

学術発表会

2月3日（日曜日）第2日目 11:00 ～ 11:59

座長：鳩谷晋吾（大阪府立大学）

- ① 藤谷洋平（さくら動物病院） 11:00～開始、発表～11:07、質疑応答～11:11
「ゼラチンハイドロゲルと組織修復性因子を用いた犬の褥瘡治療のパイロット的研究」

- ② 岸上義弘（岸上獣医科病院） 11:12～開始、発表～11:19、質疑応答～11:23
「脂肪由来幹細胞と薬剤徐放システムを用いた新しい難治性疾患治療」

- ③ 塚本雅也（大阪府立大学） 11:24～開始、発表～11:31、質疑応答～11:35
「獣医再生医療への応用可能なイヌ iPS 細胞作成方法の確立」

- ④ 渡辺駿一（大阪府立大学） 11:36～開始、発表～11:43、質疑応答～11:47
「高効率免疫アジュバントを用いた腫瘍免疫治療の検討」

- ⑤ 大石達也（稲畑産業株式会社） 11:48～開始、発表～11:55、質疑応答～11:59
「間質血管細胞群(SVH)を用いた動物の再生医療について」

ゼラチンハイドロゲルと組織修復性因子を用いた

創傷治療のパイロット的研究

○藤本洋平¹、杉本太一¹、田畑泰彦²、横山篤司¹

1) さくら動物病院／併設長野どうぶつ再生医療センター（長野県）

2) 京都大学ウイルス再生医科学研究所 生体材料学分野（京都府）

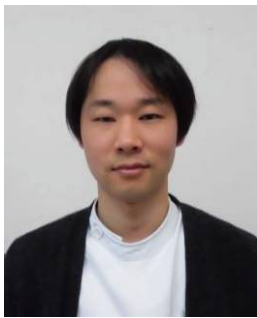
創傷は日常的に遭遇する疾患であり、そのうち褥瘡に関してはそのほとんどの症例が高齢で、その難治性と管理の煩雑さから動物の生活の質（QOL）はもちろんのこと、飼い主の QOL にも大きな影響を及ぼす。また、皮膚が厚く硬くなった猫の術創や、腫瘍完全切除後の広範な皮膚欠損に関しても完治までに時間がかかり、その重症度によっては生命に関わる場合もある。

近年、組織修復性因子を含む多血小板血漿（PRP）や塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）製剤を小動物臨床の現場において使用するケースが増加している。しかしながら、bFGF 製剤を頻繁に使用することは、飼い主にとって日々の管理はもちろんのこと経済的にも大きな負担となる。そこで当院では、これら組織修復性因子の効果を最大限効率的に生かす方法として、ゼラチンハイドロゲルシート（GHS）を用いることにした。

第 1 症例目はトイプードル（8 歳、避妊雌、2.0kg）、既往歴として関節リウマチがあり、両前肢肘部、両後肢足根部に褥瘡が形成された（褥瘡面積 右前肢；167.8mm²、左前肢；72.8mm²、右後肢；51.6mm²、左後肢；22.7mm²）。各部に対し PRP を含浸した GHS、bFGF を含浸した GHS、bFGF 溶液の噴霧のみの 3 パターンの治療を複合的に行った。結果、治療開始から 9 日で両後肢の創が治癒し、19 日で両前肢の創の 90%以上の縮小を確認した。

第 2 症例目は日本猫（推定年齢 9 歳、去勢雄、2.8kg）、頸部腹側の創傷に対し外科的処置を実施した。その後術創が離開し、2 期癒合を期待するも創の縮小が認められなかったため、創部に対し bFGF を含浸させた GHS の貼り付けを行った。20 日後には創の完全癒合を認めたが、14 日程経過した時点で肉芽組織の著しい発達が認められたため bFGF の適用を中断し、ステロイド含軟膏に切り替えることで良好な結果が得られた。

GHS を用いることで液性薬剤を用いた創傷治療において課題となる薬剤の創面からの消失を防ぐことができ、加えて GHS で創を覆うことで湿潤を保つことが出来たことが本治療成績に反映されたと考えている。第 2 症例の結果から、猫症例に適応する際は肉芽組織の増成を考慮した使用が必要になると考えられる。



2009 年 麻布大学獣医学科 入学
2015 年 同学科 卒業
2015 年 長野県さくら動物病院に就職
2016 年 再生医療部門に所属
2017 年 京都大学 ウイルス・再生医科学研究所
生体材料学分野に研修員として3ヶ月在籍
2018 年 さくら動物病院再生医療部門

脂肪由来幹細胞と薬剤徐放システムを用いた

新しい難治性疾患治療

○岸上義弘¹、伊井正明²

¹岸上獣医科病院、²大阪医科大学 研究支援センター 実験動物部門

【背景】脂肪由来幹細胞（adipose-derived stem cell, AdSC）を用いた臨床研究が動物医療分野だけでなくヒト臨床においても盛んに行われているが、次世代型の幹細胞治療として、多彩な生物学的作用を有するスタチン製剤のドラッグデリバリーシステム（DDS）として AdSC を活用し、難治性疾患治療に対する有効性を検討した。

【方法・結果】薬剤徐放が可能な生体分解性ポリマー（PLGA）基質を用いてスタチン封入ナノ粒子を作製した。そのスタチン封入 PLGA ナノ粒子をヒト AdSC に抱合させて細胞機能を評価したところ、遊走能を充進させ血管新生関連遺伝子の発現上昇が認められた。次に、難治性疾患モデルとして、マウス冠動脈結紮により心筋梗塞を誘発した 3 日後に、1)生理食塩水、2)スタチン封入ナノ粒子、3) AdSC（10⁴個）、4)スタチン封入ナノ粒子抱合 AdSC（10⁴個）を投与する群に分け（各群 n = 8）、投与後 1 および 2 ヶ月の時点で心筋を免疫組織化学的及び形態学的に評価した。スタチン封入ナノ粒子抱合 AdSC 群の心筋梗塞部においては、AdSC の集積、Nkx2.5 陽性細胞が多数含まれる肉芽組織が認められ、術後 2 ヶ月後の組織像では梗塞部に新たな心筋の再生が認められた。また、この方法によって、潰瘍性大腸炎、間質性肺炎などの炎症性疾患、認知症やアルツハイマー病などの神経精神疾患、および変形性膝関節症モデルマウス、さらに、慢性腎不全ネコにおいても少数の脂肪幹細胞の静脈内投与によって治療効果が認められた。従来 of 脂肪幹細胞（ナノ粒子無し）を 2 回投与しても効果を示さなかった例で、今回のナノ粒子抱合 AdSC を投与した途端に著効したものである。

【結論】スタチンナノ粒子を AdSC に抱合させることによって幹細胞自身の機能をアップさせ、少数のスタチン封入ナノ粒子抱合 AdSC の静脈内投与で、心筋梗塞部における内因性の心筋組織再生を誘導することに成功した。この技術によって、心筋梗塞だけでなく他の難治性疾患に対しても次世代型の幹細胞治療法として応用できることが示唆された。



1956 年 大阪生まれ
1978 年 麻布獣医科大学卒業
1978-1981 年 米国カリフォルニア大学デイビス校 神経外科研究室
に 2 年間留学
1981-1982 年 鳥取県 山根動物病院にて研修
1982 年-現在 大阪 岸上獣医科病院にて、犬と猫の臨床
1998-2005 年 京都大学再生医科学研究所 臓器再建応用分野にて研
究

獣医再生医療へ応用可能なイヌ iPS 細胞作製方法の確立

塚本雅也

大阪府大院・先端病態解析学

【はじめに】

さまざまな細胞への分化能をもつイヌ人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を、獣医再生医療へ応用するためには、安全性が高く、高品質で、大量培養が可能な細胞を作製する必要がある。センダイウイルスベクター [SeVdp (KOSM) 302L] は、宿主細胞ゲノムを傷つけることなく遺伝子を発現させることができ、iPS 細胞内では複製が阻害されるため、ウイルスが除去された安全性の高い iPS 細胞を作製できる。本研究では、このベクターを用いて遺伝子導入し、酵素により継代することで、上記の性質を有するイヌ iPS 細胞の作製を目的とした。

【材料・方法】

イヌ胎子線維芽細胞へ SeVdp (KOSM) 302L を用いてヒト山中 4 因子を導入し培養を続けた。得られたコロニーを物理的に数継代し、RT-PCR にてベクターの除去を確認した後、酵素による継代に切り替え培養を続けた。得られた細胞の未分化性をアルカリフォスファターゼ（AP）染色、免疫染色、定量的 PCR により評価した。また、浮遊培養により作製した胚様体を介して *in vitro* での分化能を、免疫不全マウスの精巣被膜下に接種することで *in vivo* での分化能（テラトーマ形成能）を評価した。さらに核型解析により染色体異常の有無を評価した。

【結果】

SeVdp (KOSM) 302L を用いることで、初代イヌ iPS 細胞コロニーが得られ、数継代の後ベクターの除去が確認できた。得られた細胞は酵素による単一細胞での継代が可能であり、AP 染色、未分化マーカーに対する免疫染色に陽性を示した。また、定量的 PCR の結果より、酵素継代を繰り返しても未分化マーカーの発現量を維持していた。本細胞は *in vitro* における三胚葉への分化能に加えて、テラトーマ形成能も有していた。さらに酵素継代を繰り返しても染色体異常は認められなかった。

【考察】

SeVdp (KOSM) 302L により、宿主ゲノムに傷がなく、ベクターが除去された安全性の高いイヌ iPS 細胞が得られた。また、得られたイヌ iPS 細胞は酵素により簡便に大量培養が可能であった。さらに、本細胞はテラトーマ形成能を有していたことから、既報のイヌ iPS 細胞と比較して高品質であることがわかった。これらのことから獣医再生医療研究へ応用可能なイヌ iPS 細胞作製方法の確立に成功した。



