

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	同種歯根膜幹細胞シートの安全性・有効性評価指標の確立と歯周組織の再建
研究開発代表者 所属 役職 氏名	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 (兼) 歯科口腔外科 准教授 岩田 隆紀

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

本研究開発の目標は、多施設臨床試験課題名「同種培養歯根膜由来間葉系幹細胞シートによる歯周組織の再建」を実施するために、同種間葉系幹細胞シート製造における安全性・有効性指標の簡便かつ迅速な評価システムを策定すると共に、平成 30 年度以降の治験届提出を目指す。

細胞を用いる再生治療が今後本格化するにあたり、ロット毎に実施しなければならない検査費用は現状、膨大である。よって本研究開発により、製品に含まれる塩基配列情報を次世代シーケンサーを用いて一括で解析する技術が確立すれば、細菌・ウイルス・マイコプラズマなどの安全性試験のみならず、有効性評価指標に基づいた遺伝子発現をロット毎に簡便かつ迅速に分析することが可能となり、再生したい組織に最適なロット選択が可能となると考えている。

治験（医師主導治験）の実施とそのための薬事戦略相談においては、2014 年に終了した「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に則った臨床研究「自己培養歯根膜細胞シートによる歯周組織の再建」の実施時に用いた品質試験・前臨床試験（Cell Tissue Res. 341:397-404. 2010. Int J Dent. 2012:307024. 2010）をもとに進め、同種細胞では必要となる凍結融解条件、保存条件などを規格化していく。

2. 実施内容及び結果

・細胞ストックの構築と輸送条件の検討

東京女子医科大学歯科口腔外科にて、20 歳以上 25 歳以下の健常な若年者の不働歯を抜去後に歯根膜組織を採取し、同大学細胞プロセッシングセンター内で培養された歯根膜由来間葉系幹細胞を 30-100 アンフル程度に分注し、細胞凍結液 STEM-CELLBANKER® GMP grade (日本全薬工業株式会社) にて凍結保存した。なお、平成 28 年度内で 7 検体の細胞ストック構築が終了している(図 1)。また 7 検体の細胞ストックから、治験実施時に必要となる最適ロットを選定し、同細胞ロットについては日本薬局方、および ICH-Q5A、Q5D にて要求される細菌・マイコプラズマ・ウイルス等の微生物否定試験を実施し、いずれの試験においても陰性であることを確認済みである。さらに細胞輸送時に必要な保存容器の開発、細胞シート形態を保持するためのリング開発、および保存輸送液の選定を行い、1 時間の輸送、および 7 日間の保存に問題がないことを検証済みである。

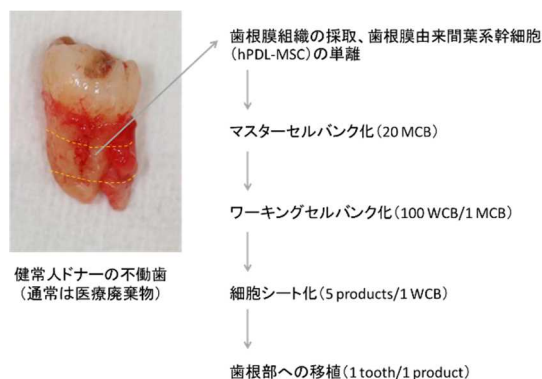


図 1：細胞製品作製フロー

智歯抜歯等により得られた歯根膜組織から、細胞シート製品を作製する。

・核酸情報分析と有効性指標の同定

in vitro による試験系(細胞増殖能、骨芽細胞分化誘導時の ALP 活性度、コロニー形成能)の各パラメーターをもとに、網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq)を実施し、高い有効性を持つ細胞の発現上昇遺伝子を調査したところ、ALP の遺伝子発現が非誘導時においても著しく高いことが分かった(図2)。また有効性の高い細胞における遺伝子発現をもとに、有効性指標となりうる 21 遺伝子を選定した。ALP や選定した遺伝子発現パラメーターを総合的に評価して、細胞の有効性を反映しうるかについては、今後の医師主導治験を通じて検証していく予定である。また、間葉系幹細胞の標準指標の一つである表面抗原マーカー(CD105, 90, 73 等)についてはフローサイトメーターによる試験ではなく、RNA-seq を用いて判定する評価法を確立したため、間葉系幹細胞のマーカーならびに有効性評価指標に関しては、NGS を用いて評価する予定であり、PMDA との対面助言を通じて同意取得済みである。



図2：全細胞ストックにおける ALP 活性能
有効性が高いと判断され細胞では、非誘導時においても ALP 活性が有意に高いことが分かった。

・核酸情報分析と安全性評価指標の同定

データベースに登録されている NGS データを使用し、ヒトゲノム由来リードと微生物ゲノム由来リードを選定するためのアルゴリズムを開発した(図3)。また実際のサンプルを用いて、NGS により微生物ゲノム由来リードを検知しうるかについて、マイコプラズマをスパイクしたヒト歯根膜由来間葉系幹細胞のシーケンスデータを使用し、現在まで構築された外来ゲノム検知のためのアルゴリズムを検証した。その結果、mRNA をターゲットとした RNA-seq では改良の余地があると判断されるが、DNA をターゲットとした DNA-seq では、既存試験法である PCR 法と比較して、同等以上の感度を有していることが分かった。さらには、RNA-seq を実施した際には、宿主(この場合はヒト)の遺伝子発現の変化から、微生物感染を予測するためのマーカーとなる遺伝子を選定可能であり、これらのアルゴリズムについても構築済みである。

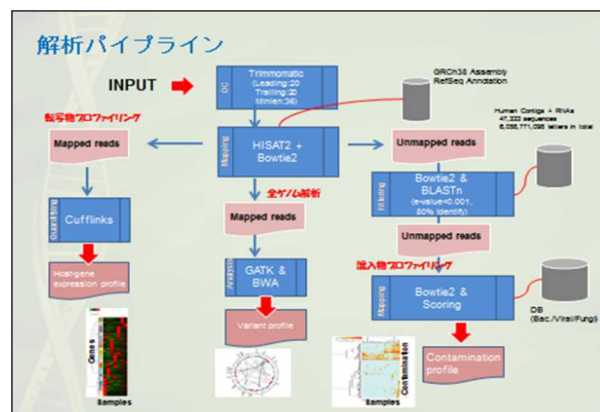


図3：NGS を用いた評価手法のためのパイプライン
各種ソフトウェアを組み合わせることで外来ゲノムを検知するためのパイプラインとなる。

しかしながら DNA-seq においては全ゲノム配列が対象となり、倫理面の対応が困難化することや、多くのリード数を必要とするためシーケンスに係る費用も高くなる点がデメリットとして挙げられる。また RNA-seq においては、既存方法と比較して、検知能力の感度低下という問題点もあるため、新規評価方法として ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing) を用いた解析手法を開発した。これにより、コストの削減、

かつ微生物由来リードの検知における感度が上昇し、これまでのNGS解析手法の問題点を克服した。よって本手法が細胞製品の安全性評価法の代替法になりうると判断した。

- ・細胞製品の核酸情報から一括で安全性・有効性を評価するアルゴリズムの開発

上記の、NGSを用いた有効性と安全性に関する評価アルゴリズムが確定したため、二つの評価を一括で判定可能なアルゴリズムを最終的には構築する予定である。しかしながら有効性に関しては、今後の医師主導治験においても引き続き検証が必要となるため、まずは細胞に感染している微生物を検知するための安全性評価に関して、NGSで判定可能なシステムをデータベースとして今年度内に公開する予定である。具体的には、NGSから得られたファイルをデータベースに登録するだけで、検体となる細胞の微生物感染プロファイルをスコア化し、安全性を評価できるものとなる。

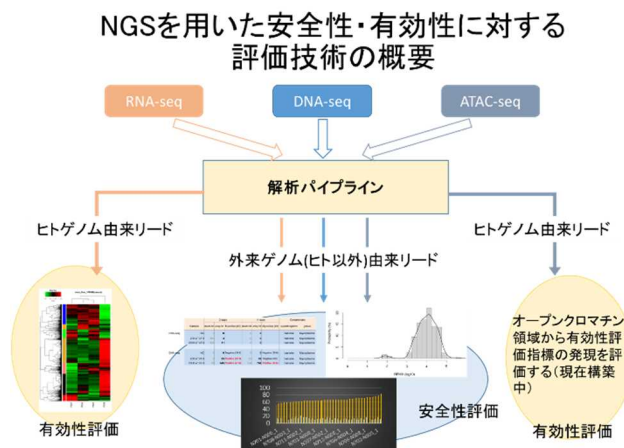


図4：NGSを用いた有効性・安全性を評価するシステム

RNA-seq等の塩基配列データから、ヒト由来ゲノムを用いてマーカーとなる遺伝子発現を、微生物由来ゲノムを用いて混入の有無を検定することができる。

- ・薬事相談～製品規格・非臨床安全試験・臨床プロトコルの立案～

医師主導治験を目指して、PMDAとの品質、非臨床、および治験に関する対面助言を実施した。品質

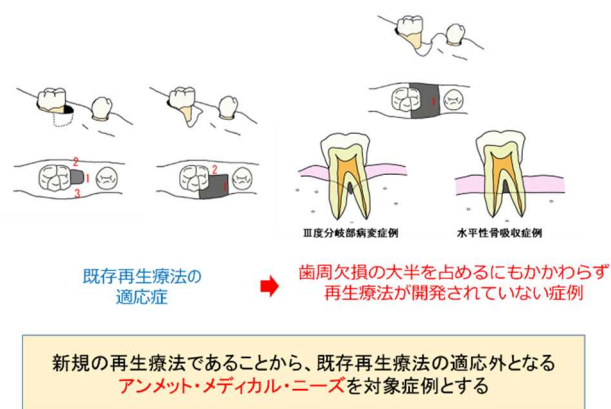


図5：治験における対象疾患

歯周病におけるアンメットメディカルニーズである病態に対して、最終製品の移植を予定している。

については最終製品作成までのプロセスや、品質管理試験項目等に関して、またNGSを用いた評価法の治験時における検証について了承を得た。非臨床安全性についても、治験期間中に一部試験を再検証することが必要ではあるが、これまで実施した試験結果により十分安全性を証明でき、治験可能であるとの合意を得た。また臨床プロトコルに関しては、対象疾患をアンメットメディカルニーズとなる1壁性骨欠損、III度分岐部病変、および水平性骨吸収に設定し、観察項目・観察期間についてもPMDAとの相談の上決定しているため、本事業期間内にPMDAとの相談は終了しており、平成30年度以降にIRB申請、および治験届の提出を予定している。

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

本事業では、これまで多くの試験によって細胞製品の有効性・安全性を評価する必要がある現状において、より簡便でかつ信頼度の高い評価手法を開発することを目的に、次世代シーケンサー(NGS)を用いて一括で判定するシステムを構築することを目指した。

同種細胞を用いた移植治療を実現するためには、特に安全性における試験が重要となってくるが、従来法による試験系は多くの時間と費用を必要としており、この点が細胞治療の普及を妨げている大きな要因である。品質管理における安全性試験では、細菌、マイコプラズマ、ウイルスといった微生物を対象として、セルバンクや最終製品への混入を否定する必要がある。このような微生物もヒト細胞と同様に DNA/RNA といった核酸を有していることから、核酸をターゲットとした PCR 法は感度の高い判定試験であるが、プライマーと呼ばれる特定の塩基配列のみを認識するため、プライマーの存在しない微生物への対応は困難であるという問題点もあり、その他多くの試験が必要である理由となっている。これらの点から、網羅的に塩基配列を解読することができる NGS を用いた評価法に着目した。

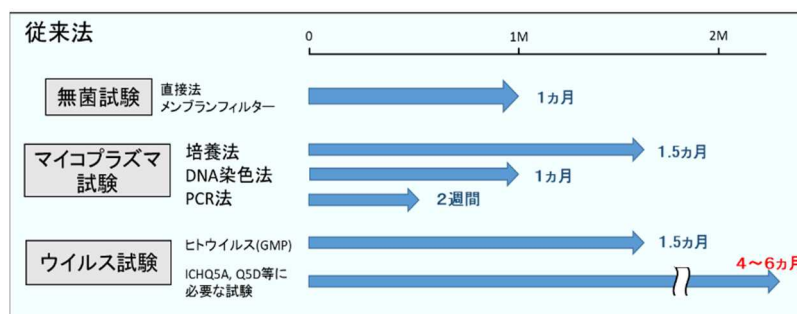
NGS を用いることは、①PCR と同じように塩基配列を対象としているため、細菌、マイコプラズマ、ウイルスのすべてに対応して評価が可能である。②プライマーを必要とせず、データベースに存在する数多くの微生物の塩基配列を対象として解析をすることができるため、既存の方法以上の微生物否定試験が可能となる。③細胞製品を構成するヒト細胞由来の塩基配列を用いることで同時に有効性も評価することができるといった利点が存在する。

しかしながら、PCR は特異的に特定の塩基配列を増幅するため、ゲノムや遺伝子を検知する感度が高いことが知られている一方、NGS は網羅的に塩基配列を読むことが目的であり、感度については疑問もある。そこで実際のサンプルを用いて NGS により微生物ゲノム由来の塩基配列(リード)を検知しうるかについて、マイコプラズマを混入したヒト歯根膜由来間葉系幹細胞のシーケンスデータを使用し、現在まで構築された外来ゲノム検知のためのアルゴリズムを用いて検証した。

その結果 mRNA をターゲットとした RNA-seq では改良の余地があると判断されるが、DNA をターゲットとした DNA-seq では、既存試験法である PCR 法と比較して、同等以上の感度を有していることが分かった。さらに驚くべきことに、非混入群サンプル(NC)では微生物由来リードが 0 と判定されており、偽陽性がないという結果を得ることができたため、新規の安全性評価指標として妥当であると考えられる。

さらにはヒト由来の塩基配列を用いて RNA-seq を実施することにより、細胞純度測定試験であるフローサイトメトリー法による ALP 陽性率だけでなく、MSC マーカーとなる細胞表面抗原マーカー(CD73, 90, 105 等)の発現に関して NGS で検出することが可能であり、従来試験の代替法になりうることが分かった。

このような NGS を用いた評価手法は、我々の最終製品を構成する細胞のみではなく、当然他の細胞製品においても活用することができる。また、核酸を抽出し塩基配列を読むだけであるため、従来法と比較して時間も費用も節約することができ、多くの研究所で実施することができる手法となる。我々はさらに普遍的な評価手法とするため、これらのアルゴリズムを用いた微生物検知システムをデータベースに公開しているため、シーケンスデータさえあれば解析可能な環境を構築した。



図：従来法と新規手法との比較

従来法に比べて、多くの試験を必要としないことで、費用の削減につながり、短期で試験結果を得ることも可能となる。

なお、NGS を用いた評価手法については、PMDA との協議の結果、従来法と並行して実施、比較検討を行うことが必要となるが、新規評価手法の一つとして今後予定している治験で実施することとなった。

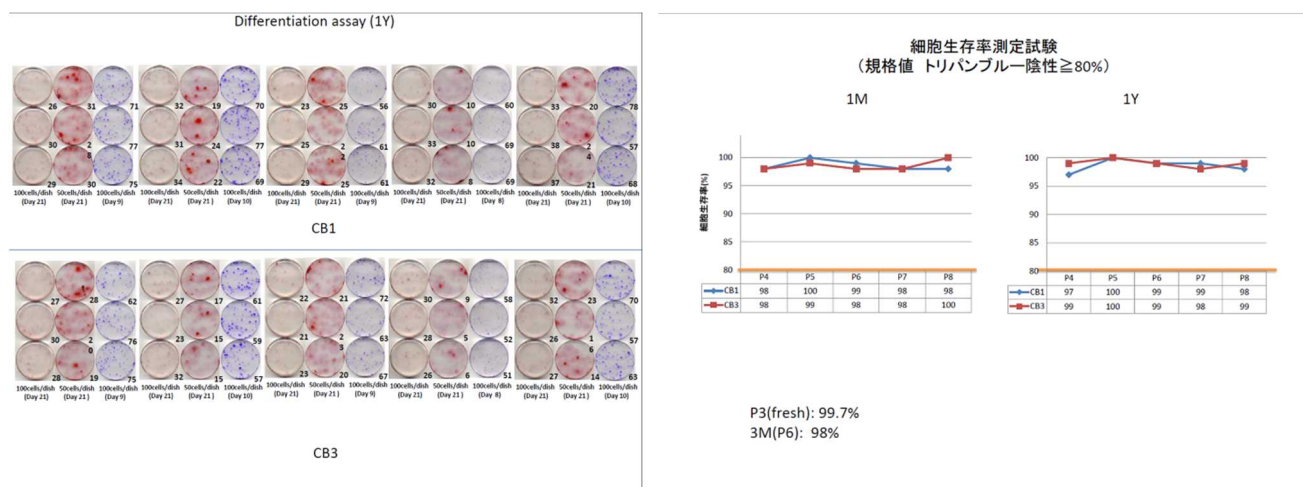
② 製造工程の合理化

まず、生物由来原料基準に抵触する原材料をピックアップし（左図）、供給業者から、本培地の製造には生物由来原料基準の反芻動物由来原材料に相当する原料は使用していない旨の文書を得ると共に、培地の構成成分の開示を求め、CoA 等を取得し、PMDA と「製造に用いる試薬類の生物由来原料基準への適格性について」の相談を

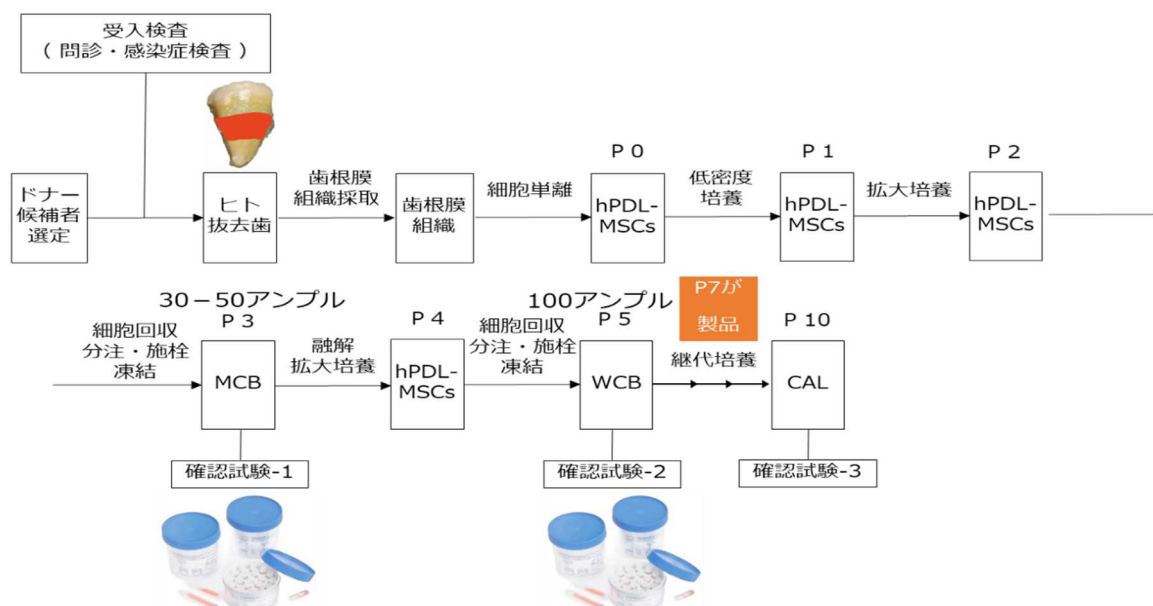
原材料	由来	供給元
牛胎児血清 (FBS)	牛胎児	Life Technologies社
トリプシン	ブタ膵臓	Life Technologies社
コラゲナーゼ	Clostridium histolyticum	SERVA社
ディスパーゼ	Bacillus polymyxa	合同酒精

実施した。照会の段階にて「本品の製造に使用する 0.25% Trypsin の、動物由来原料基準（4）への対応状況について、トリプシン原料粉末に対する 25 kGy 以上の電子線照射による PPV を含む各種ウイルスに対するウイルスクリアランス能を、試験成績、公表論文等に基づき説明してください。説明が困難な場合は、電子線照射以外にウイルス不活化／除去が期待できる工程の有無を確認し、該当する工程がある場合には、ウイルスクリアランス能を、試験成績、公表論文等に基づき説明してください。なお、公表論文を引用する場合には、論文における処理条件と比較し、引用するウイルスクリアランス試験成績の外挿性を説明してください。」との質問があり、「0.25% Trypsin は、サプライヤーによってその原料粉末に対する電子線照射による PPV (porcine parvovirus) のウイルスクリアランス能が評価されています。製造上の照射線量 (25 kGy 以上) よりも低い線量 (23.2~24.7 kGy) にて PPV を 1×10^6 感染単位でスパイクしたトリプシン原末への照射試験 (3 試験実施) を実施し、その結果、ウイルスクリアランス指数 (Log10) は 3.79~3.98 となっています。詳細は照会事項資料 (Summary Report Evaluation of Porcine Parvovirus (PPV) Inactivation by Invitrogen E-beam Irradiation Step for Porcine Trypsin) ご参照ください。電子線やγ線の二次電子は主にウイルスゲノム (核酸分子) に障

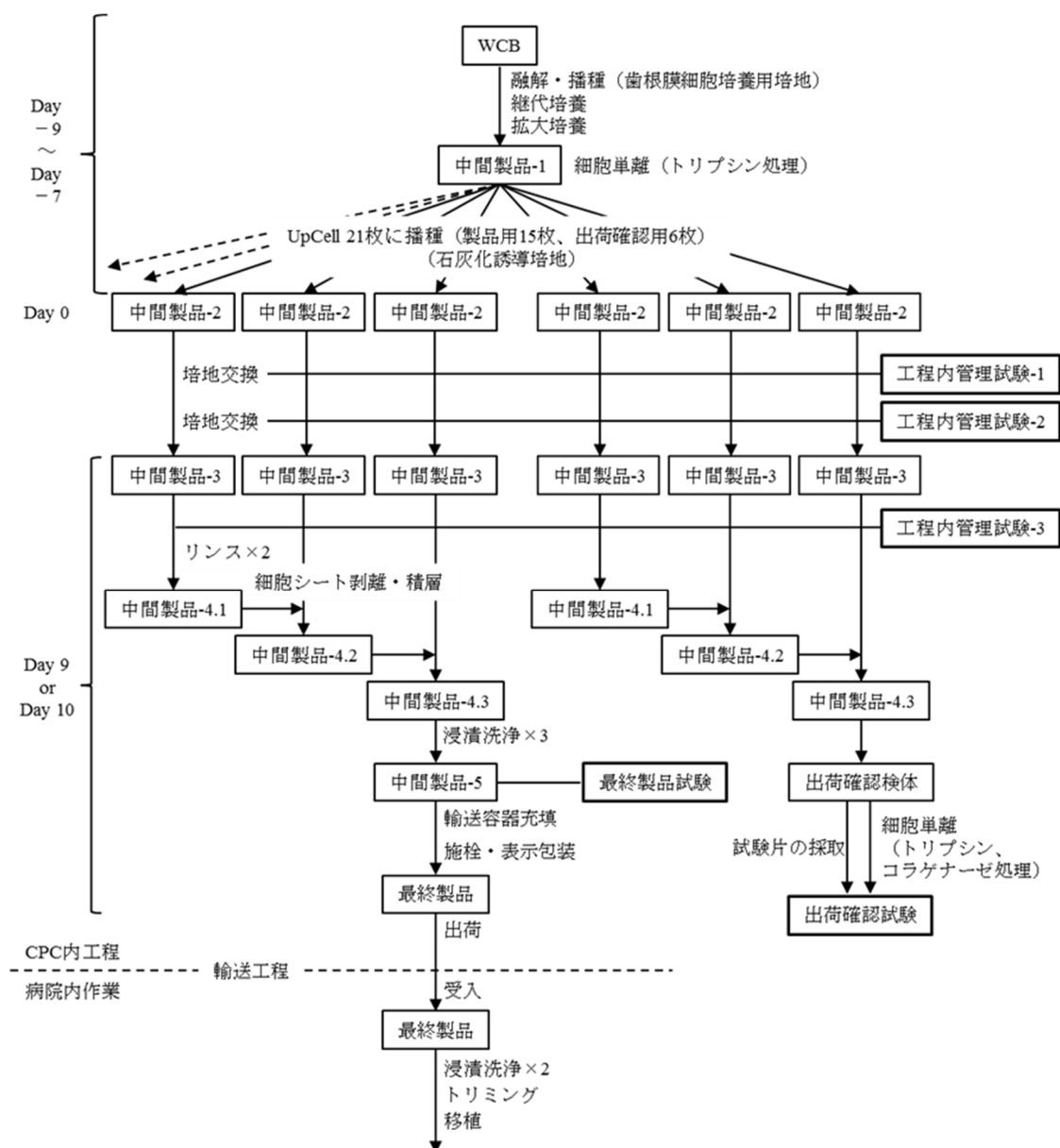
害を与えることでウイルスを不活化するため、既知のブタ関連ウイルスで最もゲノムサイズが小さく、ゲノム構造が頑健であると考えられる PPV はモデルウイルスとして適していると考えます。このことから、ワーストケースと見なし得る PPV が不活化できる電子線照射条件であれば、他のブタ関連ウイルスに対しても十分なウイルスクリアランス能を有していると論理的に推定されます。なお、ウイルスクリアランス能のバリデーションは実施されておりませんが、ブタ腭臓から本トリプシン成分を抽出する際に、酸処理工程を行っております。一般的に低 pH 処理はウイルスを不活化することが知られているため、試験成績はございませんが、本トリプシンの製造においては低 pH 処理及び電子線照射 (> 25 kGy) の 2 工程のウイルス不活化工程を含んでおります。」と回答したところ、治験開始までの対応として、本品の製造に用いるヒト・動物由来原料等に対する相談者の説明は受け入れ可能との意見を得た。ワーキングセルバンクならびにマスターセルバンク作成時に用いる細胞凍結液に関しては、GMP 準拠にて製造されたセルバンカーの血清ありのもの (CB1) ならびに血清無しのもの (CB3) を用いて凍結 1 ヶ月ならびに 1 年のサンプルの生存率・コロニー形成能・多分化能を検索したところ、継代 8 代目までは遜色の無いデータが得られたことからマスターセルバンクを継代 3 代目、ワーキングセルバンクを継代 5 代目、製品を継代 7 代目で作製することとした。



セルバンクの製造工程概要



再生医療等製品を製造するにあたり、製造日数が短ければ短いほどよく、私共の研究室では、先の自己細胞の臨床研究では組織採取より合計約4週間の培養期間が必要であった。本研究事業においてはワーキングセルバンクならびにマスターセルバンクを構築済みであり、拡大培養期間の短縮は可能であることが当初より想定されていた。まず、ワーキングセルバンクからのリカバリー期間を短縮し、7～9日間の前培養が必要であることを見出した。次に14日間前後であった温度応答性培養皿播種後の培養期間を9～10日前後に短縮することに成功した。以上のことよりトータル期間としては自己細胞では約4週間かかっていた培養期間を16～19日間に短縮することに成功した。

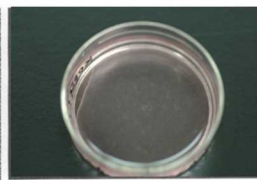
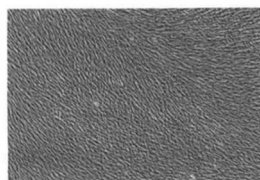


図：歯根膜細胞シートの製造工程

WCB(継代5代目)から製造を開始し、継代7代目でUpCellに播種し9～10日後に最終製品が完成する

次の問題としては、製造した製品の有効期間が長ければ長いほど良いわけであり、最適な保存液の検索と、保存期間が製品の品質に与える影響を検索し、有効期限の設定を実施した。具体的には、市販されていて入手可能な培地や組織保存液 6 種類（培地、PBS、生理食塩水、EC 液、ビアスパン、ETK 液）を用いて、出荷項目である細胞数・細胞生存数・細胞純度・ALP 活性に与える影響を経時的（最大 14 日）に検索し、最適な組織保存液を決定した。また、通気性のある一次容器を考案し特許出願した。市販の二次容器ならび三次容器で密閉性と保温性をそれぞれ担保する形で保存ならびに輸送実験を実施し、7 日間程度であれば出荷時検査に影響が出ないことを確認している。

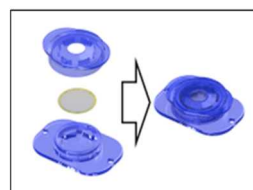
本製品の概要



歯根膜細胞シート（単層時）



リング状支持体に懸架した
歯根膜細胞シート（3層時）



専用輸送容器
(特願2017-016305)



専用輸送箱

4. まとめ

NGS を用いた核酸の網羅的解析による再生医療等製品の有効性・安全性評価に関しては、我々の実験条件においては既存方法と比べて遜色の無い感度と特異性を示すことが示唆された。本法は確かな精度を持つことがスパイクテストからも示唆され、数日程度で解析が完了することから、今後の検査手法を根本から変えるポテンシャルがあると自負している。その中核を担うアルゴリズムに関しては一般公開しており東大医科研のホームページからアクセスすることが可能である。今後は平成 30 年度から計画されている医師主導治験に従来法と平行して本技術を検討することを PMDA より承認されおり、リード数の最適化（最小化）等を進めて更なる実用的なソフトウェア開発を行っていく。後続企業や同業他社にも積極的に活用していただきたいと考えている。

また、凍結液、輸送液、輸送容器の開発を実施し、確固たる製造工程を立案し、PMDA の承認を得た。平成 30 年度から実施予定である医師主導治験にて本事業にて得られた技術と知財を活かして行きたいと考えている。