

201409002B

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

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

平成24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 出沢 真理

平成27（2015）年 3月

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

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

平成24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 出沢 真理

平成27（2015）年 3月

## 目 次

I. 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 出沢 真理	----- 1
II. 分担研究報告書	
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・有効性の検証に関する研究 浅田 隆太 清水 忍	----- 14
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 18
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 21

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）  
総合研究報告書

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、組織に応じて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

名古屋医療センター・臨床研究センター  
臨床研究事業部・研究開発推進室・室長

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（H24、25年に担当）

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

肝細胞、骨細胞などに 90%以上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。

**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。2010 年にその説明となる Muse 細胞が発見された(Kuroda et al., PNAS, 2010)。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。さらには誘導せずに、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、

評価を行うターゲット臓器として肝疾患モデルを中心的なモデルとして選択する。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。さらに Muse 細胞の有効性の汎用性を検証するために、脳梗塞モデルと腎不全モデルも採用する。

本プロジェクトでは、①有効性検証の指標設定、②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、投与速度の最適化)、③細胞調製の最適化、④Muse 細胞製剤の規格の設定、⑤非臨床安全性評価を実施する。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】

ヌードマウスを用いて速度投与の最適化まず検討する。2 万のヒト骨髄間葉系幹細胞やヒト線維芽細胞を尾静脈から投与するが、その際に速度を 3 種類設定して投与する。全身状態と同時に各臓器を採取して塞栓の有無などを検討する。(吉田、出沢)

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 CCl<sub>4</sub> を 1.5 mg/kg の量で単回投与して作成する。

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、投与する。コントロールとして PBS を同量、投与する群を設定した。

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、組織学的検討を 30 日目に実施する。

移植細胞の生着率、分布、分化、を免疫組織化学によって検証する。ヒト Muse、非 Muse 細胞の検出はヒトミトコンドリア抗体、ヒト golgi 体抗体を用いて検出する。肝細胞への分化はこれら 2 種の抗体染色に加え、ヒトアルブミン、ヒト anti-trypsin、ヒト特異的な HepPar-1 抗体との二重染色を行い、ヒト Muse、非 Muse 細胞の生着と分化を調べる。(吉田、出沢)

また細胞の体内分布を見るために、細胞投与後 2 週において各臓器を採取し、DNA を抽出し、ヒトゲノムに特異的な Alu sequence の含有量を定量 PCR(Q-PCR)によって計測した。

### 【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】

SCID マウスに四塩化炭素 0.5 mg/kg を 3~4 日ごとに 8 週まで腹腔内投与し、慢性モデルを作成する。(出沢)

ヒト骨髄間葉系幹細胞由来の Muse 細胞と非 Muse 細胞を SSEA-3 を指標に分取し尾静脈から投与する群と、さらに同量のリン酸バッファー(PBS)の投与群の 3 群を作成する。また移植細胞数を 2 万と 5 万に絞り、単発の投与と複数回の投与における有効性の比較検討を行う。(出沢、吉田)

8 週をエンドポイントとし、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 8 週で行う。(吉田、出沢)

8 週目において移植細胞の生着率、分布、分化を免疫組織化学によって検証する。ヒト Muse、非 Muse 細胞の検出はヒトミトコンドリア抗体、ヒト golgi 体抗体を用いて検出する。肝細胞への分化はこれら 2 種の抗体染色に加え、ヒトアルブミン、ヒト anti-trypsin、ヒト特異的な HepPar-1 抗体との二重染色を行い、ヒト Muse、非 Muse 細胞の生着と分化を調べる。(吉田、出沢)

機能的分化能として、アルブミン、解毒作用にかかわる CYP1A2、糖代謝酵素である Glu-6-Pase のヒトサブタイプの発現が SCID マウス肝臓で検出されるかを RT-PCR を用いて行う。また組織学的によるヒトミトコンドリア、ヒト Golgi 体抗体でのヒト細胞生着をさらに裏付けるために、RT-PCR でヒトアルブミンのシグナル検出も併せて行う。プローブと条件は下記の通りである。human  $\beta$ -actin (annealing temperature (Tm) 55 °C, 40 cycles (C)) sense: 5' - AGGCGGACTATGACTTAGTTGCGTTACACC-3' and antisense: 5' -AAGTCCTCGGCCACATTGTGAACTTTG-3' ; mouse  $\beta$ -actin (Tm 55 °C, 32C) sense: 5' -ACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATGAC-3' and antisense: 5' -CCGCTCGTTGCCAATAGTGATGACCT-3' ; human albumin (Tm 54 °C, 36C) sense:

5' -CACAAGCCCAAGGCAACAAAA-3' and antisense: 5' -AGTGTGTACTACTCTATTAG-3' ; human cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide2 (CYP1A2) (Tm 58°C, 36C) sense: 5' -GGCACTTCGACCCTTACAAT-3' and antisense: 5' -TTCAACCAGAGGTTCTGTG-3' ; human glucose-6-phosphatase (Glc-6-Pase) (Tm 58°C, 36C) sense: 5' -GAAAGATAAAGCCGACCTACA-3' and antisense: 5' -GCAGCAGATAAAATCCGATG-3' 。  
(出沢)

宿主 SCID マウスの肝細胞との fusion の有無を FISH 法を用いて検証する (浅田、清水、出沢)。

#### 【肝障害モデル以外の動物モデルにおける薬効薬理試験】

肝障害モデルでは機能評価が極めて困難であるので、Muse 細胞の薬効薬理試験 (効果試験) は脳梗塞、腎不全モデルで検討する。投与する細胞はヒト骨髄由来 Muse 細胞、対照群として非 Muse 細胞を用いる。

脳梗塞はラットの中大脳動脈を 45 分虚血再還流し、2 日後 Neurological severity score (NSS) で 7 点以上の症状を有するものをモデルとして採択する。細胞は梗塞を起こした皮質の下記 3 カ所にそれぞれ 1 万ずつ、合計 3 万細胞を投与する。(1) [from bregma: anterior (A) +2.0 mm, right (R) +2.0 mm, ventral (V) +4.0 mm], (2) [from bregma: A -1.0 mm, R +3.0 mm, V +4.5 mm], (3) [from bregma: A -4.0 mm, R +3.0 mm, V +4.5 mm]。コントロールとして PBS 投与群を作成する。移植後、84 日をエンドポイントとし、一日おきに免疫抑制剤 FK506 を 0.5 mg/kg 投与した。評価は NSS、rotarod などの機能評価と共に脳内での細胞生着、神経分化を組織科学的に評価する。(浅田、清水、出沢)。

腎不全モデルは doxorubicin hydrochloride (DOX) (5.3 mg/kg body) を SCID マウス尾静脈に投与し作成する。7 日後、Muse、非 Muse 細胞を 2 万細胞尾静脈から投与する。コントロールとして PBS 投与群を作成する。移植後、7 週で血中クレアチニン、クレアチニンクリアランス、BUN、total protein を計測する。また移植細胞の腎臓

内への生着、分化を組織科学的に検証する。(浅田、清水、出沢)。

#### 【細胞調製の最適化, Muse 細胞製剤の規格の設定】

Muse 細胞は SSEA-3 という ES 細胞などの多能性細胞表面マーカーとして知られている抗体を使って分離することができる (Kuroda et al., PNAS, 2010)。しかし実際に SSEA-3 抗体を臨床研究用 Muse 細胞製剤に使用すると抗体のトレーサビリティーの問題があり、新たに SSEA-3 抗体を作成しなくてはならないなどの問題が生じることが吉田の調査によって分かった。

そこで本年度は別のアプローチを試みる。Muse 細胞はそもそもストレス耐性細胞として同定された (Kuroda et al., PNAS, 2010)。そこで複数のストレスを組み合わせ、Muse 細胞率を上昇させる条件を検討し、さらには組織修復における機能性を解析する (吉田、浅田、清水、出沢)。

#### 【核型分析試験】

平成 24 年度に実施した核型分析試験は、一般財団法人食品薬品安全センターに委託する。

核型分析試験は、WHO Expert Committee on Biological Standardization の方法及び American Type Culture Collection American Type Culture Collection (ATCC) の培養細胞品質検査方法を参考に、「厚生省令第 21 号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」(平成 9 年 3 月 26 日、一部改正 厚生労働省令第 114 号 平成 20 年 6 月 13 日) (GLP 省令) を遵守して実施する。

#### 【単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験】

SCID マウスの肝障害モデルマウス及び正常マウスを用いた Muse 細胞の体内分布評価の結果を踏まえ、正常ラットにおけるヒト Muse 細胞の単回静脈内投与毒性試験のデザインについて、投与細胞数、動物種、観察期間、観察項目等を検討する。単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験を株式会社イナリサーチに委託する。

雄性ラットを 2 週観察群、4 週観察群、8 週観察群に分けて、ヒト Muse 細胞  $1 \times 10^7$  個/kg を単回静脈内投与する。単回静脈内投与毒性試験の

毒性評価項目については、「単回投与及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について」

(平成5年8月10日 薬新薬第88号) (ICH S4ガイドライン) 及び「反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について」(平成11年4月5日 医薬審第655号) (ICH S4Aガイドライン) を一部参考に実施する。

#### 【薬事戦略相談】

H25年10月にPMDAで薬事戦略相談を行った(浅田、清水、出沢、吉田)。H26年には治験デザイン、Muse細胞製剤の品質等について対面助言面談を目指す。

#### (倫理面への配慮)

東北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、今後も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。実験におけるヒト細胞使用に関しては「東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会」より「臍帯に内在する幹細胞の探索と特性解析研究(2013-1-370号)」で承認をすでに受けている。

### C. 研究結果

#### 【急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】

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、5分、20分をかけて尾静脈から投与しても、いずれも morbidity と mortality はみられなかった。また肺や腎臓、脳などの組織を採取して検討したが、

塞栓の形成、塞栓による壊死などは見られなかった。一方、100万細胞を3~5分かけて投与したところ、肺塞栓を起こし、呼吸が停止してほとんどの動物が死亡した。したがって2万細胞/30秒投与の速度投与を以下の実験で採用することとした。

SCIDマウスでの急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。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。総ビリルビンの上昇、GOT、GPT、総蛋白、アルブミンの一過性の増悪し、14日前後には PBS を投与した vehicle 群を含めて正常に戻ってしまい統計的な有意差は見られなかった。従って機能的な評価系としては急性肝障害モデルは適切ではないことが分かった。

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。生着効率は H-Golgi (+) 細胞として検出した結果 Muse 群では  $1 \text{ mm}^2$  liver section 当たりの総細胞数の  $1.89 \pm 0.65\%$  が Muse 細胞であり、非 Muse 群の  $0.04 \pm 0.08\%$  の ~48 倍の生着効率に相当し、両者の間に統計的な有意差があった ( $p < 0.001$ )。非 Muse 細胞は30日後の肝臓ではほとんど認められなかった。

ヒト特異的な配列 Alu sequence を細胞移植後2週で各臓器において評価した。その結果、Muse 群では肝臓に圧倒的多数の Alu シグナルが検出され、それよりも弱いシグナルが肺に見られたが、他の臓器では検出されなかった。一方、非 Muse 群では肝臓ではほとんどシグナルが検出されず、肺でのみ高い値が確認された。一方、興味深いことに、健常な SCID マウスの尾静脈から同数の Muse 細胞を入れても、2週間後において肺でわずかにシグナルが検出されるものの、他の健常組織では検出されなかったことから、Muse 細胞は傷害部位に特異的に生着・残存すると考えられ、健常組織には残らないことが示唆された。

組織学的な解析結果と合わせると間葉系幹細胞の 99%を構成する非 Muse 細胞は投与しても傷害肝臓には残存せず、2 週目にはすでにほとんど消えてしまっていること、30 日目においても同様であること、一方 Muse 細胞は有意に肝臓に集積し、肺を含めたそのほかの臓器よりも遙かに有効に生着すること、また自発的に肝細胞に分化することなどが示された。

