実験を行った。

(C) 順天堂大学

(C-1) マウス・ヒト再生アソシエイト細胞の培養・評価法の確立: ヒト再生アソシエイト細胞は確立しているので、マウス再生アソシエイト細胞の培養を試み、その確認を進めた。マウス再生アソシエイト細胞の EPC コロニーアッセイ・FACS 解析を進めた。

(C-2) 同種同系移植試験: 実験系確立のため、健常マウス(C57BL6J)と糖尿病マウス(db/db)に潰瘍を作成し、組織評価による局所 M1/M2 細胞活性・血管新生を解析した。

A. 研究目的

H25 年度は、東海大学・大阪大学・順天堂大学各施設でのヒト再生アソシエイト細胞・マウス再生アソシエイト細胞の培養・評価法の統一化を進めると、本プロジェクトでの評価実験系の確率を中心として、各分担研究を本格化させることが目標である。

B. 研究方法**1. 課題①: 再生アソシエイト細胞移植の免疫寛容研究**

(1) 再生アソシエイト細胞の獲得免疫反応に対する免疫寛容効果の *in vitro* 研究

(2) 再生アソシエイト細胞 (同種同系) 移植実験

上記両課題のために以下研究が進められている。

(A) 東海大学

(A-1) マウス・ヒト再生アソシエイト細胞の培養・評価法の確立とその技術指導: それぞれの

2. 課題②：iPS 組織移植のための再生アソシエイト細胞免疫寛容研究

該当無し

3. 課題③：再生アソシエイト細胞基盤・応用研究

(1) 再生アソシエイト細胞免疫寛容メカニズムの最適化研究

東海大学において、再生アソシエイト細胞免疫寛容メカニズム基盤研究の為に、ヒト再生アソシエイト細胞の評価法を確立し、免疫寛容の最適化に関しての候補因子とその組み合わせなど調査・検討を開始した。

(2) 臨床再生アソシエイト細胞培養開発
臨床検体測定を開始が目標である。ヒト再生アソシエイト細胞評価研究がほぼ終了したことで、臨床再生アソシエイト細胞培養確立のための培養データを蓄積するため、順天堂大学および東海大学における糖尿病患者・動脈硬化患者検体での解析を開始した。

(倫理面の配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成18年厚生労働省告示第425号）、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守した。動物実験は、各施設の実験動物委員会承認のもと動物愛護法を遵守、臨床研究については各施設臨床研究委員会の承認のもとに実施している。

C.研究結果

1. 課題①：再生アソシエイト細胞移植の免疫寛容研究

(1) 再生アソシエイト細胞の獲得免疫反応に対する免疫寛容効果の *in vitro* 研究

(2) 再生アソシエイト細胞（同種同系）移植実験

(A)東海大学

(A-1) マウス・ヒト再生アソシエイト細胞の培養・評価法の確立とその技術指導：東海大学増田はマウス・ヒト再生アソシエイト細胞の培養・評価法の標準化プロトコールを記述し、計2回の班会議（第一回：2013年10月15日東海大学、第二回：2014年3月5日京都国際会館）および各施設との連絡を重ね、大阪大学・順天堂大学にて再現性のあるマウス・ヒト再生アソシエイト細胞の培養・評価法の標準化の向上が確認された。

(A-2) 同種同系移植試験：マウス下肢虚血モデルへの同種同系マウス再生アソシエイト細胞移植実験を行い、毛細血管増加・末梢循環増加などの血管再生効果、iNOS 発現現象などの抗炎症効果の確認が終了した。免疫寛容効果について検証中である。

(B) 大阪大学

(B-1) マウス・ヒト再生アソシエイト細胞培養：培養細胞群の免疫寛容作用 *in vitro* 評価法としてのリンパ球混合培養試験を開始した。現時点では実験系の調整中で、免疫寛容作用の程度などの確認はまだできてはいない。

(B-2) 同種同系移植試験の実験系確立ために、マウス心筋梗塞モデルを作成し移植試験を開始した。モデルの成功率がまだ低いため、モデル作成技術の確立に努めている。

(C) 順天堂大学

(C-1) マウス再生アソシエイト細胞の培養：東海大学からのプロトコールに従い。マウス再生アソシエイト細胞を培養したところ、EPC コロ

ニー形成細胞の増加を確認し、培養の再現性を確認できた。

(C-2) 同種同系移植試験の実験系確立：健常マウス(C57BL6J)と糖尿病マウス(db/db)に潰瘍を作成し、組織学的に確認したところ、健常マウスでは炎症性マクロファージ (M1) は D1 に上昇してから減少し、抗炎症マクロファージ (M2) は D7.10 で増加するが、DM マウスでは M1 上昇が遷延化し、M2 の増加が抑制されていることが判明した。

2. 課題②：iPS 組織移植のための再生アソシエイト細胞免疫寛容研究
該当無し。

3. 課題③：再生アソシエイト細胞基盤・応用研究

(1) 再生アソシエイト細胞免疫寛容メカニズムの最適化研究

東海大学：再生アソシエイト細胞免疫寛容メカニズム基盤研究：ヒト再生アソシエイト細胞の血管再生作用・抗炎症作用を *in vitro* および *in vivo* 実験で確認した。このデータは *Journal of American Heart Association* に投稿し受理されている。この細胞群の免疫寛容作用も制御性 T 細胞の増幅、Th2 細胞の増幅から、強く示唆されるデータが出ている。

(2) 臨床再生アソシエイト細胞培養開発
順天堂大学では、DM 患者において再生アソシエイト細胞は EPC、M2 マクロファージ数を約 10 倍に増幅し、EPC コロニーアッセイと RT-PCR においても抗炎症効果・血管再生能を示すデータが確認された。その細胞移植実験では、DM 再生アソシエイト細胞移植群において高い創傷治癒効果と組織内血管再生効果が示された。

東海大学では、脳血管障害患者を対象とした臨床サンプルの再生アソシエイト細胞培養が試みられているが、まだ進行中である。

D. 考察

本年度の大きな目標である、ヒト・マウス再生アソシエイト細胞培養法およびその評価法の再現性を全施設で確立する点において、ほとんどが達成されたと考える。各施設での再現性達成は、本技術の信頼性を示すもので、この細胞群の移植実験に進めることが可能になる。

移植実験は、同種同系実験が進行中で、東海大学での下肢虚血モデル実験は完成し、潰瘍モデル・心筋虚血モデルでの移植実験を開始するところである。同種同系移植では、血管再生・抗炎症作用しか評価が出来ないが、この実験系終了後に進める同種異系移植にて *in vivo* での免疫寛容作用を評価することになる。

ヒト再生アソシエイト細胞培養法、および免疫寛容作用評価法の確立に伴い、免疫寛容作用を強化する培養法に着手し始めている。

臨床血液での再生アソシエイト細胞培養における不安定性を危惧しているが、現時点では糖尿病患者での培養法は効果が確認されており、さらに臨床研究を進める予定である。

E. 結論

ヒト・マウス再生アソシエイト細胞培養法およびその評価法の再現性確立の点においては、目標は達成された。同種同系移植実験では、マウス再生アソシエイト細胞の血管再生・抗炎症効果は確認されつつあり、同種異系移植へと展開して、iPS 細胞移植実験に繋げていく予定である。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1 論文発表

1. Masuda H, Asahara T et al. Vasculogenic Conditioning of Peripheral Blood

Mononuclear Cells Promotes Endothelial Progenitor Cell Expansion and Phenotype Transition of Anti-inflammatory Macrophage and T Lymphocyte to Cells with Regenerative Potential. Journal of American Heart Association. 2014.(in press)

2. Tanaka R, Masuda H, Asahara T, et al. Autologous G-CSF-mobilized peripheral blood CD34+ cell therapy for diabetic patients with chronic nonhealing ulcer. Cell transplantation. 2014;23:167-179.

