

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 再生医療の実現化ハイウェイ
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine,
Highway Program for Realization of Regenerative Medicine.

研究開発課題名： (日本語) 培養ヒト骨髄細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法の開発
(英語) Development of a less invasive liver regeneration therapy using
cultured human bone marrow derived cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人山口大学大学院医学系研究科消化器内科学及び
再生医療研究教育センター 教授及びセンター長 坂井田 功

所属 役職 氏名： (英語) Department of Gastroenterology and Hepatology, and Center for
Regenerative Medicine, Yamaguchi University Graduate School of
Medicine.
Professor and Director, Isao Sakaida

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 培養骨髄間葉系細胞投与による肝線維化改善効果のメカニズム解析
開発課題名： (英語) Analysis of mechanism of liver fibrosis regression by the cultured
bone marrow derived mesenchymal stem cells.

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野
教授 寺井崇二

所属 役職 氏名： (英語) Division of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of
Medical and Dental Science, Niigata University.
Professor Shuji Terai

分担研究 (日本語) 薬事開発に対応可能な培養ヒト骨髄細胞の製造・品質管理工程構築に向けた支援

開発課題名: (英語) Support of manufacture and quality control process building of cultured human bone marrow derived cells for a clinical trial

研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人先端医療振興財団 再生医療製品開発室 室長 郷 正博

所属 役職 氏名: (英語) Foundation for Biomedical Research and Innovation, Division for Regenerative Medical Product Development.
Division Chief, Masahiro Go

II. 成果の概要 (総括研究報告)

山口大学は、肝硬変症に対する再生療法として自己骨髄細胞(骨髄単核球細胞)を末梢静脈から投与する「ABMi療法: Autologous bone marrow cell infusion therapy」を開発し、国内外でその安全性と有効性を確認した。しかし、ABMi療法は全身麻酔下に400mLの自己骨髄液を採取する必要があり、全身麻酔可能な症例に適応が制限されるため、重症の肝硬変症患者に適応するためには、ABMi療法をより低侵襲に発展させる必要があった。これまでの基礎研究で骨髄液を培養して得られる骨髄間葉系幹細胞(MSC: Mesenchymal stem cell)の肝線維化改善効果が明らかとなったことから、本研究開発では小型動物(マウス)や中大型動物(イヌ)モデル系で非臨床 Proof of Concept (POC)を取得し、ABMi療法では適応外となる肝硬変患者を対象とする「培養ヒト骨髄細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法」を開発することを目的とした。

平成23~25年度「再生医療の実現化プロジェクト・再生医療の実現化ハイウェイ」プログラムでは、局所麻酔下に採取した少量の骨髄液から骨髄MSCを培養し、末梢静脈から点滴投与する「培養ヒト骨髄MSCを用いた低侵襲肝臓再生療法」を開発した。免疫不全マウス肝硬変モデル及びイヌ肝線維化モデルで骨髄MSCの末梢静脈投与による肝線維化改善を確認し、免疫不全マウスでの*in vivo*造腫瘍性試験、イヌモデルでの単回投与毒性試験を経て非臨床POCを取得し、平成26年8月に安全キャビネットで培養した自己骨髄MSCを用いた「低侵襲肝臓再生療法の安全性に関する研究」について厚生労働大臣より実施の了承を得た(厚生労働省発医政0806第8号)。そこで平成27年2月より厚生労働省「再生医療実用化研究事業」プログラムとして、臨床研究「非代償性肝硬変患者に対する培養自己骨髄細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法の安全性に関する研究」を開始し、平成28年3月31日までに5例に実施し、うち4例に細胞投与を行った。

さらに平成26~28年度「再生医療の実現化プロジェクト・再生医療の実現化ハイウェイ」プログラムにおいて、「より効率的な骨髄MSCを用いた低侵襲肝臓再生療法」を開発した。初めに、イヌ肝線維化評価モデルを確立し、細胞(非培養全骨髄細胞 vs 培養骨髄MSC)や細胞投与経路(末梢静脈 vs 肝動脈)の違いによる治療効果の比較を行った。その結果、全骨髄細胞と骨髄MSCの治療効果は同等であること、肝動脈の治療効果は末梢静脈より高いこと、単回投与毒性試験でも肝梗塞や向凝固活性の亢進等認めないことを確認したことから、骨髄MSCの肝動脈投与の非臨床POCを取得した。また、山口大学医学部附属病院の「アイソレータ完備 Cell Processing Facility」に対応したSOP図書を整備した後、クールドランを実施し、品質評価基準を満たす十分量の骨髄MSCの培養が可能であることを確認した。以上

の研究成果に基づき、平成 29 年 3 月 23 日にアイソレータを用いた「非代償性肝硬変症に対する培養自己骨髄 MSC 肝動脈投与療法の安全性に関する研究」について、山口大学特定認定再生医療等委員会への第二種再生医療等提供計画申請が受理された。

これと並行して、治験に向けた取り組みとして、「CP-1 液とヒト血清アルブミン液の混合液」を用いた長期保存に対応したヒト骨髄 MSC の凍結保存法、マイコプラズマ否定試験（第 17 改正日本薬局方）に準じた PCR 法による測定系を確立した。また、PMDA との事前相談を行い、生物由来原料基準・反芻動物由来原料基準への適合、製造工程不純物の安全性アセスメントについて協議した。

さらに、骨髄 MSC を用いた肝臓再生療法の効率化を図るため、培養 MSC の体内動態及び肝線維化改善効果のメカニズムの解析を行った。*in vivo* 生体内イメージング系を用いて、マウスの尾静脈または脾臓から投与した骨髄 MSC・全骨髄細胞の体内動態を観察し、肝動脈投与を模した脾臓投与では、肝臓特異的に投与細胞が分布することが明らかとなった。*in vitro* では、骨髄 MSC とマクロファージの細胞間相互作用について検討し、骨髄 MSC 由来液性因子（エクソソーム、microRNA (miR)、ケモカイン）の肝細胞保護、抗炎症効果、マクロファージ Matrix metalloproteinases (MMPs) 産生促進効果等を明らかにした。以上の研究開発は山口大学、先端医療振興財団、新潟大学が共働で実施した。

Yamaguchi University has developed an autologous bone marrow cell infusion (ABMi) therapy, in which autologous bone-marrow cells (BMCs) (bone-marrow mononuclear cells) are administered via a peripheral vein as regenerative therapy for liver cirrhosis, and confirmed its safety and efficacy in Japan and other countries. Its application is limited, however, to cases permitting the use of general anesthesia necessary for collection of 400 mL of BM fluid. For patients with severe liver cirrhosis, a less invasive therapy was therefore necessary. Basic research showed improvement in liver fibrosis as an effect of mesenchymal stem cells (MSCs) cultured from BM fluid. In the present research, the objective was therefore to obtain nonclinical proof of concept (POC) with small animals (mice) and medium- to large-size animals (canine) models, and on this basis, develop a less invasive liver regeneration therapy using cultured autologous BMCs for liver cirrhosis patients in which ABMi therapy is not indicated.

In the Project for Practical Applications of Regenerative Medicine and the Highway Program for Realization of Regenerative Medicine from 2011 to 2013, we therefore cultured MSCs from a small amount of bone-marrow fluid obtained under local anesthesia and developed less-invasive liver regeneration therapy comprising drip infusion of cultured human bone marrow MSCs (BM-MSCs) via a peripheral vein. We confirmed liver fibrosis improvement by peripheral vein administration of the BM-MSCs in an immunodeficient mouse liver cirrhosis model and in a canine liver fibrosis model, and obtained nonclinical POC in immunodeficient mouse *in vivo* tumorigenicity testing and by single-dose toxicity testing in the canine model. We received approval from the Minister of Health, Labour and Welfare (MHLW) (0806 No. 8 issued by Health Policy Bureau, MHLW), in August 2014 for performance of clinical research on the safety of the less-invasive method of liver regeneration using autologous BM-MSCs cultured in a safety cabinet, and in February of the following year we began the clinical study known as the Study to assess the Safety of a Less-invasive Liver Regeneration Therapy Using Cultured Autologous Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells for Decompensated Liver Cirrhotic Patient, as part of the MHLW Regenerative Medicine Realization

Research program. Five cases were enrolled in the study and cell administration was performed for four of the five by 31 March 2016.

