

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) 肝炎等克服緊急対策研究事業
(英語) Program for Basic and Clinical Research on Hepatitis

研究開発課題名：(日本語) 腫瘍性を持たない多能性幹細胞 Muse 細胞を用いた新たな肝再生治療
(英語) A novel therapeutic strategy for liver regeneration by using non-tumorigenic pluripotent Muse cells.

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東北大学 大学院医学系研究科 教授 出沢真理
所属 役職 氏名：(英語) Mari Dezawa, MD, PhD, Professor and Chair, 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) ヒト他家製剤での治療を想定した基礎研究
開発課題名：(英語) A basic research assuming the human allogenic transplantation therapy

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学 大学院医学系研究科 講師 若尾昌平
所属 役職 氏名：(英語) Shohei Wakao, Lecturer, Tohoku University Graduate School of Medicine

分担研究 (日本語) 外科的疾患を想定したブタ肝切除モデルでの実験
開発課題名：(英語) The experiment in porcine hepatectomy model assuming surgical diseases

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学 大学院医学系研究科 教授 海野倫明
所属 役職 氏名：(英語) Michiaki Unno, MD, PhD, Professor, Tohoku University Graduate School of Medicine

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学 大学院医学系研究科 助教 水間正道
所属 役職 氏名：(英語) Masamichi Mizuma, Assistant Professor, Tohoku University Graduate School of Medicine

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学 大学院医学系研究科 教授 山口拓洋
所属 役職 氏名：(英語) Takuhiro Yamaguchi, PhD, Professor, Tohoku University Graduate School of Medicine

分担研究 (日本語) 内科的疾患を想定したブタ肝不全モデルでの実験
開発課題名：(英語) Evaluation of efficacy and safety of MUSE cell transplantation in mini-pig model of chronic liver failure.

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人山形大学 医学部 教授 上野義之
所属 役職 氏名 : (英語) Yoshiyuki Ueno, Department of Gastroenterology, Yamagata University
Faculty of Medicine

分担研究 (日本語) 治験を前提とした Muse 細胞製剤開発
開発課題名 : (英語) Development of Muse cells product for implementation of clinical trial

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 医学部附属病院 病院講師 清水忍
所属 役職 氏名 : (英語) Shinobu Shimizu, Clinical Lecturer, Center for Advanced Medicine and
Clinical Research, Nagoya University Hospital

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人岐阜大学 医学部附属病院 准教授 浅田隆太
所属 役職 氏名 : (英語) Ryuta Asada, Associate Professor, Innovative and Clinical Research
Promotion Center, Gifu University Hospital

研究開発分担者 (日本語) 株式会社生命科学インスティテュート 事業企画部長 榎富直哉
所属 役職 氏名 : (英語) Naoya Masutomi, General Manager, Business planning department,
Regenerative Medicine Division, Life Science Institute, Inc.

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本プロジェクトでは既に免疫不全マウスの劇症肝炎ならびに肝繊維化モデルにヒト Muse 細胞の有効性・安全性が確認されていることに基づき、ブタでの検証を進めるものである。臨床治験の実施を前提とし、大型動物ブタを用いて外科的疾患モデル (70%肝切除) と内科的疾患モデル (肝不全作成) を作成し同種由来 (他家移植) の骨髄 Muse 細胞を静脈投与し、Muse 細胞の生着、肝再生の促進、安全性等を検討することを目的とする。

ブタ間葉系幹細胞を特定の培養装置と様々なストレスなどの条件を組み合わせることで Muse 細胞の含有率が高いブタ Muse 細胞製剤を作製することができた。本製剤を用いて2つのモデルを作成し実験を行った。

70%ブタ肝切除モデル、においては Muse 細胞製剤移植群、骨髄間葉系細胞移植群、vehicle 群の3群を作製した。4週後の組織学的解析においていずれの群においても腫瘍化は認められなかった。また、Muse 細胞製剤を移植した肝臓では多くの移植細胞の生着・分化が認められたのに対し、骨髄間葉系細胞を移植した肝臓では少量の移植細胞のみが生着していた。血液検査結果でも Muse 細胞移植群で黄疸の改善等、肝機能の改善がみられる傾向にあった。このことから Muse 細胞製剤の有用性が示唆されてきている。(東北大学 海野・水間・山口)

