

平成 28 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	iPS 細胞由来血小板製剤および製造原料マスターセルバンクの品質評価法の開発
研究開発代表者 所属 役職 氏名	株式会社メガカリオン 取締役最高執行責任者 赤松 健一

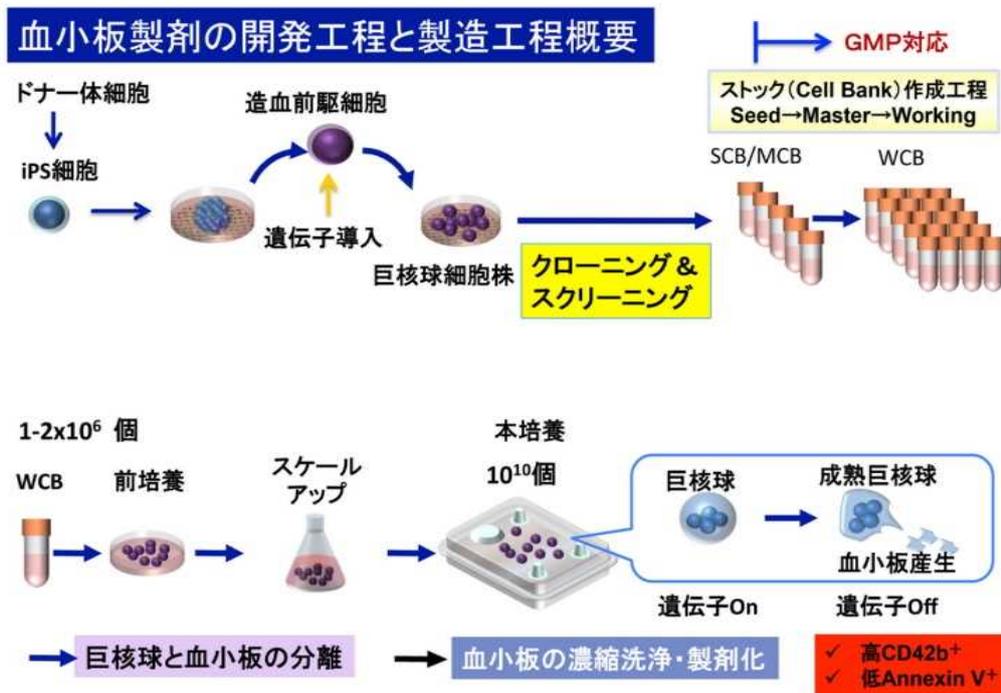
目次

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

1. 事業の目的

献血ドナー人口の高齢化および若年ドナーの減少から、我が国の50歳以上人口がピークを迎え、最も高齢者医療受給者の比率が高くなる事が予測される2027年には、必要量の2割以上の献血が不足することが厚生労働省の統計データとして発表されている。特に、繰り返し血小板輸血治療が必要な患者に発生する輸血不応症患者に対し、輸血するHLA（ヒト白血球抗原）・HPA（血小板抗原）が一致する血小板を確保するためのドナー確保は緊急を要する課題である。この緊急課題はアンメットメディカルニーズを遥かに超えた医学会の重要問題である。この問題解決のためiPS細胞技術を応用した新たな大量血小板供給システムを構築することを目指している。

生体内で複雑な過程を経て構築される血小板をiPS細胞から生体外（in vitro）で大量製造する戦略を下図に示す。



この工程は、主に「不死化巨核球株を樹立してマスターセルバンクを作成する段階」と「そのマスターセルバンクから多量に巨核球を得てさらに血小板を産生させ、得られた血小板を精製して製剤化する製造工程」の2段階に分けることができる。

本事業では、日本赤十字社の規格である患者1回投与製剤に該当する10単位（ 2×10^{11} 個の血小板）のiPS細胞由来血小板を製造する工程を確立すると共に、iPS細胞由来血小板最終製剤の品質を保証するために不可欠である最重要原材料である巨核球細胞株やその中間体及び血小板の細胞学的評価系の確立を目指した。

2. 実施内容及び結果

iPS 細胞由来血小板製剤の臨床投与必要量を製造するための製法及び血小板品質評価法を開発した。さらに、血小板産生効率を上げるための良質な製造用マスターセルの評価法を開発するために、以下の課題に取り組んだ。

課題 1. 分担研究開発課題：iPS 細胞由来血小板製剤製法確立および特性解析法確立

課題 2. 電子顕微鏡デジタル可視化技術を駆使した血小板製剤品質評価手法の開発

課題 3. 増殖フェーズにある不均一集団の巨核球細胞株から、マスターセル細胞株として選別できる評価技術の確定

課題 1. 分担研究開発課題：iPS 細胞由来血小板製剤製法確立および特性解析法確立

献血由来洗浄血小板 10 単位相当の血小板製剤製造法の開発と得られた血小板の品質評価法の開発を以下に行った。

1-1. iPS 細胞由来血小板製剤の治験製剤（献血由来洗浄血小板 10 単位相当）製造法の確立

ラボスケール及び治験薬製造スケール相当での試験製造を繰り返し、巨核球細胞から多量の血小板を調整する。血小板製造工程を巨核球細胞の①拡大増殖、②巨核球細胞の成熟・血小板放出、③血小板の分離・濃縮の 3 つの工程に分けて各々の最適条件を検討する。中でも、②工程では大容量の攪拌型細胞培養槽、③工程では分離膜、連続遠心機など *in vitro* での血小板製造では世界初の技術に挑戦した。

（結果）①凍結巨核球細胞株を起眠して徐々に培養スケールアップすることで 10L 規模の細胞懸濁液を調整した。②異なる培地に交換し攪拌型の培養槽に移し替える（最大 50L 規模）ことで増殖期の巨核球細胞を血小板への成熟・分化段階に誘導した。③前段階で得られた血小板懸濁液を膜濃縮することで数 L 容量まで減容化⇒血小板と残存巨核球細胞の分離・精製⇒精製血小板溶液の濃縮⇒血小板の血液バッグへの封入。以上の工程を経て 10 単位量相当の血小板製剤の調整を達成した。

1-2. iPS 細胞由来血小板製剤の特性解析

血小板の特性解析項目は、Thon の総説（Road blocks in making platelets for transfusion J. N. Thon, D. A. Medvetz, S. M. Karlsson and J. E. Italiano Jr. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 13 (Suppl. 1): S55p1.）や現在改定中の FDA のガイドライン（Guidance for Industry For Platelet Testing and Evaluation of Platelet Substitute Products）を参考にして選定した項目について評価法の条件検討を実施した。また、止血・循環能等の血小板効能試験は動物モデル（マウス、ウサギ）を用いて検討した。

（結果）血小板の確認試験及び活性化試験として主に細胞表面マーカー（CD41, CD42b, PAC-1, CD62P 等）の解析、また純度試験としての巨核球混入率の測定、製造工程における非特異的活性化指標として Annexin V 発現等を何れもフローサイトメーターにて確立した。効能試験としては *in vitro* での血小板凝集能およびウサギでの止血効果を検討した。これらの検討結果、iPS 細胞由来血小板は止血作用を含めて総じて献血血小板に匹敵する特性を有すること、また Annexin V の評価が血小板品質評価に有用であることが明らかとなった。一方、献血血小板と比較して iPS 細胞由来血小板のサイズ分布が異なること、そのため臨床検査で汎用されている自動血球分析装置では正確な血小板数が算出できないことが判明した。このため、血小板数についても標準ビーズを指標にフローサイトメーターでの測定系を確立した。

