

201406017A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

再生医療実用化研究事業

「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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浅原 孝之

平成 27 (2015) 年 3 月

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浅原 孝之

平成 27 (2015) 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）	10
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）	21
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）	25
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

# I . 総括研究報告

（総括・分担）研究報告書

「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：**本プロジェクト事業は、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ものである。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してきた。H26年度の目標は、①再生アソシエイト細胞の *in vivo* および *in vitro* での免疫寛容作用の証明、②確立したヒト・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治療実験への応用開発と、③臨床検体での再生アソシエイト細胞培養データの集積である。同種同系移植実験から同種異系移植実験へと移行し、再生アソシエイト細胞の血管再生・抗炎症効果とともに免疫寛容作用が確認され、他の研究結果も合わせ、今年度の目標はほぼ達成している。来年度には、この移植実験を同種異系 iPS 細胞由来細胞移植実験に発展させていく。

**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）

果を検討した。Stimulator 細胞としてドナー C57BL/6 マウスの脾臓細胞（SPCs）、Responder 細胞としてレシピエント BALB/c マウス SPCs から CD4+/CD25-細胞、及び Treg（CD4+/CD25+細胞）を採取し、同種異型細胞混合による免疫賦活に対する Treg の免疫抑制効果を判定する。

**A. 研究目的**

平成26年度は、再生アソシエイト細胞の *in vivo* および *in vitro* での免疫寛容作用の証明、確立したヒト・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治療実験への応用開発、同種同系移植実験から同種異系移植実験への移行、臨床検体における培養データの集積などが研究目的である。

**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**

【①-1】*in vitro* 免疫抑制効果の判定（東海大学）

*in vitro* 制御性 T 細胞（Treg）抑制アッセイによる再生アソシエイト細胞の免疫活性化抑制効

【①-2】マウス同種異系移植実験

(A) マウス再生アソシエイト細胞培養条件の最適化（東海大学）

C57BL/6 及び BALB/c マウスの SPCs 及び末梢血液単核球（MNCs）を採取し、培養期間・培養方法などを比較するための再生アソシエイト細胞培養（QQ 培養）を実施し、FACS 試験・EPC コロニー試験などにより、免疫細胞分画・血管再生能・マクロファージ型などを判定した。

(B) 骨格筋移植モデルの確立（東海大学）

C57BL/6 マウスから外側腓腹筋（GCM）を摘出し、同部位 GCM を摘出したレシピエントの野生型 C57BL/6 マウスへ同所性に GCM を移植し、組織生着の判定方法を確立した。さらに、C57BL/6 マウスからの培養再生アソシエイト細胞（QQ 細胞）の投与アプローチにおける移植片生着への

局所性貢献を確認するために、各移植アプローチ（尾静脈内投与、腹腔内投与、移植片近隣局所移植）を検討した。

(C) 同種異系骨格筋移植モデル実験（東海大学）  
移植用ドナー筋肉組織片を C57BL/6 マウスから摘出し、レシピエント BALB/c マウスの同部位に移植し、野生型 BALB/c マウスの SPCs より培養した再生アソシエイト細胞 (QQ 細胞) の同時移植の有無で、生着移植片を定量的及び定性的に評価した。

(D) 同種同系皮膚潰瘍移植モデル実験（順天堂大学）  
C57BL6J マウス末梢血から MNC を採取し培養再生アソシエイト細胞を作成。潰瘍モデル BALB/C マウスに移植し同種異系潰瘍移植実験による細胞生着率、創傷治癒効果、血管新生を検証した。

## 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（大阪大学）

### 【②-1】同種異系 iPS 細胞移植実験

蛍光色素である Luciferase を恒常的に発現する BL6/J マウスの線維芽細胞由来の未分化 iPS 細胞をマウス腹部皮下に移植するモデルを作成し、再生アソシエイト細胞が移植された iPS 細胞の生存に与える影響を経時的に観察した。レシピエント側として、同種同系となる BL6/J マウスを Positive Control とし、同種異系である BALB/C マウスを対象として、BALB/C マウス由来の再生アソシエイト細胞混入の効果を検討した。IVIS を用いて移植細胞の残存を定量的に評価するとともに、再生アソシエイト細胞の同時移植が iPS 細胞の生存に与える影響を評価した。さらに、マウスの iPS 細胞由来心筋細胞シート of 左心室表面への移植モデルを作成し、IVIS による移植細胞の生存を測定した。

【②-2】 $[^{18}\text{F}]$ -DPA714-PET による同種異系細胞移植による免疫拒絶反応評価の確立

臓器移植においては移植片にたいする免疫拒絶反応は、主に移植片の機能および組織所見により評価され、免疫抑制療法の適正化が図られる。しかしながら、細胞移植においては、特に心臓へ移植された細胞の病理診断を行うことは困難であることから、組織診断に変わる免疫拒絶反応の評価法の確立が重要である。ここでは、活性型マクロファージを特異的に描出することが証明されている  $[^{18}\text{F}]$ -DPA714-PET 法を用いて、細胞移植における免疫拒絶反応が経時的に評価できるか否かを検証した。

Luciferase 発現 iPS 細胞由来心筋細胞を細胞シート化し、マウス左心室表面に移植するモデルを作成して、1) シャム手術群、2) 同種同系移植群、3) 同種異系移植群の 3 群に分けて拒絶反応を経時的に評価した。

## 3. 課題③: 再生アソシエイト細胞基盤・応用研究（東海大学）

### 【③-1】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）

制御性 T 細胞、マクロファージの分化増殖に必要と考えられる増殖因子 (TGF- $\beta$ 、IL-10、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2、Prostaglandin E2、Adenosine) およびホルモン ( $\beta$ -Estradiol、Progesterone、Trans-Dehydro Androsterone、Testosterone) を加え細胞培養を行った。培養方法の評価は、細胞の増殖率、FACS による分化マーカー解析、更には、血管内皮前駆細胞のコロニーアッセイなどを用い、必要とされる細胞群の増加割合、血管内皮前駆細胞に対する影響の有無を検証した。

