

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390145

研究課題名(和文) 卵膜由来間葉系幹細胞系統分離法の開発、ならびに分類細胞の特異的移植療法の確立

研究課題名(英文) Development of method for the systemic separation of fetal membrane-derived MSCs to establish the cell-specific transplantation therapy

研究代表者

池田 智明 (IKEDA, TOMOAKI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・病院・客員部長

研究者番号：80202894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵膜由来間葉系幹細胞(MSC)分離法を開発し、様々な疾患に対応した細胞移植療法を確立することを目指した。

1. 卵膜MSC移植の臨床応用を目指した基礎的研究【難治性疾患モデルにおける卵膜MSC移植による治療効果解析】ラット人工心肺モデルおよびマウスSLEモデル【分離・大量培養法の樹立】国立循環器病研究センターセルプロセッシングセンター(CPC)において、GMP準拠ヒト卵膜MSC調製法を確立し、北海道大学病院CPCへの技術移転を行った。
2. 卵膜MSC移植による前臨床試験【大型動物における卵膜MSC静脈内投与による毒性試験】ブタにおいて卵膜由来MSCを経静脈的に投与し、血行動態変化がないことを確認した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop the method to separate fetal membrane-derived MSCs, and to establish the optimized cell-based therapy for the application in a variety of diseases.

1. Basic research for the clinical application of fetal membrane-derived MSC transplantation; Analysis of therapeutic effects in refractory disease models after fetal membrane-derived MSC transplantation: rat artificial lung and mouse SLE models. Establishment of the method for cell separation and mass culture: In National Cardiovascular Research Center Cell Processing Center (CPC), we established a method to generate GMP-grade human fetal membrane-derived MSCs, and this technique was transferred to Hokkaido University Hospital CPC.
2. Pre-clinical trials by fetal membrane-derived MSC transplantation Toxicity test of fetal membrane-derived MSCs in large animals: Fetal-membrane-derived MSCs were intravenously injected in pig and no hemodynamic change was observed.

研究分野：再生医療、産婦人科学

キーワード：細胞・組織 間葉系幹細胞 胎児付属物 卵膜 細胞シート 他家移植

1. 研究開始当初の背景

近年、既存の治療に抵抗性を示す難治性心臓血管および脳血管疾患に対する再生医療の必要性が高まっており、骨髄、脂肪などに存在する幹細胞を用いた組織再生療法が注目され、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSC)も細胞ソースとして期待されている。非造血系の未分化細胞であるMSCは、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、筋細胞、神経細胞などの様々な組織に分化する能力を有する細胞として知られており、国内外で心臓血管などの再生を目的として臨床研究が盛んに行われている。しかし、現在臨床的に幅広く用いられる骨髄由来MSCは、侵襲性や移植細胞数確保が困難(急性期に適用不可能)等の問題点があり、細胞移植が断念されるケースも多い。

そこで我々は、骨髄由来MSCの問題点を克服すべく、新たな移植ソースとして、分娩時に廃棄されている胎児付属物である卵膜に着目した。卵膜を用いる利点として、1) 従来、廃棄されるため大量かつ容易に細胞が入手可能である2)骨髄採取のように細胞の採取に伴う提供者への侵襲性がない3)胎児由来の若く、増殖能が高い細胞を得ることができる。4)胎児由来であることから免疫原性が低い5)また、卵膜由来MSCは移植医療・再生医療に常に付きまとう倫理的問題を軽減することができ、研究・臨床応用を進めて行く上で非常に有利である。申請者らは、すでにヒト卵膜からMSCを分離・培養することに成功している。特筆すべきことに、一人分のヒト卵膜から、約6千人分の移植に必要な細胞数を確保することができた。これは、移植ソースとして用いるにあたり非常にアドバンテージとなり、既存の細胞源にはない卵膜

由来MSC独自の治療法が期待できる。

これまで、申請者らは卵膜由来MSCの他家移植における治療効果ならびに拒絶反応について検討を行い、卵膜由来MSCは他家移植において現在臨床応用されている骨髄由来MSCと同等の閉塞性動脈硬化症に対する血管新生効果や (Ishikane S, et al. Stem Cells 2008)、心筋炎に対する心機能改善効果を有することを報告した (Ishikane S, et al. JM ol Cell Cardio 120 10)。興味深いことに、卵膜由来MSCは他家移植に伴う拒絶反応を回避し、自己骨髄MSC移植と同等の治療効果を示すことを見いだしている。

2. 研究の目的

卵膜由来の間葉系幹細胞 (MSC; mesenchymal stem cell)の分類、細胞純化法および誘導法を開発し、様々な疾患に対応した最適な細胞移植療法を確立することを目的とする。

MSCは間葉系の多様な前駆細胞を含んでおり、MSC移植療法が有効な疾患は幅広い。卵膜由来MSC移植療法の治療効果を最大限に引き出すべく、対象疾患に適した前駆細胞を得るために形態的・機能的・高純度分類法を確立する。

さらに、様々な疾患に対応した最適な細胞移植療法を確立する。加えて、卵膜由来MSCの長期保存法の開発や細胞バンク化を視野に入れた研究も行う。

再生医療における卵膜由来MSCが持つ潜在性に注目し、適応疾患に対する細胞規格の最適化、応用化を確立すると共に、診断材料としての応用法も開発する。

3. 研究の方法

(1) 卵膜MSC移植の臨床応用を目指し

た基礎的研究

【各種難治性疾患モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果解析】

ラット心筋梗塞モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果メカニズム解析：核医学技術を用いた細胞トラッキング法確立を目指した。

ラット人工心肺モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果メカニズム解析：ラット人工心肺モデルでの卵膜 MSC 移植による治療効果検証を目指した。

マウス SLE モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果メカニズム解析：マウス SLE モデルでの卵膜 MSC 移植による治療効果検証を目指した。

【分離・大量培養法の樹立】

細胞移植に必要な MSC を確保するには、セルプロセッシングセンター(CPC)にて組織から MSC を分離培養する必要がある。国立循環器病研究センターCPCにおいて、GMP に準じたヒト卵膜 MSC 調製法の確立を目指した。

(2) 卵膜 MSC 移植による前臨床試験

【大型動物における卵膜 MSC 静脈内投与による毒性・安全性試験】

臨床応用を目指した研究において、安全性を評価するには大動物を用いた検討は必須である。そこで、大動物を用い、卵膜由来 MSC の大量静脈内投与による毒性・安全性評価を行った。

4. 研究成果

(1) 卵膜 MSC 移植の臨床応用を目指した基礎的研究

【各種難治性疾患モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果解析】

ラット心筋梗塞モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果メカニズム解析：核医学技術を用い hNIS 過剰発現系による細胞トラッキング法確立し、卵膜 MSC 細胞の移植後の動態を経時的に観察可能な系を確立した。

ラット人工心肺モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果メカニズム解析：ラット人工心肺モデルを確立し、卵膜 MSC 移植による治療効果を証明した。

マウス SLE モデルにおける卵膜 MSC 移植による治療効果メカニズム解析：マウス SLE モデルを確立し、卵膜 MSC 移植による治療効果を証明した。

【分離・大量培養法の樹立】

国立循環器病研究センターCPC において、GMP に準じたヒト卵膜 MSC 調製法の確立した。更に本調整法に関し、北海道大学病院臨床研究開発センターCPC への技術移転を行った。

(2) 卵膜 MSC 移植による前臨床試験

【大型動物における卵膜 MSC 静脈内投与による毒性・安全性試験】

ブタにおいて、卵膜由来 MSC を経静脈的に大量投与を行い、観血的大・肺動脈圧、経皮的動脈血酸素飽和度を経時的にモニターし、血行動態変化の有無がないことを確認した。

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8件、全て査読有り)

1. Onishi R, Ohnishi S, Higashi R, Watari M, Yamahara K, Okubo N,

- Nakagawa K, Katsurada T, Suda G, Natsuiizaka M, Takeda H, Sakamoto N. Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Severe Colitis in Rats. *Cell Transplant*. 2015 Mar 25.
2. Ohshima M, Taguchi A, Tsuda H, Sato Y, Yamahara K, Harada-Shiba M, Miyazato M, Ikeda T, Iida H, Tsuji M. Intraperitoneal and intravenous deliveries are not comparable in terms of drug efficacy and cell distribution in neonatal mice with hypoxia-ischemia. *Brain Dev*. 2015 Apr;37(4):376-86.
 3. Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K, Ikeda T. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2014 Feb 14;9(2):e88319.
 4. Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34(+) cells in a mouse model of neonatal stroke. *Neuroscience*. 2014 Mar 28;263:148-58.
 5. Ishikane S, Hosoda H, Yamahara K, Akitake Y, Kyoungsook J, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Miyazato M, Kangawa K, Ikeda T. Allogeneic transplantation of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell sheets increases neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. *Transplantation*. 2013 Oct 27;96(8):697-706.
 6. Tsuda H, Yamahara K, Otani K, Okumi M, Yazawa K, Kaimori JY, Taguchi A, Kangawa K, Ikeda T, Takahara S, Isaka Y. Transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Cell Transplant*. 2014;23(7):889-99.
 7. Ohshima M, Yamahara K, Ishikane S, Harada K, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Miyazato M, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Kodama M, Kangawa K, Ikeda T. Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Sep;53(3):420-8.
 8. Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Kanda T, Inoue T, Kasahara Y, Hirose H, Sato I, Matsuyama T, Nakagomi T, Yamahara K, Stern D, Ogawa H, Soma T. Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2012

Apr;14(4):441-50.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

「羊膜間葉系細胞の高純度簡便分離培養法、治療剤および至適凍結保存法」特願
2013-170008

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 智明 (IKEDA TOMOAKI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・病院・客員部長

研究者番号：80202894

(2) 研究分担者

山原 研一 (YAMAHARA KENICHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：50450888

大谷 健太郎 (OTANI KENTARO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：50470191

犬伏 正幸 (INUBUSHI MASAYUKI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70399830