

平成27年度－平成28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	自己軟骨細胞シートのための統合的評価手法の開発
研究開発代表者 所属 役職 氏名	株式会社DNAチップ研究所 代表取締役社長 的場 亮

目次

1. 事業の目的
2. 実施内容及び結果
3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容
4. まとめ

1. 事業の目的

変形性膝関節症は国内だけで約 2,500 万人以上と推定されており、国民健康寿命や介護費、医療費を考えると、喫緊に対処すべき非常に重要な疾患である。その解決手段として、東海大学医学部において、ヒト幹細胞指針に基づく臨床研究「自己軟骨細胞シートによる関節軟骨再生治療」を実施しており、8 例の自己細胞シートの移植を行い、術後の 1 年間フォローアップを終了、全症例で重篤な有害事象は認められず、この治療の安全性と有効性について確認している。この治療法の特徴は、欠損部分を積層化細胞シートでカバーするだけで、欠損部に誘導された骨髄液中の幹細胞が軟骨に分化することにより、通常の軟骨細胞移植で不可能であった硝子軟骨による修復が可能となる。本事業では、この臨床研究において使用される「自己軟骨細胞シート」について、安全性、有効性に関する指標を示すための品質評価用パネルの作成と、それを用いたデータを取得し、データベースを構築するとともに、多変量解析から移植時の指標を設定することを目的とした（図 1）。

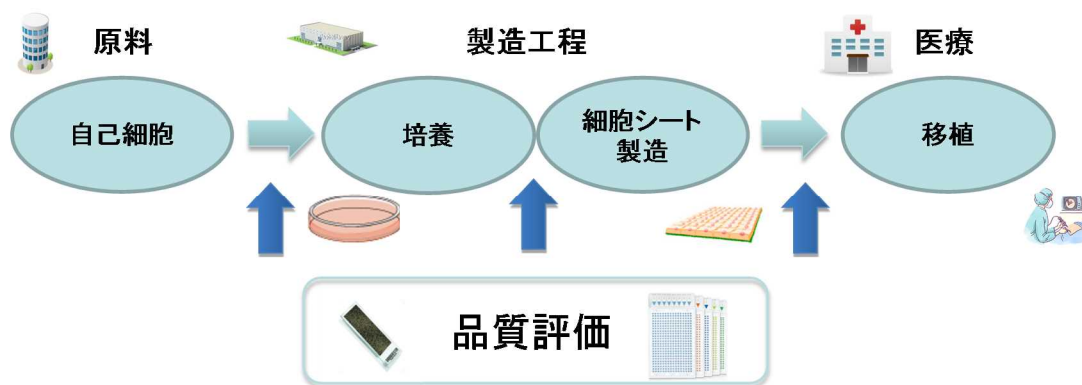


図 1 自己軟骨細胞シート（最終製品）の品質評価のスキーム

2. 実施内容及び結果

(1) 品質評価用パネルの作成とそれを用いた性能試験

軟骨細胞シートの性能を評価する上で重要と思われる遺伝子とコントロール遺伝子を含む候補遺伝子群について、データベースより最適と思われるプライマー/プローブセットをデザインし、軟骨細胞及び幹細胞から抽出した mRNA を用いて RT-PCR の確認実験を行った。その結果、安定して測定が可能な 47 遺伝子を選択し品質評価用カスタムパネルを作成した。

次に、遺伝子発現の微量解析系を確立するために、増幅系の検討を行った。具体的には、微量 RNA を用いて増幅を行った後、RT-PCR により発現解析を行い、増幅しない RNA を用いて RT-PCR を行った結果と比較検討した。その結果、前述のパネルに搭載されている遺伝子群について、微量な軟骨細胞シートサンプルから抽出した RNA から増幅プロトコルを用いても、バイアスなく遺伝子発現解析が可能な系を確立することができた。

続いて、東海大学医学部で実施された自己軟骨細胞シートによる関節軟骨再生治療症例について、前述の品質評価パネルを用いて増幅プロトコルによる遺伝子発現データの取得を行った。

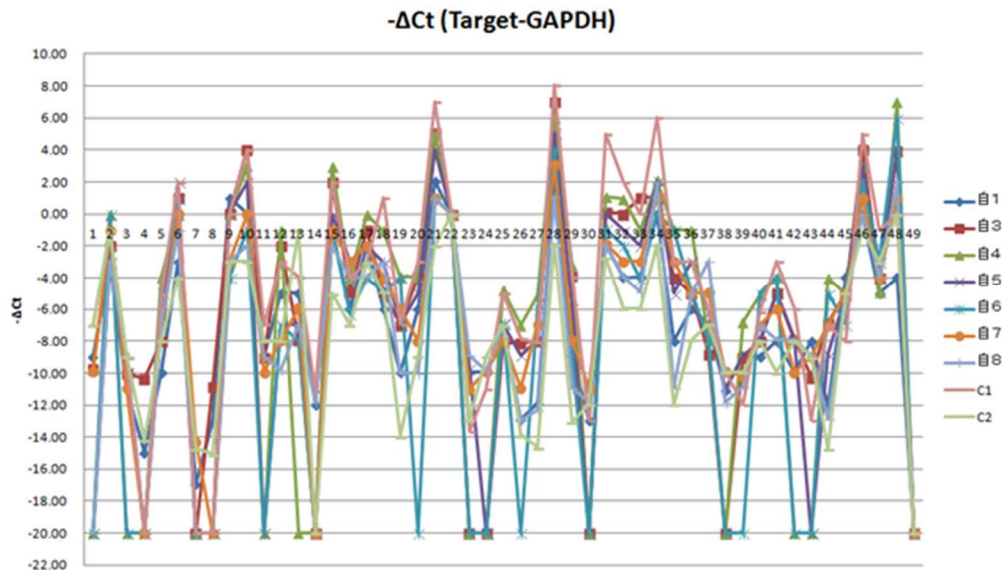


図2 自己軟骨細胞シート発現データ

(2) 細胞シート（最終製品）の製造工程における品質評価

自己軟骨細胞シート製造で使用する酵素に関して、生物由来原料基準に準拠した酵素への切り替えを試みた。ヒトの軟骨・滑膜組織を用いて東海大学の臨床研究で使用されていた酵素と組織分散比較試験を行った結果、切り替え予定の酵素処理で同等もしくはより多くの生細胞を回収することができた。また、切り替え予定酵素から作製した細胞シートが臨床研究時と同等の特性を示すことを確認した。

次に、製造工程内で実施するマイコプラズマ否定試験に関して、バリデーション試験を行った。試験は第十七改正日本薬局方に例示されている方法に則り、7種の試験用菌株を予め試験検体に接種させ、NAT法を用いて検体中から検出可能であるか確認することを目的に実施した。その結果、7種すべての菌種について目標とする感度 10 CFU/mL を確認することができた。

名称	株
<i>Mycoplasma orale</i>	ATCC 23714, NBRC 14477又は同等の株
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC 15531, NBRC 14401又は同等の株
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	ATCC 17981, NBRC 14858又は同等の株
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	ATCC 23206, NBRC 14400又は同等の株
<i>Mycoplasma fermentans</i>	ATCC 19989, NBRC 14854又は同等の株
<i>Mycoplasma salivarium</i>	ATCC 23064, NBRC 14478又は同等の株
<i>Mycoplasma arginini</i>	ATCC 23838又は同等の株

図3 マイコプラズマ否定試験において検出できた菌種

(3) 細胞シート（最終製品）の性能試験

データベースに統合する項目の選定を行い、患者背景情報のデータ項目、細胞シートの臨床的品質の指標（Lysholm score および J-KOOS の術前、術後フォローアップデータ）を選定した。また、細胞シートの機能評価項目として、前述の遺伝子発現の他、栄養因子産生能、力学的物性試験、表面マーカー発現解析、細胞数、生細胞率測定および組織学的解析（組織染色、免疫染色）等を選定し、各プロトコルを確定した。さらに、それらの項目について実際の軟骨細胞シートのデータを取得し、後述のデー

データベースへ格納した。続いて、新規の細胞シート症例について、同様に細胞機能評価を行うとともに、遺伝子パネルデータも合わせて統合的解析を行った。

(4) データベース作成

データベースの構造は取得するデータセット項目を整理し、対応するサンプルセットとそれに付随する測定条件を紐づけする形で、「測定対象」 x 「サンプル」のマトリックスを測定データとした。また「測定対象」の中には複数の測定タイプが存在するので、データ参照における測定対象の指定、及び、測定対象の異なる測定対象セット間でのデータ比較を可能とするようにデザインを行った。一方、「サンプル」は測定セット毎に、サンプルタイプ、サンプル情報、サンプル ID 等の情報を持ち、将来の匿名化を見据えて、「対象サンプルマスター」を割り振り、独立したシステム管理ができるようにデザインした。

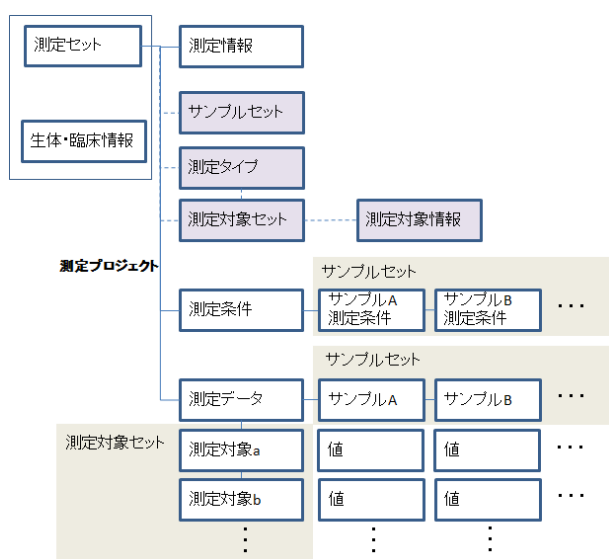


図4 データベース構造デザイン

得られたデータについて、遺伝子パネルによる遺伝子発現情報、細胞特性情報、臨床評価情報をデータベースへ格納した。入力生データで、データベース上で様々な解析可能な仕様になっている。それぞれの測定データがサンプル毎に数値及び図表で表示されることが可能となっている。さらに、対象となるデータやサンプルの絞り込み、ソート機能により、遺伝子発現量と細胞特性情報及び臨床評価情報との相関解析が可能となった。解析の結果、臨床成績スコアと高い相関をもつ遺伝子発現マーカーを同定することに成功した。

(5) 薬事戦略相談

品質に係る対面助言および対面助言後面談を実施し、現時点の自己軟骨細胞シートの特性解析結果から複数の出荷項目を設定することで合意を得た。

3. 評価手法等の開発・製造工程合理化のための検討内容

本事業では、自己軟骨細胞シートについて安全性、有効性に関する指標を設定することを目的としている。これまでの研究開発において、安全性についていくつかの指標が示されつつあるが、有効性については皆無であった。この問題を解決するために、品質評価遺伝子パネルを作成しデータを取得するとともに、様々な細胞情報と実験条件情報、外部データベースを取り入れた解析・数値実行データベースを構築することにより、移植前の細胞シートの遺伝子パネル解析情報から、移植後の有効性予測をおこなうシステムを構築した。本事業で開発したデータベースは、検証と再現が可能なシステム構築を行うことにより精度を向上させ、付加価値の高いデータを提供可能とすると同時に、細胞データの利用・評価におけるデータ処理の基準を提供している。

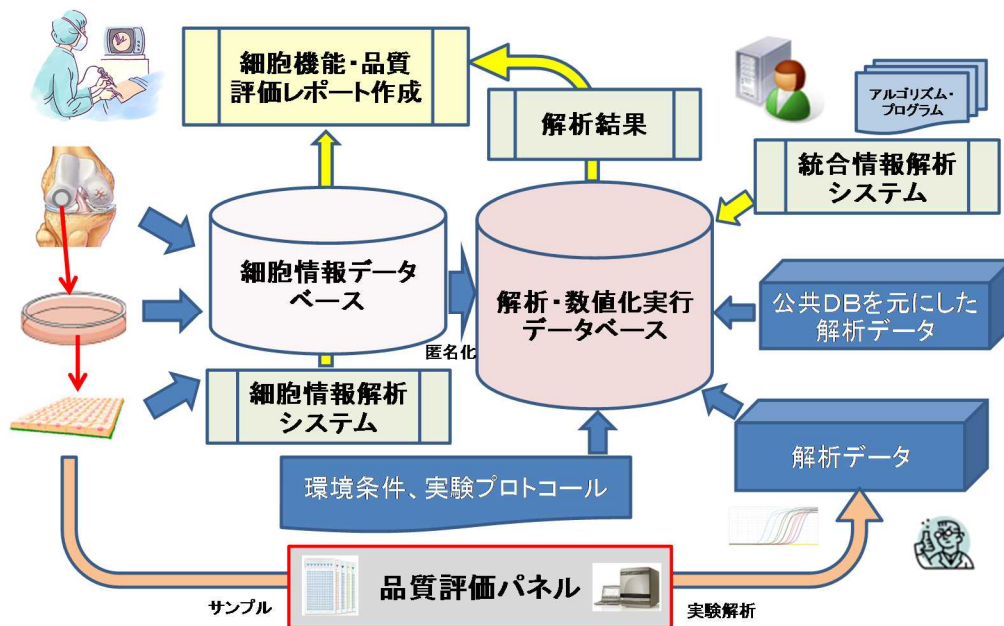


図5 統合的評価手法システム

また、本事業期間中に薬事戦略相談を複数回おこない、品質に係る対面助言後面談について、承認申請時までに幅広く特性解析データを収集し、有効性を示す出荷項目の設定を検討するように助言を受け、移植済症例について追加解析を行い、データを取得した。

4. まとめ

本事業では、軟骨細胞シートを評価するための遺伝子パネルを作製し、それをを用いた解析を行うことによって、自家移植評価での有効性予測が可能であることを確認した。この遺伝子パネルは、自己軟骨細胞シートの品質評価だけでなく、同種軟骨細胞シートにも応用できるものである。また、このような開発プロセスは、軟骨細胞シートだけでなく、様々な種類に細胞を対象とした再生医療等製品の開発に、共通のプロトコールを提供できると思われる。さらに、得られたデータは品質評価として用いられるだけでなく、軟骨細胞シート作製時の分子メカニズム解明にも貢献すると考えられる。

また、実験データ、臨床情報を統合するためのデータベース、それらを解析するためのアプリケーションシステムを構築した。このシステムは、データベースを利用して、細胞シートの機能と遺伝子マーカー群との関連解析を行い、コアとなるマーカー測定のみで、細胞シートの機能的品質を予測、評価を

可能にしている。今後、情報の蓄積が進めば、様々な再生医療分野における細胞品質評価システムを構築できると思われる。