### 【③-2】糖尿病マウス再生アソシエイト細胞の確立（順天堂大学）

糖尿病マウスを作成し、末梢血からの培養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。

【③-3】糖尿病患者における再生アソシエイト細胞の確立（規格の設定、培養方法の確立、安全性検査）（順天堂大学）

糖尿病患者の末梢血液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。臨床研究を目的とした移植細胞の規格を決定するため FACS 解析を行い、40 例の糖尿病患者における CD34 陽性細胞と CD206 細胞の移植可能細胞比率を調べた。また、移植細胞の安全性のため造腫瘍性試験、核型試験を実施した。

#### （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

【①-1】in vitro 免疫抑制効果の判定（東海大学）

アッセイ培養上清中の TNF-alpha 及び INF-gamma 濃度の測定において、再生アソシエイト細胞由来 Treg は、非培養 SPCs の Treg と比較して、著名に Responder 細胞免疫賦活化サイトカインの発現抑制効果を認めた。結果、再生アソシエイト細胞の免疫寛容担当細胞の Treg は、質的にも、非培養 SPCs の Treg よりも、免疫抑制効果が強いと判定される。CSFE による Responder 細胞の増殖抑制効果について、現在解析中。

【①-2】マウス同種異系移植実験

(A) マウス再生アソシエイト細胞培養条件の最適化（東海大学）

(A-1) QQ 培養中の細胞数の変化

SPCs 及び MNCs からの再生アソシエイト細胞の確保について、培養期間中に採取可能な細胞数の MNCs に対する SPCs の比率は、両系統マウスで漸減するが 3 日までは 5 倍以上 SPCs が高値を示した。動物実験に利用する再生アソシエイト細胞の確保には、SPCs の方が有利であることが判明した。

(A-2) QQ 培養における細胞の経時的血管再生能

EPC-CFA によるコロニー産生性 EPC 数評価による血管再生能評価において、両系統マウスの総 EPC コロニー産生能は、SPCs、MNCs とともに漸増し、SPCs の方が MNCs よりも高かった。両系統マウスともに SPCs 及び MNCs において、day3 までは血管再生能は漸増することが判明した。

(A-3) QQ 培養における細胞の経時的サイトカイン産生能

再生アソシエイト細胞の QQ 培養期間各時点における抗炎症・免疫寛容機能サイトカイン

(IL-10) 及び炎症性・免疫賦活性サイトカイン (TNF- $\alpha$ ) の産生を CBA 法により測定したところ、SPC 再生アソシエイト細胞において、IL-10 発現は day3 まで培養前細胞の 30 倍以上に増加した。

QQ 培養においては、SPCs は、MNCs に比較して抗炎症・免疫寛容作用を有する IL-10 の産生が高く、day3 SPCs は MNCs よりも再生アソシエイト細胞源として優れている可能性がある。

(A-4) SPCs 由来再生アソシエイト細胞の含有細胞群評価

炎症性・免疫賦活性マクロファージ (M1) 及び抗炎症・免疫寛容性マクロファージ (M2) の細胞分画を CD206<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>細胞及び CD206<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>細胞にて分画し、培養細胞中の含有率で算出したところ、M2 マクロファージの含有率は、C57BL/6 マウスで培養前細胞に比較して漸増し、day3 で 17 倍に増加した。BALB/c マウスでは、day3 以降、培養前細胞の 5 倍以上に増加した。制御性 T 細胞の含有率は、C57BL/6 マウスで漸増し、BALB/c マウスでは day3、day5 では day2、day4 よりも減少したが、培養前細胞中の含有率との比較では、2.4 倍、5.7 倍と増加した。SPCs の再生アソシエイト細胞の抗炎症・免疫寛容機能は day3 が高いと考えられる。

(B) 骨格筋移植モデルの確立 (東海大学)

同種同系マウスにおける外側腓腹筋 GCM 移植モデルの確立を行った。4 週目において移植 GCM 組織片が肉眼的にも、組織学的にも確認された。いずれの QQ 細胞移植方法においても、QQ 細胞が移植片内に確認され、QQ 細胞の移植片の生着に影響を及ぼす可能性が示唆された。本法によって、GCM 移植による組織移植及び QQ 細胞移植モデルは確立され、同種異系移植実験に利用可能となる。

(C) 同種異系骨格筋移植モデル実験 (東海大学)

tdTomato-GCM 移植後 1 週目において、移植片生着を観察したところ、再生アソシエイト細胞との共移植群において、GCM 移植片単独群及び非培養 SPCs 共移植群に比較して蛍光移植筋肉束が多く認められた。また、画像解析ソフトで定量的に評価したところ、tomato の蛍光陽性面積及び蛍光陽性領域の平均輝度において、GCM 移植片及び再生アソシエイト細胞の共移植群が、GCM 移植片及び間葉系幹細胞共移植群とともに高値を示した。HE 染色における GCM 移植片組織像の観察では、GCM 移植片単独及び SPCs 共移植群に比較して、GCM 移植片及び再生アソシエイト細胞の共移植群における浸潤細胞が少なく観察された。現在浸潤細胞の組織学的評価を進めている。再生アソシエイト細胞が異系マウスの移植組織片に対する免疫拒絶を抑制し、その生着に貢献したと考えられる。

(D) 同種同系皮膚潰瘍移植モデル実験 (順天堂大学)

GFP 陽性の C57BL/6J マウス再生アソシエイト細胞を同種異系である BALB/c マウス潰瘍モデルに移植し、潰瘍作成後 Day1, Day3, Day5, Day7, Day10, Day14 における局所の細胞生着率と創傷治癒効果、血管新生効果を評価した。C57BL/6J マウス再生アソシエイト細胞は移植後 7 日目まで潰瘍組織に生着していたが、移植後 14 日目の潰瘍組織に移植細胞は認められなかった。しかし、同種異系細胞の再生アソシエイト細胞を移植した群のほうが PBS 移植のコントロールに比べ高い潰瘍縮小率と組織再生効果を示したことから同種異系細胞の再生アソシエイト移植は創傷治癒に対する効果が認められることが証明できた。

