

2.6.2.2.1.4 eASC による制御性 T 細胞の産生

eASC と PBMC 共培養における Treg の誘導：

添付資料番号 4.2.1.1-2（参考），-3（評価）

CD4 陽性 CD25 陽性の制御性 T 細胞（Treg）は自己免疫疾患の予防において重要な役割を果たしている[12]。Treg は T 細胞の増殖、サイトカインの産生、自己抗体の産生、樹状細胞及び単球/マクロファージの機能を抑制することが示されている[13][14]。MSC が炎症を制御するための重要な機序の 1 つが Treg の産生であるという事実は、これら細胞の免疫調節機構が多様であることを示している。また、Tregs は MSC による機能抑制作用の影響を受けないことが報告されている[15]。

上記の知見に基づき、eASC を in vitro で活性化 PBMC と接触条件で共培養し Treg の増加が誘導されることを調べた（概要表 2.6.3.2：報告書番号 [REDACTED]）。共培養は 15 日間実施し、得られた細胞について、FACS（蛍光活性化セルソーティング）を用いて Treg の細胞画分（CD4 陽性 CD25 陽性）における Treg 関連マーカー分子の発現を解析した。その結果、eASC と PBMC の共培養で誘導された Treg 細胞は、FOXP3、CTLA4 及び CD62L を発現するが、CD103、CD127 及び GITR の発現は認められなかった（図 2.6.2-12）。

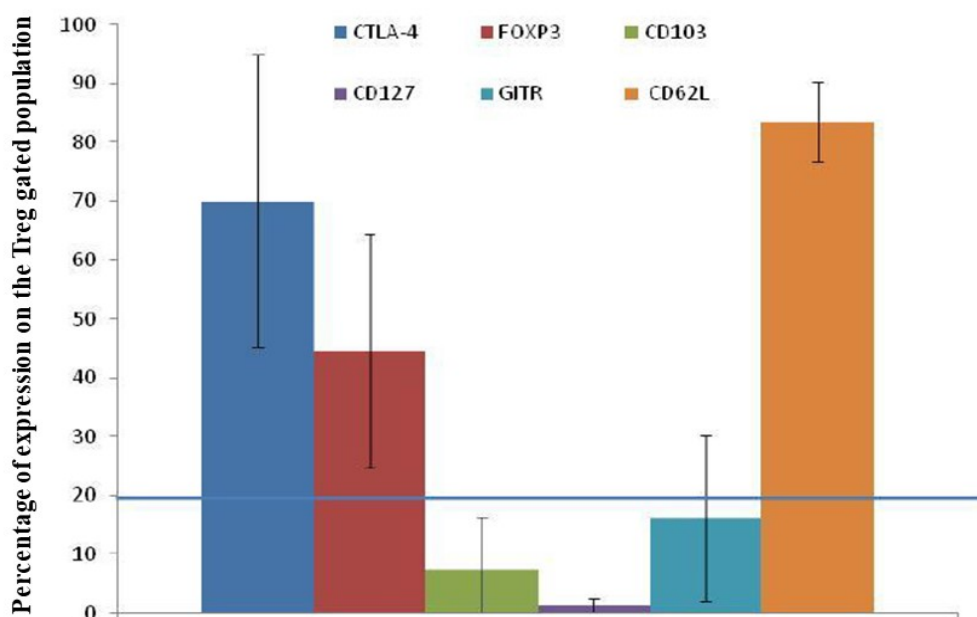


図 2.6.2-12 eASC による Treg の誘導

eASC と PBMC を 15 日共培養し、Treg 細胞画分（CD4 陽性 CD25 陽性細胞）における CTLA4、FOXP3、CD103、CD127、GITR、CD62L の発現量を FACS 解析した。CD4 陽性 CD25 陰性細胞をネガティブコントロールとし、発現陽性の判断は 20% 以上とした。

Treg 誘導に対する共培養条件の影響：

添付資料番号 4.2.1.1-2（参考），-3（評価）

次に eASC と PBMC の共培養を CT と TW 条件で行い、Treg の誘導率を比較した（概要表 2.6.3.2：報告書番号 [REDACTED]）。その結果、eASC と PBMC を用いた TW 条

件での共培養実験では、Treg の有意な増加は認められなかったことから、eASC による Treg 産生には細胞間接触が必要であることが示された（図 2.6.2-13）。

上述の実験からは、eASC による Treg 増殖誘導効果が、eASC によって直接的又は間接的にもたらされるかどうかは明らかではない。一つの可能性として、eASC 以外の細胞種〔単球及びその他の抗原提示細胞（APC）〕が Treg の増殖に間接的に影響を及ぼしている可能性がある。例えば、eASC が Treg の増殖に影響を及ぼす可能性として PBMC に含まれる抗原提示細胞の調節を介している可能性があり、eASC が抗原提示細胞の表面分子およびサイトカインの発現プロファイルを免疫調節型に変化させている可能性が報告されている[16]。

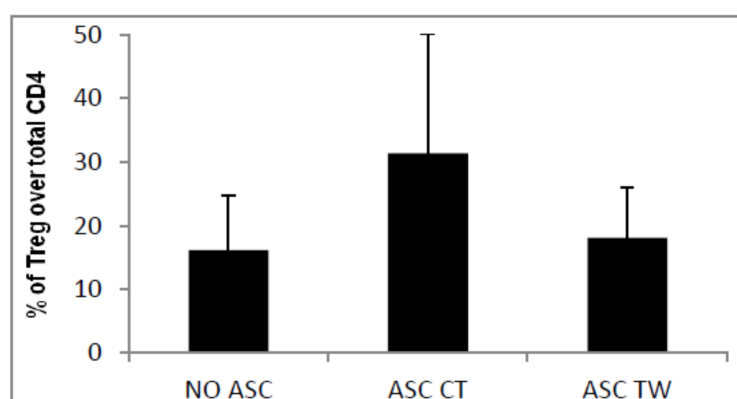


図 2.6.2-13 eASC の接触条件及びトランスウェル条件による Treg の誘導

活性化 PBMC は eASC と接触条件及びトランスウェル条件で 14 日間培養した； CT:接触条件； TW:トランスウェル条件

eASC によって誘導される Treg の由来：

添付資料番号 4.2.1.1-4（参考）

eASC で誘導される Treg の由来を調べるため、eASC と PBMC を 15 日間共培養した場合と、eASC と PBMC（Treg 細胞を除去）を 15 日間共培養した場合の Treg 細胞数を評価した（概要表 2.6.3.2：報告書番号 [REDACTED]）。その結果、誘導された Treg 細胞数に両者で大きな差はなかったため、eASC は非 Treg から Treg 表現型への分化を誘導する可能性が示された（図 2.6.2-14）。

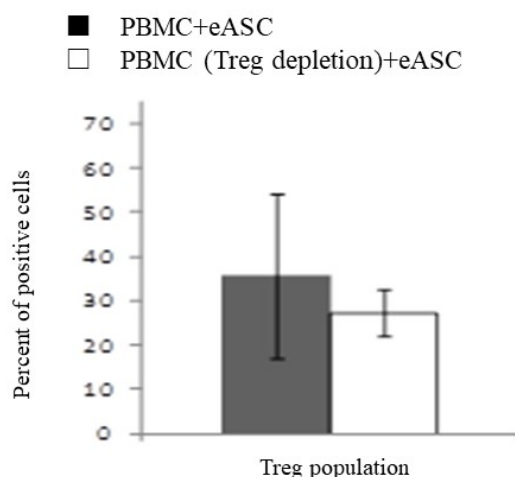


図 2.6.2-14 eASC を介した Treg が新規に生成される

CD25 を除去又は除去されていない活性化 PBMC と eASC の共培養を 15 日間実施し、Treg の含有率を CD4 及び CD25 発現に基づいて算出した。

eASC を介した Treg 誘導における IDO の役割：

添付資料番号 4.2.1.1-5（評価）

これまでの試験で IDO が eASC の細胞増殖阻害機構に極めて重要であることを示している（2.6.2.2.1.3 項）。ここでは、eASC を介した Treg 誘導における IDO の役割について検証した（概要表 2.6.3.2：報告書番号 [REDACTED]）。その結果、活性化 PBMC と野生型 eASC の共培養に比べて、IDO をノックアウトした eASC(eASC-IDOsi)との共培養では、Treg 細胞誘導能が低下していた。また、活性化 PBMC と IDO を恒常的に発現している eASC(eASC-IDO)との共培養に IDO 阻害剤（1-MT）を添加しても、Treg 細胞の誘導が低下しており、eASC による Treg 細胞の誘導は IDO の発現に依存することが示された（図 2.6.2-15）。以上のことから、eASC は IDO 依存的な機序を介して非 Treg 細胞から Treg を誘導することで、PBMC の増殖を阻害することが示された。

