

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10241

研究課題名(和文) iPS細胞由来血管構成細胞移植による重症下肢虚血に対する新たな血管再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new vascular regenerative therapy for severe limb ischemia by the transplantation of human iPS cell-derived vascular cells

研究代表者

坂田 隆造 (SAKATA, RYUZO)

京都大学・医学研究科・名誉教授

研究者番号：20325781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞由来血管細胞のマウス下肢虚血モデルへの移植において、血管内皮細胞および血管壁細胞をゼラチンスポンジとともに投与した群において有意に血流改善効果を認めたのに加え、組織学的評価において血管密度が有意に高いことが示され、それらの新生血管に、Ku80陽性のヒト由来細胞が含まれていることが確認された。このことは移植した血管細胞が、虚血組織における血管再生に寄与したことを示している。この血管再生に加え、移植によるパラクライン因子にともなう宿主に対する血管新生促進効果が得られた。これらの結果は、ヒトiPS細胞由来血管細胞を用いた重症下肢虚血に対する新規の治療法開発に向けた基礎的基盤になりうる。

研究成果の概要(英文)：The transplantation of human iPS cell-derived endothelial cells and vascular mural cells with gelatin sponges revealed a significant improvement of blood flow and a higher vascular density in the ischemic hindlimb. Ku-80 positive human cells are observed in the newly-formed vasculature indicating the contribution of transplanted human cells toward the vascular regeneration of the host. Furthermore, the transplantation induced the angiogenesis mediated by the up-regulation of paracrine factors. These results would serve as a basis toward the development of a new vascular regenerative therapy for a severe limb ischemia in the future.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：末梢動脈外科学 iPS細胞 血管新生 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢化及び食生活の欧米化に伴い、動脈硬化を原因とする重症下肢虚血性疾患の患者が増加している。細胞移植による血管新生療法は有望な治療アプローチのひとつであり、臨床研究が行われてきたが、その治療効果は移植した細胞がさまざまなサイトカインを放出することによる血管新生の機序が大きく、長期的効果が不十分と考えられた。

われわれはこれまでにヒト iPS 細胞から血管内皮細胞および血管壁細胞を効率的かつ多量に分化誘導する技術を開発した。これらの iPS 細胞由来血管構成細胞を重症下肢虚血への移植治療に用いることにより、従来のパラクライン効果を超えた移植細胞自身による真の血管再生治療を行うことができ、より効果的かつ持続的な下肢虚血救済効果が期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では動物実験による治療効果および安全性に関する基礎的検討を行い、近い将来予想される医療用 iPS 細胞の実用段階に向けて技術的基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

【ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いたマウス下肢虚血モデルへの血管細胞移植効率の検討】

非疾患・免疫抑制マウス下肢虚血モデルを大腿動脈除去により作成する。作製 2 週後に移植を行う。生着効率を向上させるために、ゼラチンスポンジを同時に移植する。

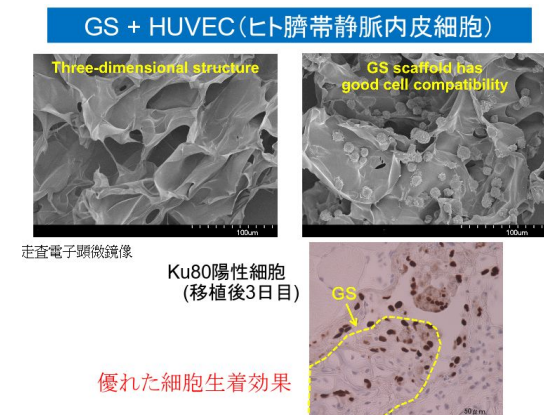
【正常マウス下肢虚血モデルへのヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞および血管壁細胞移植実験】

非疾患・免疫抑制マウス下肢虚血モデルを大腿動脈除去により作成する。作製 2 週後にゼラチンスポンジを用いた移植を行う。マウスを 4 群に分ける(各 n=10) 1: 偽手術群(PBS 投与), 2: 血管内皮細胞投与群, 3: 血管壁細胞投与群, 4: 血管内皮細胞+血管壁細胞投与群。ヒト iPS 細胞からの高純度・高効率な血管内皮細胞誘導法 (Ikuno, ESC 2014 abstract P623) 及び血管壁細胞誘導法(未発表; ウシ血清を用いた平面培養法)により、各細胞を分化誘導し、各群マウスに筋注にて投与する。下肢虚血作成前、移植前、移植 2 週後、以降移植後 8 週までの下肢血流をレーザードプラー血流計にて評価する。一部移植後 2 週ないし、4 週にて犠牲死させ、組織学的に生着した血管組織の有無 (HNA 染色) 血管新生の有無 (vWF 染色) を評価する。一部は移植後 24 週まで観察し、腫瘍形成の有無につき評価する。

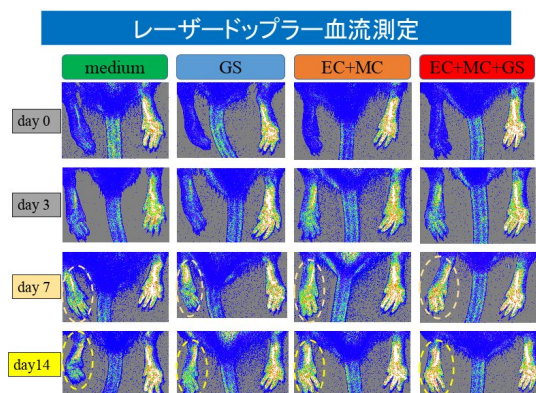
4. 研究成果

HUVEC をゼラチンスポンジとともに移植した群において、多くの細胞生着を来すことが、組織学および電子顕微鏡的に確認できた (図 1)。

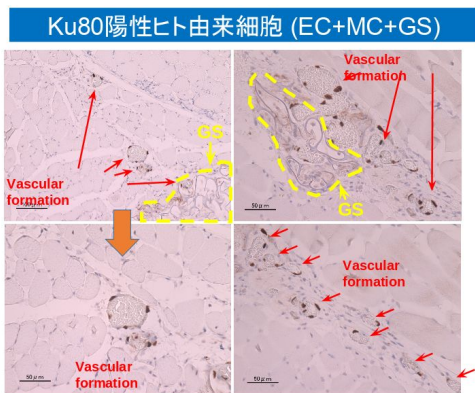
ヒト iPS 細胞由来血管細胞の移植実験では、血管内皮細胞および血管壁細胞をゼラチンスポンジとともに投与した群において、レーザードプラー血流計において有意に血流改善効果を確認したのに加え (図 2) 組織学的評価において、aSMA 陽性の血管密度が有意に高いことが示され、さらにそれらの新生血管に、Ku80 陽性のヒト由来細胞が含まれていることが確認された (図 3)。このことは、移植したヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞および血管壁細胞が、虚血組織における血管再生に寄与したことを示している。定量 PCR により、移植群で血管内皮細胞増殖因子の遺伝子発現が増加していた (図 4)。このことは、前述の血管再生に加え、移植によるパラクライン因子にともなう宿主に対する血管新生促進効果が得られたことを示しており、これらの相乗効果により優れた血流改善効果が得られたことが示唆された。これらの結果は、将来的なヒト iPS 細胞由来血管細胞を用いた重症下肢虚血に対する新規の治療法開発に向けた基礎的基盤になるものと思われる。



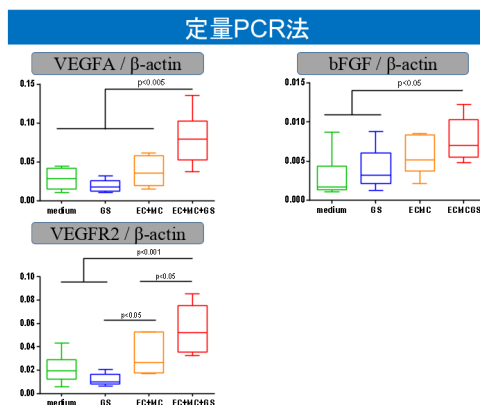
(図 1: ゼラチンスポンジ (GS) による HUVEC 移植の優れた細胞生存支持効果)