肝不全モデルにおいては前年度までに四塩化炭素の適正量を確定し、本年度は Muse 細胞他家細胞移植の有効性及び安全性評価を実施した。Muse 細胞製剤移植群および骨髄間葉系細胞移植群、vehicle 群の3群を作製し、4週における組織学的解析において腫瘍化はいずれの群にも認められなかったことから、安全性が示唆された。また Muse 細胞製剤移植群においてアルブミンの血中濃度が有意に高くなる傾向を示しており、Muse 細胞製剤の有効性が確認された。(山形大学 上野)

また、ブタ Muse 細胞及び骨髄間葉系細胞から得られた培養上清に含まれる IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、TGF-beta1、TNF-alpha を測定したところ、ブタ Muse 細胞において骨髄間葉系細胞と同等かそれ以上の分泌が認められたことから、Muse 細胞には肝臓の保護効果や抗炎症作用があることが示唆された。(東北大学 出澤・若尾)

治験を前提とした Muse 細胞製剤開発も並行して行い、医薬品医療機器総合機構（PMDA）の薬事戦略相談を活用して、医師主導治験に用いる Muse 細胞製剤の製造工程や規格等に関する相談を行った。（名古屋大学附属病院 清水・岐阜大学附属病院 浅田・㈱生命科学インスティテュート 榊富）

This project aims to proceed the verification of Muse cell effect on swine liver disease model based on efficacy and safety of Muse cell on partial-hepatectomy and liver cirrhosis models in immunodeficient mouse model. Based on supposition of clinical trial, swine models with partial-hepatectomy and acute liver failure were prepared and allogenic bone marrow-derived Muse cells were administrated by intravenous injection. Cell engraftment, liver function recovery and safety were evaluated.

We succeeded in generating allogenic Muse cell-preparation from swine bone marrow-mesenchymal stem cells (MSCs) by enrichment of Muse cell fraction in MSCs through culturing MSCs in a certain culture system with several kinds of stresses. We then administrated the Muse cell preparation to two types of model.

In the partial hepatectomy model, three groups were prepared; 1) Muse cell group, 2) MSC group 3) vehicle group. None of tumorigenic transformation was observed in all the three groups in histological analysis at four weeks after administration. The Muse cell group showed homing and integration of cells and differentiation into hepatocyte-lineage marker-positive cells. In contrast, the MSC group showed a small number of cell homing compared to the Muse group. Blood test revealed a substantial recovery of functional parameters including bilirubin in the Muse group. Based on the fact we carried out, allogenic Muse cell preparation is suggested to be safe and efficient for functional recovery in partial hepatectomy model. (Unno, Mizuma, Yamaguchi, et al., Tohoku University)

For the disease model of acute liver failure, we set the dose of carbon tetrachloride to produce a proper model in the first fiscal year, and then efficacy and safety evaluation was performed in this year. Three groups were prepared; 1) Muse cell group, 2) MSC group 3) vehicle group. None of tumorigenic transformation was observed in all the three groups in histological analysis at four weeks after administration. Serum albumin level was significantly higher in the Muse group compared to the other two groups. These collectively suggested the safety and efficacy of allogenic Muse cell preparation. (Ueno, et al. Yamagata University)

In vitro production ability of IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TGF-beta1 and TNF-alpha was evaluated in swine Muse cells and MSCs. Muse cells showed an equivalent or a higher level production ability of those factors compared to MSCs. These results suggested that swine Muse cell may also have anti-inflammatory and trophic effects. (Dezawa, Wakao, et al. Tohoku University)

On supposition of clinical trial, we started discussion with Pharmaceutical Strategy Council of Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), which provided consultation regarding Muse cell preparation procedures and standardization for clinical trials. (Dr. Shimizu of Nagoya University Hospital, Dr. Asada of Gifu University Hospital, Dr. Masutomi of Life Science Institute, Inc.)

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 3 件)

1. Iseki M, Kushida Y, Wakao S, Akimoto T, Mizuma M, Motoi F, Asada R, Shimizu S, Unno 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 Transplant*. 2017 May 9;26(5):821-840. doi: 10.3727/096368916X693662. Epub 2016 Nov 2.
2. 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.
3. 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. Review.

(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

12. 「Muse 細胞製剤の開発」、口頭、榎富直哉、第 16 回日本再生医療学会総会、平成 29 年 3 月 8 日、国内

13. 「Allogeneic transplantation of MUSE cell ameliorates liver regeneration in swine model of chronic liver injury」、ポスター発表 (top 10% of poster presentation) T Nishina, H Haga, K Mizuno, T Katsumi, K Okumoto, T Saito, S Wakao, M Dezawa, Y Ueno. 26th Annual Meeting of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL)、Shanghai, China、平成 29 年 2 月 17 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