

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) エクソソーム製剤の品質管理戦略構築に関する研究
(英語) Studies on establishment of control strategy of exosome products

研究開発実施期間: 令和4年4月1日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 石井 明子
(英語) Akiko Ishii-Watabe

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長
(英語) National Institute of Health Sciences, Division of Biological Chemistry and Biologicals,
Director

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

近年、新規医薬品モダリティとして、細胞から放出されるエクソソーム（細胞外小胞の中でも粒子径 100nm 前後のもの）が注目を集めており、国内外で開発が進められ、既に欧米では臨床試験に移行する動きが加速している。免疫系疾患、神経系疾患、創傷等を対象に、既存の医薬品にない治療効果が期待されている一方で、その作用機序は必ずしも明確でなく、エクソソーム製剤の品質安全性確保のための方策は確立されていない。本課題では、医薬品としては極めて複雑な構造・組成を有するエクソソーム製剤の品質管理戦略構築に資する方法を確立することを目的に、ヒト間葉系幹細胞（mesenchymal stem cells:MSC）由来エクソソームをモデルとした検討を行い、製造工程に用いられる細胞基材及び最終製品となるエクソソーム製剤の評価法の確立、さらに、管理戦略構築に資する薬理・薬物動態学的な評価を行った。また、産官学の関係者からなるワーキンググループでの議論を行って、天然型エクソソーム製剤の品質確保に関するガイドライン案を作成した。以下に各課題について得られた成果概要を記す。

（１）研究開発項目１：エクソソーム製剤の品質評価

エクソソーム製剤の特性解析として実施される構造・組成・物理的・化学的性質の評価、及び、生物学的性質の評価に用いられる評価法の構築と、MSC 由来エクソソームをモデル試料とした評価を行った。エクソソーム製剤の粒子不均一性評価法として、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を利用した粒子径分布評価法及び、陰イオン交換クロマトグラフィー (AEX) を利用した粒子電荷分布評価法を確立した。粒子径や電荷で分画した試料をナノ粒子トラッキング解析 (NTA)、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM)、ELISA、プロテオミクス解析等により詳細に評価した結果、各画分は粒子径分布やマーカー分子の発現強度、構成タンパク質に明確な差異が認められたことから、それぞれ異なる種類の細胞外微粒子により構成されることが判明し、確立した方法がクロマトグラフィーパターンの解析に有用であることが示された。同一製法で製造した複数ロットの試料の比較では、粒子径分布や電荷分布が大きく変動していることを捉えることができ、品質管理における有用性も示すことができた。また、エクソソーム中の網羅的な脂質量並びに脂質組成解析に利用可能なリピドミクス手法を構築し、MSC 由来エクソソーム試料において 200 種以上の脂質の解析を可能であることを実証した。更に、複数ロットのエクソソーム試料やそれらを追加精製（超遠心法、SEC、または AEX）した試料の脂質解析を実施し、ロット間差より精製法の違いの方が、エクソソーム中の脂質量やその組成に大きな影響を及ぼすことを示した。

生物学的性質については、ヒト MSC 由来エクソソームの抗炎症効果を評価する *in vitro* 評価系の構築と新規指標の探索を行なった。これまでの TNF α などの炎症性マーカーと比較して、より広いダイナミックレンジで高感度に評価が可能な CXCL10 を新たな指標として同定した。また miRNA ライブラリーを用いて抗炎症効果を発揮する miRNA を網羅的に探索し、約 30 種類の miRNA が抗炎症効果を発揮することを明らかとした。これらの miRNA には抗炎症作用との関連が報告されているものが多く含まれており、これらが MSC 由来エクソソームの抗炎症活性に重要であることが示唆された。

単一粒子レベルでより詳細に粒子の不均一性を評価するため、ナノ粒子対応のフローサイトメーター (NanoFCM) により核酸の内包率や表面発現分子等の発現率を評価したところ、イオン HPLC で分画した試料の各フラクションは明確に異なる発現分子パターンを示した。加えて、複数ロットの試料の比較では、CD9、CD81 といった代表的なエクソソームマーカーとされる分子であっても顕著に発現率が異なり、ロット間の均一性を保つ上で重要な指標の候補分子となることが示唆され、単一粒子レベルでの解析の有用性が示された。

（２）研究開発項目２：エクソソーム製剤の製造工程評価

本項目は、エクソソームの臨床応用を見据え、エクソソーム製剤の品質とそれを産生する細胞基材の特性との関連性を明らかにすることを目的とした。エクソソームは MSC などの細胞から分泌されるが、その品質や機能はソースとなる細胞の由来や状態に大きく依存することから、機能的かつ安定したエクソソーム製剤を製造するには、エクソソームの出発原料である細胞基材の特性を精緻に把握することが不可欠である。そこで本研究では、モデル疾患として関節軟骨疾患を、モデル製剤としてヒト MSC 由来のエクソソームとして設定し、ヒト MSC の品質とエクソソームの機能の関係性を多面的に解析した。まず、ヒト MSC の培養上清中に分泌されたエクソソームを、SEC やタンジェンシャルフロー濾過などを組み合わせて単離・精製した。また、エクソソームの機能評価系として、軟骨細胞に対するエクソソームの増殖能、遊走能、細胞外基質合成能に着目し、これらアッセイ系の精度を評価した。その結果、ケモタキシスアッセイによる遊走能試験が、エクソソームのロット間差の評価において最も優れた評価系であることが明らかとなった。次に、脂肪由来 MSC (AD-MSC) 及び歯髄由来 MSC (DP-MSC) のエクソソームの遊走能をケモタキシスアッセイにより評価したところ、AD-MSC 由来エクソソームは DP-MSC 由来エクソソームと比較して高い遊走能活性を持つことが確認され、エクソソーム機能はその細胞ソースによって異なることも明らかとなった。さらに、このような遊走能活性を持つエクソソー

ムを分泌する細胞集団の特徴を明らかにするために、単一細胞 RNA-Seq (scRNA-Seq) 解析により AD-MSC のロット間における細胞集団の構成の違いを明確化し、これら scRNA-Seq 解析のデータおよびケモタキシスアッセイによって得られたロットごとのエクソソームの遊走能の違いに基づいた相関解析を実施した。その結果、遊走能促進活性をもつエクソソーム産生に寄与する AD-MSC の細胞集団の候補を特定することに成功した。以上の成果により、エクソソームの機能に影響を与える細胞基材の特性、すなわち Critical Material Attribute (CMA) の特定に向けた重要な知見を得ることができ、本成果はエクソソーム製剤の実用化に向けた基盤的知見としての活用が期待される。

(3) 研究開発項目 3 : エクソソームの薬理作用評価

エクソソームの薬理作用評価においては、ヒト MSC 由来エクソソーム製剤の薬理作用を、関節疾患をモデルとして多面的に評価する系の構築を進めた。in vitro では、初年度にヒト軟骨細胞を用いて、細胞増殖促進、遊走促進、アポトーシス抑制、細胞外基質合成促進といった関節組織修復に関連する作用を指標とした評価法を確立し、ヒト MSC 由来エクソソームの標的細胞に対する薬理効果を初期的に確認した。続いて、関節内の炎症環境に着目し、マクロファージ様細胞に対する抗炎症作用の評価系を構築し、炎症刺激に応答したサイトカイン分泌の抑制などの効果を明らかにした。これらの評価系は、他の研究分担機関にも技術移転され、施設間で共通の指標によるデータ取得が可能な体制を構築した。

一方、in vivo においては、国際的に広く用いられているコラゲナーゼ誘導性関節炎モデルを用いて、精製条件の異なる複数のエクソソーム製剤を投与し、関節組織における骨・軟骨破壊の抑制効果を指標とする薬理作用の定量的評価を行った。組織学的評価、滑膜炎スコア、軟骨損傷スコア、 μ CT による骨量評価などを統合した多面的な評価により、製剤の製造条件が治療効果に与える影響を定量的に把握する解析基盤が整備された。

これらの成果は、天然型エクソソーム製剤の薬理作用を標準的な評価系で捉える上で重要な前進であり、エクソソームの品質特性 (Critical Quality Attributes, CQA) と薬理活性との相関を明らかにする第一歩となった。特に、製造条件によるばらつきを薬理評価に反映させることが可能となった点は、製剤の一貫性確保と規制対応の観点から極めて重要である。今後は、得られた評価系を基盤として、CQA 候補となりうる含有分子 (miRNA、タンパク質など) の同定や、製造管理指針の策定、臨床応用に向けたエビデンスの蓄積に発展させていくことが期待される。

(4) 研究開発項目 4 : エクソソームの動態評価

本項目では、エクソソーム製剤、特に MSC 由来エクソソームの培養細胞における in vitro 動態ならびに生体内における in vivo 動態の評価を可能とする標識法の確立を目的とした検討を行った。発光標識体としてルシフェラーゼを選択し、これを細胞外小胞親和性ペプチドとの融合体とした新規融合タンパク質を設計し、これを用いた MSC 由来エクソソームの標識法を確立した。蛍光標識体の調製については、エクソソームをはじめとした細胞外小胞の蛍光染色に繁用される脂溶性蛍光色素である PKH 色素を用いることで、上記の評価に資する蛍光標識エクソソームの調製が可能であることを見出した。一方で、マウスを用いた in vivo 実験においては脱脂操作を伴うパラフィン切片での評価についても予定されていたため、脂溶性蛍光色素である PKH 色素の利用は困難と想定された。そこで、細胞外小胞内のタンパク質に特異的に反応する蛍光色素である ExoSparkler protein 色素を用いた MSC 由来エクソソームの標識法を確立した。確立した方法を用いて標識したエクソソームを投与したマウスでの検討を行い、蛍光の消失が観察された PKH 投与群とは異なり脱脂操作後も蛍光を維持していることを確認できた。確立した方法により調製した蛍光標識エクソソームを用いて、標的細胞と想定されたマクロファージによる MSC 由来エクソソームの取り込み機構を評価した。その結果、MSC

由来エクソソームはマクロピノサイトーシスならびにクラスリン依存性エンドサイトーシスを介してマクロファージに効率よく取り込まれることを明らかとした。また、MSC 由来エクソソームはすぐれた炎症性マクロファージに対して抗炎症能を発揮するが、この効果は細胞取り込みを介して発揮することを明らかとした。また、関節炎モデルマウスにおいて、投与された蛍光標識に由来するシグナルが、投与部位である膝関節内に存在することを観察できたことから、その薬理効果は投与部位局所において発揮される可能性を明らかとした。以上の検討を通じて、MSC 由来エクソソームの薬理活性と体内動態の関係性を明らかとするための基礎的知見を得ることができた。

(5) 研究開発項目 5：エクソソーム製剤の品質確保に関するガイドライン案作成

エクソソーム製剤の品質確保に関する留意事項を明らかにするため、産官学の専門家からなるワーキンググループ (WG) を構築した。WG での議論に際しては、上記の各分担研究で得られた実験研究及び調査の結果を基盤に、PMDA 科学委員会エクソソーム専門部会で作成された報告書を参照して検討を進めた。欧米規制当局の関係者との意見交換も行った。エクソソーム製剤が複雑な特性を有する新しいモダリティであり、基本的な要件を最初に示すことが重要との考えが WG 内で合意されたことから、現在までの開発の主流である天然型エクソソームを適用対象として、「ヒト細胞由来天然型細胞外小胞 (EV) を利用した医薬品の品質確保に関するガイドライン案」を作成した。

Summary

For the purpose of establishment of quality control strategy for therapeutic EV products, we conducted studies for development of evaluation methods for EV-producing cell substrates and EV products, and their pharmacological and pharmacokinetic evaluation was also performed using human mesenchymal stem cell-derived EV as a model. In addition to these experiments, we held a working group consisting of stakeholders from industry, government, and academia, and prepared a draft guideline for ensuring the quality of native therapeutic EV products.

(1) Quality evaluation of EV preparations

In order to characterize EV products, SE-HPLC and AEX-HPLC methods were established and applied for size distribution and charge distribution analysis. Flowcytometry and proteomics analysis revealed particle composition of EV samples and several marker proteins fluctuating between manufacturing batches. Lipidomics platform was also established for comprehensive quantification and profiling of lipids in extracellular vesicles, enabling the detection of over 200 species. This approach revealed distinct lipid compositions associated with different purification methods and highlighted inter-batch variability. In addition, we searched for a new index to evaluate the anti-inflammatory effect. CXCL10 was identified as a new indicator that can be evaluated over a wider dynamic range. In addition, a miRNA library screening revealed that 30 types of miRNAs exert anti-inflammatory effects.

(2) Cell substrate evaluation

This study aimed to clarify the relationship between the quality of therapeutic EV products and the characteristics of their EV-producing cell substrates. Using single-cell RNA-seq analysis, we identified the cell subpopulations potentially responsible for the efficacy of EVs. These findings

will provide important knowledge for the identification of the critical material attribute (CMA) of therapeutic EV products, *i.e.*, the characteristics of the cell substrate that affect the function of EVs.

(3) Pharmacological activity evaluation

This study aimed to establish a pharmacological evaluation system for hMSC-derived EVs using joint disease models. In vitro assays using chondrocytes and macrophage-like cells were developed to assess regenerative and anti-inflammatory effects. These systems were transferred to partner institutions for standardized evaluation. In vivo, EVs with different purification methods were administered in a mouse osteoarthritis model, and therapeutic effects on bone and cartilage were quantitatively assessed. The results contribute to identifying critical quality attributes (CQAs) and support regulatory strategies for EV-based therapeutics.

(4) Pharmacokinetics evaluation

In this section, we established a labeling method of MSC-derived EVs in order to evaluate the in vitro and in vivo pharmacokinetics of MSC-derived EVs. We have succeeded in establishing methods to label MSC-derived EVs with fluorescent or luminescent probes. By using the labeled EVs, we have shown that anti-inflammatory effect of MSC-derived EVs on inflammatory macrophages was exerted through cellular uptake. Moreover, by using arthritis model mice, we found that MSC-derived EVs exerted therapeutic effect probably through the uptake by cells in knee joint.

(5) Draft guideline preparation

A working group consisting of industry, government and academia experts was organized to discuss points to consider regarding quality assurance of exosome formulations. Based on the research results described above and report from PMDA expert committee of EVs, "Draft Guideline for Ensuring the Quality of Therapeutic Native EV products derived from Human Cells" was established.