

201406018A

厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業

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

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 落谷 孝広

平成 27 (2015) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

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----- 1

落谷 孝広

II. 分担研究報告

1. 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----- 6

石井 強

2. 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----- 10

石川 俊平

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 13

IV. 研究成果の刊行物----- 14

I. 総括研究報告

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

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、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞（hAD-MSC）の肝線維化に対する有効性評価の検討、及び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。平成26年度の成果は以下の通りである。1）分泌型 miRNA による細胞品質管理法の検討に関しては、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96種類同定、qPCRにより再現性が得られた3種類の miRNA を品質管理用ターゲット miRNA として特許出願を行った。2）hAD-MSC の肝線維化に対する有効性評価に関しては、四塩化炭素誘発肝線維化モデル及び CDAA 誘発 NASH モデル（Severe NASH）において、hAD-MSC が肝線維化を抑制する結果が得られ、その有効性が示唆された。3）hAD-MSC の体内動態解析手法の検討に関しては、蛍光標識された hAD-MSC を投与し、細胞の継時的体内動態解析を In Vivo Imaging System (IVIS) により解析を行った。

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 (落谷、石井ら)

①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。

②hAD-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。

③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。

(石川ら)

①hAD-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)の培養上清を鋳型とし、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。

②マウス肝臓中のヒト由来細胞の定量法の構築

正常または肝障害マウスにヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞(hAD-MSC)を静脈内投与し、その6時間、1及び2日後において摘出した肝臓及び肺から抽出したDNA 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。

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き実験を行う。

C. 研究結果

(落谷、石井ら)

1. hAD-MSC の均質性評価系の構築の基盤研究:

Microarray による発現解析より、P4、P6 及び P11 の細胞から分泌される miRNA について、有意に発現量が変化する miRNA を 94 種類同定した。

同定した miRNA のうち 6 種類について qRT-PCR を実施した。その結果、3 種類の miRNA を細胞の老化とともに発現量が低下する miRNA として同定した (has-miR-Xa, has-miR-Xb, has-miR-Y)。

なお、同定した miRNA に関しては、2015 年 1 月 30 日に特許出願済み。

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:

①四塩化炭素誘発肝線維化モデル

四塩化炭素誘発肝線維化モデル(マウス)への hAD-MSC (1×10^6 cells/body) の細胞投与により、線維化面積の縮小及び肝臓中ヒドロキシプロリン量の減少が認められた。

②NASH モデル

CDAА を 9 週間摂取させた Severe NASH 群において、hAD-MSC 投与により肝臓中ヒドロキシプロリン量の有意な低下が認められ、hAD-MSC による線維化抑制効果が示唆された。一方で、Mild NASH に関しては hAD-MSC による線維化抑制効果は認められなかった。

③蛍光標識 hAD-MSCs による IVIS を用いた体内動態解析

四塩化炭素誘発肝線維化モデルマウスに DiR 標識 hAD-MSC を投与した結果、投与 30 分後から肺、6 時間後から肺だけでなく肝臓における蛍光シグナルの分布が確

認められ、14日後まで検出することができた。

3. デジタル PCR による生着細胞の絶対定量

四塩化炭素誘発肝障害モデルに hAD-MSC を投与し、投与 6 時間後、1 日後、2 日後、7 日後における肺及び肝臓からゲノム DNA を抽出し、分担研究者である東京医科歯科大学（石川教授）へ送付、デジタル PCR 解析を実施頂いた。

4. RNA シーケンシングによる生着細胞の分化状態解析

①四塩化炭素誘発肝線維化モデル

四塩化炭素誘発肝線維化モデル（マウス）に hAD-MSC を 1×10^6 cells/body の用量で尾静脈から投与した。細胞投与 4 週間後、マウス肝臓を摘出し Total RNA を調整した。

（石川ら）

1. ヒト AD-MSC 培養情勢中の miRNA 絶対定量法の構築

H25 年度の結果からヒト AD-MSC 培養上清から単位培養上清あたりの miRNA のコピー数の推定が可能であることが可能であることが明らかになったが培養上清を用いた直接 PCR により検出できるのか、また精製エクソソームを用いた結果と同様であるのかについて検討を行った。その結果、培養上清を用いた直接デジタル PCR による miRNA の検出は可能であるが精製エクソソームの結果とは感度の低下が認められた。

