

ある。多能性幹細胞等を原材料として使用する場合やあるいは中間体として多能性能を獲得する工程を含む等、懸念すべき特別な理由がある再生医療等製品の場合には、生殖発生毒性試験や造腫瘍性の評価も含まれる。その他、特殊安全性試験である免疫毒性試験及び幼若動物を用いる安全性試験に関する非臨床試験は、個々の事例に応じて実施すべきであり、非臨床試験packageの中での位置づけを明確化し、非臨床安全性試験での必要性や実施される臨床試験との関係が示されるべきである。

本基本的考え方は、再生医療等製品の開発において通常起こり得る状況に適用されるものであり、再生医療等製品開発のための一般的な指針としてみなされるべきである。非臨床安全性試験及び臨床試験の計画やデザインは、科学的かつ倫理的に適切なものでなくてはならない。

開発中の再生医療等製品が、現在治療法のない生命を脅かす疾病又は重篤な疾病を適応とする場合、個々の事例に応じて毒性学的評価と臨床開発を進め、最適かつ迅速な再生医療等製品開発が行われることが必要である。これらの事例や革新的な治療法では、特定の試験の、簡略化、延期、省略、又は追加もあり得るであろう。

#### 一般原則

再生医療等製品の開発プロセスは、動物及びヒトから得られた安全性及び有効性情報の評価を行いながら、段階的に進めるものである。非臨床安全性評価の主たる目的は、標的臓器および投与経路・投与デバイスを含む投与方法（用法）、用量依存性、MOAおよびその生着との関係、及び適切な場合には回復性についての安全性の特徴を明らかにすることである。これらの情報は、初めてヒトを対象とした治験を行う際の安

全な用法および初回投与量と用量範囲を推定する上で、また臨床で有害事象をモニターするためのsurrogate markerを明らかにするために用いる。臨床開発の開始時までにに行なわれる非臨床安全性試験は、通常限られたものであるが、臨床試験の諸条件下で現れる可能性のある有害作用を十分に検証しうるものでなくてはならない。

臨床試験を実施するのは再生医療等製品の安全性及び有効性を明らかにするためであり、最初は比較的低い投与量で少数の被験者を対象として行われるかもしれない。引き続き実施される臨床試験では、通常、投与量が増やされ、対象患者数も増加する。臨床試験の拡大は、先行する臨床試験で十分な安全性が実証されていることに加えて、臨床開発の進行と並行して実施される非臨床安全性試験からの追加情報に基づいて行われるべきである。

臨床又は非臨床試験でみられた重篤な有害所見は、臨床試験の継続に影響することがある。臨床的意義を包括的に捉えた上で、これらの有害所見を評価し、追加の非臨床試験ないし臨床試験の必要性やデザインを決定すべきである。

特に再生医療等製品での臨床開発では、臨床試験の各段階を区別しない傾向が広がっていることから、本文書では、場合によっては、非臨床試験と関連付ける臨床試験を、臨床各相ではなく臨床試験の期間、対象被験者の数、被験者の特性、また適応疾患の患者数によっても区別している。

#### 動物使用の削減、改善、代替に関する原則

可能な場合には一度の試験で効能裏づけ試験と安全性試験、あるいは安全性薬理試験等を併合試験として実施することで、また、合理的に説明できる範囲にて最終評価

項目を持った多様な動物群の代わりに中大動物を用いる非臨床試験での最終的評価を用いることで、一つの種類の動物の使用を削減することができる。

苦痛の管理や人道的な評価項目を組み込んだり、非侵害的なモダリティイメージングを用いるといったような改善も指向できる。

代替手段が存在するないしは開発されうる場合になされる、*in vitro* 試験を含む合理的な動物試験の代替も想定できる。

#### 非臨床計画の目的

非臨床試験の実施は、治験製剤の開発過程全体のうちの重要な要素の一つである。再生医療等製品に関する非臨床計画を十分なものにするための目的は次のようなものである。

- a. 生物学的な妥当性の確立。
- b. 生物学的に活性を示す投与量の特定。
- c. 開始時の投与量、用量漸増の計画、投与方法の選択
- d. 提案された臨床時の治験製剤の投与経路（投与方法）の、実現可能性と相対的安全性の確立。
- e. 患者の適格性基準の実証（選択基準、除外基準の合理的実証）。
- f. 臨床時モニタリングの指針となる生化学的、生理学的あるいはそれ以外の適切な surrogate marker パラメータの特定。
- g. 感染症の伝播など潜在的な公衆衛生に対する危険性の特定。

#### 対象疾患・臓器によるリスク評価

非臨床安全性試験において、対象疾患の特異性と細胞特性を勘案し、安全性上の懸念事項を適切に議論する必要がある。投与臓器については、中枢、循環、呼吸器系を治療目的としている場合、安全性薬理試験

を実施し、臓器傷害の発生によるリスクと細胞特性に応じた付加的リスクに関して考察する必要がある。

#### 投与方法によるリスク評価

投与方法により、細胞による塞栓症あるいは細胞の容量による周辺組織圧排など検討すべき事項を明示し、そのリスクを評価しうる非臨床試験系を組み立てる必要がある。全体的な非臨床試験 **package** の組み立て

特定の患者集団への再生医療等製品の投与を妨げないための非臨床計画は、包括的で、既知あるいは *in vitro* 試験を含む非臨床試験にて明らかにされた細胞特性に基づいて議論されなければならない。特定の試験それぞれの目的を満たす適切な *in vitro* 試験系、動物種、モデルを用いて試験を段階的に進めることが望ましい。再生医療等製品治験製剤の非臨床試験をデザインする際には以下のことすべてが考慮されなければならない。

- a. 標的細胞の表現型
- b. 細胞源
- c. 生体外でなされる操作（たとえば、選択、精製、増殖、活性化を含む、manipulation すべて）
- d. 生物学的に適切な反応を得るのに必要な最小細胞投与量及び至適細胞投与量（用量）
- e. 望ましくない反応を生んだ細胞投与量とその発症機序
- f. 体内動態
- g. 投与された細胞に対する宿主の免疫反応の可能性の検討
- h. 潜在的な局所および全身安全性

非臨床試験で用いられる再生医療等治験製剤

可能であれば、適応患者に投与される再生医療等治験製剤は検証的な非臨床試験で

用いられることが望ましい。非臨床での使用が意図された製剤ロットと臨床での使用が意図された製剤ロットとの類似点と相違点は、治験の提出書類において強調され、議論されるべきである。

動物実験による投与方法・投与機器の検討

臨床時の投与経路を動物モデルで再現すべきである。なお、製剤投与の方法に関連する潜在的风险を評価するために、中大動物で行われる検証的な非臨床試験において用いられる投与方法・投与機器は、計画された臨床時の投与機器と同一であることが望ましい。

#### 動物種の選択

選択された動物種は、ヒトにおいて予想されるのと同様の、再生医療等治験製剤に対する生物反応を示すべきである。もっとも適切な動物種を選択する際に考慮されるべき要因は以下のものである。

- a. 生理機能と解剖学的構造の点におけるヒトとの類似性
- b. 再生医療等製品に対する免疫寛容度
- c. 事前に計画された投与手法・機器の使用可能性
- d. 非標準的でない試験動物種、たとえば遺伝子組み換えマウスや大型動物のような試験動物種の場合、適切な正当化がなされることで、上記の要因を満たすことができる。

モデル動物の選択にあつては、生物学的に適切な動物種、および疾患、損傷動物モデルの選択に関する議論に関して追加の考慮は以下のものを含む。

- a. 製剤投与における解剖学的部位にアクセスすることができる。
- b. 標的となる臓器・組織に、特定の投与量の細胞をその集団としての細胞特性を

変化させることなく投与できる。

- c. 再生医療等製品の安全性に関する長期の評価を可能にする免疫不全動物あるいは免疫不全状態とした動物を利用できる。

再生医療等製品に関する適切な動物種、モデルの選択に関して主に議論されるべきことは、その動物の、投与された治験製剤に対する免疫寛容度である。ヒト再生医療等製品では免疫反応により安全性あるいは有効性が示しえない場合、非臨床試験においては類似細胞製剤を投与することもまた、許容可能な、取られうる選択肢の一つである。しかしながら、類似細胞製剤を用いた非臨床試験が実施されるとしたら、生物活性や分子調節機構、不純物、混入物質が潜在的に異なっているために、特に安全性データの妥当性に関する不確実性が生じる。それゆえ、もしこのような非臨床試験過程をたどるなら、臨床開発を目指しているヒト細胞製剤に対する動物細胞製剤の類似の程度が特徴づけられるべきである。その際の評価 surrogate marker の例は次のようなものである。