#### 【慢性肝障害モデルを用いたヒト Muse 細胞の有効性評価】

慢性モデル（肝線維化モデル）：慢性肝障害モデルでは四塩化炭素 0.5ml/kgを週に 2 回腹腔内投与を 8 週間続けると、線維化を起し肝細胞の減少を見る。この段階で 2 万、5 万の Muse 細胞を投与しても有効な機能改善、すなわち血中総ビリルビンの低下と血清アルブミン上昇は確認されず、また細胞の有効な肝臓への生着もみられなかった。従って破壊が進み、「場の論理」が荒廃し固まってしまった慢性期にそのまま血中に Muse 細胞を投与しても、有効性は期待できないことが示唆された。

一方、四塩化炭素投与開始から 2 週、4 週、6 週の 3 ポイントで 5 万の Muse 細胞を投与することで、血中総ビリルビンの低下と血清アルブミン上昇が有意に確認された。そこで以下の結果は 2 週、4 週、6 週の 3 ポイントで 5 万の Muse 細胞を投与する実験系で行うこととした。

Muse 細胞の生着率：ヒト Golgi 体抗体を用いて細胞を検出したところ、1 mm<sup>2</sup> 肝臓組織中の全細胞における比率が Muse 群では 5.78±2.39%であり、非 Muse 群は 0.27±0.12%であった。両者の間に統計的有意差があり(p<0.001)、Muse 群は非 Muse 群よりも ~21 倍高い生着効率が認められた。また非 Muse 群はそもそも 8 週において細胞がほとんど肝臓内に残っていないことも改めて確認された。Muse 群における生着した Muse 細胞は Heppar1、human albumin 陽性の肝細胞マーカー陽性細胞として肝臓内に生着していた他、Cytokeratin-7 陽性の胆管系細胞としても生着していることが確認された。

血中総ビリルビンは Muse 群 (0.26±0.05 mg/dl)、PBS 投与の vehicle 群 (0.74±0.05

mg/dl, p<0.001)、非 Muse 群 (0.48±0.12 mg/dl, p<0.001)であり、統計的有意差をもって Muse 群が vehicle、非 Muse 群よりも改善していた。血中アルブミンも同様の傾向を示し Muse 群 (2.99±0.11 g/dl)、vehicle 群 (2.65±0.08 g/dl, p<0.001)、非 Muse 群 (2.81±0.06 g/dl, p<0.01)であった。

Sirius red などのコラーゲンを染色する方法で線維化を調べたところ、Muse 群では統計的有意差をもって顕著に線維化が減少することが確認された。Muse 群における線維化面積は 0.75±0.15% (total area per section) であり、vehicle 群 (2.91±0.35%) や非 Muse 群 (1.86±0.13%)よりも遙かに低い値を示し統計的有意差(p<0.001)が確認された。Muse 群は vehicle 群に比べ 75%もの線維化抑制をもたらしていたといえる。

組織学的解析によって肝臓に生着した Muse 細胞は肝細胞に分化していることが示唆された。ヒトミトコンドリア、ヒト Golgi 体によって検出された Muse 細胞のうち、HepPar-1 は 71.1±15.2%、human albumin は 54.3±8.2%、human anti-trypsin は 47.9±4.6% が陽性を示した。

FISH 解析によって生着した Muse 細胞のうち、ホストのマウス肝細胞と fusion していることが示唆されたのは 2.6%であった。このことから 97~98%の生着した Muse 細胞は fusion することなしに肝細胞に分化していることが示唆された。

RT-PCR において Muse 群の肝臓ではヒトアルブミン、ヒト CYP1A2、ヒト Glu-6-Pase がヒト beta-actin と同様に検出された。一方非 Muse 群ではこれら 4 つのシグナルはいずれも検出されなかった。このことから RT-PCR レベルにおいてもヒトのシグナルが非 Muse 群で検出されないことから、細胞は 8 週の段階でほとんど肝臓内に残っていないことが裏付けられる。

#### 【肝障害モデル以外の動物モデルにおける薬効薬理試験】

脳梗塞モデル：Muse 細胞投与後、70 日を過ぎてから NSS、rotarod において vehicle、非 Muse 群との統計的有意差を持った顕著な機能回復が確

認された。組織学的検討においては、Muse 細胞は広く梗塞を受けた部位の周辺領域、peri-infarct area に生着が確認されたが、非 Muse 細胞はほとんど確認されなかった。マーカーの発現を検討したところ、神経の一般的なマーカーである MAP-2 が  $64.6 \pm 0.6\%$ 、NeuN が  $32.4 \pm 2.4\%$ 、また介在ニューロンマーカー calbindin が  $27.5 \pm 2.5\%$ 、さらにグリア細胞である oligodendrocyte マーカー GST- $\pi$  が  $25.0 \pm 0.8\%$  であった。一方アストロサイトマーカー GFAP は確認されなかった。このことから 84 日までホスト脳内に残った Muse 細胞は多くが神経細胞に分化することが示唆された。

腎不全モデル：7 週において Muse 群におけるクレアチンクリアランスの改善が確認された。Muse 群では  $76.9 \pm 8.7 \mu\text{l}/\text{min}$  で vehicle 群では  $50.4 \pm 6.1 \mu\text{l}/\text{min}$  で両者の間には  $p < 0.05$  の統計的有意差があり、Muse 群では 45%の改善率となった。一方非 Muse 群では vehicle との有意差がなかったことから改善が顕著でないと言える。一方血漿クレアチニン、BUN、総蛋白では 3 群間に有意差は無かった。腎臓内に生着した Muse 細胞は足細胞マーカー WT-1、podocin、Mesangial 細胞マーカー megsin、毛細血管マーカー CD31 を発現していた。

#### 【細胞調製の最適化、Muse 細胞製剤の規格の設定】

Muse 細胞の臨床応用に適応可能な調整方法を検討した。その結果骨髄、脂肪、皮膚線維芽細胞をトリプシン液中にて shaker で振盪することによって数十%以上の Muse 細胞精製率を得られることが分かった。この方法はすでに GMP 基準で製造されているトリプシンを利用することが可能であり、汎用性がある。