3. Tsukada S, Masuda H, Asahara T. et al. Identification of mouse colony-forming endothelial progenitor cells for postnatal neovascularization: a novel insight highlighted by new mouse colony-forming assay. Stem cell research & therapy. 2013;4:20

4. Tanaka R, Masuda H, Asahara T. et al. Quality-control culture system restores diabetic endothelial progenitor cell vasculogenesis and accelerates wound closure. Diabetes. 2013;62:3207-3217.

5. Masuda H, Asahara T. Clonogenic assay of endothelial progenitor cells. Trends in cardiovascular medicine. 2013;23:99-103.

6. Kamata S, Asahara T, Sawa Y. et al. Improvement of cardiac stem cell-sheet therapy for chronic ischemic injury by adding endothelial progenitor cell transplantation: Analysis of layer-specific regional cardiac function. Cell Transplant. 2013

PCT出願番号：PCT/JP2013/76618

国際出願日：2013年9月30日（基礎出願日：2012年9月28日）

発明者：浅原孝之、増田治史、田中里佳

H.知的財産権の出願・登録状況

特願第 2012-218206 号「血管内皮前駆細胞を含む細胞群の生体外増幅方法」

基礎出願の番号：特願 2012-218206

II. 分担研究報告

「再生アソシエイト細胞による iPS 細胞移植時の免疫寛容治療研究」

研究分担者 増田 治史 (東海大学医学部 基盤診療学系 再生医療科学 准教授)

研究要旨：ヒト、マウスの末梢血単核球を用いて、近年、本研究室で開発した血管再生培養法による再生アソシエイト細胞(Regeneration Associate Cell= RAC)の作成に成功した。マウス下肢虚血モデルへの移植実験を用いて抗炎症、血管再生能を確認した。また、同種異型のヒト末梢血単核球と RAC の混合培養によるリンパ球混合試験において RAC の抗炎症・免疫寛容能を確認した。次年度以降は、1) 培養条件の至適化を行い、より安定した抗炎症・免疫寛容能獲得可能な RAC 培養法を確立、2) ヒト及びマウスにおける同種異型の RAC の抗炎症・免疫寛容能の in vitro 評価系確立を目標に研究を実施する。

A.研究目的

近年開発した血管再生培養法の純化 EPC の生体外機能性 EPC 増幅培養法 (Quality & Quantity 培養法= QQc 培養) を、EPC を含有するヒト及びマウスの末梢血液細胞群 (単核球) の QQc 培養に発展させ、その血管再生能、組織再生を検討し、QQ 単核球の組織再生、抗炎症能を確認し、再生アソシエイト細胞 (Regeneration Associate Cell= RAC) としての可能性を検証、さらに、RAC の免疫寛容能評価系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1) 健康人より末梢血単核球 (PBMC) を採取し、その QQc 培養細胞を再生アソシエイト細胞 (RAC) とした。血液 20 mL より末梢血単核球を採取し、Stem line II 無血清造血幹細胞増幅培地にヒト遺伝子組み換え VEGF, SCF, TPO, IL-6, Flt-3 ligand を添加し、7 日間培養し RAC 細胞を調整した。in vitro RAC 特性評価系として、EPC コロニーアッセイ、FACS を実施した。

2) Balb/c ノードマウスを用いて重症下肢虚血モデルを作成し、末梢血単核球、培養 EPC、G-CSF 動員 CD34+細胞との比較において RA 細胞を移植した。血流改善能 (レーザードップラー血流測定)、組織学的血管再生能 (共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いた isolectin B4-FITC 染色によるマウス新生血

管密度、Alexa594 標識抗ヒト CD31 抗体を用いた免疫組織化学染色によるヒト移植細胞分化による形成血管密度評価)、抗炎症能 (iNOS 抗体を用いた免疫組織化学染色による陽性領域占有率評価) の評価を実施した。

3) ヒト RAC 細胞と同様に、雄 C57BL6/J マウスの末梢血単核球 (PBMC) を採取し、前述のマウス遺伝子組み換え因子を添加した Stem Line II 培地を用いて RAC 細胞を 5 日間培養調整した。雄 C57BL6/J マウスに重症下肢虚血モデルを作成し、PBMC 及び RAC を移植の血管再生能 (isolectin B4-FITC 染色によるマウス新生血管密度)、抗炎症能 (iNOS 抗体を用いた免疫組織化学染色による陽性領域占有率評価) を評価した。

3) RA 細胞の抗炎症・免疫寛容能の in vitro assay 評価系を確立することを目的として、同種異型ヒト末梢血単核球の混合培養系による in vitro リンパ球混合試験 (MLR) を実施した。異なる健康人から採取した末梢血単核球及び RAC を調整し、10%FBS・RPMI1640 を用いて 5 日間培養し、この cytometric bead assay (CBA) による培養上清中の炎症生及び抗炎症生サイトカインを定量した。

(倫理面の配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、疫学研究に関する倫理指針 (平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示

第1号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年厚生労働省告示第425号)、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守した。

また、動物実験は、東海大学実験動物委員会承認のもと動物愛護法を遵守した。また、ボランティアからの単核球採取については東海大学臨床研究委員会の承認のもとインフォームドコンセントを受け実施した。

C.研究結果

1) RACの血管再生能の評価;

EPC-CFAを用いた血管再生能のin vitro評価において、RACはPBMNCに比較して血管再生能の高いEPCコロニーの産生促進(18.9倍)が認められた(図1※以下、別添図表一覧参照)。未分化EPCの増幅(6.0倍)及び抗炎症・血管再生性・組織再生性血液細胞群(M2マクロファージ、制御性T細胞の増幅:4.95倍、5.82倍)が認められた(図2)。

また、単核球及びそのQQc培養細胞の血管再生能、抗炎症能を下肢虚血モデルへの移植によるin vivo assay系により検討した。50 mL末梢血相当から獲得した細胞数相当(1×10^4 個/匹)を患部に移植した。PBMNC移植群との比較において、RAC移植群は血流改善効果、血管再生能、抗炎症能の増強が確認された(図3)。

さらに、従来の培養EPC移植群、G-CSF動員CD34細胞移植群との比較においても、G-CSF動員CD34細胞移植群と同等以上の効果が確認された(図4)。

共焦点レーザー顕微鏡による組織学的血管再生能を評価した。血管再生能(マウス宿主の血管新生促進能及び移植細胞に含有されるEPCの血管内皮細胞への分化による血管形成能)は、PBMNC移植群に比較してRAC移植群において高く(図5)、また、従来の培養EPC移植群、G-CSF動員CD34細胞移植群との比較においても、G-CSF動員CD34細胞移植群と同等以上の血管再生促進効果が確認された(図6)。

2) 抗炎症能の評価;

iNOS免疫組織化学染色による評価において、RAC移植群は、PBMNC移植群以上の組織炎症抑制効果が認められた(図7)。また、従来の培養EPC移植群、G-CSF動員CD34細胞移植群の組織再生性血液細胞移植群との比較においても、G-CSF動員CD34細胞移植群と同等以上の組織炎症抑制効果が認められた(図8)。

3) 免疫寛容能評価系確立に向けて;

ヒトPBMNC及びRACのリンパ球混合培養試験において、同種異型のPBMNCの混合培養は同種同型のPBMNCの混合培養に比較して、炎症性サイトカイン(IL-1 α 、TNF α)の産生亢進を認めた。一方、同種異型のPBMNC及びRACの混合培養では、細胞数の増加、炎症性サイトカイン(TNF α)の低下とともに抗炎症性サイトカイン(IL-10)の著しい上昇を認めた。これは、同種異型のPBMNC混合培養系では免疫拒絶反応による炎症が惹起されたこと、同種異型のPBMNCと $\alpha\alpha$ 混合培養では、この免疫拒絶反応による炎症が抑制されたこと、すなわち $\alpha\alpha$ においては抗炎症・免疫寛容能が獲得されていることを意味する(図9)。

4) マウス $\alpha\alpha$ 調整法の確立に向けて;

ヒトと同様に、マウスにおいても血管再生能、抗炎症能を有するRACの調整が可能か否かを検討した。ヒトと同様のマウス遺伝子組み換えサイトカインを添加したStem Line II培地を用いてC57BL6/JマウスPBMNCを5日間培養し

た。培養細胞を C57BL6/J マウスに移植し、血流改善効果を評価したところ、移植細胞数依存性に血流改善効果が認められた (図 10)。また、組織学的評価において、RAC 移植群において微小血管密度の上昇及び壁細胞裏打ち成熟血管密度の上昇を認め、微小血管及び成熟血管形成促進による血管再生能促進効果が認められた (図 11)。また、iNOS 抗体を用いた免疫組織化学的染色においても PBMNC 移植群に比較して組織炎症抑制効果が認められた (図 12)。

D. 考察

1) QQ 培養による末梢血単核球からの RAC 調整は簡便であり、その移植療法は、患者の身体的負担が少ない簡便な抗炎症効果を有する血管再生・組織再生療法として実用性に優れ、脳梗塞、心筋梗塞などの広汎な循環器系疾患に対する応用が期待される。

2) さらに、リンパ球混合試験のサイトカイン定量結果から、同種異型の PBMNC と RAC の反応による抗炎症及び免疫寛容担当細胞の増幅、すなわち、RAC の免疫寛容促進効果が示唆された。RAC の免疫寛容能の臨床応用に向けた当該研究課題に沿った今後の研究の基盤研究成果として意義がある。

3) マウスにおいても血管・組織再生能を有する RAC の調整が可能であることが判明し、in vivo におけるマウスを用いた免疫寛容能の証明研究の基盤研究成果として意義がある。

E. 結論

ヒト及びマウスの PBMNC から QQ 培養により RAC を作成することに成功した。RAC は血管再生、抗炎症能を獲得することを証明した。さらに、ヒト RAC において、免疫寛容能を獲得することを示した。以上、本研究課題の基盤研究を実施し、上述のように順調に成果が得られた。

次年度以降、1) 培養液添加因子の選別、培養器具などの改変を行い、より安定した抗炎症・免疫寛容能獲得可能な RAC 培養法を確立、2) 同種異型のヒト末梢血単核球、RAC 細胞の抗炎症・免疫寛容能の in vitro 評価系を確立、3) さらに、マウスにおいても、同様の RAC 培養法及び抗炎症・免疫寛容能の in vitro 評価系を確立する。4) マウス同種異型の皮膚移植モデルを用いて、RAC の免疫寛容能を in vivo にて証明する。

本研究計画の成果が得られた暁には、iPS 細胞や細胞シート移植における RAC 併用療法の効果評価系及びこれらの併用移植治療法開発に繋がり、iPS 細胞や細胞シート移植治療効果向上に寄与することが期待される。今後、これらの臨床応用の可能性を探索・発展させていく予定である。

F. 研究発表

1 論文発表

1. Masuda H, Asahara T et al. Vasculogenic Conditioning of Peripheral Blood Mononuclear Cells Promotes Endothelial Progenitor Cell Expansion and Phenotype Transition of Anti-inflammatory Macrophage and T Lymphocyte to Cells with Regenerative Potential. *Journal of American Heart Association*. 2014.(in press)
2. Tanaka R, Masuda H, Kato S, Imagawa K, Kanabuchi K, Nakashioya C, Yoshida F, Fukui T, Ito R, Kobori M, Wada M, Asahara T, Miyasaka M. Autologous G-CSF-mobilized peripheral blood CD34+ cell therapy for diabetic patients with chronic nonhealing ulcer. *Cell transplantation*. 2014;23:167-179.
3. Tsukada S, Kwon SM, Matsuda T, Jung SY, Lee JH, Lee SH, Masuda H, Asahara T. Identification of mouse colony-forming

endothelial progenitor cells for postnatal neovascularization: a novel insight highlighted by new mouse colony-forming assay. *Stem cell research & therapy*. 2013;4:20.

4. Tanaka R, Vaynrub M, Masuda H, Ito R, Kobori M, Miyasaka M, Mizuno H, Warren SM, Asahara T. Quality-control culture system restores diabetic endothelial progenitor cell vasculogenesis and accelerates wound closure. *Diabetes*. 2013;62:3207-3217.

5. Masuda H, Asahara T. Clonogenic assay of endothelial progenitor cells. *Trends in cardiovascular medicine*. 2013;23:99-103.

2 学会発表

1. 第78回日本循環器学会(2014年3月21-23日、東京) ; Vasculogenic Culture of Blood Mononuclear Cell Enhances Regenerative and Anti-inflammatory Potential

2. 第13回日本再生医療学会(2014年3月4-6日、京都) ; Vasculogenic Culture of Blood Mononuclear Cell Enhances Regenerative and Anti-inflammatory Potential

3. 第11回回国際幹細胞学会(ISSCR) (2013年6月12-15日、ボストン) ; Establishment of Serum-Free Culture System of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Potentiate Vascular Regeneration.

