

令和元年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「網羅的遺伝子解析技術を利用した細胞治療用間葉系幹細胞集積・採取
技術および再生誘導医薬評価系の開発」

研究開発成果等報告書

令和2年 5月

担当局 近畿経済産業局
補助事業者 株式会社ステムリム

目 次（例）

第 1 章 研究開発の概要

1－1 研究開発の背景・研究目的及び目標

「研究背景」

○研究開発の背景

医薬品・診断薬産業においては、科学の発達とともに多くの疾患の治療薬・診断法が開発されてきた。また、分子レベルの疾病の理解により、これまで全く理解されていなかった難治性疾患の原因究明も進んでいる。一方、多くの難治性疾患は未だ有効な治療法が開発されておらず、新しい医療の開発が求められている。

以前より、難病に対する治療法として、病変臓器を正常の臓器に取り換える治療法（臓器移植、輸血等）が行われている。このような治療法は、失明、致死性心臓病、白血病、重度熱傷などの疾患に対しておこなわれ多くの患者を救ってきた。しかし、ドナー不足、自己の免疫細胞による拒絶反応、倫理的な問題等多くの課題が残っている。

生体内には正常臓器の維持や損傷臓器の再生のために、組織幹細胞（骨髄間葉系幹細胞、神経の幹細胞、心筋の幹細胞、腸管の幹細胞、表皮幹細胞等）が存在することが知られている。これらの組織幹細胞は ES 細胞や iPS 細胞のような万能な幹細胞ではないが、存在する臓器や組織を構成する細胞を再生する幹細胞として働いている。

組織幹細胞の中でも骨髄間葉系幹細胞は、複数の組織（骨、軟骨、脂肪、腱、心筋、上皮等）を構成する細胞に分化することが可能な多能性幹細胞として知られる特異な細胞である。また、免疫寛容効果、瘢痕抑制効果、trophic 効果なども知られており、骨髄間葉系幹細胞移植による治療効果は、脳梗塞、心筋梗塞、脊髄損傷、GVHD、栄養障害型表皮水疱症（大阪大学における臨床試験で効果を確認済み）など難病と言われる数々の疾患における優れた治療効果が確認されている。

大阪大学玉井教授は、栄養障害型表皮水疱症の治療法を研究するなかで、難治性の皮膚損傷部位へ骨髄から骨髄間葉系幹細胞を遊走させる分子を発見した。この分子は HMGB1 と

【公開版】

いう既知の核内タンパクであった。HMGB1 は損傷皮膚から放出されると末梢循環血流を介し骨髓に到達し、骨髓に存在する骨髓間葉系幹細胞を血流中に遊走させる。骨髓間葉系幹細胞は循環血流によって損傷組織近傍まで移動すると、損傷組織に存在する SDF1 α と呼ばれる分子に引き寄せられ、損傷部位に骨髓間葉系幹細胞が集積し治療効果を発揮している。

(AJP2008, Stem Cells2008, PNAS2011, Stem Cells2015, J Immunol2015, Sci Rep 2015)

株式会社ステムリムと大阪大学玉井教授は、以上のような生体メカニズムを基盤に基礎研究を進め、合成した骨髓間葉系幹細胞遊走因子による再生誘導医薬の開発を目指している。疾患モデル動物を用いた試験では表皮水疱症のような難治性皮膚疾患ばかりではなく、脳梗塞等の中枢神経系疾患や、心筋梗塞等の循環器系疾患にも優れた効果が得られている。

すでに、大学では表皮水疱症に対する患者を対象とした医師主導治験（Phase II）も終了している。また、先行開発品に並行して、その他の再生誘導医薬の候補品についても複数の疾患モデル動物における薬効を確認している。

今後、更に有効な再生誘導医薬を開発するために、損傷臓器に集積した骨髓間葉系幹細胞を適切に活性化する薬および活性化の評価系に対する技術開発が課題である。これらの技術が可能になれば、先行開発品によって末梢血中から損傷組織に動員された骨髓間葉系幹細胞が病態に応じて活性化（分化制御・免疫寛容効果・瘢痕抑制効果・trophic 効果を発揮）することにより、より効率的に損傷組織の機能的再生誘導を促進する医薬を開発できる。また、このような細胞の活性化技術は世界中で実施されている間葉系幹細胞移植にも応用することで、治療効果の改善が期待できる。