- a. 原材料としての細胞・組織の、サンプル摘出手順の同等性。
- b. 細胞の同定、単離、増殖、生体内培養に関する手順の同一性。
- c. 細胞成長動態（たとえば、細胞倍加時間、細胞増殖曲線、細胞増殖停滞期）。
- d. 表現型と機能特性（たとえば、成長因子とサイトカインの分泌、細胞集団特有の表現型、遺伝子型マーカー）。
- e. 最終製剤の、製剤設計、細胞足場を播種する手順（必要があれば）。
- f. 最終製剤の保管状態と細胞の生存率。

#### 疾患・損傷動物モデルの選択

非臨床安全性試験に用いる動物は、健常

動物である場合が多いと想定されるが、疾患、損傷動物モデルにおいてなされる非臨床安全性試験も、再生医療等製品の臨床試験を許容するデータを取得するための投与量と活性、安全性との関係についての知見を与える場合がある。

再生医療等製品に共通する特徴のため、疾患、損傷動物モデルは、これらの製剤の活性や安全性を評価する点では、健康な動物よりも好ましい場合もある。健常動物を用いる場合と疾患・損傷動物モデル選択にあつては、投与方法・経路および MOA の観点から、安全性面での worst case を想定して選択されなければならない。疾患・損傷動物モデルを用いた場合、安全性上の懸念（リスク）と予測される適応症患者の得るであろう利益（ベネフィット）のリスク・ベネフィット比を勘案することも可能で、特に希少疾病を適応症とした再生医療等製品の場合には奨励されうる。

さらに、疾患・損傷動物モデルの使用は、臨床試験における安全性上のモニタリングに適用可能な surrogate marker を特定できる可能性がある。

治験の提出書類に示されているべき情報は、選択された動物モデルの次のような有用性、能力を支持する情報であるべきである。すなわち、標的疾患集団の発症病態生理に外挿できることということと、以下の一つひとつを考慮した、再生医療等治験製剤の安全性についての評価を可能にしているということである。

- a. 疾患・損傷動物モデルの発症病態生理と、ヒトの疾患・損傷の発症病態生理学の類似点と相違点およびその外挿可能性。
- b. 再生医療等製品治験製剤の効能、安全性に対して、動物の疾患・損傷状態が持っている効果（すなわち、試験中の特定の

製剤および投与方法に対する、動物の感受性。安全性試験では worst case であることの提示が必要)。

現存の疾患、損傷状態に対して、投与された治験製剤が持っている有害作用（すなわち、現存の疾患の状態を悪化させることや新たな疾患、安全性への懸念事項を惹起すること）。

#### 一般安全性試験のための高用量選択

安全性試験においては、十分に高倍数の用量又は投与可能な最大用量（MFD（MAXIMUM FEASIBLE DOSE））を用いることで臨床的に意味のある影響として、どのような有害作用が生ずる可能性があるかを十分に明らかにすることができる。この限界量を設けることで、臨床での安全性予測に有用でない（高）用量を動物に投与することを避けることができる。

造腫瘍性の指標が一般安全性試験に組み込まれる場合には、投与可能な限界用量に基づいて設定されるべきである。

#### ヒト初回臨床投与量の算出

ヒトへの初回投与量の算出は、初めてヒトに投与する臨床試験に参加する被験者の安全を確保するための重要な要件である。推奨されるヒト初回投与量の決定にあたっては、薬理学的な用量反応性や、薬理的／安全性プロファイル及び体内動態を含む、関連する全ての非臨床試験データを考慮すべきである。

一般的に、投与経路が臨床試験に外挿可能である最適な動物種で実施された非臨床安全性試験で求められた安全性用量が、最も重要な情報となる。また、臨床試験の開始用量は、再生医療等製品の有効成分である細胞としての特性、及び臨床試験のデザインといったさまざまな要因を考慮して設定

される。

ヒトにおける早期探索的臨床試験は、臨床開発で通常求められるものよりも少ない、もしくは異なる種類の非臨床データに基づいて開始できるため、臨床試験の開始用量（及び最高用量）の算出方法も異なる。

#### 検証相の臨床試験のための製剤開発

再生医療等製品治験製剤の開発が検証相の臨床試験に進んだら、**risk-based approach** の手法により、既存の非臨床試験についての考察をくわえ、必要に応じて追加の非臨床試験が実施されるべきである。

#### 動物実験実施基準

あらゆる非臨床安全性試験は可能な限り **GLP** に準拠して実施されるべきである。しかしながら、再生医療等製品の開発は新たな領域であるため、**GLP** 規制が整備されているわけではなく、**GLP** の精神に基づいて実施されることを許容する

#### D. 考察

平成 24 年 5 指針は、哲学として世界最高水準の通知である。しかしながら、再生医療等製品は開発後に国内にとどまらず、国際展開すべきことを考えると、規制 **issue** を明確に提示する必要がある、また国際協調が可能な記載であるべきである。そのため、**ICH** 規定と **FDA** の **guidance** を涉猟し、わが国の規制としてあるべき姿として取りまとめることとした、本分担研究の方向性は適切であるといえる。

#### E. 結論

再生医療等製品の開発において、平成 24 年 5 指針に基づいて規制適合性を確認しつつ進めていくことは必須であるが、5 指針に記載の非臨床試験規制は抽象的であり、実践的でなかった。本研究では、幅広く再生

医療等製品をターゲットとすることとし、臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床試験の実施にかかる基本的考え方を示した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- A) Hayakawa T, Aoi T, Umezaw A, Ozaw K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of autologous human somatic stem cells, *Regenerative Therapy 1*, in press
- B) Hayakawa T, Aoi T, Umezaw A, Ozaw K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of allogenic human somatic stem cells. *Regenerative Therapy 1*, in press
- C) Hayakawa T, Aoi T, Umezaw A, Ozaw K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of autologous human induced pluripotent stem (-like) cells. *Regenerative Therapy 1*, in press
- D) Hayakawa T, Aoi T, Umezaw A, Ozaw K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of allogenic human induced pluripotent stem (-like) cells. *Regenerative Therapy 1*, in press
- E) Hayakawa T, Aoi T, Umezaw A, Ozaw K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from

- processing of human embryonic stem (-like) cells. *Regenerative Therapy 1*, in press
- F) Kono K, Takada N, Yasuda S, Sawada R, Niimi S, **Matsuyama A**, Sato Y. Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals*. 2014 Dec 16.
- G) Okura H, Soeda M, Morita M, Fujita M, Naba K, Ito C, Ichinose A, **Matsuyama A**. Therapeutic potential of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells in liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Dec 6
- H) Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Ozawa T, **Matsuyama A**, Hayakawa T. Role of notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Stem Cells Dev*. 2014 Sep 15;23(18):2211-24.
- I) Ozasa M, Sawada K, Iwayama T, Yamamoto S, Morimoto C, Okura H, **Matsuyama A**, Komoda H, Lee CM, Sawa Y, Kitamura M, Hashikawa T, Takedachi M and Murakami S. Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells. *Inflammation and Regeneration*, 2014, in press
- J) Moriyama M, Moriyama H, Uda J, **Matsuyama A**, Osawa M, Hayakawa T. BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2014 Jun;134(6):1627-35. doi: 10.1038/jid.2014.11. Epub 2014 Jan 8.
- K) 大倉華雪・松山晃文 細胞医療での申請にあたっての注意点—品質の観点から— 先進医療 NAVIGATOR II 再生医療・がん領域の実用化への TOPICS 2014. pp5-8
- L) 大倉華雪 松山晃文：「再生医療の開発および規制の歴史」再生医療. 情報機構 (印刷中)
- M) 大倉華雪 松山晃文：「再生医療にかかる規制の現状」日本臨床 (印刷中)
- N) 大倉華雪 松山晃文：「再生医療製品の品質管理と規制への対応」再生医療事業の課題解決のための手引書. 技術情報協会 (印刷中)

