

厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業

ライソゾーム病に対する細胞医薬品の開発にむけた
Confidence in Mechanism (CIM) 取得のための
基礎研究

平成 24 年度 総括研究報告書

主任研究者

(公財) 先端医療振興財団

大倉 華雪

平成 25 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

ライソゾーム病に対する細胞医薬品の開発にむけた Confidence in Mechanism (CIM) 取得のための基礎研究 2
大倉華雪

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 11

III. 研究成果の刊行物・別刷 14

IV. その他 43

I 総括研究報告

ライソゾーム病に対する細胞医薬品の開発にむけた
Confidence in Mechanism (CIM) 取得のための基礎研究

研究代表者 （公財）先端医療振興財団 大倉華雪

研究要旨

ライソゾーム病は、ライソゾーム加水分解酵素の先天性欠損により中間代謝産物がライソゾーム内に蓄積する症患者であり、根治的治療法はない。本研究では、脂肪組織由来多系統前駆細胞（ADMPC）が生体内で再生肝細胞として生着し、がライソゾーム加水分解酵素を持続的に分泌、全身の細胞組織に供給補充する細胞製剤と位置付けている。GM1-ガングリオシドーシスを代表疾患として取り上げ、本年度においてはADMPCが経門脈的に投与後に肝臓内にて肝細胞へと分化生着し、血中にβガラクトシダーゼを分泌、血中濃度が健常マウスの半分程度まで回復することを明らかとした。研究期間後すみやかなヒト幹細胞臨床研究の申請あるいは薬事法上の治験開始を目指す。

A. 研究目的

ライソゾーム病は、ライソゾーム加水分解酵素の先天性欠損により中間代謝産物がライソゾーム内に蓄積、骨変形、肝脾腫、知能障害など種々の症状を呈する症患者であり、根治的治療法はない。対症療法として酵素補充療法製剤が承認された疾患もあるが一部にすぎず、新規機序の医薬品の開発が待たれている。

本研究では、生体内で分化生着したADMPC由来再生肝細胞がライソゾーム加水分解酵素を持続的に分泌、全身の細胞組織に供給することを機序とした新規概念の細胞医薬品の開発を目指し、臨床試験を開始するための有効性にかかる基礎的知見を収集する。

B. 研究方法

ライソゾーム病の一部疾患で製剤として確立している酵素補充療法は、多くのライソゾーム加水分解酵素が末端にマンノース6リン酸（M6P）と呼ばれるライソゾーム限局シグナルを有することを利用して、M6P受容体は広く細胞膜表面に存在し、細胞外に存在する加水分解酵素と結合、それを細胞内、さらにライソゾーム内に輸送する。酵素補充療法はこの輸送系を利用して、欠損している酵素を製剤として体外から投与することにより、細胞内に欠損酵素を補充し、ライソゾーム内に蓄積している物質の分解を促進する方法である。

本研究にて開発を目指す細胞医薬品は、生体内に生着分化することで、欠乏酵素を補充し続ける製剤と位置付けられる。従って、ADMPCが生体内で肝細胞に分化生着し、ライソゾーム加水分解酵素を持続的に分泌、全身の細胞組織に供給することを確認することで、ライソゾーム病に対する新規機序細胞医薬品として研究開発を進めること

の Confidence-in-Mechanism が得られると想定、以下の計画を行った。

1) *in vitro* 脂肪組織由来多系統前駆細胞の β ガラクトシダーゼ発現の検討:

β ガラクトシダーゼはマンノース 6リン酸 (M6P) を持ち、細胞のマンノース 6リン酸受容体を介して細胞に保持されることから、M6P あるいは mannosamine を過剰に添加して培養、その上清を β ガラクトシダーゼ活性にて解析した。コントロール肝細胞と ADMPC の双方で当該細胞は検出可能であり、M6P および M6P 合成阻害剤である mannosamine による competition にて培養上清への分泌を検討した。

2) ADMPC の間葉系幹細胞としての特性を用いた免疫抑制プロトコールの検討:

生着における免疫抑制剤の必要性を検証すべく、F344 Rat をレシピエントとし、ドナーとして F344 Rat (syngeneic)、Lewis Rat (minor miss match)、ACI rat (major miss match) より採取した ADMPC を移植し、拒絶にともなう組織学的変性について観察した。

3) ADMPC の再生肝細胞への分化生着の確認

ライゾゾーム病モデルマウスへの ADMPC 投与により、当該細胞が肝内に生着し、肝細胞に分化することを確認する。具体的には、医薬基盤研究所生物資源バンクより GM1-ガングリオシドーシスモデルマウス (β ガラクトシダーゼ KO マウス) を入手し、経門脈的に ADMPC 投与を投与して肝細胞として分化生着を検証する。

GM1-ガングリオシドーシスモデルマウス (β ガラクトシダーゼ KO マウス) への細胞の投与は、下記により実施した。1%イソフルラン吸入による麻酔下で、30G 針 (ニプロ株式会社) を取り付けた 2.5 mL 容のポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒 (テルモ株式会社) を用いて、開腹後経門脈的に注射針を刺入する。チューブ内の血液逆流が静脈血であることを確認後、投与検体を 30 秒程

度で投与する。投与検体は、マウス由来脂肪組織由来多系統前駆細胞であり、経門脈的に 1 回投与した。1 か月後に処置日と同様の方法にて深麻酔状態とする。深麻酔状態において開腹開胸し、心腔から採血を行った後腹部大動脈を切開し放血させ、安楽死させた。肝臓を摘出、組織学的に検証した。

(倫理面への配慮)

1. 非臨床試験 (研究) において遺伝子改変動物、プラスミド DNA あるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。
2. 動物操作に当たっては、(公財) 先端医療振興財団の動物実験規定に従って行なう。
3. 臨床試験の実施にあつては、計画書 (プロトコール) に関して医学倫理委員会での承認を受け、本人の書面による informed consent を取得した患者のみを対象とする。

C. 研究結果

平成 24 年度においては、生体内で分化生着した脂肪組織由来多系統前駆細胞 (Adipose tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cell; ADMPC) 由来再生肝細胞がライゾゾーム加水分解酵素を持続的に分泌、全身の細胞組織に供給することを機序とした根治的治療法に近い新規概念の細胞医薬品の開発を目指し、臨床試験を開始するための有効性にかかる基礎的知見を収集した。

1) *in vitro* 脂肪組織由来多系統前駆細胞の β ガラクトシダーゼ発現の検討:

β ガラクトシダーゼはマンノース 6リン酸 (M6P) を持ち、細胞のマンノース 6リン酸受容体を介して細胞に保持されることから、M6P あるいは mannosamine を過剰に

