

## 学術研究助成金〔社会実装研究〕実績報告書

令和 5年 4月 1日

日本大学学長 殿

氏 名： 岡山 吉道  
所属・資格： 医学部・准教授  
実施研究所： 医学部・総合医学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

重症アレルギー疾患患者に対する抗 IgE 抗体治療のコンパニオン診断薬の開発

## 2 研究期間

令和 2 年度 ～ 令和 3 年度

※令和 2 年度 ～ 令和 4 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

## 3 研究組織

研究代表者及び研究分担者

	氏 名	部科校・資格	役 割 分 担
研 代 表 者	岡山吉道	医学部／准教授	総括, Free IgE 測定系の確立, 臨床データ収集と解析
研 究 分 担 者	権 寧博	医学部／教授	喘息患者の臨床データ収集と解析, Free IgE 測定系の確立
	木澤靖夫	薬学部／教授	Free IgE 測定系の確立
	高橋恭子	生物資源科学部/教授	Free IgE 測定系の確立
	丸岡秀一郎	医学部／准教授	喘息患者の臨床データ収集と解析
	葉山惟大	医学部／助教	蕁麻疹患者の臨床データ収集と解析

連携組織

組 織 名	役 割 分 担
株式会社シノテスト	Free IgE 測定用酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) の最適化と ELISA の分析法バリデーションの評価

※ホームページ等での公開 (☑可・☐否) いずれかをチェックしてください。

否の場合は, 理由書を別途添付のこと。

## 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
 <区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ①】・【達成度： 85%】

## 5 研究目的

研究の全体構想及びその中で本研究の具体的な目的について記述してください。

我が国の全喘息患者（300 万人）のなかで高容量吸入ステロイド薬と長時間作用性 $\beta$ 2刺激薬等の長期管理薬の併用でも効果不十分な難治性喘息は、約 34～35 万人いる。この患者の治療費は全喘息患者の治療費の七割を占めているため難治性喘息患者の医療費の削減が喫緊の課題である。難治性喘息患者の治療薬として使用されているヒト化抗 IgE 抗体（オマリズマブ）は、日本での売上額は 50 億円であり、患者の 1 カ月の医療費は 30 万円にもおよび、投与中の薬剤減量の目安となる biomarker は存在せず年余に渡り投与されている。従って副作用の頻度も上昇する。さらに、我が国で慢性特発性蕁麻疹と診断された患者の中で重症患者は 5～6 万人と推定されており、オマリズマブは重症患者に適応があり、その患者の約 7000 人に年余に渡り投与されており、その減薬方法は確立されていない。我が国にてオマリズマブは、既存薬で効果が不十分な重症花粉症の適応となり、その患者数は国内に 200～300 万人いると推定されている。既に私達は、オマリズマブの投与中の薬剤減量の目安となる biomarker の測定系を実験室レベルで確立しており、今回企業との共同研究によってさらに感度が高く安定した測定系（コンパニオン診断薬）を確立させ、保険収載を目指すことを本研究課題の目的とする。

社会実装研究を行うことによる具体的な効果

このコンパニオン診断薬によって重症喘息、重症慢性特発性蕁麻疹および重症花粉症患者へのオマリズマブ投与量を減らすことができ、患者の負担額と副作用の頻度が減少する。オマリズマブの投与量を漸減あるいは、中止できれば我が国の医療費削減に結び付く。

## 6 当該年度の実施状況の概要

次の点について、具体的かつ明確に記述してください。

- ①当初の研究計画、具体的なマイルストーンに対する進捗状況
- ②進捗上の問題点と今後の対策

本研究課題は、2つの段階に分けて進めた。

第一段階：高感度 free IgE 測定系（コンパニオン診断薬）の確立；（株）シノテストからの助言

第二段階：free IgE 測定系のバリデーションの評価による実用化

すでに前年度までに第一段階を終了し、第二段階もほぼ終了していたが、オマリズマブ投与前の free IgE 値（pre-free IgE）と total IgE 値（pre-total IgE）とオマリズマブ治療効果の関連に関する解析に関して、症例数を増やして検討を行った。当該研究は、日本大学医学部附属板橋病院 臨床研究倫理審査委員会に臨床試験の申請をし、承諾を得た。図 1 のようにオマリズマブ 1 回目投与前に採血し、pre-free IgE と pre-total IgE を測定した。オマリズマブ 2 回目投与までの 4 週間の UAS7 の平均値とオマリズマブ投与 3 回目から 4 回目までの UAS7 の平均値を用いて治療効果を判定した。平均 UAS7 が 6 以下を responder, 6 より大きい場合を non-responder とし、responder と non-responder の 2 群間において pre-free IgE 値と pre-total IgE 値に有意差があるかどうか評価した。

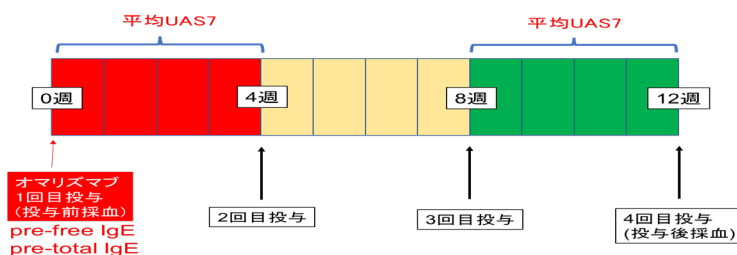


図 1. 臨床研究プロトコール

〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）〕

その結果、図2に示すように投与開始0～4週間後の平均UAS7で分類した responder と non-responder では pre-free IgE 値、pre-total IgE 値は有意差がなかった。

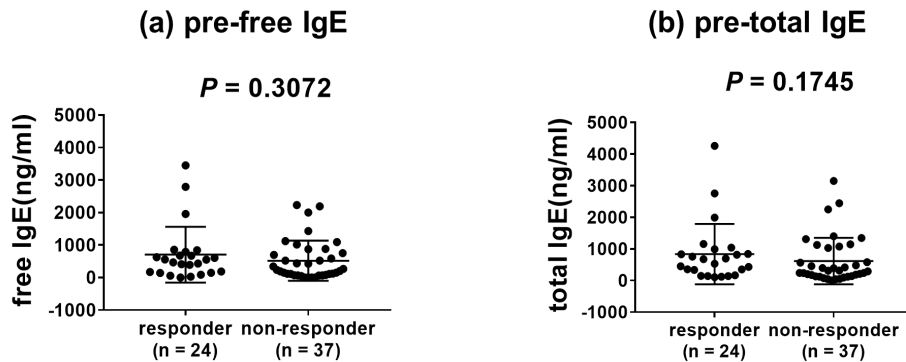


図2. オマリズマブ投与開始0～4週間後の平均UAS7で分類した responder と non-responder の2群間での pre-free IgE 値、pre-total IgE 値の有意差検定

次に図3に示すようにオマリズマブ投与開始8～12週間後の平均UAS7で分類した responder と non-responder の2群間での pre-free IgE 値、pre-total IgE 値の有意差検定を行った。

A)

B)

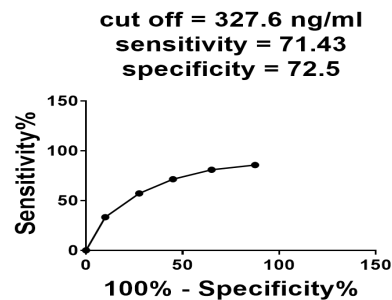
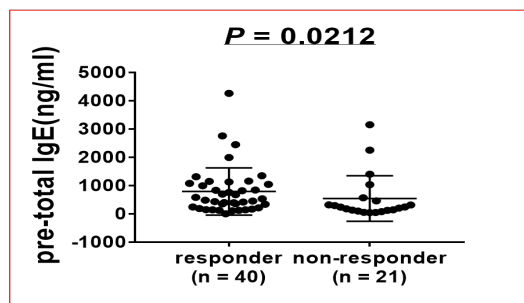
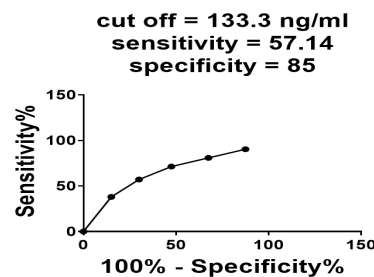
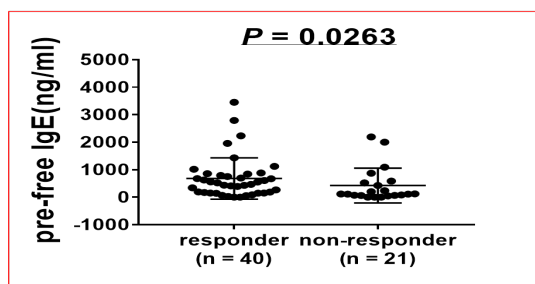


図3. オマリズマブ投与開始8～12週間後の平均UAS7で分類した responder と non-responder の2群間での pre-free IgE 値、pre-total IgE

値の有意差検定（それぞれAとC）およびそれぞれのカットオフ値、感度と特異度（それぞれBとD）

オマリズマブ投与開始8～12週間後の平均UAS7で分類した responder と non-responder の2群間での pre-free IgE 値、pre-total IgE 値は両者とも responder 群で有意に高かった。Pre-free IgE のカットオフ値は、133.3 ng/ml、感度は、57.1%、特異度は、85%であった。Pre-total IgE のカットオフ値は、327.6 ng/ml、感度は、71.4%、特異度は、72.5%であった。従って、慢性特発性蕁麻疹に対してオマリズマブの治療効果を判定する biomarker として pre-free IgE が pre-total IgE に勝るものではなかった。現在オマリズマブ投与3回目の際に採血し post-free IgE と post-total IgE を測定しオマリズマブの投与中の薬剤減量の目安となる biomarker となるかを検討中である。

### 7 学会発表等

当該年度における研究成果の発表状況（学会発表、成果物展示、プレス発表等）について記入してください。  
要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
岡山吉道	第 52 回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会	高親和 IgE 受容体、IgE とアレルゲンコンポーネント	2022. 6. 18
岡山吉道	第 71 回日本アレルギー学会学術大会	MRGPRX2 と慢性特発性蕁麻疹	2022. 10. 8
丹羽悠介、葉山惟大、清水佳祐、田杭真帆、伊東真奈、坂本朋美、豊島翔太、藤田秀樹、岡山吉道	第 71 回日本アレルギー学会学術大会	慢性特発性蕁麻疹 (CSU) 患者のオマリズマブ (Oma) 治療前後における血清中 free IgE と total IgE の臨床的意義	2022. 10. 9
清水佳祐、田杭真帆、豊島翔太、三木寿美、伊東真奈、葉山惟大、坂本朋美、藤田秀樹、照井正、武富芳隆、村上誠、岡山吉道	第 71 回日本アレルギー学会学術大会	アトピー性皮膚炎患者の血漿中 Resolvin D2 濃度の増加と病態への関与	2022. 10. 9
岡山吉道、黒澤雄介、豊島翔太、丸岡秀一郎、岡山吉道、權寧博	アレルギー・好酸球研究会 2022	プロエンケファリン代謝産物によるヒト 2 型自然リンパ球 (ILC2) の活性化機構	2022. 11. 3

### 8 著書・雑誌論文

当該年度における研究成果の発表状況（著書、雑誌等）について記入してください。  
著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Toyoshima S, Okayama Y	Allergol Int /Neuro-allergology: Mast cell-nerve cross-talk.	71: 288-293	2022年7月	Elsevier

9 本研究課題に関するその他の発表（新聞、一般雑誌掲載等）  
特になし。

10 その他の成果  
特になし。

### 11 本研究課題による知的財産権の出願・取得状況

名称	知的財産の種類	発明者 (考案者・創作者)	権利者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

## 1 2 今後の計画

実用化までの今後の計画について、当初計画からの変更点をふまえて記載してください。

第一段階の高感度 free IgE 測定系(コンパニオン診断薬)の確立に関して様々なアドバイスをしてくれた(株)シノテストが、実用化後のこのコンパニオン診断薬の市場が大きくなり、収益に見合わないという会社側の判断で商品化を断念した。Pre-free IgE は慢性特発性蕁麻疹に対するオマリズマブ治療の効果判定に有用であったが、pre-total IgE に勝るものではなかった。しかしながら、今後、post-free IgE が投与中の薬剤減量の目安となる biomarker となるかを検討し保険収載を目指していく予定である。

第二段階の free IgE 測定系のバリデーションの評価に関して

ヒト化抗 IgE 抗体 (オマリズマブ)は、血清中の IgE を捕獲し、さらにマスト細胞や好塩基球の高親和性 IgE 受容体 (Fc $\gamma$ RI)に結合した IgE をも解離させ捕獲することを機序とした抗体療法である。オマリズマブに結合していない free の IgE がアレルギー疾患の病態に関与しているため、理論的には、この free の IgE を 0 にすればよい訳である。しかしながら、慢性特発性蕁麻疹においてはオマリズマブ治療によって free IgE が 0 に近づいても治療効果がない群が存在し、その慢性特発性蕁麻疹患者群の病態には IgE が関与していないことが示唆された。

重症喘息においては、オマリズマブによる治療後の血清 free IgE 値が 25 ng/mL 以下になる群がオマリズマブの治療効果がみられる群であることを私達も確認している。今後重症喘息および慢性特発性蕁麻疹患者においてオマリズマブによる治療効果と治療後の血清 free IgE (post-free-IgE) 値との関係を明らかにすることによって重症喘息および慢性特発性蕁麻疹患者へのオマリズマブ投与量を減らすことができ、患者の負担額と副作用の頻度が減少できると思われる。

# 学術研究助成金〔社会実装研究〕実績報告書

令和 5 年 3 月 31 日

日本大学学長 殿

氏 名： 上田 賢志  
資格・所属： 生物資源科学部・教授  
実施研究所： 生物資源科学部・生命科学研究所

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

微生物酵素を活用した神経伝達物質の簡易定量キット
--------------------------

## 2 研究期間

令和 2 年度 ～ 令和 3 年度

※令和 2 年度 ～ 令和 4 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

## 3 研究組織

研究代表者及び研究分担者

	氏 名	部科校・資格	役 割 分 担
研 究 代 表 者	上田賢志	生物資源科学部・教授	研究総括・キット用途拡大のための酵素生産菌の探索と性状解析
研 究 分 担 者	西山辰也	生物資源科学部・助教	キットの最適化と用途拡大のための酵素の特性解析

連携組織

組 織 名	役 割 分 担
株式会社エンザイム・センサ 代表取締役 日下部 均 〒305-0047 茨城県つくば市千現 2-1-6 つくば研究支援センター	キットの商品化と事業展開

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 80 %】

#### 5 研究目的

研究の全体構想及びその中での本研究の具体的な目的について記述してください。

ヒトの神経伝達において信号物質として機能することが知られる  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) を簡易測定する酵素キットを開発し実用化することを目的とする。

グルタミン酸が興奮性の伝達物質であることに對し、その  $\alpha$ -カルボキシル基が取り除かれてできる GABA は、抑制性の伝達物質として機能する。抗不安、血圧低下、睡眠調節等、ヒトの精神状態の鎮静化・安定化に正に作用することから、GABA の血中濃度は躁病・うつ病等の精神疾患の指標として用いられる。また、最近では高 GABA 含量の食品はヒトの精神的安定に効果的とされ、注目を集めている。さらに、動物腸内に共生する細菌に GABA を生産するものが存在し、それが宿主動物におけるストレス耐性に関わっている可能性が指摘されはじめている。本研究では、様々な試料中の GABA 濃度を簡便に定量する汎用キットを開発することを通じて農産物をはじめ様々な試料中の GABA 含量が手軽に測定できる技術基盤を確立、新たな産業の創出を後押しする。

#### 6 当該年度の実施状況の概要

次の点について、具体的かつ明確に記述してください。

- ①当初の研究計画、具体的なマイルストーンに対する進捗状況
- ②進捗上の問題点と今後の対策

##### 1. キットの販売

本研究によって開発、完成した GABA 測定キットは、昨年度に (株) エンザイム・センサから「GABA ミエール」として販売を開始した。以来、トマトを対象にした測定の用途を中心に利用が拡大し、一般向けの販売が軌道に乗った。

また、本プロジェクトで開設した本学学内向けのウェブサイトを通して測定モニターの募集を行い、数件の応募を受け付けて実施した。測定した試料については信頼度の高い測定結果を得ることに成功した。GABA 量を増強した味噌については、当初味噌由来の色素によって測定が阻害される可能性が考えられたが、問題なく測定できることも判明し、用途の拡大に繋がった。

野菜以外の試料についても、液体クロマトグラフィーを用いた従来の測定法との比較を通じてキットによる測定の有効性を検証した。その結果、多くの試料については問題なく使用できることが判明した一方で、柑橘類では測定が阻害されるケースが散見され、阻害要因の特定とそれに対する対策をひきつづき検討する必要がある。

## 〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）〕

## 2. 他のアミノ酸の定量を可能にするトランスフェラーゼの探索と実用化

特異的に反応する酵素を用いることで GABA の定量法と同様の手段が他のアミノ酸についても適用できることから、特に定量法の確立に実効性が見込まれるアミノ酸数種について、ひきつづきそれらを基質とするトランスフェラーゼを生産する微生物の探索を実施した。昨年度精製に成功したフェニルアラニンに特異的に作用するトランスフェラーゼについて、そのアミノ酸配列と生産菌の全ゲノム情報をもとに遺伝子を同定することに成功した。

昨年度完成させ特許申請を行ったアスパラギンおよびアスパラギン酸の酵素定量キットについては、特許が承認され公開された。本キットについても野菜を主とする実サンプルを用いた測定試験を行い、従来法と比較してその精度を検証した。その結果、両キットに関しては発売を目前とした状況である。

本年度はアラニンアミノトランスフェラーゼを用いたアラニン定量を目指した。本酵素遺伝子は多くの生物が持つ。そこで、複数のアラニンアミノトランスフェラーゼ遺伝子を大腸菌で発現させ、キットに適した酵素遺伝子を得た。また、組換え酵素を用いてキット化にも着手した。

## 7 学会発表等

当該年度における研究成果の発表状況（学会発表、成果物展示、プレス発表等）について記入してください。要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
西山辰也, Woro Triarsi Sulistyaningdyah, 新館啓子, 上田賢志, 日下部均	日本農芸化学会関東支部 2020 年度大会	放線菌由来 GABA トランスアミナーゼ を利用した GABA 測定キットの開発	令和 2 年 11 月 29 日
西山辰也, Woro Triarsi Sulistyaningdyah, 新館啓子, 上田賢志, 日下部均	日本農芸化学会 2021 年度大会	アスパラギン酸トランスアミナーゼを利用したアスパラギン酸測定キットの開発	令和 3 年 3 月 19 日
西山 辰也, 宮本 宜英, 上田 賢志	2022 年度（第 36 回） 日本放線菌学会大会	フェニルアラニン定量系確立のためのアミノ基転移酵素の探索	令和 4 年 9 月 15 日
西山 辰也, 宮本 宜英, 上田 賢志	日本農芸化学会 2023 年度大会	L-フェニルアラニン定量系確立を目指したアミノ基転移酵素の探索	令和 5 年 3 月 15 日



## 8 著書・雑誌論文

当該年度における研究成果の発表状況（著書，雑誌等）について記入してください。  
著書，雑誌，抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
該当なし				

## 9 本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

配当無し

## 10 その他の成果

- 1) 7の1件目に挙げた日本農芸化学会大会における発表が、日本農芸化学会 2020 年度大会トピックス賞に選定された。

## 11 本研究課題による知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月 日	取得年月日
アミノ酸の測定方法、及びそのためのキット	特許	日下部 均、 ウォロ トリ アルシ ステ スティア ニ ンディア、 西山 辰也、 上田 賢志	日下部 均	特 許 第 6703721 号 (P6703721)	令和元年 10月1日	令和2年5月13日
L-アスパラギンの測定方法、及びそのためのキット	特許	日下部 均、 新館 啓子、 ウォロ トリ アルシ ステ スティア ニ ンディア、 西山 辰也、 上田 賢志	日下部 均	特 許 第 7046408 号 (P7046408)	令和4年 1月20日	令和4年4月4日

## 1 2 今後の計画

実用化までの今後の計画について、当初計画からの変更点をふまえて記載してください。

### 1. アスパラギン／アスパラギン酸測定キットの実用化

本年度に特許が成立したアスパラギン／アスパラギン酸測定キットについて、先行したGABA 測定キットと同様の実用化を目指し、実証実験と有効性の試験を継続する。特に安定試験を重ねることでキットとしての完成を目指し、販売を開始する。

### 2. アラニン測定キットの開発

本年度に遺伝子組換えに成功したアラニンアミノトランスフェラーゼを用いたアラニン測定キット開発について、精製酵素を用いて諸性質の解明を実施する。また、それらを用いたキット開発を目指す。

### 3. 他のアミノ酸測定キットの開発

上記のキットと同様の酵素反応の連携によるアミノ酸の簡易定量キットを開発する。これまでに実施してきたアミノトランスフェラーゼ生産菌のスクリーニングを継続し、基質特異性と安定性が高い酵素の生産菌取得を試みる。得られた生産菌とその酵素については、本研究で実施した通りの手順でその遺伝子を特定し、組み換え酵素の生産とそのキットへの適用性を精査する。有効性が確認されたものについては特許を取得すると同時に、その実用化に向けた試験と改良を重ねる。

### 4. その他の酵素センサーの開発

上記の一連のアミノ酸定量システムは、放線菌由来のグルタミン酸オキシダーゼに連携することで構築するものであるが、それ以外にも特に特定の化合物に対するオキシダーゼ活性を有する酵素をセンサーとして活用し、その検出・定量手法を確立することも目撃した探索研究を実施する。すでに本研究でも開始し、候補が見つかったいくつかの酵素についてはその精製と遺伝子の同定、組み換え体の作出を通じて特性を精査し、そのセンサーとしての利用に繋げる。

## 学術研究助成金〔社会実装研究〕実績報告書

令和 5年 5月 6日

日本大学学長 殿

氏 名： 松本 太郎  
所属・資格： 医学部・教授  
実施研究所： 医学部・総合医学研究所

下記のとおり報告いたします。

### 1 研究課題

脱分化脂肪細胞調製キットの開発
-----------------

### 2 研究期間

令和 3 年度 ～ 令和 4 年度  
※令和 3 年度 ～ 令和 5 年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

### 3 研究組織

研究代表者及び研究分担者

	氏 名	部科校・資格	役 割 分 担
研 究 代 表 者	松本 太郎	医学部・教授	研究の総括・キットの最適化
研 究 分 担 者	副島 一孝	医学部・教授	キットの性能評価に関する脂肪組織の採取
	樫村 勉	医学部・准教授	キットの性能評価に関する脂肪組織の採取
	李 予昕	医学部・准教授	キットの性能評価に関する品質管理試験・非臨床有効性試験
	風間 智彦	医学部・助教	キットの最適化、キットの性能評価に関する細胞製造・非臨床有効性試験

連携組織

組 織 名	役 割 分 担
株式会社サンプラテック	DFAT 調製キットの製造担当
日水製薬株式会社	DFAT 基礎培地の製造担当

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。

#### 4 現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として、以下の区分より自己評価を行ってください。  
<区分>①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分： ②】・【達成度： 80 %】

令和 4 年度に予定されていた研究計画の内、「DFAT 調製キットを用いた最終製品の製造」および「PMDA 相談」についてはほぼ計画通りに実施された。「最終製品の非臨床安全性試験」、「最終製品の非臨床有効性試験」については、国際情勢変化に伴う長期的な物流の停滞の影響を受け、未実施項目が残ったが、特例措置による研究期間延長が認められたため、実施予定の研究計画は完遂できる予定である。以上より、②概ね順調に進展している（達成度 80%）と自己評価した。

#### 5 研究目的

研究の全体構想及びその中での本研究の具体的な目的について記述してください。

再生医療によく用いられる間葉系幹細胞 Mesenchymal stem cell (MSC)は患者自身の体から調製できるが、患者の年齢や病状により細胞の品質にばらつきが生じやすいといった問題点がある。MSC による細胞治療を普及させるためには、簡便・安価に大量調製可能で、患者を選ばず均質で安定した性能を示す MSC 製造技術の確立が望まれる。脱分化脂肪細胞 Dedifferentiated fat cell (DFAT)は、成熟脂肪細胞を「天井培養」という方法で培養して作られる MSC に類似した多能性細胞である。DFAT は少量の脂肪組織から均質な治療用細胞を大量に作ることができることから、低コストで実用性の高い再生医療の細胞源として期待できる。研究代表者らは、日本大学医学部リサーチセンター細胞加工施設(CPF)において臨床グレードの DFAT 製造法を確立し、重症下肢虚血患者を対象とした自家 DFAT を用いた血管再生細胞治療の臨床研究を実施中である。またより簡便・効率的に DFAT 調製を可能とする「天井培養フラスコ」を開発し、製品化するに至っている。さらにこの天井培養フラスコを主要構成パーツとし、高効率で安価に DFAT を製造できる「DFAT 調製キット」の開発に着手している。

本研究の目的は、この DFAT 調製キットの最適化を行い、最も効率良く安定的に DFAT を製造できる調製キットを完成させる。そして、この調製キットを用いて製造した DFAT の規格試験や非臨床試験を行い、品質や性能が担保された DFAT が再現性よく調製できることを確認する。これらの研究を通じて本調製キットにて製造した DFAT の品質、安全性、有効性が治験水準に到達していることを確認し、最終的に企業への導出を目指す。本調製キットを完成させ社会実装させることにより、均質で安定した性能を示す臨床グレード DFAT を一般の細胞加工施設でも簡便に製造できるようになる。将来的には現在先行している MSC を用いた細胞治療の大部分をより安全・安価なものとして普遍的に発展させる可能性がある。

#### 6 当該年度の実施状況の概要

次の点について、具体的かつ明確に記述してください。

- ①当初の研究計画、具体的なマイルストーンに対する進捗状況
- ②進捗上の問題点と今後の対策

##### ①当初の研究計画、具体的なマイルストーンに対する進捗状況

令和 4 年度は、(1) DFAT 調製キットを用いた最終製品の製造、(2) 最終製品の非臨床安全性試験、(3) 最終製品の非臨床有効性試験、(4) PMDA 相談の 4 項目を実施した。

##### (1) DFAT 調製キットを用いた最終製品の製造

マイルストーン: 10 症例から調製した最終製品の規格試験を完了する。(達成時期: 2022 年 10 月)

## 〔6 当該年度の実施状況の概要（つづき）〕

本年度は DFAT 調製キットを用いて、計 7 症例の脂肪組織から最終製品の試験製造(コールドラン)を行った。その結果、すべての症例で工程内管理試験および規格試験の基準値から逸脱することなく最小単位(8 バッグ)を上回る 10 バッグ以上の最終製品を製造することができた。また凍結保存した最終製品の一部を溶解し、規格試験を行った結果、生細胞数、生細胞率、細胞純度といったパラメーターが最終製品の規格に適合していることを確認した。また昨年度 NUBIC を通じて特許出願を行ったゼノフリー培地（ヒト脱分化脂肪細胞の製造方法及びヒト成熟脂肪細胞からヒト脱分化脂肪細胞を製造するための培地、特願 2020-052876）に関して、PCT 出願を目指して、JST の各国移行出願費用支援に応募した結果、2023 年 1 月に採択されるに至った。そしてこの培地を含む DFAT 調製キットを用いて再現性良く DFAT が製造できることを示した実施例のデータを追加した上で、2023 年 3 月に PCT 出願(PCT/JP2023/012925)を完了した。以上より本年度のマイルストーンはほぼ達成されたと思われる。

## (2) 最終製品の非臨床安全性試験

マイルストーン：最終製品の非臨床安全性試験を完了する。(達成時期: 2023 年 3 月)

DFAT 調製キットを用いて製造した最終製品の非臨床安全性試験として予定している核型解析試験および軟寒天コロニー形成試験について、実施試験機関との契約、試験プロトコルの決定、被験サンプルの調製を完了した。これらの試験に関しては本部助成金の経費執行に係る特例措置が承認され研究期間が 1 年間延長となったため、令和 5 年度に実施する予定である。

## (3) 最終製品の非臨床有効性試験

マイルストーン：最終製品の非臨床有効性試験を完了する。(達成時期: 2023 年 3 月)

最終製品の非臨床有効性試験として免疫不全マウス下肢虚血モデルに対する筋肉内投与試験および免疫不全ラット変形性膝関節症モデルに対する関節内投与試験を予定していたが、必要試薬等の供給遅延により本年度内の実施に至らなかった。これらの試験に関しては特例措置が承認され研究期間が 1 年間延長となったため、令和 5 年度に実施する予定である。

## (4) PMDA 相談

マイルストーン：PMDA 相談に必要な書類を作成し事前面談を実施する。(達成時期:2023 年 3 月)

DFAT 調整キットを用いて製造した最終製品の特性解析、長期保存試験、凍結融解後の安定性試験などのデータをまとめ、PMDA 相談資料を作成した。そして 2023 年 3 月 28 日に PMDA RS 戦略相談事前面談を実施した。この事前面談を通じて、治験用 DFAT 製品の品質および安全性に係る合意取得に向けて各種留意事項が伝達され、対面助言に向けた要点整理をすることができた。以上より、本年度のマイルストーンは予定通り達成された。

## ②進捗上の問題点と今後の対策

令和 4 年度は、新型コロナウイルス感染症流行やウクライナ戦争に伴う長期的な物流の停滞により、研究に用いる試薬や資材の供給に遅延が生じた。このため、本年度に予定していた最終製品の非臨床安全性試験や非臨床有効性試験の一部に遅延が生じた。2022 年 12 月に特例措置の申請を行った結果、1 年間の研究期間延長が認められた。実験計画書作成等の準備はほぼ完了しており、この延長期間内に実施予定の研究計画はすべて実施できる予定である。

## 7 学会発表等

当該年度における研究成果の発表状況（学会発表，成果物展示，プレス発表等）について記入してください。  
要旨集の抜き刷り，発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会，発表会名等	発表テーマ	発表年月
秋田大輔， <u>風間智彦</u> ， <u>松本太郎</u> ，他	第 43 回日本炎症・再生医学会	頬脂肪体由来脱分化脂肪細胞の自家移植による歯周組織再生の非臨床試験	2022 年 7 月
<u>風間智彦</u> ， <u>松本太郎</u> ，他	第 43 回日本炎症・再生医学会	骨髄由来脱分化脂肪細胞(DFAT)は骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)に類似した高い骨分可能と骨再生能を示す	2022 年 7 月
長岡悠紀， <u>松本太郎</u> ， <u>風間智彦</u> ，他	第 43 回日本炎症・再生医学会	膝蓋下脂肪体に由来する脱分化脂肪細胞(DFAT)の特性および機能解析	2022 年 7 月
<u>松本太郎</u>	第 7 回 Nephrology Expert Conference	脱分化脂肪細胞が拓く未来の再生医療	2022 年 7 月
<u>松本太郎</u> ， <u>風間智彦</u> ， <u>李予昕</u> ， <u>檜村勉</u> ， <u>副島一孝</u> ，他	第 54 回日本動脈硬化学会総会・学術集会	重症下肢虚血を対象とした脱分化脂肪細胞移植による血管再生細胞治療	2022 年 7 月
<u>松本太郎</u>	BioJapan/再生医療 Japan2022	脱分化脂肪細胞による低コスト・低侵襲細胞治療	2022 年 10 月
<u>松本太郎</u>	第 45 回 Tonomachi Cafe	細胞製造技術が拓く再生医療の最前線 脱分化脂肪細胞による再生医療の実用化	2022 年 12 月

## 8 著書・雑誌論文

当該年度における研究成果の発表状況（著書，雑誌等）について記入してください。  
著書，雑誌，抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Murata Y, <u>Matsumoto T</u> , et al.	International Urology and Nephrology/Urethral injection of dedifferentiated fat cells ameliorates sphincter damage and voiding dysfunction in a rat model of persistence stress urinary incontinence.	54 巻・4 号	2022 年 4 月	Springer
Utsumoniya K, <u>Matsumoto T</u> , et al.	Stem Cell Research & Therapy/ Implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated antineutrophil	13 巻・1 号	2022 年 7 月	BMC

	cytoplasmic antibody glomerulonephritis by immunosuppression and increases in tumor necrosis factor-stimulated gene-6.			
小山公行, 風間智彦, 松本太郎, 他	日大医学雑誌/椎間板針穿刺による椎間板変性ラットに対する脱分化脂肪細胞静脈内投与の治療効果.	81 巻・5 号	2022 年 10 月	日本大学医学会
Hidaka A, Kazama T, Matsumoto T, et al.	Pediatric Surgery International/ Effects of dedifferentiated fat cells on neurogenic differentiation and cell proliferation in neuroblastoma cells.	39 巻・1 号	2022 年 12 月	Springer
Sawada H, Kazama T, Matsumoto T, et al.	Journal of Orthopaedic Surgery and Research/ Bone marrow-derived dedifferentiated fat cells exhibit similar phenotype as bone marrow mesenchymal stem cells with high osteogenic differentiation and bone regeneration ability.	18 巻・1 号	2023 年・ 1 月	BMC

9 本研究課題に関するその他の発表（新聞，一般雑誌掲載等）

松本太郎：第 45 回 Tonomachi Café ～細胞製造技術が拓く再生医療の最前線～  
KingSkyFront Lifescience Portal （2022 年 12 月, YouTube 動画配信  
<https://www.youtube.com/watch?v=31mvrtFqOX8>）

10 その他の成果

松本太郎：2022 年度 Kawasaki-NEDO Innovation Center Startup Hands on Program 採択（事業プラン名 DFAT 細胞医薬品開発・製造受託事業）

松本太郎：第 4 期日本大学理事長・学長特別研究 採択（2022～2024 年度 研究課題名：日本大学発技術を用いた再生・細胞治療の実用化に向けた学部横断的研究）

### 1 1 本研究課題による知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年 月日	取得年 月日
ヒト脱分化脂肪細胞の製造方法及びヒト成熟脂肪細胞からヒト脱分化脂肪細胞を製造するための培地	特許権	松本太郎 風間智彦 長岡悠紀	日本大学	PCT/JP2023/012925	令和 5 年 3 月 29 日	

### 1 2 今後の計画

実用化までの今後の計画について、当初計画からの変更点をふまえて記載してください。

本年度実施した PMDA 相談にて、本調製キットにて製造した DFAT の品質、安全性、有効性に関する機構との合意取得に向けて必要な試験データが明確になった。例えば長期保存試験におけるデータに関しては、品質の安定性の確認に加え、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験のデータも必要であることが示された。今後、このような追加実施が必要な試験項目について着実にデータを取得し、治験実施承認につなげていく予定である。

また本研究の社会実装を加速するためには、本調製キットを用いて自施設のみならず、一般の細胞培養加工施設でも安定した性能を示す臨床グレード DFAT を製造できるようにする必要がある。これに関しては、細胞加工受託を行う CDMO 企業と秘密保持契約を締結し、本調製キットを使った臨床グレード DFAT の試験製造を開始している。現在、安全キャビネットを用いた DFAT の製造標準手順がほぼ確立しており、今後、製造工程におけるリスクマネジメント評価やプロセスシミュレーションテストを行う予定である。さらにより高品質な DFAT 製造を行うために、GCTP に対応可能な自動培養装置を開発する企業と共同研究契約を締結し、DFAT 製造工程の自動化システムの共同開発を行っていく予定である。

また DFAT 細胞医薬品を社会実装するためには、多額の研究資金の確保が必要となるため、NUBIC とも協調し、DFAT 細胞医薬品開発を行う大学発ベンチャーの設立に向けた準備、細胞医薬品開発を共同で行う再生医療関連企業やファウンダーであるベンチャーキャピタルとのマッチングを引き続き行っていく。