さらに既存の autoMACS を使うことによって 70~80%の精製率が得られる事が分かった。しかし GMP レベルで使用できる SSEA-3 が現存しないことも吉田の調査により判明した。

プログラムフリーザーを用いて凍結保存した Muse 製剤の生存細胞率、細胞の活性等を調べたところ、細胞を再び保存状態から立ち上げ直した時に有意に細胞の生存率が高まること、また

多能性や増殖力などの活性も保たれていることが確認された。従って製剤の調整にプログラムフリーザーを使用することは意味があると考えられる。

#### 【核型分析試験】

核型分析試験では、MSC のギムザ染色による 100 核板の染色体数分析の結果、最頻値は正常ヒト細胞と同じ 46 本（頻度 92%）であり、それ以外の核板は偽二倍体構成が 7 核板（45 本が 4 核板、47 本が 3 核板）と、染色体数 92 本の四倍体構成が 1 核板であった。また、観察した 100 核板のうちに構造異常が観察されたものは無かった。染色体分染による 10 核板の核型分析の結果、10 核板ともにバンドパターンが正常なヒト女性染色体と一致し、欠失、転座、重複など、染色体レベルで確認できる異常は存在しなかった。

Muse 細胞のギムザ染色による 100 核板の染色体数分析の結果、最頻値は正常ヒト細胞と同じ 46 本（頻度 86%）であり、それ以外の核板は偽二倍体構成が 13 核板（45 本が 7 核板、47 本が 5 核板および 48 本が 1 核板）と、染色体数 92 本の四倍体構成が 1 核板であった。また、観察した 100 核板のうちに構造異常が観察されたものは無かった。染色体分染による 10 核板の核型分析の結果、10 核板ともにバンドパターンが正常なヒト女性染色体と一致し、欠失、転座、重複など、染色体レベルで確認できる異常は存在しなかった。

#### 【単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験】

Muse 細胞の単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験の結果は、以下の通りであった。

いずれの動物においても、死亡は認められず、一般状態の変化、体重、摂餌量、摂水量、眼科的検査、血液学的検査、生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査のいずれの所見にも、ヒト Muse 細胞投与に関連した変化は認められなかった。

体内分布に関しては、投与後 4 週の検査では、1 例の大動脈で総 DNA 量あたりのヒト DNA 量が  $0.09237 \text{pg}/\text{ng}$  であったが、その他投与後 2 週、4

週、8週時の試料ではヒト DNA は検出されなかった。

#### 【PMDA の薬事戦略相談】

研究代表者の出沢は研究分担者（浅田、清水、吉田）と共に複数回の打合せを重ね、PMDA の薬事戦略相談（対面助言）の資料作成準備を行い、平成 25 年 10 月 24 日、平成 26 年 7 月 16 日及び平成 26 年 10 月 8 日に薬事戦略相談（事前面談）を実施した。これら 3 回の事前面談を踏まえ、平成 26 年 12 月 16 日に PMDA の薬事戦略相談（第戦確 P27 号）を実施し、Muse 細胞製剤の実用化に向けて、規格及び試験方法、製造方法、非臨床試験について、議論を行った。

#### D. 考察

Muse 細胞は骨髄、脂肪、臍帯、皮膚などのアクセスしやすい組織から SSEA-3 表面マーカーで分取可能で、またストレス耐性であることからストレスの組み合わせなどにより比率を高めることが可能である。最大の特徴は、ES, iPS 細胞では必須とされる移植前の分化誘導を必要とせず、上述のソースから分取し、そのまま血中に投与するだけで有効な再生治療効果をもたらすことができることである。これは Muse 細胞に備わる特異な性質、傷害部位への遊走と傷害組織から出されるシグナルに応じて自発的に組織にマッチする細胞への分化能力が備わっているためである。このためにコストと時間がかかり、ハードルが高いとされてきた再生医療を大きく変えることができると期待されている。

本年度の研究結果によって、急性肝障害モデルにおいて Muse 細胞が組織に残存し自発的に肝細胞に分化すること、血中に投与するだけで肝臓に集積し、肺を含めてそのほかの臓器には有効に残存しないこと、一方非 Muse 細胞は肝臓にほとんど集積もせず組織内にも残らないことが分かった。このような体内動態から、Muse 細胞の特異な性質がさらに裏付けられたといえる。

慢性肝障害モデルにおいて機能回復、線維化抑制などの効果が統計的有意差を持って示され、また Muse 細胞は一般の骨髄間葉系幹細胞とは異なり 8 週という長期にわたってホストの肝臓内に肝

細胞として生着・残存すること、さらにはマウスの肝臓内においてヒト肝細胞のもつ機能性を備えていることが示唆された。

肝臓はそもそも 2 核以上の多核の細胞が正常でも存在し、肝細胞同士の fusion が起こる組織である。今回、FISH で検証したところ、少なくとも 8 週において Muse 細胞はそのほとんどが fusion によって見せかけ上肝細胞になっているようにみえるのではなく、機能的な肝細胞に分化を遂げてホスト肝臓内に存在することが示唆された結果は大きい。

慢性肝障害モデルだけではなく、脳梗塞、腎不全モデルにおいても Muse 細胞の生着、機能回復が示めされたことは Muse 細胞の汎用性が示唆される。いずれのモデルにおいても共通していたことは、Muse 細胞は傷害組織に長期にわたり残存するが非 Muse 細胞はしない、ということ、また肝臓、脳、腎臓いずれも自発的にその組織に応じた細胞に分化することである。このような機構の解明は今後必要であると思われる。

Muse 製剤を作成することは本プロジェクトの目標の一つであるが、現在世界中で使われている Millipore 社、BioLegend 社等の SSEA-3 は出所が一つのハイブリドーマに由来すること、しかしながらそのトレーサビリティが追えないことから、実際に臨床試験用の Muse 製剤作成には使えないことが判明した。一方今回の実験で、培養条件を調整することで Muse 細胞の比率が一定程度以上に向上されることも分かった。ストレスであれば GMP 基準を満たした上で作成することも可能であるので実用面では利便性があると考えられる。

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 replace 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再生効果が担う。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ことから、細胞治療のパラダイムシフトがもたらされる可能性がある」と期待できる。

## E. 結論

急性・慢性肝障害、脳梗塞、腎不全モデルを用いて、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、神経細胞、腎糸球体細胞に自発的に分化すること統計的有意差を持った機能回復がもたらされることが示唆された。また Muse 細胞の調整中において核型における変異の懸念は非常に低いこと、単回静脈内投与毒性試験において死亡例は認められず、ヒト Muse 細胞投与に関連した異常は認められなかったこと、体内分布試験に関しては、投与後 4 週の検査では、1 例の大動脈で総 DNA 量あたりのヒト DNA 量が 0.09237pg/ng であったが、その他投与後 2 週、4 週、8 週時の試料ではヒト DNA は検出されなかったことなどから、安全性の懸念が低いことが分かった。これらの結果から、本プロジェクトは大きな前進を生んだといえる。

さらに、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も分かった。Muse 細胞は現在世界中で患者へ投与されている間葉系幹細胞の数パーセントに相当するが、この細胞を有効に活用することで、安全で再生効果の高い治療が低コスト、短時間で提供できる可能性が示唆された。今後、これらのデータや現状を踏まえ、さらに PMDA との面談をさらに進めていきたいと考えている。

## F. 危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Wakao S, Matsuse D, Dezawa M. Mesenchymal Stem Cells as a Source of Schwann Cells: Their Anticipated Use in Peripheral Nerve Regeneration. *Cells Tissues Organs*, 2015. [Epub ahead of print]
- Yamauchi T, Kuroda Y, Morita T, Shichinohe H, Houkin K, Dezawa M, Kuroda S. Therapeutic Effects of Human Multilineage-Differentiating Stress Enduring (MUSE) Cell Transplantation into Infarct Brain of Mice. *PLoS One*. 10(3): e0116009. 2015.
- Mannoji C, Koda M, Kamiya K, Dezawa M, Hashimoto M, Furuya T, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M. Transplantation of human bone marrow stromal cell-derived neuroregenerative cells promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 74(4):479-88, 2014.
- 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)*.
- Okano T, Dezawa M. A new age of regenerative medicine: fusion of tissue engineering and stem cell research. *Anat. Rec (Hoboken)*. 297(1):4-5, 2014.
- Albertine KH, Dezawa M. A new age of regenerative medicine: fusion of tissue engineering and stem cell research. *Anat. Rec (Hoboken)*. 297(1):1-3, 2014.
- Wakao S, Akashi H, Kushida Y, Dezawa M. Muse cells, newly found 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

- nontumorigenic 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.
  - Shigemoto T, Kuroda Y, Wakao S, Dezawa M. A novel approach to collect satellite cells from adult skeletal muscles based on their stress tolerance. *STEM CELLS Translational Medicine.* 2(7):488–98, 2013.
  - Tsuchiyama K, Wakao S, Kuroda Y, Ogura F, Nojima M, Sawaya N, Yamazaki K, Aiba S, Dezawa M. Functional melanocytes are readily reprogrammable from multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells, distinct stem cells in human fibroblasts. *J Invest. Dermatol.* 133(10):2425–35, 2013.
  - Hayashi T, Wakao S, Kitada M, Ose T, Watabe H, Kuroda Y, Mitsunaga K, Matsuse D, Shigemoto T, Ito A, Ikeda H, Fukuyama H, Onoe H, Tabata Y, Dezawa M. Autologous engraftment of A9 dopaminergic neurons induced from mesenchymal stem cells in parkinsonian rhesus macaques. *J. Clin. Invest.* 123(1):272–84, 2013.
  - Wakao S, Kitada M, Dezawa M. The elite and stochastic model for iPS cell generation: Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) cells are readily reprogrammable into iPS cells. *Cytometry A.* 83(1):18–26, 2013.
  - Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Ogura F, Murakami T, Niwa A, Dezawa M. Morphologic and gene expression criteria for identifying human induced pluripotent stem cells. *PLoS One.* 7(12):e48677, 2012.
  - Wakao S, Kuroda Y, Ogura F, Shigemoto T, Dezawa M. Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells: Contribution of Muse Cells, a Novel Pluripotent Stem Cell Type that Resides in Mesenchymal Cells. *Cells* 1(4): 1045–60, 2012.

- Kitada M, Dezawa M. Parkinson's disease and mesenchymal stem cells: potential for cell-based therapy, Parkinson's Disease. 2012:873706, 2012.
  - Kitada M, Wakao S, Dezawa M. Muse cells and induced pluripotent stem cell: implication of the elite model. Cell Mol Life Sci. 69(22):3739-50, 2012.
  - Wakao S, Kitada, Kuroda Y, Dezawa M. Isolation of adult human pluripotent stem cells from mesenchymal cell populations and their application to liver damages. Liver Stem Cells: Methods in Molecular Biology, Springer Protocols. vol. 826: 89-102, 2012.
  - 若尾昌平、出澤真理「体性幹細胞と Muse 細胞の位置づけ」膝島の再生医学 73-78, 2015.
  - 出澤真理「生体内多能性幹細胞：Muse細胞」脳神経系の再生医学 19-26, 2015
  - 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.
  - 出澤真理「神経再生研究の最前線—Muse 細胞」脳神経外科速報 22 : 550 -559, 2012.
  - 出澤真理「ヒト生体由来多能性幹細胞 Muse 細胞—再生医学と生物学における意義」実験医学 30 (2) : 180—188, 2012.
  - 出澤真理「ヒト生体内に存在する多能性幹細胞 Muse細胞と肝再生への可能性」肝胆膵 65 : 145-155, 2012.
2. 学会発表
- Mari Dezawa Clinical Applications of Stem Cells, Discovery of Muse Cells shifts the Paradigm of Mesenchymal Stem Cells, Singapore, Feb. 2015.
  - 出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 第 5 回先進医療開発コアセンターシンポジウム, 東北大学, 12 月, 2014.
  - 出澤真理 Discovery of Muse Cells shifts the Paradigm of Mesenchymal Stem Cells, 日仏再生医学シンポジウム, 東京, 11 月, 2014.
  - 出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 第 56 回日本先天代謝異常学会, 仙台, 11 月, 2014.
  - 出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 弘前再生医療講演会, 弘前大学, 11 月, 2014.
  - 出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 第 31 回細胞療法研究会, 愛知医科大学, 11 月, 2014.
  - 出澤真理 Muse 細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 未来医療開発プロジェクト (MIAST) シンポジウム, 岩手医科大学, 8 月, 2014.
  - 出澤真理 腫瘍性の無い生体由来多能性幹細胞 Muse 細胞の発見：ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, 第 14 回日本外傷歯学会, 大阪歯科大学, 7 月, 2014.
  - 出澤真理 再生医療研究の現状と Muse 細胞の将来展望, 特許庁 平成 26 年度先端技術研修, 東京, 6 月, 2014.
  - 出澤真理 骨髄と結合組織を足場とする多能性幹細胞 Muse 細胞の担う生体内修復機能, 第 46 回日本結合組織学会学術大会 第 61 回マトリックス研究会大会合同学術集会, 名古屋, 6 月, 2014.
  - 出澤真理 Muse 細胞発見のもたらす間葉系幹細胞のパラダイムシフト, 第 55 回日本神経学会, 福岡, 5 月, 2014.
  - 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., Seminar at Nelson Biological Labs in Rutgers, Rutgers, The State University of New Jersey, USA., April, 2014.
- Mari Dezawa Making three dimensional human colored skin by using Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, Stem Cells and Tissue Injury Platform Session at EB 2014, San Diego Convention Center, USA., April, 2014.
  - 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, PPSSC 2014, Taipei, Taiwan, April, 2014.
  - 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 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 回日本脊椎外科学会, 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 回松本ボーンフォーラム, 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.
  - 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: 医療における様々な展開の可能性, 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 香川, 3月, 2013.
  - 出澤真理 生体に内在する多能性幹細胞 Muse 細胞: 組織修復細胞としての機能と次世代の再生医療に向けて, 第 12 回日本再生医療学会総会, 横浜, 3月, 2013.
  - 出澤真理 The Possibility of Novel Adult Human Pluripotent Stem Cell Type, Muse Cell, for Regenerative Medicine, 第 77 回日本循環器学会学術集会, 横浜, 3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?“, Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology, 名古屋大学, 1月, 2013.
  - 出澤真理 新たに発見されたヒト生体内多能性幹細胞 Muse 細胞の再生医療と組織再建への可能性, JAACT2012, 名古屋, 11月, 2012.
  - 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, 第 50 回日本人工臓器学会大会, 福岡, 11月, 2012.
  - 出澤真理 ヒト生体由来多能性幹細胞 MUSE 細胞の組織修復再生医療の可能性, 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 10月, 2012.
  - Mari Dezawa Muse cells, a novel type of adult human pluripotent stem cells that reside in mesenchymal tissues: their great possibility for regenerative medicine and tissue repair, Seminar hosted by JOSED, Amman, Jordan. Oct., 2012
  - Mari Dezawa Muse cells, a novel type of adult human pluripotent stem cells that reside in mesenchymal tissues: their great possibility for regenerative medicine and tissue repair, A weekly

seminar series at NCDEG, Amman, Jordan.  
Oct., 2012.

- 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、病態解析への展開の可能性, MCC II, 北海道, 9月, 2012.
- 出澤真理 新たに発見されたヒト生体由来の多能性幹細胞 Muse 細胞：神経再生医療への可能性, 第23回日本末梢神経学会, 福岡, 9月, 2012.
- Mari Dezawa Novel type of pluripotent stem cells (Muse cells) that reside in adult human mesenchymal tissues and their potential for cell-based therapy, AR Symposium, Queenstown, New Zealand, Aug., 2012.
- 出澤真理 新たに発見されたヒト生体内多能性幹細胞 Muse 細胞：再生医療の進歩への可能性, 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (未来医療開発プロジェクト) 研究成果報告会, 岩手医科大学, 8月, 2012.
- Mari Dezawa Muse cells, a novel type of adult human pluripotent stem cells that reside in mesenchymal tissues: their great possibility for regenerative medicine and tissue repair, Seminar at Jinan Univ., Jinan Univ., China, Aug., 2012.
- Mari Dezawa Muse cells, a novel type of adult human pluripotent stem cells that reside in mesenchymal tissues: their great possibility for regenerative medicine and tissue repair, A joint seminar of Department of Anatomy and Centre for Reproduction, Development and Growth, 香港大学, 7月, 2012.
- 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：再生医療、予後の診断、病態解析への展開の可能性, 分子細胞機能学分野セミナー, 東京医科歯科大学, 7月, 2012.
- 出澤真理 Muse cells, a novel type of adult human pluripotent stem cells that

reside in mesenchymal tissues: their great possibility for regenerative medicine, Dutch - Japanese Cross Debate Workshop on RM and Stem cells, 横浜, 6月, 2012.

- Mari Dezawa Muse cells, a novel type of adult human pluripotent stem cells that reside in mesenchymal tissues: their great possibility for regenerative medicine, IANR/GCNN/ISCIT symposium, 西安, 中国, 5月, 2012.
- Mari Dezawa A Novel Type of Adult Human Pluripotent Stem Cells (Muse Cells) that Exist Among Mesenchymal Tissues and Their Primary Role in iPS Cell Generation, Mayo Clinic, Minnesota, USA, April 2012.
- Mari Dezawa Muse cells: a novel type of adult human pluripotent stem cells in mesenchymal tissues and their contribution to tissue repair, EB 2012 (poster), San Diego, USA, April 2012.
- Mari Dezawa Muse cells: A Great Potential of Muse Cells for Clinical Application to Neurodegenerative Diseases, APSNR&PPSSC joint meeting, 台北, 台湾, 4月, 2012.

#### 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

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）  
分担研究報告書

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・有効性の検証に関する研究

研究分担者 浅田 隆太  
名古屋医療センター臨床研究センター臨床研究事業部研究開発推進室 室長  
研究分担者 清水 忍  
名古屋大学医学部付属病院先端医療・臨床研究支援センター 病院講師

研究要旨

ヒト骨髄由来のヒト生体由来多能性幹細胞（Muse 細胞）を再生医療等製品として開発するための予備データを取得することを目的に、Muse 細胞の核型分析試験、及び正常ラットにおける単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験を実施した。核型分析試験の結果から、ヒト間葉系幹細胞（MSC）及びMuse細胞のいずれも正常な核型を有しており、MSCより分離したMuse細胞は、染色体の構造的及び数的な異常の増加を示さないことが確認できた。また、単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験の結果から、ヒト Muse 細胞による毒性は認められなかった。一方、投与したヒト Muse 細胞由来の DNA は、投与 4 週後の 1 例で大動脈に認められた以外は、2～8 週後時点で検出されなかった。また、医薬品医療機器総合機構との薬事戦略相談を実施し、実用化に向けた開発の検討を進めた。

A. 研究目的

研究代表者の出沢により発見された Muse (Multilineage-differentiating Stress Enduring) 細胞は、ヒト生体内に存在し、あらゆる細胞に分化する能力を有する多能性幹細胞であることから、様々な疾患に対する組織再生や機能回復をもたらすことが期待される。既に世界各国でヒトに移植されている骨髄や間葉系細胞にも Muse 細胞は含まれていることから、一定の安全性は示唆されていると考えられる。しかし、この Muse 細胞を再生医療への応用に向けて開発、つまり、Muse 細胞製剤を「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」（昭和 35 年 8 月 10 日 法律第 145 号（平成 26 年 11 月 27 日 法律第 122 号））（以下、医薬品医療機器等法）における「再生医療等製品」として開発を行うためには、臨床試験の実施前に「「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について」（平成 22 年 2 月 19 日 薬食審査発 0219 第 4 号）（ICH M3 ガイドライン）を参考に、必要な非臨床試験を実施する必要がある。

Muse 細胞は、骨髄及び間葉系幹細胞の移植の実績から、腫瘍化の危険性が低いと考えられるものの、臨床試験開始前に造腫瘍性を検討する必要があると考えられることから、まず初めに、平成 24 年度に造腫瘍性試験の一部（1 ロットの核型分析試験）を実施し、Muse 細胞の造腫瘍性を評価することとした。

また、平成 24～25 年度にかけて実施した急性・慢性肝障害モデルマウスを用いたヒト Muse 細胞の有効性評価の結果と、重度複合免疫不全（SCID）マウスの肝障害モデルマウス及び正常マウスを用いた Muse 細胞の体内分布評価の結果を踏まえて、正常ラットにおけるヒト Muse 細胞の単回静脈内投与毒性試験のデザインを検討することとした。また、医薬品医療機器総合機構（PMDA）の薬事戦略相談（対面助言）の準備を行うこととし、事前面談を実施することとした。

平成 26 年度には、検討したデザインを正常ラットにおけるヒト Muse 細胞の単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験を実施し、Muse 細胞の安全性を評価することとした。また、得られた非臨床試験成績を踏まえ、PMDA の薬事戦略相談（事前面

談及び対面助言)を実施することとした。

## B. 研究方法

### 1. 核型分析試験

平成 24 年度に実施した核型分析試験は、一般財団法人食品薬品安全センターに委託し、実施した。

核型分析試験は、WHO Expert Committee on Biological Standardization の方法及び American Type Culture Collection American Type Culture Collection (ATCC) の培養細胞品質検査方法を参考に、「厚生省令第 21 号「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」(平成 9 年 3 月 26 日、一部改正 厚生労働省令第 114 号 平成 20 年 6 月 13 日)(GLP 省令)を遵守して実施した。

### 2. 単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験

平成 25 年度には、SCID マウスの肝障害モデルマウス及び正常マウスを用いた Muse 細胞の体内分布評価の結果を踏まえて、正常ラットにおけるヒト Muse 細胞の単回静脈内投与毒性試験のデザインについて、投与細胞数、動物種、観察期間、観察項目等を検討した。

平成 26 年度には、単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験を株式会社イナリサーチに委託し、実施した。

雄性ラットを 2 週観察群、4 週観察群、8 週観察群に分けて、ヒト Muse 細胞  $1 \times 10^7$  個/kg を単回静脈内投与した。単回静脈内投与毒性試験の毒性評価項目については、「単回投与及び反復投与毒性試験ガイドラインの改正について」(平成 5 年 8 月 10 日 薬新薬第 88 号)(ICH S4 ガイドライン)及び「反復投与毒性試験に係るガイドラインの一部改正について」(平成 11 年 4 月 5 日 医薬審第 655 号)(ICH S4A ガイドライン)を一部参考に実施した。

### 3. PMDA の薬事戦略相談への対応

平成 25 年度から PMDA の薬事戦略相談(対面助言)の資料作成の検討を開始し、平成 25~26 年に

複数回の事前面談を行い、平成 26 年 12 月に PMDA の薬事戦略相談を実施した。

## (倫理面への配慮)

### 1. 核型分析試験

核型分析試験は、Lonza 社より購入した生体試料を用いており、また、*in vitro* 試験であることから、動物は用いていない。なお、核型分析試験実施施設は、PMDA の GLP 適合性調査の結果、評価 A と判定されている。

### 2. 単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験

単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を遵守し、試験施設の動物実験審査委員会による審査を受けた試験計画書に従って適正に実施された。なお、試験実施施設は、AAALAC International により認証されている(認証番号:001107)。

## C. 研究結果

### 1. 核型分析試験

核型分析試験では、MSC のギムザ染色による 100 核板の染色体数分析の結果、最頻値は正常ヒト細胞と同じ 46 本(頻度 92%)であり、それ以外の核板は偽二倍体構成が 7 核板(45 本が 4 核板、47 本が 3 核板)と、染色体数 92 本の四倍体構成が 1 核板であった。また、観察した 100 核板のうちに構造異常が観察されたものは無かった。染色体分染による 10 核板の核型分析の結果、10 核板ともにバンドパターンが正常なヒト女性染色体と一致し、欠失、転座、重複など、染色体レベルで確認できる異常は存在しなかった。

Muse 細胞のギムザ染色による 100 核板の染色体数分析の結果、最頻値は正常ヒト細胞と同じ 46 本(頻度 86%)であり、それ以外の核板は偽二倍体構成が 13 核板(45 本が 7 核板、47 本が 5 核板および 48 本が 1 核板)と、染色体数 92 本の四倍体構成が 1 核板であった。また、観察した 100

核板のうち構造異常が観察されたものは無かった。染色体分染による 10 核板の核型分析の結果、10 核板ともにバンドパターンが正常なヒト女性染色体と一致し、欠失、転座、重複など、染色体レベルで確認できる異常は存在しなかった。

## 2. 単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験

Muse 細胞の単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験の結果は、以下の通りであった。

いずれの動物においても、死亡は認められず、一般状態の変化、体重、摂餌量、摂水量、眼科的検査、血液学的検査、生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査のいずれの所見にも、ヒト Muse 細胞投与に関連した変化は認められなかった。

体内分布に関しては、投与後 4 週の検査では、1 例の大動脈で総 DNA 量あたりのヒト DNA 量が 0.09237pg/ng であったが、その他投与後 2 週、4 週、8 週時の試料ではヒト DNA は検出されなかった。

## 3. PMDA の薬事戦略相談への対応

研究代表者の出澤（東北大学）及び研究分担者の吉田（株式会社 Clio）と共に、複数回の打合せを重ね、PMDA の薬事戦略相談（対面助言）の資料作成準備を行い、平成 25 年 10 月 24 日、平成 26 年 7 月 16 日及び平成 26 年 10 月 8 日に薬事戦略相談（事前面談）を実施した。これら 3 回の事前面談を踏まえ、平成 26 年 12 月 16 日に PMDA の薬事戦略相談（第戦確 P27 号）を実施し、Muse 細胞製剤の実用化に向けて、規格及び試験方法、製造方法、非臨床試験について、議論を行った。

## D. 考察

### 1. 核型分析試験

核型分析試験について、染色体分染による核型分析ではヒト MSC 及び Muse 細胞の全ての核板が正常なヒト女性染色体と一致し、染色体レベルで確認できる異常は無く、染色体の構造的変化は無いと判断された。また、ギムザ染色による 100 核板

の観察においても、ヒト MSC の染色体数は正常なヒトの染色体数である 46 本の核板が 90%以上であり、一方、Muse 細胞は 86%とやや低めであったが、染色体数の変化は無いと判断された。

これらの結果から、MSC 及び Muse 細胞のいずれも正常な核型を有しており、MSC より分離した Muse 細胞は、染色体の構造的及び数的な異常の増加を示さないと判断された。

### 2. 単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験

単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験について、正常ラットにヒト Muse 細胞  $1 \times 10^7$  個/kg を単回静脈内投与し、8 週後までの一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査において、ヒト Muse 細胞による安全性上問題となる所見は認められなかった。しかし、組織中にヒト DNA は、投与後 4 週の 1 例の大動脈以外に検出されなかったことから、毒性評価のための十分な曝露ができていない可能性も否定できない。

一方、免疫不全マウスにおいてヒト Muse 細胞  $1 \times 10^4$  個/body 単回静脈内投与時の体内分布を確認した際には、投与 2 週後においても肺にヒト DNA が相当量存在することを確認しているため、今回も同様に、投与 2 週後に少なくとも肺でヒト DNA が確認できると考えていた。しかし、今回、静脈内投与 2 週後のいずれの組織の試料でもヒト DNA が検出されなかった。これは、適切に投与できていなかったのか、免疫不全の有無によるのか、マウスとラットの種差によるものであるかは、不明である。

本検討結果を踏まえ、今後実施する毒性試験及び体内分布試験においては、静脈内投与 2 週後よりも早い段階でヒト DNA の組織分布を確認し、Muse 細胞の全身曝露を確認すると共に、各種毒性所見の有無を検討する必要があると考える。

### 3. PMDA の薬事戦略相談への対応

平成 26 年 12 月 16 日に実施した PMDA の薬事戦

略相談（第戦確 P27 号）において規格及び試験方法、製造方法や非臨床試験について、議論を行い、実用化に向けた課題が整理できた。その課題を踏まえ、研究代表者の出澤（東北大学）及び研究分担者の吉田（株式会社 Clio）と共に検討を重ねることとする。それらの検討結果を踏まえ、今後も継続的に PMDA と薬事戦略相談を行うことで、実用化に結びつく可能性が高まるものとする。

#### 4. まとめ

今後、Muse 細胞製剤の実用化に向けた臨床試験（治験）を可能な限り早期に実施できるようにするために、薬理試験成績を踏まえ、「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について」（平成 22 年 2 月 19 日 薬食審査発 0219 第 4 号）（ICH M3（R2）ガイドライン）、「ヒト（自己）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日 薬食発 0907 第 2 号）、「ヒト（同種）体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」（平成 24 年 9 月 7 日 薬食発 0907 第 3 号）等や PMDA の薬事戦略相談を踏まえた意見を参考に、実際に製造販売する製造方法で製造した Muse 細胞製剤を用いて非臨床試験（薬理試験、薬物動態試験、安全性薬理試験、単回投与毒性試験等）を実施することが必要である。

#### E. 結論

核型分析試験の結果から、MSC より分離した Muse 細胞は、染色体の構造的及び数的な異常の増加を示さないことが確認できた。また、単回静脈内投与毒性試験及び体内分布試験において、正常ラットにヒト Muse 細胞を投与しても、組織中にヒト DNA はほとんど検出されず、ヒト Muse 細胞の毒性学的影響が認められないことが確認できた。

今後、Muse 細胞製剤の実用化のためには、実際に製造販売する製造方法で製造した Muse 細胞製剤を用いて非臨床試験（薬理試験、薬物動態試験、安全性薬理試験、単回投与毒性試験等）を実施す

ることが必要であるが、その基礎となる知見が得られたことには、意義があると考えます。

#### F. 研究発表

なし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし。