

## 「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 力所 ( $1 \times 10^5$  細胞/40  $\mu$ L Hanks Balance Salt Solution 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  $1 \times 10^7$  個の細胞懸濁液に 60  $\mu$ g/mL の MMC を添加し 30 分、37  $^{\circ}$ 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  $\mu$ M 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  $\mu$ M  $\beta$ -メルカプトエタノール添加 10%FBS-RPMI1640 培地 200  $\mu$ L/well 当たり、Stimulator 細胞  $1 \times 10^5$  個、Responder 細胞  $2.5 \times 10^4$  個入るように調整した。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( $2.5 \times 10^4$  個/well)に対して 1/16、1/32 個ずつ入るように連続希釈にて調整した。以上の細胞調整後、37  $^{\circ}$ 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と考えられる増殖因子 (TGF- $\beta$ 、IL-10、Angiopoietin-1、Angiopoietin-2、Prostaglandin E2、Adenosine) やホルモン (17 $\beta$ -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。

### (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

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、まず、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 7a)。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 7b)。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 7c)。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 9A)、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9B)。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10A)、10 $\mu$ Mの17 $\beta$ -Estradiol、Progesterone添加群で細胞増殖が抑制され、10nMの17 $\beta$ -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10A)、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 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：2 0 1 3 年 9 月 3 0 日（基礎出願日：2 0 1 2 年 9 月 2 8 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）

## 別添図表一覧

図 1 :

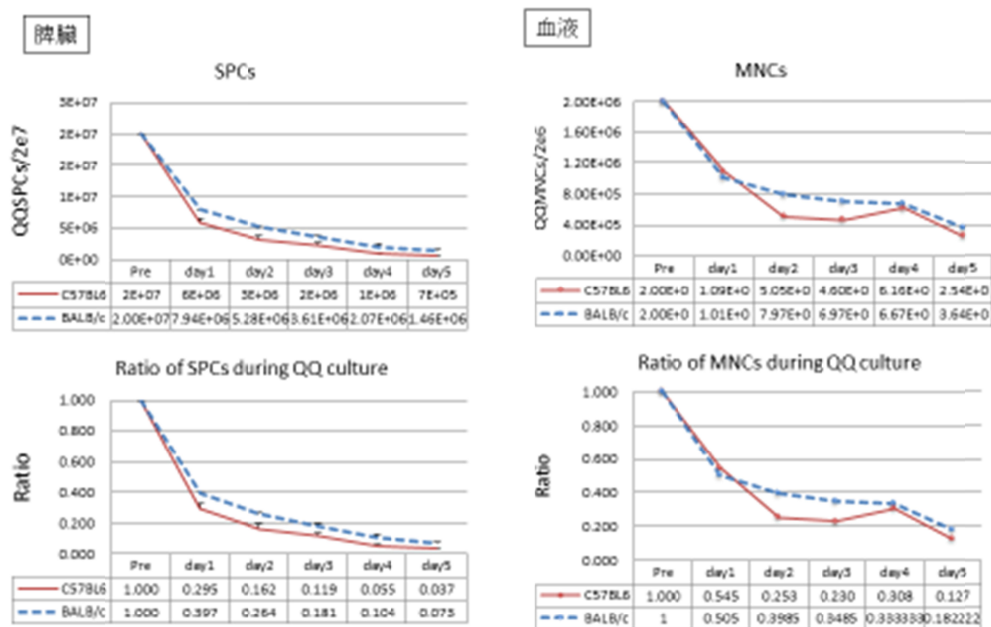


図1: C57BL/6及びBALB/cマウスの培養期間中細胞数の推移。  
上段は、QQ培養中の細胞数。下段は培養開始時の細胞数に対する培養基中細胞数の比率。  
SPCsは、脾臓細胞、MNCsは循環血液単核球。

図 2 :