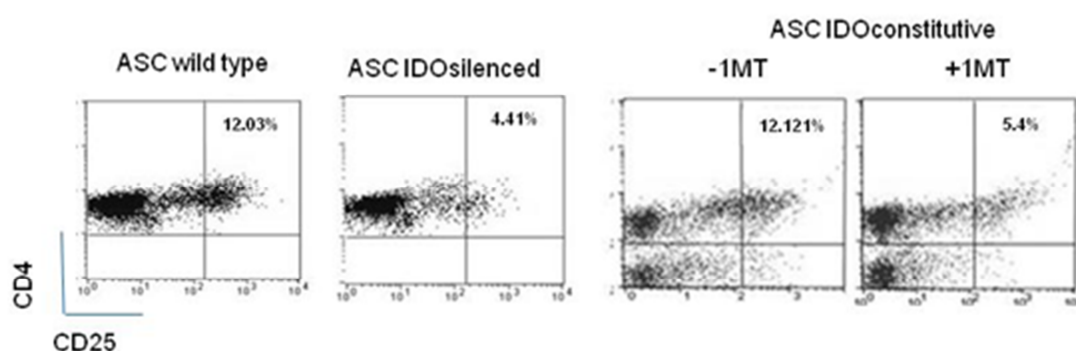


図 2.6.2-15 IDO を発現しない又は恒常的に発現させた IDO を用いた ASC を介した Treg 形成
ASC wild type（eASC 野生型クローン）及び ASC IDO silenced（eASC IDO 非産生クローン）を活性化 PBMC と 7 日間共培養（左図）。ASC IDOconstitutive（IDO 恒常的に発現クローン）に 1-MT 存在下又は非存在下で活性化 PBMC と 7 日間共培養（右図）。培養終了後、Treg 細胞集団を FACS 解析した。

2.6.2.2.1.5 Toll 様受容体リガンドによる eASC の免疫抑制特性の調節

Toll 様受容体 (TLR) はクローン病を含む慢性炎症性疾患及び自己免疫疾患の持続に関与している[17][18]。TLR による微生物病抗原の認識は、自然免疫と獲得免疫反応の両方に至るシグナル伝達経路の引き金となり、炎症の調節に関与する[19][20][21]。eASC は TLR を発現することが報告されている[22][23][24]また、MSC の機能は、クローン病及び関節リウマチなどの慢性炎症性疾患に関与する TLR リガンド刺激によっても調節される。特に、eASC による肛門周囲複雑瘻孔の治療は TLR リガンドに曝露される可能性が高く、これが eASC の免疫調節作用に影響を及ぼす可能性がある。ここでは、eASC の TLR リガンドへの曝露の影響を評価したいくつかの in vitro 試験の結果を要約する。

eASC における Toll 様受容体の発現及び活性化：

添付資料番号 4.2.1.1-1 (参考)

予備検討として、eASC の TLR 遺伝子発現は、eASC 細胞から総 RNA を抽出し、ヒト TLR1-TLR10 の遺伝子特異的プライマーを用いた RT-PCR 法で測定した。タンパク質の発現は、TLR 特異的モノクローナル抗体及び FACS 解析を用いて評価した。その結果、eASC は TLR8 を除くすべての TLR の mRNA を発現することが判明し、さらに TLR2 及び TLR4 タンパク質の発現が認められた (データ未掲載)。

次に、eASC の TLR リガンド刺激に対する反応を評価した (概要表 2.6.3.2：報告書番号 [REDACTED])。eASC は PGN (TLR2 リガンド)、Poly I:C (TLR3 リガンド)、LPS (TLR4 リガンド) 及び ODN (TLR9 リガンド) で 72 時間刺激した。LPS 及び PolyI:C は、Mn スーパーオキシドジスムターゼ (MnSOS) の発現を強く誘導したが、PGN は弱い誘導しか引き起こさず、ODN では誘導は認められなかった (図 2.6.2-16 A)。eASC は IL-6 及び IL-8 を恒常的に発現しており、LPS、Poly I:C 及び PGN で刺激すると、両サイトカインの分泌が顕著に促進されたが、これらのリガンド刺激で、他のサイトカインの産生の誘導は観察されなかった (図 2.6.2-16 B)。eASC を LPS、Poly I:C 又は PGN で刺激すると、IkB- α が急速に分解され、NF- κ B シグナル伝達カスケードが作動したことが示唆された (図 2.6.2-16 C)。