## 2. 学会発表

### 【松山晃文】

- A) 「ヒト ES/iPS 細胞由来細胞製剤の品質管理」(招待講演) NPO バイオチップコンソーシアム事務局・2014/4/22
- B) 「再生医療からみた規制政策・知財戦略」(独) 医薬基盤研究所・2014/06/06
- C) 「再生医療とレギュレーション」(招待講演) 神戸ポートアイランド創薬フォーラム・2014/6/16
- D) 「先進医療 B とトランスレーショナルリサーチの実際」東京大学 CRC 講習会 2014/06/26
- E) 「創薬支援に向けたヒト由来試料の位置付けについて」厚労科研(創薬支援のためのバイオリソースデータベースのネットワーク整備と政策・倫理課題に関する研究) 班会議・2014/07/09
- F) 「再生医療のこれから」島津製作所内部セミナー・2014/07/25
- G) 「再生医療のビジネスモデル」(招待講演) ヒューマンサイエンス振興財団・2014/7/22
- H) 「再生医療とレギュラトリーサイエンス」(招待講演) 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会・2014/9/5
- I) 「再生医療法の成立と薬事法の再生医療等製品区分の創設 その展望と課題—アカデミアの立場から—」(招待講演)・2014/9/6
- J) 第 4 回学術大会シンポジウム 一般社

- 団法人レギュラトリーサイエンス学会・2014/9/6
- K) 「再生医療分野における法規制のフレームについて」(招待講演)第14回CRCと臨床試験のあり方を考える会議 2014 日本 SMO 協会・2014/10/4
- L) 「再生医療と非臨床試験」(招待講演)第10回霊長類医科学フォーラム 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター 2014/11/12
- M) 「ヒト由来の生物資源の知財等の環境について」ワークショップ、TKP 品川カンファレンスセンター・2014/11/17
- N) 「再生医療のこれまでとこれから」(招待講演)第44回日本医事法学会大会 日本医事法学会・2014/11/30
- O) 「ヒト多能性幹細胞を用いる再生医療製品での品質管理 A Case Study」(招待講演)バイオリジクスフォーラム第12回学術集会・2014/12/12
- P) 「再生医療における品質管理の考え方」(招待講演)第1回再生医療産業化展セミナー・2015/2/4
- Q) 「創薬・再生医療と知財」(講義)東京大学大学院教育学研究科・2015/2/14
- R) 「再生医療 その規制と知財」(講義)東京医科歯科大学セミナー・2015/2/24
- S) 「再生医療 その規制と知財」(招待講演)熊本大学平成26年度臨床研究センター/付属病院総合臨床研究部キックオフ合同シンポジウム・2015/3/6
- 「iPS 細胞由来再生医療等製品の品質と安全性」(招待講演)第18回バイオメディカル研究室・2015/3/17
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得  
該当なし
  2. 実用新案登録  
該当なし
  3. その他  
該当なし



### Ⅲ. 学会等発表実績



学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いた抗炎症・肝線維溶解療法の開発」

機関名 独立行政法人 医薬基盤研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
「ヒトES/iPS細胞由来細胞製剤の品質管理」口演	松山 晃文	NP0バイオチップコンソーシアム事務局	2014/4/22	国内
「再生医療からみた規制政策・知財戦略」口演	松山 晃文	(独) 医薬基盤研究所	2014/6/6	国内
「再生医療とレギュレーション」口演	松山 晃文	神戸ポートアイランド創薬フォーラム	2014/6/16	国内
「先進医療Bとトランスレショナルリサーチの実際」口演	松山 晃文	東京大学CRC講習会	2014/6/26	国内
「創薬支援に向けたヒト由来試料の位置付けについて」口演	松山 晃文	厚労科研（創薬支援のためのバイオリソースデータベースのネットワーク整備と政策・倫理課題に関する研究）班会議	2014/7/9	国内
「再生医療のこれから」口演	松山 晃文	島津製作所内部セミナー	2014/7/25	国内
「再生医療のビジネスモデル」口演	松山 晃文	ヒューマンサイエンス振興財団	2014/7/22	国内
「再生医療とレギュラトリーサイエンス」口演	松山 晃文	第67回日本酸化ストレス学会学術集会	2014/9/5	国内
「再生医療法の成立と薬事法の再生医療等製品区分の創設その展望と課題ーアカデミアの立場からー」口演	松山 晃文	第4回学術大会シンポジウム 一般社団法人レギュラトリーサイエンス学会	2014/9/6	国内
「再生医療分野における法規制のフレームについて」口演	松山 晃文	第14回CRCと臨床試験のあり方を考える会議2014 日本SMO協会	2014/10/4	国内
「再生医療と非臨床試験」口演	松山 晃文	第10回霊長類医科学フォーラム 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター	2014/11/12	国内
「ヒト由来の生物資源の知財等の環境について」口演	松山 晃文	ワークショップ、TKP品川カンファレンスセンター	2014/11/17	国内
「再生医療のこれまでとこれから」口演	松山 晃文	第44回日本医事法学会大会 日本医事法学会	2014/11/30	国内
「ヒト多能性幹細胞を用いる再生医療製品での品質管理 A Case Study」口演	松山 晃文	バイオリジクスフォーラム第12回学術集会	2014/12/12	国内
「再生医療における品質管理の考え方」口演	松山 晃文	第1回再生医療産業化展セミナー	2015/2/4	国内
「創薬・再生医療と知財」口演	松山 晃文	東京大学大学院教育学研究科	2015/2/14	国内

「再生医療 その規制と知財」口演	松山 晃文	東京医科歯科大学セミナー	2015/2/24	国内
「再生医療 その規制と知財」口演	松山 晃文	熊本大学平成26年度臨床研究センター/付属病院総合臨床研究部キックオフ合同シンポジウム	2015/3/6	国内
「iPS細胞由来再生医療等製品の品質と安全性」口演	松山 晃文	第18回バイオメディカル研究室	2015/3/17	国内

## 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

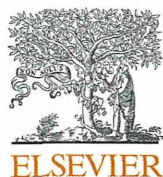
掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of autologous human somatic stem cells	Hayakawa T <u>Aoi T</u> Umezaw A Ozaw K Yoji Sato Sawa Y <u>Matsuyama A</u> Yamanaka S Yamato M	Regenerative Therapy	in press	
Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of allogenic human somatic stem cells.	Hayakawa T <u>Aoi T</u> Umezaw A Ozaw K Yoji Sato Sawa Y <u>Matsuyama A</u> Yamanaka S Yamato M	Regenerative Therapy	in press	
Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of autologous human induced pluripotent stem (-like) cells.	Hayakawa T <u>Aoi T</u> Umezaw A Ozaw K Yoji Sato Sawa Y <u>Matsuyama A</u> Yamanaka S Yamato M	Regenerative Therapy	in press	
Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of allogenic human induced pluripotent stem (-like) cells.	Hayakawa T <u>Aoi T</u> Umezaw A Ozaw K Yoji Sato Sawa Y <u>Matsuyama A</u> Yamanaka S Yamato M	Regenerative Therapy	in press	
Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of human embryonic stem (-like) cells.	Hayakawa T <u>Aoi T</u> Umezaw A Ozaw K Yoji Sato Sawa Y <u>Matsuyama A</u> Yamanaka S Yamato M	Regenerative Therapy	in press	

Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells.	Kono K Takada N Yasuda S Sawada R Niimi S <u>Matsuyama A</u> Sato Y	Biologicals	in press	
Therapeutic potential of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells in liver fibrosis.	Okura H Soeda M Morita M Fujita M Naba K Ito C <u>Ichinose A</u> <u>Matsuyama A</u>	Biochem Biophys Res Commun	2014 Dec 6	国外
Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells.	Ozasa M Sawada K Iwayama T Yamamoto S Morimoto C <u>Okura H</u> <u>Matsuyama A</u> Komoda H Lee CM Sawa Y Kitamura M Hashikawa T Takedachi M Murakami S	Inflammation and Regeneration	2014 Mar	国外
BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes.	Moriyama M Moriyama H Uda J <u>Matsuyama A</u> Osawa M Hayakawa T	J Invest Dermatol	2014 Nov	国外
Role of notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions.	Moriyama H Moriyama M Isshi H Ishihara S <u>Okura H</u> <u>Ichinose A</u> Ozawa T <u>Matsuyama A</u> Hayakawa T	Stem Cells Dev	2014	国外
細胞医療での申請にあたっての注意点-品質の観点から-	<u>松山晃文</u> <u>大倉華雪</u>	先進医療NAVIGATOR II 再生医療・がん領域の実用化へのTOPICS 2014	2014年3月25日	国内
再生医療の開発および規制の歴史	<u>松山晃文</u> <u>大倉華雪</u>	再生医療規制の動向と製品開発および産業化の注意点・情報機構	2015年3月上旬	国内
再生医療にかかる規制の現状	<u>松山晃文</u> <u>大倉華雪</u>	日本臨床	印刷中	国内
再生医療製品の品質管理と規制への対応	<u>松山晃文</u> <u>大倉華雪</u>	再生医療事業の課題解決のための手引書	印刷中	国内

Topical rebamipide treatment for superior limbic keratoconjunctivitis in patients with thyroid eye disease.	<u>Ichinose A</u> Takahashi Y Kakizaki H	Am J Ophthalmol	2014 Jan	国外
Combination of nasolabial v-y advancement flap and glabellar subcutaneous pedicled flap for reconstruction of medial canthal defect.	<u>Ichinose A</u> Matsuda H Takahashi Y Miyazaki H Kakizaki H	Case Rep Ophthalmol	2014 Jan	国外
Comparison of surgical outcomes between simple posterior layer advancement of lower eyelid retractors and combination with a lateral tarsal strip procedure for involutional entropion in a Japanese population.	<u>Ichinose A</u> Lee H Takahashi Y Kakizaki H	Br J Ophthalmol	2014 May	国外
Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors.	<u>Aoi T</u> Oshima N Yamada Y Nagayama S Kawada K Hasegawa S Okabe H Sakai Y	PLoS One	2014 Jul	国外
生体肝移植（小児例） —小児生体肝移植—	<u>田中紘一</u> 山田貴子	日本移植学会50周年記念誌	2014年10月1日	国内

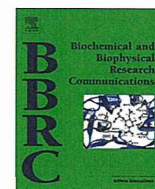
#### IV. 研究成果の刊行物・別刷





Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Therapeutic potential of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells in liver fibrosis

Hanayuki Okura<sup>a,b</sup>, Mayumi Soeda<sup>a</sup>, Mitsuko Morita<sup>a</sup>, Maiko Fujita<sup>a</sup>, Kyoko Naba<sup>a</sup>, Chiyoiko Ito<sup>a</sup>, Akihiro Ichinose<sup>c</sup>, Akifumi Matsuyama<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Platform of Therapeutics for Rare Disease, National Institute of Biomedical Innovation, 5-5-2-602 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan

<sup>b</sup> The Center for Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0879, Japan

<sup>c</sup> Department of Plastic Surgery, Kobe University Hospital, 7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 November 2014

Available online xxx

#### Keywords:

hADMPCs  
Chronic hepatitis  
Fibrosis  
MMPs  
Mouse

### ABSTRACT

**Introduction:** Liver fibrosis is characterized by excessive accumulation of extracellular matrix. In a mouse model of liver fibrosis, systemic injection of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) was considered to rescue the diseased phenotype. The aim of this study was to assess the effectiveness of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells (hADMPCs) in improving liver fibrosis.

**Methods and results:** hADMPCs were isolated from subcutaneous adipose tissues of healthy volunteers and expanded. Six week-old male nude mice were treated with carbon tetra-chloride (CCl<sub>4</sub>) by intraperitoneal injection twice a week for 6 weeks, followed by a tail vein injection of hADMPCs or placebo control. After 6 more weeks of CCl<sub>4</sub> injection (12 weeks in all), nude mice with hADMPCs transplants exhibited a significant reduction in liver fibrosis, as evidenced by Sirius Red staining, compared with nude mice treated with CCl<sub>4</sub> for 12 weeks without hADMPCs transplants. Moreover, serum glutamic pyruvate transaminase and total bilirubin levels in hADMPCs-treated nude mice were lower levels than those in placebo controls. Production of fibrinolytic enzyme MMPs from hADMPCs were examined by ELISA and compared to that from BM-MSCs. MMP-2 levels in the culture media were not significantly different, whereas those of MMP-3 and -9 of hADMPCs were higher than those by BM-MSCs.

**Conclusion:** These results showed the mode of action and proof of concept of systemic injection of hADMPCs, which is a promising therapeutic intervention for the treatment of patients with liver fibrosis.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Various conditions such as viral hepatitis, chronic alcohol abuse, metabolic diseases, autoimmune diseases and bile duct epithelial injury can cause liver fibrosis [1,2]. Liver fibrosis is reversible, whereas cirrhosis, the end-stage result of fibrosis, is in general irreversible [3]. Liver fibrosis is characterized by excessive accumulation of extracellular matrix, with the formation of scar tissue encapsulating the area of injury [4]. The prognosis of patients with liver fibrosis is poor, but liver transplantation seems to improve the prognosis [5,6]. However, limited numbers of donor livers are available for the millions of patients who need them worldwide [7]. Thus, there is a need for novel therapeutic approaches.

Recently, cell therapy has been proposed as an attractive tool for treatment of patients with severe liver disease [8–13]. Stem/

progenitor cells, which possess certain characteristics including self-renewal, proliferation, longevity, and differentiation, are valuable in cell therapy [14]. Several groups have demonstrated the effectiveness of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) in animal models of liver fibrosis and cirrhosis [15–18]. However, others have reported the lack of any changes in the extent of liver fibrosis or liver function tests following the use of BM-MSCs in a rat model of severe chronic liver injury [19]. Thus, the therapeutic efficacy of BM-MSCs transplantation remains controversial at present [19].

Adipose tissue-derived progenitor/stem cells are an attractive cell source for cell therapy of liver fibrosis, based on several properties of these cells; (1) ample production of fibrinolytic enzymes and cytokines [20], (2) ease of obtaining stem cells compared to other tissue-specific stem cells including BM-MSCs, [21]. The use of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells (hADMPCs) supports the view that cytokine production could mediate the therapeutic actions of hADMPCs in liver fibrosis.

\* Corresponding author at: Platform of Therapeutics for Rare Diseases, National Institute of Biomedical Innovation, 5-5-2-602 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan. Fax: +81 78 304 6176.

E-mail address: [akifumi-matsuyama@umin.ac.jp](mailto:akifumi-matsuyama@umin.ac.jp) (A. Matsuyama).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.11.122>

0006-291X/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.



In the present study, we investigated the efficacy of treatment using hADMPCs in nude mice with CCl<sub>4</sub>-induced chronic liver dysfunction and the mechanism of their action in improvement of liver fibrosis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Adipose tissue

Adipose tissue samples were resected from 7 human subjects during plastic surgery (all females, age, 20–60 years) as excess discharges. About 10–50 g subcutaneous adipose tissue was collected from the sample of each subject. All subjects provided informed consent. The protocol was approved by the Review Board for Human Research of Kobe University, Graduate School of Medicine, Osaka University, Graduate School of Medicine and National Institute of Biomedical Innovation, Japan.

### 2.2. Isolation and expansion of hADMPCs

hADMPCs were prepared as described previously [8–10]. Briefly, the resected excess adipose tissue was minced and then digested at 37 °C for 1 h in Hank's balanced salt solution (HBSS, GIBCO Invitrogen, Grand Island, NY) with Liberase (Roche Diagnostics, Germany) as indicated by the manufacturer. Digests were filtered through a cell strainer (BD Bioscience, San Jose, CA) and centrifuged at 800×g for 10 min. Red blood cells were excluded using density gradient centrifugation with Lymphoprep ( $d = 1.077$ ; Nycomed, Oslo, Norway), and the remaining cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO Invitrogen) with 10% defined fetal bovine serum (FBS, Biological Industries, Israel) for 24 h at 37 °C. Following incubation, the adherent cells were washed extensively and then treated with 0.2 g/l ethylenediaminetetraacetate (EDTA) solution (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). The resulting suspended cells were replated on retromectin (RN)-coated dishes (Takara, Kyoto, Japan) in SteMedis (Nipro, Osaka, Japan), 1× insulin-transferring selenium (Nipro, Osaka), 1 nM dexamethasone (MSD, Tokyo, Japan), 100 μM ascorbic acid 2-phosphate (Sawai Pharmaceuticals Co., Osaka), 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF, PeproTec, Rocky Hill, NJ), and 5% FBS (FBS, Biological Industries, Israel). The culture medium was changed twice a week and then the cells were applied for the experiments after 5–6 passages.

### 2.3. Flow cytometric analysis of hADMPCs

hADMPCs were characterized by flow cytometry. Cells were detached and stained with anti-human CD31, CD34, CD44, CD45, CD56, CD73, CD90, CD105 or CD166 antibodies (BD Lyoplate™ Screening Panels, BD Bioscience, San Jose, CA). Isotype-identical antibodies served as controls. After washing with Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS, Nacalai Tesque), cells were incubated with PE-labeled goat anti-mouse Ig antibody (BD PharMingen) for 30 min at 4 °C. After three washes, the cells were resuspended in PBS and analyzed by flow cytometry using a guava easyCyte flow cytometry systems (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

### 2.4. Adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation procedure

Tri-lineage differentiation was examined as described previously [22]. Briefly, for adipogenic differentiation, the cells were cultured in Differentiation Medium (Zen-Bio, Inc.). After three days, half of the medium was replaced with Adipocyte Medium (Zen-Bio, Inc.) every two days. Five days after differentiation,

characterization of adipocytes was confirmed by microscopic observation of intracellular lipid droplets after Oil Red O staining. Osteogenic differentiation was induced by culturing the cells in DMEM containing 10 nM dexamethasone, 50 mg/dl ascorbic acid 2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate (Sigma), and 10% FBS. Differentiation was examined by Alizarin red staining. For chondrogenic differentiation,  $2 \times 10^5$  cells of the hADMPCs were centrifuged at 400×g for 10 min. The resulting pellets were cultured in chondrogenic medium (α-MEM supplemented with 10 ng/ml TGF-β, 10 nM dexamethasone, 100 M ascorbate, and 10 μl/ml 100× ITS Solution) for 14 days. For Alcian Blue staining, nuclear counter-staining with Weigert's hematoxylin was followed by 0.5% Alcian Blue 8GX for proteoglycan-rich cartilage matrix.

### 2.5. Animal model of liver fibrosis and cell administration

Chronic liver fibrosis was induced in nude mice using the procedure described previously [23,24] with some modification. Briefly, 6-week-old male nude mice (body weight of 20–30 g purchased from CLEA, Tokyo) were treated with a mixture of CCl<sub>4</sub> (Wako Pure Chemicals, Osaka) (0.3 ml/kg) and olive oil (Wako Pure Chemicals) (1:1 vol/vol) by intra-peritoneal injection twice a week for 6 weeks, and this was followed by a tail vein injection of hADMPCs ( $1.0 \times 10^6$  cells/kg body weight,  $n = 4$ ) or placebo control ( $n = 5$ ), and followed by 6 more weeks of CCl<sub>4</sub> treatment.

### 2.6. Liver function tests and histological analysis

Blood specimens were collected by cardiac puncture at the end of the experiment. Measurement of serum albumin, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and total-bilirubin levels by routine laboratory methods was outsourced to Oriental Yeast Co. (Shiga, Japan).

Hematoxylin and eosin (H&E) staining and Sirius Red (SR) staining were performed to determine the extent of liver inflammation and fibrosis. The stained slides were viewed on a BioZero laser scanning microscope (Keyence, Osaka). The area of liver fibrosis was quantified with SR staining. Briefly, the fibrotic area (red staining) was assessed at 40× magnification using computer-assisted image analysis with All-in-One analysis software (Keyence, Osaka). Sixteen fields were randomly selected for each group.

### 2.7. Measurement of MMP-2, -3 and -9 production by hADMPCs

One million cells of hADMPCs and BM-MSCs (DS Pharma Biomedical, Osaka) were seeded onto 6 well plates and then cultured for 24 h. The supernatants were harvested, centrifuged, and frozen at –80 °C until analysis. MMP-2, MMP-3 and MMP-9 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits from R&D Systems (Minneapolis, MN) using the instructions supplied by the manufacturer.

### 2.8. Statistical analysis

Serum parameters and fibrotic area are presented as mean ± SD. Differences between groups were assessed for statistical significance by the Student's *t*-test, with  $p < 0.05$  considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Characterization of hADMPCs

Flow cytometry was used to assess markers expressed by hADMPCs (Fig. 1A). The cells were negative for markers of



hematopoietic lineage (CD45) and hematopoietic stem cells, CD34 and CD133. They were also negative for CD31, an endothelial cell-associated marker, and c-Kit (CD117), a cell surface antigen. However, they stained positively for several surface markers characteristic of mesenchymal stem cells, but not embryonic stem (ES) cells, such as CD29, CD44 (hyaluronan receptor), CD73 and CD105 (endoglin).

Next, we examined the adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of hADMPs. Adipogenic differentiation was confirmed by accumulation of intracellular lipid droplets stained with Oil Red O (Fig. 1B). Differentiation and induction of hADMPs was associated with increase in the amount of Oil Red O-stained lipid droplets, indicating that hADMPs can differentiate into adipocytes. Osteogenic induction was examined by Alizarin red S staining (Fig. 1B). Induction of hADMPs for osteogenesis was associated with Alizarin red S staining and appearance of mineralized nodules. The chondrogenic potential of hADMPs is shown in Fig. 1B. Induction of chondrogenesis by pellet culture resulted in staining of extracellular matrices of hADMPs-derived pellet-cultured chondrocytes for Alcian Blue, indicating the chondrogenic differentiation potential of hADMPs. These results confirmed the tri-lineage differentiation potential of hADMPs and the mesenchymal stem cell properties of hADMPs.

### 3.2. Effects of hADMP on CCl<sub>4</sub>-induced chronic liver dysfunction in nude mice

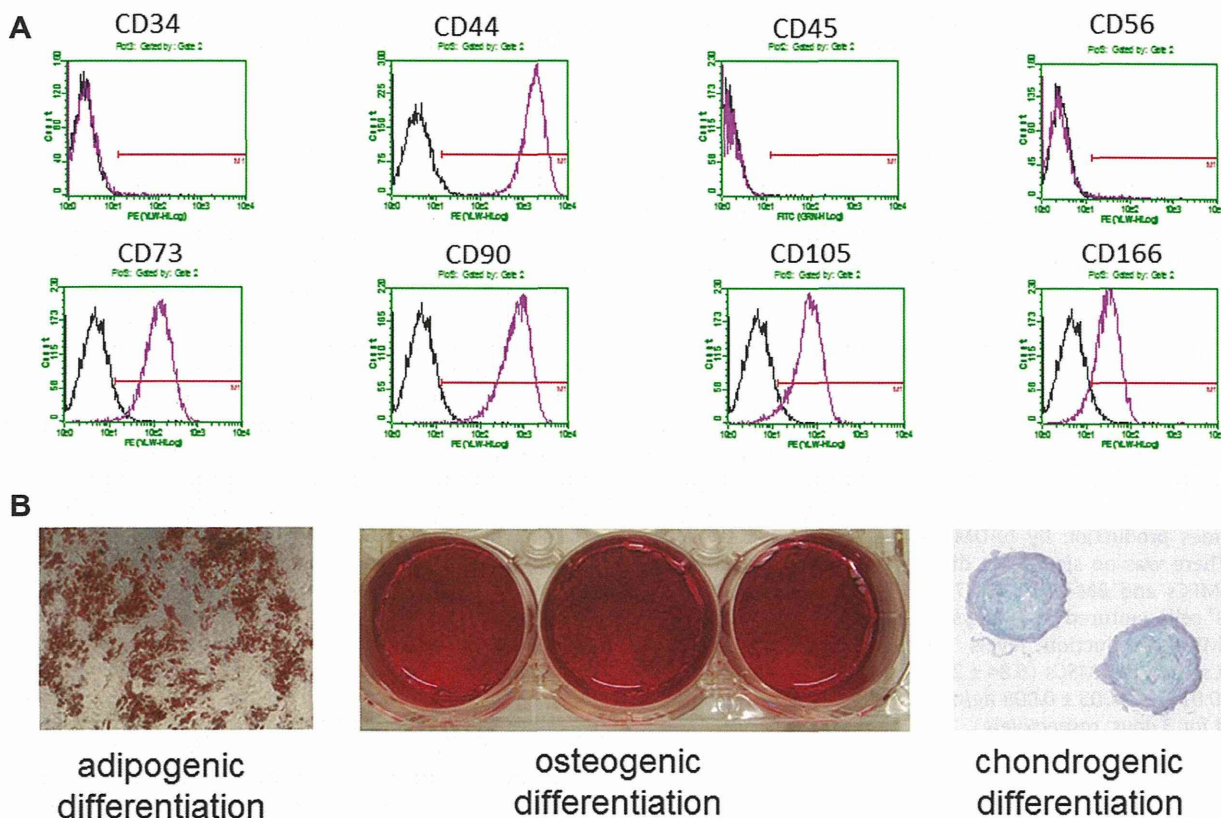
We adopted the CCl<sub>4</sub>-induced chronic mouse fibrosis model in this study rather than the CCl<sub>4</sub>-induced acute model because CCl<sub>4</sub>-induced acute liver fibrosis resolves spontaneously [25]. For this purpose, 9 male nude mice were injected intraperitoneally

with CCl<sub>4</sub> twice weekly for 6 weeks, and then divided into two groups, 4 animals received hADMPs transplantation via the tail vein and the other 5 vehicle control received Ringer's solution with 1/30 volume of heparin. All animals were followed for 6 weeks after the last injection (a).

H&E staining of liver sections showed reduced hepatocyte vacuolar degeneration in hADMP-transplanted CCl<sub>4</sub>-injured mice compared with the control (Fig. 2B). The peri-lobular regions were the main areas affected by CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity while the centrilobular regions seemed to be the least affected. These findings suggest intact albumin secretion, which was confirmed by Sirius Red (SR) staining of control liver sections. SR staining of sections from hADMP-transplanted mice showed mild liver fibrosis, while that of sections from control group mice showed moderate fibrosis (Fig. 2B). Quantitative image analysis of the fibrotic area in SR-stained sections confirmed the efficacy of hADMP-transplantation on liver fibrosis. The mean fibrotic area was significant lower in hADMP-transplanted CCl<sub>4</sub>-injured mice ( $1.8 \pm 1.1\%$  of fibrotic areas) than control mice ( $10.9 \pm 3.9\%$  of fibrotic areas) ( $p < 0.05$ ), indicating that hADMP-transplantation ameliorated liver fibrosis and increased the area containing hepatocytes (c).

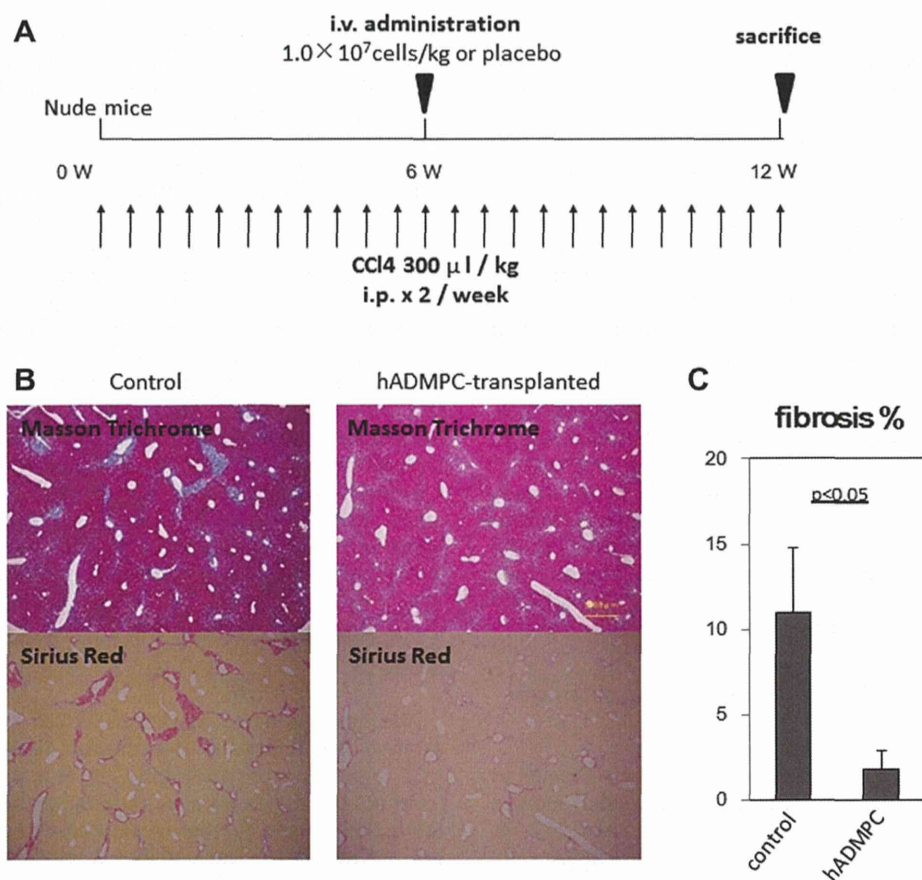
### 3.3. Functional recovery of liver damage following transplantation of hADMPs

We next evaluated the effects of cell transplantation on the extent of liver injury and liver function. Serum transaminase levels (AST and ALT) were significantly higher in mice with liver damage (control), but the increase was attenuated by hADMPs transplantation (Fig. 3A and B). These results confirmed the effectiveness of hADMPs in the treatment of liver damage associated with fibrosis.



**Fig. 1.** Characterization of hADMPs. (A) Flow cytometric characterization of hADMPs. (B) An isotype-matched negative control indicated as red curve. (C) Adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of hADMPs. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)





**Fig. 2.** Assessment of liver fibrosis in hADMPC-transplanted nude mice and controls. (A) Diagram of the treatment protocol. (B) Extracellular deposition of collagen fibers stained with Sirius Red. (C) Quantification of collagen by image analysis. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Interestingly, serum albumin level remained high after hADMPCs, similar to the control (Fig. 3C). These results could be explained by damage of the centrilobular region, the main site of albumin production. Considered together, the results suggest the beneficial effects of hADMPCs in attenuating liver damage and recovery of liver function.

#### 3.4. hADMPCs-induced functional recovery is mediated by MMP release

Finally, we analyzed the mechanism of the hepatoprotective effect of hADMPCs. For this purpose, we measured the amount of the fibrinolytic enzymes, MMP-2, MMP-3 and MMP-9, secreted by hADMPCs by ELISA (Fig. 4). After 3-day culture, the amounts of enzymes production by hADMPCs and BM-MSCs were measured. There was no significant difference in MMP-2 production by hADMPCs and BM-MSCs ( $59.7 \pm 2.3$  vs  $58.3 \pm 0.0$  ng/ml from  $1.0 \times 10^4$  cells cultured for 3 days). On the other hand, MMP-3 and MMP-9 production levels were significantly higher in hADMPCs than BM-MSCs ( $6.84 \pm 2.3$  vs  $0.03 \pm 0.0$  ng/ml,  $p < 0.05$ ,  $0.462 \pm 0.015$  vs  $0.003 \pm 0.008$  ng/ml,  $p < 0.05$ , from  $1.0 \times 10^4$  cells cultured for 3 days, respectively).

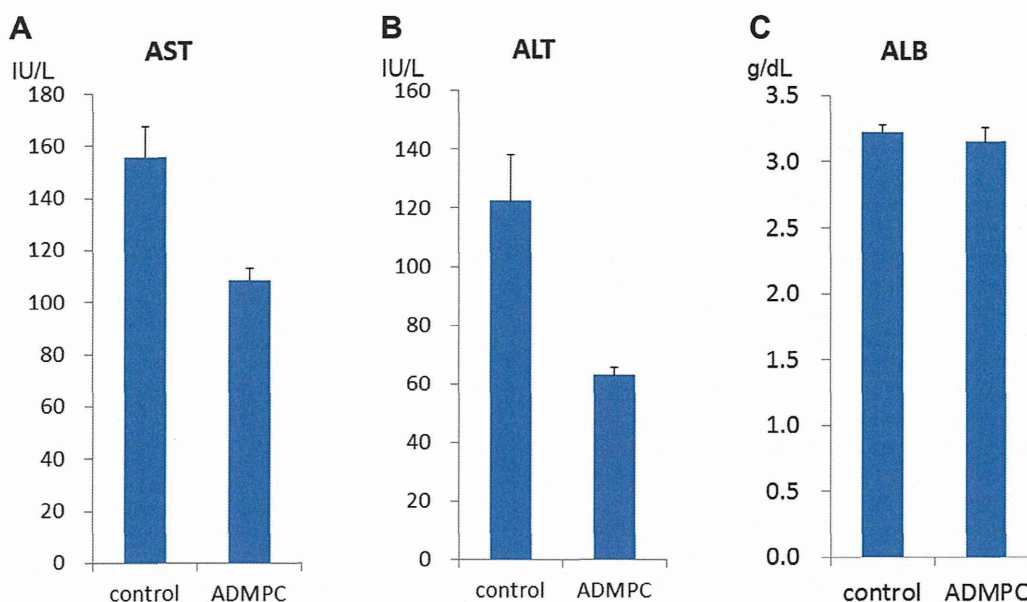
#### 4. Discussion

The major finding of the present study was improvement of liver fibrosis in CCl<sub>4</sub>-induced mice after systemic administration of hADMPCs, and that this effect was mediated, at least in part,

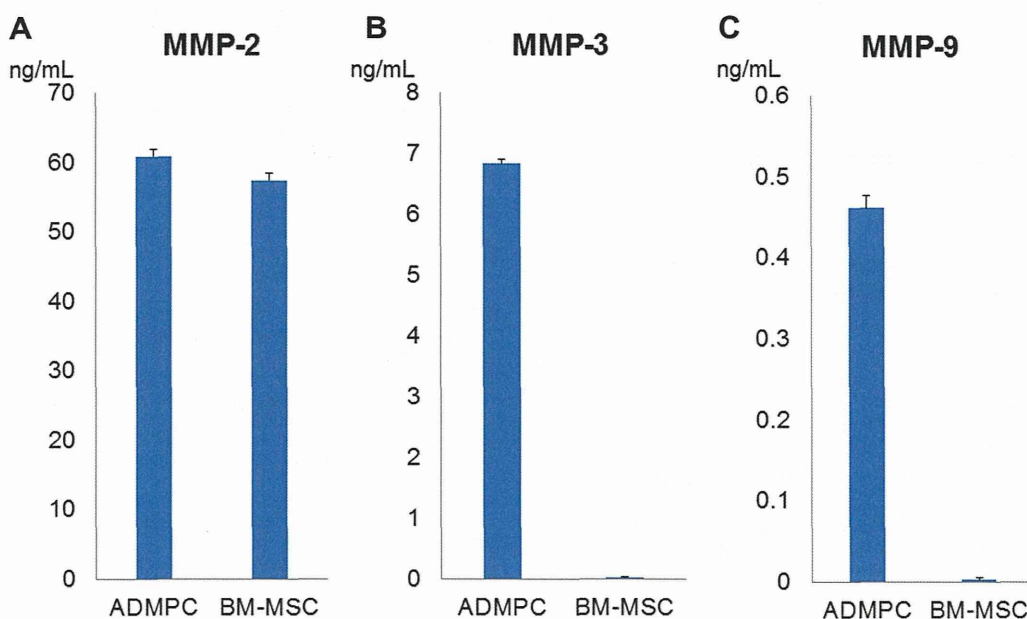
through the production of fibrinolytic MMP-2, -3, and -9, from hADMPCs, suggesting that these cells could be particularly effective in resolving liver fibrosis.

Liver transplantation is an established treatment for severe liver cirrhosis, although the number of patients who could benefit from such treatment is small due to the limited number of donors [5]. Cell therapy has been proposed as an alternative and attractive tool for treating patients with severe liver disease [8–13]. Among the cell therapy tested so far, hepatocyte replacement therapy had been examined. Isolated hepatocytes from human liver [13], regenerated hepatocyte-like or -progenitor cells from embryonic, induce pluripotent [26,27], or hepatic progenitor cells [11], and *in situ* reprogrammable cells [9, 10] have been tested for their efficacy in animal models. The strategy has also been successful in clinical trials involving patients with certain inherited diseases [28]. Although large numbers of hepatocytes or hepatocyte-like cells are needed for meaningful cure and there should be no room for the cells in fibrotic hepatic parenchyma to engraft, such replacement therapies, however, do not seem to be clinically fruitful for liver fibrosis. We hypothesized that fibrolytic enzymes produced by hADMPCs could be useful for treatment of liver fibrosis, and therefore shifted the treatment strategy to improvement of liver fibrosis with cell-based fibrinolytic enzymes delivery. In this strategy, hADMPCs derived-MMPs should produce lysis of excess extracellular matrices and make room for the patient's own proliferative hepatocytes.

To establish the cell-based fibrinolytic enzyme delivery therapy as first line next to liver transplantation, some challenging issues



**Fig. 3.** Examination of serum parameters. (A, B) Transaminase (AST and ALT), (C) Serum albumin. Data are mean  $\pm$  SD. C: control mice; T: mice transplanted mice with hADMPCs.



**Fig. 4.** Quantitative analysis of MMP-2, MMP-3 and MMP-9 level produced by hADMPCs and BM-MSCs. The amount of MMP-2 (A), MMP-3 (B) and MMP-9 (C) after 3 days of culture.

should be dealt with; (1) the cells should be obtained easily and ethically in large quantities, (2) the cells should improve liver fibrosis and liver panel, and (3) the cells act as vehicle for the delivery of MMPs.

The first issue is whether the cells could be obtained easily and ethically in large quantities. hADMPCs is favorable for the therapy because adipose tissue, from which ADMPCs are obtained, is easily and safely accessible and large quantities of the tissues can be obtained without serious ethical issues, since liposuction surgery yields from 100 ml to >3 L of lipoaspirate tissue [8–10]. Therefore, hADMPCs can potentially be applied not only for autologous but also allogenic cell-based enzyme delivery in the future. Based on

the above advantages, hADMPCs represent a potentially promising source of cells for the therapy.

Second, we need to show that hADMPCs-administration results in improvement of liver fibrosis and liver panel, as proof-of-concept of therapy. As shown in Fig. 2, hADMPC significantly improved liver fibrosis in CCl<sub>4</sub>-treated nude mice (a model of chronic liver cirrhosis). The treatment also resulted in improvement of serum transaminase levels. In this model, massive fibrosis was mainly noted in the peri-hepatic lobular region but not in the centrilobular regions surrounding the central veins. Albumin is known to be mainly produced by hepatocytes in the centrilobular region. This is the most likely reason for the lack of difference in serum albumin



levels between hADMPC-transplanted animals and controls. These results indicate that hADMPCs transplantation showed the proof-of-concept to liver dysfunction associated with fibrosis.

Finally, an important issue in this kind of therapy is whether the cells secrete sufficient amount of MMPs. One study reported that matrix metalloproteinase gene delivery could decrease collagen fibers and reduce liver fibrosis [29]. The mode of action was considered to be the strong expression MMPs on the transplanted cells, indicating that MMPs-producing cells other than BM-MSCs [30] are suitable for use for the cell-based enzyme delivery. The present study showed that hADMPCs expressed MMP-2, -3 and -9 (Fig. 2). There was no significant difference in MMP-2 production between hADMPC and BM-MSCs. However, the production of MMP-3 and MMP-9 from hADMPCs was superior to that from BM-MSCs. MMP-3 and MMP-9 are known to lyse collagen types III and I, which are major compartment of liver fibrotic lesion [29]. These data highlight the potential effectiveness of hADMPCs in the treatment of liver fibrosis and the superiority of hADMPCs compared to other therapies.

In conclusion, the present study demonstrated that systemic administration of hADMPCs significantly attenuated liver fibrosis and improved liver function, and that the therapeutic effect of hADMPCs was in part due the secretion of fibrinolytic enzymes, MMPs. These proofs of concept and mode of action prompted us to choose hADMPCs for cell therapy of liver fibrosis. hADMPCs therapy, as cell-based enzyme delivery therapy, has the potential to be an effective source of inducers that support liver regeneration.

#### Declaration

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgments

This study was partly supported by a grant-in-aid for A.M. from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

#### References

- [1] A. Kasahara, H. Tanaka, T. Okanou, et al., Interferon treatment improves survival in chronic hepatitis C patients showing biochemical as well as virological responses by preventing liver-related death, *J. Viral Hepat.* 11 (2004) 148–156.
- [2] T. Saito, K. Misawa, S. Kawata, *Intern. Med.* 6 (2007) 101–103.
- [3] V. Manne, E. Akhtar, S. Saab, *J. Clin. Gastroenterol.* 8 (2014) e76–e84.
- [4] A. Mallat, S. Lotersztajn, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 305 (2013) C789–C799.
- [5] C.L. Chen, S.T. Fan, S.G. Lee, et al., Living-donor liver transplantation: 12 years of experience in Asia, *Transplantation* 75 (2003) S6–S11.
- [6] Y. Takada, M. Ueda, T. Ito, Living donor liver transplantation as a second-line therapeutic strategy for patients with hepatocellular carcinoma, *Liver Transpl.* 12 (2006) 912–919.
- [7] R. Rai, *Liver transplantation – an overview*, *Indian J. Surg.* 75 (2013) 185–191.
- [8] H. Okura, H. Komoda, A. Saga, *Tissue Eng. Part C Methods* 16 (2010) 761–770.
- [9] H. Okura, A. Saga, Y. Fumimoto, *Tissue Eng. Part C Methods* 17 (2011) 145–154.
- [10] A. Saga, H. Okura, M. Soeda, HMG-CoA reductase inhibitor augments the serum total cholesterol-lowering effect of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells in hyperlipidemic homozygous Watanabe rabbits, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412 (2011) 50–54.
- [11] R. Semeraro, V. Cardinale, G. Carpino, et al., The fetal livers as cell source for the regenerative medicine of liver and pancreas, *Ann. Transl. Med.* 1 (2013) 13.
- [12] K. Sun, X. Xie, J. Xi, et al., Cell-based therapy for acute and chronic liver failures: distinct diseases, different choices, *Sci. Rep.* 4 (2014) 6494.
- [13] C. Jorns, E.C. Ellis, G. Nowak, et al., Hepatocyte transplantation for inherited metabolic diseases of the liver, *J. Intern. Med.* 272 (2012) 201–223.
- [14] M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284 (1999) 143–147.
- [15] T. Saito, K. Okumoto, H. Haga, et al., Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis, *Stem Cells Dev.* 20 (2011) 1503–1510.
- [16] I. Sakaida, Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 3 (2008) 1349–1353.
- [17] M. Abdel Aziz, H. Atta, S. Mahfouz, Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis, 2007, *Clin. Biochem.* 40 (2007) (2007) 893–899.
- [18] M. Hardjo, M. Miyazaki, M. Sakaguchi, et al., Suppression of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by transplantation of a clonal mesenchymal stem cell line derived from rat bone marrow, *Cell Transplant.* 18 (2009) 89–99.
- [19] A.B. Carvalho, L.F. Quintanilha, J.V. Dias, et al., Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury, *Stem Cells* 26 (2008) 1307–1314.
- [20] Y. Ding, D. Xu, G. Feng, et al., Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogenic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9, *Diabetes* 58 (2009) 1797–1806.
- [21] J.M. Gimble, B.A. Bunnell, T. Frazier T, et al., Adipose-derived stromal/stem cells: a primer, *Organogenesis* 9 (2013) 3–10.
- [22] H. Komoda, H. Okura, C.-M. Lee, et al., Reduction of N-glycolylneuraminic acid xenoantigen on human adipose tissue-derived stromal cells/mesenchymal stem cells leads to safer and more useful cell sources for various stem cell therapies, *Tissue Eng. Part A* 16 (2010) 1143–1155.
- [23] I. Sakaida, S. Terai, N. Yamamoto, et al., Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice, *Hepatology* 40 (2004) 1304–1311.
- [24] T. Takami, S. Terai, I. Sakaida, Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease, *Discov. Med.* 14 (2012) 7–12.
- [25] L.W. Weber, M. Boll, A. Stampfl, Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model, *Crit Rev Toxicol.* 33 (2003) 105–136.
- [26] D.A. Chistiakov, P.A. Chistiakov, Strategies to produce hepatocytes and hepatocyte-like cells from pluripotent stem cells, *Hepatol. Res.* 42 (2012) 111–119.
- [27] M. Imamura, T. Aoi, A. Tokumasu, et al., Induction of primordial germ cells from mouse induced pluripotent stem cells derived from adult hepatocytes, *Mol. Reprod. Dev.* 77 (2010) 802–811.
- [28] J. Meyburg, G.F. Hoffmann, Liver, liver cell and stem cell transplantation for the treatment of urea cycle defects, *Mol. Genet. Metab.* 100 (Suppl. 1) (2010) S77–S83.
- [29] Y. Iimuro, D.A. Brenner, Matrix metalloproteinase gene delivery for liver fibrosis, *Pharm. Res.* 25 (2008) 249–258.
- [30] B. Usunier, M. Benderitter, R. Tamarat, A. Chapel, Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough, *Stem Cells Int.* 2014 (2014) 340257.





## Original Article

# Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells

Masao Ozasa<sup>1)</sup>, Keigo Sawada<sup>1)</sup>, Tomoaki Iwayama<sup>1)</sup>,  
Satomi Yamamoto<sup>1)</sup>, Chiaki Morimoto<sup>1)</sup>, Hanayuki Okura<sup>2)</sup>,  
Akihumi Matsuyama<sup>2)</sup>, Hiroshi Komoda<sup>3)</sup>, Chun Man Lee<sup>3)</sup>,  
Yoshiki Sawa<sup>3)</sup>, Masahiro Kitamura<sup>1)</sup>, Tomoko Hashikawa<sup>1)</sup>,  
Masahide Takedachi<sup>1)</sup> and Shinya Murakami<sup>1,\*</sup>)

<sup>1)</sup>Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan

<sup>2)</sup>Department of Somatic Stem Cell Therapy and Health Policy, Foundation for Biomedical Research and Innovation, Hyogo, Japan

<sup>3)</sup>Medical Center for Translational Research, Osaka University Hospital, Osaka, Japan

Several stem and progenitor cells are currently under investigation for their application in cell-based therapy for periodontal tissue regeneration. The present study evaluates periodontal tissue regeneration following transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells (ADMPCs) into periodontal tissue defects in beagle dogs.

ADMPCs were isolated from the greater omentum and their characteristics were identified using *in vitro* studies. Flow cytometric analysis demonstrated that the isolated ADMPCs were CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, and CD90<sup>+</sup>. When cultured in mineralization-inducing media, these cells upregulated osteogenic genes and formed calcified nodules. Gene expression of the periodontal ligament specific gene, *PLAP-1*, was also increased. In addition, culture in adipogenic media resulted in accumulation of intracellular lipid droplets, suggesting multi-lineage differentiation capability of ADMPCs.

The efficacy of ADMPC transplantation for periodontal regeneration was evaluated using a beagle dog model. The furcation bone defects were surgically created and autologous transplantation of ADMPCs with fibrin gel was performed. Six weeks after transplantation, periodontal regeneration was analyzed using micro-CT, which showed a significant increase in bone formation at sites where ADMPCs were applied compared with control sites. Histological analysis revealed new cementum formation on the instrumented root surface was significantly increased following ADMPC transplantation and connective tissue fibers were inserted vertically in newly formed bone and cementum. Importantly, no instances of undesirable healing, such as root resorption or ankylosis, were observed at any sites examined. These results indicate that transplantation of ADMPCs with fibrin gel promotes periodontal tissue regeneration.

Rec.11/20/2013, 1/14/2014, pp109-116

\* Correspondence should be addressed to:

Shinya Murakami, DDS, PhD, Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, 1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Phone: +81-6-6879-2930, FAX: +81-6-6879-2934, E-mail: ipshinya@dent.osaka-u.ac.jp

### Key words

adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells, beagle dog, cell therapy, periodontal tissue regeneration, periodontitis