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 (大阪大学)



### 【②-1】同種異系 iPS 細胞移植実験

再生アソシエイト細胞が他家移植された未分化 iPS 細胞の生存を向上させた。

IVIS での測定結果では、同種同系モデルにおける蛍光信号が次第に強くなるのに対して、同種異系モデルにおいては、7 日後以降次第に蛍光信号が減弱することが示された。一方、同種異系モデルに、再生アソシエイト細胞を混入させた群においては、同種同系ほどではないものの蛍光信号が維持された。同種異系移植によって生じる拒絶反応を、再生アソシエイト細胞が抑制することが示唆された。

### 【②-2】 $[^{18}\text{F}]$ -DPA714-PET による同種異系細胞移植による免疫拒絶反応評価の確立

活性型マクロファージを特異的に描出することが証明されている $[^{18}\text{F}]$ -DPA714-PET 法を用いて、細胞移植における免疫拒絶反応が経時的に評価できるか、1) シャム手術群、2) 同種同系移植群、3) 同種異系移植群の 3 群に分けて拒絶反応を経時的に評価した。

結果、シャム手術群ならびに同種同系移植群が、第 1 日に比べて第 7 日において、PET 法での SUV max に変化が見られないのに対して、同種異系移植軍医においては、SUV max の増強が見られた。

さらにこの SUV max は、摘出心の線量 (ARG) と有意な相関を認めた。また、第 7 日に摘出した心臓の病理組織標本において、同種異系移植群に CD68 陽性マクロファージの集積が見られた。以上より、 $[^{18}\text{F}]$ -DPA714-PET 法は細胞移植における拒絶反応の定量的評価に有用であることが示唆された。

## 3. 課題③: 再生アソシエイト細胞基盤・応用研究

### 【③-1】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)

#### A) 増殖因子添加による効果検証

6つの増殖因子(TGF- $\beta$ 、IL-10、Angiopoietin-1、Angiopoietine-2、Prostaglandin E2、Adenosine)において、Totalの細胞増殖への効果は(図12A)、増殖因子無添加群と有意差は見いだせなかった。FACSによる分画別の解析を行ったところ、M2-マクロファージ分画において、TGF- $\beta$ は、増殖抑制に働き、残りの5因子では、添加したDoseにもよるが増殖促進に働いていることが顕著に判明した。ただしEPCマーカーではTGF- $\beta$ は、わずかに増殖促進に働いていた。

#### B) ホルモン添加による効果検証

4つの性ホルモン( $\beta$ -Estradiol、Progesterone、Trans-Dehydro Androsterone、Testosterone)において、Totalの細胞増殖への効果は、10uMの $\beta$ -Estradiol、Progesterone添加群で細胞増殖が抑制され、10nMの $\beta$ -Estradiol、Progesterone添加群で細胞増殖がわずかに促進された。また、1nM-Testosterone添加群で細胞増殖が促進される傾向にあり、10nMを超えると、細胞増殖を阻害していた。一方、Trans-Dehydro Androsterone、添加群では、細胞増殖への顕著な効果は確認できなかった。

### 【③-2】糖尿病マウス再生アソシエイト細胞の確立(順天堂大学)

糖尿病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判明した。糖尿病マウス末梢血単核球は培養を行うことで培養前の健常マウスに比べ有意に血管再生能の回復を示した。

### 【③-3】糖尿病患者における再生アソシエイト細胞の確立(規格の設定、培養方法の確立、安

全性検査) (順天堂大学)

40例のDM患者において再生アソシエイト細胞の組成を調べた結果、CD34陽性細胞が平均1.85%、CD206細胞が平均13.9%であった。これらの値は健常人比べ低下していたが、培養前と比べ有意に高くなっていた。臨床研究における細胞移植の規格として、CD34陽性細胞は0.1%以上、CD206陽性細胞は1%以上とした。Hera細胞と比較した造腫瘍性試験と実施したが、ヒト再生アソシエイトによる造腫瘍性試験は陰性であり、核型試験においても染色体異常を示す結果は得られなかった。昨年度実施した、ヒト再生アソシエイト細胞のヌードマウス潰瘍モデルに対する創傷治癒効果の結果を踏まえると、ヒト同種再生アソシエイト細胞移植は安全であり、高い創傷治癒効果を示すことが明らかになった。

#### D. 考察

本年度の成果は、【別添図】にまとめた。

その中で次の3点は、本プロジェクトを完成させるために大変重要である。

①in vivo 同種異系 (アロ) 移植において、再生アソシエイト細胞の免疫寛容効果を確認できた。②iPS 細胞組織移植における再生アソシエイト細胞移植効果の実験方法を確立出来た。③糖尿病患者でも、再生アソシエイト細胞培養により血管再生能力を確保できる。

特に、①の in vivo 同種異系 (アロ) 移植において、再生アソシエイト細胞の免疫寛容効果を確認できたことは、本プロジェクトの中で最も証明が求められていた治療効果に直結する所見を得られたことになる。当然次年度は同種異系 iPS 細胞由来心筋シート移植における再生アソシエイト細胞移植の効果判定を行う予定であり、このために②の移植実験技術の確立は重要である。

また、再生アソシエイト細胞の移植方法についても検討したが、骨格筋移植の例では、局所・

全身投与とともに同等の効果が確認された。しかし治療方法によって、再生アソシエイト細胞の移植方法は精密に検討が必要と思われ、心筋シートの場合の投与方法について、大阪大学チームと検討中である。

もう一点大切なことは、③の糖尿病患者でも本培養法が安定して効果を発揮できることにある。少なくとも動物の糖尿病モデルでの再生アソシエイト細胞、あるいは糖尿病患者再生アソシエイト細胞で血管再生効果が確認できた。順天堂大学では、細胞培養センターで本細胞群の培養を開始し、血管再生作用を利用した難治性潰瘍への臨床移植研究が開始された。しかし本プロジェクトにとっては、臨床検体での免疫寛容作用を示せたわけではないので、今後の臨床実験でのデータでの証明が必要で、来年度の課題となる。

