

【報告様式A】

日本医療研究開発機構
再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）新生児の肺障害を修復する多能性幹細胞（Muse細胞）を用いた再生治療の開発

（英語）Development of regenerative therapy using pluripotent stem cells (Muse cells) to repair neonatal lung injury

研究開発実施期間：令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）佐藤 義朗

（英語）Yoshiaki Sato

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）国立大学法人東海国立大学機構・名古屋大学医学部附属病院・病院准教授

（英語）Tokai National Higher Education and Research System・Nagoya University Hospital・Associate clinical professor

II 研究開発の概要

1) 研究開発の背景、目的

新生児慢性肺疾患 (CLD) は依然として極低出生体重児の約 4 割に認められる重大な合併症である。人工呼吸器管理以外に十分な治療法はないため、CLD への進展予防のための新規治療法の開発は急務の課題である。

一方、我々が実用化を計画している Muse 細胞は、生体に内在する多能性幹細胞であり、他の間葉系幹細胞と同様に抗炎症作用を示すだけでなく、また、傷害組織からのシグナルに対する受容体を有するため、血管投与であっても傷害部位に集積・生着し、組織を構成する細胞に分化し、修復する細胞となると考えられている。

本研究開発の目的は、極低出生体重児の重大な合併症である CLD に対して、Muse 細胞を用いた新たな治療法を開発することである。

本研究課題では、Muse 細胞以外の間葉系幹細胞、間葉系幹細胞全体や媒体投与と治療効果を動物モデルで比較し、また、その機序の解明を進めることとした。また、Muse 細胞の気管内投与の有効性も確認し、投与経路の最適化を図り、治験に向けた非臨床 POC を取得することとした。

2) 各研究開発項目の成果

研究開発項目 1：効力を裏付ける試験～Muse 細胞投与の肺機能改善効果

生後 24 時間以内の SD ラットの新生仔ラットに 80% の高酸素負荷をすることにより CLD モデルを作製した。日齢 5 に外頸静脈から、Muse 細胞、Muse 細胞以外の間葉系幹細胞 (non Muse 細胞)、間葉系幹細胞全体、あるいは媒体 (Vehicle) を外頸静脈から投与し、有効性を検討した。

- Muse 細胞を投与すると、CLD で認められる肺胞発達障害が軽減した。その効果は、non Muse 細胞や間葉系幹細胞全体よりも有意であった。
- 肺機能評価 (肺活量、分時換気量) においても Muse 細胞の効果は、non Muse 細胞や間葉系幹細胞全体よりも有意であった。
- Muse 細胞は、肺障害に伴い併発する肺高血圧症に対しても治療効果をもたらした。壁肥厚での評価では、その効果は、non Muse 細胞や間葉系幹細胞全体よりも有意に高く、また、Muse 細胞は、カテーテルで測定した右心室圧の評価でも有意な低下が確認された。
- Muse 細胞は、肺障害に伴い併発する末梢肺動脈の肥厚を改善し、末梢肺動脈血管壁の細胞新生を改善した。
- Muse 細胞は、肺傷害に伴い増加する肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症性細胞を減少させた。

研究開発項目 2：効力を裏付ける試験～投与経路による違いの検討～

研究開発項目 1 と同じモデルを使用し、日齢 5 に気管内投与、あるいは静脈内投与で Muse 細胞、あるいは媒体 (Vehicle) を投与し、有効性、安全性を比較した。

- 生存率は、気管内投与群より静脈内投与群の方が高かった。

- ・ 静脈内投与群に比べ、気管内投与群で体重増加の鈍化が強かった。
- ・ 両投与方法ともに Muse 細胞による肺胞発達障害の改善が認められた。
- ・ 静脈内投与群では、肺機能（肺活量）の改善が認められたが、気管内投与群はその効果は不十分であった。

研究開発項目 3： Muse 細胞の投与後体内分布、分化能、肺修復能の解析

- ・ CLD モデルの日齢 15 に、ヒトゲノムに特異的な Alu 配列の定量的 PCR でヒト細胞（Muse 細胞、non Muse 細胞を検出することにより投与後の体内分布（肺、脳、肝臓、脾臓）を評価した。non Muse 細胞に比べ、Muse 細胞投与時で、より高い分布が、各臓器において確認された。
- ・ 日齢 5 に GFP 遺伝子を導入した Muse 細胞、non Muse 細胞を CLD モデルに投与し、日齢 29（投与後 24 日）に免疫組織学的に肺での細胞の生着を確認したところ、Muse 細胞投与時に、より多くの GFP 陽性細胞が観察された。また、その多くの細胞は、ヒト細胞質マーカー特異的抗体である STEM121 も陽性であった。Muse 群では多くの扁平状の陽性細胞を、non Muse 群では球体状の陽性細胞を確認した。
- ・ ヒト I 型肺胞上皮細胞マーカーであるヒトポドプラニン⁺は、Muse 群の GFP 陽性細胞、特に GFP 陽性の扁平状細胞において発現を確認した。そのヒトポドプラニン⁺陽性細胞は、リング状の局在が散見され、肺胞の修復や形成に寄与している可能性が示唆された。一方、non Muse 細胞群ではヒトポドプラニンの発現が認められなかった。また、Muse 細胞群の一部の球体状 GFP 陽性細胞において、周囲に扁平状の GFP 陽性細胞が少ない場所で、ヒト II 型肺胞上皮細胞マーカーであるヒト SP-A（PE-10）の発現を確認した。

研究開発項目 4： 治療機序解明

- ・ 対照群、CLD モデル群、Muse 細胞を投与した CLD モデル群、non-Muse 細胞を投与した CLD モデル群の日齢 15 の肺からタンパク質を抽出し、タンパク質の網羅的解析を行った。検出・定量された 2,694 分子のうち、CLD で有意に変動したタンパク質が 844 分子あった。そのうち、Muse 細胞により変動したタンパク質は 141 分子であり、うち 85 分子は、non Muse 細胞では変動せず、Muse 細胞のみに影響を受けた。
- ・ Gene Ontology を用いたアノテーション解析を行ったところ、細胞接着関連分子（8 分子）と血液凝固関連分子（4 分子）の発現変動が、病態と治療機序として重要である可能性が高いと考えられた。
- ・ 細胞接着関連分子（8 分子）のうち分子 A は、細胞の成熟や分化、形態形成に大きく関与し、B シグナル経路の中心的な分子であるが、免疫組織学的評価では、肺内に生着した Muse 細胞に隣接した肺細胞に発現亢進を認めた。一方、肺で認められた non Muse 細胞の周囲での発現の亢進は認められなかった。治療機序として、Muse 細胞による直接的な、あるいは液性因子による間接的な、周囲の肺細胞への B シグナルの誘導が関与している可能性が示された。
- ・ 同様にアノテーション解析により選出された分子 C は、免疫細胞の浸潤とそれに伴う炎症を抑制する機能を持つが、non Muse 細胞群に比べ、Muse 細胞群で著明に発現が亢進していた。Muse 細胞が

C 陽性細胞を増加させ、免疫細胞の浸潤とそれに伴う炎症を制御している可能性が示唆された。

- CLD モデルに Muse 細胞を投与し、日齢 15 の摘出肺のメタボローム解析を行った。溶媒群と比較して、Muse 細胞群では肺内 Propionylcarnitine 及び Isobutyrylcarnitine の代謝産物量が少なく、Muse 細胞治療は、高濃度酸素曝露によるミトコンドリア内の代謝異常を軽減させる可能性があることが示唆された。
- 日齢 4 のマウスの肺を摘出後、スライスしてコラーゲン培地下で 4 日間培養を行うと、日齢 4 で固定した肺と比較して、より日齢 8 の形態に近い、擬似的な肺胞形成モデルを作製することができた。

研究開発項目 5：治験計画

- 治験における対象患者を決めるため、Muse 細胞治療が必要と思われる患者を早期に同定する必要がある。そのため、患者の予後を早期に予測できるモデルを作成するための後方視的臨床研究を、倫理審査委員会の手続きを経て、愛知県全域の population study（全 NICU）として行った。
- 2016 年 4 月から 2020 年 3 月に出生した在胎 32 週未満又は出生体重 1,500g 以下の全早産児（愛知県下の全周産期母子医療センター（21 施設））を対象に、RS score（Respiratory Severity score：MAP（平均気道内圧）×FiO₂（吸入酸素濃度））に、出生直後に得られる CLD のリスク因子を加え、在宅酸素療法（HOT）の使用又は CLD による死亡をアウトカムとした予測モデルを決定木分析にて作成した。
- その結果、在胎期間と日齢 7 の時点の RS score を用いて、アウトカム（CLD 死亡又は HOT）を予測できるモデル（AUC 0.7860）が作成できた。また、日齢 14 の時点の RS score のみを用いたモデル（AUC 0.7689）が作成できた。
- そのモデルの妥当性を検証するために、同時期に埼玉医大総合医療センターNICU に入院した児のデータセットに適応したところ、日齢 7 モデルで AUC が 0.7427、日齢 14 モデルで AUC が 0.8345 となり、ほぼ同等の予測精度があることが確認できた。
- 治験に向け、レギュラトリーサイエンス戦略相談（事前面談）を行い、先行する新生児低酸素性虚血性脳症に対する治験と同様の用法・用量であれば、追加の非臨床安全性試験は不要であり、そのため、非臨床安全性試験の充足性を確認するための対面助言は必要ない、と回答を得た。
- 2023 年 2 月 14 日に治験製品開発を進めていた企業が開発中止を発表した。

Background and purpose of this research

Neonatal chronic lung disease (CLD) remains a serious complication in approximately 40% of extremely low birth weight infants. Since there is no adequate treatment other than ventilator management, the development of new treatment methods to prevent progression to CLD is an urgent issue.

On the other hand, Muse cells, which are intrinsic pluripotent stem cells, exhibit not only anti-inflammatory effects like other mesenchymal stem cells, but also differentiate into tissue-constituting cells and repair the injured tissue. The purpose of this research is to develop a new treatment for CLD using Muse cells.

Results of each R&D item

Item 1: Treatment Effect of Muse Cells Administration on Lung Functions

1) Administration of Muse cells reduced the alveolar development impairment observed in CLD. The effect was more significant than that of non Muse cells or whole mesenchymal stem cells. 2) Lung function (lung vital capacity and minute ventilation rate) was also significantly improved by Muse cells compared to non Muse cells or whole mesenchymal stem cells. 3) The treatment of pulmonary hypertension associated with lung injury was also effective by Muse cells. The effect of Muse cells was significantly higher than that of non Muse cells and whole mesenchymal stem cells when assessed by wall thickening, and a significant reduction in right ventricular pressure measured by catheterization was also observed. 4) Muse cells reduced inflammatory cells in alveolar lavage fluid (BALF), which increases with lung injury.

Item 2: Efficacy Support Study - Examination of Differences by Route of Administration

1) The survival rate was higher in the intravenous group than in the intratracheal group. 2) The intratracheal group showed slower weight gain than the intravenous group. 3) Both methods of administration improved alveolar hyperplasia. 4) The intravenous group showed improvement in lung function (lung capacity), while the intratracheal group showed inadequate effect.

Item 3: Analysis of post-treatment distribution, differentiation ability, and lung repair ability of Muse cells

1) More Muse cells were detected than non Muse cells by quantitative PCR of Alu sequences. 2) More GFP-positive cells were observed in the lungs when GFP-labeled Muse cells were administered. 3) We observed more positive cells with flattened shapes in the Muse group and spherical shapes in the non Muse group. 4) Human podoplanin, a marker of human type I alveolar epithelial cells, was found to be expressed in GFP-positive cells in the Muse group, especially in GFP-positive flat cells. 5) Human SP-A (PE-10), a human type II alveolar epithelial cell marker, was found in some spheroidal GFP-positive cells in the Muse cell group. In the non Muse group, expression was confirmed in a large number of spherical GFP-positive cells.

Item 4: Elucidation of Therapeutic Mechanisms

1) Proteins were extracted from the lungs of CLD models, and comprehensive analysis was performed. Of the 2,694 molecules detected and quantified, 844 proteins were significantly altered in CLD. Of these, 141 proteins were affected by Muse cells administration, and 85 of them were affected only by Muse cells, not by non Muse cells. 2) The annotation analysis using Gene Ontology revealed that the expression changes of cell adhesion-related molecules (8 molecules) and blood coagulation-related molecules (4 molecules) are likely to be

important for the pathogenesis and therapeutic mechanism. 3) Molecule A is a major molecule in the B-signaling pathway, and is involved in cell maturation, differentiation, and morphogenesis, and was upregulated around Muse cells. 4) Molecule C, which has a function of suppressing immune cell infiltration and associated inflammation, was markedly upregulated in the Muse group.

Item 5: Clinical Trial Plan

1) The population study (clinical study) covered all patients less than 32 weeks or 1,500g in Aichi-prefecture was conducted to identify parameters to expect poor prognosis in early phase. The results showed that the model (AUC: 0.7860) was able to predict the outcome (death from CLD or HOT) at day 7 using the conception age and RS score. At day 14, a model (AUC: 0.7689) was generated using only the RS score. To verify the validity of this model, we adapted it to the dataset of Saitama Medical School and found that the prediction accuracy was almost equivalent.

2) Regulatory science strategy consultation meeting of PMDA was conducted, and no additional non-clinical safety studies are required if the dosage and administration is same to the preceding clinical trial for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Therefore, the response was that in-person advice to confirm the sufficiency of the non-clinical studies is not required. However, on February 14, 2023, development of the investigational product by the company was discontinued.