添加して培養、その上清を解析した。コントロール肝細胞と ADMPC の双方で当該細胞は検出可能であり、M6P および M6P 合成阻害剤である mannosamine による濃度依存性 competition から当該酵素は培養上清に分泌されたと想定される。酵素分泌という Mode of Action (MOA)が確認され、comparability assay を行うための外挿性確認の証左となった。

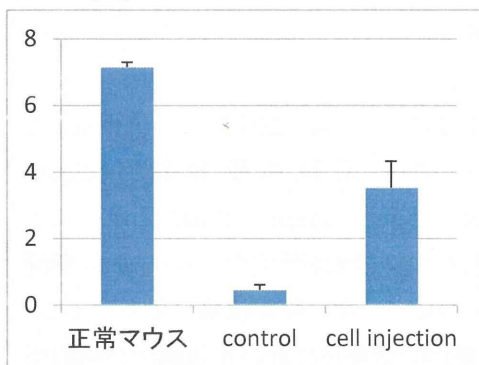
2) ADMPC の間葉系幹細胞としての特性を用いた免疫抑制プロトコルの検討:

生着における免疫抑制剤の必要性を検証すべく、3 系統のラットを用いた。F344 Rat をレシピエントとし、ドナーとして F344 Rat (syngeneic)、Lewis Rat (minor miss match)、ACI rat (major miss match)より採取した ADMPC を移植した。移植後2カ月において、特に問題は起こっていない。

3) ADMPC の再生肝細胞への分化生着の確認:

平成 24 年度において、医薬基盤研究所生物資源バンクより GM1-ガングリオシドーシスモデルマウス (β ガラクトシダーゼ KO マウス)を受精卵凍結融解後の産生仔での分譲を受け、繁殖後 mADMPC を移植した。

mU of β -gal/mL



GM1-ガングリオシドーシスモデルマウス (β ガラクトシダーゼ KO マウス)の血清には β ガラクトシダーゼ活性をほぼ認めないが、mADMPC の経門脈的投与にて健常対象コントロールマウスの半分程度まで β ガラクトシダーゼ活性が改善しており、治療剤としての Feasibility は確認された。

D. 考察

本研究「ライソゾーム病に対する細胞医薬品の開発にむけた Confidence-in-Mechanism (CIM) 取得のための基礎研究」において、研究期間終了後の細胞組織利用医薬品としての展開を見据えると、開発初期からのマーケティングおよびプロダクト・マネージメントが必須であろう。

第 1 にマーケティング分析を行う。マーケティングは、Research \rightarrow Segmentation, Targeting and Positioning \rightarrow Marketing Mix \rightarrow Implementation \rightarrow Control より成る。Research においてはヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞の環境分析 (マクロ・ミクロ)から SWOT 分析を実施し、それを Segmentation, Targeting and Positioning に生かし、当該製品たるヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞浮遊細胞製剤が市場展開性を有するか検討・検証を行う。当該製品に市場展開性があると判断されれば、Marketing Mix として、4P (product, price, place and promotion) を代表的手法として検証することとなる。これらをもとに、実施 (Implementation) にてマーケティング組織を構築し、年間計画・収益性あるいは戦略のコントロールを行う。ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞は、いまだ製品として上市されていないことから、本考察では R \rightarrow STP について議論することとする。

Research においてまず、マクロ環境分析を PEST 手法により分析する。(1) 政治・法的要因(P)として、産業界への法的規制、政府助成、政府の介入度が挙げられる。再生医療製品一般にあっては、薬事規制を受けるという前提があり、例外的に医師法・医療法下にて医師が自ら実施する臨床研究として、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針への適合性も課題である。本研究にて開発しているライソゾーム病を適応症とするヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞は、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針にのっとりするため、機関内倫理審

査委員会にて審議ののち、厚生労働省厚生科学審議会科学技術部会ヒト幹細胞臨床研究の審査に関する委員会にて審議されるべく、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成20年厚生労働省告示第380号）に適合すべく研究開発を進めている。本研究グループには、平成24年5月指針の策定を主導した早川堯夫がアドバイザーとして参画しており、密接な研究打ち合わせと相まって、対応可能である。（2）経済的要因(E)として、GDP、為替、金利水準、所得水準について議論するのが一般的であるが、本再生医療製品に展開にあつては、我が国固有の国民皆保険制度（特に保険点数の上限）について評価すべきである。再生医療製品は先端的医薬品であるため、「革新的医薬品医療機器創出に係る5カ年計画」にあつても、高薬価にてインセンティブを付与することとなっており、将来的に治験が実施されれば、本再生細胞製剤にあつても、十分な薬価が公示されると想定される。また、対象疾患がオーファンであることから、インセンティブを与えられる蓋然性が高い。（3）社会的要因(S)としては、宗教、道徳観、文化的価値観について分析を加えるが、当該再生細胞製剤にあつてはゼロリスクを求める国民性と、疾病構造としてライソゾーム病患者がオーファンであることを念頭に入れる必要がある。患者数が少ないため展開性が低いのではないかの議論に関しては、患者数が少ないため競合研究者・機関が少ないという利点でもある。再生細胞治療は個別化医療に近く、供給側が律速となることを考えると、共同他者が少ないことは、当該マーケットを確実に得られるということであり、むしろ強みとなる。（4）技術的要因(T)に関しては、最新技術、技術特許について議論することとなる。当該再生細胞製剤にあつては、特許・ノウハウ等知的財産および、競合他者製品の研究開発状況について分析を進める必要がある。間葉系幹細胞の基本特許のうち有効とみなされているのが1990年にUCLAより出願された骨髄由来間葉系幹細胞である。当該

知財に追加する形で実施例なくして脂肪組織由来幹細胞の存在が示されたのが1994年である。これら知財は、米国では成立しているが我が国では放棄されている。脂肪組織由来間葉系幹細胞として実施例を伴って出願されたのが、UCLAとPittsburg大学の共同出願である出願2000-603416があるが、我が国では2回の拒絶査定を受けている。脂肪組織由来幹細胞として、我が国では「脂肪組織から幹細胞を調製するための方法およびシステム」（登録番号4217262）が成立しているものの、コラゲナーゼ処理を工程に含んでいない。

ついで、マイクロ環境分析として外部分析を試みる。マイクロ環境の外部分析要因として5 Forcesを考慮する。Forcesとは、競争者（競合者）、新規参入者、代替品、供給者（原材料供給業者）、買い手（保険者・病院・医師・患者）である。（1）競争者に関しては、本再生細胞製剤にあつては研究者・開発者間の敵対関係はどの程度か、という分析である。脂肪組織由来細胞を用いる臨床研究を実施している研究グループも多数あるが、美容外科等が主体で遺伝性疾患を対象としているグループはない。（2）新規参入者については、新規参入の脅威はどの程度かを議論することとなる。本再生細胞製剤では、希少難病を対象としているため、他研究グループが被験者（患者）リクルート可能であるか、という議論となろう。患者団体への働きかけなどが、今後の課題となろう。ついで、（3）代替治療法の脅威はどの程度か分析する。ライソゾーム病に対する酵素補充療法が試みられ、すでに3薬剤の承認が得られている。これら薬剤はム多糖症の病型の一つ一つについてBiologicsの開発が必須であるが、我々が開発中の細胞製剤は、本薬剤によって広範は病型を網羅可能であり、著しい優位性を持つ。（4）供給業者（原材料供給業者）については、試薬メーカー等の交渉力はどの程度か、という議論となる。臨床展開後に、試薬メーカーから原材料の値上げを通告されても薬価は変わらず、利益率は低下することとなる。我々は、

研究開発当初から、「essential facilities は与えない」という戦略のもと、すべての培地、試薬は併売者がいる試薬のみを原材料として選定、かつ必ず併売者間で見積もりを取って競合させるとの戦略をとってきた。実際、基礎培地 (DMEM-Low glucose: MCDB201, 6:4) は、当初 500mL3500 円で納入されていたが、平成 24 年度末にて 700 円にて納品され、fibronectin コート培養皿にあつては 1 枚 1200 円であったものが 540 円になり、かつ fibronectin のヒト由来ウイルス検査まで実施した後に納品されている。これらにより、製造 (品質管理・人件費と CPC 賃借料を除く) に 1 ロットで 350 万円程度かかっていたものが、90 万円程度にまで低コスト化できている。ついで、5 Forces の最終要素である (5) 買い手の交渉力は、将来的に十分な保険点数が公示されうるか、どの程度利用していただけるかを左右する。前者に関しては、再生医療製品は先端的医薬品であるため、「革新的医薬品医療機器創出に係る 5 カ年計画」にあつても、高薬価にてインセンティブを付与することとなっており、将来的に治験が実施されれば、治験中に厚生労働省医政局経済課と折衝を持つこととしている。買い手 (保険者・病院・医師・患者) に着目した解析手法が、VALS である。VALS とは Values & Life-styles 調査手法で、顧客の価値観で segmentation をする手法である。開発しているヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞にあつては、その投与により疾患の増悪を予防できる可能性があり (機能的価値)、保険診療費用の低減 (経済的価値) も意思決定に寄与しうる。臨床利用の決定に大きな影響力を有する医師 (主治医) を想定すれば、先端医療を用いて治療しているという充足感 (心理的価値) もモチベーションになると考えられる。一方で、innovator であるヒト幹細胞臨床研究の実施施設となる研究開発病院 (特定機能病院等) と、差別化を希求する early adaptor たる大学病院・専門病院と、early majority となる一般病院では臨床利用の意思決定に差があるのは明白である。まず、

innovator たる特定機能病院にてヒト幹細胞臨床研究を実施し、研究期間終了時には治験として early adaptor たる大学病院・専門病院への導入を目指すこととなる。

マイクロ分析として、内部分析を試みる。マイクロ環境の内部分析要因は Value chain の分析であり、「アウトプットする価値はさまざまな活動の連鎖からなる」という考えに基づく。購買物流、製造、出荷物流、販売、サービスからなる主活動と、インフラストラクチャー、人事/労務管理・技術開発・調達活動を行う支援活動とに分けられる。確固とした知財が Value Chain の根幹であることを考えると、「肝臓関連疾患治療薬」(特許第 4965000 号) として特許が成立しており、EU 特許も平成 24 年度末に成立していることから優位な位置にある。今後、スタッフの増員と教育により Value chain 体制の構築が急務であり、自らの企業による社会好悪権も含め、今後の課題である。

これまで、マクロ環境分析とマイクロ環境分析を実施してきた。これらをもとに、SWOT/SWOT クロス分析を行い、もって Research とする。S:は Strength (強み)、W は Weakness (弱み) でともに内部環境因子である。O は Opportunity (機会)、T は Threat (脅威) でともに外部環境因子である。本研究にて開発しているヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞たる「肝臓関連疾患治療薬」は、特許が成立していることに加え、請求項にて広範囲に肝臓関連疾患を対象とすることを認めていることから、将来的に本研究対象疾患であるライソゾーム病など遺伝性肝疾患のみならず肝炎・肝硬変への展開も可能であり、十二分な強みがある。外部要因としては本研究事業にて開発している再生細胞製剤は、PEST 分析・5 Forces 分析の結果にみるように市場展開の機会を十分に有している。従って、SWOT クロス分析をみるに portfolio 上事業機会を有しているとの結論に至る。

ついで、マーケティングの第 2 段階としての STP (Segmentation, Targeting and Positioning) について考

察したい。再生医療製品は限りなく個別化医療に類似している。マーケティング的にいえば、マス・マーケティングからターゲット・マーケティングへの転換である。再生医療はこれまで治せなかった疾患を治療する等アンメット・メディカル・ニーズへの応答であって、従来のマス・マーケティングでは展開不可なのは自明であることから、ターゲット・マーケティングの発想が重要であることが分かる。共通ニーズを持つ集団（セグメント）を発見し、その集団をターゲットに価値（ポジショニング）を提供して市場占有を確保することが STP の本質であることから、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞の展開可能な疾患 Segment は知財の範囲から広範な肝臓関連疾患とできる。ライソゾーム病はセグメントとして小さすぎるとの議論もあろう。市場をセグメント以上に細分化したこれら集団はサブセグメント、あるいはニッチとも呼ばれる。本研究開発シーズにおいては、positioning をしっかり押さえれば、グローバル・ニッチ・トップ、ついで適応拡大として遺伝性肝疾患、最終的には肝硬変治療剤としての展開を射程に入れうる。

Positioning とは、ジャック・トラウトによれば「あなたが狙う顧客の心の中であなたの製品をどう独自化するか、それがポジショニングの意味」である。本研究事業に当てはめれば、ライソゾーム病患者あるいはその主治医の治療法選択肢のなかで、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞製剤を独自化することといえる。まず、梯子の法則にのっとり当該細胞製剤の存在を想起させしめ、Positioning map ポートフォリオ分割にて高機能かつ低価格（国民皆保険下では低負担と定義した方が適切と思われる）であることから選択に導くことが肝要である。

STP が終了すると、Marketing Mix にいたる。代表的な手法として製品：product、価格：price、流通チャンネル：place およびプロモーション：promotion により marketing を進める「4P」が用い

られる。再生細胞治療製剤に当てはめれば、Product：どのような再生医療製品を、Price：どの程度の価格で、Place：どのような流通経路で、Promotion：どのように宣伝するか、である。しかし、4P はあくまで造り手の視点であるとの批判もあり、「4C」による marketing が行われるようになっている。4C とは、Customer Solution：ニーズにこたえるサービスであるか？、Customer Cost：サービスに見合った価格であるか？、Convenience：利便性をもったサービスであるか？、そして Communication：どのように顧客と意思疎通するのか？である。顧客視点への転換であると言われる所以である。再生細胞治療製剤に焦点を絞れば、Customer Solution：患者・医師のニーズにこたえる治療法であるか？、Customer Cost：医療保険財政・制度からみて、治療による費用と治療により得られる社会的利益が見合っているか？、Convenience：患者・医師にとって選択しやすい治療法であるか？、そして Communication：どのように患者・医師と意思疎通するのか？である。ライソゾーム病を適応症とするヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞の細胞製剤としての開発にあっては、1) Customer Solution：根治的治療法がなかったライソゾーム病患者とその主治医にとって、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞投与が求められる治療法となりうるのか？ 2) Customer Cost：医療保険財政・制度からみて、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞投与にかかる費用と本治療により得られる社会的利益が、経済的・QOL・社会正義の観点から見合っている（trade-off 可能）か？ 3) Convenience：患者・医師にとって選択しやすい治療法として提供が可能か？、そして 4) Communication：患者・主治医と意思疎通が現実的に可能なのか？である。本研究グループは、これらのマーケティング上の課題に一つ一つ答えを見出すべく、研究開発をすすめなければならない。

これらマーケティング上の課題に応える前提と

して、本再生細胞製剤をどのように開発していくか、プロダクト・マネージメントが求められる。本研究事業では、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針にのっとりヒト幹細胞臨床研究を実施し、研究期間終了後には治験を実施することを目標としている。ヒト幹細胞を用いる臨床研究にあっても、医薬品と同様に有効性・安全性・品質が肝要である。本研究の進捗と今後の展開展望につき、三要件ごとに考察を行いたい。

(1) 有効性

hADMPc が、経門脈的投与によりライソゾーム病モデルマウスである GM1-ガングリオシドーシスモデルマウス(β ガラクトシダーゼ KO マウス)の血中 β ガラクトシダーゼ活性を発現させることを明らかとした。GFP 導入マウス鼠径部脂肪組織から GFP-ADMPc を単離・培養、GFP-ADMPc を経門脈的に投与したところ、肝内に生着、アルブミン陽性細胞へと分化することが確認された。これは被投与細胞が *in vivo* で肝細胞へと分化し、native parenchymal cells と機能的コンタクトを有していることを示唆する。低分子化合物であれば、当該化合物が標的蛋白質に結合する、ないしは *in vitro* にて生理的作用を有することを確認することが 1st step であり、これを Confidence in Mechanism (CIM) の取得と定義する。本剤に関しては、生体内で肝細胞へと分化生着し、肝細胞として host 肝細胞と同等に機能して β ガラクトシダーゼを産生・分泌することがその mechanism であるため、上記知見により、本剤は CIM を取得したと言える。予備試験のプレリミナリーな結果から、 $1.0 \times 10^6/\text{kg}$ が至適用量であると推定され、本予備試験の取りまとめが終了次第、有効性用量確認試験につなげ、ADMPc の Proof of Concept の取得を目指したい。

これら CIM を基盤とし、Stem cell が肝臓内で肝細胞へと分化誘導されていることから、“*in situ* reprogramming” との概念を提唱している。Terminal differentiated cell を *in vitro* にて多能性幹細胞化す

る“reprogramming”、遺伝子導入等で *in vitro* にて直接目的細胞へと分化させる“direct reprogramming”に加えて新しい概念であり、治療へは *in situ* stem cell therapy として展開することとなる。

(2) 安全性

経門脈的投与にかかる単回投与毒性試験の予備試験 (non-GLP; 用量設定試験)、経門脈的投与単回投与毒性試験 (GLP) と安全性薬理コアバッテリー試験として安全性薬理中枢毒性試験と安全性薬理呼吸毒製試験が終了、有意な毒性を認めなかった (GLP) (第 9 回 国際幹細胞学会にて発表)。

遺伝毒性試験にて細胞製剤としての開発に支障のある結果は認められず、造腫瘍試験及び軟寒天コロニー形成試験 (WHO ガイドラインに則り実施) で造腫瘍性は否定された。癌原性試験は、長期観察試験を予備試験として開始し、投与後の肝臓内での腫瘍形成あるいは異所分化ともに認めていない (第 9 回 国際幹細胞学会にて発表)。癌原性本試験の試験系の組み立ては、薬事戦略相談にて規制当局と相談中である。本製剤は、単回投与を前提としてデザインしていること、および脂肪組織由来多系統前駆細胞にあつては、投与後肝細胞として生着機能することから、単回投与でも長期細胞に暴露された状態となり蓄積毒性を考慮する試験系である反復投与毒性試験は不要と考えている。薬事戦略相談にて規制当局にコンサルトしている。

薬物動態試験に相当する試験として、体内動態試験 (運命試験) がある。これまでの細胞の投与後体内動態は、細胞を放射性同位元素標識しその分布を追うものであったが、半減期による追跡期間の限界と特異度の観点から限界があった。そこで、我々は細胞投与後 6 カ月経過観察し、30 余臓器をリストアップ、各々につき肉眼的所見、組織学的病理所見を確認、異所性生着および慢性毒性試験として病的所見を認めないことを報告している (第 9 回 国際幹細胞学会にて発表)。加えて、我々は *Alu*-PCR 法をもちいるヒト由来細胞の非ヒト動物体内動態追跡が可能であることを報告して

いる (Okura et al. 2011.)。

(3) 品質

品質管理は、論文としての業績になりにくいいため、多くの研究では取り残されやすい課題である。本研究では、将来的な細胞製剤としての上市を念頭に入れ、品質管理項目を設定し、工程品質管理にかかるマスタープラン策定は喫緊の課題である。出荷時の細胞製剤としての品質管理は、生物学的同等性評価項目と同一視することが可能であると想定し、生物学的同等性にかかる評価項目を設定、平成 23 年度にて検証確認を実施した。工程管理検査項目を検討中で、本研究事業終了時までには医薬品レベルでの品質管理を目指す。加えて、本細胞製剤は凍結にて貯蔵されることを想定しているため、凍結による品質の安定性評価、凍結期間による品質の安定性評価、融解による品質の安定性評価、融解後の安定性にかかる時間経過の評価が必須となる。当初、生存率のみでの品質管理を想定していたが、規制当局コンサルトにより生存率のみならず細胞表面マーカー等生物学的同等性評価項目も参考とすべきとのコメントを得、長期保存試験を開始し、現在までに 18 カ月の保存で生存率及び細胞表面マーカー発現・未分化性に問題はないことを確認している。なお、non-GLP 下での retrospective な保存細胞による長期保存検定では、4 年までの保存であれば問題はないことを確認している。

