

## 「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) 健常人より末梢血単核球(PBMNC)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 Doppler 血流測定) 組織学的血管再生能(共焦点レーザー顕微鏡を用いた 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(PBMNC)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、PBMNC 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。異なる健常人から採取した末梢血単核球及び RAC を調整し、10%FBS・RPMI 1640 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、別添図表一覽参照)。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( $1 \times 10^4$ 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 $\alpha$ 、TNF $\alpha$ )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 $\alpha$ )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 $\square\square\square$ 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 $\square\square\square$ 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 $\square\square\square$ 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/JP2013/76618

国際出願日: 2013年9月30日(基礎出願日: 2012年9月28日)

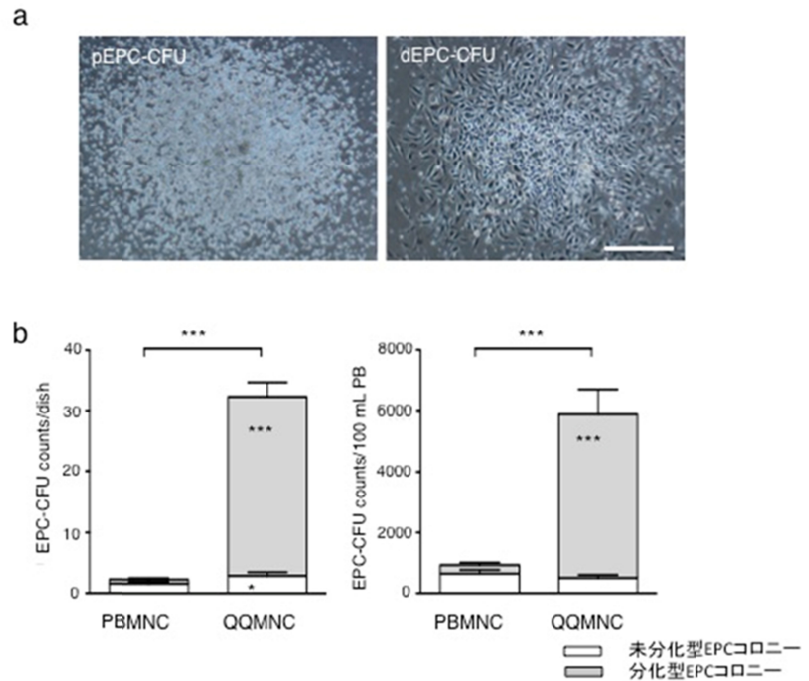
発明者: 浅原孝之、増田治史、田中里佳

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**

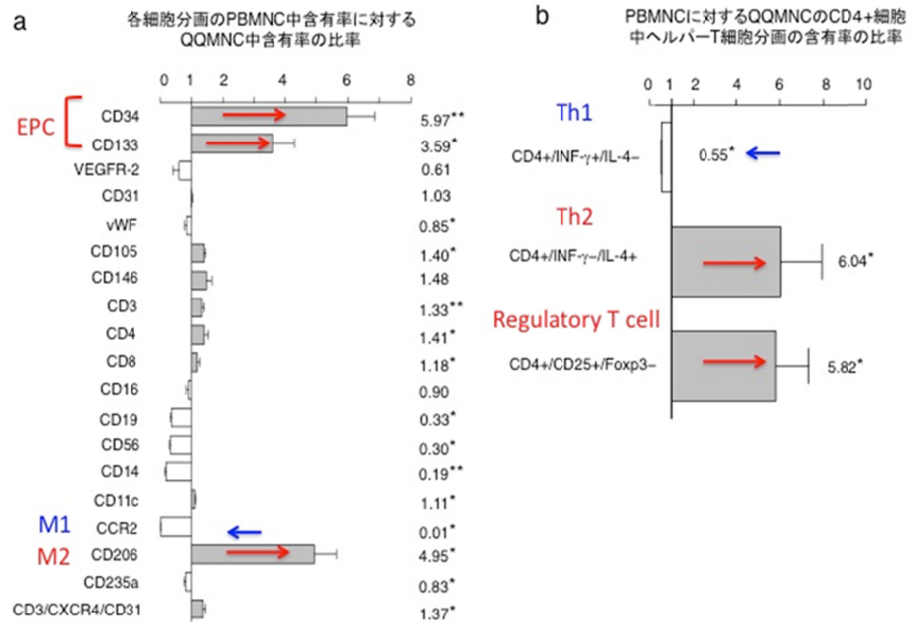
**図 1 :**



**図 1 ; QQMNC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 $\mu$ m。b) EPCコロニーアッセイにより、QQMNC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 ; QQMNC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 :

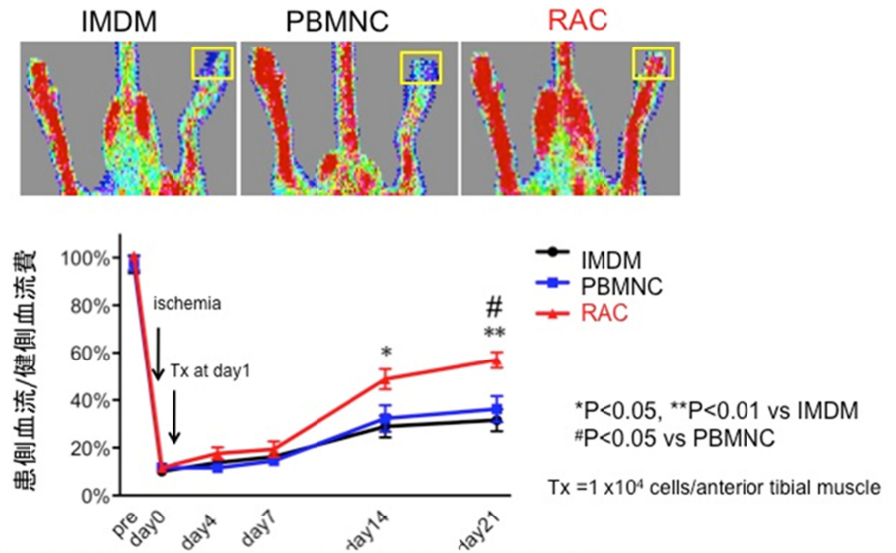


図3. RACと末梢血単核球移植における虚血下肢血流改善効果の比較。レーザードップラー血流比測定結果を示す。IMDM; 非細胞移植群、PBMNC; 末梢血単核球移植群、下肢虚血作成21日、 $1 \times 10^4$ 個/下腿筋肉内移植後20日。

図4 :

