

平成28年度－平成29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	家族性 LCAT 欠損症治療用加工ヒト脂肪細胞の製剤の品質・安全性・有効性の評価と治験実施
研究開発代表者 所属 役職 氏名	所属：セルジェンテック株式会社 役職：代表取締役社長 氏名：麻生 雅是

目次

1. 事業の目的	1
2. 実施内容及び結果.....	2
3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容	8
4. まとめ	9

1. 事業の目的

レシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞（加工ヒト細胞）の再生医療等製品の研究開発において、① 加工ヒト細胞と LCAT 遺伝子導入マウス増殖型脂肪細胞（加工マウス細胞）の導入遺伝子産物の分泌能やその性能に差異があるため、加工マウス細胞をマウスへ移植する系において加工ヒト細胞+足場タンパク質から構成される移植用製剤の最適化研究ならびに安全性及び有効性の検討を行うことは困難である、② ヒト細胞の生着や動態を把握するために使用される免疫不全マウスへ、加工ヒト細胞移植用製剤の移植を試みたが、加工ヒト細胞移植用製剤の生着率と加工マウス細胞（同種）の生着率とに相違が認められるため、加工ヒト細胞の非臨床における生着率や薬効から臨床における移植細胞数含む製剤設計を行うことが難しい（図 1）。このため用法用量の設定根拠となるヒトでの移植細胞数を、免疫不全マウスへの移植試験成果やマウスの同種同系の正常モデルあるいは病態モデルの移植成果から外挿すること、また動物試験から安全性を適切に評価することは困難であった。

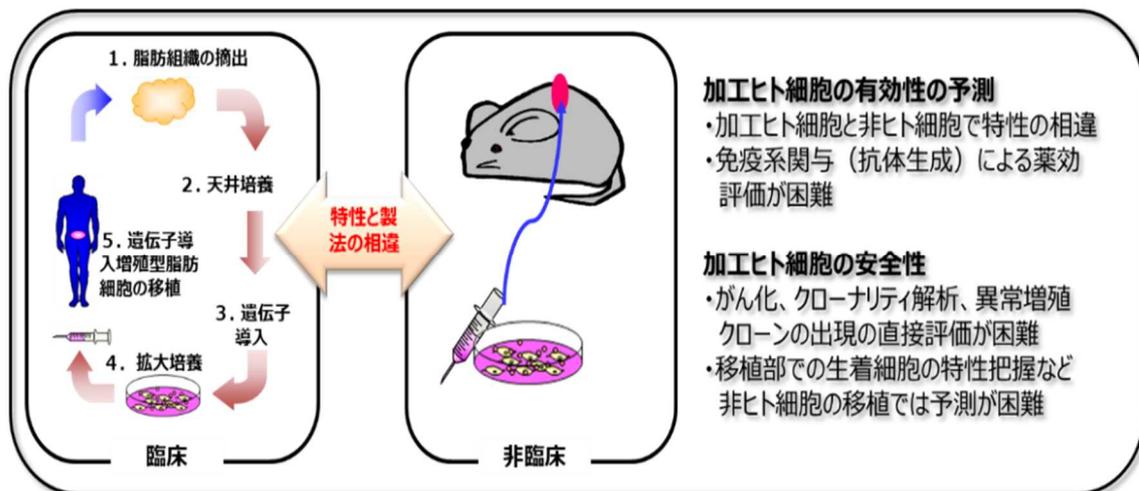


図 1. 加工ヒト細胞を用いる場合の研究開発課題

以上の課題を解決するため研究開発者は、H26 年度および H27 年度「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、LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞を、免疫系による影響を受けない中空糸に包埋する技術を用いて、加工ヒト細胞のみでの正常免疫マウスでの生存の確認と病態モデルでのヒト細胞の直接的な薬効確認を成し得ることができ、また安全性評価を実施し成果を獲得してきた。

本研究開発は、上記課題を解決するため宿主免疫系から隔離可能な中空糸（図 2）に包埋した加工ヒト細胞を正常免疫動物へ移植し、加工ヒト細胞とそれを移植部位にて局所で保持する足場タンパク質より組成される移植用製剤の最適化、移植用製剤の有効性ならびに安全性を検討できる新たな評価技術の研究開発を行い、さらには本技術を他の再生医療等製品の非臨床評価手法に適用し、実用化の確度の向上、すなわち迅速な再生医療等製品の製造販売承認の取得の一助としての活用を目的とする（図 3）。