成果はこれだけでなく、in vitro 免疫寛容効果も確認できるようになった点も重要である。再生アソシエイト細胞の in vitro 実験系の確立は予想外に難航していたが、移植時の免疫賦活作用を抑制する効果を、定量的及び定性的に評価できる目処がたち、次年度には必要なデータを揃えることが可能である。

#### E. 結論

in vivo 同種異系 (アロ) 移植における再生アソシエイト細胞の免疫寛容効果、iPS 細胞組織移植における再生アソシエイト細胞移植効果の実験方法の確立、糖尿病患者での再生アソシエイト細胞培養の確認、in vitro 免疫寛容判定が進められ、目標は達成された。同種異系移植実験の成果を iPS 細胞由来心筋シート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, Tanaka R, Fujimura S, Ishikawa M, Akimaru H, Shizuno T, Sato A, Okada Y, Iida Y, Itoh J, Itoh Y, Kamiguchi H, Kawamoto A, Asahara T. 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 the American Heart Association*. 2014;3:e000743
2. Kuroda R, Matsumoto T, Niikura T, Kawakami Y, Fukui T, Lee SY, Mifune Y, Kawamata S, Fukushima M, Asahara T, Kawamoto A, Kurosaka M., Local Transplantation of Granulocyte Colony Stimulating Factor-Mobilized CD34+ Cells for Patients With Femoral and Tibial Nonunion: Pilot Clinical Trial. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Jan;3(1):128-34.
3. Fujita Y, Kinoshita M, Furukawa Y, Nagano T, Hashimoto H, Hirami Y, Kurimoto Y, Arakawa K, Yamazaki K, Okada Y, Katakami N, Uno E, Matsubara Y, Fukushima M, Nada A, Losordo DW, Asahara T, Okita Y, Kawamoto A., Phase II Clinical Trial of CD34+ Cell Therapy to Explore Endpoint Selection and Timing in Patients With Critical Limb Ischemia. *Circ J*. 2014 Jan 24;78(2):490-501. Epub 2013 Nov 21.
4. Masuda H, Asahara T. Clonogenic Isolation of Colony-forming Endothelial Progenitor Cells. *Manual of Research Techniques in Cardiovascular Medicine*, published from Willey Blackwell, 2014 p.71-93
5. Tanaka R, Masuda H, Kato S, Imagawa K, Kanabuchi K, Nakashioya C, Yoshiba 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 Transplant*. 2014;23:167-179
6. Obi S, Masuda H, Akimaru H, Shizuno T, Yamamoto K, Ando J, Asahara T. Dextran induces differentiation of circulating endothelial progenitor cells. *Physiological reports*. 2014;2:e00261
7. Lee SH, Lee JH, Asahara T, Kim YS, Jeong HC, Ahn Y, Jung JS, Kwon SM. Genistein promotes endothelial colony-forming cell (ecfc) bioactivities and cardiac regeneration in myocardial infarction. *PLoS One*. 2014;9:e96155
8. Nakamura T, Torimura T, Iwamoto H, Kurogi J, Inoue H, Hori Y, Sumie S, Fukushima N, Sakata M, Koga H, Abe M, Ikezono Y, Hashimoto O, Ueno T, Oho K, Okamura T, Okuda S, Kawamoto A, Ii M, Asahara T, Sata M. Cd34 cell therapy is safe and effective in slowing the decline of hepatic reserve function in patients with decompensated liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014
9. Kuroda R, Matsumoto T, Niikura T, Kawakami Y, Fukui T, Lee SY, Mifune Y, Kawamata S, Fukushima M, Asahara T, Kawamoto A, Kurosaka M. Local transplantation of granulocyte colony stimulating factor-mobilized cd34+ cells for patients with femoral and tibial nonunion: Pilot clinical trial. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3:128-134

10. Fukui T, Mifune Y, Matsumoto T, Shoji T, Kawakami Y, Kawamoto A, Ii M, Akimaru H, Kuroda T, Horii M, Yokoyama A, Alev C, Kuroda R, Kurosaka M, Asahara T. Superior potential of cd34-positive cells compared to total mononuclear cells for healing of nonunion following bone fracture. *Cell Transplant*. 2014
11. Fujita Y, Kinoshita M, Furukawa Y, Nagano T, Hashimoto H, Hiramami Y, Kurimoto Y, Arakawa K, Yamazaki K, Okada Y, Katakami N, Uno E, Matsubara Y, Fukushima M, Nada A, Losordo DW, Asahara T, Okita Y, Kawamoto A. Phase ii clinical trial of cd34+ cell therapy to explore endpoint selection and timing in patients with critical limb ischemia. *Circ J*. 2014;78:490-501
12. Fadini GP, Ferraro F, Quaini F, Asahara T, Madeddu P. Concise review: Diabetes, the bone marrow niche, and impaired vascular regeneration. *Stem Cells Transl Med*. 2014
13. Kwon SM, Lee JH, Lee SH, Jung SY, Kim DY, Kang SH, Yoo SY, Hong JK, Park JH, Kim JH, Kim SW, Kim YJ, Lee SJ, Kim HG, Asahara T. Cross talk with hematopoietic cells regulates the endothelial progenitor cell differentiation of cd34 positive cells. *PLoS One*. 2014;9:e106310
- 発明者：浅原孝之、増田治史、田中里佳  
本年度、国内国外移行手続き（USA, EU, China, India）

#### 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

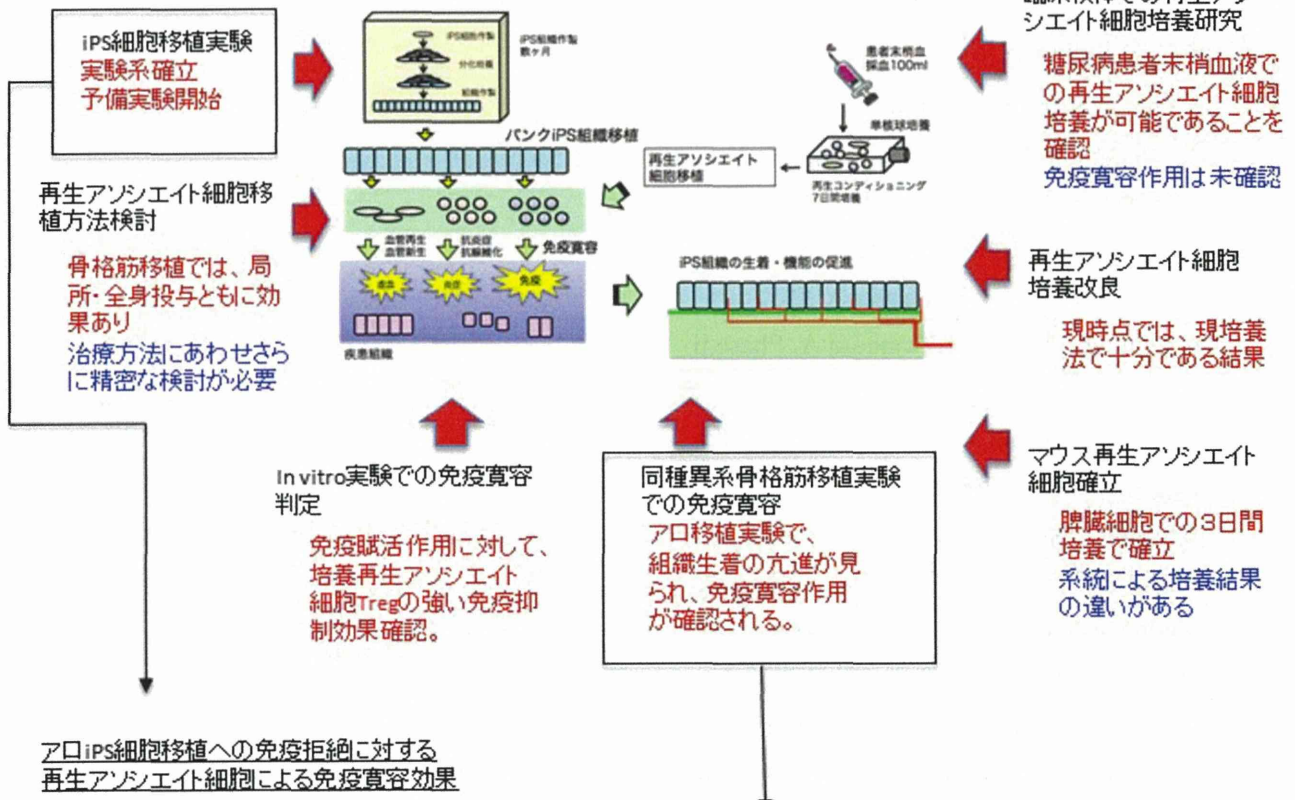
PCT 出願番号：PCT/JP2013/76618

国際出願日：2013年9月30日（基礎出願日：2012年9月28日）

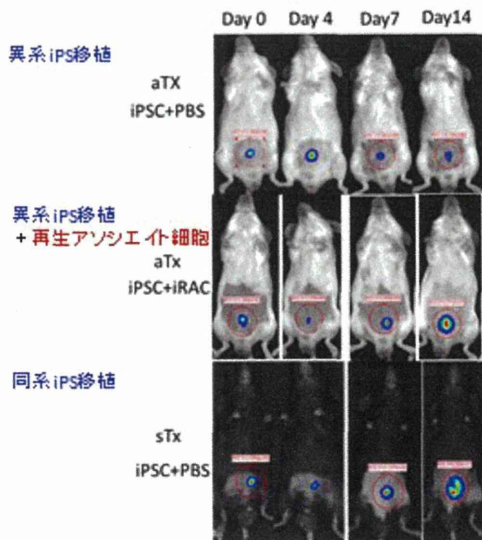
平成26年度・成果のまとめ

平成25年度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）

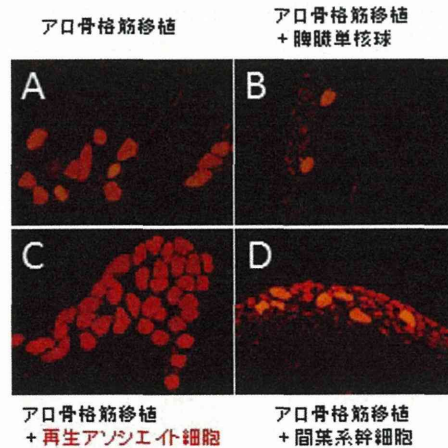
「再生アソシエイト細胞によるiPS細胞移植時の免疫寛容治療研究」



アロiPS細胞移植への免疫拒絶に対する再生アソシエイト細胞による免疫寛容効果



アロ骨格筋移植への免疫拒絶に対する再生アソシエイト細胞による免疫寛容効果



# I . 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：**再生アソシエイト細胞の免疫寛容機能を検証することを目的として、1) 同種移植実験のためのマウス再生アソシエイト細胞の抗炎症・免疫寛容機能および血管再生能を細胞生物学的に検証し、培養条件（採取細胞、培養期間）を至適化した。2) 同種異系マウス組織移植の可否を判定する為に、外側腓腹筋の同所性移植モデルを確立し、異系ドナー（C57BL/6）マウス外側腓腹筋移植における、レシピエント（BALB/c）マウス再生アソシエイト細胞による筋移植片生着促進効果を解析し、免疫抑制効果による異系（アロ）組織生着を確認した。3) in vitro 制御性 T 細胞免疫抑制アッセイにより、再生アソシエイト細胞の免疫抑制効果を判定している。以上から、再生アソシエイト細胞培養における至適化により移植組織に対する免疫拒絶抑制効果を証明した。さらに、血管再生・抗炎症細胞とともに免疫寛容細胞がより活性化される培養系に仕上げるために、再生アソシエイト細胞培養に対する各種のサイトカイン・ホルモン・その他因子の効果を検討中であり、実験経過を報告する。

**A. 研究目的**

- 1) マウス再生アソシエイト細胞の抗炎症・免疫寛容効果における培養条件（採取細胞、培養期間）細胞生物学的至適化を行う。
- 2) 同種異系マウスの骨格筋移植モデルを確立し、1) に基づく、レシピエントマウス再生アソシエイト細胞の免疫拒絶抑制効果を検証する
- 3) in vitro 制御性 T 細胞免疫抑制アッセイにより、再生アソシエイト細胞の免疫抑制効果を判定する
- 4) 再生アソシエイト細胞培養に対する各種のサイトカイン・ホルモン・その他因子の効果を細胞生物学的に解析する

**B. 研究方法**

1) マウス再生アソシエイト細胞培養条件の至適化

10～12 週齢♂の C57BL/6 及び BALB/c マウスの脾臓及び心腔採血した血液から、脾臓細胞（splenocytes= SPCs）及び単核球(mononuclear cells= MNCs)を採取し、再生アソシエイト細胞培養(Quality and Quantity 培養= QQ 培養)を実施した。培養液は、SCF100ng/mL、VEGF 50ng/mL

、TPO 20ng/mL、Flt-3 ligand 100ng/mL、IL-6 20ng/mL（Peprotec）の 5 つの成長因子を添加した StemLine II（Sigma Aldrich）を用いた。SPCs 及び MNCs は、6well plate 培養器を用いて  $2 \times 10^7/2 \text{ mL/well}$ 、 $2 \times 10^6/2 \text{ mL/well}$  の細胞密度で 5 日まで培養した。培養開始 1 日毎に細胞を採取し、未分化性血管内皮前駆細胞コロニー産生アッセイ (endothelial progenitor cell colony forming assay= EPC-CFA) 及び分化型コロニー非形成性 EPC 培養アッセイによる血管再生能評価、flow cytometry による細胞群の特定及び含有率評価、また、Cytometric Beads Array (CBA) により細胞が産生するサイトカイン評価を実施した。これらの評価系により、至適培養期間を決定した。

2) マウス組織移植モデルの確立

同種異系マウスにおける組織移植モデルを確立することを目的として、先ず、同種同系組織移植モデルの移植片生着実験を実施した。イソフルラン吸入麻酔下に、10～12 週齢♂のドナーの tdTomato-C57BL/6 マウスから外側腓腹筋 (tdTomato-GCM) を摘出し、同部位 GCM を摘

出したレシピエントの野生型 C57BL/6 マウスへ同所性に tdTomato-GCM をした。さらに、EGFP-C57BL/6 マウスから至適培養期間にて培養した再生アソシエイト細胞(QQ細胞)の投与アプローチにおける移植片生着への局所性貢献を確認するために、QQ細胞の移植アプローチ(尾静脈内投与、腹腔内投与、移植片近隣局所移植)を検討した。QQ細胞移植は、GCM移植近隣局所に4カ所(1x10<sup>5</sup>細胞/40 uL Hanks Balance Salt Slution 培地/匹)実施した。4週目に安楽屠殺後、蛍光顕微鏡で移植片の生着を観察した。以上の同種同系マウス間での組織移植モデル、細胞移植モデルの確立を基盤にして、以下の同種異系マウス間での同様の実験を実施した。

### 3) 同種同系組織移植モデルにおける QQ 細胞移植による免疫拒絶抑制効果

10~12 週齢♂の tdTomato-C57BL/6 マウスから GCM を摘出し、移植用ドナー筋肉組織片とした。また、レシピエントとして BALB/c マウスの同部位外側腓腹筋を摘出した。ドナー tdTomato-GCM を同所性に BALB/c マウスに移植し、同種異系マウス組織移植モデルとした。さらに、野生型 BALB/c マウスから採取した SPCs を至適培養期間にて培養した再生アソシエイト細胞(QQ細胞)を移植直後、1週、2週目に移植 GCM 近隣局所に2)と同様に移植した。培養1週間後にレシピエントマウスを安楽屠殺し、移植片生着を蛍光顕微鏡にて観察し、生着移植片を定量的に評価した。

4) *in vitro* 制御性 T 細胞免疫抑制アッセイ  
*in vitro* 制御性 T 細胞抑制アッセイによる再生アソシエイト細胞の免疫活性化抑制効果を検討した。Stimulator 細胞としてドナーC57BL/6 マウスの SPCs を採取し、マイトマイシン (MMC) 処理を施した(10%FBS-RPMI1640 培地 1 mL 当たり 1x10<sup>7</sup> 個の細胞懸濁液に 60 μg/mL の MMC を添加し 30 分、37°C インキュベーション)。

Treg isolation kit (Miltenyi Biotec)を用いて、レシピエントの BALB/c マウス SPCs から Responder 細胞(CD4+/CD25-細胞)及び Treg (CD4+/CD25+細胞)を単離した。予め、BALB/c マウス SPCs の3日間の QQ 培養にて調整した再生アソシエイト細胞から、同様に、Responder 細胞(CD4+/CD25-細胞)及び Treg (CD4+/CD25+細胞)を単離した。Responder 細胞(CD4+/CD25-細胞)を終濃度 4 μM の CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester)にて染色した。

96well の U 型細胞培養プレートに、50 μM β-メルカプトエタノール添加 10%FBS-RPMI1640 培地 200 μL/well 当たり、Stimulator 細胞 1x10<sup>5</sup> 個、Responder 細胞 2.5x10<sup>4</sup> 個入るよう調整した。さらに、BALB/c マウスの SPCs または再生アソシエイト細胞(QQ 培養 SPCs)から単離した Treg を Responder 細胞(2.5x10<sup>4</sup> 個/well)に対して 1/16、1/32 個ずつ入るよう連続希釈にて調整した。以上の細胞調整後、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 72 時間培養した。培養細胞中 Responder 細胞(CD4+/CD25-細胞)の増殖(免疫賦活)について、CFSE の減衰率を Flow cytometry(Verse™, BD) 及び FlowJo(Tomy)を用いて測定し、また、培養上清を採取して、CBAにて INF-gamma 及び INF-alpha の測定を実施し免疫活性の評価を行った。

