

「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。

糖尿病マウス再生アソシエイト細胞の確立

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。

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

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。

C57BL6J 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。

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

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)

GPF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)

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 - 専門医取得後の出産について - 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回日本創傷治療学会(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回日本創傷治療学会(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

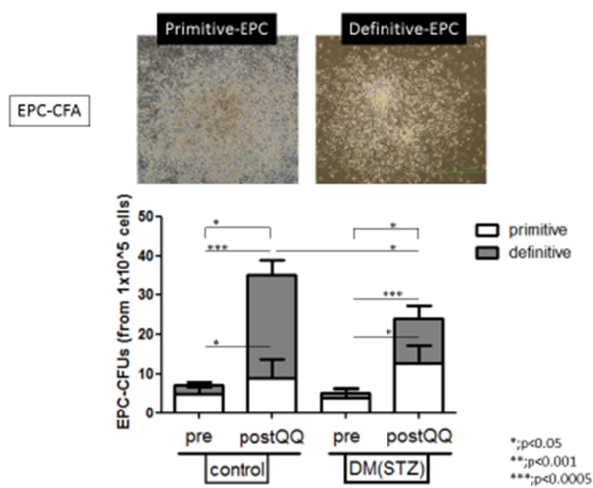
丙管理番号：TF-130PCT(T-1467)

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 :

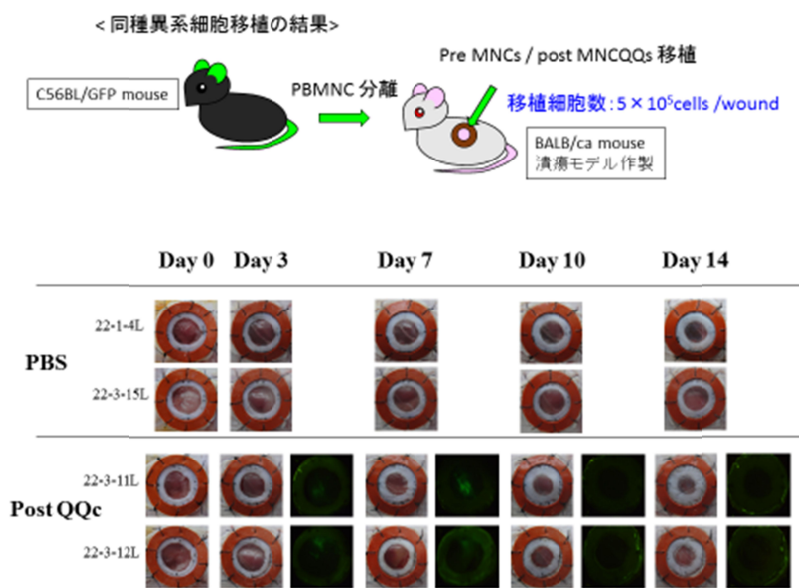
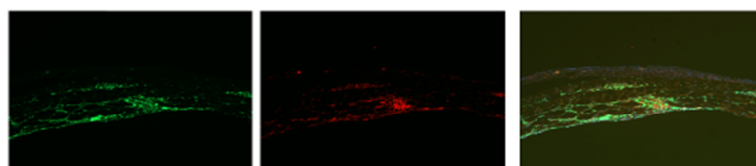


図 3 :

同種異系再生アソシエイト細胞移植後7日目組織像



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。

