

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293229

研究課題名(和文) ムコ多糖症に対する細胞医薬品の開発にむけた基礎研究

研究課題名(英文) Transplantation of adipose tissue derived multilineage progenitor cells via portal vein improved serum levels of mucopolysaccharidosis model mice.

研究代表者

松山 晃文 (Matsuyama, Akifumi)

大阪大学・国際医工情報センター・招へい教授

研究者番号：10423170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生体内で分化生着した脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPC)由来再生肝細胞がムコ多糖症で欠損するライソゾーム加水分解酵素を持続的に分泌することを機序としている。

ADMPCの経門脈的投与により、ムコ多糖症モデル動物であるGM1-Gangliosidosis mouseで欠損している β -Galactosidaseを血中に発現、効果が長期持続することを明らかにした。ADMPCが肝臓内で肝細胞へと分化誘導されており、“in situ reprogramming”との概念を提唱した。治療へはin situ stem cell therapyとして展開することとなる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of this study is in vivo engrafted reprogrammed-hepatocyte from adipose tissue derived multilineage progenitor cell, so called ‘ADMPC’ sustained secrete and supplied lysosomal hydrolase deficient in mucopolysaccharidosis to the whole body. Via the portal vein administration of ADMPC, β -galactosidase that are deficient GM1-gangliosidosis mouse, which is a mucopolysaccharidosis model animal had expressed in the blood, and the effect has been revealed that long-lasting. ADMPC have been induced to differentiate into hepatocytes in the liver, so we proposed the new concept of the “in situ reprogramming”. The concept is different from “Reprogramming”, reprogrammed terminal differentiated cell to pluripotent cells and “direct reprogramming”, to differentiate directly to the target cells in vitro gene transfer, so far. We are going to deploy this as in situ stem cell therapy to the treatment.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 ムコ多糖症 ライソゾーム病 遺伝子疾患

1. 研究開始当初の背景

ムコ多糖症に代表されるライソゾーム病は、ライソゾーム加水分解酵素の先天性欠損により中間代謝産物がライソゾーム内に蓄積し、骨変形や肝脾腫、知能障害など様々な症状を呈する先天性疾患群である。根治的治療はなく、対症療法として酵素補充療法製剤が承認された疾患もあるものの、それは一部疾患にすぎず、新規機序製剤の開発が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究事業では、脂肪組織由来多系統前駆細胞を、ムコ多糖症などライソゾーム病を適応とする細胞製剤として臨床応用することを目的とする。

本研究にあたり、生体内で分化生着した脂肪組織由来多系統前駆細胞由来再生肝機能細胞がムコ多糖症などライソゾーム病で欠損するライソゾーム加水分解酵素を持続的に分泌、血流を介して全身細胞組織に供給することを機序としている。根治的治療により近い新規概念の製剤であり、その開発を目指し有効性にかかる基礎的知見を集積することを本研究の目的としている。

3. 研究の方法

ムコ多糖症に代表されるライソゾーム病の一部疾患で製剤として確立している酵素補充療法は、多くのライソゾーム加水分解酵素が末端にマンノース6リン酸と呼ばれるライソゾーム限局シグナルを有することを利用して、マンノース6リン酸受容体は広く細胞膜表面に存在し、細胞外に存在するマンノース6リン酸結合型加水分解酵素と ligand-receptor binding し、それを receptor mediated endocytosis する。酵素補充療法はこの輸送系を利用して、欠損している酵素を製剤として体外から投与することにより、細胞内に欠損酵素を補充し、ライソゾーム内に蓄積する物質の分解を促進するものである。

本研究にて開発を目指す細胞製剤は、生体内に生着分化することで、欠乏している酵素を補充し続けることをその Mode of Action としている。従って、脂肪組織由来多系統前駆細胞が生体内で再生肝機能細胞として分化生着し、ライソゾーム加水分解酵素を持続的に分泌、全身の細胞組織に供給することを確認することができれば、ライソゾーム病に対する新規機序細胞医薬品として研究開発を進めることの Proof of Concept が得られる。このようなコンセプトのもと、以下の計画を立案、実施した。

