

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 9 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689055

研究課題名(和文) 脂肪組織由来多前駆細胞を用いる薬剤誘導心筋前駆細胞シートの臨床展開にむけた研究

研究課題名(英文) Drug-stimulated-adipose tissue derived multi-lineage progenitor cell sheets improve left ventricular dysfunction

研究代表者

大倉 華雪 (Hanayuki, Okura)

独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、脂肪組織から脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPC)を見出し、低分子化合物ライブラリーから当該細胞に心筋マーカー発現を誘導する薬剤のスクリーニングに成功、ブタ慢性心筋梗塞モデルによる薬剤誘導心筋前駆細胞の有用性の検証を行った。体重30kgのブタを用い、薬剤のスクリーニングにhitしたスペルミンを用い、ADMPCより薬剤誘導心筋前駆細胞を誘導し、当該細胞を心筋梗塞領域に移植した。当該薬剤は強いカチオンであるため細胞の培養皿への接着を妨げ、薬剤誘導心筋前駆細胞をシート化することが困難を極めたが、薬剤誘導心筋前駆細胞シートを安定的に作製する条件を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：We found human adipose tissue derived multi-lineage progenitor cells from adipose tissue (ADMPC). In this study, we examined whether some chemical from low molecular compound library could commit human adipose tissue derived multi-lineage progenitor cells (hADMPCs) into cardiac lineage, and we found spermine, known as one of polyamines, can differentiate into cardiac lineage. After that, we examined whether the spermine induced-hADMPCs would differentiate into cardiomyocytes-like cells and improve left ventricular dysfunction in a swine chronic myocardial infarction model. Spermine, charged with strong cationic charge, prevented the adhesion between cells and the culture dish and it was extremely difficult to make the sheet of drug-induced cardiomyocyte progenitor cells, but we could succeed in finding a condition to create the sheet in a stable manner.

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 再生医療 心筋再生 薬剤誘導

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 心疾患は国民死亡率の第二位を占めており、その過半数が心筋梗塞に起因にする。頻回の心筋梗塞は、心筋組織構築のみならず機能性心筋幹細胞・心筋前駆細胞の疲弊喪失を招き、血管網新生すなわち冠動脈形成術・バイパス術、あるいは従前の細胞医療であるサイトカイン治療といった広義の血行再建のみでは十分な心機能回復が期待できない。次世代の心疾患再生医療として、喪失した心筋組織を再構築する必要があると想定されている。

(2) 心疾患に対する再生細胞医療の研究開発進捗状況につき表に現した。

細胞種	想定作用機序	投与方法	進捗状況	備考
BM-MSC	血管新生 抗炎症作用	経冠動脈	placeboと有意差なくdrop out	
未精単核球 (培養無)	血管新生	心筋へ直接注射	千葉大学にて臨床研究中	手術時併用
myoblast	血管新生 残存心筋活性化	心筋へ直接注射 シート移植	Magic Trial (不整脈でdrop out) 大阪大学専任教授ら	手術時併用
cardiac stem cell	心筋再生	心筋へ直接注射 心筋へ直接注射 (bFGF併用)	Columbia U. Prof Amvasa. (IND取得) 京府医 松原教授ら臨床研究中	手術時併用
ADSC (SVF) (培養無)	血管新生 抗炎症作用	経冠動脈	サイトリ社フィリピンで先行 (ICH3 種外)	手術時併用 bFGFなしでは無効
CD34+ cell (EPC)	血管新生	経冠動脈 心筋へ直接注射	Baxter社贈還 大阪大学 ヒト幹細胞臨床研究指針で許可	手術時併用
ES/iPS	心筋再生			
gene modified cardiomyocyte	心筋再生			

体性幹細胞を用いる再生細胞医療の比率高く、ほとんどが血管新生作用を期待していることがわかる。心筋幹細胞を用いる心筋組織再構築治療も臨床研究として実施されているが、自己心筋組織からのバイオプシーでの幹細胞採取であるため細胞数の獲得に難点があり、bFGF との併用でしか効果が認められない。また、かつ針移植であるため Magic Trial と同様に不整脈の発生が危惧されている。心筋組織再構築治療として iPS 細胞・胚性幹細胞を心筋細胞へと分化させて投与方法も大きな期待が寄せられているが、大量培養のコストや安全性の観点から、臨床応用には遠いという現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究ではラット・ブタ心筋梗塞モデルを用い、薬剤誘導心筋前駆細胞シートの有効性を検証する。心筋マーカー alpha-Cardiac actin、Myosin Light Chain、Cardiac troponin I、Myosin Heavy Chain を高発現する条件を基盤とし、得られる誘導心筋前駆細胞をシート化すべく最適条件検討を行い、小動物実験、次いで大動物実験にて心機能回復による有用性の検証と、本研究成果の臨床利用を射程に入れた安全性評価項目の設定を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 本申請者らは脂肪組織から新規幹細胞として心筋前駆細胞マーカーである *islet-1* を発現する脂肪組織由来多系統前駆細胞 (Adipose tissue-Derived Multilineage Progenitor Cells; ADMPC) を見出し (Komoda et al. Tissue Eng Part A. 2010.) よる心筋梗塞モデル動物への有効性を示してきた (Okura et al. Tissue Eng Part C. 2010.) ついで、低分子化合物ライブラリー (のべ約 2000 種類) から、添加培養により心筋マーカーである alpha-Cardiac actin、Myosin Light Chain、Cardiac troponin I、Myosin Heavy Chain のすべての発現を誘導する薬剤として "polyamine" のスクリーニングに成功した。

(2) "polyamine" を用いた薬剤誘導 hADMPC で、細胞シートが作成可能か、について検証した。

(3) これら "polyamine" を用いて作製した薬剤誘導性 hADMPC を、心筋梗塞を作成したモデル動物に single cell にて移植することで、当該細胞の心機能回復効果について検証した。

(4) 本研究を臨床応用する際、再生医療安全確保法下で行われる臨床研究であっても、薬事法に基づく治験であったとしても、各種通知にのっとり安全性試験を実施する必要がある。PMDA の指導の下、まず原材料の生物由来原料基準適合性を

確認し、ついで安全性試験を実施することとした。原材料に関しては、生物由来原料基準適合性について確認した対面助言戦確 P31 の帰結を採用することとした。

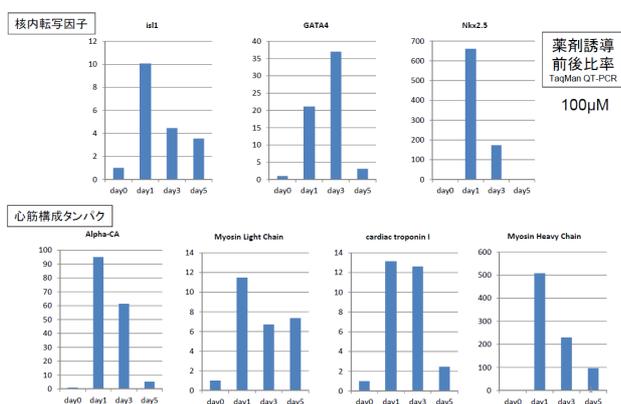
(倫理面への配慮)