G.知的財産権の出願・登録状況

1.PCT出願番号：PCT/J P 2 0 1 3 / 7
6 6 1 8

国際出願日：2013年9月30日（基礎出願日：2012年9月28日）

発明者：浅原孝之、増田治史、田中里佳

2.特願第2012-218206号「血管内皮前駆細胞を含む細胞群の生体外増幅方法」

基礎出願の番号：特願2012-218206

別添図表一覧

図 1 :

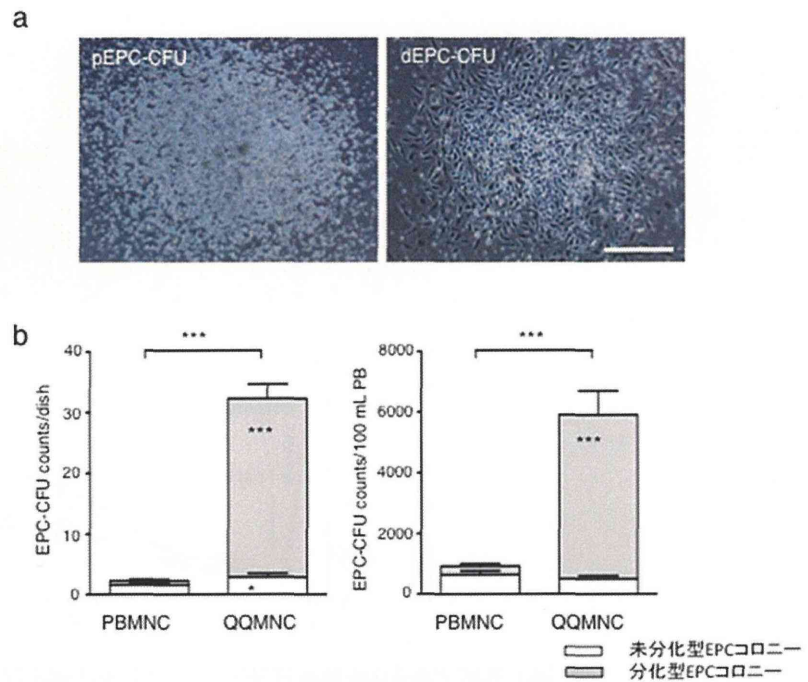


図1; QMNCとPBMNCの血管再生能の比較。

a) 未分化型EPCコロニー(pEPC-CFU)及び分化型EPCコロニー(dEPC-CFU)の写真。スケール100 μ m。b) EPCコロニーアッセイにより、QMNCは機能性分化型のコロニー形成性EPCの増幅を認める。

図 2 :

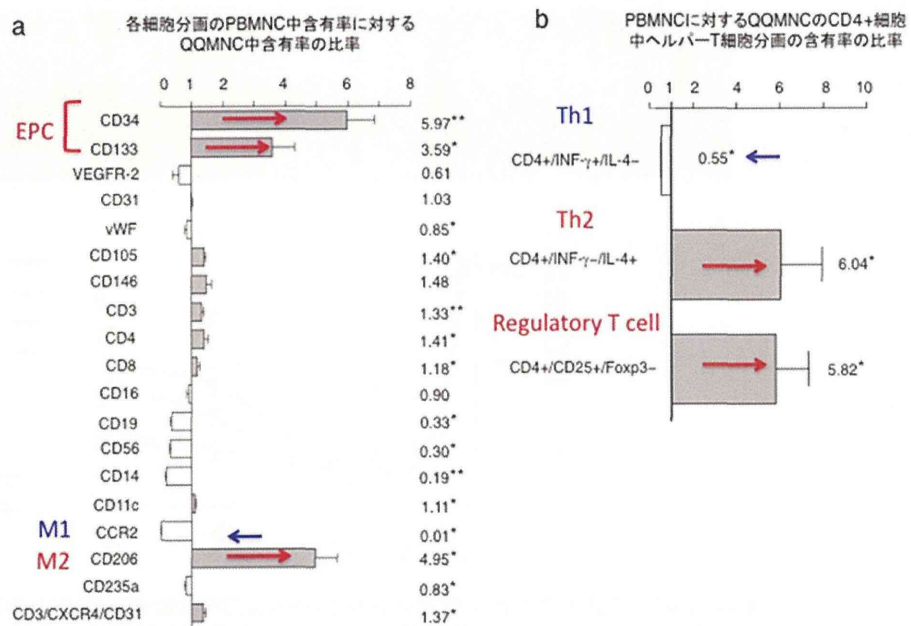


図2: QMNCのPBMNCに対する含有細胞分面のflow cytometryによる比較。

EPCの増幅、炎症性マクロファージ(M1)の減少、抗炎症性・組織再生性マクロファージ(M2)の増幅、炎症性ヘルパーT細胞(Th1)の減少、抗炎症性・組織再生性ヘルパーT細胞(Th2、regulatory T)の増幅を認めた。

図 3 :

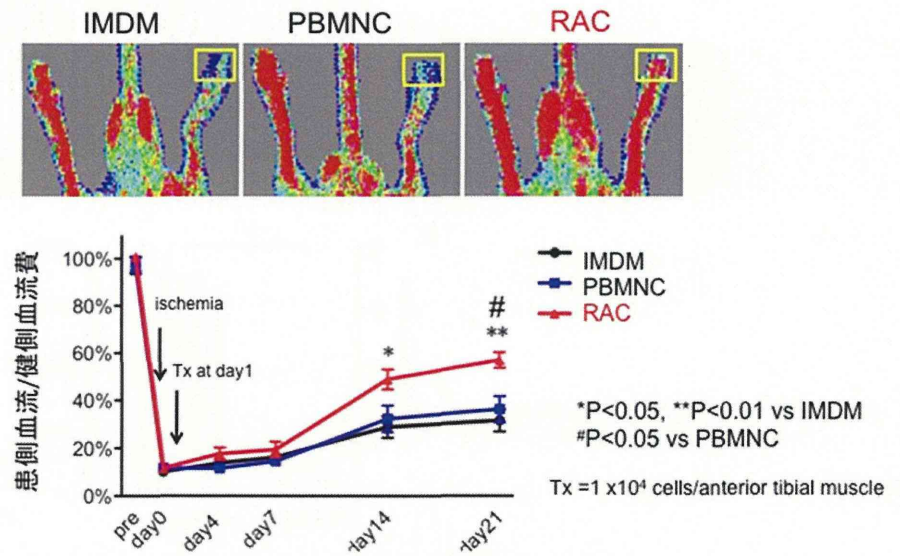


図3. RACと末梢血単核球群移植における虚血下肢血流改善効果の比較。レーザードップラー血流比測定結果を示す。IMDM; 非細胞移植群、PBMNC; 末梢血単核球移植群、下肢虚血作成21日、 1×10^4 個/下腿筋肉内移植後20日。

図 4 :