In developing this therapy, known as the More Efficient Method of Less-invasive Liver Regeneration using BM-MSCs, from 2014 to 2016 in the Project for Practical Applications of Regenerative Medicine and the Highway Program for Realization of Regenerative Medicine, we first established a canine liver fibrosis assessment model and used it to compare the therapeutic effects of the different cells (non-cultured total BMCs vs. cultured BM-MSCs) and the different routes of administration (peripheral vein vs hepatic artery). The results showed that the therapeutic effects with BM-MSCs as with total BMCs and higher with hepatic artery administration than with peripheral venous administration. No hepatic infarction or accelerated procoagulant activity was found even in the single-dose toxicity test. We thus obtained nonclinical POC for BM-MSC hepatic artery administration. We compiled the standard operating procedures for the Cell Processing Facility complete with isolator at Yamaguchi University Hospital and performed cold runs that confirmed its capability for culturing BM-MSCs in amounts sufficient to satisfy quality assessment criteria. Based on all of these research results, the application for “the Study to assess the Safety of Cultured Autologous BM-MSC Hepatic Artery Administration for Decompensated Liver Cirrhosis” was approved on 23 March 2017 by the Yamaguchi University Certified Committee for Regenerative Medicine.

Concurrently, we engaged in development of the underlying structure for implementation of the clinical research. We established a method of long-term preservation of human BM-MSC by cryopreservation using a mixture of CP-1 fluid and human serum albumin and a measurement system using PCR based on Negative Tests for Mycoplasma (The Japanese Pharmacopoeia, Seventeenth Edition), performed advance consultation with the PMDA, and discussed conformity with biologically derived materials standards and ruminant derived materials standards and production process impurities safety assessment.

We analyzed the internal biokinetics of cultured BM-MSCs and the mechanism of the liver fibrosis improvement effect with the objective of increasing the efficiency of liver regeneration therapy with BM-MSCs, used an *in vivo* imaging system to observe the internal biokinetics of BM-BSCs administered via the mouse caudal vein or spleen, and confirmed the liver-specific distribution of administered cells by splenic administration simulating the administration via the hepatic artery.

We performed *in vitro* examination of the cellular interaction between BM-MSCs and macrophages to elucidate the hepatic cell-protection, anti-inflammatory, and macrophage matrix metalloproteinase production-promoting effects of BM-MSC derived humoral factors (exosomes, microRNA, and chemokines).

This project was performed through the collaboration of Yamaguchi University, the Foundation for Biomedical Research and Innovation, and Niigata University.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Cell transplantation as a non-invasive strategy for treating liver fibrosis. Matsumoto T, Takami T, Sakaida I. Expert Review of Gastroenterology & Hepatology. 2016;10(5):639-48.
2. Status of and candidates for cell therapy in liver cirrhosis. Terai S, Tsuchiya A. Journal of Gastroenterology. 2017;52(2):129-140.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 非代償性肝硬変症に対する培養自己骨髄間葉系幹細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法, ポスター, 高見 太郎, 松本 俊彦, 坂井田 功, 第 113 回日本内科学会総会, 2016.4.16, 国内
2. 自己骨髄細胞による肝臓再生療法の臨床実施とそのメカニズム解析, 口頭, 松本俊彦, 高見太郎, 坂井田 功, 第 102 回日本消化器病学会総会, 2016/4/22, 国内
3. 当科における非代償性肝硬変症に対する先進的医療の現状と展開, 口頭, 高見太郎, 石川 剛, 坂井田 功, 第 52 回日本肝臓学会総会, 2016/5/19, 国内
4. 培養骨髄間葉系細胞によるマクロファージ MMP 発現の制御, 口頭, 仁志 麻衣子, 松本 俊彦, 高見 太郎, 坂井田 功, 第 52 回日本肝臓学会総会, 2016/5/19, 国内
5. イヌ肝線維化モデル系における培養自己骨髄間葉系幹細胞投与の有効性評価, ポスター, 相部 祐希, 高見 太郎, 西村 達朗, 佐々木 嶺, 松田 崇史, 藤澤 浩一, 松本 俊彦, 石川 剛, 山本直樹, 坂井田 功, 第 52 回日本肝臓学会総会, 2016/5/19, 国内
6. Hepatic arterial infusion of cultured autologous bone marrow mesenchymal stem cells has a stronger therapeutic effect on liver cirrhosis in our established canine model. Poster. Taro Takami, Yuki Aibe, Tatsuro Nishimura, Takashi Matsuda, Toshihiko Matsumoto, Koichi Fujisawa, Naoki Yamamoto, Kenji Tani, Yasuho Taura, Isao Sakaida. The 13rd Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research. 2016/6/23. 国外
7. 肝硬変症に対する自己骨髄細胞による肝再生機序の検討, 口頭, 高見太郎, 松本俊彦, 坂井田 功, 第 23 回肝細胞研究会, 2016/7/7, 国内
8. イヌ肝線維化モデル系における培養自己骨髄間葉系幹細胞投与の有効性評価, 口頭, 相部 祐希, 高見太郎, 西村達朗, 佐々木嶺, 松田崇史, 山本直樹, 坂井田功, 第 23 回肝細胞研究会, 2016/7/7, 国内
9. Our liver regeneration therapies using autologous bone marrow-derived cells for liver cirrhosis: current status and prospects. Oral. Taro Takami, Isao Sakaida. ISBRA ESBRA BERLIN 2016. SYMPOSIUM "Alcohol and Organ Damage". 2017/9/4, 国外
10. 肝硬変症に対する自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法, 口頭, 高見太郎, 松本俊彦, 坂井田 功, 第 20 回日本肝臓学会大会, 2016/11/4, 国内

11. Hepatic arterial infusion of cultured autologous bone marrow mesenchymal stem cells has a stronger therapeutic effect on liver cirrhosis in our established canine model. Poster. Taro Takami, Isao Sakaida. Asian Pacific Digestive Week 2016. 2016/11/3, 国外
12. Cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells contributed to improving liver cirrhosis through both the direct stabilization of redox homeostasis and cell-cell interaction with macrophages. Poster. Taro Takami, Toshihiko Matsumoto, Maiko Nishi, Koichi Fujisawa, Naoki Yamamoto, Shuji Terai, Isao Sakaida. AASLD Liver Meeting 2017, 2017/11/13, 国外
13. The efficacy and safety of liver regeneration therapy by hepatic arterial infusion of cultured autologous bone marrow mesenchymal stem cells in our established canine cirrhotic model. Poster. Yuki Aibe, Taro Takami, Ryo Sasaki, Tatsuro Nishimura, Takashi Matsuda, Toshihiko Matsumoto, Koichi Fujisawa, Naoki Yamamoto, Kenji Tani, Isao Sakaida. AASLD Liver Meeting 2017, 2017/11/13, 国外
14. 培養骨髄間葉系細胞によるマクロファージ MMP 発現の制御, 口頭, 仁志 麻衣子, 松本 俊彦, 高見 太郎, 坂井田 功, 第 30 回肝類洞壁細胞研究会, 2016/11/25, 国内
15. 肝硬変症に対する自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法, 口頭, 坂井田功, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内
16. 肝硬変に対する培養骨髄間葉系幹細胞の肝臓再生機序の検討, 口頭, 高見太郎, 松本俊彦, 坂井田功, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法, 高見 太郎, 坂井田 功, やまぐち医療関連成長戦略推進協議会シンポジウム, 2016/9/13, ANA クラウンプラザホテル宇部, 国内
2. 培養ヒト骨髄細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法の開発, 坂井田 功, 平成 28 年度 AMED 再生医療公開シンポジウム, TKP ガーデンシティ品川 ボールルーム, 2017/2/2

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 再生医療の実現化ハイウェイ
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine,
Highway Program for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名：(日本語) 培養ヒト骨髄細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法の開発
(英語) Development of a less invasive liver regeneration therapy using
cultured human bone marrow derived cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人山口大学大学院医学系研究科消化器内科学及び
再生医療研究教育センター 教授及びセンター長 坂井田 功

所属 役職 氏名：(英語) Department of Gastroenterology and Hepatology, and Center for
Regenerative Medicine, Graduate School of Medicine, Yamaguchi
University.
Professor and Director, Isao Sakaida

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 薬事開発に対応可能な培養ヒト骨髄細胞の製造・品質管理工程構築に
向けた支援

開発課題名：(英語) Support of manufacture and quality control process building of cultured
human bone marrow derived cells for a clinical trial

研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人先端医療振興財団 再生医療製品開発室 室長 郷 正博

所属 役職 氏名：(英語) Foundation for Biomedical Research and Innovation, Division for
Regenerative Medical Product Development.
Division Chief, Masahiro Go

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者による報告の場合

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：山口大学大学院医学系研究科 坂井田 功 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 再生医療の実現化ハイウェイ
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine,
Highway Program for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) 培養ヒト骨髄細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法の開発
(英語) Development of a less invasive liver regeneration therapy using
cultured human bone marrow derived cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人山口大学大学院医学系研究科消化器内科学及び
再生医療研究教育センター 教授及びセンター長 坂井田 功

所属 役職 氏名： (英語) Department of Gastroenterology and Hepatology, and Center for
Regenerative Medicine, Yamaguchi University Graduate School of
Medicine. Professor and Director, Isao Sakaida

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 培養骨髄間葉系細胞投与による肝線維化改善効果のメカニズム解析
開発課題名： (英語) Analysis of mechanism of liver fibrosis regression by the cultured
bone marrow derived mesenchymal stem cells.

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野
教授 寺井崇二

所属 役職 氏名： (英語) Division of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medical
and Dental Science, Niigata University.
Professor Shuji Terai

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 山口大学大学院医学系研究科 坂井田 功 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Terai S, Tsuchiya A. Status of and candidates for cell therapy in liver cirrhosis: overcoming the "point of no return" in advanced liver cirrhosis. J Gastroenterol. 2017 Feb;52(2):129-140.
2. Tsuchiya A, Kojima Y, Ikarashi S, Seino S, Watanabe Y, Kawada Y, Terai S. Clinical trials using mesenchymal stem cells in liver diseases and inflammatory bowel diseases. Inflammation and Regeneration 2017 in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Combination therapy with mesenchymal stem cells and macrophages from bone marrow shows favorable outcome in mouse CCl4-induced liver cirrhosis model. ポスター発表, 渡邊雄介, 土屋淳紀, 寺井崇二, AASLD 2016, 2016/11/11-15, 海外
2. Comparative effectiveness of mesenchymal stem cell therapy and macrophage cell therapy in a liver cirrhosis disease model. ポスター発表, 土屋淳紀, 寺井崇二, APDW 2016, 2016/11/2-5, 国内
3. 難治性消化器疾患に対する修復再生療法の開発. 口頭, 寺井崇二, 日本再生・炎症医学会, 2016/6/16-17, 国内
4. 肝硬変の治療メカニズム解析のための骨髄由来 MSC, マクロファージ培養および解析. ポスター発表, 土屋淳紀, 寺井崇二, 日本再生・炎症医学会, 2016/6/16-17, 国内
5. 肝硬変に対する自己由来細胞を用いた再生療法から他家細胞を用いた再生医療へ. 口頭, 寺井崇二, 土屋淳紀, 日本再生医療学会, 2017/3/7-9, 国内
6. 骨髄由来間葉系幹細胞と培養マクロファージの混合投与療法による肝硬変治療. 口頭, 渡邊雄介, 土屋淳紀, 寺井崇二, 日本再生医療学会, 2017/3/7-9, 国内
7. 間葉系幹細胞、マクロファージの相互作用による新しい肝硬変治療を目指して. 口頭, 土屋淳紀, 寺井崇二, 日本肝臓学会東部会, 2016/12/8-9, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし。

(4) 特許出願
該当なし。