(図 2: GS と血管細胞の移植による血流改善効果)



(図3: 移植したヒト iPS 細胞由来血管細胞による生体内血管形成)



(図4: 細胞移植による血管新生関連因子の遺伝子発現の上昇)

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 7 件)

1. Matsuo T, Masumoto H, Tajima S, Ikuno T, Katayama S, Minakata K, Ikeda T, Yamamizu K, Tabata Y, Sakata R, Yamashita JK. Efficient long-term survival of cell grafts after myocardial infarction with thick viable cardiac tissue entirely from pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2015;5:16842.
2. Funamoto M, Masumoto H, Takaori K, Taki T, Setozaki S, Yamazaki K, Minakata K, Ikeda T, Hyon SH, Sakata R. Green Tea Polyphenol Prevents Diabetic Rats From Acute Kidney Injury After Cardiopulmonary Bypass. *Ann Thorac Surg*. 2016;101:1507-1513.
3. Kumagai M, Marui A, Tabata Y, Takeda T, Yamamoto M, Yonezawa A, Tanaka S, Yanagi S, Ito-Ihara T, Ikeda T, Murayama T, Teramukai S, Katsura T, Matsubara K, Kawakami K, Yokode M, Shimizu A, Sakata R. Safety and

efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. *Heart Vessels*. 2016;31:713-21.

4. Setozaki S, Minakata K, Masumoto H, Hirao S, Yamazaki K, Kuwahara K, Ikeda T, Sakata R. Prevention of abdominal aortic aneurysm progression by oral administration of green tea polyphenol in a rat model. *J Vasc Surg*. 2017;65:1803-1812.
5. Ikuno T, Masumoto H, Yamamizu K, Yoshioka M, Minakata K, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK. Efficient and robust differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells via lineage control with VEGF and cyclic AMP. *PLoS One*. 2017;12:e0173271.
6. Kawatou M, Masumoto H, Fukushima H, Morinaga G, Sakata R, Ashihara T, Yamashita JK. Modelling Torsade de Pointes arrhythmias in vitro in 3D human iPS cell-engineered heart tissue. *Nat Commun*. 2017;8:1078.
7. Tsumaru S, Masumoto H, Minakata K, Izuhara M, Yamazaki K, Ikeda T, Ono K, Sakata R, Minatoya K. Therapeutic angiogenesis by local sustained release of microRNA-126 using poly lactic-coglycolic acid nanoparticles in murine hindlimb ischemia. *J Vasc Surg*. In press.

[学会発表](計 16 件)

1. Tsumaru S, Sakata R et al. Therapeutic angiogenesis by local sustained release of microRNA-126 in murine hindlimb ischemia. 第 80 回日本循環器学会学術集会. 2015-2016 年
2. 津丸真一、坂田隆造ほか. マウス下肢虚血モデルにおける microRNA-126 の局所徐放による血管新生効果. 第 46 回日本心臓血管外科学会学術総会. 2015-2016 年
3. Tsumaru S, Sakata R et al. Therapeutic angiogenesis by local sustained release of microRNA-126 in murine hindlimb ischemia. The 24th Annual Meeting of Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (ASCVTS). 2016-2017 年
4. 津丸真一、坂田隆造ほか. マウス下肢虚血モデルにおける microRNA-126 の局所徐放による血管新生効果. 第 44 回日本心臓血管外科学会学術総会. 2016-2017 年
5. Tsumaru S, Minakata K, Masumoto H, Ono K, Izuhara M, Yamazaki K, Ikeda T,

- Sakata R. Therapeutic angiogenesis by local sustained release of microRNA-126 in murine hindlimb ischemia. European Association of Cardiology Congress. 2016-2017年.
6. Masumoto H, Nakane T, Tinney JP, Kowalski WJ, Minakata K, Sakata R, Keller BB. Implantation of human iPS cell-derived engineered cardiac tissues including cardiomyocytes and multiple vascular lineages ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in a rat model. European Association of Cardiology Congress. 2016-2017年.
 7. Nakane T, Masumoto H, Tinney JP, Kowalski WJ, Minakata K, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK, Keller BB. Impact of geometry and cell density on structural and functional maturation in large-format mesh engineered cardiac tissues. American Heart Association. 2016-2017年
 8. Li Z, Masumoto H, Minakata K, Kawatou M, Takimoto S, Hirao S, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita JK, Sakata R. Sequential treatment with sustained-release of basic fibroblast growth factor followed by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissue improved left ventricular function in a rat chronic myocardial infarction model. American Heart Association. 2016-2017年
 9. Tsumaru S, Minakata K, Masumoto H, Ono K, Izuhara M, Yamazaki K, Ikeda T, Sakata R. Angiogenic effects of local sustained release of microRNA-126 in murine hindlimb ischemia. American Heart Association. 2016-2017年
 10. 津丸 真一, 南方 謙二, 升本 英利, 尾野 亘, 出原 正康, 熊谷 基之, 山崎 和裕, 池田 義, 坂田 隆造. マウス下肢虚血モデルにおける microRNA-126 の局所徐放による血管新生効果. 第44回日本血管外科学会学術総会. 2016-2017年
 11. 李 子澎, 升本 英利, 南方 謙二, 川東 正英, 瀧本 真也, 平尾 慎吾, 池田 義, 坂田 隆造, 湊谷 謙司. 慢性期ラット心筋梗塞に対する bFGF 徐放後ヒト iPS 由来心筋組織シート移植の治療効果. 第47回日本心臓血管外科学会学術総会. 2016-2017年
 12. Nakane T, Masumoto H, Minakata K, Ikeda T, Minatoya K, Yamashita JK, Sakata R. Mesh-shaped engineered cardiac tissue generated from human iPS cell for cardiac regeneration. 第81回日本循環器学会学術集会. 2016-2017年
 13. 瀧本 真也, 升本 英利, 南方 謙二, 池田 義, 湊谷 謙司, 坂田 隆造, 山下 潤. Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissue meliorates heart failure in delayed cardiomyopathy of hamster model. 第81回日本循環器学会学術集会. 2016-2017年
 14. Tsumaru S, Masumoto H, Yoshioka M, Yoshizawa K, Kawatou M, Ikuno T, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita J.K, Minatoya K. Transplantation of human iPS Cell-derived Endothelial and Mural Cells Incorporated with Gelatin Sponge Scaffold increased the Blood Perfusion in a Murine Hindlimb Ischemia Model. European Society of Cardiology Congress. 2017-2018年
 15. Tsumaru S, Masumoto H, Yoshioka M, Yoshizawa K, Kawatou M, Ikuno T, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita J.K, Minatoya K. Therapeutic potential of human iPS Cell-Derived Endothelial and Mural Cells incorporated with Gelatin Sponge Scaffold in a Murine Hindlimb Ischemia Model. European Society for Vascular Surgery. 2017-2018年
 16. Tsumaru S, Masumoto H, Yoshioka M, Yoshizawa K, Kawatou M, Ikuno T, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita J.K, Minatoya K. Therapeutic Angiogenesis of human iPS Cell-Derived Endothelial and Mural Cells incorporated with Gelatin Sponge Scaffold in a Murine Hindlimb Ischemia Model. American Heart Association. 2017-2018年
- 〔図書〕(計 1 件)
- 升本英利、坂田隆造. Annual Review 循環器：心筋再生医療の進歩. 中外医学社. 2016. 7 ページ
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 件)
- 名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：
- 取得状況 (計 件)
- 名称：
 発明者：
 権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://kyoto-cvs.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田隆造 (SAKATA RYUZO)
京都大学・大学院医学研究科・名誉教授
研究者番号：20325781

(2) 研究分担者

池田 義 (IKEDA TADASHI)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40281092

山崎和裕 (YAMAZAKI KAZUHIRO)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：50464227

(3) 連携研究者

山下 潤 (YAMASHITA JUN)
京都大学・その他部局等・教授
研究者番号：50335288

(4) 研究協力者

升本英利 (MASUMOTO HIDETOSHI)
京都大学・大学院医学研究科・特定助教
研究者番号：70645754