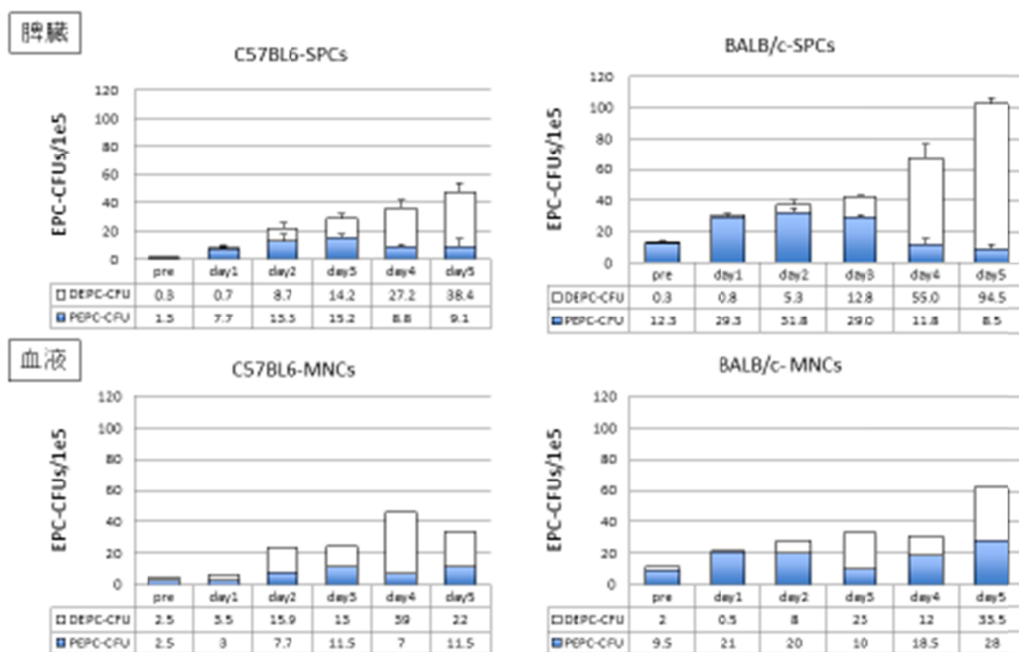


図2: 同種異系マウスにおける再生アソシエート細胞のEPCコロニー産生細胞数。  
赤: 分化型コロニー形成EPC、青: 未分化型コロニー形成EPC。  
Y軸は1x10<sup>5</sup>個の培養細胞当たりのEPCコロニー数。

図3 :

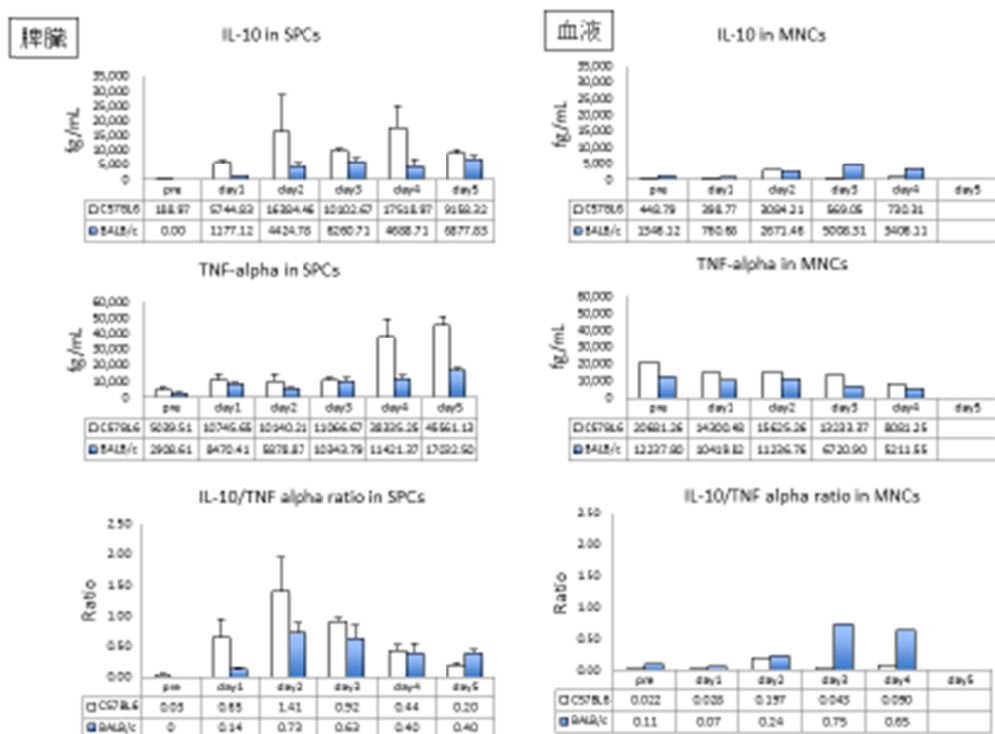


図3: 同種異系マウス再生アノシーエト細胞の培養期間中における産生サイトカイン。  
左グラフ= SPCs, 右グラフ= MNCs, MNCsについては、培養5日目における細胞確保が不可能で測定せず。  
上段: IL-10, 中段: TNF-alpha, 下段: IL-10/TNF-alpha比, 左列: SPCs, 右列: MNCs。