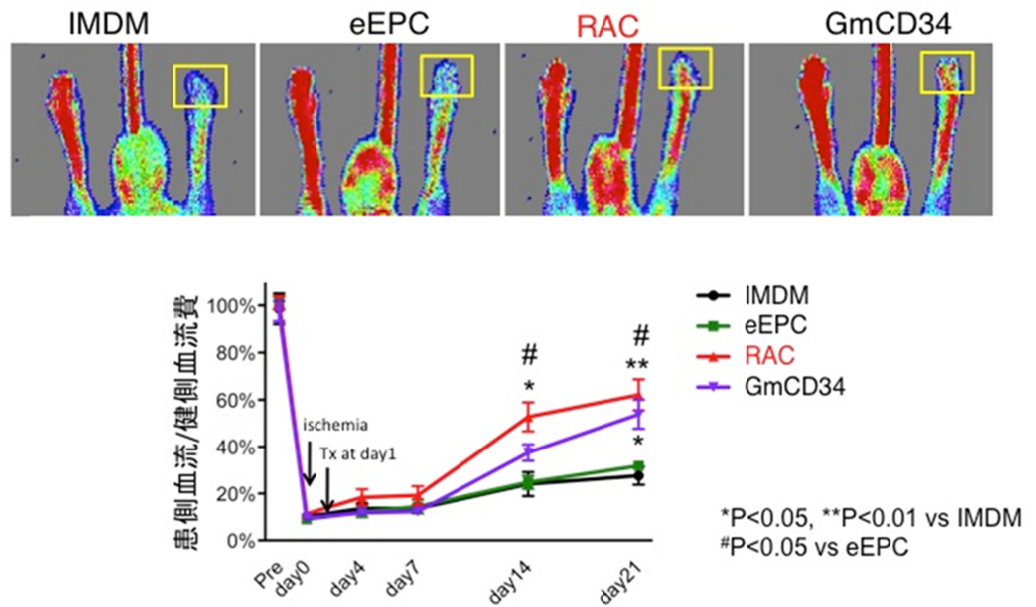


図4. RACと従来の組織再生性血液細胞群移植における虚血下肢血流改善効果の比較。レーザードップラー血流比測定結果を示す。IMDM; 非細胞移植群、eEPC; 末梢血単核球由来培養EPC移植群、GmCD34; G-CSF動員CD34+細胞移植群。下肢虚血作成21日、 $1 \times 10^4$ 個/下腿筋肉内移植後20日。

図 5 :

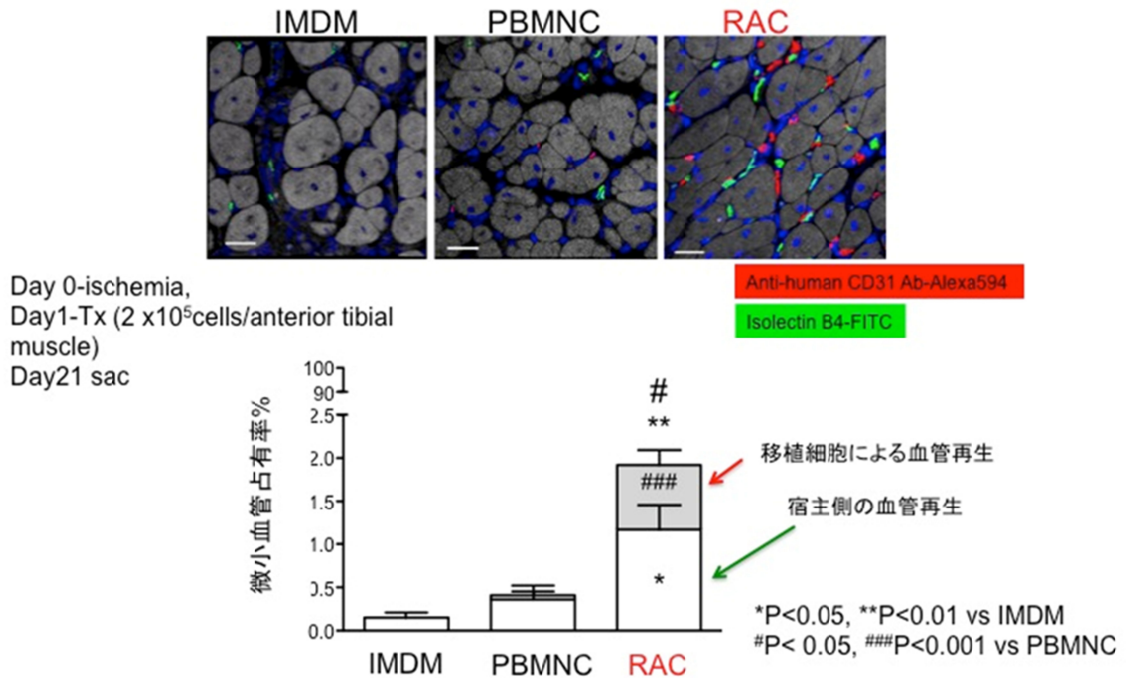


図5.従来の組織再生性血液細胞群に対するRACの血管再生促進効果の比較。共焦点レーザー顕微鏡による観察。IMDM; 非細胞移植群、PBMNC; 末梢血単核球移植群、RAC; RAC移植群。

図 6 :

