

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）ヒト幹細胞加工製品の原料としての幹細胞及び最終製品中の加工細胞の品質評価に関する研究
（英語）Research on the quality assessment for starting cellular materials and human processed cells in the stem cell-processed products

研究開発実施期間：令和3年7月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）阿久津 英憲
（英語）Hidenori Akutsu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立研究開発法人国立成育医療研究センター・研究所再生医療センター 生殖医療研究部・部長
（英語）Director, Center for Regenerative Medicine, National Center for Child Health and Development,

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：

高品質な細胞加工製品を高い再現性で製造するためには、原料細胞の品質最適化が極めて重要となる。ヒト多能性幹細胞（hPSC）から特定の臓器に類似した組織構造かつ機能性も有する3次元（3D）組織構造体（オルガノイド）を作製する研究が活発に展開されてきた。再生医療応用を見据えた、オルガノイドのGMP準拠製造法開発研究（Dossenaら2020）や規制の観点からも欧米では議論され始めた（Vives & Batlle-Morera 2020）。本研究では、hPSCの次世代の3Dオルガノイド活用に対応するため、オルガノイドを細胞加工製品として製造する品質試験法についても提示していく。幹細胞を原料とした細胞加工製品の開発が、国内外で盛んに行われている。その品質を確保するには、個別の最終製品の製造に適した特性を示す細胞を用いる必要がある。目的細胞への分化効率が低い原料細胞では、製造の歩留まりが悪いだけでなく、造腫瘍性リスクのある未分化細胞が残存する恐れも高まる。従って、製品の効率的な製造や安全性確保・品質管理の上では、製造に適した原料細胞株の選別のための試験法が必要とされている。

・研究開発項目1では、hPSCの次世代の3Dオルガノイド活用に対応するため、オルガノイドを細胞加工製品として製造する品質試験法について提示していく。腸管オルガノイドの特徴的な組織構造および培地上清中の小腸特性因子評価を考慮した品質規格項目案（粘膜上皮組織の敷石状、杯細胞有無、培

地上清 DEFA5 等)を設定し得た。腸管オルガノイドの規格化に形態評価が適応できることを示し、組織像(HE 染色)と比較評価すると、腸管粘膜の特徴的な形態(敷石状と表現)が「真」と「偽」があることを明らかにした。腸管オルガノイドおよびヒト小腸組織も含めた RNA-seq 解析では、原料となる細胞株間での腸管オルガノイドが分類され、その分子群では粘膜下固有層に関連する遺伝子発現動態が影響していることを明らかにした。腸管オルガノイドの画像取得・イメージング解析のデータも含めた統合的なアプローチによる品質評価法確立へ向け重要な基盤を構築できた。

・研究開発項目 2 では、ヒト多能性幹細胞(hPSC)の特定の細胞系譜への分化傾向を予測するマーカーの探索とその機能解析を実施し、hPSC 株の細胞加工製品の原料としての品質試験法を開発することを目的としている。本研究課題の分担研究として、神経細胞製造の原料としてのヒト多能性幹細胞(hiPSC)に着目し、神経分化能予測マーカーの同定とこれを用いた品質評価法の開発を目指し研究を行った。ROR2 遺伝子を選定することができ、機能性解析から上皮間葉転換(EMT)に関連する遺伝子が抑制されていることを見出した。このことから、ROR2 は EMT を抑制することにより、神経分化誘導を促進し機能的に神経分化に寄与していることが強く示され、汎用性の高いマーカーであることが明らかとなった。以上の結果から、ROR2 の発現が低い hiPS 細胞株を選択することにより、神経前駆細胞や GABA 作動性ニューロンに効率的かつ再現性高く分化する hiPS 細胞株を得ることが期待でき、神経細胞製造の原料としての hiPSC の新規品質評価法の重要な基盤成果を得た。

・研究開発項目 3 では、ヒト間葉系幹細胞(MSC)加工製品の有効性関連生理機能(potency)を代替品質特性において評価するための in vitro 試験を開発することを目的としている。ヒト MSC の potency の一つとして「分化能」に着目し、骨分化能の簡易品質評価系として骨分化能予測マーカーの同定とこれを用いた品質評価法の開発を目指した。これまでに、先行研究によって得られた MSC の骨分化能予測マーカー候補遺伝子 A と発現が相関する遺伝子としてマイクロアレイデータを用いた順位相関分析やパスウェイ解析による関連機能等からまず 3 遺伝子を選定した。機能性解析から、遺伝子 B の過剰発現による骨分化亢進についても確認した。転写因子である遺伝子 B の MSC 骨分化への関与はこれまでほとんど報告されておらず、遺伝子 A と関連した骨分化能予測関連遺伝子としては新規の因子を見出した可能性が高いと考えている。さらに、遺伝子 C も加え相互の発現へ関与していることが判った。以上の結果から、MSC の骨分化能における 3 遺伝子の機能的な関連性が示され、MSC の骨分化能予測の量的マーカーとして遺伝子 A を用いた簡易な評価法に加えて、質的マーカーとしての遺伝子 B、さらに遺伝子 C の MSC 未分化状態での発現レベルについても確認することによって評価法としての精度を上げられる成果を得た。

英文：

To manufacture high-quality cell-processed products with consistent reproducibility, optimizing the quality of the source cells is critically important. Extensive research has been conducted to generate three-dimensional (3D) tissue structures (organoids) that mimic specific organs in structure and function, derived from human pluripotent stem cells (hPSCs). In anticipation of regenerative medicine applications, studies on the development of Good Manufacturing Practice (GMP)-compliant manufacturing methods for organoids and regulatory discussions have commenced in the EU and the United States. The present study aims to develop quality testing methods for manufacturing organoids as cell-processed products to accommodate the next generation of 3D organoid utilization from hPSCs. The development of cell-processed products using stem cells as raw materials is actively pursued both domestically and internationally. To

ensure product quality, cells exhibiting characteristics suitable for manufacturing individual final products must be used. If the raw cells have a low differentiation efficiency toward the target cell type, not only is the manufacturing yield compromised, but there is also an increased risk of residual undifferentiated cells posing a tumorigenic threat. Therefore, to enable efficient manufacturing, ensure safety, and maintain quality control, testing methods for selecting appropriate raw cell lines for manufacturing are essential.

Research and Development Item 1: To adapt to the next generation of 3D organoid utilization from hPSCs, we present quality testing methods for manufacturing organoids as cell-processed products. We established draft quality standards considering the characteristic tissue structure of intestinal organoids and the evaluation of small intestine-specific factors in the culture supernatant (e.g., cobblestone appearance of mucosal epithelial tissue, presence of goblet cells, DEFA5 in the culture supernatant). By demonstrating the applicability of morphological evaluation to the standardization of intestinal organoids, we elucidated the existence of "true" and "false" representations of the characteristic cobblestone appearance of intestinal mucosa through comparative evaluation with tissue images (HE staining). RNA-seq analysis, including intestinal organoids and human small intestine tissues, revealed that intestinal organoids are classified among raw cell lines, and the gene expression dynamics related to the submucosal propria influence this classification. We have established a critical foundation for developing quality evaluation methods through an integrated approach, incorporating imaging analysis data of intestinal organoids.

Research and Development Item 2: This item aims to develop quality testing methods for hPSC lines as raw materials for cell-processed products by exploring markers that predict the differentiation tendency of hPSCs into specific cell lineages and analyzing their functions. As part of this research task, we focused on human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) as raw materials for manufacturing neural cells, aiming to identify neural differentiation prediction markers and develop a quality evaluation method using these markers. We identified the ROR2 gene, and functional analysis revealed the suppression of genes related to epithelial-mesenchymal transition (EMT). This strongly suggests that ROR2 functionally contributes to neural differentiation by promoting neural induction through EMT suppression, establishing it as a highly versatile marker. Based on these findings, by selecting hiPSC lines with low ROR2 expression, we expect to obtain hiPSC lines that efficiently and reproducibly differentiate into neural precursor cells and GABAergic neurons, yielding significant foundational outcomes for a novel quality evaluation method for hiPSCs as raw materials for neural cell manufacturing.

Research and Development Item 3: This item aims to develop in vitro tests to evaluate the potency of human mesenchymal stem cell (MSC) processed products in terms of effectiveness-related physiological functions (potency) using substitute quality characteristics. Focusing on "differentiation ability" as one aspect of human MSC potency, we aimed to identify osteo-differentiation prediction markers and develop a quality evaluation method using these markers as a simple quality evaluation system for the differentiation ability. We first selected three genes through rank correlation analysis and pathway analysis of related functions using microarray data as genes correlated with gene A, a candidate osteodifferentiation prediction marker for MSCs

obtained from previous research. Functional analysis confirmed the promotion of osteodifferentiation through the overexpression of gene B. The involvement of gene B, a transcription factor, in MSC osteodifferentiation has been rarely reported, suggesting a high possibility of identifying a novel factor related to osteodifferentiation prediction in connection with gene A. Furthermore, gene C was also found to be involved in the mutual expression of these genes. These results demonstrate the functional relationship of the three genes in MSC osteodifferentiation ability, enhancing the accuracy of the evaluation method by confirming the expression levels of gene B as a qualitative marker and gene C in the undifferentiated state of MSCs in addition to using gene A as a quantitative marker.