

## 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) 再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業  
(英 語) Project Focused on Developing Key Evaluation Technology:  
Manufacturing Technology for Industrialization in the Field of  
Regenerative Medicine

研究開発課題名：(日本語) ヒト間葉系幹細胞由来の再生医療製品製造システムの開発  
Muse 細胞を用いた再生医療の実現に向けた製剤製造システムの研究開発  
(英 語) Development of manufacturing method for Muse cell preparation aiming  
for actualization of regenerative medicine.

研究開発担当者 (日本語) 東北大学大学院医学系研究科 細胞組織学分野 教授 出澤真理  
所属 役職 氏名：(英 語) Mari Dezawa, MD, PhD, Professor and Chair, Department of Stem Cell  
Biology and Histology, Tohoku University Graduate School of Medicine

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) Muse 細胞を用いた製剤製造システムの研究開発  
開発課題名：(英 語) Research and development of manufacturing system of Muse cell  
formulation

研究開発分担者 (日本語) 東北大学大学院医学系研究科 細胞組織学分野 教授 出澤真理  
所属 役職 氏名：(英 語) Mari Dezawa, MD, PhD, Professor and Chair, Department of Stem Cell  
Biology and Histology, Tohoku University Graduate School of Medicine

### II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究開発では、Multilineage-differentiating stress enduring (Muse)細胞を含むヒト幹細胞製剤を  
製造・加工するための、製造システムの開発を行うことを目的とした。Muse 細胞は、2010 年に代表研  
究者の出澤らにより発見された生体内に存在する多能性幹細胞であり、内胚葉（肝実質細胞、胆管上皮

細胞、膵臓 $\beta$ 細胞等)、中胚葉(骨芽細胞、脂肪細胞、骨格筋、血管内皮細胞等)及び外胚葉(神経細胞、グリア細胞、メラノサイト等)への分化能を示す。Muse細胞は静脈内投与後に傷害組織に遊走し、失われた細胞を補充するように自発的に分化して組織修復を促す。またMuse細胞は造腫瘍性の懸念が小さい。

目標達成ための道程として、生体材料からMuse細胞を分離・濃縮する工程、Muse細胞の製剤化工程、製剤の規格決定、心筋梗塞モデル動物を用いた製剤の有効性検証を掲げた。

原材料として各種生体材料について検討した結果、複数の組織からMuse細胞を分離することが可能であった。各組織から得られたMuse細胞の遺伝子発現を比較した結果、ある特定の原料由来のMuse細胞が三胚葉のマーカー遺伝子をバランスよく発現していたため、それをベースに検討を進めることとした。Muse細胞はプロテアーゼ処理、低酸素濃度、低リン酸濃度、低血清濃度、低栄養などのストレス条件下においても増殖可能であるため、原料細胞をストレス条件下で培養することによってMuse細胞率を増加させることが可能である。ストレスが強すぎる場合には細胞収量を上げることが困難であったが、Muse細胞率を増加させ、かつ一定の細胞収量が得られる条件を見出した。製剤化工程については、培地成分等の工程内不純物を除去する工程、小分け容器への分注工程、細胞を凍結保存する工程を確立した。製剤の規格試験については、対面助言の内容を踏まえて確立を行った。また複数ロットについて規格試験を実施し、設定した規格値について対面助言での確認を行った。Muse細胞製剤の有効性については、心筋梗塞をモデルとして検証を行った。ラットにおいて冠動脈の虚血再灌流により急性心筋梗塞モデルを作製し、再灌流後24時間に細胞を静脈内投与して、その後1ヶ月間の心機能(左室駆出率、EF)をエコー法にて評価した。その結果、細胞投与によってEFが有意に改善することが確認された。また同様の有効性が、ウサギの心筋梗塞モデルにおいても確認された。

以上のように、それぞれの工程が完成・検証され「Muse細胞を用いた治験が実施できる体制を整える」ことができた。治験が実施できる体制の構築にあたっては、PMDAとの薬事戦略相談を行って確認を行った。研究初年度に実施した対面助言内容を踏まえて各製造工程を確立し、規格試験項目及び試験法を確立した。最終年度にも対面助言を実施し、製造法及び規格試験について「治験を行うにあたって受け入れ可能」との評価を得た。

The purpose of the present project was to develop a production system for the manufacture of a human-derived stem cell product containing Muse (Multilineage-differentiating stress enduring) cells. Muse cells, originally discovered by Prof. Dr Dezawa, the project leader, are pluripotent stem cells that reside naturally in living organisms. They have the ability to differentiate into mesodermal- (which includes osteocytes, adipose cells, skeletal muscle cells and endothelial cells), endodermal- (hepatocytes, cholangiocytes, islet  $\beta$  cells) and ectodermal- (neuronal and glial cells, melanocytes)-lineage cells. When intravenously administered to disease models, they migrate to damaged organs/tissues, and spontaneously differentiate into tissue-compatible cells to replenish damaged cells, leading to efficient tissue repair. They have been shown to be non-tumorigenic.

To achieve the goal, the project was divided to steps to expand and enrich Muse cells derived from biological materials; to prepare Muse cell formulation; to establish quality testing methods and quality standards; and to test the efficacy of the formulation in animal models of AMI (acute myocardial infarction).

We have shown that Muse cells can be derived from several biological materials. Gene

expression analysis revealed that Muse cell from a certain biological sample most consistently expressed genes related to tridermic differentiation. We determined to use the biological sample for further development. Muse cells can survive under stress culture conditions such as protease treatment, low oxygen condition, low phosphate condition, low serum condition and low nutritional condition. We have determined the culture condition to selectively expand and enrich Muse cells. Muse cell formulation was manufactured through removal of impurities such as culture media, dispensing into small container and freeze preservation. The quality testing items were determined based on the face-to-face advice with the PMDA. We have developed quality testing methods and quality standards based on the test results of several formulation lots. The efficacy of the Muse cell formulation was tested in rat models of AMI. Muse cell formulation was administered intravenously after 24 hours ischemia reperfusion model of AMI rats. The formulation improved the left ventricular ejection fraction one month after AMI. The efficacy of the formulation was similarly observed in rabbit model of AMI.

We have completed all the steps in the project and established manufacturing methods of Muse cell formulation. We have basically followed the discussion and advice with the PMDA face-to face meeting conducted in first year of the project. We have shown the manufacturing methods and the quality standards of the Muse cell formulation to the agency at the end of the project and received comments that they are acceptable for the conduct of clinical trial.

### 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 8 件)

1. Uchida H, Niizuma K, Kushida Y, Wakao S, Tominaga T, Borlongan CV, Dezawa M. Human Muse Cells Reconstruct Neuronal Circuitry in Subacute Lacunar Stroke Model. *Stroke*, 2017 Feb;48(2):428-435, doi:10.1161/STROKEAHA.116.014950. Epub 2016 Dec.20.
2. Iseki M, Kushida Y, Wakao S, Akimoto T, Mizuma M, Motoi F, Asada R, Shimizu S, Unnno M, Chazenbalk G, Dezawa M: Muse Cells, Nontumorigenic Pluripotent-Like Stem Cells, Have Liver Regeneration Capacity Through Specific Homing and Cell Replacement in a Mouse Model of Liver Fibrosis. *Cell Transplantation*, 2017 May 9;26(5):821-840. doi: 10.3727/096368916X693662. Epub 2016 Nov 2.
3. Shimamura N, Kakuta K, Wang L, Naraoka M, Uchida H, Wakao S, Dezawa M, Ohkuma H. Neuro-regeneration therapy using human Muse cells is highly effective in a mouse intracerebral hemorrhage model. *Exp Brain Res*. 2017 Feb;235(2):565-572. doi: 10.1007/s00221-016-4818-y. Epub 2016 Nov 5.
4. Alessio N, Özcan S, Tatsumi K, Murat A, Peluso G, Dezawa M, Galderisi U. The secretome of MUSE cells contains factors that may play a role in regulation of stemness, apoptosis and immunomodulation. *Cell Cycle*. 2017 Jan 2;16(1):33-44. doi: 10.1080/15384101.2016.1211215. Epub 2016 Jul 27.

5. Uchida H, Morita T, Niizuma K, Kushida Y, Kuroda Y, Wakao S, Sakata H, Matsuzaka Y, Mushiake H, Tominaga T, Borlongan CV, Dezawa M. Transplantation of Unique Subpopulation of Fibroblasts, Muse Cells, Ameliorates Experimental Stroke Possibly via Robust Neuronal Differentiation. *Stem Cells*. 2016 Jan;34(1):160-73. doi: 10.1002/stem.2206. Epub 2015 Sep 28.
6. Dezawa M. Muse Cells Provide the Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells: Direct Contribution of Muse Cells to Tissue Regeneration. *Cell Transplant*. 2016;25(5):849-61. doi: 10.3727/096368916X690881. Epub 2016 Feb 15.
7. Katagiri H, Kushida Y, Nojima M, Kuroda Y, Wakao S, Ishida K, Endo F, Kume K, Takahara T, Nitta H, Tsuda H, Dezawa M, Nishizuka SS. A Distinct Subpopulation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Muse Cells, Directly Commit to the Replacement of Liver Components. *Am J Transplant*. 2016 Feb;16(2):468-83. doi: 10.1111/ajt.13537. Epub 2015 Dec 11.
8. Uchida H, Sakata H, Fujimura M, Niizuma K, Kushida Y, Dezawa M, Tominaga T. Experimental model of small subcortical infarcts in mice with long-lasting functional disabilities. *Brain Res*. 2015 Dec 10;1629:318-28. doi: 10.1016/j.brainres.2015.10.039. Epub 2015 Oct 29

