

「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 田中里佳（順天堂大学医学部 形成外科学 准教授）

研究要旨：本提案課題では、血液単核球細胞を再生シグナル環境で培養することで、血管再生・抗炎症・免疫寛容作用を有する「再生アソシエイト細胞」に誘導する技術を研究し、iPS 組織の生着・機能化のための臨床応用技術として開発し、心筋細胞シート（拠点大阪大学：澤グループ）、網膜色素上皮シート（拠点理化学研究所：代表笹井：高橋グループ）産業化を前提とした臨床応用まで進めることを目的とする。田中里佳率いる順天堂大学グループにおいては、糖尿病患者の再生アソシエイト細胞有効性の確認、糖尿病疾患に対する再生アソシエイト細胞の血管再生・抗炎症・免疫寛容作用を確認、将来的に iPS 組織の生着・機能化のための臨床応用技術を開発する。平成 25 年度は、マウス再生アソシエイト異種移植実験を実施するための培養法と実験手技、評価確立を行い、糖尿病疾患における再生アソシエイト細胞の有効性を確認する研究計画を予定した。

A. 研究目的

順天堂大学において平成 25 年度は下記を目的に実験を実施した。

マウス再生アソシエイト細胞培養法の確立

糖尿病患者における再生アソシエイト細胞の血管新生、抗炎症効果

マウス再生アソシエイト細胞の同種同系潰瘍移植実験による血管新生、抗炎症反応の組織評価指標確立。

B. 研究方法

マウス末梢血から単核球を採取し、単核球を再生アソシエイト細胞培養カクテルにて 5 日間培養を行い培養後に再生アソシエイト細胞の血管再生と抗炎症効果の指標となる細胞表面マーカーを FACS 解析にて、血管再生能を EPC-colony forming assay にて解析した。

糖尿病患者末梢血単核球から再生アソシエイト細胞を作成し、血管再生と抗炎症効果の指標となる細胞表面マーカーを FACS 解析にて、血管再生能を EPC-colony forming assay, EPC Culture Assay にて解析をおこなった。糖尿病患者再生アソシエイト細胞をヌード潰瘍モデルマウスに移植し、組織における血管新生、抗炎症、創傷治癒効果を解析した。

マウス再生アソシエイト細胞の同種同系潰瘍移植実験による血管新生、抗炎症反応の組織評価指標を確立するため、健常マウス(C57BL6J)と糖尿病マウス(db/db)に潰瘍を作成し潰瘍作成後 Day1, Day3, Day5, Day7, Day10 における局所の M1/M2 細胞活性を評価した。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針（平成 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）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）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）及び順天堂大学で定めた医学部倫理委員会の規定を遵守した。動物実験は、順天堂大学実験動物委員会と学長の承認のもと動物愛護法を遵守、臨床研究については順天堂大学病院倫理委員会の承認のもとに実施している。

C. 研究結果

マウス末梢血再生アソシエイト細胞は培養前に比べ培養後に細胞数は減少する（ 5.0 ± 0.0 vs. 1.0 ± 0.2 ）が EPC の数は増加する傾向にある。EPC colony forming assay の結果、再生アソシ

エイト細胞は、primitive, definitive, および total-CFU 全てにおいて Colony 数は優位に増加し高い血管再生能を有する細胞であることがわかった。

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、上記に示した血管再生能を検証するアッセイ法と RT-PCR においても DM 再生アソシエイト細胞は健常人以上の抗炎症効果と血管再生能を示した。ヌードマウス移植効果は In vitro の結果同様、DM 再生アソシエイト細胞植群において高い創傷治癒効果と組織内血管再生効果を示した。

健常マウス(C57BL6J)と糖尿病マウス(db/db)に潰瘍を作成し潰瘍作成後 Day1,Day3, Day5, Day7, Day10 における局所の M1/M2 細胞活性を評価した。健常マウス潰瘍において M1 細胞は Day1 に上昇しその後減少する。M2 は Day 7 をピークに上昇し、その後 Day10 まで潰瘍内部に存在する。一方糖尿病マウス潰瘍において M2 細胞は Day 1 における上昇が少なく、Day7 においても M1 細胞が遷延して潰瘍内に存在する。M2 の発現は Day10 に軽度の発現が認められるにとどまる。

D. 考察

今年度の研究結果においてマウスと糖尿病患者の末梢血再生アソシエイト細胞は高い抗炎症・免疫寛容・血管再生能を有することが示された。また、今後の動物実験において組織抗炎症効果・免疫反応を解析するための潰瘍モデルの有効性と解析プロトコルの作成準備が整ったため今年度の実験データをもとに来年度の実験をスムーズに進められると考える。

