

課題番号 : 23 指 201

研究課題名 : 細胞調整室 (CPC) を用いた新規療法に関する研究

主任研究者名 : 萩原将太郎

分担研究者名 : 萩原将太郎、大河内仁志、石坂幸人、辻谷俊一、杉山温人

キーワード : 再生医療、CPC、樹状細胞、血管新生、腫瘍免疫

<背景>

本格的な高齢化社会を目前に控え、動脈硬化による血行障害、膵内分泌異常、悪性腫瘍および癌治療に伴う合併症等の罹患者数の著明な増加が予測されている。これらに対する有効かつ医療経済性に優れた治療法として細胞治療が期待されている。

<目的>

Cell processing center を用いた医療技術の開発を行うことを目的とする。本研究では、ヒトの幹細胞を用いた再生医療、自己または同種細胞を用いた移植医療、細胞免疫療法等についての基礎技術開発を行う。

I. 細胞調製室 (CPC) を用いた新規療法の開発

1) CPC の運用体制を構築し、品質管理標準手順、衛生管理、バリデーション等についてマニュアルを作成した。

2) 再生医療、免疫療法、移植療法の基盤技術となる安全な細胞培養法の確立を目指し、動物血清を用いない自己血小板濃厚血漿による細胞培養法を確立し、骨髄由来間葉系幹細胞の選択的増幅法を確立した。

II. 骨髄由来間葉系細胞による血管新生作用の基礎的検討

末梢性動脈疾患に対して自己骨髄由来の単核細胞を濃縮して筋注する治療法があるが、400ml 以上という大量の骨髄液を採取しなければならない。そこで少量の骨髄 (10 ml 程度) を採取し、細胞調製室で間葉系幹細胞を培養して、細胞数を確保した後に投与するという新しい治療法を開発することを目指す。そのために以下の実験を行った。

1) 動物由来の血清の代替として自己多血小板血漿をもちいた骨髄培養法の確立と間葉系幹細胞の増幅培養法の確立

2) マウスの下肢虚血モデルの作製

3) マウスにおける骨髄由来の間葉系幹細胞の培養と移植実験

4) ビーグル犬をもちいた間葉系幹細胞移植の安全性の検証

以上の結果より、マウスの下肢虚血モデルにおいて培養した骨髄間葉系幹細胞を移植すると筋肉内に血管新生を促進し、一部の細胞は血管内皮細胞になっていることが示唆された。

次にビーグル犬の下肢虚血モデルを作成し、ビーグル犬の多血小板血漿で培養した骨髄由来の間葉系幹細胞を投与して安全性と効果を検討した。

まず古河市の動物実験施設ハムリー (株) において 10-14 月齢のビーグル犬の左側外腸骨動脈と正中仙骨動脈を結紮、切断して下肢虚血モデルを作製した。次にイヌ骨髄由来間葉系細胞の培養を行った。1 匹の犬から動物愛護上の理由で大量に採血できないので、複数のビーグル犬か

ら各 50ml ずつ採血をして、多血小板血漿 (PRP) を調整し、プール血漿とした。ビーグル犬より腸骨穿刺により骨髓液を 3-5ml 採取した (n=5)。骨髓液から単核球分画を Ficoll 法により分離して、 α -MEM 培地に PRP を 10% 添加して 2 週間程度培養して間葉系細胞を増殖させた。

培養でよく増殖の見られた個体の骨髓由来の間葉系細胞を $1 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$ となるように調整して、蛍光色素の DiI で細胞を標識した後、作製したモデル犬の大腿四頭筋に $100 \mu\text{L}$ ずつ 6 カ所(合計 6×10^6 個)と 9 カ所(合計 9×10^6 個)に分けて筋注した(n=2)。対照群は PBS を筋注した (n=1)。移植後 2 週間と 6 週間で大腿四頭筋と腓腹筋を採取し、ホルマリン固定後にパラフィン包埋し、組織学的に検討するために各種染色を行った。

移植後 2 週間と 6 週間の大腿四頭筋にはいずれも DiI 陽性の移植した細胞が認められた。血管新生については、明らかに血管が増えている所見は得られておらず、それぞれ 1 匹ずつの検討になったため、効果についての有意差検定はできなかった。少なくともビーグル犬におけるシミュレーションの結果は、細胞移植による合併症は認められず、移植手技は安全に行えることを証明できたと考えている。

今後、ヒト患者への臨床応用を目指して研究を継続する。

本研究は、当センター倫理委員会の承認を得た後、ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関わる倫理審査へ申請中である。

Ⅲ. 樹状細胞への蛋白導入方法の開発

腫瘍細胞に由来する蛋白質を用いた lysate-DC 療法の際に効率的な蛋白質導入システムの開発が必要である。培養液中に添加すると細胞の中に取り込まれる cell-penetrating peptide (CPP) である NTP: nuclear trafficking peptide を新たに同定した。本課題では、R9(アルギニンが 9 個連続したペプチド)、Tat 由来ペプチドと NTP の有効性を比較した。

- a. NTP は DC に外来性蛋白質を導入できるが、抗原提示や T 細胞の活性化を増強させない。
- b. R9 を用いることで DC 細胞に外来性蛋白質が導入可能となり、抗原提示能も増強できることが分かった。
- c. しかし、R9 で刺激した DC では、皮下移植した腫瘍の増殖は抑制できない。などの知見が得られた。

Subject No. : H23-201

Title : Development of the novel therapy methods using the cell processing center

Researchers : Hiroshi Ookochi, Yukihiro Ishizaka, Shun-ichi Tsujitani and Shotaro Hagiwara

Key word : Cell processing center, regenerative medicine, dendritic cell, immune-therapy
angiogenesis

Abstract :

<Aim of the study> To address the problems of the aged society, such as increasing the incidence of malignancies and vascular diseases caused by arteriosclerosis, the development of cell therapy is needed. In this study, we develop the basic technology of cell therapy using cell processing center.

1. The development of novel therapy using CPC

- 1) CPC management board was organized, and we developed the manuals of quality control, sanitation and validation of CPC.
- 2) We investigated the method of cell culture system using platelet rich plasma.
- 3) In order to avoid pathogen from fetal bovine serum, cell culture system using autologous platelet rich plasma was established.
- 4) The method of cell culture for expansion of mesenchymal stem cells was investigated, and we established cell culturing system for mesenchymal stem cells.
- 5) The quality control and assurance of the products which are produced using CPC is necessary. Therefore, we have set up the measuring system for CD 34 using flow cytometry.

2. Basic investigation of angiogenesis from mesenchymal stem cells

- 1) We established the mouse model of lower limb ischemia.
- 2) The method of mesenchymal stem cells derived from bone marrow was investigated.
- 3) We injected mesenchymal stem cells to the mouse model of lower limb ischemia and we observed the angiogenesis in the injected site.
- 4) The safety of mesenchymal stem cell injection must be evaluated. To evaluate the toxicity of mesenchymal stem cells, we injected mesenchymal stem cells in limbs of Beagle dogs and investigated the safety. No acute and sub-acute reaction was observed in the dogs.

3. Investigation of the method of protein introduction into dendritic cells

- 1) The new cell penetrating peptide (NTP) was developed.
- 2) The efficacy of protein introduction into dendritic cells were compared among NTP, Tat derived peptide, R9.
 - a. We confirmed NTP introduced exogenous protein into dendritic cells, however NTP did not enhance the ability of antigen presentation and activity of T cells.

Researchers には、分担研究者を記載する。

b. R9 facilitated the introduction of exogenous protein into dendritic cells, and enhanced antigen presenting ability.

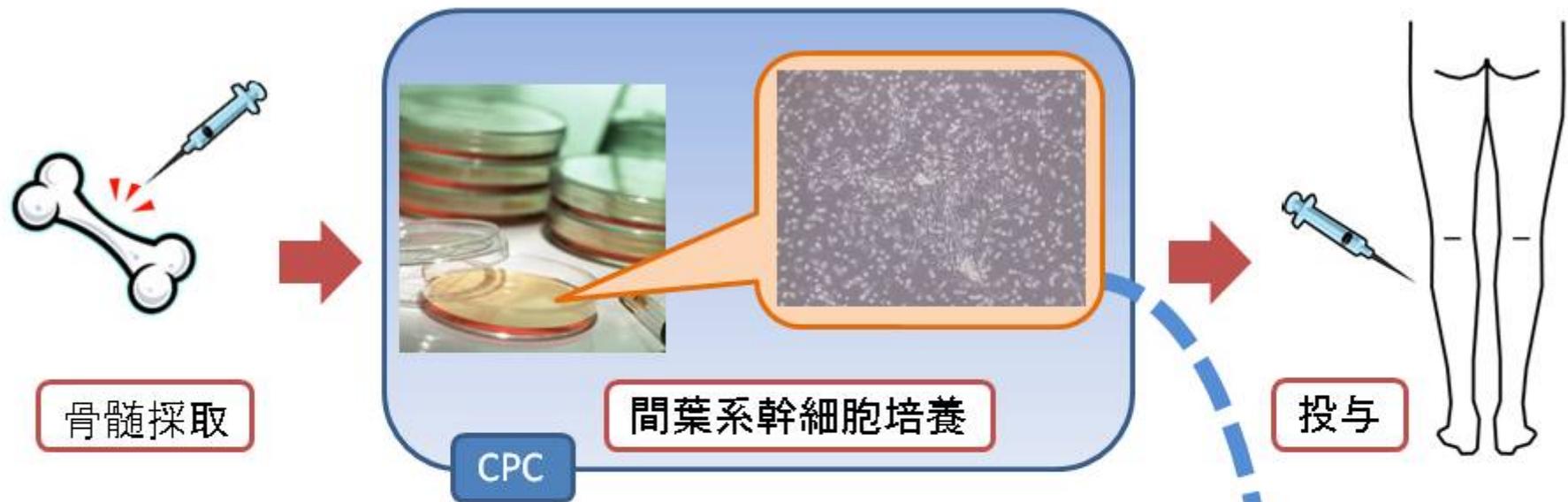
c. However, the dendritic cells stimulated by R9 did not suppress the growth of tumor which was implanted in the mouse skin.