前述のように「損傷組織の機能再生に関わる細胞」の活性化の評価項目は多岐にわたるため、細胞の性質変化を総合的に評価する必要がある。一方、骨髓間葉系幹細胞のような多能性幹細胞の場合、様々な種類の細胞に分化する可能性があるため、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリー法、免疫組織染色法などを利用した分化マーカーによる従来の解析手法では、多数の細胞や未知の細胞を対象にした場合は評価が困難であるため、再生誘導医薬だけではなく多能性幹細胞による細胞治療の開発の課題となっている。

○従来技術での課題（高額な機器が必要、個々の測定が必要等）

あらゆる臓器のもととなる胎生幹細胞（ES 細胞）が開発されドナー不足の課題解決の糸

【公開版】

口となり、さらに、受精卵を使わずに ES 細胞と同様の万能細胞である iPS 細胞が発明されたことにより拒絶反応や倫理的課題についても解決に向けて大きく前進した。一方、これらの細胞を臓器移植に必要な疾患に使用するためには、必要とする臓器や細胞に適切に分化制御することが必須であり、移植後の癌化や未知の病原体に汚染された細胞に起因する感染症についても注意する必要がある。この他、細胞を利用した医療（細胞治療）としては、重度熱傷のための培養皮膚シート、重度の心疾患のための心筋シート、培養角膜シートなどが開発されている。これらを使用した治療は、既存の医薬品と異なり、生きた細胞が治療用マテリアルとなるため、製造、輸送、保管の特別な管理が必要となるためコストが高くなるという課題がある。

○新技術を実現するために解決すべき研究課題

（十一）バイオに係る技術に関する事項

1 バイオに係る技術において達成すべき高度化目標

（4）川下分野特有の事項

1）医療・健康分野（医薬品・診断薬産業分野）に関する事項

①川下製造業者等の共通の課題及び要請（ニーズ）

ア. オミックス情報等の収集、解析

医薬品・診断薬産業においては、科学の発達とともに多くの疾患の治療薬・診断法が開発されてきた。また、分子レベルの疾病の理解により、これまで全く理解されていなかった難治性疾患の原因究明も進んでいる。一方、多くの難治性疾患は未だ有効な治療法が開発されておらず、幹細胞を利用する等の新しい医療の開発が求められている。

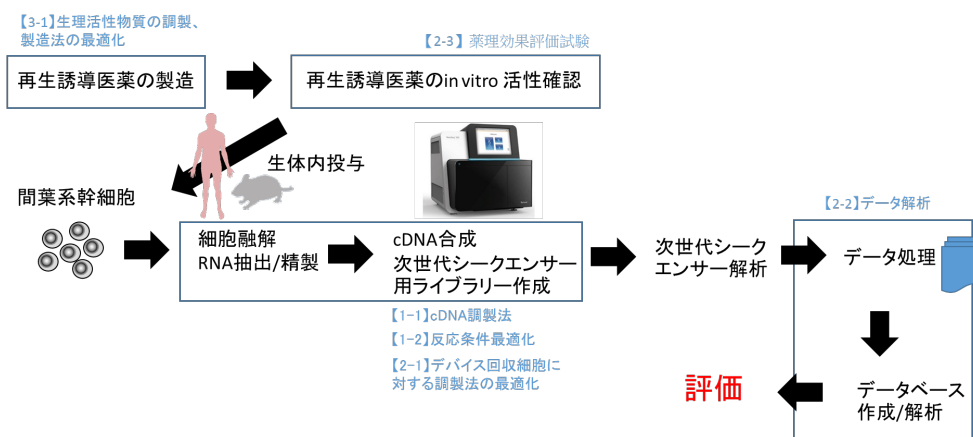
細胞治療などの再生医療においても、医薬品による損傷組織に対する再生誘導医療においても、直接治療効果を発揮するのは幹細胞である。治療法の開発のために、幹細胞の評価系の構築は必須である。幹細胞は分化の方向性やステージによってさまざまな遺伝子発現パターンを示すことから、再生医療や再生誘導医療の開発において遺伝子発現の網羅的な解析が必要である。一方、生体内の幹細胞は希少であることから、解析に十分なサンプルを回収できないという課題がある。

