

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05679

研究課題名(和文) 脂肪組織由来多系統前駆細胞シートを用いた肝線維融解療法の開発

研究課題名(英文) To develop the effective treatment for hepatic fibrosis using Adipose Tissue-Derived.

研究代表者

大倉 華雪 (OKURA, Hanayuki)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・研究調整専門員

研究者番号：20589684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPC)からのサイトカイン分泌について検証した結果、肝内線維を溶解する作用を持つサイトカインが、通常の脂肪組織由来細胞等に比べ多量に分泌されており、本機序がMode-of-Actionになる可能性が示唆された。シート化条件検討としてTGF- $\beta$ 添加培養を試みた。シート化効率は良好であったが、抗炎症サイトカインの発現低下等を認め、肝硬変症へ適用する細胞調製には不適であり培養皿の前処理法を改善しシート化効率を高めた。ADMPCシートを肝硬変モデルラットに移植したところ、control群に対しシート投与群で有意な線維化率の改善を認め、治療効果が推定される結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：As a result of examining cytokine secretion from ADMPC, cytokine having the curative properties of dissolving hepatic fibrosis was secreted in a greater amount than fibroblasts or adipose tissue-derived cells. This mechanism might be Mode-of-Action. In order to investigate conditions for producing cell sheets, culturing ADMPCs with TGF- $\beta$  were examined. The efficiency of producing cell sheets were good, but unfortunately the expression of anti-inflammatory cytokines decreased. It was found to be unfavorable for preparing cells for treating to the liver cirrhosis. So, we improved pretreatment method for temperature sensitive culture dish and increased producing cell sheets efficiency. When the ADMPC sheets were transplanted into a liver cirrhosis model rats, compared with the control group, the fibrosis rate was significantly improved in the sheet administration group.

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪組織由来多系統前駆細胞 細胞シート 肝線維症 再生医療 再生医学 肝硬変 ADMPC 肝線維化

## 1. 研究開始当初の背景

昨今のB型およびC型ウイルス性肝炎治療法の開発は著しく、ウイルス排除によりその進行・増悪を抑制することが可能となっておりウイルス治療は一定の効果をあげている。しかしながら、ウイルス排除後の非代償性肝硬変にはいまだ治療法はなく、肝線維症に対する抗肝機能改善は必ずしも期待できていない。肝硬変患者自身から自己骨髄細胞液を採取、末梢静脈から点滴静注する臨床研究が実施されているが、全身麻酔下に400cc以上の自己骨髄細胞液を採取する必要があるため負荷が著しい。これら課題を克服する新規の肝線維溶解療法の開発が希求されている。

## 2. 研究の目的

これまでの我々の研究において、脂肪組織から、脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) の単離培養に成功、当該細胞が肝線維溶解機能の指標である MMPs を発現分泌し、慢性肝炎モデルマウスへの経尾静脈的投与で肝線維化が改善し、肝機能が血清学的に改善することを見出している。本研究では、ウイルス排除療法の適応とならず、肝線維化が進行し続け、肝硬変が悪化する患者を対象とした、新たな低侵襲肝臓再生療法としての「脂肪組織由来多系統前駆細胞シートを用いた低侵襲肝臓再生療法」を開発し、臨床応用することを最終目標とした。

局所麻酔下に採取する10cc程度と少量の脂肪組織から低侵襲で得られ、かつ肝線維溶解作用を有するADMPCを体外で培養・シート化し、肝臓表面に直接移植する。

肝線維溶解医療の細胞源として、脂肪吸引など形成外科手術の際の余剰組織として容易に採取できる脂肪組織に着目したことを特色とする。特に本研究では、脂肪組織由来多系統前駆細胞 (図1) を用いることを特色とする。

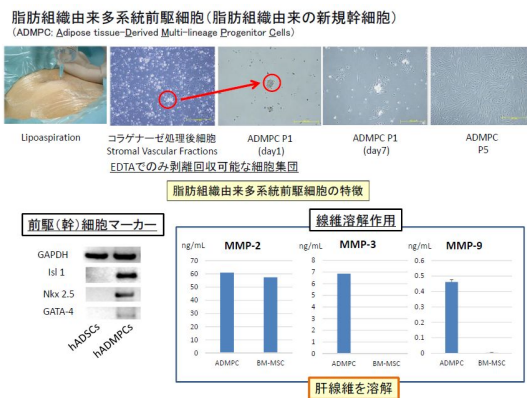


図1 新規間葉系幹細胞：脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC)

これまで、脂肪組織から、脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) の単離培養に成功、当該細胞が肝線維溶解機能の指標である MMPs を発現分泌し、四塩化炭素投与慢性肝炎モデルマウスへの経尾静脈的投与で肝線維化が改善し、肝機能が血清学的に改善することを見出している (図2)。

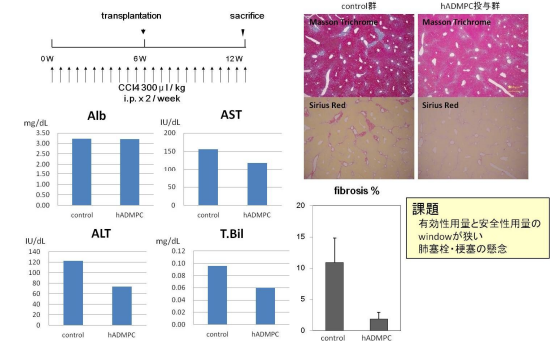


図2 ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞経静脈的投与による肝線維化改善

## 3. 研究の方法

平成 27 年度

1) 脂肪組織由来多系統前駆細胞シートを用いた肝線維溶解療法の有効性・MOA 確認  
移植した細胞が肝被膜を超えて肝臓内に遊走して肝線維を溶解するのか、あるいは分泌した MMPs が肝内線維を溶解するのか、細胞シートの作用機序 (Mode-of-Action) を確認する。そのため、慢性肝炎モデルマウス・ラットに当該細胞シートを移植し細胞を追跡するとともに、サイトカイン濃度、MMPs の肝内局所分布を肝線維溶解と比較検討した。

2) 脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) の、シート化条件の検討  
脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) は、成体幹細胞のなかでも未分化性が高く、培養機材より、細胞同士で self aggregation する傾向にある。シート化には通常培養する細胞数より多くの細胞を必要とするため、効率よくシート化させる細胞数や培養条件の検討を行った。

平成 28 年度

1) 一次図書の策定  
臨床応用に必要とされる各種文書の整備に着手した。

2) 体内動態試験の実施

臨床応用に際し、実施すべき体内動態試験を実施した。

### 3) 品質管理項目となりうる検証形の立ち上げ

前年度より開始した mode-of action 検討試験において新たに発覚した論点について、検証系の立ち上げ等について検討した。

平成 29 年度

#### 1) シート化技術再検討・評価

平成 27 年度で検証したシート化技術を再検討し、さらに効率がよく細胞数をへらすことができる技術開発について取り組んだ。

#### 2) 小動物モデル動物を用いた有効性の確認試験

四塩化炭素肝硬変モデルラットを用い、これら細胞シートの有効性について検討した。

## 4. 研究成果

平成 27 年度

平成 27 年度においては、脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) の、シート化条件の検討、脂肪組織由来多系統前駆細胞シートを用いた肝線維融解療法の作用機序 (Mode-of-Action) の確認を行った。

脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) は、成体幹細胞の中でも未分化性が高く、培養機材よりも細胞同士で凝集する傾向にある。シート化には通常培養する細胞数より多くの細胞を必要とするため、残念ながら、通常の培養条件より細胞を多く播種するという定石法では、細胞は凝集塊を作るばかりで全くシート化させることはできなかった。しかし、シート化培養前に培養皿に工夫を施す手法を用い、通常の培養条件程度の細胞数で効率よくシート化させる最適条件をみつけることができ、脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) のシート化技術を開発することができた。また、脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) からのサイトカイン分泌について検証した結果、肝内繊維を溶解する作用を持つサイトカインが、繊維芽細胞や通常の脂肪組織由来細胞に比べ、多量に分泌されていることがわかり、本機序が Mode-of-Action になる可能性があると考えられることが分かった。

平成 28 年度

平成 28 年度においては、製品標準書、標準作業手順書、製造指図書、記録書の策定に取り掛かり、一次図書に関しては策定が終了した。

各法令との齟齬確認の後、cold run を数回実施しながら最終図書として策定予定である。また、平成 28 年度は通知改正等があったことから、当初予定していた大動物を用いた安全性試験や PMDA 相談等の項目を実施することは見合わせた。小動物を用いた体内動態試験を実施し、投与の細胞の体内分布および消失を確認し、良好な結果を得ることができた。

実際の臨床応用に際し、本治療に有効と想定されるサイトカイン分泌量の、脂肪ドナーによる分泌量のばらつきなど、新たに問題となりうると思われる項目に対して、マイクロアレイを用いた系を立ち上げ、検証を行った。

平成 29 年度

ADMPC は、経静脈的投与により肝線維溶解作用を有するものの、投与後の細胞の生存率が低く、十分な機能が期待できない可能性がある。そこで、投与方法を比較し、経門脈的/経動脈的投与についても検討したが、経門脈的投与にあっては投与細胞が肝小葉 triad 周辺のみを集簇、経動脈的投与にあっては投与細胞のほとんどが肝実質を通過して肺へと到達し、経静脈的投与と delivery 効率が変わらなかった。この点を改善すべく、細胞をシート化して硬変肝の表面に貼付・移植することが適切であると判断した。

シート化条件の再検討として TGF- 添加培養を試みた。シート化成功率は、平成 27 年度に実施した条件と比較し、きわめて良好であったが、コラーゲン message の増加、抗炎症サイトカインの発現低下を認め、細胞増殖速度の増加という利点を考慮しても、TGF- 添加培養は肝硬変症へ適用する細胞調製には不適であると考えた。

次に温度感受性培養皿の前処理法をさらに改善したところ、前回の検討結果と比較し、さらにシート化効率を高めることができた。

得られた ADMPC シートを四塩化炭素肝硬変モデルラットに移植したところ、コントロール群では 2.01% の線維化率であったものが、ADMPC シート投与群では 0.97% に改善を認めた。

通常用いられる ADSC では 1.37%、骨髄由来間葉系幹細胞では 1.59%、羊膜由来間葉系幹細胞では 1.12% であり、これらと比較しても ADMPC シートは他組織由来間葉系幹細胞シートよりも治療効果が高いことが推定された。

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 13 件)

-2017 年度-

1. Tada M, M Hirata, Sakate R, Okura H, Matsuyama A. The Rare Disease Bank of Japan: establishment, current status and future challenges. Human Cell 2018 in press. 査読有 doi:10.1007/s13577-018-0204-3
2. Okura H, Morita M, Fujita M, Naba K, Takada N, Takagaki Y, Suzuki O, Matsuyama A. Therapeutic potential of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cell-sheets on liver fibrosis. Journal of Translational Science 2017 4(1):1-6. 査読有 doi:10.15761/JTS.1000200
3. Tada M, Hirata M, Okura H, Yoshida S and Matsuyama A. Trends of intractable disease research using biopsies. Journal of Translational Science 2017 4(1):1-5. 査読有 doi:10.15761/JTS.1000198
4. Negoro T, Okura H, Matsuyama A. Induced Pluripotent Stem Cells: Global Research Trends. Biores Open Access. 2017 Jun 1;6(1):63-73. 査読有 doi:10.1089/biores.2017.0013
5. 大倉華雪 松山晃文 再生医療等製品にかかる品質規格について 公表論文からの考察 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 査読無 2018 in press
6. 大倉華雪 松山晃文 我が国の再生医療研究と国際状況 CLINICAL NEUROSCIENCE 2018 36:288-292. 査読無
7. 大倉華雪 松山晃文 再生医療等製品 日本病院薬剤師会雑誌 No.5382 (146-151) 査読無 2017

-2016 年度-

8. Okura H. and Matsuyama A. Currently available rapid microbial tests for translational medicine. Translational Biomedicine. 7:3. 2016. 査読有 doi:10.21767/2172-0479.100087
9. Okura H. and Matsuyama A. Regulatory aspect of pre-clinical studies for regenerative medicine. Translational

Medicine. 6:4. 2016. 査読有 doi:10.1016/j.healun.2016.11.012.PMID:28159019

10. Okura H and Matsuyama A. Adipose tissue-derived cellular medicinal products for ischemic heart disease. Nihon Rinsho.74(Suppl4 Pt1)671-675,2016. 査読有
11. Okura H, Morita M, Fujita M, Naba K, Hasebe-Takada N, Ichinose A, Matsuyama A. Spermine 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. 6:2. 2016. 査読有 doi:10.4172/2157-7633.1000326

-2015 年度-

12. Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Okura H, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y. Characterization of in vivo tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R null mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. Regenerative Therapy.30-37,Dec;1(4),2015. 査読有 doi:10.1016/j.reth.2014.12.001
13. Sawada K, Takedachi M, Yamamoto S, Morimoto C, Ozasa M, Iwayama T, Lee C, 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. 299-305 Aug 14 2015 査読有 doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.147

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 大倉華雪「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業における再生医療製品開発ガイドラインの作成」於・再生医療学会 2017/3/8 国内
2. 大倉華雪「再生医療のむこう側」エレクトロニクス実装学会 ナイトセッション 2016/7/15 国内

3. 大倉華雪「再生医療実用化にむけて乗り越えるべき課題」～お力をお貸しくださる方はおられませんか?～エレクトロニクス実装学会 ナイトセッション 2016/7/14 国内
4. 大倉華雪「ACT社 ヒト由来 RPE の品質評価」第 12 回 MCP 策定会議 2015/9/15
5. 大倉華雪「ACT社 ヒト由来 RPE の品質評価」第 11 回 MCP 策定会議 2015/9/7
6. 大倉華雪「ACT社 ヒト由来 RPE の品質評価」第 10 回 MCP 策定会議 2015/8/9
7. 大倉華雪「ACT社 ヒト由来 RPE の品質評価」第 9 回 MCP 策定会議 2015/8/6

ポスター発表

8. H Okura, M Morita, M Fujita, K naba, A Matsuyama, 臨床応用のための MOA と POC ,World Congress on Toxicology and Pharmacology 2018/3
9. 脂肪組織由来多系統前駆細胞治療薬 H Okura, M Morita, M Fujita, K naba, A Matsuyama, Nature conferences Regeneration 2017/11
10. Y Morita, H Okura, A Matsuyama. iPS 細胞の特許出願動向 International Society for Stem Cell Research 2017/6
11. Okura H. and Matsuyama A. Can ADMPC be a remedy for intractable disease? IRDiRC Scientific meeting. 2017. Feb 20-22. Paris, France.
12. Okura H., Morita M, Fujita M, Naba K, Hasebe-Takada N, Ichinose A, Matsuyama. in situ reprogrammed spermine treated-adipose tissue & #8211; derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction in a swine chronic myocardial infarction model. Clinical applications of stem cell. Feb 2016, Singapore.
13. Okura H., Morita M, Naba K, Hasebe-Takada N, Ichinose A, Matsuyama. Allogenic spermine treated-adipose tissue & #8211; derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction in a swine chronic myocardial infarction model. IC CAD,2015, Florence, Italy.
14. Okura H., Morita 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. 2015.Jun.24-27, Stockholm Sweden.

〔図書〕(計 2 件)

1. 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、日本臨床社、2016、671-675.
2. Okura H. and Matsuyama A. Critical Path Initiative for Regenerative Medicine in Japan. Springer Japan 2016.139-146

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況 (計 2 件)

名称：凸部を備える細胞培養用プレート及び細胞培養器具  
 発明者：松山晃文、大倉華雪  
 権利者：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所  
 種類：特許  
 番号：2015-219783  
 取得年月日：2015-11-09  
 国内外の別：国内

名称：貫通孔を備える細胞培養用プレートを備える積層プレート式細胞培養器具  
 発明者：松山晃文、大倉華雪  
 権利者：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所  
 種類：特許  
 番号：2015-219802  
 出願年月日：2015-11-09  
 国内外の別：国内

〔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

大倉 華雪 (OHKURA Hanayuki)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・難治性疾患研究開発・支援センター・研究調整専門員

研究者番号：20589684

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )