

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) 再生医療実用化研究事業
(英語) Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名：

(日本語) 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
(英語) Quality control and the kinetics of the in vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells based on genome sciences for the practical use of human adult mesenchymal stem cells in regenerative medicine

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野
主任分野長 落谷 孝広

所属 役職 氏名： (英語) Division of Molecular and Cellular Medicine,
National Cancer Center Research Institute,
Chief, Takahiro Ochiya

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) 最新のゲノム科学によるヒト脂肪由来間葉系細胞 (hAD-MSC) の性状解析
開発課題名： (英語) Functional analysis of hAD-MSC using genome analysis technologies

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 難治疾患研究所ゲノム病理学分野
教授 石川 俊平

所属 役職 氏名： (英語) Department of Genomic Pathology, Medical Research Institute, Tokyo
Medical and Dental University. Professor. Shumpei Ishikawa

分担研究

(日本語) hAD-MSCs の培養及び動物実験

開発課題名: (英語) Cultivation of hAD-MSC and animal experiment

研究開発分担者 (日本語) ロート製薬株式会社 マネージャー 石井 強

所属 役職 氏名: (英語)

Rohto Pharmaceutical co., ltd.

Regenerative Medicine Research & Planning Division.

Group Manager Tsuyoshi Ishii

II. 成果の概要 (総括研究報告)

再生医療製品の品質管理は、製品の安全性と有効性を保証する上で不可欠である。しかし、品質管理試験は、通常、大量の製品を消費するだけでなく、多くの時間、労力、費用を費やす。落谷孝広主任分野長 (国立がん研究センター研究所) らのグループは、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (hAD-MSC) の培養上清中のエクソソームに含まれる miRNA による簡便な品質管理方法を確立した。我々は、細胞老化に伴って発現抑制が認められる 3 種類の miRNA を同定した。本研究では、繰返し継代する事で細胞老化を誘導した hAD-MSC を用いた。継代数 4、6 及び 11 において、培養上清から分離したエクソソームから RNA を抽出し、miRNA 発現をマイクロアレイによって解析した。その結果、細胞の老化と関連する 3 種類のマイクロ RNA を同定した。qRT-PCR においても、これらマイクロ RNA は、細胞の老化に伴い発現が抑制されることが確認された。このように、これらのマイクロ RNA は、細胞老化に関わる培養上清中のバイオマーカーとして有用であると考えられ、培養上清の一部を用いる簡易で迅速な検査方法が確立されたと言える。

また、研究開発分担者のロート製薬と協力し、ヒト脂肪由来間葉系細胞 (hAD-MSC) の肝障害に対する抑制作用を確認した。今回の検討では、コンカナバリン A 誘発急性肝炎、四塩化炭素誘発肝硬変および非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスを用いて hAD-MSC の肝障害に対する改善作用を確認した。また、hAD-MSC の肝炎に対する改善作用のメカニズムは、エクソソームの分泌が関わっていることを示した。

疾患モデル動物に投与された hAD-MSC は、障害臓器に集積し、パラクラインやエクソソーム分泌などの様々な機構により、治療効果を示すとされる。今後、より詳細なメカニズムを解明するためには、新たな解析技術を導入する事も重要であると考えられる。石川俊平教授 (東京医科歯科大学) らのグループでは、投与細胞 (hAD-MSC) の体内動態を絶対定量的に解析することを目的とし、デジタル PCR 解析を実施した。定量解析に際しては、マウス由来細胞のコピー数をリファレンスとし、ヒト由来細胞の存在比率を算出した。この定量方法により、肝疾患モデルマウスにヒト由来 MSC を投与した時の体内動態を解析した。実験方法として、正常および肝傷害モデルマウスに MSC を投与した後、経時的 (6、24、48 時間) に臓器を採取した。結果、デジタル PCR により解析した場合、投与 6、24 および 48 時間後において、正常および肝炎動物のいずれにおいても、ヒト由来細胞の存在を絶対的に定量することが出来た。このように、デジタル PCR は新たな体内動態の解析装置とし

て有用であると期待される。また、今回の解析結果より、ヒト由来細胞は、投与 24 時間後をピークとし、継時的に減少する傾向があること、正常肝に比べて障害肝では約 10 倍のヒト由来細胞が存在することを確認した。このように、デジタル PCR を用いることで、肝臓へのホーミング現象を定量的に観察する事ができた。

さらに、前述の hAD-MSC により肝障害の改善が認められたマウスにおいて肝臓中のヒト由来細胞の遺伝子発現プロファイルを並列型シーケンサーにより解析を行い、*in vivo* 微小環境下で特異的に発現誘導される分泌タンパクを数種類同定することに成功した。

The quality control of regenerative medicine products is essential for guarantee its safety and efficacy. However, quality control tests need not only a large amount of final products, but extensive time, effort and expense. Ochiya Group (National Cancer Center Japan) established a method of quality control for human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAD-MSCs) using exosomal miRNAs in cell culture supernatant. We identified three exosomal miRNAs that decrease their expression along with the progression of cell senescence. In this study, cellular senescence of hAD-MSC was induced by serial passages. We conducted the microarray analysis of exosomal miRNA at the passage number 4, 6 and 11. In accordance with microarray data, the three miRNAs were down-regulated correlate with cellular senescence. Additionally, we confirmed the down-regulation of these microRNAs using real-time PCR. Finally, we proposed that three microRNAs as a new quality control marker using a small amount of culture supernatant.

Besides, in collaboration with Rohto Pharmaceutical Co. Ltd. which is a member of this research project, Ochiya group also confirmed that hAD-MSC have therapeutic potential against liver failure in mouse model such as acute hepatitis, cirrhosis and NASH. Furthermore, we demonstrated that hepatoprotective effects of hAD-MSCs against hepatitis were significantly dependent on their secretory capacity of exosomes.

There are accumulating evidence that hAD-MSC home to injured organ, and exhibit a therapeutic effect through paracrine effect and exosome secretion. We expected that genome analyzer such as digital PCR and RNA-sequencing would be useful to investigate more detailed mechanisms of regenerative medicine. Ishikawa Group (Tokyo Medical and Dental University) performed digital PCR analysis to absolutely quantitatively analyze kinetics of the *in vivo* distribution of hAD-MSC after administration in mouse. For the quantitative analysis, genomic DNAs purified from a mouse tissue were used as a template for the digital PCR analysis and the ratio of human cells relative to mouse cells were quantified using primers that distinguish human and mouse cells. In the current study, we administered hAD-MSCs intravenously and extracted their organs at 6, 24 and 48 hours in mice with or without hepatitis. As a result, the digital PCR was able to detect absolutely human genome from liver at 6, 24 and 48 hours after *i.v.* injection of hAD-MSCs in both normal and hepatitis mice. These results suggest that dPCR is a promising alternative for analyzing kinetics of hAD-MSCs in mouse. Ishikawa Group

confirmed that the ratio of human cells peaked at 24 hours after administration and then decreased afterwards. These data exhibit that there were 10 times more human cells in damaged liver compared to normal liver. Therefore, homing phenomenon was observed quantitatively using digital PCR.

Furthermore, they also analyzed human gene expression in the mouse liver damage model which was treated with hAD-MSCs. Massive parallel sequencing successfully identified several secreted proteins that were specifically induced in hAD-MSCs in the microenvironments of mouse damaged liver.

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 1 件、国際誌 0 件）

1. 倉田隼人・勝田毅・玉井里枝・石井強・落谷孝広（2017）「パラダイムシフトをもたらすエクソソーム機能研究最前線」 pp. 257-266. エヌティーエス

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ゲノム解析技術を用いた間葉系間質細胞の体内動態解析および機能解析、口頭、倉田隼人、玉井里枝、勝田毅、石井強、佐藤康成、中西宏文、石川俊平、落谷孝広、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/7
2. ヒト脂肪由来間葉系細胞を用いた細胞療法とエクソソーム、口頭、石井強、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/8
3. ヒト細胞マウス移植モデルのインタラクトーム解析、ポスター、河村大輔、砂河孝行、鈴木良平、貴志一樹、佐藤玲子、加藤洋人、石井強、落谷孝広、石川俊平、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/7

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「先制医療の最前線」落谷孝広 株式会社ヘルシーパス（市民）講演会 2016. 11. 27（東京）
2. 「間葉系幹細胞の可能性」落谷孝広 再生医療サポートビジネス懇話会 2016. 10. 17（京都）
3. 「動き出したエクソソーム創薬」落谷孝広 日経 BP 社講演会（一般）エクソソームセミナー 2016. 6. 6（東京）
4. 再生の起点となる間葉系幹細胞の抗炎症作用のメカニズムを解明する」落谷孝広 第 37 回日本炎症・再生医学会 ランチョンセミナー 2016. 6. 16（京都）

(4) 特許出願

今年度の出願はなし。

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) 再生医療実用化研究事業
(英語) Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名：

(日本語) 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
(英語) Quality control and the kinetics of the in vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells based on genome sciences for the practical use of human adult mesenchymal stem cells in regenerative medicine

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野
主任分野長 落谷 孝広
所属 役職 氏名： (英語) Division of Molecular and Cellular Medicine,
National Cancer Center Research Institute,
Chief, Takahiro Ochiya

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) 最新のゲノム科学によるヒト脂肪由来間葉系細胞 (hAD-MSC) の性状解析
開発課題名： (英語) Functional analysis of hAD-MSC using genome analysis technologies

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 難治疾患研究所ゲノム病理学分野
教授 石川 俊平
所属 役職 氏名： (英語) Department of Genomic Pathology, Medical Research Institute, Tokyo
Medical and Dental University. Professor. Shumpei Ishikawa

成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者： 国立がん研究センター研究所・分子細胞療法研究分野・主任分野長・落谷孝広

石川俊平教授（東京医科歯科大学）らのグループでは、投与細胞（hAD-MSC）の体内動態を定量的に解析することを目的とし、デジタル PCR 解析を実施した。定量解析に際しては、マウス由来細胞のコピー数をリファレンスとし、ヒト由来細胞の存在比率を算出した結果、投与 24 時間後をピークとし、継時的に減少する傾向があること、さらには正常肝に比べて障害肝では約 10 倍のヒト由来細胞が存在することを見出した。また、前述の hAD-MSC により肝障害の改善が認められたマウスにおいて肝臓中のヒト由来細胞の遺伝子発現プロファイルを並列型シーケンサーにより解析を行い、in vivo 微小環境下で特異的に発現誘導される分泌タンパクを数種類同定することに成功した。

Ishikawa Group (Tokyo Medical and Dental University) performed digital PCR analysis to quantitatively analyze kinetics of the in vivo distribution of hAD-MSC after administration. For the quantitative analysis, genomic DNAs purified from a mouse tissue were used as a template for the digital PCR analysis and the ratio of human cells relative to mouse cells were quantified using primers that distinguish human and mouse cells. As a result, Ishikawa Group found that the ratio of human cells peaked at 24 hours after administration and then decreased afterwards. They also found that there were 10 times more human cells in damaged liver compared to normal liver. They also analyzed human gene expression in the mouse liver damage model which was treated with hAD-MSCs. Massive parallel sequencing successfully identified several secreted proteins that were specifically induced in hAD-MSCs in the microenvironments of mouse damaged liver.

II. 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

1. ゲノム解析技術を用いた間葉系間質細胞の体内動態解析および機能解析、口頭、倉田隼人、玉井里枝、勝田毅、石井強、佐藤康成、中西宏文、石川俊平、落谷孝広、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/7
2. ヒト細胞マウス移植モデルのインタラクトーム解析、ポスター、河村大輔、砂河孝行、鈴木良平、貴志一樹、佐藤玲子、加藤洋人、石井強、落谷孝広、石川俊平、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/7

(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

今年度の出願はなし。