

平成 27 年度－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	均質な培養ヒト角膜内皮細胞による安全な再生医療の確立のための革新的 評価の開発
研究開発代表者 所属 役職 氏名	京都府立医科大学 感覚器未来医療学講座 教授 木下 茂

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

培養ヒト角膜内皮細胞懸濁液の前房内移入による角膜内皮機能の再生を可能とする革新的医療技術について、国際戦略ビジネスにも対応できる高品質培養細胞を安定的に産生するために、

- ① 高品質細胞製造の工程評価
- ② 高品質細胞純度の評価
- ③ 目的細胞と非目的細胞の生体内動態の評価並びに混在非目的細胞に反応する自己抗体様タンパクの評価
- ④ 移入細胞の変性を誘起する生体因子の評価

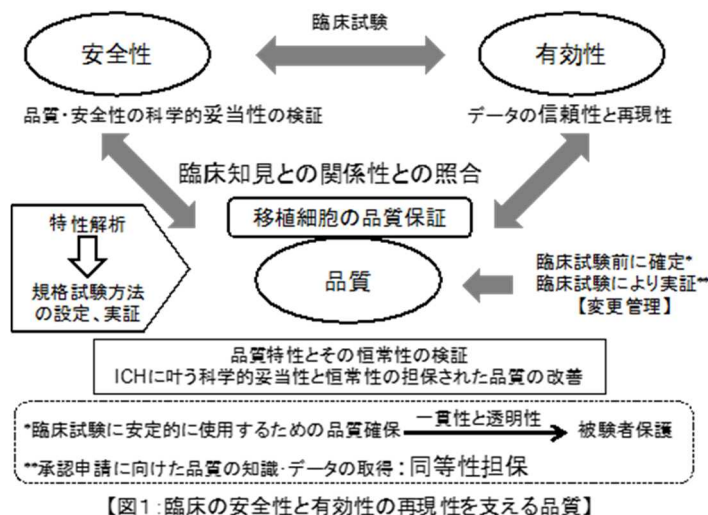
の4つを目的に、平成29年度の治験開始、国際臨床研究開始に遺漏のないよう実践的技術を確立する。

本医療技術は、若年者ドナー由来の角膜内皮細胞を、生体外で培養拡大後、細胞懸濁液を水疱性角膜症患者の前房内に移入するもので、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に基づく11例の偵察・探索臨床研究で、ヒト適用においての安全性、臨床POCは確立している。更に再生医療等安全性確保法の下での探索的臨床研究を平成28年3月までに19例を実施してきた。薬効薬理・安全性に関する非臨床試験、薬事承認に対応した製法・品質は並行する再生医療の実現化ハイウェイ（HW）事業で平成28年度に最終決定し、PMDAとの4回にわたる対面助言により確定してきた。本年3月に医師主導治験を申請して受理され、9～10月にも患者への投与を計画している。平成31年度に企業治験開始予定である。

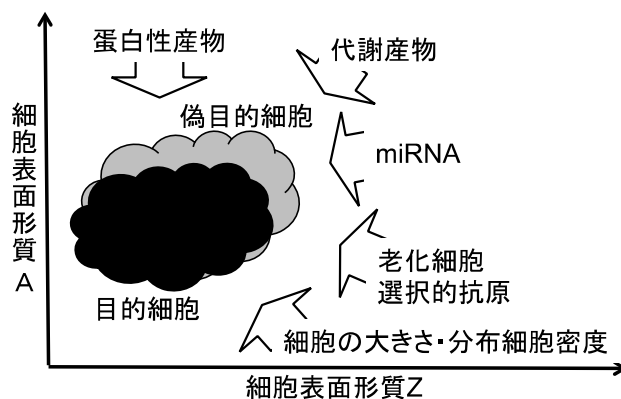
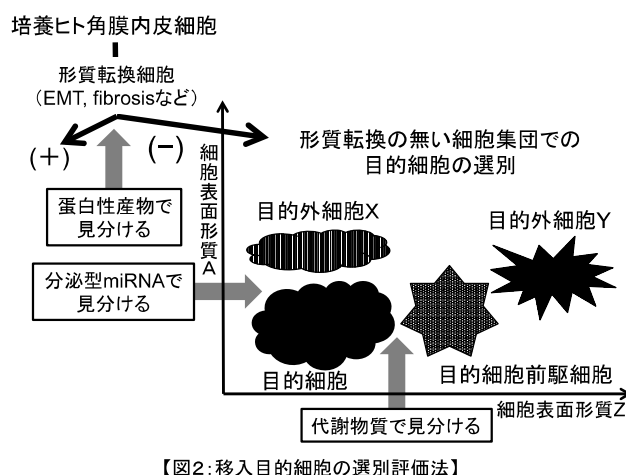
細胞表面形質を駆使して培養ヒト角膜内皮細胞が細胞特性の異なる複数の亜集団から構成されていることを見出し、細胞移植に最適な高品質な細胞亜集団と予想するエフェクター細胞が小型で六角形の敷石様形状を形成し、ミトコンドリア機能によるエネルギー代謝系を利用する成熟分化内皮細胞であることを確認している。

移入される細胞の品質が高品質かつ目的細胞の含有率が高いほど、短期間に優れた臨床薬理効果を発揮することを確認している。既に、複数の細胞亜集団の選別判定基本技術を見出している。本技術の実践化が本課題の大きな目的である。

細胞移入再生医療において移植細胞の品質は現代科学に立脚しつつ、臨床知見との関係性が照合できる具体性を持つことが不可欠である。これによって初めて、臨床試験の安全性と再現性が担保される。再現性のある安定な医療こそ安全性の最前提となる要件で、不均質集団からなる培養細胞の品質を、そのバラツキ・分布の程度を含め基質化し、製造工程によりその品質を有する最終製品を再現性良く安定的に供することが極めて重要である（図1）。



この基本的考え方をもとに、本事業においては、高品質移入目的細胞を識別できる非破壊的評価法の実践検証と治験に用いる最終的な規格試験方法を確立（図2）、移入細胞の効能と直結する機能試験法を含めた移入細胞の同等性確認試験法の決定（図3）を目的とする。



2. 実施内容及び結果

研究開発項目1：外観試験を超える最終製造物たる培養細胞の品質評価法の実践検証

基盤研究で仮設定の品質規格項目並びに基準値を治験デザインに組み込めるよう新たな評価方法の策定を検討してきた。相転移細胞を排除した相対的に均質な細胞集団でも、目的細胞（エフェクター細胞）以外に非目的細胞が混在し、その混在の評価法を定め、有効性を検証した。以下の各研究開発項目ごとに詳細を記すが、治験における最終被験目的細胞の品質評価法項目候補の決定の為に、CPC 生産品を用いて①分泌型 miRNA 候補 5 種から 2 種類の miRNA に絞り込み、他の評価法との補完性について結論を得る。②エネルギー代謝産物について CPC 生産品培養上清を用いて有用性を検証し評価法への採否を決定する。③ハイブリッドセルカウント法による培養細胞の位相差像定量化技術による細胞面積と細胞密度の解析の治験適用試験法としての適合性について実験プロトコールを含め判断する。

研究開発項目 2：非侵襲的品質評価法としての分泌型 miRNA の有用性検証

培養細胞亜集団のうち、目的細胞（エフェクター細胞）の構成割合・純度を非侵襲的に選別定量、評価できる分泌型 miRNA 分子種が CPC 生産品の品質評価に適用できるかを明らかにする目的で、6 well plate のラボ継代培養品を用い上清の保存条件、抽出条件を検討した。その結果 4℃で保存し 3～4 日以内に miR を抽出し、更には培地交換後 3～4 日目の培養上清を回収すべきであることを確認した。候補産物 5 種類から 2 種の miRNA135 及び miRNA184 に絞り込んだ。更に T25 フラスコ製品を用いて検討した結果、miRNA135、miRNA184 共に目的細胞の割合（E-ratio）と相関が見られ、目的細胞が 90%以上のロットでは分泌量としては miR135 が 20～50 copies/ μ L で miR184 が 100～200x10¹² copies/ μ L で miR184 のほうが 20～30 倍高値を示した。

