

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：ヒト成体間葉系幹細胞の再生医療実現のためのゲノム科学に基づく品質管理と体内動態研究

2. 研究開発代表者： 落谷孝広（国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野）

3. 研究開発の成果

（研究開発の概要）

hAD-MSC 均質性評価に関しては、継代数依存的に変化する数種類のエクソソーム中に含有される miRNA を同定し、特許出願（特願 2015-0177736）が完了している。H27 年度は品質管理試験としての妥当性を検証する目的で、別ドナー由来の hAD-MSC を用い、継代数によるターゲット miRNA（hsa-miR-Xa、Xb、Y）発現量変化について検討を行った。

（研究成果の概要）

1) 均質性評価系構築においては、これまでに 3 ドナー由来の hAD-MSC の継代数 4、継代数 6、継代数 11 において継代数依存的に発現が減少する 3 種類の miRNA（hsa-miR-Xa、Xb、Y）を同定し、これまでに特許出願まで完了している。今年度はさらに別ドナー由来の hAD-MSC による検証試験を実施し、その妥当性の確認について確認を行った。結果、hsa-miR-Xa 及び Y の 2 種類の miRNA に関しては再現性が確認できたが、hsa-miR-Xb に関しては再現性が確認できなかった。

2) hAD-MSCs の新たな有効性評価として ConA 誘発肝障害モデル（自己免疫性肝炎モデル）による薬効薬理試験を実施した。結果、細胞投与群において肝組織障害の改善と炎症細胞の浸潤抑制が確認された。次いで、本作用の MOA を明らかにする目的で、hAD-MSCs がエクソソームを分泌する現象に着目し検討を行った。エクソソームの分泌に関与するタンパクである nSMase2 を shRNA によりノックダウンすることでエクソソーム分泌を抑制した結果、mock control 細胞と比べて肝炎治療効果が減弱することが確認された。さらに、エクソソームに含まれるタンパク質及び miRNA について網羅解析を行い、肝炎治療に関連する候補分子(miRNA 等)を同定した。なお、本結果に関しては特許出願が既に完了している（特願 2015-250361）

3) IVIS による体内動態解析に関しては、H25 年度及び H26 年度の検討で継時的な動態解析の結果が得られているが、今年度はより特異性の高い解析を目的とし、レンチウイルスベクターを用いてルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞（hAD-MSC-Luc）を新たに樹立し、継時的な体内動態解析を実施した。その結果、本細胞を健常動物及び免疫不全動物（NOD-SCID）に静脈内投与した場合、投与直後より胸部への集積が認められ、その後継時的にそのシグナルが減弱し、72 時間後ではそのシグナルが消失することが判明した。

4) H27 年度は、Luc 遺伝子を hAD-MSC に導入し新たに樹立した hAD-MSC-Luc を ConA 誘発肝障害モデルマウスに投与し、疾患モデル動物における体内動態解析を行った。当初は尾静脈投与のみを予定していたが、投与経路による体内動態の比較を行う目的で、経脾臓投与も追加で行った。IVIS による解析の結果、細胞投与 24 時間後の肝臓において、尾静脈投与では投与細胞の検出はできなかったが、経脾臓投与では検出することができた。また、ConA により炎症反応を惹起させた肝臓において、正常動物に比べて尾静脈投与 24 時間後における投与細胞の集積が増強されていることも確認され、障害部位へのホーミング作用によって投与細胞が肝臓組織中へ遊走された可能性が示唆された。