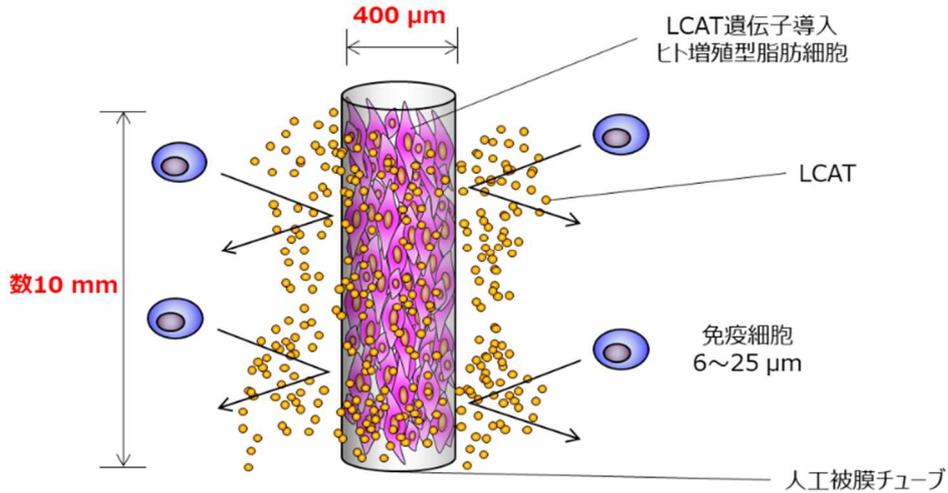


図 2. 包埋加工ヒト細胞の概要

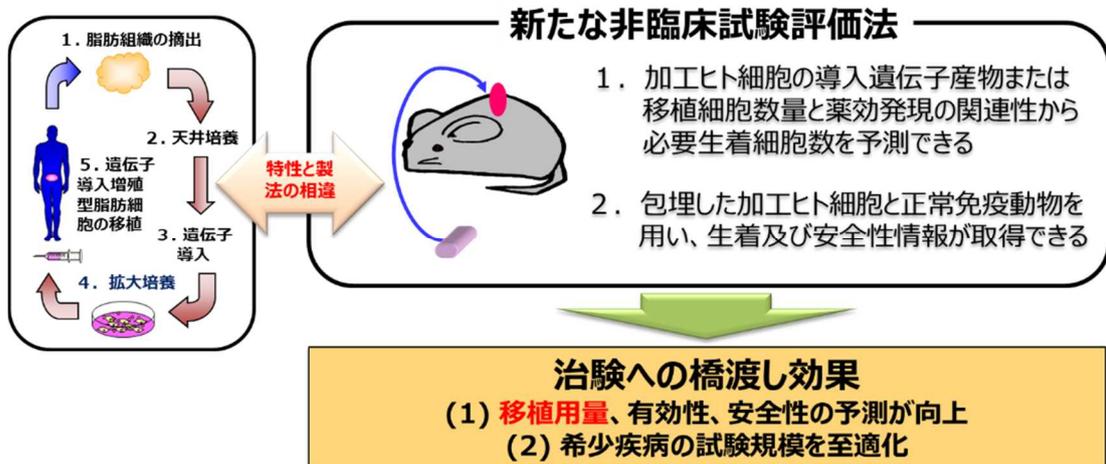


図 3. 包埋加工ヒト脂肪細胞を用いた新たな非臨床試験評価法とその効果

2. 実施内容及び結果

本事業では、製剤組成の最適化を検討したのち、治験導入に向けた安全性評価及び薬効評価を実施した。得られた結果は、RS 戦略相談において移植用製剤の用法用量の設定根拠、有効性及安全性評価など治験実施計画の設定根拠として活用する。

課題 1. *in vitro* 評価系における中空糸包埋下の LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞＋足場タンパク質組成の最適化検討

LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞＋足場タンパク質組成製剤の移植後の生着率や薬効発現に必要な移植細胞数の把握に必要となる、足場タンパク質と混合した包埋細胞の中空糸からの適切な抽出・単離法を *in vitro* で検討し、確立した。LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞＋足場タンパク質を包埋した中空糸に対し、3 種類のタンパク質分解酵素を反応させ、中空糸内を洗浄

することにより、包埋した細胞からの DNA の回収が可能となった。さらにその DNA を用いたコピー数測定により中空糸内に包埋された LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞の生存率を算出することが可能となった (図 4)。さらにその条件検討を進め、得られた細胞生存率、酵素反応時間、及び細胞障害性を指標に総合的に検討し、至適分解条件を特定した。

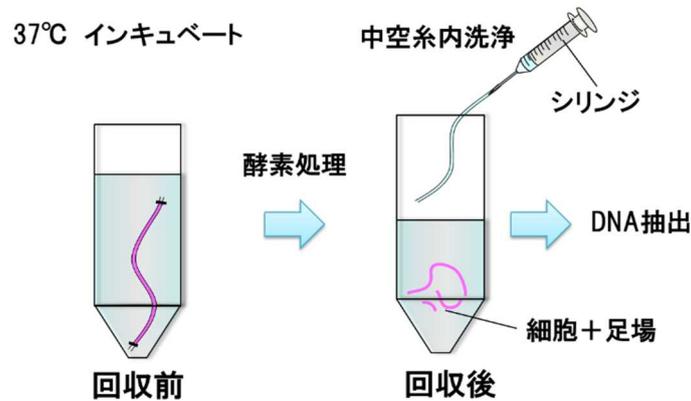


図 4. *in vitro* 封入細胞の抽出法の確立

さらに足場タンパク質の至適濃度を検討するため、 5×10^5 cells/tube の細胞懸濁液と各種濃度の足場タンパク質の混合液を封入した中空糸を作製し、*in vitro* で培養し、封入後 4、8、14 日目に包埋細胞を上記方法にて回収し、細胞数と回収率を測定した。細胞回収率、生存率、及び中空糸へ細胞包埋する際の操作性を考慮し、足場タンパク質濃度を決定できた。生存率は当初目標値より高く、用いた足場タンパク質が足場材として適切であることが確認できた。

課題 2. *in vivo* 評価系における中空糸包埋下の LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞の機能評価

平成 27 年度本事業にて実施した LCAT 欠損マウスの *in vivo* 移植実験において、移植 14 日後の包埋細胞の生存率は 20% と高値を示したにもかかわらず、免疫沈降ウエスタンブロット (IP-WB) による血中 LCAT 持続分泌は移植後 7 日までであった (平成 27 年度報告書)。中空糸表面の肉芽形成が中空糸内から外部への LCAT の移行を阻害している可能性が考えられたため、肉芽形成と LCAT 分泌との関係を検討した。LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞のみを包埋した中空糸を各種免疫抑制剤、抗生物質、あるいは生理食塩水に浸潤させたのち、LCAT 欠損マウスに移植し、移植後 3、7、14、21 および 28 日目に IP-WB を用いて血中 LCAT 分泌を測定した。また LCAT 抗体生成阻害のためサイクロフォスファミドを投与した。肉芽形成はいずれの処置群においても認められたが、免疫抑制剤を浸潤させた中空糸群では血中 LCAT が早期に検出できなくなり免疫抑制剤による細胞への傷害が考えられた。一方、抗生物質塗布群では LCAT 持続検出は 28 日目まで確認されたが、肉芽形成と LCAT 検出に関連性は認められなかった。むしろ LCAT の持続供給に伴う抗体形成抑制使用したサイクロフォスファミドの間歇投与で肉芽形成の過度な形成が抑制され、また目的とする LCAT の 28 日持続分泌が確認された。

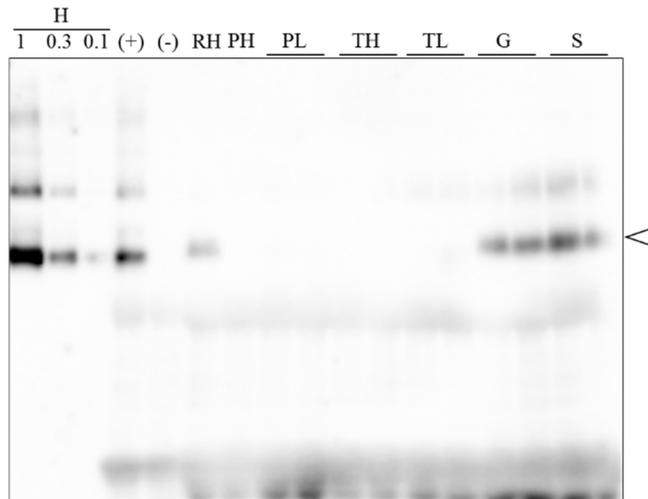


図 5. 肉芽形成抑制と LCAT 持続分泌 (移植 28 日後)