プレ・コールドランは 3 例終了し、三管理書、製造指図書・記録書、製造手順書 (第 1 版) の改定を実施している。例えば、作業者の動線の問題と、入室時間が課題である。入室時間が 3 時間を超えると、作業者に脱水のリスクと女性では特に膀胱炎のリスクが生じることが判明、労務管理の観点からも手当てが必要であると認識したところである。

品質は、CTD package にあつては CMC として 3 本柱の 1 つである。しかし、アカデミア発のシーズではおさなりにされやすく、そのために臨床利

用が遅れることもあろう。本事業では、積極的に評価項目、手法を検討したい。

E. 結論

本研究では、生体内で分化生着した再生肝細胞がライゾゾーム加水分解酵素を持続的に分泌、全身の細胞組織に供給補充し続けることを機序とした新規概念の細胞医薬品と位置付けられるとの特色を有する。当該概念による製剤はこれまで皆無であり独創的である。

本研究事業では、研究期間後すみやかなヒト幹細胞臨床研究の申請あるいは薬事法上の治験開始を目指している。高度医療評価制度トラックの利用が迅速と考えられるが、企業等へのスムーズなライセンスアウトにむけ、薬事戦略相談・治験・製造販売承認取得を念頭に置いた研究開発を今後も進めることとしている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Okura H**, et al. Intracoronary artery transplantation of cardiomyoblast-like cells from human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction and survival in a swine model of chronic myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;425(4):859-65.
2. Moriyama M, **Okura H**, et al.. Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. *BMC Cell Biol.* 2012;13:21
3. **Okura H**, et al.. Adipose Tissue-Derived

Multi-lineage Progenitor Cells as a Promising Tool for In Situ Stem Cell Therapy. *Current Tissue Engineering*, 2012;1(1):43.

4. 大倉華雪 ほか：「再生医療とレギュラトリーサイエンス」*Medical Science Digest*. 2012; 39(11). 486-489.
5. 大倉華雪 ほか：「再生医療とレギュラトリーサイエンス」*整形・災害外科 in press*.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

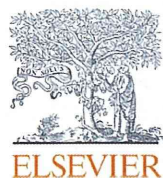
著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okura H, Saga A, Soeda M, Miyagawa S, Sawada Y, Daimon T, Ichinose A, Matsuyama A.	Intracoronary artery transplantation of cardiomyoblast-like cells derived from human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction and survival in a swine model of chronic myocardial infarction.	Biochem Biophys Res Commun	425	859-65.	2012
Moriyama M, Moriyama H, Ueda A, Nishibata Y, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T.	Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling.	BMC Cell Bio	13	21	2012
Okura H, Saga A, Soeda M, Ichinose A, Matsuyama A.	Adipose Tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cells as a Promising Tool for In Situ Stem Cell Therapy.	Current Tissue Engineering,	1	43	2012
大倉華雪 松山晃文	「再生医療とレギュラトリーサイエンス」	Medical Science Digest.	39	486-489.	2012
大倉華雪 澤芳樹	脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる重症心不全治療細胞組織加工医薬品の開発	医学の歩み	242巻4号	297-302	2012

大倉華雪 松山 晃文	：「再生医療とレギュ ラトリーサイエンス」	整形・災害外 科			<i>in press.</i>
------------------	--------------------------	-------------	--	--	------------------

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷



Intracoronary artery transplantation of cardiomyoblast-like cells from human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction and survival in a swine model of chronic myocardial infarction

Hanayuki Okura^{a,b}, Ayami Saga^b, Mayumi Soeda^b, Shigeru Miyagawa^c, Yoshiki Sawa^c, Takashi Daimon^d, Akihiro Ichinose^e, Akifumi Matsuyama^{a,e,f,*}

^a The Center for Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0879, Japan

^b Department of Somatic Stem Cell Therapy and Health Policy, Institute of Biomedical Research and Innovation, Foundation for Biomedical Research and Innovation, 2-2 Minatogima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan

^c Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0879, Japan

^d Division of Biostatistics, Hyogo College of Medicine, 1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8501, Japan

^e Department of Plastic Surgery, Kobe University Hospital, 7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo, Japan

^f RIKEN Program for Drug Discovery and Medical Technology Platforms, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 July 2012

Available online 7 August 2012

Keywords:

Cellular cardiomyoplasty

ADMPCs

Myocardial infarction

Transplantation

ABSTRACT

Transplantation of human cardiomyoblast-like cells (hCLCs) from human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improved left ventricular function and survival of rats with myocardial infarction. Here we examined the effect of intracoronary artery transplantation of human CLCs in a swine model of chronic heart failure. Twenty-four pigs underwent balloon-occlusion of the first diagonal branch followed by reperfusion, with a second balloon-occlusion of the left ascending coronary artery 1 week later followed by reperfusion. Four weeks after the second occlusion/reperfusion, 17 of the 18 surviving animals with severe chronic MI (ejection fraction <35% by echocardiography) were immunosuppressed then randomly assigned to receive either intracoronary artery transplantation of hCLCs hADMPCs or placebo lactic Ringer's solution with heparin. Intracoronary artery transplantation was followed by the distribution of DiI-stained hCLCs into the scarred myocardial milieu. Echocardiography at post-transplant days 4 and 8 weeks showed rescue and maintenance of cardiac function in the hCLCs transplanted group, but not in the control animals, indicating myocardial functional recovery by hCLCs intracoronary transplantation. At 8 week post-transplantation, 7 of 8 hCLCs transplanted animals were still alive compared with only 1 of the 5 control ($p = 0.0147$). Histological studies at week 12 post-transplantation demonstrated engraftment of the pre DiI-stained hCLCs into the scarred myocardium and their expression of human specific alpha-cardiac actin. Human alpha cardiac actin-positive cells also expressed cardiac nuclear factors; nkx2.5 and GATA-4. Our results suggest that intracoronary artery transplantation of hCLCs is a potentially effective therapeutic strategy for future cardiac tissue regeneration.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

End-stage heart failure remains a major cause of death worldwide, mainly due to myocardial ischemia. Cardiac transplantation and mechanical support using implantation of the left ventricular assist system (LVAS) were established as the ultimate means of support for these patients [1,2]. However, these treatment entities have certain limitations including donor shortage, rejection, and LVAS durability, and alternative strategies are needed in such circumstances.

Cellular cardiomyoplasty was developed as a new approach to restore normal heart function, [3,4] using a variety of cell types [3–5]. Mesenchymal stem cells (MSC) seem particularly advantageous for cellular therapy in general because they are multipotent, potentially immune privileged [6]. MSC also proliferate rapidly and differentiate into cardiomyogenic cells [7–10]. MSC can be isolated from human adipose tissue, which can be resected easily and safely in most patients [11,12]. In fact, we have reported that adipose tissue-derived multilineage progenitor cells (ADMPCs), which met the criteria as mesenchymal stem cells [13], can differentiate into hepatocytes both *in vitro* and *in vivo* [14,15]. Recently, we demonstrated that human cardiomyoblast-like cells (hCLCs) from human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells transplanted into rats with chronic myocardial infarction reversed wall thinning

* Corresponding author at: The Center for Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0879, Japan.

E-mail address: akifumi-matsuyama@umin.ac.jp (A. Matsuyama).

in the scarred area with the engrafted cells forming a thick stratum, and that the hCLCs reversed left ventricular dysfunction in the long term and survival of rats with experimentally-induced myocardial infarction [16].

The present study is an extension to the above study and was designed to accelerate the clinical application of hCLCs. Specifically, we examined in pre-/non-clinical studies the effects of hCLCs transplantation on cardiac dysfunction and on long-term survival with swine chronic myocardial infarction model. We also documented the histological regeneration of damaged myocardium after transplantation of hCLCs *in vivo*.

2. Materials and methods

2.1. Adipose tissue

Adipose tissue samples were resected from five human subjects during plastic surgery (all females, age, 20–60 years) as excess discards. Ten to 50 g of subcutaneous adipose tissue were collected from each subject after obtaining of informed consent. The protocol was approved by the Review Board for Human Research of Kobe University Graduate School of Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine and Foundation for Biomedical Research and Innovation.

2.2. Isolation of hADMPCs and preparation of hCLCs

Human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells (hADMPCs) were prepared as described previously [13–17]. After passaging 5 to 6 times, the hADMPCs were replated and treated with 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Cryoserve, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden) for 48 h.

2.3. Reverse transcriptase–polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from hADMPCs and cardiomyoblasts using an RNAeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). After treatment

with DNase, cDNA was synthesized from 500 ng total RNA using Superscript III reverse transcriptase RNase H minus (Invitrogen, Carlsbad, CA). Real-time PCR was performed using the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). 20X Assays-on-Demand™ Gene Expression Assay Mix for *nkx2.5* (Hs00231763_m1), *islet-1* (Hs00158126_m1), *GATA-4* (Hs00171403_m1), *alpha-cardiac actin* (Hs01109515_m), *cardiac troponin I* (Hs00165957_m1), *myosin light chain (MLC)* (Hs00166405_m1), *myosin heavy chain (MHC)* (Hs00411908_m1) and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* (Hs99999905_m1) were obtained from Applied Biosystems. Taq-Man® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X), was also purchased from Applied Biosystems. Reactions were performed in quadruplicate and the mRNA levels were normalized relative to human GAPDH expression. Then the fold-inductions of hCLCs were compared to hADMPCs.

2.4. Animal model of myocardial infarction and cell transplantation

Five weeks before transplantation, the first diagonal branch (D1; #9) of the coronary arteries of 24 pigs (8-week-old female, 30.5 ± 0.7 kg, mean \pm standard error of the mean) was balloon-occluded for 60 min followed by reperfusion (Fig. 1A). One week later, the left ascending coronary artery of the same animals was balloon-occluded just proximal of the first septal branch divergence (#6), followed by reperfusion (Fig. 1A). To rescue the better baseline survivals and to obtain severe old myocardial infarction swine model, two separate reperfused infarcts one week apart were performed. From 5 days before cell transplantation to the end of the experiment, the swine received tacrolimus as an immunosuppressant (0.1 mg/kg/day intramuscularly) (Fig. 1B) as previously reported [18] with modification. Four weeks after the second occlusion/reperfusion (day 0), we examined 17 animals with chronic severe MI (ejection fraction <35% by echocardiography) of only 18 survivors. The tacrolimus-immunosuppressed chronic MI swine were randomly assigned to receive intracoronary transplantation of hCLCs (3×10^5 cells/mL concentration of cell

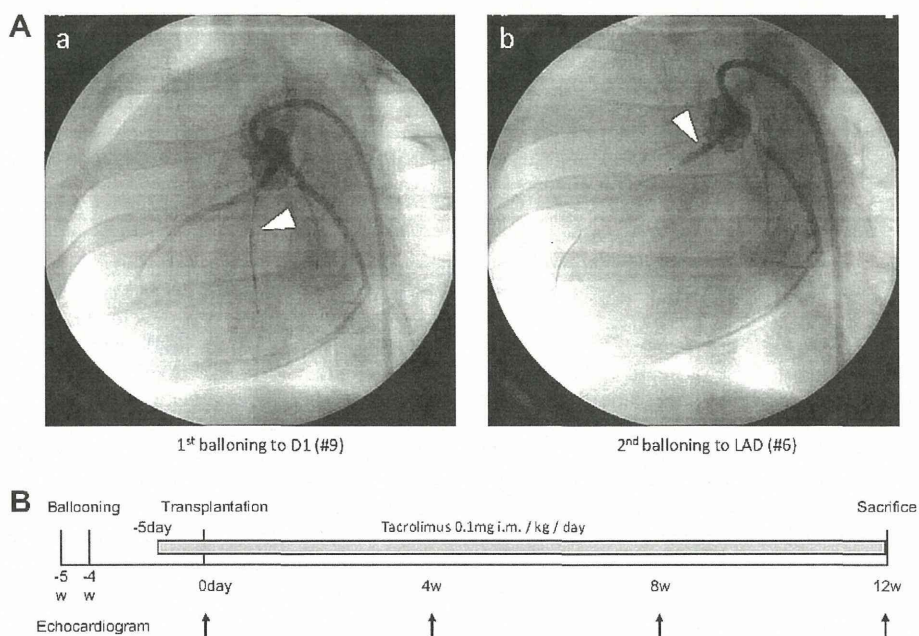


Fig. 1. Study protocol and angiographic demonstration of transient coronary artery occlusion. (A) Five weeks before transplantation, the first diagonal branch (D1; #9) of the coronary arteries was balloon-occluded followed by reperfusion (a, arrowhead). One week later, the left ascending coronary artery of the same animals was balloon-occluded just proximal of the first septal branch divergence (#6), followed by reperfusion (b, arrowhead). (B) From 5 days before cell transplantation to the end of the experiment, the swine received tacrolimus as an immunosuppressant. At day 0, 17 animals with chronic severe MI were applied for the experiment.

Table 1
Cardiomyocyte induction of hCLCs.

	Fold induction	
	Mean	SE
nkx2.5	2.49	1.02
islet-1	1.32	0.36
GATA-4	6.84	1.47
Alpha-Cardiac actin	1.46	0.22
Cardiac troponin I	2.36	0.47
Myosin light chain	1.89	0.49
Myosin heavy chain	109.89	6.13

suspension, 1 mL/kg cell suspension was transplanted.) ($n = 8$), hADMPCs (3×10^5 cells/mL concentration of cell suspension, 1 mL/kg cell suspension was transplanted.) ($n = 4$), or placebo lactic Ringer's solution with heparin ($n = 5$), at 4 weeks after the second occlusion/reperfusion. Transplantation procedure was performed as following, the transarterial catheter was placed in the left coronary artery, and then the cell-suspensions or placebo control solutions were transplanted into LAD (#6). The Osaka University Graduate School of Medicine Standing Committee on Animals approved all experimental protocols.

2.5. Assessment of swine cardiac function and histological analysis

Cardiac ultrasound studies were performed before cell-transplantation and at 4, 8 and 12 weeks after transplantation using a

VIVID 7 system (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden) and the data at the day transplantation, 4- and 8-week-after transplantation were applied for the statistical analysis. The studies were shown as M-mode with short axis view observed from left fifth intracostal space.

For histological analysis, the swine hearts were dissected out at the end of the experiment and immediately fixed overnight in 4% paraformaldehyde and processed for embedding in paraffin wax. Sections were cut at 3- μ m thickness, deparaffinized and then rehydrated through a graded ethanol series into distilled water. The sections were then immersed in Target Retrieval Solution (Dako, Glostrup, Denmark) and boiled, followed by cooling at room temperature for 20 min. Sections were incubated overnight with 10% blocking solution (Nacalai tesque) in TBS-T, and then in a humidity chamber for 16 h at 4 °C with mouse monoclonal antibodies to human alpha-cardiac actin (American Research Products., Belmont, MA), human myosin heavy chain (MHC) (mouse monoclonal anti-human myosin heavy chain cardiac antibody, Cat: 05-833., Upstate, NY) and CD34 (ab81289 [EP373Y], Abcom) diluted in blocking solution, followed by Alexa Fluor 488-labeled anti- IgG (Molecular Probes, Eugene, OR) with counter DAPI-staining. Hematoxylin and eosin stain, Masson trichrome stain and Sirius red stain were also performed. The stained all slides were viewed on a Bio-Zero laser scanning microscope (Keyence, Osaka, Japan). The scarred area percentages of the middle portion and apex side of LV were calculated by area stained blue with Masson's trichrome staining/total of 10 each independent sections using software Dynamic Cell Count (Keyence, Osaka, Japan).

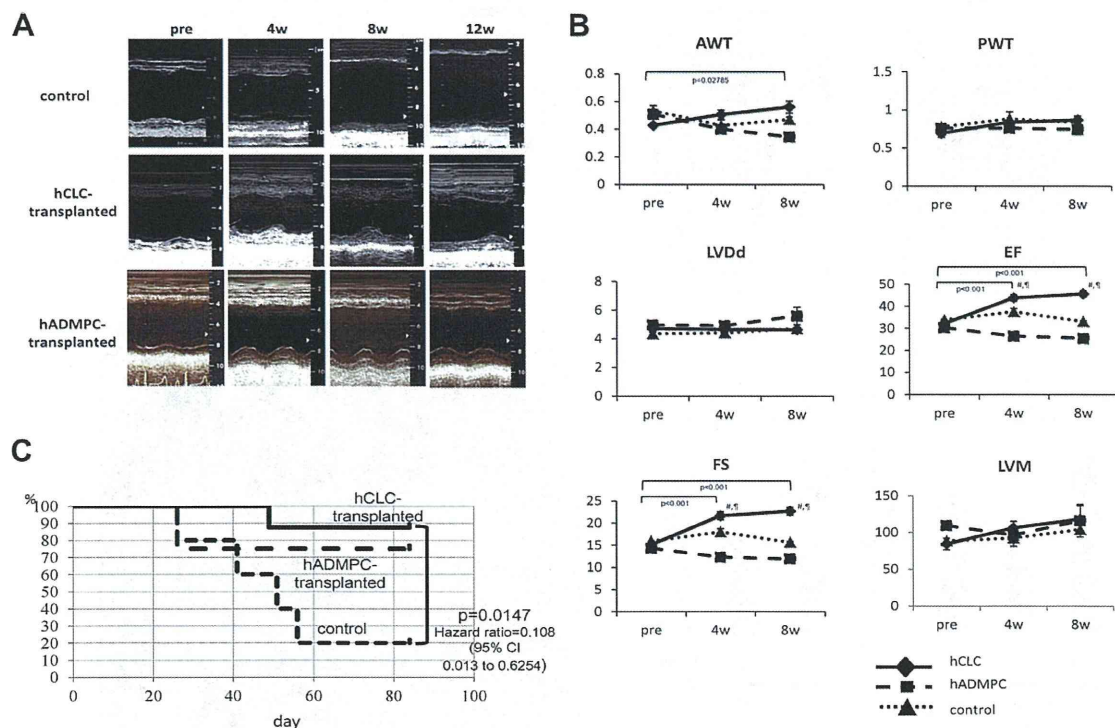


Fig. 2. Effects of hCLCs transplantation on cardiac function and survival rate. (A) In the hCLCs transplanted group, M-mode echocardiography showed improved wall motion within 4 weeks of transplantation. In contrast, worsening of the wall motion was noted in the mock-transplanted control swine. (B) Anterior wall thickness (AWT), ventricular ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) improved significantly in the hCLCs transplanted group, as confirmed by echocardiography. In the hCLCs transplanted swine, cardiac functions were recovered from transplantation to the end of the study. In the hADMPCs transplanted swine, cardiac functions were maintained from transplantation to the end of the study. In contrast, worsening of these cardiac function parameters was noted after mock-transplantation. The left ventricular diastolic dimension (LVDd) was maintained during the course of the experiment in hCLCs transplanted swine, but increased in the control groups. Posterior wall thickness (PWT) and left ventricular mass (LVM) showed no significant difference in the groups. Solid lines and squares indicated the transplanted group and the dashed lines and open squares indicated the control group. The symbol # indicated $p < 0.01$ hCLCs-transplanted vs control and indicated $p < 0.01$ hADMPC-transplanted vs control, respectively. Bars indicated mean \pm standard error of the mean (SEM). (C) Effect of hCLCs transplantation ($n = 8$), hADMPCs transplantation ($n = 4$) and lactic Ringer's solution injection ($n = 5$) on long-term survival rates of swine. Kaplan-Meier survival curve analysis demonstrated significant difference in the survival rates between the hCLCs group and the lactic Ringer's solution group.

2.6. Statistical analysis

Longitudinal changes between groups were tested with the use of mixed-model repeated-measures analysis of variance, with adjustment for baseline values. When the overall *P* value for the main effect of group or time, or interaction between group and time was less than 0.05, the post hoc multiple comparisons with the use of the single-step adjustment method as implemented by Hothorn et al. were performed [19]. Survival curves were constructed by the Kaplan–Meier method and survival among groups was compared using the Log-Rank test (StatMate III for Windows, Atoms, Tokyo).

3. Results

3.1. Cardiocytic commitment of hADMPCs into hCLCs

The potential for hADMPCs to commit into CLCs was evaluated from the mRNA expression of several cardiocytic markers by quantitative reverse transcriptase-PCR before and after DMSO induction, as follows: *islet-1* is a cardiac stem cell marker; *nkx2.5* and *GATA-4* are transcription factors required for subsequent cardiac differentiation; and *alpha-cardiac actin*, *myosin light chain (MLC)*, and *myosin heavy chain (MHC)* are markers of cardiocytic commitment (Table 1). After induction, hADMPCs expressed all markers with increment, indicating that hADMPCs could be successfully committed into cells of the cardiac lineage, hCLCs.

3.2. Effects of hCLCs transplantation on cardiac function and survival rate

Cardiac function was assessed by echocardiography. Four weeks after intracoronary transplantation of hCLCs, wall motion was improved but not in the placebo group (Fig. 2A). The wall motion of control swine worsened at 12 weeks after transplantation, while the improved motion was maintained after the hCLCs transplant (Fig. 2A). In the early post-transplantation period, there was no significant difference in left ventricular diastolic dimension (LVDd) between hCLCs-transplanted swine and the control. During the course of the study, LVDd exacerbated gradually in the control swine while it did not change significantly in the transplant swine (Fig. 2B). Likewise, the left ventricular ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) improved in the implanted group, but not in control swine (Fig. 2B). After hCLCs transplantation via left anterior descending (#6), the anterior wall thickness improved in the implanted group, but not in control swine. These results indicate that intracoronary transplantation of hCLCs resulted in recovery of cardiac function.

The Kaplan–Meier survival curves showed higher long-term survival rates for the hCLCs transplanted group than the control (Fig. 2C). Notably, only 1 of 8 swine died after transplantation of hCLCs. Survival at 12 weeks after transplantation was significantly higher in the hCLCs group (87.5%) than the control group (20%, 1 of 5) (Log-rank test: *p* = 0.0147. Hazard ratio = 0.108; 95% CI 0.013 to 0.625). These results suggest that transplantation of hCLCs

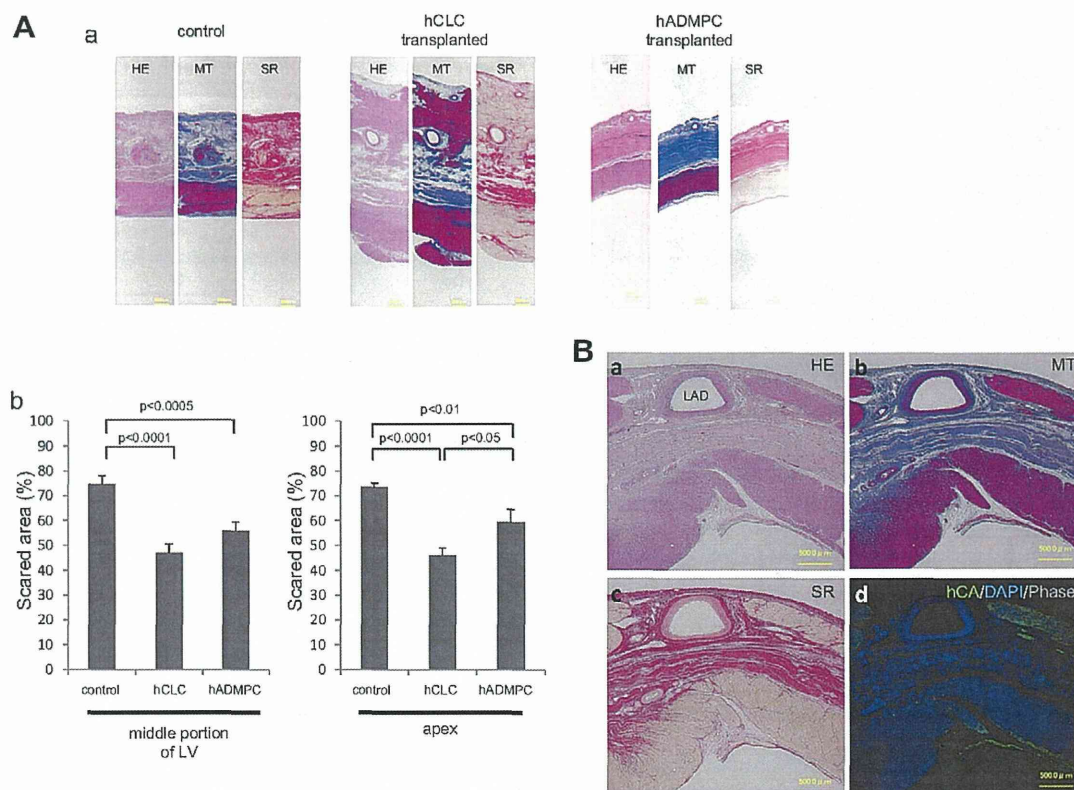


Fig. 3. Effects of hCLCs transplanted via coronary artery on cardiac structure. (A) (a) Photomicrographs of representative myocardial sections of the scarred area stained with hematoxylin/eosin (HE), Masson trichrome (MT) and Sirius red (SR) in the hCLCs-, hADMPC-transplantation and mock-transplanted control groups. Transplantation of hCLCs improved myocardial wall thickness in the infarcted myocardium and resulted in the development of new cardiac muscles on the surface. Bars = 500 μ m. HE; hematoxylin and eosin staining, MT; Masson trichrome staining, and SR; Sirius red staining. (b) The scarred area percentages of the middle portion and apex side of LV. The scarred area percentages of hCLCs-, hADMPC-transplantation and control groups were calculated by area stained blue with Masson's trichrome staining/total of 10 independent sections. The error bar indicated SEM. (B) Photomicrographs of representative myocardial sections of apical side of the anterior wall stained with HE (a), MT (b), SR (c) or phase contrast merge image of neighboring sections stained with anti-human alpha-cardiac actin (hCA; green), and DAPI as counter staining (d). In the HE-, MT-, and SR-stained sections, cardiac muscles were distributed on the scarred areas, and some parts of these muscles expressed human alpha-cardiac actin (green). Bars = 500 μ m. LAD; left anterior descending.