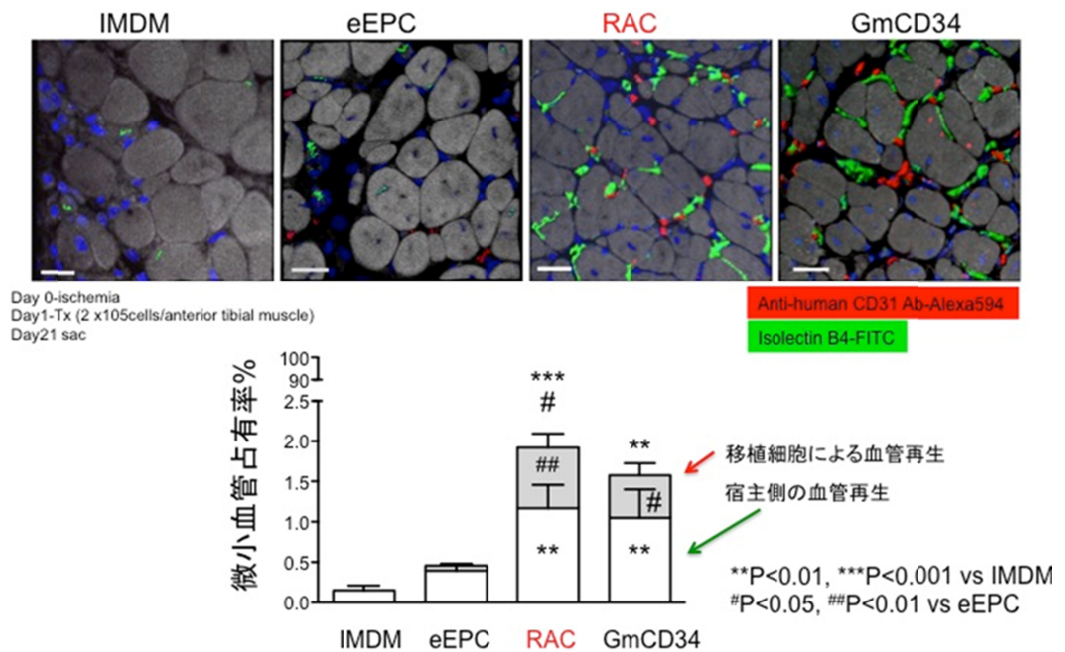


図6.従来の組織再生性血液細胞群に対するRACの血管再生促進効果の比較。共焦点レーザー顕微鏡による観察。IMDM; 非細胞移植群、eEPC; 末梢血単核球由来培養EPC移植群、RAC; RAC移植群、GmCD34; G-CSF動員CD34+細胞移植群。

図7 :

