

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業  
(再生医療関係研究分野)

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 落谷 孝広

平成26(2014)年5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- hAD-MSC の肝障害・肝硬変モデルにおける体内動態・分化状態の研究および総括—— 3  
落谷 孝広

## II. 分担研究報告

1. 最新のゲノム科学による hAD-MSC の性状解析 —— 6  
石川 俊平

2. hAD-MSC の培養及び動物実験全般、デジタル PCR 及び並列型シーケンサ実務全般 —— 8  
石井 強

- . 研究成果の刊行に関する一覧表 —— 10

- . 研究成果の刊行物・別刷 —— 11

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

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

### 研究要旨

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

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

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

## A . 研究背景、目的 (背景)

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

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

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

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

## B . 研究方法

### ストレス応答性 miRNA の探索及び同定

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

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

### 肝障害モデル

BALB/c マウスの腹腔内に四塩化炭素を投与し肝障害を誘発した。四塩化炭素投与 1 日後に  $1 \times 10^6$  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、 $1 \times 10^6$  cells/body の用量で hAD-MSC を

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

蛍光標識 hAD-MSCs による体内動態解析

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

### (倫理面への配慮)

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

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

## C. 研究結果

### 1. hAD-MSC の均質性評価系の構築の基盤研究：

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

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

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

(達成度:80%/100%)

### 3. デジタル PCR による生着細胞の絶対定量：

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

## D. 考察

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

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

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

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

### 特記事項

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

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

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

## 2. 評価委員会コメントへの対応状況

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

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

コメント2：ゲノム解析に終始する事にならないか懸念

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

コメント3：細胞の供給源はどこか？

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

コメント4：蛍光マーカーとの感度等の比較は？

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

コメント5：細胞機能の影響についての考慮は？

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

## E. 結論

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

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

## F. 健康危険情報

特に無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

### 2. 学会発表

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 1. その他

なし



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

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

### 研究要旨

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

### A. 研究背景、目的 (背景)

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

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

平成25年度の研究分担として、東京医科歯科大学では、hAD-MSC 培養上清中の分泌型 miRNA のデジタル PCR による定量解析法の評価系構築、及びデジタル PCR によるマウス肝臓中のヒト由来細胞の定量解析法の評価系構築を行った。

### B. 研究方法

hAD-MSC 培養上清中の miRNA 定量法の構築

Lonza 社から購入した hAD-MSC をフラスコで 4 継代培養した細胞 (P4 細胞) および 11 継代培養した細胞 (P11 細胞) を作成、それぞれの培養上清からエクソソームを精製した。精製エクソソーム中の RNA を鋳型として miR-xxx 特異的逆転写プライマーを用いて逆転写を行った。得られた逆転写産物を鋳型とし

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

マウス肝臓中のヒト由来細胞の定量法の構築

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

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

### (倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

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

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

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

#### **D. 考察**

hAD-MSC培養上清中のmiRNA絶対定量法の構築

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

マウス肝臓内のヒト由来細胞の絶対定量法の構築

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

#### **E. 結論**

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

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

#### **F. 研究発表**

##### **1. 論文発表**

特になし。

##### **2. 学会発表**

特になし。

#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

特になし。

##### 2. 実用新案登録

特になし。

##### 3. その他

特になし。



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

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

## 研究要旨

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

## A. 研究背景、目的 (背景)

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

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

平成 25 年度の研究分担として、ロート製薬では、hAD-MSC のストレス負荷による培養上清中分泌型 miRNA の発現プロファイル解析及びストレス応答性のバイオマーカーとなる miRNA の同定、さらに hAD-MSC の肝障害モデルマウス及び肝線維化モデルマウスを用いた有効性評価、及び体内動態解析の従来法として蛍光標識 hAD-MSC による高感度 in vivo imaging 技術を用いた体内動態解析を行った。