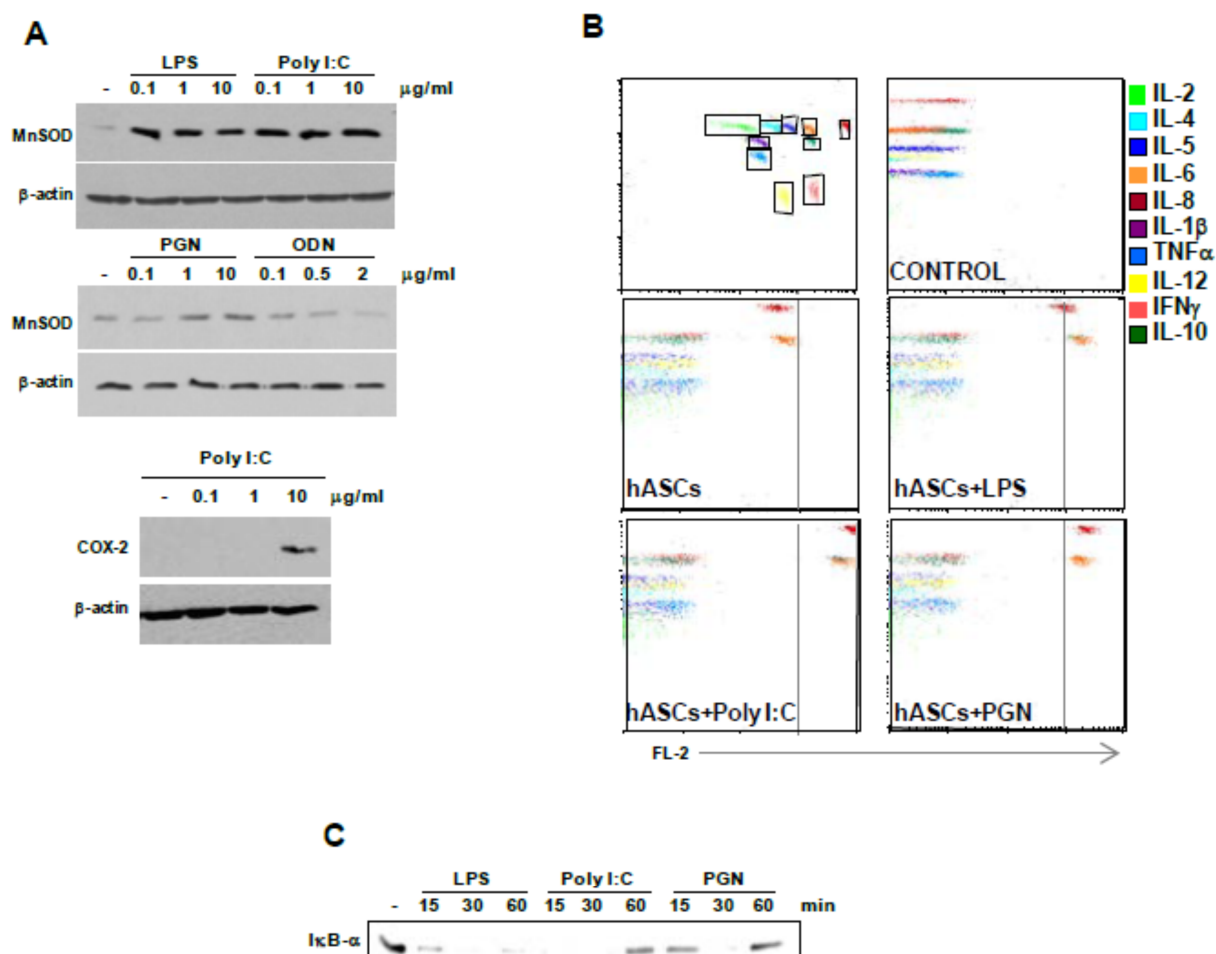


図 2.6.2-16 Toll 様受容体 (TLR) リガンド刺激に対する eASC の反応性

A) eASC を PGN (TLR2 リガンド)、Poly I:C (TLR3 リガンド)、LPS (TLR4 リガンド) 及び ODN (TLR9 リガンド) で 72 時間刺激した。TLR を介した Mn スーパーオキシドジスムターゼの誘導及びシクロオキシゲナーゼ-2 の発現をウェスタンブロット法で検討した。B) 様々なサイトカインの産生は、Cytometric Bead Array 免疫測定法により測定した。C) NF-κB シグナル伝達カスケードの活性化は、IκB-α の分解をウェスタンブロットで解析することにより測定した。PGN:ペプチドグリカン； ODN:オリゴデオキシヌクレオチド； MN-SOS:Mn-スーパーオキシドジスムターゼ； COX-2:シクロオキシゲナーゼ-2； IL:インターロイキン； IFN-γ:インターフェロン-γ； TNF-α:腫瘍壊死因子-α

TLR シグナル伝達が eASC の免疫調節作用に及ぼす影響：

添付資料番号 4.2.1.1-1 (参考)

TLR 刺激による eASC の活性化が eASC の免疫調節作用に影響を及ぼしているか否かを確認するため、LPS、Poly I:C 又は PGN で 24 時間刺激後 eASC 細胞を活性化 PBMC と共培養し、PBMC 細胞に対する増殖阻害作用を調べた (概要表 2.6.3.2: 報告書番号 [REDACTED])。その結果、eASC が各リガンドを認識して TLR シグナル伝達が誘発されるにもかかわらず、eASC 細胞の PBMC 増殖阻害活性は影響されなかった (図 2.6.2-17)。eASC のリガンド刺激時間を 72 時間に延長した場合、リガンド濃度を高くした場合でも eASC の PBMC 増殖阻害作用に対する影響は認められなかった (データ未掲載)。

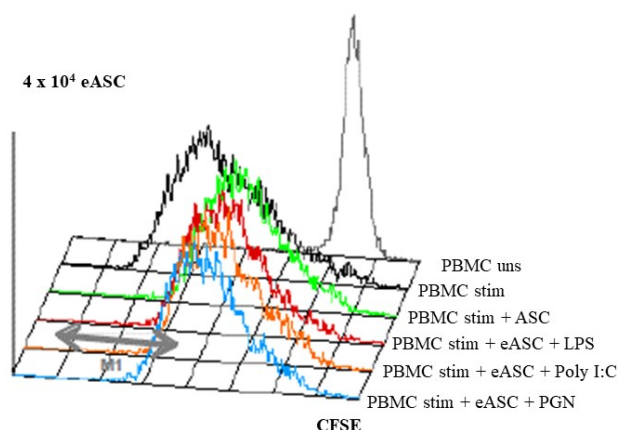


図 2.6.2-17 TLR 活性化 eASC によるリンパ球増殖阻害作用

ヒト活性化 PBMC を LPS、Poly I:C 又は PGN で 24 時間前刺激した eASC と共培養し、CFSE 標識法により細胞増殖を測定した。PBMC uns:非活性化 PBMC ; PBMC stim: 活性化 PBMC。

eASC を介した IDO 活性に対する TLR シグナル伝達の影響：

添付資料番号 4.2.1.1-1 (参考)

IFN- γ は eASC 細胞の IDO 活性を誘導した (2.6.2.2.1.3 項)。そこで、TLR リガンド刺激による eASC 細胞における IDO 活性の誘導作用を調べた (概要表 2.6.3.2 : 報告書番号 [REDACTED])。その結果、LPS 及び PGN で刺激したとき、eASC でのキヌレニン産生は検出されなかった (図 2.6.2-18)。しかし、Poly I:C は、IFN- γ 刺激時の IDO 誘導活性よりは低かったものの、検討した最高濃度で IDO 活性を誘導した。Poly I:C の刺激はウイルスによる IFN- γ 受容体の活性化に類似していることから、弱いながら IDO 活性が誘導された可能性が考えられる。

以上、eASC 細胞では TLR 刺激によりシグナル伝達カスケードの活性化、並びにいくつかのサイトカイン及び IDO 誘導が観察されたことから、eASC は細菌及びウイルス成分を検知し、活性化されることが示唆された。しかし、*in vitro* での eASC のこれら成分への曝露は、同細胞によるリンパ球増殖阻害作用には影響しなかったため、TLR リガンドは eASC の免疫調節作用を変化させないことが示された。

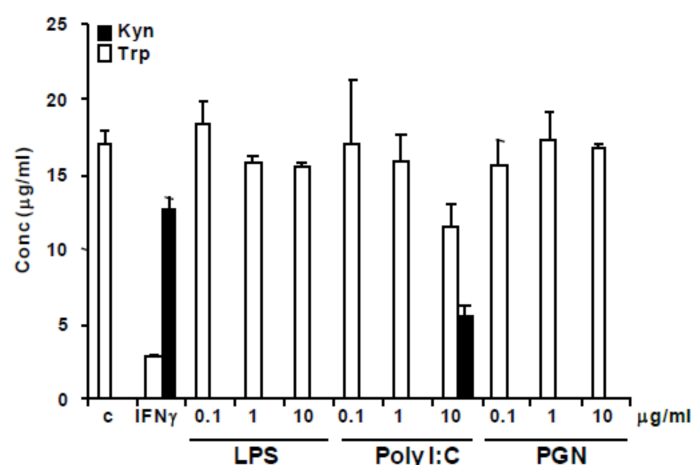


図 2.6.2-18 Toll 様受容体リガンド刺激による eASC の IDO 誘導活性

eASC 細胞を IFN- γ 存在下で LPS、Poly I:C 又は PGN と 72 時間培養し、培養上清中のキヌレニンとトリプトファン濃度を測定した。■ Kyn:キヌレニン；□ Trp:トリプトファン；

2.6.2.2.2 in vivo 試験

添付資料番号 4.3-2 (参考)

クローン病患者の肛門周囲複雑瘻孔に相当する適切な動物モデルが存在しなかったことから、適応症に直接関連するモデルを用いた有効性試験は実施できなかった。しかし、瘻孔が観察されるクローン病患者では消化管炎症が観察されるので、消化管炎症を惹起する実験モデルを用いた in vivo 試験は、in vitro で示された eASC の免疫調節作用について多くの情報を得ることができる。本項では、2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘発マウス大腸炎モデルを用いて、eASC の治療効果の実証と作用機序の解析を試みた。

2.6.2.2.2.1 動物を用いた有効性試験：ヒト eASC はマウス大腸炎の治癒を促進する

炎症性腸疾患の免疫病理学的研究において、TNBS 誘発マウス大腸炎モデルは、化学的に誘発された腸管炎症モデルとして最も広く使用されている。同モデルは、TNBS をマウス直腸内に投与することで重度の大腸炎を誘発する。この処置によって生じる大腸炎は、クローン病で見られる病態に類似した臨床的及び組織病理学的所見を呈する。本モデルは TNBS の直腸内投与により大腸炎が誘発され、さらにハプテンで修飾された自己抗原に対する T 細胞介在性の免疫反応を誘発すると考えられている。上記実験モデルに対する eASC の有効性を、eASC を腹腔内投与することで評価した (概要表 2.6.3.2. González et al. 2009)。本試験に用いた評価項目を表 2.6.2-4 に記載した。

表 2.6.2-4 TNBS 大腸炎モデルでの評価項目

死亡及び体重
結腸の免疫細胞浸潤
結腸及び血清におけるサイトカイン産生
Treg の誘導

eASC が大腸炎マウスの体重減少及び死亡率に及ぼす影響：

TNBS 直腸内投与による大腸炎誘発後、マウスに最大 10^6 細胞となるよう eASC を腹腔内に局所投与した（概要表 2.6.3.2：González et al. 2009）。大腸炎マウスの体重減少、生存率及び腸管への炎症性細胞浸潤に及ぼす eASC の影響を以下に示した。eASC はマウスの体重減少を用量依存的に抑制した（図 2.6.2-19 A）。 10^6 細胞の腹腔内投与により、マウスは 10 日目までに対照群と同程度の体重に回復したが、 3×10^5 細胞の投与では 0 日目と同程度のレベルまでの体重回復であった。したがって、10 日目までにマウスの体重を正常なレベルまで回復させる最小有効用量は 10^6 細胞であった。さらに、eASC 投与によりマウスの生存率が改善した（図 2.6.2-19 B）。また、eASC 投与で大腸炎マウスの結腸への免疫細胞浸潤が減少した（図 2.6.2-19 C）。腸管損傷組織におけるこのような炎症細胞の浸潤低下は、組織における抗炎症プロセスの明確な指標である。