1) in vitro 脂肪組織由来多系統前駆細胞のガラクトシダーゼ発現の検討：

ガラクトシダーゼはマンノース6リン酸結合型酵素であり、細胞表面のマンノース6リン酸受容体を介して細胞に保持される。マンノース6リン酸あるいはマンノースアミンを過剰に添加して培養すると、competitionにより酵素は乖離、あるいはマンノース6リン酸の結合を阻止すると想定、その上清にガラクトシダーゼ活性が出現すると想定、解析した。コントロールとしての肝細胞と脂肪組織由来多系統前駆細胞の双方で当該細胞は検出可能であり、マンノース6リン酸およびマンノース6リン酸合成阻害剤であるマンノースアミンによる competition にて培養上清への分泌を検討することとした。

2) 脂肪組織由来多系統前駆細胞の再生肝機能細胞への分化生着の確認

ライソゾーム病モデルマウスへの脂肪組織由来多系統前駆細胞投与により、当該細胞が肝内に生着し、肝細胞に分化することを確認する。具体的には、(独)医薬基盤研究所生物資源バンクよりムコ多糖症モデルマウスとして、GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスを入手し、経門脈的ないし経尾静脈的に脂肪組織由来多系統前駆細胞投与を投与して肝細胞として分化生着を検証する。

GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスへの細胞の投与は、下記により実施した。30G針を取り付けた注射筒を用いて、経門脈的投与においては、吸入麻酔下で、開腹後経門脈的に注射針を刺入した。チューブ内の血液逆流を確認後、投与検体を投与した。経尾静脈的投与においては、無麻酔科でマウス尾静脈に投与した。投与検体は、マウス由来脂肪組織由来多系統前駆細胞であり、経門脈的あるいは経尾静脈的に1回投与した。3か月後に処置日と同様の方法にて深麻酔状態して開腹開胸、心腔から採血を行った後に腹部大動脈を切開し放血させ、安楽死させた。肝臓は摘出し、組織学的に検証した。また、採取した血液より、血液学的検索を行った。

(倫理面への配慮)

1. 非臨床試験(研究)において遺伝子改変動物、プラスミドDNAあるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。

2. 動物操作に当たっては、(公財)先端医療振興財団の動物実験規定に従って行なう。

3. 臨床試研究の実施にあつては、計画書(プロトコール)に関して医学倫理委員会での承認を受け、本人の書面による informed consent を取得した患者のみを対象とする。

4. 研究成果

生体内で生着・分化した脂肪組織由来多系統前駆細胞由来再生肝機能細胞がライソゾーム加水分解酵素を持続的に分泌、全身の細胞組織に供給することを機序とした根治的治療法に近い新規概念の細胞医薬品の開発を目指し、臨床試験を開始するための有効性にかかる基礎的知見を収集した。

1) *in vitro* 脂肪組織由来多系統前駆細胞のガラクトシダーゼ発現の検討:

ガラクトシダーゼはマンノース6リン酸を持ち、細胞のマンノース6リン酸受容体を介して細胞に保持されることから、マンノース6リン酸あるいはマンノースアミンを過剰に添加して培養、その上清の活性を測定した。コントロール肝細胞と脂肪組織由来多系統前駆細胞の双方で当該細胞は検出が可能であり、マンノース6リン酸およびマンノース6リン酸合成阻害剤であるマンノースアミンによる濃度依存性 competition から当該酵素は培養上清に分泌されたと想定された。酵素分泌というMOAが確認された。

2) 脂肪組織由来多系統前駆細胞の再生肝機能細胞への分化生着の確認:

(独) 医薬基盤研究所生物資源バンクよりGM1-ガングリオシドーシスモデルマウスを受精卵凍結融解後の産生仔での分譲を受け、繁殖後脂肪組織由来多系統前駆細胞を移植した。この際、KOモデルを選択している。

モデルマウスの血清にはガラクトシダーゼ活性をほぼ認めないが、脂肪組織由来多系統前駆細胞の経門脈的あるいは経尾静脈的投与にて健常対象コントロールマウスのいずれの移植方法においても脂肪組織由来多系統前駆細胞が、ムコ多糖症モデル動物であるGM1-ガングリオシドーシスマウスで欠損しているガラクトシダーゼを血中に発現させ、その効果持続期間が3カ月は少なくとも持続することを明らかになった。移植3か月後においても、野生型マウスと比較し4割程度の活性を維持していた。

ライソゾーム内加水分解酵素が他組織細胞に供給され治療効果を期待しうることを確認するため、GM1-ガングリオシドーシスモデルマウスにおける肝臓以外の組織におけるガラクトシダーゼの存在を免疫組織化学的に検証したところ、8割程度が陽性であった。

3) 有効性

脂肪組織由来多系統前駆細胞が、経門脈的投与によりムコ多糖症モデル動物であるGM1-ガングリオシドーシスマウスで欠損しているガラクトシダーゼを血中に発現させ、その効果持続期間が3カ月は持続することが明らかとなった。GFP-mouse 脂肪組織由来多系統前駆細胞を経門脈的した試験系では、投与後にGFP陽性細胞が肝内に生着、アルブミン陽性細胞へと生着・分化することを確認した。これは投与細胞が *in situ* で肝細胞へと分化していることを示唆する(*in situ* reprogramming)。

肝細胞と脂肪組織由来多系統前駆細胞を共培養したところ、脂肪組織由来多系統前駆細胞はアルブミン陽性を示した。これは、脂肪組織由来多系統前駆細胞が *in situ* で肝細胞様に生着・分化するには、脂肪組織由来多系統前駆細胞と肝細胞の接触が必須であることが必要であることを示す。実際、GFP-mouse 脂肪組織由来多系統前駆細胞の肝内存在 pattern を観察すると、肝実質細胞と機能的コンタクトを有していた。

有効性用量設定試験を行ったところ、 1.5×10^6 /kg の用量まではガラクトシダーゼ血中濃度が上昇し、当該用量を超えるとガラクトシダーゼ血中濃度が plateau になることから、当該用量が至適用量であると推定した。また、3点以上の用量を設定した上で用量依存性があると言うことは、脂肪組織由来多系統前駆細胞が有効であることの証明である。

低分子化合物であれば、当該化合物が標的蛋白質に結合する、ないしは *in vitro* にて生理的作用を有することを確認することが第1段階であり、これを Proof of Concept の取得と定義する。本剤に関しては、生体内で肝細胞へと分化生着し、肝細胞として host 肝細胞と同等に機能することがその mechanism であるため、上記知見により、本剤は POC を取得したと言える。

これら POC を基盤とし、脂肪組織由来多系統前駆細胞が肝臓内で肝細胞へと分化誘導されていることから、“*in situ* reprogramming” との概念を提唱した。Terminal differentiated cell を *in vitro* にて多能性幹細胞化する “reprogramming”、遺伝子導入等で *in vitro* にて直接目的細胞へと分化させる “direct reprogramming” に加えて新しい概念であり、治療へは *in situ* stem cell therapy として展開することとなる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{ 雑誌論文 } (計 12 件)

1. Okura H., Morita M., Fujita M., Naba K., Hasebe-Takada N., Ichinose A., Matsuyama A. Sperm-Treated-Adipose Tissue-Derived Multi-Lineage Progenitor Cells Improve Left Ventricular Dysfunction in a Swine Model of Chronic Myocardial Infarction. *J Stem Cell Res Ther.* 2016. 6:2
2. Kanayasu-Toyoda T., Tanaka T., Ishii-Watabe A., Kitagawa H., Matsuyama A., Uchida E., Yamaguchi T. Cell-surface MMP-9 protein is a novel

- functional marker to identify and separate pro-angiogenic cells from early endothelial progenitor cells derived from CD133+ cells. *Stem Cells. Stem Cells*. 2016 Jan 29. doi: 10.1002/stem.2300. [Epub ahead of print]
3. Mizuno M., Katano H., Otabe K., Komori K., Matsumoto Y., Fujii S., Ozeki N., Tsuji K., Koga H., Muneta T., Matsuyama A., Sekiya I. Platelet derived growth factor (PDGF) -AA/AB in human serum are potential indicators of the proliferative capacity of human synovial mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015. 2015 Dec 10;6(1):243.
 4. Hayakawa T., Aoi T., Bravery C., Hoogendoorn K., Knezevic I., Koga J., Maeda D., Matsuyama A., McBlane J., Morio T., Petricciani J., Rao M., Ridgway A., Sato D., Sato Y., Stacey G., Sakamoto N., Trouvin J.H., Umezawa A., Yamato M., Yano K., Yokote H., Yoshimatsu K., Zorzi-Morre P.. Report of the international conference on regulatory endeavors towards the sound development of human cell therapy products. *Biologicals*. 2015 Sep;43(5):283-97
 5. Sawada K., Takedachi M., Yamamoto S., Morimoto C., Ozasa M., Iwayama T., Lee C.M., Okura H., Matsuyama A., Kitamura M., Murakami S. Trophic factors from adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells promote cytodifferentiation of periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 14;464(1):299-305
 6. Kanayasu-Toyoda T., Tanaka T., Ishii-Watabe A., Kitagawa H., Matsuyama A., Uchida E., Yamaguchi T. Angiogenic Role of MMP-2/9 Expressed on the Cell Surface of Early Endothelial Progenitor Cells/Myeloid Angiogenic Cells. *J Cell Physiol*. 2015 Nov;230(11):2763-75.
 7. 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*. 2015 Mar;43(2):146-9.
 8. Hayakawa T., Aoi T., Umezawa A., Ozawa K., Sato Y., 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*. 2015 Dec;1(2):57-69.
 9. Hayakawa T., Aoi T., Umezawa A., Ozawa K., Sato Y., 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*. 2015 Dec;1():70-80.
 10. Hayakawa T., Aoi T., Umezawa A., Ozawa K., Sato Y., 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*. 2015 Dec;1(2):81-94.
 11. Hayakawa T., Aoi T., Umezawa A., Ozawa K., Sato Y., 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*. 2015 Dec;1(2):95-108.
 12. Hayakawa T., Aoi T., Umezawa A., Ozawa K., Sato Y., 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*. 2015 Dec;1(2):109-122.
- 【学会発表】(計17件)
- 【国内学会：招待講演】
1. 松山晃文：ヒト由来組織の産業化にむけた課題 日本組織移植学会 2015年8月29日
 2. 松山晃文：再生医療推進の課題 第5回レギュラトリーサイエンス学会学術集会 2015年9月5日
 3. 松山晃文：日本の将来に向けた細胞治療の展望 日本免疫細胞治療学会学術集会 2015年12月5日
 4. 松山晃文：細胞製剤の品質、有効性及び安全性の確保 第6回レギュラトリーサイエンス学会学術集会 2015年12月11日
 5. 松山晃文：再生医療とOMICS 第15回日本再生医療学会総会特別シンポジウム 2016年3月19日

6. 松山晃文:「正しいモノを作る」から「正しくモノを作る」へ 再生医療が切り拓くバイオセーフティーの新規マーケット 関西バイオセーフティー研究会 2015年6月12日
7. 松山晃文:再生医療新法実施で見えてきた課題 再生医療倫理講習会 2015年10月31日
8. 松山晃文:再生医療の実用化にむけて 規制と知財の観点から 東北大学未来科学技術共同研究センター第6回先進医療コアシンポジウム 2015年12月10日
9. 松山晃文:共同座長 再生医療の臨床はどこまですすんだのか?」第15回日本再生医療学会総会 スポンサーシップシンポジウム2 2016年3月19日

【国内学会：一般講演】

10. 松山晃文:細胞製剤におけるCMCおよび非臨床試験 package について HS 財団 2015年7月31日
11. 松山晃文:平成24年5指針からみた品質について 第9回MCP策定会議 2015年8月6日
12. 松山晃文:平成24年5指針からみた品質について 第10回MCP策定会議 2015年8月7日
13. 松山晃文:平成24年5指針からみた品質について 第11回MCP策定会議 2015年9月7日
14. 松山晃文:平成24年5指針からみた品質について 第12回MCP策定会議 2015年9月15日

【国際学会：一般講演】

15. Okura H., Morita M., Fujita M., Naba K., Hasebe-Takada N., Ichinose A., Matsuyama A. Therapeutic potential of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells in non-alcoholic fatty liver disease Bridging the MOA and the POC for clinical application -in case study. ISSCR Stockholm Sweden. 2015. June 24-27.
16. Okura H., Morita M., Fujita M., Naba K., Hasebe-Takada N., Ichinose A., Matsuyama A. Allogenic spermine treated-adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction in a swine chronic myocardial infarction model. ICCAD Florence, Italy. 2015. No 29-Dec 2.
17. Best Poster Award. Okura H., Morita M., Fujita M., Naba K., Hasebe-Takada N., Ichinose A., Matsuyama A. in situ reprogrammed spermine treated-adipose tissue-derived

multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction in a swine chronic myocardial infarction model. Clinical applications of stem cell. Singapore. Feb. 24-25. 2016.

〔図書〕(計15件)

1. Okura H., Takada N., Morita M., Fujita M., Naba K., Ichinose A., Matsuyama A. Allogenic spermine treated-脂肪組織由来多系統前駆細胞s improve left ventricular dysfunction in a swine chronic MI model. Proceedings of the 11th International Congress on Coronary Artery Disease. 2015.
2. Okura H. and Matsuyama A. Critical Path Initiative for Regenerative Medicine in Japan. Gene Therapy and Cell Therapy Through the Liver. Springer Japan. 139-146.
3. 松山晃文 再生医療実現にむけた課題 BioClinica 31 (3) 2016 (253) PP.43-46
4. 大倉華雪・松山晃文 脂肪組織由来細胞を用いる冠動脈疾患治療戦略 日本臨床 in press
5. 松山晃文 ヒト幹細胞を用いる臨床研究指針の改正 『日本臨床』 2015年6月増刊号「再生医療 - 新たな医療を求めて - 」
6. 松山晃文 再生医療のこれまでとこれから 年報医事法学 30号 日本評論社
7. 松山晃文 先制医療における制度・行政の取り組み MEDICAMENT NEWS 第2225号 2016年3月15日
8. 松山晃文 再生医療用語ハンドブック」非臨床安全性試験 p311 メディカルトリビューン 2015: (17)
9. 松山晃文 再生医療用語ハンドブック」造腫瘍性試験 pp311-312 メディカルトリビューン 2015: (17)
10. 松山晃文 再生医療用語ハンドブック」効力又は性能を裏付ける試験 pp312 メディカルトリビューン 2015: (17)
11. 松山晃文 再生医療用語ハンドブック」体内動態 p312-313 メディカルトリビューン 2015: (17)
12. 松山晃文 再生医療用語ハンドブック」臨床試験 p313 メディカルトリビューン 2015: (17)
13. 松山晃文 再生医療用語ハンドブック」製造販売承認 p314 メディカルトリビューン 2015: (17)
14. 松山晃文 再生医療用語ハンドブック」市販後調査 p314-315 メディカルトリビューン 2015: (17)
15. 松山晃文 再生医療用語ハンドブック」ミニマム・コンセンサス・パッケージ

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

該当なし

取得状況(計 件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者:

松山 晃文(MATSUYAMA, Akifumi)
大阪大学
国際医工情報センター・招へい教授
研究者番号:
10423170

(2)研究分担者

該当なし()

研究者番号:

(3)連携研究者

該当なし()

研究者番号: