

平成 2 8 年度－平成 2 9 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	移植に用いる間葉系幹細胞の評価ならびに製品開発
研究開発代表者 所属 役職 氏名	株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング 代表取締役 社長執行役員 畠 賢一郎

目次

1. 事業の目的.....	1
2. 実施内容及び結果.....	3
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.....	48

1. 事業の目的

間葉系幹細胞（MSC）は、既に多くの臨床使用経験を有しているにもかかわらず、細胞生物学的には必ずしも明確な特性解析がなされているとはいえない。現在の培養手法では、さまざまな細胞（骨芽細胞、脂肪細胞、マクロファージ、内皮細胞等）が混入することは明らかであり、基礎研究のみでなく厳密な細胞の特性解析を必要とする再生医療等製品の開発においては、扱いに困難を要することになる。また、継代を繰り返す過程において、MSC の持つ多分化能や増殖能、遊走能は徐々に失われ、より成熟した表現型へと変化する可能性が示唆されている。これらの諸問題を解決するため、MSC の多様性の詳細を明らかにするとともに、クローン解析方法に準じて、MSC の詳細な特性解析を提案することが目的である（図 1-1）。

『再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発』
移植に用いる間葉系幹細胞の評価ならびに製品開発



研究の目標

- ❖ 間葉系幹細胞の多様性の詳細を明らかにするとともに、表皮細胞のクローン解析方法に準じて、間葉系幹細胞の詳細な特性解析を提案する。
- ❖ これら細胞ならびにそれぞれのクローンについて、臨床使用可能なレベルのセルバンクを構築し、間葉系幹細胞を必要とする疾患への供給基盤をつくる。

- ❖ **間葉系幹細胞（MSC）の評価・機能解析**
 - 線維芽細胞の品質評価手法を間葉系幹細胞に応用し、培養方法を最適化することにより、**下肢虚血治療用**に管理された間葉系幹細胞を特定する。
- ❖ **非臨床試験による有効性評価**
 - 確立した皮膚欠損モデルラット、**下肢虚血モデル**マウス等への移植を通じ、**血管新生を目的**とした治療用間葉系幹細胞の有効性を確認する。
- ❖ **治験実施に向けた再生医療新法下でのMSC臨床応用**
 - 再生医療新法を活用した**自家骨髄由来間葉系幹細胞を早期に臨床応用**し、その探索的検討を行う。
- ❖ **臨床応用可能な同種MSCバンクの構築**
 - 別途目指している線維芽細胞の**商業用セルバンク構築**を通じて得た知見を応用し、脂肪由来、骨髄由来間葉系幹細胞の**商業用セルバンク構築**を目指す。

図 1-1 本事業で実施する研究の目標

本研究を通じて、間葉系幹細胞を含む間葉系細胞を用いた再生医療の発展に寄与したいと考え、図 1-2 に示す研究体制の下、次のような研究内容を計画した。

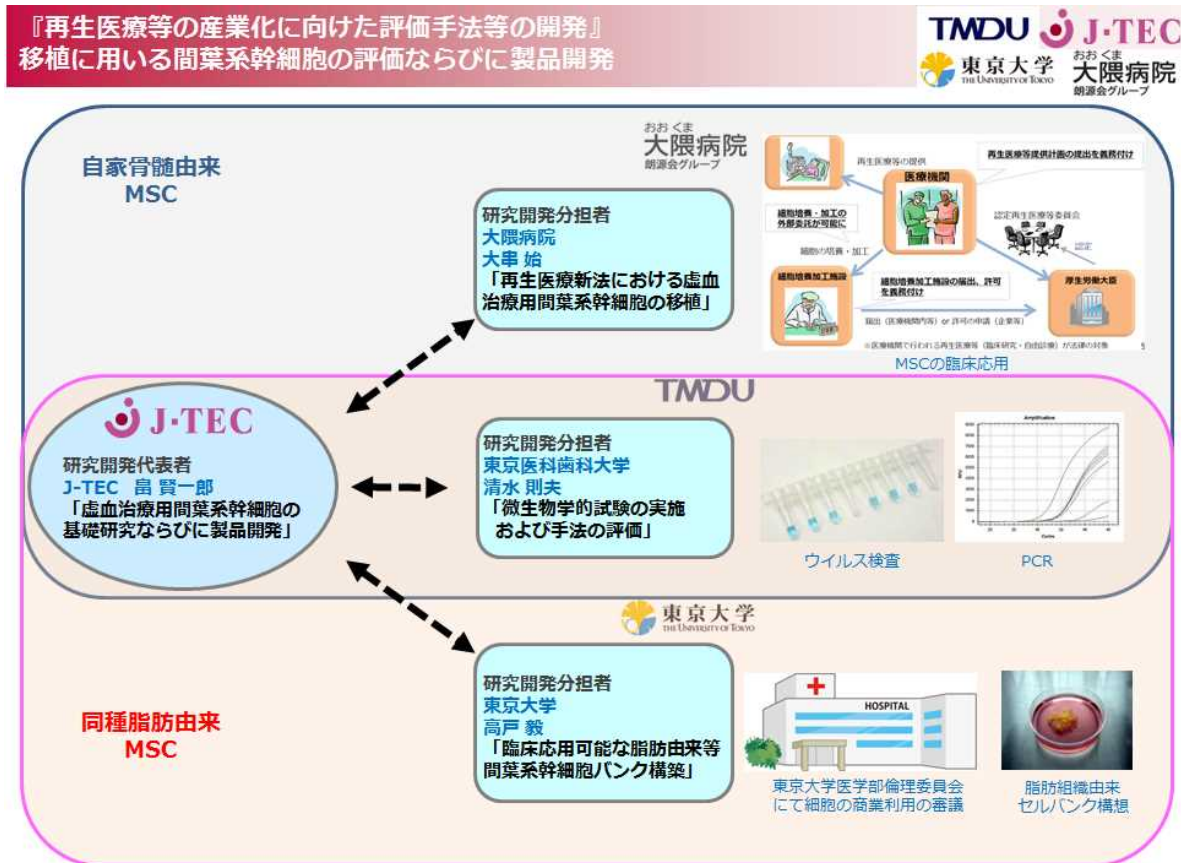


図 1-2 本事業における研究体制

すなわち、1.虚血性疾患への応用に適した MSC の培養方法標準プロトコルと品質管理方法を確定する。さらに、それら 2.標準プロトコルを用いて培養した MSC を再生医療新法下にて臨床応用する。臨床応用のデータを参考に 3.治験相談もしくは治験プロトコル薬事戦略相談を行い、再生医療等製品として製造販売承認を取得するための活動に移行する。くわえて、4.脂肪由来等、各種組織由来の間葉系幹細胞バンクを構築していくことになる。これにより、商業利用可能な MSC ならびにそれに関する評価方法等知見をまとめることとする。これら一連の研究内容に関する成果を下記にまとめた。

2. 実施内容及び結果

間葉系幹細胞（MSC）培養による分類

【MSCのクローン解析】

輸入骨髓液を培養皿上で培養し、様々な形状のコロニーをピックアップした後、連続継代を行う（クローン培養）とともにコロニー形成率（CFE）を確認した。CFE は、フラスコに低密度で細胞を播種し、11 日培養後、コロニー数を播種細胞数で除算することにより算出した。同時に、クローン単離を行わない通常培養（バルク培養）を実施した。2 種類の培地を用いてクローンを培養した結果、培地によって形態の異なる細胞が確認された。市販の MSC 専用培地（A 培地とする）を用いてクローン培養した結果、粒状、紡錘状、針状、扁平状の細胞形態が見られ、さらに分裂寿命の長さから 3 グループに分けることができた。MSC の培養で汎用されてきた 15%FBS 含有培地（B 培地とする）では、粒状、網状、扁平状の細胞形態が見られ、分裂寿命の長さから 2 グループに分けることができた。どちらの培地においてもバルク培養は分裂寿命の長い（増殖能の高い）クローンと増殖曲線が類似していたことから、最初に多様であった細胞が継代していくにつれて分裂寿命の長い細胞集団に駆逐されている可能性が示唆された。分裂寿命の長いクローンの CFE は連続継代初期において高値を維持し、徐々に低下する傾向を示したが、分裂寿命の短いクローンは早期に低値を示した。以上より、MSC は細胞形態及び分裂寿命、CFE について種々の特性を有した MSC から構築された細胞集団であることが示された。

【MSC の特性解析】

クローン培養やバルク培養によって得られた培養上清を用いて、サイトカインアレイにより、複数種のサイトカイン産生能（1 細胞あたりのサイトカイン産生量）を評価した。培養初期と後期の比較では、chitinase 3-like 1 を除いて、培養後期の細胞集団の方がサイトカイン産生能は高値を示した。さらにクローンのグループ間で比較すると、分裂寿命の長いクローンより分裂寿命の短いクローンにおいてサイトカイン産生能が高値を示す傾向があった。興味深いことに、血管新生を促進すると考えられているサイトカイン（VEGF、angiogenin）と、血管新生を抑制すると考えられているサイトカイン（serpin E1/PAI-1、TSP-1）ともに高値を示していた。また、バルク培養のサイトカイン産生能は分裂寿命の長いクローンと類似した値を示した。

血管形成ネットワーク等による機能解析

【MSC と血管形成ネットワークの解析】

GFP 発現 HUVEC との共培養により MSC の血管ネットワーク形成支持能を確認した。MSC および HUVEC を種々の割合で混合し、18 日培養後、蛍光観察により GFP 発現 HUVEC のネットワーク形成を評価した。同一骨髓液内で相対的に分裂寿命の短いクローンと比較して、分裂寿命の長いクローンとの共培養において、より多くのネットワーク形成が見られた。よって、分裂寿命の異なるクローン間で、血管新生能力が異なる可能性が示唆された。

【機能発現候補因子の探索】

血管ネットワーク形成に対する、血管新生促進因子 VEGF、HGF の影響、及びそのダイナミックレンジを確認した。GFP 発現 HUVEC と線維芽細胞を 1 : 2 の割合で混合し、7 日共培養した。

VEGF 及び HGF を最終濃度 1 ng/mL、100 ng/mL となるように添加し、血管ネットワーク形成への影響を確認した。無添加群に対して VEGF 100 ng/mL 条件では、細く分岐の多いネットワーク形成が見られた。一方で、HGF 1 ng/mL 条件及び HGF 100 ng/mL 条件では、GFP 発現 HUVEC の生存数が増加する傾向があった。よって、VEGF 濃度及び HGF 濃度は血管ネットワーク形成に影響を与えることが示された。

虚血治療用 MSC の非臨床試験における有効性評価

【機能発現候補因子の *in vivo* における再現性確認】

下肢虚血モデルマウスに関して、虚血後の反応性を再確認する目的で様々なモデルマウスを作製し群内および群間の下肢虚血程度のばらつきを確認した。すなわち、大腿動静脈を結紮し抜去する A モデル、大腿動静脈を結紮し深部大腿動脈を結紮する B モデル、大腿動静脈の上流および脛骨動脈の下流を結紮後抜去する C モデル、大腿動静脈の上流と分岐部位、脛骨動静脈の上流と下流を結紮する D モデルの計 4 種類について、下肢虚血モデルマウスを作製し、外観による評価を実施した。その結果、総じて虚血レベルやばらつきをコントロールすることは困難であった。各種下肢虚血モデルマウスの血管結紮位置を確認し、足先への血流を予測した。足先への血流供給はどれも大腿二頭筋の血管からのみで、すべてのモデルマウスに対して共通していた。しかしながら下肢虚血モデルマウス個体間の外観上のばらつきは回避できず、個体間の微細な血管走行の違いが、ばらつきの原因である可能性が示唆された。

In vivo における有効性評価の観点で、細胞を移植することにより、移植先の新生血管数を検出する手法を開発した。マウス下肢を採取し、ヒト MSC をスパイクした後、コラゲナーゼ消化と精製を実施し、フローサイトメーターにてヒト MSC を検出した。結果、ヒト MSC をスパイクしたサンプルにおいて特定のゲート内にヒト MSC が検出された。これらの検討結果より、マウス下肢にスパイクしたヒト MSC に対して、表面抗原マーカーによる検出は可能であることが示唆された。さらに、血管内皮細胞のマーカーである CD31 陽性細胞群の中で、移植部位で細胞分裂している CD31 陽性細胞のみを特異的にラベリングすることで、総 CD31 陽性細胞中の新生 CD31 陽性細胞を定量する手法を考案した（特許申請準備中）。当該手法をもちいて、先のクローン別に培養したヒト細胞を移植し新生マウス血管内皮細胞を検出したところ、分裂寿命の短い細胞集団を移植した方が、新生血管細胞数が多く存在することを定量的に示すことに成功した。

虚血治療用 MSC 培養プロトコルの確定

【虚血治療用 MSC の暫定仕様と培養方法の確定】

暫定的に設定した MSC の培養工程に関する詳細な手順書および記録紙を作成し、社内文書として登録した（骨髄由来間葉系幹細胞（MSC01）作製手順書：PD-103SP-P1-001）。検査に関する手順書についても作成し、社内文書として登録した（特定細胞加工物（骨髄由来間葉系幹細胞 MSC01）試験検査手順書：QC-103SP-Q1-001）。当該培養工程や文書は暫定的に設定した。

骨髄由来 MSC の製造開始に先立ち、J-TEC の細胞培養加工施設において、プロセスバリデーションの一部として、骨髄の受け入れから一次包装までを実施し、規格に適合した MSC が製造可能であることを確認した。本バリデーションでは、海外から輸入した 1 症例の骨髄 10 mL を培養

し、 10^8 個の細胞数が得られるまで継代を重ねた。骨髓の受け入れから一次包装を実施し、規格に適合した MSC が製造可能であることを確認した。手順書の製造法で製造した MSC が、設定したすべての規格に適合することを確認した。以上のことから、本バリデーションを通じて MSC の製造法の妥当性が確認できた。

再生医療新法下における自家骨髓由来培養 MSC の移植

【MSC の受託培養体制整備】

大隈病院（再生医療等提供機関）では、法施行以前より、「ヒト幹指針を用いる臨床研究に関する指針」に基づき、産業技術総合研究所で骨髓由来 MSC を製造し、大隈病院等で移植する「重症末梢動脈疾患患者に対する自家間葉系幹細胞を用いた血管再生：厚生労働省発医政 1125 第 9 号」（2013 年 11 月 25 日承認）を行っていた。今回、その研究成果に基づき、本臨床研究「重症末梢動脈疾患に対する骨髓由来間葉系幹細胞を用いた血管再生」に関する再生医療等提供計画を作成し、特定認定再生医療等委員会の審査を受けたのち、近畿厚生局（所轄の地方厚生局）に提出した。製造委託先である J-TEC に対し、自家骨髓由来培養 MSC の技術移管を行い、特定細胞加工物標準書等の文書を含め、再生医療等安全性確保法に基づく製造・品質管理に係る体制を整備した。これらの対応を含む本計画について、特定認定再生医療等委員会の審査を受けた。委員会では、本計画が再生医療等安全性確保法の基準に適合することを前提に、いくつかの点に関する変更を求められた。これらの意見に対応し、修正後の書類を特定認定再生医療等委員会に提出した。さらに、実際の輸送条件下でシミュレーションを行った結果についても当該委員会に提出した。その後、認定再生医療等委員会意見書等を受領し、提供計画一式を近畿厚生局に提出、受理され、計画番号を付与された。これにより本再生医療等を開始するための再生医療新法上の対応を完了し、法律上は臨床研究を開始できる状況となった。

【MSC の臨床応用】

血管内狭窄を伴う下肢潰瘍患者に対して、本臨床研究の適用範囲に該当する可能性について検査を実施し、エントリー可能であることを確認した。

本症例は以前に両腸骨動脈にすでにステントを挿入され、大隈病院受診時には左足関節外側部（外果）に直径約 5.5 cm の円形の皮膚壊死（潰瘍）を認める Fontaine 分類 IV の患者であり、糖尿病の合併症もあった。骨髓を採取し、J-TEC にて MSC を培養し、2 回に分けて大隈病院にて潰瘍部位とその周囲皮下、筋肉組織内に移植した。

移植後 3 か月後において移植部位の潰瘍は直径約 2.5 cm と縮小傾向にあり、MSC 移植がおこなわれた左足外果の皮膚潰瘍部位は良好な再生過程を示したことが示唆された。

臨床応用可能な同種脂肪由来培養 MSC バンク構築

【倫理委員会の審議】

J-TEC の倫理基本方針の適合確認を目的として、J-TEC 倫理委員会を開催し、手術において余剰となった脂肪組織を J-TEC へ研究用として受け入れることに対して協議した。結果、J-TEC 倫理基本方針への適合が確認でき、J-TEC 倫理委員会への付議は不要と判断した。臨床応用可能な同種脂肪由来培養 MSC バンクの構築にあたって、J-TEC へ患者由来脂肪組織を提供することを目的とした計画の審議を求め、東京大学医学部倫理委員会へ書類一式を提出した（題名：再生医療を使用目的としたヒト脂肪由来組織幹細胞の特性評価と培養法の確立に関する多施設共同前向き観察研究）（2017 年 1 月 27 日承認）。

商業利用可能な同種セルバンク構築をめざし、東京大学附属病院倫理委員会との協議を実施した。すなわち、本商業用の細胞ストックの用途により、疫学・観察研究および特定臨床研究のいずれかになるため、2017 年 5 月より東京大学内の研究倫理支援室との相談を開始した。

東京大学倫理支援室においても、疫学・観察研究および特定臨床研究の線引きについての考え方の原則について、議論が継続中であった。2017 年 9 月に研究倫理支援室との相談を受けて振り分けチェックフローの申請を行い、疫学・観察研究として倫理申請を実施した。医学部研究倫理支援室による数回のフォーマットチェックならびに臨床研究支援センターおよび病院研究支援チームとの相談を経て、2017 年 11 月に医学部研究倫理支援室に申請書が受理され個別審査を受けることが決定した。その後、2017 年 12 月に個別審査を受け、2018 年 1 月に本倫理申請は承認された。同種細胞を用いた再生医療を実現するためには画期的な事例であるといえる。

【同種脂肪由来培養 MSC セルストック作製】

セルバンク構築に向けた脂肪由来 MSC の増殖および細胞形態を確認するために、まずマウス由来脂肪組織を用いて培養を実施した。6 週齢のマウス鼠蹊部より脂肪組織を採取し、コラゲナーゼにより処理した。セルストレーナーを用いて残渣を取り除いた後、得られた細胞を培養皿に播種し、培養した。細胞の形態を確認しながら継代を実施し、細胞の倍加時間を算出した。その結果、細胞の形態から、継代を重ねることによりクルードな細胞集団が均一化する傾向が示唆された。5 継代までは増殖能を維持し、継代とともに倍加時間が延長する可能性が示唆された。

研究用ヒト脂肪組織を用いて、ヒト脂肪組織より MSC が分離・培養が可能であること確認し、東京大学及び J-TEC 間での技術的な差異が生じないことを確認した。しかしながら、東京大学医学部附属病院における倫理委員会にてセルバンク構築に使用可能な臨床用脂肪組織に対する倫理的な判断に時間を要し、最終的には 2018 年 1 月末に倫理委員会の同意を得られたものの、研究期間内に臨床応用可能な脂肪由来 MSC セルストックを構築するには至っていない。

【セルバンクの安全性評価】

製品の安全性試験としての微生物学的試験において、合理的手法の選択について提案した。具体的には、東京医科歯科大学（TMDU）の特許技術を使用した MycoFinder（日水製薬）を用いたマイコプラズマ否定試験（NAT）の施設バリデーションの支援を実施した。J-TEC にて実施中であるマイコプラズマ否定試験（NAT）の施設バリデーションにおいて、陰性対照（DNA 抽出工程の妥当性確認用）で、原因不明のコンタミネーションが頻発した。原因追求のため、当該検体のシーケンス解析を実施した結果、5 検体中 4 検体で *Acholeplasma laidlawii* が確認された。マイ

コプラズマ混入工程を特定するために、複数の試験を実施したところ、コンタミネーションの原因は DNA 抽出キットの構成品であるスピнкаラムであることが判明した。

マイコプラズマ否定試験（NAT）で使用する MycoFinder の性能を評価した。独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（NBRC）もしくは American Type Culture Collection（ATCC）から入手後バンク化し、菌数（CFU）及びゲノムコピー（GC）数を測定したマイコプラズマ菌株を使用した。マイコプラズマ以外の生物種で交差反応性がないこと、適切な検出感度を示すことを確認し、MycoFinder をマイコプラズマ否定試験（NAT）で使用する妥当性を確認した。

3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

間葉系幹細胞（MSC）は、すでに多くの臨床使用経験を有しているにもかかわらず、細胞生物学的にはいまだ明確な特性解析がなされているとはいえない。例えば、MSC とは単一の細胞と言うべきでなく、分化の程度が異なったヘテロな細胞集団であるともいえる。このことは、同細胞の基礎研究を実施する上での課題であるばかりか、細胞の厳密な特性解析を必要とする再生医療等製品の開発においては、扱いに困難を要することになる。また、継代を繰り返す過程において、MSC の持つ多分化能や増殖能、遊走能は徐々に失われ、より成熟した表現型へと変化する可能性が示唆されている。これら細胞の変化（劣化）も再生医療を実施する上では明確に定義する必要がある。

また、昨今の再生医療等新法下において、ヒト細胞を用いた臨床研究は一定の基準を満たすことにより、大学病院のみならず一般の病院においても実施することが可能となっており、ヒト細胞を用いた臨床研究に対する制度的なハードルは低くなっていることが予想される。よって有効性に関して十分な非臨床試験を実施せずとも、有効性が示唆され得るデータの取得を持ってヒトへの臨床応用へとステージアップするケースは今後も拡大すると考える。

細胞懸濁液による再生医療等製品の提供を想定する際、適切な評価項目の設定が重要である。また他家細胞による細胞懸濁液の製品化をイメージすると、ロットチェンジの必要性から、細胞の持つ特性を数値等の一般化した概念で客観的に説明する必要がある、当該評価項目が規格値となり得る。サイトカイン発現能や他の細胞へと及ぼす変化を適切に説明する必要がある、またこれらの手法により客観的評価がなされた細胞集団について、ヒトへの移植を通じて適切なエンドポイントと併せて効能効果を確認することにより、評価項目としての適切性も判断することが可能となる。

細胞集団の性能を評価する上で増殖能や分化能等を確認することは前提として、サイトカイン発現能や他細胞との共培養による評価も行われている。しかしながら、*in vitro* における細胞の性能評価は、人工的に形成された環境下における評価手法であり、ある瞬間における細胞の機能は表現しているものの、置かれた環境により細胞の性能が変化し得る細胞集団に対する機能評価には、さらなる最適化が必要と想定される。すなわち、適用を想定する環境下において、細胞を投与した際に起こり得る生体反応を客観的に評価できる試験系の構築が求められる。

新生血管の評価を実施する上で、血管結紮を伴う虚血モデルマウスを作出し、血流量を血流計測機器（レーザードップラー血流計等）にて評価することが一般的である。しかしながら、血流測定手法における検出には適切な陽性対照（ポジティブコントロール）が存在せず、客観的評価は困難である。また結紮により局所的にマウス血流が一時的に改善することが経験上確認されており、ヒトへの外挿性の観点から改善の余地が見受けられた。

これら上述した既存法の問題点を解決する別手段について、下記項目について提案した新手法が妥当であることを示す。

1. 間葉系幹細胞（MSC）培養による分類
2. 血管形成ネットワーク等による機能解析
3. 虚血治療用 MSC の非臨床試験における有効性評価

自家及び同種細胞ともに、移植細胞は凍結状態で保存しておくことが、細胞管理上のリスク及び手間の観点からも好ましい。しかしながら、凍結解凍工程は細胞にとってダメージを加えることは明らかであり、凍結解凍直後の細胞集団は求める細胞活性を保持していない可能性も示唆される。特に自家細胞を用いた細胞提供を想定する上で、細胞の保存や輸送状態を適切に管理することは、細胞を提供する上で重要な工程であることは広く理解されている。

自家細胞の新鮮状態で提供において、その細胞の性能を保持し続けるためには細胞の保存期間は適切に設定する必要がある。浮遊状態における細胞の生存時間は限られており、細胞を移植する当日に細胞製造施設から、細胞が輸送され、できる限り細胞を早期に移植することが望まれる。そのため、細胞が移植される日時をあらかじめ決定し、移植日を意識した細胞培養計画案を適切に設定する必要がある。しかしながら移植日は患者状態に左右される可能性が高く、移植日の延期等は自家細胞移植の観点で大きなリスクとなる。また移植日まで細胞の培養を継続することは細胞老化の観点で好ましくない。

既存工程の問題点を解決する別手法として、次のような細胞培養計画案を提示する。すなわち、初代培養後の細胞集団を適切に凍結保管し、それらの一部を解凍・播種及び培養を実施して解凍後の細胞増殖能等を評価する（試し培養）。試し培養の結果を下に、播種密度、培養日数を確定させ、移植日にあわせて解凍・播種及び培養を実施し、移植日当日に細胞を出荷するものである。

上述した既存法の問題点を解決する別手段について、自家および同種細胞の臨床適用体制を構築しながら実施する必要がある、下記項目について提案した新手法が妥当であることを示す。

4. 虚血治療用 MSC 培養プロトコルの確定

5. 再生医療新法下における自家骨髄由来培養 MSC の移植

6. 臨床応用可能な同種脂肪由来培養 MSC バンク構築

1. 間葉系幹細胞（MSC）培養による分類

【MSC のクローン解析】

輸入骨髓液を遠心して血漿を除去し、残りの細胞成分をディッシュに播種した。様々な形状を持つコロニーをピックアップし、連続継代を行うとともにコロニー形成率を確認した。コロニー形成率は、フラスコに低密度で細胞を播種し、11 日培養の後、コロニー数を播種細胞数で除算することにより算出した。同時に、クローン単離を行わない通常培養（バルク培養）を実施した。2 種類の培地を用いてクローンを培養した結果、培地によって形態の異なる細胞を確認した。市販の MSC 専用培地（以下、A 培地とする）を用いてクローンを培養した結果、粒状、紡錘状、針状、扁平状の細胞形態が見られ、さらに分裂寿命の長さから 3 グループに分けられると想定している（図 3-1）。

A培地

コロニーピックアップ (P1) から17日後の観察像

※左上の番号はクローンナンバー

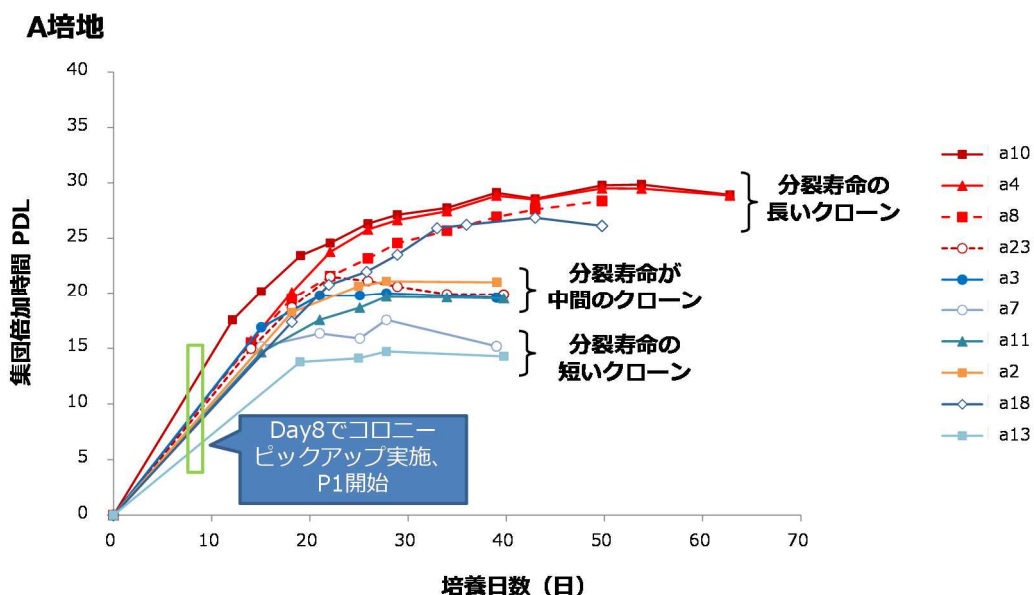
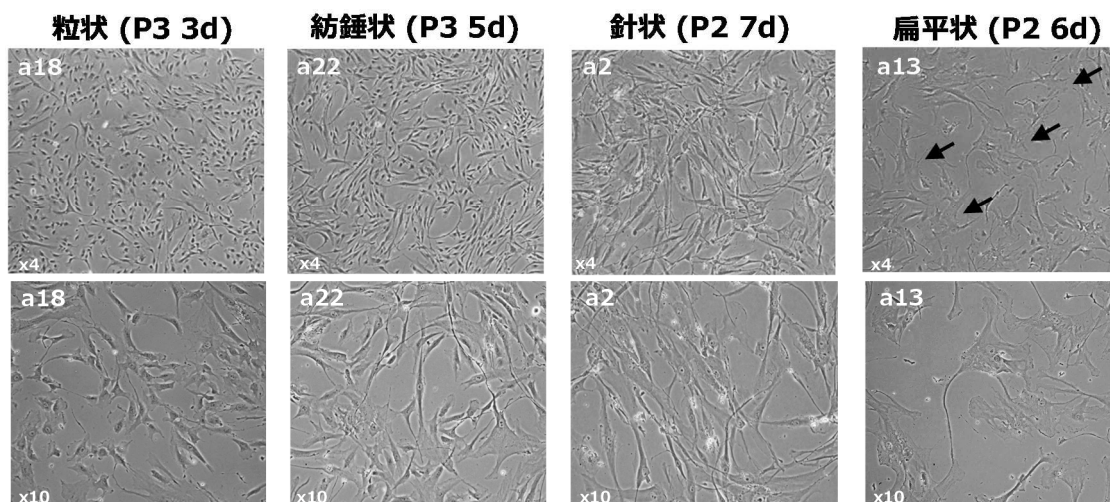


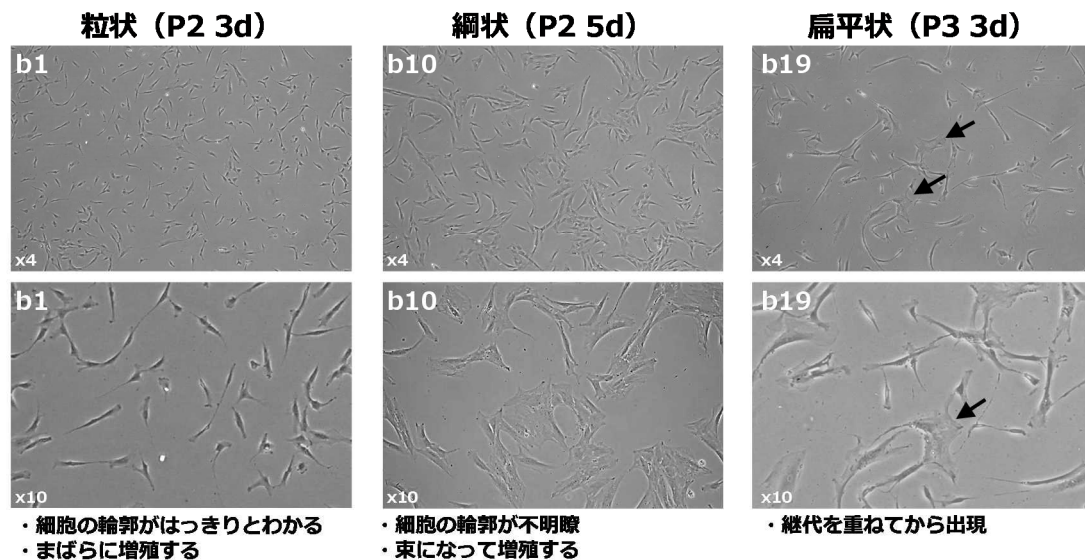
図 3-1 A 培地における細胞形態と増殖曲線 (矢印：代表的な扁平状細胞)

MSC の培養で汎用されてきた 15%FBS 含有培地 (以下、B 培地とする) では、粒状、網状、扁平状の細胞形態が見られ、分裂寿命の長さから 2 グループに分けられると想定している (図 3-2)。どちらの培地においても通常培養 (バルク培養) は分裂寿命の長い (増殖能の高い) クローンと増殖曲線が類似していることから、最初に多様であった細胞が継代していくにつれて分裂寿命の長い細胞集団に駆逐されている可能性が示唆された (図 3-3)。

B培地

コロニーピックアップ (P1) から13日後の観察像

※左上の番号はクローンナンバー



B培地

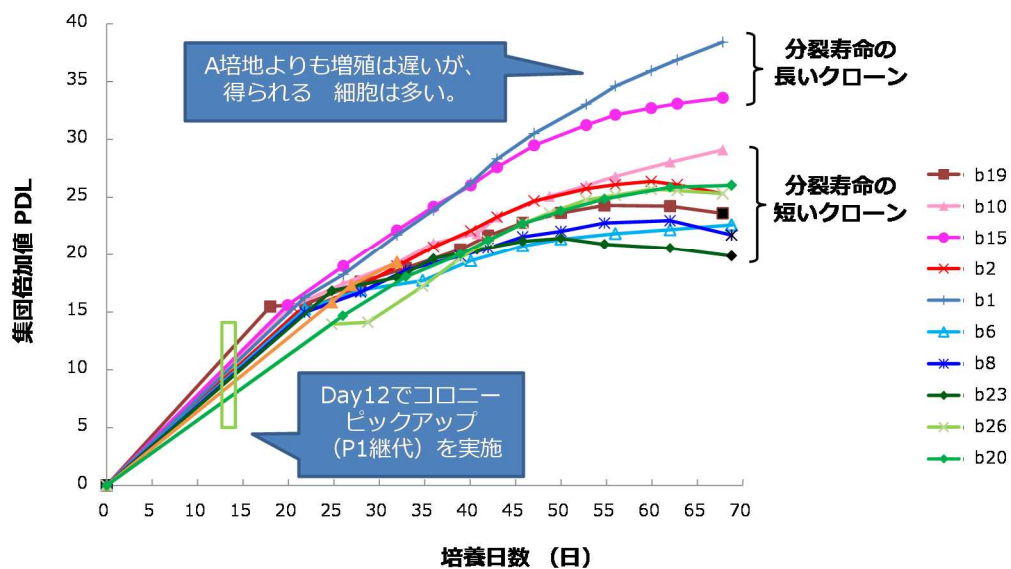


図 3-2 B 培地における細胞形態と増殖曲線 (矢印：代表的な扁平状細胞)

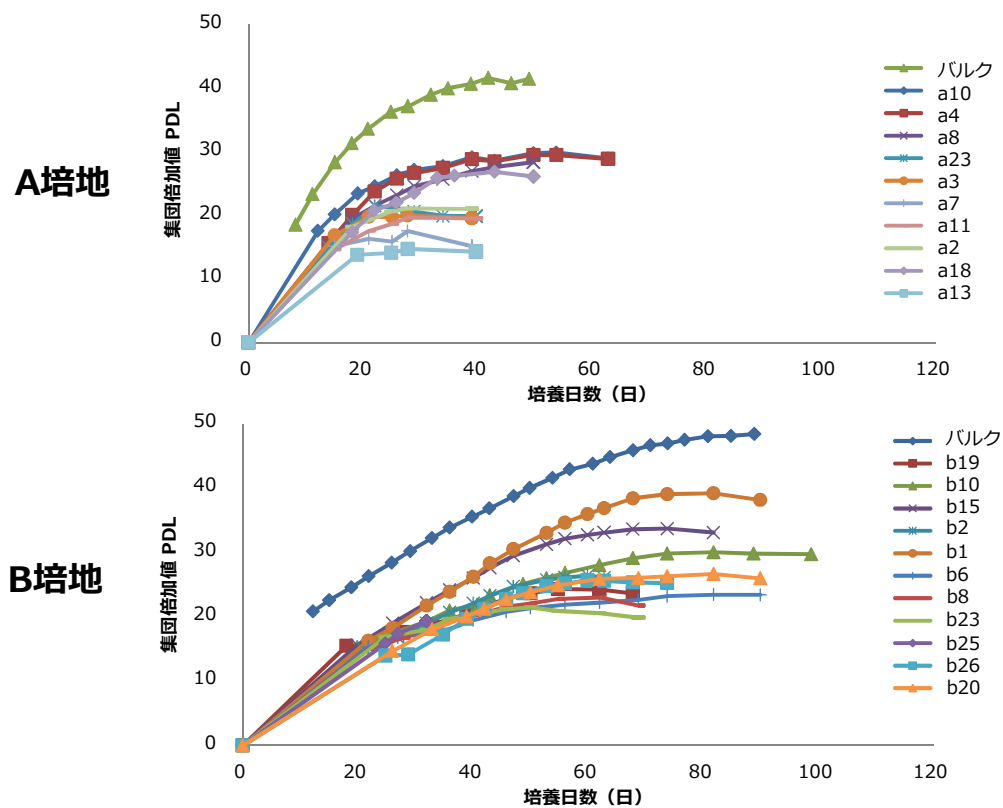


図 3-3 クローン培養とバルク培養の増殖曲線の比較

図 3-4 より、分裂寿命の長いクローンのコロニー形成率は連続継代初期において高値を維持し、徐々に低下する傾向を示したが、分裂寿命の短いクローンは早期に低値を示した。以上より、細胞形態及び分裂寿命、コロニー形成率からクローンの特性が不均一であることが示された。

