

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 筋疾患に対する他家細胞移植治療剤の開発
(英語) Development of autologous cell therapy for muscular disease

研究開発実施期間: 2018年10月1日～2020年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 櫻井 英俊
(英語) Hidetoshi Sakurai

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人京都大学・iPS細胞研究所・准教授
(英語) Kyoto University, Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Associate Professor

II 研究開発の概要

【研究開発の目的および開発項目】

本研究開発の最終目標は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の新規治療法として、再生医療用 iPS 細胞ストックから分化誘導、純化、凍結保存した骨格筋幹細胞を用いた細胞治療製剤を開発することである。その達成のため本セットアップスキームでは、作製された iPS 細胞ストック由来骨格筋幹細胞が、DMD モデルマウスへの移植により腫瘍化などの副作用なく治療効果を発揮するかという POC の取得を目標とした (研究開発項目 1)。また細胞治療製剤化へのステップとして、骨格筋幹細胞を高い筋再生能力を保持したまま凍結保存できる技術の開発も目標とした (研究開発項目 2)。さらに前臨床試験の実施に向け、ヒトへの治療に外挿できる動物モデルとしてラットモデルに注目し、ヒト細胞を受け入れることのできる免疫不全 DMD モデルラットの作製も目標とした (研究開発項目 3)。

【研究開発の成果】

(1) 再生医療用 iPS 細胞ストックを用いた POC 取得

1) 再生医療用 iPS 細胞ストック由来骨格筋幹細胞の性状評価

まず骨格筋幹細胞の純化方法について検証を進めた。これまでに使用してきた骨格筋幹細胞の表面マーカーである CD82 について、ヒト iPS 細胞分化系においては間葉系細胞も CD82 陽性であり、CD82 陽性分画に骨格筋幹細胞以外の系譜の細胞が混入している事が、線維化などのリスクにつながる可能性が懸念された。そこで以前に解析していた、Pax7-Venus ノックイン iPS 細胞を活用した Pax7 陽性細胞における網羅的遺伝子発現解析のデータを再解析することで、Pax7 陽性細胞特異的な表面マーカーの探索を行い、MCAM を同定した。再生医療用 iPS 細胞ストックから骨格筋幹細胞を MCAM 陽性/CD57 陰性分画を用いて純化し、再培養系にて 70%以上の効率で筋分化誘導に成功した。また免疫不全 DMD モデルマウスへの移植では、 3×10^5 個の細胞を移植し平均 70 本程度、最大 100 本の再生筋線維を同定した。同一の細胞サンプルを用いて、CD82 陽性細胞と MCAM 陽性細胞を純化し免疫不全 DMD モデルマウスに移植した実験では、CD82 陽性細胞移植肢において間質領域の増生、線維化の拡大を認めたが、MCAM 陽性細胞移植肢では筋再生のみを認めており、今後の開発においても有用なマーカーとなる MCAM の同定に成功した。

2) DMD モデルマウスへの移植による有効性および安全性の検証

上記で性状評価された骨格筋幹細胞を免疫不全 DMD モデルマウスの片側の腓腹筋に移植し、4 週ごとに筋張力測定を経時的に実施した。移植後 24 週時点で非移植側の腓腹筋と比較して筋力改善効果を解析した。12 例のマウスに移植し、自然死等で 4 匹が脱落したため、8 匹の解析データとなった。残念ながらいずれの時点でも、筋張力の改善を示すデータは得られなかった。引き続いて移植 26 週後に組織学的解析も行った。ジストロフィン陽性筋線維数は最大 400 本、平均 240 本程度で目標とする 1000 本には及ばなかった。腫瘍形成は 8 例全例で認められなかったことにより、iPS 細胞由来細胞の最大の懸念事項である腫瘍化については一定の安全性が示された。しかし 8 例中 7 例で線維化や脂肪化の進行が認められ、それが移植細胞に起因することが明らかとなった。筋再生のレベルが目標に達しなかったことの原因として、新規マーカー MCAM を使用したものの、純化後の細胞に非目的細胞が混入し線維化や脂肪化にはたらいてしまい、筋再生を阻害してしまったことが示唆された。

(2) 骨格筋幹細胞の能力を損なわない凍結保存法の確立

1) 細胞生存率の高い凍結保存試薬の選定

市販の細胞凍結試薬 9 種類を用いて、同一の細胞を使って凍結保存時の細胞生存率を比較検証した。iPS 細胞由来 Pax7 陽性細胞を凍結保存し、解凍時の細胞生存率が 60%を超えたのは 6 種類であり、最も高い

ものは80%を超える生存率であった。解凍後培養の細胞増殖率で比較すると、5日間で20倍以上の増殖を示すものが5種類あり、筋分化効率とも合わせてベストであったバンバンカー（DMSO+およびDMSO-）を選別した。また細胞解離法の検証も進め、従来法よりも生存率の良いAccumaxを用いた方法をプロトコール化した。それらの成果をプログラムフリーザーを用いた凍結プロトコールに適応することで、解凍後の生存率が90%を超えるプロトコールを策定できた。

2) 解凍後の骨格筋幹細胞の筋再生能評価

上記で選定した細胞凍結保存試薬を用いて、まず実験用iPS細胞株であるPax7-VenusレポーターiPS細胞から骨格筋幹細胞を分化誘導し、Pax7の発現を元に純化した。純化直後および凍結保存し1週間後に解凍したサンプルを、免疫不全DMDモデルマウスの前脛骨筋に $2\sim 3 \times 10^5$ 個の細胞を移植した。4週後に組織学解析を行い、ジストロフィン陽性筋線維を計数したところ、純化直後サンプルでは128本、凍結融解後のサンプルでは68本のジストロフィン陽性線維を確認し、再現効率は約52%であった。次にPOC取得試験で用いた再生医療用iPS細胞ストック株から骨格筋幹細胞を分化誘導し、MCAM陽性CD57陰性分画を純化し、同様に純化直後サンプルと凍結保存1週間後のサンプルを移植して筋再生能を比較した。しかし純化直後サンプルでもジストロフィン陽性線維が38本、14本、28本と非常に低い筋再生能しか認められず、凍結融解後のサンプルでは4本から12本という低い水準であった。凍結細胞による再現効率は約34%であった。今回の実験では非凍結細胞でのジストロフィン陽性線維数が少なく、用いた細胞のロットにおいて骨格筋幹細胞への分化誘導効率が低かった可能性が高い。一方でiPS細胞由来骨格筋幹細胞は、少なくとも凍結・融解後も筋再生能力を保持していることが確認出来、今後の至適化によって細胞製剤となりうることが示唆された。

(3) 免疫不全DMDモデルラットの作出

1) 免疫不全DMDモデルラット受精卵の作製

日本クレアへの業務委託により、東京大学よりDMDヘテロラット♀を日本クレアに搬入し、F344/NJcl-rnu/rnuラット♂との自然交配で受精卵を作製し、免疫不全DMDモデルラット受精卵を196個作製することに成功した。

2) 免疫不全DMDモデルラットの繁殖と、病理学的検討

日本クレアにて上記受精卵を偽妊娠ラットに胚移植しF0ラットを作製した。そのF0ラットをCiRA動物実験施設に搬入し、ジェノタイプングを実施し、DMDヘテロ/ヌードヘテロの遺伝子型を示す♀ラットを3匹選別した。このヘテロ♀ラットに日本クレアより購入したヌードラット♂との掛け合わせを進めた。これまでのところヌードバックグラウンドのDMDヘテロラット♀が8匹、ヌードバックグラウンドのDMD-KOラット♂が9匹生まれた。またDMD-KO/ヌードヘテロラットを用いて組織学的解析を進め、ジストロフィン免疫染色にてジストロフィン発現の欠損を確認し、HE染色にて炎症細胞浸潤や壊死筋線維の増加を認めた。また横隔膜サンプルのシリウスレッド染色にてシリウスレッド陽性の線維化領域が増大していることが明らかとなり、DMDモデルとして有用性が確認された。

【研究開発の意義】

本研究開発によって、骨格筋幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する治療法確立を目指したが、安全性では腫瘍化の懸念は払拭できたものの、大変残念ながら有効性のPOCは取得できなかった。2018年度に線維化抑制に有用と考えられるMCAMという新規マーカーを同定し、プロトコールは万全と思われたが、やはり長期的な観察では線維化や脂肪化した領域が増大してしまい、肝心の筋再生は阻害されていた。

今回の開発で得た教訓としては、やはりiPS細胞から分化させた細胞は一様な細胞群ではなく、複数の細胞が混在しHeterogeneityが高いという事実である。今後はいかに必要な細胞だけを純化し、不要な細

胞を除去するのか、というテーマの1点に絞って研究を進める。そのために、シングルセル RNAseq など 1 細胞レベルの解析を進め、我々が扱っている細胞集団にはどのようなクラスターが存在し、どれが必要でどれが不要かを科学的に十分な根拠で明らかにすることであると考える。

一方で凍結保存法の開発については、最適な凍結保存試薬と細胞解離法にプログラムフリーザーを使用することで、凍結融解後の細胞生存率が 90%を超える有用な凍結保存プロトコルが策定できたと考える。さらに DMD モデルヌードラットの作出も順調に進んでおり、供給を開始できるレベルになった。あとは細胞純化に関する部分で検証が進めば、臨床開発も遠くない未来に達成できるものと考えている。

[Purpose of R&D]

The ultimate goal of this research is to develop a new cell therapy for Duchenne muscular dystrophy (DMD). In order to achieve this goal, we aimed to obtain the POC whether the produced iPS cell stock-derived skeletal muscle stem cells (iMuSCs) exert a therapeutic effect without side effects such as tumorigenesis by transplantation into DMD model mice. In addition, as a step toward the formulation of cell therapy, we also aimed to develop a technology that enables cryopreservation of iMuSCs while maintaining high muscle regeneration capacity. Furthermore, for the purpose of conducting preclinical studies, we aimed to produce immunodeficient DMD model rats that can accept human cells.

[Achievement]

First, we identified new surface marker MCAM for the purification of iMuSC by deep analysis of RNAseq data taken from PAX7 positive cells derived from iPSCs. MCAM positive cells showed less fibrogenesis than previously used CD82 positive cells, while they retained muscle regeneration potential as well as CD82 positive cells. Then we transplanted MCAM positive iMuSCs into the gastrocnemius muscle of one side of immunodeficient DMD model mouse to obtain POC for cell therapy. At 24 weeks after transplantation, the effect of improving muscle strength was analyzed in comparison with the gastrocnemius muscle on the non-transplant side. Unfortunately, no data were available to show improvement in muscle tension. A histological analysis was also performed 26 weeks after the transplantation. The maximum number of dystrophin-positive muscle fibers was 400, and the average was about 240, which was less than the target of 1000. Since no tumorigenesis was observed in all 8 cases, a certain level of safety was shown for tumorigenesis, which is the greatest concern of iPS cell-derived cells. However, in 7 out of 8 cases, progression of fibrosis and adipogenesis was observed, which was clarified to be due to transplanted cells. These results suggest that muscle regeneration may be repressed by fibrosis and adipogenesis caused by the contamination of non-target cells in MCAM+ cells.

Regarding the establishment of the cryopreservation method, we first selected Banbanker as a good candidate to keep cell viability after freeze-thawing. Combination of the programmed freezer and optimal reagents improved cell viability after freeze-thawing over 90%. As for comparison of muscle regeneration, the iMuSCs after freeze-thawing showed about half muscle regeneration potential than the iMuSCs immediately after purification.

Regarding the production of model rats, we obtained eight female DMD heterozygous/nude rats and nine male DMD-KO/nude rats. Histological analysis was performed using DMD-KO/nude hetero rats, dystrophin immunostaining confirmed a deficiency of dystrophin expression, and HE staining showed inflammatory cell infiltration and an increase in necrotic muscle fibers. Sirius red

staining of the diaphragm sample revealed that the fibrotic region was increased All these histological results revealed usefulness of DMD-KO/nude rat as a DMD model.

III 事後評価総合所見

新規表面マーカーMCAM を活用して再生医療用 iPS 細胞ストックから純化された骨格筋幹細胞群を免疫不全 DMD モデルマウスに移植して POC 検証が進められた結果、腫瘍化の懸念が概ね払拭されました。また、非臨床 POC 検証で有用なモデルとなりうる免疫不全 DMD モデルラットの開発も進展し、供給可能なレベルに達するなど、高い達成度が認められました。セットアップ企業内には CPC が立ち上がっており、臨床試験に向けての細胞調整に関する準備は整えられています。

分化誘導した細胞の Heterogeneity が解決すべき新たな課題として浮上しており、その解決方法の構築が一つのポイントであると考えられます。その課題を克服し研究が進展することを期待します。