

平成27年度

再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業

(再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発)

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開発事業 (再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発)
研究開発課題名	B細胞性急性リンパ性白血病
研究開発担当者 所属 役職 氏名	タカラバイオ株式会社 常務取締役 CDMセンター長 峰野 純一

## 目次

1. 事業の目的	P. 3
2. 実施内容及び結果	P. 3
3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容	P. 13
4. まとめ	P. 14

## 1. 事業の目的

テラーメイド型の再生医療等製品を安全に、確実に、迅速に患者に届けるため、B細胞性急性リンパ性白血病（B-ALL）患者を対象とし、遺伝子導入Tリンパ球のpotency評価に用いるCD19安定発現細胞株の開発、遺伝子導入Tリンパ球のIL-2依存性増殖試験期間の短縮、遺伝子導入Tリンパ球の原材料である患者の血液やPBMCの凍結保存方法の開発を行い、対象患者が治療の機会を逸失することなくCD19特異的キメラ抗原受容体（CAR）遺伝子導入Tリンパ球（CD19 CAR-T細胞）の投与を受けられるように、確実に再生医療等製品が製造できる体制を構築する。

## 2. 実施内容及び結果

CD19 CAR-T細胞の開発において、再生医療等製品を安全に、確実に、迅速に患者に届けるための、品質の評価手法の開発ならびに原材料である細胞を保存した場合における製品品質の同等性の評価手法の開発を目指し3つの課題に取り組んだ。

課題1. 遺伝子導入Tリンパ球のpotency評価用細胞の開発

課題2. 遺伝子導入Tリンパ球の造腫瘍性評価系の開発

課題3. 遺伝子導入Tリンパ球の原材料に関する評価系の開発

課題1. 遺伝子導入Tリンパ球のpotency評価用細胞の開発

本評価法の開発においては、CD19 CAR-T細胞のpotency評価用細胞の樹立に向けて、CD19遺伝子安定発現細胞の作製と当該細胞を用いたCD19 CAR-T細胞のPotency評価系の開発を行った。

平成27年度においては、以下の項目を実施した。

項目	実施内容
①	CD19遺伝子発現ベクターのベクター骨格の選定
②	試験製造を行ったCD19 CAR-T細胞を用いた評価
③	CD19遺伝子および陰性コントロールの安定発現細胞の樹立

① CD19遺伝子発現ベクターのベクター骨格の選定

本再生医療等製品（CD19 CAR-T細胞）は、患者の末梢血リンパ球にCD19に対するCAR遺伝子をレトロウイルスベクターで導入し、拡大培養することによって製造される。製造した本再生医療等製品（CD19 CAR-T細胞）の、腫瘍抗原に対する特異的な細胞傷害活性を見る試験（Potency試験）は、腫瘍抗原を提示している細胞を用いて評価手法を開発することが必要となる。そのため、本事業では、本再生医療等製品（CD19 CAR-T細胞）の細胞傷害活性を見るため、細胞表面にCD19分子が発現していないK562細胞を使用し、ヒトCD19遺伝子を3種類のウイルスベクターで導入して安定株を取得し、CD19遺伝子の安定発現について最適なベクターシステムを検証した。具体的には、マウス白血病ウイルス（MoMLV）由来のLTRプロモーターからCD19が発現するDON5型レトロウイルスベクター、Murine stem cell virus (MSCV) LTRプロモーターから発現するMS3型レトロウイルスベクター、MSCVのU3プロモーターから発現する自己不活型レンチウイルスベクター（LV型）の3種類でCD19遺伝子発現K562の選定を行い、ベクター骨

格を選定した。また、同時に、陰性コントロールとして細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体 ( $\Delta$ LNGFR) 遺伝子を搭載したベクターも同様に3種類作製して選定した。 $\Delta$ LNGFR 遺伝子は細胞外にヒト低親和性神経成長因子受容体を発現するが、この受容体に対するリガンドが作用しても、細胞内領域を欠損しているため、何ら細胞内シグナルを伝達することができないため、遺伝子導入された細胞のマーカーとしての役割のみを果たすことが期待される。

(結果) 一次スクリーニングとして、3種類のベクター骨格 (DON5 型、MS3 型、LV 型) それぞれにおいて遺伝子導入 K562 クローンをそれぞれ 48、48 および 34 クローン取得し、抗 CD19 抗体を用いてフローサイトメーターで CD19 遺伝子の発現を確認し、ヒストグラムの結果から、CD19 遺伝子の発現レベルがシングルピークで検出されるクローンをそれぞれ 15、14、および 10 クローン選抜した。次に、二次スクリーニングとして、これらクローンに導入されているウイルスベクターのプロウイルスコピー数を測定し、1~2 コピー/細胞で導入されているクローンとして、それぞれ 5 クローンを選定した。 $\Delta$ LNGFR 遺伝子を搭載した陰性コントロール導入 K562 細胞に関しては、一次スクリーニングで 20 クローンから 4~5 クローンに絞り込み、二次スクリーニングでそれぞれ 2 クローンを選定した。

三次スクリーニングとして、タカラバイオが開発を進めている CD19-CAR レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入細胞を調製し、CD19 発現 K562 細胞への細胞傷害活性の評価をすすめた。評価手法の概略を図 I-1 に示す。CD19 CAR-T 細胞 (Effector 細胞) と CD19 発現 K562 細胞 (Target 細胞) の比率 (E/T 比) を 10:1、3:1、1:1 の 3 点で評価した。評価結果を図 I-2 に示す。

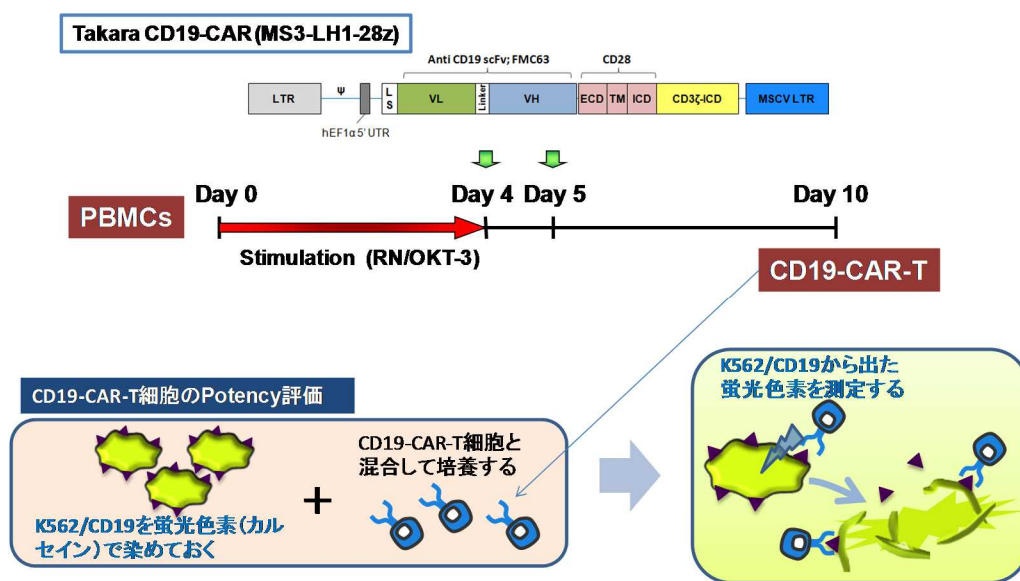


図 I-1. 細胞傷害活性評価方法概略

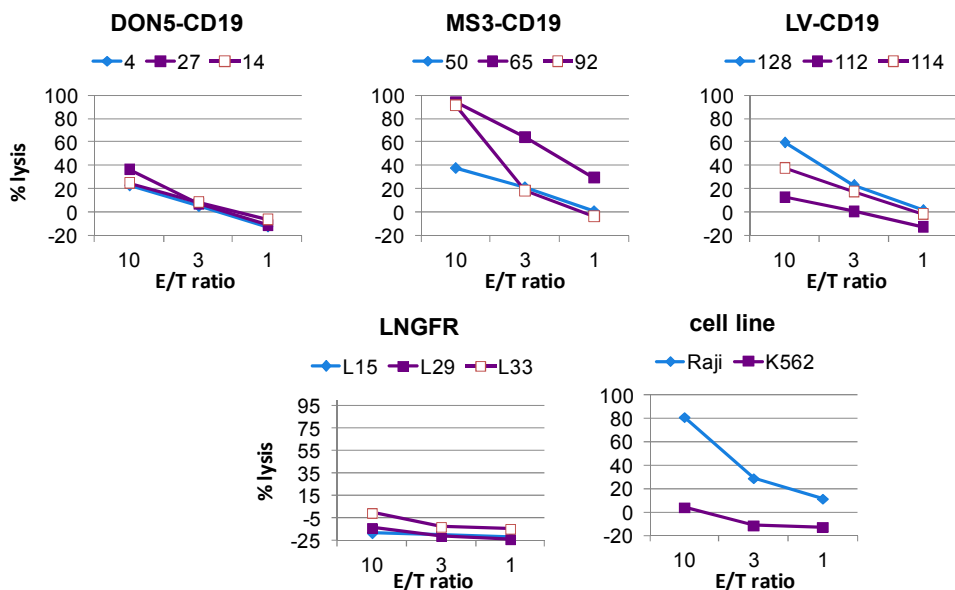


図 I-2. 細胞傷害活性評価スクリーニング結果

DON5 型の CD19 発現 K562 細胞は、MS3 型、LV 型と比較して CD19 CAR-T 細胞との反応性が低いことが明らかとなった。一方で陰性コントロールとして用いた  $\Delta$ LNGFR は、DON5 型 (L15)、MS3 型 (L29)、LV 型 (L33) いずれも陰性コントロールとして機能することが明らかとなった。評価の結果から、MS3 型のクローン 65 を第一候補に、LV 型のクローン 128 を第二候補として選定した。また、それぞれのベクター骨格の陰性コントロールとして MS3 型のクローン L29 を第一候補に、LV 型のクローン L33 を第二候補に選定した。