高効率免疫アジュバントを用いた腫瘍免疫治療の検討

渡邊 駿一

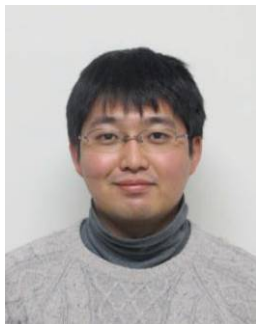
大阪府立大学

h11c は、Toll 様受容体 2 のリガンドと樹状細胞 (DC) に特徴的な CD11c の両方に結合することができる合成リポペプチドで、DC が提示した抗原に対する免疫反応のみを増強することができる。我々はこれまでに、腫瘍抗原を提示した DC を h11c によって活性化し、担癌マウスや腫瘍罹患犬に投与することによって、腫瘍の成長を抑制することに成功した (PLOS One 2017)。しかし、この方法では、投与 DC の数によって効果が限定され、また、h11c の特性である DC への親和性が十分に生かされていないという問題がある。近年開発された pH 感受性ポリマーを結合させたリポソーム (pH 感受性リポソーム) は、DC の細胞傷害性 T 細胞への抗原提示効率を著しく高めることができる。そこで、本研究では、より簡便かつ効果的な腫瘍免疫治療を目指し、リポソームに h11c と pH 感受性ポリマーの両方を結合させた高効率免疫アジュバント ([h11c・pH 感受性リポソーム]) の直接投与による腫瘍治療効果を検討した。

C57BL/6 (B6) 由来マウスリンパ腫株である EL-4 に卵白アルブミン (OVA) エピトープを発現させた E. G7-OVA を B6 マウスの背側皮下に移植して担癌マウスを作製し、これに OVA を腫瘍抗原として内包した [h11c・pH 感受性リポソーム] を総 h11c 量 10 nmol、総 OVA 量 15 µg の条件で、週に 3 回、2 週間投与した。

腫瘍体積は、初め増加したが、5 匹中 3 匹において、投与開始後 12 日前後で減少し始め、20 日前後で寛解に至り、その後エンドポイントとした投与 60 日後まで再増加はなかった。[pH 感受性リポソーム] と free h11c の混合物を投与した群では、5 匹中 1 匹において同様な治療効果が見られたが、[pH 感受性リポソーム] 投与群では、効果はみられなかった。また、[h11c・pH 感受性リポソーム] で処置した担癌マウスの腋窩および鼠径リンパ節の細胞は、移植した E. G7-OVA に対してのみでなく、プロトタイプの EL-4 やナチュラルキラー細胞感受性の YAC-1 に対しても有意に高い細胞傷害活性を示した。

以上の結果から、高効率免疫アジュバントを用いて、より簡便かつ効果的に腫瘍を治療できることが示唆された。



2014 年 大阪府立大学生命環境科学域獣医学類 入学

間質血管細胞群(SVF)を用いた動物の再生医療について

大石達也

稲畑産業株式会社 生活産業本部 ライフサイエンス部

脂肪組織を酵素処理することにより得られる間質血管細胞群(stromal vascular fraction; 以下 SVF)は、末梢血由来の細胞群（マクロファージ、好中球など）が有核細胞の過半数を占め、残りは脂肪間質細胞や血管内皮細胞から構成される。既に本邦においては、ヒト臨床分野にて SVF を用いて乳癌術後の乳房再建、顔面陥没、変形性膝関節症治療等に利用されており、組織修復における細胞療法剤として有望視されている。

その一方で、動物の再生・修復医療においても酵素処理など実験手技に伴う人的ミスや最終産物の質のバラツキが治療上の課題となっている。この課題解決の一助として、SVF を安定的かつ均一に抽出し、かつ SVF に含まれる細胞量及び臨床上有用な細胞が一定割合含まれることが保証された米国 Tissue Genesis 社の自動細胞分離抽出機器 (Icellator®) を利用して採取することができる。本報告では、Icellator®にて得た SVF の質的評価結果、及び SVF を使用した 10 例のイヌの変形性関節症（後膝関節、肩関節、股関節、肘関節、）、1 例の神経変性疾患に対する米国での治療事例を紹介し、脂肪採取から SVF 抽出までの時間と SVF 中に含まれる有核細胞数の相関関係、及びその有核細胞数と治療効果に与える影響について考察する。



平成 26 年 3 月 九州大学医学府医科学 博士前期課程修了

平成 26 年 4 月 稲畑産業(株)入社（生活産業本部ファーマケミカル部）

現在 稲畑産業(株) 生活産業本部ライフサイエンス部所属

ランチオンセミナー

2月3日（日曜日）第2日目 12:00 ~ 12:50

細胞治療の普及に向けて

協賛：セルトラスト・アニマル・セラピューティクス株式会社