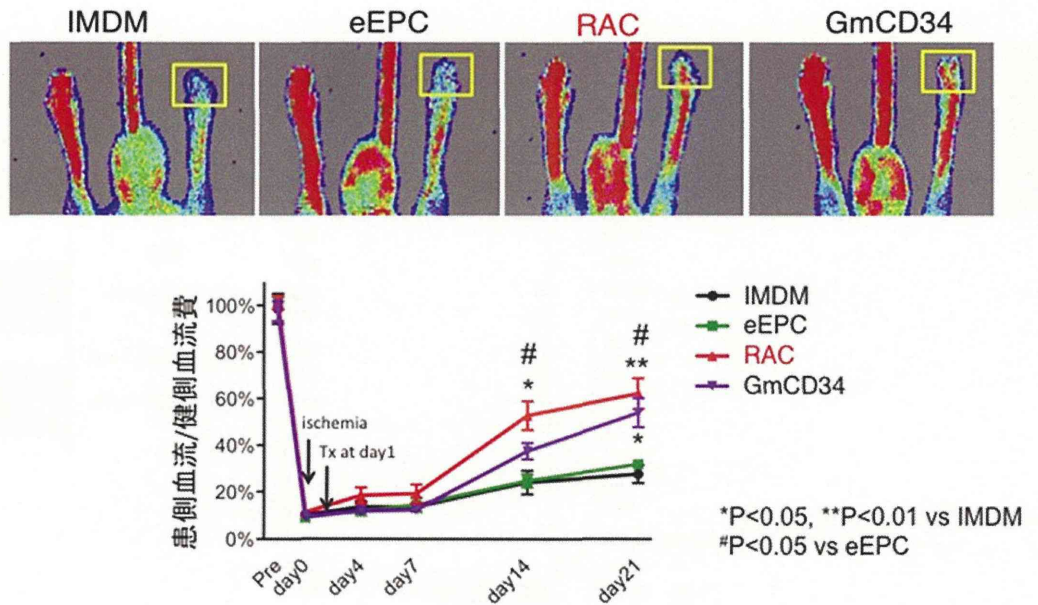


図4. RACと従来の組織再生性血液細胞群移植における虚血下肢血流改善効果の比較。レーザードップラー血流比測定結果を示す。IMDM; 非細胞移植群、eEPC; 末梢血単核球由来培養EPC移植群、GmCD34; G-CSF動員CD34+細胞移植群。下肢虚血作成21日、 1×10^4 個/下腿筋肉内移植後20日。

図 5 :

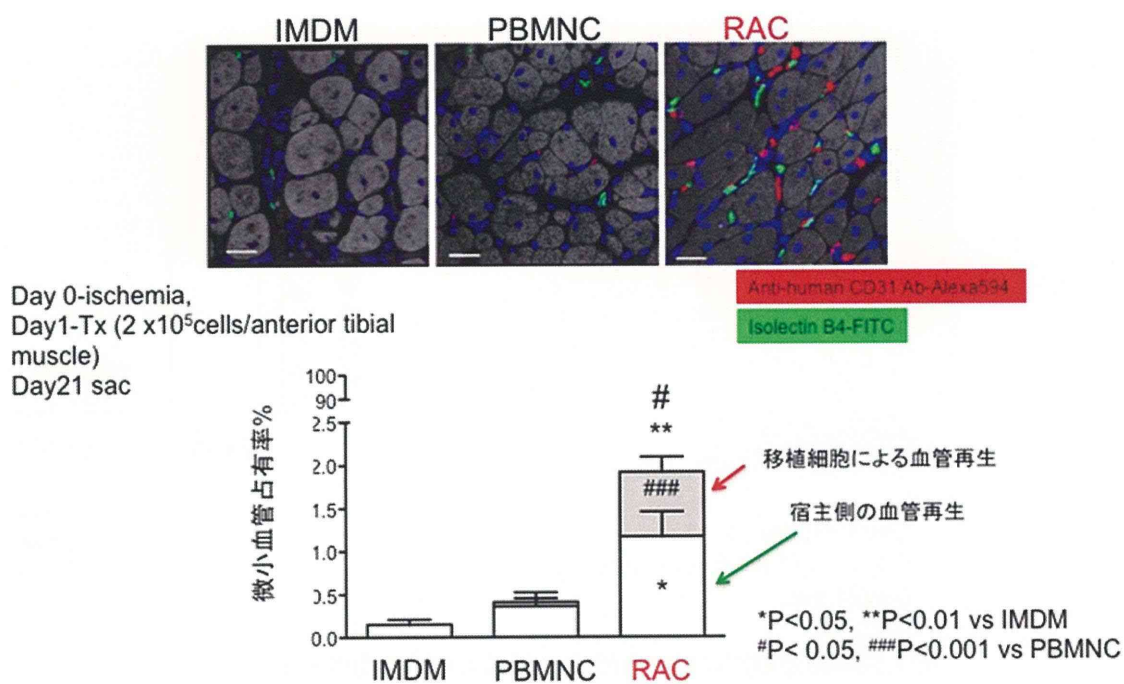


図5.従来の組織再生性血液細胞群に対するRACの血管再生促進効果の比較。共焦点レーザー顕微鏡による観察。IMDM; 非細胞移植群、PBMNC; 末梢血単核球移植群、RAC; RAC移植群。

図 6 :

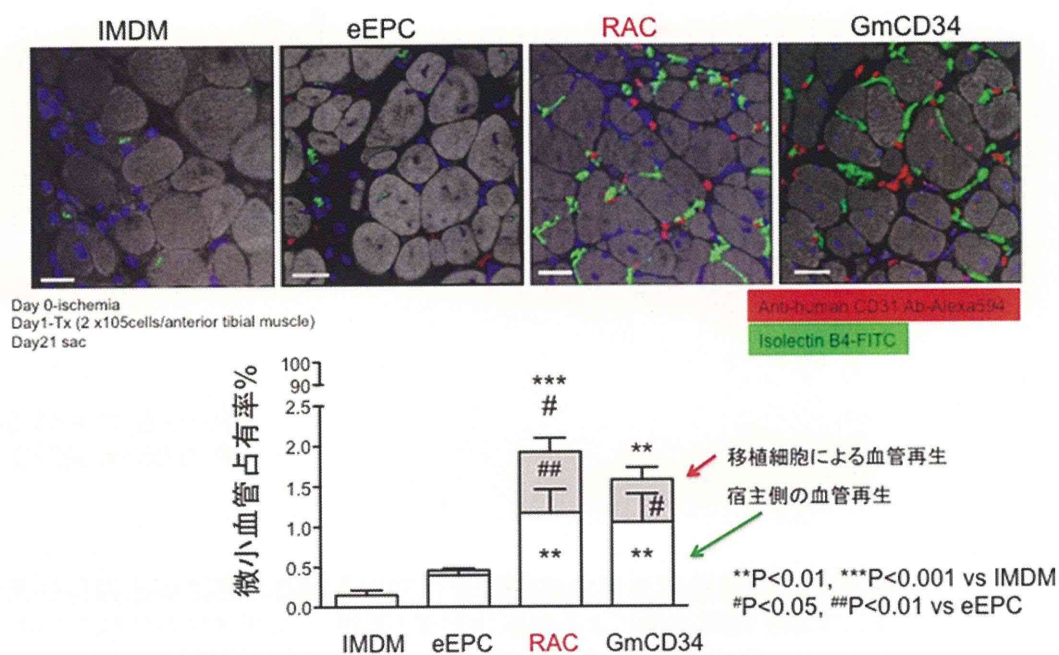


図6.従来の組織再生性血液細胞群に対するRACの血管再生促進効果の比較。共焦点レーザー顕微鏡による観察。IMDM; 非細胞移植群、eEPC; 末梢血単核球由来培養EPC移植群、RAC; RAC移植群、GmCD34; G-CSF動員CD34+細胞移植群。