図4 :

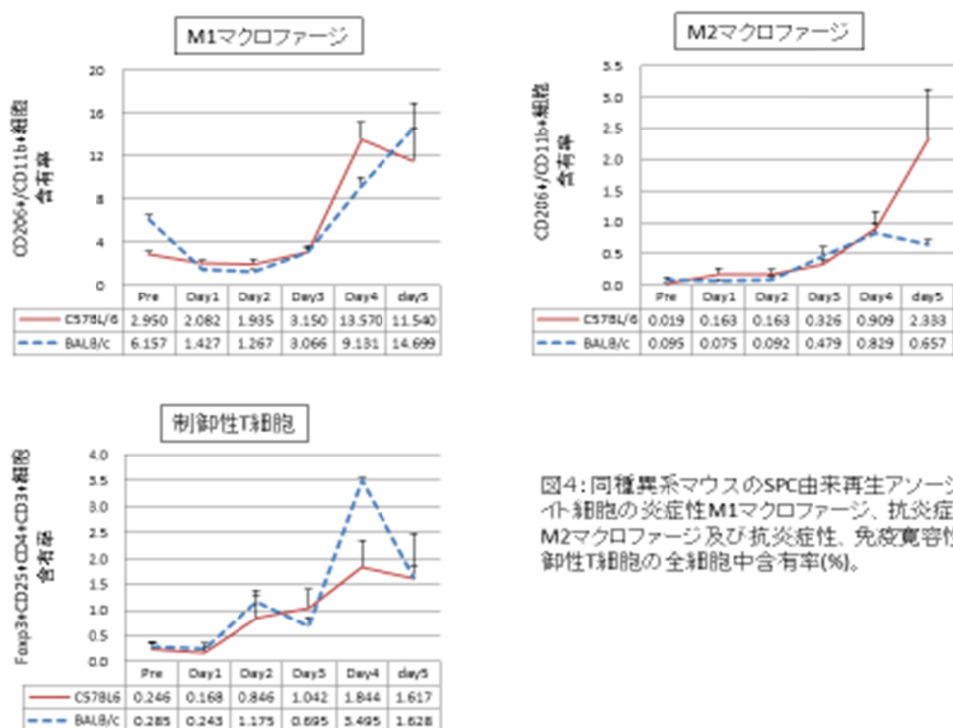


図4: 同種異系マウスのSPC由来再生アノシーエト細胞の炎症性M1マクロファージ、抗炎症性M2マクロファージ及び抗炎症性、免疫寛容性抑制性T細胞の全細胞中含有率(%)。



図5:

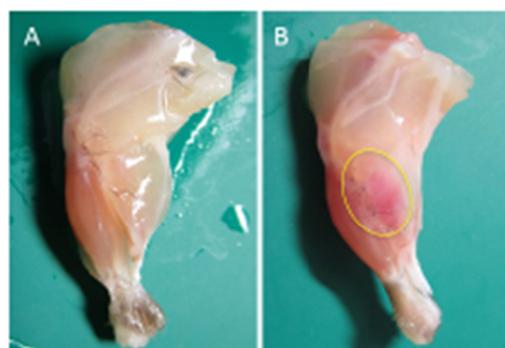


図5: 同種同系マウスにおける移植腓腹筋の生着。  
tdTomato-C57BL/6マウスの外側GCMを同所性に移植した  
1週間後の肉眼写真。  
A: 健常下腿像。B: tdTomato-C57BL/6マウスの外側GCM  
移植された野生型BALB/cマウスの下腿像。tdTomatoの赤  
色GCM移植片が確認された。

図6:

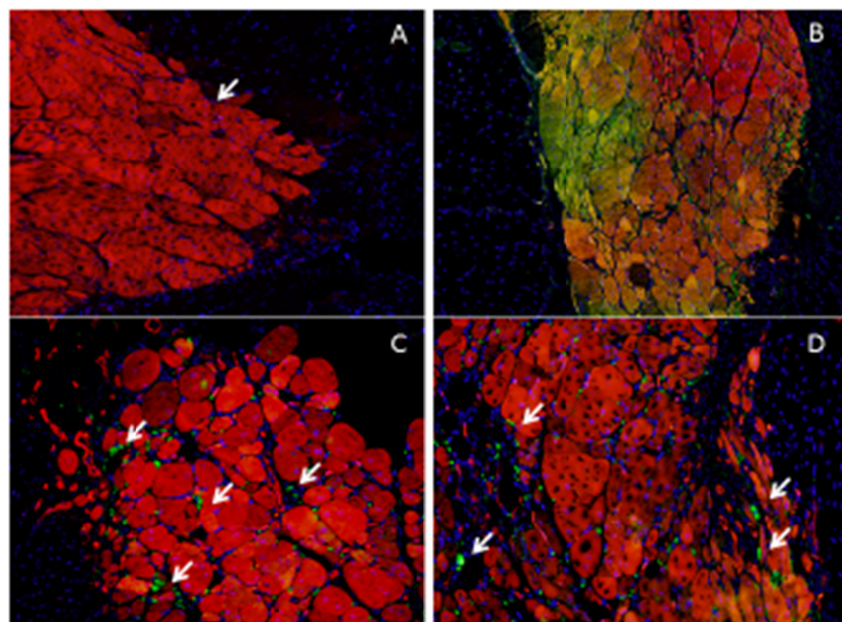


図6: 同種同系マウスにおける移植腓腹筋及び共移植した  
SPC由来再生アソーシエイト細胞の局在。  
tdTomato-C57BL/6マウスの腓腹筋を野生型C57BL/6マウスに移植し、eGFP-  
C57BL/6マウスの再生アソーシエイト細胞を共移植した(移植細胞数=  $1 \times 10^5$ /匹)。  
A: 腓腹筋移植のみ、B: 腓腹筋移植及び再生アソーシエイト細胞尾静脈移植、C: 腓  
腹筋移植及び再生アソーシエイト細胞腹腔内移植、D: 腓腹筋移植及び再生アソー  
シエイト細胞局所移植。↓は移植した再生アソーシエイト細胞。(x10HPF)

図7 :

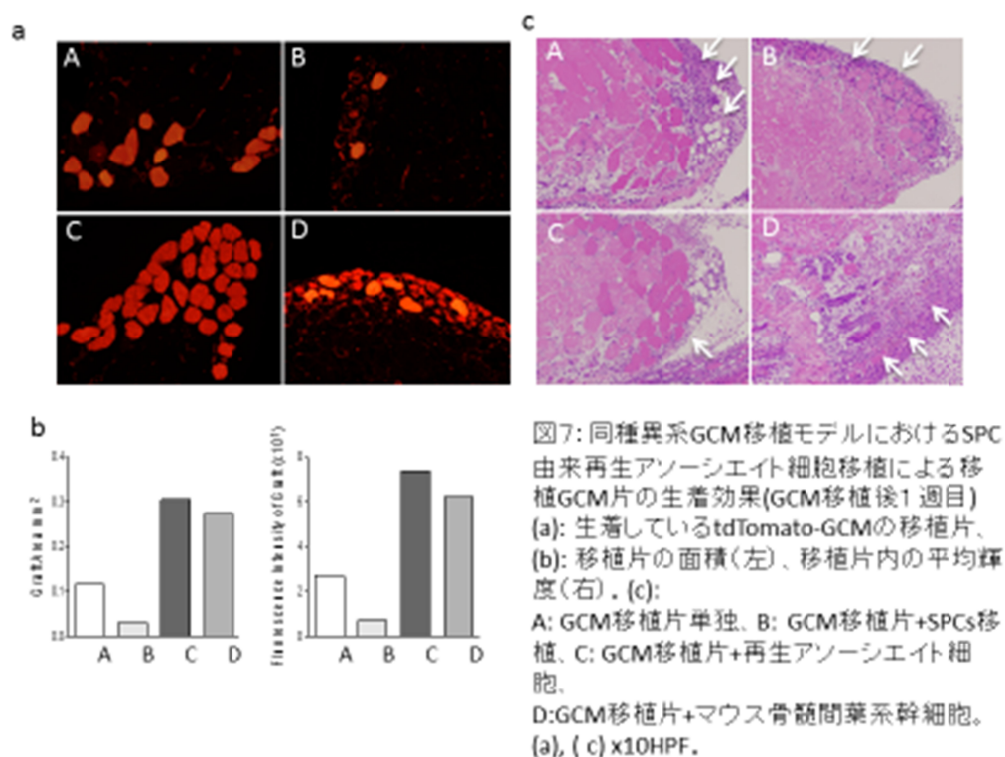


図8 :

