

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：82674

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890249

研究課題名（和文）重症心不全の同種幹細胞移植治療へ向けた大動物モデル系の構築

研究課題名（英文）The assembly of an animal experimental model system for cell transplantation therapy using allogeneic stem cells with severe cardiac failure.

研究代表者

板倉 陽子 (ITAKURA YOKO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30582746

研究成果の概要（和文）：ブタ組織の胎児付着物（羊膜、胎盤、臍帯）から細胞を樹立した。これらの細胞は増殖能を有し、かつ、間葉系幹細胞マーカーを発現していた。その発現は安定し、ヒト細胞とブタでは同等であることが示された。の間葉系幹細胞マーカーが発現していた。EGFP（緑色蛍光タンパク質）遺伝子をマーカーとして組み込んだブタの羊膜由来細胞を心筋虚血性心不全モデルブタへ移植し組織検体の評価を行ったところ、EGFP陽性細胞の組織への生着が確認できた。

研究成果の概要（英文）：We established porcine amniotic membrane, placenta and umbilical cord-derived mesenchymal cells. Their mesenchymal cells were expressed mesenchymal stem cell markers, just as human cells. The cells transduced with enhanced green fluorescent protein (EGFP) were directly transplanted in injured myocardium on porcine chronic myocardial ischemic model. Injected allogeneic EGFP-expressing AMSCs were identified in the immunocompetent host heart without the use of any immunosuppressants at 4 weeks after transplantation. Immunohistochemistry revealed that EGFP colocalized with cardiac troponin T and cardiac troponin I.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1230000	369000	1599000
2011年度	1130000	339000	1469000
年度			
年度			
年度			
総計	2360000	708000	3068000

研究分野：糖鎖生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・外科学一般

キーワード：再生医学、心臓、大動物、評価、幹細胞移植、間葉系細胞

1. 研究開始当初の背景

| (1) 背景

近年、幹細胞は人工多能性幹 (iPS) 細胞研究をきっかけに再び大きな注目を集めている。その理由の一つには、幹細胞には機能低下を生じた種々の疾患に対し、再び正常機能をもたらす可能性を有する細胞移植治療といった再生医療が期待されることにある。実際、一部の幹細胞移植が様々な施設で施行されている。しかし、心臓病における幹細胞移植の臨床試験では、心臓機能の改善効果に関する有効性はいまだ明らかとなっておらず、今後の課題が多く残されている。万能細胞と呼ばれるヒト胚性幹 (ES) 細胞を使用することにより心筋を始め様々な組織へと分化させた細胞を治療に利用することは有効的であると予想されるが、倫理的問題や移植後の安全面などの課題があり現状困難である。

国内外において、胎児付着物由来の細胞は分化能が高く各種標的細胞へと分化誘導しやすい傾向にあることが知られている

(Portmann-Lanz, et al., *Am J Obstet Gynecol.*, 2010)。胎児付着物は医療廃棄物または非侵入襲組織であり、これらの組織を使用することによる倫理的問題は低く、入手もしやすい。その一つである羊膜由来細胞は、マウスおよびヒトで心筋へとよく誘導されることがすでに報告されている (Okamoto, et al., *Exp Cell Res.* 2007)。

一方、加齢に伴う心筋機能の低下は、高齢化を迎えた日本においては深刻な問題の一つである。しかし、重症な心疾患においては治療法の一つである心臓移植に規定があり、60歳以上の患者は対象とはなっていない。そこで、幹細胞を使用した細胞移植治療に大きな期待がもたれている。

以上のことから、細胞の樹立、特性解析ならびに移植実験を実施し、将来的な重症心疾患に対する幹細胞移植の臨床応用を目指し、用いる細胞の有効性及び安全性評価を実施する必要がある。しかし、安全性評価に有用と考えられる中大動物実験の系が確立されていないという課題がある。

(2) 現状

現在、幹細胞研究はマウスおよびヒト由来試料が多く用いられている。臨床を念頭にした自己移植モデル実験ではマウス由来細胞はマウスへと移植される一方、ヒト由来細胞はヒトへと移植することが不可能なため免疫不全マウスへ移植することで評価する。しかし、ヒト由来細胞をマウスへ移植する実験系では正確な細胞および機能評価がなされることは困難である。そこで、モデル系とし

