平成２７年度

再生医療の産業化に向けた評価基盤技術事業

（再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発）

事業報告書

事　業　名	再生医療の産業化に向けた評価基盤技術事業 （再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発）
研究開発課題名	パーキンソン病に対する機能再生療法に用いる iPS 細胞由来神経細胞製剤の開発
研究開発担当者 所属 役職 氏名	大日本住友製薬株式会社 執行役員　再生・細胞医薬事業推進室担当　木村　徹

目次

1. 事業の目的 2
パーキンソン病に対する再生医療 2
iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞の製造方法 2
本事業にて実施する研究開発の概要 3
2. 実施内容及び結果 6
3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容 9
① 自動培養装置の導入に伴う加工プロセスの改良時の妥当性評価 9
② 抗体でのセルソーティングプロセスの評価手法の開発 19
③ 凍結保存法の評価手法の開発 35
④ 非臨床有効性と安全性についての予備検討と理論構築 43
4. まとめ 47
参考文献 50

1. 事業の目的

パーキンソン病に対する再生医療

パーキンソン病(以下 PD)は、平成 26 年度の厚生労働省の統計では国内での患者数は約 16.3 万人と運動障害をきたす神経変性疾患として最も患者数の多い疾患である。また、平成 25 年度の厚生労働省の統計において、要介護になった主な原因では、PD が 4.2%を占め(第 6 位。単独の疾患としては最多)、特に生活全般において全面的介助が必要な要介護 5 のカテゴリーでは 7.3%(第 5 位)を占めており、社会的・経済的損失の大きな疾患の一つである。社会の高齢化に伴って患者数は増加を続けており、米国では 150 万人、世界中では推定 1 千万人の患者がいると言われており、画期的な治療薬の開発が望まれている。中核となる運動症状は、中脳黒質のドパミン神経が変性、脱落することに伴って出現する。現在のところ、薬剤による治療が標準的であるが、罹病期間の長期化に伴い患者中のドパミン神経の数は減少していき、投与量の増量が必要となり最終的には、有効性の減弱、ジスキネジアなど副作用の増強やオフ時間の増加が認められる。外科治療としては、脳内に電極を埋め込み電気刺激を与える脳深部刺激療法があり、追加の治療オプションとして用いられているが、施術数も限られておりあくまでも対症療法である。一方で、病態生理が比較的単純であるため、細胞移植によるドパミン神経の補充療法にも古くから期待が寄せられており、1980 年代より、ドパミン細胞を含む胎児脳組織由来神経細胞を用いた臨床研究が欧米を中心に、現在までに約 400 例程度実施されてきた。当初より、オープンラベル試験での著効例や症状の軽い症例での有効性が確認され、さらに近年になって当時の症例の病理組織学的検査や PET 等による高感度検査法を利用した長期経過報告がなされるようになり、移植後 20 年以上も移植片が患者脳内に生存して機能し、適切に適応を選べば細胞移植治療が有効であるという Proof of Concept が確立しつつある[1-4]。しかしながら、移植材料細胞の調製過程を考慮すると、胎児由来細胞では、妊娠11週以前という限られた時期の中絶胎児を10体近く準備しなければいけないという倫理面、供給面での大きな課題があり、さらにこれらの原材料を使用する限りドナー細胞の均質性や品質を統一的に一定に保つことは事実上困難であるため、当該治療法は概念実証段階にとどまっている。特に、移植によって誘発される副作用である不随意運動は、移植細胞内に混入した目的外細胞であるセロトニンニューロンが関与しているといわれており、大きな課題となっている。胎児由来細胞以外には、ヒト ES 細胞の利用も検討されているが、倫理面や供給面の課題を完全に解決させるには至らない。一方で、ヒト ES 細胞を用いたこれまでの研究によって、iPS 細胞などの多能性幹細胞からのドパミン神経への分化誘導方法の開発やヒト神経発生に関する知見が蓄積し、現在の再生医療への道が拓かれたとも言える。

iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞の製造方法

これらさまざまな原材料細胞の課題を解決し、細胞移植による治療法を現実のものとするため、事業実施分担者の京都大学(京大)高橋らは、神経細胞に親和性の高い合成基質上での「高密度培養」、中脳 floor plate マーカーの発現量を指標にした「セルソーティング」技術を組み合わせることで、iPS 細胞から高効率かつ極めて高純度にドパミン神経前駆細胞を製造する画期的な方法の開発に成功している(図 1)。本課題で対象となるドパミン神経前駆細胞は、下記のような 4 つの製造プロセスで製造される[5](図 2)。

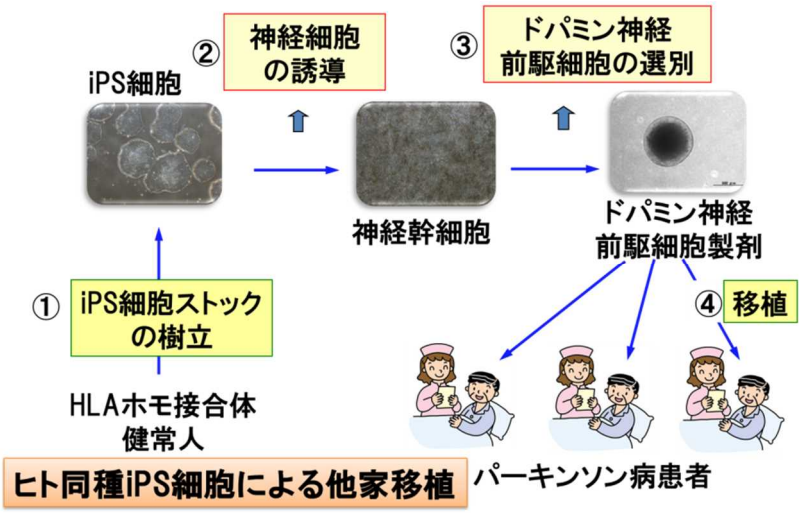


図１　本製品のコンセプト

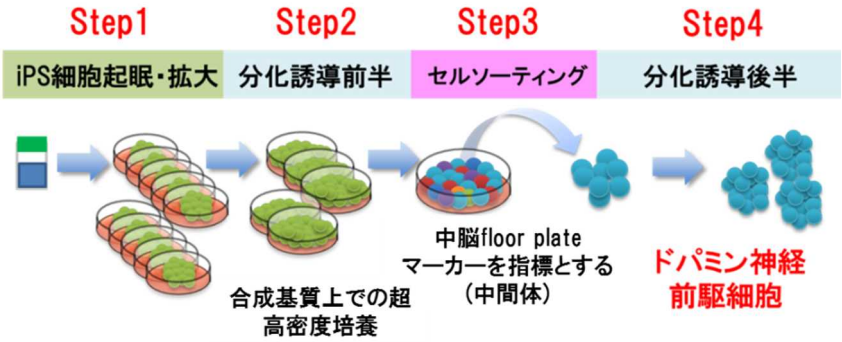


図２　本製品の製造プロセス

- Step1（iPS 細胞の起眠・拡大）: iPS 細胞を起眠し、フィーダーフリー培養にて大量に調製する。
- Step2（分化誘導前半）: iPS 細胞を回収して播種し、合成基質上への接着状態で高密度に約 12 日間培養する。
- Step3（セルソーティング）: Step2 で培養した細胞を回収し、細胞表面に発現している中脳 floor plate マーカーを指標にセルソーターで陽性細胞を回収、濃縮する（中間体）。
- Step4（分化誘導後半）:分取した細胞を細胞塊として約 16 日間（day28 頃まで）培養する。

研究開発代表者（大日本住友製薬株式会社）は、研究開発分担者らが実施中の再生医療実現拠点ネットワークプログラム拠点 A や本委託事業の研究開発成果等を発展させ、医薬品医療機器等法に基づいた、「ヒト同種 iPS 細胞由来のドパミン神経前駆細胞（以下本製品とも記載）を用いたパーキンソン病治療」の産業化を目指している。

本事業にて実施する研究開発の概要

前述のとおり、本製品の製造方法は既に確立済みであるが、治験以降の開発段階における製造を考えた場合、PD の対象患者数を考えると現行の製造方法ではロットサイズが不十分であることが明確である（図 3）。現状では、Step3 のセルソーティングプロセスが製造のボトルネックとなっており、1 ロットで

1 人分しか製造することが出来ず、最終製品を保存する手法も未開発である。また、仮にロットサイズを現行法のまま拡大した場合、必要となる培養プレート数が増え、長時間作業により品質面等でのリスクが上昇してしまう。現行法では、熟練した研究員の手作業で実施されるため個々の製品は高品質となるが、GMP 製造という工業的観点からは、高コスト、低生産性、低品質安定性、とも表現できる。

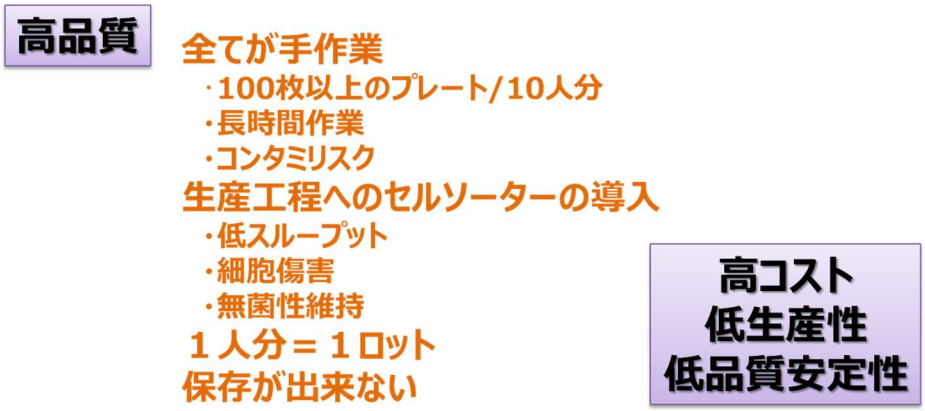


図 3　現行の製造方法の課題

従って、産業化の成功には種々の製造プロセス合理化が必須な状況である。具体的な目標としては、品質を損なわずに、ロットサイズを 10 倍以上とし、自動化による人件費削減、凍結による長期保存を実現させたいと考え、各プロセスの改良を実施中である。その際には、現行手法との同等性評価手法開発、基準値の設定や各種変更に伴うリスク評価のための基礎データの取得が必要となる(図 4)。

そこで、平成２７年度の本研究開発事業においては、製造プロセスを医薬品医療機器等法などの各種規制に準拠させ、また低コストで再現性の良い、GMP 準拠での製造に相応しい生産体制を確立するために必須となる、①自動培養装置の導入に伴う加工プロセスの改良時の妥当性評価、②抗体でのセルソーティングプロセスの評価手法の開発、③凍結保存法の評価手法の開発を計画した。さらに、これらの変更に伴う現行法との同等性評価手法を確立するための基礎データ取得を目的として④非臨床有効性と安全性についての予備検討と理論構築、の計 4 課題を設定し、実施した。

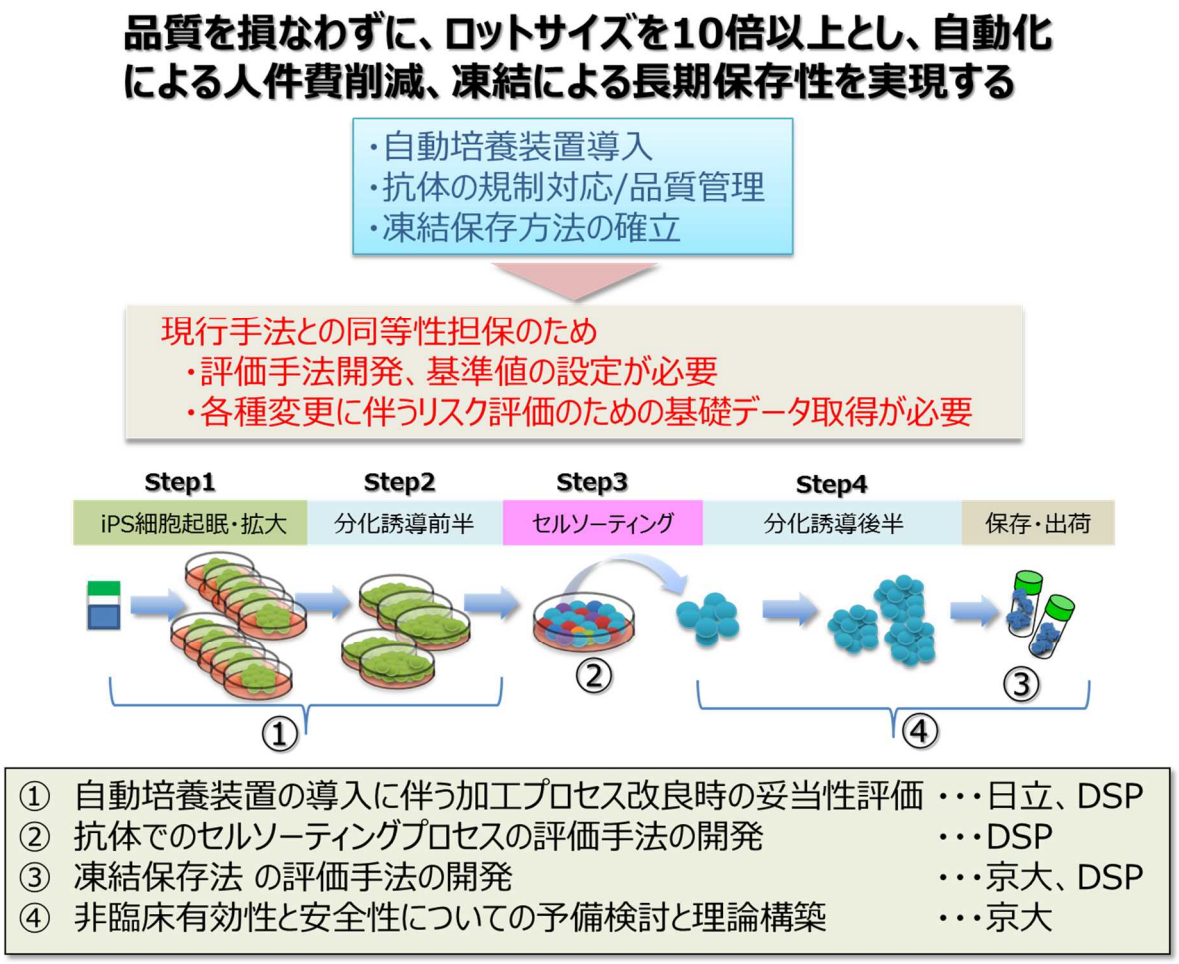


図 4 本事業の目的及び、設定した課題と製造プロセスの対応

2. 実施内容及び結果

本研究開発事業では、これまでに延べた製造に関する諸問題を解決し、低コストで再現性の良い GMP 製造に相応しい生産体制を確立するために必須となる、既存の培養方法との同等性を担保するための検証方法や基準値の設定を目的として下記の内容を計画、実施した。

研究開発の実施項目と内容

① 自動培養装置の導入に伴う加工プロセスの改良時の妥当性評価

患者由来 iPS 細胞を用いた自家細胞による再生医療のように、一種類の原材料 iPS 細胞から一人分の投与をまかなうというものであれば、コストを度外視し手作業で十分に供給可能である。一方で、他家移植における治験や保険診療として承認後の商用製造を想定した場合、ロットサイズ拡大は不可欠である。一方で、GMP に準拠した製造が求められるため、作業時間の増加による汚染リスクや細胞ダメージの増加、細胞播種・回収等の作業毎のバラつき、最終製品の品質への影響等を低減する必要がある。そこで、ロットサイズ拡大と品質の向上を両立すべく、閉鎖系大面積プレートを利用した自動培養装置の導入を検討している。本事業では、自動培養装置の導入に伴い、現行の手培養からプロセスが変更となる点について検討し、検証すべき要素を抽出する。特に、培養プレートについての「培養容器の変更」及び送液・送気方法などの「培養プロトコール」の変更について、既存の手培養との同等性を担保する品質評価手法を開発し、自動化に向けたプロセス導入の妥当性を評価する。

② 抗体でのセルソーティングプロセスの評価手法の開発

本製品の製造工程(Step3)にはセルソーターによる細胞選別工程が含まれており、当該工程では目的細胞表面に発現する中脳 floor plate マーカーを特異的に認識する抗体を蛍光標識したものを使用する。この抗体を産生する組み換え細胞は既に樹立済みであり、研究用途での抗体製造に既に利用しているが、治験以降の開発段階における抗体製造時の製造管理及び生物由来原料基準などへの規制対応、また出荷試験等の製造バッチごとの性能評価を定量的に実施する手法は確立できていない。GMP に準拠して本製品を商用製造する際は、規格をクリアした原材料による繰り返しの製造が発生するため、各種培養試薬と同様に細胞選別用抗体にも合理的な出荷判定基準が必要となる。そこで、抗体あるいは標識抗体について物理化学的あるいは生化学的な指標により一定の品質を確保できるような評価手法を開発する。また、現行の Step3 で使用しているセルソーターは、商用製造を想定した場合本製品の製造にはスループットが低く、ボトルネックとなっている。そこで、現存機種を網羅的に調査し、処理速度、回収率や処理時の細胞ダメージ等を踏まえ、本製品の GMP 準拠下での製造における使用可能性を検討し、将来的な導入戦略を検討する。

③ 凍結保存法の評価手法の開発

再生医療等製品の出荷形態としては、出荷前に全ての試験を終え、”off the shelf”で安定供給が出来るような形態が理想である。また、事業展開や品質面、製造施設や病院での管理等運用面を考慮すると、細胞移植までの時間や準備を標準化し易い凍結保存状態での出荷が望ましいことから、本製品に対する凍結保存プロセスへの導入を検討している。凍結保存プロセスが導入できれば、ロットサイズ拡大と相乗効果を引き起こし、また製品の輸送も容易となり大幅なコストダウンかつ安定供給が達成できる。

しかしながら、本製品のような三次元構造を保持した神経細胞に対して、細胞凍結プロセスが品質に与える影響を評価する有効な手法は存在しない。神経細胞への凍結保存プロセス導入については、細胞の生存率のみだけでなく、移植後の生着能力、周辺の細胞とのネットワーク構築などの神経機能の保持を総合的に評価するために動物への移植検討が不可欠である。一方で、有効な凍結法探索のための動物への移植は、労力、時間の点から制約が大きいことが問題となる。そこで、種々の条件にて作製した凍結細胞の in vitro 評価結果を動物への移植データと比較し、神経細胞に特異的で高精度な凍結保存プロセスの評価手法を開発する。また、細胞の凍結プロセスに用いる凍結保護剤については、工程由来不純物としての取り扱いが予想されることから、その洗浄の必要性や医薬品の残留溶媒ガイドライン上の取り扱いについて検討する。

④　非臨床有効性と安全性についての予備検討と理論構築

iPS 細胞由来の再生医療等製品特有の課題として、株間での差や、分化誘導の過程中に生じる品質や有効性、安全性に対するバラつきがある。本製品の製造プロトコールは再現性が高いため、iPS 細胞の株が異なっていても、品質や有効性、安全性に影響を与えるほどの大きなバラつきを生じないことは、これまでの検討によって既に明らかにされている。また、本製品の原材料 iPS 細胞は 1 種類であるため、バラつきは比較的小さいことも予想される。しかしながら、ロットサイズが比較的小さい本製品は、頻繁な繰り返し製造が想定されることから、ロット毎の製造管理を目的として製造毎のバラつきの把握が必須であり、出荷される最終製品については GMP での製造管理としてこのバラつき幅以上の品質面、安全性面での担保が必要となる。また、種々の製造プロセス改良時の同等性を証明し、できる限りロットサイズを拡大できるような理論構築も必要である。そこで、治験製品の製造や商用製造で使用されるような臨床株同等株を用いてドパミン神経前駆細胞を製造し、ロット毎のバラつきや品質の差異を評価する手法を開発する。

研究開発の実施方法および結果

①　自動培養装置の導入に伴う加工プロセスの改良時の妥当性評価

大量製造に向けた閉鎖系大面積プレートによる自動培養装置の導入に伴い、現行の手培養からプロセスが変更となる点について検討し、検証すべき要素を抽出した。検証すべき要素は大まかに「培養容器の変更」と「培養プロトコールの変更」に分けられた。「培養容器の変更」については、培養面積が 50 倍以上に大型化した培養面の歪みや傾斜が培養に与える影響を検証してその許容範囲を設定した。また、このような大面積容器に細胞を均一播種するために、細胞の容器導入後の攪拌のための揺動方法を検討し、播種後の容器内の細胞分布を評価することで均一播種の手法を決定した。「培養プロトコールの変更」は閉鎖系流路導入に伴い、チューブやポンプを通して細胞懸濁液を容器に送ることにより細胞に与えるダメージ、閉鎖系容器へチューブから 5%CO_2 の混合ガスを送気する培養方法が与える影響について検証し、いずれも通常の培養と大きな差は検出されず細胞の性質は変わらないことを明らかとした。最終的に自動培養装置を想定した培養を実施してドパミン神経前駆細胞を製造し、細胞の品質を網羅的遺伝子解析によって評価した。この結果、現行法と同等の品質を持つことを確認し、閉鎖系自動培養装置導入の妥当性を検証した。

② 抗体でのセルソーティングプロセスの評価手法の開発

再生医療等製品の製造に用いる抗体に関して、抗体医薬品を参考に製造管理戦略及びガイドラインに基づくウイルス安全性戦略を構築した。また、抗体の物理化学的な特性を基に品質管理項目と試験法を設定し、出荷試験や実施中の安定性試験結果を踏まえ各管理項目と基準値を設定した。さらに、抗原抗体反応に基づいた生化学的な指標により、抗体力価の評価手法を開発した。具体的には、抗原配列由来の合成ペプチドを用いたELISAによる評価手法を開発し、実用的な抗体濃度範囲で良好な反応曲線が得られることを確認した。また、機能評価用の抗原強制発現細胞を作製して使用条件を検討し、最適な条件を決定した。抗原強制発現細胞を用いて、ロット間の力価比較を実施し、ロット間の力価差を検出できる高い感度を持つ評価手法を開発した。さらに、二次抗体を使用することで、標識抗体中の蛍光標識率測定法の原型を開発した。開発した評価手法は、本製品のGMP製造に向けた抗体の製造ごとあるいは本製品製造時の日常的な抗体の品質評価や安定性評価等に活用できる。

セルソーターに関しては、現存機種を網羅的に調査し、処理速度、回収率や処理時の細胞ダメージ等を踏まえ、GMP準拠での使用可能性を考察した。

③ 凍結保存法の評価手法の開発

市販の凍結試薬を用いて、種々の凍結条件にて作製した凍結細胞の in vitro 評価結果を動物への移植データと比較し、一般的に用いられる生存率評価やアポトーシス評価が、神経細胞塊の凍結感受性への感度が低いこと、移植後の挙動と相関が低いことを見出した。さらに、in vivo への移植結果と相関性が高い神経機能評価系として神経突起伸長評価法を確立し、また細胞単位の指標としては、正常細胞数のカウントが最も高感度であることを見出した。以上の結果をもとに、神経細胞に特異的で高精度な凍結保存プロセス評価手法を開発した。さらに、構築した評価系で低分子の評価を行った結果、in vivo 移植時の効果向上が期待できるような、in vitroでの生存率の向上や突起伸長の亢進を示した。最後に、凍結保護剤の残留について医薬品の残留溶媒のガイドラインに基づき考察した。

④ 非臨床有効性と安全性についての予備検討と理論構築

商用製造段階に起こり得る連続製造時のバラつきを把握し許容範囲を設定することを目指し、臨床使用株と製法が同一でドナーの異なるiPS細胞を原料としてドパミン神経前駆細胞を製造し、暫定的に設定済の in vitro 品質評価項目の解析、形態解析及び網羅的遺伝子発現解析等を実施し、in vitro にて多数のデータを取得した。この結果、有効性や安全性などに関連する可能性のある品質パラメーターや、最終製品の形態や主要遺伝子の発現量等は継代数によらず安定していることを明らかとした。またこの過程で使用した in vitro 評価指標、形態情報や分子生物学的指標を用いて、GMP準拠下での製造毎の逸脱管理やロット管理戦略の理論構築に実用的に活用できる評価手法を開発した。再生医療等製品の場合は、通常の化学合成品とは異なり、機器分析等による製品の単一規格化は不可能である。分子生物学的手法や生化学的手法を駆使して製品の評価手法とすることで、其々の細胞の真の状態を理解することが可能となり、ロット毎のバラつきや品質の差異を検出することまでもが可能であることを示した。

3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

① 自動培養装置の導入に伴う加工プロセスの改良時の妥当性評価

＜諸言＞

再生医療等製品の製造コストの中で占有率が高いものの一つとして、ロットごとに必須な出荷判定試験である品質評価試験や汚染検査が挙げられる。根本的な解決法はロットサイズを大きくすることである。ロットサイズを大きくするためには、原料となる分化誘導前の未分化細胞をばらつき無く大量に調製することが最初の課題である。しかしながら、例えば 1 ロットを患者 10 人分として製造を計画した場合、現行の手培養では Step1, 2 でのべ 100 枚近くのプレートが必要となる。作業時間の増加による汚染リスクや細胞ダメージの増加、細胞播種・回収等の作業毎のバラつきが懸念され、GMP に準拠した製造管理としては不十分である。この相反する課題を解決するために、Step1, 2 の工程を、実験用器材を用いた手培養から、大面積プレートを用いた閉鎖系の自動培養へと変更することを目指している。閉鎖系の培養容器、流路を備えることにより汚染リスクを解消し、またバラつきを小さく留め、品質を安定させることが出来る。そこで本事業においては、上記のような装置化を想定したときのプロセス変更点を抽出し、培養容器の変更や送液・送気方法の変更について細胞の品質評価手法を開発し、自動化プロセス導入の妥当性を検証した。

培養容器の変更に関する検討

・培養面積変更の予備検討

ロットサイズを大きくするために、通常手培養で用いられる 6 well プレートより、培養面積が大きい容器での培養を検討する必要がある。まず、T-225 フラスコ(培養面積 225 cm^2)にて iPS 細胞の培養と分化誘導前半工程、およびそれに先立つコーティングの予備検討を行った。培養後、容器内の 6 箇所の細胞の様子を観察したところ、いずれの培養工程においても、コーティングむらに起因する細胞密度のむらは観察されなかった。また細胞の形状についても 6 well プレート同様であった。さらに、Step2 終了時の細胞の中脳 floor plate マーカー陽性率は 6 well プレートで 32.66 %、T-225 フラスコで 36.50 % と同程度であった。これらのことから、6 well プレート以外での培養でも大きな問題はないと予想された。

・培地液深さと細胞播種密度の検討

大面積プレートによる自動培養装置では、容器底面の変形を考慮する必要がある。培養面が傾斜していることに加え、底面ゆがみによって場所による培地液深さの差が大きくなり、播種密度もばらつくことが予想される。そのため、自動培養装置での使用を想定した大面積培養容器(培養面積 500 cm^2)の底面の平坦性を計測した。同サイズの培養容器が 3 社から市販されているため、培養面の平坦度を計測した。結果を図 1 に示す。これらの結果から C 社の容器を使用することとした。

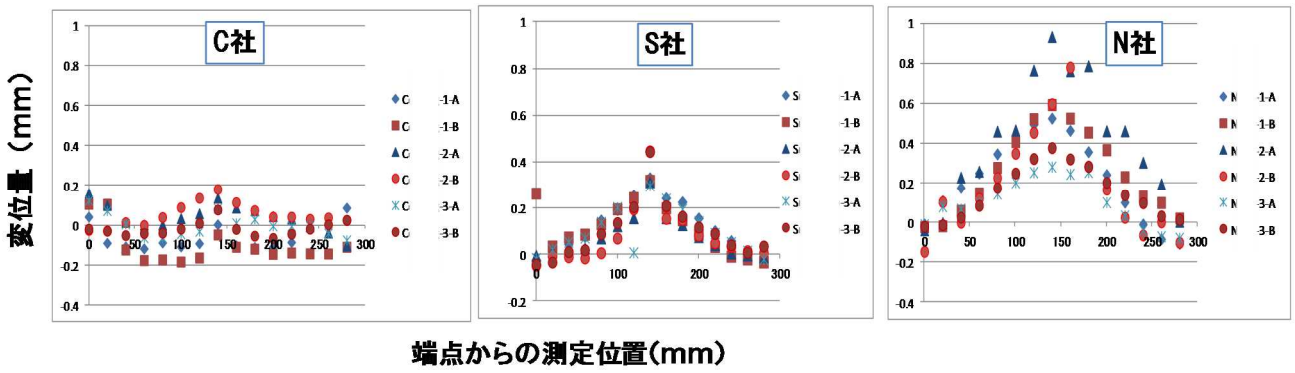


図１　市販大面積培養容器の平坦度

次に、培地液深さ、および播種密度を変えた培養を検討した。各条件で iPS 細胞を 7 日間培養し、細胞形態観察、増殖倍率および未分化マーカー遺伝子の発現量を計測して評価した。図 2 には iPS 細胞を異なる培地液深さで 7 日間培養した結果を示す。

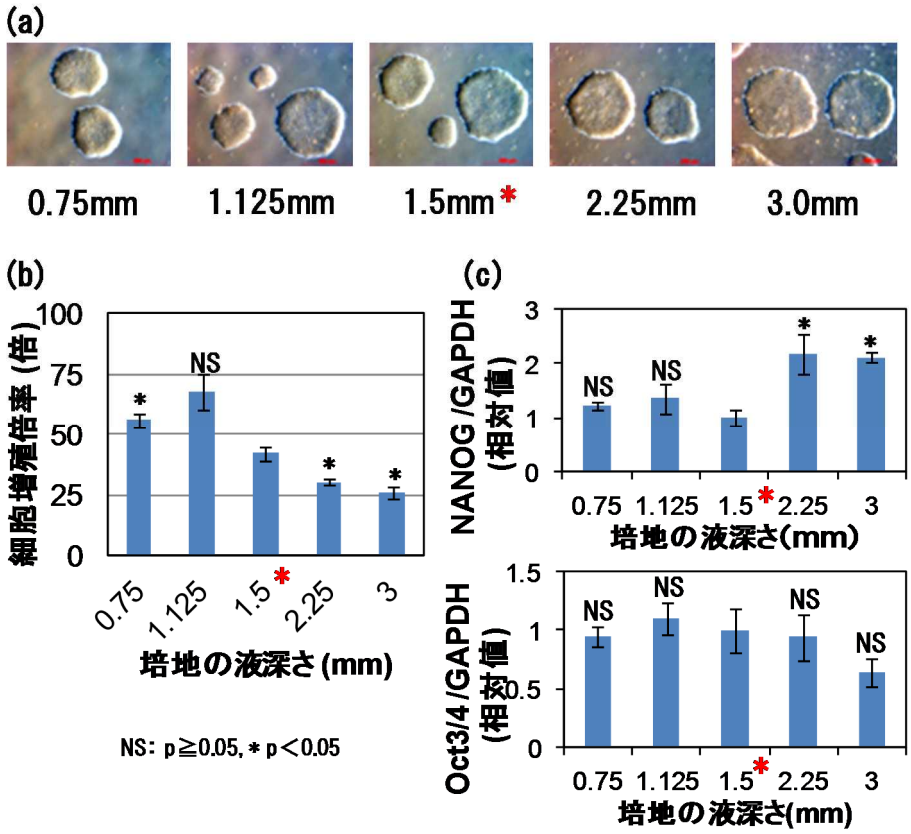


図２　異なる培地液深さで iPS 細胞を培養した結果
(a) 位相差顕微鏡像、(b) 細胞の増殖倍率、
(c) 未分化マーカー遺伝子(NANOG、 Oct3/4)の発現量

通常の手培養では、培地液深さは 1.5 mm である（図中に＊を表示)。図 2(a)に示されるとおり、位

相差顕微鏡像では細胞の形態に特に異常は見られなかった。これらの細胞を剥がしてセルカウントし、7 日間の増殖倍率を算出した結果が図 2(b)、未分化マーカー遺伝子(NANOG, Oct3/4) の発現量を示したものが図 2(c)である。エラーバーは N=3 の標準偏差である。遺伝子発現を見る限りいずれの条件でも未分化維持に影響があると見られないが、培地液深さが通常の手培養より 0.75 mm 以上深くなることでやや増殖が悪くなる傾向があった。培養容器はこれより平坦であるので大きな問題はないと考えられる。

次に iPS 細胞を異なる密度で播種し 7 日間培養した結果を図 3 に示す。通常の手培養では、播種密度は 1.4。通常 ^{3} cells/cm^2 である (図中に＊を表示)。位相差顕微鏡像(図 3(a))では、播種密度の高いものはコロニー同士が接合して形状がわかりにくくなっているが、特に異常ではなかった。これらの細胞を剥がしてセルカウントし、7 日間の増殖倍率を算出した結果が図 3(b)、未分化マーカー遺伝子(NANOG、Oct3/4) の発現量を示したものが図 3(c)である。エラーバーは N=3 の標準偏差である。遺伝子発現を見る限りいずれの条件でも未分化維持が低下している様子は見られず、増殖倍率も通常の手培養の条件より悪くなることはなかった。播種時に懸濁液深さが通常の 4 倍 (6 mm)となって播種密度が 4 倍となることは、容器の歪み等が原因で起こることは考えにくいが、仮に播種の不均一により密度が 4 倍程度あっても未分化維持に影響は少ないと考えられる。

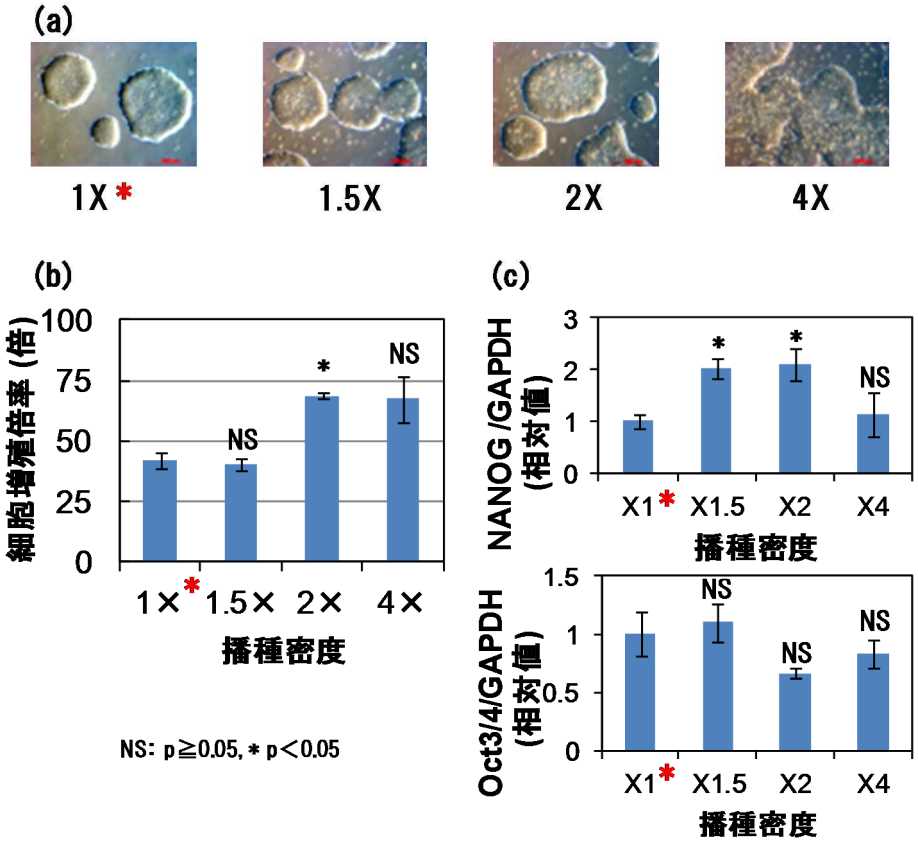


図 3　異なる播種密度で iPS 細胞を培養した結果
(a) 位相差顕微鏡像、(b) 細胞の増殖倍率、
(c) 未分化マーカー遺伝子(NANOG、 Oct3/4)の発現量

以上の結果から、培地液深さは通常の手培養の条件より 0.75 mm 以内でコントロールしていればよく、これは大面積容器の傾きに換算すると 0.14 度以内となる。播種密度は通常の条件の 4 倍以下であれば

問題はなく、ここから要求される播種時の培地液深さの条件は上記(0.75 mm 以内)よりゆるいものとなる。

培養プロトコールの変更に関する検討

・細胞のチューブおよびポンプ通過の検討

閉鎖型容器で培養を行う際、細胞播種も容器を開放せず無菌的に播種することが望ましい。しかし、閉鎖系容器に細胞懸濁液を注入するためには、チューブやポンプを通して送らなければならない。このとき機械的なストレスにより、細胞にダメージが加えられる可能性がある。そのため iPS 細胞をチューブやポンプを通過させ、その後の細胞の回収率(＝通過後得られた生細胞数 / 最初に投入した生細胞数)、生細胞比率(＝回収された細胞中の生細胞の数 / 回収された全ての細胞の数) を計測した(図 4(a))。さらに、通過後の細胞を 6well プレートに播種し、7 日間培養して増殖倍率および生細胞比率を計測し (図 4(b))、この細胞の未分化マーカー遺伝子発現を評価した(図 4(c)、 (d))。エラーバーは 4 回の実験の標準偏差である。増殖倍率については、実験回ごとに値がばらつき、エラーバーが大きいが、回収率、通過直後の生細胞比率、そして培養後の増殖倍率や生細胞比率、未分化マーカーの発現に、チューブやポンプを通過した影響は明確に現れなかった。以上の結果から、自動培養装置での細胞の自動播種に大きな問題はないと判断された。

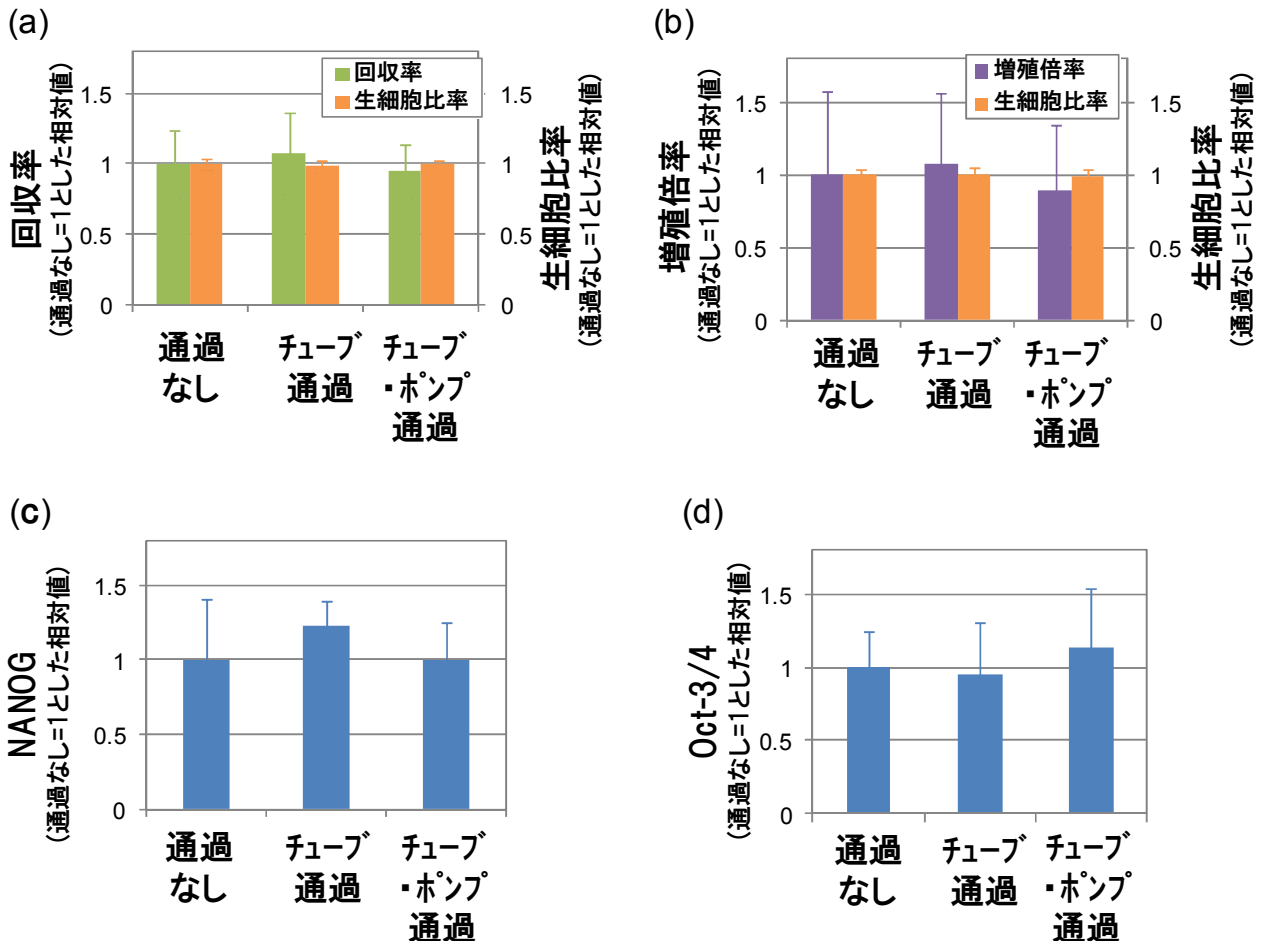


図 4 細胞のチューブ・ポンプ通過による影響

(a) 通過後の回収率と生細胞比率、 7 日間培養後の、 (b) 増殖倍率と生細胞比率、

(c) 未分化マーカー(NANOG)発現量、(d) 未分化マーカー(Oct3/4))発現量

・閉鎖系培養の検討

通常の細胞培養で用いられる培養皿は、通気が可能なわずかな隙間がふたと容器の間に形成されている。一方、閉鎖型培養容器はこのような自然な通気ができないため、容器に設けられたポートからチューブを通して、無菌化した 5% CO_2 ガスを強制的に送気する。このような培養環境が iPS 細胞の拡大培養(Step1)及び分化誘導前半工程(Step2)に影響を与えないか、閉鎖系大面積容器を用い、常時通気して培養を行った。培養後、iPS 細胞の増殖倍率および未分化マーカーの発現を評価した。図 5 に、市販の大面積容器(培養面積 500cm^2、 開放系)、およびこれの蓋等外装部を加工して閉鎖系容器としたもの(閉鎖系)について、iPS 細胞の培養を 7 日間行った結果を示す。閉鎖系培養の方がやや増殖倍率が低いものの、未分化マーカー遺伝子の発現については、全く差がなかった。

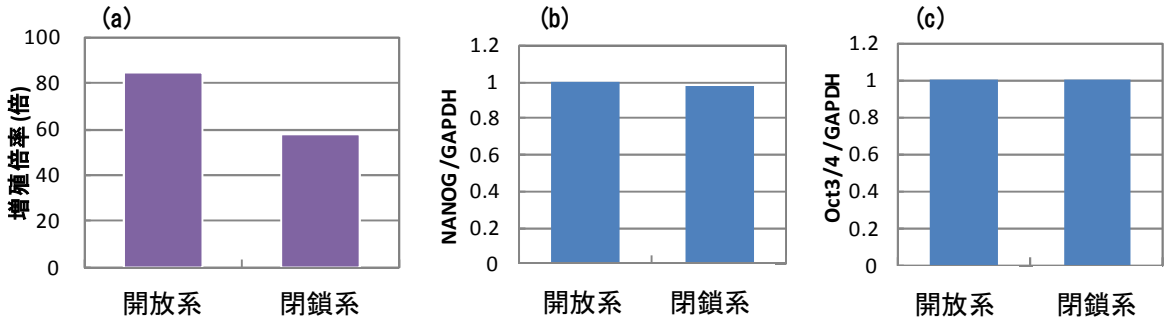


図 5　開放系および閉鎖系大面積容器での iPS 細胞の培養結果

7 日間培養後の、(a) 増殖倍率、(b) 未分化マーカー遺伝子(NANOG)の発現、(c) 未分化マーカー遺伝子(Oct3/4)の発現

また、図 6、図 7 にはフローサイトメトリによる未分化マーカーSSEA-4、TRA-1 の評価を行った結果を示した。いずれのマーカーに対しても陽性細胞が 100 %に近く、閉鎖系培養であっても十分に未分化維持がなされており、閉鎖系での培養に大きな問題はないと考えられる。

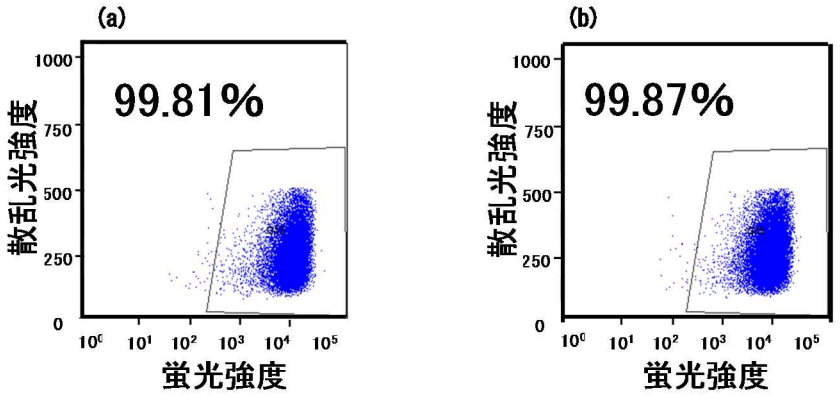


図 6　Step1 培養後のフローサイトメトリによる未分化維持の評価 (SSEA-4)

(a) 開放系(大面積容器)、　(b) 閉鎖系(大面積容器)

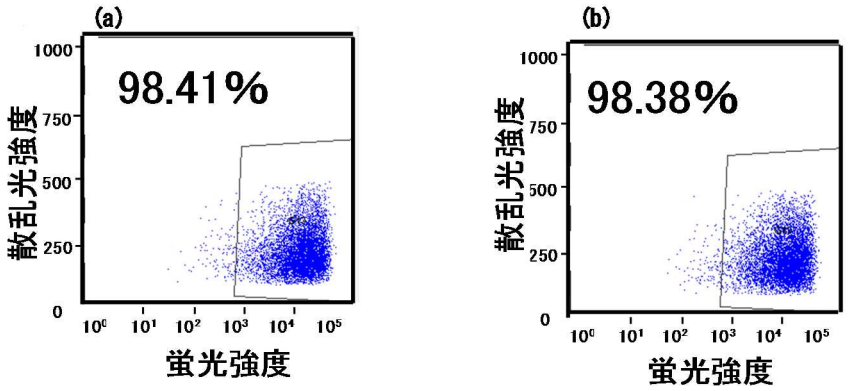


図 7　Step1 培養後のフローサイトメトリによる未分化維持の評価（TRA-1）
(a) 開放系(大面積容器)、　(b) 閉鎖系(大面積容器)

次に、同様の閉鎖系システムで、分化誘導の前半工程(Step2)を行った細胞の評価について示す。比較として開放系、ここでは通常の手培養で用いる 6well プレートで培養した結果を合わせて示す。それぞれの条件で分化誘導を行った細胞に対し、その後工程であるセルソーティング(Step3)を行い、指標である中脳 floor plate マーカー陽性率を、本事業の研究課題①で開発中の蛍光標識抗体を用いて調べた結果を図 8 に示す。なお、Step1 の iPS 細胞の拡大培養での培養条件による影響を受けないよう、分化誘導前半工程の開放系、閉鎖系のいずれの培養に対しても、原材料細胞は同じ大面積開放系で培養した iPS 細胞を用いている。閉鎖系においても、分化誘導が正常に進行し、中脳 floor plate マーカー陽性となる細胞が多数存在することが分かる。

また、この工程(Step2)では、 iPS 細胞が徐々に神経前駆細胞へと変化していくため、細胞の性質も変化する。接着培養中に細胞が剥がれて死滅することも予想されたが、閉鎖系培養であっても細胞の剥がれなどの問題もなく培養が完了した。

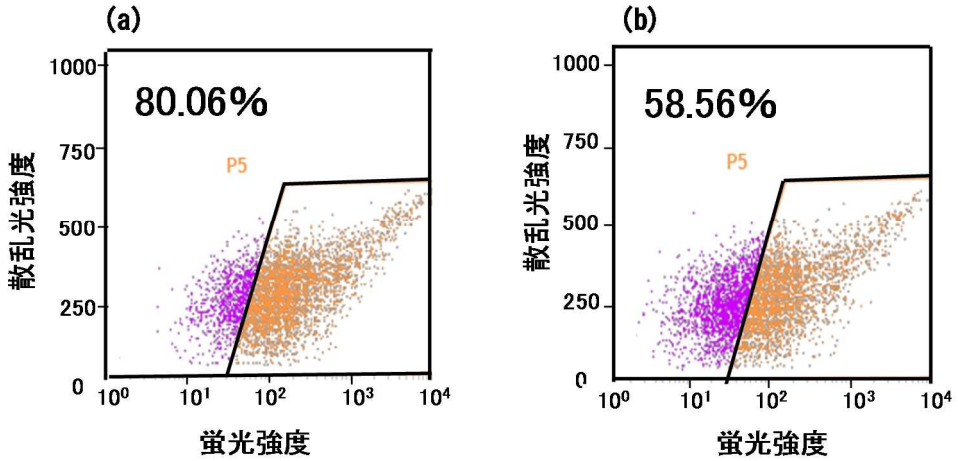


図 8　Step2 培養後のフローサイトメトリによる中脳 floor plate マーカー陽性率評価
(a) 開放系(6well プレート)、 (b) 閉鎖系(大面積容器)

同様の Step2 の培養を合計 3 回行った結果を表 1 にまとめた。

表１　3 回の Step2 培養後のフローサイトメトリ評価の結果

	開放系 〔6well プレート〕	閉鎖系 〔大面積容器〕
第 1 回目	80.06 %	58.56 %
第 2 回目	14.81 %	12.74 %
	15.56 %	
第 3 回目	17.94 %	9.93 %
	10.98 %	10.02 %

開放系の方が中脳 floor plate マーカー陽性率は毎回高いが、本製品の製造工程ではセルソーティング(Step3)により目的細胞を濃縮し、最終工程(分化誘導後半、Step4)へと進む。そのため、次工程へ進む細胞数が減少するという課題は残るが、最終工程で得られた細胞の質で判断することとした。

セルソーティングにより目的細胞を濃縮した (Step3)後、分化誘導後半工程(Step4)で細胞塊を形成させた。図 9 に示すように、閉鎖系で培養した細胞も正常な形態を示し、Step4 の工程も問題なく完了した。ここでは第 1 回目の写真を示している。

図 9　セルソーティング後分化誘導後半工程(Step4)での細胞塊形成
(a) 開放系(6 well プレート)、 (b) 閉鎖系(大面積容器)

この Step4 を完了した細胞について、 Step2 を閉鎖系培養したものと手培養したものとを比較するため、免疫染色を行った。図 10 に示すように、ドパミン神経前駆細胞および post mitotic なドパミン神経のマーカー遺伝子である Foxa2 と NURR1 の染色像にそれぞれ差は見られず、いずれの系でも同等のドパミン神経前駆細胞が分化誘導されたことを確認した。以上の結果より、Step2 についても閉鎖系システムでの培養が可能であると判断された。

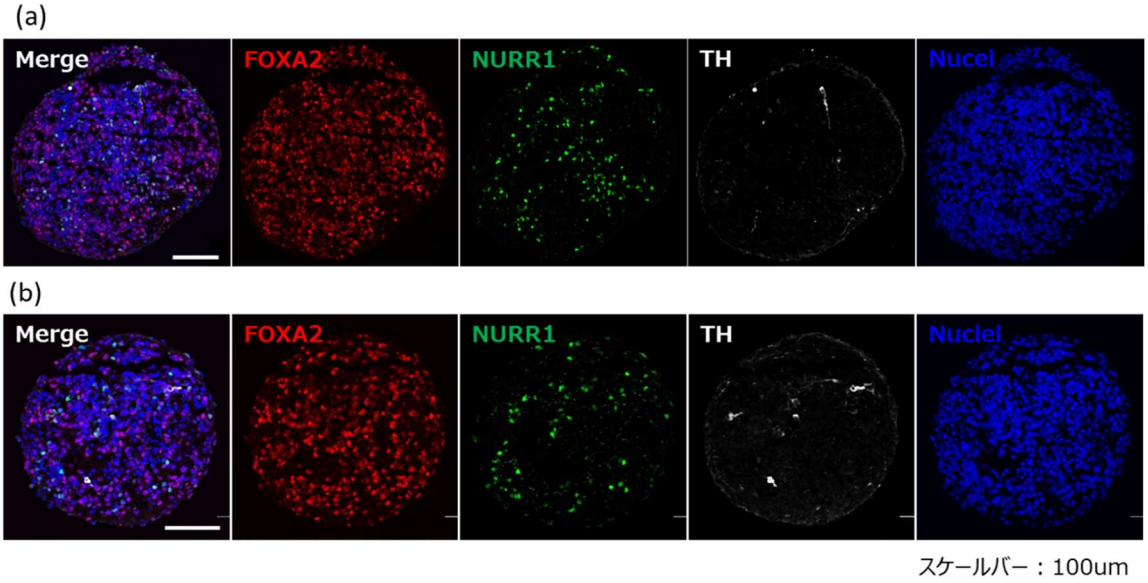


図 10　Step4 終了後のドパミン神経前駆細胞の免疫染色
(a) 開放系(6 well プレート)、 (b) 閉鎖系(大面積容器)

網羅的遺伝子発現解析による同等性評価

前項で示した、閉鎖系大面積容器(閉鎖系)での分化誘導前半(Step2)の培養について、その細胞の品質を詳細に評価するため各段階においてサンプルを採取し、網羅的遺伝子発現解析を行った。使用したマイクロアレイはアフィメトリクス社 Human Genome U133 Plus2.0 である。得られたマイクロアレイデータの数値解析を行い、閉鎖系大面積容器で培養した細胞と手培養との同等性評価を行った。

iPS 細胞の拡大培養(Step1)での培養の違いによる影響がないよう、Step2 の原材料細胞は、同じ培養を行った iPS 細胞を用い、Step2 から開放系と閉鎖系に分けて培養した。Step2 を開放系および閉鎖系で培養したあと、それぞれ中脳 floor plate マーカーを指標としたセルソーティング (Step3)、及び分化誘導後半工程で細胞塊を形成させて浮遊培養(Step4)を行った。この一連の実験を 3 回繰り返し行った。サンプル数の内訳を表 2 にまとめた。

表 2　網羅的遺伝子発現解析を行ったサンプルの内訳

		Step1	Step2	Step3	Step4
Run#1	Open	–	1	1	1
	Closed		1	1	1
Run#2	Open	–	2	2	–
	Closed		1	1	–
Run#3	Open	2	2	1	1
	Closed		2	1	1
合計	Open	2	5	4	2
	Closed		4	3	2

マイクロアレイ解析からは、信頼性の低いプローブおよび発現量の低いプローブのデータを除去した結果、全プローブ数の 32.6 %にあたる 17,841 のプローブのデータが得られた。これは全 21,213 のヒト遺伝子のうち 49.9%にあたる 10,595 遺伝子が検出されたことになる。開放系と閉鎖系培養の違いが遺伝子発現に与える影響を検証するため、Step2 完了後、 およびその後の Step3 完了後の細胞について、遺伝子発現量の数値解析を行って比較した。まず，発現量に対する検出されたプローブ数で検出感度を解析したところ、いずれの工程においても、開放系と閉鎖系の違いはなく、検出感度に違いはないことがわかった。すなわち、培養条件による発現量の変化に起因する、検出感度に差はなかった。

さらに、遺伝子発現量に対する発現量のばらつき(標準偏差)を比較した。Step3 完了時においては、開放系と閉鎖系の間で、その平均値に差はほとんどないが、Step2 完了時においては閉鎖系の発現量のばらつきが開放系と比較して低発現側で若干大きかった。セルソーティングを経て目的細胞が濃縮され、全体的なばらつきが開放系と同等のレベルまで低減したと考えられた。また、閉鎖系と開放系の遺伝子発現パターンの類似度を比較するため、検出された全遺伝子について Step2 完了時、Step3 完了時の各々の発現量の平均値を算出し、閉鎖系と開放系の間で発現量の散布図を作成した(図 11)。Step2 完了時における相関係数 R は 0.9920、Step3 完了時における相関係数 R は 0.9920 であり、両ステップにおいて閉鎖系と開放系の間における遺伝子発現パターンの類似度は極めて高い事が示された。

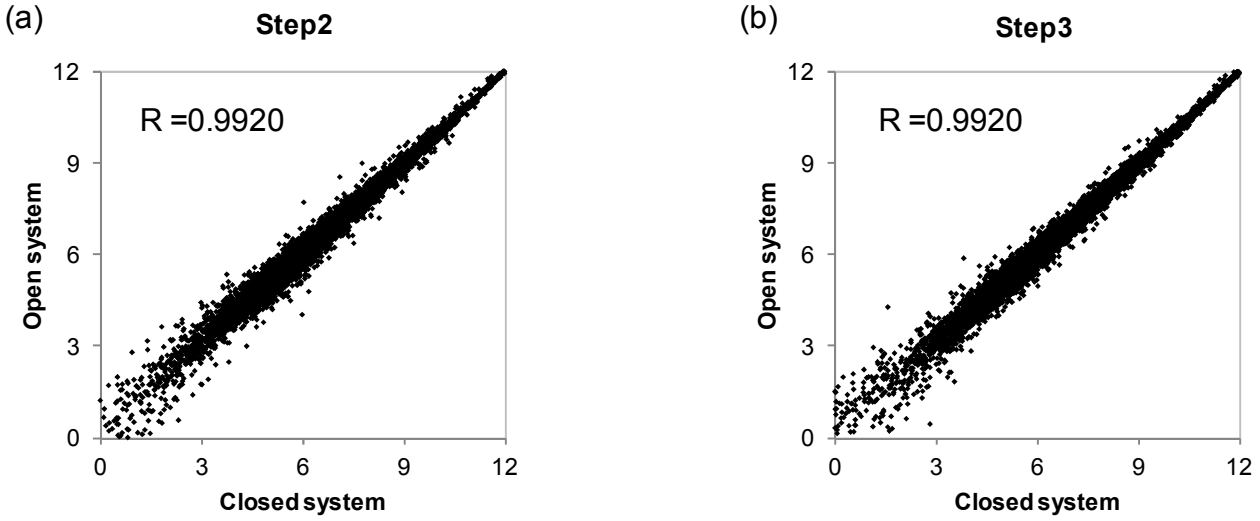


図 11　開放系と閉鎖系の遺伝子発現データの散布図
(a) 分化誘導前半(Step2)、 (b) ソーティング(Step3)

表 2 で示した Step1～4 のサンプルで得られたマイクロアレイデータの主成分分析を行って、開放系と閉鎖系の比較を行った。主成分 1 軸と 2 軸に関してプロットすると、各 Step ではっきりグループ分けされ、Step ごとに遺伝子の発現が大きく変わっていることがわかった。開放系と閉鎖系は、同じ Step であればほぼ同じ位置にプロットされ、明確な差が見出せなかった。以上の結果から、培養容器の閉鎖系化は全体的な遺伝子発現パターンに影響を及ぼすほどの大きなストレスを与えない事が明らかとなった。

閉鎖系培養を行った iPS 細胞のドパミン神経前駆細胞への分化誘導効率を検証するために、未分化マーカー、腹側マーカー、中脳マーカー、前脳マーカー、神経マーカー、ドパミン神経マーカーについて、

各 Step 後の発現量変化を開放系と比較した。いずれのマーカーにおいても、開放系と閉鎖系培養とで振る舞いの違いは見られなかった。マーカー遺伝子の発現量の変化は以下のようにまとめられる。

1. 未分化マーカー発現量は分化誘導のステージが進むにつれ著しく減少した。
2. 腹側マーカーは Step2 までに発現が誘導され、Step3 での細胞選別により発現量の多い細胞のポピュレーションが上がったため数値がやや上昇した。
3. 中脳マーカーは Step2 で発現が誘導されたが、前脳マーカーの発現は全 Step を通して誘導されなかった。
4. 神経マーカーの発現は Step 進行に従い発現上昇が確認された。
5. ドパミン神経マーカーは Step4 で発現量が上昇した。

これらの振る舞いが、研究開発分担者から既に報告されている結果と一致しており[5]、妥当であることから、今回検討した開放系及び閉鎖系での両培養において、ドパミン神経前駆細胞への分化誘導が正常に行われた事が示された。また、閉鎖系でも開放系とほぼ同等の振る舞いをしていることから、閉鎖系培養において開放系と同程度の品質のドパミン神経前駆細胞を生産可能である事が明らかとなった。

まとめ

自動培養装置の導入に伴い、現行の手培養からプロセスが変更となる点について検討した。検証すべき要素として、「培養容器の変更」と「培養プロトコールの変更」を抽出して検討を行い、いずれも現行法の培養と大きな差は検出されず、細胞の性質は変わらないことを明らかとした。また、自動培養装置を想定した培養を実施してドパミン神経前駆細胞を製造し、細胞の品質を網羅的遺伝子解析によって評価した。この結果、閉鎖系大面積培養を実施しても、現行法と同等の品質を持つことを確認し、ロットサイズの拡大に向けた閉鎖系大面積容器での培養においても従来の手培養と同品質の細胞が製造可能と判断し、プロセス変更の妥当性を検証した。

② 抗体でのセルソーティングプロセスの評価手法の開発

抗体の品質管理手法の開発

＜諸言＞

本製品の製造工程(Step3)にはセルソーターによる細胞選別工程が含まれており、当該工程では目的細胞表面に発現する中脳 floor plate マーカーを特異的に認識する抗体を蛍光タンパク質で標識したものを使用する。この抗体を産生する組み換え細胞は既に樹立済みであり、研究用途での抗体製造に既に利用しているが、GMP 管理の求められる本製品製造の原材料としてふさわしい抗体の製造管理戦略や、抗体の製造バッチごとの出荷判定に用いる定量的評価手法、生物由来原料基準への対応策は確立できていない。また、本抗体を用いてセルソーティングした後に、約 2 週間の浮遊培養ステップがあるものの、最終製品中に抗体が残存している可能性があり、この残存抗体の安全性リスク評価については、実測値に元づいて定量的に議論することが望ましいということが PMDA との事前面談により指摘されており、抗体の定量的評価手法開発の要求は高い。また、抗体に加えて、標識する蛍光物質についても同様に安全性リスク評価を実施する必要がある。ここでは、抗体の製造管理手法の確立と物理化学的あるいは生化学的に定量的に品質を確保できるような評価手法を開発する。

抗体の製造管理、ウイルス安全性戦略

蛍光標識抗体の製造方法の概略を図 1 に示す。

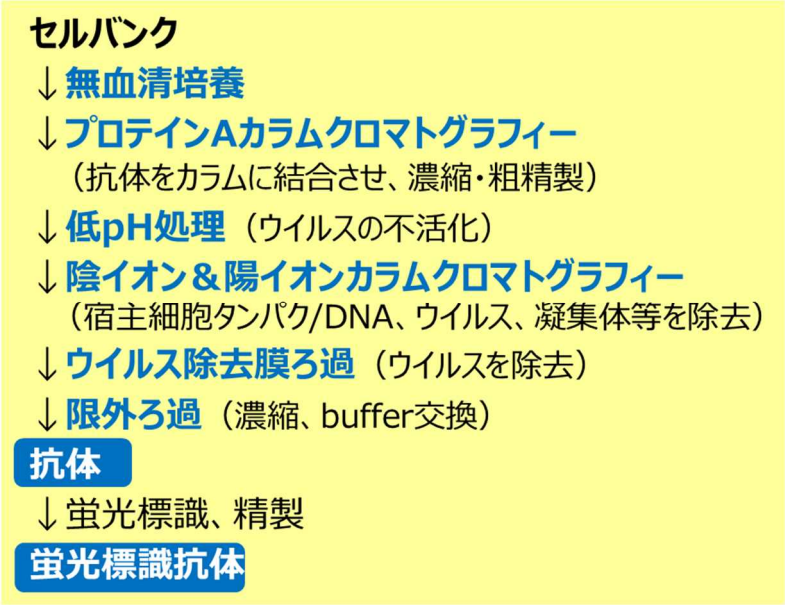


図 1　蛍光標識抗体の作製フロー

本標識抗体は再生医療等製品製造用の原料であることから非 GMP での製造を計画しているが、他品目との交差汚染及び微生物等の汚染を防ぐため、GMP 準拠施設を使用することとした。また、本標識抗体は生物由来原料であり、ウイルス安全性を担保するために ICH-Q5A のガイドラインや通常抗体医薬品の製造時に実施される試験などを一部省略し、表 1 に示すウイルス安全性評価計画を策定した。本計画の生物由来原料基準対応としての妥当性については、次年度に PMDA にて薬事戦略相談対面助言を実施することを計画している。H27 年度に事前面談を実施済で、ここでは「抗体の製造工程を示した上で、各

工程で使用する各生物由来原料を示し、それぞれに対して生物由来原料基準に対する対応状況」を示すべき、という指示を受けており、情報を整理中である。以上の通り、抗体医薬品の各種基準を参考として、再生医療等製品の製造原料としての抗体の製造管理ストラテジーを決定した。

表 1　標識抗体のウイルス安全性評価項目

対象工程	評価項目
セルバンク	ICH ガイドライン Q5A に準拠し、ウイルスを評価する。一部の試験については、宿主細胞で実施されているウイルス試験結果を利用する。
無血清培養上清	製造毎にウイルス否定試験を実施する。
低 pH 処理工程及び ウイルス除去膜ろ過工程	ウイルスクリアランス試験を実施し、除去能力を評価する。

物理化学的特性を基にした品質管理

標識抗体の製造では、最終形態の品質管理に加え、標識前の抗体の品質管理を行い 2 段階で管理することを目指している。標識前抗体の品質管理においては、抗体の物理化学的特性を踏まえて種々の試験項目を設定した。これらの項目に基づき、2015 年に製造した抗体の出荷試験及び安定性試験の結果を表 2 に示した。この結果から、抗体は製造用原料として十分な品質を有しており、また-60℃以下の保存では少なくとも 6 箇月は物理化学的に安定であることが明らかとなった。

表 2　抗体の出荷試験及び安定性試験結果

目的	試験項目		試験開始時 (出荷試験)	<-60℃, 1 箇月保存	<-60℃, 3 箇月保存	<-60℃, 6 箇月保存
示性値	性状		無色澄明の液で、 異物を認めない	無色澄明の液で、 異物を認めない	無色澄明の液で、 異物を認めない	無色澄明の液で、 異物を認めない
	pH		6.4	6.5	6.4	6.5
	浸透圧		297 mmol/kg	(出荷時のみ実施)		
含量	濃度(吸光度測定)		4.86 mg/mL	5.0 mg/mL	4.9 mg/mL	4.9 mg/mL
確認	キャピラリー 等電点電気泳動	酸性	7.66 %	8.84 %	8.27 %	9.02 %
		6.66	49.56 %	53.85 %	54.52 %	53.57 %
		6.82	21.32 %	17.97 %	17.63 %	17.39 %
		6.87	9.77 %	8.13 %	8.54 %	8.77 %
		6.92	6.65 %	6.14 %	6.36 %	6.61 %
		塩基性	5.01 %	5.06 %	4.68 %	4.64 %
純度/	SEC HPLC	主ピーク	94.6 %	96 %	96 %	97 %

不純物		高分子量	3.3 %	(数値報告は出荷時のみ)		
		低分子量	2.1 %	(数値報告は出荷時のみ)		
	非還元 SDS-PAGE		結果報告	91% intact IgG	85% intact IgG	84% intact IgG
	還元 SDS-PAGE		96 % 重鎖+軽鎖	96% 重鎖+軽鎖	94% 重鎖+軽鎖	94% 重鎖+軽鎖
	宿主細胞タンパク質		22.567 ng/mg	(出荷時のみ実施)		
	宿主細胞 DNA		< 9 fg/μL	(出荷時のみ実施)		
	プロテイン A		0.140 ng/mg	(出荷時のみ実施)		
微生物管理	エンドトキシン		< 0.1 EU/mL	(出荷時のみ実施)		
	生菌数	総好気性微生物数	< 1 CFU/mL	(出荷時のみ実施)		
		総真菌数	< 1 CFU/mL	(出荷時のみ実施)		

次に、2015 年に製造した標識抗体の出荷試験結果を表 3 に示す。標識抗体については安定性の指標となる試験方法を検討中であり、安定性の評価は次年度以降に実施する予定である。

表 3 標識抗体の出荷試験結果

目的	試験項目	試験結果
示性値	性状	わずかに着色した澄明の液
含量	濃度	1.03 mg/mL
純度	free 蛍光物質量	2.8 %

これらの各種試験結果を踏まえ、治験実施時のサンプル製造あるいは将来の商用製造に使用する抗体及び標識抗体の品質管理項目を策定した(表 4)。

表 4 抗体及び標識抗体の品質管理項目及び試験方法

管理対象	管理項目	試験方法
抗体	性状	目視
	pH	pH 測定法
	タンパク質濃度	紫外吸光度測定法
	確認	キャピラリー等電点電気泳動
	力価	ELISA
	純度(目的物質由来)	SEC-HPLC
		SDS-PAGE(還元/非還元)

	純度(工程由来)	宿主細胞由来 DNA
		宿主細胞由来タンパク質
		残存プロテイン A
	微生物管理	生菌数試験
		エンドトキシン試験
標識抗体	性状	目視
	タンパク質濃度	検討中
	1 抗体分子あたりの標識分子数	検討中
	機能試験	検討中
	微生物管理	無菌試験
		エンドトキシン試験

小括

抗体および標識抗体について、抗体医薬品を参考に製造管理、ウイルス管理戦略を立案した。また、抗体の物理化学的な品質管理項目と試験法を設定し、出荷試験や実施中の安定性試験結果を基に各管理項目の基準値を設定した。

力価試験の確立

表 4 に示したように、力価を評価する方法として ELISA 法を選択して品質管理項目とする予定であることから、試験方法の確立に着手した。

・抗原の調製

まず、ELISA 系の確立に必要な抗原の調製方法について検討を行った。調製方法として、①一過性発現細胞からの調製、②強制発現細胞株からの調製、及び③エピトープマッピングの手法を利用したペプチドライブラリーからの調製、の 3 種類の方法を検討した。それぞれの調製法の概略を図 2 に示す。

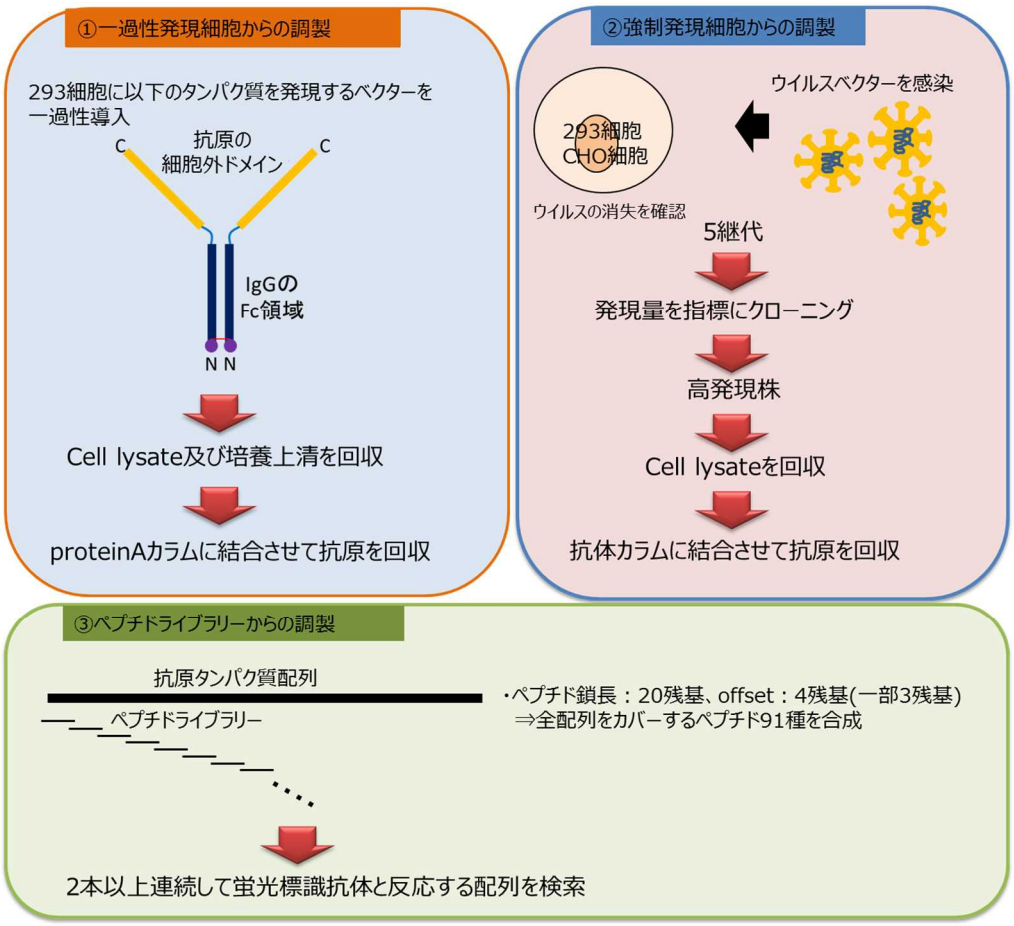
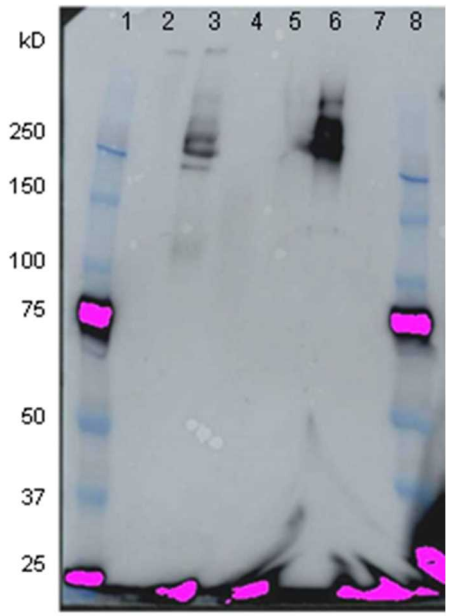


図 2　抗原調製法の概略

①及び②の方法で調製した抗原について、非還元 SDS-PAGE 後に標識抗体を用いたウエスタンブロットを行った(図 3)。これにより、一過性発現細胞系の培養上清から抗原を調製できることが確認できた。一方で現在の抽出法では、強制発現細胞からの抗原の調製は難しいと考えられた。一過性発現細胞系では、非還元電気泳動/CBB 染色により、1L の培養から約 4mg の抗原を調製できると見積もられた。



Lane No.	サンプル
1	分子量マーカー
2	一過性発現細胞系の cell lysate
3	一過性発現細胞系の培養上清
4	強制発現細胞の cell lysate
5	一過性発現細胞系の cell lysate の proteinA カラム溶出液
6	一過性発現細胞系の培養上清の proteinA カラム溶出液
7	強制発現細胞の cell lysate の抗体カラム溶出液
8	分子量マーカー

図 3　一過性発現細胞及び強制発現細胞からの抗原調製

次に、③の方法で作製したペプチド 91 種を 96 穴プレートに結合させ、標識抗体の結合の有無を確認した。抗原結合部位の長さは一般的に 10 残基程度であることから、2 本以上のペプチドが連続して標識抗体と反応する箇所が抗原結合部位であると考えた。結果を図 4 に示した。赤丸で示した 3 本のペプチドが連続して標識抗体と反応したことから、これらのペプチドに共通に含まれる配列が抗原結合部位であると考えられた。

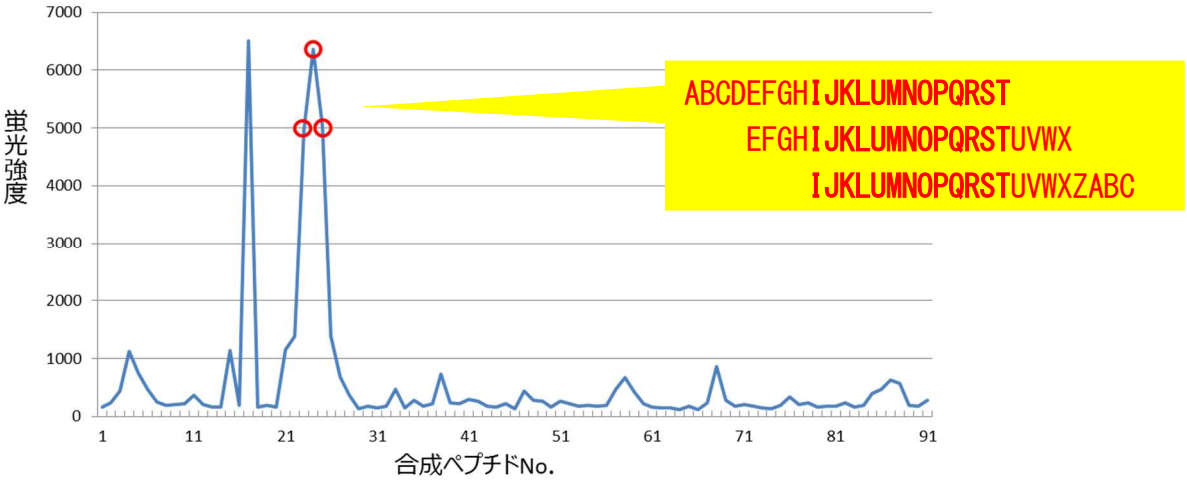


図 4　標識抗体によるペプチドライブラリーのスクリーニング結果

以上の検討より、一過性発現細胞系の培養上清及びペプチドライブラリーから見出された配列から抗原が調製できることが確認された。合成ペプチドの方が一定の品質を維持して繰り返し調製しやすいと考え、ペプチド合成により抗原を作製することとした。図 4 に赤丸で示した 3 本のペプチドからなる配列の安定性を向上させたペプチドを作成した。このペプチドを用いて標識抗体量を測定した結果を図 5

に示す。本製品の製造工程にて使用される濃度域を含む 10ng/mL～100g/mL で良好な用量反応を示したことから、本ペプチドを用いた力価試験が設定可能であることが確認できた。今後、さらなる試験条件の最適化を行い、種々サンプルの定量法とする。

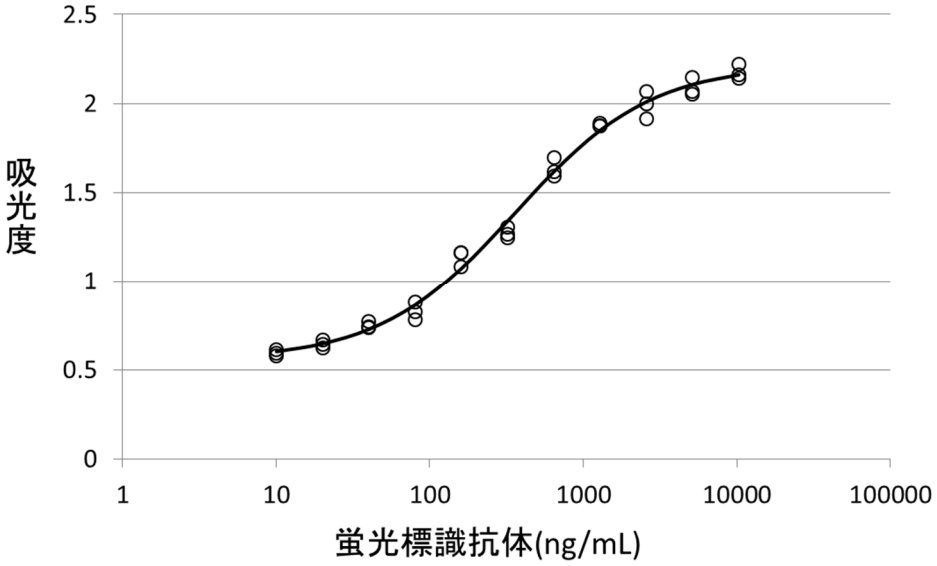


図 5　標識抗体の用量反応曲線

機能評価のための抗原強制発現細胞の樹立・実用性評価

上記にて確立した ELISA 法による力価試験は、標識抗体の品質管理に極めて有効である。一方で、本製品の製造プロセスにおいては標識抗体がセルソーティングに使用されることも踏まえ、現実的な機能評価として標準細胞による簡便なフローサイトメトリー(FACS)による管理も有用であると考えた。そこで、図 2②で示した手順により抗原の強制発現細胞の評価を実施した。

細胞表面での抗原の発現に適した細胞を選定するため、HEK293 細胞および CHO 細胞に強制発現用レンチウイルスを感染させ、シングルクローン化を行った。得られたクローンを標識抗体で染色し、FACS 解析を実施した。親株(WT)と比較してより分離の良かったクローンの解析例を示した(図 6)。この図では、蛍光強度を X 軸に取ったヒストグラムを示しており、図中の数値は蛍光強度の平均値を示している。CHO 細胞と比較して、293 細胞ではピークの形状がシャープであり、親株の 100 倍以上の蛍光強度を示していたことから、以降の検討は 293 細胞を使用することとした。

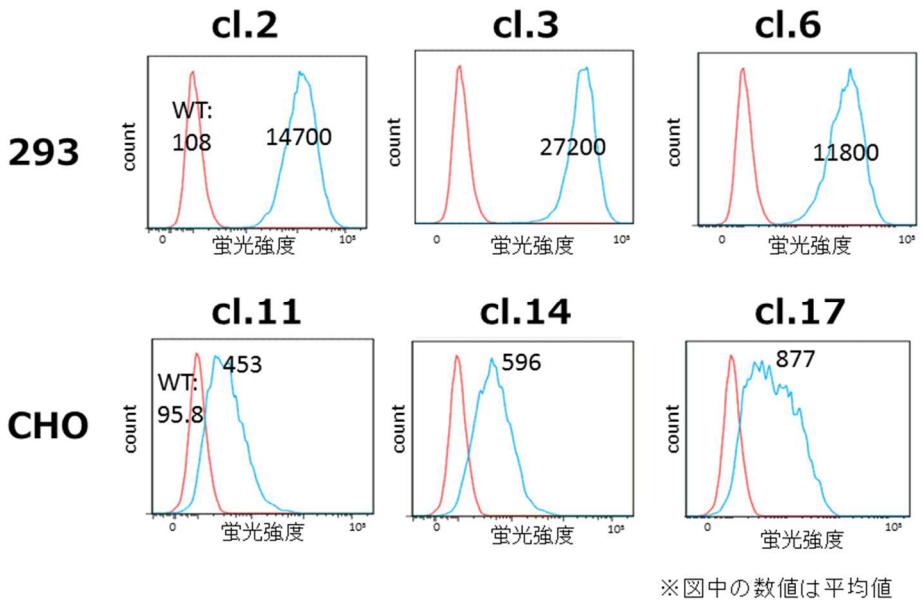
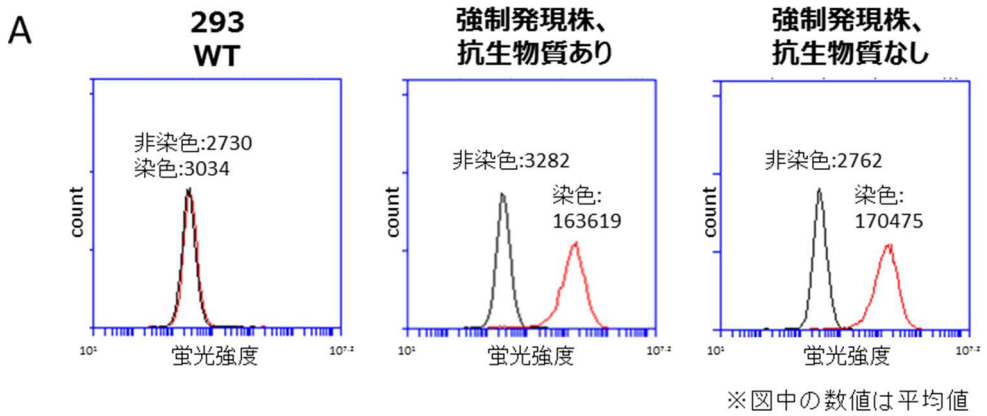


図 6　293 細胞および CHO 細胞を用いた強制発現細胞の作製

次に強制発現細胞の性状を検討した。強制発現細胞の安定性を調べるため、抗生物質非存在下の 14 継代後において FACS により発現量を測定した。この段階でも、親株に対して強制発現株は十分な分離を示しており、安定的に抗原が発現し続けることが確認できた(図 7A)。さらに、標識抗体の機能評価をどのように実運用するか検討するため、固定の有無および保管法を調べた。親株及び強制発現細胞を 4%PFA またはメタノールで固定し、標識抗体にて染色し、FACS により非染色細胞との分離を確認した。その結果 PFA, メタノール固定ともに分離は可能であるが、親株において非特異的染色が認められた(図 7B)。また、保存法の検討として固定後 4℃保存(PBS)、固定後-80℃保存(PBS/10%DMSO)、生細胞凍結保存(凍結保存液使用)を比較した。固定後保存した細胞は親株において非特異的な染色が起こり、使用には適さないことが判明した。それに対して、生細胞を凍結保存した条件では、親株の非特異的な染色が認められない上、強制発現株で強い染色が確認できた(図 7C)。このことから、強制発現細胞を用いた標識抗体の機能評価の運用としては、強制発現細胞を凍結保存し、解凍後速やかに染色して用いる方法が最適であると言える。



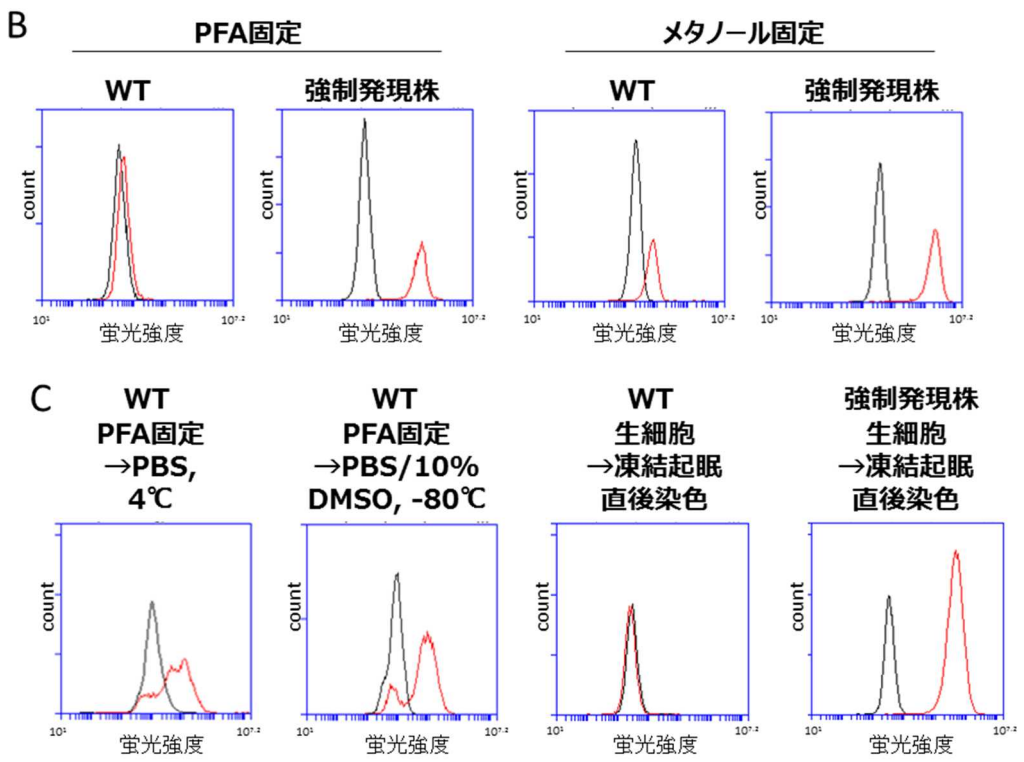


図 7 強制発現細胞の保存条件検討
A: 細胞の安定性の検討, B: 細胞の固定の検討, C: 細胞の保存の検討

次に、作製した細胞が標識抗体のロット差を検出できるか、というフィージビリティー検討を実施した。2 ロットの標識抗体を準備し、種々の濃度で iPS 細胞由来細胞(Step2 終了時 : 本製品の中間体)及び強制発現細胞を染色して FACS により解析した。10ng / mL の濃度で標識抗体を使用した場合、iPS 細胞由来細胞において Lot1 では蛍光が確認できたが、Lot2 では蛍光が確認できなかった(図 8)。また、作製した強制発現細胞のシグナル平均値は、Lot1 で 845、Lot2 では 489 であり、こちらにも差が認められた。この結果は、抗体タンパク質量が同じであっても標識抗体の力価がロットによって異なっていることによるものであり、作製した強制発現細胞はこの力価の違いを判断できる感度を持つということを示している。また、この感度は実際に使用する濃度域である 10-100ng/mL において確認できたことから、この強制発現細胞は十分に実用性があると言える。以上の結果より、強制発現細胞を用い、「規定質量の抗体量で基準値以上のシグナルを検出」等を基準とするような、「抗体の機能評価手法」を開発した。

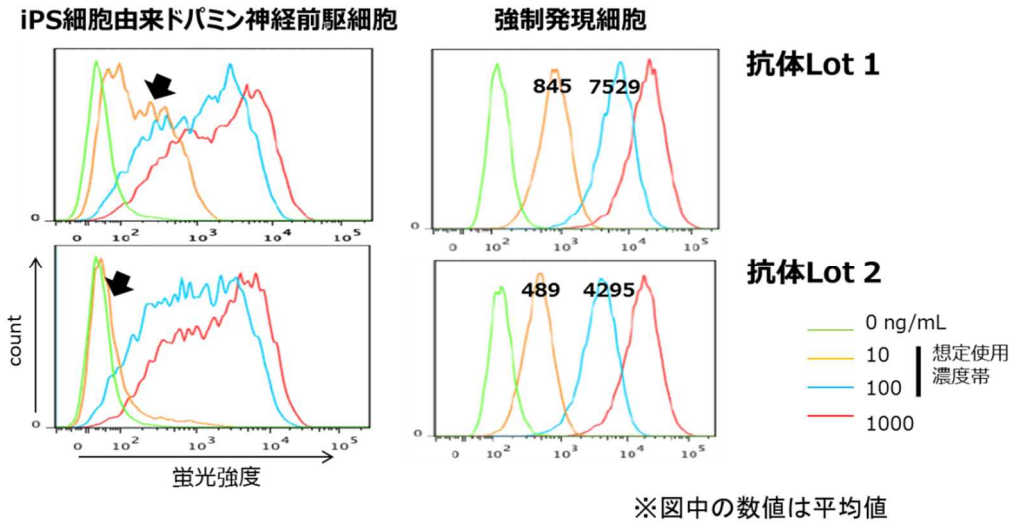


図 8 細胞を用いた標識抗体ロット差の比較

定量的な基準値設定に向けた検討

製品の GMP 下での連続製造時の品質低下リスクとして、標識率の低下、すなわち標識の脱落の可能性も考えられる。そこで、強制発現細胞を用いた評価の中で、標識抗体に対する二次抗体を同時に使用することで、蛍光物質による標識率を評価する手法の開発に取り組んだ。また、より定量的な基準値の設定を目指し、セルソーター本体のキャリブレーションに用いられる市販の標準蛍光ビーズも同時に測定することとした。種々の濃度の標識抗体及び規定濃度の二次抗体で処理した強制発現細胞の FACS 解析を行った(図 9)。この解析では、標識抗体に結合する二次抗体(Alexa488 標識)の蛍光は「細胞を認識する抗体の総量」、標識抗体由来蛍光は「細胞に結合した標識抗体量」を反映する。また、本製品の製造時に運用を想定している標識抗体の使用濃度域で、得られる蛍光強度は使用したキャリブレーションビーズのピーク内に収まることが確認でき、ビーズのピークとの関係性で基準値を設定できることを見出した(図 9A 左)。すなわち、例えば「X 番目と Y 番目のピークの間に Z ng/mL の標識抗体で染色した強制発現細胞の集団 95%以上が入ること」、などの定量的な基準を設定できる。二次抗体の蛍光強度も同様で、キャリブレーションビーズとの相関により、「総抗体量」の把握と基準の設定が可能であることが示された(図 9A 右)。また、二次抗体の蛍光強度は、使用した標識抗体濃度に依存していたことから、蛍光標識と二次抗体の蛍光比率を計算することなどにより、標識率が一定の基準幅に収まる規格値を設定することも可能となることが示唆された。このような考えの基、標識抗体と非標識抗体を種々の比率で混合し、二次抗体の蛍光強度との蛍光強度の比率をプロットした。この結果、標識抗体の含有率に比例した直線の検量線を描くことに成功した(図 9B)。本手法を用いて、標識抗体の標識率を簡便に測定することが可能となった。以上の結果により、日常的な抗体の性能点検に利用可能な、標識率の評価手法の原型を開発した。

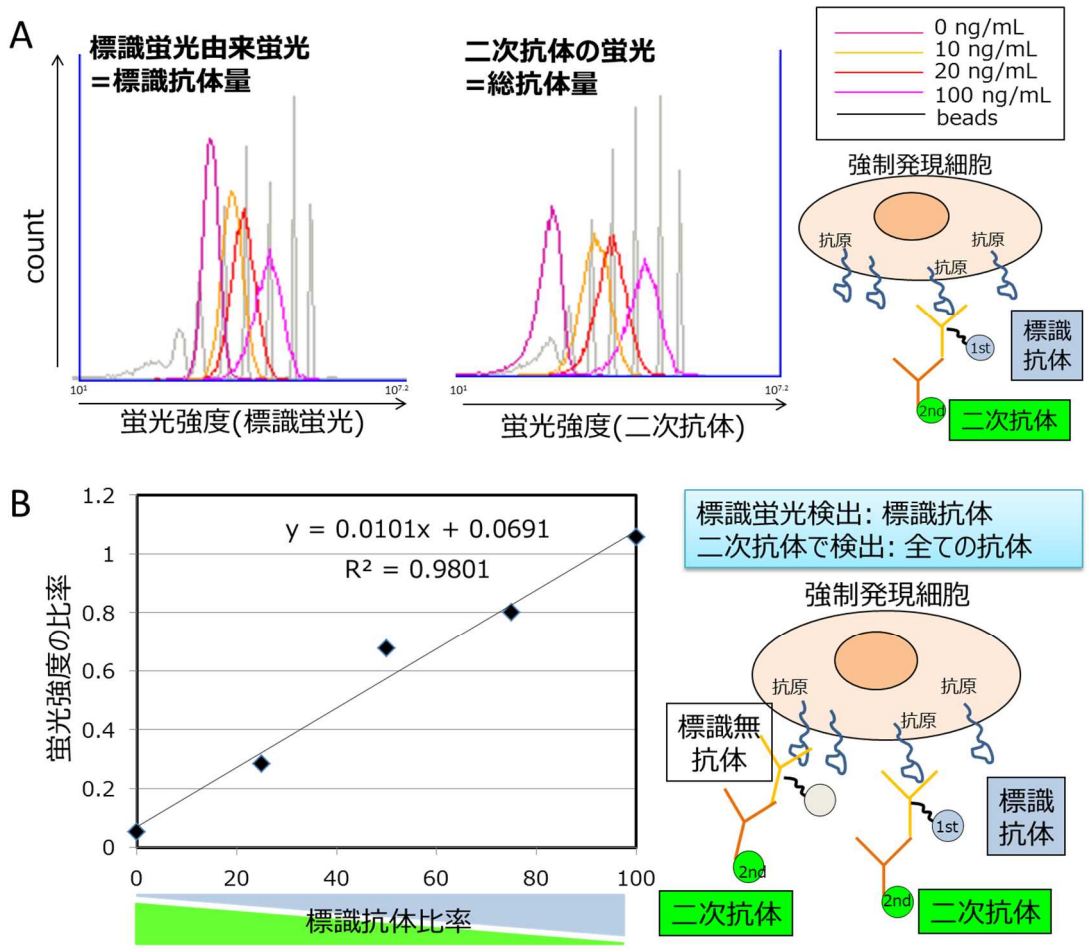


図 9　二次抗体を用いた基準値設定に向けた検討

A: 標準ビーズとの比較 B: 標識蛍光と二次抗体の蛍光比率による標識率測定

小括

抗体力価の生化学的な機能評価のため、抗原配列由来の合成ペプチドを用いた ELISA の測定系を構築し、実用的な抗体濃度範囲で良好な反応曲線が得られることを確認した。また、機能評価用の抗原強制発現細胞を作製して使用条件を検討し、最適な条件を決定した。抗原強制発現細胞を用いることで、ロット間の力価差を検出できる感度を持つ評価手法を開発した。さらに、標識抗体中の蛍光標識率測定法の原型をそれぞれ開発した。

② 抗体でのセルソーティングプロセスの評価手法の開発

セルソーターの調査とフィージビリティー評価

＜諸言＞

本製品を製造するための分化誘導方法やセルソーターによる細胞の分離方法についての基本プロトコールは既に確立済みであるが、現在の製法のままではロットサイズが小さく製造コストが高額になることが課題であり、現在、研究開発代表者らを中心にさらなる製造プロセスの合理化・効率化を検討している。ボトルネックとなっている現行のセルソーティングプロセス(Step3)は、患者一人当たり数百万個の細胞を移植しなければならない本製品の製造にはスループットが低すぎる。また、目的細胞の分取漏れによるロスが多い上に、機器の構造上ソーティング時の細胞へのダメージが大きいことや無菌環境での製造が難しいことにより、本製品の大量生産を GMP に準拠させて実施することは最大のチャレンジである。将来的には、治験および市販後の商用製造に導入可能なセルソーターの導入戦略を構築しなければいけない。そこで、現在セルソーターを市販しているメーカーを海外も含めて網羅的に調査し、我々の要求に合致するメーカー、機種があるか調査する。さらに、これらの機種について種々の指標により考察し、本製品の実製造への使用可能性を検討する。

本製品製造上の既存技術の問題点

図 10 に、現在主流である jet in air 機構の模式図および現行技術の問題点を整理して示した。現在研究用途で主流となり広く使用されているこの機構のセルソーターでは、溶媒と細胞が層流を保ったまま高速で上から下に流され、この際一定の振動を与えることで液滴を形成させる。液滴 1 個中に 1 個の細胞が入るように設計されており、液滴形成の直前で細胞由来の蛍光シグナルが測定される。細胞が蛍光抗体に結合していれば、蛍光シグナルを元に液滴形成時に瞬時に荷電され、落下時に目的液滴(細胞)が選り分けられる(図 10 左)。

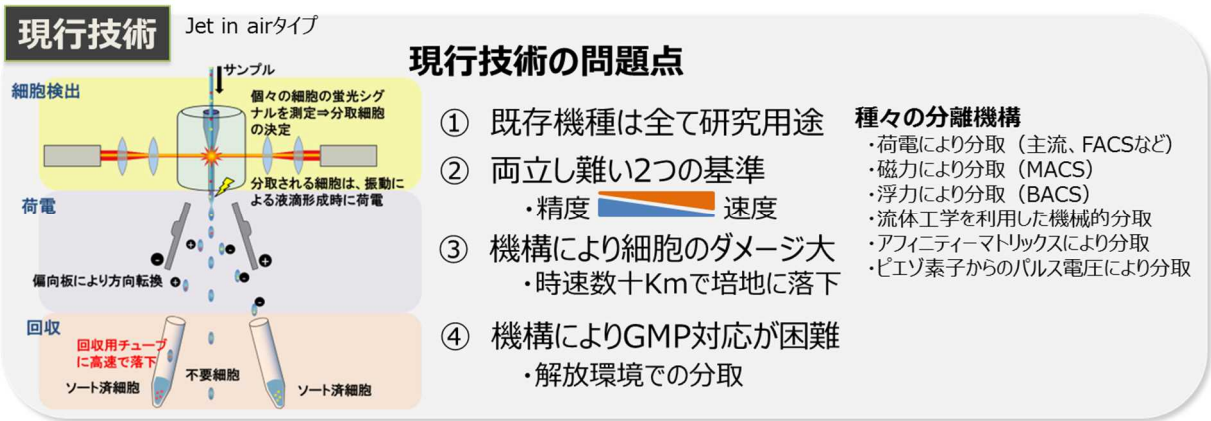


図 10　現行のセルソーティング技術の問題点

セルソーティングは今回の製法の中で有効性や安全性の向上を意図したプロセスである一方で、このような機構では「分取速度」と「分取精度」がトレードオフの関係にあることから高速化に限界があり、生産規模を上げる際の大きなボトルネックとなっている。これまでの経験により、高速化を制限する要因は使用する細胞種の接着性やサンプル溶液の細胞濃度などに依存しており、メーカーの仕様に記載さ

れる標準的な数値からは、本製品の場合実際にはワンオーダー程度低下することがわかっている。また、分取精度を向上させたがゆえ多量の目的細胞がそもそもの分取対象とされない(あるいは種々の安全機構により分取をスキップすることもある)ことも問題である。これまで、jet in air 機構を持つ機種で試製造を繰り返しているが、一例としてあげると、細胞全体のうち約 50%を陽性細胞集団として 4.8 億個の細胞を処理した場合、丸二日近くかけて 3200 万個の細胞が最終的に分取され、その総回収率は 10%以下、陽性細胞の分取効率は高々15%程度でしかなかった。「回収率」以外にさらに生産性を下げる要因として、後培養時の「細胞生存率」が低いということがある。機種ごとに多少異なるが一般に溶媒の流速は数十 km/h と非常に速く、細胞が回収用培地表面に強い圧力で衝突してしまい、ダメージに弱い神経細胞の場合長期的には死滅してしまう。本製品においても、後の培地交換にて死細胞を積極的に除去しない場合は、細胞の死骸が確認できる。現行の製法においては、培養中に死細胞は取り除かれており最終製品ではほぼすべての細胞がドパミン神経前駆細胞として生存していることは種々の試験にて確認済である。しかしながら、上記実測データを踏まえ、生産性という観点で「回収率」や「細胞生存率」を総合的に考えると、現在の機種では事実上最終製品として得られる細胞数が Step2 で準備した全細胞の 10%以下程度で、陽性細胞の内多くの細胞を使用しなかった計算となる。このような、「回収率」や「細胞生存率」を改善するセルソーターが利用できれば、生産性の低さという課題を解決することにつながる。

加えて、規制面の観点からの課題もある。患者に直接触れるものではないため、医療機器の範疇には入らず、セルソーターそのものの治験実施や承認申請の必要性は無いと考えられるが、jet in air 機構では開放環境で分取されるため、商用製造を見据えた GMP 上の無菌環境の担保は困難である。これに加えて、キャリブレーションビーズの材質や製造方法、流路への残留否定等に GMP 対応が必要であるという課題も存在する。

再生医療等製品等の製造時に生じる上記のようなセルソーターの課題を解決するため、新規のセルソーティング技術の開発も進んでおり、jet in air 機構以外の機構を持つセルソーターがいくつか存在している。現存する種々の分取機構や特徴についても図 10 に示した。

既存のセルソーターと本製品の製造に向けた考察

上記にて解説した、セルソーターを用いた再生医療等製品におけるトータルでの生産性向上を達成するためには、上記の各課題に対応したパラメーターを検討し、最適なセルソーターを選択する必要がある。そこで表 5 に、現存するセルソーターについて、分取機構、分取速度、分取精度、細胞ダメージ、分取環境といった 5 つのパラメーターからカタログ上のスペック等を基に整理した。実際上は、細胞の接着性等に依存して最高処理速度が規定されるため意義は大きくないが、カタログ上の分取速度が約 50000cells/sec 以上のものを高速とし、10000-50000cells/sec 程度のものを中速とした。残念ながら、公表されている情報から得られる情報は不明確な点も多く、分取精度は一般論をベースに記載した。また、細胞へのダメージや回収率、分取環境については各機種の機構をもとに推察した。本課題では、機種数の多いマイクロ流路機構と jet in air 機構に絞って以下のように考察した。

表5　現存するセルソーターの比較

機種	分取機構	分取速度	分取精度	ダメージ	分取環境	開発段階
A	荷電	高	高	大	解放	市販
B	荷電	高	高	大	解放	市販
C	荷電	高	高	大	解放	市販
D	荷電	高	高	大	解放	研究開発
E	荷電	高	不明	大	解放	市販
F	マイクロ流路	中	高	小	閉鎖	研究開発
G	マイクロ流路	中	高	小	閉鎖	販売準備
H	マイクロ流路	中	不明	小	閉鎖	販売準備
I	マイクロ流路	低	不明	小	閉鎖	不明
J	マイクロ流路	低	高	小	閉鎖	市販
K	磁力	中	低	中	閉鎖	市販
L	浮力	中	低	小	閉鎖	不明
M	ピエゾ素子	中	低	小	閉鎖	市販

マイクロ流路機構のセルソーター

マイクロ流路系のセルソーターでは、シース液とサンプル液で層流を形成して細胞を流すもの、オイルで形成した液滴に細胞を封入して利用するもの、出来るだけ外圧を与えずにわずかな空気圧でサンプル溶液を微細流路に押し出すものなど、実用化されていないものも含めると多種の機構が考案されているようである。また、蛍光シグナルを元にした目的細胞の分取機構も、空気圧を利用して押し出すもの、メカニカルな弁によって流路を変えるものから、局所的に加熱して流路を移動させるものなどがある。このように、マイクロ流路系と言っても細胞処理の機構は多種にわたるが、一般に、マイクロ流路系を利用することによって閉鎖型のセルソーターの作製が可能となり、無菌性が高く要求されるGMP製造へ応用しやすい。これは、最大のメリットである。一方、これらのマイクロ流路系では、薄く希釈したサンプルを穏やかな条件で使用する設定が多いため、分取速度は中速から低速となる。しかしながら、再生医療等製品の製造のように品質の安定化と最終的な生産性が重要なアプリケーションの場合、短い流路を溶液が穏やかに流れ、またjet in air機構のような電磁的な力や物理的衝突が無いこのような機構では、中途での細胞ロスの低減や細胞ダメージが軽減できる可能性がある。このような観点に基づいた研究は少なく、文献等においてもほとんど情報が無いため今後の生細胞を用いた情報の蓄積は不可欠であるが、jet in air機構で実測された数字と比較すると、分取速度から予想されるほど最終的な生産性は悪くない可能性がある。Jet in air機構のセルソーターの場合、サンプル溶液中の細胞密度が高く、一つの液滴に2細胞以上が入っている場合や分取しきれない細胞が多く存在する。これらは、非目的細胞分取リスクを排除するため、目的細胞の可能性があっても全て無視され、結果的に分取効率が低下する。マイクロ流路系であれば、細胞の濃度が薄いため、このような中途での分取効率の低下が少なく回収率にも期待が持てるかもしれない。仮に細胞ダメージが低いことが実証できれば、回収率の最大化を目指して廃液の再解析・再分取を取り入れるという選択肢も出てくる。従って、個々の処理速度が高くない場合であっても、目的の生産性を達成することが可能になるかもしれない。現在研究開発の進むいくつかの機種も、基本的には似通った特徴を有していると予想され、今後の市販が期待される。

Jet in air 機構のセルソーター

Jet in air 機構は、解放系での分取という大きな問題があるものの、種々の細胞種に対しての多くの実績があり処理速度のポテンシャルや分取精度が高いことは言うまでもない。また、トラブルに対する対応についても多くの事例がありメンテナンス面での信頼は厚い。これらは品質面の GMP という観点からは最大のメリットである。従って、これらの機種の改良も課題解決には有用である。特に、ダメージに強い細胞種や大量の細胞処理を目的としない場合は、十分に活用できる可能性はある。しかしながら、一般に研究用途の現行機種は、再生医療等製品の製造という観点では、前述のように現実的な高速化に限界があるのにもかかわらず、レーザーの本数や蛍光フィルタが多いなどハイスペックであり、CPC 内に設置するには機器が複雑かつ大型で管理に多大なエネルギーを必要とする。また、稼働に必要なシース液の容量やコンプレッサーによって粉塵の発生が懸念される加圧機構など研究用途と工業用途の間には大きなギャップがある。また、最大の課題となる無菌管理については、全ての流路と分取部分を完全ディスポーザブル化しなければならない。これらの課題に対しては、GMP への対応を踏まえたハード面の大改良が必須となるためセルソーターメーカーの負担は大きく、市販に近い製品はまだ無い。改良の前にこれら機種を使用する場合は、機器の特性を勘案してクリーン環境に設置し、製造工程を踏まえたベリフィケーションなどのソフト対応が必要になるであろう。また、前述した回収率の悪さや細胞生存率の低さによる最終的な生産性の悪さを根本的に改善することにはならないため、仮に GMP 対応機種となっても台数を増やして同時稼働する必要があり、設備投資額が高額となる。さらにこの場合、マイクロ流路系と比較してディスポーザブル化した消耗品のランニングコストが大きくなってしまう懸念も残る。

小括

以上、現存するセルソーターについて網羅的な調査と本製品製造をモデルケースとして考察を行った。残念ながら、現在のところ市販されている既存の機種は全て研究用途であり発展途上である。分取機構別では、jet in air 機構では機種のデチューンと GMP 対応及び消耗品のコスト削減の推進、マイクロ流路タイプでは処理速度向上に向けた取り組みや GMP 対応が必須であると考えられた。現時点では双方共に一長一短であると言えるが、生産性にかかわる情報が蓄積されれば、再生医療等製品の製造にはマイクロ流路系が主流になっていく可能性もある。各セルソーターメーカーにおいてもこれらの課題は独自に把握して対応を進めているようであるが、本製品のような具体的な事例に基づいた機種開発が最も効率的である。今後、セルソーターメーカーからの機種開発が待たれる。

まとめ

本課題において、治験以降の開発段階における抗体の製造管理及びウイルス安全性戦略を構築し、生物由来原料基準に対応するための PMDA への薬事戦略相談事前面談を実施して対面助言の準備を進めた。また、抗体や標識抗体の物理化学的特性を評価指標とした品質管理項目を設定し、抗体の製造ごとに使用できる基準とした。さらに、抗原抗体反応に基づいた生化学的な指標により、ELISA 及び強制発現細胞を用いた抗体あるいは標識抗体の品質管理手法の原型を開発した。開発した評価手法は、抗体の製造ごとあるいは GMP 準拠での本製品製造時の日常的な抗体の品質評価や安定性評価等の評価に活用できる。

最終製品への抗体残存のリスク評価に向けて、開発した生化学的な試験法を利用した今後の定量的議論の準備を行い、今後の PMDA への薬事戦略相談の原案とした。セルソーターに関しては、現存機種を網羅的に調査し、処理速度、回収率や処理時の細胞ダメージ等を踏まえた総合的な本製品の GMP 下での使用可能性を検討し、将来的な導入戦略を検討した。

③　凍結保存法の評価手法の開発

＜諸言＞

再生医療等製品の出荷形態としては、出荷前に全ての試験を終え、”off the shelf”での安定供給が出来るような形態が理想である。培養状態で出荷することは、製造スケジュールの管理が困難である上、ウイルスや無菌試験の結果が投与後にしか判明せず予期せぬリスクの要因ともなる。治験や承認後の事業展開を考慮すると、細胞移植手術までの時間や準備を標準化し易い凍結保存状態での出荷が望ましいことから、本製品に対する凍結保存のプロセスへの導入を検討している。凍結保存プロセスが導入できれば、ロットサイズ拡大と相乗効果を引き起こし、最終製品での各種試験に必要なサンプル量が数十分の一となり、また製品の輸送も容易となり低コストかつ安定した供給が達成できる。施設維持の面からも、製造施設の定期的な無菌シミュレーションが柔軟に実施可能となることも大きなメリットとなる。しかしながら、本製品のような三次元構造を保持した神経細胞に対して、細胞凍結プロセスが品質に与える影響を評価する有効な手法は存在しない。そこで、細胞凍結が品質に与える影響について検討する。種々の条件にて作製した凍結細胞の in vitro 評価結果を動物への移植データと比較検討し、神経細胞に特異的で高精度な凍結保存プロセスの評価手法を開発する。また、細胞の凍結プロセスに用いる凍結保護剤については、工程由来不純物としての取り扱いが予想されることから、その洗浄の必要性や医薬品の残留溶媒ガイドライン上の取り扱いについて検討する。

細胞移植後の効果を予測する in vitro 評価法の開発

再生医療等製品においては、通常の生化学実験用途と異なり解凍後の凍結細胞を速やかに使用することが想定されている。そのため、細胞の生存率のみならず、移植後の生着能力、機能の保持といった点が非常に重要となる。このような細胞の機能評価には、実際に疾患モデル動物への移植実験が妥当である。しかし動物への移植は、労力、時間の点から問題があり、代替となる in vitro の評価法が望まれる。

凍結傷害に弱い神経細胞や、均一に凍結することが難しい大きな組織状の細胞は、特に機能を維持したまま凍結することが難しいため、神経、細胞塊に適した高感度な評価手法が必要となる。そこで、GMP 製造品等を含む市販されている幅広いバリエーションの凍結保存液を用いて、形態観察・細胞生存率・突起伸長等異なる観点からの細胞評価を中心に各種条件でデータ採取を行い、神経・細胞塊に適した条件を絞り込んだ。その後、絞り込まれた条件で凍結した細胞を動物へ移植し、in vitro のデータと比較することで、移植後を予測する評価手法の開発ストラテジーとした(図 1)。

市販凍結保存液の評価

まず、凍結後の膜透過性を指標にした細胞生存率で各種凍結保存液を評価した。ドパミン神経前駆細胞(最終製品：分化誘導 Day 28)の細胞塊を回収し、各種凍結保存液に浸透後、プログラムフリーザーを用いて-1 ℃/min で-80 ℃まで冷却し液体窒素に移動した。定法にて 37℃の湯浴で融解し 1 日後に評価を行った結果、DMSO フリーの凍結液 F のみで生存率の低下が認められ、他の試薬に関しては非常に高い生存率を示した(図 2)。膜透過性の凍結保護剤を含む条件で高い生存率が認められたことから、ドパミン神経前駆細胞塊の凍結には膜透過性の凍結保護剤が必須であることが示唆された。また、膜透過性を指標にした生存率評価法では、測定時点ですでに細胞の形態をとどめない死細胞は除外された条件で測定を行なわれることが多く、全般に生存率は高くなる。すでに、非凍結細胞と凍結細胞との間で生存率

が僅差であることから、膜透過性を指標にした評価法はさらに詳細な検討を行う上で、系の評価感度が飽和していると考えられた。

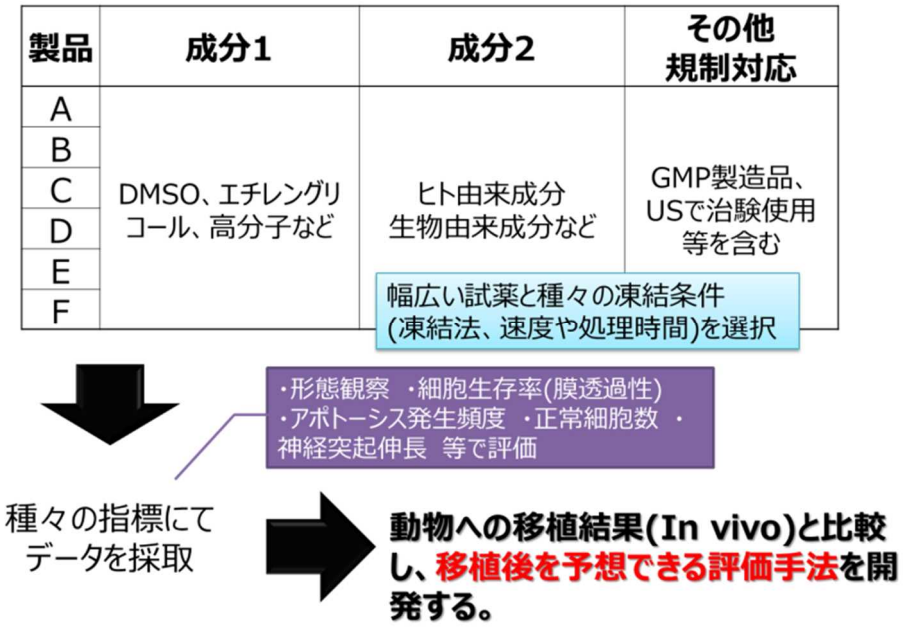


図１ 評価手法の開発ストラテジー

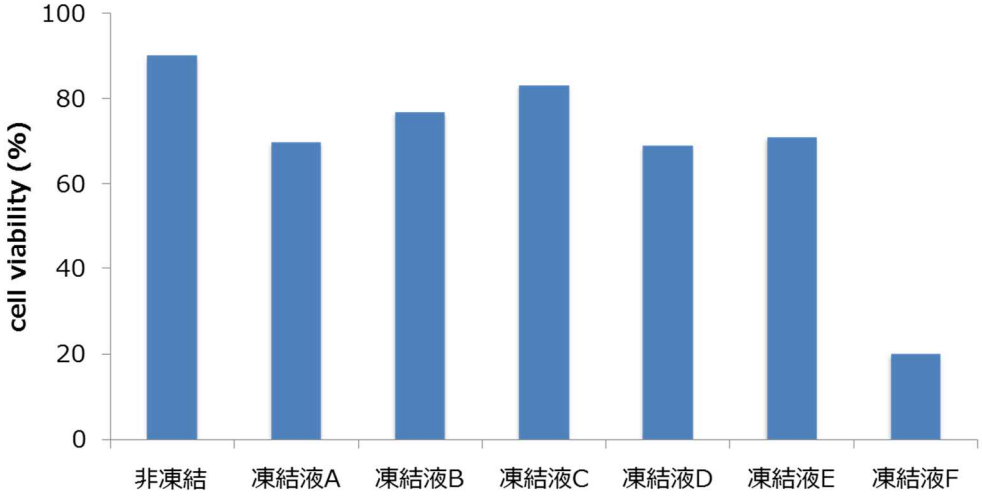


図２　膜透過性による細胞生存率評価
（凍結融解後１日目）

高感度 in vitro 評価系の検討

上記の結果より、さらに高感度の評価項目として細胞の生死より高次な機能面での評価項目を検討することとした。神経細胞は神経線維を伸ばし、ターゲット神経に対しシナプスを形成し電気信号を伝達することが機能の原理である。移植後のドパミン神経前駆細胞が有効性を発揮するためには、脳内で生

着、成熟し、神経突起を伸長させシナプス形成を行う必要がある。そこで、新たに凍結保存、融解後の神経突起伸長の変化を評価できる系の確立を行った。本評価で細胞の接着能力および移植後の神経機能が同時に評価できる可能性があると考えられる。

細胞塊(Day28)を凍結、融解後、接着培養を行った。再培養 3~5 日目に細胞を固定し、神経細胞マーカーである PSA-NCAM 抗体で細胞を染色し、神経突起の形態を観察した(図 3)。

細胞塊を各冷却速度および凍結保存液で凍結し、上記評価を行った。その結果、どの冷却速度でも安定して凍結液 B で最も突起数が多い結果となった。また、凍結液 A、C は冷却速度 a で良好な突起伸長を示したが、その他の冷却速度では突起数は少なかった。各条件での差が明確に評価可能であることから、より高次かつ高感度な評価系として、神経突起伸長評価が使用できる可能性が示唆された。

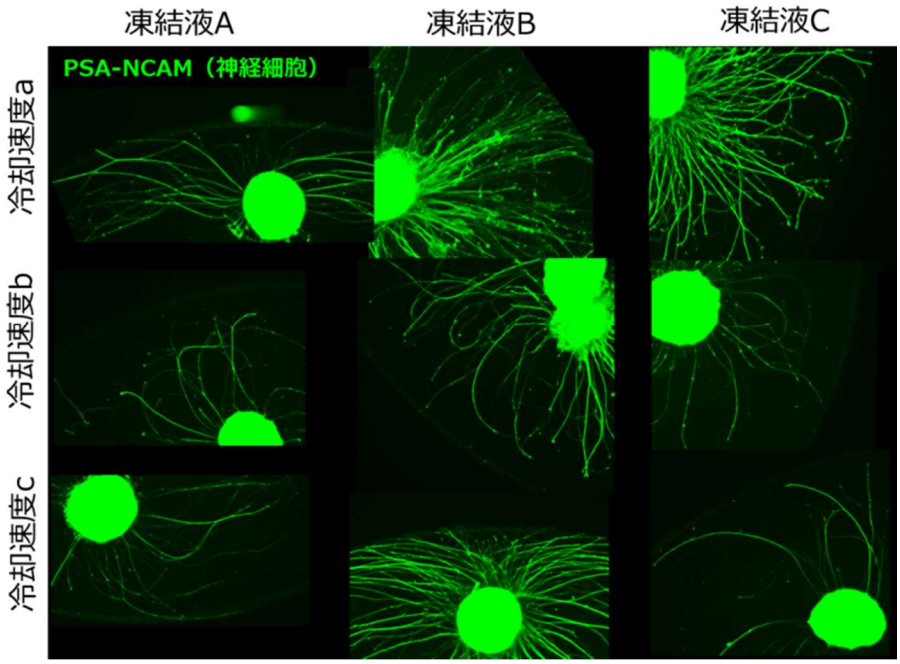
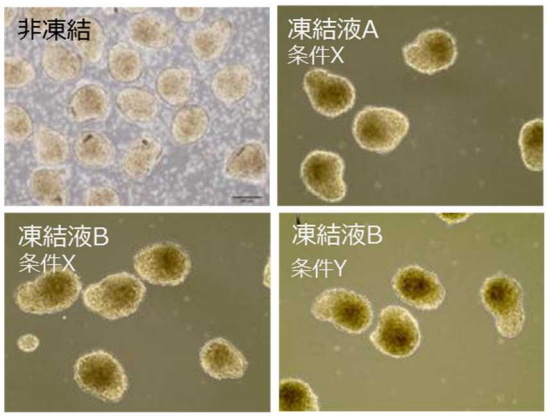


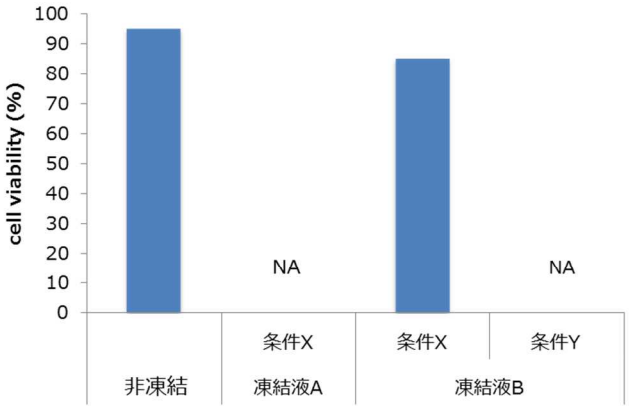
図 3　神経突起伸長評価（凍結融解後 3 日目）

移植実験結果との相関性の検討

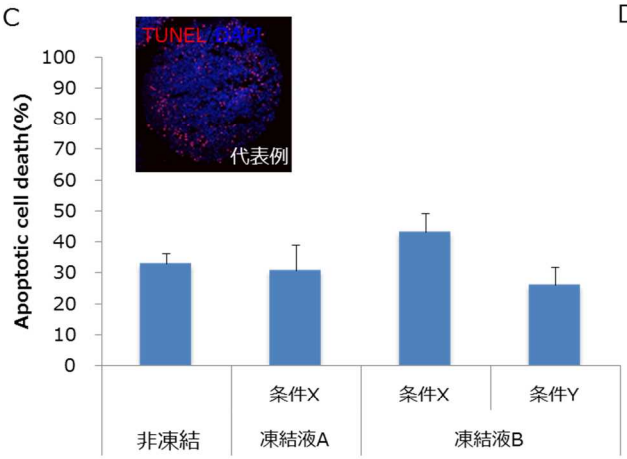
検討中のどの in vitro 評価項目が実際の in vivo での移植実験と相関するかを検証するため、各種評価で比較的良好であった条件を暫定的に選定し、上記方法で凍結した細胞を正常ラット線条体に移植した。この移植に用いる細胞の in vitro での各種評価結果は以下の通りであった(図 4)。細胞塊の形態評価では、非凍結細胞と比較して凍結細胞で細胞塊が部分的に崩れている傾向が認められたが、各凍結群間では大きな差は認められなかった(図 4A)。膜透過性を指標にした生存率評価では、凍結細胞に関しては、凍結液 B(条件 X)で凍結した条件で非常に高い生存率が保たれていた(図 4B)。TUNEL 染色により融解 24 時間後の細胞のアポトーシス細胞の割合を評価した結果、凍結液 B(条件 X)でアポトーシスを起こしている細胞が多い傾向があるものの、非凍結細胞においても一定のアポトーシスが認められ、凍結細胞の各条件で大きな差は認められなかった(図 4C)。次に、一定個数の細胞塊に含まれる正常な形態の細胞数をカウントして生存細胞数として評価した結果、凍結液 B(条件 Y)＞凍結液 B(条件 X)＞凍結液 A(条件 X)の順で高い数値を示した。凍結液 B(条件 Y)では非凍結細胞とほぼ同等の生存率を示した。ま

た、ドパミン神経系マーカーで免疫染色し定量した所、有意ではないものの凍結細胞でドパミン神経前駆細胞マーカーであるFoxa2およびドパミン神経細胞マーカーであるTH、Nurr1陽性細胞が減少する傾向が認められたがその組成に大きな差は無かった(図4E)。また、突起伸長評価では、非凍結細胞と比較して凍結細胞で突起の長さが短い傾向が認められた。画像解析ソフト(winROOF)を用いて神経突起の数と長さを面積として定量化した結果、各凍結条件間で大きな差は認められないが、非凍結細胞と比較して凍結細胞では神経突起の顕著な減少が認められた(図 5)。これらのことより、凍結融解により、細胞は特異的な神経機能を失うというよりはむしろ、細胞の組成は保持したままで、接着能力を含む全体の活性が低下しているという印象を受けた。従って凍結細胞では、移植後に生存する一定の細胞数を確保し、ホストの脳に接着して生着さえすれば非凍結と同等の効果を持たせられる可能性が考えられた。

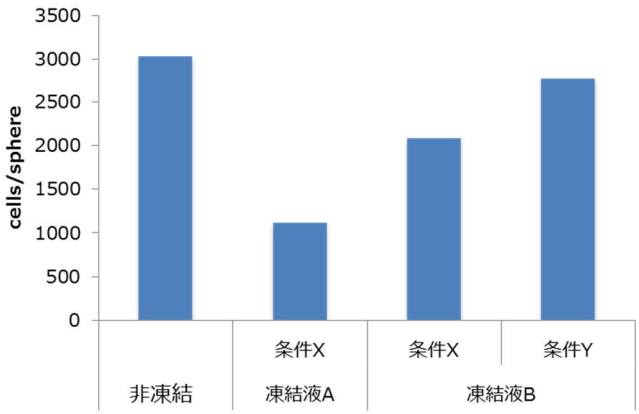




C



D



E

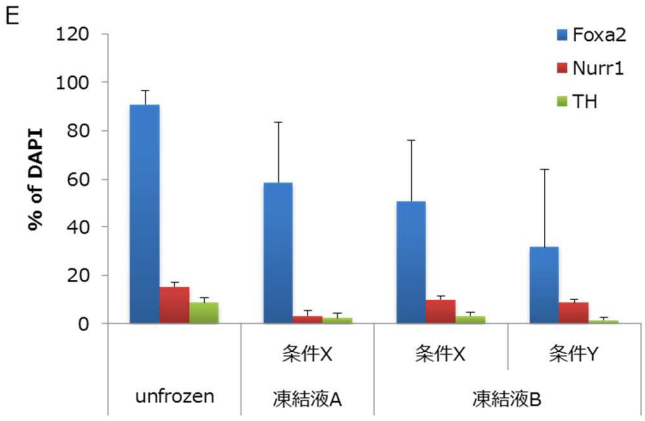


図4　移植に用いた凍結融解細胞の各種評価結果　(凍結融解後1日目)

A：形態観察

B：膜透過性による細胞生存率

C：アポトーシス評価

D：細胞数カウントによる生存率評価

E：ドパミン神経系マーカーの発現

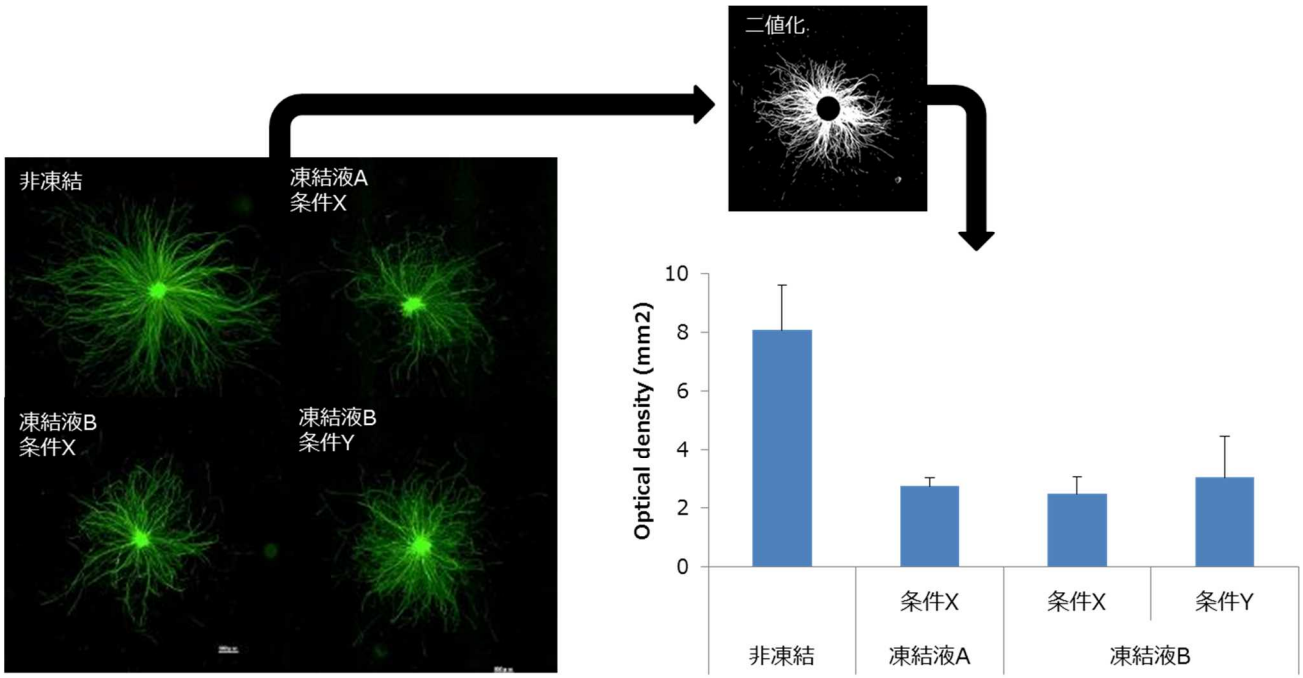


図 5　移植に用いた凍結融解細胞の神経突起伸長評価（凍結融解 4 日後）

次に、これら細胞の正常ラットへの移植実験を行った(図 6)。免疫不全動物の線条体に非凍結細胞、凍結細胞をそれぞれ 400,000 細胞ずつ移植し、移植 1 か月後に灌流固定して脳を摘出し評価に用いた。ヒト核抗体および TH 抗体で組織を染色し、ヒト細胞を定量して生着細胞数を算出した結果、非凍結細胞と比較して凍結細胞では生着率の低下が認められた。一方、生着した細胞あたりの TH 陽性細胞を定量化した結果、非凍結細胞および凍結液 B では生着細胞に対するドパミン神経の割合に大きな差は認められなかった。最も生着率の低い凍結液 A(条件 X)の条件ではドパミン神経は認められなかった。移植 1 か月の時点では、移植細胞は成熟途中の段階のため TH 陽性となるドパミン神経が少なく正確性に欠ける評価である。しかしながら、in vitro の生存細胞数が多く凍結細胞の中で生着率の高かった凍結液 B の条件でドパミン神経が認められたことから、一定数以上の生存細胞を移植することが出来れば、接着して生着できた細胞は TH 陽性の成熟ドパミン神経細胞に向けて順調に成熟していくことが示唆された。

In vitro 評価系の妥当性について

In vivo と in vitro を比較した結果、細胞数カウントによる細胞生存率評価は、凍結群間の差を評価する上では最も高感度であった。しかし、細胞生存率と生着率の間には大きなかい離があり、その差をもっともよく反映していたのは突起伸長評価であった。移植した細胞のうち実際に生着した細胞は非凍結細胞でも 6%である。過去の報告でも、移植後のドパミン神経の生着率は移植細胞の 5-10%程度であり、移植した細胞の大部分は生着しない。その原因としては栄養因子の不足、移植時の機械的損傷、アノイキス(細胞間および細胞外マトリックスとの結合が失われたことにより誘導されるアポトーシス)などが挙げられる。凍結過程では脱水等による膜傷害に加え、細胞接着因子のインテグリンの発現低下が起こることが肝細胞などで報告されており、細胞の接着能力の低下が予想される。突起伸長の評価が in vivo の生着率を最もよく反映した理由として、細胞の接着能力を評価することにより、移植後に生着できない細胞を正確に評価できた可能性が考えられる。これらの in vitro, in vivo の検討結果を合わせて考

えると、本課題で開発した 2 種類の in vitro 評価系を用いて良好な条件を探索すれば、ホストに届けられる生細胞の比率と接着能力の両者の向上が期待でき、最終的に得られる成熟ドパミン神経細胞の数を増やすことにつながると言える。

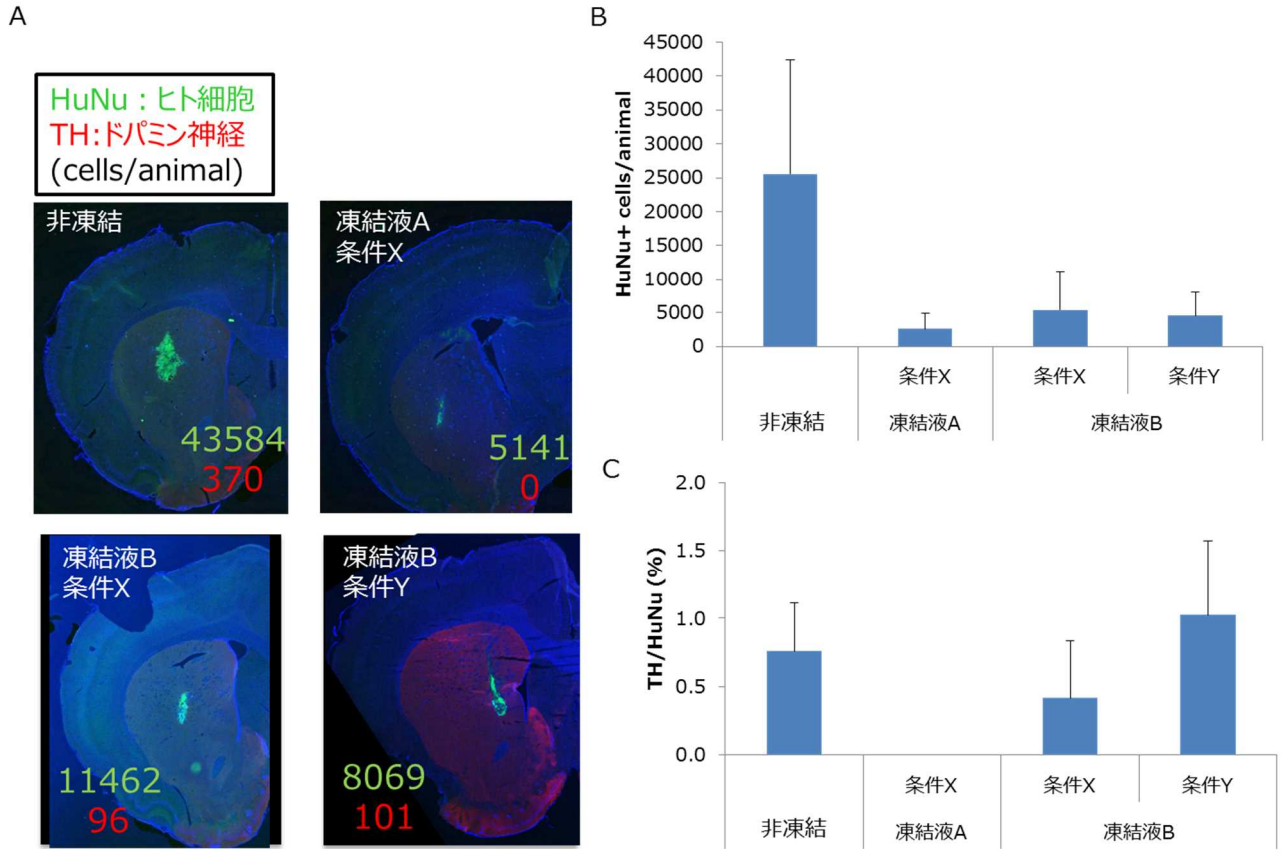


図 6　ラット線条体へ移植後の組織評価（移植後 1 か月）
A：HuNu/TH 染色像（代表例)B：生着率　C：生着細胞中のドパミン神経の割合

本課題で開発した in vitro 評価手法の実用性を調べるために、両評価系を用いて、凍結プロセスに導入できるような低分子化合物の評価を行った。神経細胞の生存及び機能改善の報告のある化合物 A および B を、24 または 48 時間前処置して細胞を凍結した(図 7)。その結果、化合物 A および B の添加により生存率および突起伸長が増加する傾向が認められた。この結果は、それぞれの低分子化合物の期待した作用によって、細胞死を抑えて、また神経細胞としてより良好な環境で、凍結融解されたからである。上記のような化合物は、in vivo 移植時においても同様に、生存率と接着能力の改善を介した有効性の向上に寄与することが期待できる。以上より、開発した評価手法は十分な実用性を持つ可能性があることが示された。

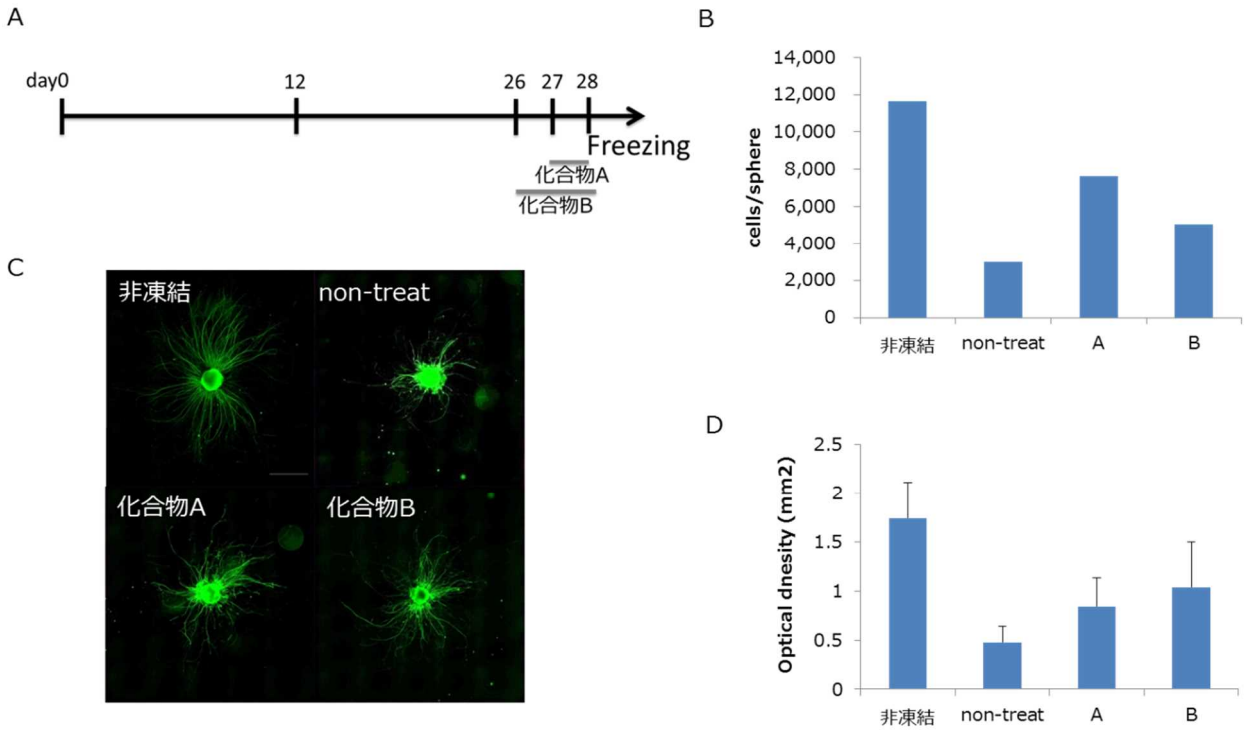


図 7　新規評価系を用いた凍結前の化合物処理評価

A：実験計画　B：細胞数カウントによる細胞生存率　C, D：神経突起伸長評価

臨床使用を想定したその他の検討

次に、凍結保存液中に含まれる残存 DMSO 量とそのリスク評価を実施した。医薬品の工程由来不純物に関しては、個々の不純物ごとに残存量を推定又は実測し、その安全性を検証することが原則となる。凍結保存プロセスの導入には、最終工程に凍結保護物質として DMSO が用いられる可能性があるため、その残存量および洗浄工程における除去率を計測し、ヒト投与時の安全性リスクを考察した。

本実施事項にて検討した凍結方法では、凍結保存液による前処理の平衡化時間として 30 分ないし 60 分を設定している。そこで、本検討ではドパミン神経前駆細胞を 10 % DMSO 溶液に氷上で 60 分間浸透させ、その後、上清を完全に除去して 10 倍量の PBS で 2 分間指定回数洗浄したものをサンプルとした。得られた細胞サンプルの表面又は内部に存在する DMSO 濃度を GC/MS で測定し、想定される患者一人当たりの投与量に換算した(図 8)。その結果、洗浄なしであっても、推定投与量で 4.7 mg/回と、医薬品の残留溶媒ガイドラインで規定される DMSO の許容量 50 mg/day よりもはるかに低い値であった。また、DMSO 量は、2 回の PBS 洗浄により 20 倍以上も減少し、0.2 mg/回まで減少した。

以上の検討結果より、凍結保護剤として含まれる DMSO は複数回の洗浄操作によって無視できるレベルであることを示した。

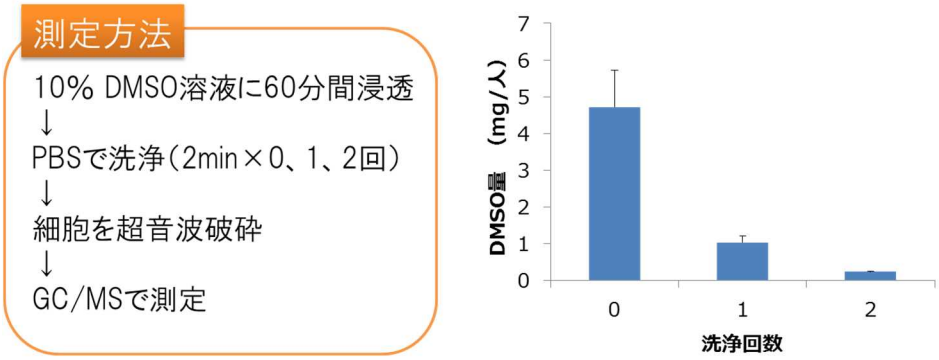


図 8 最終製品に残存する DMSO のリスク評価

本事業において開発した評価手法により見いだした良好な凍結方法を用い、想定される実製造を模して病態モデル動物への移植サンプルを作製して凍結保存した。ここでは、臨床で使用される株と同等の製法にて作製された iPS 細胞株を用い、暫定的に設定した品質管理項目の in vitro 評価を実施し、現在これに併せて in vivo での有効性・安全性の解析を実施中である。現在、予備検討段階ではあるが、凍結細胞と非凍結細胞の同等性を示唆する結果を得つつある。今後、長期間の観察を含め、更なる有効性、安全性評価へと進めていく予定である。

まとめ

今回、凍結プロセスの評価手法開発のモデルケースとして、iPS 細胞由来ドパミン神経前駆細胞の凍結方法とその評価方法の検討を行った。従来の in vitro 評価結果と in vivo のデータを比較することにより、一般的に用いられる生存率評価やアポトーシス評価は、神経細胞塊の凍結感受性への感度が低いこと、移植後の挙動と相関が低いことを見いだした。そこで、in vivo と相関が高い評価系として神経突起伸長評価を確立し、また、細胞単位の生存率の指標としては、正常細胞数のカウントが最も高感度であることを見出した。さらに、構築した評価系で低分子の評価を行った結果、実際に凍結細胞の生存率の向上、突起伸長の亢進を示す化合物が取得された。

④　非臨床有効性と安全性についての予備検討と理論構築

＜諸言＞

これまでの研究により、iPS 細胞の起眠ごとに最終製品として得られる細胞数が変動し、ロット毎の生産性や有効性、安全性に係わる品質がバラつくことが解っている。この現象は、程度の差こそあれ生物を製造対象とした再生医療等製品においては避けられない問題である一方で、商用製造においてはGMP への対応として適切に管理される必要がある。商用での連続製造時における管理手法を開発する戦略として、我々が既に得ている多数の非臨床試験の結果をベースに種々の in vitro 解析データを取得し、有効性や安全性を担保した上で許容できる品質の基準幅を設定することが出来ないかを考えた。ここでは、臨床で使用される予定の株と同等の製法で作製された iPS 細胞株を使用して、製造時のバラつきや品質の差異を把握する手法を開発するための種々の検討を実施した。

ドパミン神経前駆細胞の品質のバラつきを評価する手法の開発

用意した iPS 細胞について、現行の手法にてドパミン神経前駆細胞を継代毎に作製した。得られた細胞の中間体における目的細胞陽性率、最終製品において有効性や安全性に関連する指標、細胞の形態評価、網羅的遺伝子解析等を実施した(図 1)。この結果、中間体での目的細胞（中脳 floor plate マーカー陽性細胞）の陽性率は、平均約 40%程度であり、目的細胞をセルソーターで分取した後の再解析結果では、目的細胞は約 90%となりバラつきは小さく抑えられた。そこで、本工程による特異的な細胞濃縮は、有効性・安全性を向上させる役割のみならず、ロット間の品質安定化にとっても極めて有意義なもので

あり、管理項目の一つになり得ると考えられた(図 1A)。セルソーティングによって分取した細胞を用いて細胞塊を作製して浮遊培養し(Step4)、得られた最終製品であるドパミン神経前駆細胞を用いて、有効性や安全性に関連する指標について評価を行った。具体的には、ドパミン神経前駆細胞のマーカーの一つである Foxa2、安全性を示す品質評価項目の一つとして増殖性細胞のマーカーKi67 の免疫染色を実施した。最終製品に含まれるすべての細胞(DAPI にて染色)に対する Foxa2 陽性細胞の割合は約 90%、Ki67 陽性細胞は約 10%程度であり、バラつきは極めて小さかった。さらに、ドパミン神経前駆細胞塊の形態について顕微鏡により観察、画像処理し、種々のパラメーターについて定量的に評価した(図 2)。細胞塊の画像上の面積は、CV 値が 22.0 と比較的バラつきは大きかったものの、円形度、フェレ系比及び周囲長に対する包絡度の CV 値は小さくほとんどバラつかず、0.9 以上の高値を示した。画像評価では、パラメーターによりバラつきが大きかったものから小さかったものまであり、このような形態情報も、連続製造におけるロット毎のバラつきを反映する指標であると言え、商用製造における評価項目の候補となる。

次に、このドパミン神経前駆細胞の網羅的遺伝子発現解析を実施した。網羅的遺伝子解析には、Affymetrix 社の Gene chip (HG-U133Plus2)を利用し、全てのサンプルにおいて低発現な遺伝子群及び、サンプル間に変動が認められない遺伝子群を除いた約 20000 遺伝子を解析対象とした。各サンプル間のグローバルな遺伝子発現の差異は細胞の品質の違いを端的に反映するとの考えにより、この 20000 遺伝子による主成分分析を行った。この結果、原材料の iPS 細胞、分取後の中間体、最終製品は、明確にプロットされる位置が異なっていた。しかしながら、いずれの継代数のサンプルにおいても、Step4 で得られた最終製品はほぼ同じ場所にプロットされた。これは、継代数 P32 から P44 の iPS 細胞から得られたドパミン神経前駆細胞の性質が極めて類似していることを示している(図 1B)。また、ドパミン神経に

関連した遺伝子である Foxa2 や Nurr1 は、いずれも 100 倍近くの発現上昇が認められており（図 1C）、別途実施した免疫染色による評価で得られた結果と一貫性があった。また、これらの遺伝子の各サンプル間のバラつきは小さいことも明らかとなった。

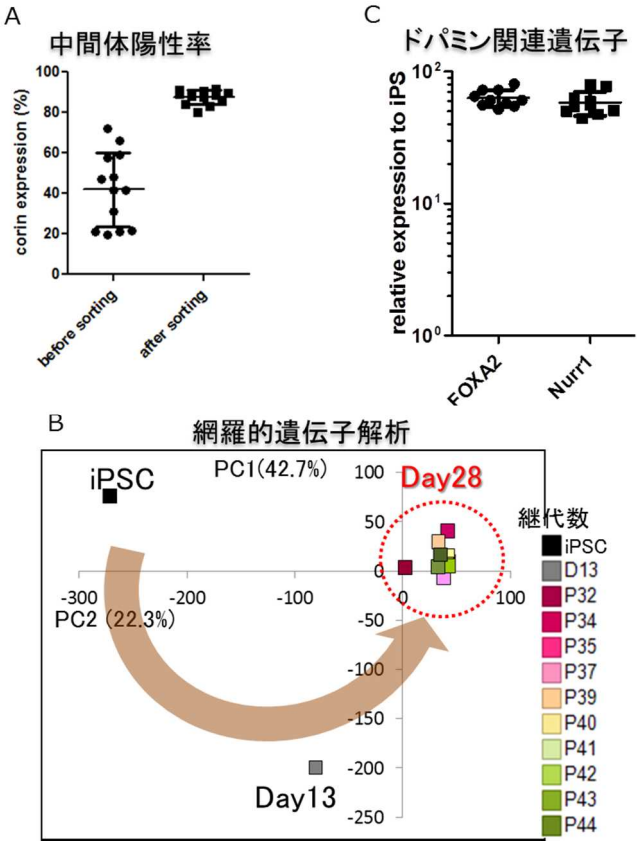


図 1 継代毎に作製したドパミン神経前駆細胞のバラつき評価

A: セルソーティング前後の中間体陽性率

B: 網羅的遺伝子 解析の主成分分析

C: 主要な遺伝子の発現量

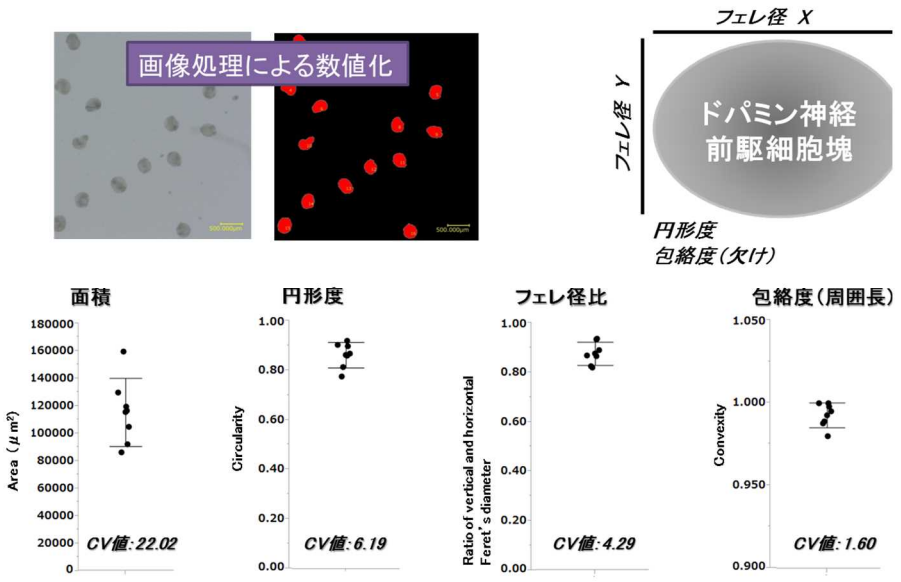


図 2 ドパミン神経前駆細胞の画像データによるバラつき評価

以上の検討結果より、セルソーティングを利用した現行の製造プロトコールは極めて頑健性が高く、原材料 iPS 細胞の継代を重ねてもバラつきを抑えた安定的な製造が可能であることが示された。また、製造工程の頑健性が高かったことから、工程内の重要なポイントにおいては、製造毎の許容幅を設定して逸脱管理に活用できる可能性が示された。また、データは示していないが、ドナーの異なる同じ製法の iPS 細胞株を使用しても、in vitro の解析や網羅的遺伝子解析において上記の結果とほぼ同じ結果が得られている。これは、このような評価手法が株間を超えて普遍的に使用可能であることを示している。再生医療等製品の場合は、通常の化学合成品とは異なり、定量的な機器分析により製品の構造や物性、規格値への合致を確認することが難しい。網羅的遺伝子解析等の分子生物学的手法や生化学的手法を駆使した評価手法を利用することで、其々の細胞の真の状態を把握し、ロット毎の最終製品のバラつきや品質の差異を検出することが可能であると考えられた。また、今後試製造を繰り返してデータを蓄積すれば、本評価手法は製造毎の逸脱管理や許容幅設定まで可能な強力なツールとして活用できる。

開発した評価手法の実用性評価

次に、上記で開発した評価手法が、実用的な検出力を持つかどうかについて検討した。ここでは、Step4 の培養期間がドパミン神経前駆細胞の性質の変化におよぼす影響について評価した。中間体(Day13)及びセルソーティング後の浮遊培養中の各段階(Day19, 24~32, 42 の各ポイント)で細胞を回収し、網羅的遺伝子解析に供した。この解析では、神経細胞のサンプル間比較をより強調するため、遺伝子発現が明確に異なる原材料 iPS 細胞は解析対象から除くこととした。

全サンプルで発現していない遺伝子及び、サンプル間に変動が認められない遺伝子を除いた遺伝子群を解析対象として階層型クラスタリング解析を実施した(図 3)。

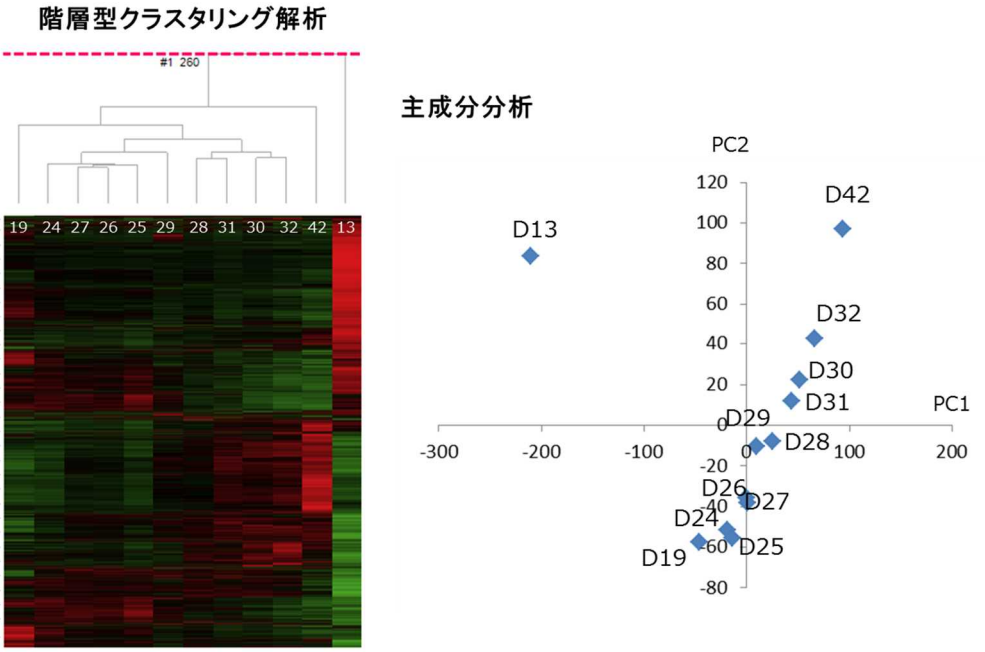


図 3　Step4 の培養期間がドパミン神経前駆細胞の遺伝子発現変化におよぼす影響

この結果、中間体の Day13 は明らかに他のサンプルとは異なり、続いて Day19 と Day42 が異なるクラスターに配置された。さらに、Day24, 27, 26, 25, 29 と Day28, 31, 30, 32 は小さなクラスターを作っているものの大まかには同じ群に属することが明らかとなった。また、原材料 iPS 細胞を含めた遺伝子群の発現を用いて主成分分析を実施し、主成分 1(寄与率 49.7%)を X 軸、主成分 2(寄与率 21.6 %)を Y 軸としてプロットした。この結果、Day19 から Day42 にかけて、主に主成分 1 軸に沿って経時的に徐々に性質が変化していることが示された(図 3)。今回解析を実施したこれらのサンプルについて、過去の経験を踏まえて以下のように考察した。Day19 の細胞は、ドパミン神経前駆細胞としては分化程度が低く、一方、Day42 の細胞は分化程度が高いため、病態モデル動物への移植検討により、ホスト脳内での TH 陽性ドパミン神経としての生着、成熟あるいは行動薬理学的解析において差異を認めている[5]。これらのことを合わせて考えると、本研究課題で開発した評価手法は、in vivo における有効性、安全性の違いを明確に切り分けることが出来るような感度であると言える。今後は、in vivo での評価データをさらに蓄積し、有効性や安全性面で真の境界となるタイミングの絞り込みや、開発した評価手法を用いたロット間の同等性評価等にも活用していく予定である。

まとめ

本事業の実施により、in vitro の評価指標、培養終了時の形態解析や網羅的遺伝子解析を用いることで、製造時のバラつきや品質の差異を把握できることを明らかとした。また、試製造を繰り返すことで、逸脱管理に用いることのできる基準値をパラメーター毎に設定することも可能であることを示した。本評価手法は、再生医療等製品の製造プロセス改良時における同等性評価やロット管理戦略の理論構築に応用可能である。

4. まとめ

iPS 細胞等を原材料とした再生医療等製品を事業として確立するためには、「生物由来原料基準や種々のガイドライン等の規制上の要求に対応した上で、再現性のある GMP に準拠した製造プロセス構築」が不可欠である。一方で、iPS 細胞技術は日本発の極めて優れた技術ではあるものの、未だ研究用器材や研究用試薬が用いられ、実験室レベルでの高度な手作業の単純移行による産業化、ロットサイズ拡大が中心である。このような形態をとる限り、産業化においては生産性やコスト、品質の安定性に課題が残り、いわゆる「ダーウィンの海」は超えられない。

そこで、平成２７年度の本研究開発事業においては、製造プロセスを医薬品医療機器等法などの各種規制に準拠させ、また低コストで再現性の良い大量生産を確立するために必須となる、①自動培養装置の導入に伴う加工プロセスの改良時の妥当性評価、②抗体でのセルソーティングプロセスの評価手法の開発、③凍結保存法の評価手法の開発を計画した。さらに、これらの変更に伴う現行法との同等性評価手法を確立するための基礎データ取得を目的として④非臨床有効性と安全性についての予備検討と理論構築、の計 4 課題を設定し、実施した。

①　自動培養装置の導入に伴う加工プロセスの改良時の妥当性評価

本課題において、GMP に準拠した商用製造で必要となるロットサイズ拡大と品質の向上が両立可能な、閉鎖系大面積プレートを利用した自動培養装置の導入妥当性を検証した。iPS 細胞の増殖率、未分化マーカー遺伝子の発現量、中間体における中脳 floor plate マーカーの陽性率、最終製品での免疫染色などの種々の評価指標で手培養と比較検討し、同等性を評価した。また、網羅的遺伝子解析を行い、遺伝子発現レベルで同等性の評価データを重ねた。本事業の課題④においては、網羅的遺伝子解析を評価手法とした解析手法が、細胞の性質の違いを端的に表現することを示した。従って、本課題で示した種々の比較データから、開放系と閉鎖系で培養した両細胞は同等であるとことが明らかとなった。ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞を原材料とした再生医療等製品では、分化前の原材料の状態と分化後の最終製品の状態は密接に関連していると言われている。例えば、iPS 細胞の時点での状態が悪いと、分化誘導が上手くいかない、という現象は実験室では散見される。また、このような問題を解決するために、さらに未分化性の高い naive state の多能性幹細胞を作製しようとする試みも世界的に盛んである。iPS 細胞は本製品の原材料の一つであるが、本課題では未分化性の維持などの表面上の性質の評価にとどまらず、約 1 ヵ月間の分化誘導プロセスを経た最終製品まで経時的に同等性を比較検証したことは大変意義深い。これまで、iPS 細胞の自動培養装置はいくつか存在しているが、GMP 準拠下での大面積プレートによる閉鎖系大量培養を目指した装置は未だ存在していない。我々が本事業で証明を試みた自動培養装置の導入妥当性検証プロセスは、新たな再生医療等製品の製造において装置化を目指す際、研究室レベルから工業レベルへの飛躍に参考にしていただきたい。

②　抗体でのセルソーティングプロセスの評価手法の開発

本課題において、治験以降の開発段階における抗体の製造管理及びウイルス安全性戦略を構築した。これは、抗体医薬品における GMP 管理や ICH-Q5A のガイドライン等を参考に構築したものであり、現在対面助言の準備中であるが当局の要求を満たすと考えている。また、抗体や標識抗体の物理化学的、生化学的指標に基づいた品質管理手法を開発した。これにより、当局に示すべき残存抗体のリスク評価にも対応が可能となる。セルソーターに関しては、本製品を具体的な事例として既存セルソーターについ

て調査、検討し、現行機種の課題を抽出して再生医療等製品の製造に相応しい機構を提案した。本製品は、再生医療等製品の製造に抗体によるセルソーティング技術を世界で初めて利用するものである。再生医療等製品の製造に抗体を使用したプロセスを考える場合には、通常は研究用途に使用していた抗体を用いることになると予想され、使用量や頻度の増加に伴って品質を研究レベルから GMP 管理レベルへと厳格化させることが課題となる。その主なものは、製造管理やウイルス安全性戦略であり、また厳密な出荷判定基準の設定や安定性評価、日常的な品質管理手法の確立などである。本事業において抗体の管理手法を開発したが、異なる抗原を対象とする場合も、同様のプロセスを踏むことで GMP に耐えうる管理体制が効率的に達成できる。従って本事業で得られた成果は、抗体による選別工程を経て製造する次世代再生医療等製品全てに応用可能であり汎用性が高いと考える。

③　凍結保存法の評価手法の開発

本課題において、三次元構造を持つ神経細胞塊に特異的で in vivo でのデータと相関の高い高感度評価手法を開発し、これを用いて適した凍結法の探索を実施した。本事業で開発した評価法は神経細胞の生着、神経回路の構築能力を評価していると考えられる。そのため凍結細胞の評価として、神経一般に使用できる。特に本製品のような細胞塊の場合は細胞を分散させることなくそのまま接着させて評価することができるため、酵素処理等によるアーティフィシャルな影響も少ない。また、今回の検討により in vitro での細胞接着能力の評価が in vivo での生着能力と強く相関することを示した。細胞表面の接着因子を介した生存シグナルの消失よる細胞死は多くの接着細胞に共通する現象であり、凍結による接着因子の傷害により移植細胞の生着は大きく影響を受けると考えられる。そのため、他の臓器や細胞においても、細胞の接着能力を評価することで、移植後の生着を予期できる可能性があり今後の研究発展が期待される。また、凍結保存液に頻用される DMSO の残留についても評価し、医薬品の残留溶媒ガイドラインで規定される許容量 50mg/day よりも遥かに低い値で管理できる可能性を示した。本製品は、iPS 細胞由来の初の立体組織(細胞塊)製品であり、洗浄液が浸透しにくく DMSO が残留しやすいと思われるにもかかわらず低値を示していたことから、一般的な再生医療等製品においては DMSO の残留に関してはほぼ無視できるレベルで議論できると考えている。

④　非臨床有効性と安全性についての予備検討と理論構築

本課題において、in vitro の評価指標、培養終了時の形態解析や網羅的遺伝子解析を用いることで、製造時のバラつきや品質の差異を把握できることを明らかとし、同等性の評価手法として開発した。また、試製造を繰り返すことで、これらの評価指標において逸脱管理に用いることのできる基準値を、パラメーター毎に設定することも可能であることを示した。再生医療等製品の場合は、通常の化学合成品とは異なり、定量的な機器分析により製品の構造や物性、規格値への合致を確認することが困難である。当然出荷試験としては、製品の特長を示すパラメーターによる品質管理、規格値の設定は必須であるが、必要十分ではないことが自明である。製品となる細胞の状態は刻一刻と変化するものであり、例えば種々の製造プロセス改良時には、規格値への合致に加え、形態情報や生物学的な観点からの同等性評価が最も感度と信頼性が高いと言える。黎明期にある再生医療等製品においては、今後の技術革新に伴い、自動化装置導入のような大幅なものから器材の変更などの微細なものまで、製法の変更が頻繁に発生すると思われるため、本課題で取り組んだ生物学的な観点からの同等性評価手法開発の意義は大きい。今回開発した手法は、細胞を対象としたあらゆる製品に応用可能な普遍的な考え方であり、種々の製造プロ

セス改良時における同等性評価や、さらに発展させることでロット管理戦略の理論構築にまで応用が可能である。

本事業の実施により、本製品は産業化へ一歩前進した。オールジャパン体制で取り組む iPS 細胞ストック構想を複数の製品で実現させ、各種規制を満たした産業レベルの生産技術を構築するためには、自動化、閉鎖系、凍結保存法といった新規技術によってロットサイズを拡大させながら、並行して品質の同等性を証明していくというプロセスを何度も繰り返す必要がある。この地道なプロセスによってのみ、GMP 準拠での製造に相応しい高生産性、低コスト、高品質安定性を達成することができる。本事業の実施により、これらを達成するために必要となる汎用性の高い各種評価手法を開発できたと考えている。後続の事業者にも参考にしていただきたい。

参考文献

[1] Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W. Y., et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. N Engl J Med 344, 710-719 (2001).

[2] Olanow, C. W., Goetz, C. G., Kordower, J. H., Stoessl, A. J., et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. Ann Neurol 54, 403-414 (2003).

[3] Mendez, I., Viñuela, A., Astradsson, A., Mukhida, K., et al. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. Nat Med 14, 507-509 (2008).

[4] Li W., Englund E., Widner H., Mattsson B., van Westen D., et al. Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. Proc Natl Acad Sci USA 113, 6544-6549 (2016).

[5] Doi, D., Samata, B., Kasukawa, M., Kikuchi, T., et al. Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. Stem Cell Reports 2, 337-350 (2014).