

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
（再生医療関係研究分野））
総括研究報告書

ヒト成体間葉系幹細胞の再生医療実現のためのゲノム科学に基づく品質管理と体内動態研究
研究代表者 落谷孝広 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野・分野長

研究要旨

平成 25 年度に計画していた研究内容は、hAD-MSC の均質性評価系の構築の基盤研究、hAD-MSC の肝硬変モデルマウスにおける有効性評価及び IVIS による体内動態の解析である。

均質性評価系構築の基盤研究の進捗としては、ストレス負荷で変化する分泌型 miRNA の同定を目的とし、継代ストレス (P4,P6,P11) による分泌型 miRNA の発現プロファイル解析を進めている。現在までに、培養上清中の分泌型 miRNA 量が継代ストレス負荷により増加するという結果が得られており、継代ストレスが分泌型 miRNA 発現に影響を及ぼすことが示唆された。現在は個々の分泌型 miRNA 発現量について Micro array 解析を実施中であり、平成 25 年度中には 20~30 種類のターゲット miRNA の同定を完了した。またデジタル PCR による高感度 miRNA 解析についても既に培養上清を用いた条件検討に着手しており、分泌型 miRNA による品質管理の実践については計画より早く実用化できると考えている。

肝硬変モデルマウスにおける有効性評価及び IVIS による体内動態解析については、四塩化炭素誘発肝硬変モデルに対して hAD-MSC を既に投与しており、AST 及び ALT 等の改善を図る事に成功した。一方で本試験モデルは最短でも 8 週間を要するため、別途四塩化炭素誘発急性肝障害モデルを用いた検討も並行して進めている。現在までに急性肝障害モデルを用いた hAD-MSC の有効性の確認、さらに hAD-MSC に最適な蛍光色素及び標識条件の確立は終了し、疾患モデルにおいて、hAD-MSC の肝臓への集積を示す IVIS の結果も得られている。

A . 研究背景、目的 （背景）

本提案では、最新のゲノム解析技術を用いた投与前の細胞の均質性、移植後の細胞の生着状況、体内循環状態、分化状況の定量的解析を行うことにより移植細胞の詳細な動態解析の実現を目的としている。これにより、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞である hAD-MSC の安全かつ効果的な投与条件を定量データから予測することが可能となり、安全性の高い再生医療実現へ向け幅広い応用が期待できる。

このような背景のもと、本研究ではゲノム解析技術を応用し、種々ストレス下における分泌型 miRNA の発現プロファイルからバイオマーカーを同定し、さらにデジタル PCR による高感度定量解析を行うことで、新しい細胞の均質化方法を開発することを目的としている。また移植細胞の体内動態および生着細胞の機能解析についても、デジタル PCR 及び並列型シーケンサーを用いたゲノム解析技術を応用した新しい定量解析法の開発を本研究の目的としている。

平成 25 年度の研究分担として、国立がん研究センターとロート製薬では、hAD-MSC のストレス負荷による培養上清中分泌型 miRNA の発現プロファイル解析及びストレス応答性のバイオマーカーとなる miRNA の同定、さらに hAD-MSC の肝障害モデルマ

ウス及び肝線維化モデルマウスを用いた有効性評価、及び体内動態解析の従来法として蛍光標識 hAD-MSC による高感度 *in vivo* imaging 技術を用いた体内動態解析を行った。

B . 研究方法

ストレス応答性 miRNA の探索及び同定

Lonza 社から購入した hAD-MSC を培養フラスコで 4 継代培養した細胞 (P4 細胞) および 11 継代培養した細胞 (P11 細胞) を作製、それぞれの培養上清からエクソソームを精製した。精製したエクソソームを Agilent 社 Human miRNA microarray により P4 細胞及び P11 細胞から分泌された miRNA 発現プロファイルを比較した。

hAD-MSCs の肝障害モデルマウス及び肝線維化モデルマウスによる有効性評価

肝障害モデル

BALB/c マウスの腹腔内に四塩化炭素を投与し肝障害を誘発した。四塩化炭素投与 1 日後に 1×10^6 cells/body の用量で hAD-MSC を尾静脈から投与した。細胞投与 1 日後にそれぞれのマウスから採血を行い、各種生化学検査を行った。

肝線維化モデル

BALB/c マウスの腹腔内に四塩化炭素を週 2 回、8 週間投与し肝線維化を誘発させた。8 回目の四塩化炭素投与後、 1×10^6 cells/body の用量で hAD-MSC を

尾静脈から投与した。細胞投与 4 週後、マウスから採血及び肝臓を摘出し、各種生化学検査及び Masson trichrome 染色により線維化部分を染色し、画像解析により線維化部分の面積を算出した。