てヒトに類似していると言われるヒツジ、ブタ、サルなど中大動物を用いた機能評価は必須であると考えられるが、幹細胞研究においては、上記の細胞を用いた評価はこれまでほとんど報告がなく、細胞の樹立自体が確立されていない。そのため、ブタ等を用いた中大動物由来幹細胞の樹立系の確立、マウス、ヒト由来細胞との比較評価を実施することが必須である。

申請者はこれまで、糖鎖に焦点を当てた幹細胞評価系の確立 (Kuno, Itakura, et al., *JPB* 2008) ならびに、関連糖鎖を認識する糖結合タンパク質 (レクチン) の糖鎖結合特異性解析 (Itakura, et al., *JB* 2007, Yabe, Itakura et al., *BBRC* 2009) を実施してきた。自身が確立した細胞評価システムを用いることにより、マウスおよびヒト由来各種幹細胞においてその由来組織ならびに分化状態に応じて糖鎖が変化していることを明らかとし、ヒト ES 細胞もその特性に応じた変化を示すことを明らかとしている。そこで、いまだ確立されていない細胞においても、分化に適した特性を示す細胞を樹立し、選抜することによって、より臨床へと近づけるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

幹細胞生物学の発展とともに、細胞移植を利用した再生医療応用への関心が強く寄せられている。中でも幹細胞移植治療においては、皮膚や骨・軟骨などを始め、心臓、肝臓、膵臓など主要臓器に関する疾患など幅広く期待される。臨床における細胞移植では自家移植あるいは同種移植となるが、特性の明らかな細胞の個体レベルでの評価系が存在するのは主としてマウスのみである。ヒトに近い中大動物での評価が求められているが、特性評価された中大動物の幹細胞は現状ほとんど樹立されていない。そこで、本研究では、1) ブタの羊膜や胎盤由来細胞を樹立し、安定培養系のプロトコルを確立すること、2) 得られた細胞の心筋への分化誘導法を確立、特性評価を実施し、ヒト由来細胞との比較解析を実施すること、3) 臨床応用を目指しモデル動物への細胞移植治療法の検討を行うことを目的とした。ヒトへの臨床応用に用いるためには多くの検討課題が存在するが、本研究では、その第一歩として、同種細胞移植のための基盤確立に着目した検討を実施した。

3. 研究の方法

(1) 研究概略

数ある疾患の中でも特に重症心不全に焦点を当て、ブタをモデル動物とした細胞移植治療の基盤確立を目指した。すでに報告されているヒト幹細胞研究においては、胎児組織由来の細胞は心筋分化能が高く、細胞ソースとして期待されている。そこで、胎児組織由来の細胞をヒトと同様にブタより樹立した。さらに、既存のヒト細胞における知見を下に、ブタ胎児組織より樹立した細胞を安定的に培養する方法を検討した。さらに、樹立した細胞は、遺伝子発現解析や免疫染色、糖鎖プロファイル解析などによりその特性評価を実施した。

(2) 方法

①EGFP-トランスジェニックブタ組織由来細胞の樹立

ブタの羊膜や胎盤などから細胞を樹立することを目指した。本研究では最終目標が移植細胞評価を行うことにあつたため、移植細胞を判別するマーカーとしてEGFPを組み込んだブタより細胞を樹立し、得られた細胞を安定的に培養するための条件検討を行った。

②EGFP-トランスジェニックブタ幹細胞の特性解析

①で樹立した間葉系幹細胞において、細胞増殖能の観察、遺伝子発現解析および糖鎖プロファイル解析などの特性評価を行った。既存のマウスおよびヒト由来間葉系細胞の形態学的特徴ならびに遺伝子発現などに関する結果と比較検討し、臨床応用の基盤を目指した最適な細胞ソースの評価を行った。

③EGFP-トランスジェニックブタ幹細胞の心筋分化誘導法の確立

上記で得られた細胞に対し、効率的な心筋分化誘導法の確立を目指した。重症心不全モデルブタへの細胞移植治療を念頭に、心筋への効率的かつ安定的な誘導法の開発を目指した。

④心筋分化誘導細胞の特性解析

③で確立した誘導法に従い得られた心筋分化細胞を形態学的・遺伝学的知見からこれまでに得られているマウスおよびヒト由来細胞の結果と比較し評価を行った。

⑤心不全モデルブタを用いた細胞移植法の検討

これまで、心臓における治療として細胞移植を行う方法は確立されていない。そこで、EGFPをマーカーとし、間葉系幹細胞およびin vitroで分化誘導した心筋分化細胞のような分化段階の異なる細胞の移植効果を検証し、生着率・有効性ならびに機能改善効果の評価することを目指した。

4. 研究成果

医療用廃棄物かつ非侵襲組織である胎児付着物(羊膜、胎盤、臍帯)由来の細胞は資源として有効活用が大いに期待されるものである。まずは、すでに樹立されているヒト細胞に関してその特性評価を実施した。細胞表面糖鎖を調べるため、羊膜、胎盤、臍帯由来細胞についてエバネッセント波励起型レクチンマイクロアレイを実施した。その結果、各由来組織に応じてクラスターを形成し、特異的な糖鎖プロファイルを有することを示した。また、羊膜由来の間葉系細胞では、フローサイトメトリー(FCM)による解析の結果、間葉系に特異的なマーカー(CD29, CD44)を発現していた。(表1)

表1 ヒト組織由来細胞のFCM解析結果

	hAM925
CD29	++
CD44	++
CD45	-
HLA Class I A, B, C	++
HLA Class II DR	-

次に、大動物モデル実験のため、ブタの胎児付着物から幹細胞の樹立を試みた。樹立方法は、羊膜・臍帯においては組織法および酵素法を、胎盤では組織法を用いた。羊膜の細胞は、8株中6株が樹立に成功した。臍帯の細胞は5株すべてが樹立に成功した。胎盤は3株すべてが樹立に成功した。これらの細胞を評価するため、まずは、細胞の形態を観察し、増殖能を調べた。羊膜では、上皮系細胞様の細胞は維持できなかったが、繊維芽細胞様で単離された細胞は順調に培養可能であった。また、上皮系細胞様で得られた細胞は継代の際には非常にはがれにくかったが、極力細胞へのダメージを抑えることで培養が可能であった。臍帯では、ほとんどの株で細胞は一定速度で増殖し、比較的大きな繊維芽細胞様の細胞が単離された。胎盤では、一部の細胞は上皮系細胞様の細胞であったが、徐々に繊維芽系細胞様の形態を維持した。(図1、2)

