

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総括研究報告書

ヒト生体由来多能性幹細胞（Muse細胞）の再生医療への応用に向けた
安全性・有効性の検証

研究代表者 出沢真理 東北大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨 Muse 細胞は成人ヒトの骨髄、皮膚などの間葉系組織から多能性幹細胞マーカーと間葉系マーカーの二重陽性細胞として採取可能な生体由来の多能性幹細胞であり、腫瘍性を持たない。3 胚葉性のあらゆる細胞に分化する能力を持ち、そのまま生体内に投与すると損傷部位に生着し、組織に応じた機能的細胞に分化して様々な臓器の再生をもたらす。Muse 細胞を迅速に臨床試験を実現するために、誘導しないそのままの Muse 細胞懸濁液を疾患部位に投与する「医薬品」として開発することを本研究の目的とし、ターゲット臓器を肝臓に絞り非臨床有効性試験、細胞調製の最適化、Muse 細胞製剤の規格の設定、安全性検証等を行った。本年度は急性肝障害モデルを中心に研究を行ったところ、Muse 細胞は肝組織への生着、分化による組織修復を担うが、Muse 以外の非 Muse 細胞にはこのような能力がないことが分かった。Muse 細胞の核型検査を行ったところ、変異等異常は無いことが分かった。Muse 細胞の実用化を推進することにより、幅広い疾患を対象に安定的な効果をもたらす細胞治療が世界に先駆けて実現されると期待される。

研究分担者

浅田隆太

京都大学医学部附属病院
臨床研究総合センター・特定助教

清水忍

名古屋大学医学部附属病院
先端医療・臨床研究支援センター
病院講師

藤澤浩一

山口大学医学部
修復医学教育研究センター・助教

吉田正順

(株)Clio 社・代表取締役社長

の高率で誘導も可能である。従っていくつかの利用方法が想定できるが、迅速に臨床試験を実現するためには、誘導しないそのままの Muse 細胞懸濁液を疾患部位に投与する「医薬品」として開発が最も現実的であると考えられる。Muse 細胞はすでにヒトに移植されている骨髄や間葉系細胞に含まれているとはいえ、精製した細胞を投与する際の安全性・有効性評価は必須である。本研究では PMDA の審査官として薬事承認審査等の経験を有する浅田隆太と民間企業（株）Clio 社が研究分担者として参画し、実用化を目指した検証を行う。

ターゲット臓器として肝臓を選択する。血中アルブミンやビリルビンなどの機能改善や有効性を計るための客観的指標があること、また Muse 細胞が含有されている骨髄細胞を用いた治療（自己骨髄細胞投与療法 ABMi）が研究分担者藤澤浩一の所属する山口大学で肝硬変患者に実施されており、有効性・安全性を計るためのパラメーター設定が明確であるためである。

本プロジェクトでは、有効性検証の指標設定、非臨床有効性試験（急性と慢性の肝疾患モデルを用いた有効性検証、用量探索、投与速度の

A. 研究目的

間葉系幹細胞は 3 胚葉性にまたがる多様な細胞に分化するので ES 細胞のような多能性幹細胞が内在すると推察されていた。今回その説明となる Muse 細胞が発見された。Muse 細胞は多能性幹細胞としての特性を備えているが腫瘍性が無いところが最大の利点である。

誘導せずに、そのまま生体内に投与すると損傷部位に生着し、機能的細胞に分化して様々な組織再生をもたらす（PNAS, 2010）。また特定の誘導をかけると神経、肝細胞、骨細胞などに 90%以上

最適化)、細胞調製の最適化、Muse細胞製剤の規格の設定、非臨床安全性評価を実施する。、の一部(in vitroの安全性評価)はほぼ終了しており、H24~H25に、を実施し、その後、(in vivoの安全性評価を中心)を行う。また、薬事戦略相談を適宜利用して、安全性が高く再生効果を有するMuse細胞を出来る限り早く臨床試験に移行できるように進める。

B. 研究方法

【急性・慢性肝障害モデルを用いたヒト Muse 細胞の有効性評価、用量探索試験、投与速度の最適化】

H24年：モデル作製の条件検討を行った。ヒト細胞を拒絶しない免疫不全動物のSCIDマウスを使用する。急性肝障害モデルは腹腔内に四塩化炭素CCl₄を1.0mg/Kgの量で投与し、モデルとして最適の作成量を決定した。慢性モデルは週に2回、1.0mg/Kgの分量を4週間にわたって投与し作成することとした。

ヒトMuse細胞は骨髄(あるいは脂肪、皮膚)などからFACSでSSEA-3/CD105ダブル陽性細胞として採取する。FACSによってMuse細胞を除去した残りの間葉系細胞群を非Muse細胞とし、尾静脈投与するヒトMuse細胞の細胞数は2万とし、急性・慢性モデルに投与する。速度投与の最適化を検討する。血清アルブミン量、総蛋白量、ビリルビン値の他、体重、一般血液、血液生化学、全身状態、組織学的検討による線維化領域の算出、などによって有効性評価を7週で行う。

【細胞調製の最適化、Muse細胞製剤の規格の設定】

本研究では急性・慢性の肝障害モデルに上記で凍結保存したMuse細胞の移植を行い、FACSで採り立ての細胞との比較検討を行い検証する。

【非臨床安全性評価】

Clio社がMuse細胞製剤の製造工程の目途を立てる。

【薬事戦略相談】

H26年：非臨床有効性試験が終了した段階で、非臨床安全性試験(毒性試験・安全性薬理試験等)の計画について、薬事戦略相談を行う。

・非臨床安全性試験(毒性試験・安全性薬理試験等)が終了し、治験デザインの骨子が固まった段階で、治験デザイン、Muse細胞製剤の品質等について相談を行う。

【倫理面への配慮】

東北大学と山口大学の遺伝子組換え実験安全専門委員会と動物実験専門委員会の指針に従って研究計画書を提出し、機関承認を得た後に実験を実施しており、承認を得た計画のみを実行する。

ヒト間葉系細胞はスイスLonza社やアメリカのATCCなどから購入した細胞を用いる。ヒト各種組織、臓器などは同じく購入によって入手したものを実験に用いる。

遺伝子導入実験は「東北大学 遺伝子組み換え実験計画承認」を得ている(研研76-20-35号)。また動物実験委員会の承認に関しては2011医動-282、2011医動-283、2011医動-284、2011医動-285にて承認を得た上で実験を行っている。

C. 研究結果

投与速度の最適化をヌードマウスとヒト線維芽細胞を用いておこなった。呼吸不全・肺塞栓などの有害事象を検討したところ9匹のヌードマウスすべてにおいて、2万細胞を30秒で尾静脈から投与してもmorbidityとmortalityはみられなかったのでこの速度投与を採用した。

SCIDマウスでの急性・慢性肝障害モデルを作成し、ヒト骨髄由来Muse細胞の有効性を検討した。急性モデルではヒト骨髄由来Muse、非Museそれぞれ2万細胞を四塩化炭素投与2日目にSCIDマウス尻静脈より投与した。いずれの群も総ビリルビンの上昇がマイルドに抑えられた他は、GOT、GPT、総蛋白、アルブミンは一過性に増悪し、14日前後には正常に戻ってしまい統計的な有意差は見られなかった。しかし組織学的検討では顕著な差があり、移植30日後では非Muse細胞はほとんど肝臓組織内に残っておらず検出されなかった一方、Muse細胞は組織内に生着し、Heppar 1, albumin, anti-trypsinなど肝細胞の機能的なマーカー陽性を示していた。

慢性モデル実験も行い、Muse 細胞投与群では肝臓の線維化の有意な抑制効果を認め、ヒト Muse 細胞の肝臓内での生着、分化が急性モデル同様に確認されている。また線維化抑制性については非 Muse 細胞とは優位差をもって有効性を示すデータが得られている。

Muse 細胞の安全面の検証として、健康成人に由来する骨髄由来の Muse 細胞の核型検査を実施し染色体数の異常が見られないことが確認された。検証は一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所で実施された。臨床応用を目指した Muse 細胞の分離方法の確立に関してはトリプシンと物理的ストレスを組み合わせた方法で約 30%、AutoMACS では 70~80%の精製率で得られることが確認できた。

これらの結果を持って H25 年 10 月 24 日に PMDA と薬事戦略相談を行った。

Clio 社はこれらの成果をもとに検討し、現在 Muse 細胞製剤作成のための MACS を用いた製造工程を検討している。

進捗状況としてはほぼ当初の予定通りに進んでいると考えている。

D. 考察

期待される成果は、安全性が高い様々な疾患を対象とした再生医療の実現である。

間葉系幹細胞は肝硬変、心筋梗塞、脊髄損傷、脳梗塞、変形性関節症などの多岐にわたる疾患において、ドイツ、イギリス、アメリカを含め、世界中で臨床試験が展開され一定の効果を挙げている。もたらす効果として、間葉系幹細胞の産生するサイトカインによる保護効果の他に、投与したごく一部の細胞が損傷を受けた組織に生着して分化し、失われた細胞を「置換」する再生効果が報告されている。ただサイトカイン効果は一過性であり、持続的な機能回復は欠落した細胞の置換による再生効果が担っている。このような細胞の探索が世界中で進められていたが、今回 Muse 細胞が再生効果を担うことが明らかになった。