## ② 試験製造を行った CD19 CAR-T 細胞を用いた評価

第一候補として選定した MS3 型の CD19 発現クローン 65 および陰性コントロールとして MS3 型のクローン L29 を用い、CD19 CAR-T 細胞への反応性の再現性・頑健性を確認するとともに、非導入リンパ球 (NGMC) に対しては反応しないことを確認するため、2 ドナー (ドナー A、ドナー B) の末梢血リンパ球 (PBMC) より CD19 CAR-T 細胞と非導入細胞 (NGMC) を調製し、細胞傷害活性を測定した。何れのドナーも、本事業の課題 3 において、一旦凍結保存した PBMC より細胞調製を実施しており、特にドナー B は GMP にて試験製造を行った細胞である。

(結果) Effector 細胞と CD19 発現 K562 細胞 (Target 細胞) の比率 (E/T 比) を 10:1、3:1、1:1 の 3 点で評価した。評価結果を図 I-3 に示す。何れのドナー T 細胞においても、遺伝子導入を行った CD19 CAR-T 細胞においてのみ、CD19 発現 K562 細胞 (クローン 65) 特異的な細胞傷害活性が確認され、選定した CD19 発現 K562 クローンおよび陰性コントロールの  $\Delta$ LNGFR 発現 K562 クローンが、CD19 CAR-T 細胞の potency アッセイに使用可能なクローンであることが再現性良く確認された。

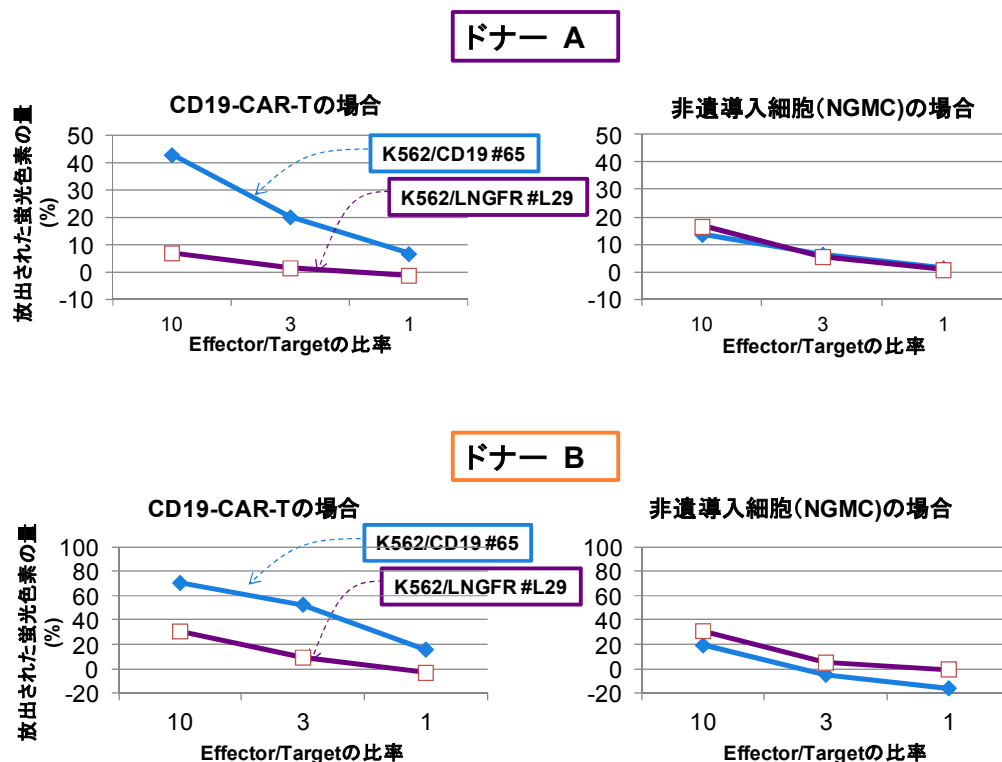


図 I-3. 試験製造を行った CD19 CAR-T 細胞を用いた細胞傷害活性の評価

### ③ CD19 遺伝子および陰性コントロールの安定発現細胞の樹立

上記スクリーニング評価を行った結果、MS3 型の CD19 遺伝子導入クローン 65 および、陰性コントロールとして MS3 型の  $\Delta$ LNGFR 遺伝子導入クローン L29 を安定発現細胞の第一候補として選定した。また、バックアップとして LV 型の CD19 発現クローン 128 および  $\Delta$ LNGFR 発現クローン L33 を第二候補に選定した。第一候補のクローン 65 および L29 について、それぞれマスターセルバンク 40 本を作製した。また、第二候補のクローン 128 および L33 について、マスターセルバンク 10 本を作製した。

### 課題 2. 遺伝子導入 T リンパ球の造腫瘍性評価系の開発

本評価法の開発において、再生医療等製品を安全に、かつ迅速に患者に届けるための、新たなインビトロ造腫瘍性評価系の開発を行った。

平成 27 年度においては、以下の項目を実施した。

項目	実施内容
①	現行法による造腫瘍性評価系の検証と評価期間の短縮
②	検出感度を確認する系の立ち上げ (K562 細胞をスパイクした系での評価)
③	カルセイン AM を用いた造腫瘍性評価系の開発

#### ①現行法による造腫瘍性評価系の検証と評価期間の短縮

造腫瘍性評価期間の短縮を目的として、現行法による造腫瘍性評価系の検証を行った。

(i) 現行の測定法

検体となる CD19 CAR-T 細胞を IL-2 存在下及び非存在下にて培養し、培養 7 日目、及び 30 日目にそれぞれの総生細胞数をトリパンプルー染色法にて測定し、検体が IL-2 依存的に増殖すること、及び IL-2 非存在下で増殖する細胞が含まれていないことを確認する。現行の測定法の概略を図 II-1 に示す。

判定基準は従来の IL-2 依存的増殖試験の判定基準に従った。

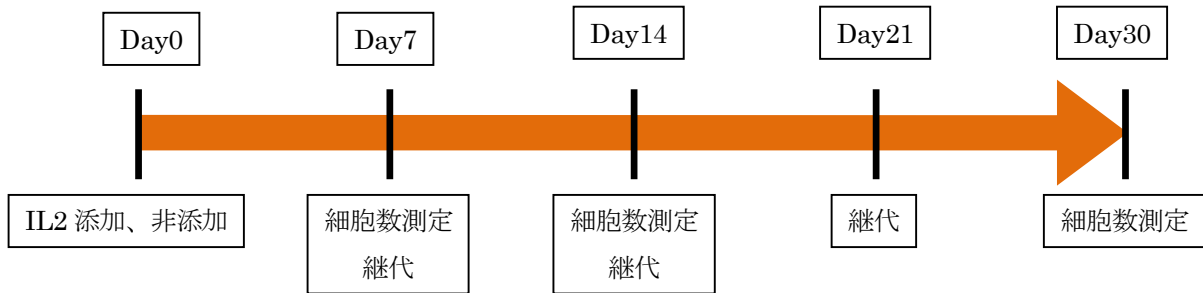


図 II-1. 現行の測定法の概略

(ii) 評価期間の短縮を目的にした現行法の検証

今回、評価期間の短縮を目的に、新たに検体となる CD19 CAR-T 細胞 (6 検体) の培養 14 日目の総生細胞数をトリパンプルー染色法にて測定し、培養 30 日目の結果と比較検討した。その結果造腫瘍性評価の 14 日目の結果の判定が可能であることを確認した。

② 検出感度を検証する系の立ち上げ (K562 細胞をスパイクした系での評価)

現行のトリパンプルー染色法による造腫瘍性評価系において、混入するがん細胞の検出感度を求めるため、がん細胞株 (K562) をスパイクして培養を行い、培養 7 日目及び 14 日目の細胞増殖を検討した。

(試験方法の詳細)

検体となる CD19 CAR-T 細胞 (2 検体) にがん細胞 (K562) を各割合 (0.1%, 0.01%, 0.001%) で添加して IL-2 非存在下で培養を行い、7 日目および 14 日目にトリパンプルー染色により生細胞数を測定し、細胞の増殖率を求めた。

(結果) K562 をスパイクして培養した場合、14 日目に T01 では 0.01%以上、T02 では 0.001%以上スパイクした培養において、細胞増殖が検出された。一方で、7 日目では T01、T02 とともに 0.1%スパイクした培養においてのみ細胞増殖が検出された (表 II-1)。

表 II-1. 培養 7 日目および 14 日目の細胞の増殖率

検体	7 日目				14 日目			
	K562 のスパイク量 (%)				K562 のスパイク量 (%)			
	0	0.001	0.01	0.1	0	0.001	0.01	0.1
T01	0.31	0.38	0.36	0.45*	0.13	0.08	0.47*	0.41*
T02	0.22	0.21	0.29	0.57*	0.06	0.49*	0.43*	0.52*

\*細胞増殖が検出された検体

本検討の結果、7日目の検出感度は0.1%だった。検出感度をさらに上げるため、他の評価系の開発を行った。

### ③ カルセイン AM を用いた造腫瘍性評価系の開発

K562 をスパイクして培養した場合、7日目に細胞増殖を感度良く検出することが可能なトリパンブルー染色法に代わる他の評価系を開発する。

(試験方法の詳細)

検体となる CD19 CAR-T 細胞 (5 検体) にがん細胞 (K562) を各割合 (無添加、0.01 %、0.001 %) で添加して IL-2 非存在下で培養を行い、7日目にカルセイン AM を用いた蛍光検出法により細胞増殖 (蛍光強度) を測定した (表 II-2)。

(測定原理)

蛍光色素 Calcein-AM は細胞内エステラーゼにより Calcein に加水分解され、黄緑色の強い蛍光 ( $\lambda_{ex}=490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em}=515 \text{ nm}$ ) を発する。この時の蛍光強度が細胞内エステラーゼ活性に比例することから、生じた Calcein の蛍光を測定することで、細胞増殖を定量的に測定することができる (図 II-2)。

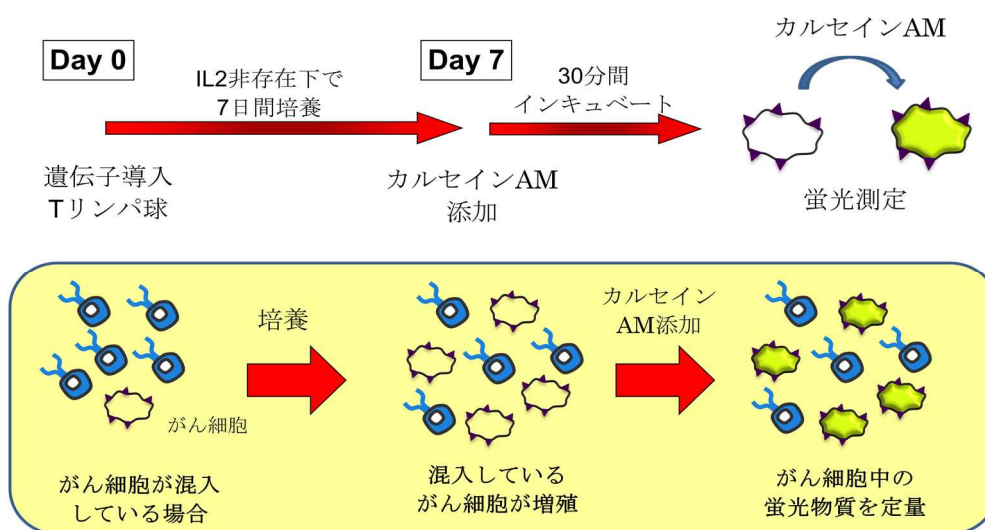


図 II-2. カルセイン AM を用いた造腫瘍性評価系

(結果) K562 をスパイクして7日間培養した場合、カルセイン AM を用いた蛍光検出法による細胞増殖の検出感度は0.01%であり、トリパンブルー染色法の10倍の感度を示した (表 II-2)。



表Ⅱ-2. 培養7日目の細胞増殖（蛍光強度）

検体		K562 のスパイク量 (%)		
		無添加	0.001	0.01
遺伝子導入 Tリンパ球 (5検体)	平均 (Ave)	159.53	239.93	731.67*
	偏差 ( $\sigma$ )	66.88	106.22	351.15

\*無添加群と有意差あり (P=0.023)

### 課題3. 遺伝子導入Tリンパ球の原材料に関する評価系の開発

本評価法の開発においては、原材料である細胞を保存した場合における製品品質の同等性の確認方法の評価系の開発を行った。

平成27年度においては、以下の項目を実施した。

項目	実施内容
①	凍結によるリスク項目分析
②	凍結保存による血液分離細胞の品質変化項目の評価
③	凍結保存分離細胞を用いて製造した製品の品質評価

#### ① 凍結によるリスク項目分析

CD19 CAR-T 細胞製造の原材料である末梢血リンパ球 (PBMC) を凍結保存した場合に影響を受ける製品品質についてリスク分析を行った。凍結により影響を受けると想定される項目として、解凍時生存率の低下、細胞増殖率の低下、遺伝子導入効率の変化を本課題での評価とした。また、凍結保存検体増加による取り違い発生リスクの増加、凍結保存期間中の管理温度逸脱リスクの増加なども項目として考えられるが、検体数が限られることや製品へ直接影響する項目の評価ではないことなどから、本課題においてこれらは評価対象としなかった。

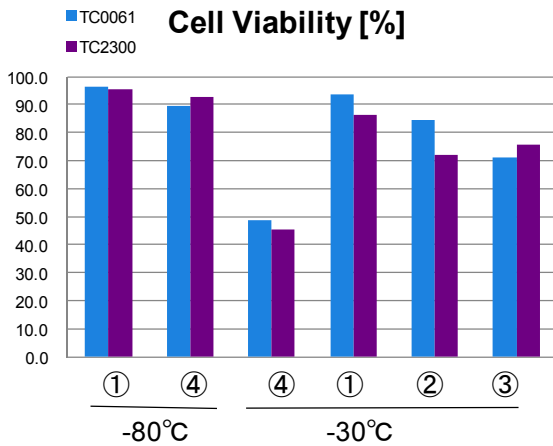
#### ② 凍結保存による血液分離細胞の品質変化項目の評価

##### (i) PBMC 凍結保存溶液の検討

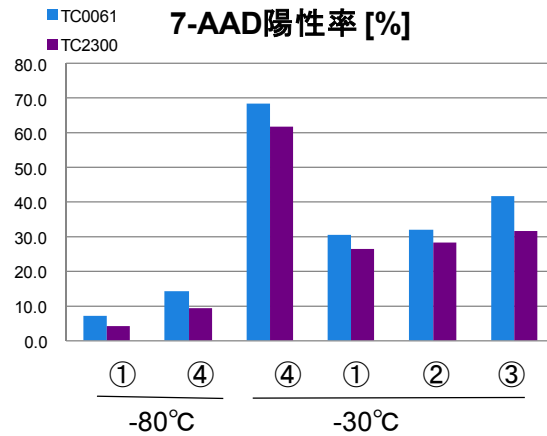
製品製造の原材料である PBMC の凍結保存にあたり、凍結保存溶液による凍結細胞への影響を短期間で評価する系として、平成26年度の再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業において実施した、凍結保存温度を上げた条件 (-30°Cで7日間) で保管した細胞による測定検討を行った。凍結保存溶液の陽性対照とし市販凍結保存溶液と、陰性対照として長期保存では保存安定性が低下する 5% DMSO/7% HSA/生理食塩水を使用し、その他検討用溶液を試験に用いた。凍結 PBMC は 37°Cの温浴で急速に解凍した後生存率および7-AAD 染色測定を行った。

(結果) -80°Cにおける凍結保存では、市販凍結保存溶液①と 5% DMSO/7% HSA/生理食塩水④の間に解凍後生存率に差は認められなかった。-30°Cによる凍結保存検体では 5% DMSO/7% HSA/生理食塩水に明らか

な生存率の低下と 7-AAD 染色細胞の増加が検出された。検討用溶液②③においては、市販凍結保存溶液と同様の生存率(図Ⅲ-1)と 7-AAD 染色細胞率であった(図Ⅲ-2)。



図Ⅲ-1. 細胞生存率



図Ⅲ-2. 7-AAD 陽性率

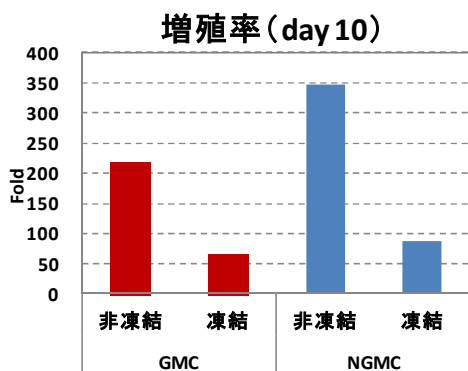
(ii) 凍結及び非凍結 PBMC の培養による比較検討 (短期保存)

同一ドナーから得られる PBMC を用いて、凍結及び非凍結 PBMC からの CD19 CAR-T 細胞の培養を行った。凍結保存 PBMC を用いて培養後の細胞について評価を行い、凍結保存に伴い影響を受ける項目を検索した。実施した評価項目を以下に示す。

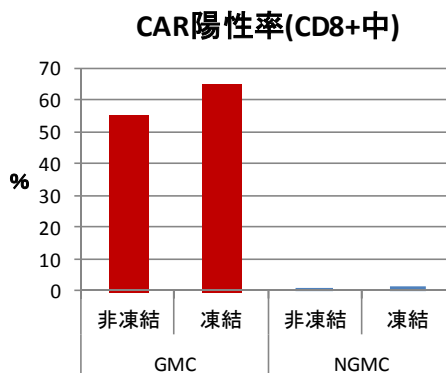
評価項目

- ・細胞増殖率
- ・細胞生存率
- ・遺伝子導入効率 (CD19CAR 発現率)
- ・免疫表現型 (CD3/CD4/CD8)
- ・細胞傷害活性
- ・サイトカイン産生能 (IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )

(結果) 凍結及び非凍結 PBMC の細胞増殖率は、培養 10 日目において凍結保存による解凍後刺激に対する増殖能の低下が確認された(図Ⅲ-3)。遺伝子導入効率については、凍結 PBMC において高い導入効率を示す傾向が見られた(図Ⅲ-4)。一方、培養後の細胞生存率、免疫表現型、Raji 細胞株に対する細胞傷害活性及びサイトカイン産生能は両者間で明確な差は確認されなかった。



図III-3. 凍結及び非凍結 PBMC の細胞増殖率



図III-4. 凍結及び非凍結 PBMC の遺伝子導入効率

### (iii) 凍結及び非凍結 PBMC 由来 CD19 CAR-T 細胞の in vivo 比較検討

凍結及び非凍結 PBMC から培養した CD19 CAR-T 細胞の in vivo による比較評価を行った。NOG マウス (NOD/Shi-scid, IL-2R $\gamma$  KO Jic) に対して、標的細胞として Raji 細胞株を背部皮下接種し、凍結または非凍結 PBMC 由来 CD19 CAR-T 細胞及び非遺伝子導入細胞を iv 投与した後に、Raji 細胞の腫瘍体積を測定した。

(結果) 何れの条件においても評価期間中にマウスの明らかな体重減少は確認されなかった。腫瘍体積については、CD19 CAR-T 細胞投与群においては、投与後 14 日目以降において腫瘍が消滅し、その後腫瘍体積の増大は認められなかった。非遺伝子導入細胞投与群では、何れの条件においても腫瘍体積の増加が確認された。従って、凍結及び非凍結 PBMC 由来の CD19 CAR-T 細胞についても、CD19-CAR 遺伝子導入により腫瘍に対する in vivo での傷害性を示すことが確認された。

### (iv) 凍結及び非凍結 PBMC の培養による比較検討 (長期保存)

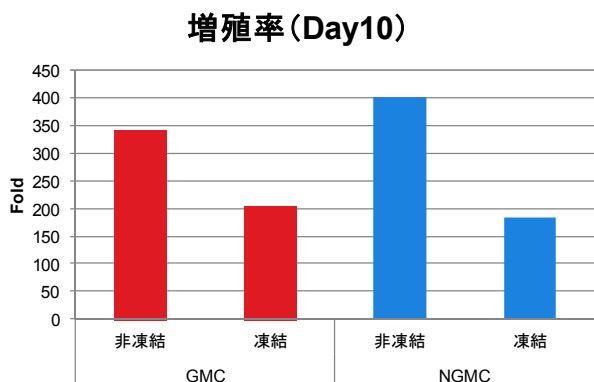
PBMC を分離凍結後長期保存後に、同一ドナーから得られた非凍結 PBMC を用いて、長期凍結保存 PBMC と CD19 CAR-T 細胞の培養による比較を行った。凍結保存後、約 6 ヶ月の凍結保存 PBMC を用いて培養後の細胞について評価を行い、凍結保存に伴い影響を受ける項目を検索した。短期保存 PBMC と同様の評価項目について測定を行った。

#### 評価項目

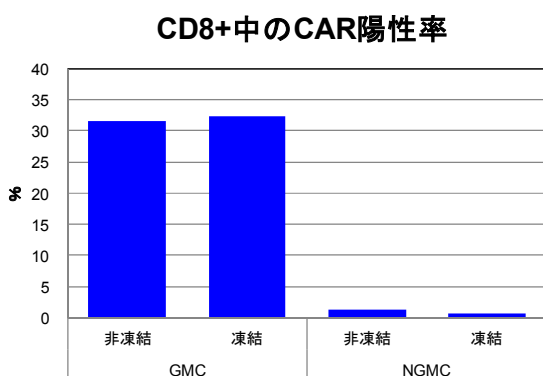
- ・細胞増殖率
- ・細胞生存率
- ・遺伝子導入効率 (CD19CAR 発現率)
- ・免疫表現型 (CD3/CD4/CD8)
- ・細胞傷害活性
- ・サイトカイン産生能 (IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )

(結果) 6 ヶ月凍結保存及び非凍結 PBMC について培養後細胞の比較を行った結果、短期保存による結果と同様に、細胞増殖率は培養 10 日目において凍結保存による解凍後刺激に対する増殖能の低下が確認さ

れた(図III-5)。遺伝子導入効率はわずかに凍結 PBMC で高い値を示したが、明らかな差ではなかった(図III-6)。また、培養後の細胞生存率、免疫表現型、Raji 細胞株に対する細胞傷害活性及びサイトカイン産生能は両者間で明確な差は確認されなかった。従って、-80℃における PBMC 凍結保存については少なくとも6ヵ月の保存が可能であることが確認された。



図III-5. 凍結及び非凍結 PBMC の細胞増殖率 (長期保存)

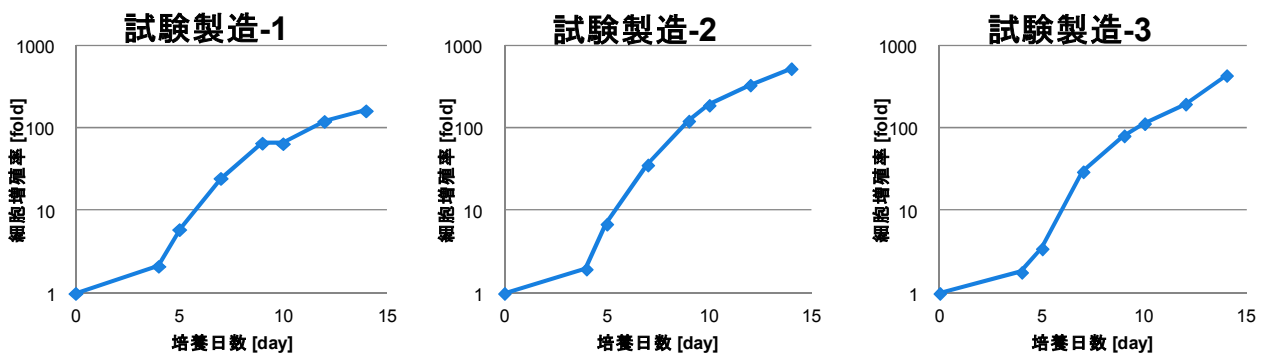


図III-6. 凍結及び非凍結 PBMC の遺伝子導入効率 (長期保存)

#### ④ 凍結保存分離細胞を用いて製造した製品の品質評価

凍結保存 PBMC を用いた治験製品の製造の可能性について、予定される製造施設において、実スケールでの製造検討を行った。健康人ドナーから成分採血により採取分離した凍結 PBMC を用いて、3回の試験製造を行った。試験製造に用いた CD19-CAR 遺伝子導入用のレトロウイルスベクターについても、遺伝子導入効率を確認するために、管理された製造施設において製造後に全ての品質試験を行い規格を満たしたものを使用した。

(結果) 健康人2ドナー由来の凍結保存 PBMC を使用した実製造スケールでの3回の試験製造の結果、培養第10日目において約70-200倍の増殖率が確認された(図III-7)。細胞増殖率には製造及びドナー毎の差が見られたが、何れの製造についても想定されている投与細胞数が得られる増殖率であることが確認された。また、品質試験においては、すべての規格試験(無菌試験、マイコプラズマ試験、エンドトキシン試験、細胞濃度試験、細胞生存率試験、外観試験、免疫表現型試験、CAR陽性率試験、IFN- $\gamma$ 産生試験、Galv RCR試験など)について、規格を満たすことが確認された。



図III-7. 試験製造における細胞増殖率

## 機構相談

PMDA と以下の二つの対面相談を実施した。

### (1) プロトコールに関する相談

事前面談を実施した後に対面助言を行い、プロトコールにある患者の登録基準、初回投与量の妥当性、試験デザイン、臨床第 I 相試験部分における安全性を担保する方法について PMDA 側の了承を得た。

### (2) 品質安全性に関する相談

事前面談を実施した後に対面助言に臨み、①凍結保存バッグからの溶出物、②無菌試験、③ マウス安全性試験、④培地由来の不純物の安全性評価等のコメントを得た。

## 3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

### 課題1 遺伝子導入 T リンパ球の potency 評価用細胞の開発

再生医療等製品である CD19 CAR-T 細胞の CD19 抗原に対する特異的な反応性の評価の既存の方法として CD19 陽性の癌細胞株である Raji 細胞や Daudi 細胞を使用することが可能である。しかし、これら細胞は Epstein Barr ウイルス (EB ウイルス) の DNA を保持しており、バイオセーフティーレベル 2 での封じ込めによる取り扱いが要求されている。また、陰性コントロールとしては、CD19 を発現していない別の細胞株を使用することになり、細胞株の背景の違いによる非特異的な反応性など、評価手法として不鮮明な要素も含まれる。そこで、より汎用性の高いプラットフォームを構築するため、ヒト CD19 遺伝子を人工的にウイルスベクターにより K562 細胞に導入して安定株を取得し、評価用細胞とした。また、陰性コントロールとして K562 細胞に  $\Delta$ LNGFR 遺伝子を導入し、長期間にわたり安定に発現を継続できる細胞を取得した。得られた細胞株は、バイオセーフティーレベル 2 での封じ込めの必要はなく、より汎用性の高い評価系が提供できる。今回は CD19 遺伝子の強制発現細胞株を開発したが、同様の手法で、CD19 を他の標的分子の遺伝子と置きかえることにより、他の CAR 遺伝子導入 T リンパ球の評価系への応用が期待できる。また、HLA 遺伝子を導入することにより、TCR 遺伝子導入リンパ球の細胞傷害活性の評価システムの構築にも応用が可能となり、TCR や CAR を用いた遺伝子導入 T リンパ球の Potency assay の基本プラットフォームの評価手法となり得ることが期待される。

## 課題2. 遺伝子導入Tリンパ球の造腫瘍性評価系の開発

製造した遺伝子導入Tリンパ球の安全性を担保するため、規制当局（PMDA）から造腫瘍性評価を行うことが求められている。従来の造腫瘍性の評価系（トリパンブルー染色法）では結果判定までに30日かかることから、病態の進行が速い疾患においては、治療が間に合わない可能性がある。造腫瘍性評価の試験期間を短縮するため、調製したCD19 CAR-T細胞を用いて従来法（トリパンブルー染色法）を再検証し、新たな評価基準を設定することにより14日での判定方法を提案した。この判定方法については、PMDAから妥当であるとの判断が示されている。遺伝子導入Tリンパ球だけでなく、遺伝子非導入Tリンパ球の造腫瘍性評価においても、今回新たに設定した評価基準を用いることにより、14日での造腫瘍性評価が可能であると考えられる。

## 課題3

再生医療等製品における最終製品の原材料となる開始細胞の品質は、製造する最終製品自体の品質にも影響を及ぼす。原材料の使用に際して講ずべき必要な措置については、生物由来原料基準により基準が定められている。しかし、これは主として製造等に用いる細胞の安全性について示したものであり、再生医療等製品の製造後の細胞数や遺伝子導入効率などの品質を確保するために規定されたものではない。既存の再生医療等製品の多くは、原材料である血液等を患者から採取した後に出来るだけ速やかに製造が開始される。疾患によっては病態の変化などにより採血可能な期間に制限がある。また、テーラーメイド型の再生医療等製品は、患者ごとに製造を行う必要があり、さらに患者に投与されるまでに培養や遺伝子導入操作等の加工及び品質試験を行う期間が必要であるが、製造施設の稼働状況などにより、必ずしも治療が必要な時期に合わせた採血と製造が開始できない場合が想定される。このような場合においては、開始細胞の凍結保存により採取期間や製造施設の状態に影響されずに製造を行うことができると考えられる。本事業においては、採取した血液から分離したPBMCの凍結保存の可能性について検討を行った。検討においては、凍結したPBMCの特性および凍結したPBMCからの製造の可能性と品質の評価に分けて検討を行った。凍結したPBMCの特性を非凍結細胞と *in vitro*、*in vivo* において比較し、凍結による影響を受ける特性を探索した。また、凍結したPBMCからの製造の可能性と品質においては目的とする細胞数や規格試験項目等で検証した。両検討により凍結により細胞増殖率に対する影響は見られるものの、その他の特性に明らかな影響は確認されなかった。

本検討手法により、CD19 CAR-T細胞に限らず再生医療等製品の開始細胞の保存等における影響の評価方法の提案が出来たと考える。

## 4. まとめ

本事業においては、製品の製造のための開始細胞の保存による影響、製品の品質試験（リンパ球製品における造腫瘍性）の試験期間の短縮検討、製品のPotency評価のための均一な標的細胞の作製とその評価の3つの課題の検討を行った。これらにより、開始細胞の凍結保存の可能性と評価方法の構築、品質試験の期間短縮に対する検討方針の提案、Potency評価用の標的細胞の構築が出来た。これにより、遺伝子導入Tリンパ球に限らず、同様の細胞等を使用した再生医療等製品の開発を行う際の製造および品質試験方法への課題に対する解決法の提案が出来た。