本事業では生体内埋め込みデバイスに集積した骨髄間葉系幹細胞の機能解析をおこない、

デバイスに挿入した分子の評価や集積した細胞の医薬用途可能性の評価を行う。

(図1 本事業開発技術の概要)

本事業開発技術の概要



「研究目的及び目標」

目的

- ・新規再生医療の開発（本事業で得られた医薬候補品は、患者への直接投与（再生誘導医薬）もしくは、デバイスに挿入して「細胞治療用」細胞を回収するために使用する。）

目標

1. 次世代シーケンサーを利用した再生誘導医療評価系の構築
2. 新規再生誘導医薬候補品、細胞回収デバイス挿入用物質の選定

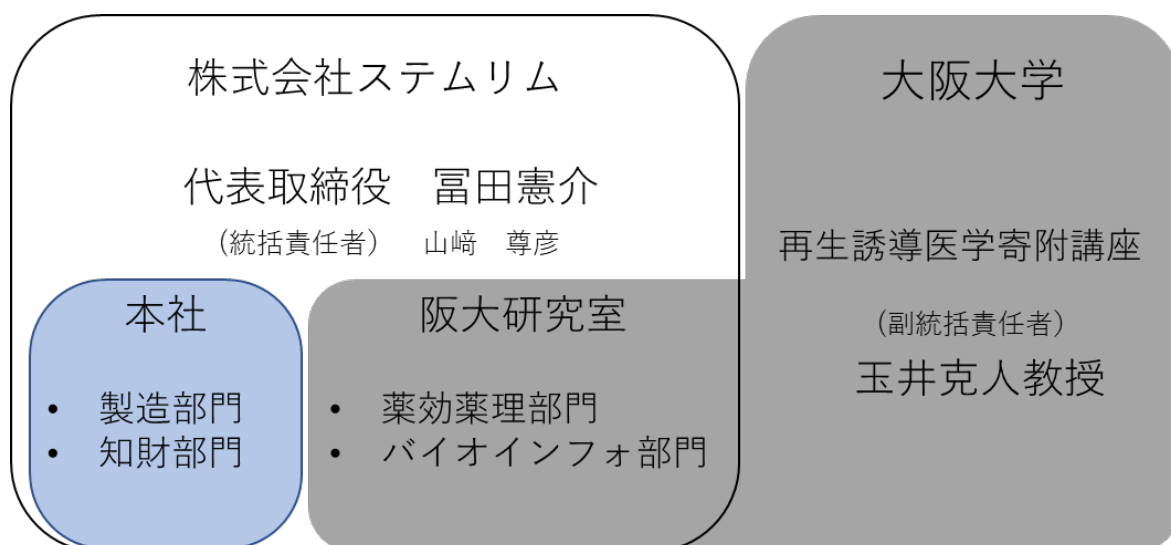
結果

- ・目標 1 に対しては、生体内間葉系幹細胞に対し、シングルセルレベルにおいて、網羅的かつ定量的な遺伝子発現解析系を確立した。
- ・目標 2 に対しては、複数の再生誘導医薬候補物質に対し、細胞回収デバイス内への生体内間葉系幹細胞集積試験を実施し、生体内において細胞活性物質を同定するとともに、集積細胞に対する次世代シーケンサーを利用したシングルセル網羅的遺伝子解析法を確立した。

1-2 研究体制

（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）

(図 2 研究体制)



1-3 成果概要

生体内間葉系幹細胞は生体内に存在する希少な細胞であるとともに、遺伝子発現量が少ないことも知られており、シングルセルレベルの遺伝子発現解析は非常に困難な技術と予想された。本事業では、RNA の調整から次世代シーケンサー用のライブラリー作成まで、1 から最適化することでシングルセルレベルの網羅的遺伝子発現解析法を確立することに成功した。また、バイオインフォマティクス技術を駆使することで、得られた遺伝子発現情報を基に、クラスタリング解析などのデータを可視化指標化することも可能になった。

以上の評価系によって、大腿骨に存在する間葉系幹細胞に対してシングルセル解析実施するとともに、生体内に埋没したデバイス内に集積した細胞をシングルセルレベルで遺伝子発現解析を行い、これらの細胞集団が骨髓内の骨や軟骨に分化する細胞とは異なる特異な細胞集団であることも明らかになった。今後、今回得られた新たな知見と確立した技術を発展させ新規再生誘導医薬や新規細胞治療の開発の推進が期待される。

なお、事業期間内に当初目標とした項目についてはすべて達成することができた。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

所属氏名：経営管理部長 星野 智之

E-mail：hoshino@stemrim.com

電話番号：06-6170-2070

第2章 本論一（1）

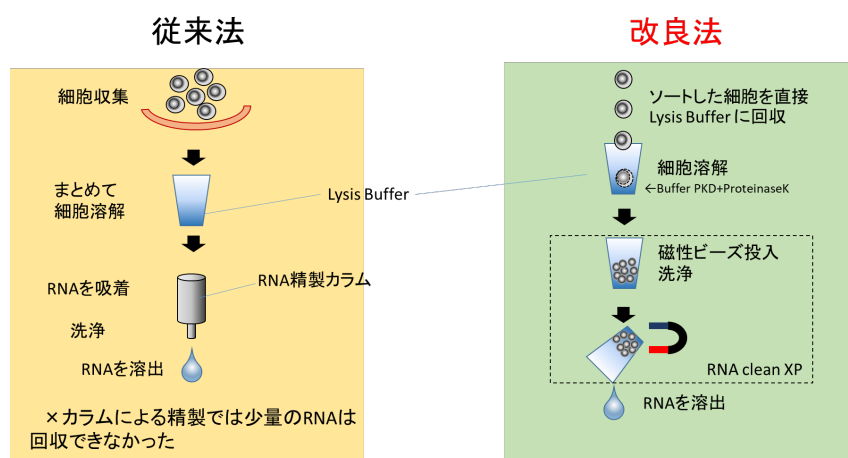
【1. 微量細胞用網羅的遺伝子発現解析課題への対応】

1-1 cDNA 調製法

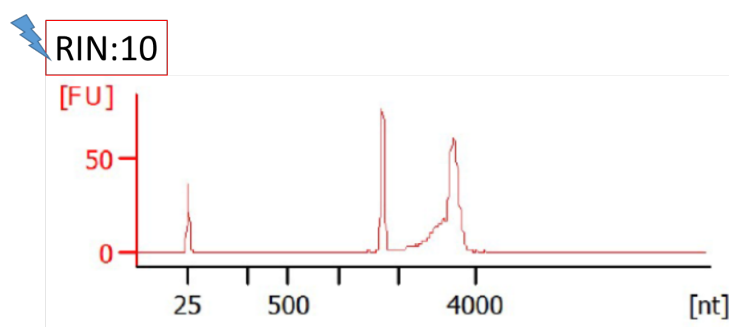
「生体内間葉系幹細胞のシングルセル解析のために、mRNA の精製法を簡略化し cDNA へ変換する方法の最適化を実施した。事業開始当初は、次世代シーケンサー用のサンプルを作製するために、最低 1000 個の細胞が必要であったが、生体から採取した多様な間葉系幹細胞の分化度、機能を定量化するために、最終的には数十個以下の細胞から得たごく少量の mRNA の精製法と cDNA へ変換法を開発する必要があるという理由から、特に少数の細胞を開始サンプルとした mRNA の精製法の最適化を重点的に実施した。

