

平成25年度 再生医療等産業化促進事業
(急性移植片対宿主病、ヒト間葉系幹細胞を
用いた細胞性医薬品)

報告書

平成26年3月

委託元 経済産業省

委託先 JCRファーマ株式会社

目次

1.	事業内容及び実績	2
(1)	臨床試験	2
(2)	医薬品製造販売承認申請	4
(3)	安全性の高い細胞培養方法の構築 (動物由来成分不含)	4
(4)	新規細胞ソースの探索	6
2.	本事業の評価	8
3.	まとめと今後の課題	8

1. 事業内容及び実績

受託者は、他家ヒト間葉系幹細胞による急性移植片対宿主病に対する細胞性医薬品（以降、JR-031 とする。）の開発を行っている。現在、臨床第Ⅱ／Ⅲ相試験を行っているところであり、製造販売承認を得られれば、日本初の他家細胞による細胞性医薬品を上市することとなる。化学合成品と異なり、生細胞を医療応用するため、申請資料における製品規格の策定方法、的確な有効性、安全性の提示方法、市販後の安全性情報の収集項目、集計方法に適切な前例がない。また事業の持続性の観点から原材料確保が不可欠であり、培養法の更なる改善が求められる。

本事業においては、様々な検討を行い、本製品のみならず、同種の再生医療製品等が抱える課題を解決し、規制当局の円滑な審査に資することを旨とした評価手法の開発を行った。また、有効性や安全性を確保しつつ、より効率的な製造工程を模索するため、現状よりもコスト削減や安定的供給等を実現する機器類や培地・試薬等を用いた製造についても、検証等を行った。

(1) 臨床試験

[計画]

従来の医薬品と違って生きた細胞を投与するため、臨床試験では、投与時および投与後の新たな安全性評価を組み込んだ評価手法を用いる。これにより、細胞性医薬品の新たな評価手法を提示できる。

本年度中に、JR-031 を医薬品として評価するための臨床試験を実施し、臨床データの取りまとめ及び解析を行って評価する。

[実績]

同種造血幹細胞移植（骨髄移植、末梢血幹細胞移植、臍帯血移植）を受けた後に、急性 GVHD を発症し、副腎皮質ステロイド剤による GVHD 治療に抵抗性を示したグレードⅢ～Ⅳの急性 GVHD 患者に対して、治験薬 JR-031 を投与し、その有効性及び安全性を確認する臨床試験（「同種造血幹細胞移植後に発症したステロイド抵抗性の急性移植片対宿主病（急性 GVHD）に対する JR-031 投与の第Ⅱ／Ⅲ相試験」）を実施した。試験計画は UMIN に開示（UMIN000006719）し、この試験に、JR-031（間葉系幹細胞）の安全性の新たな評価指標として、①細胞投与に伴う輸注毒性評価、特に肺への集積による SPO2 低下のモニタリング、②多分化能を有する幹細胞投与に伴う異所性組織形成評価として、定期的胸腹部レントゲン撮影を組み込んだ。今年度の事業としては、当該試験のモニタリング、臨床データの取りまとめ及び解析を行った。

治験実施計画書への記載は以下の通りであった。

① 細胞投与時の輸注毒性

- JR-031 の投与は、治験責任医師又は治験分担医師が直接、あるいはその管理下で実施し、呼吸状態、バイタルサイン（脈拍数、体温、血圧、呼吸数）、経皮酸素飽和度等により被験者の状態を継続して観察する。

- 治験責任医師又は治験分担医師は、治験薬の投与中に、処置を必要とするような呼吸状態の悪化やバイタルサインの変化、経皮酸素飽和度の低下等が確認され、その発生が治験薬の投与に関連すると判断した場合は、直ちに投与を中止する。その他、治験薬の投与に関連すると判断する有害事象があった場合も、治験責任医師の判断により投与を中止することができる。これら有害事象が発現した場合には、直ちに適切な処置を行い、被験者の安全を確保する。治験依頼者は、必要に応じて医学専門家と協議を行い、実施医療機関等への連絡等や治験の継続及び中止の判断が適切に行われるような体制を確保する。
- 治験薬の各投与時において、投与開始 30 分以上前から投与後 30 分まで持続モニターを行う。投与開始前（-60~0 分）、投与開始直後（0~5 分）、15 分（± 5 分）、30 分（± 5 分）、1 時間（± 15 分）、2 時間（± 15 分）、4 時間（± 30 分）、6 時間（± 30 分）、24 時間（± 60 分）の値を記録し、測定開始時間とともに症例報告書に記載する。