蛍光標識 hAD-MSCs による体内動態解析

hAD-MSC に DiR を添加し DiR ラベル hAD-MSCs を作製した。DiR-MSCs をマウス肝線維化モデルに 1×10^6 cells/body の用量で尾静脈から投与、投与 2 時間、1 日、2 日、3 日、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間における蛍光シグナルの経時変化を IVIS により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究課題で用いるヒト脂肪由来間葉系幹細胞はインフォームドコンセントを得て取得されたものであり、海外の市販品を購入するため倫理的な問題は起こらない。また本研究課題においてはヒトへの臨床応用は実行されない。

動物実験は、国立がん研究センターおよび委託試験先である三菱メディエンスの定める動物実験指針の基準に従うとともに、動物倫理委員会の承認を得たうえで、動物の苦痛軽減に努め、動物愛護の精神に基づく実験を行う。

C. 研究結果

1. hAD-MSC の均質性評価系の構築の基盤研究：

均質性評価系構築の基盤研究の進捗としては、ストレス負荷で変化する分泌型 miRNA の同定を目的とし、継代ストレス(P4,P6,P11)による分泌型 miRNA の発現プロファイル解析を進めている。現在までに、培養上清中の分泌型 miRNA 量が継代ストレス負荷により増加するという結果が得られており、継代ストレスが分泌型 miRNA 発現に影響を及ぼすことが示唆された。現在は個々の分泌型 miRNA 発現量について Micro array 解析を実施中であり、平成 25 年度 12 月中には 20~30 種類のターゲット miRNA を同定する予定である。またデジタル PCR による高感度 miRNA 解析についても既に培養上清を用いた条件検討に着手しており、分泌型 miRNA による QC の実践については計画より早く実用化できると考えている。(達成度:80%/100%)

2. hAD-MSC の肝硬変モデルマウスにおける有効性評価及び IVIS による体内動態の解析：

肝硬変モデルマウスにおける有効性評価及び IVIS による体内動態解析については、四塩化炭素誘発肝硬変モデルに対して hAD-MSC を既に投与しており、平成 25 年 12 月末には有効性の結果が得られる予定である。一方で本試験モデルは最短でも 8 週間を要するため、別途四塩化炭素誘発急性肝障害モデルを用いた検討も並行して進めている。現在までに急性肝障害モデルを用いた hAD-MSC の有効性の確認、さらに hAD-MSC に最適な蛍光色素及び標識条件の確立は終了し、疾患モデルにおいて、hAD-MSC の肝臓への集積を示す IVIS の結果も得られている。

(達成度:80%/100%)

3. デジタル PCR による生着細胞の絶対定量：

予定より早くマウス肝障害モデルにおける hAD-MSC の有効性及び IVIS によるイメージング解析の目的が立ったことから、平成 26 年度に実施予定であるデジタル PCR による生着細胞の絶対定量について計画を前倒して着手している。現在デジタル PCR による生着細胞数の絶対定量法の確立に向け、マウス肝臓組織に hAD-MSC を一定量混合し調整した DNA を用いた定量法のバリデーションを実施中である。(達成度:20%/100%;平成 26 年度の前倒し)

D. 考察

hAD-MSCs から分泌されるエクソソーム中の特定の miRNA に着目し、その発現プロファイルの変化を hAD-MSCs の品質管理に応用する目的で、各種ストレス下で変化する miRNA の同定を進めている。H25 年度の研究では継代ストレスによる miRNA の発現プロファイルの変化に着目し、P4 細胞及び P11 細胞における分泌型 miRNA 発現をマイクロアレイにより解析を行い、約 40 種類の miRNA を同定することができた。今後、qRT-PCR による検証を行うことでさらに miRNA を絞り込み、東京医科歯科大学で進めている miRNA コピー数のデジタル PCR による測定を行う予定である。

hAD-MSCs の急性肝障害モデルマウスによる有効性評価においては、細胞投与により血清中 AST 及び ALT の低下が認められた。本効果については再現性も確認されており、hAD-MSC の肝障害への有効性が示唆された。一方で、四塩化炭素の頻回投与による肝線維化モデルマウスによる有効性評価においても血清中 AST 及び ALT が低下傾向を示すと共に、hAD-MSCs 投与により肝線維化面積の縮小が認められた。しかしながら再現性の確認は必要であり、今後評価項目を追加して試験を行う予定である。

hAD-MSCs の肝線維化モデルマウスにおける体内動態を評価すべく、蛍光色素(DiR)で標識した hAD-MSCs 投与後のマウス全身の蛍光強度変化を In Vivo Imaging System(IVIS)を用いて観察した。投与直後は、肺付近に強い蛍光シグナルがみられ、その後、肝臓付近にも蛍光シグナルが観察された。

今後、投与後の各臓器における細胞数の定量化方法確立の検討として、東京医科歯科大学においてデジタル PCR の手法を用い、移植細胞の絶対定量評価の検討を進める予定である。