その結果、事業初年度には、磁性ビーズを用いた精製法（改良法）が優れていることが明らかになり（図 3、図 4）、細胞 1000 個相当の RNA を用いて、網羅的遺伝子発現解析に供することができる技術開発に成功した。

（図 3 RNA 精製法の改良）



(図4 RNAの品質評価)



バイオアナライザ(Agilent)によるRNAの品質評価によって、RIN(*)の値が10であり次世代シーケンサーに使用することが出来る高品質のRNAを精製することが出来た。

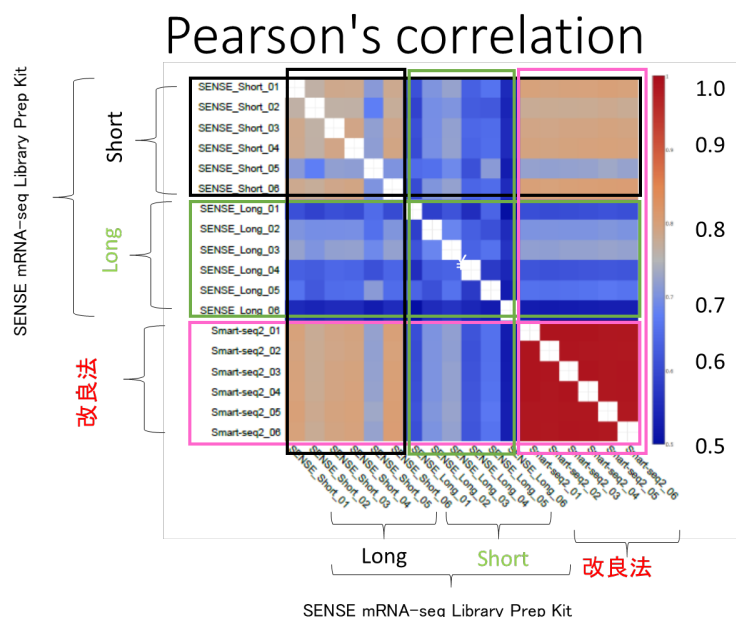
(*) RIN:RNA品質評価の指標(10段階評価)、RNA-seqには、RIN>7のRNAを使用

事業次年度には、数十個以下の細胞でも評価を可能にすることを目標とした。骨髄由来間葉系幹細胞において cDNA 調整法の最適化をすすめ、数十個以下の細胞でも評価を可能にすることを目標とした。実際には、1 個の骨髄由来間葉系幹細胞において、cDNA 調整法の最適化を完了し当初の目標を以上に少ない細胞の調整が可能になり、シングルセル解析のための cDNA の調整の研究を進めることが出来た。」

1-2 反応条件最適化

「初年度は、酵素反応の検討、アダプター配列の付加、各種精製法等に関する微量サンプルに対する最適化を実施した。特に、酵素反応の検討、アダプター配列の付加、各種精製法等に関する微量サンプルに対する最適化を重点的に行った。細胞 1000 個から得られる総 RNA 量は、10ng 程度 (1 細胞あたり 10pg の RNA を含むと想定) であった。従来の 10分の1のサンプルでも評価を可能にする条件を検討するために、細胞約 100 個分に相当する、精製 RNA 1ng 用い、微量サンプルを用いた酵素反応、アダプター配列付加の最適化を試みた。具体的には、市販のキット (SENSE mRNA-seq Library prep kit、KAPA Hyper prep kit) と論文報告を参考にし、1 ng の精製 RNA を調整し網羅的遺伝子発現解析ライブラリーを作製したところ、比較検討したプロトコルの中で改良した本法を使用した結果が最も優れた結果を示した。(図 5)

(図5 ライブラリー作成法の改良)



さらに、次年度は、骨髄由来間葉系幹細胞において、反応条件の最適化を進め、数十個以下の細胞でも評価を可能にすること、また少なくとも10分の1の量のサンプルでも評価を可能にすることを目標とした。実際には、1個の骨髄由来間葉系幹細胞において、反応条件の最適化が完了し、当初の目標であった、少なくとも10分の1の量のサンプルでも評価を行うことが可能になり、シングルセル解析のための上記反応条件を最適化することが出来た。」

【2. 生体内骨髄由来集積細胞の網羅的遺伝子解析課題への対応】

2-1 デバイス回収細胞に対する調製法の最適化

「初年度及び次年度は、・限界希釈法、ソーティング法、コロニー培養法等の条件検討及び最適化を実施した。限界希釈法、ソーティング法、コロニー培養法などによって得られた数十個以下という少数の骨髄由来間葉系幹細胞の網羅的遺伝子解析を目標とした。実際には、限界希釈法と類似の『液滴法』、及びソーティング法によって単一細胞の解析を可能にした。また、コロニー培養法によって少数細胞からなる単一細胞由来のコロニーの解析も可能になった。

さらに、最終年度には、均一な少数（数十個以下）の細胞群を使用した解析の最適化を目標

【公開版】

としたが、体内に埋没したデバイスに集積した細胞のシングルセル網羅的遺伝子発現解析を行うことが可能になった。

以上のことから、生体内間葉系幹細胞のシングルセル解析技術が確立され、残る課題は、バイオインフォマティクス技術を利用したデータ解析技術の開発であった。」

2-2 データ解析

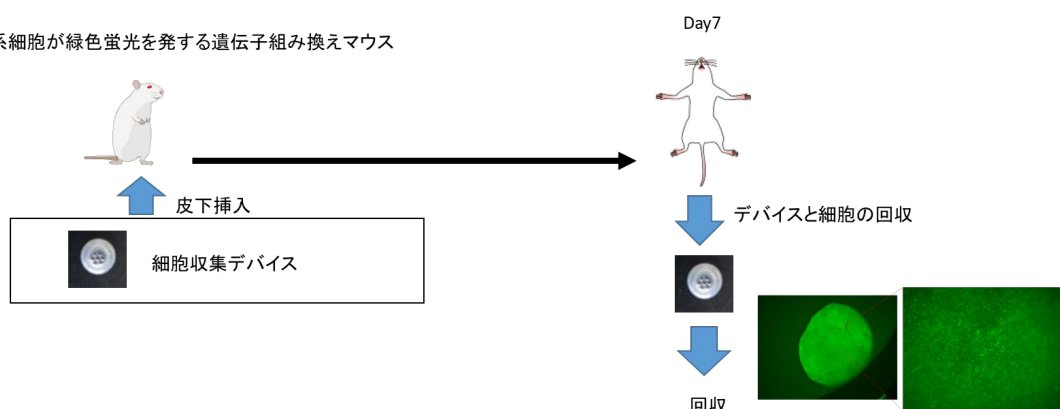
「初年度は、データベース構築およびデータ共有システムの構築を行った。次世代シーケンサーによって得られたデータを効率的に解析、共有するためのプラットフォームを作製した。まず実験データと実験情報を一元的に管理するシステムの構築を進めた。遺伝子発現解析データを、そのデータ取得に関する詳細な実験条件情報と紐付け、迅速なデータ解析を可能にするデータベースを MongoDB を用いて作製した。データベース作製以前は、実験情報が記載されたエクセルファイルを参照しながらの解析作業であり、解析速度を限定していた。実験情報を一元的に管理することにより、数十倍の作業効率の向上がみられた。

初年度までに、データ解析の高速化やインターフェースの改善は完了したため、次年度には、解析ツールの作成やデータベースのメンテナンスを実施し、実際にサンプルの評価を開始した。

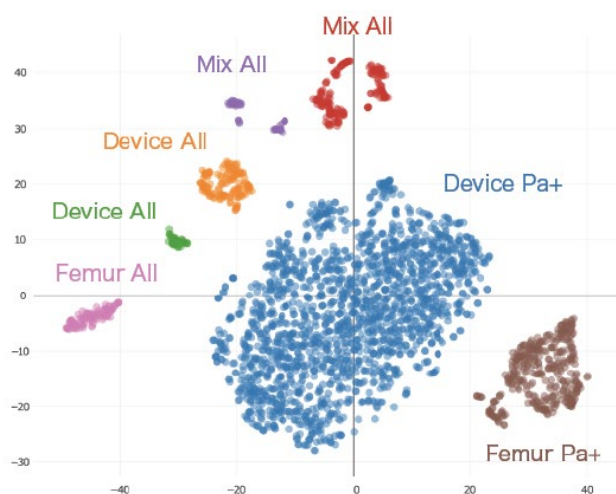
最終年度開始時には当初の目標は達成していたため、当初から生体内間葉系幹細胞のシングルセル網羅的遺伝子発現解析を日常的に実施することが可能になっていた。」