2. マウス肝臓内のヒト由来細胞の絶対定量法の構築

H25 年度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ことから、四塩化炭素誘発肝障害モデルにおけるヒト AD-MSC の継時的な体内動態解析をデジタル PCR による検討を行った。投与後 6 時間の肝臓に於いてマウス肝臓層細胞数の 0.1%、投与後 24 時間で 0.05% のヒト由来細胞が検出された。また、投与後 6 時間の肺においてマウス肺総細胞数の約 2%、投与後 24 時間では約 0.75% のヒト由来細胞が検出された。以上のことからデジタル PCR を用いることで生着細胞の絶対定量が可能であることが確認できた。

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 の四塩化炭素誘発肝線維化モデル及び CDAA 誘発 NASH モデル (Severe NASH) を用いて hAD-MSC の線維化に与える影響を検討した結果、両モデル共に hAD-MSC 投与による肝臓中ハイドロキシプロリン量の低下が認められ、hAD-MSC による肝線維化に対する有効性が示唆された。一方、病理組織学的な線維化領域の評価では、四塩化炭素誘発モデルに比べると NASH モデルでは明確な効果は認められなかった。原因としては NASH モデルでは、四塩化炭素誘発モデル程強い線維化像（病理組織）が認められておらず、線維化のレベルが低かったことが考えられる。

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 IVIS を用いて検討を行ったところ、投与 30 分後から肺、6 時間後から肺だけでなく肝臓における蛍光シグナルが検出できたが、肺及び肝臓のみでしか検出できておらず、ルシフェラーゼ等感度の高い標識方法を検討する必要があると思われた。今後は、ルシフェラーゼ標識した hAD-MSC (既に着手済み) を用いた IVIS 解析を行い、デジタル PCR との比較検討を行う予定である。

①hAD-MSC 培養上清中の miRNA 絶対定量法の構築

hAD-MSC 培養上清を用いた、単位培養

上清中の miRNA はデジタル PCR により検出可能であることが分かった。しかしながら、培養上清より精製した miRNA を用いた際と同程度の検出感度を得るためには測定施行数を著しく増やす必要がある。以上の事から今後の hAD-MSC の品質管理という観点より培養上清中のエクソソームを精製し、定量を行うことが定量の正確性及びコスト面で妥当であると思われた。

②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肝臓及び肺に含まれるヒト細胞数の絶対定量が可能であることが示された。さらに、デジタル PCR の継時的測定から疾患責任部位である肝臓に於いてヒト AD-MSC は、投与後 48 時間で消失していることが明らかとなった。今後、デジタル PCR による定量法と既存の In vivo Imaging (IVIS) 法やヒト特異的 Alu PCR による検出系などの既存の他の検出系と比較検討していくことでより高感度な定量法の確立が期待される。

E. 結論

分泌型 miRNA による細胞品質管理法の検討に関しては、継代ストレス負荷により発現量が著しく変化する 3 種類の miRNA を同定し特許出願まで完了できた。今後は特許出願した 3 種類の miRNA をターゲットとし、実生産工程における検証試験を実施する予定である。

hAD-MSC の肝線維化に対する有効性については、異なる肝線維化モデルを用いて検討を行ったところ、肝臓中ヒドロキシプロリン量の低下が認められ、hAD-MSC の肝線維化に対する有効性を示唆する結果が得られた。今後はこれら肝線維化モデルによる hAD-MSC の体内動態をデジタル PCR 解析にて行い、IVIS 解析のみならずヒト特異的 Alu リピート配列を検出する Alu-PCR 解析においても実施し、検出感度や定量性などについて比較検討を行う予定である。

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培養上

清を直接用いた際と精製エクソソームを用いた際の比較を行った結果、定量の感度及びコストの両面において精製エクソソームを用いた定量法が適していることが明らかとなった。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精製エクソソームを用いた方法で進める予定である。

マウス組織中におけるヒト由来細胞の絶対定量評価系については四塩化炭素誘発肝障害モデルマウスにおいてヒト AD-MSC を尾静注した後、これまで IVIS により著名な集積がみられていた肺及び疾患責任部位である肝臓におけるヒト AD-MSC の継時的にサンプリング後、デジタル PCR を用いて定量を行うことでその動態を検出することができた。今後、IVIS による解析及び既存のヒト特異的 Alu PCR による検出系との比較検討を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. The in vivo evaluation of the therapeutic potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for acute liver disease.

Katsuda T, Kurata H, Tamai R, Banas A, [Ishii T](#), [Ishikawa S](#), [Ochiya T](#).

Methods Mol Biol. 2014;1213:57-67. doi: 10.1007/978-1-4939-1453-1_6.

2. Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine Treatment for Liver Cirrhosis – Focused on Efficacy and Safety in Preclinical and Clinical Studies

Kurata H, Tamai R, Katsuda T, [Ishikawa S](#), [Ishii T](#) and [Ochiya T](#).

JSM Regen Med. 2014; 2(1): 1012.

2. 学会発表

第 14 回日本再生医療学会総会 2015 年 3 月 19 日(木)~21 日(土) P-03-043

玉井里枝、倉田隼人、勝田毅、砂河孝行、[石井強](#)、[石川俊平](#)、[落谷孝広](#)

分泌型 microRNA を用いた脂肪由来間葉系幹細胞の品質管理

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

特許出願1件

特願2015-017736

名称：細胞の品質を評価する方法、及び細胞の品質判定キット

出願人（ロート製薬、国立がん研究センター）

発明人（落谷孝広、玉井理恵）

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

II. 分担研究報告

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、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞（hAD-MSC）の肝線維化に対する有効性評価の検討、及び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。

分泌型 miRNA による細胞品質管理法の検討に関しては、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 96 種類同定、qPCR により再現性が得られた 3 種類の miRNA を品質管理用ターゲット miRNA として特許出願を行った。

hAD-MSC の肝線維化に対する有効性評価に関しては、四塩化炭素誘発肝線維化モデル及び CDAA 誘発 NASH モデル (Severe NASH) において、hAD-MSC が肝線維化を抑制する結果が得られ、その有効性が示唆された。

hAD-MSC の体内動態解析手法の検討に関しては、蛍光標識された hAD-MSC を投与し、細胞の継時的体内動態解析を In Vivo Imaging System (IVIS) により解析を行った。

A: 研究背景、目的

再生医療分野において、①細胞の均質性担保（Quality Control）、②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、種々の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。

B. 研究方法

1. hAD-MSC の均質性評価系の構築の基盤研究：

異なる 3 ドナー由来の hAD-MSC を培養フラスコで 4 継代培養した細胞 (P4 細胞)、

6 継代培養した細胞 (P6 細胞) 及び 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内の miRNA を Agilent 社 Human miRNA microarray を行い、P4 細胞、P6 細胞及び P11 細胞から分泌された miRNA の発現プロファイルを比較した。

さらに、マイクロアレイ解析により同定された 6 種類の miRNA について、qRT-PCR によりその遺伝子発現量について解析を行った。

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：

①四塩化炭素誘発肝線維化モデル

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。

②NASH モデル

KKAy/Ta Jcl マウスに 2 週間高脂肪食を

摂取させたのち、コリン欠乏アミノ酸置換食 (CDAA) を 6 週間摂取させることで作成した Mild NASH モデル、および CDAA を 9 週間連続摂取させることで作成した Severe NASH モデルに 1×10^5 cells/body の用量で、月 2 回の頻度で計 4 回 hAD-MSC を投与した。試験開始から 8 週後 (Mild NASH) 及び 9 週後 (Severe NASH) に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た。

③ 蛍光標識 hAD-MSC s による IVIS を用いた体内動態解析

hAD-MSC に DiIC18(7)(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 30 分後、1 時間後、1 日後、1 週間後、2 週間後における蛍光シグナルの経時変化を IVIS により解析した。

3. デジタル PCR による生着細胞の絶対定量:

① 四塩化炭素誘発肝障害モデル

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 6 時間、1 日後、2 日後、7 日後にそれぞれのマウス肺及び肝臓を採取し、ゲノム DNA を調整した。

調整したゲノム DNA は分担研究者である東京医科歯科大学 石川教授に送付し、デジタル PCR 解析に供した。

4. RNA シーケンシングによる生着細胞の分化状態解析

① 四塩化炭素誘発肝線維化モデル

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、マウス肝臓を摘出し Total RNA を調整した。

(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 LSI 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:

Microarray による発現解析より、P4、P6 及び P11 の細胞から分泌される miRNA について、有意に発現量が変化する miRNA を 94 種類同定した。同定した miRNA のうち 6 種類について qRT-PCR を実施した。その結果、3 種類の miRNA を細胞の老化とともに発現量が低下する miRNA として同定した (has-miR-Xa, has-miR-Xb, has-miR-Y)。なお、同定した miRNA に関しては、2015 年 1 月 30 日に特許出願済み。

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:

① 四塩化炭素誘発肝線維化モデル

四塩化炭素誘発肝線維化モデル (マウス) への hAD-MSC (1×10^6 cells/body) の細胞投与により、線維化面積の縮小及び肝臓中ハイドロキシプロリン量の減少が認められた。

② NASH モデル

CDAA を 9 週間摂取させた Severe NASH 群において、hAD-MSC 投与により肝臓中ハイドロキシプロリン量の有意な低下が認められ、hAD-MSC による線維化抑制効果が示唆された。一方で、Mild NASH に関しては hAD-MSC による線維化抑制効果は認められなかった。

③ 蛍光標識 hAD-MSC s による IVIS を用いた体内動態解析

四塩化炭素誘発肝線維化モデルマウス

に DiR 標識 hAD-MSC を投与した結果、投与 30 分後から肺、6 時間後から肺だけでなく肝臓における蛍光シグナルの分布が確認され、14 日後まで検出することができた。

3. デジタル PCR による生着細胞の絶対定量：

四塩化炭素誘発肝障害モデルに hAD-MSC を投与し、投与 6 時間後、1 日後、2 日後、7 日後における肺及び肝臓からゲノム DNA を抽出し、分担研究者である東京医科歯科大学（石川教授）へ送付、デジタル PCR 解析を実施頂いた。

4. RNA シーケンシングによる生着細胞の分化状態解析

①四塩化炭素誘発肝線維化モデル

四塩化炭素誘発肝線維化モデル（マウス）に hAD-MSC を 1×10^6 cells/body の用量で尾静脈から投与した。細胞投与 4 週後、マウス肝臓を摘出し Total RNA を調整した。

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 の四塩化炭素誘発肝線維化モデル及び CDAA 誘発 NASH モデル (Severe NASH) を用いて hAD-MSC の線維化に与える影響を検討した結果、両モデル共に hAD-MSC 投与による肝臓中ヒドロキシプロリン量の低下が認められ、hAD-MSC による肝線維化に対する有効性が示唆された。一方、病理組織学的な線維化領域の評価では、四塩化炭素誘発モデルに比べ

ると NASH モデルでは明確な効果は認められなかった。原因としては NASH モデルでは、四塩化炭素誘発モデル程強い線維化像（病理組織）が認められておらず、線維化のレベルが低かったことが考えられる。

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 IVIS を用いて検討を行ったところ、投与 30 分後から肺、6 時間後から肺だけでなく肝臓における蛍光シグナルが検出できたが、肺及び肝臓のみでしか検出できておらず、ルシフェラーゼ等感度の高い標識方法を検討する必要があると思われた。今後は、ルシフェラーゼ標識した hAD-MSC (既に着手済み) を用いた IVIS 解析を行い、デジタル PCR との比較検討を行う予定である。

E. 結論

分泌型 miRNA による細胞品質管理法の検討に関しては、継代ストレス負荷により発現量が著しく変化する 3 種類の miRNA を同定し特許出願まで完了できた。今後は特許出願した 3 種類の miRNA をターゲットとし、実生産工程における検証試験を実施する予定である。

hAD-MSC の肝線維化に対する有効性については、異なる肝線維化モデルを用いて検討を行ったところ、肝臓中ヒドロキシプロリン量の低下が認められ、hAD-MSC の肝線維化に対する有効性を示唆する結果が得られた。今後はこれら肝線維化モデルによる hAD-MSC の体内動態をデジタル PCR 解析にて行い、IVIS 解析のみならずヒト特異的 Alu リピート配列を検出する Alu-PCR 解析においても実施し、検出感度や定量性などについて比較検討を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. The in vivo evaluation of the therapeutic potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for acute liver disease.

Katsuda T, Kurata H, Tamai R, Banas A, Ishii T, Ishikawa S, Ochiya T.

Methods Mol Biol. 2014;1213:57-67. doi:
10.1007/978-1-4939-1453-1_6.

2. Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem
Cells in Regenerative Medicine Treatment for
Liver Cirrhosis – Focused on Efficacy and
Safety in Preclinical and Clinical Studies
Kurata H, Tamai R, Katsuda T, Ishikawa S,
Ishii T and Ochiya T.
JSM Regen Med. 2014; 2(1): 1012.

2. 学会発表

第 14 回日本再生医療学会総会 P-03-043
分泌型 microRNA を用いた脂肪由来間葉系
幹細胞の品質管理
玉井里枝、倉田隼人、勝田毅、砂河孝行、
石井強、石川俊平、落谷孝広

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2015-017736

名称：細胞の品質を評価する方法、及び細胞
の品質判定キット

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

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の検討を行った。H26 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うことを目的に培養上清を直接用いたデジタル PCR 法について検討を行った。その結果、培養上清を直接用いても miRNA の検出は可能であるが、精製エクソソームを用いた手法に比して感度が落ちることが明らかとなった。さらに、四塩化炭素誘発肝障害モデルへのヒト AD-MSC 投与後、継時的(6 時間、1 及び 2 日後)に肝臓及び肺におけるヒト AD-SC の生着細胞数の定量を行うことで組織における生着細胞の動態を明らかにした。

A. 研究背景、目的

（背景）

再生医療分野において、①細胞の均質性担保（Quality Control）、②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26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

①hAD-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) の培養上清を鋳型とし、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。

②マウス肝臓中のヒト由来細胞の定量法の構築

正常または肝障害マウスにヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (hAD-MSC) を静脈内投与し、その 6 時間、1 及び 2 日後において摘出した肝臓及び肺から抽出した DNA 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

①ヒト AD-MSC 培養情勢中の miRNA 絶対定量法の構築

H25 年度の結果からヒト AD-MSC 培養上清から単位培養上清あたりの miRNA のコピー数の推定が可能であることが可能であることが明らかになったが培養上清を用いた直接 PCR により検出できるのか、また精製エクソソームを用いた結果と同様であるのかについて検討を行った。その結果、培養上清を用いた直接デジタル PCR による miRNA の検出は可能であるが精製エクソソームの結果とは感度の低下が認められた。

②マウス肝臓内のヒト由来細胞の絶対定量法の構築

H25 年度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ことから、四塩化炭素誘発肝障害モデルにおけるヒト AD-MSC の継時的な体内動態解析をデジタル PCR による検討を行った。投与後 6 時間の肝臓に於いてマウス肝臓層細胞数の 0.1%、投与後 24 時間で 0.05% のヒト由来細胞が検出された。また、投与後 6 時間の肺においてマウス肺総細胞数の約 2%、投与後 24 時間では約 0.75% のヒト由来細胞が検出された。以上のことからデジタル PCR を用いることで生着細胞の絶対定量が可能であることが確認できた。

D. 考察

①hAD-MSC 培養上清中の miRNA 絶対定量法の構築

hAD-MSC 培養上清を用いた、単位培養上清中の miRNA はデジタル PCR により検出可能であることが分かった。しかしながら、培養上清より精製した miRNA を用いた際と同程度の検出感度を得るためには測定施行数を著しく増やす必要がある。以上の事から今後の hAD-MSC の品質管理という観点より培養上清中のエクソソームを精製し、定量を行うことが定量の正確性及びコスト面で妥当であると思われた。

