

「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

別添図表一覽参照)。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

見られた。内、9匹においては心機能の低下・心室性不整脈の出現から心停止に陥った。1匹は生存し、経胸壁心エコー検査上、著明な前壁の運動の低下と、心拡大が見られた。

D 考察

(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

マウスよりヒトと同様の方法をもって作成した再生アソシエイト細胞は、ヒト再生アソシエイト細胞と類似した形態を呈しており、本作成手法の有用性が示唆された。今後、このマウス由来の再生アソシエイト細胞の表現型を同定し、ヒト再生アソシエイト細胞との相同性を検討しつつ、培養条件を最適化する必要がある。

(2)再生アソシエイト細胞（同種同系）移植実験本 *in vitro* 研究の中心的な実験手技となる混合リンパ球培養試験の実施に成功した。今回の検討では、再生アソシエイト細胞の、他家細胞に対する免疫寛容効果は明かではなかった。この原因として、レシピエントマウスが有する他家抗原に対する獲得免疫が十分でないことが考えられ、今後の実験では脾臓を摘出する前に、レシピエントマウスに抗原刺激を加えることを考慮する必要がある。また手技的な問題も考えられ、実験を繰り返すことにより、実験技術に習熟する必要がある。

(3)再生アソシエイト細胞（同種同系）移植実験マウスの急性心筋梗塞の作成に成功し、さらにマウスの心機能を経胸壁心エコー法にて評価することに成功した。今回の検討ではまだ死亡率が高く、心機能低下が一定でないことから、実験を繰り返し技術的に習熟することにより、一定の心機能低下を有するモデルを作成する必要がある。

E 結論

マウス由来の再生アソシエイト細胞の作成に成功した。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* 研究に必要な実験手技の実施に成功し、また再生アソシエイト細胞（同種同系）移植実験に必要なマウス急性心筋梗塞モデルの作成及び心機能の評価に成功した。今後、これらの基盤となる実験手技を用いて、本研究仮説を検証していく。

F 研究発表

1. 論文発表

- 1.Ishimaru K, Miyagawa S, Fukushima S, Ide H, Hoashi T, Shibuya T, Ueno T, Sawa Y. Functional and pathological characteristics of reversible remodeling in a canine right ventricle in response to volume overloading and volume unloading. *Surg Today*. 2014 Feb 13. [Epub ahead of print]
- 2.Ishimaru K, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Sakai Y, Ueno T, Sawa Y. Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a hamster model of dilated cardiomyopathy: A promising regenerative therapy for the failing heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013; 146:1516-25.
- 3.Kaneko M, Shintani Y, Narita T, Ikebe C, Tano N, Yamahara K, Fukushima S, Coppens 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:e76908.
- 4.Shudo Y, Miyagawa S, Ohkura H, Fukushima S, Saito A, Shiozaki M, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y. Addition of mesenchymal stem cells enhances the therapeutic effects of skeletal myoblast cell-sheet transplantation in a rat ischemic

cardiomyopathy model. *Tissue Eng Part A*. 2013; 20:728-39.

5. Kubota Y, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Watabe H, Daimon T, Sakai Y, Akita T, Sawa Y. Impact of cardiac support device combined with slow-release prostacyclin agonist in a canine ischemic cardiomyopathy model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013; 147:1081-7.

6. Matsuda T, Miyagawa S, Fukushima S, Kitagawa-Sakakida S, Akimaru H, Horii-Komatsu M, Kawamoto A, Saito A, Asahara T, Sawa Y. Human cardiac stem cells with reduced Notch signaling show enhanced therapeutic potential in a rat acute infarction model. *Circ J*. 2013; 78:222-31.

7. Nishi H, Sakaguchi T, Miyagawa S, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito S, Ueno T, Kuratani T, Sawa Y. Impact of microRNA expression in human atrial tissue in patients with atrial fibrillation undergoing cardiac surgery. *PLoS One*. 2013; 8:e73397.

8. Kawamura M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Miki K, Ito E, Sougawa N, Kawamura T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Toda K, Sawa Y. Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart. *Circulation*. 2013; 128:S87-94.

9. Imanishi Y, Miyagawa S, Fukushima S, Ishimaru K, Sougawa N, Saito A, Sakai Y, Sawa Y. Sustained-release delivery of prostacyclin analogue enhances bone marrow-cell recruitment and yields functional benefits for acute myocardial infarction in mice. *PLoS One*. 2013; 8:e69302.

2. 学会発表

1. 福嶋五月、宮川 繁、澤 芳樹 同種他家 iPS 細胞を用いた心筋再生療法の開発 第 41 回日本臓器保存生物医学会総会シンポジウム 2014 年 11 月東京
2. Fukushima S, Miyagawa Y, Higuchi T, Sawa Y. In depth evaluation of transplanted cardiac myocytes derived from induced pluripotent stem cells on the chronic infarct heart in vivo in rat. American Heart Association Scientific Meeting 2014 Poster Presentation Nov2014 Dallas

G 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし

別添図表一覧

図 1 :

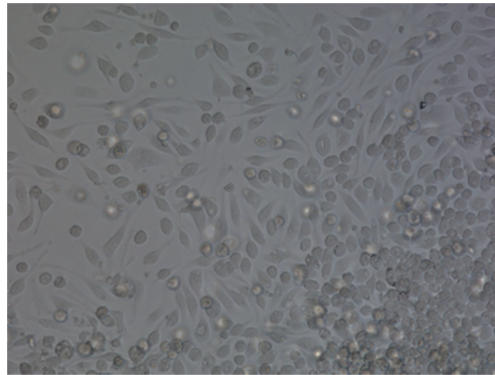


図 2 :

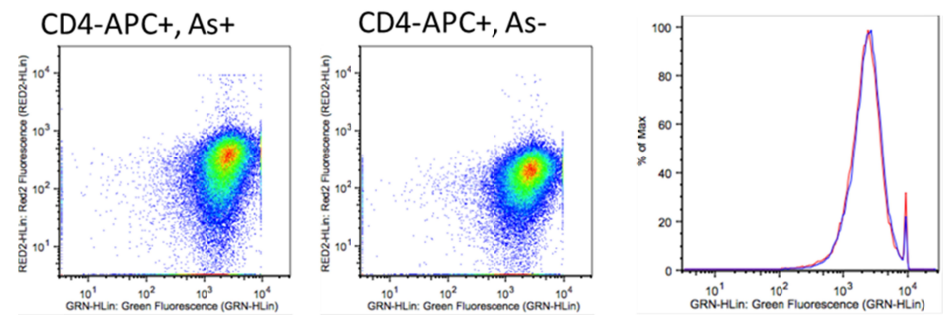
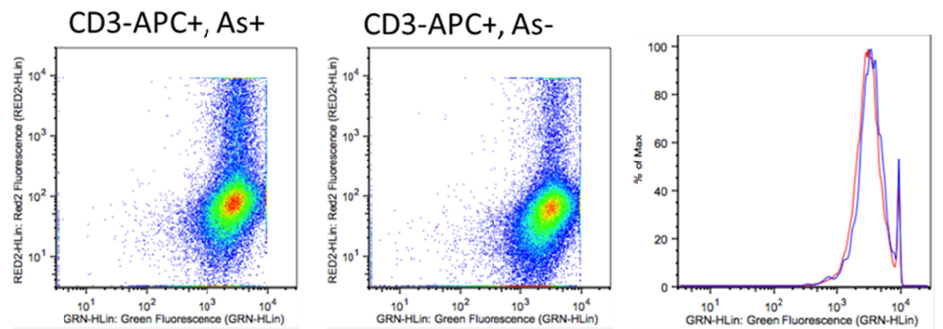


図 3 :