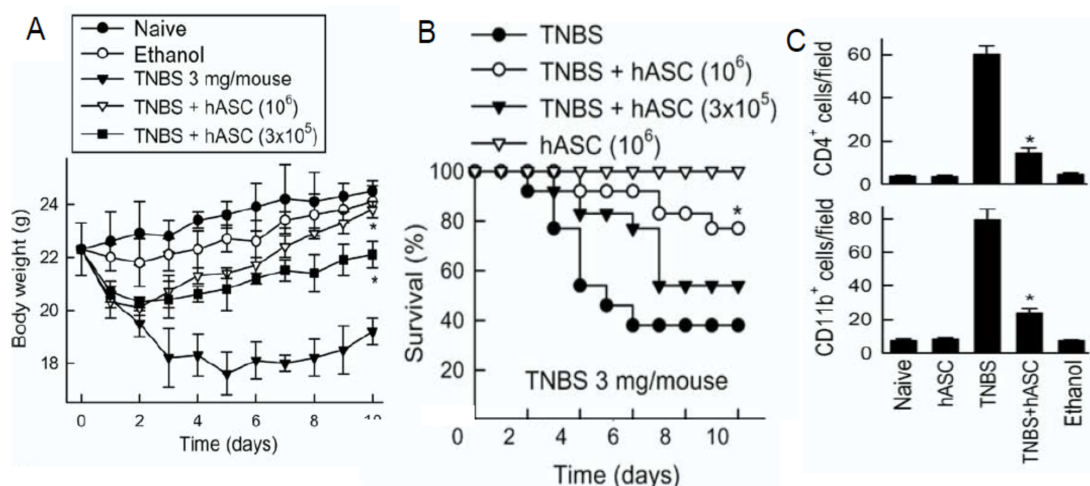


図 2.6.2-19 TNBS 誘発大腸炎マウスに対する eASC の効果

マウスあたり TNBS 3mg (50%エタノールに溶解) を結腸内投与することにより大腸炎を誘発。TNBS 投与 12 時間後に、 3×10^5 もしくは 10^6 細胞の eASC をマウス腹腔内に投与し、対照群には 50%エタノール又は eASC を単独投与した。体重の変化 (A)、生存率 (B)、炎症性浸潤 (1 視野あたりの CD4 陽性細胞数及び CD11b 陽性細胞数 (C)) により、臨床経過をモニターした (各群 n=5-8)。

大腸炎マウスでのサイトカイン産生に対する eASC の影響：

TNBS 誘発マウス大腸炎モデルの大腸における炎症性メディエーター産生に及ぼす eASC 投与の影響を検討した（概要表 2.6.3.2：González et al. 2009）。TNBS 誘発マウス大腸炎モデルにおいて、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-1 β 及び IL-12) 及びケモカイン [Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) 及び Macrophage inflammatory protein-2 (MIP2)] の結腸濃度は、eASC 非投与群と比較して、eASC 投与群で減少した（図 2.6.2-20 A）。さらに、TNBS 誘発大腸炎モデルにおいて、抗炎症性サイトカイン IL-10 の濃度が eASC 投与により上昇した。大腸における eASC の広範な抗炎症作用は、全身性炎症反応の抑制を伴っていた（図 2.6.2-20 B）。大腸炎マウスから採取し in vitro で培養した粘膜固有層単核細胞において、培養液中の TNF- α 産生は、eASC 未投与のマウス (0.94 ng/mL) より eASC を投与したマウス (0.42 ng/mL) で低かった（データ未掲載）。したがって、図 2.6.2-20 A で観察された、各種炎症メディエーターの減少は、eASC 投与によるマウスの結腸

粘膜に対する細胞浸潤の減少にのみ起因するのではなく、eASC 投与による炎症細胞の活性化抑制も反映されているものと推定される。これらの結果から、eASC 投与によりマウス大腸における炎症反応が抑制されることが示された。

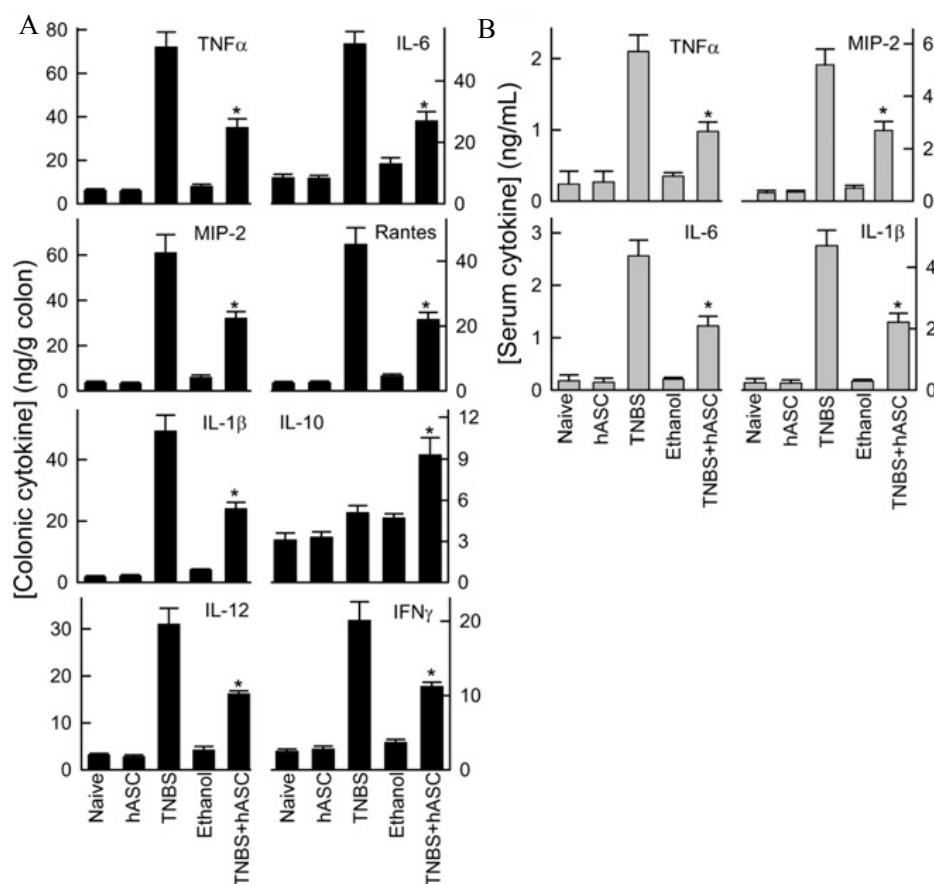


図 2.6.2-20 大腸炎マウスのサイトカイン産生に対する eASC の影響

TNBS 誘発大腸炎マウスに eASC を投与し、(A) 結腸及び (B) 血清中のサイトカイン/ケモカイン含量を測定した (各群 n=5-6)。*eASC 未投与の TNBS 誘発マウス大腸炎モデルとの比較で P<0.001。

大腸炎マウスにおける eASC による制御性 T 細胞誘導作用：

次に、TNBS 誘発マウス大腸炎モデルにおける eASC の治療効果が、eASC 投与マウスの腸間膜リンパ節(MLN)の Treg に依存するかどうか検討した(概要表 2.6.3.2:González et al. 2009)。

Treg が eASC の治療効果の直接的メディエーターであることを示すため、ヒト eASC 投与マウスから CD4 陽性 T 細胞 (炎症性 CD4 細胞及び Treg で構成) を精製し、大腸炎マウスに注入した。この試験において、eASC 投与したマウス由来の CD4 陽性 T 細胞を注入した大腸炎マウスでは、eASC 非投与マウス由来の同細胞を注入したマウスに比べて、大腸炎の症状 (体重低下、死亡率) が改善した (図 2.6.2-21)。一方、eASC 投与マウス由来の CD4 陽性 T 細胞から Treg を除去した細胞を注入すると大腸炎抑制作用は消失した。

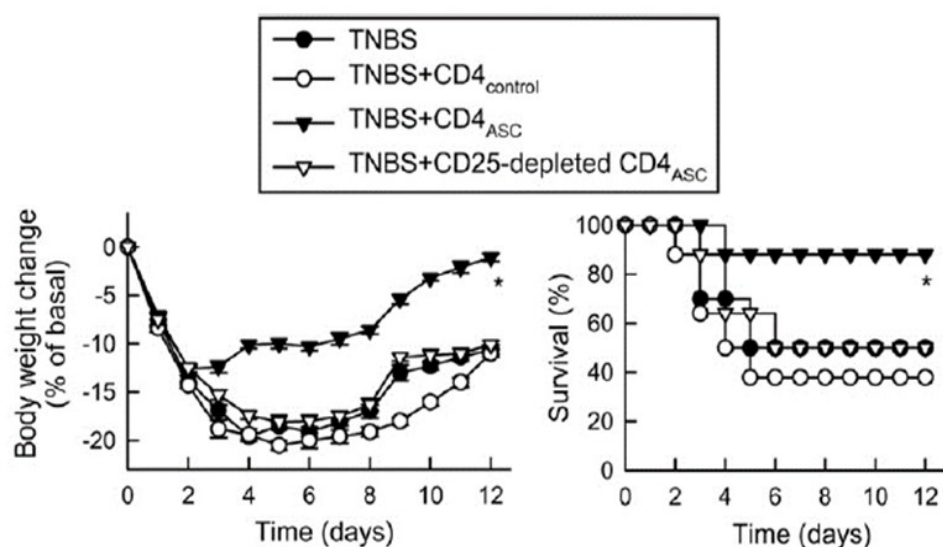


図 2.6.2-21 eASC の薬効に対する Treg の関与

eASC 未投与 (CD4_{control}) 又は eASC 投与 TNBS 誘発マウス大腸炎モデルの MLN から分離した CD4 陽性 T 細胞 (CD4_{asc}) 及び CD4+CD25-T 細胞 (CD4+CD25-depleted CD4_{asc}) を TNBS 誘発マウス大腸炎モデルに養子移植し、マウスの体重変化 (左図) と体重推移 (右図) を経時的に観察した (各群 n=5)。

*P<0.01 TNBS 投与マウスとの比較。

2.6.2.3 副次的薬理試験

eASC の副次的薬理試験は実施していない。以下の結果は、Cx601 の望ましくない生理学的標的の可能性が低いことを示唆している。詳細は 2.6.4 と 2.6.6 に示す。

- ・肛門周囲及び直腸内投与経路による eASC の生体内分布試験において、eASC 投与により血液学的及び全身性の組織病理学的所見は認められなかった (2.6.4.4.1 ; 表 2.6.5.5)。
- ・16 回倍加 (PD16) させた eASC を用いた単回及び反復投与毒性試験、並びに種々の投与経路での eASC 投与により血液学的及び全身性の組織病理所見が認められなかった (2.6.6.2 及び 2.6.6.3; 表 2.6.7.5 及び 2.6.7.7)。
- ・eASC が脂肪細胞及び骨細胞に分化する可能性を検討した in vitro 試験では、eASC の脂肪細胞及び骨細胞への分化能は、PD の増加時に低下することが示された (2.6.6.8.3 ; 表 2.6.7.17E)。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系

添付資料番号 4.2.3.2-3 (評価)

各群雌雄各 20 例の無胸腺ヌードラット (CrI:NIH-Foxn1^{rmu}) に、Cx601 (PD16) の 0.2、1 又は 5×10⁶ 細胞/mL の 1 mL/ラットを 2 週間間隔で 2 回静脈内投与した (概要表 2.6.3.4; XXXXXXXXXX)。対照群雌雄各 20 例には等量の乳酸リンゲル液を同様に投与した。最終投与 2 週間後及び 26 週間後に各群雌雄各 10 例をそれぞれ安楽殺した。最終投与後 26 週間の観察期間において、中枢神経系に対する影響を機能観察総合評価法 (Functional Observational Battery test : FOB 検査) を用いて評価した。

0.2×10⁶ 細胞群の雌 1 例が投薬第 173 日に、1×10⁶ 細胞群の雄 1 例が投薬第 196 日に、5×10⁶ 細胞群の雌雄各 1 例がそれぞれ投薬第 26 日及び 166 日に、運動及び筋緊張度の低下、蒼白化及び／又は円背位などを示して死亡したが、これら散発的に認められた死亡はいずれも投薬に関連しない死亡と考えられた。

FOB 検査（自発運動量、行動パラメータ、協調性及び反射反応）で評価した神経学的パラメータに、Cx601 投与による影響は認められなかった。

2.6.2.4.2 心血管系及び呼吸器系

Cx601 の心血管系及び呼吸器系に対する安全性薬理試験は実施していない。なお、Cx601 の臨床適用経路を想定して実施された肛門周囲+直腸内投与の生体内分布試験では、直腸及び空腸のみに細胞の局在がみられ、その他臓器に、投与した細胞の分布は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

eASC がヒト細胞加工製品であることを考慮すると、eASC を用いた薬力学的薬物相互作用試験は適切でないと考えられる。しかし、一般的に投与されるクローン病治療薬が eASC の活性に及ぼす影響を評価するため、一連の試験を実施した。クローン病の従来治療には、MTX 及び AZA などの免疫調節薬並びに抗 TNF α 製剤が用いられる[4][5]。クローン病に伴う肛門周囲複雑瘻孔患者に使用可能なこれら薬剤が eASC の免疫調節作用を変化させるか否かを明らかにするため、PBMC-eASC の in vitro モデルを用いて薬剤の作用を検討した。

2.6.2.5.1 eASC の免疫調節作用に対する抗 TNF 製剤の影響

添付資料番号 4.3-3（参考）

インフリキシマブのような抗 TNF α モノクローナル抗体は、免疫系の一部を抑制し、炎症プロセスを制御する。TNF- α は炎症反応の持続に関与し、TNF はクローン病の腸管炎症部位で認められる[25]。インフリキシマブは、クローン病の治療に初めて使用された抗 TNF 製剤であり、1999 年に欧州で承認され、寛解導入及び寛解維持において有効かつ安全な薬剤とされている[25][26]。

eASC を活性化 PBMC と共培養した培養上清及びトランスウェル又は接触条件下の共培養液にインフリキシマブを添加し、eASC の PBMC 増殖阻害作用に及ぼすインフリキシマブの影響を検討した（概要表 2.6.3.5：報告書番号 DelaRosa et al 2009）。その結果、eASC の活性化 PBMC 増殖に対する阻害作用は IFN- γ を添加することで誘導されたが（図 2.6.2-22 A）、TNF α 添加では誘導されなかった。次に、抗体により TNF- α を中和しても eASC の PBMC に対する阻害作用に影響は認められなかったが、抗体により IFN- γ を中和したところ、トランスウェル培養条件で eASC を介した PBMC に対する増殖阻害作用が解除された（図 2.6.2-22 B）。これらの結果から、eASC を介した免疫調節作用は抗 TNF 製剤により阻害されないことが示唆された。

