

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	体性幹細胞シート製品における迅速品質管理法の開発
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 特任講師 金井信雄

## 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

東京女子医科大学では自己培養上皮細胞シート（上皮細胞シート）による表在型食道癌の内視鏡治療後の食道狭窄防止を目的とした再生治療を開発してきた。現在、株式会社セルシードによる薬事承認に向けた開発が進められているが、PMDA との薬事戦略相談を通して品質管理における課題が浮き彫りとなった。具体的には、製品の作用機序に則した重要品質管理項目の設定が困難であることや、最終製品の無菌性が移植後に判明するといったことである。そこで、本事業では細胞数や細胞純度といった品質管理法ではなく、性能や作用機序が反映された項目による品質管理の評価法や、使用期限の範囲内において迅速に無菌性を測定できる評価法の開発を行う。そして、製品の性能と無菌性を定量 PCR で迅速・簡便に評価可能な品質管理ツール（製品アレイカード）を作製する。この重要品質管理項目の評価技術に関しては、治験進行中の食道再生シートの薬事承認申請で導入を目指すとともに、後続の体性幹細胞を用いた再生医療等製品においても汎用できるよう展開する。

## 2. 実施内容及び結果

### ＜製品の作用機序を考慮した重要品質管理項目の評価法の開発＞

GCTP 準拠で製造された上皮細胞シートについて、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現解析を実施した。11 例の解析を行い、口腔粘膜下層組織と比較して上皮細胞シートでの発現量が高い遺伝子群を抽出した。抽出した遺伝子群について Gene Ontology による分類を行い、分泌性因子を選択した後、上皮細胞シートの作用機序（再上皮化の促進、炎症反応の軽減、線維化の抑制）に関連が深いと考えられる遺伝子を抽出した。（図 1）

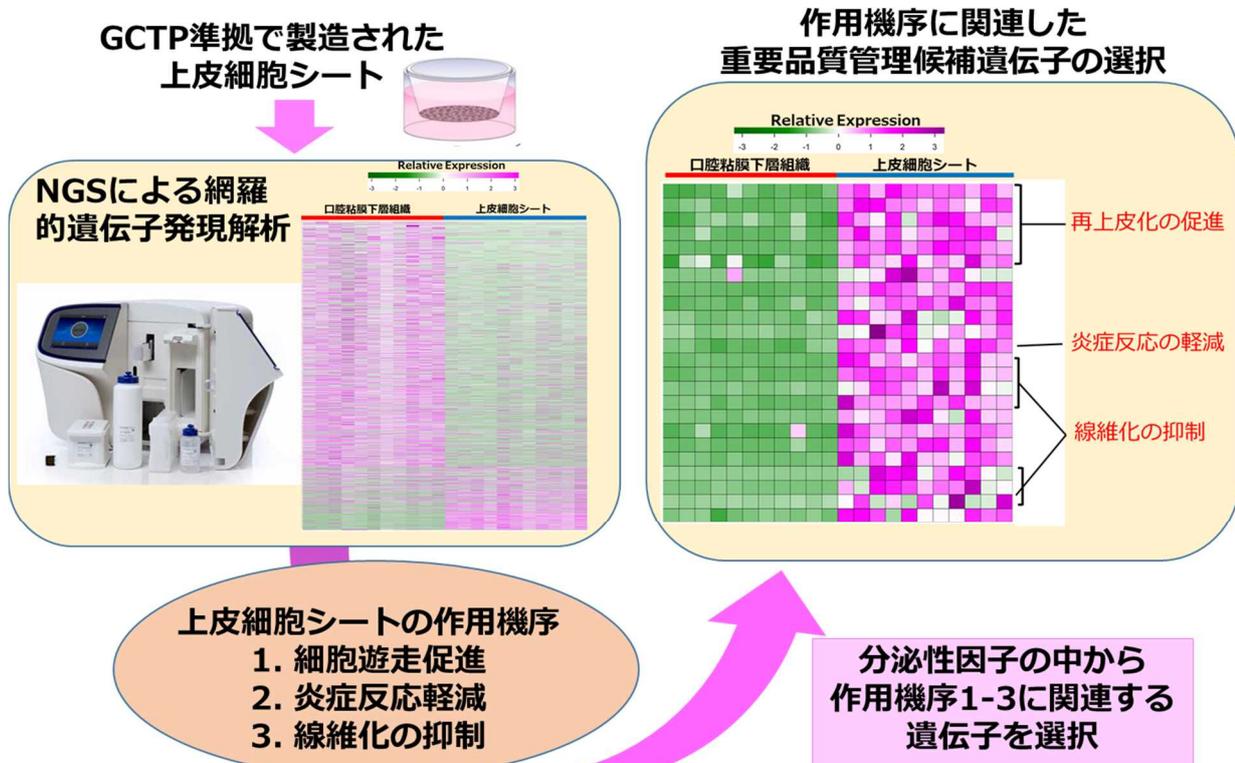


図 1 次世代シーケンサーに重要品質管理候補遺伝子の選択の流れ

次に、選定した遺伝子に関して、(1)創傷治癒アッセイ、(2)筋線維芽細胞の分化抑制アッセイによる検証を実施した。(図 2) この検証結果と、文献調査、発現量の観点から重要品質管理遺伝子を選定した。

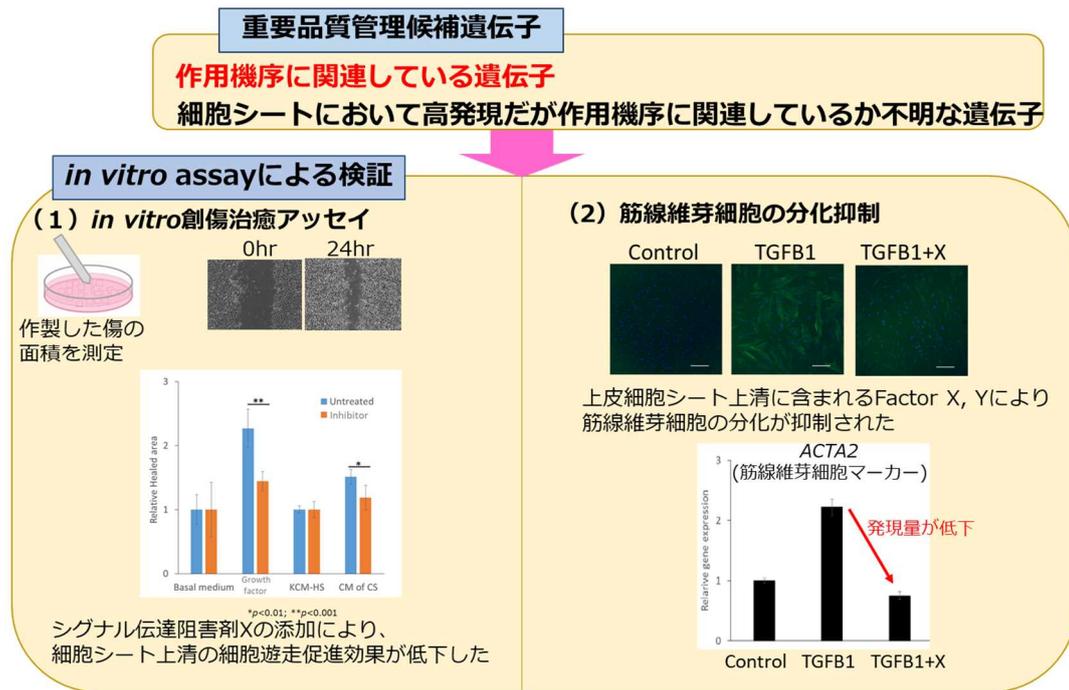


図 2 in vitro アッセイによる候補遺伝子の検証

次に、GCTP 準拠で製造された上皮細胞シート (8 サンプル) を用いて、逆転写定量 PCR による評価法の構築および閾値の設定を行った。(図 3)

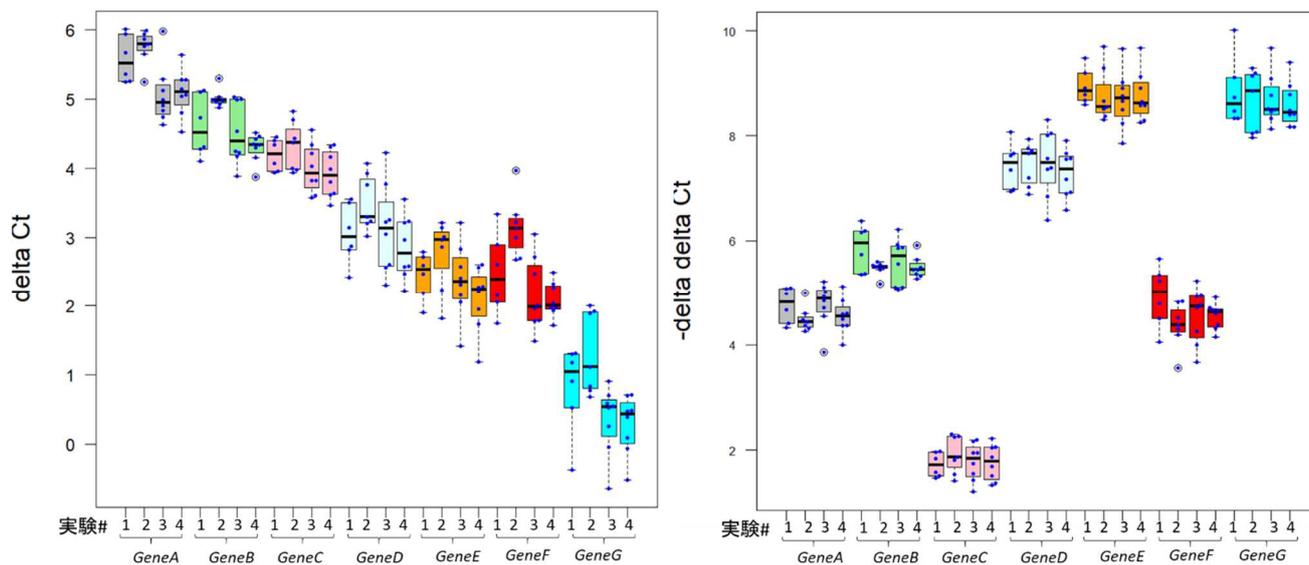


図 3 RT-qPCR による重要品質管理遺伝子の閾値の検討

標準サンプルとして Universal Human Reference RNA (UHRR) を用いて  $-\Delta\Delta Ct$  を算出した場合と、UHRR を使用せずに内部標準遺伝子を用いて  $\Delta Ct$  を算出した場合について、4 回の独立した実験間(逆

転写から定量 PCR までの操作を 1 回の実験とした)での標準偏差 (SD) を比較した。その結果、UHRR を用いて  $-\Delta\Delta Ct$  を算出した場合の方が、SD は小さかった。これは、 $-\Delta\Delta Ct$  は標準サンプルとの相対値として算出するので、実験間での逆転写反応のばらつきを補正できたことによるものであると考えられる。よって本評価法では、実験毎に標準サンプルを使用して  $-\Delta\Delta Ct$  を算出することにより頑健な評価が可能であると推察された。

#### <上皮細胞シート製品に適した微生物限度試験法の開発>

平成 28 年度の研究開発では、口腔や皮膚などに常在する微生物の文献的調査と、東京女子医科大学及びセルシードの CPC で採取・分離された環境菌に対し、現在局方に収載されているキャピラリーシーケンサーによる塩基配列解析による微生物種の同定を行い、CPC におけるバイオバーデン検索を行った。結果、様々な微生物が同定され、CPC における環境由来、ヒト由来の微生物相の知見を得た。さらには、次世代シーケンサーを用いて細菌叢解析も行い、同定された微生物に関して比較検討を行った。これらの結果を用いて、上皮細胞シート製品でリスクの高い微生物として、微生物 X と Y を選定した (図 4)。

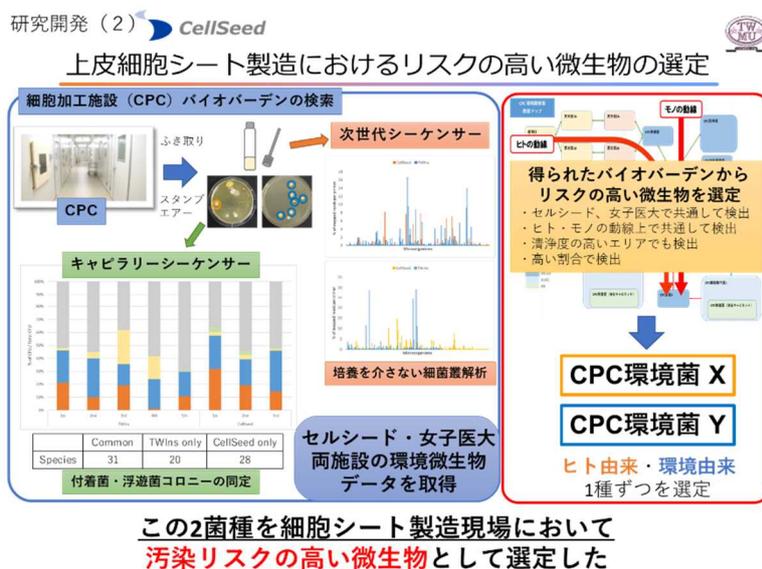


図 4. 上皮細胞シート製造における汚染リスクの高い微生物の選定

平成 29 年度では、まず、選定した 2 種と日本薬局方に記載の 6 種の微生物に対する特異的プライマーと細菌、真菌の共通プライマーを設計した。作製したプライマーを用いて、定量 PCR により感度・特異度の検討を行った。結果、各特異的プライマーは 100 CFU 未満、共通プライマーは 1000 CFU 未満の菌体核酸を検出できることが示唆された (図 5、6)。そして、特異的プライマーでは 100 CFU 以上、共通プライマーは 1000 CFU 以上の菌体が試験液中に存在することを陽性と判定する判定基準を設定した。

定量PCRによる評価法の構築・検討①

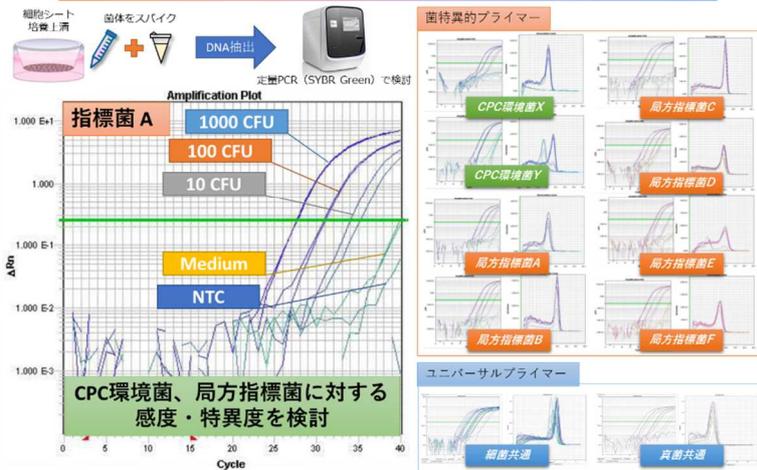


図5. 定量PCRにおける感度・特異度の検討結果

定量PCRによる評価法の構築・検討②



図6. 定量PCRによる各プライマーの感度検討結果

続いて、検討結果を基に迅速試験に使用する製品アレイカードを試作した。試作したアレイカードを用いて交差性を検討した。結果、特異的プライマーは交差性もなく、100 CFUの菌体を十分に検出することが示唆された。細菌共通プライマーは1000 CFUの菌体を検出できない微生物種も存在し、真菌共通プライマーは細菌とも交差反応を示した(図7)。次に、アレイカードを用いた迅速微生物限度試験と局方に記載の培養法による微生物限度試験とを比較検討した。結果、どちらも陰性判定となり、結果は一致した(図8)。

### アレイカードによる交差性の検討

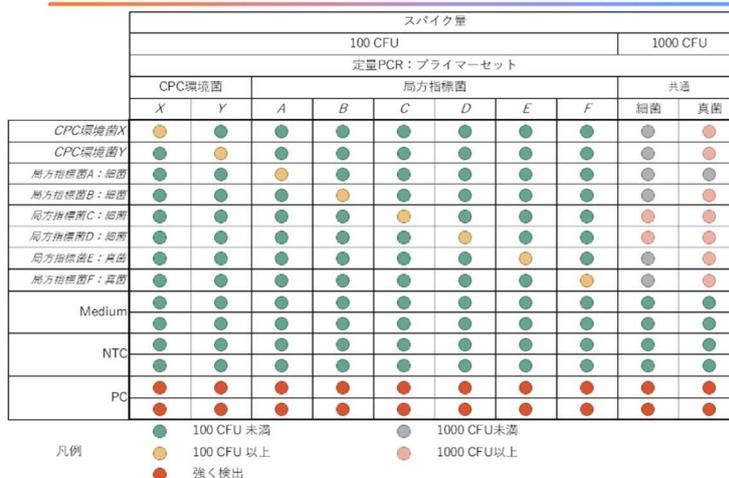


図 7. アレイカードによる交差性の検討結果

### 従来法との比較



アレイカードによる迅速微生物限度試験法と従来法の局方準拠の培養法による微生物限度試験結果は一致した

図 8. 従来法との比較検討結果

上皮細胞シート製品でリスクの高い微生物 X、Y と局方記載の 6 種の微生物の特異的な検出と共に、細菌、真菌の網羅的な検出が可能なアレイカードを用いた定量 PCR による迅速微生物限度試験を構築した。特定の微生物に対しては 100 CFU の菌体を十分に検出可能な感度と特異性を持つ試験法であることが示唆された。今後はこの試験法を品質管理試験に適用するために、夾雑物等によるバックグラウンドの低減の検討や、判定基準の精査、試験法のバリデーション等さらなる検討を重ねていきたい。

### 3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

食道再生細胞シートを事業化する株式会社セルシードは、開発者である東京女子医科大学との協体制のもと PMDA 薬事戦略相談を実施した。品質、安全性、臨床プロトコールにおける PMDA からの助言結果・経験から、今後、開発されていく製品ごとに開発者が品質管理を一から構築していくには、多くの煩雑さがあり製品開発への障害になると考えられた。例えば、従来の最終製品における品質管理には、細胞生存率、確認試験、純度試験、無菌試験あるいは微生物限度試験、マイコプラズマ試験、エンドト

キシン試験、効能試験、そして力価試験などがあるが、これらの管理項目は、安全性確保の観点から出荷前に確実な試験の迅速実施が望まれることに加え、それぞれ製品ごとに規格及び試験方法を開発者が設定していかなければならない。しかしながら自己体性幹細胞シートの問題点として、品質管理用の検体確保の困難性や、極めて短い安定性の問題があり、使用期限の範囲内において迅速に品質管理を行える方法の開発が求められている。

さらに PMDA 薬事戦略相談においては、再生医療等製品として、作用機序 (MOA) を考慮した重要品質管理項目 (CQA) の設定も望まれてきたが、再生医療等製品の作用機序は複雑であり、この設定は極めて困難であることも問題となっている。これまでの上皮細胞シートを用いたヒト臨床研究では、出荷前日に純度試験などで規格値を定めてきたが、仮に製品の純度が規格値以下であっても治療効果は期待されると思われるが、破棄せざるを得ないのが現状である。こういった課題を解決するためには、製品に含まれる細胞全体の傾向をスコアリングして、閾値を設定して重要品質管理項目とする評価法の開発が求められている。

本事業で開発した評価法①製品の作用機序を考慮した重要品質管理項目の評価法、②上皮細胞シート製品に適した微生物限度試験法に関しては、現在開発を進めている食道表在がんを対象とした食道シート再生治療の薬事承認に導入するために、PMDA との相談に活用する。本評価法は定量 PCR を用いており、製品毎に求められる効果・効能に関与する遺伝子に対するプライマーおよび、無菌性をチェックするプライマーをアレイカードに搭載することで他製品にも応用が可能であり、汎用性が高いと考えられる。

#### 4. まとめ

従来、品質管理用の十分な検体確保が困難であり、短い安定性の問題を抱えていた体性幹細胞シート製品における最終製品の品質管理が、本評価法の開発により迅速 (3 時間) かつ適切に評価が可能となる。後続の再生医療等製品に与えるもっとも大きな影響として、食道シートの適応拡大が進み (医師主導) 治験が多く行われるようになることが考えられる。他の体性幹細胞や同種細胞を用いた細胞シート製品においても、プライマーを入れ替えることにより、作用機序 (MOA) を考慮した重要品質管理項目や汚染リスクの高い微生物の限度値の規格設定が可能となる。製品ごとに品質管理 Array Cards を作製することによって、多くの領域で再生治療の (医師主導) 治験開始のハードルを下げ、再生医療の普及に大きな貢献を果たすことが期待される。