

平成27年度

再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業

(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開発事業 (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	加工ヒト細胞包埋製剤を用いた非臨床試験
研究開発担当者 所属 役職 氏名	セルジェンテック株式会社 代表取締役 社長 麻生 雅是

目次

1. 事業の目的.....	1
1) 背景.....	1
2) 既存法の問題点.....	1
3) 既存法の問題点を解決する新規評価手法.....	1
4) 研究開発の目的.....	2
2. 実施内容及び結果.....	4
1) LCAT 病態モデルの繁殖.....	4
2) hLCAT-hccdPA の GCTP 製造と細胞の包埋化.....	4
3) 細胞包埋製剤からの細胞の抽出・単離法の確立と細胞包埋製剤の特性解析.....	5
4) 細胞包埋製剤を用いた有効性評価.....	6
5) 細胞包埋製剤を用いた安全性評価.....	8
3. 評価手法等の開発のための検討内容.....	9
4. まとめ.....	10

1. 事業の目的

1) 背景

セルジェンテック株式会社は、千葉大学と家族性レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) 欠損症治療用のヒト LCAT 遺伝子導入ヒト増殖型脂肪細胞 (以下「hLCAT-hccdPA」) の細胞医薬品開発を行っている。その臨床評価に向けて平成 25 年 5 月に厚生労働省より遺伝子治療臨床研究の実施承認を受けているが、再生医療等安全性確保法の施行にともない第一種再生医療等臨床研究の実施に向け手続を行っている。また医薬品実用化に向けて、治験の実施準備を適切に行うべく医薬品医療機器総合機構 (PMDA) との事前面談を終え、平成 28 年に品質と非臨床試験に関する対面助言を計画している。

2) 既存法の問題点

生体へ移植された細胞医薬品は、移植部位での虚血・貧栄養状態や免疫・炎症反応の暴露に耐えた細胞がその薬効を発揮すると考えられる。加工ヒト細胞医薬品の薬効や安全性評価およびヒトでの臨床用量の推定ではその至適用量の検討が必須であるが、細胞医薬品の薬効やその発現過程を考慮した場合、非臨床試験における加工ヒト細胞の移植後の性能や生細胞数含む生着情報などが必須となる。ヒト細胞医薬品の薬効を検討する場合、現状では、ヒト細胞と性能が必ずしも一致しない非ヒト細胞の病態モデルへの移植による薬効・様式の検討、また安全性を評価する場合は、特殊な動物や環境下 (免疫不全動物の活用) における安全性の推定が行われている。これら既存の評価手法は、加工ヒト細胞医薬品の薬効評価や安全性評価において、医薬品の非臨床評価の指針とは異なる新たな評価技術の開発を提起している。

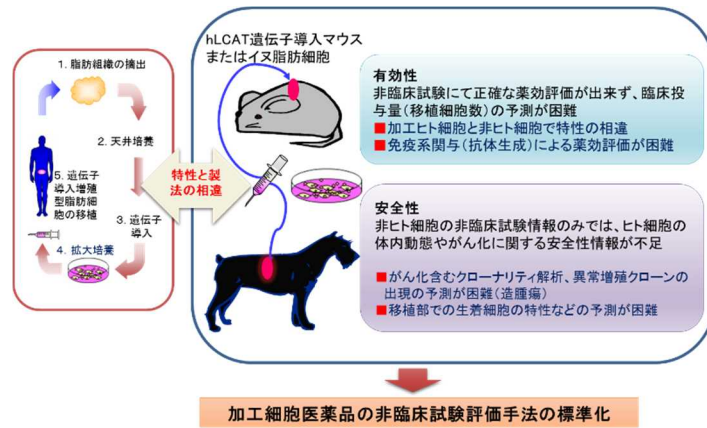


図 1. 再生医療等製品の上市に向けた既存の問題点

3) 既存法の問題点を解決する新規評価手法

生体内の攻撃因子から移植細胞を保護しつつ、栄養因子および薬効因子を相互に透過しうる半透膜素材内にヒト細胞を包埋できれば、病態モデルでの移植薬効評価試験においても実際のヒト細胞医薬品を移植し、評価することが可能となる。さらに、包埋移植細胞の生存率 (生着率) と持続的薬効の相関が正確に把握できるため、その評価において移植細胞数の把握はより正確となる。平成 26 年度「再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業 (再

生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発)」において hLCAT-hccdPA の細胞包埋製剤 (図 2) を用い、加工ヒト脂肪細胞の包埋製剤内での生存、LCAT の持続分泌、新規薬効評価モデルの作製とその病態モデルへの移植により薬効の探索的確認が行えたことから、中空糸包埋化によって免疫機構から排除された加工ヒト脂肪細胞の異種動物への移植後の薬効評価など病態モデルにおける加工ヒト脂肪細胞の直接的評価を行うための基盤技術の確立に見通しが立った。

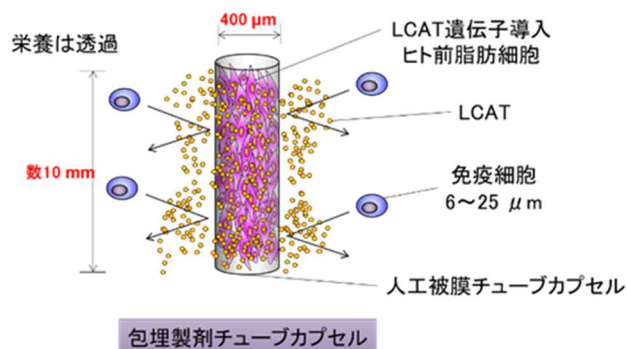


図 2. 包埋製剤チューブカプセルの概念図

本評価技術は分泌タンパク質による治療効果を狙う加工細胞医薬品、例えば、遺伝子導入細胞、間葉系幹細胞、組織細胞などを用いて生体局所に移植し、生着をはかる局所機能発現型の加工ヒト細胞医薬品の薬効評価系に応用できる。ヒト細胞の包埋化により正常動物の異種由来細胞に対する免疫応答を回避できることから、実験動物におけるがん化などの造腫瘍性試験が可能となりより精度の高い安全性の予測が可能となる。以上、本事業で提案する加工ヒト脂肪細胞自体の異種動物への移植による薬効薬理、安全性評価に関する基盤技術は、ヒト細胞の再生医療医薬品の非臨床試験評価に貢献するものである。付加価値としては免疫学的影響を受けにくいという細胞の包埋化製剤技術は、均一な品質規格と薬効・安全特性を有する他家由来細胞の製剤化を可能とし、生産効率の向上や製剤安定供給を図る産業上のメリットと重篤な遺伝性希少疾患から糖尿病を含む慢性疾患等の幅広い疾患への適応が期待できる。

包埋化する細胞医薬品は再生医療ならびに遺伝子治療に関わる規制に基づき開発を進めているが、包埋製剤としての展開を踏まえ、「医療機器の製造販売承認申請等に必要なる生物学的安全性評価の基本的考え方について (平成 24 年 3 月 1 日 薬食機発 0301 第 20 号)」に基づき複数の半透膜素材を用いて評価・検討した。

4) 研究開発の目的

以上の背景から、本事業では、細胞医薬品「hLCAT-hccdPA」の非臨床試験の課題と臨床での有効性および安全性の推定に関するリスク分析を行い、加工ヒト細胞医薬品全般の障壁となる非臨床試験における有効性および安全性の推定・課題に関する以下の検討を通じて、我が国の再生医療等製品等の優れた技術シーズの製品化を促進させるべく、承認審査、適合性評価等に当たって事業者が示すべき安全性等の論拠の作成に資する評価項目やその基準値等を明確に

し、合理的な評価手法を開発することによって、製品化されつつある後続の再生医療等製品等の実用化基盤を整備することを目的とした。

- i. 細胞包埋製剤からの細胞の抽出・単離法の確立と細胞包埋製剤の特性解析
酵素または非酵素的に中空糸を分解処理、手術用メスで細断した細胞包埋製剤を酵素処理するなどして hLCAT-hccdPA の抽出・単離法の確立を試みた。得られた hLCAT-hccdPA について特性解析を行った。
- ii. 細胞包埋製剤を用いた有効性評価
hApoA-I 発現 LCAT ノックアウトマウスに hLCAT-hccdPA 包埋製剤（低用量群と高用量群）を単回移植し、血中 hLCAT 分泌、血中リポ蛋白プロファイル（VLDL、LDL 及び HDL の詳細分画、コレステロール、中性脂肪及びリン脂質など）の分析、及び細胞包埋製剤中の細胞生存率を経過時的に確認した。これらの結果を総合的に評価し、家族性 LCAT 欠損症への hLCAT-hccdPA 移植用製剤の有効用量（最適な移植細胞数あるいは範囲）を予測しえた。
- iii. 細胞包埋製剤を用いた安全性評価
B6 マウスに hLCAT-hccdPA 包埋製剤を単回移植し、細胞包埋製剤中のクローナリティ解析や異常クローン検出、がん化、細胞生存様式を経時的に確認した。

2. 実施内容及び結果

1) LCAT 病態モデルの繁殖

① 実施内容

hLCAT のヒトでの酵素作用をより正確に反映する新規病態マウス「hApoA-I 発現 LCAT ノックアウトマウス」の系統を維持しつつ、有効性評価の検討（項目 4）の実施に必要な匹数まで繁殖した。

② 実施方法

千葉大学が創製した hApoA-I 発現 LCAT-KO マウスの繁殖計画を作成し、繁殖で得られたマウスの遺伝子解析結果から本系統の維持を本事業期間中の確認を行った。また、系統維持の観点から必要に応じて戻し交配の必要性について検討した。

③ 実施結果

hApoA-I 発現 LCAT-KO マウスを計画交配し、有効性評価の実施に必要な匹数 80 匹（雄性、9 週齢）まで繁殖・飼育した。

2) hLCAT-hccdPA の GCTP 製造と細胞の包埋化

① 実施内容

健常人から採取したヒト脂肪細胞から次項 3)～5) に使用する hLCAT-hccdPA を GCTP 製造した。得られた hLCAT-hccdPA を中空糸に包埋・封入した包埋製剤を製造した。

② 実施方法

健常成人ボランティアから脂肪細胞を摘出し、図 3（1～6）に基づく GCTP 製造を行った。得られた hLCAT-hccdPA を中空糸に包埋した。

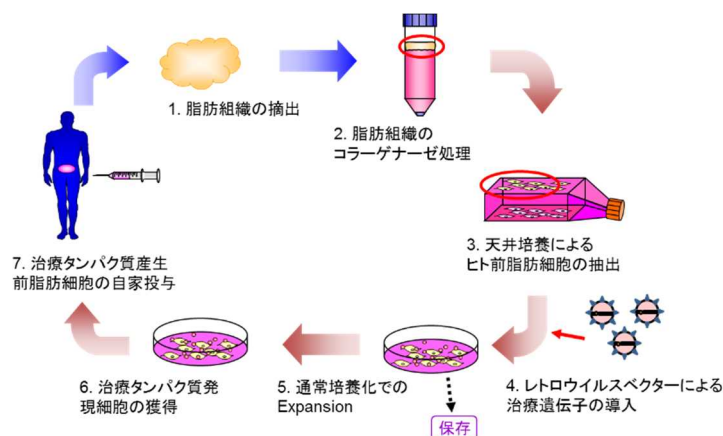


図 3. hLCAT-hccdPA を GCTP 製造の概要

③ 実施結果

次項 3)～5) の実施に必要な包埋製剤を製造できた。

3) 細胞包埋製剤からの細胞の抽出・単離法の確立と細胞包埋製剤の特性解析

① 実施内容

細胞包埋製剤を酵素処理後、シリンジで加圧することで包埋製剤からの hLCAT-hccdPA の抽出・単離法を確立した。DNA 量が残存細胞数の指標となることを確認した。

② 実施方法

酵素（セルロース分解酵素など）または非酵素（クエン酸など）的に中空糸を分解処理あるいは手術用メスで細断した細胞包埋製剤を酵素処理（コラゲナーゼなど）した。さらに摘出した包埋製剤を酵素処理したのち中空糸の一端から PBS を加圧注入し残存細胞の抽出・単離が可能かを検討した。

得られた hLCAT-hccdPA について NucleoCounter® につけ残存生細胞数を、また DNA を抽出し DNA 量を測定した。

③ 実施結果

中空糸内の hLCAT-hccdPA は凝集状態にあるため細胞包埋製剤を酵素処理後、シリンジで中空糸の一端を加圧する hLCAT-hccdPA の抽出・単離法を確立できた（図 4）。

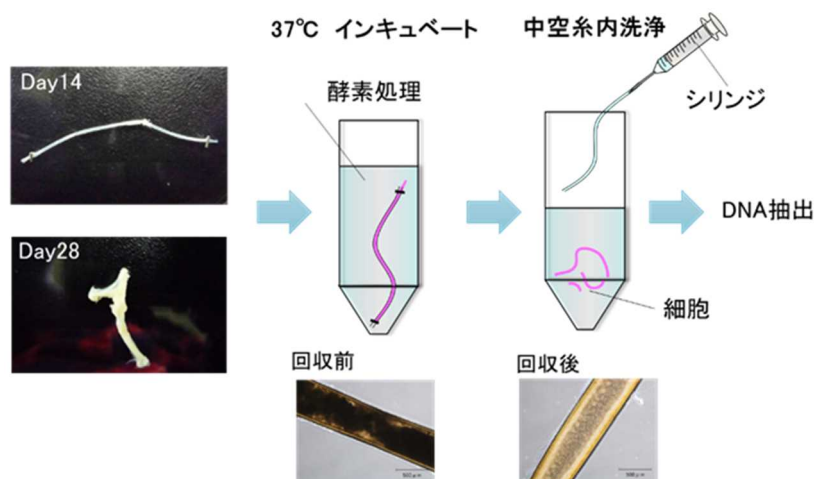


図 4. 中空糸からの細胞回収

本法を用いて包埋製剤のシャーレ内で培養 (*in vitro*) および LCAT 欠損症マウスへの移植後 (*in vivo*) の細胞残存率を経時的に測定できた (図 5)。

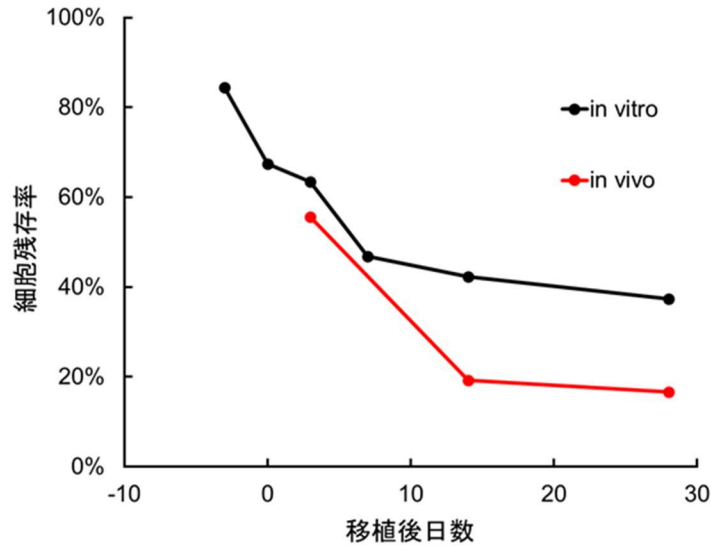


図 5. 包埋製剤中の hLCAT-hccdPA の残存率の経時変化

4) 細胞包埋製剤を用いた有効性評価

① 実施内容

hApoA-I 発現 LCAT ノックアウトマウスに hLCAT-hccdPA を包埋した中空糸を単回移植し、血中 LCAT 分泌と各種脂質プロファイルの改善効果を検討した。

② 実施方法

hApoA-I 発現 LCAT ノックアウトマウスに hLCAT-hccdPA 包埋製剤（低用量群と高用量群）を単回移植し、血中 hLCAT 分泌、血中リポ蛋白プロファイル（VLDL、LDL 及び HDL の詳細分画、コレステロール、中性脂肪及びリン脂質など）の分析、及び細胞包埋製剤中の細胞生存率を経時的に観察した。

③ 実施結果

血中 hLCAT 分泌は移植 7 日後まで観察され（図 6）、これと並行して血中コレステロールエステル化率の改善が認められた（図 7）。

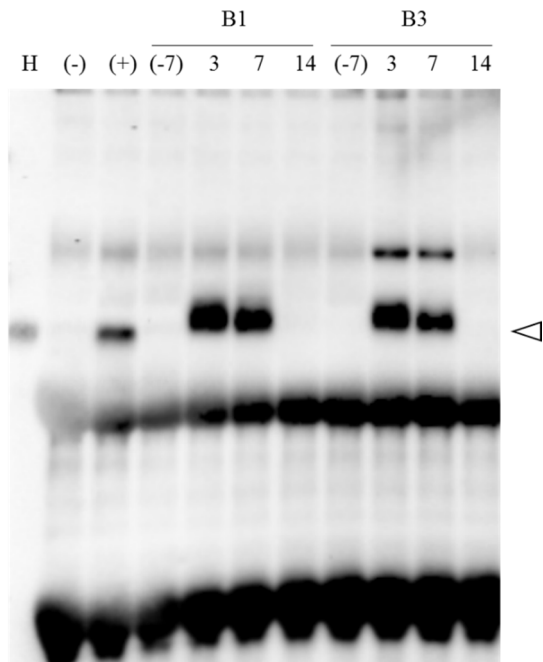


図 6. 病態モデルマウスへの包埋 hLCAT-hccdPA の移植後の血中 LCAT 分泌
 H : HDL ; (-) : hApoA-I 発現 LCAT ノックアウトマウスの血液 ; (+) : hApoA-I 発現 LCAT ノックアウトマウスの血液 + HDL ; B1 及び B3 : hLCAT-hccdPA 封入中空糸を移植した病態モデルマウスの血清 ; \triangle : LCAT ; (-7), 3, 7, 14 : 移植後日数

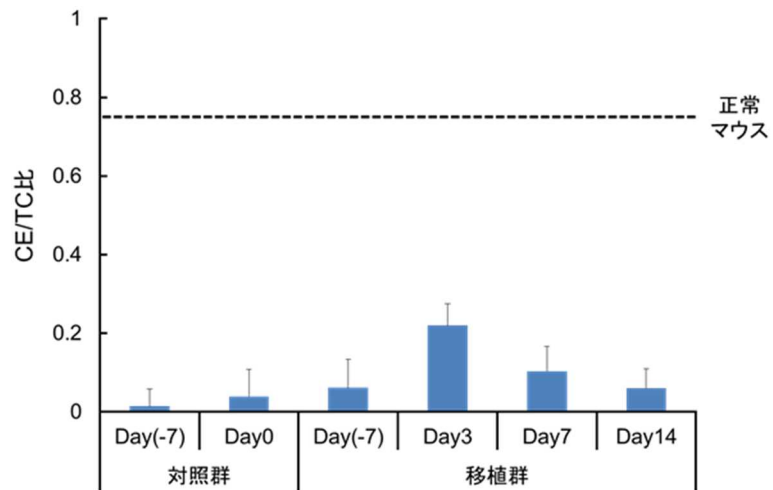


図 7. 血中コレステロールエステル化率の改善
 正常マウス : 正常マウスにおける CE/TC 比を示す
 CE : コレステロールエステル ; TC : 総コレステロール

5) 細胞包埋製剤を用いた安全性評価

① 実施内容

B6 マウスに hLCAT-hccdPA 包埋製剤を移植し、マウスの体重・一般状態、細胞包埋製剤中の細胞の形態変化などを経時的に観察し包埋製剤の安全性を検討した。

② 実施方法

B6 マウスに hLCAT-hccdPA 包埋製剤を単回移植し、マウスの体重・一般状態、細胞包埋製剤中の細胞の形態変化、細胞生存率を経時的に観察した。

③ 実施結果

移植後 3 ヶ月目に一部の中空糸の細胞残存率が 5%を下回ったため試験を中止した。中止時までには体重・一般状態における異常、クローナリティ異常は認められず、包埋製剤の安全性を検討することができた。

3. 評価手法等の開発のための検討内容

加工ヒト細胞の実験動物への異種移植は移植細胞に対する免疫反応のため有効性や安全性を評価は困難でありまたマウスやイヌなどの非ヒト由来の加工細胞は加工ヒト細胞と細胞特性が異なるため加工ヒト細胞の有効性や安全性を外挿しているとは言い難い。免疫不全動物において持続的な生着率の向上が期待できない加工ヒト細胞ではがん化やクローナリティ異常を検討する長期安全性評価試験は困難である。このような背景から加工ヒト細胞の非臨床試験では適切な有効性および安全性評価モデルの確立が求められてきた。

研究開発者は、hLCAT-hccdPA を、免疫系関与を受けない中空糸に包埋する技術、中空糸からの包埋細胞の抽出・単離および DNA 量からの残存細胞数の測定技術を用いて、加工ヒト細胞の正常免疫マウスでの生存と安全性ならびに病態モデルマウスにおける加工ヒト細胞の薬効を確認できた。

本研究成果は加工ヒト細胞を中空糸に包埋し実験動物に移植することで上記問題点を解決できる新たな有効性ならびに安全性評価手法と製品化されつつある後続の再生医療等製品等の実用化基盤の整備を提示できた。

4. まとめ

本事業では、hLCAT-hccdPA およびその移植用製剤の移植後の生着、生存様式の変化、安全性、薬効の把握を、包埋下した加工ヒト脂肪細胞を作製し、正常免疫機能を有する非ヒト動物（マウス）あるいは病態モデル動物へ移植評価することで、移植製剤の用法・用量の設定の妥当性、薬効を裏付ける移植細胞数の設定、また移植後の加工ヒト脂肪細胞の特性変化や安全性などの情報を把握する。

本事業で培った中空糸包埋技術を用いた評価技術は、概して局所移植を目論む加工ヒト細胞製剤の生着良好な条件や性能の発揮条件、安全性を適切に把握できる技術で以下のような長所をもつ。

加工ヒト細胞の包埋化技術を用いる利点

① *in vitro* 系

加工ヒト脂肪細胞の生存（生着）や特性変化、LCAT の分泌特性を把握できる。

② *in vivo* 系

- ・ 正常免疫動物への移植細胞の生着率は免疫不全動物における移植細胞の生着率より高い
- ・ 正常免疫動物または病態モデル動物において、包埋した加工ヒト脂肪細胞を移植することで、免疫排除されずに製剤の LCAT の分泌特性の把握と薬効の検出、細胞の生存や特性変化の把握、クローナリティ異常などのがん化や細胞形態の変化を把握できる。

上記の長所を踏まえ、今後は hLCAT-hccdPA をはじめ他のヒト細胞を用いた移植用製剤の開発の評価技術として論文等の公表化を通じて後続企業への技術情報の共有を図る。