（図6 生体内埋没型デバイスによる細胞回収法）

間葉系細胞が緑色蛍光を発する遺伝子組み換えマウス



(図 7 デバイスに集積した細胞（青）と大腿骨骨髓内の間葉系幹細胞のクラスタリング）



以上は、デバイス内に集積した細胞（図6）と大腿骨髄内に存在する間葉系幹細胞のマーカーを指標（PDGFR α 陽性/CD45 陰性/Lineage 陰性）に FACS にてソートした細胞集団に対してシングルセルレベルでの RNAseq を行いクラスタリングした結果（図7）である。この結果から、デバイス内に集積した細胞集団(Device Pa+)は大腿骨内の間葉系細胞集団(Femur Pa+)とは異なるクラスターを形成することが明らかになった。更に ICGS (Iterative Clustering and Guide-Gene Selection) において詳細に分析したところ、デバイス内に集積した細胞集団は間葉系幹細胞の遺伝子発現パターンを示すとともに、胎児期に存在する未分化な多能性細胞の遺伝子パターンに類似しているという結果となった。一方で、大腿骨内の間葉系細胞集団については、間葉系幹細胞の遺伝子発現パターンを示すとともに、骨芽細胞や軟骨細胞の遺伝子発現パターンと類似した遺伝子発現パターンを示したことから、大腿骨の骨髓内に存在する細胞は、骨や軟骨に分化する既知の間葉系幹細胞であることが示唆された。

2-3 薬理効果評価試験

「事業初年度は、細胞遊走活性定量法を最適化するために、通常の間葉系幹細胞に対するケモタキシスアッセイを行った。2 種類の開発候補タンパクについて、それぞれ 5 μ M、10 μ M の濃度でコントロールよりも 2 倍以上の遊走活性があることを確認した。（図 8）

【公開版】

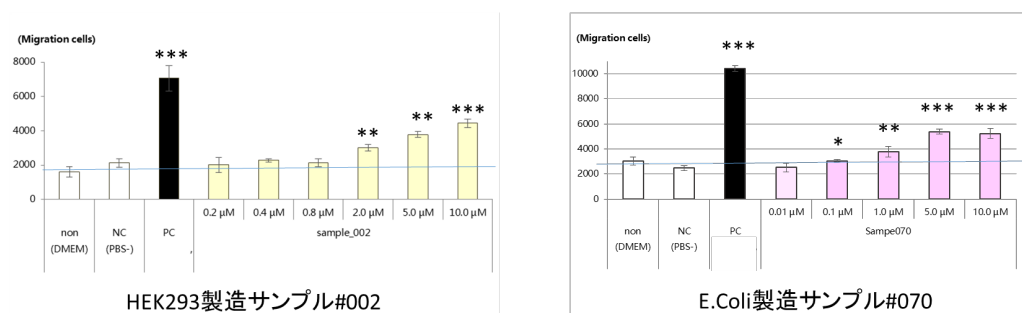
次年度には、①通常の間葉系幹細胞と新規再生誘導医薬を挿入したデバイスに集積した細胞との比較を行うこと。②細胞分化効果、免疫寛容効果、瘢痕抑制効果、trophic 効果の評価系を構築すること③組織再生誘導に関わる効果（細胞分化効果、免疫寛容効果、瘢痕抑制効果、Trophic 効果等）のいずれかの項目につて、マーカートンパクの定量、細胞増殖活性定量、細胞遊走活性定量、Trophic 因子の分泌量定量等をおこないコントロールに比較し2倍以上の有効性を確認することを目標とした。実際には、①について、骨髓内に存在する通常の間葉系幹細胞（単一細胞）に対する、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。②③については、デバイスをマウス皮下に埋没し、集積した細胞の評価を行った。具体的には、細胞から分泌されるサイトカインの定量を ELISA 法、ELISpot 法を利用して行った。ELISA 法は感度が低く定量化できなかったものの、ELISpot 法では免疫寛容効果の定量的評価を行うことが可能になった。また、FACS 法を利用し、デバイス内に集積した細胞数の定量と細胞種の評価が可能になった。複数の間葉系幹細胞活性化物質において、間葉系幹細胞の有意な（2 倍く）デバイス内集積効果（= in vivo 間葉系幹細胞遊走活性）を確認することが出来た。以上の結果から、最終年度を待たずして目標を達成することが出来た。」