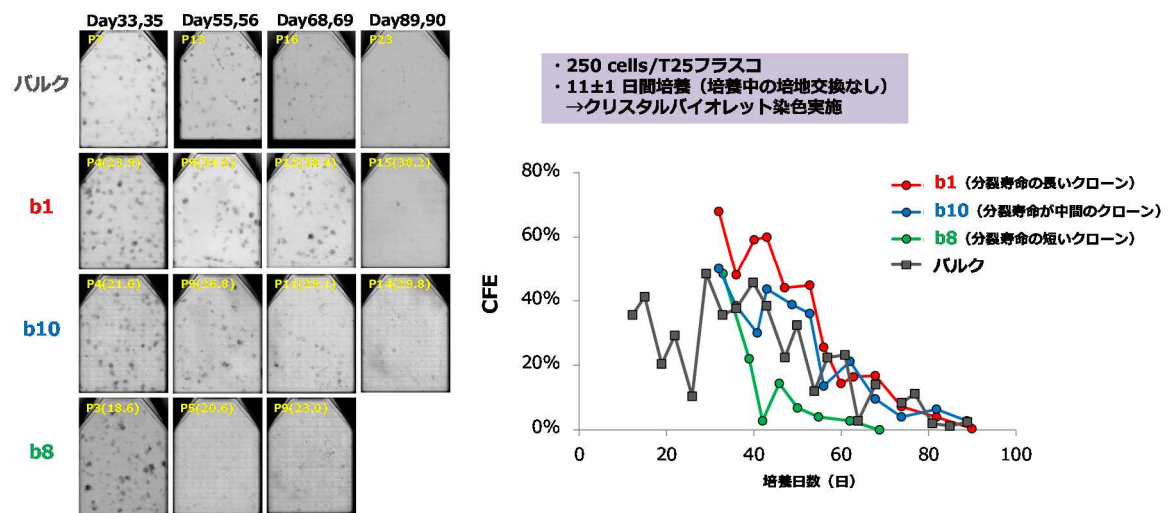


図 3-4 クローン培養とバルク培養のコロニー形成能

【MSC の特性解析】

クローン培養やバルク培養によって得られた培養上清を用いて、サイトカインアレイにより、複数種のサイトカイン産生量を評価した。さらに培養終了時の細胞数でサイトカイン産生量を除算することにより、サイトカイン産生能（1細胞あたりのサイトカイン産生量）を比較した。産生能の高かった10種類のサイトカインについて示す（図3-5）。培養初期と後期の比較では、chitinase 3-like 1を除いて、培養後期の細胞集団の方がサイトカイン産生能は高値を示した。クローン間を比較すると、分裂寿命の長いクローンより分裂寿命の短いクローンにおいてサイトカイン産生能が高値を示す傾向があった。また、バルク培養のサイトカイン産生能は分裂寿命の長いクローンと類似した値を示した。

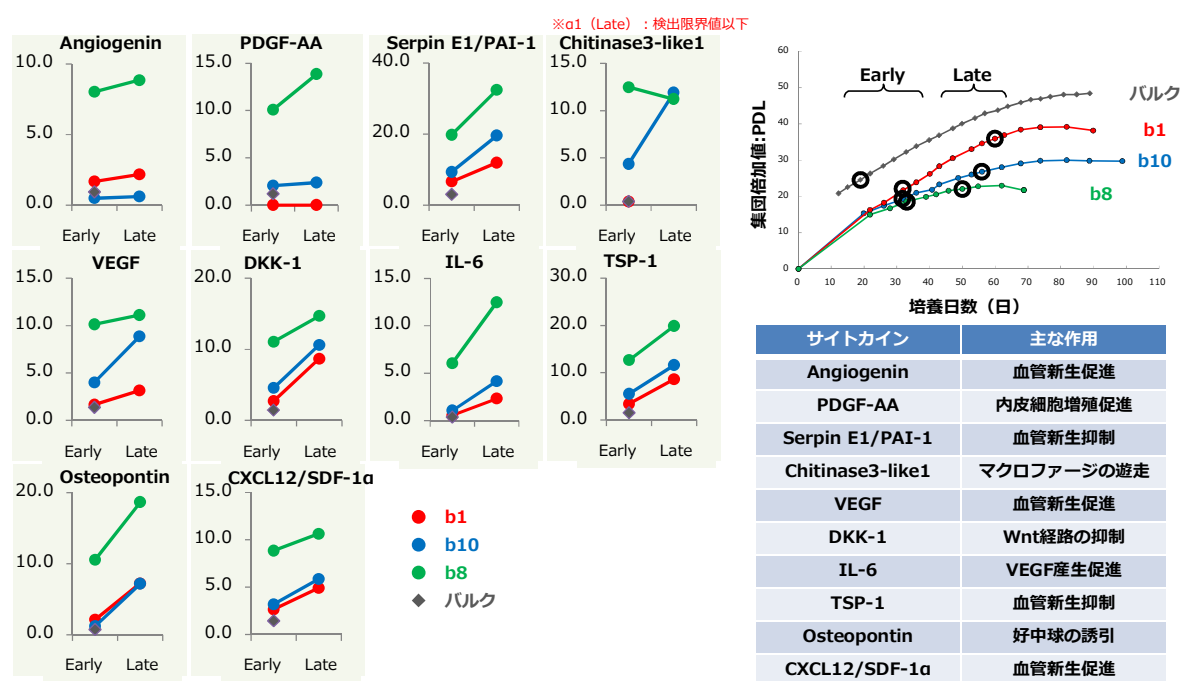


図 3-5 クローン培養とバルク培養のサイトカイン産生能

2. 血管形成ネットワーク等による機能解析

【MSC と血管形成ネットワークの解析】

サイトカインアレイの結果から、分裂寿命の短いクローンが高いサイトカイン産生能を示した。しかしながら、血管新生を促進すると考えられているサイトカイン（VEGF、angiogenin）と、血管新生を抑制すると考えられているサイトカイン（serpin E1/PAI-1、TSP-1）ともに高値を示していた。よって、さらなる機能解析が必要であると判断し、MSC の血管ネットワーク形成支持能を確認した。GFP 発現 HUVEC と MSC を 1:5 の割合で混合し、共培養を実施した。共培養 14 日後、蛍光観察により GFP 発現 HUVEC のネットワーク形成を評価した。図 3-6 より、ドナー1 およびドナー2 の骨髄由来 MSC において、分裂寿命の長いクローンは、分裂寿命の短いクローンと比較して、より高いネットワーク形成支持能を示した。よって、分裂寿命の異なるクローン間で、血管新生能力が異なる可能性が示唆された。さらに、クローンとバルクを比較すると、バルクは分裂寿命の長いクローンと同等のネットワーク形成支持能を示した。

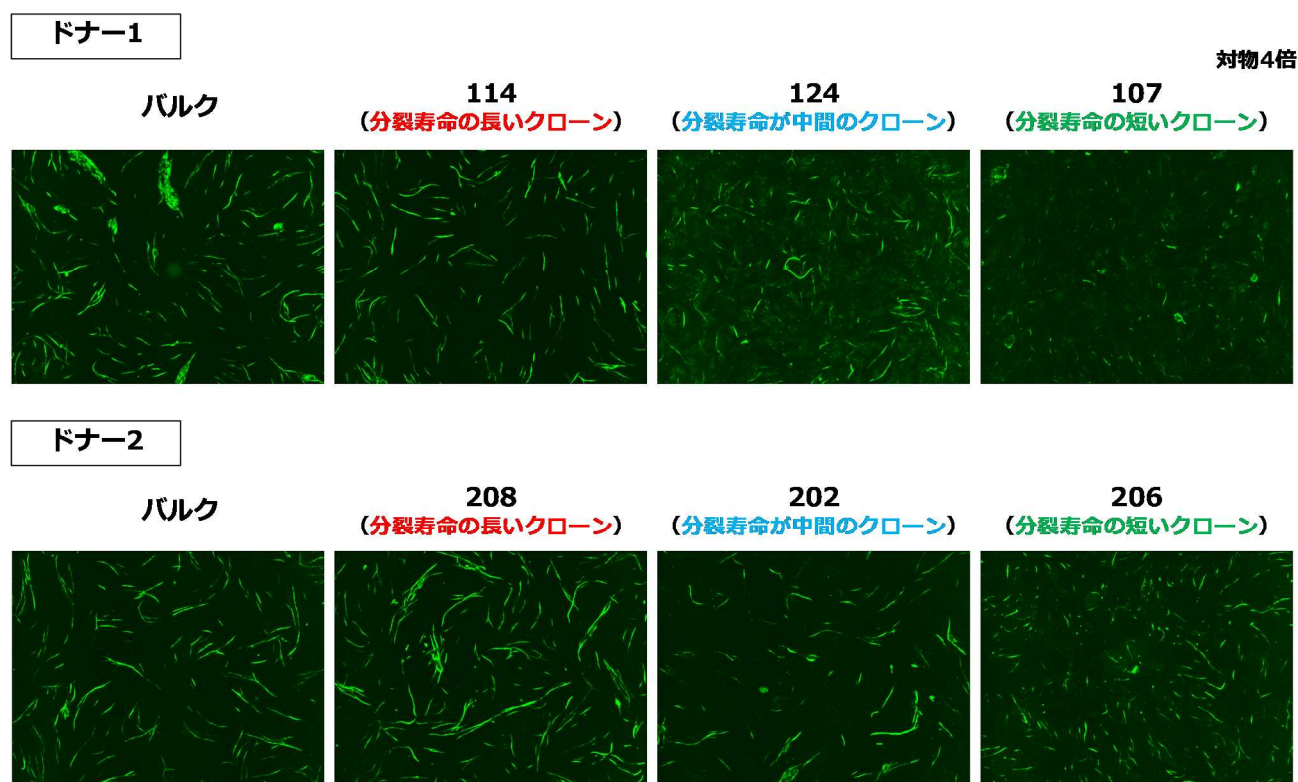


図 3-6 クローン培養とバルク培養の血管ネットワーク形成支持能

臨床研究で使用する培地（ α MEM に 15% の FBS、10 ng/mL の bFGF、20 μ g/mL のゲンタマイシン硫酸塩、以下、bFGF 添加培地）で培養した MSC に対して、特性解析を行った。MSC を P0 から bFGF 無添加培地と bFGF 添加培地で培養し、連続継代を行った。また、それぞれの培地で培養した MSC に対して、P6 で血管ネットワーク形成支持能の評価を行った。図 3-7 より、bFGF 添加培地を用いると PDL が著しく向上することが確認された。さらに、bFGF 添加培地で培養した MSC は高い血管ネットワーク形成支持能を示した。

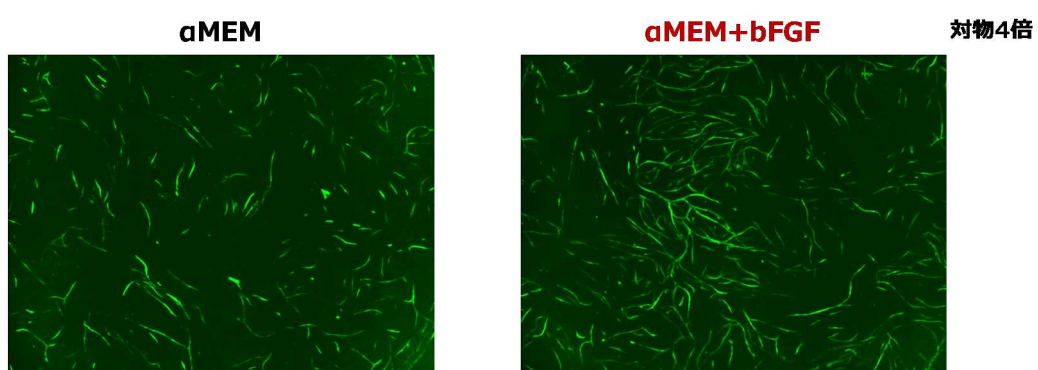
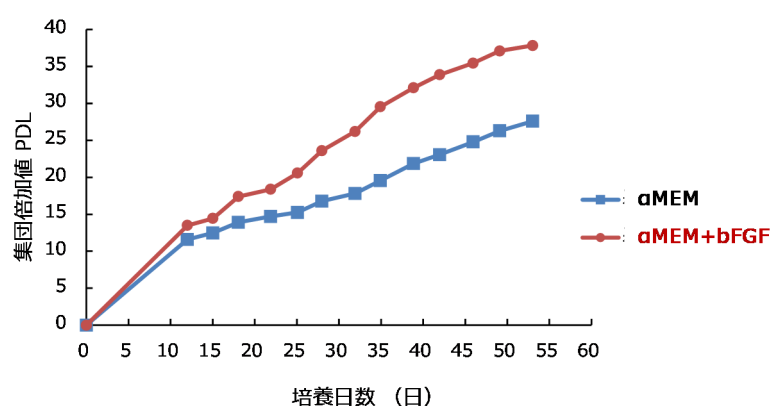


図 3-7 bFGF 無添加条件と添加条件における MSC の PDL と血管ネットワーク形成支持能

【機能発現候補因子の探索】

機能発現候補因子のひとつとして、サイトカイン産生が想定され、さらに取得したクローンによってサイトカイン産生能が異なることが示された。そこで、血管ネットワーク形成に対する、血管新生促進因子 VEGF、HGF の影響、及びそのダイナミックレンジを確認した。GFP 発現 HUVEC と線維芽細胞を 1:2 の割合で混合し、7 日間共培養した。VEGF 及び HGF を最終濃度 1 ng/mL、100 ng/mL となるように添加し、血管ネットワーク形成への影響を確認した。図 3-8 より、無添加群に対して VEGF 100 ng/mL 条件では、細く分岐の多いネットワーク形成が見られた。一方、HGF 1 ng/mL 条件及び HGF 100 ng/mL 条件では、GFP 発現 HUVEC の生存数が増加する傾向があった。よって、VEGF 濃度及び HGF 濃度は血管ネットワーク形成に影響を与えることが示された。

さらに、MSC と GFP 発現 HUVEC の共培養系における VEGF の関与を確認した。GFP 発現 HUVEC と MSC を 1:5 の割合で混合し、14 日間共培養した。最終濃度 1 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL となるように VEGF を添加した。また、最終濃度が 2 ng/mL、5 ng/mL となるように IgG および抗 VEGF 抗体を添加した。図 3-9 より、VEGF 濃度が高くなるにつれて、分岐が多く、より繋がっているネットワークが観察された。抗 VEGF 抗体を添加した実験では、GFP 発現 HUVEC の生存数が減少し、ネットワーク形成が抑制される様子が確認された。以上より、MSC と GFP 発現 HUVEC の共培養系におけるネットワーク形成には、VEGF が重要な役割を持つことが示された。