課題番号(23 指 201)
細胞調整室(CPC)を活用した新規療法に関する研究

主任研究者:萩原將太郎

分担研究者:辻谷俊一、杉山温人、
石坂幸人、大河内博

自己骨髄由来間葉系幹細胞移植による末梢動脈疾患への血管再生療法



後肢虚血モデルマウスでの検討データ

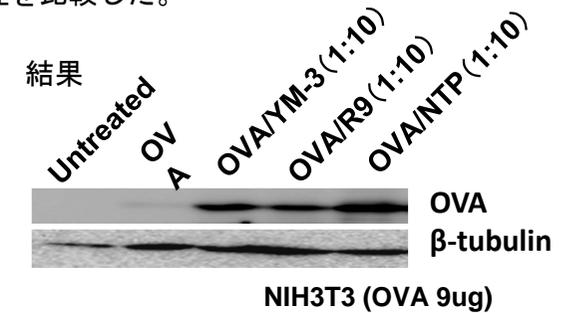
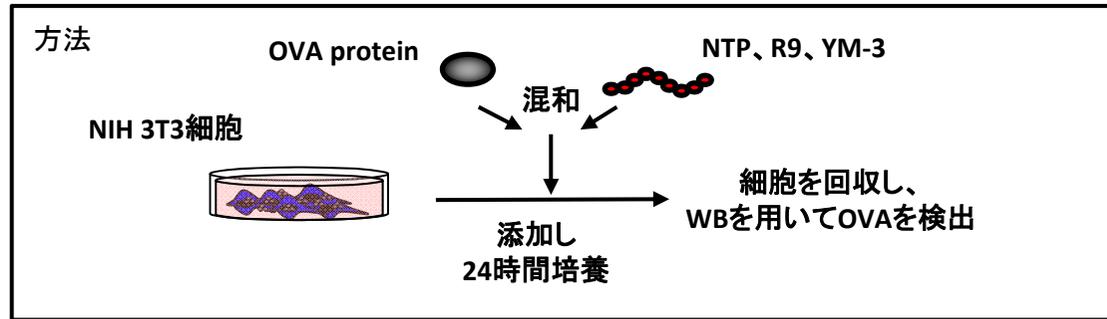


研究課題名:「細胞調整室(CPC)を活用した新規療法に関する研究」

【背景】腫瘍に対する樹状細胞(DC)療法が行なわれているが、その多くは抗原ペプチドが使用されている。しかし、ペプチドを用いたDC療法は患者のHLAに拘束されることから、将来的にはより汎用性が高く、また有効性に長けたシステムの開発が必要である。一つの可能性として腫瘍細胞に由来する蛋白質を用いたlysate-DC療法が考えられるが、lysateを効率的に樹状細胞に導入する方法は限られており、画期的な蛋白質導入システムの開発が必要である。

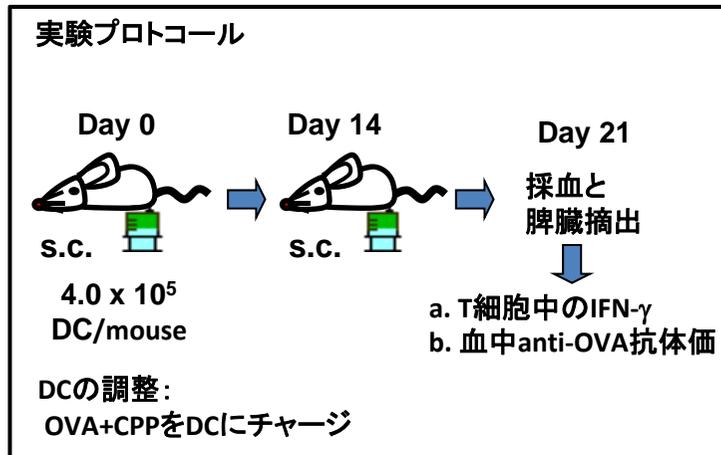
【目的】培養液中に添加すると細胞の中に取り込まれるcell-penetrating peptide(CPP)が複数報告され、分担研究者も効率性に優れたCPP(NTP: nuclear trafficking peptide)を新たに同定した。そこで本課題では、lysate-DC療法に応用できるCPPを同定することを目的に、既知のCPPであるR9(アルギニンが9個連続したペプチド)、Tat由来ペプチドとNTPの有効性を比較した。

【結果】 1. CPPは蛋白質と混和するだけで、細胞内に外来性蛋白質を導入できる

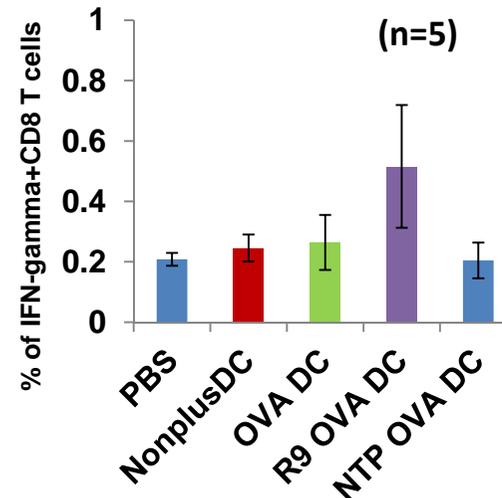


いずれのCPPも混和するだけでOVAを細胞内に輸送できる。

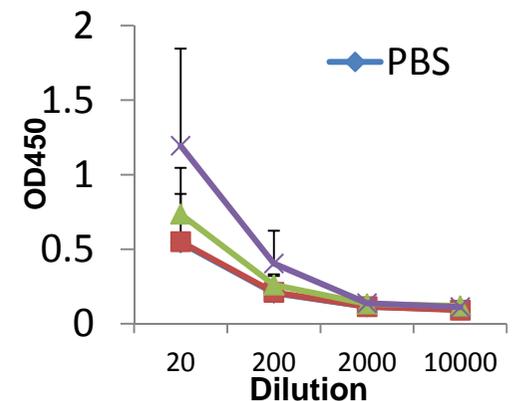
2. R9は樹状細胞に対して抗原提示能を誘導し、血中IgGの産生も増加させる



a. 細胞内サイトカイン染色法

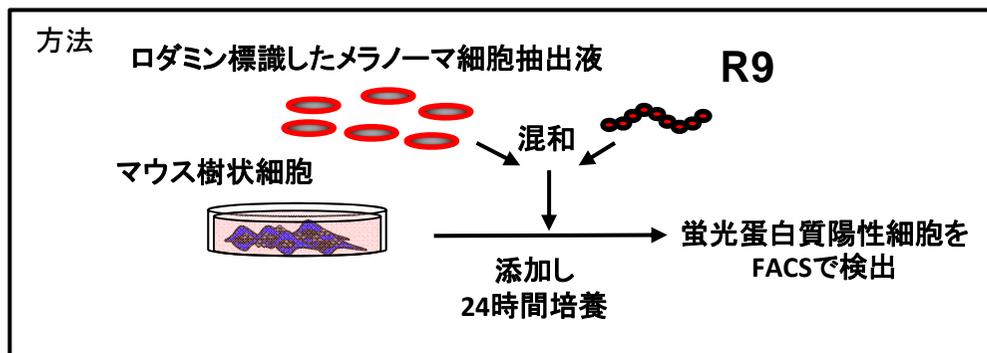


b. ELISA解析による血清中のOVAに反応性を示す抗体価



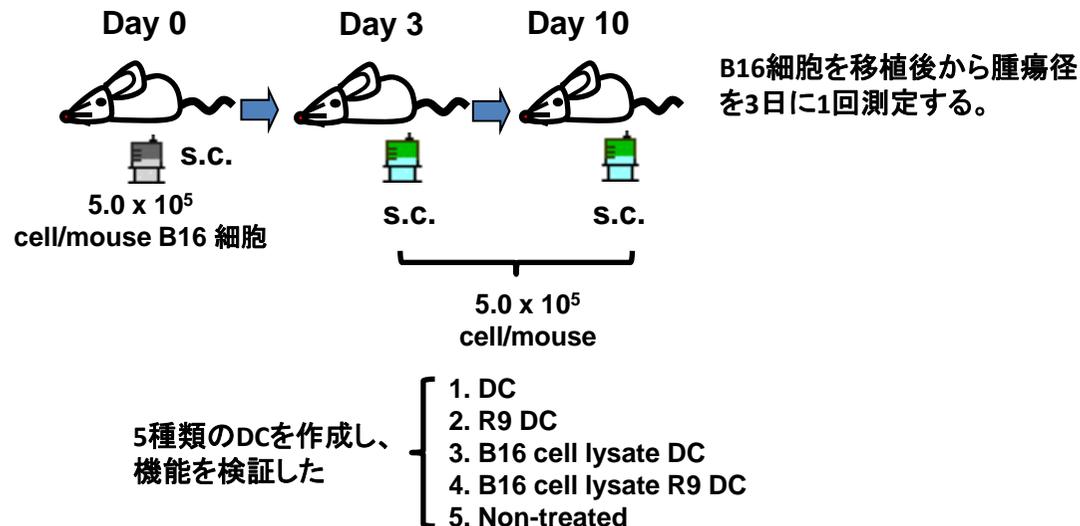
【結果の続き】

3. R9は、腫瘍細胞由来lysateを樹状細胞に導入できる



4. R9を用いたlysate-DCでは腫瘍の増殖は抑制できない。

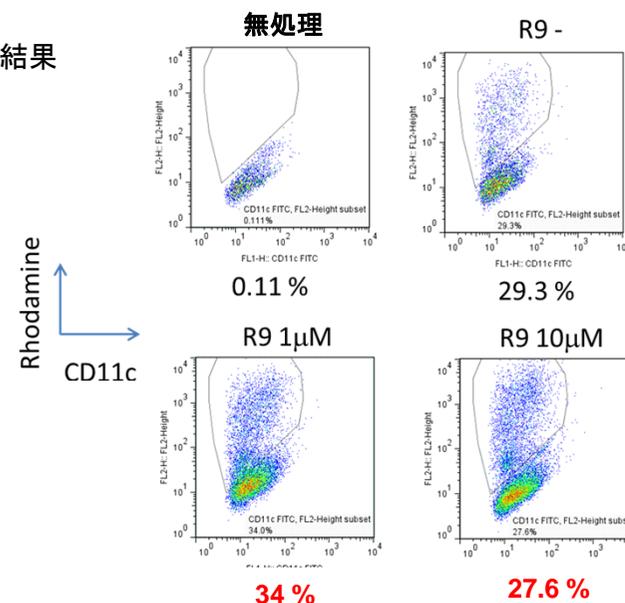
メラノーマ由来lysateをDCに作用させ、腫瘍の増殖抑制の有無を検証した



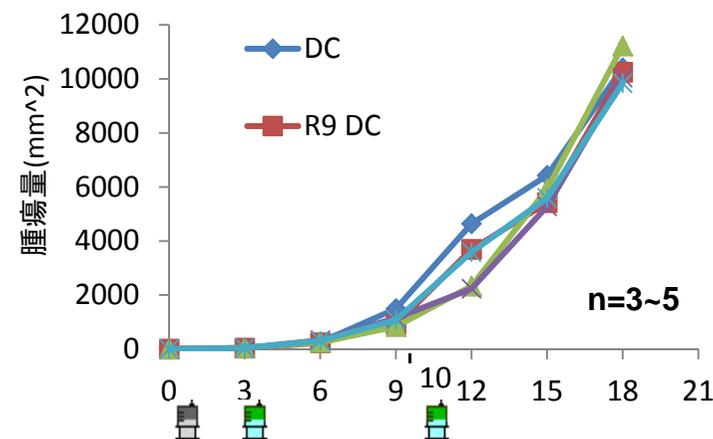
【考察】

- NTPはDCに外来性蛋白質を導入できるが、抗原提示やT細胞の活性化を増強させない。
- R9を用いることでDC細胞に外来性蛋白質が導入可能となり、抗原提示能も増強できることが分かった(結果-2a)。
- しかし、R9で刺激したDCでは、皮下移植した腫瘍の増殖は抑制できない(結果-4)。
- 肺転移モデル等を用いて、少数の腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検証することが必要と思われる。

結果



R9を混和するとlysateが良く取り込まれた。



課題番号 : 23指201

研究課題名 : 細胞調整室 (CPC) を用いた新規療法に関する研究

分担研究課題名 : 細胞調整室 (CPC) を用いた新規療法の開発

主任研究者名 : 萩原将太郎

分担研究者名 : 萩原将太郎

キーワード : 再生医療、免疫療法、CPC、移植医療

<背景>