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、(独)医薬基盤研究所の動物実験規定に従って行なう。

#### 4. 研究結果

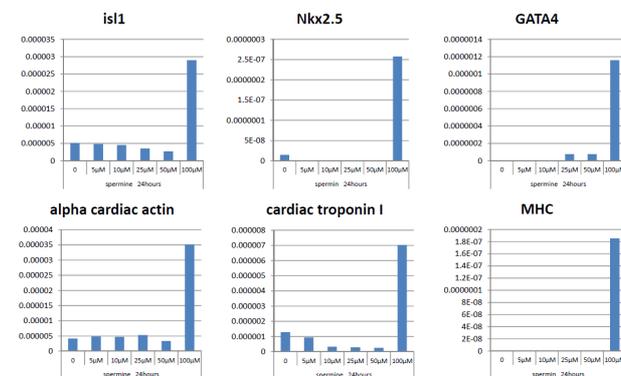
(1) polyamine と呼ばれる薬剤の中でも、臨床展開を見据え、生体に存在している薬剤を中心に検証することとした。生体に存在しているものは、spermine、spermidine、putrescine の3種類ある。これら3種の薬剤のうち、spermine は乳児に与える粉ミルクにも添加されている。よって、これより先、polyamine の中でも spermine を用いて hADMPC に刺激を与え、心筋指向性について検証することとした。

spermine を細胞培養培地に添加し、培養期間を0日~5日で検証した。



添加培養 1 日後に心筋系マーカーが増強され、心筋指向性が得られていることが分かった。

この結果を踏まえ、spermine の添加濃度について検証した。

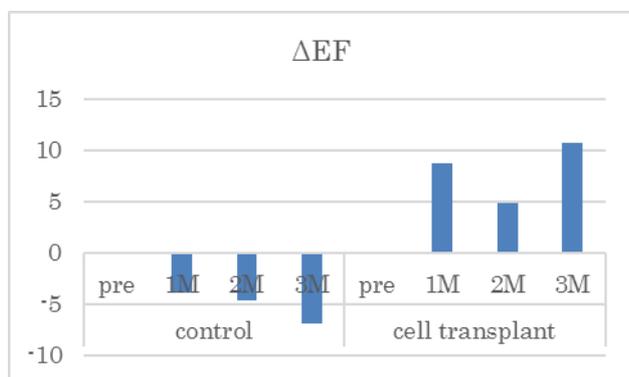
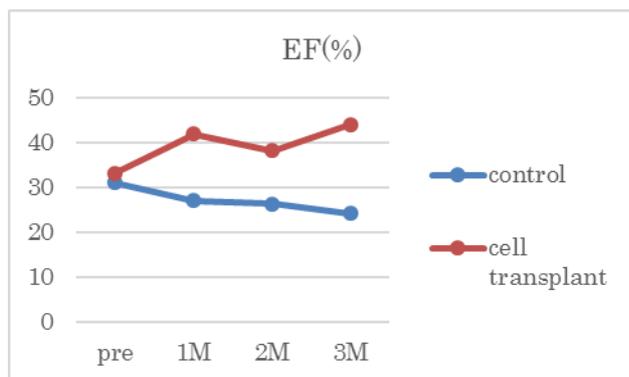


心筋系細胞指向核内転写因子である isl-1, nkx2.5, GATA-4 のみならず心筋系細胞構成タンパクである alpha-cardiac actin, cardiac troponin I, myosin heavy chain も spermine 100 μ M にて発現の増強を認め、心筋系細胞へと commitment されることが示され、commitment には spermine 100 μ M が望ましいことが明らかとなった。

(2) polyamine は強いカチオンである。すなわち、spermine も同様に強いカチオンであり、細胞の培養皿への接着を妨げ、薬剤誘導心筋前駆細胞をシート化することが困難を極めた。100 種類程度の作成法を試した結果、前もって hADMPC シートを培養皿上で通常のシート作成条件と同等の方法において培養し、2 日後に培地交換する際、spermin 添加培地にて培地交換することにより、薬剤誘導心筋前駆細胞シートを安定的に作製することができた。

(3) 当該方法において得られた spermin 加 hADMPC を、心筋梗塞モデル動物に移植し、細胞の有効性を検証することとした。有効性を検証するため移植のモデル動物としてブタを選択した。なんとすれば、ブタの心臓の大きさはヒトとほぼ同じであるためである。慢性心筋梗塞作出法として、われわれが開発した 2 段階塞栓法を採用した。梗塞 4 週間後に経胸壁心エコーにて前壁および中

隔の akinesia を確認し、心駆出率 35%以下の動物を実験に供した。投与直前、投与後 1 カ月、2 か月、3 カ月にて心臓超音波（エコー）にて、左心駆出率（EF）を計測、投与直前値との差も EF として示した。



薬剤誘導心筋前駆細胞の移植では、無移植群と比較して優位に心機能の改善を見ることができた。

(4) 本研究を臨床応用する際、再生医療安全確保法下で行われる臨床研究であっても、薬事法に基づく治験であったとしても、各種通知にのっとり安全性試験を実施する必要がある。

*in vitro* 研究により再生細胞治療における（幹）細胞と分化誘導培養法が決定される。続いて、その分化培養法により得られる細胞調整物・細胞医薬品等候補について、ヒトに投与して開発を進める価値があるか否かを判断することが必要となる。そのために実施する試験が非臨床試験である。低分子化合物で求められる具体的な項目と試験内容

を参考までに示す。非臨床試験は、毒性試験（一般毒性試験、特殊毒性試験）薬理試験（薬効薬理試験、安全性薬理試験）薬物動態試験、製剤学的試験、その他に大別されている。低分子化合物と再生細胞治療製剤とはその挙動や特性に差異があることは十二分に認識されるが、低分子化合物で用いられてきた非臨床試験 package は、再生細胞治療製剤での非臨床試験 package を組み立てるのに、大いに役に立つ。

非臨床試験では、主として実験動物を用い、開発候補再生細胞治療剤の有効性、安全性などを評価することとなる。非臨床試験は、臨床試験の実施の可否を判断するために重要な試験と位置づけられようが、臨床試験をより効率的に行うため、サロゲートマーカーの拾い上げ等を含む情報収集も目的となる。ヒト幹細胞臨床研究やあるいは臨床試験（治験）の実施中に予期せぬ有害事象等が発生した場合、非臨床試験にさかのぼって原因究明が行われるかもしれない。毒性試験のすべてと安全性薬理試験の一部はGLP省令を遵守して行われるが、ヒト幹細胞臨床研究の開始時、あるいは治験開始時にすべての試験がGLP省令下で行われていなければならないわけではない。

一般毒性試験は、単回投与毒性試験と反復投与毒性試験に分けられる。低分子化合物では実施が義務付けられており、再生細胞治療製剤でも必須と考える。単回投与毒性（急性毒性試験）は、被験物質を1回投与した時に観察される毒性を明らかにする試験であり、低分子化合物であれば観察期間14日間、必要に応じて解剖し、肉眼的な異常や病理組織的検査を実施することとなっている。再生細胞治療製剤の場合、そのものを毒性試験で用いるか、あるいは試験動物種の類似製剤を用いるべきなのか、議論がある。製剤そのものの毒性を評価するわけであるから、免疫不全・免疫抑制動物にヒト由来製剤を投与すべきと考えるが、試験動物種の類似製剤にての毒性試験を否定するものではない。いかにロジックを構築するかに尽きる

と考える。一般毒性試験では、低分子化合物と異なり致死量を求めることは困難である。本来単回投与毒性試験は、誤って薬物が大量投与された場合の毒性発現を明らかにし、反復投与時の用量を設定することが目的とされている。本細胞製剤は医師が定めた細胞数等用量を投与するため、誤大量投与の事態は想定されない。従って、臨床時用量を超える、技術的に投与可能な最大投与量で評価しうると考えている。そのため、安全性用量設定試験により技術的に投与可能な最大投与量を設定するべきであり、その際に臓器障害性についての基礎データを収集し、GLP 下で実施する単回投与毒性試験に反映させるべきである。反復投与毒性試験（亜急性毒性試験、慢性毒性試験）は、被験物質を反復投与した時に観察される毒性を明らかにする試験であり、その本質は蓄積毒性を観察する試験である。この試験の結果をもとに最大無毒性量を算出し、臨床試験を計画する際に反映させることとなっている。再生細胞治療製剤では反復投与毒性試験は実施の必要はないと考えられる。なんとなれば、単回投与であっても生着すれば長期にわたり暴露された状態となるからである。ただし、頻回投与する場合には反復投与毒性試験も必要となると思われる。

斯様な状況を鑑み、PMDA の指導の下、まず原材料の生物由来原料基準適合性を確認し、ついで安全性試験を実施することとした。原材料に関しては、生物由来原料基準適合性について確認した対面助言戦確 P31 の帰結を採用することとした。なお、細胞シートであるため一般毒性試験は不要ではないかという見解を伝え、薬理試験のみの実施で治験を開始できるよう、対面助言の実施を計画している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. 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 IL2Rgnull mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regenerative Therapy* 1 (2015) 30-37

2. **Okura H**, Soeda M, Morita M, Fujita M, Naba K, Ito C, Ichinose A, Matsuyama A. Therapeutic potential of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells in liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jan 24;456(4):860-5.
3. Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, **Okura H**, Ichinose A, Ozawa T, Matsuyama A, Hayakawa T. Role of notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Stem Cells Dev*. 2014 Sep 15;23(18):2211-24.
4. Shudo Y, Miyagawa S, **Okura H**, Fukushima S, Saito A, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y. Addition of mesenchymal stem cells enhances the therapeutic effects of skeletal myoblast cell-sheet transplantation in a rat ischemic cardiomyopathy model. *Tissue Eng Part A*. 2014 Feb;20(3-4):728-39.
5. Ozasa M, Sawada K, Iwayama T, Yamamoto S, Morimoto C, **Okura H**, Matsuyama A, Komoda H, Lee CM, Sawa Y, Kitamura M, Hashikawa T, Takedachi M and Murakami S. Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells. *Inflammation and Regeneration*. Vol. 34 (2014) No. 2 p. 109-116

6. Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, **Okura H**, Ichinose A, Matsuyama A, Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system. Hayakawa T. PLoS One. 2013 Jun 12;8(6):e66274.
7. **Okura H**, Saga A, Soeda M, Miyagawa S, Sawa Y, Daimon T, Ichinose A, Matsuyama A. Intracoronary artery transplantation of cardiomyoblast-like cells from human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction and survival in a swine model of chronic myocardial infarction. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Sep 7;425(4):859-65.
8. Moriyama M, Moriyama H, Ueda A, Nishibata Y, **Okura H**, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. BMC Cell Biol. 2012 Aug 7;13:21.

〔学会発表〕(計 11 件)

#### 国際

1. Transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits
2. Transplantation of human Adipose tissue-derived multilineage progenitor cells but not adipose tissue-derived stromal/stem cells reduces serum in hyperlipidemic WATANABE rabbits.
3. *in situ* Reprogrammed spermine

treated-adipose tissue-derived multilineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction in a swine chronic myocardial infarction model.

4. Transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells via portal vein improved serum levels of beta-galactosidase in GM1-gangliosidosis model mice.

#### 国内

1. 再生医療製剤の品質管理とレギュラトリーサイエンス
2. 体性幹細胞の品質管理
3. 再生医療と非臨床試験
4. スペルミン加脂肪組織由来多系統前駆細胞の *in situ* reprogrammed による心筋再生
5. 脂肪組織由来多系統前駆細胞のライソゾーム病に対する治療効果に関する検討

〔図書〕(計 4 件)

1. **大倉華雪**・松山晃文 細胞医療での申請にあたっての注意点 品質の観点から 先進医療 NAVIGATOR II 再生医療・がん領域の実用化への TOPICS 2014. pp5-8.
2. **大倉華雪** 松山晃文:「再生医療の開発および規制の歴史」再生医療. 情報機構 (印刷中)
3. **大倉華雪** 松山晃文:「再生医療にかかる規制の現状」日本臨床 (印刷中)
4. **大倉華雪** 松山晃文:「再生医療製品の品質管理と規制への対応」再生医療事業の課題解決のための手引書. 技術情報協会 (印刷中)

〔その他〕  
特記事項なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者:大倉 華雪 (Hanayuki, Okura)  
独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・研究調整専門員  
研究者番号:20589684