研究開発項目 3：非侵襲的品質規格法としてのエネルギー代謝産物評価法の有用性検証

T25 フラスコを用いた CPC 培養スケールの培養法による 5 ロットの生産品を用い、培養継代数 P3 の 5 週目の上清を回収し、上清中の代謝産物 Lactate、Pyruvate、Citrate を Abcam 社の Assay kit を用いて 570nm の発色法により測定し、其々 Lac/Pyr 比及び Cit/Lac 比を算出した、又 Pro、Ser を LC-MS/MS 法で測定し、Pro/Ser 比を算出した。又此れまでの規格試験項目に関しては上清中の PDGF-bb 及び IL-8 を ELISA で測定し、細胞の FACS による目的細胞割合（E-ratio）と対応させて比較した。E-ratio が高いロットの培養上清では Lac/Pyr 比は 17～27 で、E-ratio が 70%以下のロットではこの比は 10 以下と正の相関が見られた。一方 Cit/Lac 比は E-ratio が高いロットの培養上清では 1.1 以下で、E-ratio が 70%以下のロットの CM では 9.9 以上と逆相関が見られた。Pro/Ser 比は E-ratio が 70%以上のロットでは 1.9 以下で、E-ratio が 70%以下では 2.1 以上であったが、相関はみられなかった。結果として、此れまで検討してきた予備的検討で明瞭な傾向が認められた Lac/Pyr 比と Cit/Lac 比が品質規格試験項目として新たに組み込める可能性が示された。引き続き探索的治験に用いる被験製品（9 ロット予定）の培養上清で検討して規格値を決定し、検証的治験に用いる予定である。

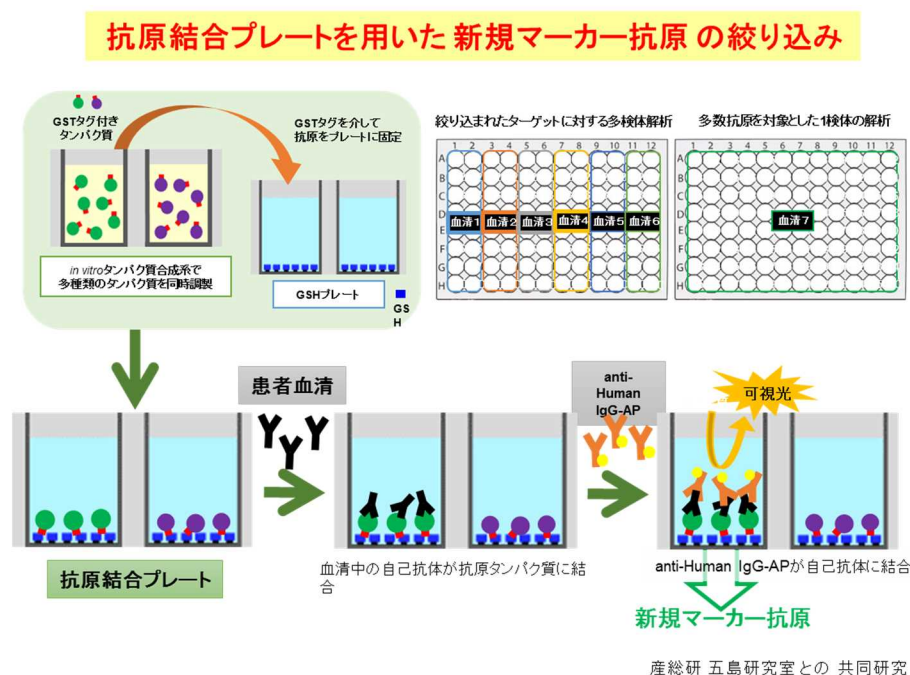
研究開発項目 4：ハイブリッドセルカウント法による培養細胞の位相差像定量化技術による

培養最終細胞産物の治験適用適合性評価

高品質エフェクター細胞は 1 細胞あたりの面積が小さく、高密度になることが判明している。そこで、キーエンス社のオールインワン顕微鏡である BZ-X700（位相差像が大幅に改善）と同社独自アルゴリズム搭載の「ハイブリッドセルカウント」を用いての細胞密度測定の有用性を検証した。CPC で製造の 5 ロットの細胞に関して、各フラスコ 5 視野をハイブリッドセルカウント法を用いて測定した。その結果は細胞面積のばらつきは 199 μ m²～344 μ m²で、細胞密度は 1724 個/mm²～2564 個/mm²であった。ハイブリッドセルカウント法と実測値にはズレはあるものの、本法は参考値として十分に工程管理に使用出来ると考えられた。なお、EGF を培地から除くことで 3 ロットは全て E-ratio が 90%以上と高 E-ratio の細胞が得られるようになったが、細胞密度（ECD 実測値）と E-ratio とはかならずしも対応はしなかった。

研究開発項目 5：プロテインマイクロアレイによる培養液、臨床検体中のタンパクの網羅的評価

下の図に示す手法で抗原結合プレートを用いた新規マーカー抗原のうち非目的細胞を識別する免疫学的新規マーカーの追跡を行った（産総研五島先生との共同研究）。2 万抗原からなる網羅的なプロテインアレイ解析でヒト血清を解析し、先ずは 38 抗原について陽性シグナルが得られた。更に絞り込みを行い 10 種類の抗体で陽性であった。培養ヒト角膜内皮細胞で陽性と思われる抗原が 10 種同定されたが、最終目的である培養細胞に含まれる非目的細胞と反応する自己抗体・抗原の選定までには至っていない。



研究開発項目 6：培養細胞内の目的細胞、非目的細胞の選択的視覚化技術評価

培養ヒト角膜内皮細胞は細胞表面形質で規定される複数の亜集団で構成されているが、亜集団間の生体内動態の差は不明である。そこで名古屋大学ナノバイオロジー研究センター馬場嘉信研究室と共同で下記研究を進めてきた。角膜内皮細胞の量子ドットラベリング条件の決定を受けて量子ドットラベル化角膜内皮細胞の *in vivo* 蛍光イメージングの試行試験を実施した。

治験に用いる製法で製造した治験予定水準である 90%以上の目的細胞を含む被験物を用い、光量子ドットで標識 (QDs655/R8) して、京都府立医科大学でクライオ処理したマウスモデルの前房内に移植して、名古屋大学にて *in vivo* 組織イメージング手法を用い体内動態を検討した。

その結果培養ヒト角膜内皮細胞は投与 24 時間後、48 時間後に眼球、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し観察した。その結果標識された細胞は角膜内皮面にのみ観察され、肺への僅かな移行が一過性に認められたが、他の主要臓器への移行は観察されなかった。非目的細胞の体内動態の解析も予定している。

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 評価手法

・規制上の要求事項等との関係

安全性に懸念のある最終製品に含まれる非目的細胞（目的外細胞）の評価方法が必要とされる。即ち含有非目的細胞比率、非目的細胞が何をしているか？非目的細胞単体での安全性、機能評価である。又目的細胞、或いは非目的細胞が産生しているタンパク質がどのようなメカニズムで内皮細胞の有効性と結びついているか、或いは有効性に阻害をかけているかは承認申請までに解明しなければならない課題である。研究開発項目 6 で確立した量子ドットラベル化法により、高純度の目的細胞を含む培養角膜内皮細胞の体内動態試験を実施したが、同様の手法で非目的細胞リッチな細胞を量子ドットラベル化法により非目的細胞を標識して体内動態を調べることにより安全性への影響を検討する予定である。

・既存法（直接対応する手法がない場合は、代理で使用される手法）の問題点

これまでの手法は生化学的手法を用いた細胞規格試験として FACS を用いた細胞表面抗原の発現の組み合わせで目的細胞の純度と、ELISA を用いた培養上清中のタンパク産物の発現量で目的細胞を絞ってきたが、それでもなお含まれている非目的細胞の比率を下げるための新たな手法が必要である。

・既存法の問題点を解決する別手法の提案及び同提案が有望であるとする根拠

培養ヒト角膜内皮細胞の亜集団の代謝特性の差で目的細胞（成熟分化細胞）が TCA サイクルを用いて生きている集団であることが分かってきた。代謝産物の解析で TCA サイクルリッチな集団を解糖系リッチな集団から分けられることが分かってきたため新たな手法として組み込んでいくことにした。更に今回検討してきた miRNA と細胞の大きさ・分布細胞密度の解析結果を組み合わせ、補完的に高品質細胞を絞っていけると判断している。

・別手法が妥当であることを示す方法

今後医師主導の探索的治験に用いる被験製品（9 ロット予定）で規格値を決定して、検証的治験でその妥当性を示していく予定である。

・個別製品特有の評価手法に留まらず、普遍的な評価手法とするための工夫

今後、平成 29 年 2 月に納入した細胞外フラックスアナライザーを駆使して、ミトコンドリア機能を本格検定し、OCAR（酸素消費速度）/ECAR（細胞外酸性化速度）値を加えて、再生医療に広汎に適用できる実用的代謝機能評価法として確立する。

② 製造工程の合理化

・当該工程の製造管理及び品質管理基準上の重要性

これまでに以下に示すように合計 4 回の PMDA 薬事戦略相談を実施した。

PMDA薬事戦略相談

第1回対面相談(2016.03.30):品質相談

- 維持培養期間内のフラスコ培養を同一と考える
- スケールダウンプレーートの使用可

第2回対面相談(2016.8.15):品質相談

- 培地交換による維持培養期間の設定
- 最終製品、出荷日、出荷後工程管理について

第3回対面相談(2016.11.22):非臨床安全性相談

- ヒト最終製品を用いた一般毒性試験の実施
- 製造工程由来不純物の安全性評価

第4回対面相談(2016.12.20):治験相談

- エンドポイントについて
主要評価項目を「細胞移入後12週の角膜内皮密度が500個/mm²以上」
- 探索的試験の設計について
細胞懸濁液(投与液)を2群間の検討及び移入細胞量(2x10⁵, 5x10⁵, 1x10⁶)

第1回、第2回の品質相談においては、最終製品の品質試験には最終継代時に同一細胞密度で播種して別途作製したスケールダウンプレーートを用いる事の上承が得られた。又第2回面談では、当該フラスコ製品において、以下の図に示す様に最終製品、出荷日、出荷後工程管理について PMDA との合意が得られた。

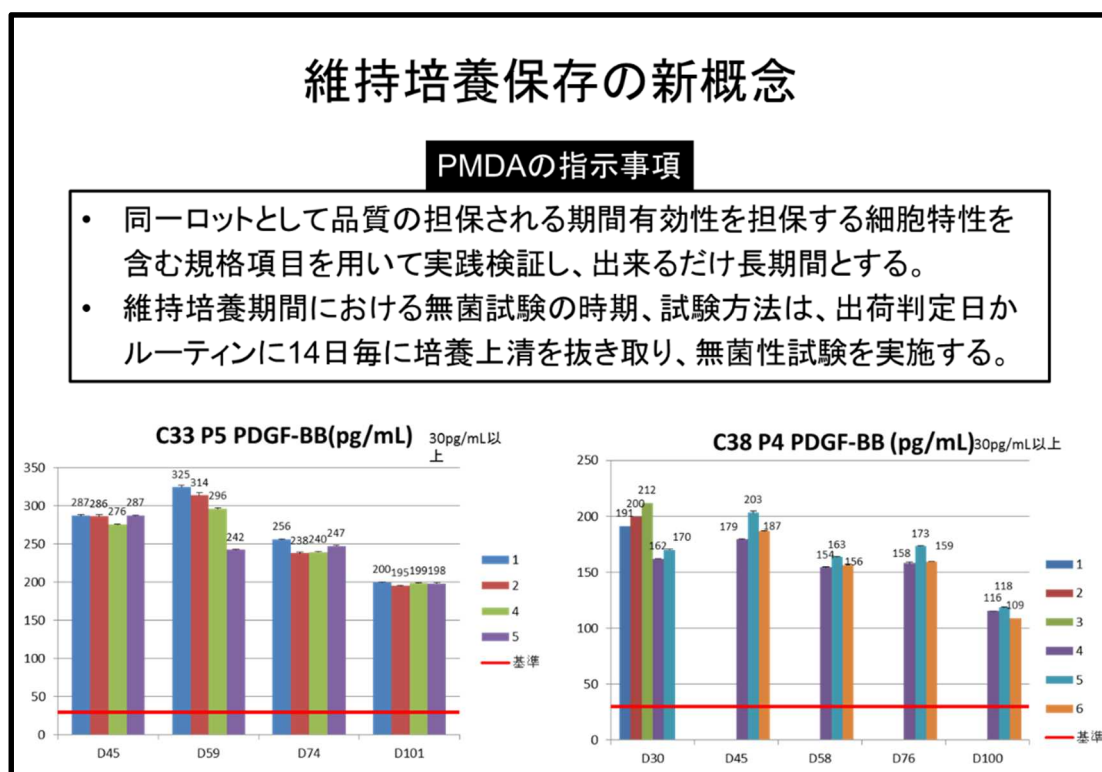
安全性に係る試験としては、以下の図に示す様に角膜の受入れ試験としてウイルス試験 (HIV-1, HIV-2, HBV, HCV, HTLV-1, HTLV-2) を行う事、出荷判定時の試験としてウイルス試験 (CMV, EBV, VZV, HSV-I/II, Parbo virus B19) を実施する事、更には各継代時には工程管理試験として無菌性試験 (無菌試験、マイコプラズマ試験、エンドトキシン試験) を実施する事、更に後述する維持・保管期間においては、出荷判定日から 14 日毎の無菌性試験を実施する事で合意した。

最終製品、出荷日について(第2回対面助言)

- ※1: 最終製品の製造終了より速やかに規格試験を実施。
- ※2: 最終製品を開封する日を出荷日とし、一番時間を要する無菌試験を含め全ての規格試験結果が得られる時を出荷判定日とする。
- ※3: 移植する前に調整時判定(投与液の細胞数、生存率の検査)を行う。
- ※4: 移植に用いた残りの細胞・培養上清を用いて無菌試験等の安全性試験を実施する。

- 維持・保管期間を通じての汚染のリスクの低減化を目指し、工程管理試験として出荷判定日から14日に一度の頻度で別フラスコ培地を用いた無菌性試験を実施する。
- 最終継代時よりゲンタマイシン非添加培地で培養することを努力する。
- 安全性試験として以下を実施
角膜受入れ時ウイルス試験: HIV-I/II, HCV, HBV, HTLV-I/II
出荷判定時ウイルス試験: CMV, EBV, VZV, HSV-I/II, PVB19

最終継代における細胞培養時に細胞が飽和密度に達した後どれくらいの期間、培養液の交換のみで高品質の細胞が得られるかを、細胞表面抗原、タンパク生産物、可溶性 miRNA、上述代謝産物を用いて評価して、新しい保存方法としての採否を決定する。後述の治験製品の輸送に関する検討に示す様にビジネスにおける細胞の運搬方法にも関連する。又以下の維持培養保存の新概念の図に示す様に細胞表面抗原に関しては P3 に於ける FACS による目的細胞比率、又培養上清に関しては ELISA による P4 の PDGF-bb の産生量は各継代後約 100 日（出荷判定日から 30 日～40 日）まで、培地交換のみで培養しても目的細胞比率、上清中の PDGF bb の産生量には変化がないことが判明した。



治験製品の輸送に関する検討

多施設による医師主導治験を早期に実施すべく、高品質な細胞を培養中のフラスコのまま 37℃で安定的に輸送する方法の検討を行った。下図に示すように培地で完全に満たした T25 フラスコを更にγ線滅菌済みのユニパックに入れ、37℃に加温した蓄熱材とともに TACPack（玉井化成株式会社）に収納し、温度ロガーとともに輸送した。通常の CO₂ インキュベータで培養した細胞と比較したが、細胞品質（サイトカイン産生と FACS 解析）に差異は認められなかった。

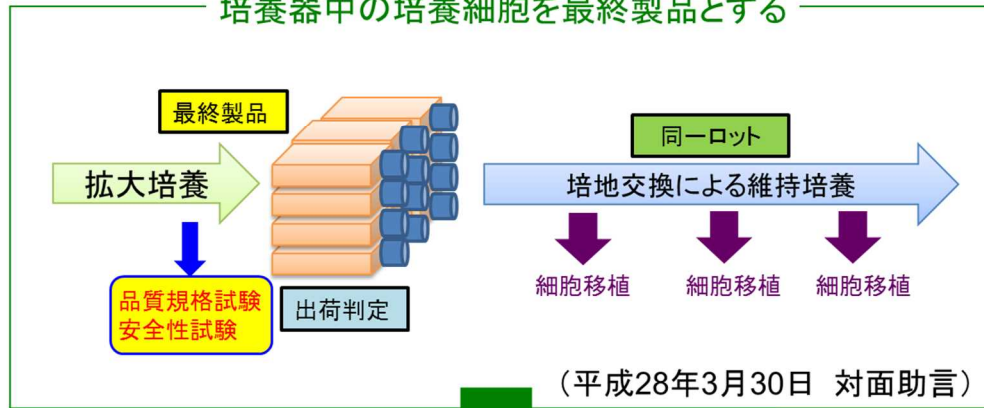


項目		R0131 (0h)	R0132 (24 h)	R0133 (24 h)
ECD (cell/mm ²)	回収細胞から算出	2028	1920	1944
	ソフト解析値	1996	2059	2102
生存率 (%)		94.4	94.0	95.6
FACS (%)	■■■■■	99.3	97.9	98.0
	■■■■■	0.1	0.0	0.0
	■■■■■	0.0	0.2	0.3
	■■■■■	0.0	0.0	0.0
	■■■■■	0.4	0.3	0.4
	E-ratio	98.6	95.8	95.7
ELISA (pg/mL)	■■■■■	UD	UD	UD
	■■■■■	104.784	223.3	215.0

早期薬事承認に向けての多施設試験

PMDAとの対面助言での展望

培養器中の培養細胞を最終製品とする



- 日本国内など近辺への輸送が可能
- 出荷時検査とロットの対応についても現実的解決

多施設治験の実施が可能となった



・既存工程の問題点

臨床研究においては、製造工程の継代数は主に P2 或いは P3 まで培養を経て最終製品として細胞の回収後、患者への投与に用いてきた。これまでは一般的には継代数が増えるにつれ目的細胞比率が下がっていく傾向が見られた。これでは多くの患者への治療には十分量の細胞が得られてこない。

・既存工程の問題点を解決する別手法の提案

これまでの製造法に於いては培地への主な添加物を其々継続添加して培養してきたが、これから添加物の添加量と添加時期を再検討する。又これまでは製造に用いる角膜ドナーの年齢を若年性ドナー（7 歳～29 歳）に絞って用いてきた。若年性ドナーのほうが高齢ドナーに比べて品質の良い培養角膜内皮細胞の得られる確率が高かったためである。しかしながら若年性ドナーの入手は簡単ではない。培地への添加因子の再検討と、高齢者ドナーからの高品質の細胞が得られる培養法を検討していく。

4. まとめ

培養細胞移入による再生医療において細胞の品質は、臨床知見との相関がみられる具体性を持つことが必要である。これによって初めて、臨床試験の安全性と再現性が担保される。高品質の細胞を高純度に再現性良く製造し、患者へ提供することが医療の安全性の大前提となる。不均質集団からなる培養角膜内皮細胞の品質を、此れまでの品質試験項目に加えて今回の評価事業で検討を行ってきた上清を用いた非破壊的評価法として3種類の代謝産物或いは2種類の miRNA を測定する新規の規格項目を設定することにより可能な限りの評価手法を駆使して、製造工程によりその高品質を有する最終製品を高純度で再現性良く安定的に供することが極めて重要である。