

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10357

研究課題名(和文)急性放射線障害に対するヒト胎盤系間葉細胞治療の非臨床有効性検証研究

研究課題名(英文) Non-clinical evaluation of PLX-R18, Placenta-derived Mesenchymal-like Stromal Cells for GI-ARS mouse model

研究代表者

稲野 彰洋 (INANO, AKIHIRO)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30437933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：急性放射線障害に対するヒト胎盤系間葉細胞治療の非臨床有効性検証研究のため、マウスのGI-ARSモデルを作成し、致死放射線量の照射後、R18細胞投与の有無による生存評価、組織学的な評価を行った。骨髄機能を一部残す部分照射において、R18細胞の投与効果を予備的に見出すことができた。高度の放射線被ばくによる細胞障害に有効な薬剤は未だに存在せず、R18細胞による治療は有力な候補となる。米国で臨床薬理試験を実施済みであり、Animal Ruleにより使用待機となっている。引き続き、使用方法など、臨床使用に備えた検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

東京電力福島第一原子力発電所の廃炉作業に現在も多くの作業員が従事している。2011年の爆発事故に象徴されるように、高度の放射線被ばくを伴う事故の発生に対処するための準備は必要である。現時点で、高度の放射線障害に対応する治療薬は無く、バイオ企業等が持つ技術や成果からの応用の可能性のあるものを見出し、備えておく必要がある。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the efficacy of PLX-R18 against Acute Radiation Syndrome, we developed ARS mice model. Preliminary data showed PLX-R18 administration after partial body irradiation was effective on survival and histological damages. There is no remedy for ARS, especial GI damage. PLX-R18 can be a possible candidate for this purpose. In US, clinical pharmacology studies have been finished and approved for emergency use under the US animal rule. However, the further investigations are needed for ARS proper indications.

研究分野：臨床薬理

キーワード：急性放射線障害 臨床薬理 細胞医療

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2011年3月11日に発生した東日本大震災に続く福島第一原子力発電所の水素爆発により、多量の放射能が、主に福島県に拡散し、「放射線(能)災害」に関して世界的に関心が高まっている。

急性放射線被ばくによる半数致死線量(LD50)は4Sv程度と考えられてきたが(表1)、これは骨髄障害による死亡する線量であり、骨髄移植が比較的簡単に施行可能となった現在では、さらに多くの線量を被ばくした時に生じる腸管死に関する研究が必要と考えられる。実際、1986年に起きた、「チェルノブイリ原子力発電所事故」では、33名(ソ連政府の発表であり実際にはもっと多くの死者が確認されている。)が急性放射線障害により亡くなっているが、その中には腸管障害が死因と考えられる報告も多数ある。逆に、1999年に起きた、いわゆる「東海村JCO臨界事故」では、3名の被ばく者のうち2名が死亡したが、死因は多臓器不全であり、確かに我が国の最先端かつ手厚い医療が十分に提供できれば、急性放射線障害のうち骨髄死・腸管死は免れ得る可能性があることが示されている。原発事故の様に被ばく者が多数・広範囲に及ぶ場合には、JCO事故のような手厚い医療体制を構えることは難しく、簡便に・素早く施行可能な治療法の開発が必須である。しかし、長年の研究にも関わらず急性放射線障害(Acute Radiation Syndrome: ARS)に対する治療薬は承認されたものがなく、満足な医学的対応措置は限定されている。

Pluristem社(本社イスラエル)が開発するPLX細胞は、投与前の組織適合性検査を必要としない、ヒト胎盤由来の間葉細胞である。この細胞が炎症組織等から放出されるシグナル物質に応答して、ケモカインやサイトカイン、増殖因子などを分泌して治療的に組織を修復することが作用機序と想定されている。さらに3D増殖技術により、間葉細胞の抗炎症性、血管形成性、組織再生性、細胞保護性などの特性を選択し、疾患適応性を検討できることが判明している。また既成品(在庫可能)であることから、被ばく医療としての常時待機が可能な医薬品に位置づけることが可能である。これは大規模の被ばく事故が発生した場合の対応に必要な特性である。

