

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791861

研究課題名(和文) ヒト羊膜中胚葉細胞を用いた心筋再生医療の創成 - 免疫寛容とアログラフトへの戦略 -

研究課題名(英文) Regenerative therapy in cardiology by human amnion-derived immunotolerant cells in a Hlogeneic combination

研究代表者

西山 紘子(辻紘子)(Nishiyama, Hiroko)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：70383891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：重症心不全に対する決定的な治療法は、脳死患者からの生体心移植以外存在しない。しかしながら、世界的に見てもドナー不足は深刻な社会問題で再生医療への期待が強い。我々は、羊膜細胞から間葉系細胞(Amniotic Membrane-derived Mesenchymal Cells=AMC)の分離技術を確認した。我々はAMC他家移植(アログラフト)可能なバイオマテリアルであることを示している。この点が学術的に正しければ再生医療に置ける細胞ソースの供給は格段に改善されるはずである。本研究では最終分化を生じたAMCが免疫学的寛容を成立させるメカニズムおよび、AMCの長期生着について検討した。

研究成果の概要(英文)：At present, the definitive therapy to patients with severe heart failure is only heart transplantation. However, lack of donor organs is indeed a social problem in the world. We have previously established isolation system of mesenchymal stem cells from amnion, and showed availability of amnion-derived cells as a transplantable biomaterial. Once availability of amnion-derived cells from the viewpoint of regenerative therapy is established, cell source problem must be solved. In this study, we showed long-term survival of amnion-derived cells and elucidate mechanism of in vivo immune tolerance.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：産科学 羊膜 アログラフト 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

重症心不全に対する決定的な治療法は、脳死患者からの生体心移植以外存在しない。しかしながら、世界的に見てもドナー不足は深刻な社会問題で再生医療への期待が強い。1999年、当該研究室が世界で初めて、マウス骨髄間葉細胞から心筋誘導を確認し(J Clin Invest 103, 697, 1999) それまでメドの立たなかった細胞ソースの可能性が垣間見えた。それに伴って、一躍心臓領域の再生医療は現実味をおび、国民の再生医療に対する期待は高まった。しかし更なる研究の結果、ヒトでの骨髄間葉系細胞はマウスほど容易には心臓に形質転換しない事が判明した(J Gene Med 6, 833, 2004)。理由はヒト骨髄の特性に起因するのか不明であるが、元々心臓病を持っている患者は、高齢・重篤な基礎代謝性疾患(糖尿病)・喫煙などのリスクファクターがあり、こういったファクターが、成人の体性幹細胞の数や能力を低下させるため、自己細胞を想定した骨髄よりも、若いドナー細胞を利用する方が良いのでは無いかとの発想に至った。ドナーへの負担が少ないほど、細胞ソースとして良好である。羊膜は元来医療廃棄物であるため、ドナーへの負担が軽く、若い体性幹細胞を治療に利用する事が出来る理想的な細胞ソースである。しかし羊膜細胞が心臓になる可能性があるのか明確ではなかった。我々は、羊膜細胞から間葉系細胞 (Amniotic Membrane-derived Mesenchymal Cells= AMC) の分離技術を確立した。得られた羊膜細胞の心筋誘導を当該研究室で考案した『ヒト幹細胞 *in vitro* 心筋誘導率アッセイシステム (特許 2005-15539)』を用いて検討した結果、得られた細胞の20%から70%が *in vitro* で生理学的に機能する心臓細胞になる事が判明、骨髄間葉系細胞の0.3%と比較する