特記事項

1. 平成 25 年度計画の変更点(研究費補助金交付申請時の平成 25 年度研究計画からの変更点)：

・変更点(1)： 予定より早くマウス肝障害モデルにおける hAD-MSC の有効性及び IVIS によるイメージング解析の目的が立ったことから、平成 26

年度に実施予定であるデジタル PCR による生着細胞の絶対定量について計画を前倒して着手している。現在デジタル PCR による生着細胞数の絶対定量法の確立に向け、マウス肝臓組織に hAD-MSC を一定量混合し調整した DNA を用いた定量法のバリデーションを実施中である。

2. 評価委員会コメントへの対応状況

コメント1：品質管理はゲノム解析だけでは不足であり、再生医療経験者と組むべきである

再生医療経験者との連携については、すでにヒト幹指針での再生医療臨床研究事業の推進研究者と連携（情報交換）をはかっているところである。

コメント2：ゲノム解析に終始する事にならないか懸念

今回提案したゲノム解析以外に、品質管理の項目は、細胞の均質性、移植後の細胞の生着状況、体内循環状態、分化状況において、従来の細胞表面マーカーや、細胞生物学的な検討を併せて実施することが望ましい。

コメント3：細胞の供給源はどこか？

本研究期間においては、申請のとおり市販のヒト間葉系幹細胞を使用して解析、最適化等の一連の作業をすすめ、平成 27 年度後半には、動物での有効性試験では実際に前臨床試験で使用するヒト間葉系幹細胞の候補ストックを使用する予定である。

コメント4：蛍光マーカーとの感度等の比較は？

蛍光による細胞標識法は、既知で標識可能な分子に対象が限定されること、強い紫外光照射による細胞障害、蛍光標識分子の退色、多重染色やそのスペクトル識別の困難さなどの欠点があり、本研究で実行されるデジタル PCR の利便性、高感度には遥かに及ばない。さらにデジタル PCR 法は 1 細胞の解析も可能である。現在マウス肝臓組織に hAD-MSC を混合した評価系を用いて、PCR 条件の詳細についてバリデーションを進めている。平成 25 年度中には、IVIS によるイメージング解析との感度の比較検討を実施する予定である。

コメント5：細胞機能の影響についての考慮は？

品質管理の項目は、細胞の均質性、移植後の細胞の生着状況、体内循環状態、分化状況において、従来の細胞表面マーカーや、細胞生物学的な検討を併せて実施することが望ましい。

E. 結論

ストレス負荷による分泌型 miRNA をマイクロアレイ解析による比較検討により、バイオマーカー候補として約 40 種類の miRNA を同定することができた。今後 qRT-PCR などで検証することで候補となる miRNA を絞り込み、デジタル PCR による高感度発現解析を進める予定である。さらに、培養工程に係る他のストレスにより変化する分泌型 miRNA の同定を並行して行い、培養工程における QC ツールとしての実用化を目指した研究を進める予定である。

肝障害モデルマウスに hAD-MSCs を投与することにより、その有効性を確認することができた。さらに、蛍光標識した細胞の IVIS 解析を行うことで、移植後細胞の体内動態、特にターゲット部位への細胞の集積が確認できた。今後は、東京医科歯科大学で確立したデジタル PCR によるヒト由来細胞の絶対定量評価系と IVIS 解析の結果を比較検討を行い、新しい体内動態解析手法の開発を進める予定である。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Katsuda T, ..., Ochiya T. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*, 13:1637-1653, 2013
2. Higashimoto M, ... Ochiya T, Kaneko S. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4⁺ T-cell suppression. *Eur J Immunol*, 43:2956-2968, 2013
3. Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, Yoshioka Y, Takagaki K, Oki K, Takeshita F, Sakai Y, Kuroda M, Ochiya T. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci Rep*, 3:1197, 2013
4. Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, Honda M, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. *Hepatology*, 58:1133-1142, 2013

2. 学会発表

1. 「機能的胆管ネットワークを配備した肝組織の機構（代：勝田 毅）」、落谷孝広、18th 日本肝臓医学生物学研究会（2013.5.25 東京）
2. 「間葉系幹細胞とパラクリン因子」、落谷孝広、34th 日本炎症・再生医学会（2013.7.1-3 京都）
3. 細胞間コミュニケーションの新たな担い手「エクソソーム」の正体と診断治療への応用」、落谷孝広、34th 日本炎症・再生医学会、（2013.7.2 京都）
4. 「The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles.」、落谷孝広、【ロート製薬】第 20 回 肝細胞研究会 イブニングセミナー（2013.9.26 大阪）
5. Ochiya T. 「Role of miRNAs in the pathogenesis of liver disease」. APASL2014, Australia.Brisbane. March 12-17

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2. 実用新案登録

なし

1. その他

なし