H 1, 0.3, 0.1: HDL 1, 0.3, 0.1 mg; (+): 培養液 (MP) + HDL 1 mg; (-): MP; RH: 中空糸培養上清; PH、PL 及び TH: 各種免疫抑制剤、G: 抗生剤; S: 生理食塩水; ◁: LCAT

課題 3. 移植用生着促進製剤キットの薬効評価に関する検証(予備試験)

LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞と足場タンパク質 (低・高濃度の 2 種) の混合細胞懸濁液を中空糸に包埋後、ヒト ApoA-I 発現 LCAT 欠損マウス (以下、LCAT 欠損マウス) へ移植した。回収した中空糸から細胞を回収し、移植 0 日目の総細胞数を 100%として生存率を経時的に測定した。足場タンパク質濃度に依存して生存率は高く、移植後 28 日目において低濃度で約 10%、高濃度で約 20%であった。血中 LCAT は移植後 28 日まで分泌され、分泌量は足場タンパク質濃度に依存して増加する傾向が認められた。肉芽形成と血中 LCAT 分泌とに相関は認められなかった。この成績から足場タンパク質との混合による移植においても、LCAT 分泌を確認できた。

移植 56 日目までの血中 LCAT 分泌、細胞生存率ならびに脂質プロファイルを解析した。残存細胞数 (用量) に依存して脂質プロファイルの変化が認められた。足場タンパク質濃度は血中 LCAT 分泌量に影響を与えなかったことから、足場タンパク質濃度は、操作性 (中空糸への細胞製剤の注入のしやすさ) の観点から低濃度に設定した。

包埋した加工ヒト脂肪細胞移植用製剤の LCAT欠損マウスへの移植後のLCAT分泌を確認する

LCAT遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞
+ 足場タンパク質を包埋化

ヒト細胞発現LCATタンパクの長期安定持続
した分泌を確認



図 6. 移植用生着促進製剤キットの薬効評価に関する予備試験の成果

課題 4. 足場タンパク質に関する研究 (製剤設計の変更に関する研究)

本製剤で用いられる足場タンパク質は凝固に不可欠なヒト内因性タンパク質をその組成として含む。レシピエント自身の内因性タンパク質を利用し、製剤開発コストの軽減やキット製

剤の調製の便宜性を図る製剤設計の変更の可能性について、血中 LCAT 分泌を *in vivo* における足場タンパク質の凝固の指標に用い検討した。

足場タンパク質と細胞懸濁液を LCAT 欠損マウスに移植し、移植後 28 日目において足場タンパク質の凝固を認めた。本結果から *in vivo* において足場タンパク質の凝固に不可欠な内因性タンパク質の添加が不要であることが示唆された。この結果から有効性および安全性評価試験では足場タンパク質内因性タンパク質を添加しないこととした。

課題 5. 移植用生着促進製剤キットの安全性試験

LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞＋足場タンパク質の局所刺激性試験を実施した。足場タンパク質群では、移植後 2 日目および 14 日目ともに軽度な炎症反応を、LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞群では同種細胞にも関わらず、異種成分である足場タンパク質単独よりも高度な炎症反応が認められた。LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞と足場タンパク質を用いた移植製剤を用いた臨床研究において、移植直後軽微な炎症反応が認められており、臨床的知見との矛盾はないと考えられた。

課題 6. 移植用生着促進製剤キットの薬効評価に関する検証

最適化された移植用生着促進製剤キット (LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞＋足場タンパク質) の組成を基準とした中空糸包埋 LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞を LCAT 欠損マウスに移植し、血中 LCAT の分泌、リポ蛋白プロファイルを経時的に測定した。移植後 56 日までの血中 LCAT 分泌 (図 7) と、脂質プロファイルの改善が認められ、その際、残存する移植細胞数の情報が得られ、移植用生着促進製剤に含まれる移植細胞数の推測が可能となった (図 8)。

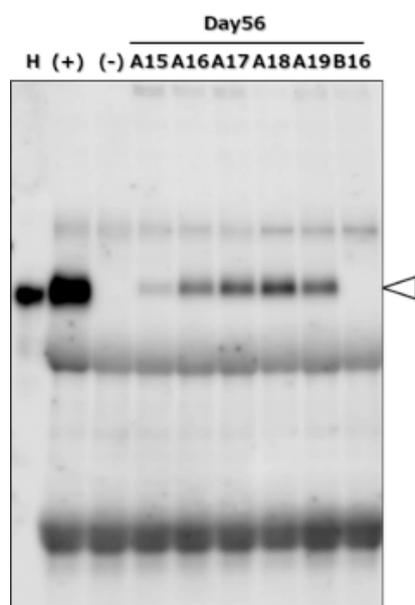


図 7. 病態マウスにおける移植 56 日目の LCAT 分泌

H : HDL、(+)LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞の培養上清 ; (-)ヒト増殖型脂肪細胞の培養上清 ;
A15～A19:LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞移植群 ; B16 : ヒト増殖型脂肪細胞移

包埋した加工ヒト脂肪細胞移植用製剤をLCAT欠損マウスに移植し薬効確認し、**生着細胞数から移植細胞数を予測する**

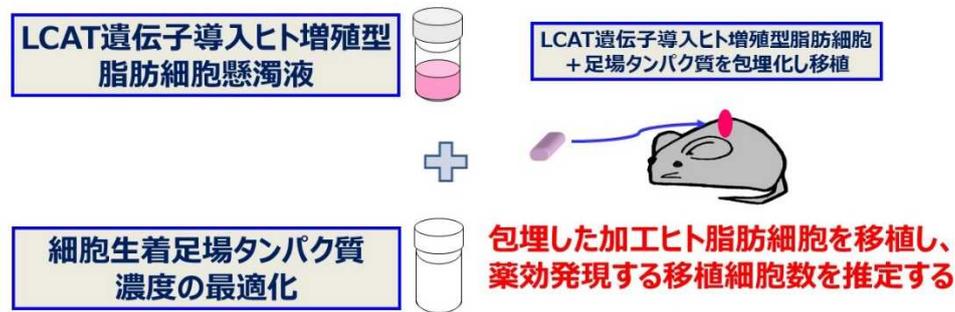


図 8. 移植用生着促進製剤キットの薬効評価に関する検証成果

RS 戦略相談

「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」に基づく再生医療等製品の承認に向け、医師主導治験（探索的治験）、企業治験を順次実施するため医薬品医療機器総合機構（PMDA）と以下の相談を実施した。

平成 29 年 9 月 8 日、非臨床試験・品質ならびに探索的医師主導試験の開始前相談の事前面談を受けた。本事前面談では、各相談事項が対面助言の対象か否か、また対面助言の対象となる相談事項については、論点整理のほか、資料のまとめ方、書式などの留意事項について説明を受けた。

平成 30 年 2 月 8 日、品質および生物由来原料基準に係る対面助言が実施され、相談事項に対する相談者の考え及び対応について PMDA との合意を確認した。

今後、非臨床安全性試験に係る対面助言を平成 30 年 7 月に実施し、引き続き本研究開発で得られた非臨床薬効性試験の成果を活用し、移植用量の妥当性について治験開始前相談を行う予定である。

【結果の要約と成果】

移植用製剤設計、特に、臨床での移植細胞数を推定する再生医療等製品の新たな評価系として、LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞＋足場タンパク質組成を中空糸に包埋し、*in vitro* 及び *in vivo* にて加工ヒト細胞と足場タンパク質とを混合した移植用生着促進製剤キットの最適化と薬効評価を行った。

製剤組成の面での最適化

- ・ 中空糸包埋下の LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞＋足場タンパク質組成の最適条件が確認できた。
- ・ 本課題検討前に想定していた移植用生着促進製剤キットの構成の内、足場タンパク質を修飾するタンパク質は、レシピエントに存在するその内因性タンパク質によって、移植後、足場タンパク質を修飾することが判明した。そのことは製剤組成のスリム化をはかり移植時の便宜性を向上させるのみならず、製剤開発コストの軽減が可能となった。

臨床における、加工ヒト細胞の移植細胞数の推測

加工ヒト細胞と足場タンパク質とを混合した移植用生着促進製剤キットの最適化と薬効評価を *in vitro* および *in vivo* で実施した (図 9)。中空糸包埋下の加工ヒト細胞+足場タンパク質組成を LCAT 欠損マウスに移植し、移植後の LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞の中空糸内残存数と LCAT 分泌と薬効の確認から、薬効発現に必要な移植細胞数と自家移植の推定生着率 (同種同系の非ヒト動物の生着率情報) から臨床での有効性を確保する移植用量の推定が可能となった (図 10)。

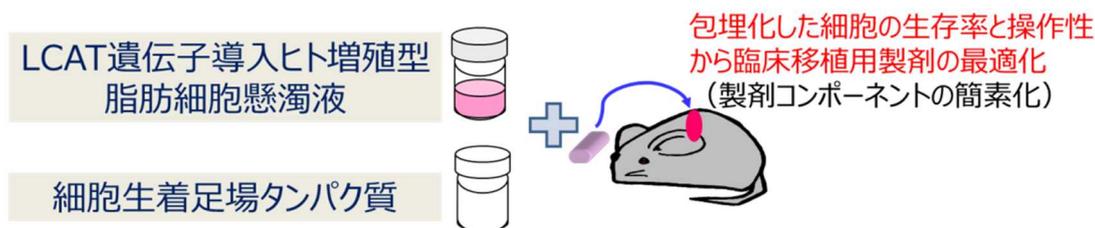


図 9. 加工ヒト脂肪細胞移植用製剤の最適化



図 10. 有効性を確保する移植細胞数の予測

安全性試験 (局所刺激性試験)

製剤の最適化検討でスリム化された製剤組成を用い、局所における安全性評価試験を実施した。加工ヒト細胞製剤および足場タンパク質ともに炎症版が認められたものの移植細胞ならびに臨床的知見との矛盾はないと考えられた。

RS 戦略相談

再生医療等製品の承認に向け、医師主導治験 (探索的治験)、企業治験を順次実施するため医薬品医療機器総合機構 (PMDA) と対面助言を行った。品質および生物由来原料基準に係る対面助言では相談事項に対する相談者の考え及び対応について PMDA との合意を確認できた。医師主導治験 (探索的治験) の開始に向け、本研究開発で得られた非臨床薬効性試験ならびに安全性試験の成果を活用し、非臨床安全性試験に関する対面助言及び移植用量の妥当性に関する治験開始前相談を予定通り実施できるようになった。

3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

- ・規制上の要求事項等との関係

医薬品と同様に再生医療等製品のヒト初回投与試験を含む早期相の臨床試験の開始にあたって、移植用製剤の用法・用量、有効性及安全性評価方法の設定根拠が問われる。

- ・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

加工ヒト細胞については、動物試験において、異種免疫反応が惹起される可能性が高く、異種免疫反応を回避するため免疫不全マウスを用いる評価系では加工ヒト細胞（異種）の生着率と加工マウス細胞の同種同系移植の生着率との差が評価に影響を与える。ヒト以外の動物種（サル、イヌ、マウスなど）から作製した加工非ヒト細胞と加工ヒト細胞の、原料、製造方法、効力（例：産生タンパク質の活性）や性能（例：産生タンパク質の分泌量）が異なる可能性は否定できない。このため従来の非臨床試験法で得られる加工ヒト細胞＋足場タンパク質から構成される移植用製剤の安全性及び有効性情報は限定的であり、また加工ヒト細胞の同等製品を利用するアプローチとして加工非ヒト細胞を用いた非臨床試験も考えられるが外挿可能性について説明が求められる。

- ・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

および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

本研究開発では、宿主免疫系から隔離可能な中空糸に加工ヒト細胞を包埋し、正常免疫動物へ移植する非臨床試験では、異種免疫反応を回避できることから加工ヒト細胞のみならず iPS 細胞をはじめとする各種細胞の有効性及び安全性を検討できる新たな評価技術と考えられる。

- ・別手法が妥当であることを示す方法

中空糸に包埋した LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞＋足場タンパク質を正常免疫動物へ移植した評価系では、中空糸に包埋しない場合と比べ血中 LCAT 分泌の持続期間と細胞生存率は約 2 倍となり、異種免疫反応が回避できることが示された。さらに有効性評価試験において有効性（血中リポ蛋白プロファイルの改善）が認められた残存細胞数から、加工ヒト細胞の生存率とヒトの体重を考慮して移植細胞数を算出した。さらに同種移植（加工ヒト細胞のヒトへの移植）であることを考慮して得られた推定移植用量が、現在実施中の第一種再生医療臨床研究計画および治験で計画している臨床移植用量に相当し、その妥当性が示唆された。

4. まとめ

LCAT 欠損症は、2015 年 7 月に厚生労働省より難病指定されている（指定難病 259）。研究開発企業及び千葉大の成果に基づき、厚生労働省より千葉大学における遺伝子治療臨床研究の実施承認がなされ、さらに 2016 年 8 月再生医療等安全性確保法に基づき厚生労働省より第一種再生医療臨床研究の承認を受け、現在臨床評価中である。2017 年に世界で初めて LCAT 欠損症患者様に自家移植がなされ、第三者委員会にて安全性、LCAT 持続補充と脂質代謝への有効性の示唆が確認され、LCAT 欠損症における臨床評価と本治療概念の証明（Proof of Concept : POC）が得られた。LCAT 欠損症治療用加工ヒト脂肪細胞の実用化に向け、医師主導治験（探索的治験）、企業治験を経て、2020 年に再生医療等製品の条件付き期限付き製造販売承認を目指している（図 11）。

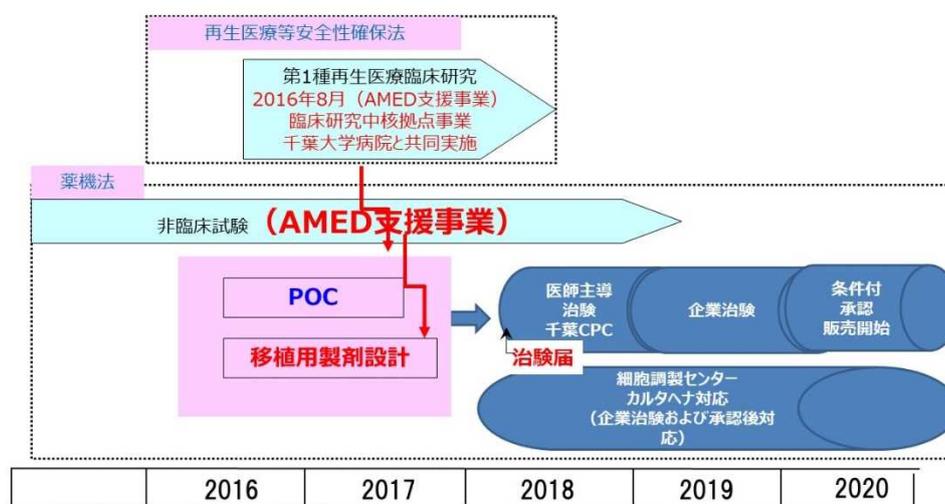


図 11. LCAT 欠損症治療用加工ヒト脂肪細胞の再生医療等製品の条件付き期限付き製造販売承認のスケジュール

今後、医師主導治験（探索的治験）及び企業治験の治験開始前相談および薬事戦略相談を行い、本研究開発で得られた成果を移植用製剤の用法用量の設定根拠として活用し、倫理的、科学的妥当性のある治験実施計画の策定や承認審査資料へ反映させることで早期に承認を得る。本評価技術は加工ヒト脂肪細胞の幅広い疾患への適用拡大の研究開発に活用でき、また iPS 細胞をはじめとする他の再生医療等製品の研究開発の共通基盤技術として期待できる（図 12）。

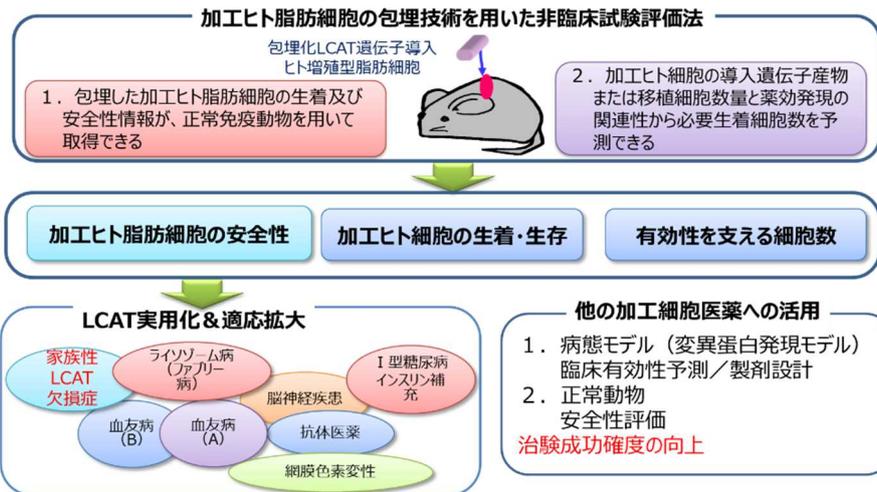


図 12. 本評価基盤技術の波及効果