

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 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 培養腸上皮幹細胞を用いた炎症性腸疾患に対する粘膜再生治療の開発拠点
(英語) Center for development of mucosal regenerative therapies for inflammatory
bowel diseases using cultured intestinal epithelial stem cells.

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) 渡辺 守
(英語) Mamoru Watanabe

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学・高等研究院・特別荣誉教授
(英語) Tokyo Medical and Dental University, TMDU Advanced Research Institute (TMDU-ARIS)

II 研究開発の概要

潰瘍性大腸炎・クローン病に代表される炎症性腸疾患はわが国に30万人を超える患者がいる難病である。患者数の急増に加え、既存治療に不応な難治例の増加への対応が課題となっているが、拠点長を研究代表者とする厚生労働省難治疾患克服研究事業(研究開始当時)による取り組みにもかかわらず、未だ画期的かつ根治的治療法の確立には至っていない。本疾患の治療法は従来から現在に至るまで炎症制御を目指した薬剤・治療法が開発・実用化されてきたが、1) 現行の強力な免疫調節薬・生物学的製剤等に不応もしくは効果不十分で再発する症例が少なからず存在すること、2) これら症例において、寛解(治癒)の維持には粘膜上皮の再生(粘膜治癒)が最も重要な治療目標である事、が明らかとなり、腸管上皮の損傷・機能的破綻を速やかに再生し得る次世代治療法の開発が世界的な課題となっている。

疾患の根治的治療への発展が期待される細胞移植治療について、血液・神経・皮膚・角膜等の移植先進組織と比べ、腸管上皮移植の研究及び臨床応用技術は大幅に遅れて来たのが現状であり、その最大の理由は体外で長期かつ安定に腸上皮幹細胞を維持・培養する技術が欠如していたことにある。同技術の欠如を解決するため拠点長並びに分担機関代表者らは世界初の腸上皮幹細胞培養技術を開発し、世界に先駆けて報告した(Nature 2009, Nat Med 2012)。両者はマウス並びにヒト腸上皮組織より幹細胞を含む細胞分画を分離し、特定条件下で培養することにより、*in vitro*で長期且つ大量に細胞機能を保持した3次元構造体(オルガノイド)として培養可能である事を示している。同分野に於いては本邦研究者が画期的成果を独占する状況にあり(研究開始当時)、他国に先駆けて臨床応用に取り組むべき技術と考え、本拠点における開発計画を立案した。

拠点長らはさらに自家腸上皮オルガノイドが損傷粘膜修復のリソースとなり得る可能性を追求するため、腸上皮オルガノイドを用いた動物疾患モデルに対する移植治療を行った。その結果、体外培養した腸上皮幹細胞が損傷粘膜に定着するだけでなく、幹細胞を含む機能的単位(陰窩)を再構築し、長期に生着が維持されることを明らかにしている(Nat Med 2012)。さらに同様の移植治療は単一の腸上皮幹細胞から培養増殖した腸上皮を用いても達成可能であったことから、内視鏡生検等の極小組織片を起点とした移植治療を実現可能な基盤技術の確立に成功していた。本技術についても拠点長らが独占している状況にあり(研究開始時)、また本拠点が開発を目指すオルガノイド医療における前臨床PoC(Proof-of-concept)が得られている状況にあったことから、本拠点において先駆けてオルガノイド医療の実践と臨床応用に取り組むべきと考え、研究開発を推進した。

一方、本拠点が対象とする潰瘍性大腸炎・クローン病の診断・治療に於いて消化管内視鏡は不可欠なモダリティであり、その技術の発展が同疾患の診断・治療体系を飛躍的に進歩させて来た。我が国において発明・発展した「バルーン小腸内視鏡」により、口腔から直腸に至るまでの全消化管に対し直接アプローチが可能となり、その上で目的部位の観察下に薬剤等を正確に送達することも非侵襲的かつ容易に実現可能となっている。拠点長らは我が国発の先端内視鏡技術を潰瘍性大腸炎・クローン病の診断・治療に応用展開する重要性を従来から提唱しており、拠点長自らが(研究開始当時)センター長を務める「東京医科歯科大学病院・潰瘍性大腸炎・クローン病先端治療センター」において、先進的な内視鏡診断・治療を積極的に展開してきた。本拠点ではこれを発展させ、1) 腸上皮オルガノイド培養、2) 腸上皮オルガノイド移植、3) 消化管内視鏡治療を統合し、「腸上皮幹細胞移植による難治性炎症性腸疾患治療」の実現を目指し、研究計画を推進した。

上記の開発背景に鑑みて、本拠点では潰瘍性大腸炎・クローン病に対し、体外培養した腸上皮幹細胞を移植し損傷した粘膜を再生するため、自家腸上皮オルガノイドを用いた世界初のオルガノイド医療の実現を目的とした研究開発を実施した。研究期間を3つの開発フェーズに分け、各々の開発フェーズに於いて炎症性腸疾患治療を行う為の自家腸上皮オルガノイド製造・供給システムの整備、自家腸上皮オルガノイドを対象とした品質評価システムの整備、及び適切な内視鏡的オルガノイド移植法の開発・検証等を実施した。さらにはFirst-in-human(FIH)試験の立案及び特定認定委員会における承認手続きを行い、AMED再生医療実用化事業と連携した臨床研究を通じ、潰瘍性大腸炎を対象とした自家腸上皮オルガノイド移植の安全性の検証、有効性を評価するための適切な指標の抽出等を順次達成することを目標におき、研究開発を実施した。

本研究課題では上記背景・目的に基づき、以下の成果を得た。

1) First-in-human (FIH) 実施に適した腸上皮オルガノイドの製造・評価・移植手順の策定と運用

本研究項目の開発にあたり、First-in-human (FIH) 試験の実施及び安全性の検証を目的とした臨床研究を行う際の「特定認定再生医療等委員会の承認要件を満たす内視鏡的細胞移植手順を策定し運用する」ことをマイルストーン(到達目標)に設定し開発を実施した。

移植用腸上皮の供給体制の確立: 平成 27 年度までに単離・培養に用いる増殖因子の GMP グレード品への置換等、臨床試験実施に向けた規制対応を概ね終了した。また、高い培養効率を維持する為に必要な化合物(シグナル阻害薬)や他の添加薬品における規制対応についても、一部医薬品については 1 回投与量に対し著しく少量であったことから、最終製品における残留濃度試験は不要と考えられた。一方、高い培養効率を維持するための他の化合物添加が必須であること確認され、これら化合物は治療薬として投与された実績に乏しく、いずれも最終製品を調製・出荷した際の残留濃度試験を実施した。自家腸上皮オルガノイドの出荷に際しては「内視鏡的移植に適した出荷形態」を決定し、体外ブタ腸管モデルを用いて検証した上で最終的な出荷形態を決定した。標準作業手順書の策定にあたり、平成 28 年度に新たに導入した培養法について、出荷作業の効率化や培養効率について従来法との比較検討を実施し、これに基づき同研究に用いる「自家腸上皮オルガノイド」の製造に係る標準作業手順書(SOP)の作成を進め、完了した。

移植用腸上皮の品質評価体制の確立: 自家腸上皮オルガノイドの出荷基準項目(規格)として細胞形態(光学顕微鏡による目視)、細胞数等を含む項目を定め、培養工程における既定のタイミングで試験を実施する旨、計画を併せて定めた。これら培養工程で実施する品質評価項目のうち、「細胞数」の評価については本拠点が独自に開発した手法を用いることにより移植用腸上皮オルガノイドを非破壊的に評価し培養工程を管理することが可能となった。一方、他の評価項目について院内で運用済みの手法を用いることを決定した。同法を用いて対象患者検体を対象とした試験を実施し、標準手順書を整備した。また造腫瘍性について特定認定再生医療等委員会における審査過程で指摘を受けた項目を含め複数の手法を用いた検討を行なった。さらにシングルセル解析等を通じて異なる患者より移植用腸上皮オルガノイドを製造した際も、現行のプロトコールを用いた際は同等の再生機能を期待し得る、等品質の移植用腸上皮オルガノイドが十分製造し得るものと考えられる結果を得た。これら検討に基づき工程内管理試験及び製品規格等を定めた「特定細胞加工物概要書」及び「特定細胞加工物標準書」の策定を進め完了した。

内視鏡的オルガノイド移植法の確立・検証: 細胞送達・定着促進法を統合した内視鏡的腸上皮オルガノイド移植法の標準的手順の策定を行った。潰瘍性大腸炎を対象とした臨床研究の実施経験から、薬剤散布法や創傷被覆を行う際の内視鏡的手法については確立済みであった。これか手法を組み合わせた新規手法について、ブタ直腸体外モデルを用いた内視鏡的腸上皮オルガノイド移植試験を実施し、一連の手技が滞りなく遂行可能であることが確認された。これら知見に基づき蠕動等を伴う生体大腸に於いても同移植手技が安全に遂行可能であるかを検証するため、分担研究機関と協働し生体ブタを用いた試験を実施し、手順の妥当性・実施可能性(フィージビリティ)が確認された。

2) 臨床研究実施に適した研究計画(実施プロトコール)の策定と運用

臨床研究計画の策定にあたり、本学関係部門等と連携・協議を行い、支援・助言の下に選択基準・除外基準・主要評価項目・副次評価項目等の臨床研究実施計画を策定した。具体的には潰瘍性大腸炎と確定診断されている成人を対象に設定し、該当者のうち大腸に潰瘍の残存を確認した患者を主な適格者と設定した。併せて除外基準の設定・改訂を適宜実施している。主要評価項目は安全性とし、First-in-human 試験であることを鑑みて移植実施後 52 週間の観察期間を置く計画とした。これに加え、有効性を推定する指標となり得る副次観察項目を設定し、jRCT への登録を完了した(臨床研究実施計画番号 jRCTb032190207)。

上記の成果等に基づき FIH 試験を開始し、計画期間内に 2 例の移植実施を完了している。移植を実施済みの 2 症例について、安全性及び有効性の予測・評価候補指標について検討を進め、有効性評価の候補指標を評価項目に採り入れた新たな臨床研究等の設計・立案に関する基盤を構築した。

Inflammatory bowel diseases (IBD), such as ulcerative colitis and Crohn's disease, affect over 300,000 patients in Japan. Addressing the increase in difficult-to-treat cases is a major challenge, with many patients not responding enough to current potent immunomodulatory drugs or biological agents. Mucosal healing is considered the most important therapeutic goal to maintain remission, yet no curative treatment has been established for IBD. To develop next-generation therapies that can rapidly regenerate damaged and functionally disrupted intestinal epithelium, the research and clinical application of intestinal organoid transplantation is crucial. However, this has lagged behind advanced tissue transplantation technologies due to the lack of a technique for maintaining and culturing intestinal epithelial stem cells for a long time and stably in vitro. To solve this problem, the principal investigator and collaborator developed the intestinal epithelial stem cell culture technique, which showed that stem cells can be cultured as three-dimensional structures with long-term cell function preservation in vitro. Based on this development, we conducted research and development to achieve organoid therapy using autologous intestinal epithelial organoids for IBD. The study involved three development phases, each establishing a system for manufacturing and supplying autologous intestinal epithelial organoids, developing a quality evaluation system, and verifying appropriate endoscopic organoid transplantation methods. We also formulated a plan for a First-in-human (FIH) trial and conducted approval procedures. As a result, we completed organoid transplantation during the planned period and established a foundation for designing new clinical studies by evaluating safety and efficacy candidate indicators for predicting and evaluating the effectiveness of therapy.

1) Establishment and implementation of manufacturing, evaluation, transplantation procedures for intestinal epithelial organoids suitable for conducting First-in-Human (FIH) studies:

Establishment of a supply system for transplantable intestinal epithelium: Regulatory compliance for clinical trials has been largely completed in the early phase, including the replacement of growth factors used for isolation and cultivation with GMP grade products. In developing the standard operating procedure (SOP), the efficiency and cultivation efficiency of the cultivation method newly introduced in the later phase were compared to those of the conventional method to streamline the shipping process, based on which the SOP used in the FIH study was created and completed.

Establishment of Quality Assessment System for Transplantable Intestinal Epithelial Cells: We established a plan to define the shipping criteria (standards) for autologous intestinal epithelial organoids, which includes items such as cell morphology (visualized through optical microscopy) and cell count, and to conduct tests at predetermined timings during the cultivation process. At the final phase, we have completed the establishment of the Outline for Specified Cell Processing Products and Standard for Specified Cell Processing Products.

Establishment and verification of endoscopic organoid transplantation method: We established a standard procedure for endoscopic intestinal organoid transplantation that integrates cell delivery and fixation promotion methods. We collaborated with other research institutions to conduct experiments to verify the safety and feasibility (feasibility) of the same transplantation technique. At the end of the study period, the validity and feasibility of the procedure were confirmed.

2) Development and implementation of a study plan (implementation protocol) suitable for clinical research:

In developing the clinical research plan, we targeted adults with confirmed diagnosis of ulcerative colitis and identified patients with remaining ulcers in the colon as the main eligible participants. The primary endpoint was safety and given that this is a First-in-human trial, we planned to observe the participants for 52 weeks after the transplantation procedure. In addition, we established secondary observation items that could serve as indicators of effectiveness and completed registration with jRCT (clinical research implementation plan number jRCTb032190207).

Based on the above results, we started the first-in-human (FIH) trial and completed two transplantations within the planned period. We have been evaluating the safety and efficacy candidate indicators for the two transplanted cases and have established a foundation for designing and planning new clinical studies by incorporating candidate efficacy evaluation indicators as evaluation items.