本格的な高齢化社会を目前に控え、動脈硬化による血行障害、膵内分泌異常、悪性腫瘍および癌治療に伴う合併症等の罹患者数の著明な増加が予測されている。これらに対する有効かつ医療経済性に優れた治療法として細胞治療が期待されている。

<目的>

Cell processing center を用いた医療技術の開発を行うことを目的とする。本研究では、ヒトの幹細胞を用いた再生医療、自己または同種細胞を用いた移植医療、細胞免疫療法等についての基礎技術開発を行い、その後の臨床研究の基盤を整備する。

<結果>

1. CPC の運用体制を構築した。
2. 品質管理標準手順、衛生管理、バリデーション等についてマニュアルを作成した。
3. 運用マニュアルに沿って CPC を維持運営した。
4. 再生医療、免疫療法、移植療法の基盤技術となる安全な細胞培養法の確立を目指し、動物血清を用いない自己血小板濃厚血漿による細胞培養法を確立した。
5. 血管再生療法について、基盤技術である骨髄由来間葉系幹細胞の選択的増幅法を確立した。
6. 培養増幅した骨髄由来間葉系幹細胞の安全性について、ビーグル犬を用いて確認できた。
7. 造血幹細胞移植療法に必要な CD34 陽性細胞数測定技術を確立した。また、幹細胞の凍結保存法を確立した。
8. 同種膵島移植に必要なリンパ球クロスマッチなど組織適合試験の体制を確立した。

課題番号 : 23指201

研究課題名 : 細胞調整室(CPC)を活用した新規療法に関する研究

分担研究課題名: ビーグル犬における下肢虚血モデルの作製と自家培養骨髄間葉系幹細胞移植による安全性と効果の検討

主任研究者名 : 萩原 将太郎

分担研究者名 : 大河内 仁志

研究成果:末梢性動脈疾患に対して自己骨髄由来の単核細胞を濃縮して筋注する治療法があるが、400ml以上という大量の骨髄液を採取しなければならない。そこで少量の骨髄(10ml程度)を採取し、細胞調整室で間葉系幹細胞を培養して、細胞数を確保した後に投与するという新しい治療法を開発することを目指す。そのための基礎実験としてマウスで細胞移植による効果が認められたので、ビーグル犬の下肢虚血モデルを作成し、ビーグル犬の多血小板血漿で培養した骨髄由来の間葉系幹細胞を投与して安全性と効果を検討することを本研究の目的とした。