② 異所性組織形成

- JR-031 は間葉系の幹細胞であり、培養条件によっては骨、軟骨、脂肪細胞などに分化することから、異所性組織形成について確認するため、胸腹部レントゲン撮影を行うこととした。
- 胸腹部レントゲン撮影
初回投与時（治験薬投与前）、4 週後、24 週後、52 週後に実施し、異所性所見の有無（有の場合はその内容及び有害事象に該当するか否か）を症例報告書に記載する。治験の中止時又は以降の治験薬の投与中止時にも実施する。

その結果、被験者 25 例全例で輸注毒性および異所性組織形成は認められなかった。しかしながら、これらの指標は、今後の細胞性医薬品の新たな安全性評価指標として有用と考えられた。なお、本試験結果は、第 36 回日本造血細胞移植学会総会（平成 26 年 3 月 7-9 日）において発表された。

なお、有識者による本事業へのご意見として、「輸注毒性について検討しているが、臍帯血で問題となっている点についても考察をしたほうがよい」との助言を得たので、以下に考察する。

臍帯血移植では、造血幹細胞を静脈から輸注するが、輸注された細胞は右心系から肺に行き、肺の毛細血管に一度はトラップされ、その後、全身に行きわたるとされており、JR-031 と同様である。また、輸注時の副作用として、低血圧、発疹、呼吸困難、などが認められることがあるので、輸注前約 30 分に患者に抗ヒスタミン剤やステロイド剤（コハク酸ヒドロコルチゾンで 100~200mg など）を投与するとされており、これも JR-031 の投与前処置と同じである。以上のように、輸注毒性については、現在広く行われている臍帯血移植の問題点とよく一致しており、細胞投与の留意点として重要

であると考えられた。

(2) 医薬品製造販売承認申請

[計画]

独立行政法人医薬品医療機器総合機構(以下、PMDA とする。)と相談を重ねた上で、製剤、非臨床、臨床試験のデータを整え、本年度中に製造販売承認申請を行う。

さらに、海外からの情報を参考に、PMDA との申請前相談を実施し、国内における製品規格の策定方法、非臨床、臨床試験の有効性、安全性の提示方法、市販後計画を確立し、追加解析等を実施し、申請資料を完成させる。

これにより、細胞性医薬品に必要な具体的な品質、安全性基準を提示する。

[実績]

今年度の事業としては、国内2試験(UMIN試験ID: UMIN000001716 及び UMIN000006719)の統合解析を行い、JR-031の臨床的有用性を評価し、申請資料(CTD)案を作成した。予定通り、11月22日にPMDAに対し、申請前相談を申込み、12月6日に申請資料(CTD)案等の資料を搬入しレビューを受けた。

現在、PMDAと事前面談を重ねており、国内初の細胞性医薬品の申請資料の構成等について検討を継続中である。そのため、具体的な基準は確定段階ではないが、解析の結果、輸注毒性、異所性組織形成が強く疑われる事象は国内外を問わず認められず、また、発生した場合、临床上重大な影響が懸念されることから、これらの評価を実施し、安全性を確認することは重要な基準となると考えられた。当該申請資料(CTD)は、承認後公表される予定であり、細胞性医薬品の申請要件についての具体的な例示となる予定である。

(3) 安全性の高い細胞培養方法の構築(動物由来成分不含)

現在JR-031の製造で用いている培地は海外から輸入しており、当該培地に添加するウシ胎児由来血清はニュージーランド産のものを使用している。今回の事業で、培養した細胞の品質等において遜色のない無血清培地を見出すことができれば、血清が不要になることから海外への依存度を低減することができる。また無血清培地を製造している企業のいくつかは国内企業であることから、将来的には国内企業から培地の調達が可能になることが期待される。

そこで、現在、細胞培養には動物由来成分を含む培地を使用しているが、これらの成分を含まない培地に変更することにより、安全性の向上ならびにウシ胎児血清等の供給リスクの低減化を図るとともに、培養器材の検証を通して細胞培養の効率性向上によるコスト削減の実現に向けた検討を行う。

今年度から来年度以降にかけて、無血清培地及び培養器接着面の比較検証及び新規培養容器での培養検証を行いJR-031への適用可能性を検討する。培地条件等が固定できた後に他の動物由来成分を含む原料を除く為の検討を行い、最終的に動物由来成分

を用いない製造方法の完成を目指す。また最終的には実スケールでの安定的な培養方法を確立することが目標となる。以上を踏まえ、本年度は以下の検討を行った。

① 無血清培地の検討

[計画]

現在細胞培養に使用している培地は、ウシ胎児由来血清を用いているが安全性を考慮した場合、含有する因子が明確であり動物由来成分を含まないものが望まれる。骨髄由来 MSC の培養に使用する無血清培地は既に多くの企業が開発しているが、現在の血清入り培地と同等の細胞増殖性、品質を維持し、さらにコスト面から実生産スケールでの使用に見合うものには至っていない。

そこで既に市販されている無血清培地からいくつか選択し、JR-031 の製造に用いた場合に血清入り培地と同等の性能を有するものを探索する。現在使用している血清入り培地から無血清培地への変更を想定し、最適な無血清培地の探索を目的として、既に市販されている複数の無血清培地と血清入り培地でそれぞれ細胞を培養した場合の細胞の増殖性への影響を比較検証する。

[実績]

既に市販されている骨髄由来間葉系幹細胞用の無血清培地に加え、細胞科学研究所 (CSTI) にて作製した無血清培地の計 4 種類及び比較対象である通常培地を用いて細胞培養を行い、集団倍加レベル (PDL 値) 及び平均粒子径により細胞増殖性及び特性の評価を行った。その結果、PDL 値については通常培地と比較して今回検討した 4 種類の培地は細胞増殖性が良好であった。特に CSTI にて作製された培地が優れており、他の培地は継代数が 4 を過ぎるあたりから著しく増殖性が低下する傾向を示した (図 1)。一方、継代時に剥離した細胞について、平均粒子径を測定したところ、無血清培地は通常培地と比較すると小さい粒子径を示すことが分かり、継代数を重ねるごとに大きくなる傾向を示した (図 2)。今回検討した 4 種類の無血清培地の中では CSTI の培地で培養した細胞が最も小さい粒子径を示すことが分かった。一般的に細胞の大きさは継代あるいは培養期間が増加するにつれて大きくなることが知られており、細胞の老化を示す 1 つの指標であると考えられる。無血清培地を用いることで細胞の粒子径が小さくなる傾向を示したことから、最も細胞粒子径が小さかった CSTI 培地についてはより良い細胞品質を示す可能性が考えられ、今後無血清培地で培養した細胞について一連の性能評価を行う予定である。また PDL 値と同時に細胞粒径を評価することで、比較的簡便に細胞特性の評価が実施可能であることが示唆された。また無血清培地で培養した場合、粒子径が小さくなるのが影響しているのか、単位面積あたりで回収できる細胞数が増加することから、より短期間で効率的に細胞を拡大培養できることが考えられた。

② 接着面が加工された細胞培養器と従来型の細胞培養器の比較検討

[計画]

血清入り培地を無血清培地に変更した場合、接着因子が十分に含まれないため、培養速度が下がる懸念がある。また、通常、細胞接着を促進するために動物由来の接着因子が用いられることが多いが、安全性を考慮すると動物由来成分を使用しないことが望ましい。

ヒト間葉系幹細胞と相性の良い接着面（動物由来成分不含）を有した細胞培養器を用いることで細胞接着が促進され、播種時の細胞密度を向上させ、その結果、より短時間で細胞を拡大培養し、無血清培地でも血清培地と同等にヒト間葉系幹細胞が実スケールでの安定的な培養ができると期待される。また、細胞培養に要する培地及び工程数を削減できればコスト削減も期待できる。

そこで、接着面に高分子ポリマー構造（動物由来成分不含）を有する培養器と通常用いている培養器の比較検討を行う。具体的には、通常用いている培養器と最適な高分子ポリマー構造（動物由来成分を使用しない）を有する培養器を用い、それぞれ細胞を血清培地で培養した場合の細胞増殖効率等を比較検証する。

[実績]

イリカ社においてマイクロコンタクト法によって印刷された3種類のマイクロアレイプレートを用い、ポリマーライブラリーの中から骨髄由来間葉系幹細胞に結合するポリマーを同定することを目的として検討を実施した。細胞は2種類のロットについて検討を行い、固定後の細胞をヘキストを用いて蛍光染色し、蛍光が認められるエリアの広さで細胞接着の程度を評価した。1,117種類のポリマーについて検討を行った結果、約3割のポリマーで間葉系幹細胞の接着が認められた。その中で特に7種類のポリマーで強い細胞接着が確認できた（図3）。また一般的な細胞培養面の構造として採用されているスチレンやウレタン構造を有するものはトップ20に認められなかったことから、上位にランクされたポリマーを使用することにより、これまで通常用いられる培養器と比べ、より良い条件で細胞培養ができる可能性が示唆された。細胞が接着したポリマーのうち上位20のポリマーのモノマー構成を解析したところ、細胞が結合したポリマーの構造的特徴として、ある種の官能基を含むモノマーが主であり（表1）、基本骨格により細胞接着の傾向があることが分かった。したがって、これらの官能基及び基本骨格が間葉系幹細胞の接着に重要であることが示唆された。

(4) 新規細胞ソースの探索

輸入骨髄に代る安定的供給が可能な細胞ソースの探索を目的とし、原料となるヒト組織を入手するための倫理面及びヒト組織の安全性確認の為に体制整備と手順作成を行う。

現在、JR-031の細胞ソースである骨髄は、国内で調達することが極めて困難で、米

国からの輸入に依存している。本年度の事業では国内におけるヒト組織の入手ルートの確保と入手の為の手順を確立し、来期以降の事業として当該手順により得たヒト組織から細胞を採取、培養し、品質確認及び安全性を検証する予定である。品質及び安全性が確認できた細胞を用いて、薬効、動態及び毒性の検証を行うことにより、新規ソース由来細胞の薬理的及び毒性学的特性について評価することが可能となる。培養方法についても上記の検討で得られた方法の適用を検討する。骨髄由来細胞との類似性が確認できた際には、各種疾患モデルを用い薬効探索を行うことにより別の適応の可能性も検討する。以上の計画を踏まえ、本年度は以下の検討を行う。

① 細胞ソース確保の為の体制づくり

[計画]

ヒト組織の入手に必要な手順作成にあたっては、「ヒト（同種）由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保に関する指針」及び他のヒト組織の調達における過去の事例等を考慮し、倫理面及びヒト組織の安全性確認に必要な検査項目を検討する必要がある。これらの事項を踏まえた上で、協力が得られるクリニックの探索、ヒト組織の入手から受け入れまでに必要な手順及びドナー選定に際し必要な検査項目などを検討し、ヒト組織の入手に関する手順を確立する。

[実績]

細胞ソースとしての抜歯体の入手手順について検討を行い、協力が得られる歯科クリニックの探索及びドナー選定方法、検査項目など一連の手順を構築した（図4）。本手順については社内倫理委員会にて検討を行い、承認を得ることができた。倫理面では属性以外の個人情報保護（血清学的検査結果も含む）、未成年者からの入手の際の条件、負担軽減費等を考慮した入手手順を策定した。また、安全性を評価するための試験項目を設定し、これまでに確立した方法に従って単離した細胞について試験を実施した。まず当該細胞の試験系への阻害確認試験を行った結果、試験系への影響は認められなかった。設定した試験項目について試験を実施し、これまでに結果が確認できた全ての試験項目について設定した基準を満たすことが分かり、骨髄由来間葉系幹細胞の結果と同様であった（表2）。したがって、新規細胞ソースから単離した細胞は一連の安全性試験項目を満たすことが示唆された。

2. 本事業の評価

JR-031 が関係する学会（血液学関連の学会、造血細胞移植関連の学会、細胞培養関連の学会など）のオピニオンリーダーであり、本事業成果について基礎と臨床の両面で評価できる下記の有識者により構成される会議体を設置し、本事業で得られる評価手法を審査して頂いた。

（有識者の先生方）

慶應義塾大学医学部 発生分化生物学講座 教授	須田 年生 先生
筑波大学医学医療系 血液内科 教授	千葉 滋 先生
日本医科大学 千葉北総病院 小児科 准教授	浅野 健 先生

その結果、3名の有識者により本年度の事業活動内容に問題はなく、計画していた各評価手法については期待していたとおりの進捗がみられ、その成果についても達成度、内容ともに本邦初の細胞性医薬品である JR-031 を評価するために適切な水準にあるものと評価いただけた。また、本年度事業において策定した評価手法は、後続の培養細胞を利用する細胞性医薬品、再生医療等に応用することで効率の良い製品開発・創出の促進に資する事例としても意義あるものとの見解もいただけた。

今後は、質疑応答で得られた助言を生かし、後続の細胞性医薬品、再生医療等への開発、産業化に資する更なる評価手法の策定を目指すこととなった。

3. まとめと今後の課題

本年度、「臨床試験」については、臨床試験のデータ回収、解析、評価を完了し、安全性指標としての輸注毒性、異所性組織形成の評価結果を提示した。「医薬品製造承認申請」においては、この安全性指標の評価データを盛り込んだ国内初の細胞性医薬品の申請資料案を検討、作成し、計画通り PMDA に提示した。これらの評価指標および申請資料は、後続の再生医療等製品の開発促進に大きく寄与出来る成果と考える。

「安全性の高い細胞培養方法の構築」においては細胞増殖に優れた無血清培地、新規細胞培養容器の細胞接着面の改良が可能な候補物質を見出すことができた。「細胞ソース確保システムの構築」においても新規細胞ソース入手に関わる手順を構築することができ、いずれの場合も一定の成果を挙げることができた。

今後は本年度得られた結果に基づき、本年度事業において見出した無血清培地を用いて拡大培養した細胞の品質試験を実施し、通常用いている培地で培養した細胞と比較する必要があると考えている。また新規細胞培養容器の細胞接着面について、スケールアップした培養容器を用いて培養を行い、通常用いている培養容器と細胞の増殖特性及び品質について比較評価することが期待される。また本年度事業において構築した手順に従って、新たに細胞ソースを入手し、細胞を単離、拡大培養を行うことが

期待される。得られた細胞の品質を評価し、輸入骨髄から得られた hMSC と比較していくことが必要である。

以上

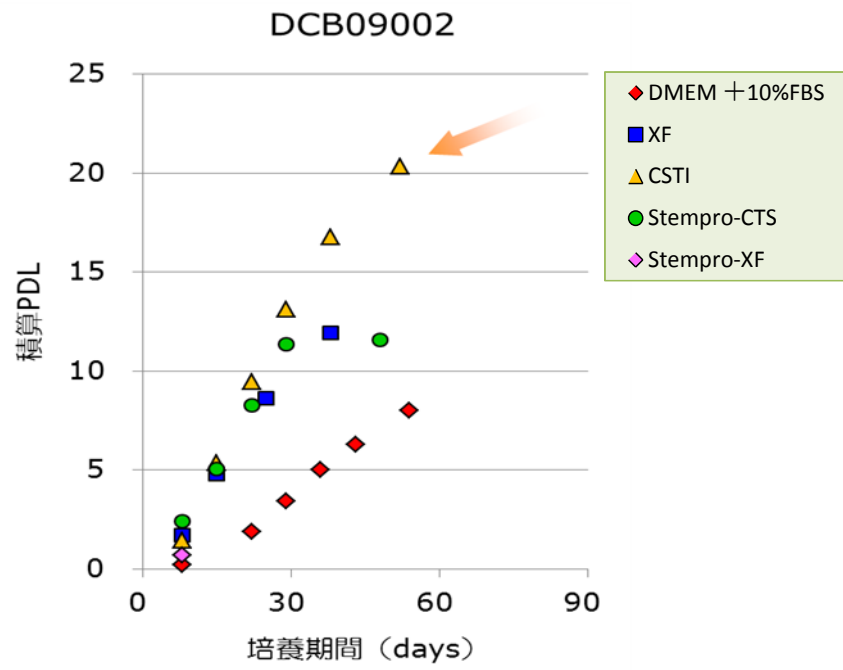


図 1. 間葉系幹細胞を用いた無血清培地の検討
 (集団倍加レベルの比較 (Population doubling level=PDL))

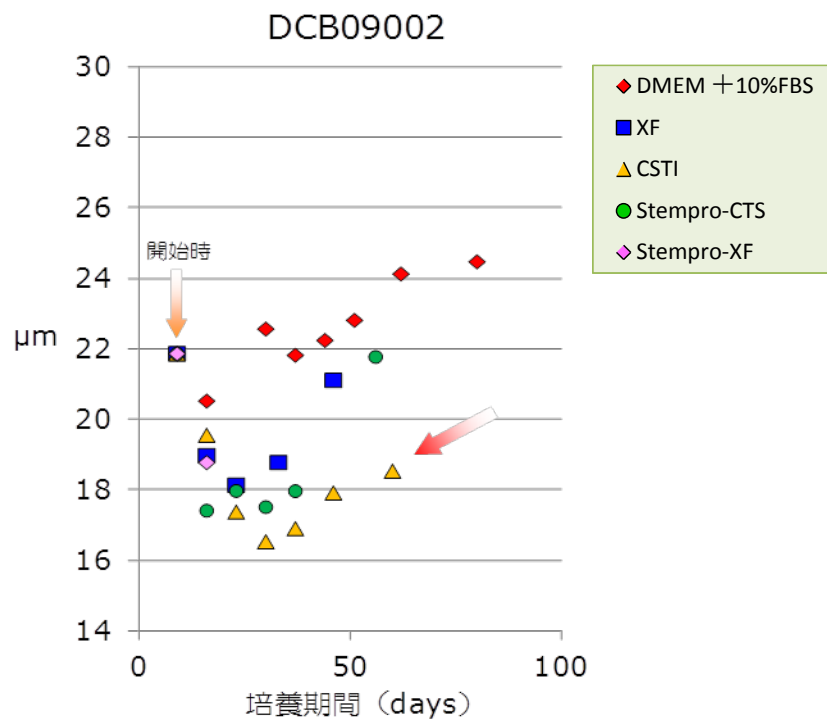


図 2. 間葉系幹細胞を用いた無血清培地の検討 (平均粒子径の比較)

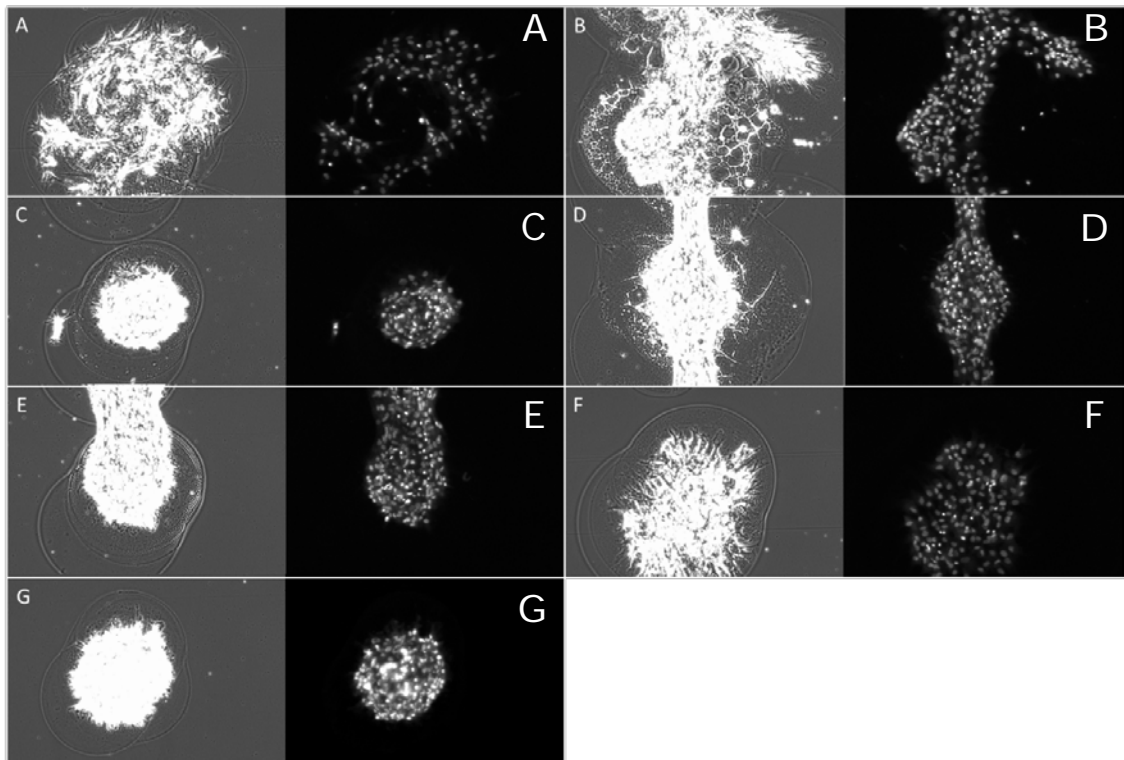


図 3. 最も細胞接着に優れていたポリマー（7種類）における位相差及び蛍光観察図

A: PA1035, B: PA1039, C: PA880, D: PA1029, E: PA888, F: PA886, G: PA864.

（全体（1117種類）の3割で細胞接着を確認、蛍光染色し蛍光が認められるエリアの広さで比較）

（左：位相差図、右：蛍光観察図（ヘキストにて核染色））

表 1. 細胞接着が認められたポリマーの中で出現回数の多かったモノマー構造一覧

モノマー	出現回数	構造
A	34	Methoxy terminating
B	27	Amino containing
C	19	Amino containing
D	13	Hydroxy terminating
E	9	Alkyl terminating
F	8	Epoxide containing
G	7	Amino containing
H	7	Hydroxy terminating
I	6	Acrlamide
J	6	Alkyl terminating
K	4	Amino containing
L	4	Amino containing
M	4	Amino containing
N	3	Hydroxy terminating
O	3	Hydroxy terminating
P	1	Carboxy terminating
Q	1	Furfuryl containing

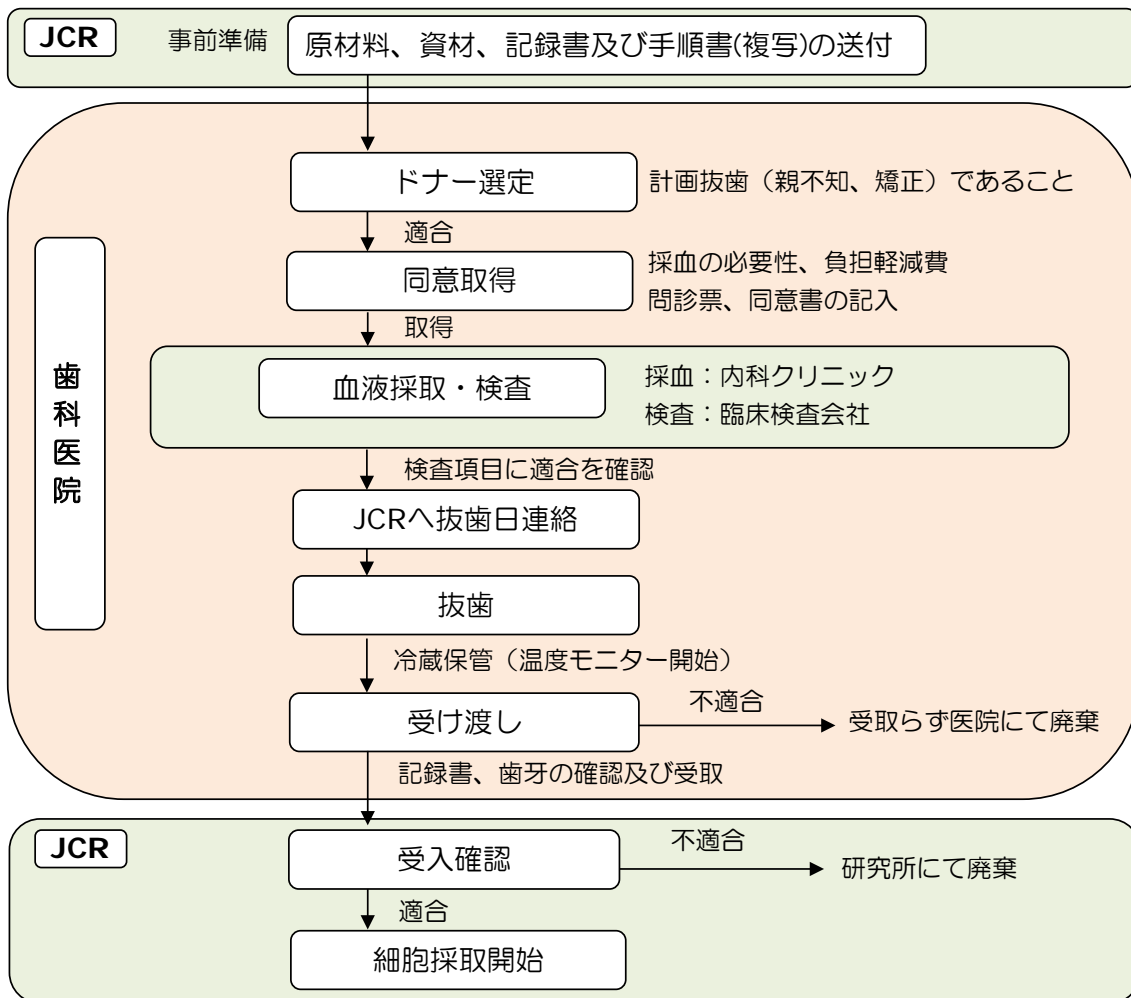


図 4. 新規細胞ソースの入手経路

表 2. 新規細胞ソースから単離した細胞の安全性試験結果一覧

試験検査項目		規格	歯髄由来幹細胞
細胞種同定		ヒト由来細胞	ヒト由来細胞であった。
染色体 検査	Gバンド分染法	46XX 又は 46XY 染色体に異常は認められない。	認められなかった。
	マルチカラー-FISH 法	染色体に異常は認められない。	認められなかった。
マイコプラズマ (染色法)		陰性	陰性
マイコプラズマ (培養法)		陰性	陰性
ウイルス 検査	電子顕微鏡観察	ウイルス様粒子は観察されない。	ウイルス様粒子は観察されなかった。
	<i>in vitro</i> 試験	陰性	陰性
	<i>in vivo</i> 試験	陰性	試験中*
	HIV-1/HIV-2	陰性	陰性
	HTLV-1/HTLV-2	陰性	陰性
	HHV-8	陰性	陰性
	HBV	陰性	陰性
	HCV	陰性	陰性
	HHV-6 variant A/B	陰性	陰性
	パルボウイルス B19	陰性	陰性
	CMV	陰性	陰性
	EBV	陰性	陰性
	HPV	陰性	陰性

* 4 月中に終了予定