

「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、^[18F]-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^[18F]-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】^[18F]-DPA714-PET

¹⁸F-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】¹⁸F]-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¹⁸F]-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。（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、¹⁸F]-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思われる。

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、¹⁸F]-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

メーキ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る、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、^[18F]-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, Kashiyama 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

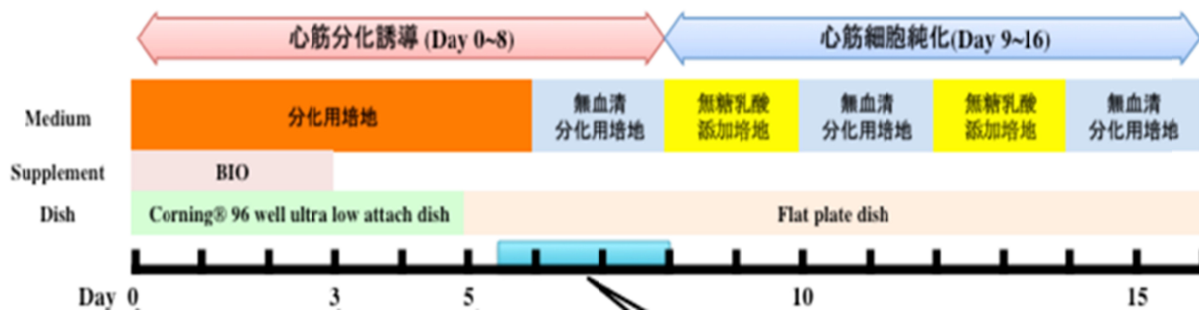
1. 福嶋五月、宮川 繁、戸田宏一、澤 芳樹 細胞移植による心筋再生療法の開発と推進 第 115 回日本外科学会パネルディスカッション「ここまで来た再生医学研究」2015 年 4 月 18 日名古屋

G 知的財産権の出願・登録状況

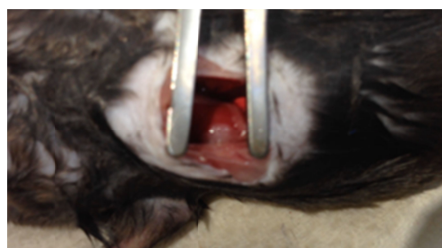
特記すべき事項なし

別添図表一覧

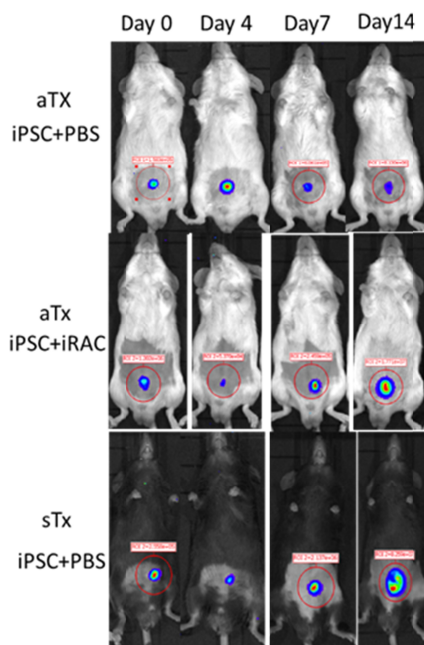
図 1 :



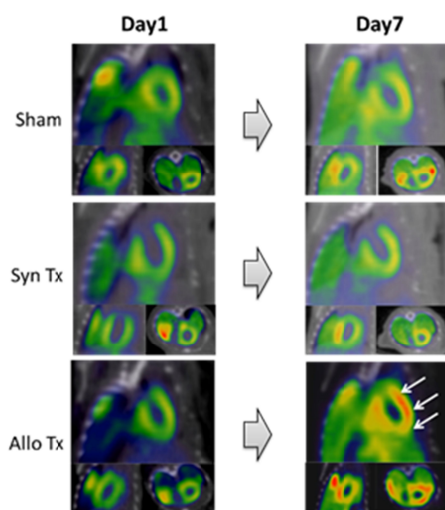
左図 2 :



右図 3 :



左図 4 :



右図 5 :