まず古河市の動物実験施設ハムリー(株)において10-14月齢のビーグル犬の左側外腸骨動脈と正中仙骨動脈を結紮、切断して下肢虚血モデルを作製した。次にイヌ骨髄由来間葉系細胞の培養を行った。1匹の犬から動物愛護上の理由で大量に採血できないので、複数のビーグル犬から各50mlずつ採血をして、多血小板血漿(PRP)を調整し、プール血漿とした。ビーグル犬より腸骨穿刺により骨髄液を3-5ml採取した(n=5)。骨髄液から単核球分画をFicoll法により分離して、 α -MEM培地にPRPを10%添加して2週間程度培養して間葉系細胞を増殖させた。

培養でよく増殖の見られた個体の骨髄由来の間葉系細胞を $1 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$ となるように調整して、蛍光色素のDiIで細胞を標識した後、作製したモデル犬の大腿四頭筋に $100 \mu\text{L}$ ずつ6カ所(合計 6×10^6 個)と9カ所(合計 9×10^6 個)に分けて筋注した(n=2)。対照群はPBSを筋注した(n=1)。移植後2週間と6週間で大腿四頭筋と腓腹筋を採取し、ホルマリン固定後にパラフィン包埋し、組織学的に検討するために各種染色を行った。

移植後2週間と6週間の大腿四頭筋にはいずれもDiI陽性の移植した細胞が認められた。血管新生については、明らかに血管が増えている所見は得られておらず、それぞれ1匹ずつの検討になったため、効果についての有意差検定はできなかった。少なくともビーグル犬におけるシミュレーションの結果は、細胞移植による合併症は認められず、移植手技は安全に行えることを証明できたと考えている。

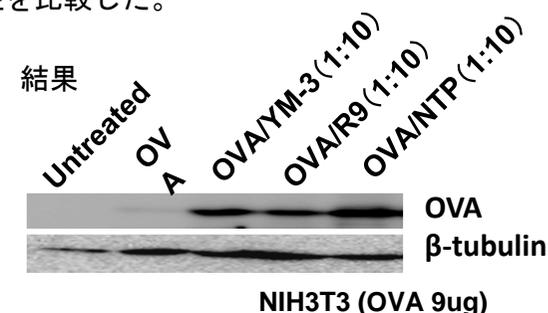
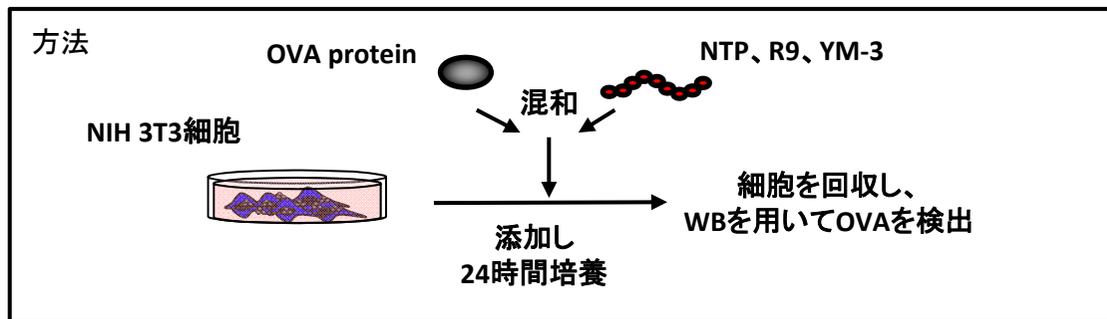
付記:平成26年4月の当センターの倫理委員会にてヒトへの臨床研究が承認されたので、「ヒト幹指針」に則り、厚労省に申請する予定である。

研究課題名:「細胞調整室 (CPC) を活用した新規療法に関する研究」

【背景】腫瘍に対する樹状細胞(DC)療法が行なわれているが、その多くは抗原ペプチドが使用されている。しかし、ペプチドを用いたDC療法は患者のHLAに拘束されることから、将来的にはより汎用性が高く、また有効性に長けたシステムの開発が必要である。一つの可能性として腫瘍細胞に由来する蛋白質を用いたlysate-DC療法が考えられるが、lysateを効率的に樹状細胞に導入する方法は限られており、画期的な蛋白質導入システムの開発が必要である。

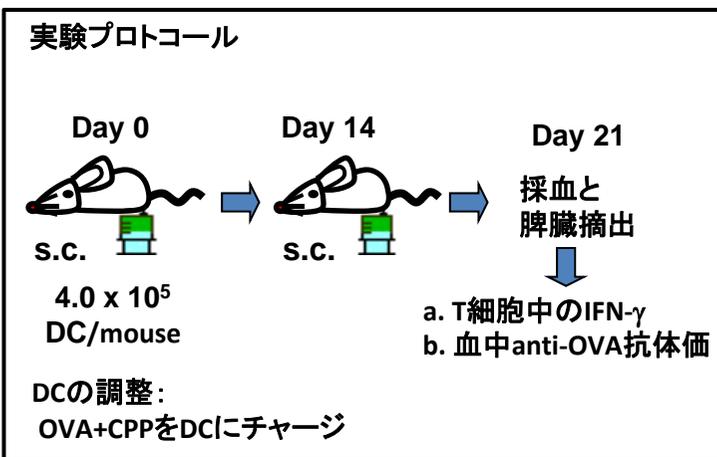
【目的】培養液中に添加すると細胞の中に取り込まれるcell-penetrating peptide (CPP)が複数報告され、分担研究者も効率性に優れたCPP(NTP: nuclear trafficking peptide)を新たに同定した。そこで本課題では、lysate-DC療法に応用できるCPPを同定することを目的に、既知のCPPであるR9(アルギニンが9個連続したペプチド)、Tat由来ペプチドとNTPの有効性を比較した。