②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肝臓及び肺に含まれるヒト細胞数の絶対定量が可能であることが示された。さらに、デジタル PCR の継時的測定から疾患責任部位である肝臓に於いてヒト AD-MSC は、投与後 48 時間で消失していることが明らかとなった。今後、デジタル PCR による定量法と既存の In vivo Imaging (IVIS) 法やヒト特異的 Alu PCR による検出系などの既存の他の検出系と比較検討していくことでより高感度な定量法の確立が期待される。

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培養上清を直接用いた際と精製エクソソームを用いた際の比較を行った結果、定量の感度及びコストの両面において精製エクソソームを用いた定量法が適していることが明らかとなった。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精製エクソソームを用いた方法で進める予定である。

マウス組織中におけるヒト由来細胞の絶対定量評価系については四塩化炭素誘発肝障害モデルマウスにおいてヒト AD-MSC を尾静注した後、これまで IVIS により著大な集積がみられていた肺及び疾患責任部位である肝臓におけるヒト AD-MSC の継時的にサンプリング後、デジタル PCR を用いて定量を行うことでその動態を検出することができた。今後、IVIS による解析及び既存のヒト特異的 Alu PCR による検出系との比較検討を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Katsuda T, Kurata H, Tamai R, Banas A, Ishii T, Ishikawa S, Ochiya T.

The in vivo evaluation of the therapeutic potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for acute liver disease.

Methods Mol Biol. 2014;1213:57-67. doi:
10.1007/978-1-4939-1453-1_6. PMID:
25173374

2. 学会発表

第 14 回日本再生医療学会総会 2015 年 3
月 19 日(木)~21 日(土) P-03-043

玉井里枝、倉田隼人、勝田毅、砂河孝行、
石井強、石川俊平、落谷孝広

分泌型 microRNA を用いた脂肪由来間葉系
幹細胞の品質管理

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。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Katsuda T, Kurata H, Tamai R, Banas A, Ishii T, Ishikawa S, Ochiya T.	The in vivo evaluation of the therapeutic potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for acute liver disease.	Methods Mol Biol.	1213	57-67	2014
Kurata H, Tamai R, Katsuda T, Ishikawa S, Ishii T and Ochiya T.	Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine Treatment for Liver Cirrhosis – Focused on Efficacy and Safety in Preclinical and Clinical Studies	JSM Regen Med	2(1)	1012	2014

IV. 研究成果の刊行物

Chapter 6

The In Vivo Evaluation of the Therapeutic Potential of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Acute Liver Disease

Takeshi Katsuda, Hayato Kurata, Rie Tamai, Agnieszka Banas, Tsuyoshi Ishii, Shumpei Ishikawa, and Takahiro Ochiya

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) have emerged as an attractive candidate for cell therapy applications. In the prior decade, many animal studies have demonstrated that MSCs are therapeutically beneficial for the treatment of liver disease. The carbon tetrachloride (CCl₄)-induced acute hepatitis model has been the most widely used model in these studies. Our group has utilized the CCl₄-induced mouse hepatitis model to study the therapeutic potential of human adipose tissue-derived MSCs (hADSCs). We have demonstrated that systemically administered hADSCs engrafted into the damaged liver and promoted tissue repair. This phenomenon likely reflected the paracrine effects of the administered hADSCs. In this chapter, we describe a method to evaluate the therapeutic efficacy of the systemic administration of hADSCs in the CCl₄-induced mouse model of acute hepatitis.

Key words Acute hepatitis, Carbon tetrachloride (CCl₄), Mesenchymal stem cell (MSC), Adipose-tissue derived MSC (ADSC), Intravenous transplantation

1 Introduction

Mesenchymal stem cell (MSC) transplantation has attracted a great deal of attention as a novel therapeutic option for liver diseases. At present, the only treatment for serious liver diseases is liver transplantation, and the application of this treatment has been limited by the shortage of donors. To compensate for this donor shortage, researchers have intensively studied hepatocyte transplantation as a potential treatment approach. However, the hepatocyte transplantation procedure is hampered by the low liver engraftment rate of transplanted hepatocytes and the low availability of transplantable hepatocytes [1]. Moreover, recent studies have not only examined approaches in which MSCs are used to repopulate a damaged liver, but also demonstrated that MSCs act via paracrine