

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））
分担研究報告書

最新のゲノム科学による hAD-MSC の性状解析
研究分担者 石川 俊平 東京医科歯科大学難治疾患研究所

研究要旨

細胞を有効成分とした再生医療分野において、その品質管理（Quality Control）や移植細胞の体内動態解析、生着細胞の機能解析は安全性及び有効性を担保する上で大きな課題である。そこで本研究では分泌型 miRNA 発現プロファイルによる細胞品質管理法の検討、ゲノム解析手法を応用した移植細胞の体内動態及び生着細胞の機能解析法の検討を行った。H25 年度の研究において、細胞培養上清中の特定の分泌型 miRNA のコピー数解析を行い、培養上清中からの miRNA 発現量の絶対定量評価系を構築することができた。さらに、マウス肝臓に混入させたヒト由来細胞を用いてデジタル PCR 解析の予備検討を行い、マウス組織中のヒト由来細胞数を高感度で検出することができた。

A. 研究背景、目的 (背景)

再生医療分野において、細胞の均質性担保（Quality Control）、移植細胞の体内動態、生着状況、分化状況の解析は、再生医療製品の有効性及び安全性を予測する上で非常に重要である。これまでは細胞表面抗原の発現パターンによる移植細胞の Quality Control や、蛍光標識された移植細胞の免疫組織学的染色による動態解析などが行われてきたが、検出感度も低く定量評価とは程遠いのが現状である。

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、東京医科歯科大学では、hAD-MSC 培養上清中の分泌型 miRNA のデジタル PCR による定量解析法の評価系構築、及びデジタル PCR によるマウス肝臓中のヒト由来細胞の定量解析法の評価系構築を行った。

B. 研究方法

hAD-MSC 培養上清中の miRNA 定量法の構築

Lonza 社から購入した hAD-MSC をフラスコで 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) を作成、それぞれの培養上清からエクソソームを精製した。精製エクソソーム中の RNA を鋳型として miR-xxx 特異的逆転写プライマーを用いて逆転写を行った。得られた逆転写産物を鋳型とし

て Digital Array™ IFC (Fluidigm) を用いデジタル PCR を行うことで miR-xxx のコピー数を測定した。

マウス肝臓中のヒト由来細胞の定量法の構築

マウス組織中の異種 (ヒト由来) 細胞のデジタル PCR による絶対定量評価を行うにあたり、まずは予備検討として、採取したマウス肝臓 10mg あたり 1000 個のヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (hAD-MSCs) を添加し、異種細胞混合状態におけるヒト由来細胞をデジタル PCR で検出を行った。

ヒト由来細胞の検出には、ヒト RNaseP 遺伝子及びマウス由来細胞の検出にはマウス Transferin 遺伝子に対する特異的 Taqman プローブ (ヒト: FAM ラベル、マウス: VIC ラベル) を用い、各ゲノム DNA を用いて Digital Array™ IFC によりデジタル PCR を行いマウス及びヒト由来細胞のコピー数を検出した。

(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。

C. 研究結果

hAD-MSC 培養上清中の miRNA 定量法の構築
ヒト AD-MSC を 4 継代 (P4) 及び 11 継代 (P11) を行った培養上清 1ml より精製したエクソソーム RNA を逆転写後、デジタル PCR による定量を行った。その結果、P4 は 7 コピー、P11 は 182 コピー検出された。精製エクソソーム画分の RNA 量が各々 P4: 7760pg、P11: 12860pg であることから培養上清 1ml あたり P4 では 1358 コピー、P11 では 33436 コピー存在することが推定された。

マウス肝臓中のヒト由来細胞の定量法の構築
マウス肝臓 10mg に 1000 個の細胞を混入した後、精製したゲノム DNA を鋳型としてデジタル PCR 11 パネル (8415 ウェル) を用いて検討を行った。その

結果、マウス由来ゲノムが7384コピー、ヒト由来ゲノムが15コピー検出された。
10mgのマウス肝臓中の細胞数が分からないので正確な理論値を算出することはできないが、固形組織1g中に約 1×10^9 個の細胞が含まれていることを参考に理論値を算出するとマウス肝臓10mg中にヒト由来細胞が約5000個含まれることとなり、本測定においてはヒト由来細胞を概ね正確に定量できていると考えられる。

