

別添図表一覧

図 1 :

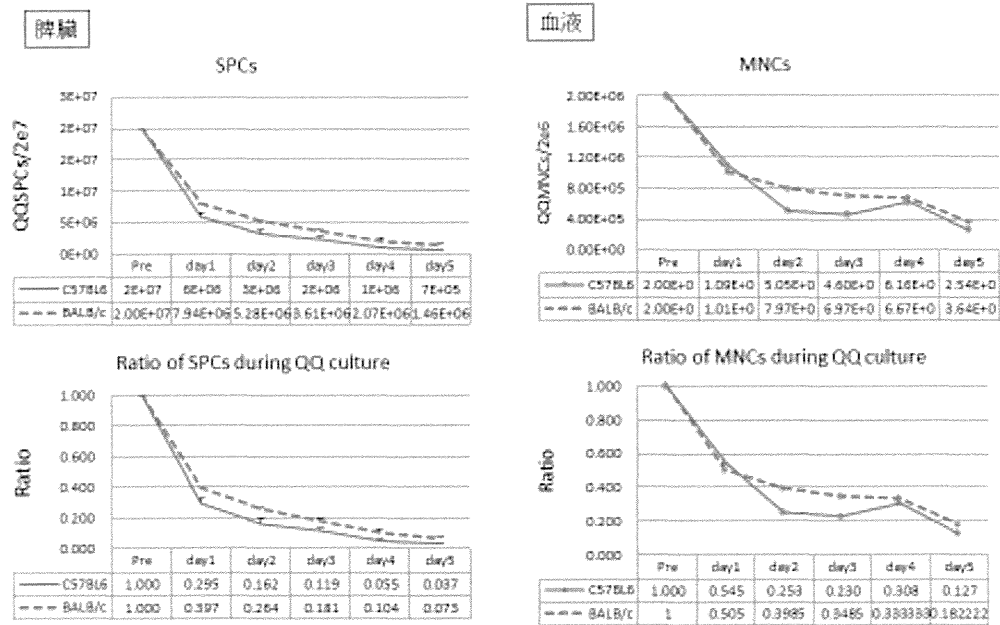


図1: C57BL/6及びBALB/cマウスの培養期間中細胞数の推移。
上段は、QQ培養中の細胞数。下段は培養開始時の細胞数に対する培養基中細胞数の比率。
SPCsは、脾臓細胞、MNCsは循環血液単核球。

図 2 :

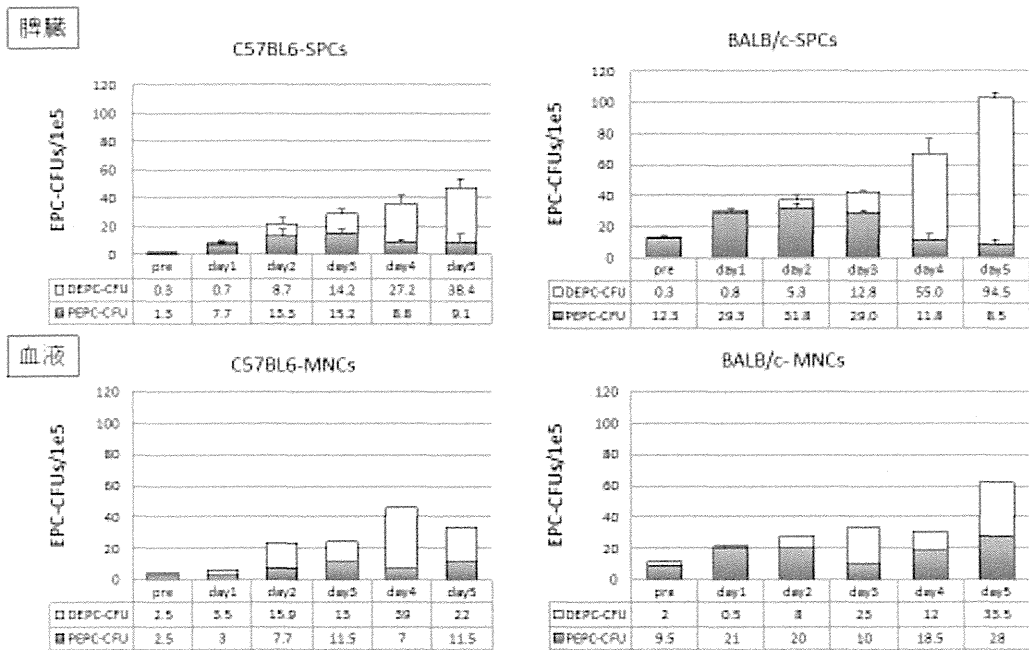


図2: 同種異系マウスにおける再生アソシエイト細胞のEPCコロニー産生細胞数。
赤: 分化型コロニー形成EPC、青: 未分化型コロニー形成EPC。
Y軸は1x10⁵個の培養細胞当たりのEPCコロニー数。

図 3 :

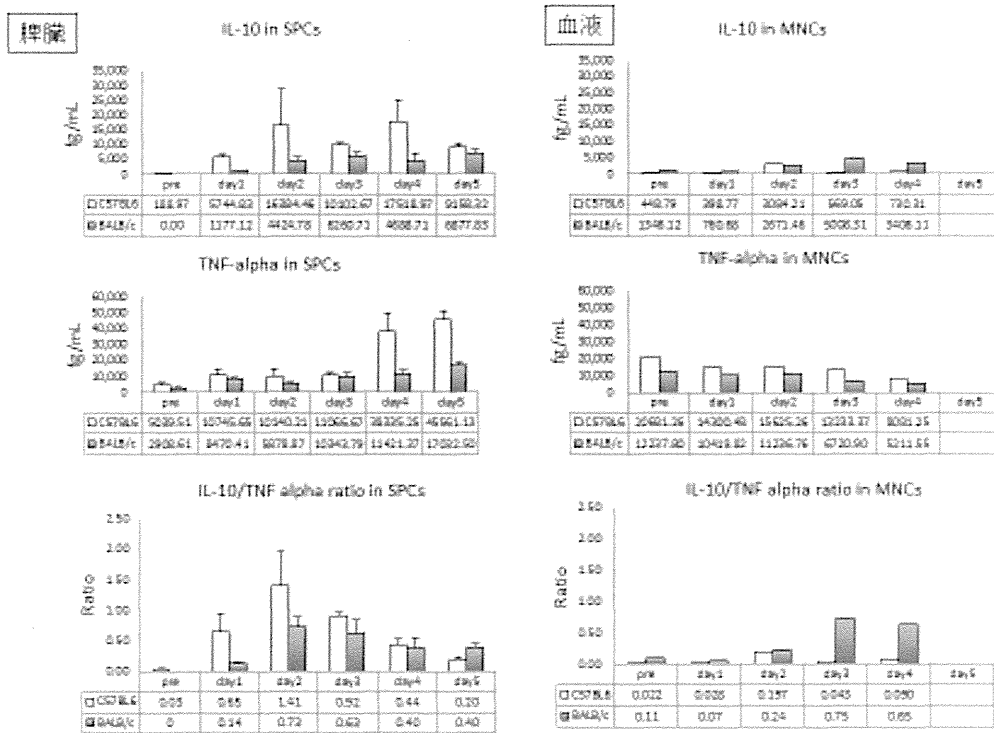


図3: 同種異系マウス再生アソシエイト細胞の培養期間中における産生サイトカイン。
左グラフ=SPCs、右グラフ=MNCs、MNCsについては、培養5日目における細胞確保が不可能で測定せず。
上段: IL-10、中段: TNF-alpha、下段: IL-10/TNF-alpha比、左列: SPCs、右列: MNCs。

図 4 :

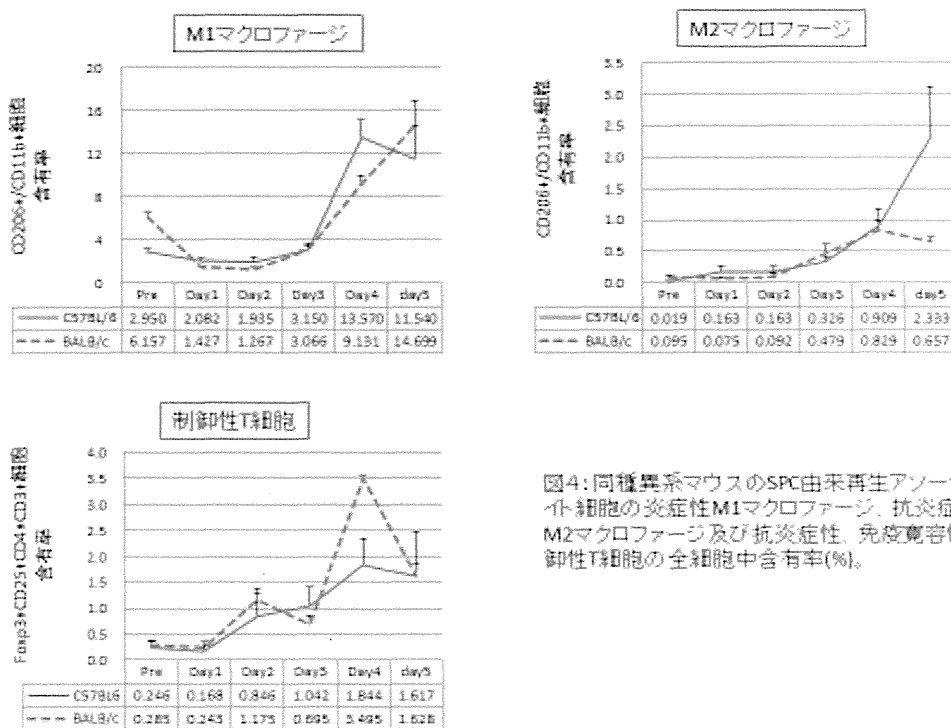


図4: 同種異系マウスのSPC由来再生アソシエイト細胞の炎症性M1マクロファージ、抗炎症性M2マクロファージ及び抗炎症性、免疫寛容性抑制性T細胞の全細胞中含有率(%)。

図 5 :

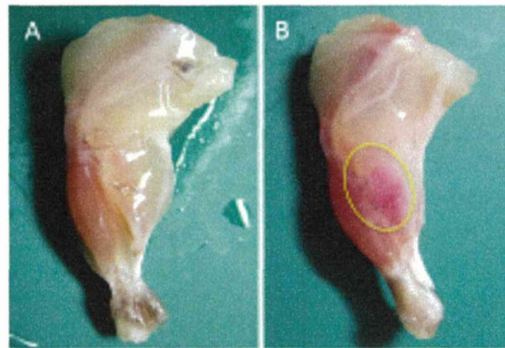


図5: 同種同系マウスにおける移植腓腹筋の生着。
tdTomato-C57BL/6マウスの外側GCMを同所性に移植した
1週間後の肉眼写真。
A: 健常下腿像, B: tdTomato-C57BL/6マウスの外側GCM
移植された野生型BALB/cマウスの下腿像。tdTomatoの赤
色GCM移植片が確認された。

図 6 :

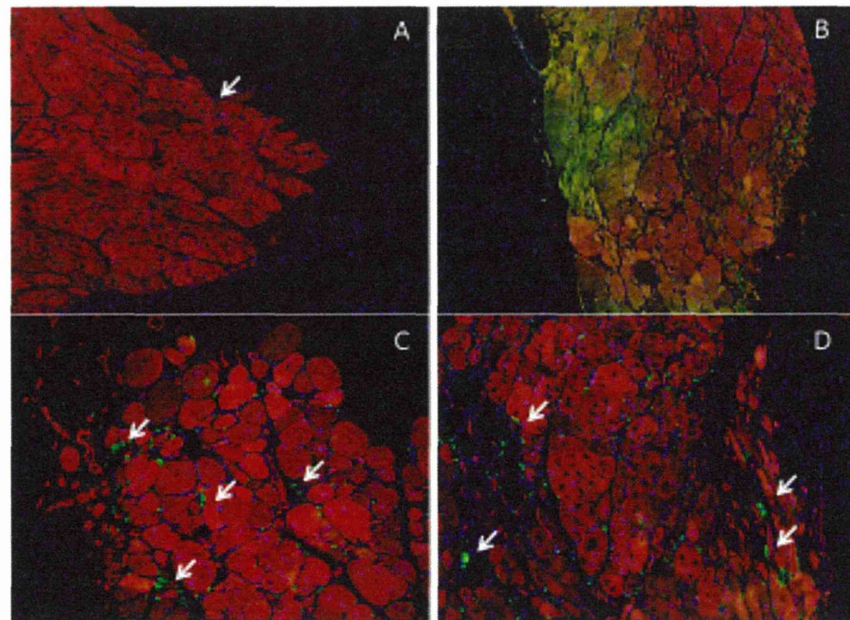


図6: 同種同系マウスにおける移植腓腹筋及び共移植した
SPC由来再生アソーシエイト細胞の局在。
tdTomato-C57BL/6マウスの腓腹筋を野生型C57BL/6マウスに移植し、eGFP-
C57BL/6マウスの再生アソーシエイト細胞を共移植した(移植細胞数= 1×10^5 /匹)。
A: 腓腹筋移植のみ, B: 腓腹筋移植及び再生アソーシエイト細胞尾静脈移植, C: 腓
腹筋移植及び再生アソーシエイト細胞腹腔内移植, D: 腓腹筋移植及び再生アソー
シエイト細胞局所移植。↓は移植した再生アソーシエイト細胞。(x10HPF)

図 7 :

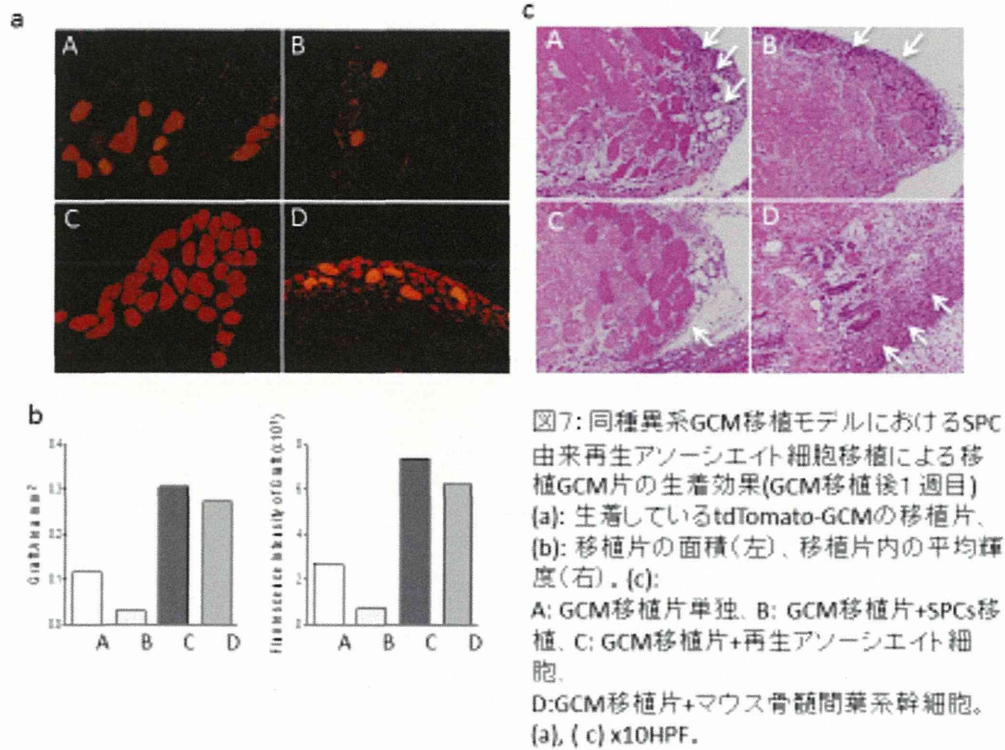


図7: 同種異系GCM移植モデルにおけるSPC由来再生アソーシエイト細胞移植による移植GCM片の生着効果(GCM移植後1週目)
(a): 生着しているtdTomato-GCMの移植片、
(b): 移植片の面積(左)、移植片内の平均輝度(右)、(c):
A: GCM移植片単独、B: GCM移植片+SPCs移植、C: GCM移植片+再生アソーシエイト細胞、
D: GCM移植片+マウス骨髄間葉系幹細胞。
(a), (c) x10HPF.

図 8 :

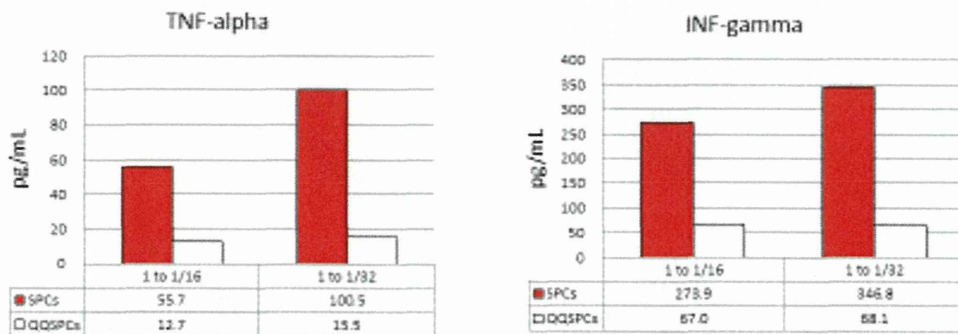


図8: in vitro抑制性T細胞抑制アッセイによる再生アソーシエイト細胞の免疫活性化抑制効果。ドナーとなるStimulator細胞(C57BL/6マウスのSPCs)によるレシピエントのResponder細胞(BALB/cマウスのCD4+/CD25-細胞)の免疫賦活反応に対するレシピエントのSPCs由来抑制性T細胞(Treg細胞: CD4+/CD25+細胞)の抑制効果をCBAにて評価した。赤: 新鮮SPCsより単離したTreg、白: QQ培養の再生アソーシエイト細胞より単離したTreg。比率は、Responder細胞数を1とした場合のTreg細胞数の割合を示す。

図 9 :

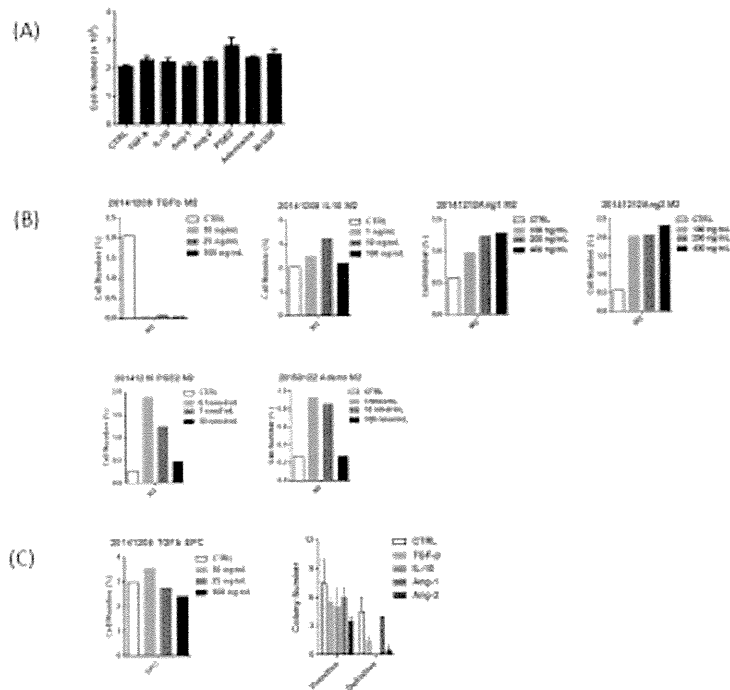


図9: 増殖因子添加による再生アソーンエイト細胞培養の検証

増殖因子の添加による、培養細胞総数 (A)、および濃度によるM2マクロファージ数 (B)、EPCコロニー数 (C) を解析した。

図 10 :

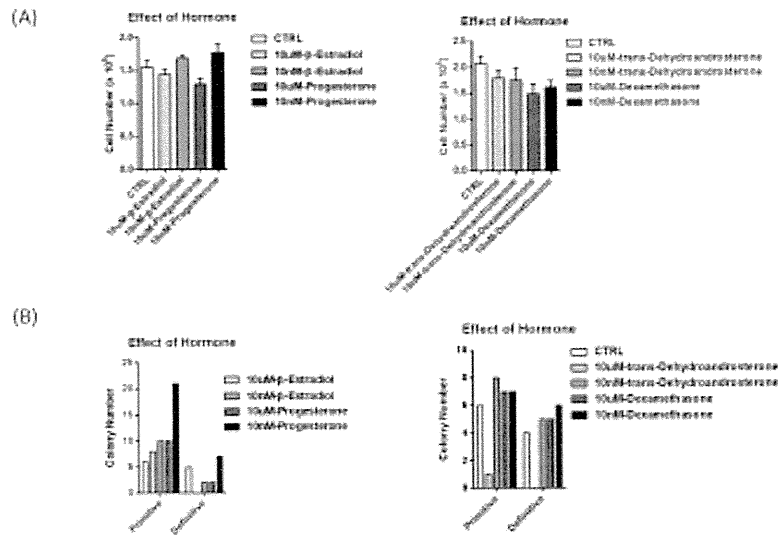


図10: ホルモン添加による再生アソーンエイト細胞培養の検証

ホルモンの添加による、培養細胞総数 (A)、およびEPCコロニー数 (B) を解析した。

「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：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 IVIS によるイメージング法により経時的に観察した。結果、自己再生アソシエイト細胞を混入させた群において、移植された他家 iPS 細胞の生存が延長されることが示唆された。さらに、心臓へ移植された他家 iPS 細胞由来心筋細胞シートに対する免疫拒絶反応が、 $[^{18}\text{F}]$ -DPA714-PET 法を用いて経時的に評価できるか否かを検証した。結果、移植された他家 iPS 細胞由来心筋細胞シートに対する拒絶反応をこのイメージング技術を用いて経時的かつ定量的に評価できることが確認された。以上、マウスモデルを用いて、再生アソシエイト細胞の混合移植が他家 iPS 細胞由来心筋細胞シート移植に与える免疫的影響を最新のイメージング技術を駆使して検証する基盤技術を確立した。

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・他家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

マウスの未分化 iPS 細胞の移植モデルを作成し、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の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とともに $[^{18}\text{F}]$ -DPA714-PET を用いて拒絶反応をイメージングし評価した。

【1】 Luciferase 発現 iPS 細胞由来心筋細胞の作成とマウス心臓表面への移植

BL6/J マウス線維芽細胞より樹立された iPS 細胞に virus vector を用いて Luciferase 遺伝子を導入した。これを以下の培養プロトコルを用いて、心筋細胞へと分化させた。（図：1）

この iPS 細胞由来心筋細胞のトロポニンT発現率は 90.6%であった。

この iPS 細胞由来心筋細胞を温度感応性培養皿に播種し、iPS 細胞由来心筋細胞シートを作成した。マウスを全身麻酔、気管挿管下に、左開胸し、心膜を縦切開することで左心室表面を露出させ、iPS 細胞由来心筋細胞シートを移植した。（図：2）

【2】 IVIS を用いた Luciferase 発現 iPS 細胞由来心筋細胞の描出

体重あたり 150 mg/kg の Rediject D-Luciferin Ultra Bioluminescence Substrate (PerkinElmer Inc.)を腹腔内投与し、6分後に Xenogen・IVIS Lumina II (Caliper Life Sciences)を用いて、そのシグナルを検出した。

【3】 $[^{18}\text{F}]$ -DPA714-PET

^{18}F -DPA-714, 10 MBq/0.1-0.2 mL を尾静脈より投与し、30分後から10分間、PET-CT (Inveon)にてデータの収集を行った。体重あたりの投与量 (MBq)で補正した SUV(Standard uptake values)にてトレーサーの取り込みを定量化し、評価した。

（倫理面への配慮）

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。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、動物実験計画書を大阪大学動物実験委員会に送付し、本実験の承認を得た。

C 研究結果

【1】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。
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。

結果、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。

以上をもって、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。(図：3)

【2】 ^{18}F -DPA714-PET により他家細胞移植による免疫拒絶反応を評価した。

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、活性化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}F -DPA714-PET 法を用いて、

細胞移植における免疫拒絶反応を経時的に評価できるか否かを検証した。(図：4)

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。

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。(図：5)

以上より、 ^{18}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。

D 考察

本年度において、再生アソシエイト細胞が他家 iPS 細胞移植時の免疫寛容効果を惹起する可能性が示唆された。すなわち、未分化 iPS 細胞を他家移植する際に、自己再生アソシエイト細胞を混入させることにより、iPS 細胞の生存の延長が見られた。今後、1) 組織標本からグラフトに対する免疫反応を評価する。2) グラフトにおける免疫関連の mRNA や蛋白を定量化することによりこの知見をさらに明らかにすることができると考えられる。

また、移植グラフトに対する拒絶反応を経時的に観察するイメージングシステムをマウスモデルにおいて確立することができた。すなわち、 ^{18}F -DPA714-PET 法は、活性化マクロファージを描出し、他家グラフトに対する拒絶反応を定量的に評価することができた。今後、このイメージングシステムを用いて、再生アソシエイト細胞による免疫寛容効果を評価し得るか否かを検証する必要がある。

さらには、心不全に対する他家 iPS 細胞由来心筋細胞シート移植の治療効果に、再生アソシエイト細胞の同時移植が与える影響を検証する必要があり、これはマウスの慢性心筋梗塞モデルを用いて、心エコー検査など心機能評価とともに、 $[^{18}\text{F}]$ -DPA714-PET 法を施行することにより、遂行することができるものと考えられる。

E 結論

他家未分化 iPS 細胞移植において、自己再生アソシエイト細胞の同時移植が免疫寛容効果を発揮することが示唆された。今後、心不全に対する他家 iPS 細胞由来心筋細胞シート移植治療において、自己再生アソシエイト細胞の同時移植が移植された心筋細胞の生存や心機能に与える影響を検証する必要がある。

F 研究発表

1. 論文発表

1. Higuchi T, Miyagawa S, Pearson JT, Fukushima S, Saito A, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Yagi N, Astolfo A, Shirai M, Sawa Y. Functional and electrical integration of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a myocardial infarction rat heart. *Cell Transplant*. 2015 Jan 20.
2. Kainuma S, Miyagawa S, Fukushima S, Pearson J, Chen YC, Saito A, Harada A, Shiozaki M, Iseoka H, Watabe T, Watabe H, Horitsugi G, Ishibashi M, Ikeda H, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Naito H, Umetani K, Shimizu T, Okano T, Kobayashi E, Daimon T, Ueno T, Kuratani T, Toda K, Takakura N, Hatazawa J, Shirai

M, Sawa Y. Cell-sheet therapy with omentopexy promotes arteriogenesis and improves coronary circulation physiology in failing heart. *Mol Ther*. 2015; 23:374-86.

3. Kamata S, Miyagawa S, Fukushima S, Imanishi Y, Saito A, Maeda N, Shimomura I, Sawa Y. Targeted delivery of adipocytokines into the heart by induced adipocyte cell-sheet transplantation yields immune tolerance and functional recovery in autoimmune-associated myocarditis in rats. *Circ J*. 2014; 79:169-79.
4. Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Yoshida A, Kashiyaama N, Kawamura A, Ito E, Saito A, Maeda A, Eguchi H, Toda K, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y. N-glycans: Phenotypic homology and structural differences between myocardial cells and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One*. 2014; 9:e111064.

2. 学会発表

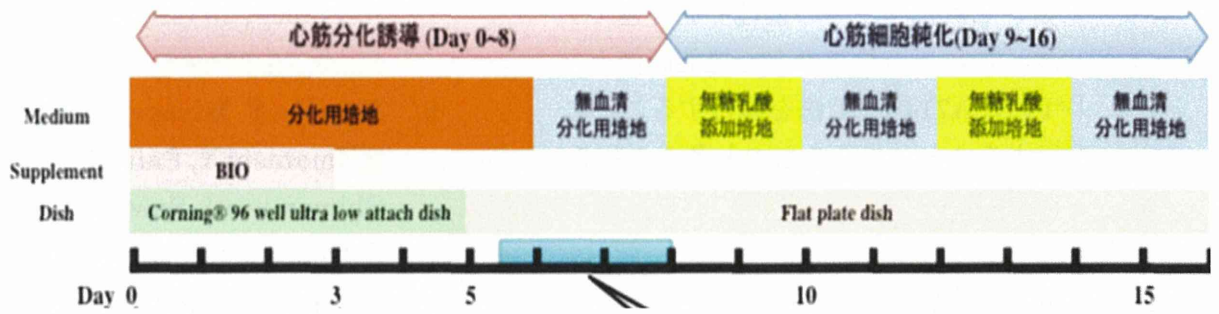
1. 福嶋五月、宮川 繁、戸田宏一、澤 芳樹 細胞移植による心筋再生療法の開発と推進 第 115 回日本外科学会パネルディスカッション「ここまで来た再生医学研究」2015 年 4 月 18 日名古屋

G 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項なし

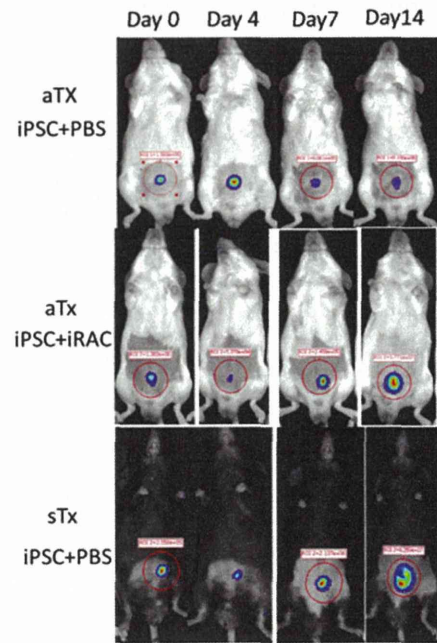
別添図表一覽

図 1 :



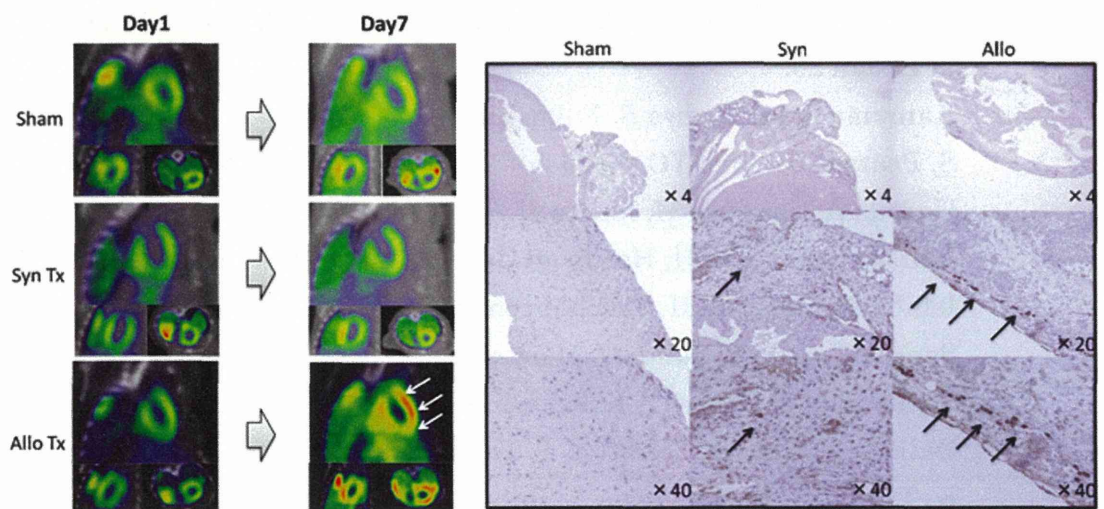
左図 2 :

右図 3 :



左図 4 :

右図 5 :



「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）の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。

分担研究者である田中里佳が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の有効性を確認することと、難治性潰瘍患者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し、将来的に iPS 組織の生着・機能科のための臨床応用技術として開発する。平成 25 年度においては、順天堂大学においても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と評価の確立を行うことと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し良好な結果が得られた。平成 26 年度は前年度に確立したマウス再生アソシエイト細胞を用いてマウス潰瘍モデルにおけるマウス再生アソシエイト細胞の同種異系細胞移植実験における細胞移植生着率と創傷治癒効果を検証した。同時に再生アソシエイト細胞の臨床応用を目的とした、糖尿病患者の再生アソシエイト細胞の規格と培養方法を確立することを目的とした。

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。

- ①糖尿病マウス再生アソシエイト細胞の確立
- ②マウス潰瘍モデルに同種異系マウス再生アソシエイト細胞移植を実施し、細胞生着率、創傷治癒効果、血管新生、抗炎症効果を検証した。
- 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）

B. 研究方法

- ①ストレプトゾトシンを投与した糖尿病マウスを作成し、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。
- ②C57BL6J 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を作成。潰瘍モデル BALBC 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。

③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。臨床研究も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。

（倫理面への配慮）

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)、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

①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(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。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。(図:1)

②GPF陽性のC57BL6Jマウス再生アソシエイト細胞を同種異系であるBALBC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。C57BL6J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。(図:2図:3)

③40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った。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

マウス再生アソシエイト細胞の同種異系細胞移植は同種同系細胞移植にくらべ潰瘍組織内での長期生存は認められなかった。皮膚細胞は他の器官にくらべ免疫反応が高いため、同種異系細胞は移植後1週間をすぎに免疫細胞に貪食されてしまう可能性が示唆された。しかし、無治療に比べて高い創傷治癒効果を示すため、移植後1週間の再生アソシエイト細胞によるサイトカイン効果により周囲の繊維芽細胞や血管内皮細胞の増殖を促し、血流改善と潰瘍縮小の効果が認められると考えられる。将来的に再生アソシエイト細胞のAllo(同種異系)細胞移植による血管再生治療と潰瘍治療に対する有効性が示唆された。また、ヒト再生アソシエイト細胞による前臨床研究を終え、来年度より臨床研究への移行が可能であると考えられる。

E. 結論

我々は抗炎症効果、高い血管再生能を有するヒト糖尿病患者末梢血再生アソシエイト細胞の確立に成功し、ヒト同種同系再生アソシエイト細胞移植の臨床研究を来年度から実施予定である。さらにマウスによる同種異系再生アソシエイト細胞移植の有効性が認められたことから今後、ヒトにおける同種異系細胞移植へ発展が期待されている。末梢血再生アソシエイト細胞は少量の血液からを抗炎

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. Sawada N, Aihua J, Takizawa F, Adeel S, Higashikuni Y, Chase W. K, Farouc A., Jaffer, T. M, Sata A., Kyu-Tae K, Joyce B, Hermann K, Juliano L. S, Kamei Y, Laura E. B, Watada H, Ogawa Y, Higashikuni Y, Chase W, Kessinger, F. A, Thomas M, Sata M, Kevin C, Tanaka R, and Zolt A.

Endothelial PGC-1 α mediates vascular dysfunction in diabetes. *Cell Metabolism* 19: 246-258, 2014

2. Shimizu A, Tajima S, Tobita M, Tanaka R, Tabata Y and Mizuno H

Effect of control-released basic fibroblast growth factor incorporated in β -tricalcium phosphate for cranial regeneration in a murine model

Plast Reconstr Surg Global Open 2: e126, 2014

3. 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 and 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 *J Am Heart Assoc* 3: e000743, 2014

4. Sukmawati D, Fujimura S, Jitsukawa S, Ito-Hirano R, Ishii T, Sato T,

Hayashi A, Itoh S, Mizuno H, Daida H, Tanaka R. Oxidative stress tolerance of early stage diabetic endothelial progenitor cell. *Regenerative Therapy*. 2014 in press.

5. Layliev J, Marchac M, Szapalski C, Henderson R, Saadeh P, Tanaka R, Warren. Endogenous cell therapy improves bone healing. *Journal of Craniofacial Surgery*; 2014 in press

6. Tanaka R, Masuda H, Kato S, Imagawa K, Kanabuchi K, Nakashioya C, Yoshiba F, Fukui T, Kobori M, Wada M, Asahara T, Miyasaka M. Autologous G-CSF mobilized peripheral blood CD34+ cell therapy for diabetic patients with chronic non-healing ulcer. *Cell Transplant*. 2014;23(2):167-79

7. Tanaka R, Shimizu A, Ichikawa Y, Yoshizawa H, Hayashi A and Mizuno H Use of Pelnac for skin defect *J Wound Technol* (in press)

2 学会発表

1. Tanaka R, Masuda H, Arita K, Jitsukawa S, Sukmawati Di, Hirano R, Fujimura S, Okada K, Asahara T, Mizuno H, Novel methodology using peripheral blood mononuclear cells for simple and effective vascular and tissue regenerative cell therapy for diabetic patients TERMIS EU 2014 /CHAPTER MEETING (Genova, Italy 2014)

2. Tanaka R Effective tissue regeneration using stem cells 1st International Conference on Repair, Regeneration and Reconstruction (London, UK 2014)

3. 林 礼人、田中里佳、飛田護邦、西牟田ゆり、石原久子、吉澤秀和、水野博司 順天堂大学形成外科における癒痕・創傷治療研究の現状と展望 癒痕ケロイド治療ジャーナル 8: 22-29, 2014

4. 田中里佳、古元将和、安藤えりか、林礼人、水野博司 当院の慢性潰瘍外来における看護師が実施する創傷マネージメントの実際～形成外科の立場から 第12回日本フットケア学会年次学術集会 (2014年 奈良)
5. 饗場恵美子、石原久子、望月真理子、西牟田ゆり、田中里佳、林礼人、水野博司 女性医師のキャリア継続のためにー専門医取得後の出産についてー 第57回日本形成外科学会総会・学術集会 (2014年 長崎)
6. 田中里佳 キャリアアップを目指すなかで女性として生きる難しさ 第57回日本形成外科学会総会・学術集会 (2014年 長崎)
7. 田中里佳、マフツォハロフマニティサムスハディ、有田佳代、内田和代、藤村聡、実川佐智恵、岡田佳世子、水野博司 血管内皮前駆細胞のWound Bed Preparationにおける役割 第57回日本形成外科学会総会・学術集会 (2014年 長崎)
8. 田中里佳、藤村聡、有田佳代、實川佐智恵、門真起子、岡田佳世子、水野博司 自己末梢血単核球生体外培養増幅細胞移植による血管・組織再生治療の臨床研究実施に向けた課題と対策 第23回日本形成外科学会基礎学術集会 (2014年 松本)
9. 田中里佳、有田佳代、實川佐智恵、門真起子、平野理恵、岡田佳世子、増田浩史、浅原孝之、水野博司 血管内皮前駆細胞の発見から最新の血管再生治療までの発展と今後の展望 第6回日本創傷外科学会総会・学術集会 (2014年 高松)
10. 古元将和、田中里佳、名取悠平、林礼人、水野博司 当院におけるLimb Salvage : 院内チーム医療と他施設との提携、その運用後の経過 第57回日本形成外科学会総会・学術集会 (2014年 長崎)
11. 田中里佳、古元将和、名取悠平、吉澤秀和、安藤えりか、望月真理子、林礼人、水野博司 レーザー治療におけるエムラクリームの有効性 第57回日本形成外科学会総会・学術集会 (2014年 長崎)
12. 饗場恵美子、須田俊一、名取悠平、古元将和、田中里佳、林礼人、齊藤光江、水野博司 乳房温存術の変形に関するトラブルを回避するための当院の試み 第57回日本形成外科学会総会・学術集会 (2014年 長崎)
13. 田中里佳、古元将和、田村浩、岡崎真也、小川尊資、三田智也、合田朋仁、石田弘美、橘優子、宮内克己、代田浩之、水野博司 当院における下肢救済のための院内連携と地域医療連携の試み 第6回日本下肢救済・足病学会学術集会 (2014年 札幌)
14. 吉澤秀和、林礼人、實川佐智恵、田中里佳、水野博司 無細胞化神経へのシュワン細胞付加法としての端側神経縫合とその応用について (第2報) 第23回日本形成外科学会基礎学術集会 (2014年 松本)
15. 田中里佳、藤村聡、有田佳代、實川佐智恵、門真起子、岡田佳世子、水野博司 難治性四肢潰瘍患者を対象とした自己末梢血単核球Qc細胞移植による新しい血管・組織再生治療の前臨床研究 第44回日本創傷治癒学会 (2014年 仙台)
16. 市川佑一、田中里佳、佐藤瑠美子、清水梓、林礼人、水野博司 難治性足潰瘍に対するPico陰圧吸引療法の使用経験 第44回日本創傷治癒学会 (2014年 仙台)
17. 亀井真由美、今川孝太郎、緒方信彦、篠崎法彦、田中里佳、鳥羽知恵美、藤井明美、星野順子、伊苅裕二、宮坂宗男 フットケア地域連携手帳による地域医療連携強化の試み 第12回日本フットケア学会年次学術集会 (2014年 奈良)
18. 石原久子、飛田護邦、田中里佳、田島聖士、田畑泰彦、水野博司 徐放型bFGFと脂肪組織由来幹細胞の相互作用による血管新生の検証

- 第13回日本再生医療学会総会（2014年 京都）
19. 田中里佳、増田浩史、有田佳代、實川佐智恵、平野理恵、Sukmawati Dewi、内田和代、藤村 聡、浅原孝之、水野博司 糖尿病患者に対する末梢血単核球を用いた無血清生体外培養増幅法による新しい血管再生治療法の開発 第13回日本再生医療学会総会（2014年 京都）
20. Maftuchah Rochmanti、田中里佳、實川佐智恵、菅波孝祥、水野博司 Anti-inflammatory polarization of diabetic macrophages with endothelial progenitor cells 第23回日本形成外科学会基礎学術集会（2014年 松本）
21. Sukmawati D、田中里佳、藤村 聡、實川佐智恵、平野理恵、伊藤誠吾、代田浩之、水野博司 Primitive endothelial progenitor cells intrinsic ability to resist oxidative stress in diabetic mice 第23回日本形成外科学会基礎学術集会（2014年 松本）
22. 田中里佳、増田治史、有田佳代、實川佐智恵、平野理恵、Sukmawati Dewi、内田和代、藤村聡、浅原孝之、水野博司 糖尿病患者に対するSimple, Easy and Effective な自己末梢血血管内皮前駆細胞による新・血管治療の開発 第35回日本炎症・再生医学会（2014年 沖縄）

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2012-218206

PCT出願番号：PCT/JP2013/76618

乙管理番号：FB12-008

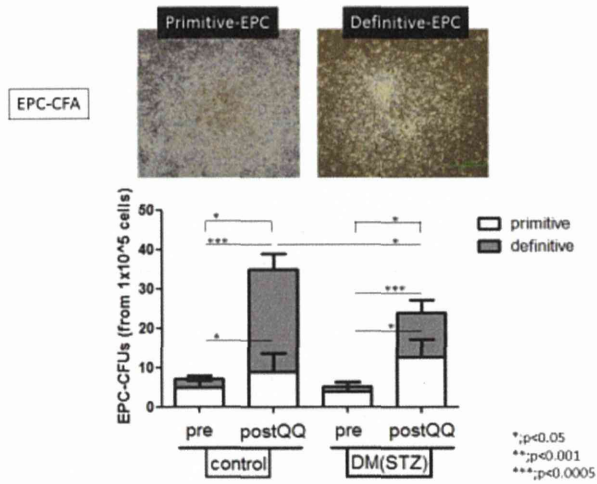
丙管理番号：TF-130PCT(T-1467)

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（所属機関：乙）、増田治史（所属機関：丙）、田中里香（所属機関：丙及び丁）

別添図表一覧

図 1 :



DM群においてもQQすることで、各colony数が増加する。

図 2 :

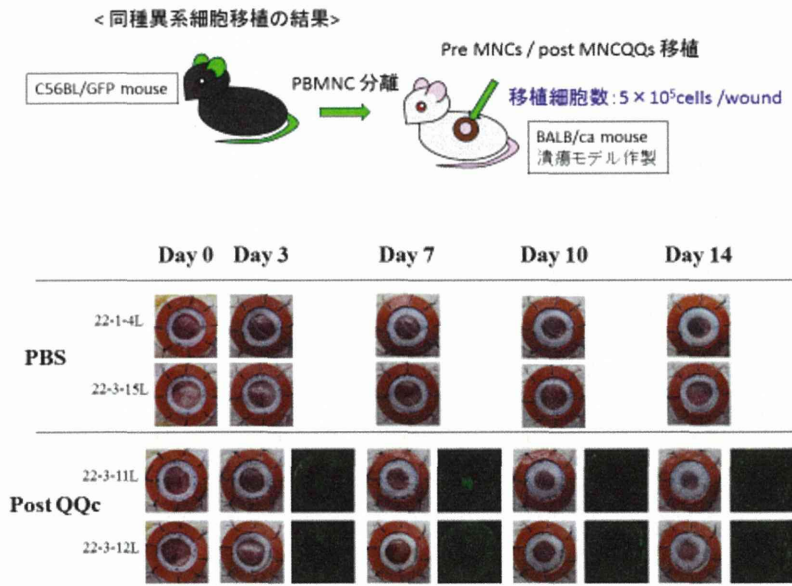
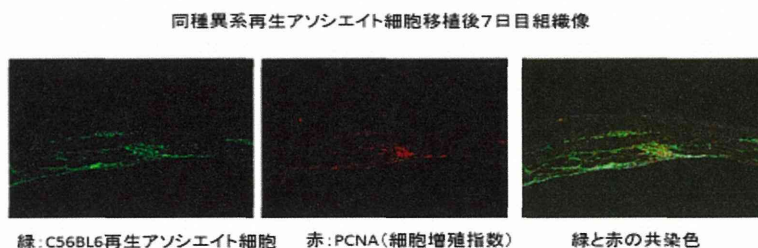


図 3 :



緑: C56BL6再生アソシエイト細胞 赤: PCNA(細胞増殖指数) 緑と赤の共染色

結果: 7日目においてC57BL6Jマウスの再生アソシエイト細胞は潰瘍組織内に確認できるが、14日目に細胞は消失している。しかし、再生アソシエイト細胞移植群のほうがPBSコントロール群にくらべ創傷治癒効果が認められた。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Masuda H, Asahara T	Clonogenic Isolation of Colony-forming Endothelial Progenitor Cells.		Manual of Research Techniques in Cardiovascular Medicine	Wiley Blackwell	USA	2014	p.71-93

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.		3-e000743	2014
Kawakami Y, Ii M, Matsumoto T, Kuroda R, Kuroda T, Kwon SM, Kawamoto A, Akimaru H, Mifune Y, Shoji T, Fukui T, Kurosaka M, Asahara T.	SDF-1/CXCR4 axis in Tie2-lineage cells including endothelial progenitor cells contributes to bone fracture healing.	J Bone Miner Res.		(1):95-105	2015
Obi S, Masuda H, Akimaru H, Shizuno T, Yamamoto K, Ando J, Asahara T.	Dextran induces differentiation of circulating endothelial progenitor cells.	Physiological reports.		2:e00261	2014
Higuchi T, Miyagawa S, Pearson JT, Fukushima S, Saito A, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Yagi N, Astolfo A, Shirai M, Sawa Y.	Functional and electrical integration of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a myocardial infarction rat heart.	Cell Transplant			2015