### 5) 各種因子の再生アソシエイト細胞培養への効果

血管内皮前駆細胞を高効率で体外増殖させる事の出来る培養方法(以下 QQ 培養)をベースとし、マクロファージ、制御性 T 細胞の分化増殖に必要なと考えられる増殖因子(TGF-β、IL-10、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2、Prostaglandin E2、Adenosine) やホルモン(β-Estradiol、Progesterone、Trans-Dehydro Androsterone、Testosterone) を加え細胞培養を行った。培養方法の評価は、細胞の増殖率、



FACSによる分化マーカー解析、更には、血管内皮前駆細胞のコロニーアッセイなどを用い、必要とされる細胞群の増加割合、血管内皮前駆細胞に対する影響の有無を検証した。

### (倫理面の配慮)

東海大学医学部動物実験委員会承認(組14-013-19)の基に、ヘルシンキ宣言を尊重して実験動物に対する十分な倫理的配慮のもとに「動物実験に関する文部科学省における取組等について」(平成18年6月1日)の法令に従った。

## C. 研究結果

### 1) マウス由来再生アソシエイト細胞培養条件の至適化

#### (1) QQ 培養中の細胞数の変化

C57BL/6 及び BALB/c マウスの SPCs 及び MNCs の QQ 培養期間において各細胞数は漸減し、両系統において SPCs の方が MNCs よりも減少率が高かった(図1)。マウス1匹当たり SPCs は約  $8 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  個、MNCs は  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  の採取細胞数であることを考慮すると、マウス1匹当たりからの採取可能な再生アソシエイト細胞数は培養3日までで、SPCs の MNCs に対する比率は、さらに4~5倍以上になる。結果的に実験に供する再生アソシエイト細胞の確保には、採取細胞の各種アッセイ実施を考慮した場合、SPCs の方が有利であることが判明した。

(2) QQ 培養における細胞の経時的血管再生能 EPC-CFA によるコロニー産生性 EPC 数評価による血管再生能評価において、両系統マウスの総 EPC コロニー産生能は、SPCs、MNCs とともに漸増し、SPCs の方が MNCs よりも高かった(図2)。QQ 培養 day3 までの血管再生能の評価では、両系統マウスともに SPCs 及び MNCs において、血管再生能は漸増することが判明した。特に、総コロニー形成性 EPC 産生能は SPCs、MNCs とともに

BALB/c において高いが、コロニー非形成性 EPC 産生能は C57BL/6 マウスにおいて高値を示した。これは、C57BL/6 マウスの方が EPC 分化度が高いことを示すことが示唆された。

#### (3) QQ 培養における細胞の経時的サイトカイン産生能

再生アソシエイト細胞の QQ 培養期間各時点における抗炎症・免疫寛容機能サイトカイン(IL-10)及び炎症性・免疫賦活性サイトカイン(TNF-alpha)の産生を CBA 法により測定した(図3)。両系統 SPCs において、IL-10 発現は、C57BL/6 マウスでは、day3 まで培養前細胞の30倍以上に増加した。両系統マウスの MNCs において、IL-10 は day2 以降に増加した(図3上段)。SPCs の TNF-alpha の発現については、培養前細胞に比較して day3 までは微増であったが、day4 以降は C57 で増加した。一方、MNCs では培養期間の day4 まで漸減した(図3中段)。

そこで、TNF-alpha 産生量に対する IL-10 産生量の比率を、QQ 培養による再生アソシエイト細胞の免疫寛容機能評価指数と定義した場合、SPCs では、両系統ともに day3 まで著増した。また、MNCs においても QQ 培養により免疫寛容機能評価指数は培養前細胞に比較して高値を示した(図3下段)。

以上、QQ 培養においては、SPCs は、MNCs に比較して抗炎症・免疫寛容作用を有する IL-10 の産生が高く、培養後期の TNF-alpha 及び INF-gamma の発現上昇による免疫賦活作用を考慮する必要があるが、SPCs は MNCs よりも再生アソシエイト細胞源として優れている可能性がある。

#### (4) SPCs 由来再生アソシエイト細胞の含有細胞群評価

炎症性・免疫賦活性マクロファージ(M1)及び抗炎症・免疫寛容性マクロファージ(M2)の細胞分

画を CD206-/CD11b+細胞及び CD206+/CD11b+細胞にて分画し、培養細胞中の含有率で算出したところ、M1 マクロファージ含有率は、C57BL/6 マウスで、培養前細胞よりも培養 day1~day3 にてほぼ変わらず、day4 以降増加した。BALB/c マウスでは、培養 day1~day3 にて低下し、day3 では 0.5 倍に減少した (図 4)。一方、M2 マクロファージの含有率は、C57BL/6 マウスで培養前細胞に比較して漸増し、day3 で 17 倍に増加した。BALB/c マウスでは、day3 以降、培養前細胞の 5 倍以上に増加した。

また、免疫寛容・抗炎症機能を有する制御性 T 細胞の含有率は、両系統マウスで漸増し、d3, d5 では、2.4 倍、5.7 倍と増加した (図 4)。以上より、SPCs の再生アソシエイト細胞の抗炎症・免疫寛容機能は day3 が高いと考えられる。

## 2) 同種同系マウス組織移植モデルの確立

同種異系マウスにおける組織移植モデルを用いた再生アソシエイト細胞の抗炎症・免疫寛容機能を評価することを目的として、先ず、同種同系マウスにおける GCM 移植モデルの確立を行った (図 5、6)。4 週目において移植 GCM 組織片が肉眼的 (図 5) にも、組織学的にも確認された (図 6)。また、いずれの QQ 細胞移植方法においても、QQ 細胞が移植片内に確認され、QQ 細胞の移植片の生着に影響を及ぼす可能性が示唆された。以上、GCM 移植による組織移植及び QQ 細胞移植モデルを確立した。

## 3) 同種異系マウス組織移植モデルにおける再生アソシエイト細胞の免疫寛容効果

確立した上記の GCM 移植モデルを用いて、同種異系の GCM 移植及び再生アソシエイト細胞の共移植による免疫寛容効果を検討する実験を実施した (図 7)。tdTomato-GCM 移植後 1 週目において、移植片生着を観察したところ、GCM 移植片及び再生アソシエイト細胞の共移植群におい