D. 考察

hAD-MSC培養上清中のmiRNA絶対定量法の構築

hAD-MSC培養上清から精製したエクソソームを用いた、単位培養上清あたりのmiRNAコピー数はデジタルPCRで測定可能であることが分かった。

マウス肝臓内のヒト由来細胞の絶対定量法の構築

今回の結果から、デジタルPCRを用いることによりマウス組織中に含まれるヒト細胞数の推定は可能であることが示された。今後、マウス組織に混入させる細胞数を振ることで検量線を書くことにより、ヒトAD-MSCを血中投与した際にマウスの肝臓内に移行したヒトAD-MSCの細胞数の算出が可能となると考えられる。

E. 結論

hAD-MSCの培養上清中の分泌型miRNAの絶対定量解析法の構築については計画通り予備検討を進めることができた。今後はマイクロアレイ解析から同定した各種ストレス応答性のターゲットmiRNAを用いた絶対定量解析を進める予定である。

マウス肝臓中のヒト由来細胞の絶対定量評価系については計画を前倒しで着手した。まずは摘出したマウス肝臓中に混合したヒト由来細胞を用いた予備検討の結果、マウス肝臓中のヒト由来細胞を高感度で定量することが可能であることが示された。今後、In vivo imagingによる解析との比較検討、疾患モデル動物でのhAD-MSCsの体内動態解析を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

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））
分担研究報告書

hAD-MSC の培養及び動物実験全般、デジタル PCR 及び並列型シーケンサ実務全般
研究分担者 石井 強 ロート製薬株式会社

研究要旨

細胞を有効成分とした再生医療分野において、その品質管理（Quality Control）や移植細胞の体内動態解析、生着細胞の機能解析は安全性及び有効性を担保する上で大きな課題である。そこで本研究では分泌型 miRNA 発現プロファイルによる細胞品質管理法の検討、ゲノム解析手法を応用した移植細胞の体内動態及び生着細胞の機能解析法の検討を行った。H25 年度の研究において、継代ストレス負荷における分泌型 miRNA 発現プロファイルの比較検討を行い、ストレス負荷により発現量が著しく変化する miRNA を約 40 種類同定した。また、移植細胞の肝障害動物モデルを用いた有効性の検討、および蛍光標識細胞を疾患動物モデルに投与し、高感度 in vivo imaging system (IVIS) によりその体内動態を解析し、移植細胞の継時的な動態変化について確認することができた。

A. 研究背景、目的 (背景)

再生医療分野において、細胞の均質性担保 (Quality Control)、移植細胞の体内動態、生着状況、分化状況の解析は、再生医療製品の有効性及び安全性を予測する上で非常に重要である。これまでは細胞表面抗原の発現パターンによる移植細胞の Quality Control や、蛍光標識された移植細胞の免疫組織学的染色による動態解析などが行われてきたが、検出感度も低く定量評価とは程遠いのが現状である。

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、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 週間後、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継時変化を 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

ストレス応答性 miRNAの探索及び同定
Agilent社Human miRNA microarrayを用い、P4細胞及びP11細胞におけるmiRNA発現プロファイルを比較した。P4細胞とP11細胞の発現量において、その発現量に5倍以上の差が認められたmiRNAを約40種類ターゲット候補miRNAとして同定した。

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

四塩化炭素で誘発した肝障害モデルマウスの血清中Aspartate aminotransferase (AST)、Alanine aminotransferase (ALT)を測定したところ、細胞非投与群において高値を示した。一方、hAD-MSCs投与群では血清中のAST及びALTが共に細胞非投与群に比べて低値を示しており、hAD-MSCs投与により肝障害レベルが改善する可能性が示唆された。

●肝線維化モデル

四塩化炭素の反復投与により肝線維化を誘発したモデルマウスにおいて、血清中AST、ALT及びLactate Dehydrogenase(LDH)を測定したところ、細胞非投与群において高値を示した。さらにMasson trichrome染色により肝組織中に四塩化炭素により誘発された線維化が確認できた。一方で、hAD-MSCs投与群では血清中のAST、ALT及びLDHが細胞非投与群に比べて低値を示し、さらに線維化部分の面積を比較したところ細胞投与群において線維化面積の低下が認められた。

蛍光標識hAD-MSCsによる体内動態解析

四塩化炭素誘発マウス肝線維化モデルにDiR-MSCs投与したところ、投与二時間後ではほとんどの細胞が肺に集積していることが示唆された。投与1日後から2日後にかけて肺から肝臓への蛍光シグナルの移行が認められ、以後継続的に肝臓における蛍光シグナルは減弱していた。

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。

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. 研究発表

特になし。

1. 論文発表

JSM Regenerative Medicine, in press

2. 学会発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。