Muse 細胞では劇症肝炎、筋変性、脊髄損傷、皮膚損傷での組織再生が確認されており、実用化を推進することにより、幅広い疾患を対象に安定的

な効果をもたらす細胞治療が世界に先駆けて実現されると期待される。開発にしのぎを削っている細胞治療において、日本の先駆性・牽引性がもたらされ、社会的な意義と国民の健康維持への貢献は大きい。また医薬品としての Muse 細胞製剤が臨床応用されることにより新たな医療創生となり、経済効果と新規雇用創出にもつながり厚生労働行政に貢献すると期待される。

E. 結論

急性および慢性肝障害モデルを用いて、血管から投与された Muse 細胞が傷害組織に遊走、生着し、さらに機能的な肝細胞に自発的に分化することが示唆された。一方、間葉系幹細胞の大半を構成する非 Muse 細胞にはこのような効果が無いことが分かった。Muse 細胞はこのように間葉系幹細胞の中から精製し投与することにより有効な再生医療が期待されるが、Muse 細胞製剤を作るに当たり、日本だけでなく欧米でも承認の取れていない FACS で精製するのではなく、すでに FDA でも承認を受けた MACS で進めるのが現状では妥当ではないか、との結論を得た。これらのデータや現状を踏まえ、さらに PMDA との面談を進めて行く。

F. 危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- Wakao S, Akashi H, Dezawa M. Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, that reside in human mesenchymal tissues. Spinal Surgery (in press).
- Wakao S, Akashi H, Kushida Y, Dezawa M. Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues. Pathology International, 64(1):1-9, 2014.
- Y. Kuroda, M. Dezawa. Mesenchymal stem

- cells and their subpopulation, pluripotent Muse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anat Rec.* 297(1):98-110, 2014.
- Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, Dezawa M. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with non-tumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cells Dev.* 23(7):717-28, 2014.
 - Ishikawa H, Tajiri N, Shinozuka K, Vasconcellos J, Kaneko Y, Lee HJ, Mimura O, Dezawa M. Kim SU, Borlongan CV. Vasculogenesis in Experimental Stroke After Human Cerebral Endothelial Cell Transplantation. *Stroke.* 44(12):3473-81, 2013.
 - Ishikawa H, Tajiri N, Vasconcellos J, Kaneko Y, Mimura O, Dezawa M. Borlongan CV. Ischemic Stroke Brain Sends Indirect Cell Death Signals to the Heart. *Stroke.* 44(11):3175-82, 2013.
 - Kanemaru SI, Kitani Y, Ohno S, Shigemoto T, Kojima T, Ishikawa S, Mizuta M, Hirano S, Nakamura T, Dezawa M. Functional regeneration of laryngeal muscle using bone marrow-derived stromal cells. *Laryngoscope.* 123(11):2728-34, 2013.
 - Furuya T, Hashimoto M, Koda M, Murata A, Okawa A, Dezawa M. Matsuse D, Tabata Y, Takahashi K, Yamazaki M. Treatment with basic fibroblast growth factor-incorporated gelatin hydrogel does not exacerbate mechanical allodynia after spinal cord contusion injury in rats. *J Spinal Cord Med.* 36(2):134-9, 2013.
 - Aizawa-Kohama M, Endo T, Kitada M, Wakao S, Sumiyoshi A, Matsuse D, Kuroda Y, Morita T, Riera J.J, Kawashima R, Tominaga T, Dezawa M. Transplantation of bone marrow stromal cells-derived neural precursor cells ameliorates deficits in a rat model of complete spinal cord transection. *Cell Transplantation.* 22(9):1613-25, 2013.
 - Kuroda Y, Wakao S, Kitada M, Murakami T, Nojima M, and Dezawa M. Isolation, culture and evaluation of Multilineage-differentiating Stress Enduring (Muse) cells. *Nature Protocols.* 8(7):1391-415, 2013.
 - 出澤真理 「ヒト生体に内在する新たな多能性幹細胞 Muse 細胞：細胞治療，予後の診断，創薬，病態解析への展開の可能性」人工臓器 42(1): 16-18, 2013.
 - 北田容章、出澤真理 「間葉系幹細胞・Muse 細胞を用いた再生医療」再生医療叢書 7; p163-187, 2013.
 - 出澤真理 「Muse 細胞の発見と再生医療への応用可能性」幹細胞技術の標準化 - 再生医療への期待, p22-41, 2013.
- ## 2. 学会発表
- 出澤真理 生体内修復機構を担う多能性幹細胞 Muse 細胞の拓く再生医療の道，新学術領域「バイオアセンブラ」第 6 回公開シンポジウム，東北大学，3 月，2014.
 - 出澤真理 生体内修復機構を担う Muse 細胞の拓く再生医療の道，第 13 回日本再生医療学会，京都，3 月，2014.
 - 出澤真理 ヒト生体に内在する多能性幹細胞 Muse 細胞：再生医学と創薬の融合への道，第 55 回創薬薬理フォーラム，東京，1 月，2014.
 - 出澤真理 自己細胞および細胞バンクを用いた神経・筋肉変性疾患の根本的治療法の開発，彩都 産学官連携シンポジウム，大阪，1 月，2014.
 - 出澤真理 Discovery of intrinsic pluripotent stem cells, Muse cells, that reside in adult human mesenchymal tissues. , *Small RNAs to Stem Cells &*

- Epigenetic Reprogramming Asia-2013 Meeting, 東京大学, 11月, 2013.
- 出澤真理 生体に内在する非腫瘍性の多能性幹細胞 Muse 細胞: ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, 第7回若手医療薬科学シンポジウム, 東北大学, 11月, 2013.
 - 出澤真理 ヒト生体に内在する新たなタイプの多能性幹細胞 Muse 細胞の発見と再生医療への応用について, 第127回遠江医学会秋季大会, 浜松, 11月, 2013.
 - 出澤真理 自己細胞および細胞バンクを用いた神経・筋肉変性疾患の根本的治療法の開発, 平成25年度医薬基盤研究所橋渡しセミナー(産学交流セミナー), 東京, 11月, 2013.
 - 出澤真理 ヒト生体に内在する新たな多能性幹細胞 Muse 細胞: 組織修復恒常性の役割, 第66回日本胸部外科学会定期学術集会, 仙台, 10月, 2013.
 - Mari Dezawa Discovery of Muse cells, novel pluripotent stem cells that reside in human mesenchymal tissues: implications for new concepts of regenerative homeostasis and stem cell failure. , International Seminar Series of Norwegian Center for Stem Cell Research, Oslo Norway, Oct. , 2013.
 - Mari Dezawa Discovery of Muse cells, novel pluripotent stem cells that reside in human mesenchymal tissues: implications for new concepts of regenerative homeostasis and stem cell failure. , 10th Annual Norwegian Stem Cell Networking Meeting, Oslo Norway, Oct. , 2013.
 - 出澤真理 間葉系組織に存在する多能性幹細胞(Muse 細胞)の可能性, BioJapan 2013, 横浜, 10月, 2013.
 - 出澤真理 Novel type of pluripotent stem cells (Muse cells) that reside in adult human mesenchymal tissues and their potential for cell-based therapy. , ASahct2013: International Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy, 仙台, 8月, 2013.
 - 出澤真理 生体に内在する多能性幹細胞 Muse 細胞の発見: ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, 東北大学校友会関東交流会, 仙台, 7月, 2013.
 - 出澤真理 ヒト生体に内在する多能性幹細胞 Muse 細胞の発見: 新たな概念 Regenerative homeostasis と stem cell failure の提唱, 北海道大学病院 高度先進医療支援センター 臨床試験講演会, 北海道大学, 6月, 2013.
 - 出澤真理 生体内に内在する多能性幹細胞 Muse 細胞と regenerative homeostasis, 第102回日本病理学会総会, 札幌, 6月, 2013.
 - 出澤真理 ヒト生体に内在する多能性幹細胞 Muse 細胞: 組織修復恒常性の役割, 第28回日本脊髄外科学会, 名古屋, 6月, 2013.
 - 出澤真理 ヒト生体に内在する多能性幹細胞 Muse 細胞: 新たな概念 Regenerative homeostasis と stem cell failure の提唱, 第12回松本ポーンフォーラム, 信州大学, 5月, 2013.
 - 出澤真理 Discovery of Muse cells, intrinsic pluripotent stem cells in human mesenchymal tissues; are they a major player of regenerative homeostasis in our body?, NIH-Tohoku University Intl. Symposium, 仙台, 5月, 2013.
 - Mari Dezawa Intrinsic pluripotent stem cells, Muse cells, are a primary source of iPS cells in human fibroblasts. Seminar at Dept. Pediatrics/Human Development College of Human Medicine, Michigan State University, USA. , April, 2013.
 - Mari Dezawa Intrinsic pluripotent stem cells, Muse cells, are a primary source of iPS cells in human fibroblasts. , AAA's Annual Meeting at EB 2013, Boston USA. , April, 2013.

- 出澤真理 新規に発見された組織恒常性を担う生体内多能性幹細胞：Muse 細胞，日本医工学治療学会第 29 回学術大会，横浜，4 月，2013.
- 出澤真理 Discovery of intrinsic pluripotent stem cells, Muse cells in human mesenchymal tissues;are they a major player of regenerative homeostasis in the body? , AsiaCORD meeting KOBE 2013 , 神戸，4 月，2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し