【結果】 1. CPPは蛋白質と混和するだけで、細胞内に外来性蛋白質を導入できる

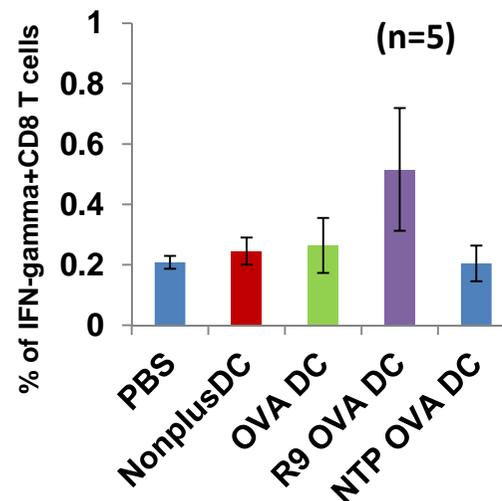


いずれのCPPも混和するだけでOVAを細胞内に輸送できる。

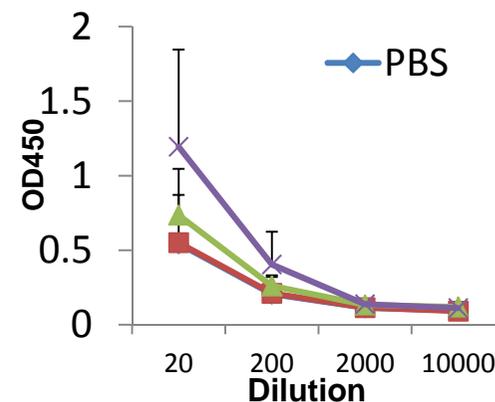
2. R9は樹状細胞に対して抗原提示能を誘導し、血中IgGの産生も増加させる



a. 細胞内サイトカイン染色法

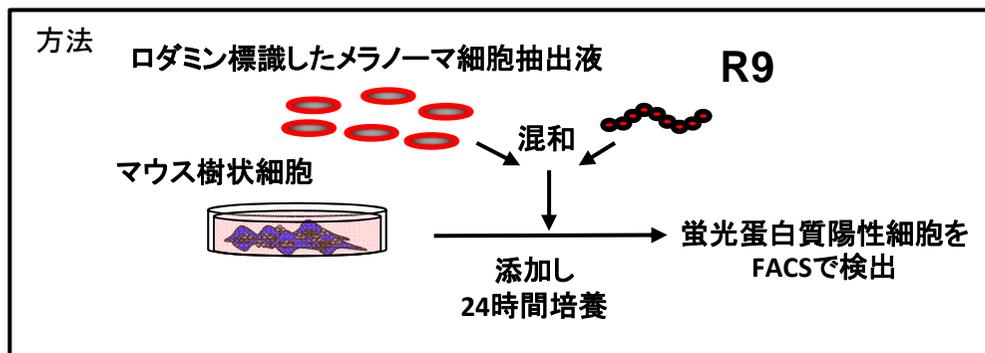


b. ELISA解析による血清中のOVAに反応性を示す抗体価

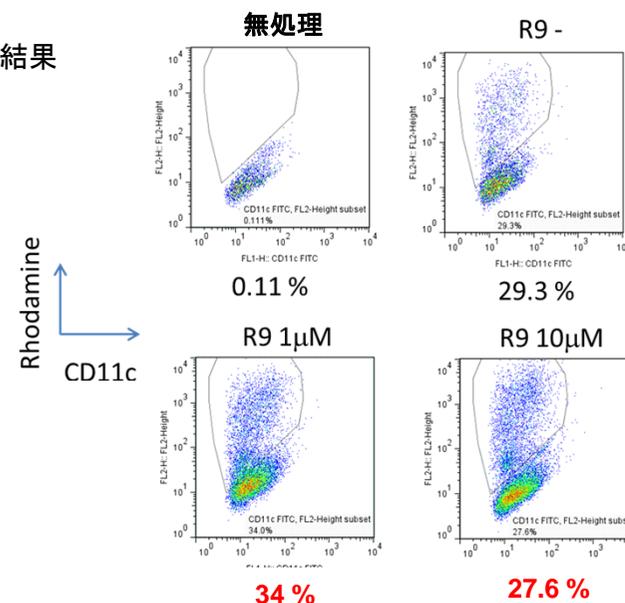


【結果の続き】

3. R9は、腫瘍細胞由来lysateを樹状細胞に導入できる



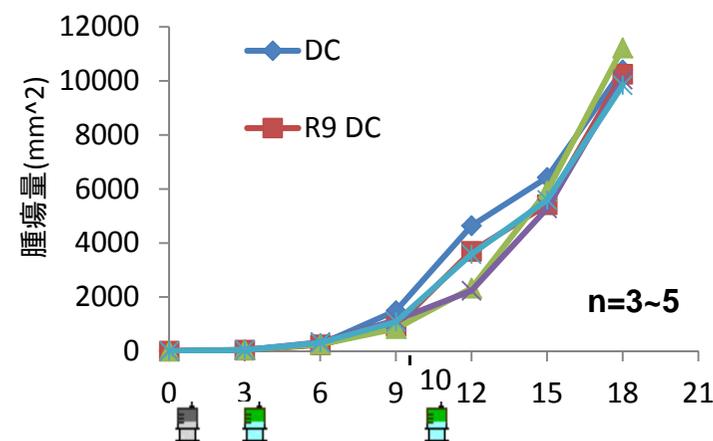
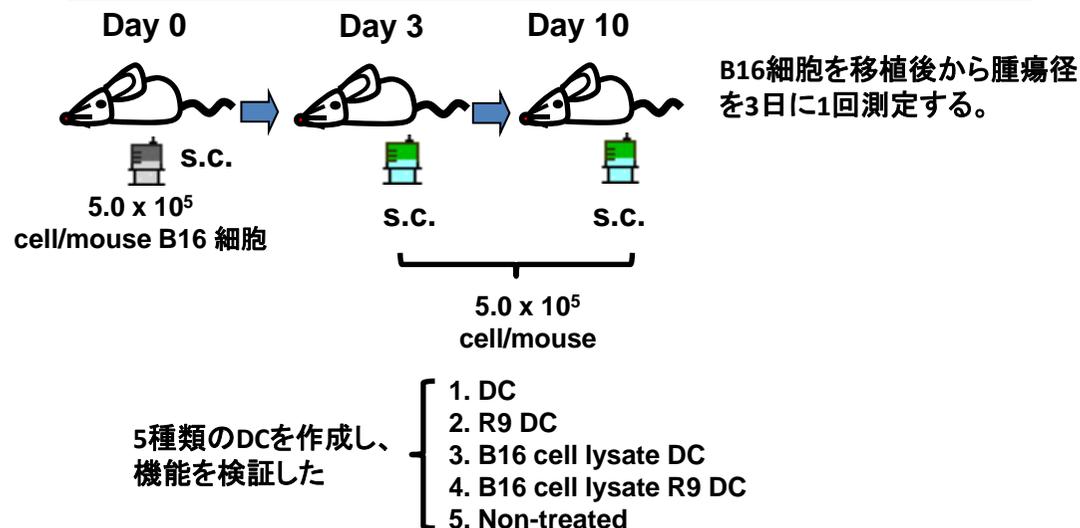
結果



R9を混和するとlysateが良く取り込まれた。

4. R9を用いたlysate-DCでは腫瘍の増殖は抑制できない。

メラノーマ由来lysateをDCに作用させ、腫瘍の増殖抑制の有無を検証した



【考察】

- NTPはDCに外来性蛋白質を導入できるが、抗原提示やT細胞の活性化を増強させない。
- R9を用いることでDC細胞に外来性蛋白質が導入可能となり、抗原提示能も増強できることが分かった(結果-2a)。
- しかし、R9で刺激したDCでは、皮下移植した腫瘍の増殖は抑制できない(結果-4)。
- 肺転移モデル等を用いて、少数の腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検証することが必要と思われる。

課題番号 : 23指201
研究課題名 : 末梢血由来樹状細胞を用いた抗原特異的がん免疫療法の臨床応用
主任研究者名 : 萩原將太郎