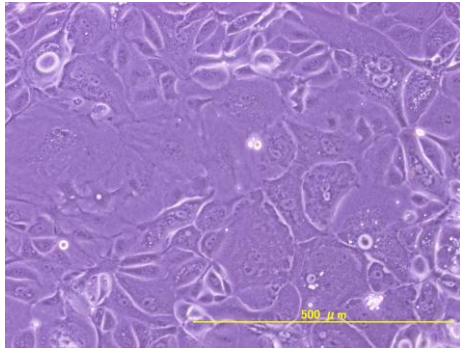


図1 ブタ（羊膜）由来上系細胞様の細胞

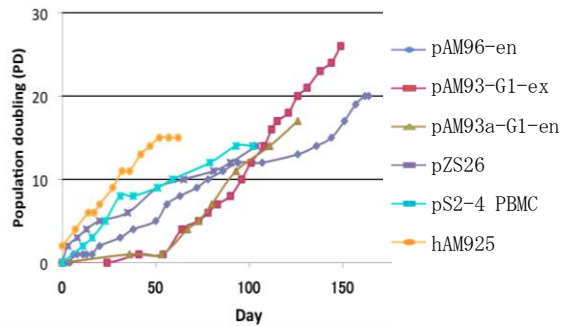


図2 ブタおよびヒト由来細胞の増殖曲線
pAM：ブタ羊膜 pZS：ブタ骨髄間質
pS：ブタ末梢血 hAM：ヒト羊膜

続いて、FCMを用いてブタ細胞における表面マーカーを解析した。移植を念頭にした細胞評価を行うため、間葉系幹細胞マーカー (CD29, CD44)、造血系幹細胞マーカー (CD45)、単球/顆粒球マーカー (SWC3a)、免疫応答関連マーカー (SLA class I, SLA class II DR, SLA class II DQ) を用いた。その結果、羊膜・臍帯・胎盤すべてにおいてCD29およびCD44に対する陽性を示した。一方、CD45に対してはすべて陰性であった。また、一部の臍帯（組織法）由来の細胞においては、SWC3aが陽性であるのに対し、そのほかの細胞ではすべて陰性であったことから、樹立法によっては単離の際に血球系の細胞など目的外の細胞が混入する可能性があり、樹立に際し十分注意する必要があることが示唆された。SLA class Iに対し解析したすべての細胞が陽性であったが、そのほかの免疫応答関連マーカーはすべて陰性であった。（表2）

表2 ブタ組織由来細胞のFCM解析結果

	sUC73 -ex	sUC76 -ex	sUC72 -en
CD29	++	++	++
CD44	++	++	++
CD45	-	-	-

SWC3a	++	+	-
SLA Class I	++	++	++
SLA Class II DR	-	-	-
SLA Class II DQ	-	-	-
	sAM93a-en (P4)	sAM93-ex (P6)	sAM93-ex (P11)
CD29	++	++	++
CD44	+	++	++
CD45	-	-	-
SWC3a	-	-	-
SLA Class I	++	++	++
SLA Class II DR	-	-	-
SLA Class II DQ	-	-	-
	sPL52 -ex	sPL53 -ex	
CD29	++	++	
CD44	++	++	
CD45	-	-	
SWC3a	-	-	
SLA Class I	++	++	
SLA Class II DR	-	-	
SLA Class II DQ	-	-	

ブタの胎児付着物から得られた間葉系幹細胞はEGFPを導入しているため目視で緑色に光ることが確認できた。この幹細胞を心筋虚血性心不全モデルブタの心臓へ移植し、4週間後に開腹した。その後、ブタから採取した心臓を確認したところ、細胞移植した一部の心臓組織でEGFP陽性の細胞を確認できた。in vivoでの心筋への分化方向性が期待されたことから、現在、in vitroにおける分化誘導法の確立および特性評価を検討している。

以上のことから、胎児付着物から間葉系幹細胞の樹立に成功し、ブタ由来細胞の表面マーカーの特徴はヒトと類似していることを示した。樹立した細胞は、由来する組織に応じてその樹立・培養系の安定性は異なるが、細胞の表面的特徴は変わらないことが明らかとなった。また、ブタを用いた同種幹細胞移植は拒絶反応を起こすことなく細胞が生着可能であることが明らかとなり、その有用性を示した。今後、同種幹細胞移植へ向けた

ヒトへの臨床応用への第一歩となることが期待される。

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)

[学会発表] (計3件)

- ① 板倉陽子、久野敦、高橋順子、五條理志、許俊鋭、梅澤明弘、平林淳、豊田雅士 再生医療へ向けた細胞表層糖鎖を用いた幹細胞評価技術の開発
ーレクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイル解析の利用ー、日本人工臓器学会、2010年11月19日、仙台国際センター (宮城県)
- ② 板倉陽子、上大介、五條理志、梅澤明弘、豊田雅士 糖鎖プロファイル解析を利用した細胞移植療法に適した組織環境評価、第84回日本生化学会大会、2011年9月23日、国立京都国際会館
- ③ 木村光利、五條理志、豊田雅士、板倉陽子、許俊鋭、梅澤明弘、小野稔 プタ慢性心筋虚血モデルへの同種プタ羊膜由来細胞移植 第11回心血管再生先端治療フォーラム、2011年7月2日、東京

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板倉 陽子 (ITAKURA YOKO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30582746

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：