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「Muse 細胞：自然の修復機構を活用した新しい再生医療の可能性」、口頭、出澤真理、第 16 回日本再生医療学会総会（シンポジウム 17）、平成 29 年 3 月 8 日、国内
2. 「成体に備わる修復幹細胞としての Muse 細胞：再生医療の一般普及を目指して」、口頭、出澤真理、第 16 回日本再生医療学会総会（会長講演）、平成 29 年 3 月 8 日、国内
3. 「Muse 細胞：自然の修復機構を活用した新しい再生医療の可能性」、口頭、出澤真理、第 14 回日本免疫治療学研究会学術集会、平成 29 年 2 月 11 日、国内
4. 「Unique Newly Discovered Muse Cells May Lead to the Paradigm Shift of Stem Cell Therapy」、口頭、出澤真理、日本研究皮膚科学会 第 41 回年次学術大会・総会、平成 28 年 12 月 11 日、国内
5. 「Unique Newly Discovered Muse Cells May Lead to the Paradigm Shift of Stem Cell Therapy」、口頭、出澤真理、第 9 回アジア太平洋小児内分泌学会(APPES)平成 28 年 11 月 19 日、国内
6. 「多能性幹細胞 Muse 細胞による障がいの機能回復の展望」、口頭、出澤真理、スポーツ・文化・ワールド・フォーラム、平成 28 年 10 月 21 日、国内
7. 「Unique Newly Discovered Muse Cells May Lead to the Paradigm Shift of Stem Cell Therapy」、口頭、出澤真理、PACT Symposium: „Designer Cells Go Clinic“、平成 28 年 9 月 23 日、国外
8. 「再生医学の現状と Muse 細胞の将来展望」、口頭、出澤真理、第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、平成 28 年 9 月 3 日、国内
9. 「再生医学における組織細胞化学的アプローチ」、口頭、出澤真理、第 41 回組織細胞化学講習会 講演会、平成 28 年 8 月 3 日、国内

10. 「Unique mitochondrial metabolism in Muse cells」、口頭、出澤真理、the 9th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research (PPSSC) 2016、平成 28 年 5 月 14 日、国外
11. 「Transplantation of Unique, Newly Discovered Muse Cells May Lead to Promising Stroke Therapy」、口頭、出澤真理、The American Society for Neural Therapy and Repair (ASNTR) 2016、平成 28 年 4 月 29 日、国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
なし

(4) 特許出願  
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) 再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業  
(英 語) Project Focused on Developing Key Evaluation Technology: Manufacturing Technology for Industrialization in the Field of Regenerative Medicine

研究開発課題名 : (日本語) ヒト間葉系幹細胞由来の再生医療製品製造システムの開発  
Muse 細胞を用いた再生医療の実現に向けた製剤製造システムの研究開発  
(英 語) Development of manufacturing method for Muse cell preparation aiming for actualization of regenerative medicine

研究開発担当者 (日本語) 東北大学大学院医学系研究科 細胞組織学分野 教授 出澤真理  
所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Stem Cell Biology and Histology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Professor and Chair, Mari Dezawa

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) Muse 細胞を用いた製剤製造システムの開発  
開発課題名 : (英 語) Development of manufacturing system of Muse cell formulation

研究開発分担者 (日本語) 名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター 病院教授  
水野正明  
所属 役職 氏名 : (英 語) Center for Advanced Medicine and Clinical Research, Nagoya University Hospital, Clinical Professor, Masaaki Mizuno

### II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者 : 東北大学大学院医学系研究科 細胞組織学分野 教授 出澤真理 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)

該当無し

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 再生医療実現に向けての課題と挑戦：実用化を視野に入れたアカデミア研究のあり方, 口演, 水野正明, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し

(4) 特許出願

該当無し

## 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) 再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業

(英 語) Project Focused on Developing Key Evaluation Technology:

Manufacturing Technology for Industrialization in the Field of  
Regenerative Medicine

研究開発課題名：(日本語) ヒト間葉系幹細胞由来の再生医療製品製造システムの開発

Muse 細胞を用いた再生医療の実現に向けた製剤製造システムの研究開発

(英 語) Development of manufacturing method for Muse cell preparation  
aiming for actualization of regenerative medicine

研究開発担当者 (日本語) 東北大学大学院医学系研究科 細胞組織学分野 教授 出澤真理

所属 役職 氏名：(英 語) Mari Dezawa, MD, PhD, Professor and Chair, Department of Stem Cell  
Biology and Histology, Tohoku University Graduate School of  
Medicine

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) Muse 細胞製剤の製剤製造システムの開発

開発課題名：(英 語) Development of manufacturing system for Muse cell formulation

研究開発分担者 (日本語) 事業企画部 部長 棚富直哉

所属 役職 氏名：(英 語) Naoya Masutomi, General Manager, Business planning department, Life  
Science Institute, Inc

### II. 成果の概要（総括研究報告）

- 研究開発代表者：東北大学大学院医学系研究科 細胞組織学分野 教授 出澤真理 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)

なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Muse 細胞製剤の開発, 口頭, 梶富直哉, 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. 身近な再生医療への挑戦—Muse 細胞製剤の可能性—, 口頭, 森本聰, 第 16 回日本再生医療学会総会市民公開講座, 2017/3/6, 国内

(4) 特許出願

なし