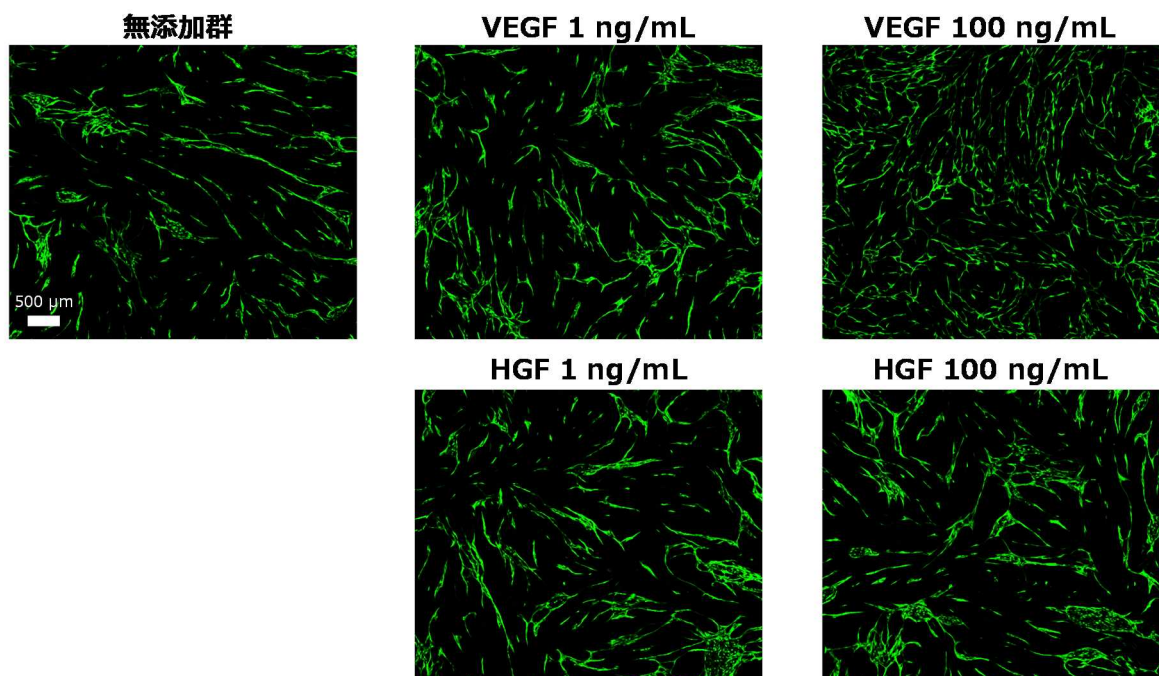


図 3-8 血管ネットワーク形成に対する VEGF および HGF の影響

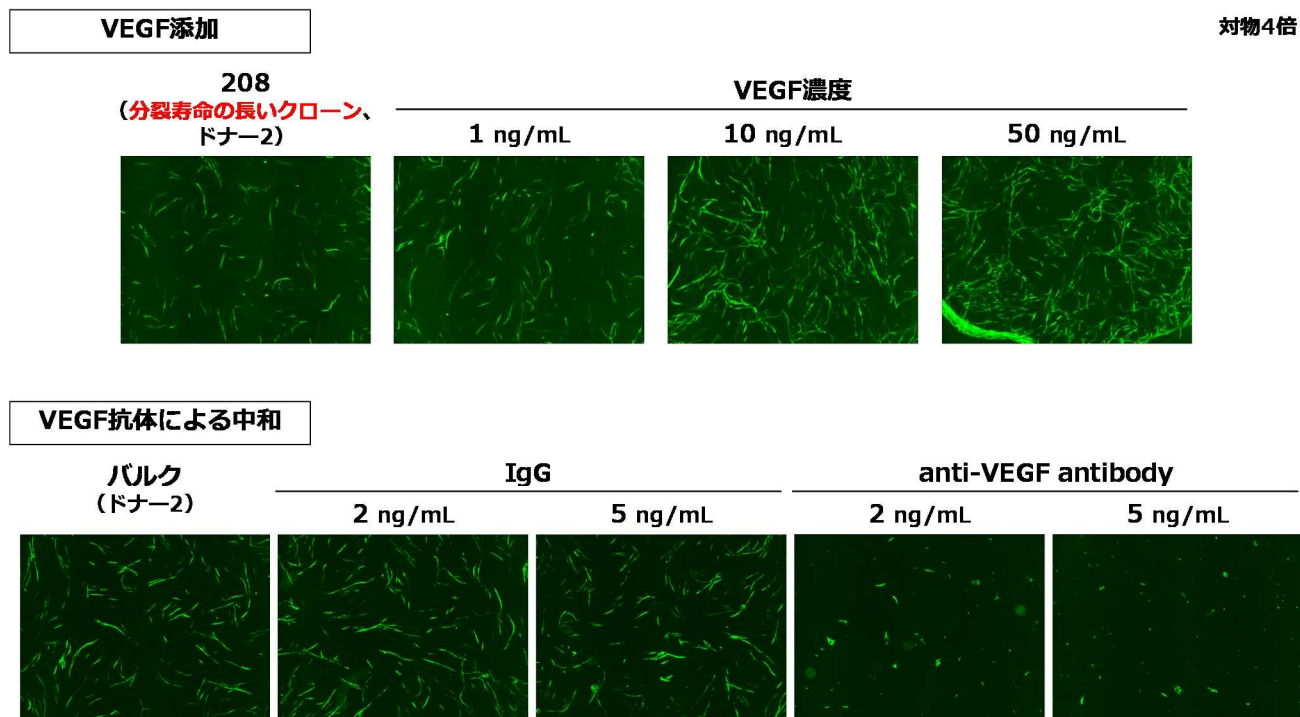


図 3-9 血管ネットワーク形成に対する VEGF 添加および中和の影響

VEGF の重要性が示された一方で、図 3-5、図 3-6 では、相対的に低い VEGF 産生能を持つクローンが高いネットワーク形成支持能を示し、クローンの VEGF 産生能とネットワーク形成支持能は相関していない。図 3-5 より、MSC は血管新生促進因子のみでなく、serpin E1/PAI-1 や TSP-1 などの血管新生抑制因子も産生していることが確認された。血管新生は促進因子と抑制因子のバランスによって制御されているという報告もあるため、内皮細胞等との共培養により、種々のサイトカインの複合的な影響を評価することが重要であると考えられた。

3. 虚血治療用 MSC の非臨床試験における有効性評価

【機能発現候補因子の *in vivo* における再現性確認】

下肢虚血モデルマウスの評価方法として外観における虚血程度を採用してきたが、モデルマウス群内における虚血程度のばらつきを把握する必要があると判断した。下肢虚血モデルマウスに関して、虚血後の反応性を再確認する目的で様々なモデルマウスを作製し群内および群間の下肢虚血程度のばらつきを確認した。すなわち、大腿動静脈を結紮し抜去する A モデル、大腿動静脈を結紮し深部大腿動脈（Deep femoral artery : DFA）を結紮する B モデル、大腿動静脈の上流および脛骨動脈の下流を結紮後抜去する C モデル、大腿動静脈の上流と分岐部位、脛骨動脈の上流と下流を結紮する D モデルの計 4 種類について、下肢虚血モデルマウスを作製し、外観による評価を実施した（図 3-10）。

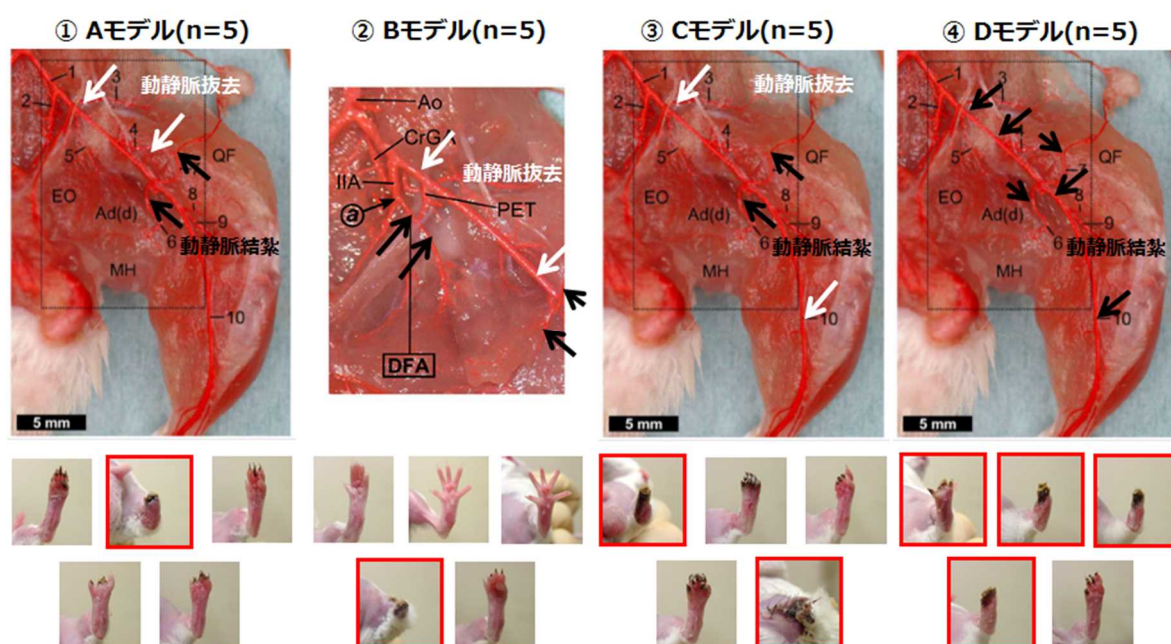


図 3-10 下肢虚血モデル別外観（虚血 14 日後）のまとめ

A モデルに関しては虚血 14 日後の外観上にて個体によるばらつきが存在することが示唆された。対照的に B モデルに関しては、多くのモデルマウスにて外観上の個体によるばらつきは確認されなかったが、重症化しなかった。DFA を結紮することにより血流に変化（逆流も含めて）が生じた影響が示唆されるが、手技による煩雑さもモデル間差に影響を及ぼした可能性もある。C モデルでは抜去する血管が広範囲に渡るため、D モデルよりも重症化する可能性を想定したが、結果として D モデルの方が外観上では重症化した。A モデル同様、C モデルにおいてもばらつきが確認された。D モデルではばらつきは少ない傾向にあったが、総じて虚血レベルやばらつきをコントロールすることは困難であった。

解剖学的な所見から、それぞれのモデルマウスの下肢に対する血流走行を予測した。

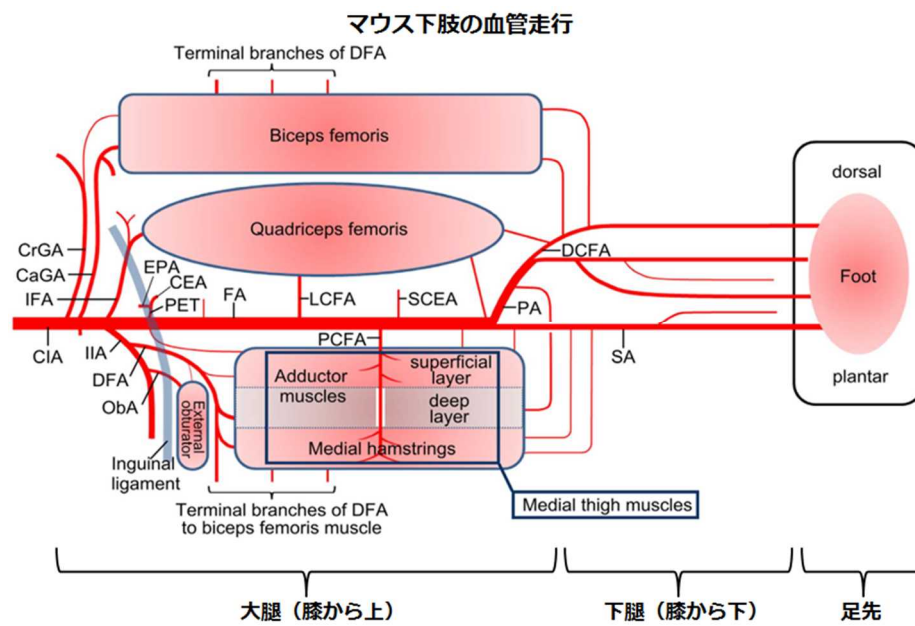
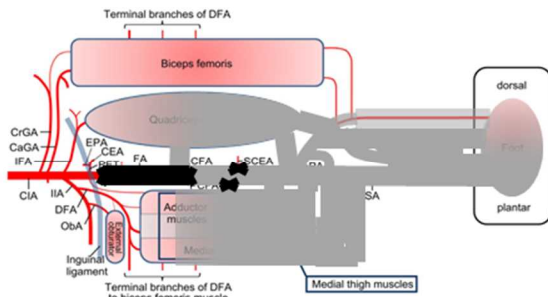


図 3-11 マウス下肢の血流模式図

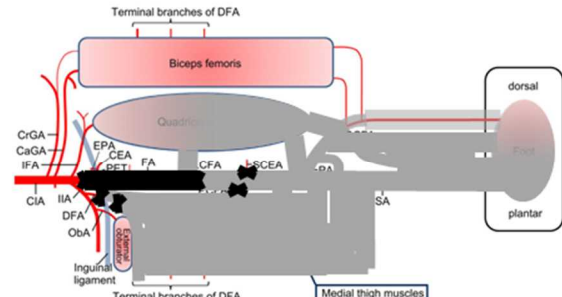
【各種虚血モデルの血流予測】

✕ : 結紮部 — : 除去部

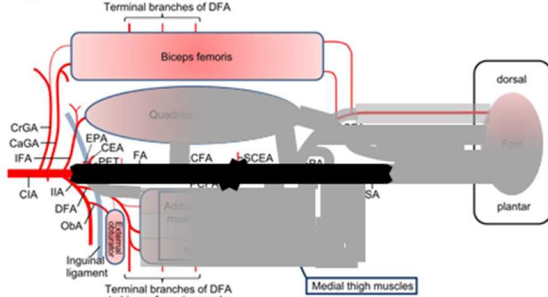
① Aモデル



② Bモデル



③ Cモデル



④ Dモデル

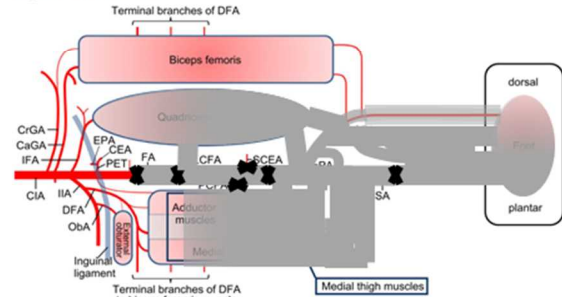


図 3-12 各種虚血モデルマウスの下肢への血流予測

図 3-11 の模式図を参考に、各種下肢虚血モデルマウスの血管結紮位置を確認し、足先への血

流を予測した。足先への血流供給はどれも大腿二頭筋の血管からのみで、すべてのモデルマウスに対して共通していた（図 3-12）。しかしながら下肢虚血モデルマウス個体間の外観上のばらつきは回避できず、個体間の微細な血管走行の違いが、ばらつきの原因である可能性が示唆された。

東京大学との議論の結果、これらの下肢虚血モデルマウスに対する外観・血流評価から、当該虚血モデルマウスを用いた移植細胞の有効性評価は困難であると判断し、移植細胞の挙動・動態を解析することにより有効性を予測する方法に切り替えた。

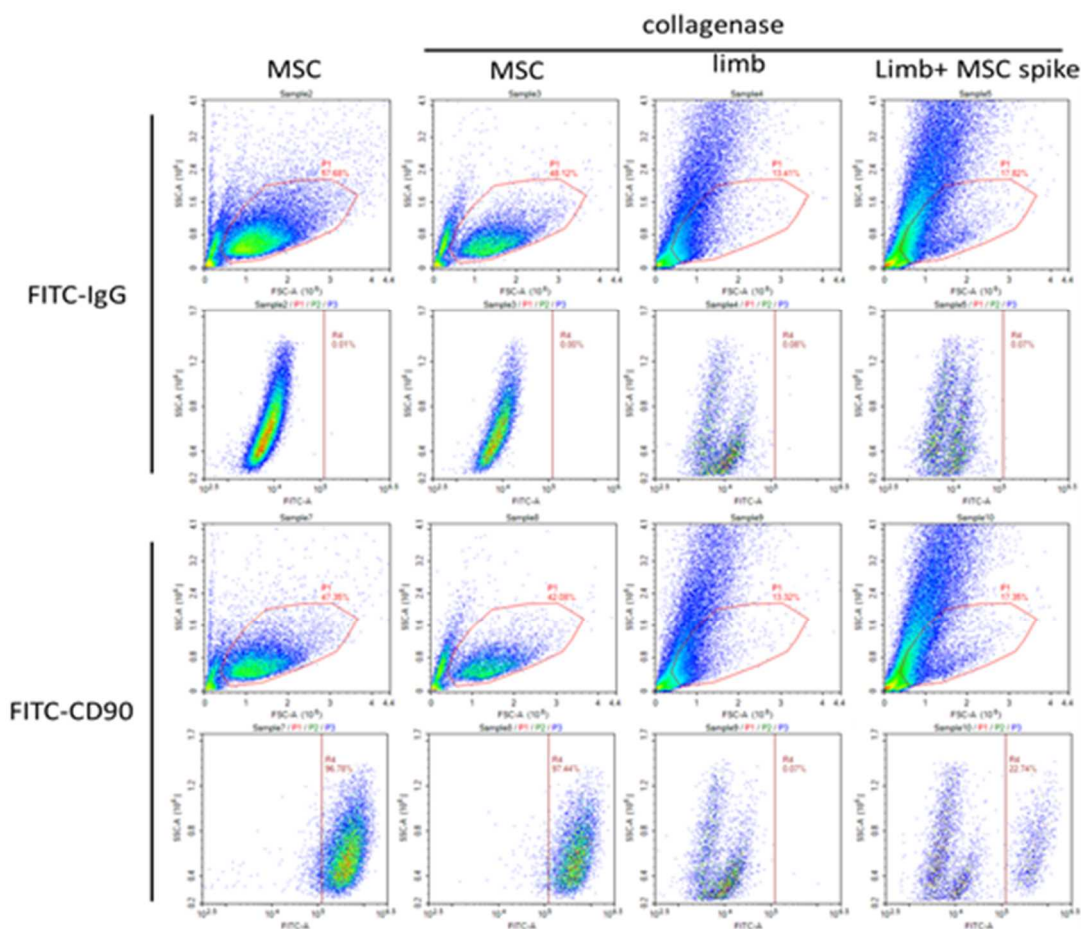


図 3-13 マウス下肢へスパイクしたヒト MSC の検出

In vivo における有効性評価の観点で、細胞を移植することにより、移植先の新生血管数を検出する手法を開発した。マウス下肢を採取し、ヒト MSC をスパイクした後、コラゲナーゼ消化と精製を実施し、フローサイトメーターにてヒト MSC を検出した。結果、ヒト MSC をスパイクしたサンプルにおいて特定のゲート内にヒト MSC が検出された（図 3-13）。これらの検討結果より、マウス下肢にスパイクしたヒト MSC に対して、表面抗原マーカーによる検出は可能であることが示唆された。

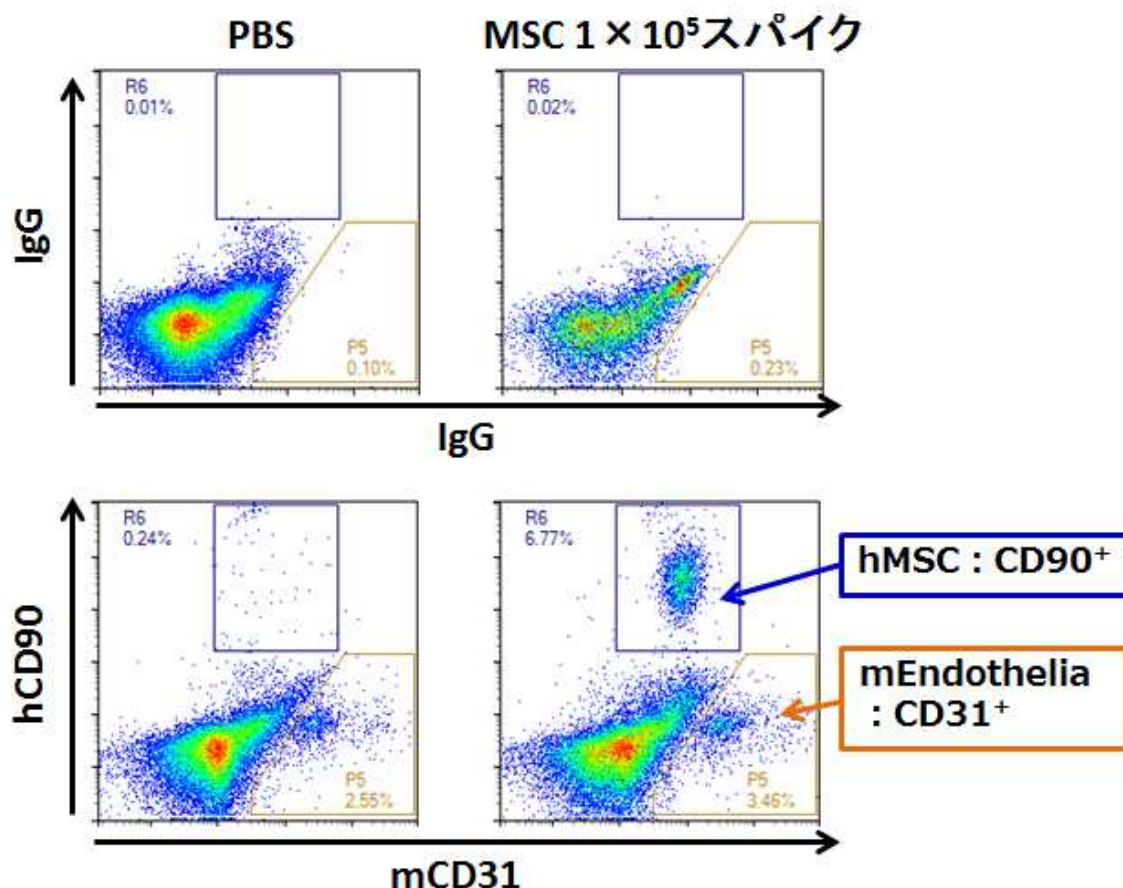


図 3-14 マウス下肢におけるマウス血管内皮細胞の検出

さらにマウス血管内皮細胞数を半定量することを目的として、ヒト MSC がスパイクされたマウス下肢をコラゲナーゼによって消化し、血管内皮細胞マーカーである CD31 陽性細胞と、ヒト MSC マーカーである CD90 陽性細胞の割合を確認した。コントロールとの比較から特異的にヒト MSC マーカーおよびマウス血管内皮細胞マーカーが検出できることを確認した(図 3-14)。

これらの手法を応用することで、筋肉組織内の血管新生能、組織修復効果等の評価も可能になると考えられる。すなわち、内皮細胞マーカーによる血管内皮細胞の定量化、炎症促進／沈着細胞群の集積・増殖等を解析することで、移植物の有効性の判断材料になりえることが期待できる。そのため本手法を応用し、筋肉組織内の血球細胞および、血管内皮細胞の検出系構築を検討した。

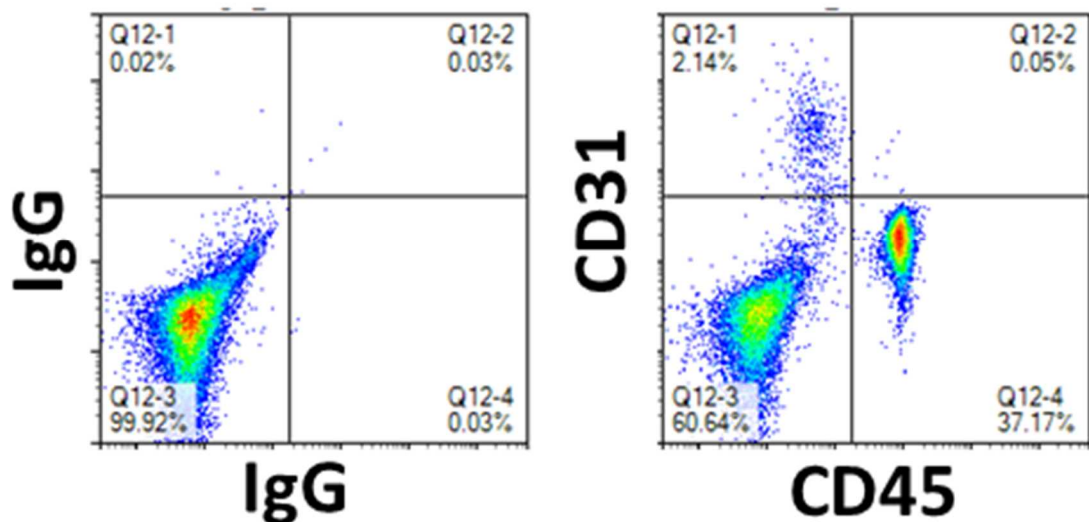


図 3-15 筋肉組織の FCM 解析

血管内皮細胞のマーカーとして CD31、白血球細胞のマーカーとして CD45 を用いた。血管内皮細胞は CD45 陰性であるため、CD31⁺/CD45⁻細胞を内皮細胞とした。本結果から、アイソタイプコントロールである IgG と比較して、CD31⁺/CD45⁻細胞が明確に検出され、筋肉組織内の血管内皮細胞の検出が可能であることが確認された (図 3-15)。

内皮細胞”増殖”として有効性を示唆するためには、本細胞の半定量化が必要である。まず、陽性対照を設定し、有効性を判断するためには、どの程度の定量性が必要であるかを見積もる必要がある。仮に陽性対照において顕著な血管新生誘導能が検出されるならば、ある程度の感度で十分であるが、既存血管内皮細胞数に埋もれてしまう場合、感度を高める工夫が必要になると考えられる。そこで、次試験では陽性対照を用いた際の血管内皮細胞を検出することを検討することとした。

最も新生血管を誘導する効力が強いと思われるがん細胞を移植することで血管新生誘導を試みた。具体的には、マウスメラノーマ細胞の悪性型である B16-F10 細胞株を筋肉内注射することで担がんマウスを作製し、血管内皮細胞の増大を解析した。

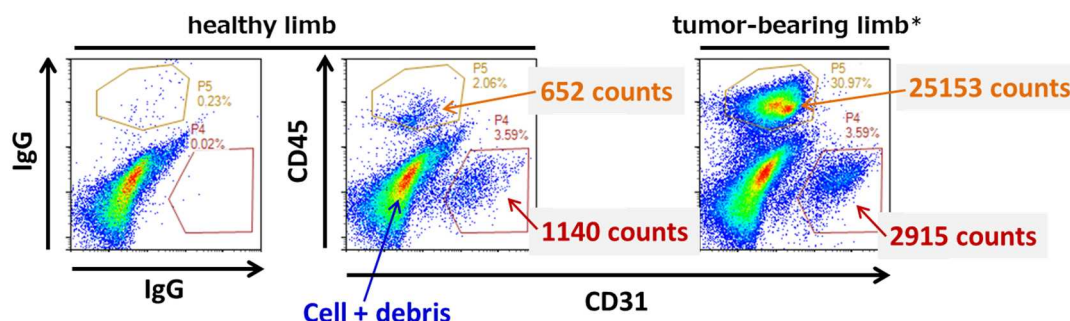


図 3-16 B16 移植マウス下肢筋肉組織の FCM 解析

本結果から、健常足での CD31 陽性細胞数は 1140 カウントであったが、B16 移植下肢においては 2915 カウントであり、CD31 陽性細胞が増大していることが確認された。しかしながら、CD31 陽性細胞率としては、共に 3.59%であり、増大は観察されなかった（図 3-16）。これは腫瘍の成長による血球細胞の浸潤に伴った CD45 陽性細胞数の増大によって総細胞数が大きく変化したためだと考えられる。総血管内皮細胞中の割合を算出することで内皮細胞増殖率を示すことができ、半定量的な解析が可能になることが期待される。

4. 虚血治療用 MSC 培養プロトコルの確定

【虚血治療用 MSC の仮仕様と培養方法の確定】

仮設定した MSC の培養工程を図 3-17 に示す。培養工程に関する詳細な手順書および記録紙を作成し、社内文書として登録した（骨髄由来間葉系幹細胞作製手順書：PD-103SP-P1-001）。さらに検査に関する手順書についても作成し、社内文書として登録した（特定細胞加工物（骨髄由来間葉系幹細胞 MSC01）試験検査手順書：QC-103SP-Q1-001）。当該培養工程や文書は暫定的に設定したため、文書の更新等の見直しは随時行う。培養工程の中で、大きな変更を伴う場合には、再度、特定認定再生医療等委員会へ審議を依頼する。

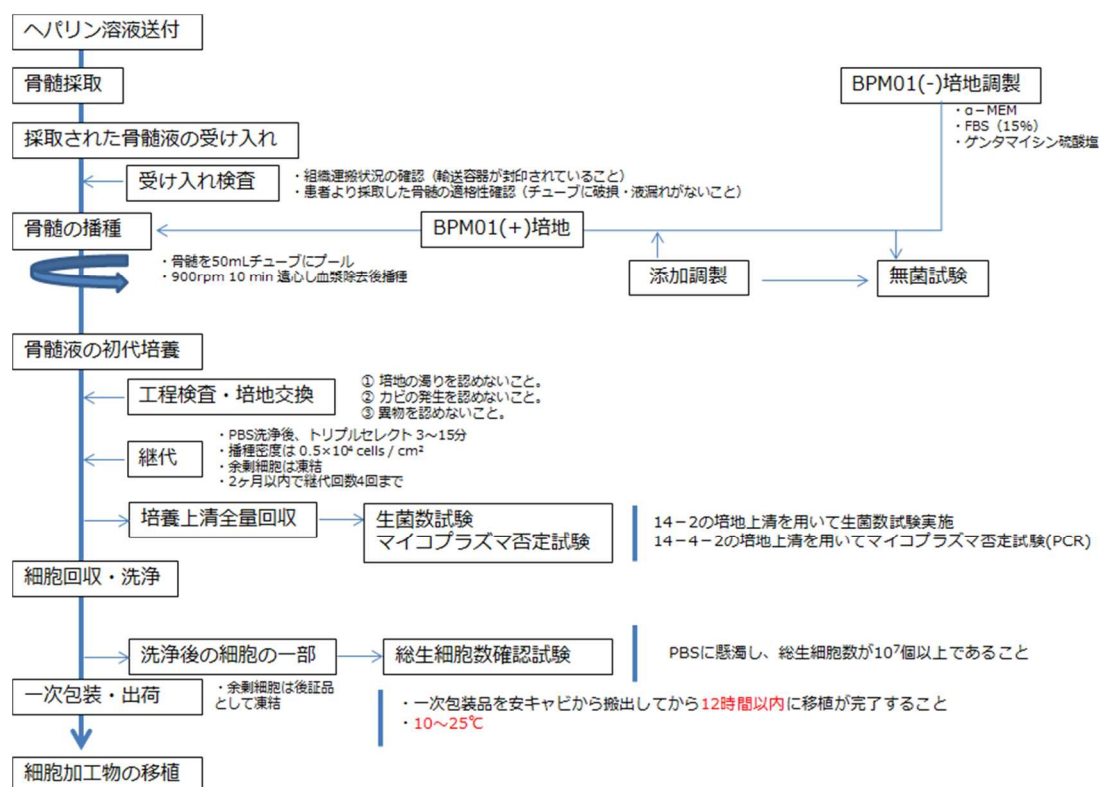


図 3-17 MSC 培養工程

骨髄由来 MSC の製造開始に先立ち、J-TEC の細胞培養加工施設において、プロセスバリデーションの一部として、骨髄の受け入れから一次包装までを実施し、規格に適合した MSC が製造可能であることを確認した。本バリデーションでは、海外から輸入した 1 症例の骨髄 10 mL を培養し、10⁸ 個の細胞数が得られるまで継代を重ねた。骨髄受け入れから工程検査、取扱い検査を行い、すべての規格に適合した MSC の作製ができた場合、骨髄受け入れから一次包装までの設計した製造工程が妥当であると判断した。

洗浄に用いる PBS を検体として、エンドトキシン試験を実施し、エンドトキシン濃度を確認した。さらに一次包装後の MSC について、無菌試験を実施し、生菌数試験用サンプル取得から

一次包装後までの MSC に対する無菌性を確認した（表 3-1）。本試験と並行して、MSC の保存安定性試験と振動に対する細胞への影響を確認した。振動による影響を評価するため、輸送容器内に細胞懸濁液を梱包した後、一方は大隈病院へ搬送し、他方は室内に保管した。保存 12 時間後の生細胞率の結果を示した（図 3-18）。

表 3-1 受け入れ検査、工程検査、取扱い検査、参考試験の結果

評価項目		評価基準	測定値	判定
受け入れ検査	組織運搬状況の確認	適合であること	—	適合
工程検査	MSC の目視による外觀観察		—	適合
取扱い検査	生菌数試験		—	適合
	マイコプラズマ否定試験		—	適合
	生細胞数確認試験		121×10 ⁶ 個	適合
参考試験	MSC の顕微鏡による細胞形態観察		—	適合
	エンドトキシン試験		0.015EU/mL 未満	適合
	生細胞率確認試験		89.4%	適合
	無菌試験		—	適合

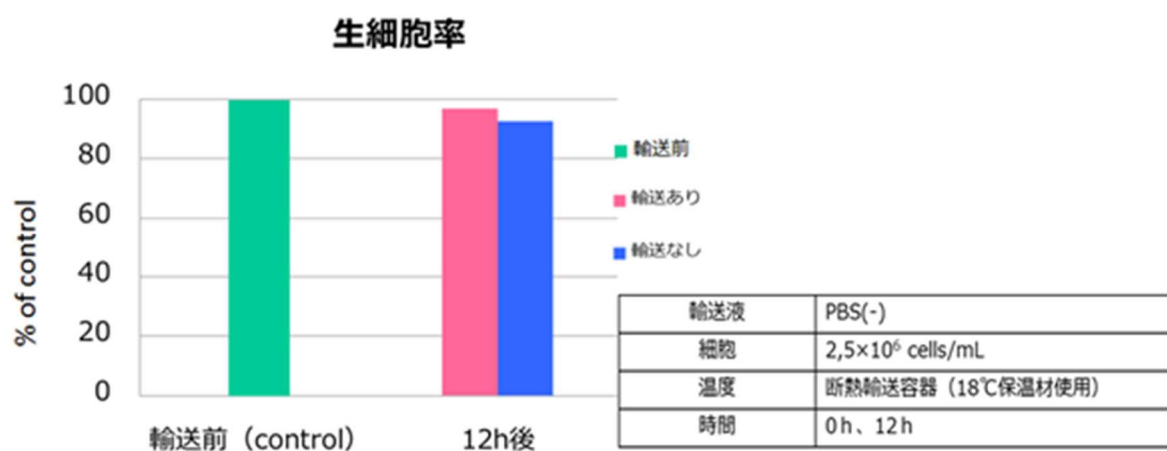


図 3-18 輸送前をコントロールとした輸送の有無に対する MSC 生細胞率への影響

プロセスバリデーションの一部として、骨髓の受け入れから一次包装を実施し、規格に適合した MSC が製造可能であることを確認した。標準書の製造法で製造した MSC が、設定したすべての規格に適合することを確認した。以上のことから、本バリデーションを通じて MSC の製造法の妥当性が確認できた。

実製造を鑑みて、標準書に記載した製造工程について、詳細部分におけるさらなる最適化を

製造担当部署とともに実施した。元製造法においては、移植日まで継代を重ね、余剰の細胞を凍結保管することを想定していたが、継代を重ねることによる細胞へのダメージや移植日にあわせた細胞増殖スピードの予測など、細胞の特性が症例ごとに異なる自家細胞特有の問題に直面することが示唆される。凍結細胞を2回目の移植に用いることを想定した標準書を設定していたため、初代培養時に回収した細胞をすべて凍結し、一部の凍結細胞を解凍して増殖を確認した後（試し培養）、移植日にあわせて本培養を実施する系を立ち上げた（図 3-19）。今後も MSC の製造に関して随時検討を実施し、移植時の状況にあわせた解凍及び培養方法を洗練していく。

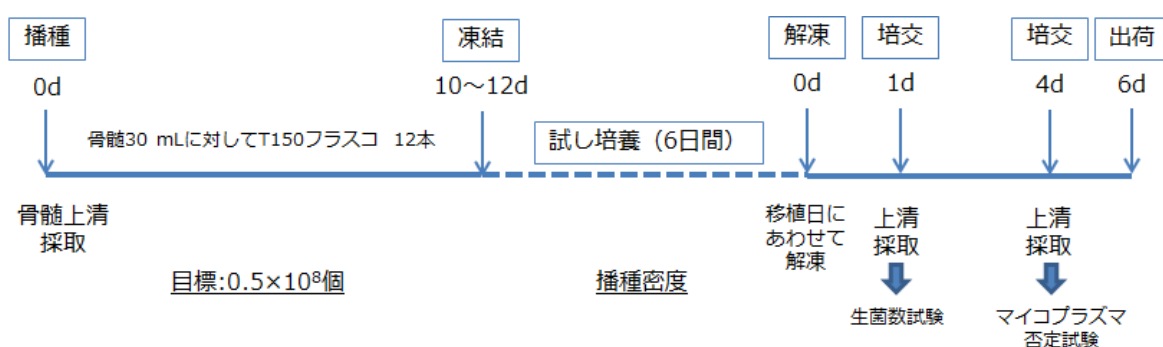


図 3-19 試し培養を含む虚血治療用 MSC の製造スケジュール

5. 再生医療新法下における自家骨髄由来培養 MSC の移植

【MSC の受託培養体制整備】

下肢虚血患者への骨髄由来培養 MSC の臨床応用は、ヒトの疾病の治療等を目的として、患者自身の細胞を培養した幹細胞を用いる医療であることから、再生医療新法における第二種再生医療等に該当する。したがって、本臨床研究の開始前に、再生医療新法に基づく手続きが必要であった。

大隈病院（再生医療等提供機関）では、法施行以前より、「ヒト幹指針を用いる臨床研究に関する指針」に基づき、産業技術総合研究所で骨髄由来 MSC を製造し、大隈病院等で移植する「重症末梢動脈疾患患者に対する自家間葉系幹細胞を用いた血管再生：厚生労働省発医政 1125 第 9 号」（2013 年 11 月 25 日承認）を行っていた。今回、その研究成果に基づき、本臨床研究「重症末梢動脈疾患に対する骨髄由来間葉系幹細胞を用いた血管再生」に関する再生医療等提供計画を作成し、特定認定再生医療等委員会の審査を受けたのち、近畿厚生局（所轄の地方厚生局）に提出した。実際の法対応の流れは表 3-2 のとおりである。

表 3-2 本臨床研究実施に向けた工程表

月	4		5		6		7		8		9		10		11	
技術移管																
提供計画作成																
委員会提出					6											
委員会							29									
委員会後対応																
意見書等受領											12					
提供計画の提出													12			
厚生局の受理														17		
製造委託準備																

なお、本計画における J-TEC 細胞培養加工施設（施設番号：FA4150005）の位置づけは、自家骨髄由来培養 MSC の製造委託先である。製造委託先である J-TEC に対し、自家骨髄由来培養 MSC の技術移管を行い、特定細胞加工物標準書等の文書を含め、再生医療等安全性確保法に基づく製造・品質管理に係る体制を整備した（図 3-20）。

これらの対応を含む本計画について、特定認定再生医療等委員会の審査を受けた。委員会では、本計画が再生医療等安全性確保法の基準に適合することを前提に、複数の点に関する可及的変更を推奨又は要求された。これらの意見に対応し、修正後の書類を特定認定再生医療等委員会に提出した。その後、認定再生医療等委員会意見書等を受領し、提供計画一式を近畿厚生局に提出し、受理され、計画番号を付与された。これにより本再生医療等を開始するための再生医療新法上の対応を完了し、法律上は臨床研究を開始できる状況となった。

重症末梢動脈疾患に対する骨髓由来間葉系幹細胞を用いた血管再生

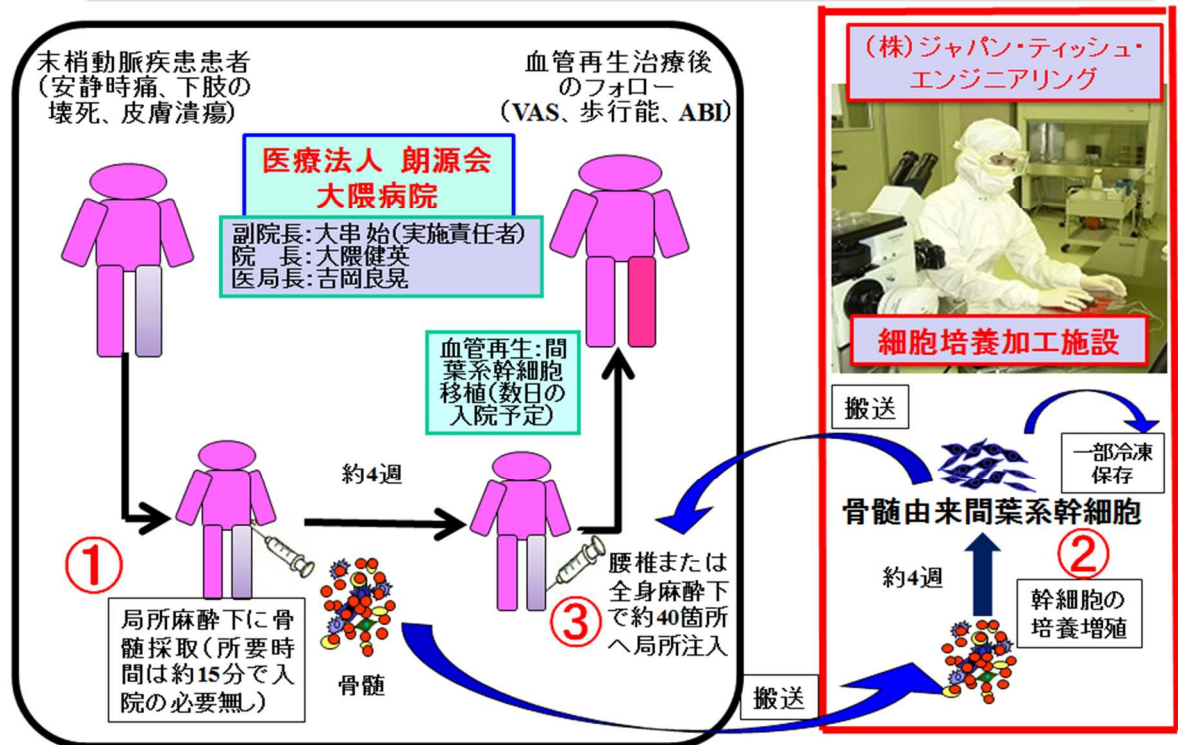


図 3-20 本臨床研究のスキーム

【MSC の臨床応用】

本臨床研究の対象として設定したクライテリアを満たした患者から同意を得て、骨髄を採取した。採取した骨髄はあらかじめ調製したヘパリン溶液と混合し、輸送ボックスを用いて J-TEC へ搬送した。J-TEC 細胞加工施設内にて骨髄液をフラスコへ播種し、ウシ血清含有培地にて培養を開始した。

培養10日目～顕微鏡観察。11日目で回収・凍結。

- ・ フラスコ底面の約半分ほどが目視で白く見える。
- ・ 前2例よりも疎密の差が少なく、全体的に早期に旺盛な細胞増殖を確認。

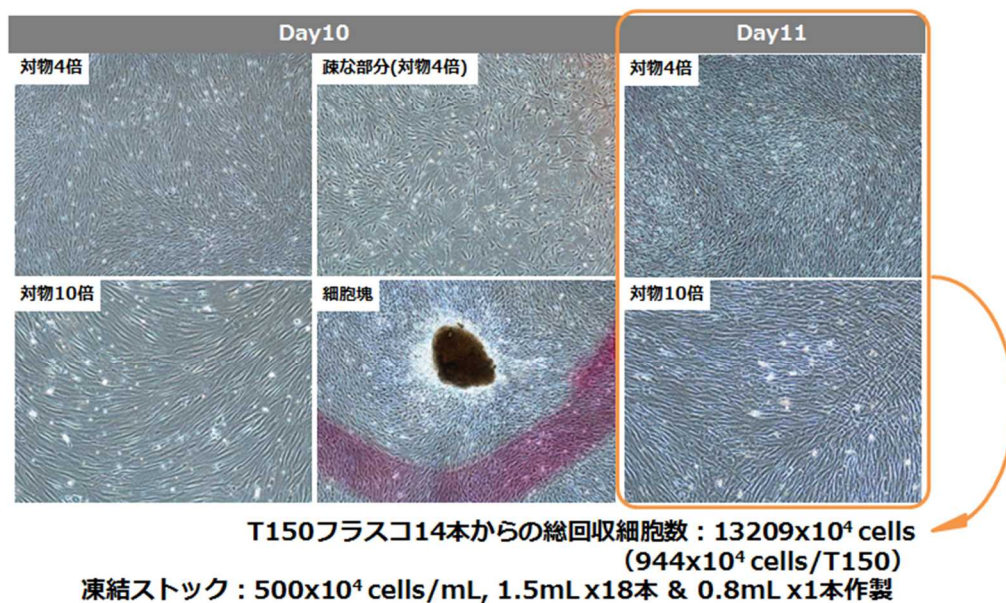


図 3-21 虚血治療用 MSC 初代培養結果

2~3 日に 1 度の間隔で培地交換を実施した。培養フラスコ全面に紡錘形の細胞集団がコロニー状に点在し、培養 10 日目にはお互いのコロニーが接している様子が確認された。培養 11 日目にトリプシン処理により細胞回収をしたところ、 1.3×10^8 個の細胞を回収した。得られた細胞を全てストックとして凍結した (図 3-21)。

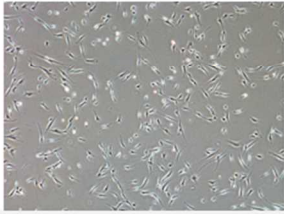
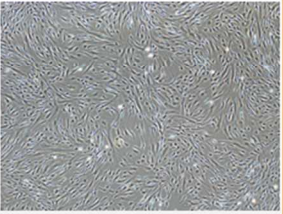
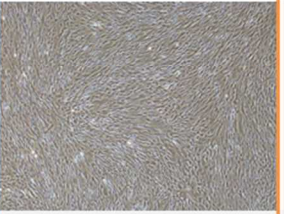
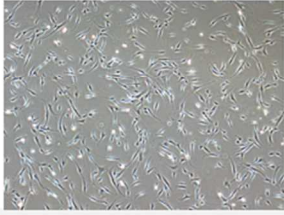
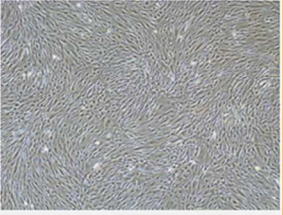
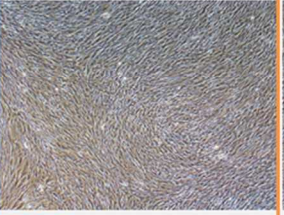
【方法】

P1細胞を解凍、**0.35x** または **0.67x** 10^4 cells/cm² の播種密度でT150フラスコへ播種。

1,4日目：観察/培地交換

6日目：細胞剥離・回収、カウント

【結果】

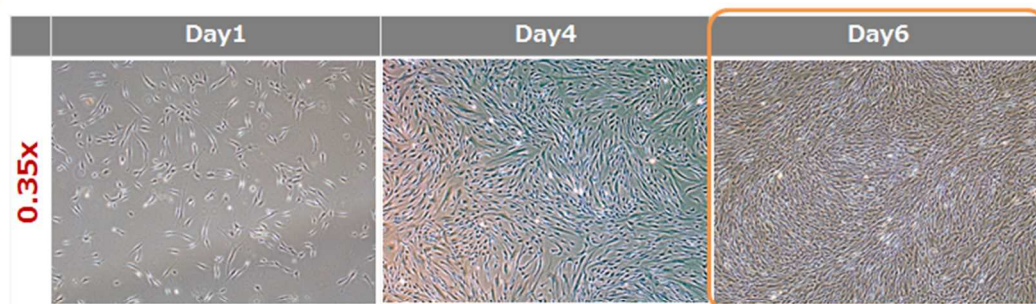
	Day1	Day4	Day6	
0.35x				・細胞1つ1つが小さく、増殖が早かった。 ←0.35xでも6dでコンフルエント、一部重層化している箇所も見られた。
			900	
0.66x				↙0.66xは4dでコンフルエント状態、6dでは至る所で重層化して増殖している箇所が見られた。
			1028	
対物4倍				
回収細胞数：x10 ⁴ cells/T150				

→**0.35x10⁴ cells/cm², 6日間培養に決定**

図 3-22 虚血治療用 MSC の試し培養結果

試し培養では 2 種類の播種密度で培養を実施した。すなわち、 0.35×10^4 個/cm² 及び 0.66×10^4 個/cm² の播種密度でフラスコへ播種し、6 日後に細胞を剥離した。 0.66×10^4 個/cm² の播種密度で播種したフラスコは 6 日間の培養で重層化している部分が至るところで確認されたため、懸濁液状で出荷・輸送する際に細胞分散が不十分となる可能性が示唆された。これらの結果から、本培養では 0.35×10^4 個/cm² の播種密度で 6 日間培養するプロトコルを採用することとした（図 3-22）。

【結果】



T150フラスコ4本から細胞を回収

洗浄① : DPBS 40 mLで懸濁、遠心 ⇒ 2649×10^4 cells (662×10^4 cells/T150)

洗浄② : DPBS 50 mLに懸濁、遠心

懸濁 : DPBS 5 mLに懸濁 ⇒ **1468×10^4 cells** > 1×10^7 cells : 出荷規格適合

濃度調整 : DPBS添加により、 2.5×10^6 cells/mL

→品管用サンプル (1mL) 分取

→出荷

図 3-23 虚血治療用 MSC 培養結果 (1 回目)

1×10^7 個以上の細胞を出荷することを目的として、前述の試し培養の結果から T150 フラスコ 4 本に 0.35×10^4 個/cm² の播種密度で凍結細胞を解凍して播種した。解凍日は移植日から逆算して適切に設定した。培養 1 日後及び 4 日後に培地交換を実施し、その培養上清を用いてそれぞれ生菌数試験及びマイコプラズマ否定試験に供した。培養 6 日目に細胞を回収し、PBS による洗浄を行った後、出荷規格に適合することを確認し、出荷した (図 3-23)。

【方法】

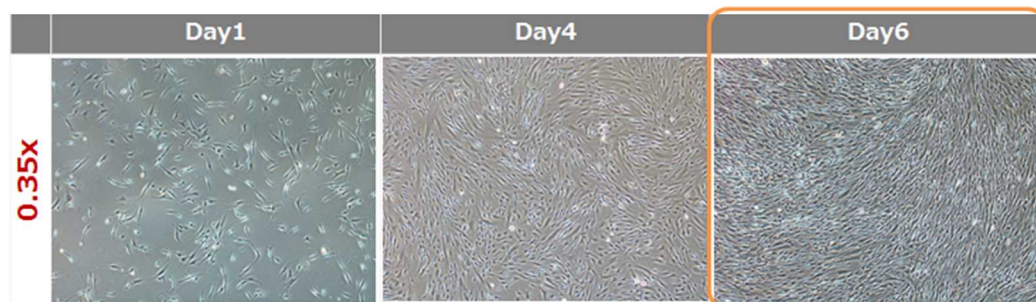
P1凍結ストック2本を解凍、 0.35×10^4 cells/cm²の播種密度でT150フラスコ12本へ播種。

1日目 : 観察/サンプリング・培地交換（異物除去（細胞塊）実施） → 生菌数試験

4日目 : 観察/サンプリング・培地交換 → マイコプラズマ否定試験

6日目 : 1次包装・出荷

【結果】



T150フラスコ12本から細胞を回収

洗浄① : DPBS 40 mLで懸濁、遠心 ⇒ 6140×10^4 cells (512×10^4 cells/T150)

洗浄② : DPBS 50 mLに懸濁、遠心

懸濁 : DPBS 5 mLに懸濁 ⇒ **5105×10^4 cells** > 1×10^7 cells : 出荷規格適合

濃度調整 : 懸濁液分取・DPBS添加により、 2.5×10^6 cells/mLに調整。

→品管用サンプル (1mL) 分取

→出荷 **3.0×10^7 cells (12mL/tube)**

図 3-24 虚血治療用 MSC 培養結果（2 回目）

2 回目の移植予定に伴い、前述の試し培養及び 1 回目出荷の細胞培養結果を参考としながら、目的細胞数を得ることが可能となるように細胞解凍作業を実施した。1 回目出荷と同様、2 回目出荷においても洗浄後の細胞数が極端に減少する可能性を踏まえ、洗浄後の細胞数が出荷規格を満たすよう、より多くの細胞数を得られるようなプロトコルにて細胞解凍作業を行った。生菌数試験及びマイコプラズマ否定試験を実施して出荷細胞数と共に出荷規格を満たすことを確認し、細胞加工物を出荷した（図 3-24）。

血管内狭窄を伴う下肢潰瘍患者に対して、本臨床研究の適用範囲に該当する可能性について検査を実施し、エントリー可能であることを確認した。

本患者は以前に両腸骨動脈にすでにステントを挿入され、大隈病院受診時の 2017 年 6 月には左足関節外側部（外果）に直径約 5.5 cm の円形の皮膚壊死（潰瘍）を認める Fontaine 分類 IV の患者であり、糖尿病の合併症もあった。骨髓を採取し、J-TEC にて MSC を培養し、2 回に分けて大隈病院にて潰瘍部位とその周囲皮下、筋肉組織内に移植した。

移植後 3 か月後において移植部位の潰瘍は直径約 2.5 cm と縮小傾向にあり、MSC 移植がおこなわれた左足外果の皮膚潰瘍部位は良好な再生過程を示したことが示唆された。

6. 臨床応用可能な同種脂肪由来培養 MSC バンク構築

【倫理委員会（東京大学・J-TEC）の審議】

臨床応用可能な同種脂肪由来培養 MSC バンクの構築にあたって、J-TEC へ患者由来脂肪組織を提供することを目的とした計画の審議を求め、東京大学医学部倫理委員会へ書類一式を提出した（題名：臨床応用目的としたヒト脂肪由来組織幹細胞の特性評価と培養法の確立に関する多施設共同前向き観察研究）。当該計画についての承認が得られた後、患者脂肪組織由来細胞の臨床応用を目的とした計画を東京大学医学部特定臨床研究倫理委員会に提出する。

一方、「運動・支持組織におけるヒト組織幹細胞・成熟細胞を用いた再生医学の応用」計画に対しては東京大学医学部倫理委員会の審議が終了しているため、計画の範囲内で患者由来脂肪組織を研究に活用することに対して、当該倫理委員会から承認を得ている。

商業利用可能な同種セルバンク構築をめざし、東京大学附属病院倫理委員会との協議を開始した。すなわち、本商業用の細胞ストックの用途により、疫学・観察研究および特定臨床研究のいずれかになるため、2017 年 5 月より東京大学内の研究倫理支援室との相談を開始した。

東京大学倫理支援室においても、この疫学・観察研究および特定臨床研究の線引きについての考え方の原則について、倫理支援室においても議論が継続中であった。2017 年 9 月に研究倫理支援室との相談を受けて振り分けチェックフローの申請を行い、疫学・観察研究として倫理申請を実施した。医学部研究倫理支援室による数回のフォーマットチェックならびに臨床研究支援センターおよび病院研究支援チームとの相談を経て、2017 年 11 月に医学部研究倫理支援室に申請書が受理され個別審査を受けることが決定した。その後、2017 年 12 月に個別審査を受け、2018 年 1 月に本倫理申請は承認された。

【同種脂肪由来培養 MSC セルストック作製】

セルバンク構築に向けた脂肪由来幹細胞の増殖および細胞形態を確認するために、まずマウス由来脂肪組織を用いて培養を実施した。6 週齢のマウス鼠蹊部より脂肪組織を採取し、コラゲナーゼにより処理した。セルストレーナーを用いて残渣を取り除いた後、得られた細胞をディッシュに播種し、培養した。細胞の形態を確認しながら継代を実施し、細胞の倍加時間を算出した（図 3-25）。

初期検討

マウス脂肪由来幹細胞の培養

1. 鼠径部脂肪組織を採取 C57/Bl 6J (6 wks), 0.5–0.7g / 1匹
2. 0.1%コラゲナーゼ溶液で処理 60分/37°C
3. 細胞単離 100 μ m nylon mesh cell strainer
4. 細胞培養
ポリスチレンディッシュ 50万細胞/10cm dish
培養液 DMEM/F12 + 10% FBS

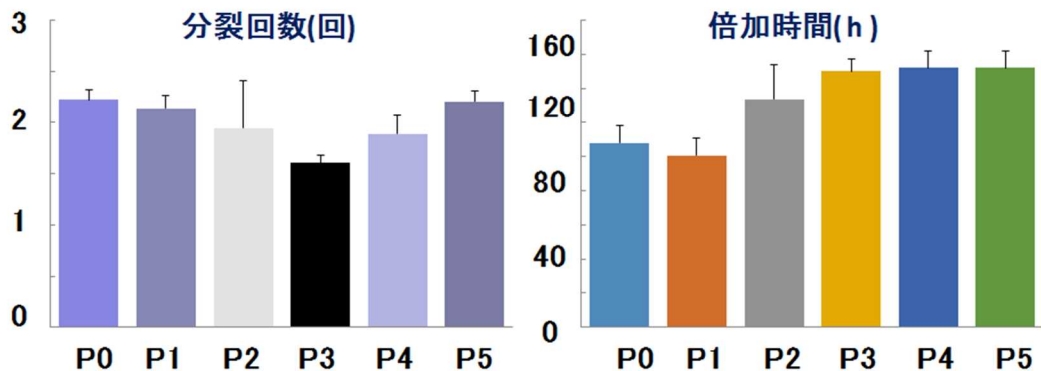


図 3-25 マウス脂肪由来幹細胞の培養概要（初期検討）

マウス脂肪由来幹細胞を培養した結果、様々な形態の細胞が確認された。細胞の形態から、継代を重ねることによりクールドな細胞集団が均一化する傾向が示唆された。5 継代までは増殖能を維持する可能性が示唆された（図 3-26、図 3-27）。継代とともに倍加時間が延長する可能性が示唆された（図 3-25）。

マウスASC (P0)

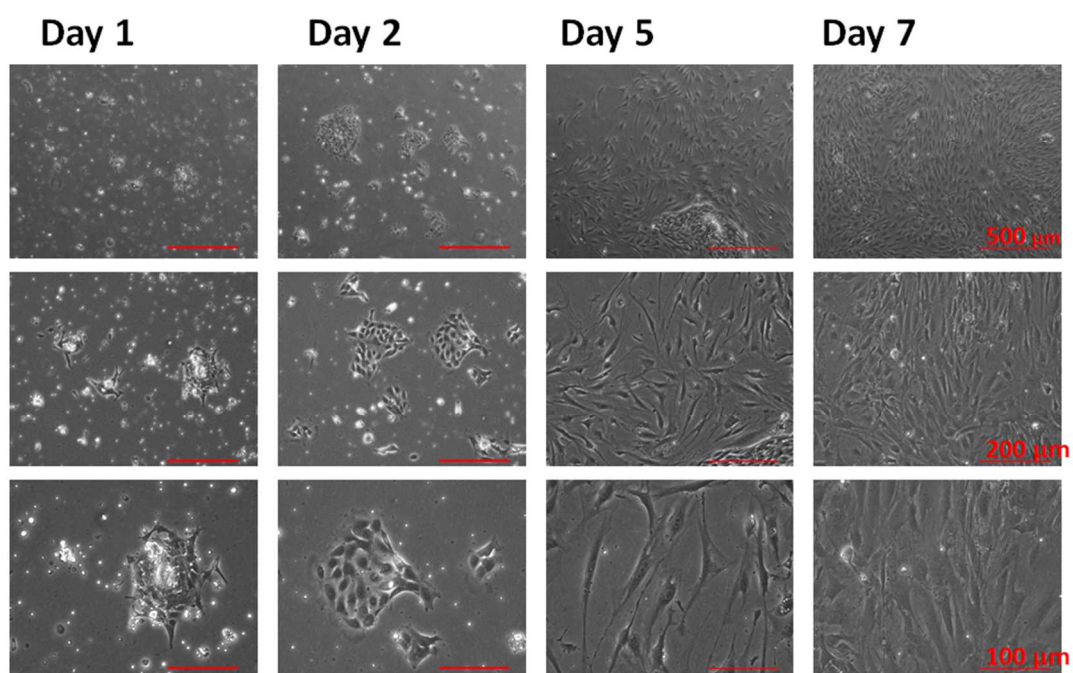


図 3-26 マウス脂肪由来幹細胞 (ASC) の形態 (P0)

マウスASC (P1-P4)

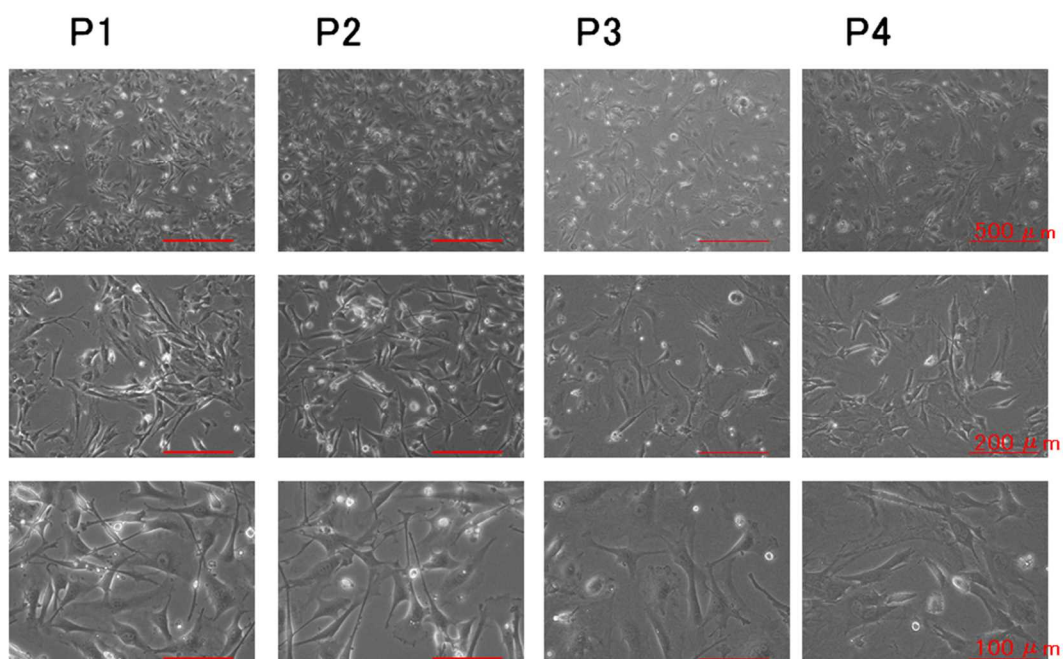


図 3-27 マウス脂肪由来幹細胞 (ASC) の形態 (P1-P4)

さらにヒト脂肪由来幹細胞の培養についても検討を実施した。ヒト脂肪組織の採取に関しては、東京大学医学部倫理委員会にて承認済である計画に基づいて実施した（題名：運動・支持組織におけるヒト組織幹細胞・成熟細胞を用いた再生医学の応用）。ヒト脂肪組織は 70 歳男性左大腿より採取し、マウス脂肪組織と同様の方法で細胞の形態を確認しながら培養を開始した（図 3-28）。また将来的な J-TEC への技術導入を想定して、実地での細胞培養指導も行った。

ヒト脂肪由来幹細胞の培養

70歳 男性
右下歯肉Ca
採皮部(左側大腿)

1. 皮下脂肪組織の細切 細切後重量 2.5g
2. 細胞単離 (0.1%コラゲナーゼ溶液、60分/37°C)
3. 細胞回収 (細胞数 8.0×10^5 cells・細胞生存率 87.1%)
4. 細胞培養(P0)
播種密度: 80万細胞 / 10cmポリスチレンディッシュ 1枚
培養液: DMEM/F-12 Ham + 10%ヒト血清・培地交換は週2回
5. 細胞継代 (細胞数 1.0×10^6 cells・細胞生存率 85%)
6. 細胞培養(P1)

図 3-28 ヒト脂肪由来幹細胞の培養概要

マウス脂肪由来幹細胞と同様、当該ヒト細胞は増殖し、継代後も増殖能は維持した（図 3-29）。

ヒト脂肪由来幹細胞の培養

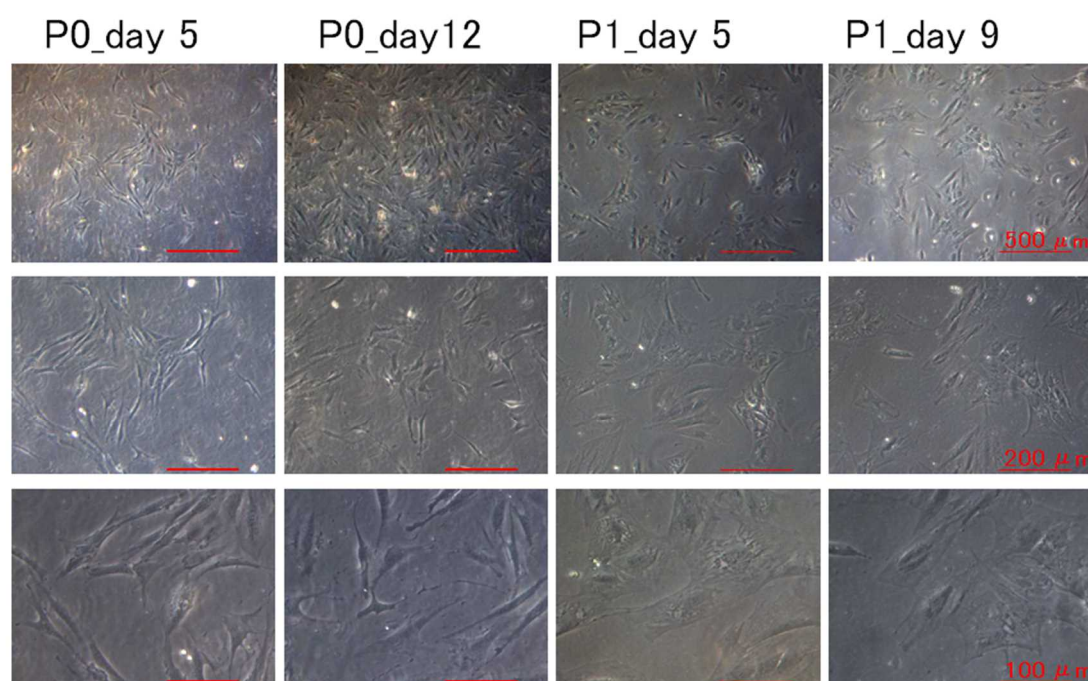


図 3-29 ヒト脂肪由来幹細胞の培養

【セルバンクの安全性評価】

東京医科歯科大学（TMDU）にて実施するウイルス検査について、信頼性基準を満たすための体制整備を実施した。具体的には、ウイルス検査を「申請資料の信頼性の基準」に基づいて実施するにあたり、その方法について J-TEC と協議した。

検査に係る文書（機器操作手順書、機器使用記録、定期保守点検記録、試験操作手順書等）を整備して運用を開始した。また、検査担当者への信頼性基準に関する研修を実施し、検体を受け入れる体制整備を完了した。

製品の安全性試験としての微生物学的試験において、合理的手法の選択について提案した。具体的には、TMDU の特許技術を使用した MycoFinder（日水製薬）を用いたマイコプラズマ否定試験（NAT）の施設バリデーションの支援を実施した。また、TMDU で開発した細菌・真菌の迅速検査法の情報を J-TEC に提供し、迅速無菌検査法の選択及び技術導入への支援を実施した。

J-TEC にて実施中であるマイコプラズマ否定試験（NAT）の施設バリデーションにおいて、陰性対照（DNA 抽出工程の妥当性確認用）で、原因不明のコンタミネーションが頻発した。コンタミネーションの原因追求のため、当該検体のシーケンス解析を実施した（表 3-3）。その結果、5 検体中 4 検体で *Acholeplasma laidlawii* が確認された。

表 3-3 各陽性検体のシーケンス解析結果

検体			シーケンス結果
①	PBS	DNA 抽出陰性対照	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
②	細胞	DNA 抽出陰性対照	<i>Acholeplasma laidlawii</i> ヒトゲノム
③	PBS	DNA 抽出陰性対照	Mycoplasma 属
④	注射用水	DNA 抽出陰性対照	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
⑤	注射用水	DNA 抽出陰性対照	<i>Acholeplasma laidlawii</i>

マイコプラズマ混入工程を特定するために、次の試験を実施した。最初に、MycoFinder キットのコンタミネーションの有無を確認した。大塚蒸留水（DNA 抽出工程は実施しない）を検体として、製造ロットの異なる 2 キットを用いて PCR を実施した（図 3-30）。その結果、すべて陰性であり、キットのコンタミネーションは否定された。

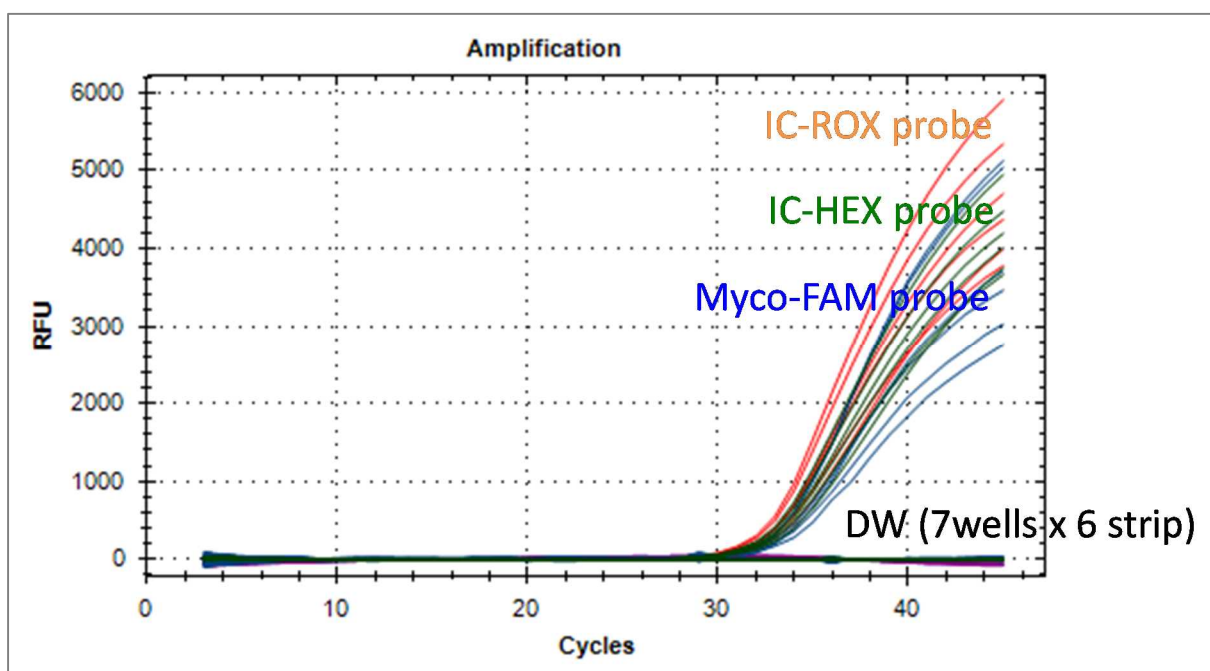


図 3-30 PCR 結果

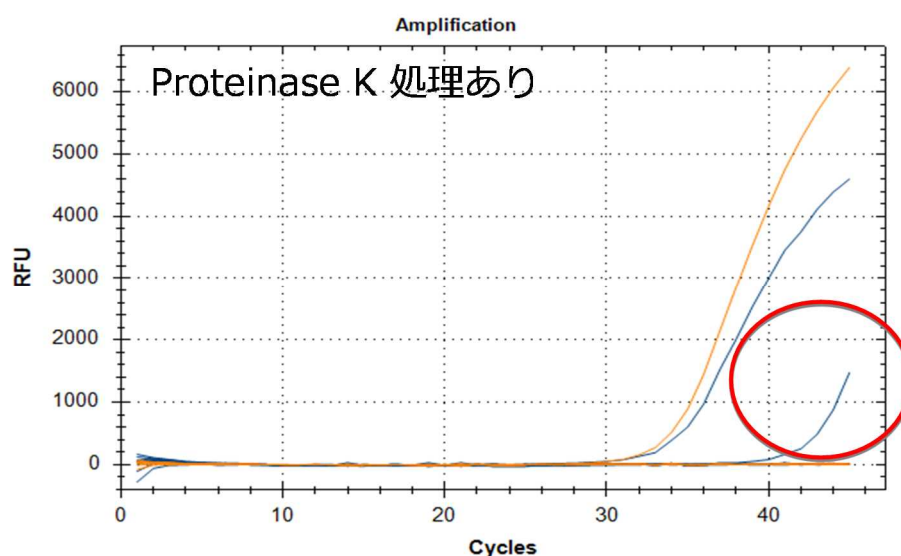
次に DNA 抽出キット（キアゲン）のコンタミネーションの有無を確認した。具体的には、大

塚蒸留水または PBS をサンプルとして、開封済みまたは未開封品の DNA 抽出キットを用いて、J-TEC、TMDU、または日本テクノサービス株式会社（NTS：MycoFinder を製造）にて、DNA 抽出及びマイコプラズマ否定試験（NAT）を実施した。その結果、実施した検体すべてにおいて陽性を確認した（表 3-4）。これにより、DNA 抽出キットがコンタミネーションの原因であると判明した。

表 3-4 マイコプラズマ否定試験（NAT）及びシーケンス解析結果

DNA 抽出キット Lot		試験場所	サンプル	陽性率	シーケンス結果
151054010	開封済み	J-TEC	大塚蒸留水	1/3	<i>A.laidlawii</i>
154013342	開封済み	J-TEC	大塚蒸留水	3/3	<i>A.laidlawii</i>
154011219	開封済み	J-TEC	DPBS	5/9	—
	開封済み	TMDU	DPBS	1/3	<i>A.laidlawii</i>
154018407	未開封	TMDU	DPBS	1/3	クローニングできず
154029760	未開封	TMDU	大塚蒸留水	1/14	<i>M.faucium</i>
154030984	未開封	NTS	大塚蒸留水	1/14	<i>A.laidlawii</i>

DNA 抽出キットの構成品のうち、Proteinase K は微生物を用いて製造していることから、まず始めに Proteinase K のマイコプラズマのコンタミネーションの有無について確認した。その結果、DNA 抽出工程における Proteinase K 処理の有無にかかわらず、マイコプラズマ陽性となった（図 3-31）。コンタミネーションの原因は Proteinase K ではないと判断した。Proteinase K 以外の DNA 抽出キット構成成分試薬については、すべてコンタミネーションのないことを確認した。



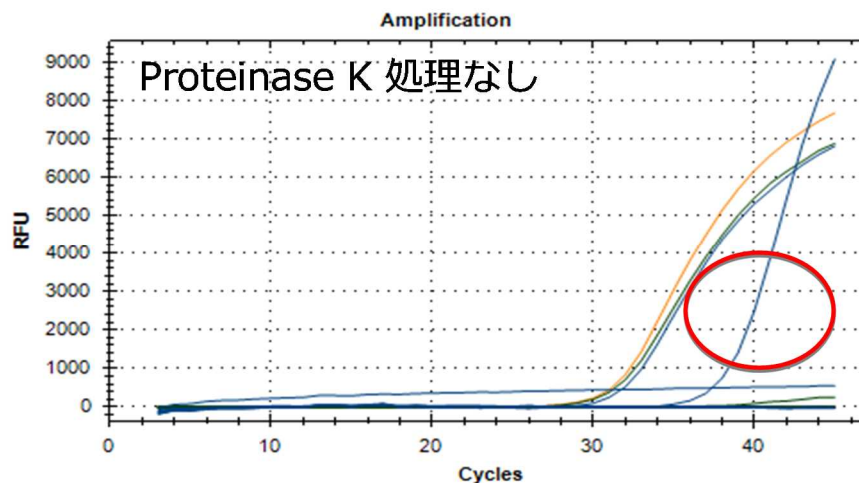


図 3-31 Proteinase K のコンタミネーション確認
赤丸：大塚蒸留水を検体とし、Proteinase K の影響を確認したもの。
その他は陽性対照及び陰性対照。

次に、DNA 抽出キットの構成品のうち、DNA の抽出・濃縮に使用するスピнкаラムのコンタミネーションについて確認した。マイコプラズマのコンタミネーションが否定されている AE buffer (DNA 抽出キット構成品) 用いて、スピнкаラム処理の有無による各検体のマイコプラズマ否定試験 (NAT) を実施した。その結果、スピнкаラム処理を実施した検体のみマイコプラズマ陽性となった。コンタミネーションの原因は DNA 抽出キットの構成品であるスピнкаラムであることが判明した (図 3-32)。現在、その他 DNA 抽出キットについて、マイコプラズマのコンタミネーションリスク、DNA 抽出効率等を確認中である。

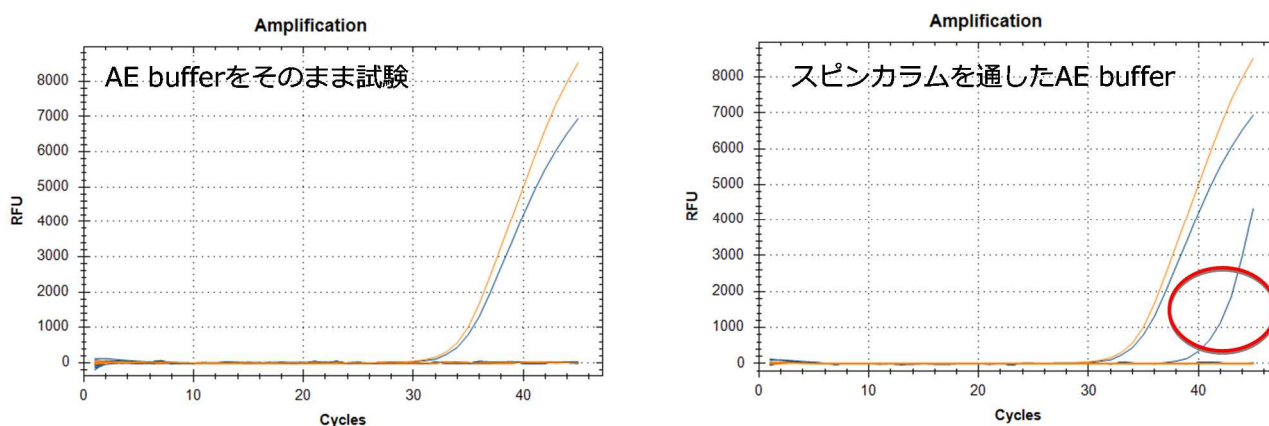


図 3-32 スピнкаラムのコンタミネーション確認
赤丸：AE buffer を検体とし、スピнкаラムの影響を確認したもの。
その他は陽性対照及び陰性対照。

再生医療等製品はその特長により、製品の無菌試験を迅速に実施する必要がある。そこで、TMDU で開発した細菌・真菌の迅速検査法の情報を J-TEC に提供し、迅速無菌検査法の選択及び技術導入への支援を実施した。

迅速に結果を得るために、PCR 法による迅速検査が有望であるが、一般的な PCR 法では生菌と死菌の区別ができない。そこで、細菌・真菌を死滅処理した後、少なくとも 48 時間で検出限界以下となることが確認された rRNA をターゲットとする（図 3-33）。rRNA 遺伝子領域の共通配列を利用して、菌の検出は検出可能であり、また、rRNA は細菌・真菌ともに 1 個あたり 10^3 コピー以上あるため、高感度の検出を期待できる。

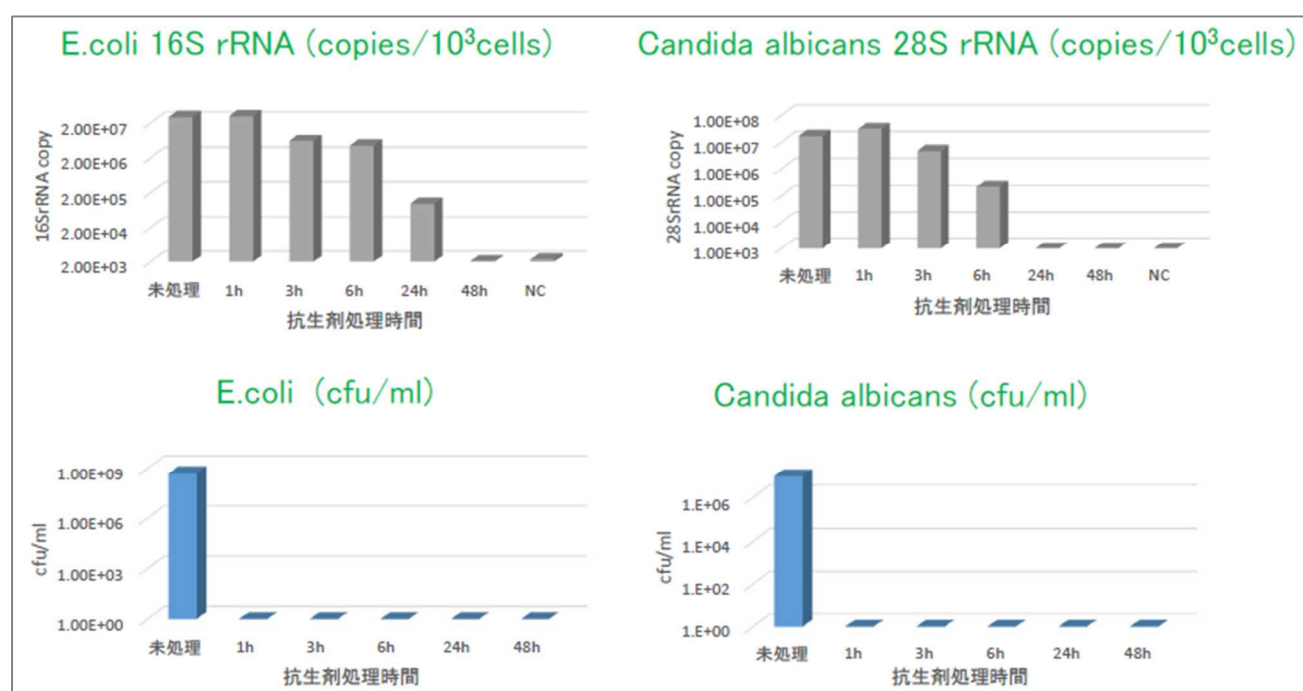


図 3-33 細菌・真菌の抗生剤殺菌後の rRNA 残存

さらに図 3-34 に示すように、rRNA 全体の 25%を占める pre-rRNA をターゲットとしてプライマー、プローブをデザインし、当該検査法の確立と、技術導出準備を開始した。

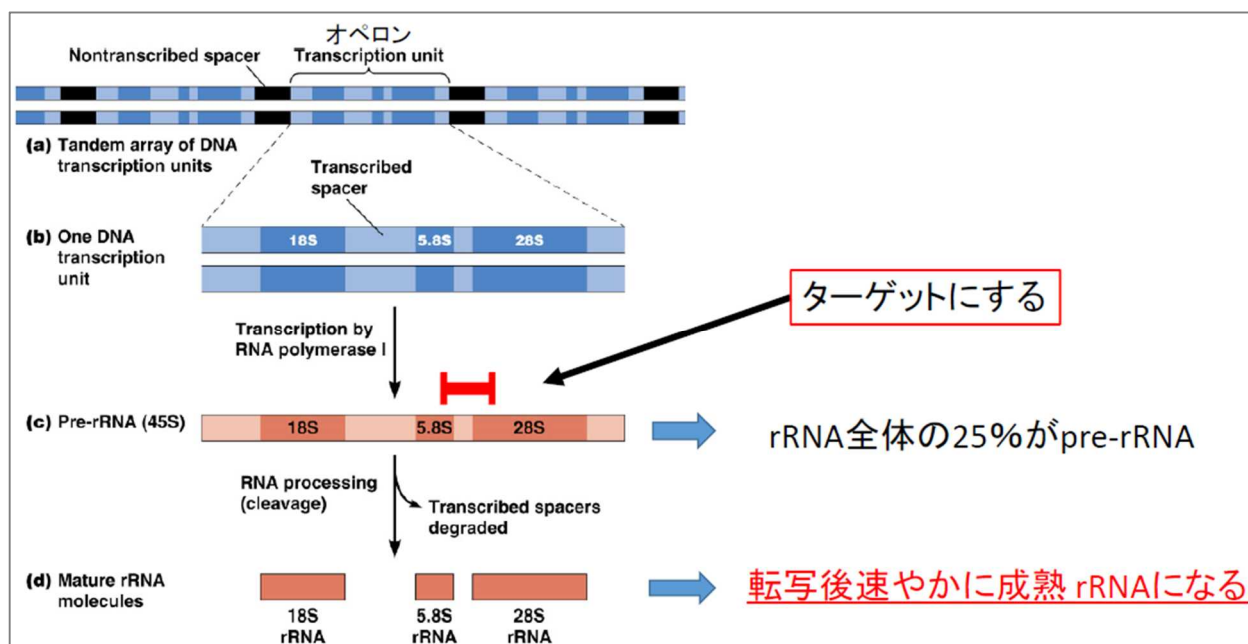


図 3-34 真菌 rRNA のサイクル例

マイコプラズマ否定試験（NAT）で使用する MycoFinder の性能を評価した。独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（NBRC）もしくは American Type Culture Collection（ATCC）から入手後バンク化し、凍結解凍後の菌数（CFU）及びゲノムコピー（GC）数を測定したマイコプラズマ菌株を使用した（表 3-5）。

表 3-5 使用したマイコプラズマ菌株

マイコプラズマ菌種
<i>Acholeplasma laidlawii</i> NBRC14400
<i>Mycoplasma arginini</i> ATCC23838
<i>Mycoplasma fermentans</i> NBRC14854
<i>Mycoplasma hyorhinis</i> NBRC14858
<i>Mycoplasma orale</i> NBRC14477
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> NBRC14401
<i>Mycoplasma salivarium</i> NBRC14478

広範囲のマイコプラズマに特異的な塩基配列でプライマーとプローブが設計されていること、マイコプラズマ以外の生物種で交差反応性がないことを開発元のデータ及び NAT キット製造業者のデータにより確認した。細菌 25 種、真菌 8 種、哺乳動物細胞 3 種のゲノム DNA について交差反応性を評価しており、マイコプラズマ以外の生物種で交差反応性がないことを確認した。

実証評価として、7 菌種のマイコプラズマ菌株で適切な検出感度を示すことを確認した。マイ

コプラズマを 10 CFU/mL となるよう添加した試料の測定結果について、合計 24 データで検出感度を評価した。7 菌種のマイコプラズマ全てにおいて 24 データ中 23 データ以上で陽性となったため、10 CFU/mL のマイコプラズマを 95%以上の確率で検出可能であると判断し、適合と判定した。

これらの結果から、MycoFinder をマイコプラズマ否定試験（NAT）で使用することは妥当であると判断した。

4. まとめ

本研究課題において、われわれは骨髄由来 MSC の詳細な解析を通じて、間葉系幹細胞集団を構成する様々な細胞をクローンとして認識し、そのクローン毎の特性を解析した。またそれらの非臨床における機能を客観的に評価することを目的として、健常マウスへの移植とその後のマウス由来新生血管内皮細胞への影響を半定量化することに成功した。これらの評価手法により、血管新生を目的とした移植細胞としての適格性を判断するための評価軸を手に入れた。

一方、再生医療新法下における自家培養 MSC の早期臨床応用を目的として、特定認定再生医療等委員会の議論を経て、自家骨髄由来 MSC の下肢虚血患者への応用を実施した。当該患者から骨髄を採取し、得られた骨髄を J-TEC にて適切に播種、培養後、得られた細胞をすべて凍結保管し、試し培養を実施した。試し培養にて得られた情報を元に、播種密度、播種細胞数を決定し、移植日から逆算した適切な日時に解凍・播種作業を実施した。同一患者の潰瘍部位へ複数回移植を経験したが、有害事象は確認されず、潰瘍サイズの縮小を認めた。

臨床応用可能な同種脂肪由来培養 MSC バンクの構築にあたり、まずは研究用脂肪組織を J-TEC へ提供することに対し、東京大学医学部倫理委員会の承認を得た。東京大学において、ヒト脂肪由来 MSC の培養について検討を開始し、マウス脂肪由来 MSC と同様ヒト脂肪由来 MSC は増殖すること、継代後も増殖能を維持していることを確認している。臨床応用可能な同種脂肪由来培養 MSC バンクの構築にあたり、まずは研究用脂肪組織を J-TEC へ提供することに対し、東京大学医学部倫理委員会の承認を得た。さらに、商業利用可能な脂肪由来 MSC セルバンク構築のための組織提供においても、東京大学附属病院倫理委員会の承認を得た。ただし、本プロジェクトの枠外で、長期的にセルバンクを構築・販売するようになるのであれば、別途東京大学と適切な契約を交わす必要があることを当該倫理委員会より指摘を受けている。こうした一連の活動は、同種細胞を用いた再生医療を企業にて実施する上では、きわめて重要な内容であり、今後同業他社への示唆となり得るとともに、先鞭をつけた事例である。

MSC はその多彩な細胞特性から、様々な疾患への応用が期待されている細胞種であり、ヒトへの臨床応用例も数多く見受けられる。特に他家細胞において、同一ロットの他家細胞集団を、作用機序の全くことなる複数疾患への適用可能性も想定されている。しかしながら、MSC に期待する効果・効能が適用疾患別に異なる中で、当該ロットの細胞集団の特性が解析されていない状態での臨床応用は、効能・効果を検証する目的での臨床研究において考察が複雑となる。下記にこれら課題に対して、本提案技術が再生医療産業界にどのように波及可能であるか、以下にまとめた。

1. 再生医療の産業化に関する MSC の意義

iPS 細胞に関する期待感は大いだが、いまだ技術が確立しておらず臨床応用に至っているものは少ない。一方、MSC を用いた臨床応用は他国も含め増加の一途をたどる。臨床応用の機運が高まるとともに産業化への期待感も高まっている。

同種細胞を用いた再生医療については、免疫学的な課題を避けて通ることができないものの、MSC の免疫抑制能は好都合である。同種細胞を用いた再生医療は産業化に適していると言え、MSC セルバンクの合理的な確立は急務である。本研究における提案によって MSC の合理的な

特性解析ができ、セルバンク構築のためのゴールドスタンダードとなることが記載される。

2. クローン解析の意義

われわれは、自家細胞による皮膚関連細胞の上市を行ってきたが、クローン解析による細胞特性評価が重要であることを経験してきた。本件では、これになぞらえてクローン解析を行い、MSC の特性を十分に評価した。これにより、さまざまな MSC の培養法がどのクローンに当たるかの分類が可能となった。クローン解析自体は大変手間のかかる作業ではあるが、ひとたびこれに相当するデータを取得しておけば、後続の企業がこれを参照できる意義があるものと考えられる。社会的な意義は高いと想定できた。

3. 細胞移植後の局所における生着状態の評価

一般に、細胞の生着率やそれによる組織形成評価は容易でない。本研究では PCR を用いて移植細胞の生着率を評価するとともに他細胞への波及効果を生体内で半定量化した。本法は、下肢虚血に対する細胞移植例に限らず他の移植組織評価へも展開できる。

4. 臨床用セルバンクの構築に向けた倫理審査への対応

臨床応用可能な同種脂肪由来培養 MSC バンクの構築にあたり、まずは研究用脂肪組織を J-TEC へ提供することに対し、東京大学医学部倫理委員会の承認を得た。さらに、商業利用可能な脂肪由来 MSC セルバンク構築のための組織提供においても、東京大学附属病院倫理委員会の承認を得た。ただし、本プロジェクトの枠外で、長期的にセルバンクを構築・販売するようになるのであれば、別途東京大学と適切な契約を交わす必要があることを当該倫理委員会より指摘を受けている。こうした一連の活動は、同種細胞を用いた再生医療を企業にて実施する上では、きわめて重要な内容であり、今後同業他社への示唆となり得る。

まとめ

今後、同種細胞を用いた再生医療が産業化の中心となっていくだろう。その長所は、①原料を選択することができる、②逸脱品を容易に廃棄できる、③あらかじめ生産しておくことができる、④大量生産が可能である。⑤永久生着を期待しないので腫瘍形成時の対応が可能である、等である。一方、短所と言えるものは、①ドナーの確保が必要である、②免疫拒絶への対応が必要である、③バイオハザードへの対策が必要である、④効果のメカニズムを証明しにくい、等が挙げられる。

MSC は先に述べたように免疫学的に有利であるとともに、組織形成が多様であり、かつさまざまな反応性が期待できる。本研究では、上記長所を十分に活かすとともに短所解決において先鞭をつけたと考える。