

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：再生医療における血管形成制御技術の開発
2. 研究開発代表者：高倉 伸幸（大阪大学微生物病研究所）
3. 研究開発の成果

平成 27 年度以下の 4 項目の研究について研究を遂行した。

研究開発項目 1 は「血管内皮幹細胞のヒト組織からの単離技術の開発」であるが、ヒト組織を用いた解析については、大阪大学微生物病研究所生命科学倫理委員会での承認を得た。また、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 生物資源バンク（難病資源研究室）からのヒト脂肪組織の供給を得る為に申請を行い、同研究所の研究倫理審査委員会における審査により承認をうけた。平成 27 年度は本申請に時間を要した為に、ヒト組織を用いた解析は行うことができなかった。そのため、マウスを用い、脂肪組織の細胞調整法、脂肪組織の分散細胞を用いた side population 解析、細胞表面マーカー解析、そして細胞表面マーカーで内皮幹細胞分画を単離した細胞を用いての内皮コロニー形成の解析を行った。また、平成 27 年度は、AMED 再生医療研究課実施事業の他のいくつかの研究課題と連携を開始した。特に血管再生を実践中の臨床医との連携がとられ、内皮幹細胞を用いた血管再生医療についての討論がなされた。

研究開発項目 2 は、「内皮幹細胞と血管成熟化の分子機構を利用した成熟血管形成による虚血の改善方法の開発」であるが、径 100~300  $\mu\text{m}$  の球体型であるゼラチンハイドロゲルへの血管内皮細胞の接着実験を行った。血管内皮細胞としてはマウス脾臓由来の MS-1 細胞を用いて解析したところ、この細胞の場合は特にマトリックスのコート無しでも細胞接着が誘導された。しかし、血管内皮幹細胞を用いた場合には、接着の効率が悪く、ハイドロゲルに内皮幹細胞の接着するラミニンのコートが必要と考えられた。そこで、種々のラミニンと、内皮幹細胞との接着実験を行い、いくつかのラミニンのアイソフォームで内皮幹細胞の接着が誘導できることが判明した。

研究開発項目 3 は「臓器特異的血管形成の誘導技術開発（肝臓を中心にして）」であるが、血管内皮幹細胞を細胞表面マーカーで回収した際に、この細胞を用いた肝臓血管再構成が、ある血液疾患に効果があるかどうかの検討を行った。血管内皮幹細胞分画の細胞を血液疾患モデルマウスの新生児の肝臓内に注入し、肝臓内の血管内皮細胞を観察すると、内皮幹細胞由来の新規血管で肝臓内血管が再構築されていることが判明した。また、内皮幹細胞により肝臓血管が再構築されたマウスでは、血液疾患が改善することが判明した。

研究開発項目 4 は、「血管内皮幹細胞の試験管内増幅技術の開発」であるが、マトリックスコート培養皿を用いて、種々のサイトカインを添加し、マウス脾臓由来の血管内皮幹細胞分画を培養したところ、顕微鏡観察では、7~10 日と細胞が増殖する培養液の組成が判明した。そこで、7 日間培養した上で、培養皿上の細胞を回収し、再度血管内皮細胞の細胞表面マーカーによる解析を行った。その結果、内皮細胞数は 20 倍以上になり、培養されている血管内皮細胞のうち 70%が内皮幹細胞の未分化な状態で培養されており、内皮幹細胞自体も 10 倍以上に増加していることが判明した。