

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
再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発
(英語) Project Focused on Developing Key Evaluation Technology:
Evaluation for Industrialization in the Field of Regenerative Medicine

研究開発課題名：(日本語) 移植に用いる間葉系幹細胞の評価ならびに製品開発
(英語) Evaluation and product development of mesenchymal stem cells for transplantations

研究開発担当者 (日本語) 株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング
取締役 常務執行役員 畠 賢一郎

所属 役職 氏名：(英語) Japan Tissue Engineering Co., Ltd.
Managing Executive Officer Ken-ichiro Hata, D.D.S., Ph.D

実施期間：平成 28 年 5 月 17 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 微生物学的試験の実施および手法の評価
開発課題名：(英語) Practice of microbiological tests and evaluation of their protocols

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 東京医科歯科大学
再生医療研究センター・准教授 清水 則夫

所属 役職 氏名：(英語) Tokyo Medical and Dental University
Center for stem cells and Regenerative Medicine
Associate Professor Norio Shimizu Ph.D.

分担研究 (日本語) 再生医療新法における虚血治療用 MSC の移植
開発課題名：(英語) Transplantation of MSC for ischemic Peripheral Artery Disease under the new low

研究開発分担者 (日本語) 大隈病院・副院長 大串 始
所属 役職 氏名：(英語) Ookuma Hospital Assistant Director Hajime Ohgushi M.D.

分担研究 (日本語) 臨床応用可能な脂肪由来 MSC バンク構築
開発課題名 : (英 語) Establishment of clinically applicable human adipose derived mesenchymal stem
cell bank

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 東京大学
顎口腔外科・歯科矯正歯科・教授 高戸 毅

所属 役職 氏名 : (英 語) Tokyo University
Department of Oral and Maxillofacial Surgery
Professor Tsuyoshi Takato

II. 成果の概要（総括研究報告）

間葉系幹細胞（MSC）の評価・機能解析

輸入骨髓液を用いて、MSC をクローン培養した結果、種々の形態をした細胞が観察され、分裂寿命の長さによって分類できることが分かった。バルク培養の増殖曲線は分裂寿命の長い（増殖能の高い）クローンと類似していたことから、最初に多様であった細胞が継代していくにつれて分裂寿命の長い細胞集団に駆逐されている可能性が示唆された。

クローン培養やバルク培養によって得られた培養上清を用いて、サイトカインアレイにより、複数種のサイトカイン産生能（1細胞あたりのサイトカイン産生量）を評価した。クローンのグループ間で比較すると、分裂寿命の長いクローンより分裂寿命の短いクローンにおいてサイトカイン産生能が高値を示す傾向があった。また、血管新生を促進すると考えられているサイトカインと、血管新生を抑制すると考えられているサイトカインともに高値を示していた。

MSC の血管ネットワーク形成支持能を確認した結果、分裂寿命の長いクローンとの共培養において、より多くのネットワーク形成が見られた。よって、分裂寿命の異なるクローン間で、血管新生能力が異なる可能性が示唆された。血管ネットワーク形成に対する血管新生促進因子について、他細胞との共培養の結果から、機能発現候補因子として VEGF、HGF が影響していることが分かった。

虚血治療用 MSC の非臨床試験における有効性評価

in vivo における有効性評価の観点で、細胞を移植することにより、移植先の新生血管数を検出する手法を開発した。具体的には、マウス下肢にヒト MSC をスパイクし、血管内皮細胞マーカーである CD31 陽性細胞と、ヒト MSC マーカーである CD90 をフローサイトメーターで評価することで、マウス血管内皮細胞数を半定量することが可能であると分かった。今後これらの手法をよりブラッシュアップし、虚血治療用 MSC の移植先の挙動を明らかにすることで、MSC の移植効果を客観的に評価することを目指す。

虚血治療用 MSC 培養プロトコルの確定と再生医療新法下における自家骨髓由来培養 MSC の移植

仮設定した MSC の培養工程および検査に関する詳細な手順書および記録紙を作成し、社内文書として登録した。骨髓由来 MSC の製造開始に先立ち、J-TEC の細胞培養加工施設において、プロセスバリデーションの一部として、骨髓の受け入れから一次包装までを実施し、規格に適合した MSC が製造可能であることを確認した。

本プロジェクトに係る臨床研究「重症末梢動脈疾患に対する骨髓由来 MSC を用いた血管再生」について、特定認定再生医療等委員会の審査を受け、提供計画一式を近畿厚生局に提出し、受理された。これにより法律上は臨床研究を開始できる状況となったため、臨床研究に向けた患者の選定を行っている。

臨床応用可能な同種脂肪由来培養 MSC バンク構築

臨床応用可能な同種脂肪由来培養 MSC バンクの構築にあたり、まずは研究用脂肪組織を J-TEC へ提供することに対し、東京大学医学部倫理委員会の承認を得た。東京大学において、ヒト脂肪由来 MSC の培養について検討を開始し、マウス脂肪由来 MSC と同様ヒト脂肪由来 MSC は増殖すること、継代後も増殖能を維持していることを確認している。

セルバンクの安全性評価についての微生物学的試験において、東京医科歯科大学（TMDU）の特許技術によるマイコプラズマ否定試験（NAT 法）の施設バリデーションの支援を実施した。

Evaluation and characterization of mesenchymal stem cells (MSC)

MSCs were isolated from commercially available imported bone marrow fluid and clonal analysis has been conducted. MSCs had various morphologies and could be divided into two to three groups depending on their cell division lifespans. The growth curve of bulk culture was similar to that of long-lifespan cells which have high proliferation ability. These results suggest that MSCs used to be crude at the beginning of the culture and short-lifespan cells seemed to be gradually expelled from long-lifespan cells.

Both bulk- and clonal- culture supernatant were assayed using cytokine array and various cytokine productivities were measured. Short- lifespan clones showed higher cytokine production than long-lifespan clones in almost all types of cytokine. Both cytokines which have two opposite natures, i.e. promotion and suppression of angiogenesis, showed high level expressions. MSCs or fibroblasts were co-cultured with other cells to examine vascular network formation and its key factor. Short-lifespan clones supported more network formation compare to long-lifespan clones. It is revealed that the VEGF and HGF had an effect on functional expression.

Evaluation of the MSC treatment efficiency for peripheral artery disease (PAD) in non-clinical study

From the view point of *in vivo* effectiveness assessment, neovascularity detection technique has been developed. It was spiked mouse inferior limb with human MSCs and the tissue was digested to apply a flow cytometer. Two-color staining for CD31 and CD90 makes it possible to count murine vascular endothelial cells on a semi-quantitative level.

Definition of the MSC culture protocols for PAD and transplantation of auto-cultured MSCs under the new law

Precise MSC culture protocols and evaluation method were established and registered as standard operation protocols (SOP). Ahead of the production, process validation has been conducted at J-TEC. Every process flow, an acceptance check of bone marrow, isolation and culture of MSCs, pre-shipment inspection and packaging the product, has carried out and it was confirmed that the MSCs has been successfully produced.

The clinical study entitled “Revascularization therapy using bone marrow derived auto MSCs for PAD” has been reviewed and approved by Certified Special Committee for Regenerative Medicine. The clinical study plan has been submitted to the Kinki Regional Bureau of Health and Welfare and is ready to start.

Establishment of clinically applicable human adipose derived MSC cell bank

The provision of human adipose tissue from Tokyo University to J-TEC has been approved by Research Ethics Committees. They have been well studied on murine adipose derived MSCs. They have also started isolation of MSCs from human adipose and confirmed cellular proliferation.

As a part of safety assessment of the cell bank, facility validation on microbiological test has been conducted. TMDU supported J-TEC to conduct the negative tests for mycoplasma, which is developed by TMDU.

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 件、国際誌 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
なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 再生医療ラボ見学ツアー，梶賢一郎，蒲郡再生医療産業化推進委員会生徒派遣事業，2017/2/4，国内.

(4) 特許出願
なし