

主論文の要旨

**iPS cell sheets created by a novel magnetite tissue
engineering method for reparative angiogenesis**

〔 Mag-TE 法を応用した iPS 細胞シート移植による修復的血管新生 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

鬼頭 哲太郎

【諸言】

細胞移植による治療的血管新生療法は難治性重症末梢動脈疾患における新たな治療法としてその効果や安全性が報告されているが、高齢患者、透析中の慢性腎不全患者、コントロール不良の重症糖尿病患者において効果が限定的であることが明らかとなっている。また、一般的な細胞移植に用いられる細胞浮遊液の直接注入療法はいくつかの欠点が指摘されている。そのため、細胞移植による治療的血管新生療法において、新たな移植候補となる幹細胞および前駆細胞の同定とその移植法の確立が求められている。中胚葉系の表面マーカーである Flk-1 (VEGFR-2) は造血系および心血管系細胞への分化過程における最も初期に発現するマーカーと考えられており、心血管前駆細胞といわれている。また近年、山中らによりすべての細胞に分化しうる胚性幹細胞と同等の性質を有する人工多能性幹細胞 (通称 iPS 細胞) が樹立され、その基礎研究の進展および応用法に注目が集まっている。我々は山中らの樹立した iPS 細胞を用い、iPS 細胞由来血管前駆細胞である Flk-1 陽性細胞移植により血管新生が増強されることを明らかにしており、本田らのグループにより開発された磁性ナノ粒子 (MCLs: Magnetically labeled with nanoparticle-containing liposomes) を用いた Mag-TE 法による組織三次元構築法を用いて間葉系幹細胞 (MSC) シート作成およびシート移植療法により、直接細胞移植療法に比べ血管新生能が増強されることを明らかにしている。

【対象および方法】

第一に、Mag-TE 法を用いて重層構造を有する iPS 細胞シート (iPS 細胞由来血管前駆細胞シート/Flk-1 陽性細胞シート) を作成することが可能か検討することを目的とした。分化誘導法にて Flk-1 陽性細胞を分化培養し FACS にて解析した。また、Flk-1 陽性細胞を FACS Aria を用いて分離精製し、Flk-1 陽性細胞に磁性ナノ粒子 (MCLs) を取り込ませシート作成を試みた。MCLs を取り込ませた Flk-1 陽性細胞の分化増殖能の検討および細胞シートの質的検討を免疫組織染色法にて行った。

第二に、マウス下肢虚血モデルにおける iPS 細胞由来細胞シート移植による修復的血管新生効果について検討することを目的とした。8 週令の KSN ノードマウスを用いマウス下肢虚血モデルを作成し、コントロール群、Flk-1 陽性/陰性細胞シート群の 3 群 (コントロール、Flk-1+, Flk-1-) に割り付け細胞シート移植による血管新生効果を検討した。レーザードップラー法による血流改善効果、毛細血管密度による血管増殖効果、血管増殖因子の遺伝子発現を RT-PCR にて定量解析した。また、虚血組織における apoptosis の程度を TUNEL 染色にて評価した。最後に PBS 局所注入群、Flk-1 陽性細胞直接注入群、Flk-1 陰性/陽性細胞シート群の 4 群に割り付け血流改善効果および血管増殖因子の遺伝子発現を評価した。

【結果】

MCLs を取り込ませた Flk-1 陽性細胞の血管内皮細胞および血管平滑筋細胞への分化

増殖能に有意差は認めなかった。FACS Aria を用いて Flk-1 陽性細胞を分離精製(精製純度 98%以上)し、 1×10^6 個の細胞を MCLs および ECM(Extracellular Matrix)と混和し、永久磁石上に留置することで、15~20 層からなる暑さ $300 \mu\text{m}$ の iPS 細胞シート(iPS 細胞由来血管前駆細胞シート/Flk-1 陽性細胞シート)を作成することができた。Flk-1 陽性細胞シートは、Flk-1 に染色性を示し CD31, α SMA の分化細胞は認めなかった。細胞シートの TUNEL 染色は陰性であった。マウス下肢虚血モデルへの移植による血流改善効果において、細胞シートは移植後 21 日目にて生着し、Flk-1 陽性細胞シート移植において周囲から微小血管が流入していることを確認した。レーザードップラー法による血流改善効果は Flk-1+群において有意に高かった(移植後 3、7、14、21 日、定量評価 $p < 0.05$)。移植後 21 日目の大腿直筋の CD31 陽性細胞数を測定した毛細血管密度は、Flk-1+群において約 2 倍高く、有意に高かった($p < 0.05$)。同様に移植シート内の毛細血管密度も同様に有意に高く血管増殖の上昇を認めた。移植後 7 日目における血管増殖因子の遺伝子発現を RT-PCR による VEGF および bFGF の発現にて評価したところ、虚血肢における両遺伝子発現が上昇することを認めた。最後に、Flk-1 陽性細胞の直接注入療法と比較検討を行ったところ、Flk-1 陽性細胞直接注入群における血流改善効果を認めたものの、Flk-1 陽性細胞シート移植群において血流改善効果(LDBF)、遺伝子発現(VEGF、bFGF)上昇効果はいずれもシート移植群において有意に高く($p < 0.05$)、虚血肢における TUNEL 染色陽性細胞数は有意に低かった($p < 0.05$)。

【考察】

本方法において、ECM 混和した Mag-TE 法を用いることで重層構造を有する iPS 細胞シート(iPS 細胞由来血管前駆細胞シート/Flk-1 陽性細胞シート)を作成することが可能であることが明らかとなり、iPS 由来血管前駆細胞シート移植はマウス下肢虚血モデルにおける修復的血管新生効果を有することが明らかとなった。虚血筋内の血管増殖因子の遺伝子発現の上昇が毛細血管密度の上昇および血流改善効果を引き起こしていることが明らかとなった。また細胞の局所注入療法に比し、シート構造を有する移植片として目的細胞を移植することが血管増殖因子の遺伝子発現を有意に上昇させ毛細血管の増殖および血流改善効果を発揮したと考える。

【結語】

細胞移植による再生治療において、移植細胞の直接局所注入療法に比しより高い血管新生効果を有する本研究は、細胞浮遊液の直接注入療法におけるいくつかの欠点を補い、虚血性疾患(難治性重症末梢動脈疾患等)への再生療法における新たな治療法になりうると思う。