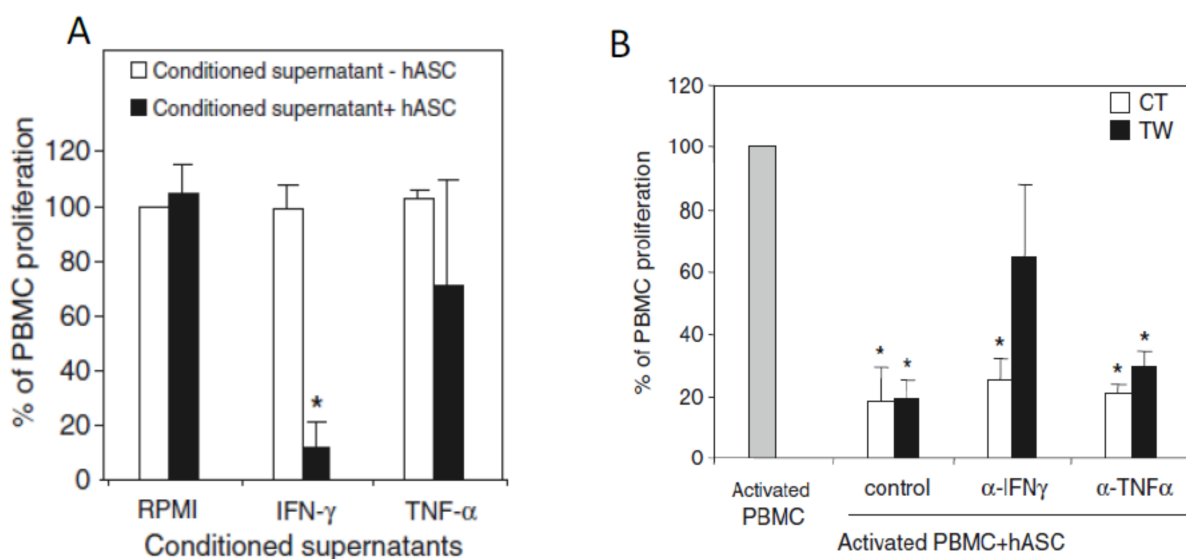


図 2.6.2-22 eASC の生存率及び増殖に対するインフリキシマブの作用 (in vitro)

(A) IFN- γ 又は TNF- α で 72 時間刺激した eASC の培養上清中で活性化 PBMC を培養 (黒色バー)。対照として、eASC を添加しない同じ培養上清中で活性化 PBMC を培養 (白色バー)。(B) 抗 IFN- γ 又は抗 TNF- α 阻害モノクローナル抗体 3 μ g/mL 存在下での活性化 PBMC の増殖を示す。活性化 PBMC の増殖を 100% として (灰色バー) 表示した。

* $p < 0.05$ (Student t 検定)

2.6.2.5.2 メトトレキサート (MTX) 及びアザチオプリン (AZA) が eASC の免疫調節作用に及ぼす影響

添付資料番号 4.3-4 (参考)

MTX 及び AZA は、炎症性腸疾患などの慢性炎症性疾患の治療に最も一般的に使用されている免疫調節薬である[27]。MTX 及び AZA は eASC の細胞増殖及び生存に影響を及ぼす可能性のある免疫調節薬であることから、MTX 及び AZA が eASC の生存及び増殖に及ぼす影響を検討した。

eASC の生存率と増殖に及ぼす MTX と AZA の影響：

eASC の PBMC 増殖阻害作用に対する MTX 及び AZA の作用を、臨床的に使用される濃度の MTX 又は AZA を添加することにより検討した[28]。eASC に MTX または AZA を添加して 2 日又は 7 日培養し、eASC の生存率及び増殖を細胞増殖アッセイキットで測定した (概要表 2.6.3.5 Mancheño-Corvo et al. 2013)。その結果、MTX は eASC 細胞の生存率及び増殖に有意な影響を及ぼさないことが示された (図 2.6.2-23 A)。AZA は、臨床で使用される濃度では eASC の生存率及び増殖率に影響を及ぼさなかったが (0.1~100 μ mol/L)、高濃度 (1000 μ mol/L) では細胞毒性がみられ、生存率及び増殖率が顕著に低下した (図 2.6.2-23 B)。これらの結果から、eASC の生存率及び増殖能は、临床上意義のある濃度において、MTX 及び AZA により低下しないことが示された。

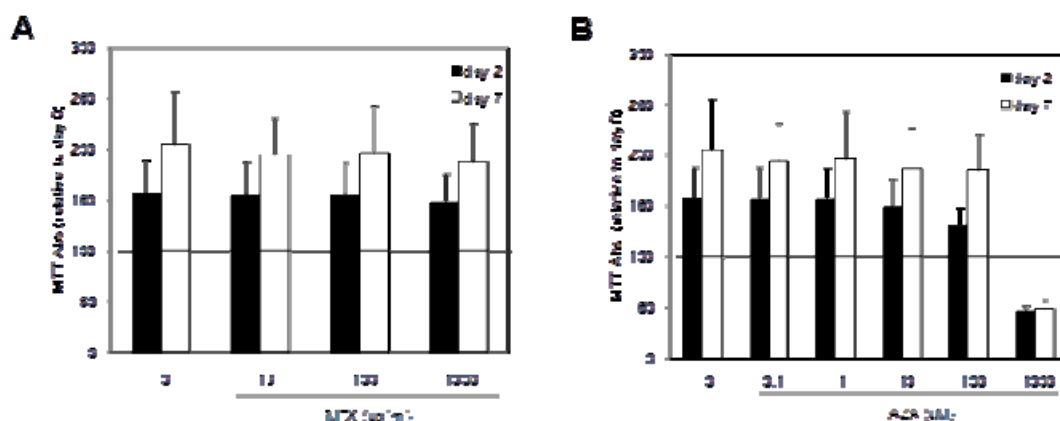


図 2.6.2-23 eASC の生存率及び増殖に対する MTX 及び AZA の作用

eASC の PBMC 増殖阻害作用に及ぼす MTX 及び AZA の影響：

MTX 及び AZA は eASC と同様に免疫調節作用を有し、その免疫調節作用により、eASC の機能に直接的な影響を及ぼす可能性があるほか、同じ種類の免疫細胞との相互作用により間接的に eASC の作用機序に影響を及ぼし、併用時に相乗作用又は拮抗作用を示す可能性がある。したがって、これらの薬剤の併用が eASC の免疫調節作用に及ぼす影響を in vitro で検討した(概要表 2.6.3.5 Mancheño-Corvo et al. 2013)。その結果、MTX (図 2.6.2-24 A) 又は AZA (図 2.6.2-24 B)は eASC の PBMC に対する増殖阻害作用は有意に変化しなかったことから、eASC と MTX 又は AZA との相乗作用又は拮抗作用は in vitro では認められないことが示された。

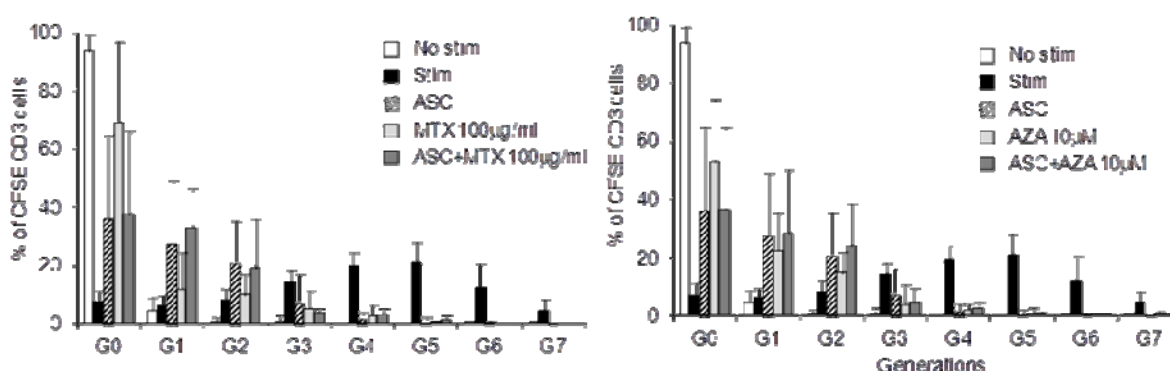


図 2.6.2-24 eASC の PBMC 増殖阻害作用に及ぼす MTX 及び AZA の影響

eASC の Treg 誘導能に及ぼす MTX 及び AZA の影響：

また、in vitro での eASC の Treg 産生能は MTX 又は AZA の影響を受けなかった(図 2.6.2-25) (概要表 2.6.3.5 : Mancheño-Corvo et al. 2013)。これらの結果は、eASC の免疫調節作用は MTX 及び AZA の曝露による影響を受けないことを示している。