図 7 :

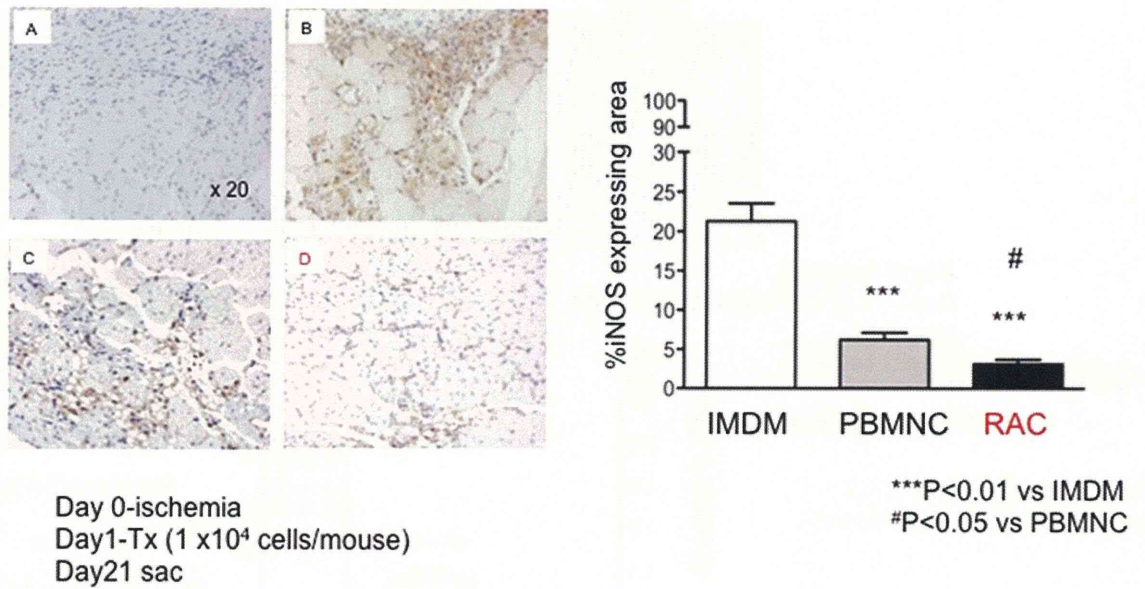


図7.末梢血単核球に対するRACの組織炎症抑制効果の比較。
iNOS免疫組織染色による炎症組織像(茶色)。
A; アイソタイプコントロール、B; 非細胞移植群、C;末梢血単核球移植群、D; RAC移植群。

図 8 :

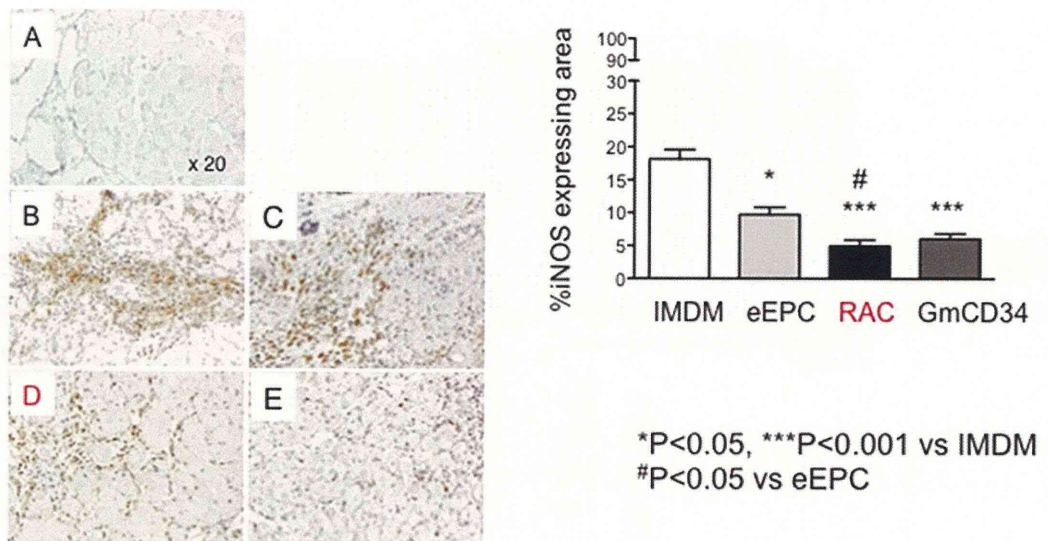


図8.従来の組織再生性血液細胞群に対するRACの組織炎症抑制効果の比較。
iNOS免疫組織染色による炎症組織像(茶色)。A; アイソタイプコントロール、B; 非細胞移植群、C; eEPC移植群、D; RAC移植群、E; GmCD34移植群。

図 9 :

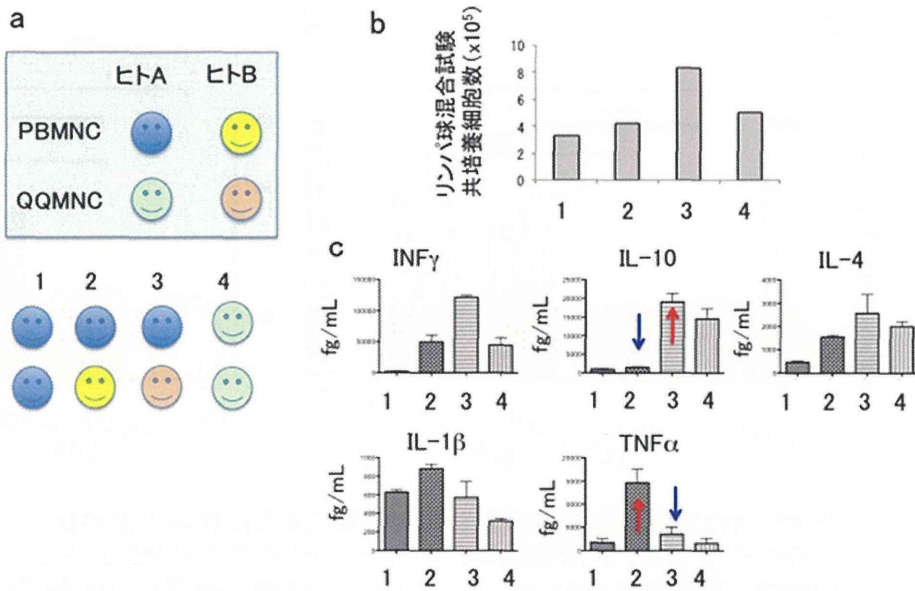


図9. ヒト末梢血及びRACの共培養系によるリンパ球混合試験培養液中の炎症性・抗炎症性サイトカイン産生の検討。a: 群分け説明図。b: 培養細胞数。c: Cytometric bead arrayによるサイトカイン測定値。
1: 同種同型末梢血単核球混合、2: 同種異型末梢血単核球混合、3: 同種異型末梢血単核球及びRAC混合、4: 同種同型RAC混合。

図 10 :

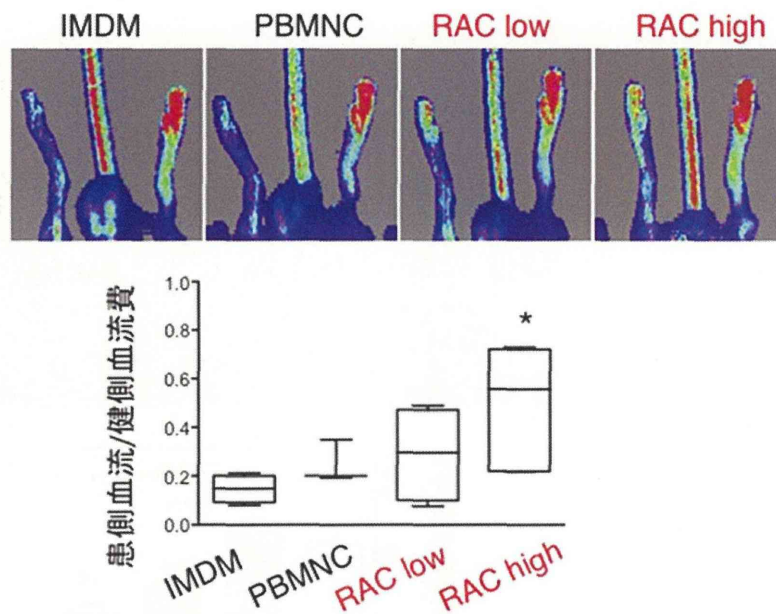


図10. マウスRACと末梢血単核球群移植における虚血下肢血流改善効果の比較。レーザードップラー血流比測定結果を示す。IMDM; 非細胞移植群、PBMC; 末梢血単核球移植群(1x10⁵ 個/匹)、RAC low; RAC低細胞数移植群(1x10⁴ 個/匹)、RAC high; 高細胞数移植群(1x10⁵ 個/匹)。下肢虚血作成14日、下腿筋肉内細胞移植後20日。
*P < 0.05。

図11 :

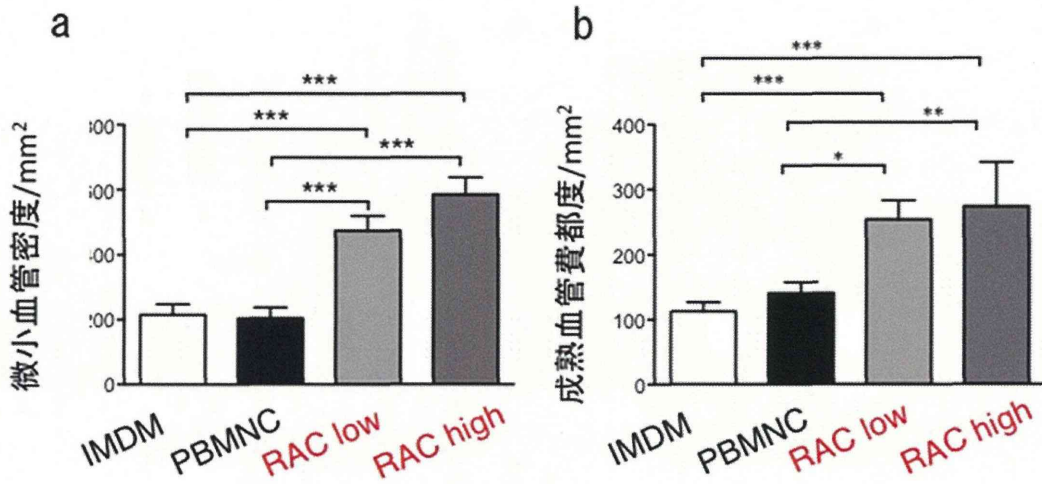


図11. マウス末梢血単核球及びRAC移植による血管再生能の比較。
a; 微小血管密度、b; 壁細胞裏打ち血管密度(成熟血管密度)。IMDM; 非細胞移植群、
PBMNC; 末梢血単核球、RAC low; RAC低細胞数移植群(1×10^4 個/匹)、RAC high; 高細胞数移植群(1×10^5 個/匹)。P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001。

図12 :

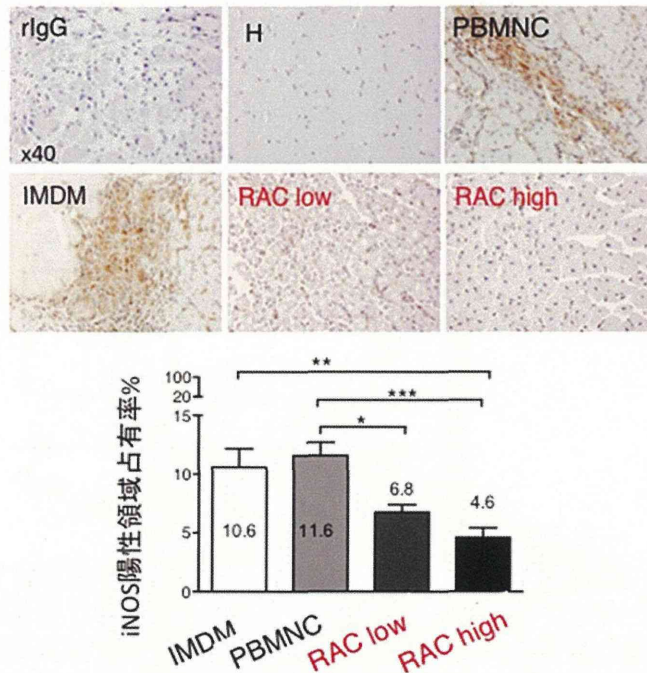


図12. マウス末梢血単核球及びRAC移植による組織炎症特性効果の比較。
a; 微小血管密度、b; 壁細胞裏打ち血管密度(成熟血管密度)。rIgG; アイソタイプコントロール、H; 健常下肢筋肉、IMDM; 非細胞移植群、PBMNC; 末梢血単核球、RAC low; RAC低細胞数移植群(1×10^4 個/匹)、
RAC high; 高細胞数移植群(1×10^5 個/匹)。P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001。

「再生アソシエイト細胞による iPS 細胞移植時の免疫寛容治療研究」

研究分担者 福嶋五月 (大阪大学医学部心臓血管外科 助教)