【3. 生理活性物質探索課題への対応】

3-1 生理活性物質の調製

「本事業で使用するために必要な再生誘導医薬候補の製造法を確立することを目標に、初年度は、タンパク合成法の最適化（In vitro translation 法、HEK293 製造法、大腸菌製造法）を開始した。さらに次年度には、大腸菌や HEK293 を使用したタンパク製造を行うとともに、試験管内でタンパクを合成できる In vitro translation 法において1 反応あたり5 倍程度の収量の改善を行い、スクリーニングの高速化を目標とした。実際には、In vitro translation 法の収量改善は終了し、かつ、大腸菌による骨髓由来間葉系幹細胞遊走促進タンパクのラボスケール製造法は確立した。

(図 8 ケモタキシスアッセイ)



大腸菌によるタンパク製造が可能になったことにより、大腸菌より高コストな HEK293 を使用したタンパクの製造は現時点で行っていない。本タンパクについては、医薬品等として開発する場合でも大腸菌を利用した製造を行う予定である。また、本タンパクについては、in vitro における間葉系幹細胞遊走試験、in vivo における間葉系幹細胞血中動員試験において活性が確認された。」

最終章 全体総括

「複数年の研究開発成果」及び「研究開発後の課題・事業化展開」

再生誘導医療の新規医薬や細胞治療の開発のために基盤技術となる、生体内間葉系幹細胞のシングルセル網羅的トランスクリプトーム解析法の開発を実施した。当初目標とした解析法を確立するのみならず、デバイス内に集積した細胞が大腿骨の骨髓内に存在する細胞とは異なる細胞集団であるということも明らかにすることが出来た。また、これらの細胞集団は、胎生期に存在する多能性細胞の遺伝子発現パターンに類似することから、細胞治療などへの応用が期待された。

今後は、前述の細胞集団や生体内間葉系幹細胞のシングルセル遺伝子発現技術を新規再生誘導医療や新規細胞治療の研究及び開発に応用するステージとなるため、今後は、医薬品開発に係る専門家や細胞治療に係る専門家と密に情報を交換し、臨床への応用を加速することが必要である。間葉系幹細胞は生体内に存在する体性幹細胞の一種であるが、免疫調節効果、瘢痕抑制効果、Trophic 効果、分化効果などの複数の効果を有することが、細胞治療において、複数の異なる臓器の損傷や疾患に対して効果がある理由と予想される。再生誘導医薬も 1 つの分子で複数の疾患モデル動物に対して効果が確認されていることから、同時に複数の

【公開版】

疾患に対する治療法としての研究・開発を進めている。今後の事業展開についても、再生誘導医薬、デバイスに集積した細胞を利用した治療とともに、複数の疾患に対しての治療効果が期待できるため、早急に各疾患領域の専門家との研究・開発の協業を目指す。

以上の観点から本事業については、2020 年 4 月に大阪大学内に設置した再生誘導医学協働研究所をプラットフォームとして、大学の部局（医学研究科、歯学研究科、生命機能研究科等）を超えた専門家チームとステムリムとの協働による再生誘導医薬や細胞治療の研究開発を行い早期の臨床応用を目指したい。