

令和元年6月17日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08382

研究課題名(和文)細胞治療薬としての幹細胞の分化再生免疫特性マーカーの探索と細胞バリデーション

研究課題名(英文) Validation and exploration of stem cell differentiation and immune characteristics for use in regenerative cellular therapeutics

研究代表者

佐藤 光利 (Sato, Mitsutoshi)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60231346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞の心筋細胞分化を観察した結果、分化誘導処理後約4日でコンフルエントになり、約10日で自律拍動する小さな結節が認められた。自動拍動する小結節の出現時期や数は、細胞株やサブラインで異なっていた。虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の血管内皮細胞成長因子の分泌はロット間で差が認められた。この分泌能の差は、細胞移植後に生じる血管新生の程度や治療効果に影響を及ぼす可能性があり、細胞の修復能力を予測する因子を探索した。さらに、免疫学的挙動の検討から間葉系幹細胞には免疫効果がないことが明らかになった。細胞組織加工製品の安全性に関しては精度の高い異常細胞検出法の開発が重要になるため検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性疾患の次世代の治療に幹細胞由来細胞治療薬の臨床応用が進んでいる。細胞組織製品を使用する際には品質を評価するための細胞特性解析指標やそれら指標による規格の設定がレギュラトリーの面からも重要になる。本研究を遂行することで、幹細胞の諸機能と緊密に関連する因子を特定し、それらの臨床応用への有用性を証明することで、再生医療における幹細胞の品質管理法の確立や安全性確保の基盤形成が達成される。また、それらの生体における生理的役割と細胞機能との因果関係が明らかになることで、幹細胞の様々な機能に関する知見が統合され、自然界における幹細胞の真の役割の全体像を明らかにし、再生医療への進歩に貢献することとなる。

研究成果の概要(英文)：Observation of cardiomyocyte differentiation from stem cells revealed that the cells became confluent about 4 days after differentiation induction treatment, and that small autonomously beating nodes were evident by 10 days. The timing of the appearance of autonomously beating nodes and their number differed among cell lines and sublines. Secretion of vascular endothelial growth factor by human mesenchymal stem cells under ischemic conditions varied among the stem cell line lot numbers. As this difference in secretory capacity may affect the degree of angiogenesis and therapeutic efficacy after stem cell transplantation, and we explored factors that might predict the repair capacity of cells. In addition, analysis of the immunological behavior of mesenchymal stem cells revealed no immune effect on them. As it will be important to develop a highly accurate assay method for detection of abnormal cells, the safety of cell and tissue processing products was also investigated.

研究分野：薬理学

キーワード：再生医療 医薬品安全性 幹細胞 細胞分化 バリデーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell, MSC)は、生体の組織が障害を受けた際の組織修復に関わっていることから心筋再生療法における有力な治療ツールの一つであり、胚性幹細胞(Embryonic stem cells, ES 細胞)や人工多能性幹細胞(Induced pluripotent stem cells, iPS 細胞)と比較しても倫理面の問題や遺伝的リスクが低いことも特徴である。間葉系幹細胞は、体性幹細胞に分類され、筋細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などへの分化能を持ち、かつ自己複製能力を有する細胞であるため、これまで間葉系幹細胞の心筋修復効果は、間葉系幹細胞自身が心筋細胞・血管細胞へ増殖・分化するものと考えられていた。しかし、我々は、間葉系幹細胞がサイトカイン等の生理活性物質を分泌し、分泌された生理活性物質が組織修復に関与していることを明らかにした。生体内では様々な細胞からそれぞれの臓器への分化方向を決定するサイトカインが分泌され、細胞機能が分化誘導されることから、間葉系幹細胞の分化・増殖をどのように *in vitro* で制御していくかが細胞・組織加工製品に関する今後の臨床応用への課題になる。間葉系幹細胞の虚血性心疾患治療に対する有効性を示すには、投与された細胞がおかれる虚血状態のストレス環境下での細胞の挙動を示すことが重要である。また、間葉系幹細胞を医療に用いる際は、細胞のソースとなるドナーやロットの違いによってもサイトカイン分泌能などの特性に差が生じることは治療効果にばらつきが生じることになる。したがって、細胞・組織加工製品の治療効果を治療開始前に保証するためには、組織修復能を予測するマーカーを見出すことが間葉系幹細胞を用いた際の治療効果を予測する上でも重要である。実際に、海外で行なわれた臨床研究では、十分量の心筋細胞が得られなかったことや適した表現型が得られなかったことによる有害事象発症の危険性などの問題が報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、*in vitro* で擬似的に再現した虚血条件下においてヒト間葉系幹細胞(Human mesenchymal stem cell, hMSC)を培養し、通常条件下で培養したものと比較することで、虚血ストレスに対する幹細胞の応答性を検討することを目的としている。中でも血管新生関連因子に着目し、虚血条件下において特異的に分泌増加する血管新生関連サイトカインを探索した。遺伝子発現量が有意に増加したサイトカインに対して実際の分泌量を測定することで、虚血ストレス下におけるヒト間葉系幹細胞の血管新生関連サイトカインに対する分泌プロファイリングを行なった。さらに、心筋細胞移植治療の安全性には未分化細胞から心筋細胞への分化のしやすさ、すなわち「生体に適用した後の心筋細胞分化活性」を適切に予測することが重要と考えられる。そこで、筆者らは、未分化細胞中に存在し、かつ心筋細胞への分化に寄与する遺伝子の同定を試みた。多分化能を有するマウス胚性癌細胞(EC 細胞)由来の P19 細胞と CL6 細胞および CL6 細胞由来の数種の細胞株を用い、同一条件で分化誘導した後の各細胞株の心筋細胞分化能を比較すると同時に、分化誘導前の遺伝子発現プロファイリングを行ない、分化誘導前の発現量と心筋分化の程度との間に相関関係が得られる遺伝子をスクリーニングすることで、未分化細胞中に発現する心筋細胞への分化に寄与する因子を検出した。

間葉系幹細胞は、それ自身が分化・増殖する他にも免疫制御作用(immunomodulatory effects)や細胞賦活作用(trophic effects)を有する。また、間葉系幹細胞は血管周皮細胞(ペリサイト)の一種としても機能しており、体内における生理的な血管新生はペリサイトの離脱、血管基底膜や細胞外マトリックスの消化、内皮細胞の遊走と増殖、内皮細胞による管腔形成、血管の成熟化など、周りの環境因子の中で一連のプロセスを経て進む。したがって、これらに関係するパラクライン因子の探索や作用メカニズムに関する検討も必要であり間葉系幹細胞から増殖・分化した心筋細胞・組織の性質が、正常組織と変わらないこと、また、ホストに対する

免疫学的組織適合性を有することも重要になる。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞および細胞培養条件

骨髄由来 hMSC は、Lonza 社より入手した。虚血条件下における hMSC の血管新生関連遺伝子発現変化を検討する目的で、hMSC (継代数 9 (PS#9)) を 1×10^4 cells/well となるよう 96 穴細胞培養プレート上に撒き、MSCBM [Lonza] に MSCGM SingleQuots [Lonza] を加えて調整した基本培地中で 37 °C、5% CO₂ の条件下で 80%コンフルエントになるまで培養した。その後、培養した上記の 96 穴細胞培養プレートを、コントロール群および虚血群に分け、次に示す通常条件または擬似的虚血条件においてさらに 24 時間培養した。

(2) マイトマイシン C (MMC) 処理ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の調製

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を培養したものをを用いた。hMSC を Trypsin/EDTA 溶液で細胞表面を軽く洗ったあと、Trypsin/EDTA を加え、5 分間インキュベートした。その後、ピペティングにより細胞をフラスコから剥離した。これを 10%FBS-RPMI 培地 18ml を入れた遠心管に移し、遠心 (1,500rpm, 5 分間) し、得られたペレットに 10%FBS-RPMI 培地を加えて懸濁し、血球計算盤を用いて細胞数を測定した。

この hMSC 懸濁液に MMC を加えて懸濁し、インキュベーターで 30 分培養する。30 分後遠心 (1,500rpm, 5 分間) し、得られたペレットに PBS を加え懸濁し、再度遠心 (1,500rpm, 5 分間) して洗浄した。得られたペレットに 10%FBS-RPMI 培地を加えて懸濁し、血球計算盤を用いて hMSC 数を計測した後、目的の濃度となるように 10%FBS-RPMI 培地に懸濁し調製した。これを MMC 処理済 hMSC (hMSC*) とする。

(3) 混合リンパ球反応 (Mixed lymphocyte reaction, MLR)

正常 PBMC と MMC 処理済 PBMC を 96 穴プレートに各細胞が 1.0×10^5 または 5.0×10^4 cells/well となるように種々の組み合わせで分注した。そして hMSC の免疫抑制効果を見るために、上記の well に各々の濃度に調製した MMC 処理 hMSC* を添加してインキュベーターで 5 日間培養した。またマイトジェン刺激用にフィトヘマグルチニン (PHA) を最終濃度 10 μg/mL となるように、1 グループに分注し、同様にインキュベーターで 5 日間培養した。

(4) BrdU-ELISA 法によるリンパ球の増殖測定

本研究では細胞増殖の測定試薬として Roche 社製のキット Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) を用いた。96 穴プレートで 5 日間培養した細胞に、10%FBS-RPMI 培地で 100 倍希釈した BrdU 標識試薬を加えてさらに 1 日培養した。翌日、冷却遠心機 EX-125 を用いて遠心 (300 × g, 4 °C, 10 分間) し、直ちに培養液を取り除き、細胞の付着したプレートを 60 °C で 1 時間乾燥させた。乾燥後、FixDenat を 200 μL/well となるように分注し、室温で 30 分間放置して細胞を固定した。プレートを逆さにして固定液を除去した後、抗体希釈液で 100 倍希釈した抗 BrdU-POD 溶液を 100 μL/well となるように分注し、室温で 90 分間反応させた。90 分後、プレートを逆さにして抗体液を除去した後、PBS/Tween で 4 回、PBS で 1 回洗浄した。ここに基質液を 100 μL/well となるように分注し、適当な発色が得られるまで 5 ~ 30 分間室温で反応させた。青色の発色が得られたら 1mol/L H₂SO₄ を 25 μL ずつ各 well に添加して反応を停止し、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度で測定した。

4. 研究成果

(1)細胞株の心筋細胞分化速度の違い

細胞の心筋細胞分化を観察した結果、分化誘導処理後約 4 日でコンフルエントになり、約 10 日で自律拍動する小さな結節が認められた。この自律拍動する小結節は、時間とともにその数が増え、約 16 日でその数の増加がプラトーになった。GFP コード配列を導入した CL6G52 細胞は、自律拍動する小結節の出現とともに、GFP の発現が認められた。自動拍動する小結節の出現時間や数は、P19 細胞と CL6 細胞、および CL6 細胞サブラインの CL6G26、CL6G36、CL6G45、CL6G52 の細胞株で異なっていた。

(2)虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の血管新生関連サイトカインプロファイリング

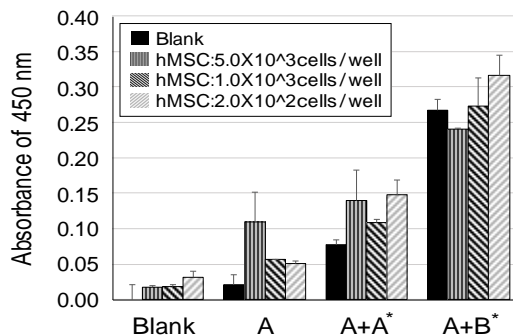
RT² Profiler PCR Array により 84 種類の遺伝子発現量を検討したところ、虚血後におけるヒト間葉系幹細胞では、アンジオゲニン、レプチン、胎盤成長因子(PIGF)、1 型形質転換成長因子(TGF- β 1)、血管内皮細胞成長因子(VEGF)の遺伝子発現に有意な上昇が見られた。これら 5 種類のサイトカインについて ELISA により濃度を測定したところ、VEGF については生理的レベルに相当する分泌量および虚血時における有意な分泌上昇が認められた。一方、虚血条件下におけるヒト間葉系幹細胞の VEGF 分泌についてはロット間での差が認められた。このロット間における分泌能の差は、ヒト間葉系幹細胞移植後に生じる血管新生の程度、ひいては治療効果に影響を及ぼす可能性が考えられる。十分な治療効果を確保するためには、細胞の修復能力を予め把握することが重要であり、特性解析指標が必要と考えられた。

cDNA 配列について、虚血前の遺伝子発現量と虚血後の VEGF 応答の相関を検討した結果、全ての組み合わせで正の相関 ($P < 0.01$) を示した VEGF 分泌能と関連する遺伝子は 17 種類であった。さらに、2 遺伝子については、RNAi による阻害後に虚血後の VEGF 分泌量および分泌変化率が双方とも抑制されることが明らかとなった。

(3)間葉系幹細胞の免疫学的挙動の予測解析

免疫抑制効果を簡便に評価することが可能な評価系を構築するため末梢血リンパ球を用いて、リンパ球混合培養試験(Mixed lymphocyte reaction, MLR) を応用し、ヒト間葉系幹細胞の免疫学的組織適合性に関連する免疫抑制効果を評価した。なお、リンパ球混合培養試験は One Way 法で行ないアッセイ法は BrdU-ELISA 法を用いた。2 種類のヒト間葉系幹細胞を試したが、免疫抑制効果は観察されなかった(図 1)。

a) ヒト間葉系幹細胞: Lot No.127767-I (at PS#9)



b) ヒト間葉系幹細胞: Lot No.4F0312-B (at PS#9)

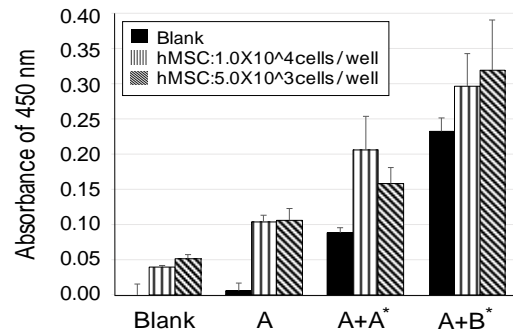


図1 ヒト間葉系幹細胞の免疫学的影響

A および B は異なった末梢血単核球 . hMSC : human mesenchymal stem cell
A=5×10⁴ cells/well, B=5×10⁴ cells/well, * : mitomycin C 処理 .

これらの結果から間葉系幹細胞には免疫抑制効果がない可能性などが考えられる。間葉系幹細胞には共受容体が発現していないことが報告されていることから、通常の条件下ではリンパ球を刺激しない可能性がある。一方では、ヒト間葉系幹細胞による免疫抑制効果にはサイトカインが関連していることが報告されており、ヒト間葉系幹細胞による免疫制御の分子機構には、T リンパ球、NK 細胞、樹状細胞などが複合的に関与し、炎症性サイトカイン産生の抑制、抑制性サイトカイン産生の増加が観察されている。さらにヒト間葉系幹細胞の免疫制御には、ヒト間葉系幹細胞が産生する PGE₂ や indoleamine 2,3-dioxygenase などを介した機序なども想定されているので、今後も検討が必要と考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

M. Satoh: Assurance of effectiveness and safety of cellular and tissue-based products- Mesenchymal stem cells -. *Bull. Meiji Pharmaceut. Univ.*, 45, 1-11 (2016). (in Japanese)
査読無

Y. Kawano, A. Imamura, T. Nakamura, M. Akaishi, M. Satoh, T. Hanawa: Development and characterization of oral spray for stomatitis containing irsogladine maleate. *Biol. Pharm. Bull.*, 64, 1659-1665 (2016). 査読有
doi: 10.1248/cpb.c16-00217

M. Satoh, A. Kamada, M. Saito, M. Akaishi, A. Imamura, Y. Kawano and T. Hanawa: Healing effects of irsogladine maleate on acetic acid-induced oral stomatitis in 5-fluorouracil-treated and-untreated Syrian golden hamsters. *Res. Rev. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 5, 18-22 (2016). 査読有
e-ISSN:2320-1215 p-ISSN: 2322-0112

M. Satoh, A. Kamada, S. Kasahara, M. Nagashima, H. Tanaka, K. Kozono, T. Kosugi and K. Nishizawa: Study of blood magnesium levels following the oral administration of magnesium oxide in a rat model of chronic renal failure induced by a 5/6 nephrectomy. *Pharmacometrics*, 91, 101-108 (2016). 査読有

H. Tanaka, E. Shinohara, M. Satoh and T. Ishii: Survey of package inserts for cautionary statements about hypersensitivity caused by drug moieties similar to sulfonamide. *Japan. J. Drug Inform.*, 18(1), 1-6 (2016). 査読有
<https://doi.org/10.11256/jjdi.18.1>

H. Tanaka, Y. Yoshida, M. Satoh and T. Ishii: Analysis of patients with hypermagnesemia using Japanese Adverse Drug Event Report database (JADER). *Japan. J. Drug Safety*, 2, 113-119 (2016). 査読有
doi: 10.29173/jpps29692

Y. Kawano, M. Satoh and T. Hanawa: Evidence-based hospital formulation (EBHF) from academia. *Japan. J. Pharmaceut. Health Care Sci.*, 42(7), 492-498 (2016). 査読有
DOI: 10.5649/jjphcs.42.492

N. Suzuki, S. Hamazaki, F. Nakamoto, M. Kumazawa, H. Koga, H. Suzuki and M. Satoh: Clinical study of risk of neonatal hypoglycemia: influences of drug therapy by administration of ritodrine and betamethasone for pregnant women on blood glucose levels in neonates. *Pharmacometrics*, 93, 63-70 (2017). 査読有

H. Tanaka, Y. Yuka, T. Watanabe, M. Satoh and T. Ishii: Analysis of patients with hypomagnesemia using the Japanese adverse drug event report database. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 21, 46-53 (2018). 査読有
doi: 10.29173/jpps29692

M. Satoh, A. Kamada, N. Mitsunashi, S. Kasahara, K. Iida, S. Miyazawa, H. Tanaka, T. Kosugi, K. Nishizawa: Study on quality assurance for drug safety - Investigation of the content of heavy metal impurities in magnesium oxide preparations-. *Pharmacometrics*, 95, 1-7 (2018). 査読有

M. Satoh: Role of pharmacy in the promotion of drug safety in pharmacotherapy. *YAKUGAKU ZASSHI*, 138, 149-150 (2018). (in Japanese) 査読有
<https://doi.org/10.1248/yakushi.17-00174-F>

〔学会発表〕(計 4 件)

1. ヒト間葉系幹細胞の分化・増殖および免疫特性に関する検討：佐藤光利、武藤里志、第 18 回応用薬理シンポジウム、2016/8、名古屋
2. ヒト由来間葉系幹細胞の虚血条件下および免疫応答性に関する検討：佐藤光利、鎌田敦音、第 19 回応用薬理シンポジウム、2017/9、東京
3. ヒト脂肪由来間葉系幹細胞における虚血誘発性血管内皮細胞増殖因子の分泌を促進する遺伝子の特性解析：佐藤光利、佐藤陽治、第 20 回応用薬理シンポジウム、2018/8、東京
4. 簡便な三次元培養法を利用した再生医療等製品の造腫瘍性関連試験の検討：草川森士、鎌田敦音、安田智、黒田拓也、西野泰斗、大塚敬一郎、佐藤光利、佐藤陽治、第 18 回日本再生医療学会総会、2019/3、神戸

〔図書〕(計 2 件)

1. 岡田賢二、佐藤光利：特集抗菌薬療法 UP-TO-DATE I. 抗菌薬療法の基礎知識 作用機序-抗菌薬の PK/PD の特徴と投与方法. 小児科診療、80(2)、151-156 (2017).
2. 宇野勝次、藤森勝也、佐藤光利 編集、平田純生、前田頼伸、飯原大念、伊藤善規、北市清幸、室井延之、岡田賢二 他(共著)：医薬品副作用アセスメント, 南山堂, 東京 (2018).

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松井 勝彦

ローマ字氏名：MATSUI Katsuhiko

所属研究機関名：明治薬科大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：20257140

研究分担者氏名：佐藤 陽治

ローマ字氏名：SATO Yoji

所属研究機関名：国立医薬品食品衛生研究所

部局名：再生・細胞医療製品部

職名：部長

研究者番号(8桁)：40312285