## B. 研究方法

ストレス応答性 miRNA の探索及び同定  
Lonza 社から購入した hAD-MSC を培養フラスコで 4 継代培養した細胞 (P4 細胞) および 11 継代培養した細胞 (P11 細胞) を作製、それぞれの培養上清からエ

クソソームを精製した。精製したエクソソームを Agilent 社 Human miRNA microarray により P4 細胞及び P11 細胞から分泌された miRNA 発現プロファイルを比較した。

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

### ●肝障害モデル

BALB/c マウスの腹腔内に四塩化炭素を投与し肝障害を誘発した。四塩化炭素投与 1 日後に  $1 \times 10^6$  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、 $1 \times 10^6$  cells/body の用量で hAD-MSC を尾静脈から投与した。細胞投与 4 週間後、マウスから採血及び肝臓を摘出し、各種生化学検査及び Masson trichrome 染色により線維化部分を染色し、画像解析により線維化部分の面積を算出した。

蛍光標識 hAD-MSCs による体内動態解析

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

### (倫理面への配慮)

本研究課題で用いるヒト脂肪由来間葉系幹細胞はインフォームドコンセントを得て取得されたものであり、海外の市販品を購入するため倫理的な問題は起こらない。また本研究課題においてはヒトへの臨床応用は実行されない。動物実験は、国立がん研究センターおよび委託試験先である三菱メディエンスの定める動物実験指針の

基準に従うとともに、動物倫理委員会の承認を得たうえで、動物の苦痛軽減に努め、動物愛護の精神に基づく実験を行う。

### C. 研究結果

ストレス応答性 miRNAの探索及び同定

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

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

#### ●肝障害モデル

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

#### ●肝線維化モデル

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

蛍光標識hAD-MSCsによる体内動態解析

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

### D. 考察

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

hAD-MSCsの急性肝障害モデルマウスによる有効性評価においては、細胞投与により血清中AST及びALTの低下が認められた。本効果については再現性も確認されており、hAD-MSCの肝障害への有効性が示唆された。一方で、四塩化炭素の頻回投与による肝線維化モデルマウスによる有効性評価においても血

清中AST及びALTが低下傾向を示すと共に、hAD-MSCs投与により肝線維化面積の縮小が認められた。しかしながら再現性の確認は必要であり、今後評価項目を追加して試験を行う予定である。

hAD-MSCsの肝線維化モデルマウスにおける体内動態を評価すべく、蛍光色素(DiR)で標識したhAD-MSCs投与後のマウス全身の蛍光強度変化をIn Vivo Imaging System(IVIS)を用いて観察した。投与直後は、肺付近に強い蛍光シグナルがみられ、その後、肝臓付近にも蛍光シグナルが観察された。今後、投与後の各臓器における細胞数の定量化方法確立の検討として、東京医科歯科大学においてデジタルPCRの手法を用い、移植細胞の絶対定量評価の検討を進める予定である。

### E. 結論

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

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

### F. 研究発表

特になし。

#### 1. 論文発表

JSM Regenerative Medicine, in press

#### 2. 学会発表

特になし。

### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

#### 1. 特許取得

特になし。

#### 2. 実用新案登録

特になし。

#### 3. その他

特になし。

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeshi Katsuda, Nobuyoshi Kosaka, Fumitaka Takemura, Fumio Ochiya, and Takahiro Ochiya.	The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles.	Proteomics	13	1637-1653	2013
Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K, Seki A, Komura T, Higashimoto M, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S.	Adipose tissue derived stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4 <sup>+</sup> T-cell suppression.	Eur J Immunol	43	2956-2968	2013
Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, Yoshioka Y, Takemura Y, Ochiya T, Ochiya T, Sakai Y, Kuroda M, Ochiya T.	Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes.	Sci Rep	3	1197	2013
Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, Honda M, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S.	Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model.	Hepatology	58	1133-1142	2013
Kurata H, Tamai R, Katsuda T, Ishikawa S, Ishii T and Ochiya T*	Adipose-derived mesenchymal stem cells in regenerative medicine treatment for liver cirrhosis	JSM Regenerative Medicine			In press