IV. 研究成果の刊行物・別刷



Isolation of colony-forming endothelial progenitor cells

Haruchika Masuda¹ and Takayuki Asahara^{1,2}

¹Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa, Japan

²Institute of Biomedical Research and Innovation, Kobe, Hyogo, Japan

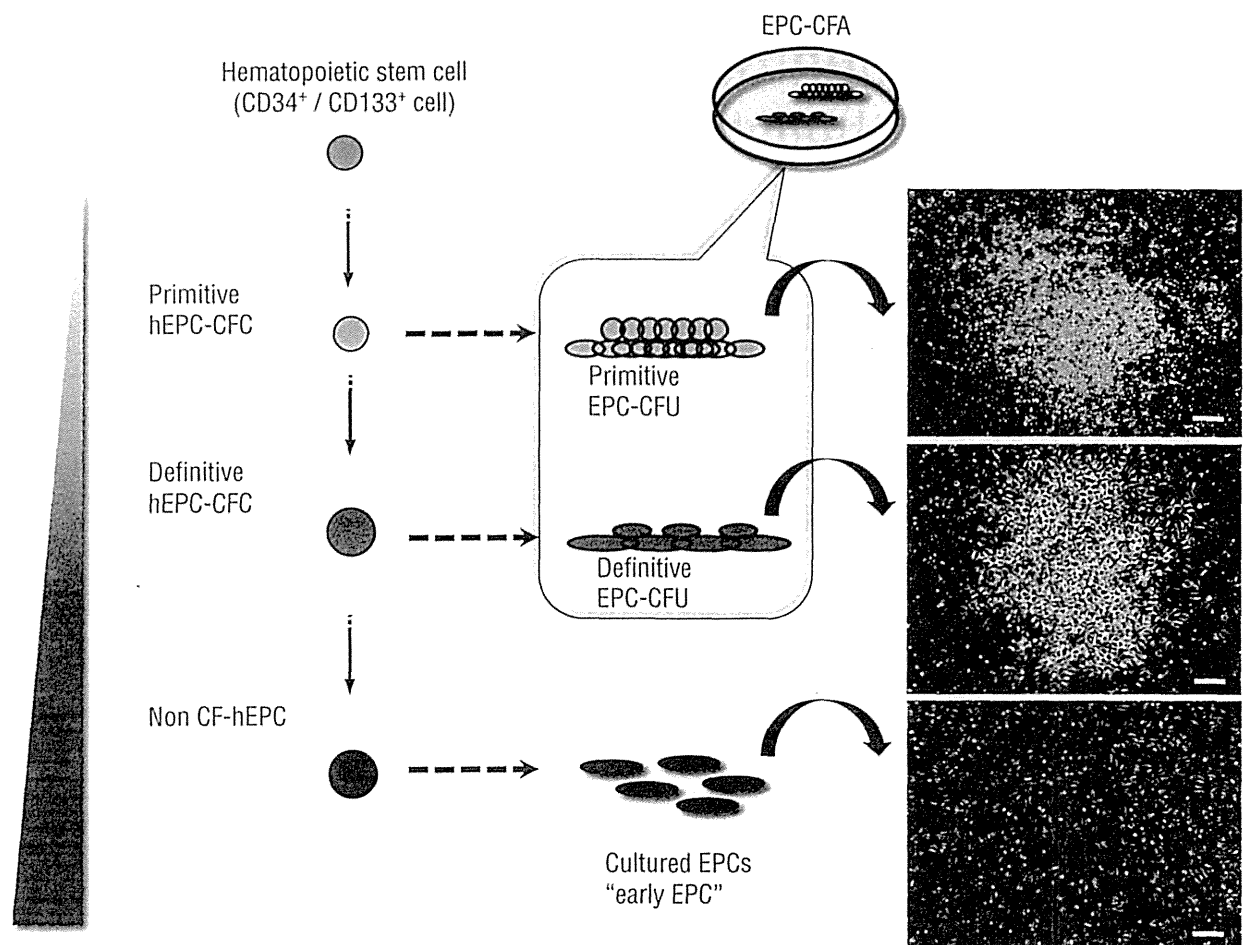
Introduction

Circulating endothelial progenitor cell (EPC) are now regarded as subdivided into two categories, hematopoietic and nonhematopoietic lineage EPCs (after controversy during the decade following their initial isolation [1]), as there is no definitive delineation of EPCs, no clear differentiation hierarchy, or unambiguous defined isolation protocol. Hematopoietic EPCs (hEPCs) have been reported to originate from a provasculogenic subpopulation of hematopoietic stem cells (HSCs) in bone marrow (BM). hEPCs have been quantified and qualified as either circulating cell populations identified by cell surface markers such as CD34, CD133, and vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) [2–11] or “colonies” [12], using conventional EPC culture methods to produce spindle adherent cells from peripheral blood (PB), BM, or umbilical cord blood (UCB) mononuclear cells (MNCs) with endothelial growth factors and cytokines. These assays using conventional EPC culture protocols were simple and satisfactory to speculate on the vasculogenic properties of EPC-enriched fractions, but have recently been criticized with respect to the quality and quantity of EPCs derived from primary cells. These assays further group heterogeneous EPCs into one qualitative category, “adhesive cultured EPCs,” without any

hierarchical discrimination and proper characterization of contaminating cell populations, which consist mainly of hematopoietic cells [13].

Ingram and Yoder *et al.* have demonstrated circulating endothelial differential stages, high and low proliferative potential endothelial colony-forming cells (HPP-ECFCs and LPP-ECFCs), using their original culture parameters, demonstrating clonal colony-forming units (CFUs) in outgrowth EPCs, cultured adhesive EPCs, or differentiated endothelial cells (ECs)[14,15]. This carefully conceived culture assay system, demonstrating thorough insight into stem cell biology, is contributing significantly to the development of EPC biology via the introduction of a differential hierarchy system for ECs. It is relevant to the isolation of CFUs from cultured adhesive cells of tissue-derived ECs or EPCs (i.e. nonhematopoietic EPCs) but it does not appear to address the identification of primary circulating EPCs from PB, BM, or UCB (i.e. hEPCs). In response to the need for a defined assay to detect hEPCs qualitatively and quantitatively from primary blood samples, we have developed a new colony assay system.

Our methodology utilizes the conventional methylcellulose assay used for stem/progenitor cell identification, and is modified to resemble the previously developed semisolid colony assay system for the determination of EPC-CFUs [16–18]. As we



hEPC differentiation

Figure 8.1 The concept of EPC-CFA to assess the hEPC differentiation cascade.

hEPCs originate from HSCs. During hEPC differentiation, hEPCs lose their colony-forming potential and become vasculogenic. Based on this, hEPCs exhibit individual colony-forming features: primitive EPC-CFUs or definitive EPC-CFUs, which are morphologically defined as small round colony cells or spindle-like colony cells. These are provasculogenic or vasculogenic, respectively, thereby providing the characteristic to estimate the proportion of colonies with vasculogenic potential of the investigated cell populations. HSC, hematopoietic stem cell; hEPC-CFC, hematopoietic EPC colony-forming cell; non CF-EPC, noncolony-forming EPC. The upper, middle, and lower pictures indicate primitive EPC-CFUs, definitive EPC-CFUs, or cultured EPCs, respectively. Scale bar = 200 μ m. (Source: Masuda H. 2013 [2]. Reproduced with permission from Elsevier).

have recently reported, the present assay system differentiates the two types of EPC-CFUs, morphologically identified by the respective colony cells with the features of small (10–20 μ m) round cells and large (50–200 μ m) spindle-like cells [19,20]. The smaller colony cells with proliferative capability, in secondary semisolid colony assay system, convert into the latter larger spindle-shaped cells with vasculogenic property. Thus this assay defines EPC colonies as *primitive EPC-CFU (PEPC-CFU)* and *definitive EPC-CFU (DEPC-CFU)*. The essential findings provide a novel and fundamental concept of the EPC colony-forming assay (EPC-CFA) to

quantitatively assess each colony in terms of the hEPC differentiation cascade (Figure 8.1, Table 8.1).

The advantage of this semisolid colony assay lies in its ability to estimate the number of immature progenitors that will go on to form colony units from a single cell and the possibility to assess the differential quality of colonies without any contamination by differentiated cells. Furthermore, we devised a semisolid media condition capable of evaluating the adhesive potential of endothelial lineage colonies.

The methodological concepts of hEPC biology were examined using: (1) EPC-CFU analysis of