研究要旨：本分担研究においては、まず再生アソシエイト細胞の獲得免疫反応に対する免疫寛容効果を *in vitro* の実験系を用いて明らかにすることを目的とする。このために、マウスの末梢血より再生アソシエイト細胞の作成を行い、これがヒト再生アソシエイト細胞に類似していることを示した。さらに本研究に必須の実験手技であるリンパ球混合培養試験をマウス由来の細胞（樹状細胞や iPS 細胞由来心筋細胞）を用いて実施することに成功し、条件検討を行いつつ研究を進めている。また、本分担研究では、再生アソシエイト細胞の抗炎症・血管再生効果を探索することを目的に、マウス急性心筋梗塞モデルを用いて再生アソシエイト細胞の同種同系移植実験を行う。本研究期間においては、マウス急性心筋梗塞モデルを作成し、心機能を経胸壁心エコー法にて検討することに成功し、例数を増やししながら条件を最適化している。

A 研究目的

再生アソシエイト細胞の免疫寛容効果を研究し、同種・異種移植実験によって病変部での免疫寛容効果および抗炎症・血管再生効果を探索し、再生アソシエイト細胞移植治療の基盤メカニズムを明らかにする。

B 研究方法

(1)再生アソシエイト細胞の獲得免疫反応に対する免疫寛容効果の *in vitro* 研究

1-1 マウス由来再生アソシエイト細胞の培養

BALB/CN および C57BL/6J マウス雄、8週齢より末梢血を採取し、主任研究者の浅原らがヒト末梢血により開発した手法を用いて、単核球の単離および QQ 培養を行い、再生アソシエイト細胞を作成した (n=5)。

1-2C57BL/6J マウス末梢血由来単核球から樹状細胞への分化誘導

上記手法にて単離された C57BL/6J マウス末梢血由来単核球に、GM-CSF および IL-4 の刺激を加えることにより、樹状細胞への分化を誘導した。

1-3C57BL/6J マウス由来 iPS 細胞株(959A)から心筋細胞への分化誘導

C57BL/6J マウス由来 iPS 細胞株(959A)から当実験室が開発した手法にて、心筋細胞への分化を誘導した。

1-4BALB/CN マウスの脾臓からのリンパ球の単離と CFSE 染色

BALB/CN マウス雄、8週齢を犠牲死させ、脾臓を摘出し、脾臓からリンパ球を単離した。そしてこのリンパ球に CFSE 色素を取り込ませた。

1-5 リンパ球混合培養試験

上述の C57BL/6J マウスの単核球由来樹状細胞あるいは iPS 細胞由来心筋細胞を Stimulator 細胞とし、また BALB/CN マウス脾臓由来リンパ球を Responder 細胞として、これらを5日間共培養した。CFSE の蛍光強度をフローサイトメトリーを用いて定量化することにより、Responder 細胞の増殖の程度を定量化した。また、同時に蛍光標識された CD4 あるいは CD8 にて染色しフローサイトメトリーにて解析した。これら混合培養の際に、BALB/CN マウス由来の再生アソシエイト細胞を混合することにより、再生アソシエイト細胞が他家抗原に対する免疫応答に与える影響を検討した。

(2)再生アソシエイト細胞 (同種同系) 移植実験

2-1 マウス急性心筋梗塞モデルの作成

BALB/CN 雄、8 週齢に対して、5%イソフルレン吸入により全身麻酔を施し、24ゲージプラスチックチューブを経口的に気道内に留置し、人工呼吸器を装着した(n=10)。胸部をアルコールにて十分消毒した上で、左第5肋間開胸にて左胸腔内に到達、さらに心膜を縦切開して心臓を露出した。左前下行枝を注意深く観察し、左心耳下縁直下にて、これを8-0プロリン糸にて結紮した。結紮部位より末梢の心筋が、白色から暗赤色に色調変化を来すことを確認した上で、胸壁および皮膚を縫合閉鎖し、イソフルレン吸入を中止し、人工呼吸器からの離脱を図った。

2-2 マウス急性心筋梗塞モデルの機能評価
心筋梗塞を作成し、人工呼吸器から離脱できたマウスの生存を観察した。生存したマウスに対して、再度5%イソフルレン吸入により全身麻酔を施し、経胸壁心エコー法による心機能評価を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験に於いては、大阪大学の動物実験の規則に従い、愛護的に行うとともに、動物実験計画所を大阪大学動物実験委員会に送付し、本実験の承認を得ることとする。また、ヒト由来のサンプルを用いた実験に於いては、採血あるいは手術時に得られたサンプルの解析を行うが、患者本人と患者の家族の同意を得るべく所定の書類を作成し、サンプル提供の申し出を行っている。また、サンプルを提供された患者の個人情報の取り扱いには十分な配慮を払う。

C 研究結果

(1)再生アソシエイト細胞の獲得免疫反応に対する免疫寛容効果の *in vitro* 研究

1-1 マウス由来再生アソシエイト細胞の作成
BALB/CN および C57BL/6J マウスの末梢血より、ヒト末梢血にて開発した手法と同様の手法で、再生アソシエイト細胞を作成した (図1※

別添図表一覧参照)。マウス由来再生アソシエイト細胞は、培養前の単核球に比べて細胞径が大きく、紡錘形を呈していた。

1-1 再生アソシエイト細胞が他家抗原 (他家樹状細胞) に対する免疫応答に与える影響

C57BL/6J マウスの単核球由来樹状細胞を Stimulator 細胞、BALB/CN マウス脾臓由来リンパ球を Responder 細胞として、BALB/CN マウス再生アソシエイト細胞の有無下にてリンパ球混合培養試験を実施した。さらに、蛍光標識された CD3 あるいは CD4 にて染色することにより、増殖反応を示した Responder 細胞の種類を特定し、免疫応答の質的評価を行った (図2)。本検討では、再生アソシエイト細胞(As)による、他家樹状細胞刺激による CD3 および CD4 陽性細胞の増殖への影響は明らかとは言えなかった。

1-1 再生アソシエイト細胞が他家抗原 (他家 iPS 細胞由来心筋細胞) に対する免疫応答に与える影響

同様に、C57BL/6J マウスの iPS 細胞由来心筋細胞を Stimulator 細胞、BALB/CN マウス脾臓由来リンパ球を Responder 細胞として、BALB/CN マウス再生アソシエイト細胞の有無下にてリンパ球混合培養試験を実施した。さらに、蛍光標識された CD3 あるいは CD4 にて染色することにより、増殖反応を示した Responder 細胞の種類を特定し、免疫応答の質的評価を行った (図3)。

本検討では、再生アソシエイト細胞(As)による、他家 iPS 細胞由来心筋細胞刺激による CD3 および CD4 陽性細胞の増殖への影響は明らかとは言えなかった。

(1)再生アソシエイト細胞 (同種同系) 移植実験

2-1 マウス心筋梗塞モデル

BALB/CN 雄、8 週齢に対して、気管挿管、左開胸下に左前下行枝の結紮による前壁心筋梗塞の作成を行った(n=10)。いずれのマウスにおいても前壁の色調の変化と壁運動の顕著な低下が