分担研究者名 : 辻谷俊一

キーワード : CPC、樹状細胞、腫瘍免疫
研究成果 :

膵がん術後の再発を予防するため、腫瘍 Lysate あるいは MUC1 等の腫瘍抗原をパルスした樹状細胞を培養し、術後患者へ投与することで腫瘍免疫を誘導する。

本研究を実施するために、予備調査および第Ⅱ相臨床試験を立案。臨床試験の計画を作成したが、諸般の事情により研究実施の妥当性が担保されないと判断し中止した。

課題番号 : 23指201
研究課題名 : 術後肺がんの再発予防を目指した癌免疫療法の開発

主任研究者名 : 萩原将太郎
分担研究者名 : 杉山温人

キーワード : C P C、樹状細胞、腫瘍免疫
研究成果 :

肺がん術後の再発を予防するため、腫瘍抗原をパルスした樹状細胞を培養し、術後患者へ投与することで腫瘍免疫を誘導する。

本研究を実施するために、予備調査および第Ⅱ相臨床試験を立案。臨床試験の計画を作成したしたが、諸般の事情により研究実施の妥当性が担保されないと判断し中止した。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：23指201

研究課題名：細胞調整室（CPC）を用いた新規療法に関する研究

主任研究者名：萩原将太郎

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. PNAS in press	Hikichi T, Matoba R, Yoshitake S, Kimura T, Ikeda T, Kawakami K, Okuda A, Okochi H, Inoue T, Masui S	PNAS	110 (16)	2013

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
なし				

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。