表1 急性全身被ばくによる死亡に関する線量と生存期間

全身吸収線量(Gy)	死亡をもたらす主な影響	被ばくから死亡までの期間(日)
3~5	骨髄の損傷(LD <sub>50</sub> )	30~60
5~15	胃腸管および肺の損傷 <sup>1)</sup>	10~20
> 15	神経系の損傷 <sup>1)</sup>	1~5

①特に高線量における血管系と細胞膜の損傷が重要である。

【出典】杉浦伸之:放射線生物学, 通商産業研究社(2001年), p61

### 2. 研究の目的

新たな原発事故や廃炉作業員の被ばく事故などに備え、急性放射線障害に対する治療手段の充実には至っていない。急性放射線障害の対症療法の一つとして間葉細胞移植が期待されているが、実用化には至っていない。今般、ヒト胎盤系間葉細胞による急性放射線障害の治療レジメの有効性を非臨床試験で確立(proof of principle)することを計画した。本研究では、急性放射線障害でも重要な腸管毒性に対する間葉細胞移植の効果・安全性について、マウスモデルを用い非臨床的に検証を進める。

### 3. 研究の方法

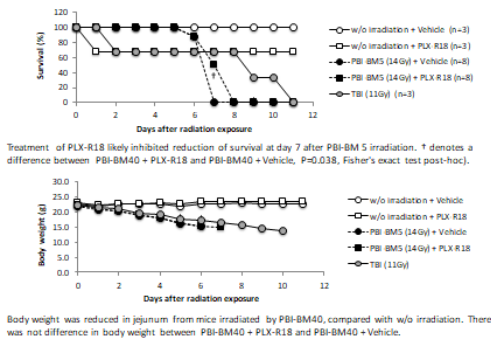
8週令、雄性マウス(C57BL6J)に対して、放射線照射装置(HITACHI MBR-1520R-3)を使用して6-15Gyの放射線を照射した。照射方法は、全身照射(Total Body Irradiation; TBI)と部分照射(Partial Body Irradiation; PBI)を行った。日内リズムを考慮し、照射時間は日中の13時から16時半の間に完了するようにした。

照射日をday0とし、day1とday5にPLX-R18細胞懸濁液( $2.0 \times 10^6$  cells)を筋肉注射した。生存、体重、下痢の有無を放射線照射から10日間確認した。Day4とday10に空腸を摘出し、組織学的な検査を行った。

### 4. 研究成果

TBI照射後のPLX-R18投与による生存率への効果は認められなかった。TBI11Gy照射は、10日ほどで100%死亡に至る。死因は特定していないが、空腸の組織染色からも組織障害が十分に発生していることを確認した。(図1と図2)

Figure 4 R18 effects on survival rate and body weight after PBI-BM5 (14Gy)



DMS

(n=5)

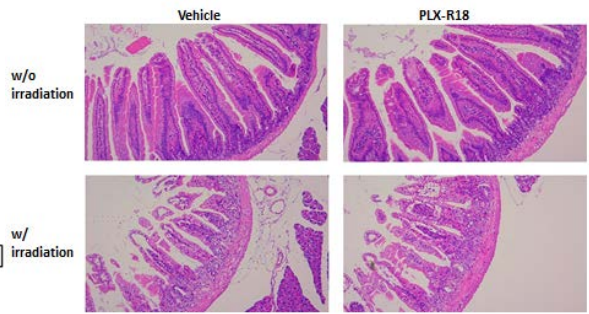
R18 (n=4)

(n=4)

w/o irradiation

w/ irradiation collected.

Figure2 Effects of PLX-R18 on GI-ARS Micromorphological Observation of jejunum at 4 days after TBI11Gy



TBI では PLX-R18 効果が観察できないと判断し、PBI の照射条件を確認した。鉛遮蔽と照射部位を工夫することで、PBI-BM5 と PBI-BM40 の照射条件を作成した。BM5 と BM40 はそれぞれ、骨髄の 5%、40%の面積を鉛遮蔽した状態での照射を指し示す。その結果、TBI11Gy と同程度の生存条件（照射後 10 日程度で全死亡）と空腸組織の十分な破壊を確認できた（図 3）。

Figure 3-1 Survival rate and body weight changes after Irradiations without R18.

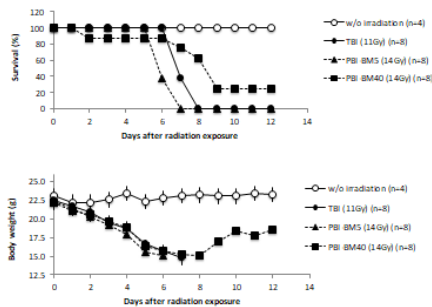
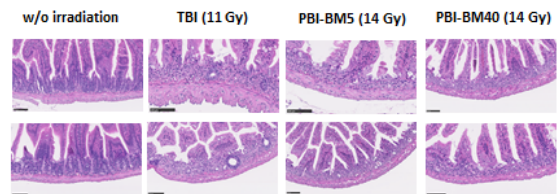


Figure 3-2 Images of HE stained jejunum at 4 day after irradiation.



The Crypt cells were reduced or lost in jejunum from mice irradiated by TBI, PBI-BM5 and PBI-BM40, compared with w/o irradiation.

この条件下で、PLX-R18 細胞の投与効果の確認を行ったところ、図 4 と図 5 に示すように、わずかなら、生存率と体重への良好な効果を得ること出来た。骨髄遮蔽により保存されている骨髄機能が保持されていることが、PLX-R18 細胞の効果発現に必要であると推定される。ただし、この実験系では、死亡原因を特定していないために、機序の詳細は不明である。図 6 に示す空腸組織の観察では、PLX-R18 の効果は特定できなかった。

Figure 5 R18 effects on survival rate and body weight after PBI-BM40 (14Gy)

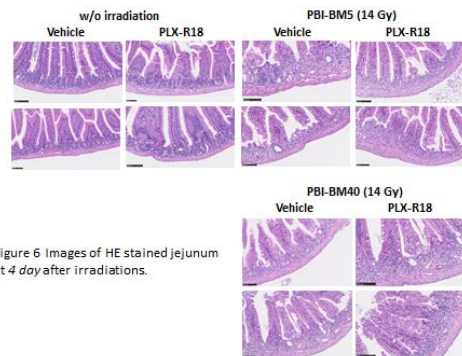
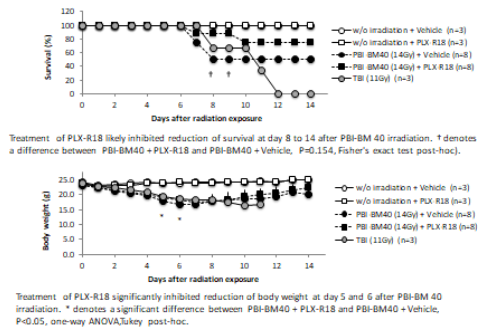


Figure 6 Images of HE stained jejunum at 4 day after irradiations.

集めた空腸組織の免疫染色による評価を行った。

小腸絨毛は、くぼみ部分に幹細胞、クリプトがあり、絨毛を構成する上皮細胞はクリプトから絨毛先端へ移動していく。Ki-67(緑)はクリプトのほぼすべての細胞で陽性となる。OLFM-4(赤)は幹細胞のみで発現する。

図 7 は、PBI-BM40 の 4 日後の空腸組織の免疫染色である。放射線照射がなし正常組織（左上）では、緑は帯状となり、基底部のみに赤色部分が存在する。放射線照射をせずに PLX-R18 細胞を投与しただけ（右上）では、正常と違いはない。放射線照射による障害（左下）は、ほぼ完全に

クリプトを破壊し、大量の上皮細胞の細胞死を引き起こしている。幹細胞もほぼ消滅している。それに比べて PLX-R18 投与を行う (右下) では、低頻度ながらクリプトおよび幹細胞の生存が認められる。

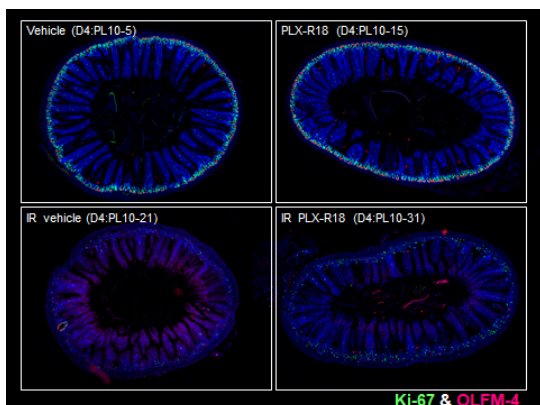


図 7 PBI-BM40 Day4

対照群の PBI-BM40 の 10 日後 (図 8) では、クリプトや絨毛構造の回復が見られているが、その形状や構造はいびつである。白矢印のように幹細胞が脱落している箇所、赤矢印のように構造そのものを失っている箇所が散見される。この状況は、電解質の喪失、感染症のリスクを大きく高める消化管障害である。

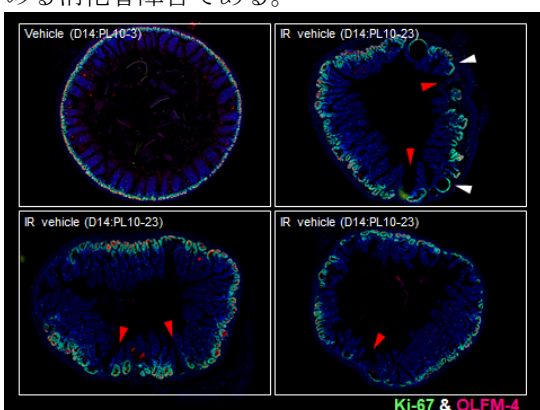


図 8 PBI-BM40 Day10 Control

PLX-R18 投与群の PBI-BM40 の 10 日後 (図 9) では、クリプト、幹細胞の回復が著しく、構造的な回復が良い。それでも障害箇所が散見される。

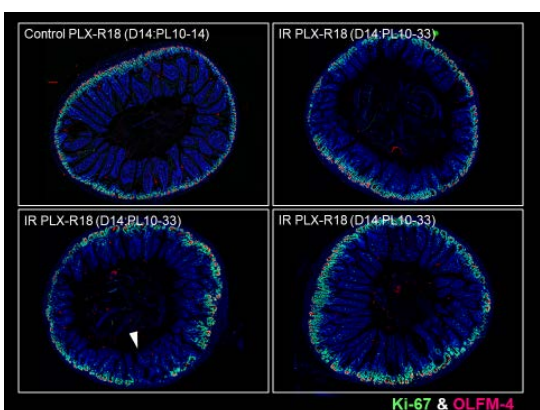


図 9 PBI-BM40 Day10 PLX-R18

図 8 と図 9 の比較が示すように、定性的には PLX-R18 の効果が、クリプト、幹細胞の回復、絨毛構造の回復という点で、確認できる。クリプト構造の数、クリプト構造中の Ki67 陽性細胞数などの定量解析を試みているが、個体差も大きく、結論に到達できていない。

Vim9 は、ヒト間葉細胞マーカーであり、PBI-BM40 の 10 日後の空腸組織には、陽性細胞は認められなかった (図 9)。マウス大腿部に筋肉内投与した PLX-R18 細胞は、空腸に移動していない。

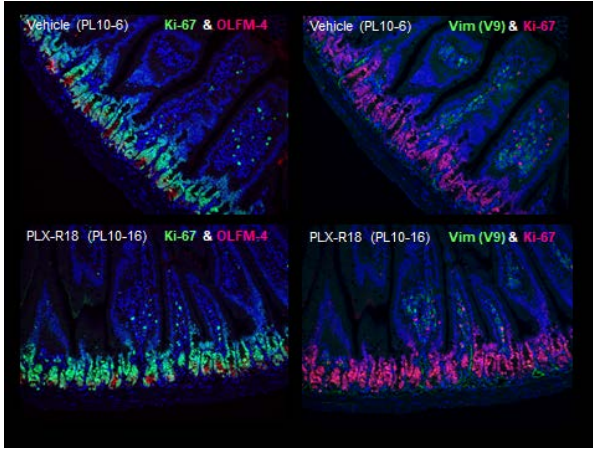


図 9 PBI-BM40 Day10 PLX-R18

以上のことから、

PLX-R18 細胞は、放射線照射による死亡率の効果がある。その効果の発現には骨髄機能の残存が必要であると思われる。また、消化管細胞への効果は、放射線照射によって惹起されたクリプト、幹細胞破壊に対して、Paracrine 効果（おそらく骨髄機能を通じて）により、クリプトの障害緩和、幹細胞の回復促進などの作用により、電解質喪失、感染症の防護に繋がる構造回復を促進していると推定される。

#### 今後の臨床応用

PLX-R18 は、イスラエルの Pluristem 社が製造、臨床開発を進めている細胞医薬品である。本研究を進めている期間においては、本細胞医薬品が承認された国はない。米国で骨髄移植不全時の骨髄機能回復を目的とした臨床薬理試験が実施されていて、ヒトでの使用経験をすでに有している。米国、イスラエルでは、animal rule に基づいて、公衆衛生上の緊急事態に備える医学的対策として、緊急使用許可を得られている。PLX-R18 は、放射性/核物質によるテロや攻撃に対する大規模使用の備えとして、と説明を受けている。実際に、PLX-R18 製剤は、バイアル封入された細胞医薬品として備蓄可能であり、使用に際して、培養などの待機時間が不要である。今回の研究では、高度の放射線被ばく後の医学的対策として検討を進めたが、被ばく前の予防的な使用での効果検討を進める計画がある、と説明を受けている。

日本国内では、福島第一原子力発電所の廃炉作業が進行中であるが、上記の備えに相当する準備環境がない。今回の研究結果が一部、ポジティブに出たことで、PMDA の他、厚労省厚生科学課、医療機器審査管理課、原子力規制庁、放射線総合医学研究所などと意見交換を行ったが、使用を正当化できる根拠は見出すことができなかった。

2017 年 6 月に発生した日本原子力研究開発機構大洗研究開発センターで発生した作業被ばく事故では、事故放射性物質のキレート剤（体外排出促進剤）が、被ばく作業員に対して使用されている。こうした未承認薬剤が使用された背景は確認できていないが、事故対策マニュアルなどでの使用想定がされている、という事実が大きいようである。現在のマニュアルに記載されている薬剤は、放射線被ばく低減のための放射性物質の体外排出促進剤だけである。

PLX-R18 は、放射線による細胞障害軽減を意図としており、類似の作用を念頭とした薬剤は、このマニュアルに記載されていないようである。

2018 年度から施行されている臨床研究法は、臨床試験での未承認薬使用も前提としているため、臨床研究としての使用の可能性はあると考えられる。今後、PLX-R18 の安全性を事前に確認しつつ、使用待機のための知見の集積が待たれる。

また、海外ではこうしたベンチャー企業に開発意欲が高いようであり、今回の研究結果を受けて、別の海外ベンチャーから別の医薬品評価の検討を依頼されている。Unmet なニーズに応じるための開発パスの導入は、創薬機会や意欲の拡大につながると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshiyuki Soeda, Racheli Ofir, Noa Sher, Yoshiyuki Suzuki, Zami Aberman, Akihiro Inano
2. 発表標題 PLX-R18- Placenta-derived Mesenchymal-like Stromal Cells are efficacious in reducing lethality in Gastrointestinal Acute Radiation Syndrome (GI-ARS) Mouse Model
3. 学会等名 18th world congress of basic and clinical pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	織内 昇 (Oriuchi Noboru) (40292586)	福島県立医科大学・医学部・教授  (21601)	
研究分担者	鈴木 義行 (Suzuki Yoshiyuki) (60334116)	福島県立医科大学・医学部・教授  (21601)	
研究分担者	長谷川 有史 (Hasegawa Arifumi) (70404879)	福島県立医科大学・医学部・教授  (21601)	
研究分担者	原 孝光 (Hara Takamitsu) (70464542)	群馬県立県民健康科学大学・診療放射線学部・教授  (22304)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	添田 義行  (Soeda Yoshiyuki)  (10553836)	福島県立医科大学・医学部・助教     (21601)	