て、GCM 移植片単独群及び GCM 移植片+SPCs 移植群に比較して蛍光 tomato 陽性の筋肉束が多く認められた (図 7 a)。また、CellSens ソフトウェア (Olympus 社) により定量的に評価したところ、tomato の蛍光陽性面積及び蛍光陽性領域の平均輝度において、GCM 移植片及び再生アソシエイト細胞の共移植群が、GCM 移植片及び間葉系幹細胞共移植群とともに高値を示した (図 7 b)。HE 染色における GCM 移植片組織像の観察では、GCM 移植片単独及び SPCs 共移植群に比較して、GCM 移植片及び再生アソシエイト細胞の共移植群における浸潤細胞が少なく観察された (図 7 c)。再生アソシエイト細胞が異系マウスの移植組織片に対する免疫拒絶を抑制し、その生着に貢献したと考えられる。

## 4) 再生アソシエイト細胞の in vitro 免疫寛容効果

in vitro Treg アッセイ系培養上清中の TNF-alpha 及び INF-gamma の測定において、SPCs 由来再生アソシエイト細胞の Treg は、新鮮 SPCs の Trge に比較して、Responder 細胞の 1/16 及び 1/32 のいずれの細胞数比率においても著名にこれら免疫賦活化サイトカインの発現低下が認められた (図 8)。結果、再生アソシエイト細胞の免疫寛容担当細胞の Treg は、質的にも、新鮮 SPCs の Treg よりも、免疫抑制効果が強いと考えられる。CSFE による Responder 細胞の増殖抑制効果については、現在、解析中である。

## 5) 各種因子の再生アソシエイト細胞培養への効果

### A) 増殖因子添加による効果検証

用いた 6 つの増殖因子において、Total の細胞増殖への効果は (図 9 A)、増殖因子無添加群と有意差は見いだせなかった。しかしながら、FACS による分画別の解析を行ったところ、M2-

マクロファージ分画において、TGF- $\beta$  は、増殖抑制に働き、残りの 5 因子では、添加した Dose にもよるが増殖促進に働いていることが顕著に判明した(図 9 B)。ただし EPC マーカーでは TGF- $\beta$  は、わずかに増殖促進に働いていた。

しかし、メチルセルロースを用いたコロニーアッセイにおいては、無添加群では、コロニーが出現するのに対し、増殖因子添加群では、コロニー形成が阻害されており、さらなる検討が必要になった。

#### B) ホルモン添加による効果検証

用いた 4 つの性ホルモンにおいて、Total の細胞増殖への効果は (図 10 A)、10 $\mu$ M の  $\beta$ -Estradiol、Progesterone 添加群で細胞増殖が抑制され、10nM の  $\beta$ -Estradiol、Progesterone 添加群で細胞増殖がわずかに促進された。また、1nM-Testosterone 添加群で細胞増殖が促進される傾向にあり、10nM を超えると、細胞増殖を阻害していた。一方、Trans-Dehydro Androsterone、添加群では、細胞増殖への顕著な効果は確認できなかった。

しかし、メチルセルロース用いたコロニーアッセイにおいては (図 10 A)、10nM の Progesterone 添加群で Primitive コロニーが顕著に増え、1nM-Testosterone 添加群で Definitive コロニーが顕著に増えることが確認された。

#### D. 考察

1) マウス再生アソシエイト細胞は、SPCs を用いて調整可能であること及び培養期間は 3 日が適切であることが判明した。

2) 同種異系骨格筋組織移植及び再生アソシエイト細胞移植モデルを確立した。

3) 同種異系の骨格筋組織移植において、再生アソシエイト細胞移植は抗炎症・免疫寛容機能を発揮することが示唆され、in vitro Treg ア

ッセイ系においても再生アソシエイト細胞中の Treg がその機能に重要であることと考えられた。本年度は、以上の実験系における再現性を確認し、論文、学会発表を実施する予定である。

4) 混合培養系 (マクロファージ、制御性 T 細胞、血管内皮前駆細胞などを含む細胞群) では、単一細胞系で効果の判定を行う場合と異なり、予測の結果を大きく異なることが判明した。これは、混合培養系に用いられる細胞群が生体内で起こっているそれぞれの役割を務めるため、添加する必要性がない場合が多いと考えられる。もしくは、今回選択したものではない因子の存在を示唆するものである。

性ホルモン添加においては、Testosterone 添加群において、細胞数、およびコロニー数の増加がみられることから、Testosterone の有無が重要であると考えられる。実際、臨床からのデータにおいて、糖尿病患者や心疾患患者では、血中 Testosterone 濃度の低下が生じており、これを補てんする治療方法も行われている。このことから、血管内皮前駆細胞の分化増殖には、重要な分子であると考えられる。

#### E. 結論

マウスにおける同種異系組織移植時の免疫拒絶反応において、マウス脾臓由来再生アソシエイト細胞の抑制効果が示された。今後、組織移植慢性期において再生アソシエイト細胞の免疫抑制効果の持続効果を検証する。さらなる因子追加については、さらなる検証が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1 論文発表

1. Masuda H, Tanaka R, Fujimura S, Ishikawa M, Akimaru H, Shizuno T, Sato A, Okada Y, Iida Y, Itoh J, Itoh Y, Kamiguchi H, Kawamoto A, Asahara T. 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 the American Heart Association*. 2014;3:e000743

2. Masuda H, Asahara T. Clonogenic Isolation of Colony-forming Endothelial Progenitor Cells. *Manual of Research Techniques in Cardiovascular Medicine*, published from Willey Blackwell, 2014 p.71-93
3. 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 Transplant*. 2014;23:167-179
4. Obi S, Masuda H, Akimaru H, Shizuno T, Yamamoto K, Ando J, Asahara T. Dextran induces differentiation of circulating endothelial progenitor cells. *Physiological reports*. 2014;2:e00261

## 2 学会発表

なし。

## G.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

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

本年度、国内国外移行手続き（USA, EU, China, India）