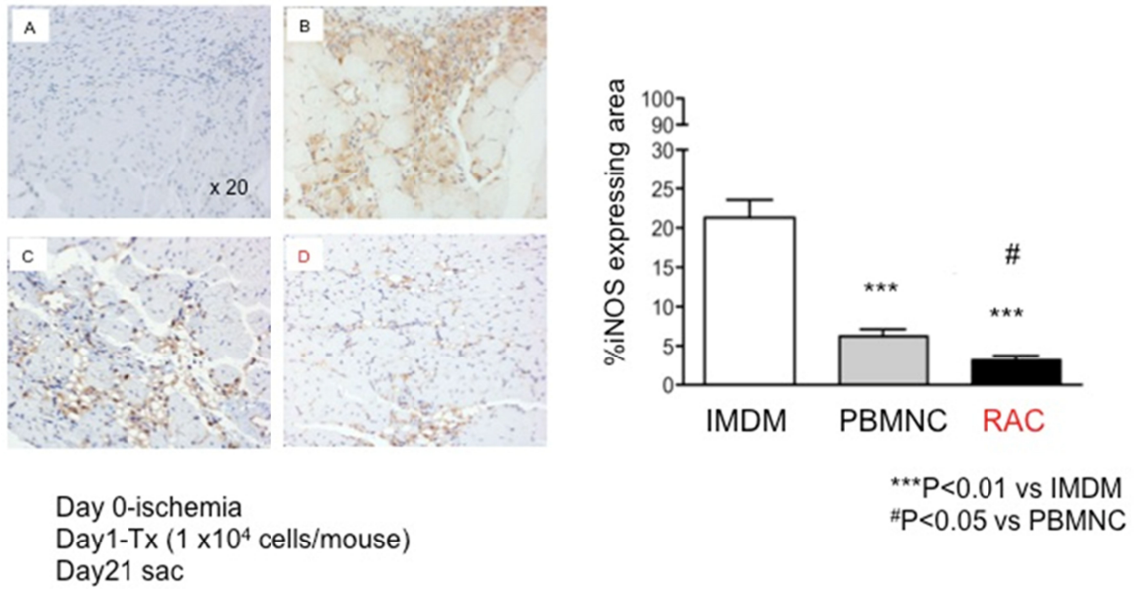


図7.末梢血単核球に対するRACの組織炎症抑制効果の比較。  
iNOS免疫組織染色による炎症組織像(茶色)。  
A; アイソタイプコントロール、B; 非細胞移植群、C; 末梢血単核球移植群、D; RAC移植群。

図8 :

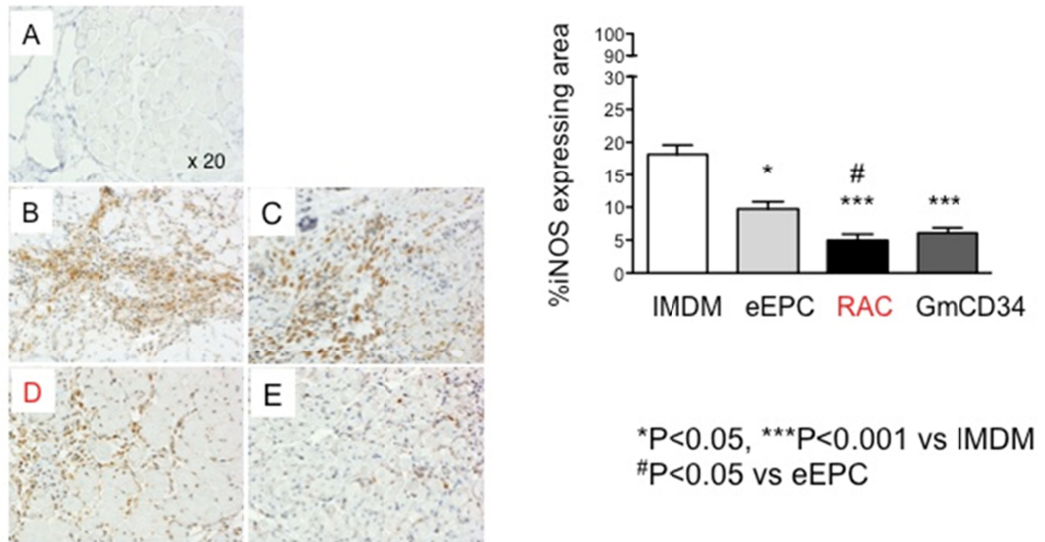


図8.従来の組織再生性血液細胞群に対するRACの組織炎症抑制効果の比較。  
iNOS免疫組織染色による炎症組織像(茶色)。A; アイソタイプコントロール、B; 非細胞移植群、C; eEPC移植群、D; RAC移植群、E; GmCD34移植群。



図9 :

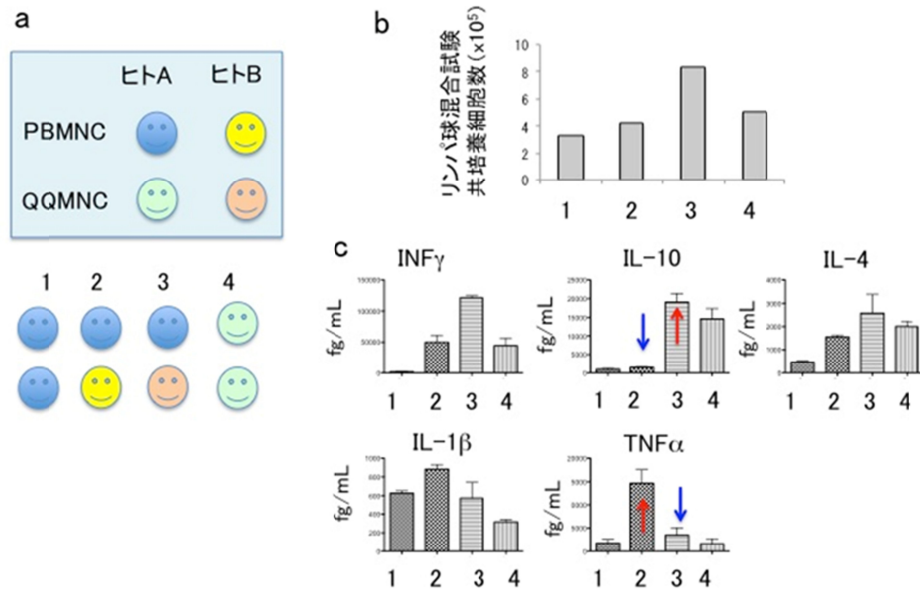


図9. ヒト末梢血及びRACの共培養系によるリンパ球混合試験培養液中の炎症性・抗炎症性サイトカイン産生の検討。a: 群分け説明図。b: 培養細胞数。c: Cytometric bead arrayによるサイトカイン測定値。  
 1: 同種同型末梢血単核球混合、2: 同種異型末梢血単核球混合、3: 同種異型末梢血単核球及びRAC混合、4: 同種同型RAC混合。

図10 :

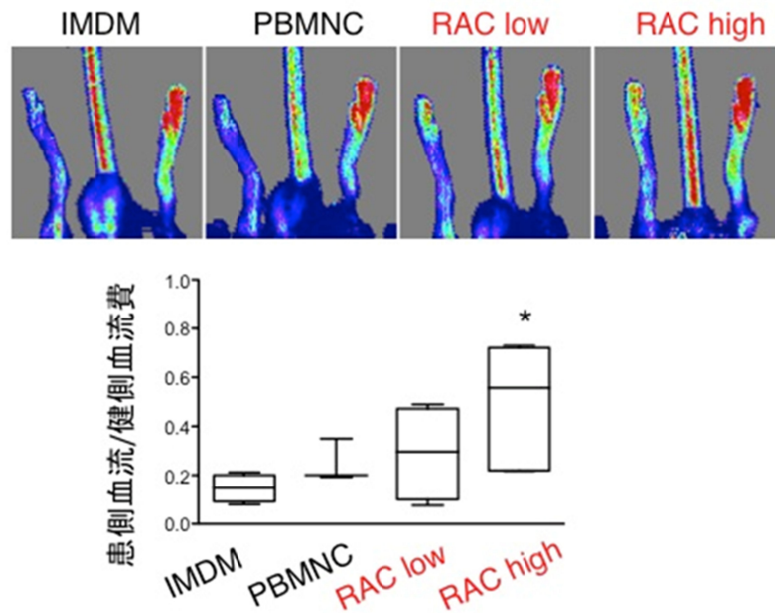


図10. マウスRACと末梢血単核球群移植における虚血下肢血流改善効果の比較。レーザードップラー血流比測定結果を示す。IMDM; 非細胞移植群、PBMNC; 末梢血単核球移植群(1x10<sup>5</sup> 個/匹)、RAC low; RAC低細胞数移植群(1x10<sup>4</sup> 個/匹)、RAC high; 高細胞数移植群(1x10<sup>5</sup> 個/匹)。下肢虚血作成14日、下腿筋肉内細胞移植後20日。  
 \*P < 0.05。

図 11 :

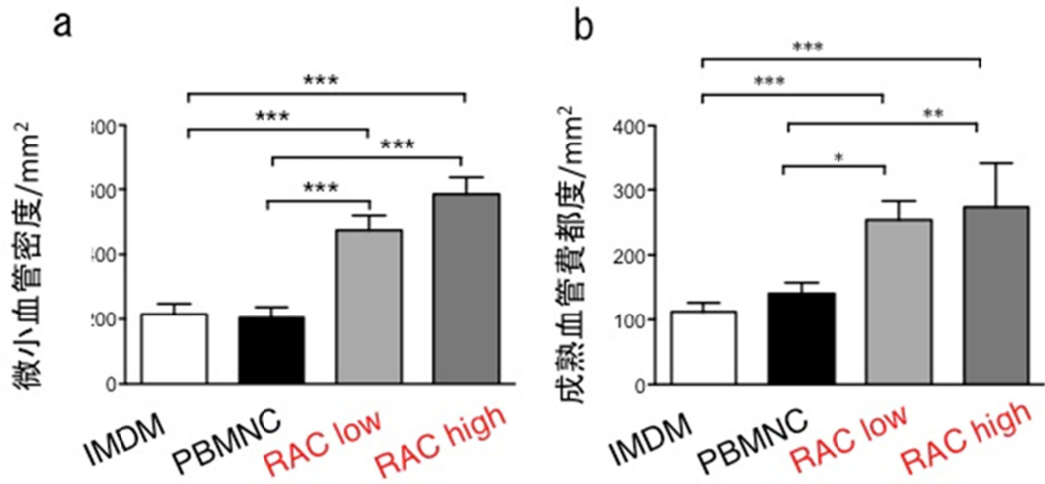


図11. マウス末梢血単核球及びRAC移植による血管再生能の比較。  
a; 微小血管密度、b; 壁細胞裏打ち血管密度(成熟血管密度)。IMDM; 非細胞移植群、  
PBMNC; 末梢血単核球、RAC low; RAC低細胞数移植群( $1 \times 10^4$  個/匹)、RAC high; 高細胞数移植群( $1 \times 10^5$  個/匹)。P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001。

図 12 :

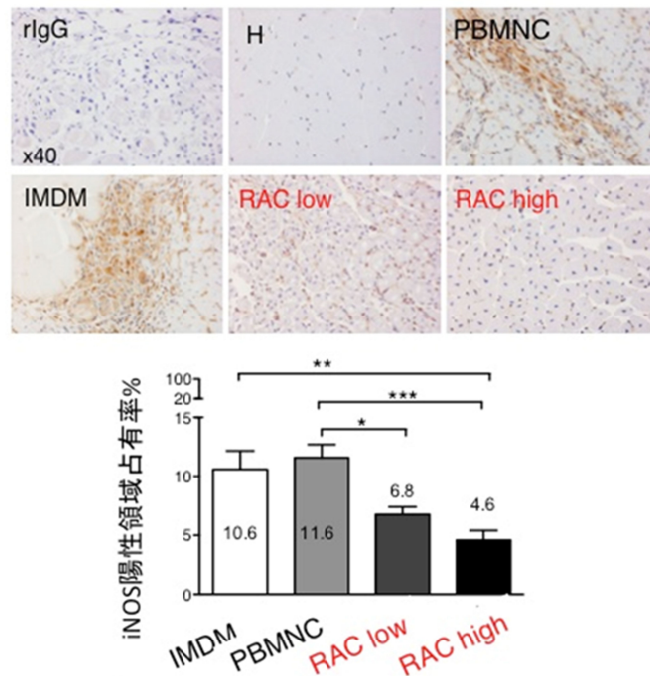


図12. マウス末梢血単核球及びRAC移植による組織炎症特性効果の比較。  
a; 微小血管密度、b; 壁細胞裏打ち血管密度(成熟血管密度)。rTgG; アイソタイプコントロール、H; 健常下肢筋肉、IMDM; 非細胞移植群、PBMNC; 末梢血単核球、RAC low; RAC低細胞数移植群( $1 \times 10^4$  個/匹)、  
RAC high; 高細胞数移植群( $1 \times 10^5$  個/匹)。P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001。

