

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) iPS細胞由来軟骨細胞を用いた軟骨疾患再生治療法の開発拠点
(英語) Center for development of regenerative therapies for cartilage diseases
using induced pluripotent stem (iPS) -cell-derived chondrocytes

研究開発実施期間: 平成25年7月8日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 妻木 範行
(英語) Noriyuki Tsumaki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人大阪大学・学院医学系研究科・教授
(英語) Professor, Department of Tissue Biochemistry, Graduate School of Medicine, Osaka University

II 研究開発の概要

研究の背景・目的・意義

関節軟骨は治癒能力が乏しい組織であり、一旦損傷を受けると自然修復が期待できないとされている。軟骨損傷を放置すると、損傷部分を起点として軟骨変性が広範囲に広がる。その結果、変形性関節症へと至るケースも少なくない。軟骨は軟骨細胞が自ら作り出した軟骨細胞外マトリックス (ECM) に囲まれる構造を持つ組織である。軟骨 ECM は、軟骨特有の優れたクッション性や滑らかさといった軟骨の物理的な機能を果たすとともに、軟骨細胞に適正な環境を与えてその性質を維持する役割を担っている。軟骨が損傷を受けると損傷部は軟骨 ECM も喪失する。すると軟骨細胞が性質を失うため軟骨 ECM が作られなくなる、という悪循環に陥るため損傷部はほとんど自然修復されない。損傷部を正常に修復するためには、細胞だけでなく軟骨 ECM も供給する必要がある。

これまで限局した関節軟骨損傷に対しては、軟骨細胞や MSCs 等の細胞を移植する治療が行われてきたが、移植細胞自身が修復組織を形成するという証拠に乏しく、その修復機序は、移植細胞が一過性に産生する修復因子による効果と考えられている。この修復機序では、修復そのものはホスト細胞に依存し、軟骨 ECM を伴わない細胞だけの移植により修復された組織は、癒痕組織のような線維性軟骨を含み硝子軟骨では修復されない。一方、軟骨組織は拒絶反応を受けにくい組織として知られており、米国では免疫抑制剤を使用することなく同種軟骨片移植が行われている。この同種移植による治療法は、上述した自家細胞移植による治療法とは異なり、移植物そのものが軟骨として機能し、硝子軟骨による修復が可能である。しかしながら、本治療法にはドナー不足ならびにドナーの個体差による移植軟骨の品質のばらつき、感染のリスクなどの課題がある。

関節軟骨損傷・変性疾患に対しては、人工関節置換術が広く行われている。人工関節置換術は、疼痛の場とな

る骨・軟骨を切除するため除痛にすぐれるが、関節可動域制限が残る。また、置換した金属のゆるみ、ポリエチレンの摩耗がある。よって人工関節置換術の適応は、重度の関節症（末期の変形性膝関節症等）に限られる。このため、軟骨再生医療に対する期待は大きいですが、真に臨床成績を向上させ、広く使われるような軟骨再生医療が行われるためには、高品質な硝子軟骨を充分量供給する必要がある。そこで、本拠点ではPS細胞が持つ多能性と無限に増えるという性質を活用し、ヒトiPS細胞を軟骨細胞へと分化誘導し、さらに軟骨細胞自身に軟骨ECMを作らせて高品質で均質な軟骨を大量に製造する方法の確立を目指した。そして、iPS細胞由来軟骨の非臨床安全性及び有効性試験での十分な検証後、軟骨損傷/欠損部に同種移植することを目標とし、移植軟骨自身が修復軟骨となる根治的な軟骨再生治療法を実現することを目的とした。代表機関の京都大学は、軟骨分化メカニズムの解明、臨床に向けた製造法の確立、非臨床データの取得、臨床研究の実施体制構築を分担した。分担機関の大阪大学は重症関節軟骨損傷への適応、東京大学は顔面軟骨欠損（小耳症）への適応を目指し、それぞれ非臨床データの取得を分担した。ヒトPOC取得については、まずは限局した軟骨損傷に対する臨床研究の開始を目標とし、さらに実用化に向けて、広範囲・重症の軟骨損傷（欠損）に対する臨床応用を目指した。尚、代表機関については、令和4年度に研究代表者の所属が京都大学から大阪大学に変わったため、代表機関も大阪大学に変更となった。

限局した軟骨損傷に対する臨床応用に向けた製造法・品質管理法の確立

iPS細胞由来軟骨（以下軟骨Particleと記載）は、直径数mmの白色パーティクルで、軟骨組織と同様に軟骨細胞とそれを取り囲む豊富な軟骨ECMで構成されている。当初、軟骨Particleの製造方法を開発した時点では、軟骨を製造するためにはiPS細胞をマトリゲル上で培養する必要があった。しかし、マウス肉腫由来であるマトリゲルは、感染性因子など安全性の観点から臨床での使用には問題があると考えられた。マトリゲルの代替品として開発された遺伝子組換え型のラミニンでは、軟骨を製造することはできなかった。そこで、マトリゲルの代替法を検討した結果、バイオリアクター中でiPS細胞を攪拌培養してiPS細胞の細胞集塊を作製することにより軟骨が製造できること、そしてそのメカニズムとして、iPS細胞からの軟骨分化にはYAP(Yes-associated protein)の不活性化が重要であることを見いだした。臨床での製造法及び品質管理法を確立し、SOPに従って試験製造を行い（8ロット）全ロットが規格値内であることを確認した。さらに、CPC施設にて試験製造を実施して製造法を検証した。

iPS細胞はテラトーマ形成能を有する。それ故、iPS細胞由来製品に関しては、腫瘍形成リスクの1つとして、未分化iPS細胞の残存を評価する必要がある。iPS細胞で高発現し、最終製品やヒト軟骨組織での発現が低い遺伝子を探索し、iPS細胞のマーカーとしてLin28Aを得た。qRT-PCRを用いて、LIN28Aの発現を指標としたiPS細胞混在検出試験法を確立した。iPS細胞でのLIN28Aの発現を100%としたときの最終製品での発現率は0.001~0.004%であった。この値は、iPS細胞由来軟骨自身が微量に発現しているLIN28Aを検出している可能性も考えられるが、品質管理法としては、残存するiPS細胞が発現していると仮定した。軟骨ParticleにiPS細胞を添加する添加回収試験の結果、LIN28A発現レベルとiPS細胞残存量は、高い相関($R^2=0.9976$)を認めた。得られた検量線をもとにLIN28A発現レベルをiPS細胞数に換算すると、軟骨Particleの臨床最大投与量中に残存するiPS細胞数は2,000個以下と算出された。一方、iPS細胞をヌードラットの膝関節軟骨欠損部に移植するin vivo造腫瘍性試験の結果では、100万個のiPS細胞を移植しても腫瘍が観察されなかったため、iPS細胞の残存に起因する腫瘍形成の可能性はきわめて低いと考えられた。生物由来原料の取り扱いに問題がないこと、iPS細胞混在検出試験法の規格の妥当性についてPMDA対面助言にて合意を得た。

限局した軟骨損傷に対する有効性・安全性試験データの取得

軟骨Particleをスキッドマウスの皮下に移植したところ、胎児での骨格発生で見られる内軟骨性骨化と同様の変化を示した。このことより、軟骨Particleは胎児期の軟骨に相当する特性を有すると考えられた。ヌード

ラットの膝関節軟骨欠損部に軟骨 Particle を移植し、15 ヶ月後に移植部位を組織学的に評価した結果、移植軟骨は残存し、隣接する宿主軟骨との融合及び軟骨下骨との連続性を認めた。関節に荷重がかかるミニブタの膝関節軟骨欠損部（直径 6 mm、深さ 1 mm）に軟骨 Particle を移植し、移植前後に免疫抑制剤を投与し、28 日間観察後に移植部位を組織学的に評価した。移植軟骨は移植部に生着・残存し、ミニブタの荷重を支え得る修復組織を構成した。軟骨 Particle はパーティクル同士を接触状態で培養すると融合する性質がある。この *in vitro* での観察結果と同様に、ミニブタへ移植した軟骨においても融合が始まっていることが確認された。

同種移植における軟骨の免疫原性は低いと考えられている。その理由としては、軟骨は無血管であり、軟骨細胞は豊富な細胞外マトリックスで囲まれているため、移植軟骨中の軟骨細胞はホストの免疫担当細胞と接触する機会が乏しく、拒絶反応が起きにくいことが挙げられる。軟骨 Particle も、生体軟骨と同様に無血管で、細胞は軟骨細胞外マトリックスに囲まれている。さらに、細胞の HLA 発現が低く、リンパ球混合試験においても免疫反応が見られないなどの結果が得られた。*In vivo* での同種移植の可否を検証するため、サルの iPS 細胞から軟骨組織を誘導し、別のサルの膝関節軟骨の欠損部に免疫抑制剤を使用せずに移植した。移植 4 か月後の組織解析で、移植軟骨は免疫反応を示さずに生着し、関節軟骨として機能していた。シングルセル RNA シークエンス解析の結果、移植軟骨は移植前よりもさらに生体の軟骨に近似していた。例えば、PRG4 は関節軟骨表層部で産生され、潤滑な関節運動に必須の役割を担う蛋白であるが、移植前の iPS 細胞由来軟骨では PRG4 の発現レベルは低かったが、移植後 4 カ月で表層部に発現が誘導されていた。これらの結果から、一人のドナーに由来する iPS 細胞から製造した軟骨 Particle が、多数の関節軟骨損傷・変性患者に移植できる可能性が示された。

iPS 細胞由来製品の腫瘍形成リスクを評価する際には、未分化 iPS 細胞の残存評価に加えて、目的外細胞としての形質転換細胞の混在を評価する必要がある。*In vivo* で形質転換細胞を検出する方法としては、免疫不全動物への投与試験が求められる。移植物が生着する微小環境での腫瘍形成リスクを評価するために、投与経路は可能な限り臨床適用と同様とすることが望ましいとされている。PMDA 相談の結果、ヌードラットの膝関節軟骨欠損部への移植で、観察期間はライフロング、観察する器官は、移植部位に加え、血流の豊富な主要臓器となった。15 か月の観察期間終了後、剖検および病理組織解析の結果、移植部位およびその他の臓器のいずれにおいても被験物に起因すると考えられる腫瘍の発生を認めなかった。陽性コントロールとして、HeLa 細胞をヌードラットの膝関節軟骨欠損部に移植したところ、10 万個の細胞を移植すると腫瘍の形成を認めたが、1 万個以下では認めなかった。*In vitro* で形質転換細胞を検出する方法としては、足場非依存的な増殖を見る軟寒天コロニー法が知られているが、正常軟骨細胞は軟寒天中でも増殖するため、形質転換細胞特異的な評価ができない。そこで、正常細胞は分裂を繰り返すと最終的には分裂しなくなる（ヘイフリック限界）を指標として、形質転換細胞を検出する試験法を構築した。軟骨 Particle をトリプシンおよびコラゲナーゼ処理し、得られた細胞を接着細胞用ディッシュ上で 10 % 牛胎児血清含有培地を用いて培養し、継代を繰り返すことにより、不死化細胞の有無を検討した。陽性コントロールとして HeLa 細胞 100 個を軟骨 Particle に加えて同様に培養した。軟骨 Particle + HeLa 添加群では継代を繰り返していくと細胞増殖速度が増加した。一方、軟骨 Particle 群では継代を繰り返すと増殖速度の低下を認め最終的には分裂が停止した。これらの結果から、臨床での最大移植量である軟骨 Particle 1.5g 中に混在し得る HeLa 相当の不死化細胞数は 1,000 個未満と推定され、上述の HeLa 細胞のヌードラット膝関節軟骨への移植試験の結果を踏まえると、腫瘍形成リスクは低いと考えられた。その他の安全性試験として、毒性試験、長期培養試験、核型解析試験、全ゲノム解析試験、残留不純物試験などを実施して軟骨 Particle の安全性を確認した。

限局した軟骨損傷に対する臨床研究の申請

軟骨 Particle を移植することにより関節軟骨損傷を治療する臨床研究実施計画書を作成し、特定認定再生医療等委員会および厚生労働省に申請し、臨床研究実施基準への適合性が確認された。この臨床研究は、AMED 実用化研究事業の支援を得て京都大学医学部附属病院にて実施し、目標症例数 4 例への移植を終了した。現在、その

安全性及び有効性を確認中である。今後、臨床研究でヒト proof of concept (POC) を取得することにより、実用化に向けた対象疾患の検証も可能となり、出口企業への導出も具現化するものと考えられる。

顔面軟骨欠損に対する非臨床データの取得

東京大学では軟骨 Particle を融合させ耳介形状を付与した再生軟骨を作製する技術開発を行っていたが、AMED の中間評価会において、本研究の開発は中止となった。

重症軟骨損傷に対する非臨床データの取得

軟骨 Particle を移植する移植治療では、移植する軟骨 Particle はフィブリン糊等で固定し、必要に応じて骨膜で被覆し、縫合糸で逢着する。しかしながら、この固定法では、軟骨損傷部のサイズが大きくなるほど固定性が悪くなり、軟骨 Particle が脱落する懸念が生じる。そこで、より広範囲な軟骨損傷部への移植が可能となる移植材料の開発に取り組んだ。大阪大学ではティッシュエンジニアリング技術を用いた移植方法の開発を分担した。一方、代表機関の京都大学では、軟骨 Particle 同士が融合するという性質を活用し、板状の軟骨（以下軟骨板と記載する）を製造する技術の開発に成功した。この軟骨板は、広範な軟骨損傷部に縫合糸で逢着することにより固定できる。AMED の中間評価会において、重症軟骨損傷に対する移植法については、ティッシュエンジニアリング技術を用いた方法での開発は中止となり、軟骨板を移植材料として開発を進めることとなった。軟骨板の製造法及び品質管理法に関する SOP を作成し、一定品質の製品が製造できるよう、順次 SOP を改訂しながら製造し、製造方法を確定した。研究代表者が京都大学から大阪大学に移籍したため、研究代表機関が大阪大学に変更となった。大阪大学 CPC で試験製造を実施し、品質試験の規格値を決定した。出荷品の不純物残量試験及び安定性試験を行った。製造法及び品質試験法について PMDA 対面助言で合意を得た。非臨床試験の実施は、大阪大学と京都大学が共同で実施した。免疫抑制剤を投与したミニブタの関節軟骨に 6x10mm 程の大きな欠損を作製し、欠損部と同じサイズに整形した軟骨板を移植した。移植 4 週後に移植軟骨の生着を確認したが、脱落する例もあったため、固定方法をさらに検討する必要があることが判った。ヌードラットの膝関節軟骨欠損部に軟骨を移植した。移植 11 か月後の組織解析で、移植軟骨は生着・機能しており、腫瘍の形成を認めなかった。安全性試験法について PMDA 対面助言で合意を得た。臨床研究の申請に必要とされる書類のドラフトを作成した。

Abstract

Background: Articular cartilage covers the ends of bones and forms joint surfaces, absorbing shocks and providing lubrication. Cartilage consists of chondrocytes embedded in abundant extracellular matrix (ECM) produced by chondrocytes. Articular cartilage has limited capacity for repair and therefore does not heal when get damaged. Cell therapies including implantation of chondrocyte or mesenchymal stem cells have been performed or studied to treat damage in articular cartilage. However, the repair tissue formed by these cell therapies contains fibrous tissue which is scar-like and inferior in mechanical function to the healthy hyaline cartilage. The probable reason is that implantation of cells alone to damaged area which lacks cartilage ECM results in loss of chondrocytic characters of implanted cells and does not produce cartilage. We therefore have developed a method to create hyaline cartilaginous particles ($\Phi 1\sim 3$ mm) from induced pluripotent stem cells (iPSCs). Like native cartilage, iPSC-derived cartilage particles (iPS-Carts) are the structure of chondrocytes being surrounded by cartilage specific extracellular matrix.

Results and Discussion: To start investigator-initiated clinical study of transplanting iPS-Carts into patients with partial articular cartilage damage, we upgraded production method of iPS-Carts for clinical use. We initially produced iPS-Carts using Matrigel derived from mouse Engelbreth-Holm-Swarm tumors which may be not compatible for clinical use. We could not produce iPS-Carts when we cultured iPSCs on culture dish coated with laminin 511-E8, which was developed to replace Matrigel. Then, we found that use of bioreactors solved issues and developed a clinically applicable production method of iPS-Carts.

We developed quality control methods for iPS-Carts including assessment of residual iPSC contamination and confirmed that iPS-Carts were effectively and safely produced in a cell processing center (CPC) under the defined standard operating procedures. We next obtained various data for pre-clinical studies. iPS-Carts spontaneously integrate with each other in vitro. When transplanted to fill the defects of articular cartilage in rat and pig models, iPS-Carts formed repair tissue by integrating with each other and with adjacent host tissue. Cartilage is known to have low immunogenicity and allogenic cartilage has thus been transplanted clinically in an allogenic manner without the use of immunosuppressive drugs. However, whether the transplanted allogenic cartilage causes an immune reaction has not been analyzed in detail. We therefore investigated immunogenicity of iPS-Carts. A mixed lymphocyte reaction assay showed that iPS-Carts simulated the proliferation of neither T cells nor the activation of NK cells. Furthermore, we revealed that allogenic iPS-Carts survived and integrated with host cartilage without immune reaction at least four months in a primate model of chondral defects in the knee joints. Regarding safety assessment, we developed an in vitro tumorigenic evaluation system and confirmed that cells in iPS-Carts reached growth arrest and senescence. We did various safety studies including in vivo tumorigenic assay with life-long observation period, general toxicity study, karyotype analysis, impurity tests, and whole genomic analysis and confirmed that results from safety assessments were acceptable. We thus applied a clinical research plan and the document was approved from Health Science Council. We are performing a clinical study of transplanting allogenic iPS-Cart particles into patients with focal damage in articular cartilage in knee joints.

To develop transplants that can treat more extensive cartilage lesions than focal lesions, we have developed large size cartilage plate from iPSCs by utilizing the character that iPS-Cart integrate spontaneously. We have been performing preclinical tests to assess efficacy and safety of iPSC-derived cartilage plates.