E. 結論

我々は抗炎症効果、高い血管再生能を有するマウス末梢血再生アソシエイト細胞の確立に成功した。来年度は同種同系再生アソシエイト細胞

移植実験、同種異種再生アソシエイト細胞移植実験を実施し、免疫寛容効果と抗炎症効果、血管・組織再生効果を検証する。末梢血再生アソシエイト細胞は少量の血液から抗炎症・免疫寛容細胞の移植することが可能となり、iPS 組織の生着・機能化のための臨床応用技術として高い可能性を有する。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1.Tanaka R .Adoptive Autologous Vascular Stem Cell Therapy for Diabetic Foot Patients. J Vasc Med Surg 1:2013. e108. doi: 10.4172/2329-6925.1000e108
- 2.Tanaka Rica , Hisako Ishihara, Kayo Arita, Sachie Jitsukawa, Rie Hirano, Kayoko Okada, Hiroshi Mizuno.Keratinocyte contact plays a role in keratinocyte differentiation of Quality and Quantity Cultured Peripheral Blood Human EPC. Plastic Surgery and Reconstructive Surgery 131:55 p155 2013
- 3.Rica Tanaka, Kayo Arita, Sachie Jitsukawa, Hisako Ishihara, Rie Hirano, Kayoko Okada, Hiroshi Mizuno.Novel methodology using diabetic peripheral blood stem cells for effective tissue regeneration. Plastic Surgery and Reconstructive Surgery 132. p506.2013
- 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; May 13 [Epub ahead of print] PMID:23670975
- 5.Ervinna N, Mita T, Yasunari E, Azuma K, Tanaka R, Fujimura S, Sukmawati D, Nomiya T, Kanazawa A, Kawamori R,

Fujitani Y, Watada H: Anagliptin, a DPP-4 Inhibitor, Suppresses Proliferation of Vascular Smooth Muscles and Monocyte Inflammatory Reaction and Attenuates Atherosclerosis in Male apo E-Deficient Mice. *Endocrinology* 2013;154:1260-1270

6.Naoki Sawada^{1,2,4,5,*}, Aihua Jiang^{4,16}, Fumihiko Takizawa^{1,2,3}, Adeel Safdar⁴, Andre Manika^{6,7}, Yevgenia Tesmenitsky⁶, Kyu-Tae Kang^{8,9}, Joyce Bischoff⁸, Hermann Kalwa⁶, Juliano L. Sartoretto⁶, Yasutomi Kamei^{1,10}, Laura E. Benjamin⁴, Hirotaka Watada¹¹, Yoshihiro Ogawa^{1,2}, Yasutomi Higashikuni¹², Chase W. Kessinger¹³, Farouc A. Jaffer¹³, Thomas Michel⁶, Masataka Sata¹⁴, Kevin Croce⁶, Rica Tanaka¹⁵, Zolt Arany^{4,*} Endothelial PGC-1 mediates vascular dysfunction in diabetes *Cell Metabolism* 2013 In press

糖尿病患者に対する新しい血管再生の開発

Author: 田中 里佳(順天堂大学 医学部形成外科学), 増田 治史, 有田 佳代, 実川 佐智恵, 平野 理恵, Dewi Sukmawati, 藤村 聡, 三田 智也, 綿田 裕孝, 浅原 孝之, 水野 博司

Source : 糖尿病(0021-437X)56 巻 Suppl.1

PageS-253(2013.04)

2 学会発表

1.Tanaka R, Arita K, Jitsukawa S, Ishihara R, Hirano R, Tago N, Okada K, Mizuno H Keratinocyte contact plays a role in keratinocyte differentiation of Quality and Quantity Cultured Peripheral Blood Human EPC the 58th Annual Meeting of the Plastic Surgery Research Council(Los Angeles, USA, 2013)

2.Tanaka R, Ishihara H, Arita K, Jitsukawa S, Hirano R, Okada K, Mizuno H Keratinocyte Differentiation of Quality and Quantity

Cultured Peripheral Blood Human CD34 positive cells ISSCR (Boston, USA, 2013)

3.Tanaka R, Ando E, Komoto M, Mizuno H Challenges and future perspective of autologous peripheral blood vascular progenitor cell therapy for diabetic patients with chronic non-healing ulcer *DIABETIC LIMB SALVAGE* (Washington D.C, USA, 2013)

4.Tanaka R, Masuda H, Arita K, Dewi S, Jitsukawa S, Fujimura S, Asahara T, Mizuno Simple, easy, and effective vascular and tissue regenerative therapy for diabetic patients by quality and quantity culture of peripheral blood mononuclear cells. *World Stem Cell Summit 2013* (San Diego, USA, 2013)

5.Tanaka R, Arita K, Jitsukawa S, Ishihara H, Hirano R, Okada K, Mizuno H Novel methodology using diabetic peripheral blood stem cells for effective tissue regeneration

6.田中里佳、有田佳代、實川佐智恵、平野理恵、石原久子、岡田佳代子、増田浩史、浅原孝之、水野博司 Simple, Easy and Effective な自己末梢血血管幹細胞による新・血管治療の開発 第6回日本創傷外科学会 (2013 年 京都)

G 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称 : 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 2 0 1 2 - 2 1 8 2 0 6、

P C T 出願番号 : P C T / 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