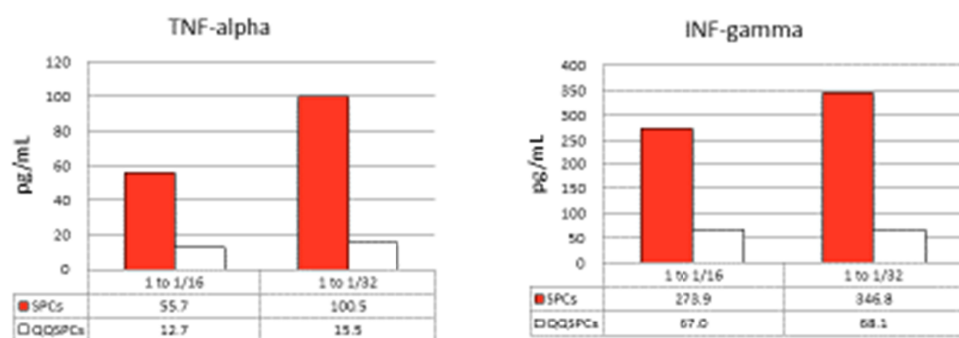


図 9 :

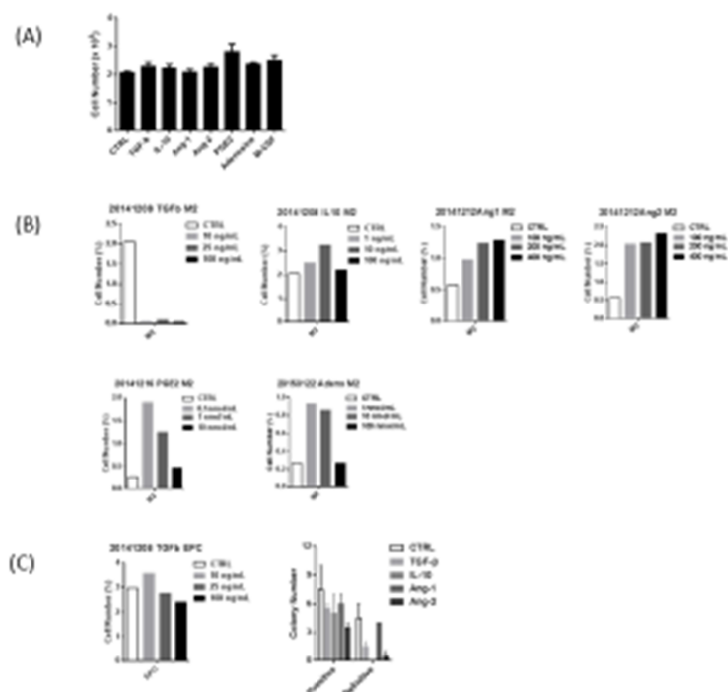


図9:増殖因子添加による再生アノールンエイト細胞培養の検証

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 :

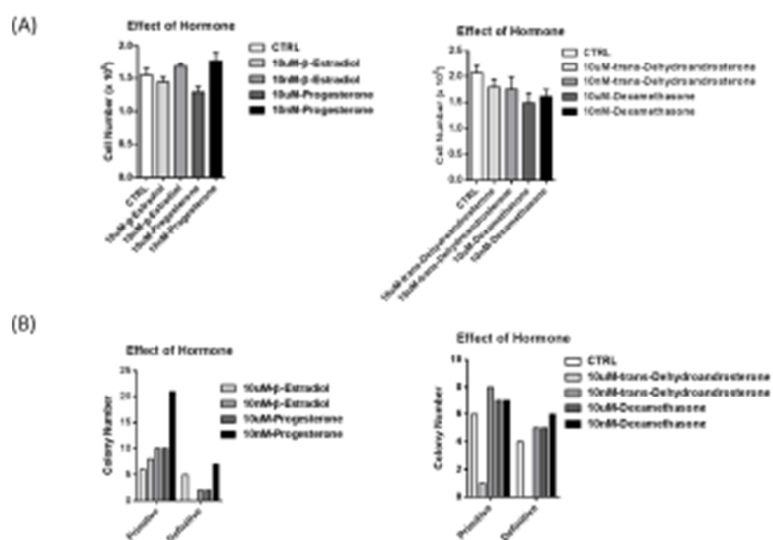


図10:ホルモン添加による再生アノールンエイト細胞培養の検証

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。