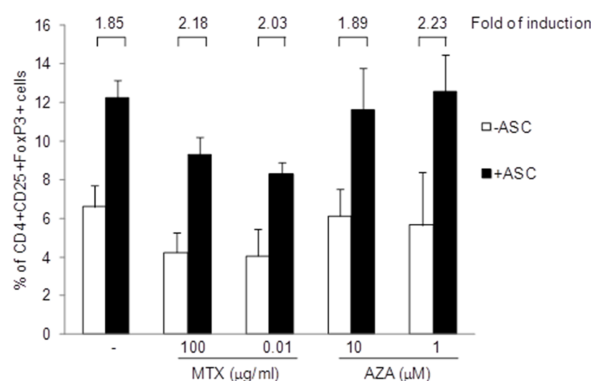


図 2.6.2-25 eASC の Treg 誘導能に対する MTX 及び AZA の作用

MTX 及び AZA 非存在下又は存在下で、ASC を加え IL-2 (100 U/mL) で刺激した PBMC について、7 日後の Treg (CD4+CD25+Foxp3+細胞と定義) の割合を測定した。白色バー:ASC 非含有 PBMC ; 黒色バー:eASC 含有 PBMC N=3

2.6.2.6 考察及び結論

eASC は *in vitro* 及び *in vivo* 試験で免疫調節作用を発揮することが示された。瘻孔におけるリンパ球の抗炎症反応に対する eASC の寄与は炎症性シグナルの低下を介しており、炎症性細胞増殖と組織修復を促進する細胞活性化の両方が減弱する。したがって、eASC とリンパ球のクロストークを検討し、eASC が組織修復前の炎症の制御にどのように寄与するかを理解することは極めて重要である。活性化 PBMC を eASC と共培養することにより、eASC と T 細胞との間の相互作用を、いくつかの側面 (細胞増殖、サイトカイン放出及び酵素活性など) から解析するための *in vitro* モデルを確立し、eASC の免疫調節作用の機序の理解に活用した。さらに、クローン病患者の炎症状態を模倣した実験モデルを用いて、*in vitro* で確認された薬理作用を *in vivo* で確認した。

eASC の免疫調節作用に関与する機序は、eASC-免疫細胞との接着及び可溶性因子の両方であった。可溶性因子については、活性化 PBMC により産生された IFN- γ が eASC の IDO 活性を誘導し、これが培養液中のトリプトファンを枯渇させることにより eASC の PBMC 増殖に対する分裂抑制作用を媒介することが示された。

また、IDO を介した eASC の活性化は、免疫炎症反応を負に制御する Treg の誘導にも重要であった。eASC は様々な免疫因子と相互作用し、Treg 細胞の増殖誘導を介して炎症反応を調節する能力により、炎症組織の損傷を減弱させ、その後の組織修復が促進されるものと考えられる。

TLR シグナル伝達は、炎症局所における TLR リガンドの存在を考慮すると、瘻孔の炎症領域においても重要であり、TLR は eASC の活性化に寄与する可能性がある[29]。このような観点から実施した、*in vitro* モデルにおける実験により、eASC は TLR を介したシグナル伝達を認識することができるが、このシグナルが eASC の免疫調節作用を修飾するには不十分であることが示された。さらに、eASC において TLR3 シグナル伝達が IDO の活性化をもたらすことが示されたが、これは過去に公表されたデータ (TLR3 プライミングの結果として IL-4、IDO 又は PGE2 等の抗炎症分子が産生される) と一致していた[30]。

In vivo では、大腸炎の実験モデルを用いて、腸管の炎症反応に対する eASC の影響を検討した。本実験モデルにおいて、eASC 投与により、疾患の重症度が低下するとともに、炎症

性細胞の腸管組織への浸潤が阻害され、炎症性サイトカインの濃度が低下し、抗炎症性サイトカインの濃度が上昇していた。これらの結果は、本項に要約した *in vitro* 試験結果と一致しており、消化管炎症の治療における eASC の有効性を裏付けるものである。

安全性薬理評価として無胸腺ヌードラットを用いた静脈内反復投与試験で実施した行動並びに呼吸器及び心血管系に対する影響評価において、Cx601 は 5×10^6 細胞の用量まで、特記すべき異常を示さなかった。また、同試験で実施した FOB 検査において、Cx601 は 5×10^6 細胞の用量まで、神経学的パラメータに影響を示さなかった。

薬力学的薬物相互作用試験として、クローン病の標準治療薬(抗 TNF 製剤、MTX 又は AZA)に eASC を曝露させたところ、これらの薬剤は eASC の免疫調節作用に重大な影響を及ぼさないことが示された。

以上、eASC を炎症部位に投与したとき、局所の炎症環境に存在する IFN- γ が eASC の活性化を誘導することにより、eASC は *in vitro* 及び *in vivo* で特徴的な多くの機序を介して免疫調節作用を発揮すると考えられる。

2.6.2.7 参考文献

- [1] Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Förster I et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*. 1999 Jan;10(1):39-49.
- [2] Kobayashi M, Kweon M, Kuwata H, Kiyono H, Takeda K, Akira S. Toll-like receptor-dependent IL-12p40 production causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J Clin Invest*. 2003 May;111(9):1297-308.
- [3] Goldstein DR., Tesar BM., Akira S, Lakkis FG. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest*. 2003 May;111(10):1571-8.
- [4] Scott FI, Osterman MT. Medical management of crohn disease. *Clin Colon Rectal Surg*. 2013 Jun;26(2):67-74.
- [5] Burguer D, Travis S. Conventional medical management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1827-1837.e2.
- [6] Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012 Apr 25;12(5):383-96.
- [7] Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013 Oct 3;13(4):392-402.
- [8] Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 2004 Oct;4(10):762-74.
- [9] Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol*. 2013 Mar;34(3):137-43.
- [10] Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *J Immunol*. 2003 Jun 15;170(12):5809-13.
- [11] Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003 Oct;31(10):890-6.

- [12] Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T et al. CD4+CD25 bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):3119-30.
- [13] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- [14] Ishimura D, Yamamoto N, Tajima K, Ohno A, Yamamoto Y, Washimi O, Yamada H. Differentiation of adipose-derived stromal vascular fraction culture cells into chondrocytes using the method of cell sorting with a mesenchymal stem cell marker. *Tohoku J Exp Med.* 2008 Oct;216(2):149-56.
- [15] Maccario R, Moretta A, Cometa A, Montagna D, Comoli P, Locatelli F et al. Human mesenchymal stem cells and cyclosporin a exert a synergistic suppressive effect on *in vitro* activation of alloantigen-specific cytotoxic lymphocytes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005 Dec;11(12):1031-2.
- [16] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005 Feb 15;105(4):1815-22.
- [17] Kanai T, Ilyama R, Ishikura T, Uraushihara K, Totsuka T, Yamazaki M et al. Role of the innate immune system in the development of chronic colitis. *J Gastroenterol.* 2002 Nov;37 Suppl 14:38-42.
- [18] Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:419-41.
- [19] Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol.* 2000 164(2): 558-61.
- [20] Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 2002 Jan 7;195(1):99-111.
- [21] Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005 Oct 17;202(8):1131-9.
- [22] Lombardo E, DelaRosa O, Mancheño-Corvo P, Menta R, Ramírez C, Büscher D. Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential. *Tissue Eng Part A.* 2009 Jul;15(7):1579- 89.
- [23] DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:865601.
- [24] Delarosa O, Dalemans W, Lombardo E. Toll-like receptors as modulators of mesenchymal stem cells. *Front Immunol.* 2012 Jul 2;3:182.
- [25] Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med.* 1999 May 6;340(18):1398-405.

- [26] Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. N Engl J Med. 1997 Oct 9;337(15):1029-35.
- [27] Blonski W, Buchner AM, Lichtenstein GR. Inflammatory bowel disease therapy: current state-of-the-art. Curr Opin Gastroenterol. 2011 Jul;27(4):346-57.
- [28] Duijvestein M, Molendijk I, Roelofs H, Vos AC, Verhaar AP, Reinders ME et al. Mesenchymal stromal cell function is not affected by drugs used in the treatment of inflammatory bowel disease. Cytotherapy. 2011 Oct;13(9):1066-73.
- [29] Romieu-Mourez R, François M, Boivin MN, Bouchentouf M, Spaner DE, Galipeau J. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a pro inflammatory phenotype. J Immunol. 2009 Jun 15;182(12):7963-73.
- [30] Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. Betancourt. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. PLoS One. 2010 Apr 26;5(4):e10088.

目次

2.6.3 薬理試験概要表	2
2.6.3.1 薬理試験：一覧表	2
2.6.3.2 効力を裏付ける試験	4
2.6.3.2.1 In vitro 試験	4
2.6.3.2.2 In vivo 試験	6
2.6.3.3 副次的薬理試験	7
2.6.3.4 安全性薬理試験	8
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験	9

被験物質: eASC

2.6.3 薬理試験概要表
2.6.3.1 薬理試験：一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	報告書番号	添付資料番号	区分
Primary Pharmacodynamics						
In vitro						
Inhibition of activated PBMC proliferation by eASC	PBMC eASC	In vitro	CELLERIX		4.2.1.1-1	参考
Effect of soluble factors on the inhibition of activated PBMC proliferation by eASC	PBMC eASC	In vitro			4.2.1.1-1	参考
IDO role in the inhibition of activated PBMC proliferation by eASC.	PBMC eASC	In vitro			4.2.1.1-1	参考
Induction of IDO in eASC	PBMC eASC	In vitro			4.2.1.1-1	参考
				Menta et al 2014	4.3-1	参考
Induction of Treg cells by eASC	PBMC eASC	In vitro			4.2.1.1-2	参考
					4.2.1.1-3	評価
					4.2.1.1-4	参考
					4.2.1.1-5	評価
Effect of TLR-ligands on eASC activation	PBMC eASC	In vitro		4.2.1.1-1	参考	
In vivo						
Effect of eASC on TNBS mouse model of colitis	TNBS mouse model of colitis	Intraperitoneal injection	CSIC CELLERIX	González et al. 2009	4.3-2	参考

試驗施設:
CSIC, Serrano, 117, 28006 Madrid, Spain.
CELLERIX., Marconi 1, Parque Tecnológico de Madrid, 28760 Tres Cantos, Madrid, Spain.
[REDACTED], Spain.

F: females; M: males; eASC: expanded adipose stem cells; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; N/A: not aplicable; TNF: tumour necrosis factor ; TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase; IFN: interferón; TGF: transforming growth factor; HGF: hepatocyte growth factor; MT: methyl-L-tryptophan; IL: interleukin; LPS: lipopolysaccharide; TLR: toll-like receptor; MTX: methotrexate; AZA: azathioprine

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 In vitro 試験

被験物質：eASC

試験の種類	試験系	投与方法	結果	報告書番号	GLP 適用	添付資料番号
Inhibition of activated PBMC proliferation by eASC	PBMC eASC	Dose escalation. Ratio ASC:PBMC from 1:200 to 1:25	・ eASC inhibited proliferation of PBMC and T lymphocytes (both CD4 and CD8 subsets) in vitro. ・ eASCs were activated by inflammatory mediators produced by actively proliferating lymphocytes (mainly IFN- γ).		Non GLP	4.2.1.1-1
Effect of soluble factors on the inhibition of activated PBMC proliferation by eASC	PBMC eASC	Ratio ASC:PBMC 1:25	・ Conditioned supernatant from IFN- γ -activated ASCs inhibited lymphocyte proliferation. ・ Neutralization of IFN- γ in PBMC:eASC cocultures impaired the capacity of eASC to inhibit lymphocyte proliferation. ・ eASC inhibited production of inflammatory cytokines by activated PBMC. ・ Blockade of IL10, TGF β , HGF, or PGE2 did not significantly impaired the inhibitory effects of ASCs.		Non GLP	4.2.1.1-1
Involvement of IDO in inhibition of activated PBMC proliferation by eASC. -IDO expression and inducibility-	PBMC eASC	ASC:PBMC ratio 1:25	・ mRNA and protein of IDO was induced in eASC after stimulation with 3ng/ml of IFN- γ . ・ IL1, TNF- α and LPS did not induce IDO expression. ・ IDO activity was induced at concentrations >0.3ng/ml IFN- γ . ・ Treatment with anti-IFN- γ impaired eASC mediated IDO activity.		Non GLP	4.2.1.1-1
Involvement of IFN- γ on IDO activity in eASC.	PBMC eASC	ASC:PBMC ratio 1:25	・ Treatment with anti-IFN- γ impaired eASC mediated IDO activity.	Menta et al 2014	Non GLP	4.3-1
Effect of IDO on inhibition of PBMC proliferation by eASC	PBMC eASC	ASC:PBMC ratio 1:25	・ Addition of IDO inhibitor 1-MT impaired the effect of eASC on lymphocyte proliferation.		Non GLP	4.2.1.1-1
Genetic modification of eASC and IDO activity in eASC-IDO and eASC IDOsi-clones ^a	PBMC eASC	ASC:PBMC ratio 1:25	・ Clones of ASCs that do not express IDO failed to inhibit lymphocyte proliferation. ・ Clones that constitutively express IDO showed a higher inhibitory effect on PBMC proliferation.		Non GLP	4.2.1.1-1

67

試驗施設:

[REDACTED], Spain.

F: females; M: males; eASC: expanded adipose stem cells; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; N/A: not aplicable; TNF: tumour necrosis factor; TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid ; IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase; IFN: interferón; TGF: transforming growth factor; HGF: hepatocyte growth factor; MT: methyl-L-tryptophan; IL: interleukin; LPS: lipopolysaccharide; TLR: toll-like receptor

被験物質：eASC

2.6.3.2.2 In vivo 試験

試験種	試験系	投与方法	結果	報告書番号	GLP適用	添付資料番号
Effect of eASC on TNBS mouse model of colitis -Effect on weight and mortality -Effect on cell infiltration -Effect on cytokine production -Effect on Treg generation	TNBS induced mouse model of colitis	1 million or 0.3 million intraperitoneal eASCs/mouse	· eASC improved loss of weight and mortality rate in a dose dependent manner. · eASC reduced infiltration of inflammatory cells in the colon. · eASC decreased levels of proinflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, IFN-γ) and chemokines while increased the levels of anti-inflammatory cytokine (IL10). · eASC Increased Treg cells capable to reduce inflammation.	González et al. 2009	Non GLP	4.3-2

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当試験なし

被験物質：eASC

試験種	試験系	投与量/投与経路	結果	報告書番号	GLP 適用	添付資料番号
Central Nervous System (Functional Observational Battery)	Rat/Crl:NIH- Foxn1 ^{nu} 20 animals/group/sex	Intravenous; 2 administrations at 2-week interval (on day 0 and day 14) Doses: 0, 0.2, 1, 5×10 ⁶ cells/rat	<u>Mortality</u> : not treatment-related ^a 0.2×10 ⁶ : 1 F (D173) 1×10 ⁶ : 1M (D196) 5×10 ⁶ : 1M (D166) + 1 F (D26) <u>Functional Observational Battery</u> : ^b No noteworthy findings		GLP	4.2.3.2-3

^a Female given 5×10⁶ cells: bad general condition, decreased alertness, ataxia/hypotonic gait, tremors, reduced muscle tone prior to death; other rats found dead: diminished motor activity, diminished muscle tone, prostrate, pallor prior to death

^b Performed weekly until sacrifice (10 M + 10 F in week 2 post-dose and 10 M + 10 F in week 26 post-dose)

M: males; F: females; D: day

2.6.3.4 安全性薬理試験

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

被験物質: eASC

試験種	試験系	投与経路	結果	報告書番号	GLP適用	添付資料番号
Effect of anti-TNF α on the immunomodulatory properties of eASC	PBMC eASC	anti-TNF- α (3 μ g/ml) ASC:PBMC ratio 1:25	anti-TNF α did not affect the capacity of eASC to inhibit PBMC proliferation.	DelaRosa et al 2009	Non GLP	4.3-3
Effect of MTX and AZA on the immunomodulatory properties of eASC -Effect on viability and proliferation.in vitro -Effect on the capacity of eASC to inhibit PBMC proliferation in vitro -Effect on the capacity of eASC to generate Treg cells in vitro	eASC PBMC eASC PBMC eASC	MTX (0.01 μ g/ml, 100 μ g/ml), AZA (1 μ M, 10 μ M) MTX (0.01 μ g/ml, 100 μ g/ml), AZA (1 μ M, 10 μ M) ASC:PBMC ratio 1:25 MTX (0.01 μ g/ml, 100 μ g/ml), AZA (1 μ M, 10 μ M) ASC:PBMC ratio 1:25	MTX and AZA did not affect viability and proliferation of eASC at clinically relevant concentrations. MTX and AZA did not affect the capacity of eASC to inhibit lymphocyte proliferation. MTX and AZA did not affect the capacity of eASC to increase Treg cells in vitro.	Mancheño-Corvo et al. 2013 Mancheño-Corvo et al. 2013 Mancheño-Corvo et al. 2013	Non GLP Non GLP Non GLP	4.3-4 4.3-4 4.3-4