課題 2. 電子顕微鏡デジタル可視化技術を駆使した血小板製剤品質評価手法の開発

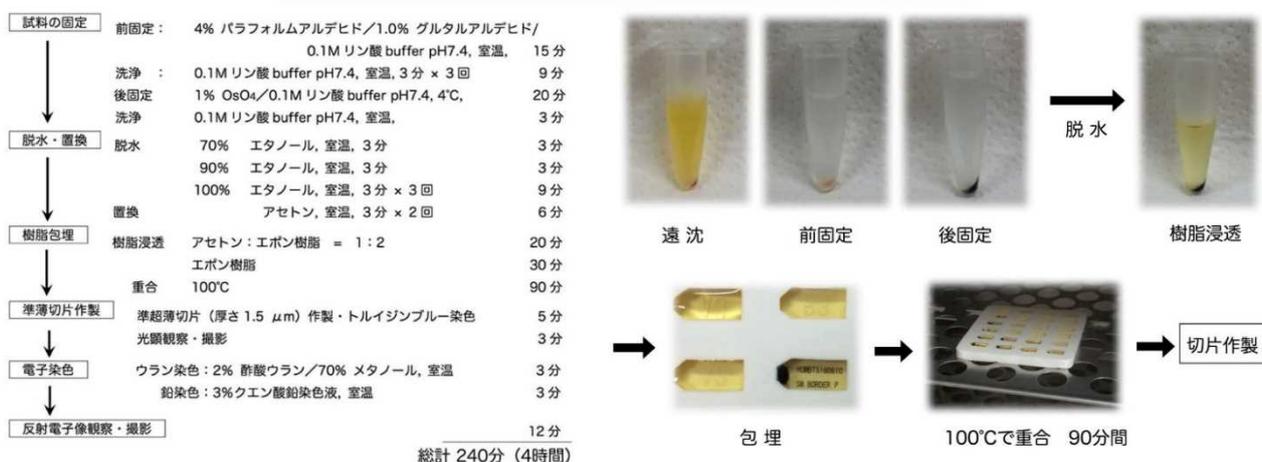
細胞治療薬の品質評価・特性解析として非常に有用な電子顕微鏡による血小板形態の迅速・簡便な観察方法を開発すると共に、細胞内形態の定量的解析ソフトを開発した。集積した画像・データを保存管理するデータベースも新たに開発し、iPS 細胞由来血小板製剤ロット間及び献血血小板との定量的比較を可能とすることで血小板製剤の品質評価基準設定の基盤を獲得した。

2-1. iPS 細胞由来血小板製剤の簡便・迅速な形態学的品質評価帆王法確立

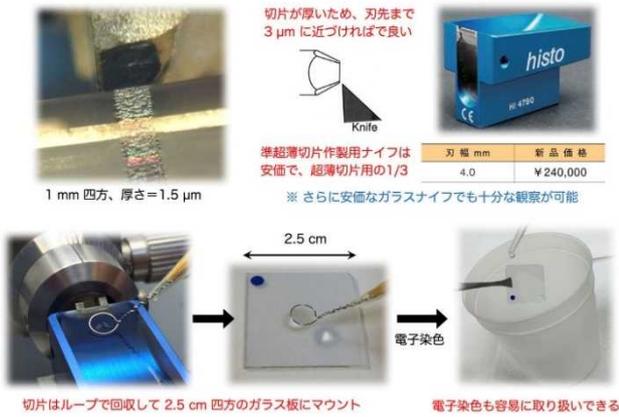
これまでの基礎研究段階では常法の透過型電子顕微鏡による解析を用いてきたが、樹脂に包埋された血小板から厚さ nm オーダーの超薄切片を作製するための高度な技術と時間、高価なダイヤモンド製ナイフを要するため、製剤のスクリーニング評価に応用するには不向きであった。そこで、安価な準超薄切片用ダイヤモンドナイフで容易に作製可能な厚さ μm オーダーの準超薄切片を走査型電子顕微鏡に挿入し、低加速電圧下の電子線によって得られた反射電子を捕捉して画像化する SEM-BSE (Scanning Electron Microscope-Back Scattered Electron) 観察法の応用により、血小板の内部構造を簡便かつ迅速にスクリーニング評価できる観察方法を開発した。

(結果) 上記の開発方法により、従来の透過型電子顕微鏡像と同等の画像解析能が得られることを確認した (下図参照) この開発によって、電顕試料作製からスクリーニング評価の観察終了までの所要時間が、従来の 1/2 へと大幅に短縮された。

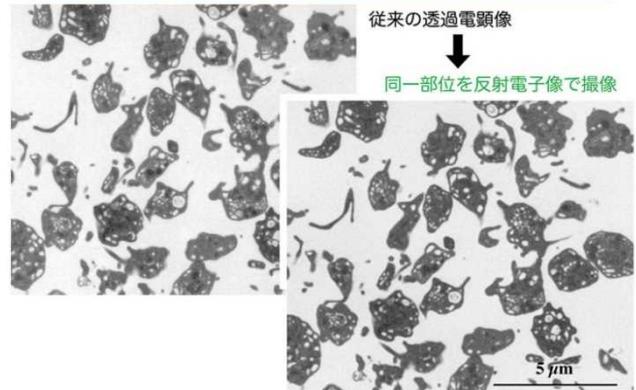
試料作製から撮像まで4時間以内を達成 (従来は8時間)



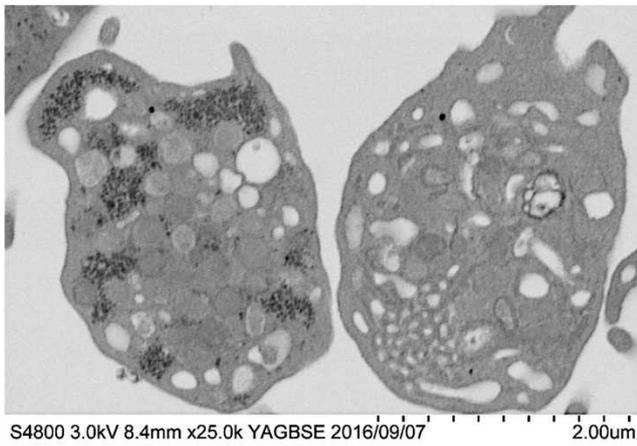
熟練を要さず簡便で迅速な準超薄切片作製 → ハードルを低く



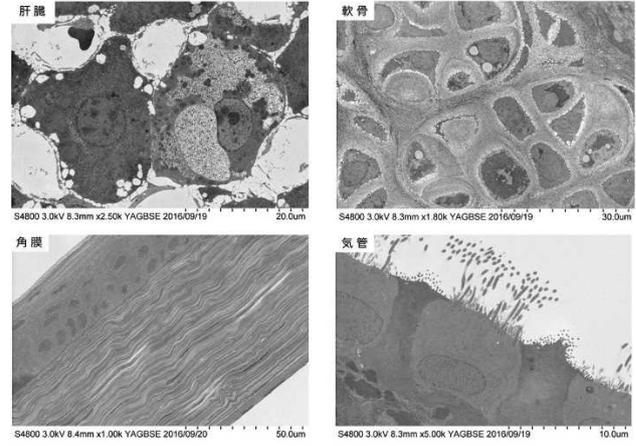
本研究開発で確立された簡便迅速な反射電子撮像条件と 熟練と時間を要する従来の透過電顕像の同等性を証明



血小板内部の構造も評価可能

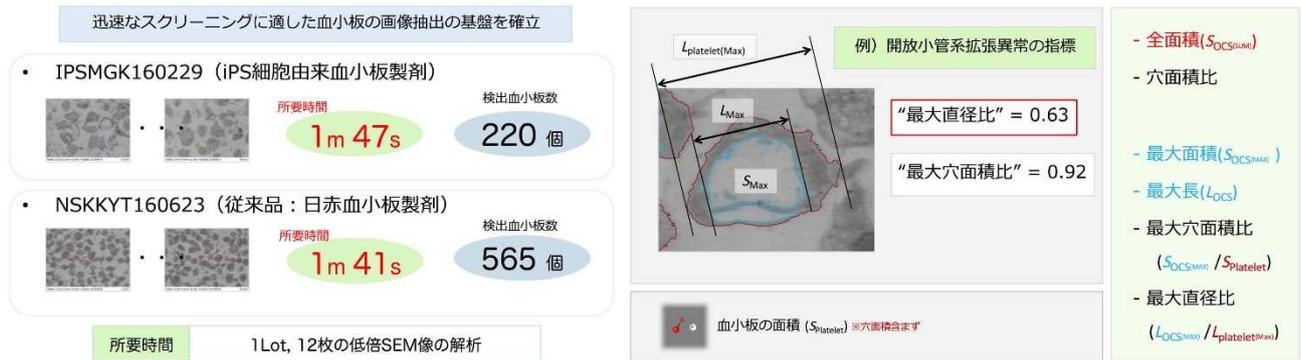


臨床応用を目指す様々な臓器・組織（ラット）の反射電子像



2-1. 電顕画像定量解析ソフトウェア開発

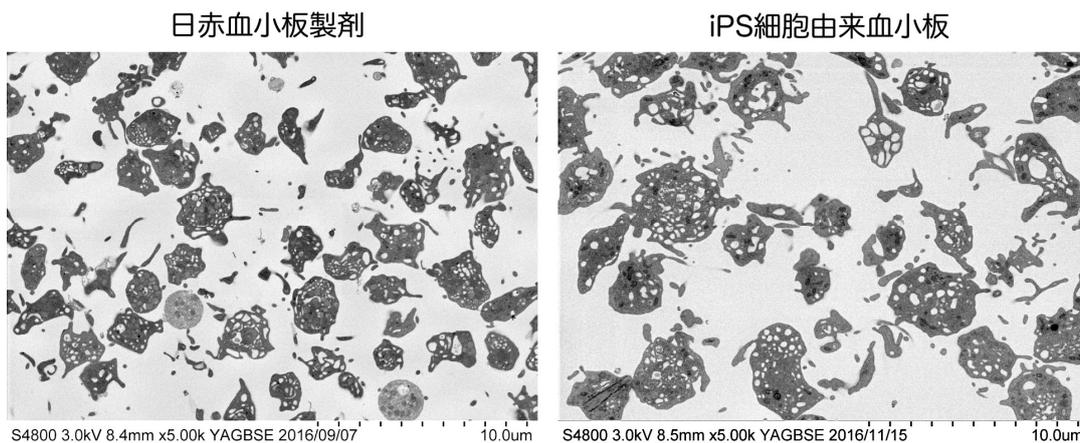
これまでの基礎研究段階で、電子顕微鏡に搭載された CCD カメラで撮影した高解像デジタル画像を既存の画像解析ソフトウェアで処理することで、血小板のサイズや分泌顆粒の数などを定量解析するプロトコルは確立されていた。しかし、血小板の電顕画像の中から分泌顆粒や開放小管系等の定量化対象物を抽出するツール機能が不十分であるため、モニター画面上で個々の対象物をトレースする作業に長時間を要していた。（結果）この定量化対象物の抽出作業をアシストする新たなツール機能を開発し、iPS 細胞由来血小板製剤のスクリーニング評価における画像解析に要する時間が、従来の 1 検体当たり約 1 時間から、最短で 2 分以内へと大幅に短縮された。



2-3. 電顕画像及び解析データの集積及びデータ管理システムの開発と活用

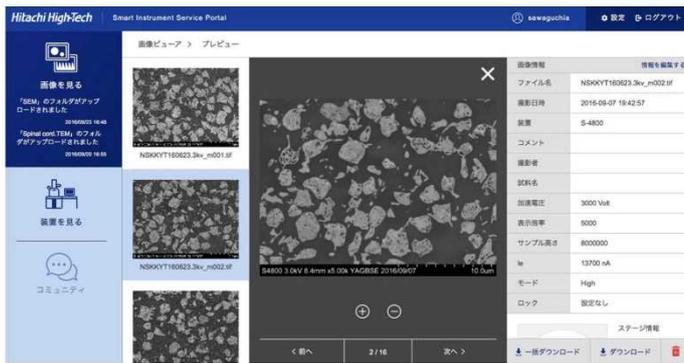
上記手法にて集積した電顕画像・データの集積に保存・管理するデータベースシステムを新たに開発し、iPS細胞由来血小板製剤ロット間及び対照となる献血血小板との比較を行った。

(結果) iPS細胞由来血小板製剤に含まれる血小板と献血血小板の電顕解析を実施し必要なデータを集積した。下図にあるように、iPS細胞由来血小板は献血血小板に比較してサイズの大きい血小板を多く含むことが判明したが、細胞内の分泌顆粒含有量や開放小管系の発達に大きな差は見られなかった。信頼性のある定量的比較には献血血小板の画像データをさらに集積する必要がある。



さらに、品質評価に関わる電顕画像および画像解析データを保存・管理し、血小板製剤 Lot No. に基づいたトレーサビリティ機能を搭載した大容量データベースを開発し、有効かつ円滑なデータ集積システムを構築した。本データベースの開発・運用に際しては、血小板製剤情報の共有をはかるため、万全なセキュリティ対策を備えたクラウドシステムを有効活用した。

クラウド画像共有・保管システムの運用を開始



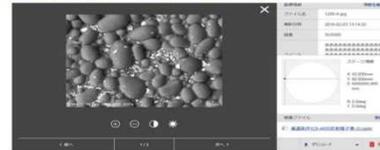
(1) 画像データ選択時、プレビュー前に撮像条件等を表示、確認



(2) プレビュー画面における画像表示拡大

(3) 画像確認用コントラスト、ブライトネス追加

(4) 画像関連ファイルの登録、閲覧



以上の検討により、最終的に電顕試料作製から画像解析を経てデータベースに登録するまで、1ユニット（試料作製1名＋電顕解析1名＝計2名）で1日に解析できる検体数が20検体/日にまで大幅に向上された（現行は1～2検体/日）。

課題3. 増殖フェーズにある不均一集団の巨核球細胞株から、マスターセル細胞株として選別できる評価技術の確定

巨核球細胞株の不均一性の原因を探索すると共に、マスターセルバンクに適した細胞集団の選別方法の開発を行った。

3-1. 巨核球細胞株の多様性・不均一性の原因探索

血小板前駆細胞である巨核球の成熟に従って発現上昇が観察できる特異マーカーXの遺伝子座に蛍光タンパクを組み込んだ巨核球細胞株を樹立した。本細胞株は、ドキシサイクリン（DOX）非存在培養液条件下におくと、その遺伝子に組み込まれているDOX依存性誘導因子（c-MYC, BMI1, BCL-XL）が発現オフとなって増殖が止まり成熟が促進される。一方、その成熟過程においては特異マーカーXの発現が上昇し、蛍光タンパク質VENUSの発現強度が経時的に強くなって行くことが観察される。巨核球細胞株が自己複製により細胞増殖する過程でも、一部の細胞においてVENUSが発現することを見出した。そこでこのVENUS発現を指標に細胞増殖期における巨核球細胞株のクローニングを試みた。

（結果）まず細胞増殖期において既にVENUSの発現が見られる細胞をクローニング培養し、VENUS発現比率が非常に高い複数のクローン細胞集団を得ることに成功した。次にこのVENUS発現比率が高い集団を、さらにVENUSの発現強度の高い集団と弱い集団に分けて解析を行ったところ、VENUS発現が高いサブクローン集団では、巨核球マーカー比率が98%以上であることを確認した。また、血小板産生能力も選別以前の不均一な細胞集団に比し、平均で3倍以上に改善した。そこで、計画していたSingle-cell mRNA sequencing（RNA-seq）に関する既存の方法による上記VENUS highとlowでの遺伝子発現の差を検証し、原因遺伝子候補を同定した。

3-2. マスターセルバンク製造に向けた巨核球細胞株の選抜方法の開発

細胞内部の挙動分子に着目し、連携研究者である京都大学 iPS 細胞研究所の斎藤博英教授が開発したmiRNAスイッチ法を導入した。発現プロファイリング検索によって細胞集団における特徴的なマイクロRNA（miRNA）発現量が決定されても、斎藤教授の研究ではメッセンジャーRNA（mRNA）の発現制御を実際に行う

miRNA の機能的な発現量とは必ずしも相関しないという最新結果を共有した。一方、血小板産生における不均一性を反映する miRNA を模索するスクリーニングを行い、以下の結果を得た。

(結果) 未選別の巨核球細胞株はある特定の miRNA に対する反応性において2つの細胞集団に分離できることを見出した。その後の解析から、これら2つの集団は、血小板産生能(放出能)が高い集団と低い集団に分離可能なこと、遺伝子発現プロファイルの検証によって、特異的な遺伝子の発現が血小板産生における不均一性の指標になることを見出した。本方法の有用性により、フローサイトメーターを用いない細胞選別方法の開発も可能になる可能性を提示した。

[1] 巨核球細胞株の不均一性を呈する原因の一端となる制御機構の発見

[2] miRNA スイッチ法を応用することにより、フローサイトメーターを用いない生物由来原料基準に適合する細胞集団単離技術の開発に繋がる知見を得た。

機構相談

PMDA と以下の事前面談・対面助言を実施した。

(1) 最終製剤中の工程由来不純物の安全性評価法と培地添加物の生物由来原料基準適合性について対面助言により、上記相談事項に対する基本的考え方のコメントを得た。

(2) 血小板産生株に関わるウイルス安全性に関する試験項目及び試験内容等の妥当性について対面助言により、ウイルス試験についての有用なコメントが得られた。

(3) 臨床試験実施を担保する一般毒性試験、造腫瘍性試験、製剤中残存不純物について対面助言により、各々の相談項目において具体的なコメントが得られ臨床試験前に実施すべき試験デザインが明確になった。

(4) 第1相試験のための治験プロトコールについて

対面助言の結果、第1相試験のデザイン(対象患者基準、被験者数、血小板投与量、エンドポイント、有害事象対策等)について相談者の提案が大筋受け入れられると共に有用なアドバイスが得られた。

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. 分担研究開発課題：iPS 細胞由来血小板製剤製法確立および特性解析法確立

iPS 細胞由来血小板製剤の製造法開発において、有用性が期待できる細胞数の血小板を調整するのみならず、高品質の血小板製剤であることが求められる。血小板数の確保においてはバイオ医薬品製造方法を参考にした。即ち巨核球細胞をフィーダー細胞無しで維持する方法を見出し、全ての工程を細胞懸濁液として取り扱い可能とすることで処理工程の効率化を図った。血小板は外的刺激に反応して容易に活性化することから、最大の課題は血小板の精製・濃縮であったが、これについては本課題で確立した種々の血小板機能マーカーを工程ごとに評価すること、各工程条件の適正化を図った。血小板評価法の開発においては米国ガイドライン等を参考にしたが、これに相当する規制ガイドラインは他に見当たらなかった。何れにしても推奨されている評価項目は既存の献血血小板において検討された評価であることから、基本的な評価法は報告されており、それらを参照して iPS 細胞由来血小板の評価系も確立した。但し、iPS 細胞由来血小板製剤の特性(血小板サイズ、製剤中の残存巨核球細胞、工程由来不純物等)を考慮した評価系の開発も必要であった。これらのうち安全性に関わるものについては、PMDA 相談を通じて必要な検討課題と方針を整理することが出

来た。血小板の効能として in vitro 試験のみならず動物モデルでの止血効果が確認できたことは、ヒトでの有用性を示唆すると共に、治験薬出荷試験で通常使用される in vitro 評価項目のうち何が血小板の体内効能を反映するかの手がかりにもなった。

現在は第1相試験開始前の初期段階であるが、今後の検討による各製造工程の設定条件と血小板品質評価法のさらなる探索により、TPP(Target Product Profile)とCPP(Critical Process Parameter)の見極めが今後の課題となる。

課題2. 電子顕微鏡デジタル可視化技術を駆使した血小板製剤品質評価手法の開発

再生医療製品において細胞内部の微細構造まで可視化できる電子顕微鏡による形態観察は重要な品質評価項目となる。しかしながら、これまでは超薄切片作製するための高度な技術と時間、高価なダイヤモンド製ナイフを要すること、高速画像処理・データベースシステム不足による定量評価困難のため容易に活用するには至らなかった。本課題では先の各問題点を解消すると共に新たなデータ管理システムを構築することにより、安易・安価・短時間かつ定量的な標本作製、画像解析が可能となった。今回得られた成果により、iPS細胞由来血小板の機能と電顕画像解析のデータを短期間に比較することが可能となった。その結果、巨核球細胞株の成熟過程評価による優良株選択、さらに製造工程の血小板品質に与える影響を総合的に評価することによる血小板製造方法の確立に繋がった。

課題3. 増殖フェーズにある不均一集団の巨核球細胞株から、マスターセル細胞株として選別できる評価技術の確定

巨核球細胞株の血小板産生能を上げる手がかりとして、増殖期にある巨核球細胞集団の不均一性に着目した。不均一性の解析法として、①血小板マーカー発現のレポーターを組み込んだ巨核球細胞株の増殖期の観察とこれに基づく検討結果から、巨核球段階で既に血小板マーカーをより強く発現している細胞集団が高い血小板産生能を示すことが分かった。別の方法として、②miRNA スイッチライブラリーの活用により、特定の mRNA 発現が異なる細胞集団と血小板産生能との関連を見出すことが出来た。これらの成果は血小板産生の細胞基質であるマスターセルバンクの品質向上に結び付く重要な手がかりとなる。

4. まとめ

本事業においては、iPS細胞由来血小板に関する「治験薬製造方法と品質評価法の確立」、「品質評価の一環としての電顕観察と画像解析システム構築」、「製造の起点であるマスターセルバンクの選別方法」の3つの課題を検討した。その結果、iPS血小板の治験薬製剤製造の基盤が確立された。さらに得られた成果のうち、大量の細胞製品を調整するための技術、電顕観察を含む品質評価と連動した製造法開発の重要性、良質なマスターセルバンクを選別するための技術的アプローチ法等は、一般に他の再生医療製品の開発においても大いに参考になると考えられる。