と圧倒的に心臓になりやすかった。また AMC は心筋誘導前から、未熟な幹細胞に発現する OCT-3/4 を発現しており、限りなく ES 細胞に近く、心筋以外へも多分化能を有する細胞である事が我々の検討で明らかになった。羊膜細胞は MHC-Class 1, Class 2 分子の双方を持たないと言われている。そのため免疫学的な寛容が成立しやすく、アログラフトが可能な臓器であると考えられている。既に眼科領域等での利用がなされている。我々の樹立した AMC も FACS によって MHC class 1 弱発現、class 2 分子を全く発現していない事が解った。MHC class 1 を発現しない細胞は Natural Killer cell 等の古典的免疫システムによって非自己として判断され、拒絶される事が知られている。しかし AMC は MHC class 1 抗原のマスターキーとされる HLA-E および HLA-G 双方を発現しており、これらの発現が胸腺由来リンパ球の攻撃および、古典的免疫システムによる拒絶を回避している可能性がある (Cell Immunol 155, 312, 1994)。我々は、Wistar rat の心筋に免疫抑制剤を投与しない条件で (Xerograft)、AMC を注入したところ4週間後にも、AMC 由来の心筋細胞が多数存在している事が確認出来た。AMC が移植直後だけでなく、心筋分化後も免疫学的寛容を獲得して生着している事を観察している。このことは、HLA マッチングすら必要ない(細胞バンク等の形成の必要がない)他家移植(アログラフト)可能なバイオマテリアルである事を示している。この点が学術的に正しければ再生医療に置く細胞ソースの供給は格段に改善されるはずである。本研究では最終分化を生じた AMC が免疫学的寛容を成立させるメカニズムおよび、AMC の長期生着を実証する。

## 2. 研究の目的

本研究はバイオマテリアルとしての羊膜細胞の利用法、特に再生医療臨床応用へのストラテジーを確立するという全体構想の中で、ヒト羊膜中胚葉細胞を用いた心筋再生医療、特にアログラフトによる利用の可能性と科学的根拠を示すための研究である。この研究によって、羊膜の再生医療に置ける有効性および汎用性が確認でき、再生医療の莫大な細胞リソースの確保が可能となる。再生医療の一つの大きな目標である重症心不全患者の生命を救う事を通じて国民の健康を保全し社会に還元する。

## 3. 研究の方法

### 心筋誘導効率の最も良い、AMC 至適培養条件の模索

AMC 樹立後の培養条件は一定の見解は無い。本研究では各種条件での培養後に心筋誘導効率を比較する事によって、どのような培養条件で心筋への分化誘導能力が高くなるかを検討した。羊膜細胞は培養直後に上皮様細胞形態を取るものと間葉系細胞形態を取る物が肉眼的に区別出来る。羊膜上皮と、間葉を初代培養樹立の段階で分離し培養する方法を用いるか、あるいは EGF 等の培養上清を加え、上皮あるいは間葉の増殖を助長する事によって生物学的な濃縮を起こして、分離培養する。また幹細胞はしばしば低酸素の状態で分裂能を増す。低酸素によって培養を行った細胞、また分裂回数毎にそれぞれのどの細胞が心筋になりやすいかを検討した。

### 異種移植時の AMC の長期生着、心筋分化の科学的実証

既に6週間の時点での AMC より分化した心筋細胞の生存を確認している。ただしこの点については従来の免疫学の常識を大きく逸脱した結果であるため、綿密に結果を検証したい。具体的には使用した

EGFP がホスト心臓へ移行した可能性や、ホスト心筋細胞との細胞融合によって見かけ上 EGFP 細胞が心筋の形質を獲得したかの様に見えた可能性が考えられる。AMC を男児から樹立しメスの Rat に移植し、FISH 法による性染色体の観察を行い EGFP 陽性細胞に Y 染色体を同定する事によって EGFP 細胞がヒト細胞である事を確認したい。また FISH 法の過程で、EGFP が流出して EGFP 陽性細胞と FISH 蛍光を同一の切片で確認出来ない可能性もある。その場合連続切片を用いて EGFP 陽性細胞の FISH である事を証明するか、ユビキタスに発現している CD9 抗体を用いて、ヒト CD9 とラット CD9 を区別して免疫染色する事によって、EGFP 陽性細胞がヒト細胞由来であることを示す事が出来る。

