

細胞製品製造における品質の同等性・重要品質特性



国立医薬品食品衛生研究所
三浦 巧

細胞加工製品の特徴

- 1) 動的で複雑な生きた細胞を含む製品である
- 2) 有効性・安全性に関する品質特性が特定しづらい
- 3) 不均一性が高い
- 4) 標準化されていない試験法が多い
- 5) 適切な標準品がない



<課題>





細胞加工製品は、細胞培養方法の変更、汚染物質不活化法の変更、製造の効率向上・コスト削減・スケールアップなど、基礎から臨床までの開発段階に応じた製法変更が多い。



<必要なこと>

細胞加工製品の製法の変更時には、製品の特徴を考慮しつつ、製造工程変更前後での製品の品質の同等性／同質性を示すことが必要

バイオ医薬品（バイオリジクス）は複雑だが・・・

	バイオ医薬品	低分子医薬品
分子量	 IgG抗体 分子量 約150,000	 アスピリン 分子量 180
製造法 (イメージ)	微生物や細胞の中で合成  微生物や細胞 抗体等の遺伝子	化学合成 
最終製品の複製	生成および精製の条件の 正確な再現は不可能である	正確な複製が可能である

出典： <https://www.pfizerpro.jp/therapy-areas/biosimilarpro/treatment/manufacturing-process>

細胞加工製品を含むバイオ医薬品等の製造工程の変更時の必須要件

- ▶ 製法変更によって少なくとも **製品の安全性と有効性に有害な影響を及ぼす変化がない** こと
- 製法変更の是非は、変更前後の製品の **品質特性の変化を評価** することにより判断することが合理的かつ効果的。
- 非臨床試験・臨床試験による確認の必要性も、品質特性の評価の内容次第で判断。

同等・同質？

ICH Q5Eにおける「同等・同質」とは

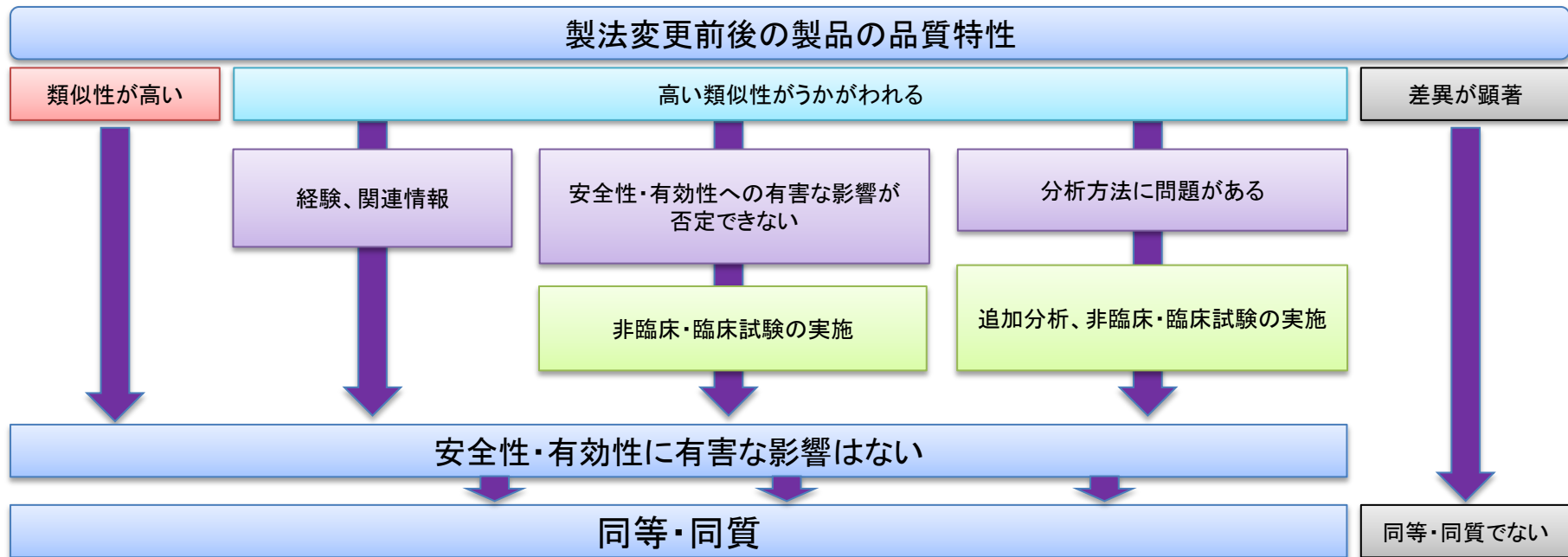
ICH-Q5Eガイドライン

『生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の製造工程の変更にもなう同等性／同質性評価』

- **製造工程変更前後の製品が品質特性において高い類似性を有し、製剤の免疫原性を含む安全性、あるいは有効性に有害な影響が生じていないこと**をいう。これは、製品の品質特性の分析に基づき判断できることが多いが、非臨床試験や臨床試験のデータを勘案する必要がある場合もある。

1. 製法変更前後の製品の**品質特性の分析結果で評価・保証することを試みる。**
2. 製造工程変更前後の製品の品質特性に変化が認められ、また、品質特性と安全性及び有効性との関係が十分に説明されていないなどの理由により、同等性が十分に説明できない場合には、非臨床試験あるいは臨床試験の成績を組み合わせて評価する。

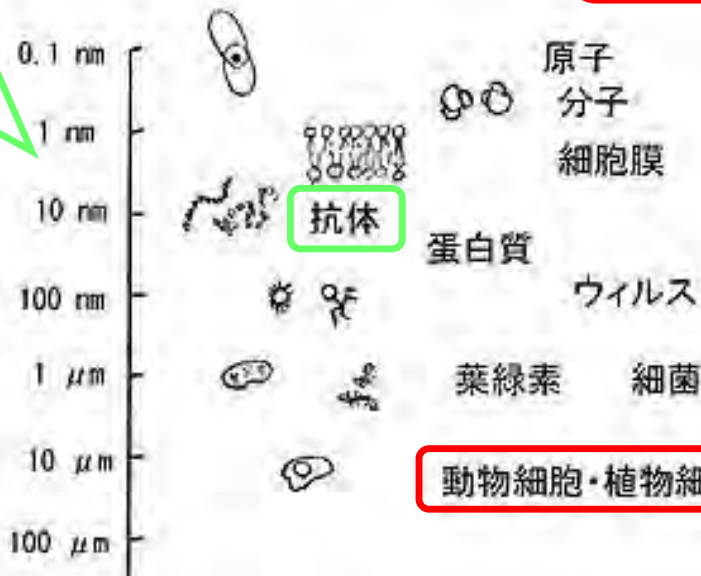
製法変更前後での同等性・同質性の評価の基本的考え方（= ICH Q5E）



細胞加工製品（再生医療等製品）は従来のバイオ医薬品よりさらに複雑

寸法の目安

これからのお話はとて
も小さな世界の事柄
です。
ナノの世界です。
抗体は蛋白質の一種で、
1nm-5nmというとても
小さい大きさです。



評価すべき「もの」が複雑である

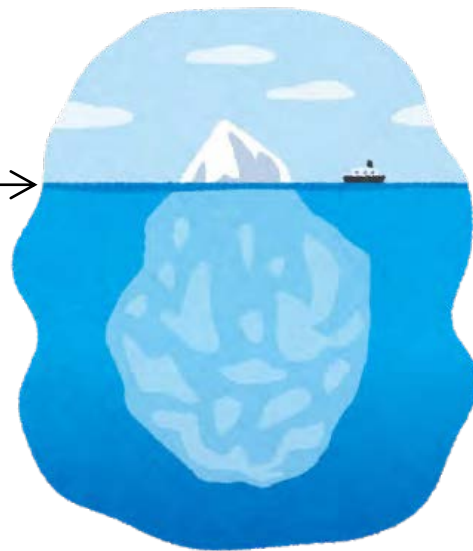
なおかつ
評価すべき細胞
は不均一集団
= 輪をかけて複雑

細胞加工製品（再生医療等製品）は従来のバイオ医薬品よりさらに複雑

理解されている特徴は限られている
(既知の品質特性)

Limit of Knowledge →

未知の品質特性
(潜在的に重要な特性)



有効性

安全性

(観察可能な) 品質特性に関するデータのみで同等性を評価・保証することは難しいと予想される

細胞加工製品（再生医療等製品）における品質特性の理解について

Q1: **スケールアップ技術**に必要なものは何か？

細胞加工製品の製造工程の変更に伴う
品質の**同等性／同質性**

細胞の不均一性を理解
するための技術が大切

Q2: 品質の**同等性／同質性**に必要なものは何か？

細胞加工製品の「**重要品質特性（CQA）**
& CQAを基盤とする「**規格及び試験方法**」

細胞集団が不均一、更に
細胞自体が複雑だから

大きな問題

細胞加工製品の場合、
すべてのCQAを網羅することは極めて困難



CQAの「**同定**」と「**検出・測定**」のためのツールが必要

ウイルス安全性や無菌性
造腫瘍性の評価方法

➤安全性関連のCQA（ハザードの質と量）

不均一な分布を示すハザード・有害不純物を漏れなく
検出できているか？検出法の感度を理解しているか？

=偽陰性・偽陽性の回避

➤有効性関連のCQA

有効性を裏付ける細胞機能とリンクした細胞特性を
如何に探り当てるか？

（作用機序が明確でない製品の場合は、とても難しい）

「不均質性」を理解するための技術が必要

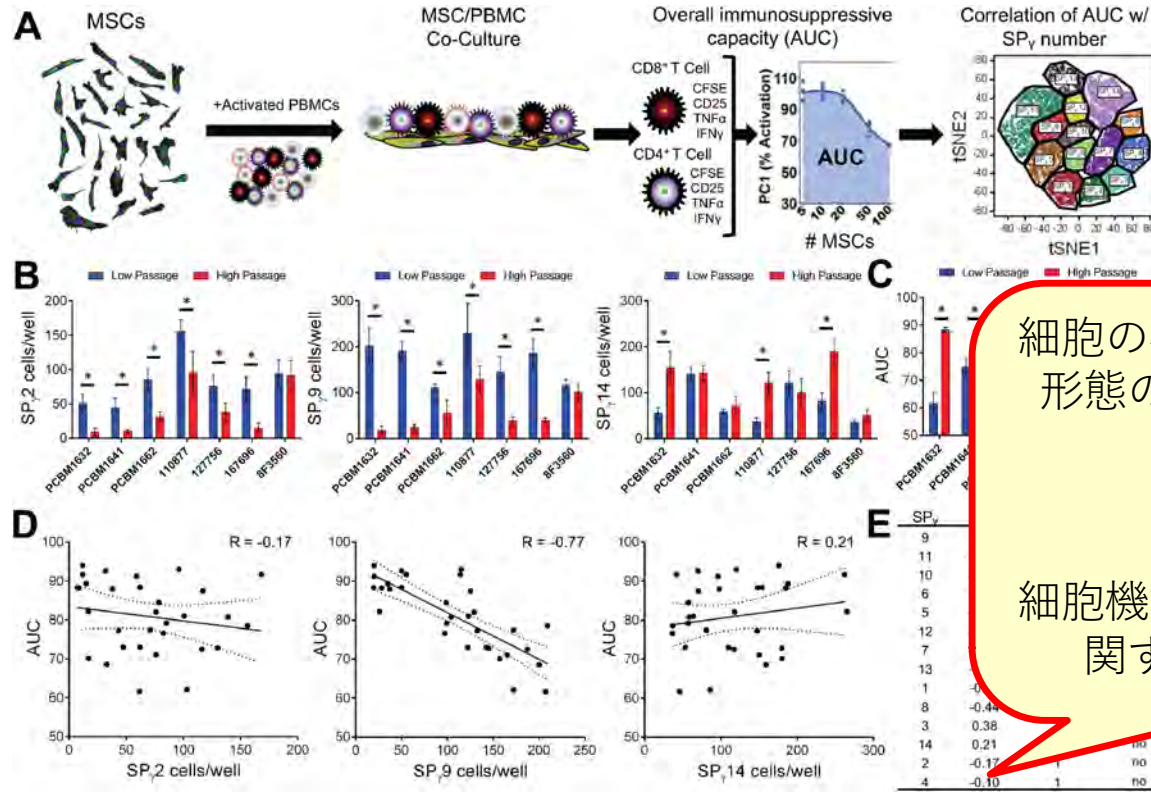
- 例えば、**総細胞数が100万個**あっても、**そのうち有効性を発揮するのは1万個**しかないという場合もありうる。



- このような**不均質性を「見える化」**することで、**その1万個の細胞がどのような特性を持つのか**を明らかにすれば、**有効性に関連するCQA（重要品質特性）を発見しやすくなる**
(・・・と期待できる)

不均一性の「見える化」は、品質評価・管理の重要なカギとなりうる

例) 画像解析



Marklein RA *et al.*,
Cytherapy.
 2019;21:17-31.



細胞の不均一性を、細胞
 形態の画像から**数値化**



細胞機能（有効性）と相
 関する特徴を同定

IFN γ 刺激後の間葉系幹細胞の形態的特徴を手掛かりに、
 その免疫抑制活性を予測することができる

Single-Cell RNA-Seq Reveals *LRRC75A*-Expressing Cell Population Involved in VEGF Secretion of Multipotent Mesenchymal Stromal/Stem Cells Under Ischemia

Takumi Miura^{1,2,‡}, Tsukasa Kouno^{3,‡}, Megumi Takano¹, Takuya Kuroda¹, Yumiko Yamamoto³, Shinji Kusakawa¹, Masaki Suimye Morioka³, Tohru Sugawara^{2,4}, Takamasa Hirai¹, Satoshi Yasuda¹, Rumi Sawada¹, Satoko Matsuyama^{1,5}, Hideya Kawaji^{3,6}, Takeya Kasukawa³ , Masayoshi Itoh³, Akifumi Matsuyama⁵, Jay W. Shin^{3,7}, Akihiro Umezawa², Jun Kawai^{3,8}, Yoji Sato^{*,1,8,9} 

¹Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences, Kanagawa, Japan

²Center for Regenerative Medicine, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

³RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, Japan

⁴Biopharmaceutical and Regenerative Sciences, Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University, Yokohama, Japan

⁵Center for Reverse TR, Osaka Habikino Medical Center, Osaka Prefectural Hospital Organization, Osaka, Japan

⁶Research Center for Genome & Medical Sciences, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan

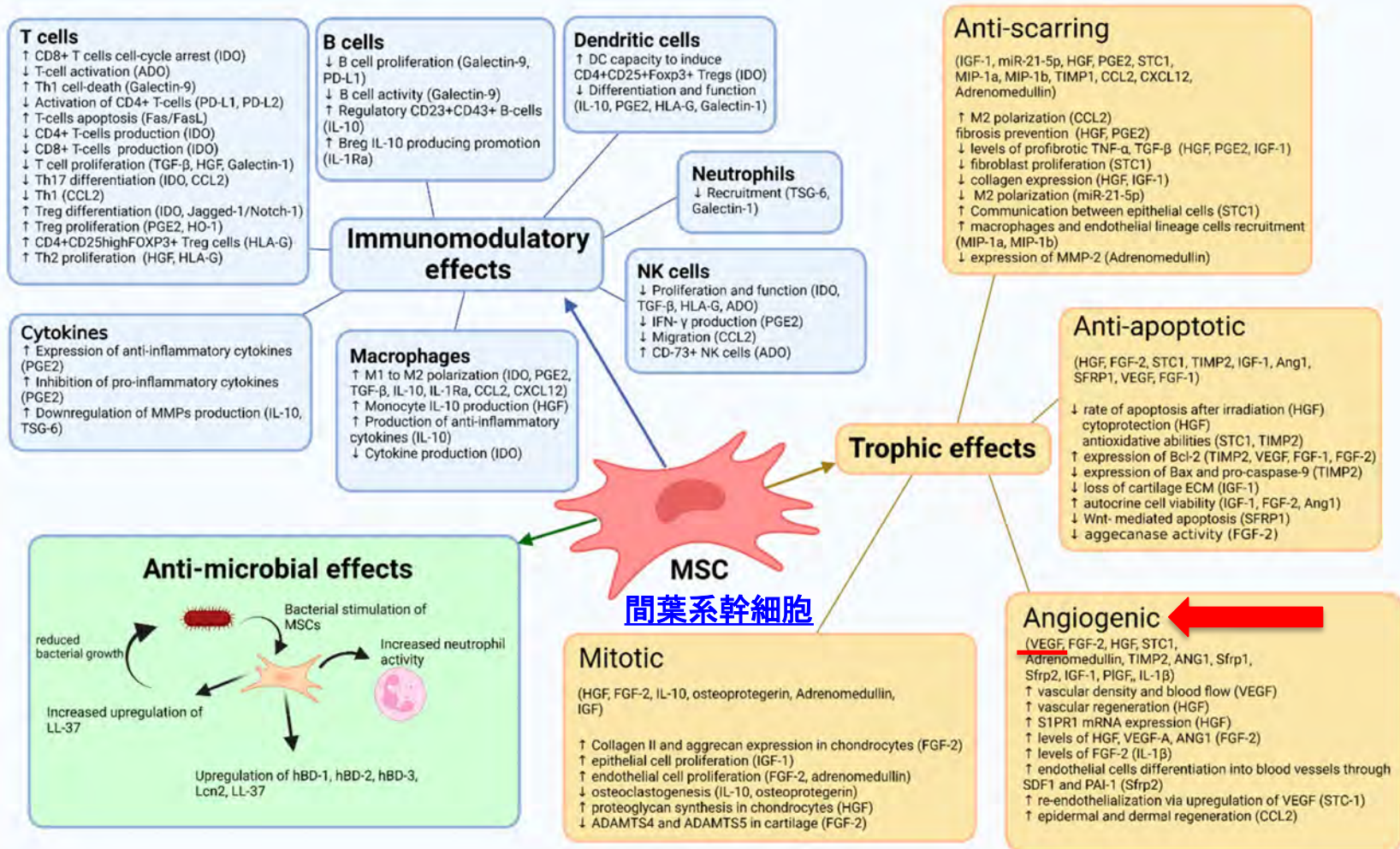
⁷Genomic Institute of Singapore, Agency for Science, Technology and Research, Singapore

⁸Life Science Technology Project, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, Kawasaki, Japan

⁹Department of Cellular and Gene Therapy Products, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

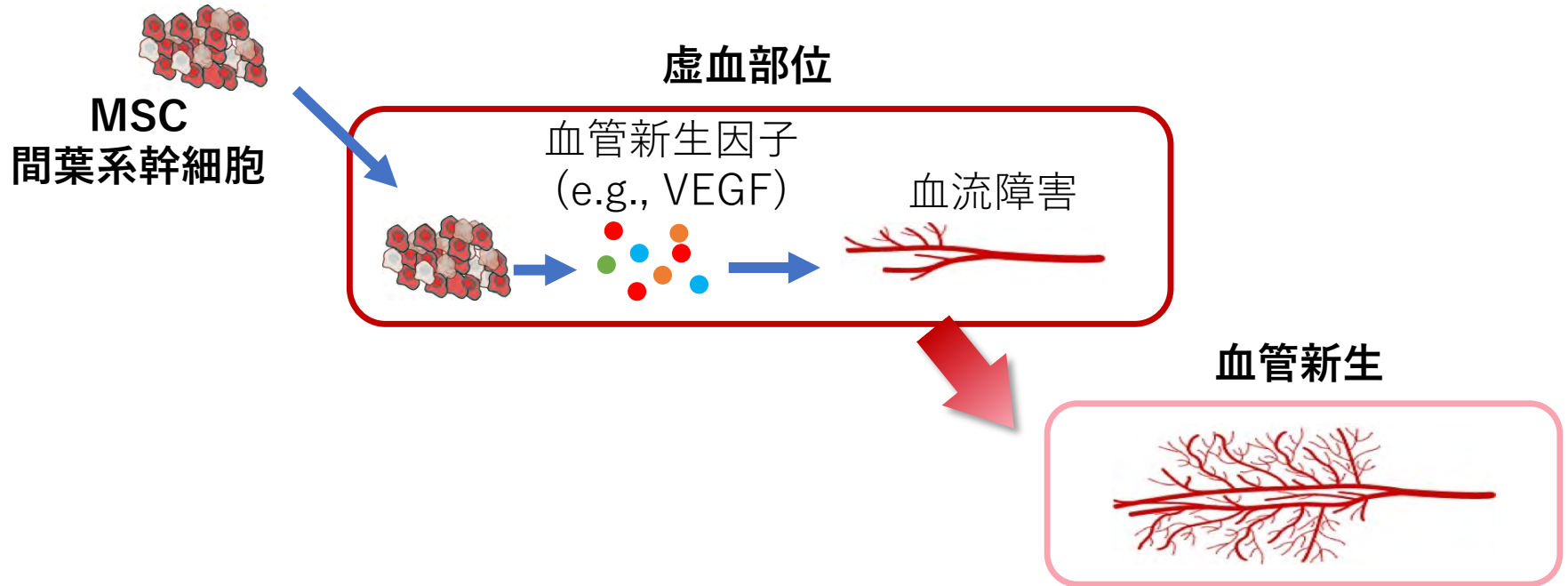
*Corresponding author: Yoji Sato, PhD, Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki Ward, Kawasaki City, Kanagawa 210-9501, Japan. Email: yoji@nihs.go.jp

‡Contributed equally.



生着部位の環境（虚血）

虚血性疾患に対する治療的血管新生として間葉系幹細胞（MSC）を用いた再生医療が注目を集めている。

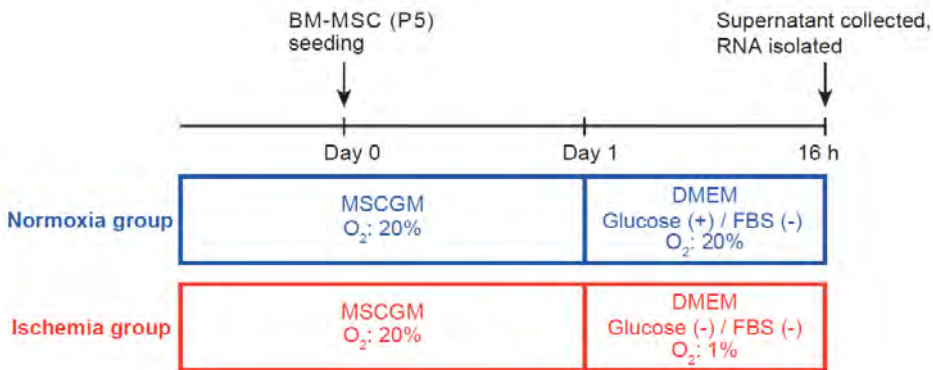


本研究では、虚血部位の血管新生に寄与するMSC由来VEGF産生能をMSCの機能の1つに設定し、虚血下でのVEGF産生能と相関のあるマーカを探索することを試みた

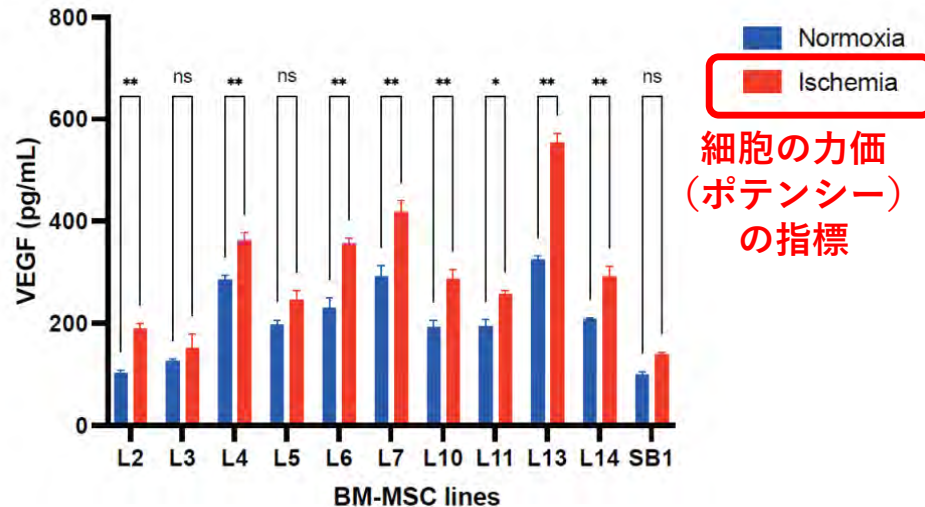
生着部位の環境を模した実験条件

Miura T et al., *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.

虚血下骨髄由来MSC (BM-MSC) におけるVEGF分泌能の評価



↑
低酸素・グルコースなし

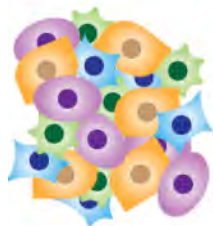


VEGFの分泌は細胞ロット間で大きくばらつく

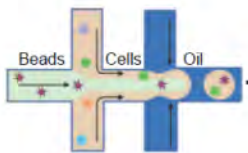
シングルセル・トランスクリプトーム解析

Miura T *et al.*, *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.

通常酸素分圧下の 骨髄由来MSC (BM-MSC)



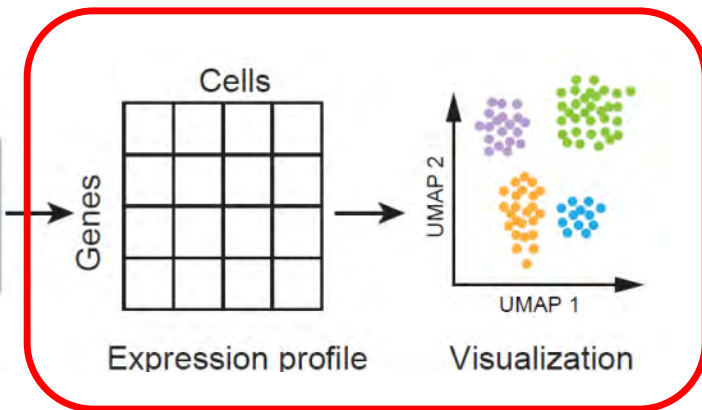
BM-MSCs (P5)
11ロット



Single cell libraries



Sequencing



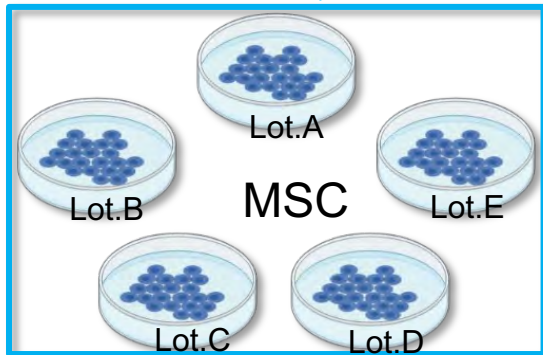
Expression profile

Visualization

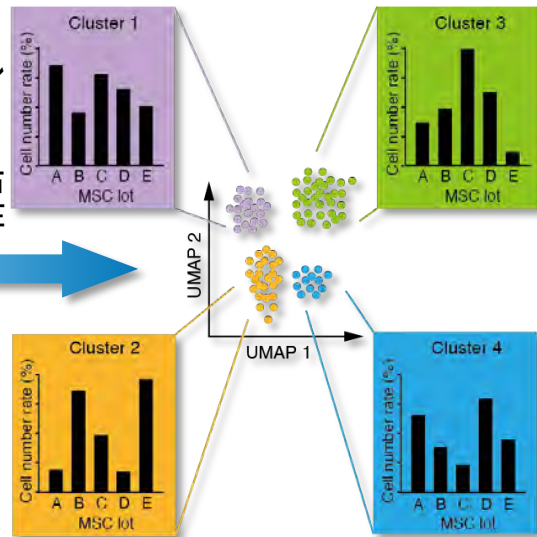
個々の細胞の遺伝子発現パターンで細胞を分類

シングルセル・トランスクリプトーム解析による虚血下VEGF産生に寄与する細胞集団の同定

通常酸素環境下培養

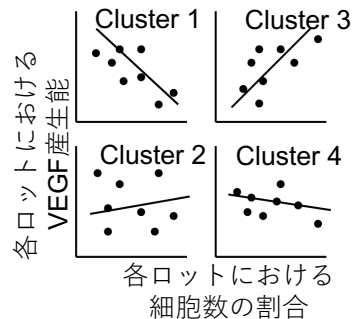


全ロットにおいてシングルセルRNA-Seq解析を実施し、各クラスター内に占める各ロットの存在比を求める

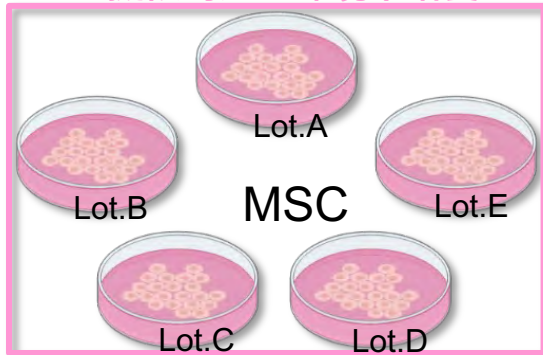


クラスターに占める各ロットの割合に基づいて虚血時のVEGF産生能と相関のあるクラスターを抽出

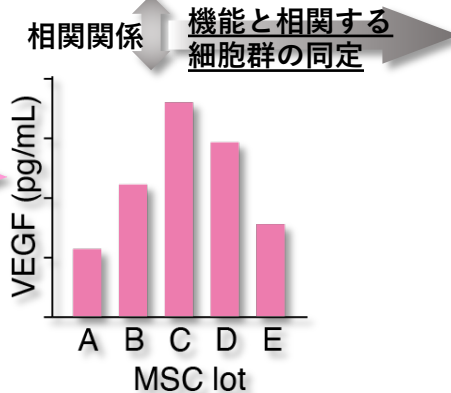
スピアマン順位相関係数を求めて比較



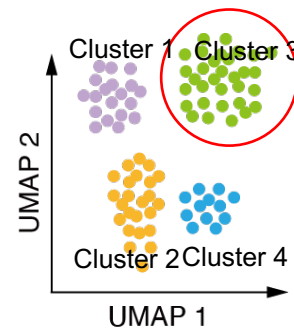
擬似的虚血環境下培養



各ロットにおけるVEGF産生能



相関関係 機能と相関する細胞群の同定

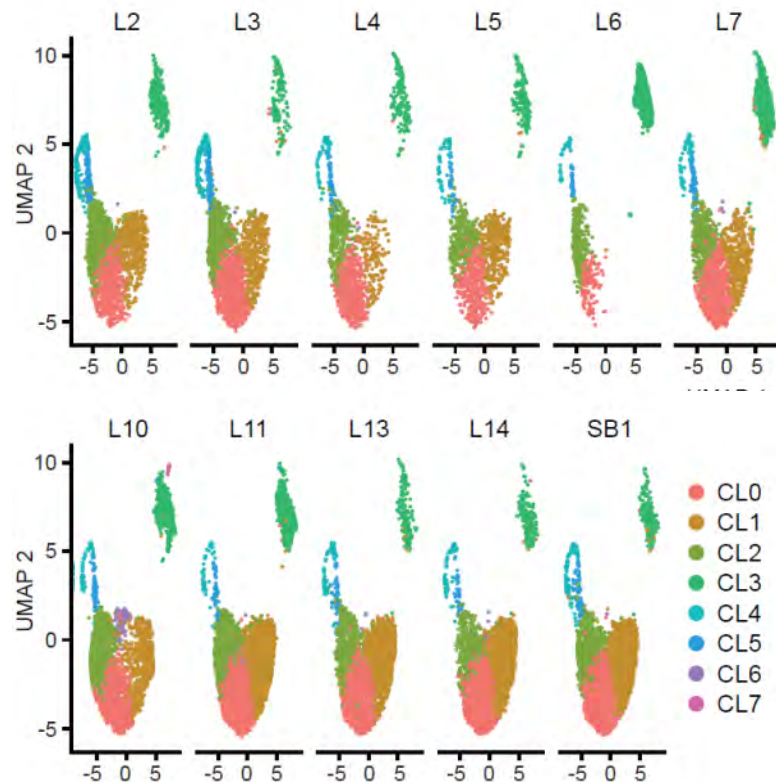
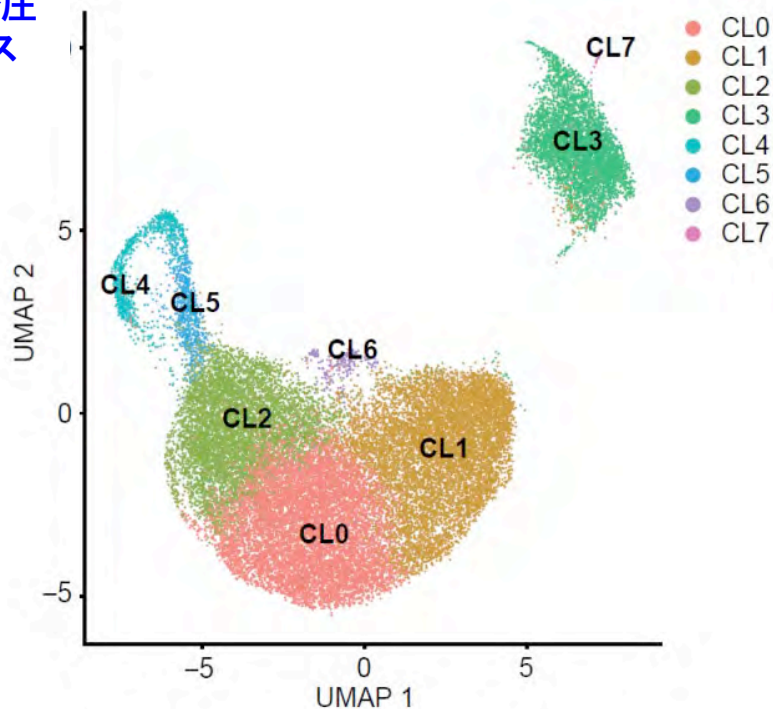


虚血下VEGF産生能と相関のある細胞群 (クラスター) の特定

11ロットのBM-MSCにおけるシングルセル・トランスクリプトーム解析

Miura T *et al.*, *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.

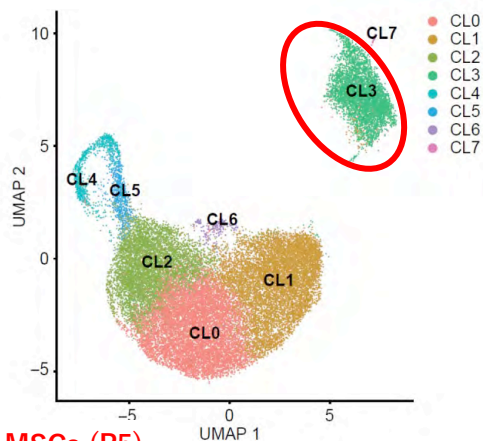
BM-MSCs
(P5)
通常酸素分圧
グルコース
(+)



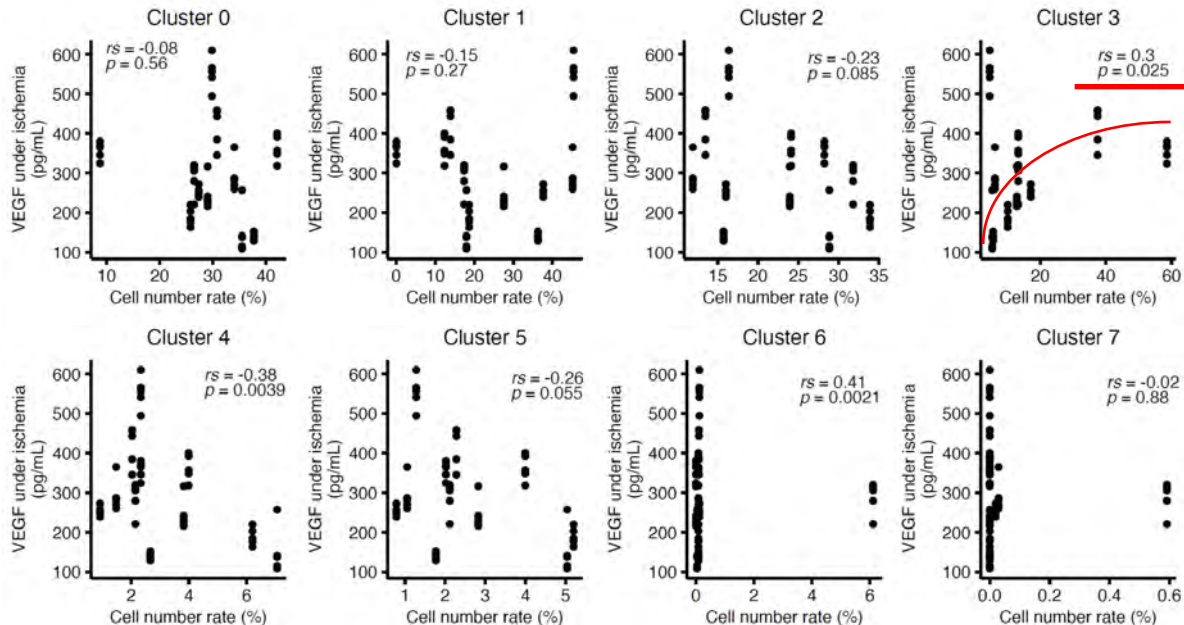
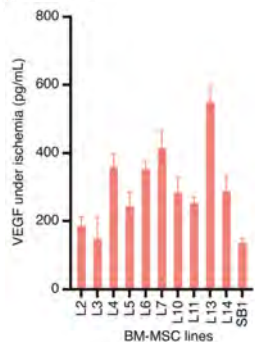
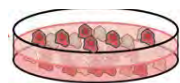
虚血下VEGF分泌に寄与する細胞集団（クラスター）の特定

Miura T et al., *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.

BM-MSCs (P5)
通常酸素分圧
グルコース (+)



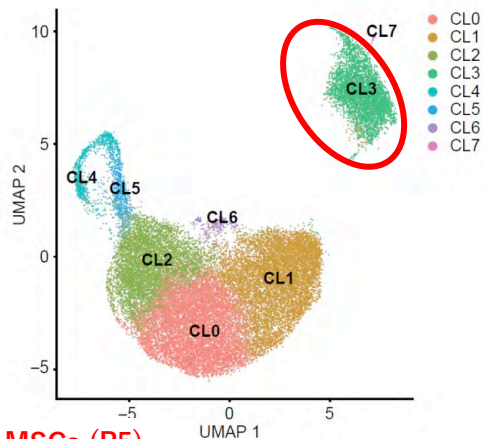
BM-MSCs (P5)
低酸素分圧
グルコース (-)



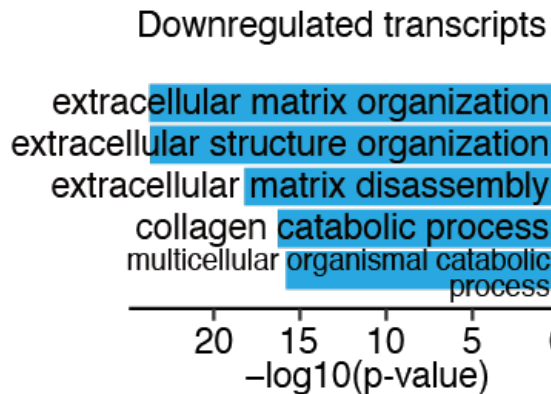
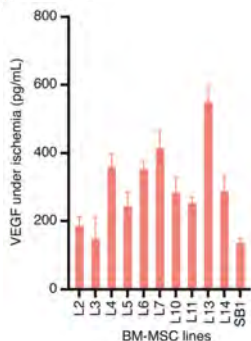
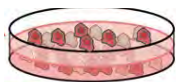
GO解析によるクラスター3の生物学的機能の推定

Miura T et al., *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.

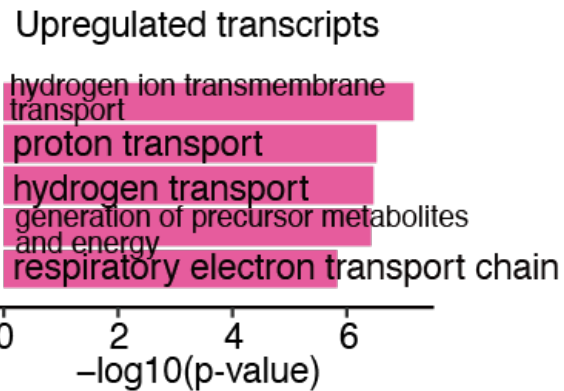
BM-MSCs (P5)
通常酸素分圧
グルコース (+)



BM-MSCs (P5)
低酸素分圧
グルコース (-)



ECM関連遺伝子の発現低下



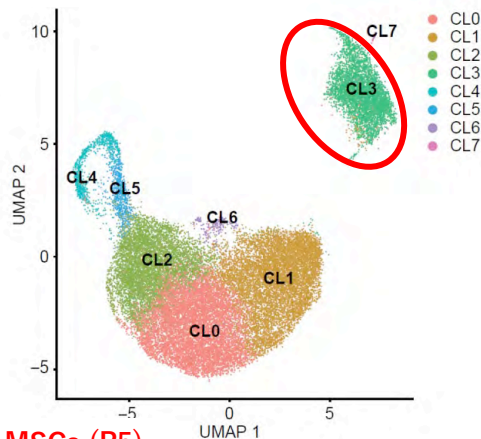
酸化的リン酸化経路に関連する遺伝子の発現亢進

クラスター3は、高い遊走能を有し、ミトコンドリア機能が増強された（間葉系的な状態にある）細胞集団であることが示唆された

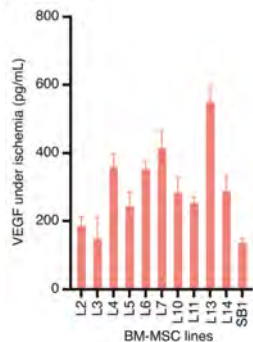
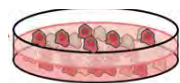
クラスター3の特徴的な遺伝子の虚血下VEGF分泌に及ぼす影響について

Miura T et al., *Stem Cells Transl Med.* 2023;12:379-390.

BM-MSCs (P5)
通常酸素分圧
グルコース (+)



BM-MSCs (P5)
低酸素分圧
グルコース (-)

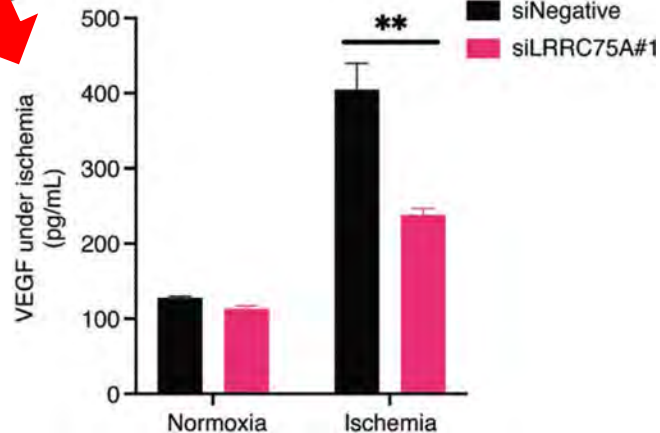
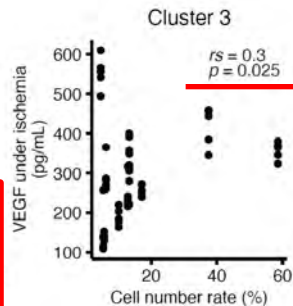


CL 3 で発現上昇している遺伝子
トップ20

Gene name	Ave log ₂ FC
<u>LRRC75A</u>	1.0357
KRT7	0.8382
KRT16	0.7902
C1orf56	0.7815
CRYAB	0.7696
HSPB1	0.7572
MTRNR2L12	0.7060
AC092069.1	0.7024
ADIRF	0.6712
LGALS1	0.6573
ID1	0.6525
MT2A	0.6424
S100A11	0.6312
COMP	0.6132
EIF5A	0.6057
FLG	0.6049
SH3BGRL3	0.5970
TPM2	0.5859
POLR2L	0.5555
GADD45B	0.5543

隠れていた
CQAs

**LRRC75Aは虚血環境下
のVEGF分泌に生理的に
寄与**



hMSC（ヒト間葉系幹細胞）の科学

仮説

CL3で発現する *LRRC75A* は、
虚血下での *hMSC* からの VEGF の分泌を制御する

hMSC の母集団（プラトンの言う「イデア」としての *hMSC*）



hMSCs

骨髄由来
hMSC

脂肪組織由来
hMSC

臍帯由来
hMSC

...

a training set

骨髄由来 *hMSC*
11ロット

骨髄由来 *hMSC*
別の 4ロット

研究で使った
特定ロットの *hMSC*
(=検体)

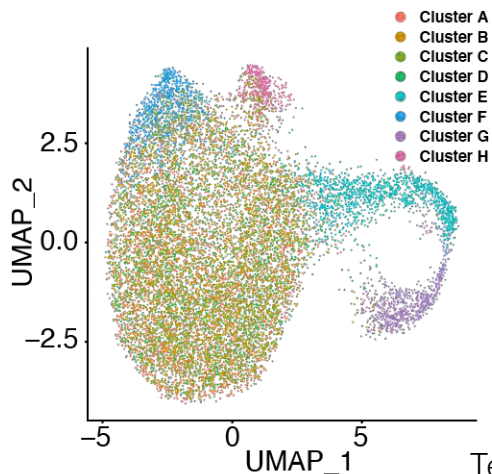
↑
a test set



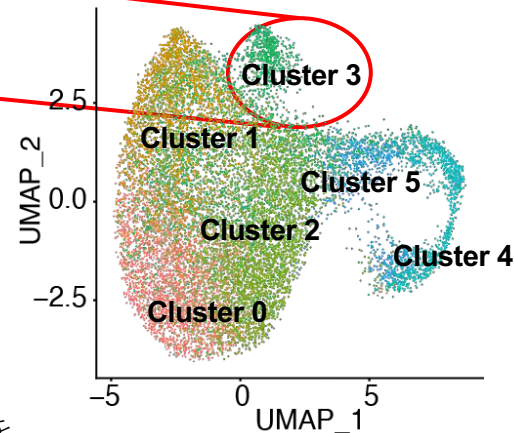
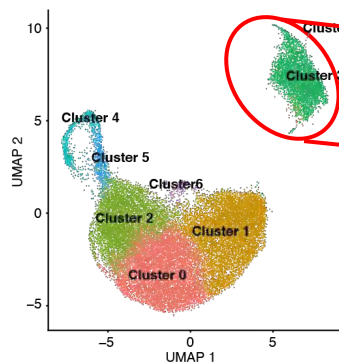
別の骨髄由来MSCのロット (test set) におけるクラスター3様の細胞集団の同定

Miura T et al., *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.

scRNA-Seq Analysis for the Test Set (4 ロット: L15 – L18)



Reference Data Set (L2 – SB1)



Test setのデータを、*FindTransferAnchors*関数を使ってreference setと統合することにより、CL3様の細胞集団が同定された。

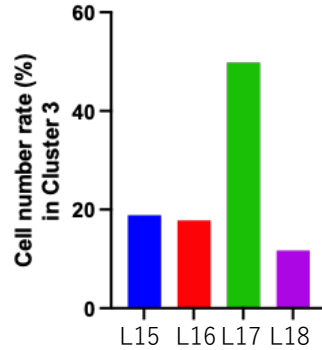
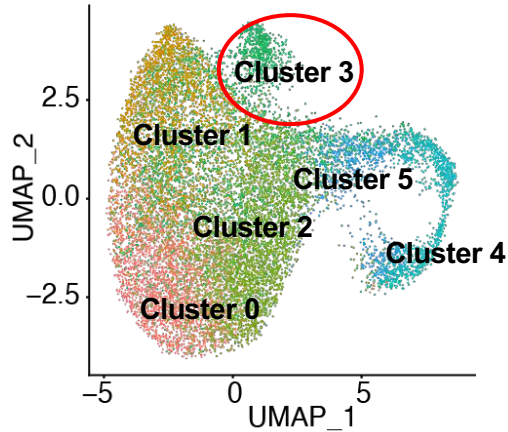
別の骨髄由来MSCのロット (test set) におけるクラスター3様の細胞集団の同定

Miura T *et al.*, *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.

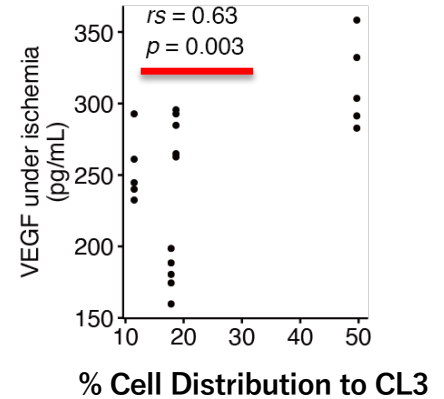
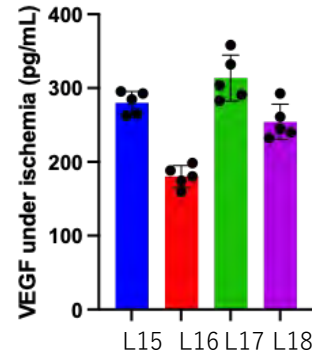
Test setのクラスター3
様集団における各ロット
の細胞数の割合 (%)

各ロットにおける
VEGF分泌量
(During Ischemia)

スピアマン順位相関係数
(% Cell Distribution vs. VEGF
Production During Ischemia)



correlation



BM-MSC lines

BM-MSC lines

% Cell Distribution to CL3

hMSC (ヒト間葉系幹細胞) の科学

仮説

CL3で発現する *LRRC75A* は、
虚血下での *hMSC* からの VEGF の分泌を制御する

hMSC の母集団 (プラトンの言う「*hMSC*」)



hMSCs

骨髄由来
hMSC

脂肪組織由来
hMSC

臍帯由来
hMSC

...

a training set

骨髄由来 *hMSC*
11ロット

骨髄由来 *hMSC*
別の4ロット

脂肪組織由来
hMSC
別の4ロット

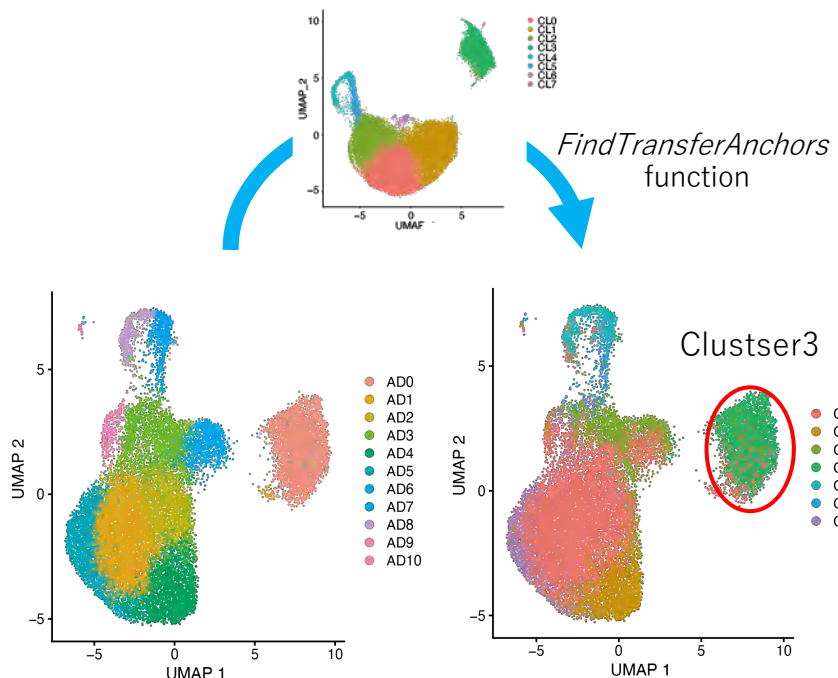
研究で使った
特定ロットの *hMSC*
(=検体)

a test set



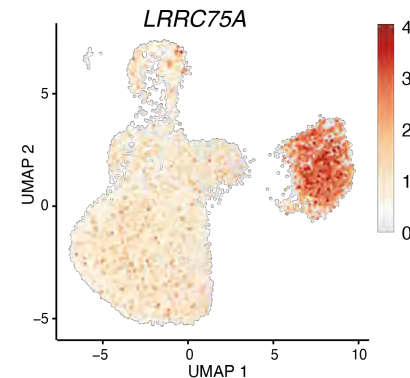
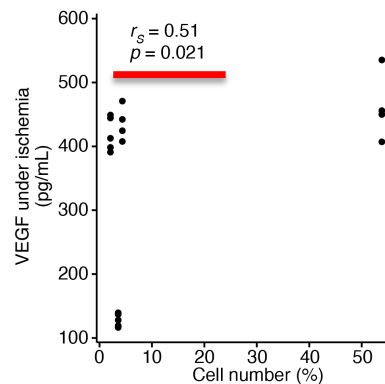
脂肪由来MSC (AD-MSC) におけるクラスター3様の細胞集団の同定

Miura T *et al.*, *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.



スピアマン順位相関係数
(% Cell Distribution vs. VEGF
Production During Ischemia)

AD-MSCにおける
*LRRC75A*の発現

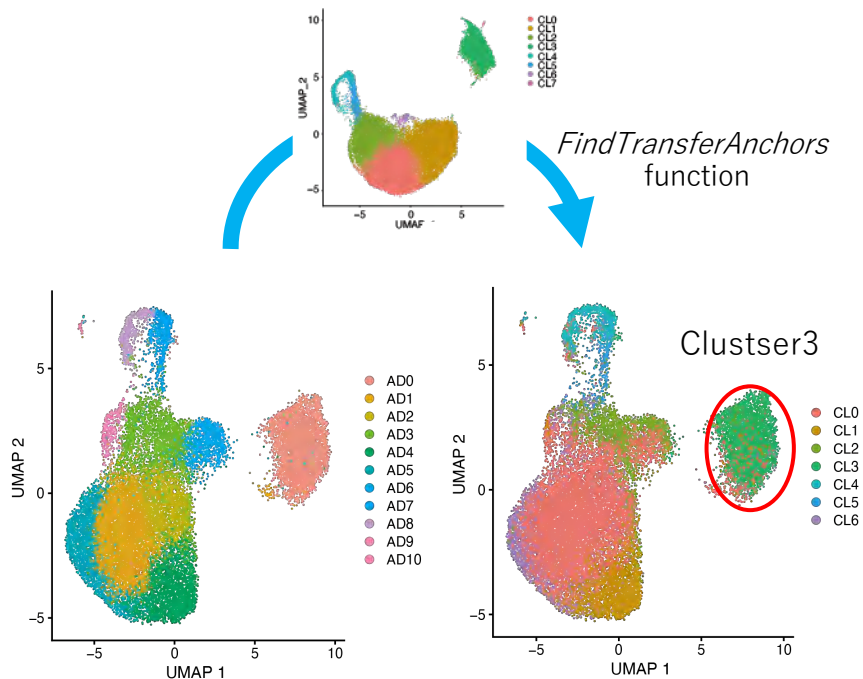
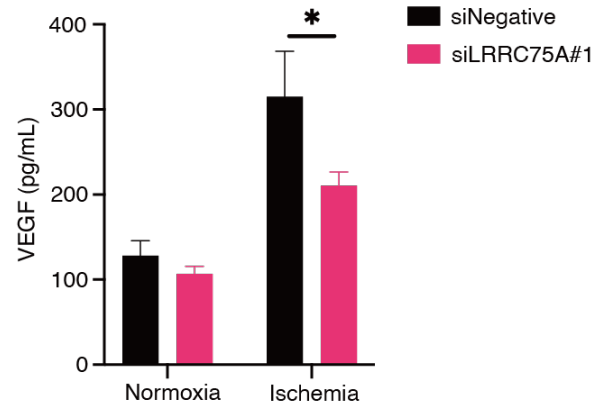


scRNA-Seq Analysis
for AD-MSCs (4ロット)

脂肪由来MSC (AD-MSC) におけるクラスター3様の細胞集団の同定

Miura T *et al.*, *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.

*LRRC75A*ノックダウンにより
虚血下VEGFの発現抑制



scRNA-Seq Analysis
for AD-MSCs (4ロット)

AD-MSCsにおいて

- CL3様の細胞集団は虚血下でVEGF産生に寄与する
- CL3様の細胞集団はLRRC75Aの発現が高い
- LRRC75AのノックダウンはVEGFの分泌を抑制する

hMSC (ヒト間葉系幹細胞) の科学

仮説

CL3で発現する *LRRC75A* は、
虚血下での hMSC からの VEGF の分泌を制御する

hMSC の母集団 (プラトンの言う「イデア」)

hMSCs

骨髄由来
hMSC

脂肪組織由来
hMSC

臍帯由来
hMSC

...

a training set

骨髄由来 hMSC
11 ロット

骨髄由来 hMSC
別の 4 ロット

脂肪組織由来
hMSC
別の 4 ロット

臍帯由来
hMSC
別の 5 ロット

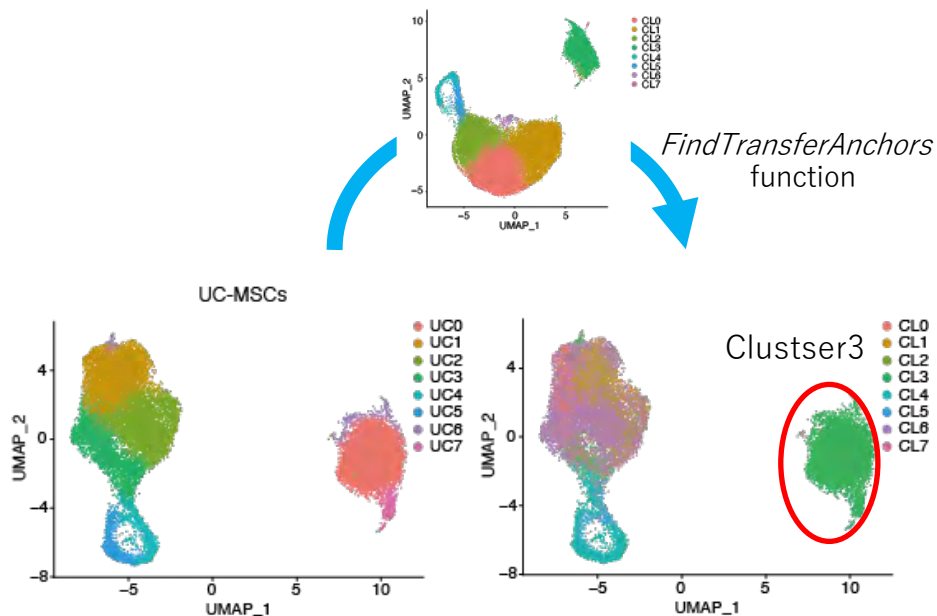
研究で使った
特定ロットの hMSC
(= 検体)

a test set



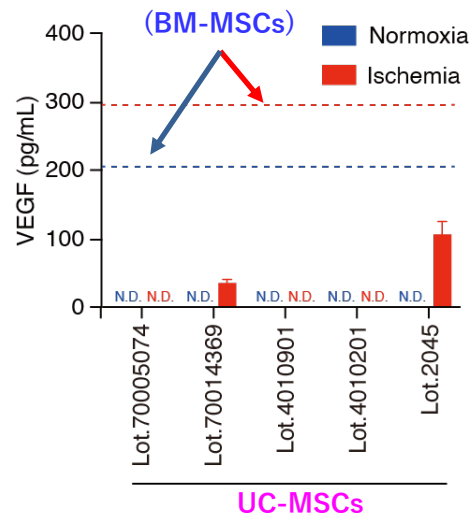
臍帯由来MSC (UC-MSC) におけるクラスター3様の細胞集団の同定

Miura T *et al.*, *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.

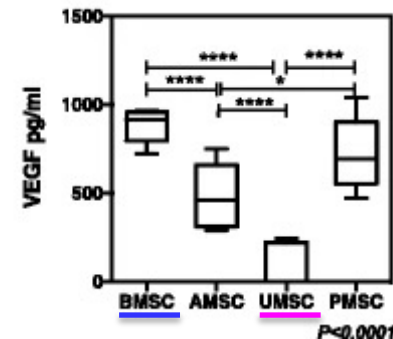


scRNA-Seq Analysis for UC-MSCs (5ロット)

UC-MSCにおけるVEGFの発現は、著しく低い (Normoxia/Ischemia)



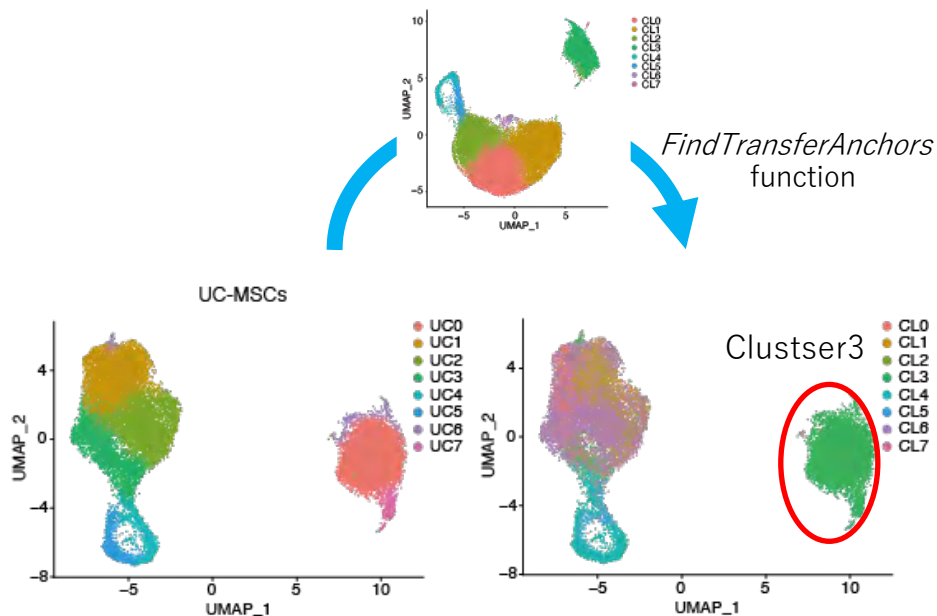
UC-MSCにおけるVEGF発現レベルは低いことが知られている (Normoxia)



Du WJ, *et al.* *Stem Cell Res Ther.* 2016;**7**:163.

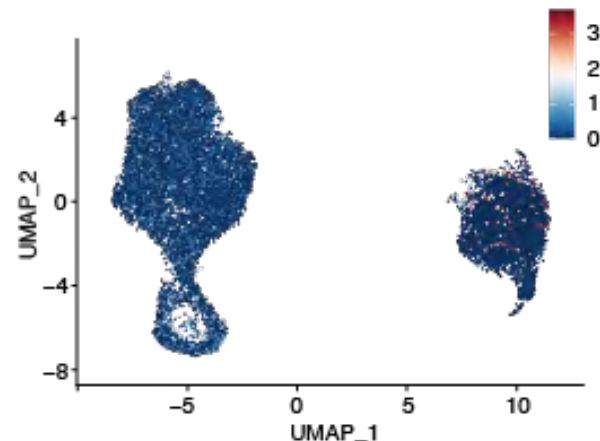
臍帯由来MSC (UC-MSC) におけるクラスター3様の細胞集団の同定

Miura T et al., *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.



scRNA-Seq Analysis for UC-MSCs (5ロット)

Expression of *LRRC75A* in UC-MSCs



CL3様の細胞集団において、高レベルの *LRRC75A* を発現している細胞は著しく少ない

つまり、シングルセルRNA-seq解析により細胞の不均一性を「見える化」することで、VEGFの生理的な分泌制御 (MSCの機能) に関わる因子 (指標) を掘り出すことができた。

まとめ



- 細胞加工製品の有効成分である細胞は複雑で不均質であるため、認知しうる品質特性をすべて列挙したとしても、製品の有効性や安全性の再現性を保証するために必要十分な重要品質特性（CQA）をすべて特定・管理することはできない可能性が高い。
- 細胞加工製品の「真の有効成分細胞」の特定、隠れたCQAの「採掘／発見」、作用機序の理解には、細胞や細胞集団の不均質性をその効力・有効性にもとづき理解するための科学、言わば Stem Cell Pharmacotaxonomy 「幹細胞薬理分類学」が必要。
- 例えば、シングルセル・トランスクリプトーム解析や画像解析に基づき、力価／有効性と相関する細胞亜集団やバイオマーカーを同定することは、有効な細胞加工製品を再現性高く製造する製法の確立、つまり細胞加工製品の価値向上に役立つと考えられる。

謝辞（敬称略）

本研究の実施にあたり、ご助力いただいた方々に深謝いたします。



国立医薬品食品衛生研究所

佐藤 陽治

安田 智

再生・細胞医療製品部の皆様



神奈川県立産業技術総合研究所

河合 純



国立成育医療研究センター研究所

梅澤 明弘



横浜市立大学

菅原 亨



理化学研究所

河野 掌

森岡 勝樹

粕川 雄也

伊藤 昌可

山本 由美子

Jay W. Shin



神奈川県

Kanagawa Prefectural Government

本研究は、AMEDおよび神奈川県より助成を受けたものです。

ご清聴有り難うございました