### AMC が免疫学的寛容を生じるメカニズムの検証

パイロットスタディでは心臓に移植した動物の血清から可溶性 HLA-G が ELISA 法で4/30の個体頻度で検出している。さらに症例数を増やし、生着効率と可溶性 HLA-G 発現量を対比した。さらに免疫寛容の指標となる、regulatory-T cell (CD4+ CD25high+細胞, Transplant Proc 37, 37,2005)と非胸腺由来 T 細胞(T細胞)の関与を、ホスト末梢血リンパ球の FACS を行う事で検証し、さらに移植局所の regulatory-T 細胞の指標となる、FOXP3 遺伝子発現を FISH 法で検討を行った。

## 4. 研究成果

心筋への分化効率算出は特許技術『ヒト間葉系幹細胞の in vitro 心筋誘導率アッセイシステム(2005-15539)』を用いることによって行う事が出来る。しかし本方法は開始から結果が出るまで1ヶ月近い時間

がかかる上、EGFP アデノウイルスの感染状況によってはうまく行かない場合も多い。そのため、共培養せずに、細胞固有の心筋誘導効率を推定した。AMC を含めその他の臓器由来のヒト間葉系幹細胞(それぞれ心筋誘導率効率が異なる)は心筋を誘導する以前から心筋の先祖遺伝子と考えられている Nkx2.5 や GATA-4 を発現について、Real time PCR を用いた mRNA の定量解析を行って、細胞自身の心筋誘導効率を判定した。

また、AMC を男児から樹立しメスの Rat に移植し、FISH 法による性染色体の観察を行い EGFP 陽性細胞に Y 染色体を同定する事によって EGFP 細胞がヒト細胞である事を確認した。また FISH 法の過程で、EGFP が流出して EGFP 陽性細胞と FISH 蛍光を連続切片を用いて EGFP 陽性細胞の検証を行った。ユビキタスに発現している CD9 抗体を用いて、ヒト CD9 とラット CD9 を区別して免疫染色する事により確認した。なお一般的に用いられる抗ヒト核抗体はラットの核と交差反応をするため本研究では利用出来なかった。我々は既に心筋梗塞を生じた NudeRat に AMC を移植、移植後 2 週間目に心臓超音波検査を行い、非移植群に比べて移植群での心機能改善効果と心筋梗塞縮小効果を確認した。本研究ではさらに、Wistar Rat 心筋梗塞モデルに移植して観察した。すなわち麻酔開胸下に Wistar Rat 前壁冠動脈を 5-0 ナイロン針で結紮後閉胸、心筋梗塞完成まで 2 週間観察した後、心エコー検査にて左室収縮能評価後、再開胸し AMC を心筋梗塞内に移植し閉胸後、さらに 2 週間後に移植細胞の効果を、細胞非移植群と比較した。さらに、取り出した心臓に対して免疫染色を行い、EGFP 陽性細胞の検出と同細胞の Cardiac troponin-I 陽性、横紋陽性率を定量評価し

た。さらに生着効率や心筋分化効率を、心筋組織切片を切って免疫染色を行う事によって定量的に評価した。

前述したごとく、我々の得た結果は従来の免疫学の常識を大きく逸脱している。このデータを一般に信頼してもらうためには、詳細なメカニズムの解析は必須と考えられる。従来骨髄等の間葉系細胞でも異種移植時に免疫学的寛容が成立する事が報告されている(Annu Thorac Surg 73,1919,2002)。間葉系細胞は一般的に、移植免疫で最も重要とされる MHC class 2 分子の一つ HLA-DR を発現していないため拒絶されないと考えられてきた。しかし骨髄間葉系細胞には MHC Class 1 分子の発現はあり、何らかの免疫学的拒絶反応が生じている事が予想された。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

西山紘子(辻紘子)((独)国立成育医療研究センター・研究員)

研究者番号：70383891