

慶應義塾大学殿町タウンキャンパスセミナー 2024
再生医療等製品製造の新しいコンセプト

QbD製造と**細胞**の特性理解の重要性について

佐藤 陽治

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部長

(神奈川県立産業技術総合研究所 次世代ライフサイエンス技術開発プロジェクト 非常勤研究員)



本発表で述べられている見解は発表者の私見であって、国立医薬品食品衛生研究所および厚生労働省ならびに神奈川県立産業技術総合研究所の公式な見解では必ずしもありません。

本日のお話

- 1. CQA/CMA: 細胞加工製品のQbD製造に必要なもの**
- 2. CMA Mining: 細胞加工製品の原料としてのヒトiPS細胞の株間
の特性の違いの理解と分化傾向マーカーの探索**
- 3. CQA Mining: シングルセルRNA-Seq解析による
ヒト間葉系幹細胞の不均一性の理解と
有効成分細胞の探索**

医薬品等の品質・有効性・安全性の評価

➤ 医薬品等には

「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」
(略称: 医薬品医療機器等法, 薬機法)の規制がかかる

➤ 医薬品等の開発の薬事制度はなぜ必要なのか？

⇒ 市場における製品の「品質」「有効性」「安全性」の確保

ゴニル(製品)



有効性

安全性

品質

品質

品質

品質

品質

品質

品質

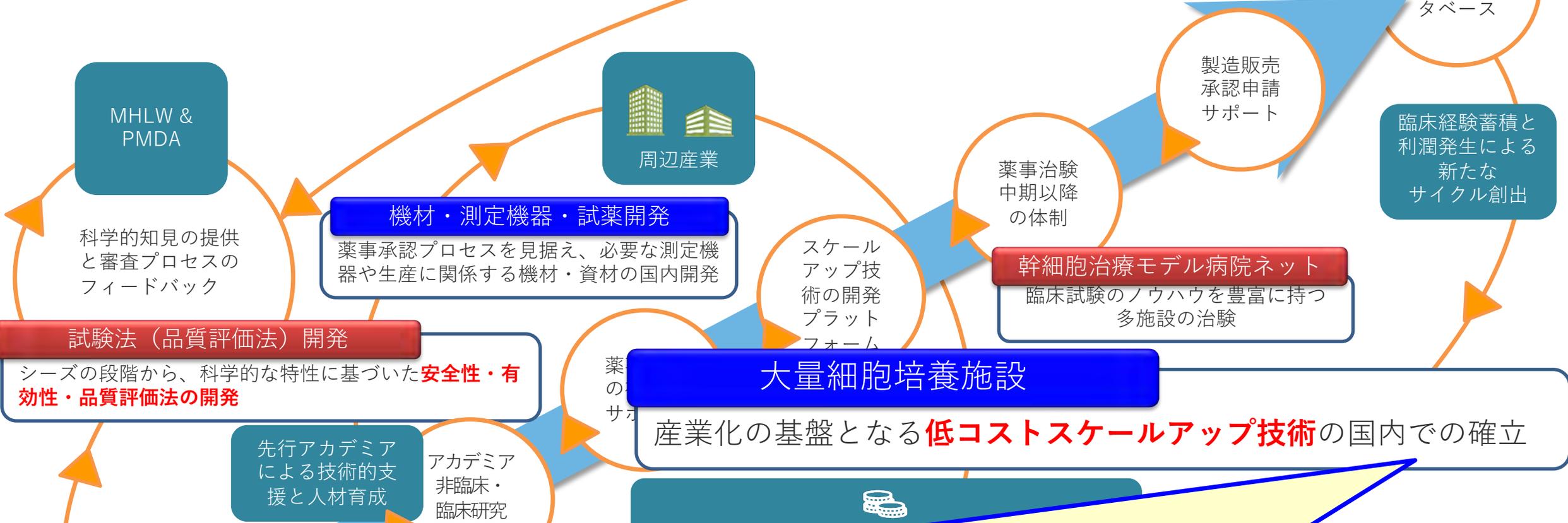
品質

再生医療等製品の実用化のための重要課題

- 有効性と安全性
- 有効性と安全性を確保するための品質のあり方
- 品質を確保するための規格設定・特性解析

再生医療を患者まで届けるための基盤

シーズを社会へと送り出す基盤の構築と蓄積したノウハウの循環



スケールアップ・製造の効率化・コストダウンなどのためには
柔軟かつ合理的な製法変更が必要！

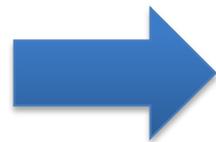
提供：日本再生医療推進機構
八代嘉美先生（佐藤が一部改変）

Q1:柔軟な製法変更(スケールアップ等)には何が必要か？

再生医療等製品(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

“Comparable”

「同等・同質」



ICH Q5E

- ▶ 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。

費用と時間がかかるので
開発者としては避けたい

Q1: **柔軟な製法変更(スケールアップ等)**には何が必要か？

再生医療等製品(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

Q2: **品質の同等性／同質性**の説明に必要なものは何か？

再生医療等製品(細胞加工製品)の有効性・安全性と関係する**重要品質特性(CQA)**や原料等の**重要物質特性(CMA)**

大きな問題

再生医療等製品(細胞加工製品)の場合、
すべてのCQA/CMAを同定することは極めて困難

CQA/CMAを「掘り当てる」ためのツールが必要



同等性／同質性の問題の解決策となりうるもの

QbD (Quality by Design Approach)

PERSPECTIVE

nature
biotechnology

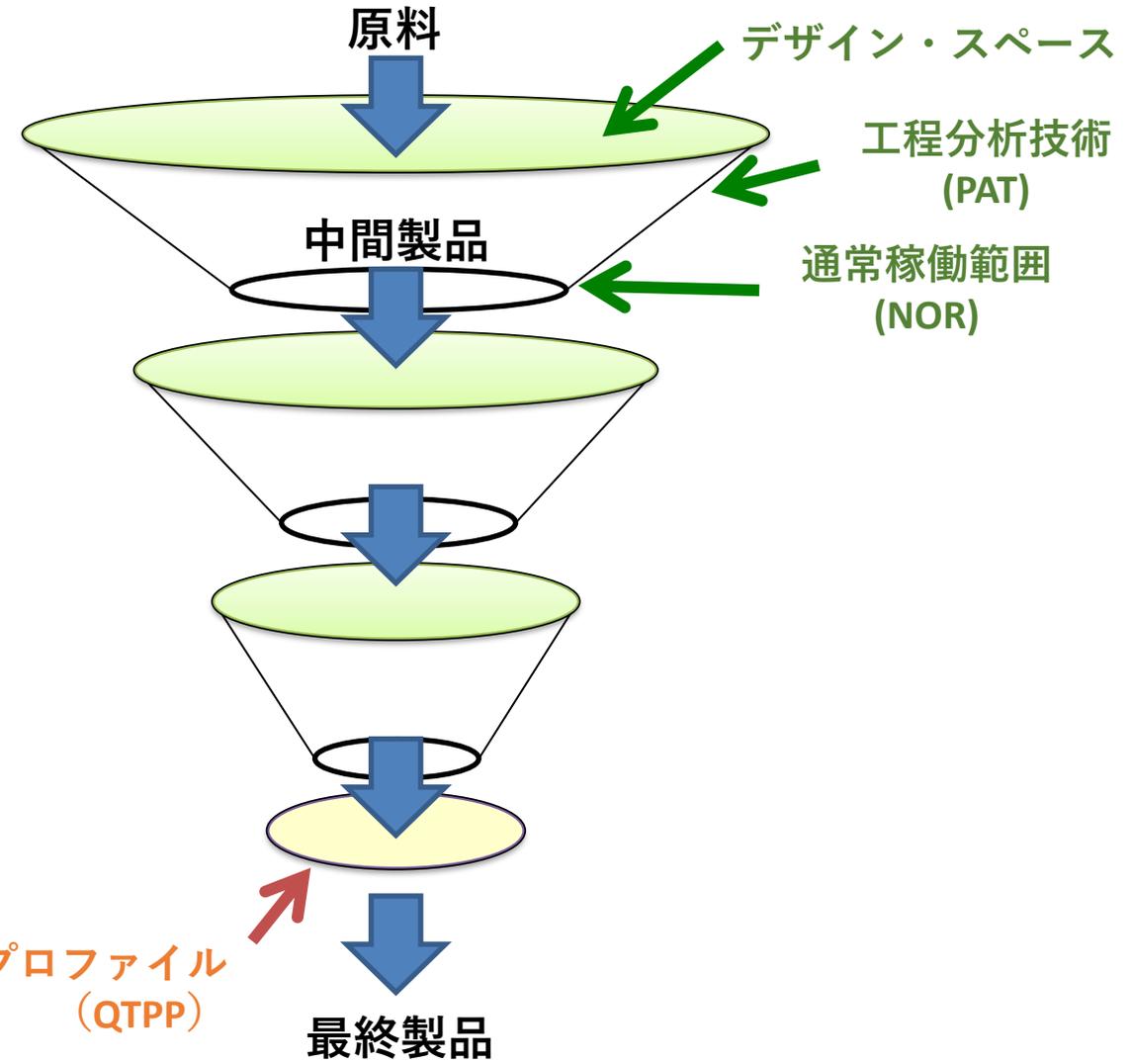
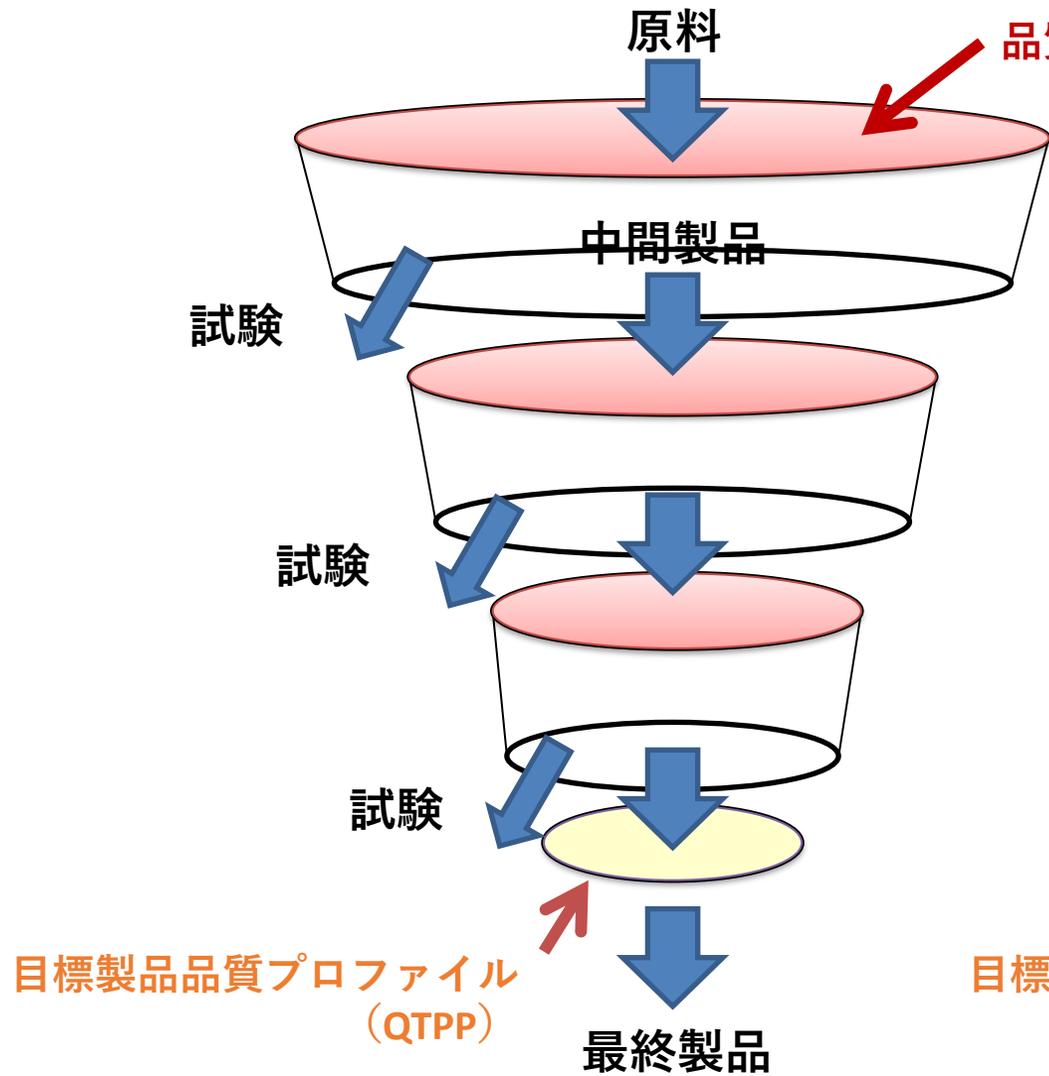
Quality cell therapy manufacturing by design

Yonatan Y Lipsitz¹, Nicholas E Timmins² & Peter W Zandstra¹⁻⁴

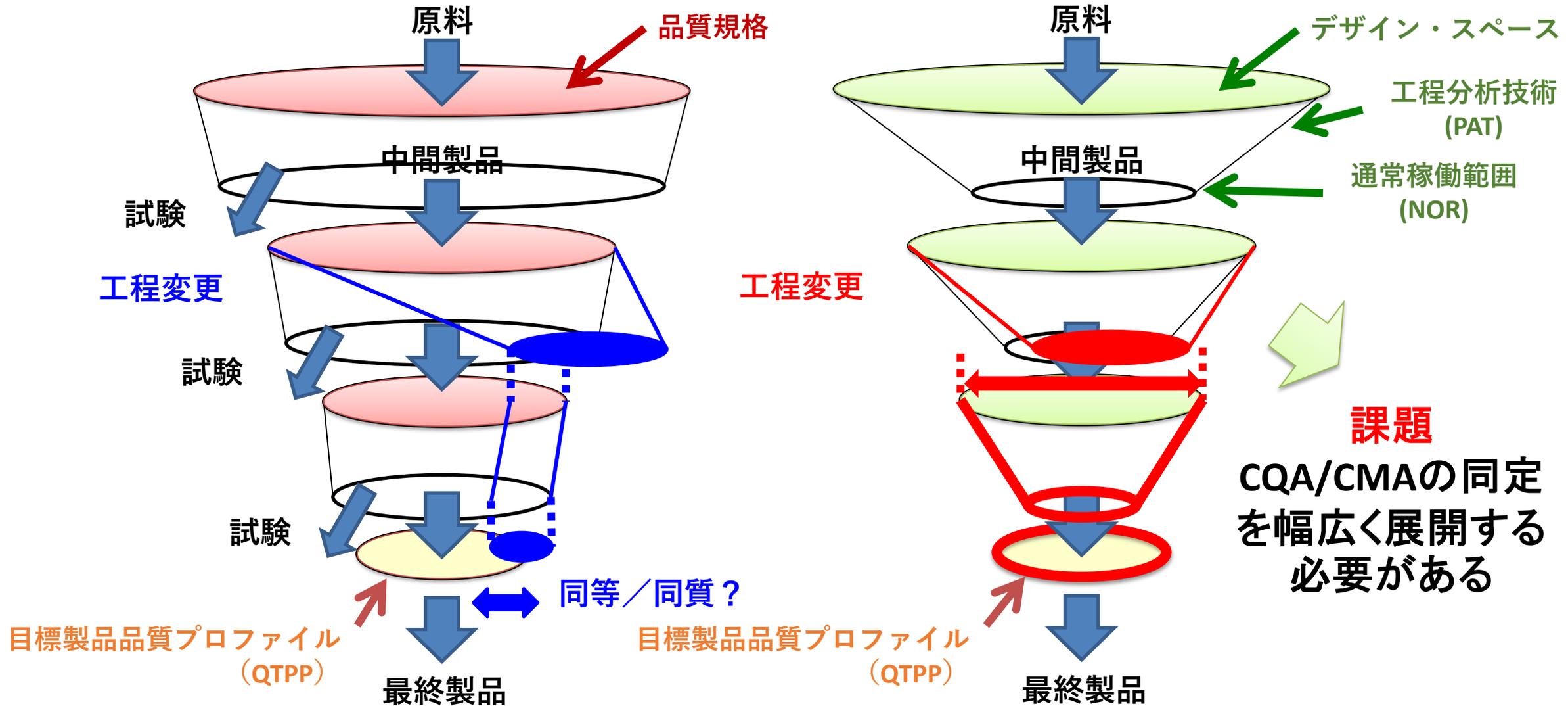
Transplantation of live cells as therapeutic agents is poised to offer new treatment options for a wide range of acute and chronic diseases. However, the biological complexity of cells has hampered the translation of laboratory-scale experiments into industrial processes for reliable, cost-effective manufacturing of cell-based therapies. We argue here that a solution to this challenge is to design cell manufacturing processes according to quality-by-design (QbD) principles. QbD integrates scientific knowledge and risk analysis into manufacturing process development and is already being adopted by the biopharmaceutical industry. Many opportunities to incorporate QbD into cell therapy manufacturing exist, although further technology development is required for full implementation. Linking measurable molecular and cellular characteristics of a cell population to final product quality through QbD is a crucial step in realizing the potential for cell therapies to transform healthcare.

In 2002, the US Food and Drug Administration (FDA) introduced the Pharmaceutical current good manufacturing practice (cGMP) Initiative to address inefficiencies and challenges in identifying the underlying cause of drug manufacturing failures, and in 2006, the International Conference on Harmonisation² outlined the QbD framework, a systematic approach to process and product management based on scientific knowledge and risk assessment. Today, following the widespread adoption of QbD by manufacturers of small-molecule pharmaceuticals, biopharmaceutical manufacturers are now increasingly implementing QbD principles in their processes³. Although some regulatory agencies, such as Health Canada, currently accept QbD-based submissions only for well-characterized chemical and biological drugs, application of QbD to cell-based therapies would greatly improve process and product understanding and outcomes. Indeed, the biological complexity of CTPs is what makes the iterative philosophy of QbD especially relevant to this therapeutic modality and indeed critical to the success of the CTP industry.

QbT (Quality by Testing, 従来の品質管理) vs. QbD (Quality by Design)



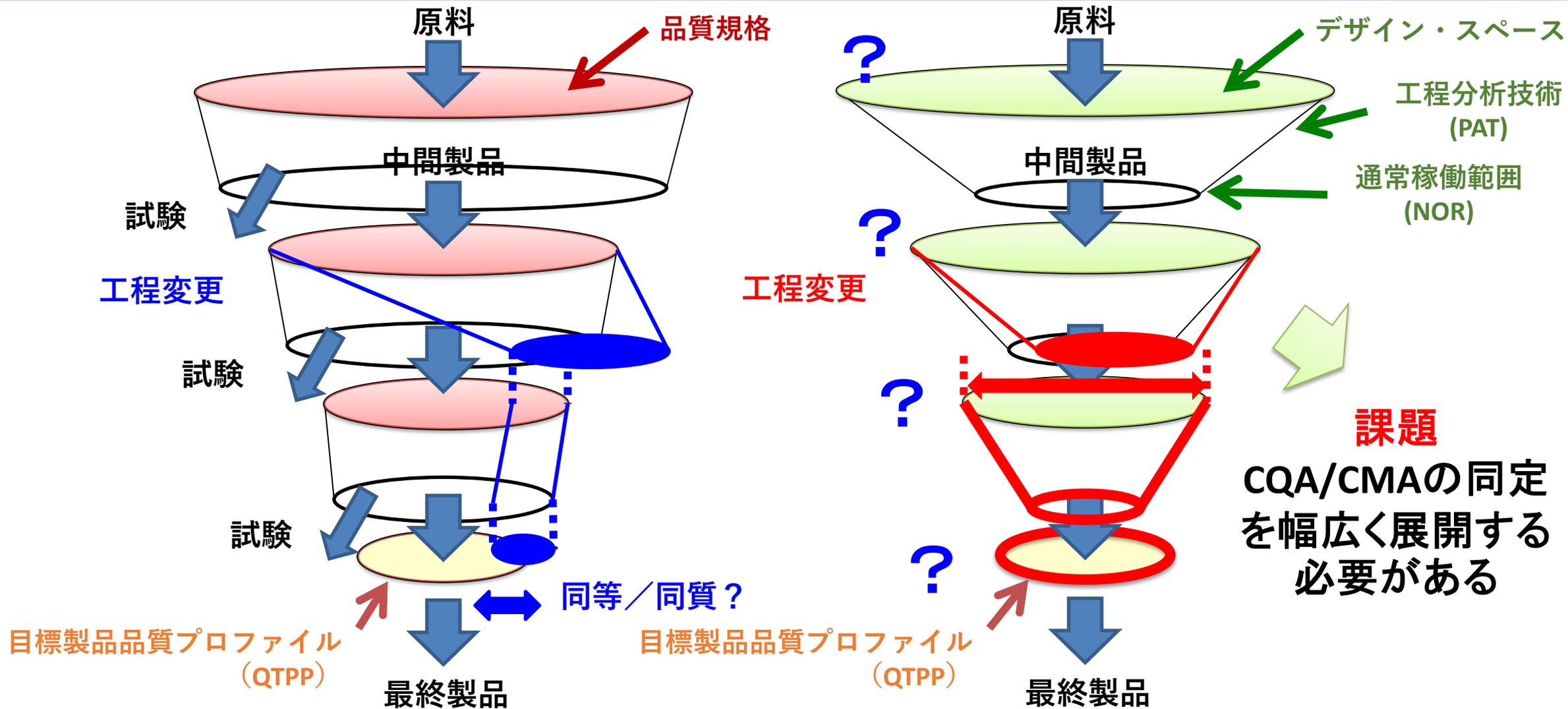
QbT (Quality by Testing, 従来の品質管理) vs. QbD (Quality by Design)



CQA/CMAを「掘り当てる」ためのツールが必要

QbT (Quality by Testing, 従来の品質管理) vs. QbD (Quality by Design)

CQA/CMAが同定されていないとデザインスペースの設定ができないので、QbDができない



CQA/CMAを「掘り当てる」ためのツールが必要

本日のお話

1. CQA/CMA: 細胞加工製品のQbD製造に必要なもの

2. CMA Mining: 細胞加工製品の原料としてのヒトiPS細胞の株間

の特性の違いの理解と分化傾向マーカーの探索

3. CQA Mining: シングルセルRNA-Seq解析による
ヒト間葉系幹細胞の不均一性の理解と
有効成分細胞の探索

何をどう評価すべきなのか？

再生医療等製品(細胞加工製品)の実用化における主な科学的課題

1. ウイルス安全性(同種由来 vs. 自己由来)
2. 原材料として供される細胞の特性解析と適格性
3. 細胞基材以外のヒト又は動物起源由来製造関連物質の適格性
4. 細胞基材としてのセル・バンクの樹立と管理のありかた
5. 最終製品の品質の再現性を達成するための包括的な製造戦略、製造工程評価
6. 最終製品を構成する細胞の有効成分としての特性解析
7. 最終製品の重要品質特性の同定と規格設定(最終製品の品質管理)
8. 製法／セル・バンクの変更による新旧製品の同等性の検証
9. 非臨床安全性試験・非臨床POC試験のデザインと解釈
10. 造腫瘍性試験のデザインと解釈(特にES/iPS細胞由来製品)
11. 最終製品の免疫原性評価
12. 投与細胞の体内での分布・挙動
13. 臨床試験のデザインと解釈
14. 有効性・安全性のフォローアップのあり方

原料の
安全性・適格性

最終製品の品質確保

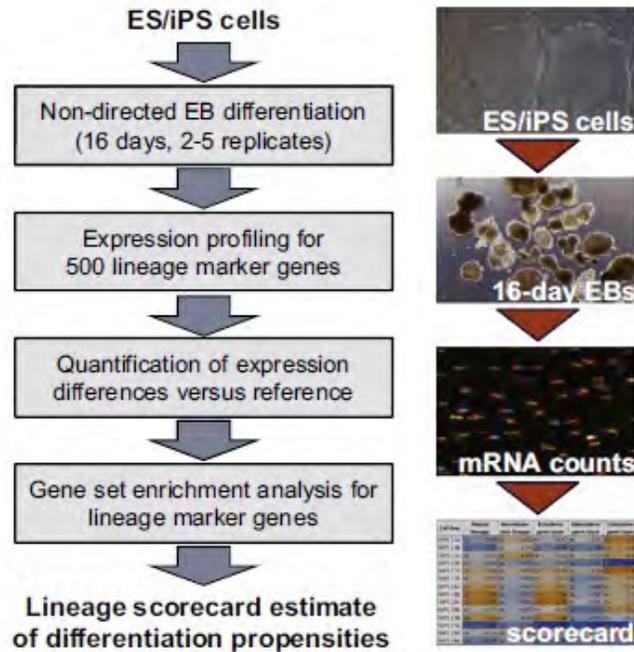
非臨床段階での
安全性・有効性の予測

臨床評価の
あり方

「目的に適った原料としてのiPS細胞のセル・バンク」とは？

例) ヒト多能性幹細胞株間における各種細胞への分化傾向(propensity)の差

Bock et al. Cell. 2011;144:439-52



Cell line	Neural lineage	Hematopoietic lineage	Ectoderm germ layer	Mesoderm germ layer	Endoderm germ layer
HUES1	-1.84	-0.30	-1.56	0.06	-0.59
HUES3	-0.29	-0.01	-0.23	-0.07	0.08
HUES6	-0.78	-0.26	-0.51	-0.05	-0.47
HUES8	-0.15	0.69	-0.17	0.68	1.45
HUES9	-0.89	0.31	-0.75	0.51	0.37
HUES28	-1.33	-0.11	-0.91	1.03	-0.07
HUES44	0.70	-0.27	0.52	-0.48	-0.45
HUES45	-0.46	-0.26	-0.49	-0.02	0.65
HUES48	0.83	0.18	0.70	0.24	0.55
HUES49	0.19	0.07	0.03	-0.66	-0.26
HUES53	-0.95	0.65	-1.19	-0.22	-0.20
HUES62	0.25	-0.15	0.15	-0.60	0.24
HUES63	0.62	0.39	0.72	0.34	0.61
HUES64	1.45	-0.07	1.44	-0.56	-0.61
HUES65	0.19	0.02	0.22	0.19	-0.15
HUES66	0.59	-0.67	0.36	-1.22	-0.37
H1	1.54	-0.29	1.21	0.07	-0.56
H9	1.08	0.01	1.10	0.55	-0.16

Cell line	Neural lineage	Hematopoietic lineage	Ectoderm germ layer	Mesoderm germ layer	Endoderm germ layer
hiPS 11a	-0.69	0.18	-0.37	-0.23	0.83
hiPS 11b	-1.17	-0.23	-0.96	-1.03	0.47
hiPS 11c	-0.22	0.40	-0.03	-0.16	0.37
hiPS 15b	-0.48	-0.78	-0.63	-1.11	-2.49
hiPS 17a	0.19	0.05	0.33	0.00	1.16
hiPS 17b	-0.07	-0.48	-0.02	-0.83	0.20
hiPS 18a	0.28	-0.52	0.31	-0.67	0.20
hiPS 18b	0.80	-0.72	0.84	-0.62	0.15
hiPS 18c	0.93	-0.65	1.05	-0.41	0.10
hiPS 20b	-0.37	-0.47	-0.30	-1.16	0.56
hiPS 27b	0.52	-0.50	0.68	-0.71	-0.42
hiPS 27e	-1.61	-1.04	-2.12	-1.82	-3.27
hiPS 29d	-0.25	-0.04	0.00	-0.11	0.83
hiPS 29e	-0.99	-0.60	-1.15	-1.14	-1.08

Differentiation propensity: ■ high ■ medium ■ low

↑ ↗ → ↘ ↓

ヒトiPS/ES細胞株のセル・バンクを「未分化性」や「多能性」のみで品質管理していると、目的とする細胞への分化効率にバラツキが生じやすい

そのまま使えるか？

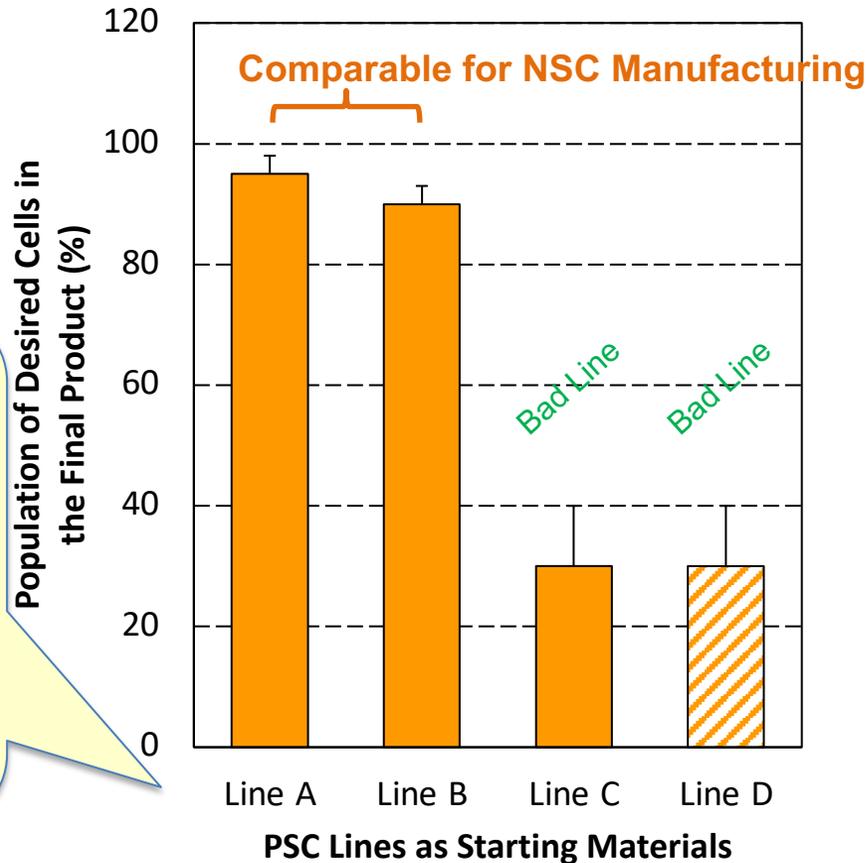
特定の製品製造用の細胞基材としてのセルバンクでは「目的に適った分化傾向・分化能」を品質として管理する必要がある

「多能性」は確かにあるが、株間で「分化傾向」がさまざま

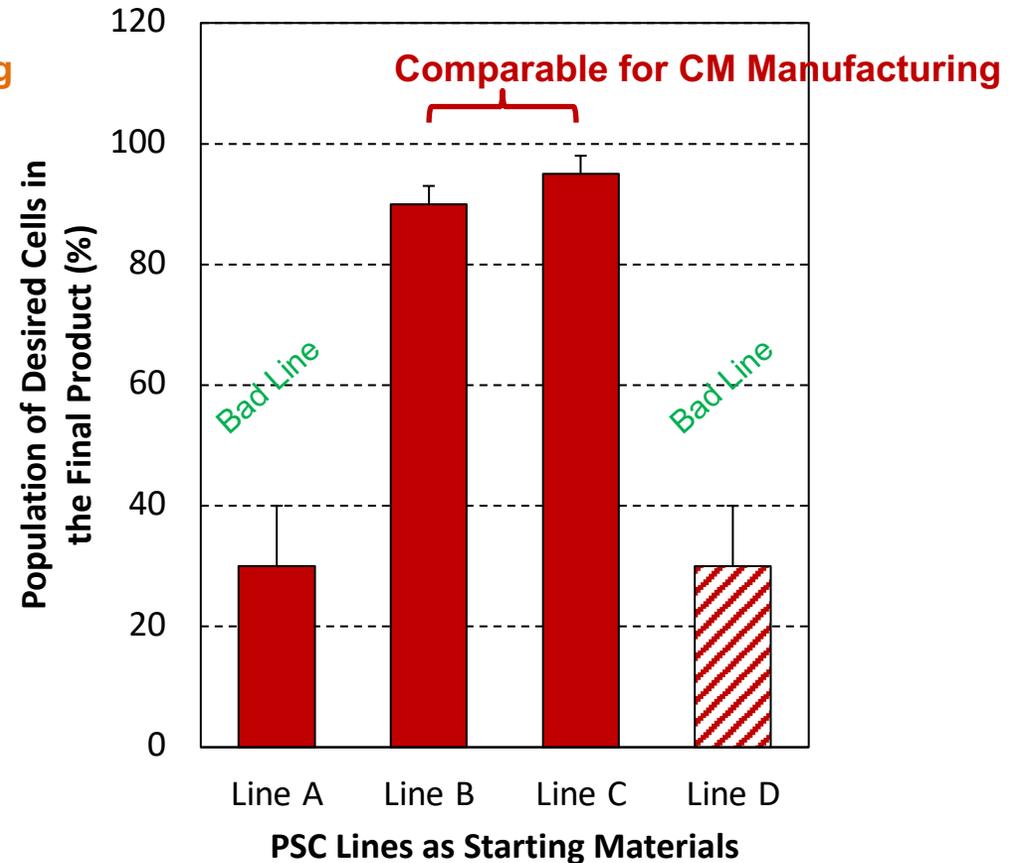
原料の品質の同等性は、最終製品が違えば異なりうる

Fictitious Cases

Final Product: **Neural Stem Cells**



Final Product: **Cardiomyocytes**



多能性幹細胞株

A, B, C, D

◆未分化マーカーを同程度発現し、

◆全ての細胞種に分化可能でも、

◆各細胞種への「分化のしやすさ」に差がある場合

細胞加工製品の出発原料細胞の品質やその同等性は、最終製品である細胞加工製品の品質やその同等性により決定される

「生きた素材」を使った「ものづくり」

ウイスキー酵母



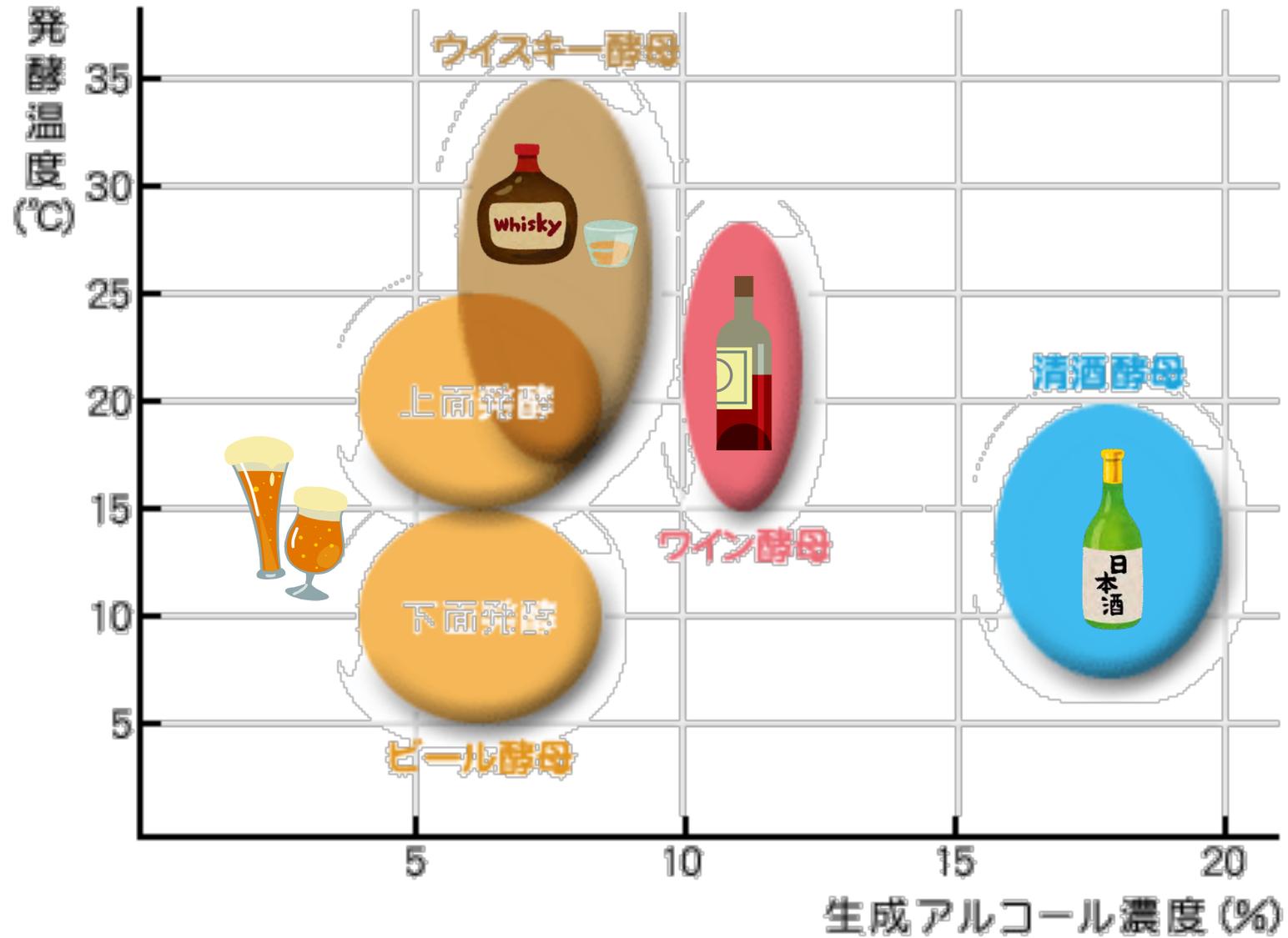
ビール酵母

ワイン酵母



清酒酵母

目的に合った酵母(素材)を使い分けることで、各品目で美味しい(高品質な)製品を作ります
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



「生きた素材」を使った「ものづくり」

ウイスキー酵母



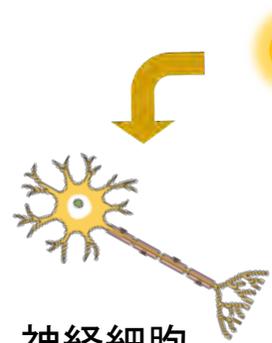
ビール酵母

ワイン酵母

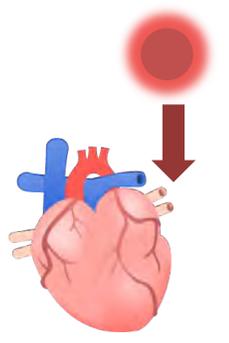


清酒酵母

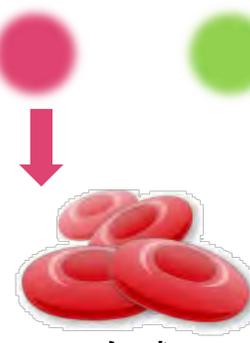
目的に合った酵母(素材)を使い分けることで、各品目で美味しい(高品質な)製品を作ります
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



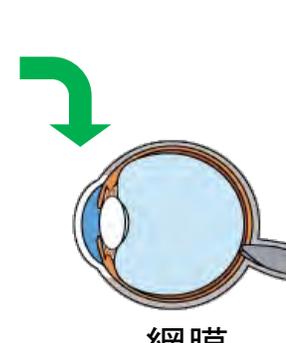
神経細胞



心筋細胞



血球



網膜

「高い再現性で品質の高い最終製品(目的細胞)を製造する」という目的に適った**素材**
(例: 専用の**細胞株**)またはその**規格**を選択する(**囲い込む**)ことが重要

厳選した「生きた素材」を囲い込む

iPS細胞の**基本特許の期間**はあと何年か？
「再生医療等製品」の**本格的実用化・産業化**はいつか？



「**厳選素材**」(セル・バンク)あるいはその**品質規格**を門外不出にすれば、**良い製品を独占的に長期にわたり売り続けることができる**

(某国産ビールのコピー)

『○○○酵母が生み出す○○○らしい味おい』

『○○○はうまさで百三十年』



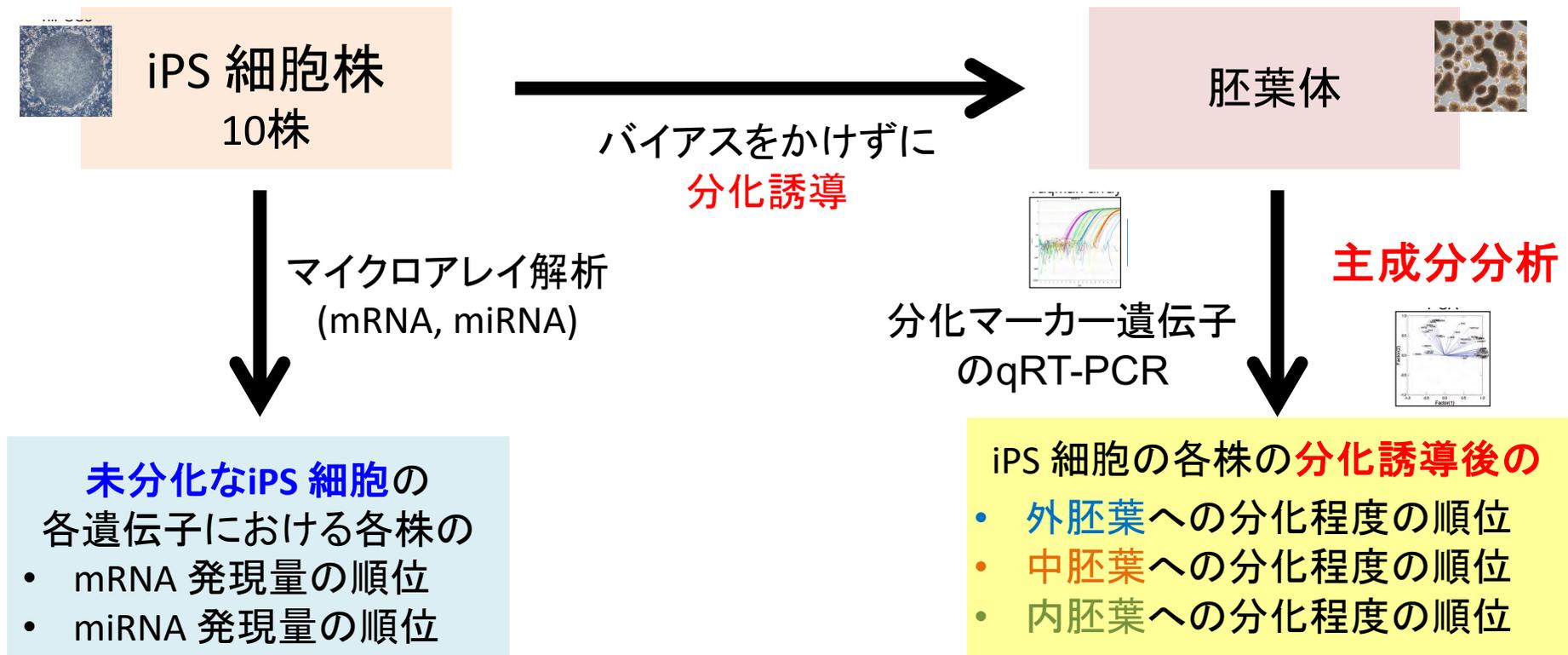
では、どうしたら「良い素材」を選ぶことができるのか？

品質特性指標 バイオマーカー

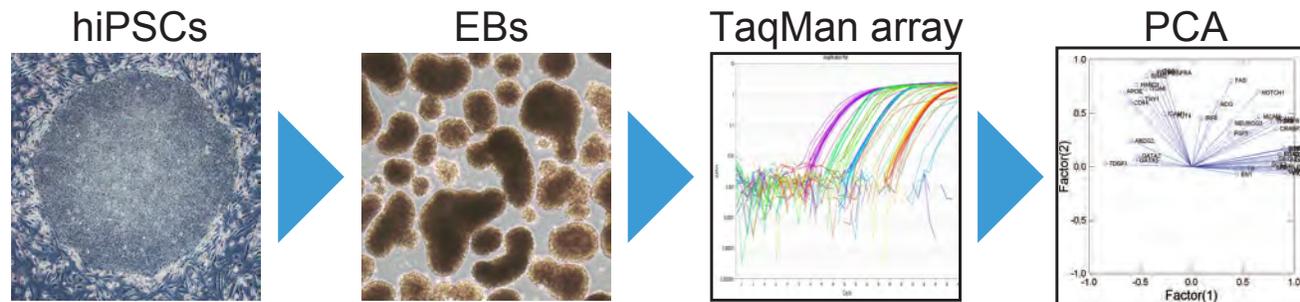
最終目的細胞に再現性高く、高効率に分化するヒト多能性幹細胞を選抜するための、ヒト多能性幹細胞中の特性指標を探し出し、原料の規格設定に利用

特性指標となる因子の効率的な探索・検証の手法の開発

iPS細胞分化傾向マーカーの探索



iPS細胞は株間で分化のしやすさ（分化傾向）に大きなバラツキがある

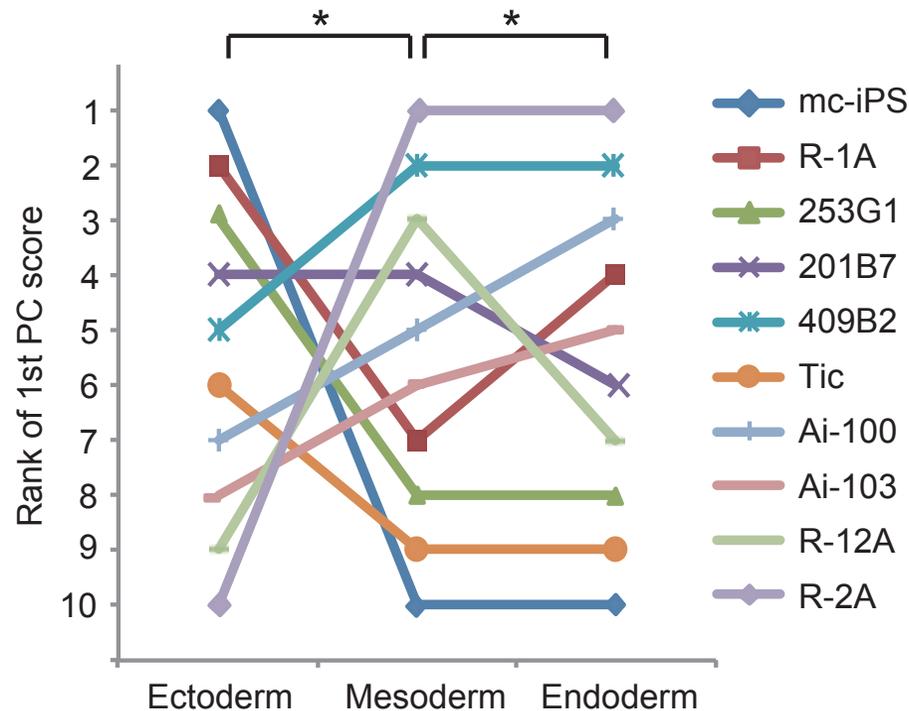


外胚葉マーカー:45遺伝子 中胚葉マーカー:56遺伝子 内胚葉マーカー:27遺伝子

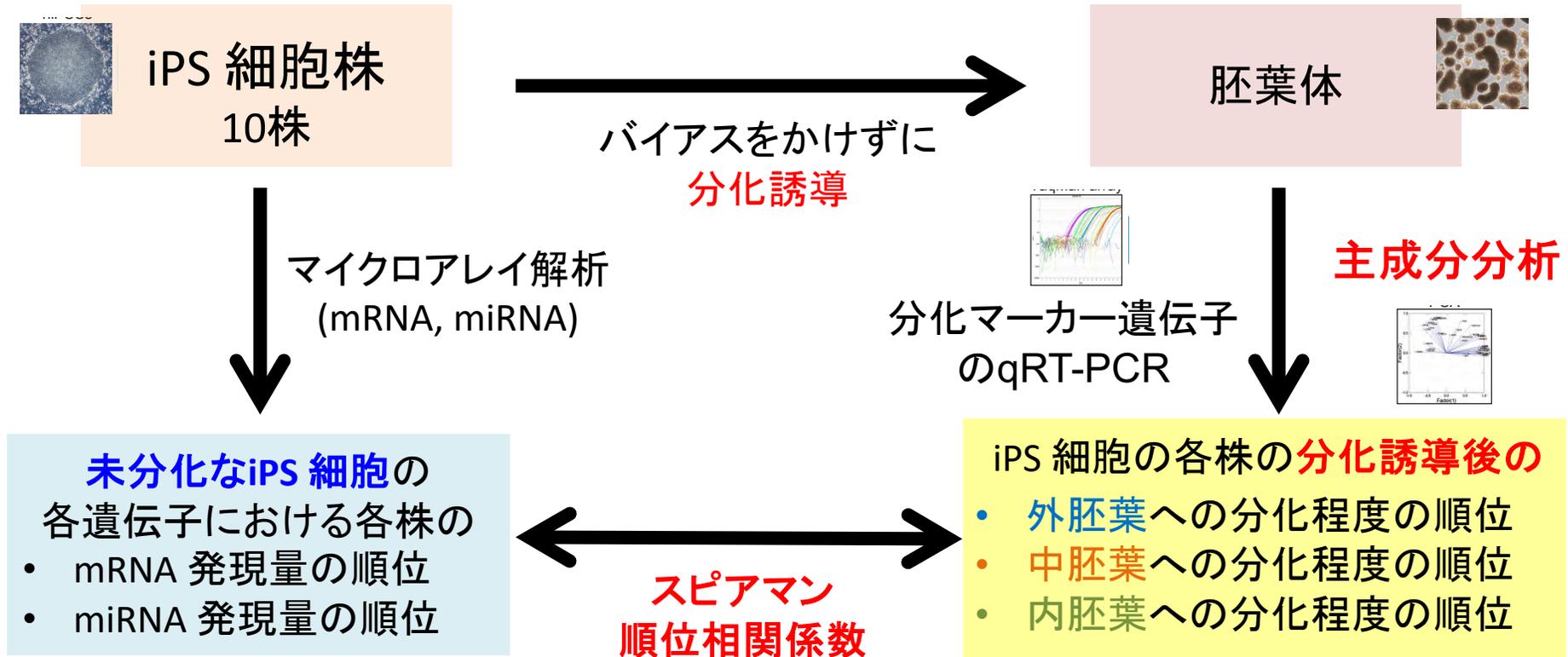
第一主成分得点

Cell line	Differentiation lineage		
	Ectoderm	Mesoderm	Endoderm
201B7	23.5	1.5	1.2
253G1	23.8	-12.6	-9.5
409B2	-11.8	18.5	9.3
Ai-100	-17.7	0.9	5.6
Ai-103	-18.0	0.2	3.0
mc-iPS	28.5	-32.2	-18.1
R-1A	25.4	-2.5	4.4
R-2A	-20.3	41.1	18.4
R-12A	-19.1	12.1	-0.4
Tic	-14.3	-27.0	-13.8

■ High □ Medium ■ Low



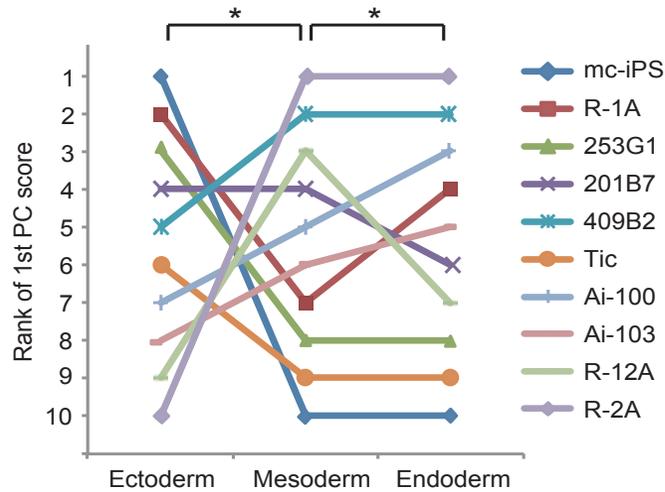
iPS細胞分化傾向マーカーの探索



Probe sets exhibiting statistically significant ($P < 0.05$)

Ectoderm			Mesoderm			Endoderm		
Correlation	MicroArray (Probes)	miRNA Array (Probes)	Correlation	MicroArray (Probes)	miRNA Array (Probes)	Correlation	MicroArray (Probes)	miRNA Array (Probes)
Positive	136	3	Positive	35	12	Positive	9	23
Negative	92	3	Negative	7	1	Negative	29	0

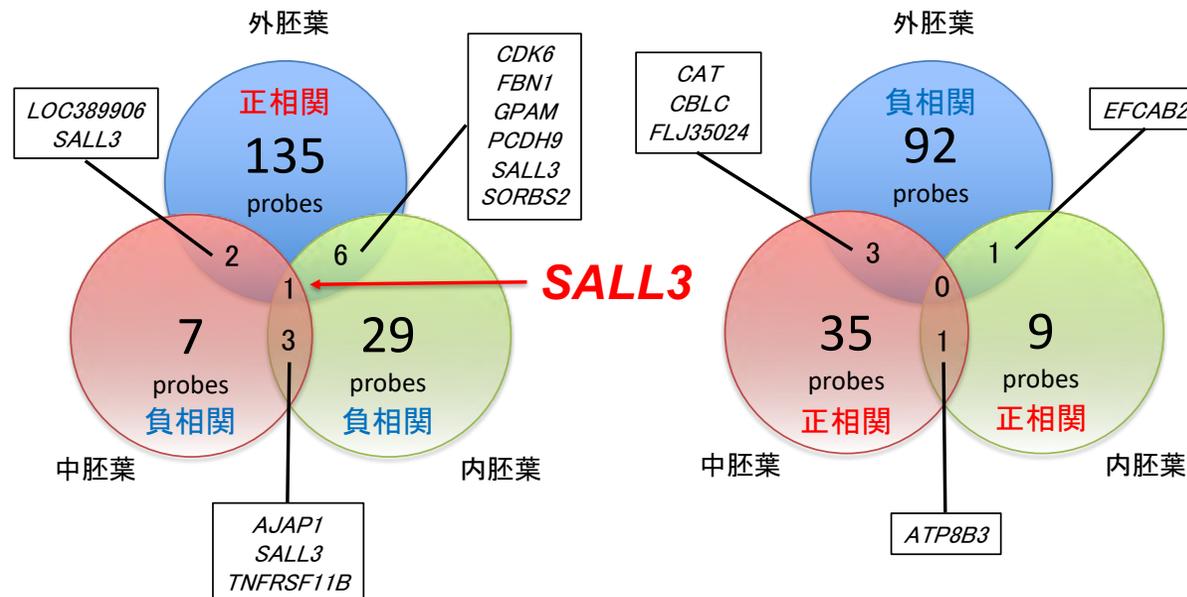
iPS細胞の分化傾向マーカー *SALL3*



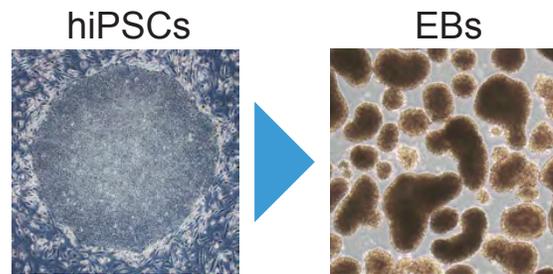
外胚葉になりやすい株は中・内胚葉になりにくい
 中・内胚葉になりやすい株は外胚葉になりにくい

仮説

外胚葉 ↔ 中・内胚葉で逆相関を示す遺伝子
 = 機能的に分化に関与



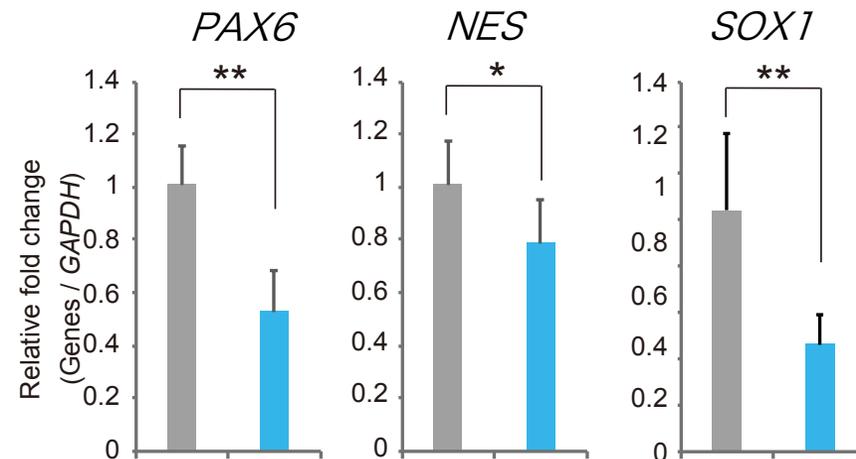
253G1 SALL3 KD株 EB分化



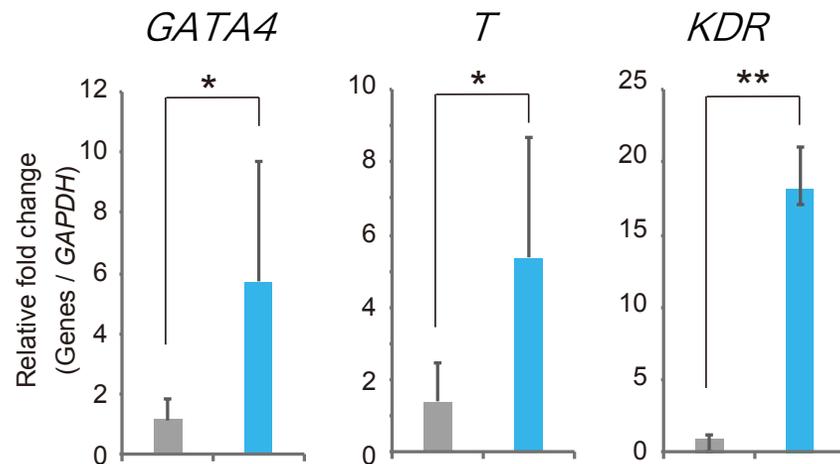
Control shRNA

SALL3 shRNA

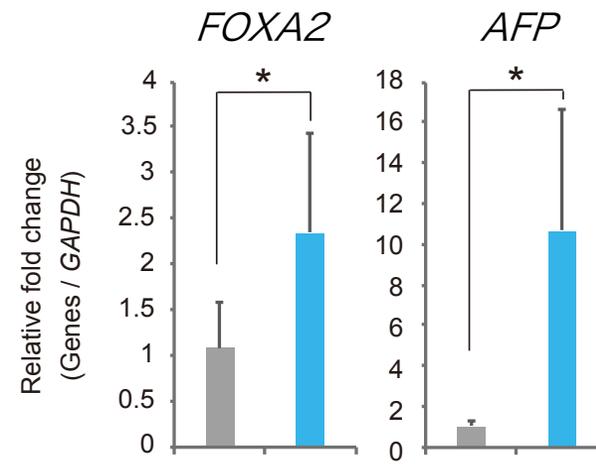
外胚葉マーカー



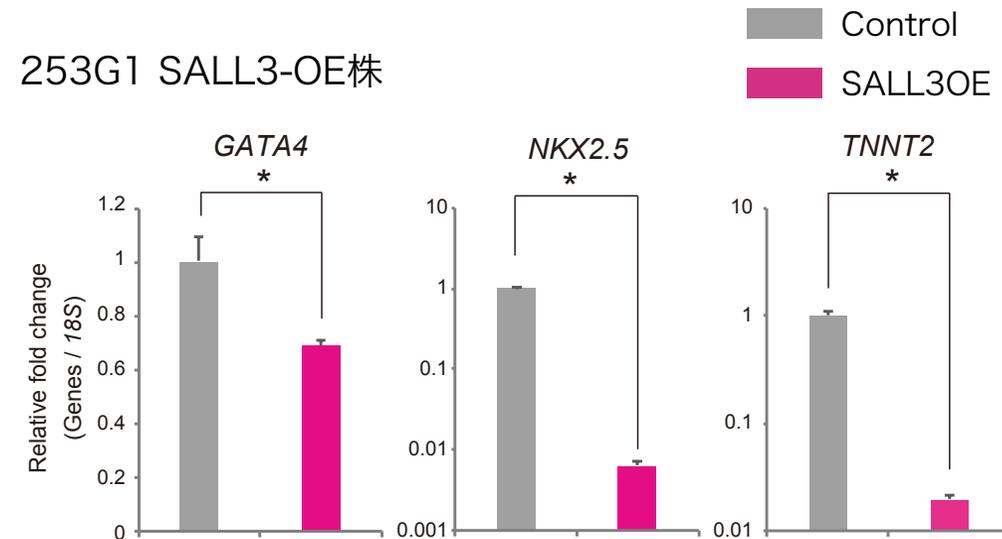
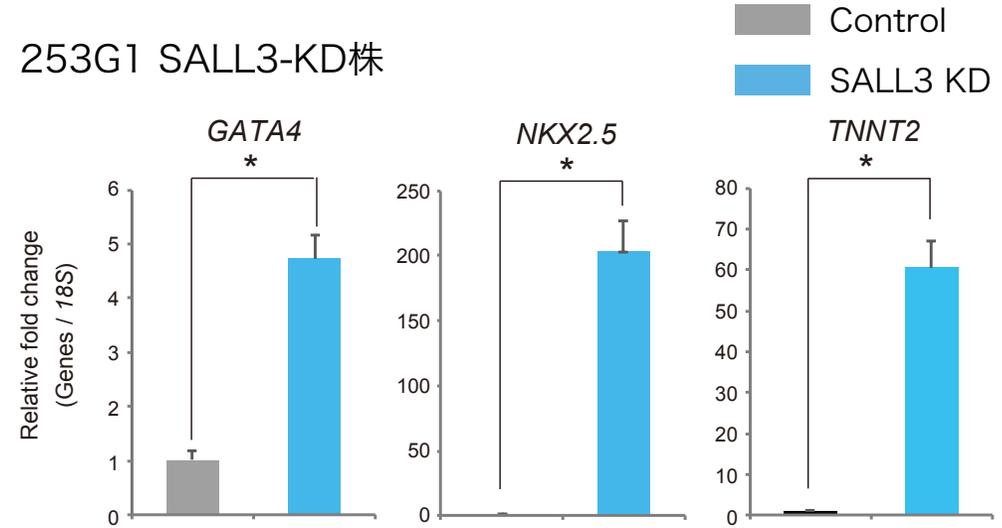
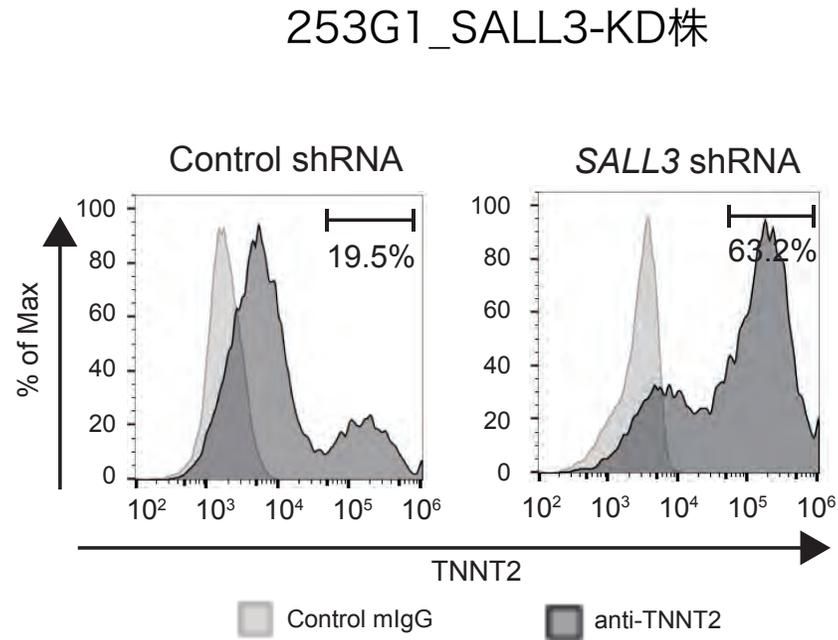
中胚葉マーカー



内胚葉マーカー



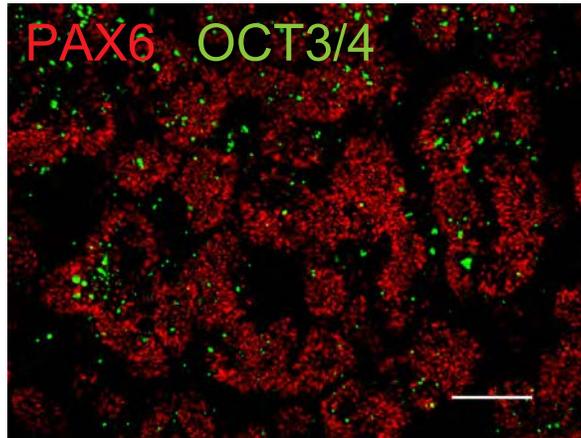
253G1 SALL3 KD/OE株 心筋分化誘導



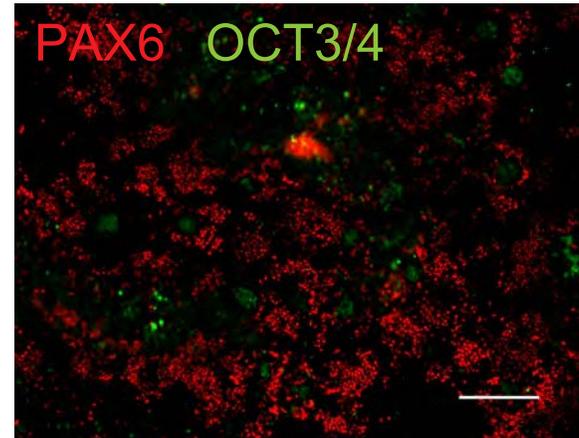
253G1 SALL3 KD/OE株 神経分化誘導

神経分化誘導 (Day10)

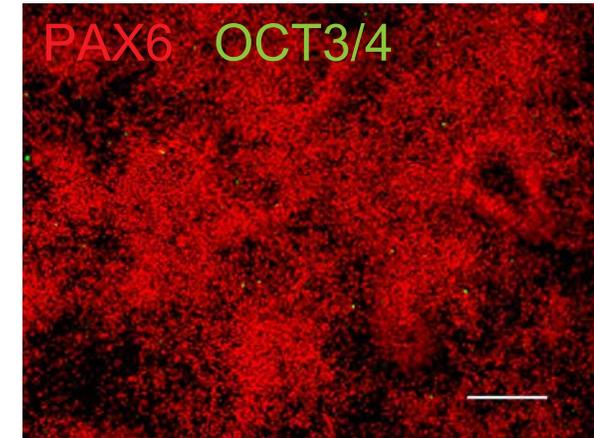
PAX6: 外胚葉マーカー



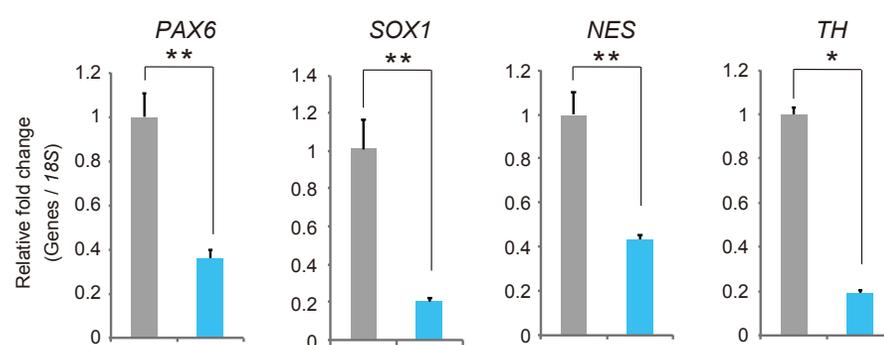
253G1



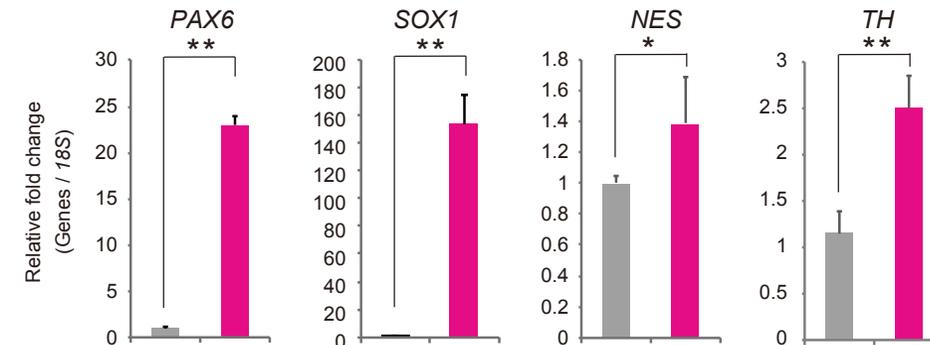
253G1_SALL3-KD



253G1_SALL3-OE



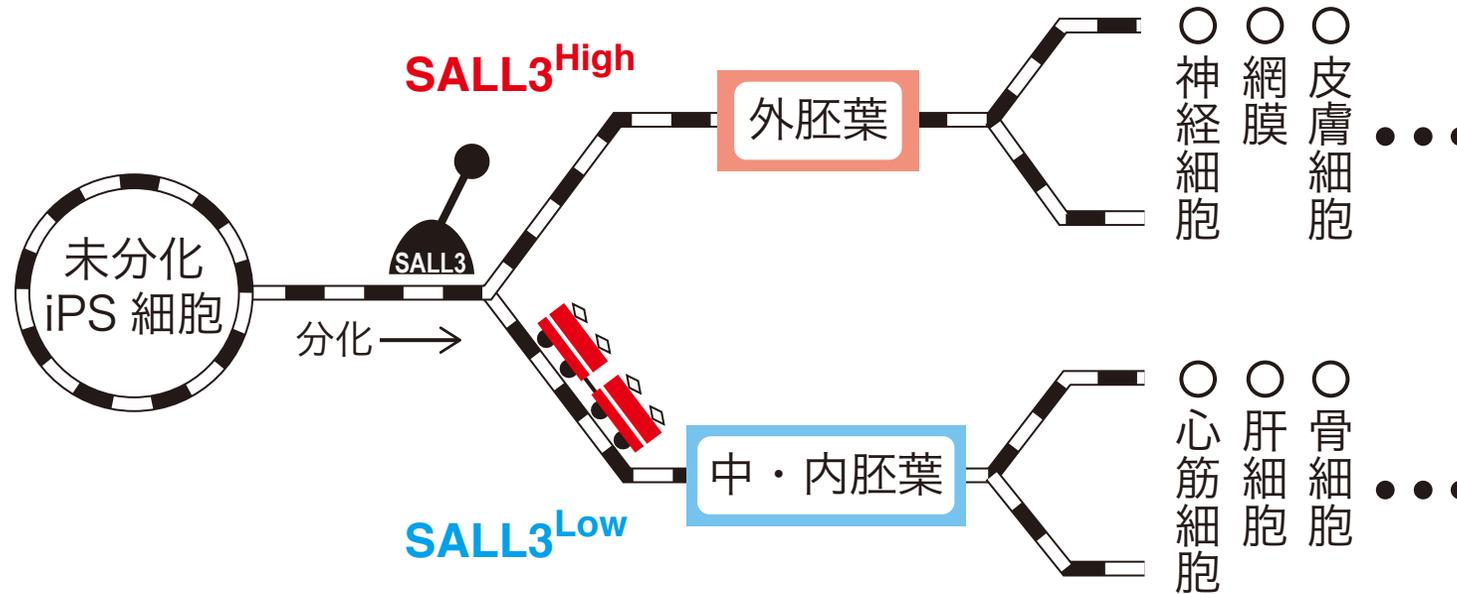
Control
SALL3 KD



Control
SALL3OE

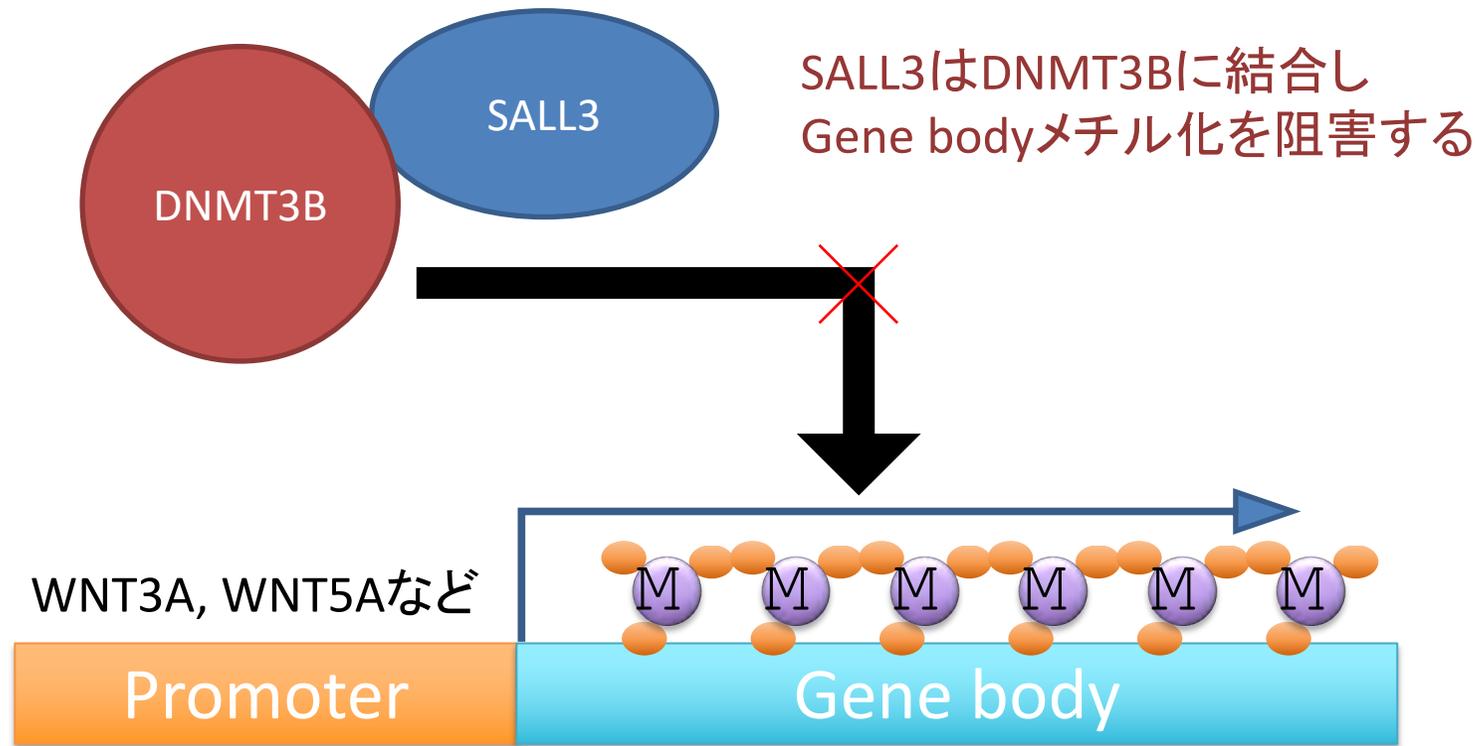
iPS細胞の分化傾向マーカー SALL3

ヒトiPS細胞はSALL3の発現が高いと外胚葉に分化しやすく、
逆に発現量が低いと中・内胚葉に分化しやすい



SALL3は分化傾向を調節する分岐器（ポイント）の機能を持つ。

SALL3の分化傾向決定のメカニズム



SALL3はDNMT3BのGene bodyメチル化を阻害している。

「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー(外胚葉 vs. 中・内胚葉)

nature COMMUNICATIONS

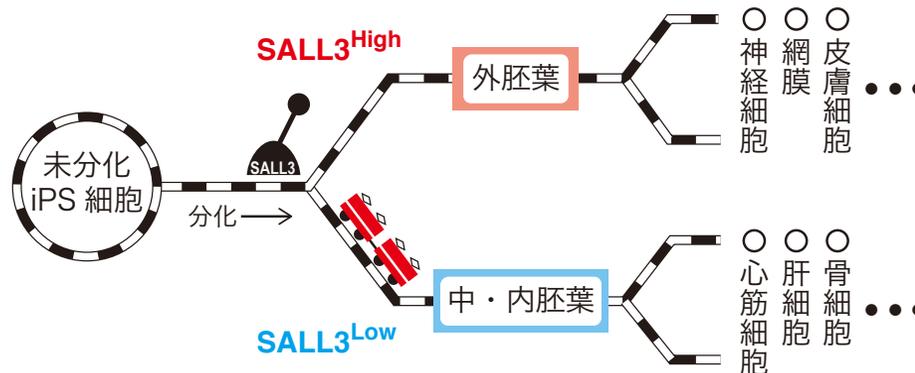
ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09511-4> OPEN

SALL3 expression balance underlies lineage biases in human induced pluripotent stem cell differentiation

Takuya Kuroda¹, Satoshi Yasuda¹, Shiori Tachi^{1,2}, Satoko Matsuyama^{1,3}, Shinji Kusakawa¹, Keiko Tano¹, Takumi Miura¹, Akifumi Matsuyama³ & Yoji Sato^{1,2,4,5}

Clinical applications of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) are expected, but hiPSC lines vary in their differentiation propensity. For efficient selection of hiPSC lines suitable for differentiation into desired cell lineages, here we identify SALL3 as a marker to predict differentiation propensity. SALL3 expression in hiPSCs correlates positively with ectoderm differentiation capacity and negatively with mesoderm/endoderm differentiation capacity. Without affecting self-renewal of hiPSCs, SALL3 knockdown inhibits ectoderm differentiation and conversely enhances mesodermal/endodermal differentiation. Similarly, loss- and gain-of-function studies reveal that SALL3 inversely regulates the differentiation of hiPSCs into cardiomyocytes and neural cells. Mechanistically, SALL3 modulates DNMT3B function and DNA methyltransferase activity, and influences gene body methylation of Wnt signaling-related genes in hiPSCs. These findings suggest that SALL3 switches the differentiation propensity of hiPSCs toward distinct cell lineages by changing the epigenetic profile and serves as a marker for evaluating the hiPSC differentiation propensity.



AMEDプレスリリース

AMED 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
Japan Agency for Medical Research and Development

プレスリリース

ヒトiPS細胞の分化傾向調節遺伝子SALL3を同定—目的細胞に分化しやすいiPS細胞株を選別可能に—

令和元年5月15日 [プレスリリース](#)

国立医薬品食品衛生研究所
日本医療研究開発機構

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部の佐藤陽治部長、安田智室長、黒田拓也主任研究官らの研究グループは、藤田医科大学医学部 松山晃文教授との共同研究により、ヒトiPS細胞株の分化傾向を予測するためのマーカー遺伝子としてSALL3を同定しました。ヒトiPS細胞は三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）全ての系譜に分化することができる能力（多分化能）を持ちますが、細胞株によって各系譜への分化のしやすさ（分化傾向）にバラツキがあることが明らかになっています。そのため、目的とする細胞への分化に適した細胞株を選択することの重要性が注目されています。ヒトiPS細胞において、今回同定したSALL3の未分化状態での発現量を測定することにより、相対的に発現量が高い細胞株は外胚葉に分化しやすく、逆に発現量が低い細胞株は中・内胚葉に分化しやすいことが予測できます。

ヒトiPS細胞 (hiPSC) の分化指向性の指標となる因子の同定のアプローチ (基本型)

「外胚葉または中・内胚葉への分化のしやすさ」を予測するためのiPS細胞バイオマーカー (SALL3) を同定



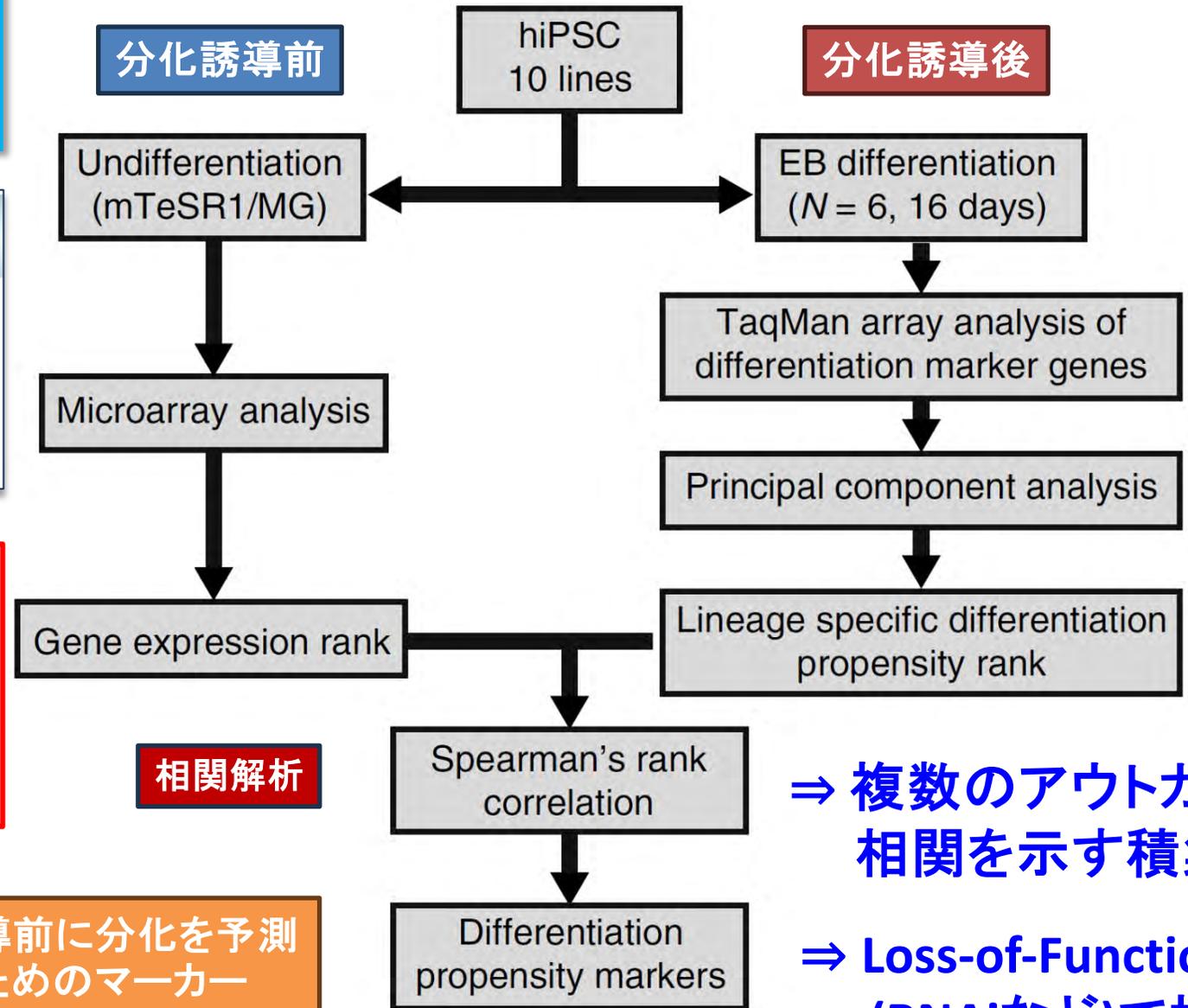
ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09511-4> OPEN

SALL3 expression balance underlies lineage biases in human induced pluripotent stem cell differentiation

オミクス解析を使って
有効性・力価関連指標を
探索する際の課題
= 偽陽性をいかに排除するか?

分化誘導前に分化を予測するためのマーカー



⇒ 複数のアウトカムとの
相関を示す積集合

⇒ Loss-of-Function実験
(RNAiなど)で検証

「生きた素材」を使った「ものづくり」

ウイスキー酵母



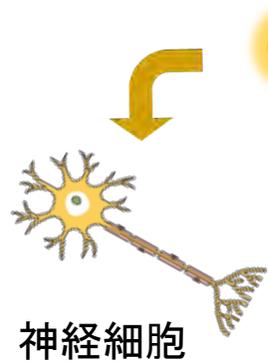
ビール酵母

ワイン酵母

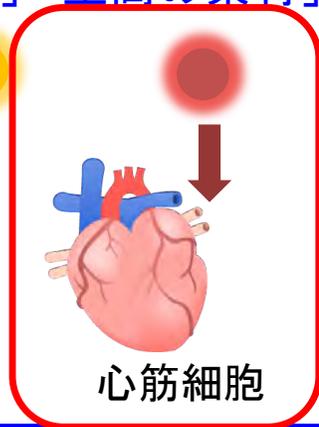


清酒酵母

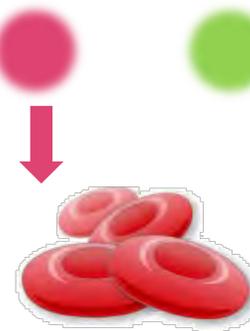
目的に合った酵母(素材)を使い分けることで、各品目で美味しい(高品質な)製品を作ります
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



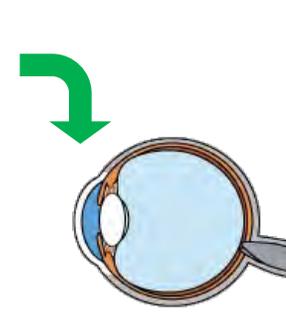
神経細胞



心筋細胞



血球



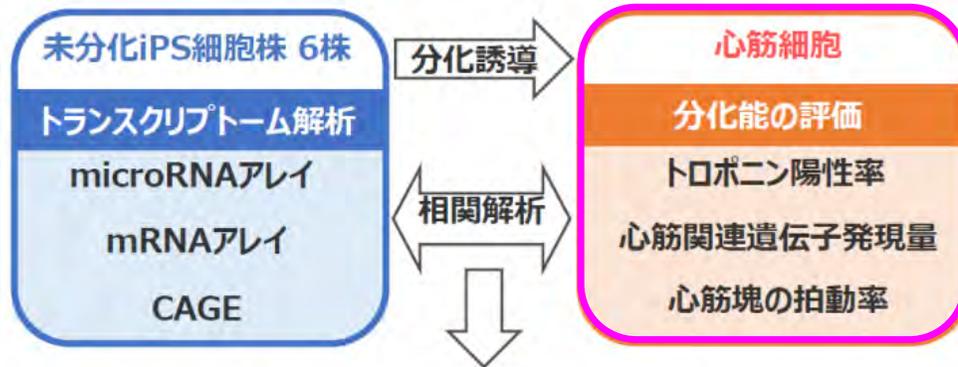
網膜

「高い再現性で品質の高い最終製品(目的細胞)を製造する」という目的に適った**素材**
(例: 専用の**細胞株**)またはその**規格**を選択する(**囲い込む**)ことが重要

「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

ストラテジー

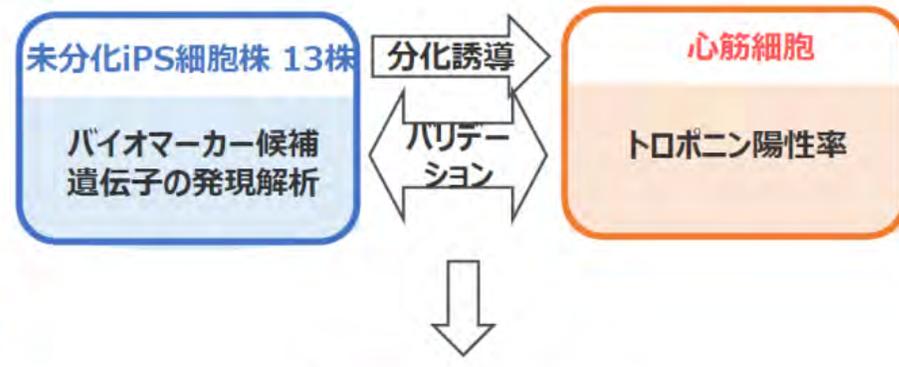
トレーニングセット



バイオマーカー候補遺伝子

候補遺伝子を絞りこむ

テストセット



バイオマーカー選択

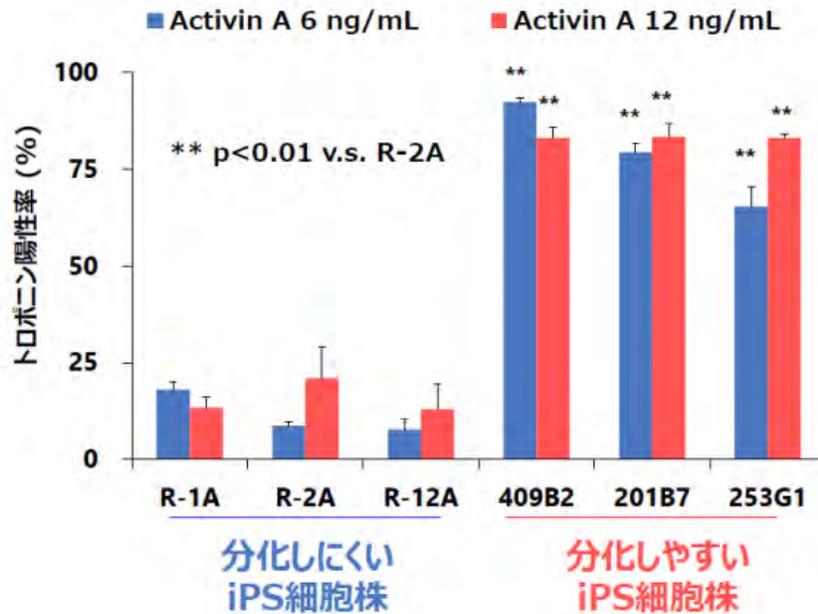
候補遺伝子のバリデーション



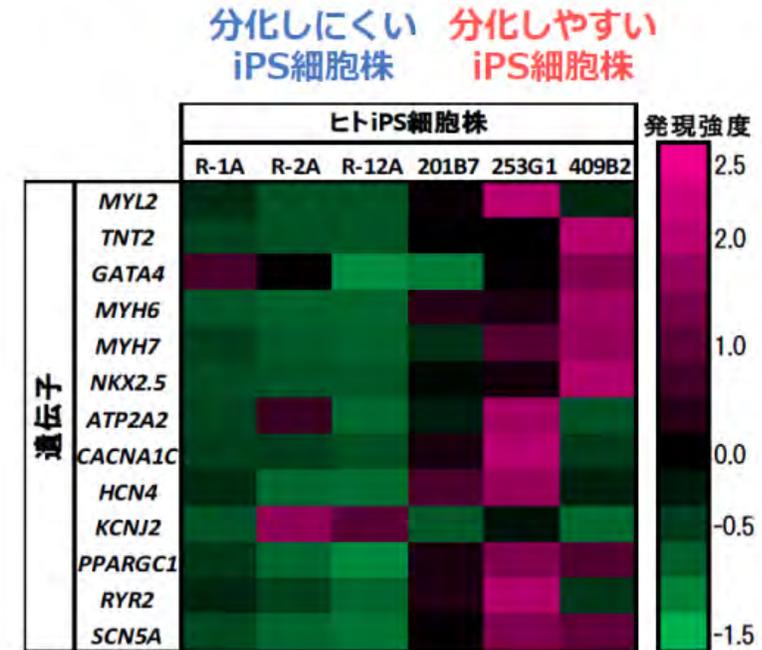
「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

iPS細胞株間の心筋細胞への分化のしやすさの違い

心筋細胞のトロポニン陽性率



心筋細胞関連遺伝子の発現解析

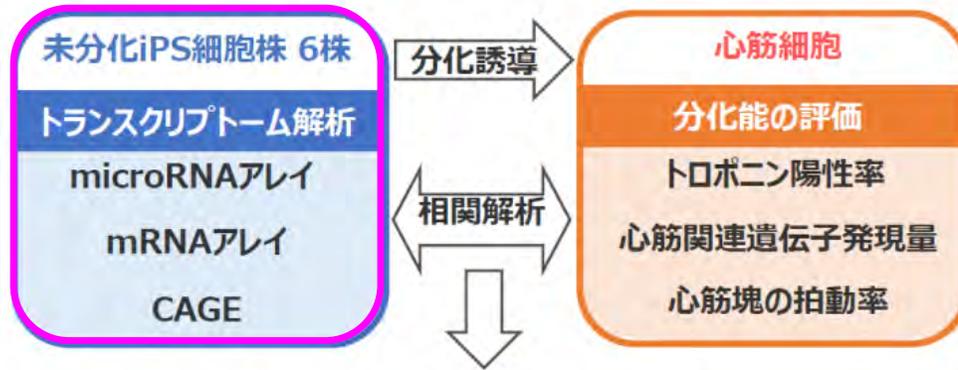


iPS細胞株による心筋分化しやすさの違いが明らかになった

「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

ストラテジー

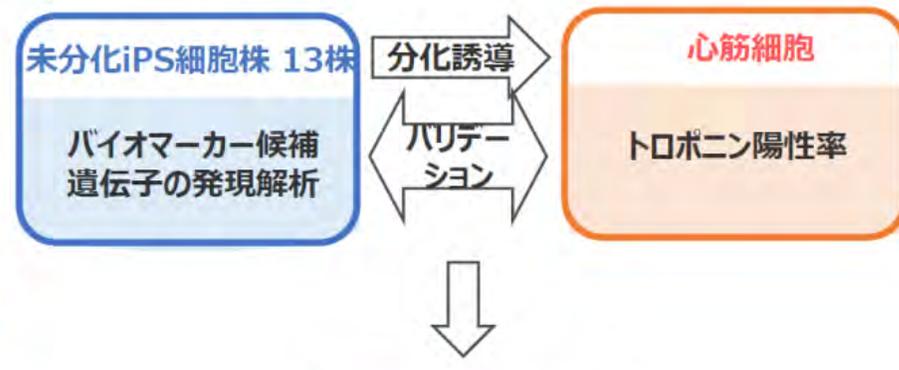
トレーニングセット



バイオマーカー候補遺伝子

候補遺伝子を絞りこむ

テストセット



バイオマーカー選択

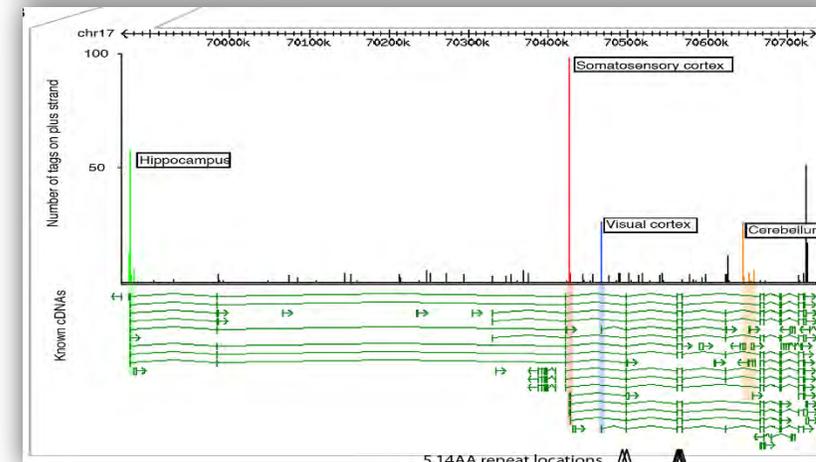
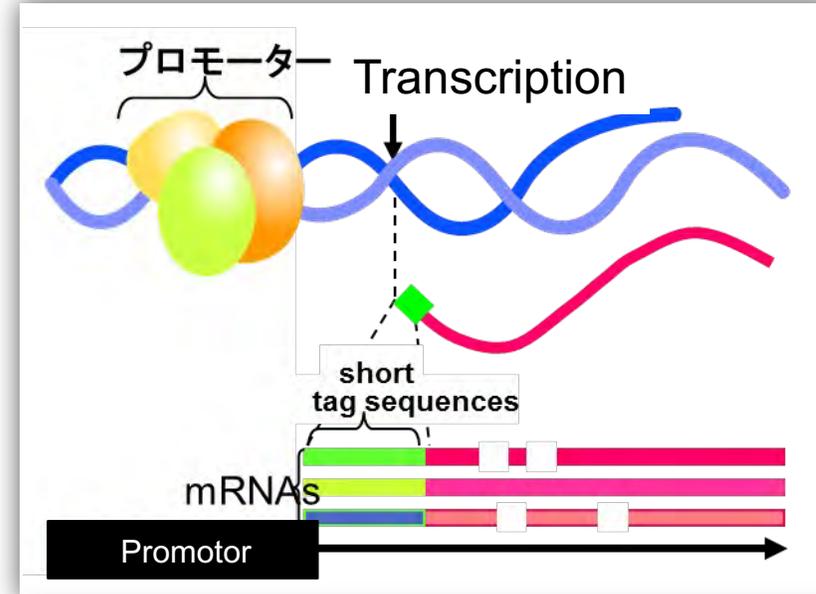
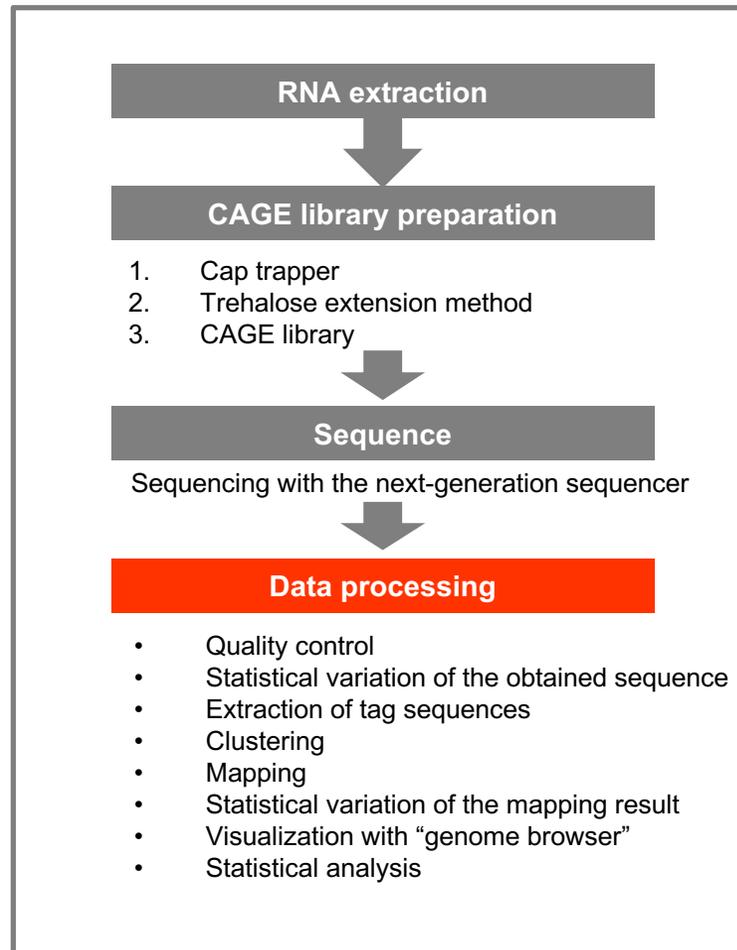
候補遺伝子のバリデーション



CAGE (Cap Analysis of Gene Expression)



耐熱性逆転写酵素やcap-trapper法を組み合わせ、転写物の5'末端から約20塩基のタグ配列を切り出し、塩基配列を決定する実験技法。



Different "transcription start point" is used for each cell type

CAGE (Cap Analysis of Gene Expression)



**CAGE: FANTOMコンソーシアムのコア技術
として活用されている**

理化学研究所のマウスゲノム百科事典プロジェクトで収集された完全長cDNAのアノテーション(機能注釈)を行うことを目的に、林崎良英博士が中心となり2000年に結成された国際研究コンソーシアム



京都大学・山中伸弥教授らの、iPS細胞の樹立研究では、細胞の初期化因子候補として24種の転写因子をFANTOMデータベースから選定。

現在、プロモーターごとの遺伝子発現をゲノムワイドに調べる方法は、CAGEしかない。

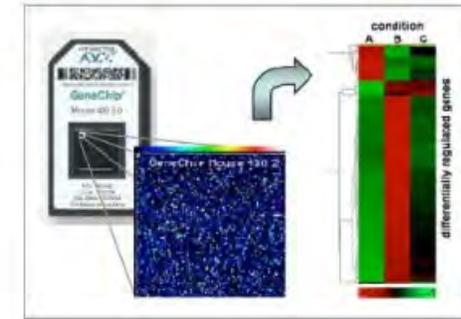
「細胞の顔つき」をトランスクリプトームの言葉で最も詳しく記述できる手法。

「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

遺伝子解析手法の違い

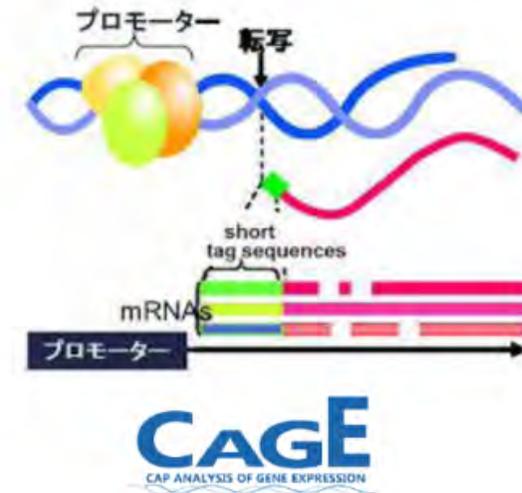
マイクロアレイ解析：従来法

- 短い時間で実験結果が得られる
- 解析の手間が少ない
- △遺伝子リード数が少ない
- △既知の遺伝子が対象



CAGE解析：転写物の5'末端から塩基配列を決定

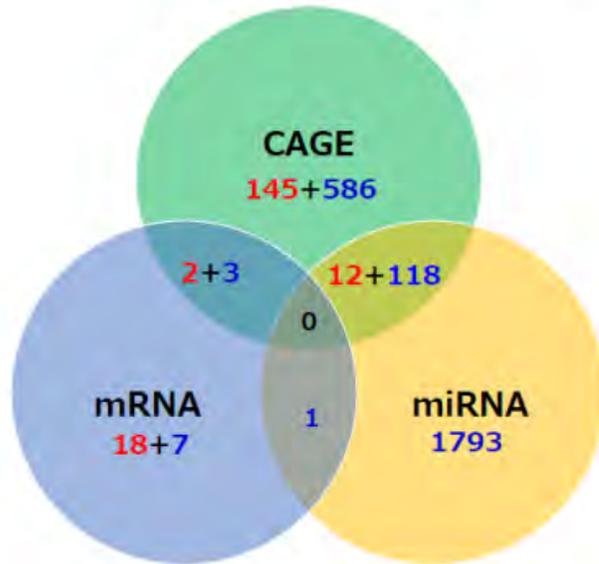
- 遺伝子リード数が多い（4万以上）
- 新規の遺伝子を発見できる可能性がある
- 転写開始点の測定から網羅的にプロモータ活性が測定できる
- △解析の手間に手間がかかる
- △実験コスト（日数や費用）



「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

バイオマーカー候補遺伝子の選定

3つの遺伝子解析手法の組み合わせ



バイオマーカー候補遺伝子

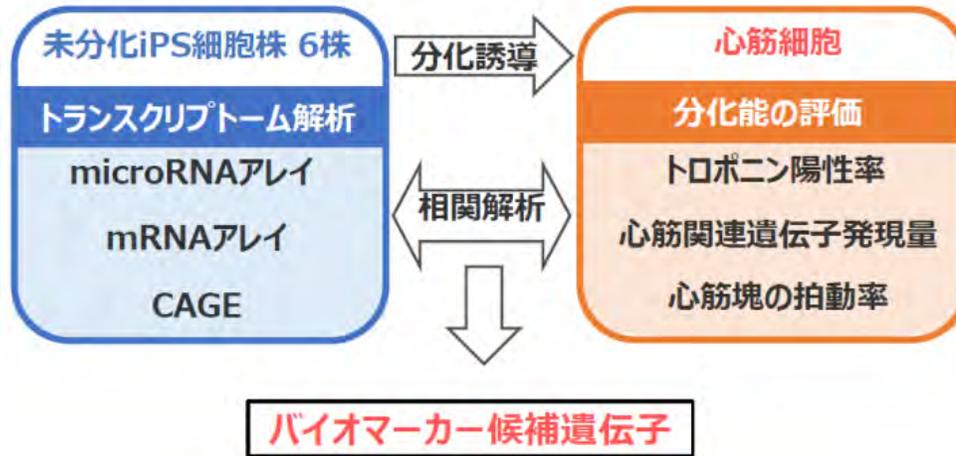
遺伝子名	解析	遺伝子名	解析
<i>CHCHD2</i>	CAGE & GeneChip	<i>ZNF229</i>	CAGE & GeneChip
<i>CXCL4 / PF4</i>	CAGE & GeneChip	<i>PLCB1</i>	GeneChip
<i>KDM6A</i>	GeneChip	<i>TMEM64</i>	CAGE & miRNA
<i>BCOR</i>	GeneChip	<i>PTGR1</i>	CAGE
<i>POMZP3</i>	GeneChip	<i>FOXQ1</i>	CAGE
<i>RBMX</i>	GeneChip	<i>MYL4</i>	CAGE
<i>RC3H1</i>	GeneChip	<i>FGF17</i>	CAGE & miRNA
<i>GLIPR1</i>	GeneChip	<i>GATA6</i>	CAGE & miRNA
<i>RIPK1</i>	CAGE	<i>ANKRD1</i>	CAGE & miRNA
<i>C7orf50</i>	CAGE	<i>IGFBP5</i>	CAGE & miRNA
		<i>WNT3</i>	CAGE
		<i>IGF2</i>	CAGE

遺伝子解析手法を組み合わせることで**バイオマーカー候補遺伝子を22個**に絞り込むことができた

「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

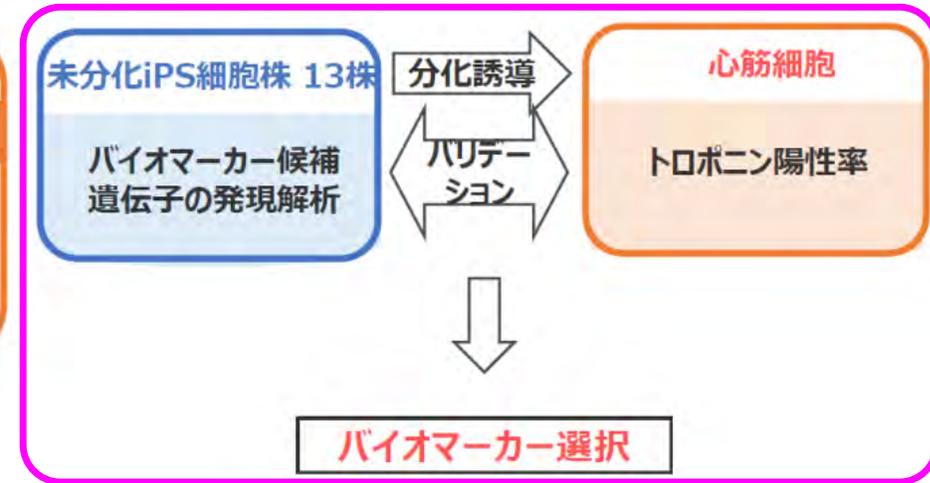
ストラテジー

トレーニングセット



候補遺伝子を絞りこむ

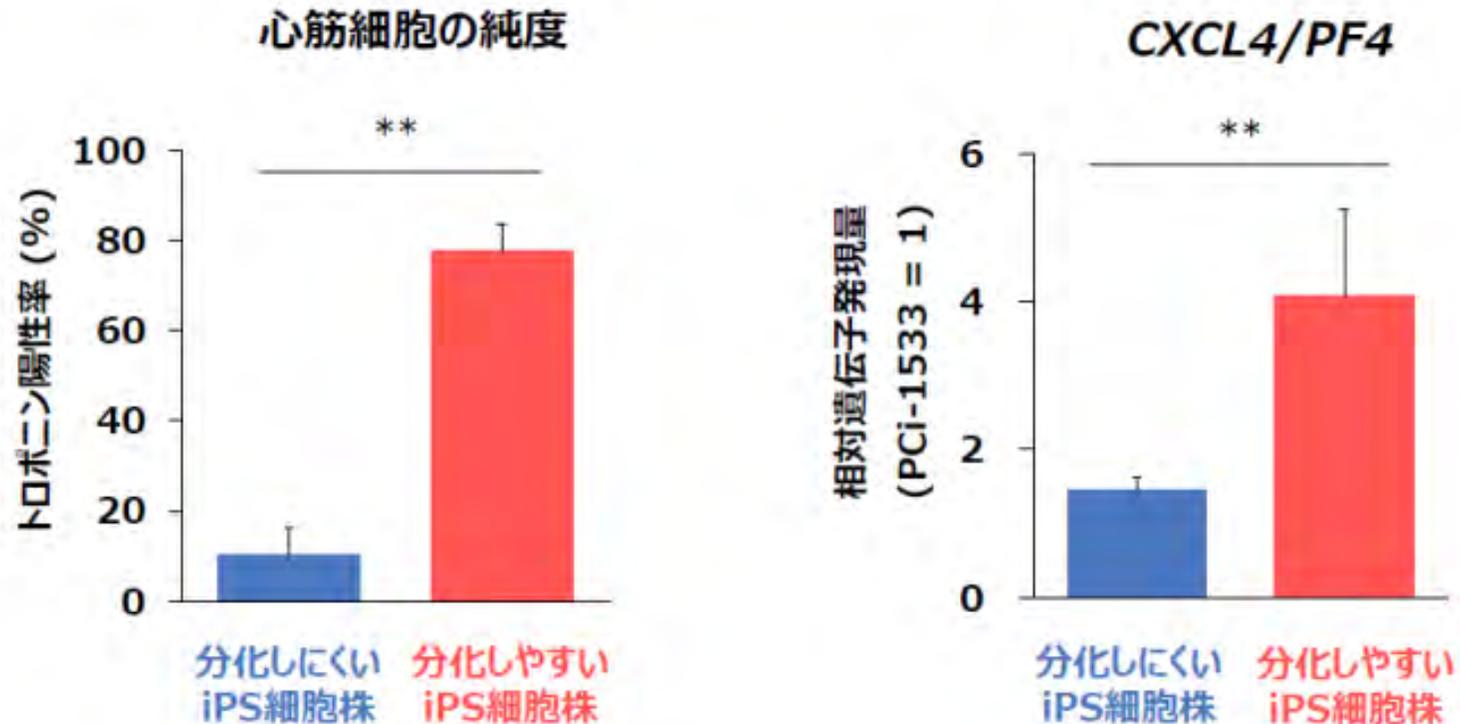
テストセット



候補遺伝子のバリデーション

「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

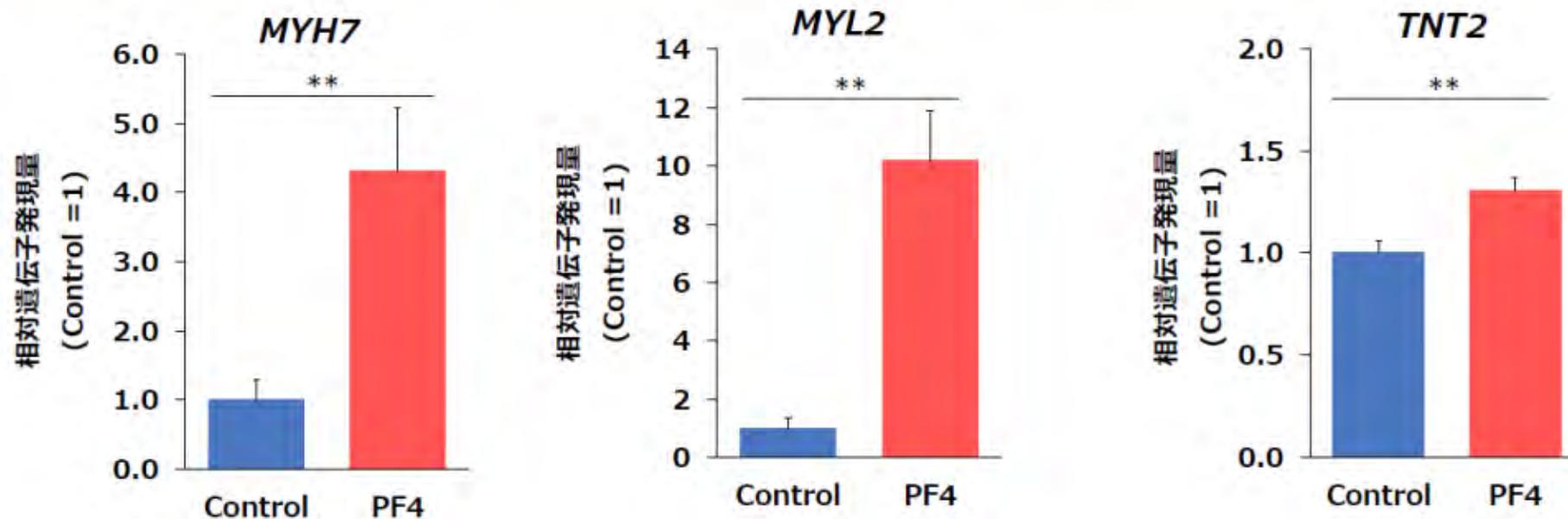
テストセット(13株)でのバイオマーカー候補遺伝子のバリデーション



テストセットにおいても心筋分化能と発現に相関のある遺伝子 **CXCL4/PF4** を同定

「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

PF4タンパク質での前処理による心筋細胞分化促進作用



iPS細胞をPF4を含む培地で前処理すると、**心筋細胞関連遺伝子の発現が高くなる**
＝**相関のみならず、心筋分化における機能的な関与を示唆**

「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー（心筋細胞）

理研プレスリリース

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

CXCL4/PF4 is a predictive biomarker of cardiac differentiation potential of human induced pluripotent stem cells

Received: 31 August 2018
Accepted: 21 February 2019
Published online: 15 March 2019

Fumiya Ohashi^{1,2,3,5}, Shigeru Miyagawa², Satoshi Yasuda¹, Takumi Miura¹, Takuya Kuroda¹, Masayoshi Itoh⁵, Hideya Kawaji⁵, Emiko Ito², Shohei Yoshida², Atsushi Saito², Tadashi Sameshima⁴, Jun Kawai⁵, Yoshiki Sawa⁶ & Yoji Sato^{1,3,7,8,9}

Selection of human induced pluripotent stem cell (hiPSC) lines with high cardiac differentiation potential is important for regenerative therapy and drug screening. We aimed to identify biomarkers for predicting cardiac differentiation potential of hiPSC lines by comparing the gene expression profiles of six undifferentiated hiPSC lines with different cardiac differentiation capabilities. We used three platforms of gene expression analysis, namely, cap analysis of gene expression (CAGE), mRNA array, and microRNA array to efficiently screen biomarkers related to cardiac differentiation of hiPSCs. Statistical analysis revealed candidate biomarker genes with significant correlation between the gene expression levels in the undifferentiated hiPSCs and their cardiac differentiation potential. Of the candidate genes, *PF4* was validated as a biomarker expressed in undifferentiated hiPSCs with high potential for cardiac differentiation in 13 additional hiPSC lines. Our observations suggest that *PF4* may be a useful biomarker for selecting hiPSC lines appropriate for the generation of cardiomyocytes.

広報活動

Home > 広報活動 > プレスリリース (研究成果) 2019 >

報道発表資料

2019年3月22日
神奈川県立産業技術総合研究所
理化学研究所
医薬品食品衛生研究所

前の記事 | 一覧へ戻る | 次の記事

Twitter

「心筋細胞になりやすいiPS細胞」をみつけるための目印となる遺伝子を同定

国立医薬品食品衛生研究所再生・細胞医療製品部佐藤陽治部長（大阪大学大学院薬学研究科教授と神奈川県立産業技術総合研究所研究員を兼務）、安田智室長、大橋文哉研究生（大阪大学大学院薬学研究科、テルモ株式会社所属）らの研究グループは、大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科澤野樹教授、宮川繁特任教授、理化学研究所科技ハブ産連本部予防医療・診断技術開発プログラム河合純副プログラムディレクターらと共同で、ヒトiPS細胞から心筋細胞への『分化しやすさ』を予測することができるマーカー遺伝子としてCXCL4/PF4を同定しました。

ヒトiPS細胞から誘導される細胞を再生医療に応用するためには、目的とする細胞に分化しやすいiPS細胞株を選ぶ必要があります。目的とする細胞に分化しにくいiPS細胞を選んでしまうと、分化していないiPS細胞が移植する細胞の中に残りやすくなり、こうした残存した未分化iPS細胞が患者さんの体内で腫瘍を形成するリスクが高くなるからです。

本研究では、心筋細胞へ分化しやすいiPS細胞株と分化しにくいiPS細胞株の遺伝子発現を理化学研究所が開発した世界唯一の遺伝子解析技術であるCAGE法など、3つの遺伝子解析手法を用いて網羅的に解析しました。その結果、CXCL4/PF4という遺伝子の発現量が心筋細胞への分化しやすさと相関することが明らかとなりました。つまり、CXCL4/PF4の発現量を目印にすれば心筋細胞の製造に適したiPS細胞株を選び出すことができると考えられます。本成果はiPS細胞株の品質管理方法として心筋再生医療の実用化に貢献することが期待されます。

ヒトiPS細胞 (hiPSC) の分化指向性の指標となる因子の同定のアプローチ (基本型)

「外胚葉または中・内胚葉への分化のしやすさ」を予測するためのiPS細胞バイオマーカー (SALL3) を同定



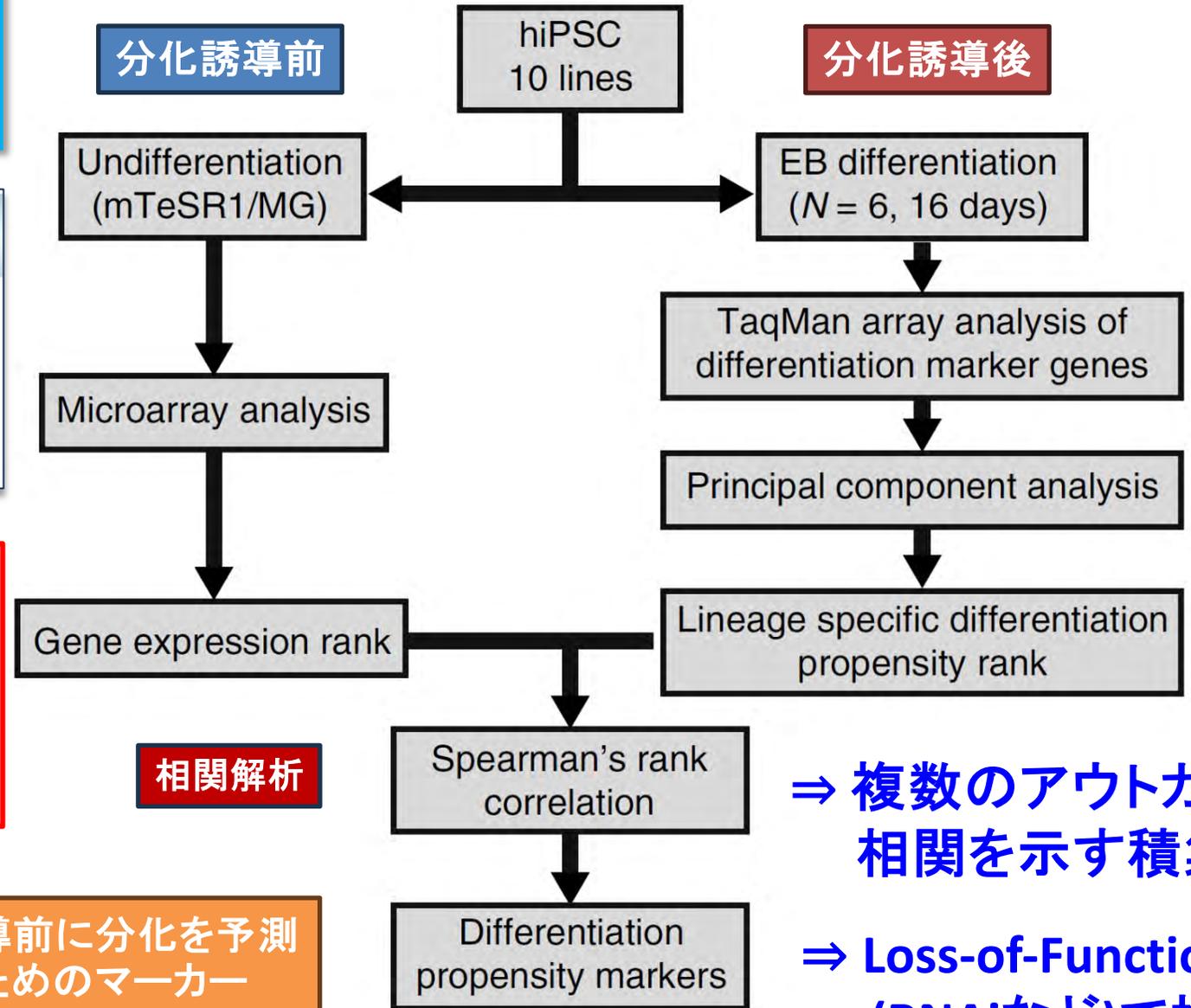
ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09511-4> OPEN

SALL3 expression balance underlies lineage biases in human induced pluripotent stem cell differentiation

オミクス解析を使って有効性・力価関連指標を探索する際の課題 = 偽陽性をいかに排除するか?

分化誘導前に分化を予測するためのマーカー



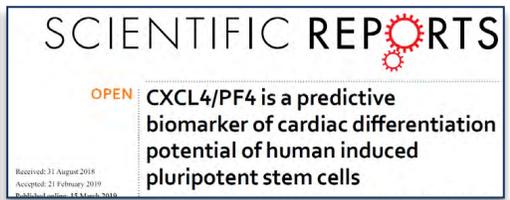
相関解析

⇒ 複数のアウトカムとの相関を示す積集合

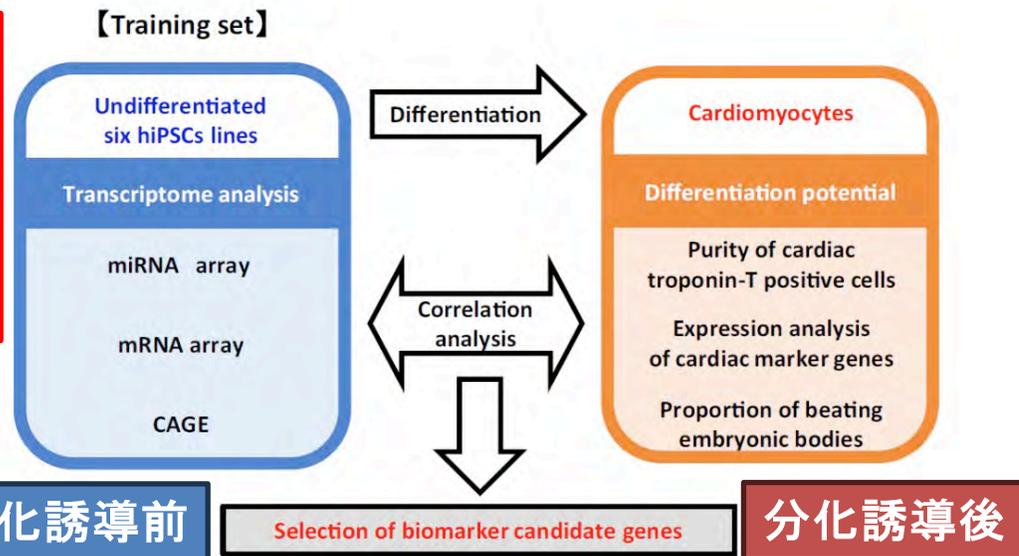
⇒ Loss-of-Function実験 (RNAiなど)で検証

hiPSCの分化指向性の指標となる因子の同定のアプローチ（応用型）

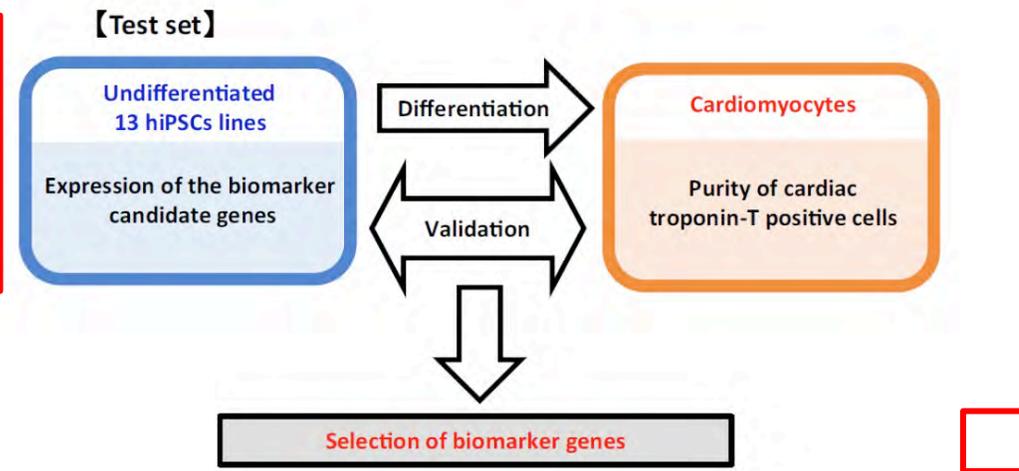
「心筋細胞へのなりやすさ」を予測するためのiPS細胞バイオマーカー(CXCL4/PF4)を同定



原理の違う複数のプラットフォームで共通の相関を探す



確固なものでない時はテストセットで検証・絞り込み



... 偽陽性を排除するための方法

「生きた素材」を使った「ものづくり」

ウイスキー酵母



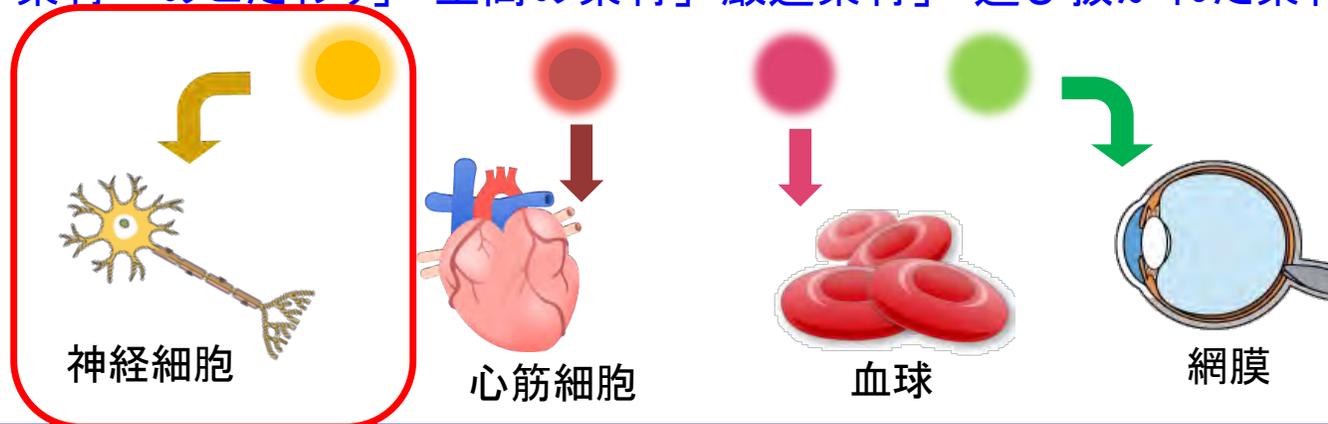
ビール酵母

ワイン酵母



清酒酵母

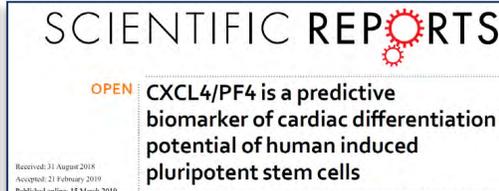
目的に合った酵母(素材)を使い分けることで、各品目で美味しい(高品質な)製品を作ります
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



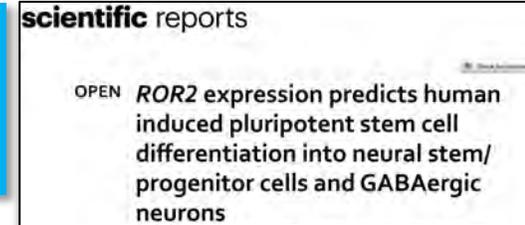
「高い再現性で品質の高い最終製品(目的細胞)を製造する」という目的に適った**素材**
(例: 専用の**細胞株**)またはその**規格**を選択する(**囲い込む**)ことが重要

hiPSCの分化指向性の指標となる因子の同定のアプローチ（応用型）

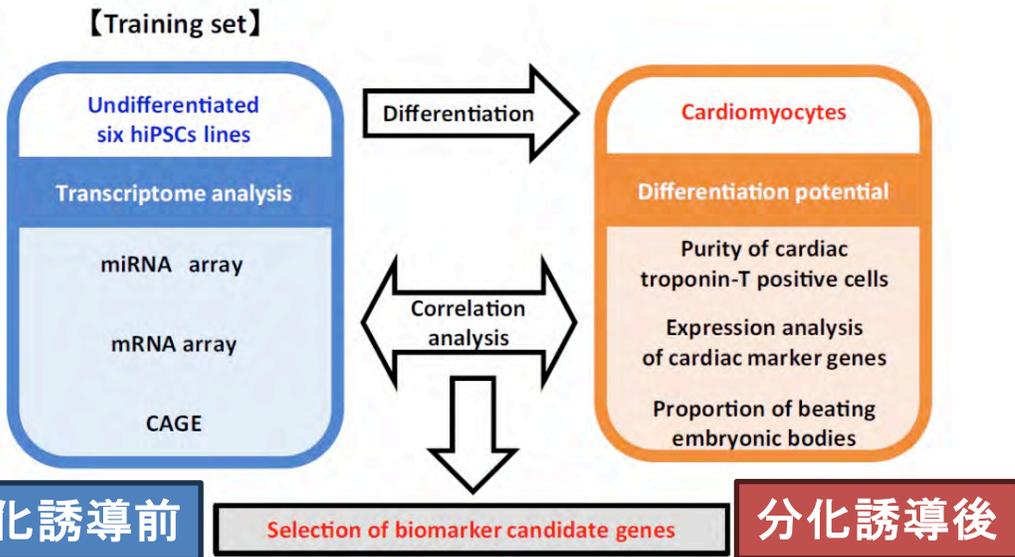
「心筋細胞へのなりやすさ」を予測するためのiPS細胞バイオマーカー(CXCL4/PF4)を同定



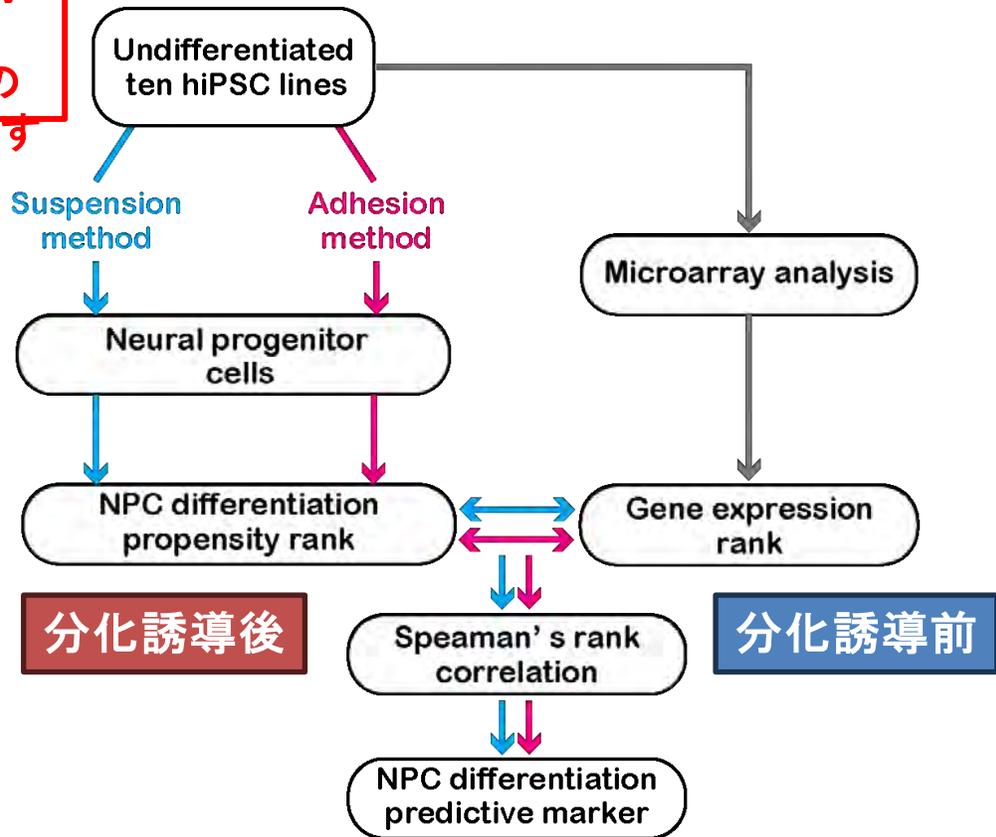
「神経幹／前駆細胞へのなりやすさ」を予測するためのiPS細胞バイオマーカー(ROR2)を同定



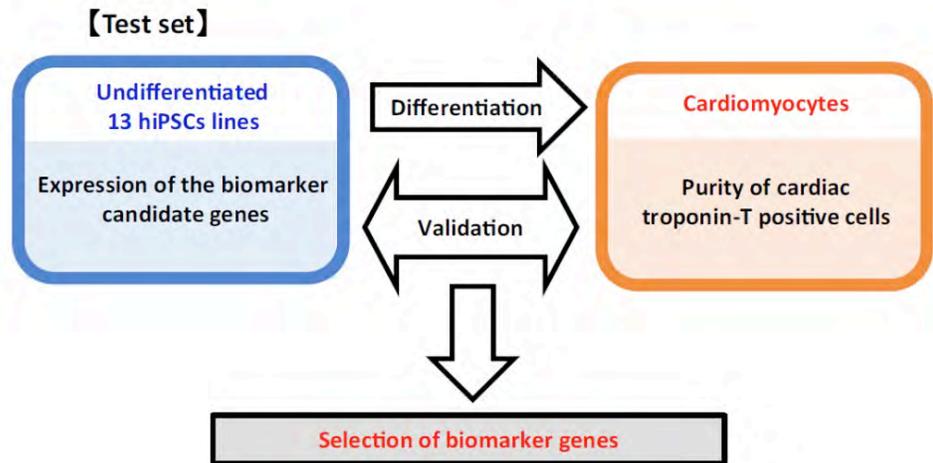
原理の違う複数のプラットフォームで共通の相関を探す



複数の分化誘導法で共通の相関を探す



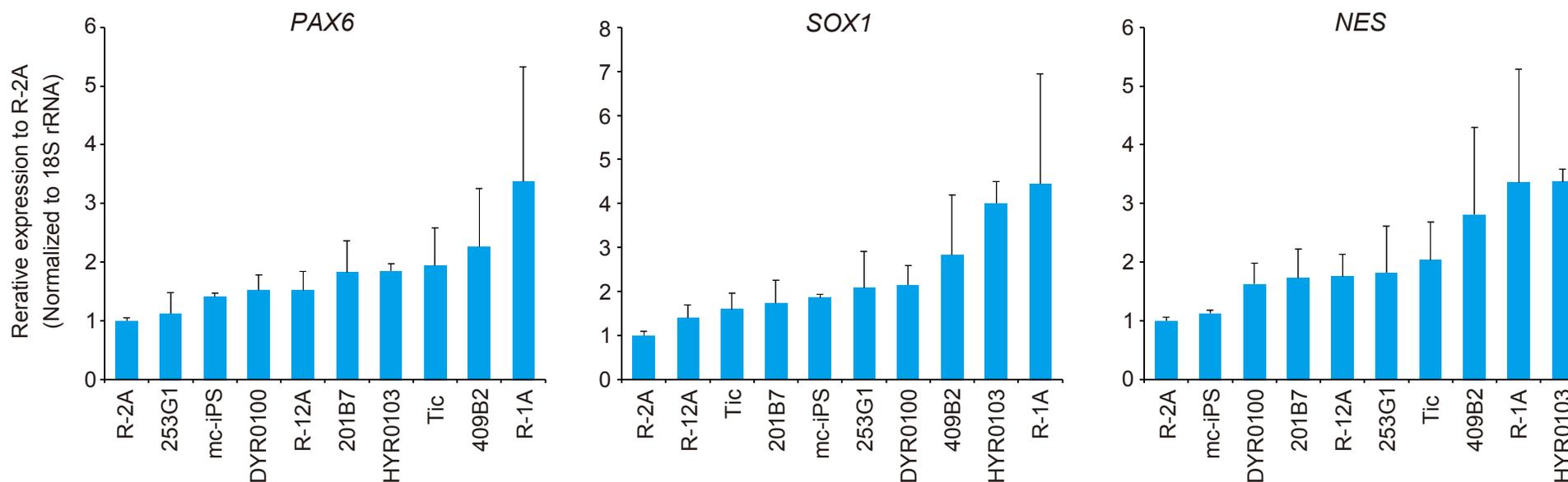
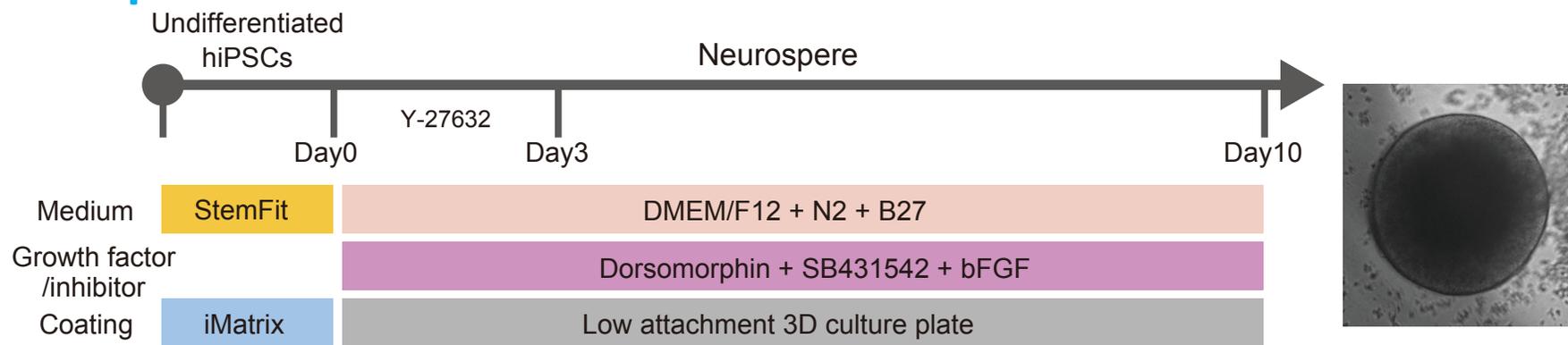
確固なものでない時はテストセットで検証・絞り込み



... 偽陽性を排除するための方法

10株のhiPSC株の神経幹／前駆細胞(NS/PC)への分化傾向の解析(浮遊培養法)

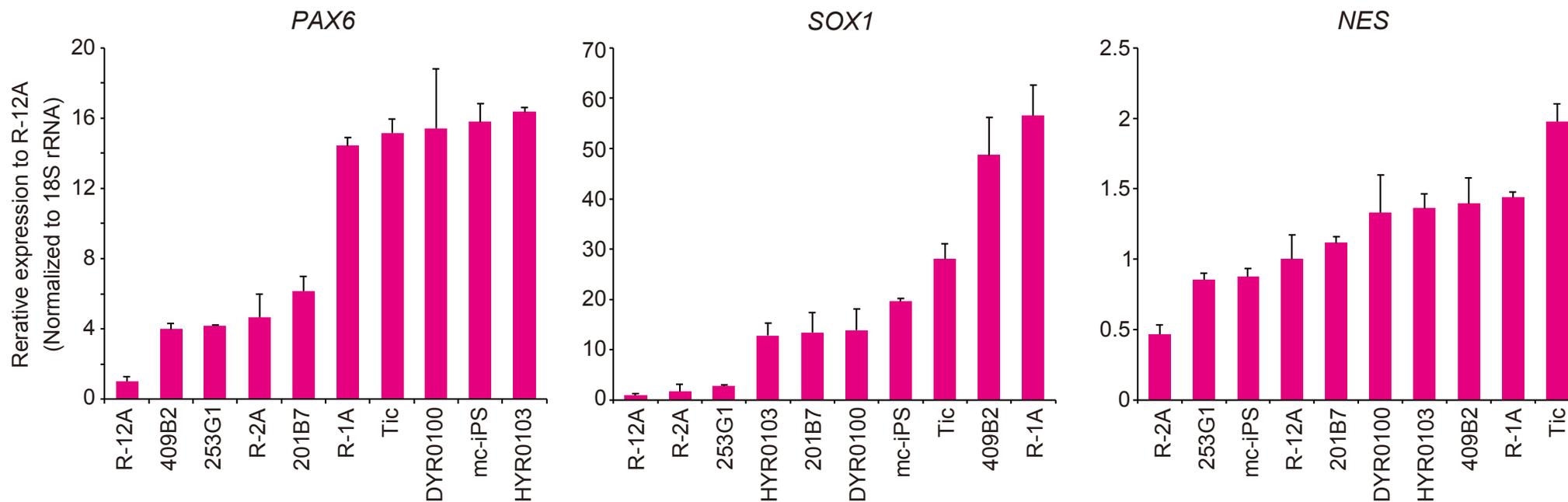
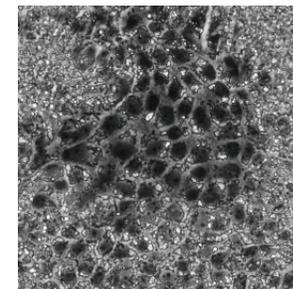
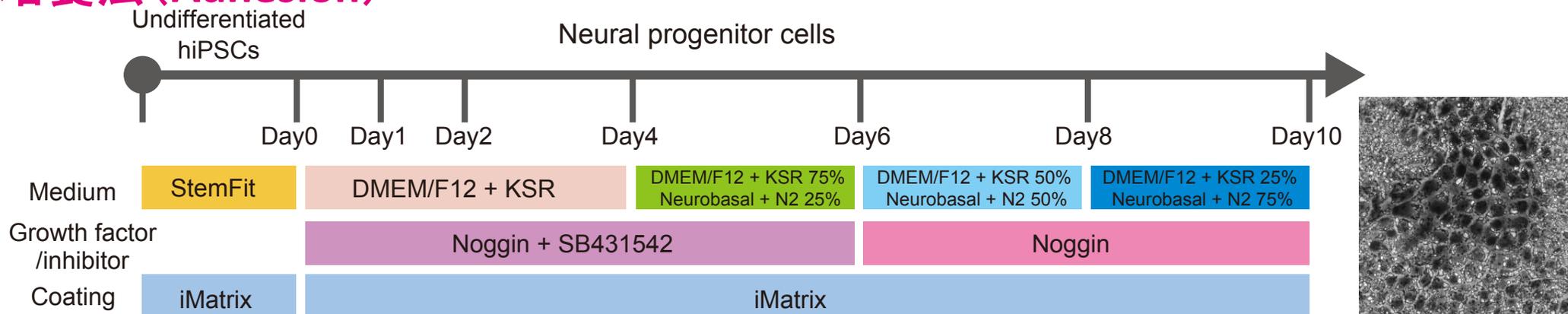
浮遊培養法 (Suspension)



浮遊培養系での分化誘導法を用いてNS/PC分化誘導を行い、NPC細胞マーカーのPAX6, SOX1, NESの発現量をqRT-PCRを用いて定量した。10株のhiPSC株間においてNS/PC細胞マーカーの発現に違いが認められた。つまり、hiPSCは株間で分化のしやすさ(分化傾向)に大きなバラツキがある。

10株のhiPSC株の神経幹／前駆細胞(NS/PC)への分化傾向の解析(接着培養法)

接着培養法(Adhesion)



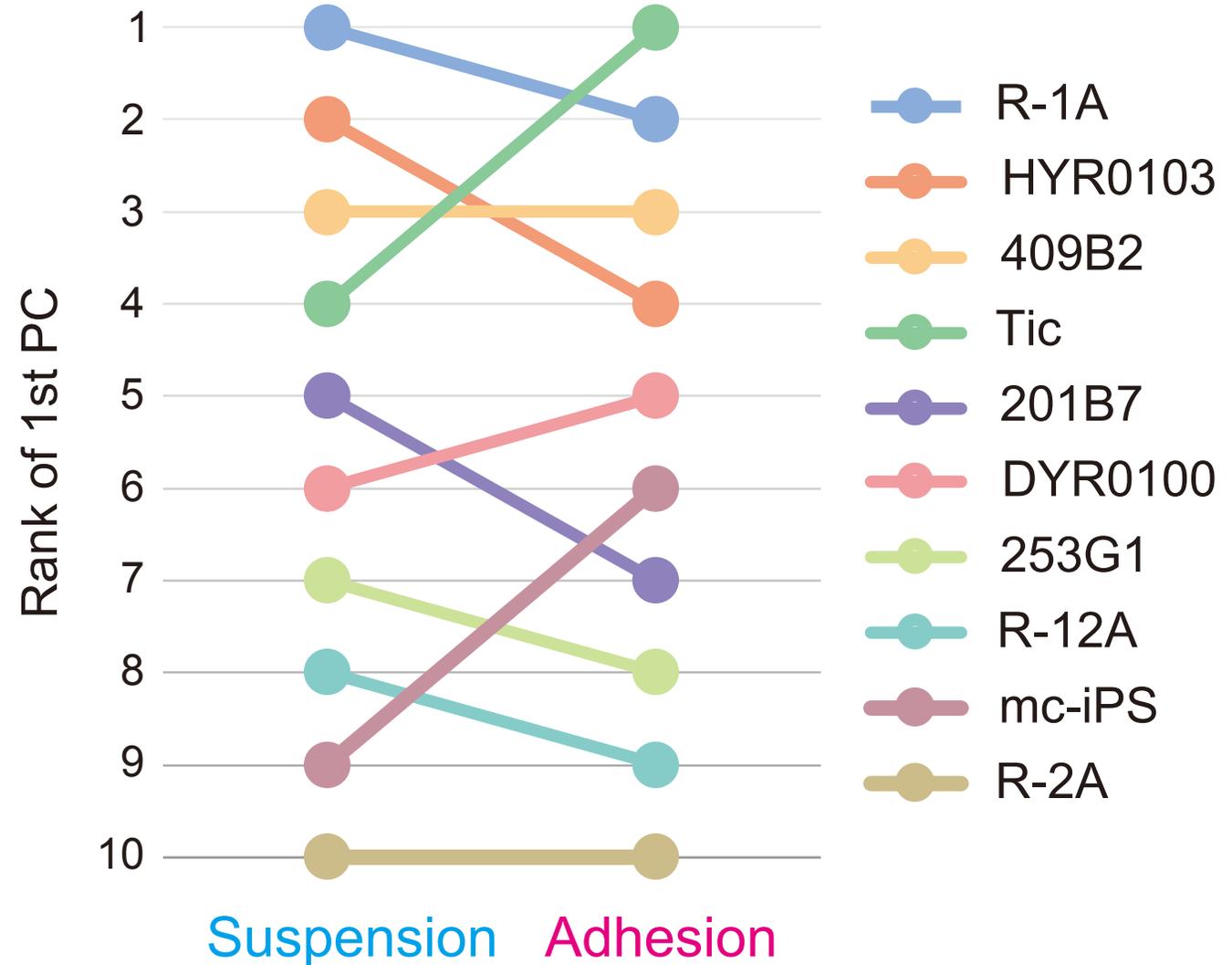
接着培養系での分化誘導法を用いてNS/PC分化誘導を行い、NPC細胞マーカーのPAX6, SOX1, NESの発現量をqRT-PCRを用いて定量した。接着培養法の分化誘導系においても、hiPSC株間においてNS/PC細胞マーカーの発現に違いが認められた。

10株のhiPSC株のNS/PC分化傾向の順位

第一主成分得点(PC1)

		Diffrentiation	
		Suspension	Adhesion
Cell line	R-1A	3.33	1.88
	HYR0103	1.85	0.64
	409B2	1.19	0.68
	Tic	-0.26	1.92
	201B7	-0.50	-0.59
	DYR0100	-0.60	0.54
	253G1	-0.83	-1.47
	R-12A	-0.91	-1.58
	mc-iPS	-1.19	0.05
	R-2A	-2.07	-2.06

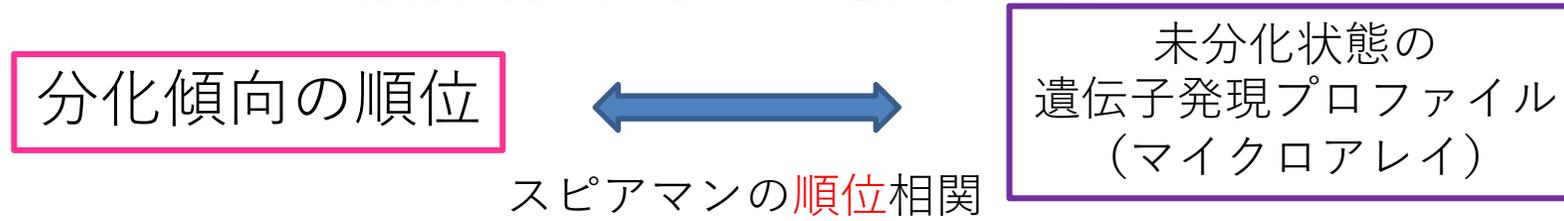
PC1順位 → NPC分化傾向の順位



PAX6, SOX1, NESの遺伝子発現を主成分分析(PCA)を行い第一主成分得点(PC1)を算出し、PC1の高い株をNS/PC分化傾向の高い株と定義した。

NS/PC分化予測マーカー候補遺伝子の同定

分化傾向と相関のある遺伝子の同定

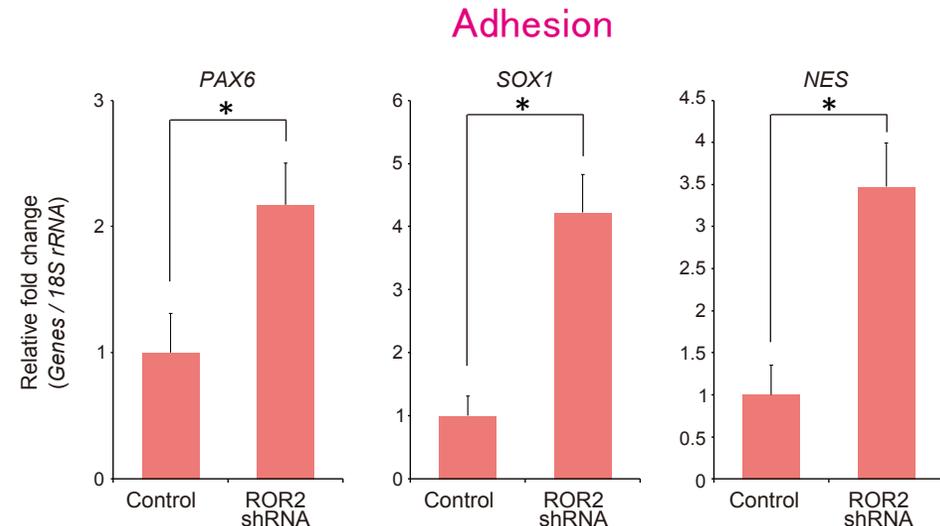
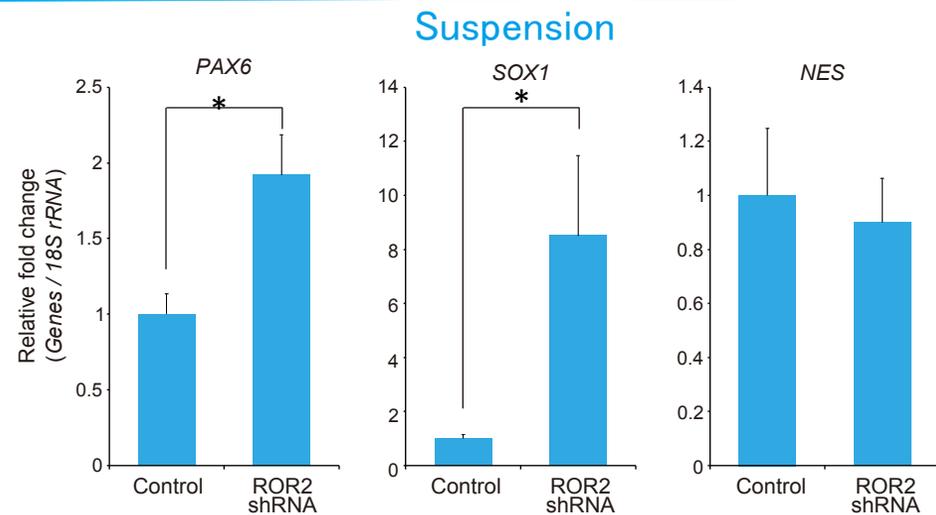
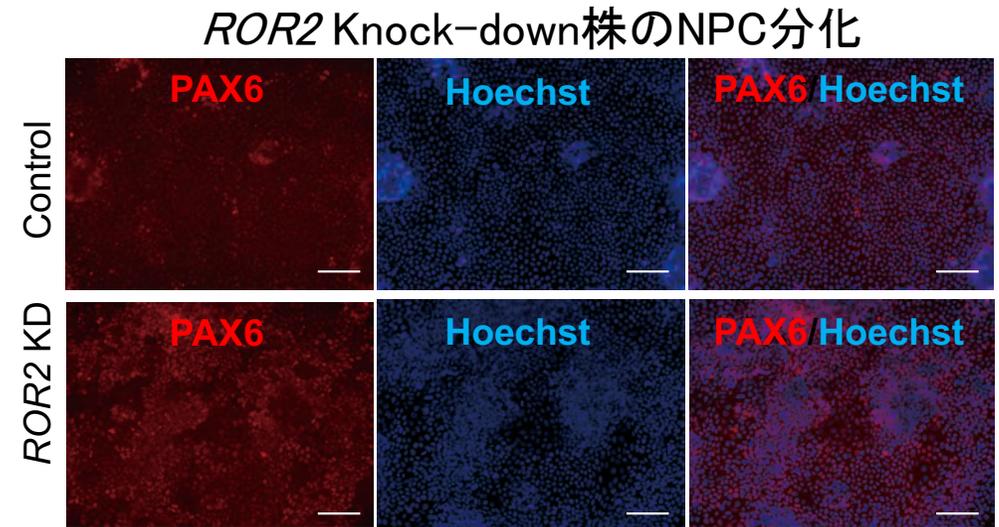
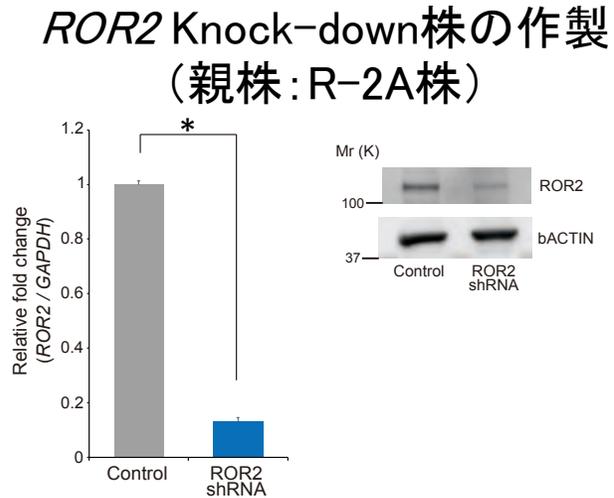
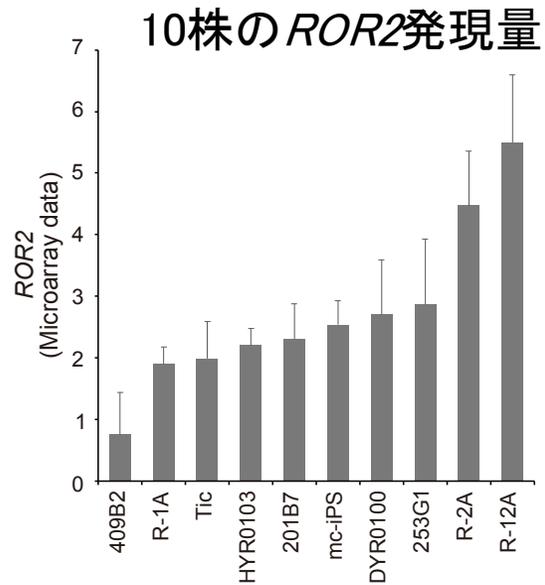


正相関：発現が高い株が分化しやすい

負相関：発現が低い株が分化しやすい

2種類の分化方法で共通して有意な相関を示した遺伝子を抽出することにより、神経分化予測マーカーとして信頼性の高い遺伝子を選別した。その結果、神経分化と**有意かつ強い負の相関**($P < 0.01$)を示す遺伝子 **ROR2** を**神経分化予測マーカー候補**として同定した。ROR2は、Wntシグナル伝達においてWNTの受容体であると報告されている。

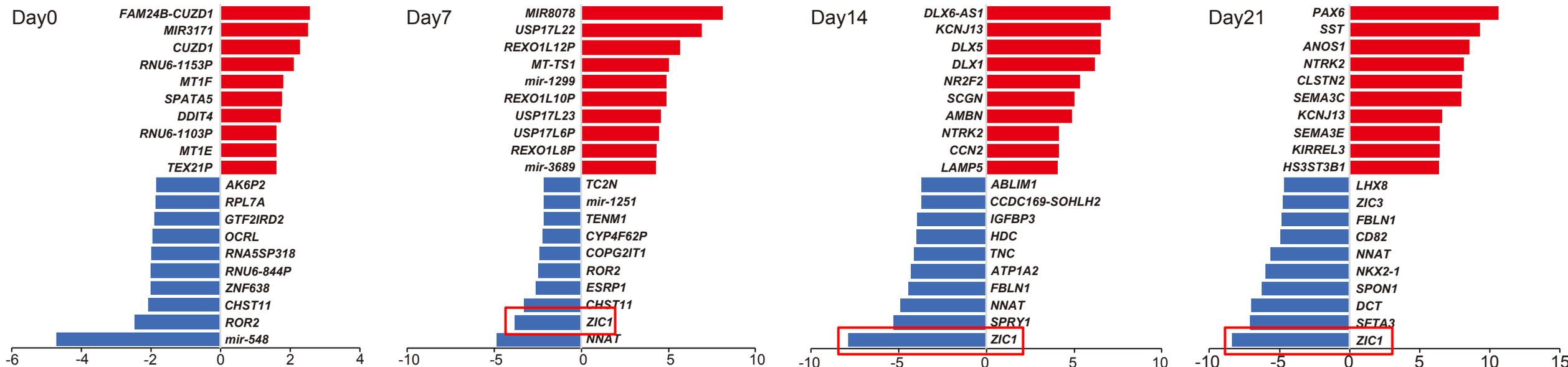
NS/PC分化予測マーカー候補遺伝子ROR2の機能解析



R-2A株を親株にレンチウイルスベクターを用いshRNAを導入し、ROR2 Knock-down株を作製した。ROR2 KD株をNS/PC分化誘導すると、NS/PC分化マーカーが有意に増加した。

ROR2 KD株を用いた神経分化過程における経時的・網羅的遺伝子発現解析

Clariom D array (Control vs ROR2 KD)

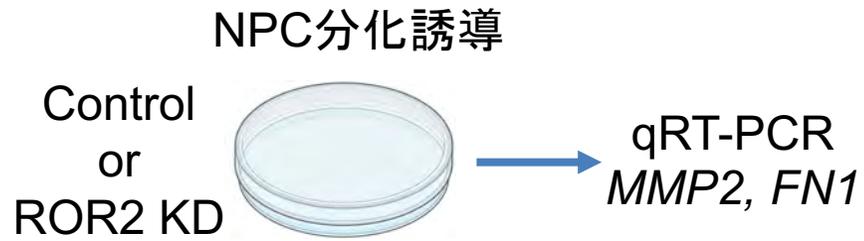


Neural crest分化に重要な転写因子であるZIC1が著しく抑制されていた

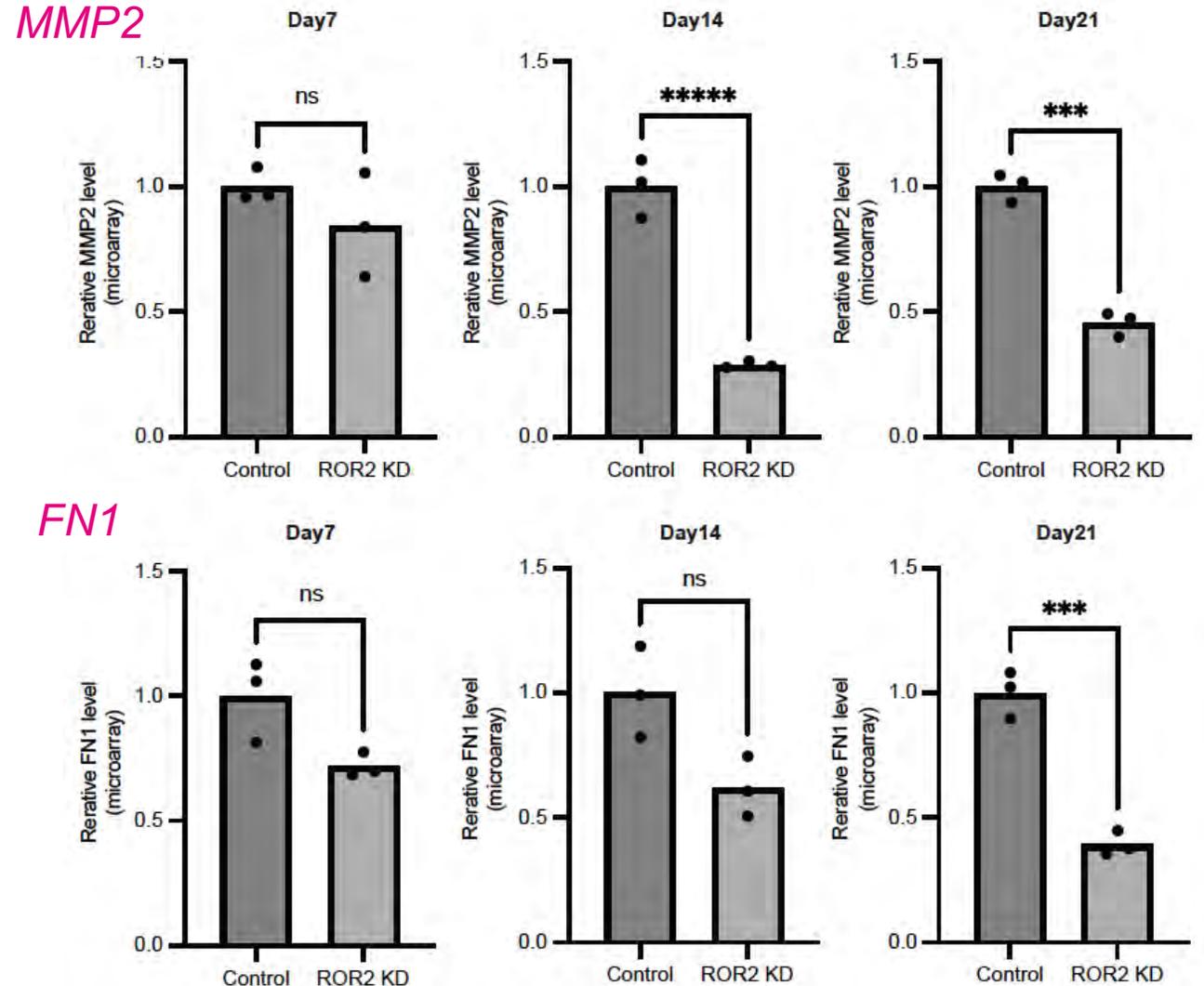
ROR2は分化過程におけるhiPSCの上皮間葉転換(EMT)に機能的に寄与する

ROR2 → EMT → Neural crest

ROR2はEMT関連遺伝子の発現の活性化に関与していることが知られている。また、Neural crestはEMTを経て形成される。



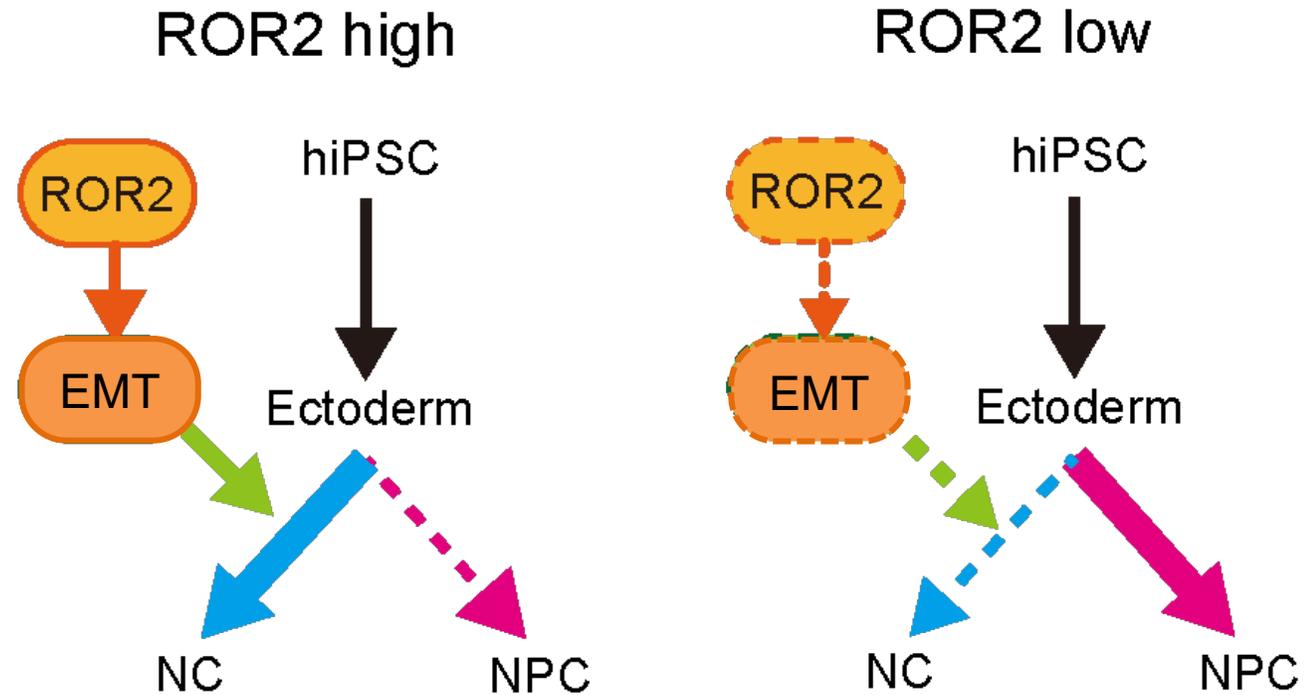
ROR2 KD株のNS/PC分化期におけるEMT関連遺伝子の発現



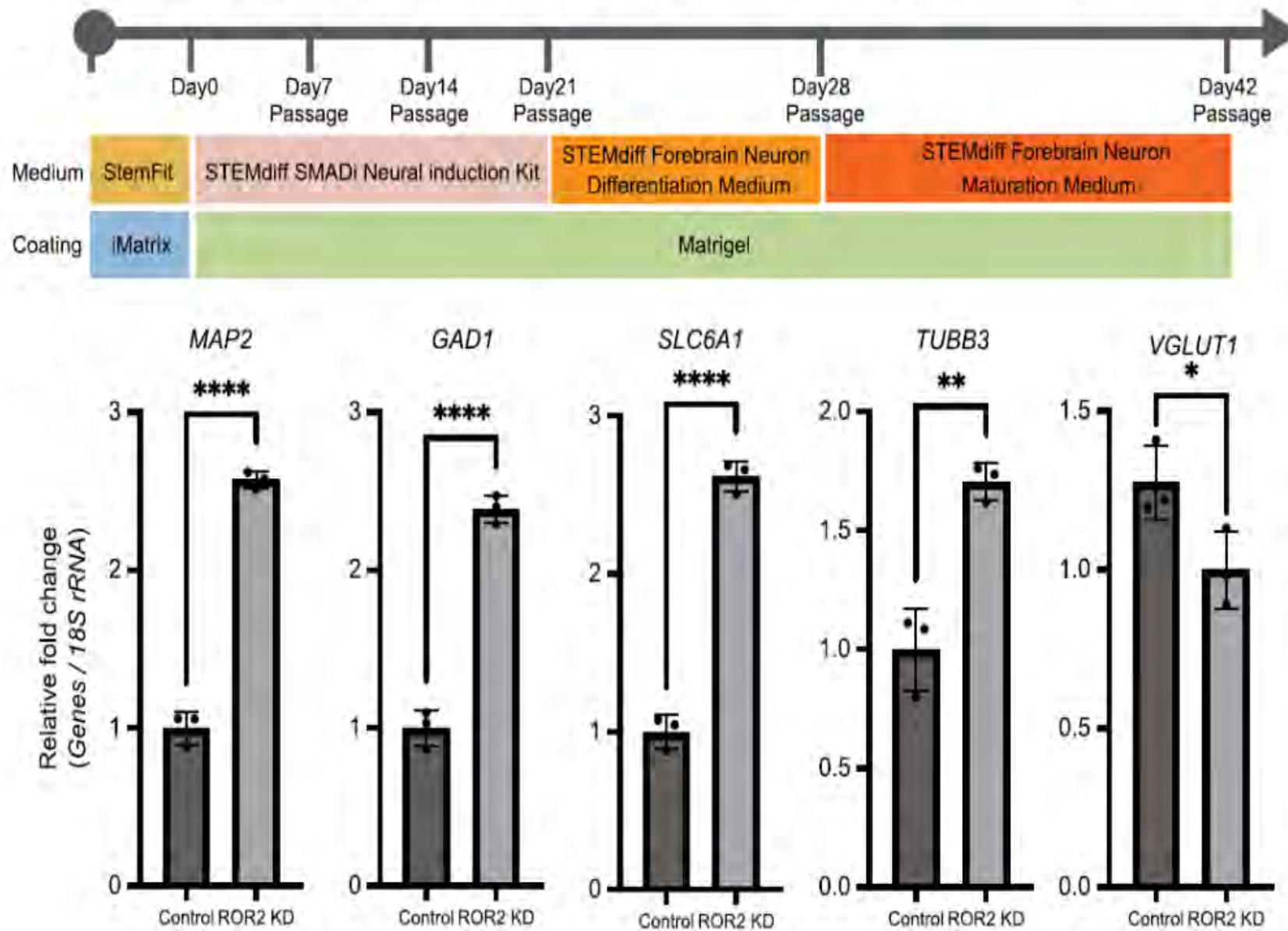
ROR2 KD株の神経分化において、EMT関連遺伝子であるMMP2およびFN1遺伝子の発現も抑制された。

ROR2 に関する結論 & 考察

- 2種類のNS/PC分化誘導法で共通して有意な負相関を示す遺伝子としてNS/PC分化予測マーカーROR2を同定した。
- ROR2をKnock-downすると、NS/PC分化が促進されることから、ROR2は機能的にNS/PC分化に関与し、汎用性が高いマーカーであることが示唆された。
- ROR2 KD株では、NS/PC分化過程においてNeural crest分化に重要なZIC1の発現が著しく抑制されていた。
- ROR2 KD株では、NS/PC分化期においてEMT関連遺伝子がControl株に比べて低下していたことから、ROR2はEMTを介したNS/PC分化とNeural crest分化の分岐の調節に関与していることが示唆された。



おまけ: *ROR2* はGABAニューロンへの分化予測マーカーでもある



「目的細胞へのなりやすさ」を予測するための iPS細胞バイオマーカー (神経幹細胞／神経前駆細胞)

scientific reports

(2024) 14:690

NEW!

 Check for updates

OPEN

***ROR2* expression predicts human induced pluripotent stem cell differentiation into neural stem/progenitor cells and GABAergic neurons**

Takuya Kuroda^{1,2}, Satoshi Yasuda^{1,2,3}, Satoko Matsuyama^{1,4}, Takumi Miura^{1,2,5}, Rumi Sawada¹, Akifumi Matsuyama⁴, Yumiko Yamamoto⁶, Masaki Suimye Morioka⁶, Hideya Kawaji^{6,7}, Takeya Kasukawa⁶, Masayoshi Itoh⁶, Hidenori Akutsu⁵, Jun Kawai^{2,6} & Yoji Sato^{1,2,3,8,9}✉

本日のお話

1. **CQA/CMA:** 細胞加工製品のQbD製造に必要なもの
2. **CMA Mining:** 細胞加工製品の原料としてのヒトiPS細胞の株間
の特性の違いの理解と分化傾向マーカーの探索
3. **CQA Mining:** シングルセルRNA-Seq解析による
ヒト間葉系幹細胞の不均一性の理解と
有効成分細胞の探索

何をどう評価すべきなのか？

再生医療等製品(細胞加工製品)の実用化における主な科学的課題

1. ウイルス安全性(同種由来 vs. 自己由来)
2. 原材料として供される細胞の特性解析と適格性
3. 細胞基材以外のヒト又は動物起源由来製造関連物質の適格性
4. 細胞基材としてのセル・バンクの樹立と管理のありかた
5. 最終製品の品質の再現性を達成するための包括的な製造戦略、製造工程評価
6. 最終製品を構成する細胞の有効成分としての特性解析
7. 最終製品の重要品質特性の同定と規格設定(最終製品の品質管理)
8. 製法／セル・バンクの変更による新旧製品の同等性の検証
9. 非臨床安全性試験・非臨床POC試験のデザインと解釈
10. 造腫瘍性試験のデザインと解釈(特にES/iPS細胞由来製品)
11. 最終製品の免疫原性評価
12. 投与細胞の体内での分布・挙動
13. 臨床試験のデザインと解釈
14. 有効性・安全性のフォローアップのあり方

原料の
安全性・適格性

最終製品の品質確保

非臨床段階での
安全性・有効性の予測

臨床評価の
あり方

A Starting Point of Modern Pharmacology

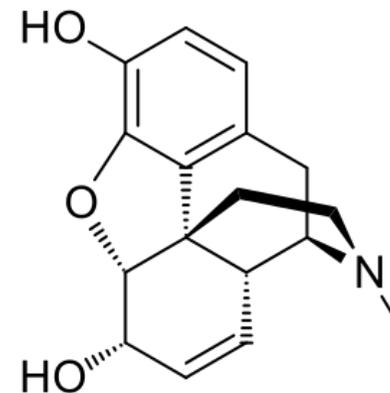
EXAMPLE: Isolation of Morphine

Opium, arguably the oldest herbal drug in human history, has always been in the spotlight throughout history as the only medicine that relieves pain and induces sleep.



In 1806, a German pharmacist Friedrich Sertürner (フリードリヒ・ゼルチュルナー) succeeded in the isolation of **morphine** from opium.

**= The starting point of their pharmacology
(and toxicology)**



<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%A2%E3%83%98%E3%83%B3>

https://en.wikipedia.org/wiki/Friedrich_Sert%C3%BCrner

学問としての「再生医学」は今どの段階にあるのか？

多様な化学物質の集合体

「生薬」と「分離科学／分析化学」(⇒⇒⇒「近代薬学」「薬理学」)の関係

=「細胞加工製品」と「???'(⇒⇒⇒「再生医学」)の関係

複雑・多様な細胞の集合体

学問としての「再生医学」は今どの段階にあるのか？

多様な化学物質の集合体

「生薬」と「分離科学／分析化学」(⇒⇒⇒「近代薬学」「薬理学」)の関係

= 「細胞加工製品」と「???'」(⇒⇒⇒「再生医学」)の関係

複雑・多様な細胞の集合体

細胞・細胞集団の不均一性を
理解するための技術・学問領域

細胞加工製品 = 「細胞集団」の
「真の有効成分細胞」の同定と、それに基づく「薬理学」は、
どうすれば成立するのか？

「不均一性」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**不均一性を「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、**有効性に関連する品質特性を発見しやすくなる**
(・・・と期待できる)

不均一性を「見える化」する技術

事例

Stem Cells Translational Medicine, 2023, 12, 379–390
<https://doi.org/10.1093/stcltm/szad029>
Advance access publication 2 June 2023
Original Research

OXFORD

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

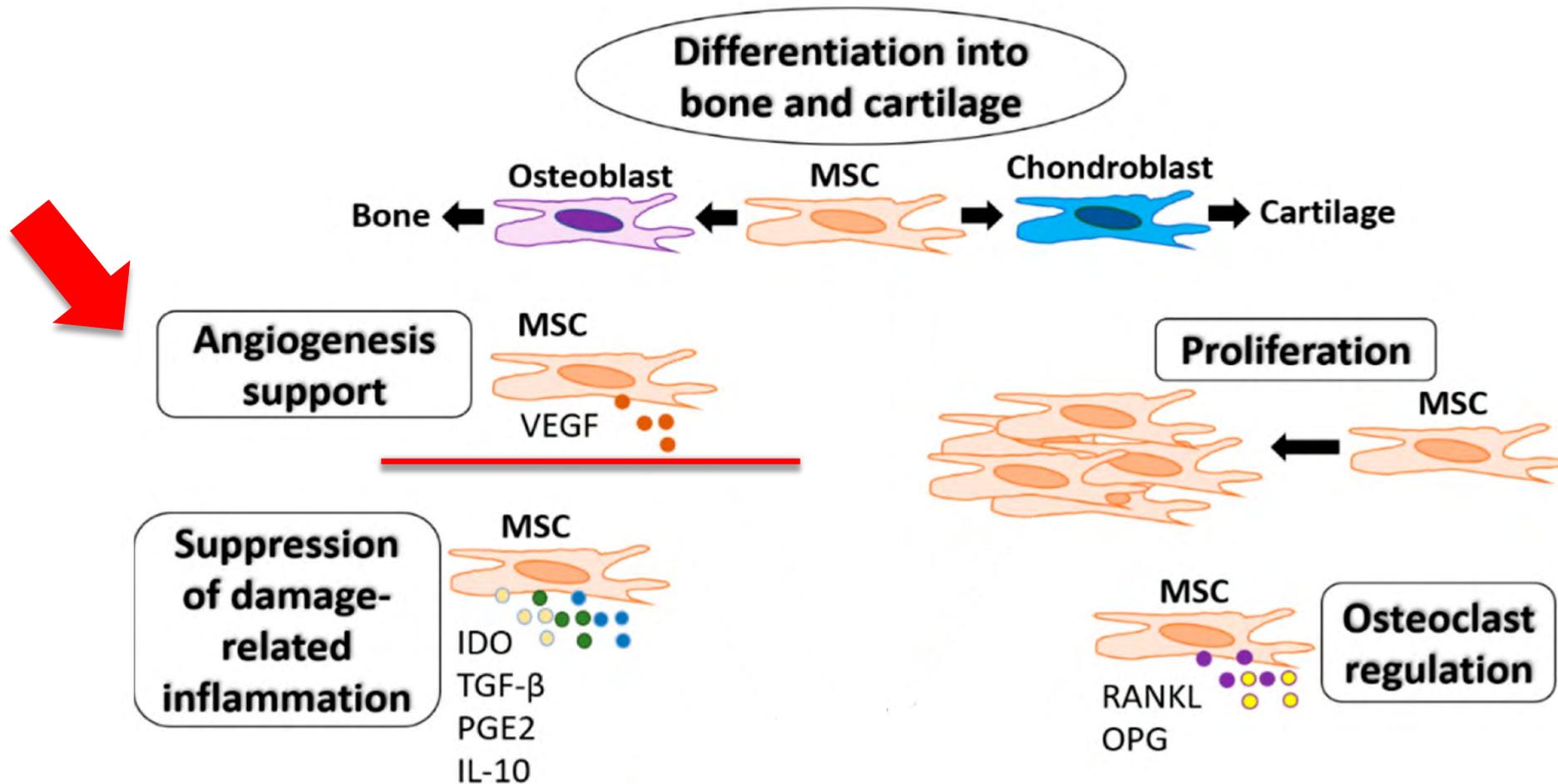
⁹Department of Cellular and Gene Therapy Products, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

*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.

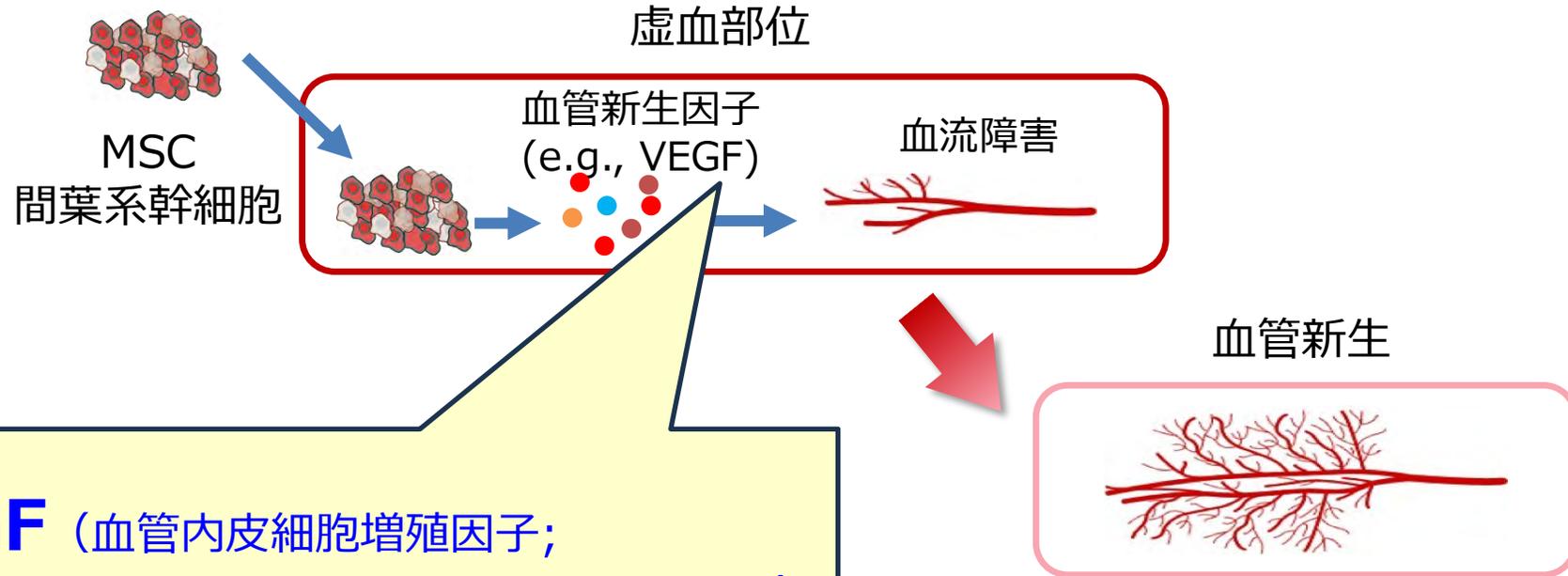
MSC(間葉系幹細胞／間葉系間質細胞)の様々な機能

<https://www.mdpi.com/2306-5354/8/5/69> を改変



培養MSCを主成分とする細胞加工製品は、様々な疾患を対象に国内外で多数開発中

生着部位の環境（虚血）

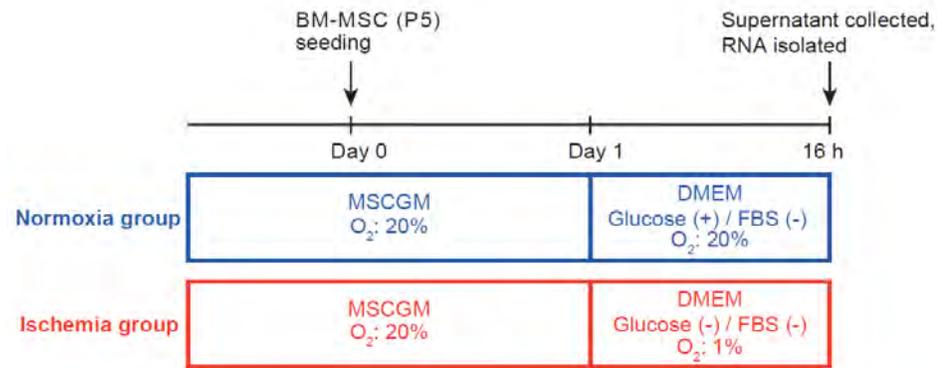


VEGF (血管内皮細胞増殖因子;
vascular endothelial growth factor)

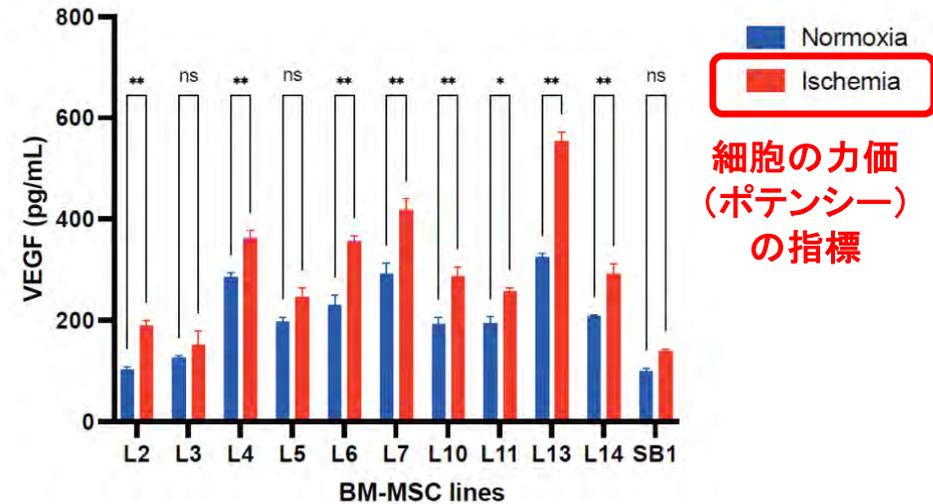
血管新生を促すタンパク質です。VEGFが血管内皮細胞に作用すると、細胞の分裂や遊走、分化などを誘導し、その結果、既存の血管から枝分かれした新たな血管が形成されます（血管新生）。

<https://oncolo.jp/dictionary/vascular-endothelial-growth-factor>

生着部位の環境を模した実験条件



↑
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

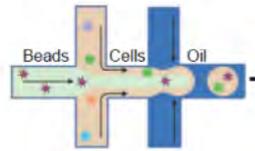
シングルセル・トランスクリプトーム解析

通常酸素分圧下の
骨髄由来MSCs



BM-MSCs (P5)

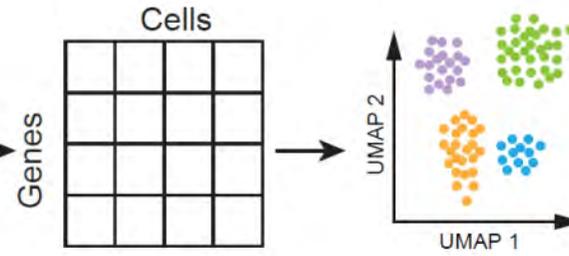
11ロット



Single cell libraries



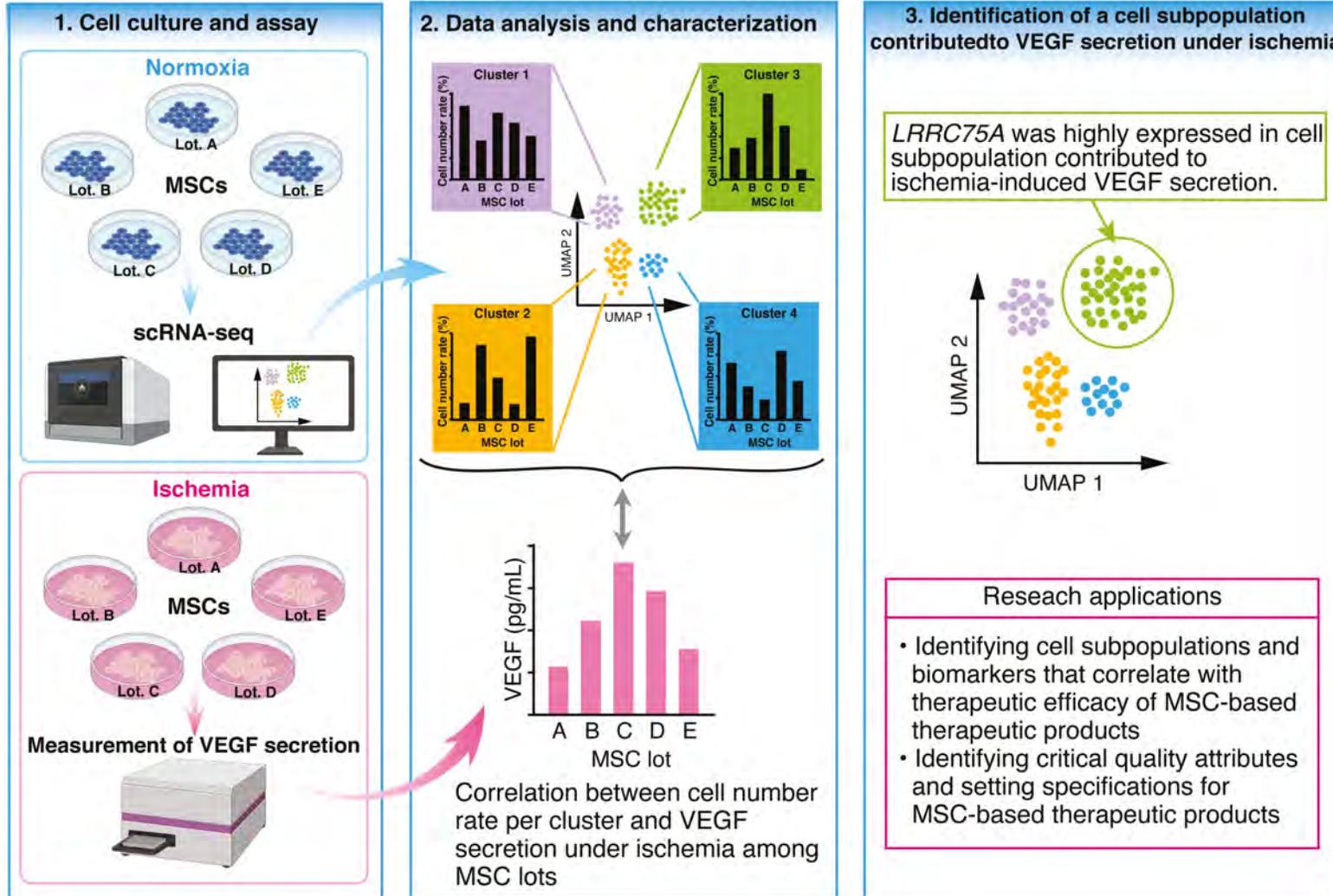
Sequencing



Expression profile

Visualization

個々の細胞の遺伝子発現パターンで細胞を分類



hMSC (ヒト間葉系幹細胞/間葉系間質細胞) の科学

hMSCの母集団 = プラトンの言う「アイデア」としてのhMSC = 『一般的なhMSC』



hMSCs

骨髄由来
hMSC

脂肪組織由来
hMSC

臍帯由来
hMSC

...

骨髄由来hMSC
11ロット



研究で使用した
特定ロットのhMSC
(= 特定の検体)

統計学では、検体数が多数であれば

「母集団のばらつき」は「検体のばらつき」で近似できるとされる。

同様に、

「母集団中の細胞の不均一性」は、

「検体に含まれる細胞の平均的な不均一性」に類似していると推定できる。

=各ロット由来のほぼ同数の細胞のデータを全部合せてからクラスタリングすれば、

「検体に含まれる細胞の平均的な不均一性」を明らかにすることができる。

そこから「母集団 hMSC の不均一性」の姿が推定できる。

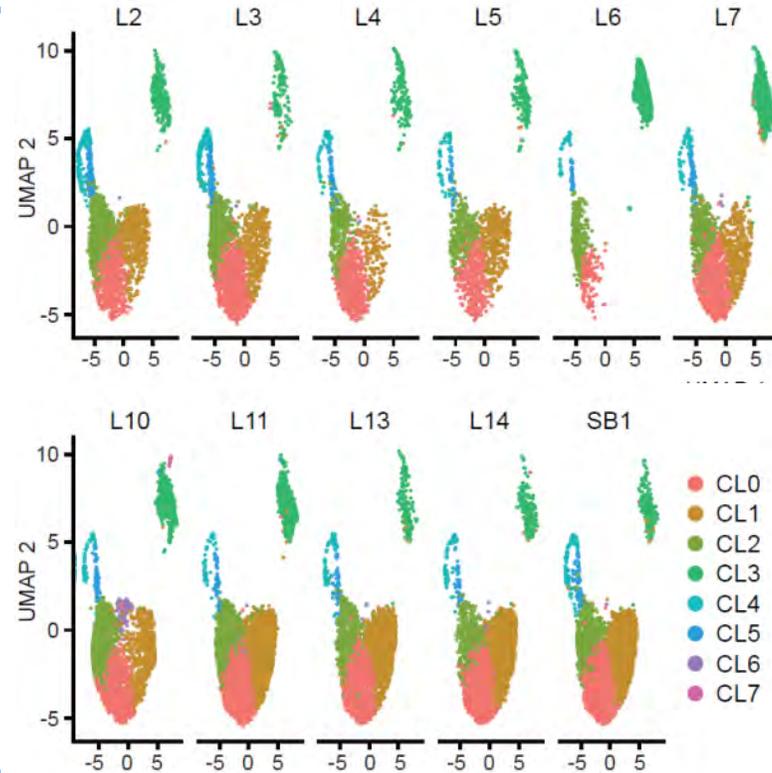
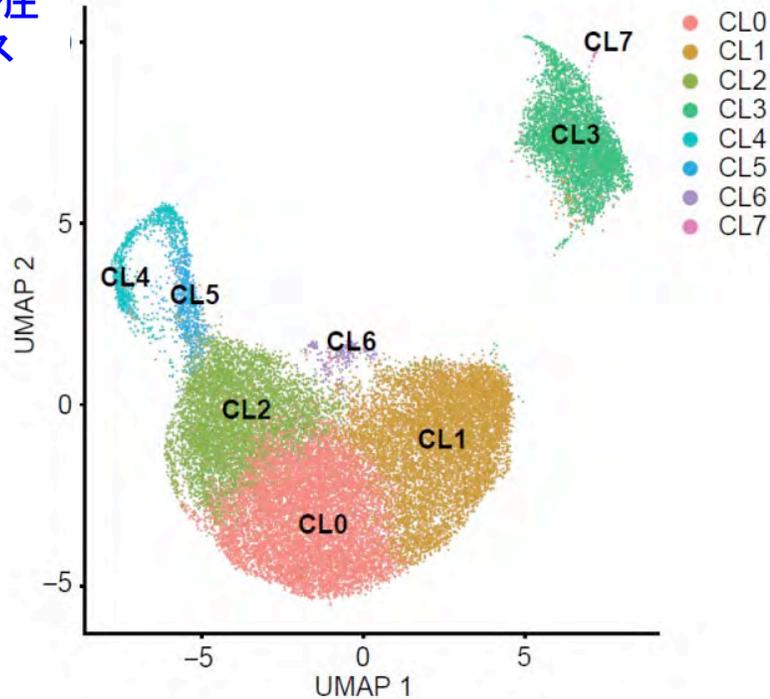
シングルセル・トランスクリプトーム解析

BM-MSCs
(P5)
通常酸素分圧
グルコース
(+)



骨髄由来
hMSC

骨髄由来
hMSC
11ロット



各ロット
において
各クラスター
に属する
細胞の割合
を計算
(次頁横軸)

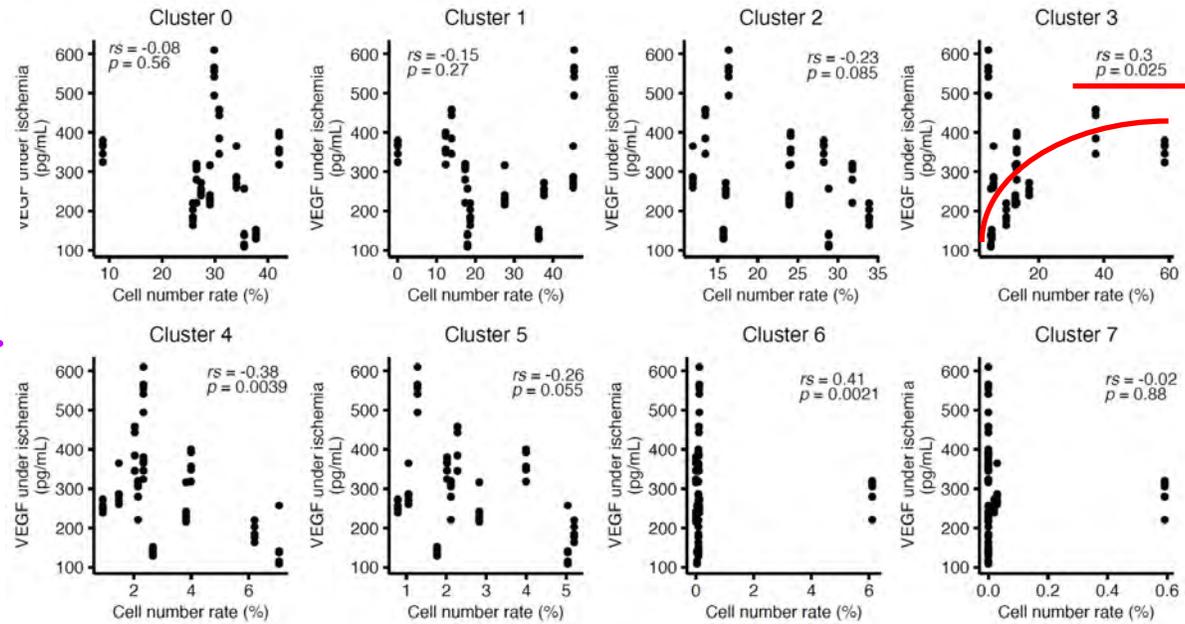
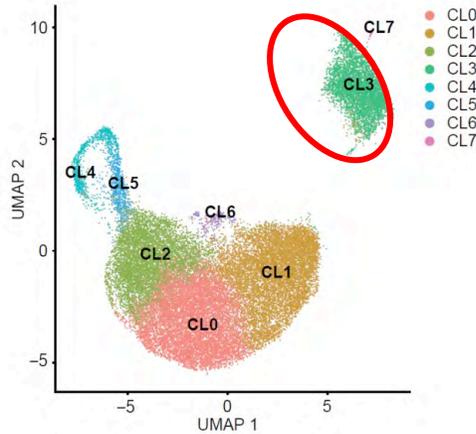
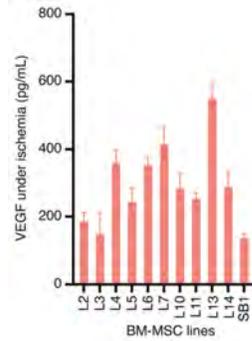
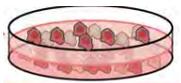
骨髄由来hMSCの母集団は、8個程度の
クラスターに分類できると推定できる

「各ロットの不均一性」が「母集団の不均一性」
からどのくらいズレているかが見える

シングルセル・トランスクリプトーム解析

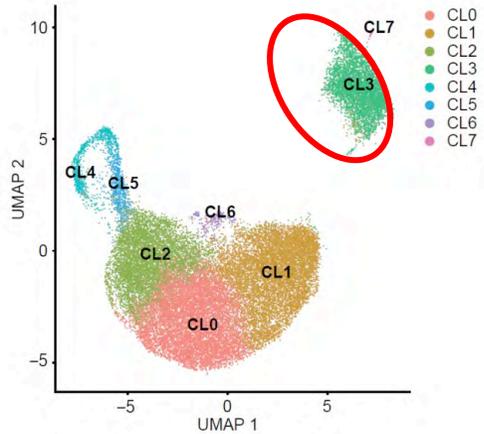
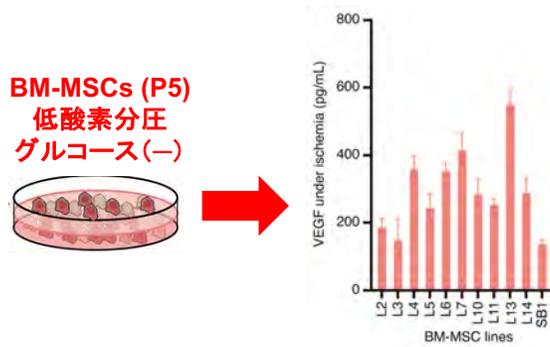
(縦軸)
虚血条件下
での
VEGF分泌

BM-MSCs (P5)
低酸素分圧
グルコース(-)



(横軸)
各ロット
における
各クラスター
に属する
細胞の割合

シングルセル・トランスクリプトーム解析

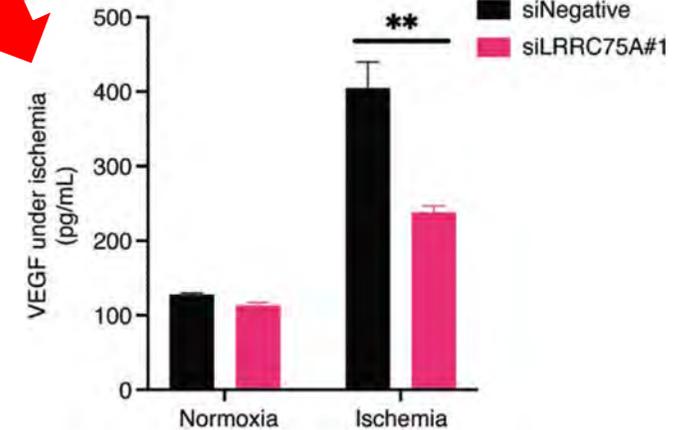
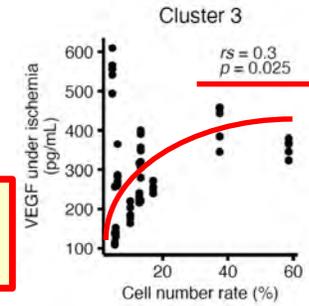


CL3で発現上昇している遺伝子
トップ20

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/間葉系間質細胞) 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「アイデア」としての *hMSC* = 『一般的な *hMSC*』



hMSCs

骨髄由来
hMSC

脂肪組織由来
hMSC

臍帯由来
hMSC

...

骨髄由来 *hMSC*
11ロット

骨髄由来 *hMSC*
別の 4ロット



研究で使用した
特定ロットの *hMSC*

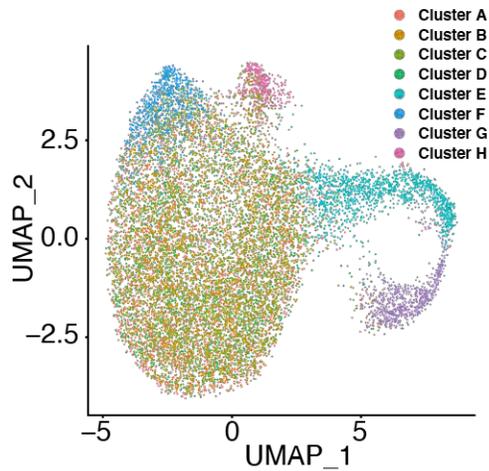
(= 特定の検体)

↑
トレーニングセット

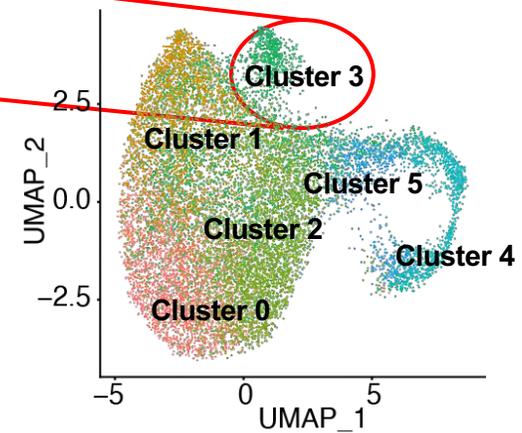
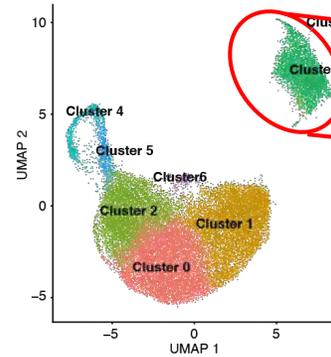
↑
テストセット

Identification of CL3-like cells in another set of BM-MSCs

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

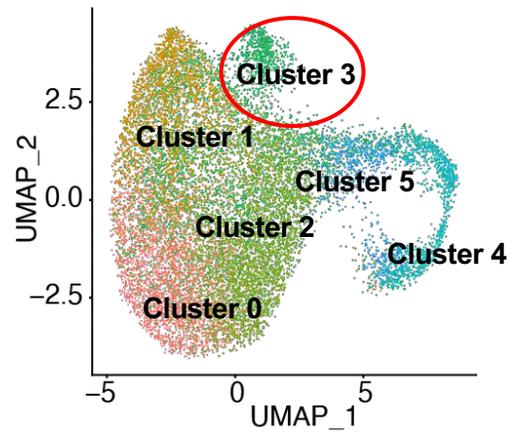


Reference Data Set
(L2-SB1)

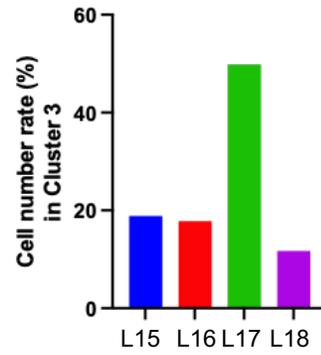


The test set data were merged using *FindTransferAnchors* function with the reference set and identified a CL3-like population.

Identification of CL3-like cells in another set of BM-MSCs



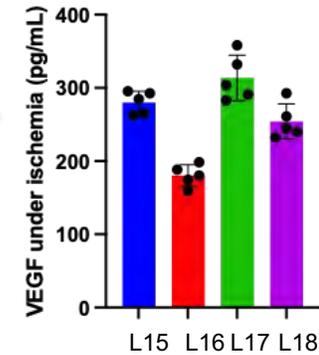
% Distribution of Cells in Each Line of the Test Set to CL3



BM-MSC lines

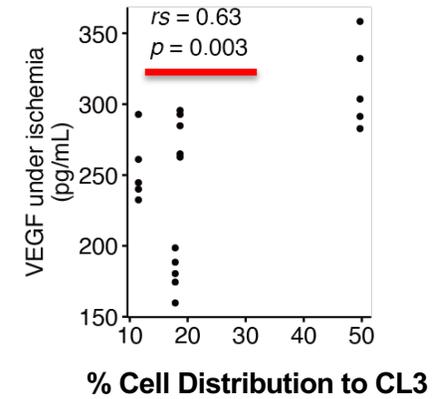
correlation

VEGF Production in Each Line (During Ischemia)



BM-MSC lines

Spearman's Rank Correlation Coefficient (% Cell Distribution vs. VEGF Production During Ischemia)



hMSC (ヒト間葉系幹細胞/間葉系間質細胞) 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「アイデア」としての *hMSC* = 『一般的な *hMSC*』



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 4ロット

研究で使った
特定ロットの *hMSC*

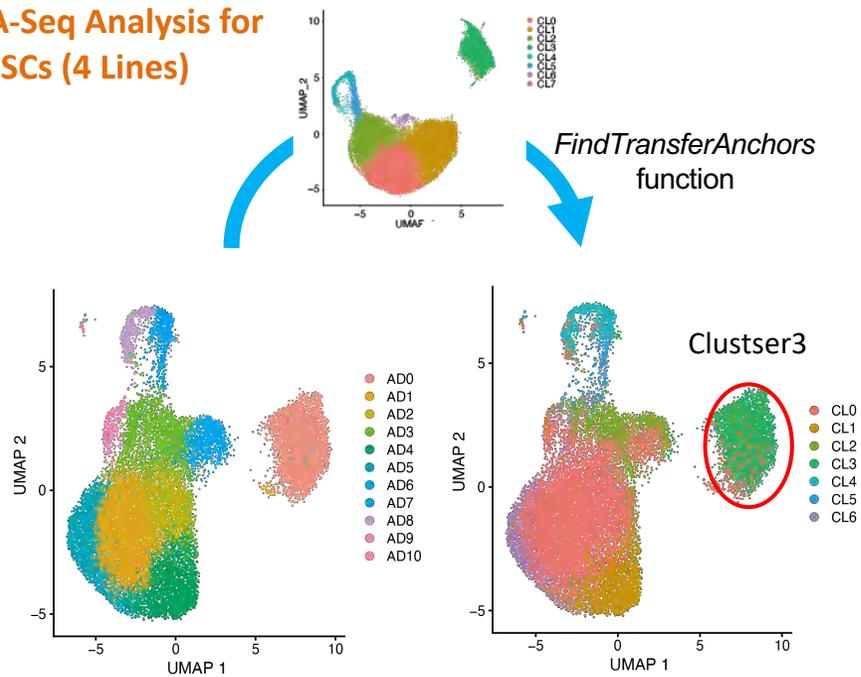
(= 特定の検体)

↑
トレーニングセット

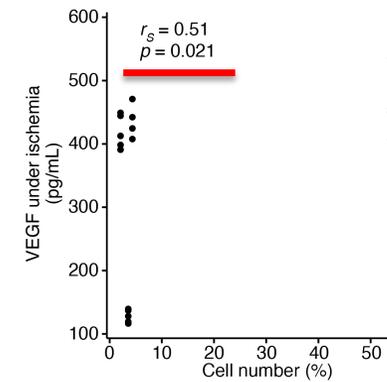
↑
テストセット

CL3-like cells in adipose-derived MSCs (AD-MSCs)

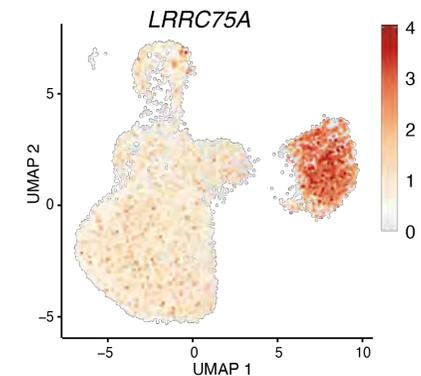
scRNA-Seq Analysis for AD-MSCs (4 Lines)



Spearman's Rank Correlation Coefficient (% Cell Distribution vs. VEGF Production During Ischemia)

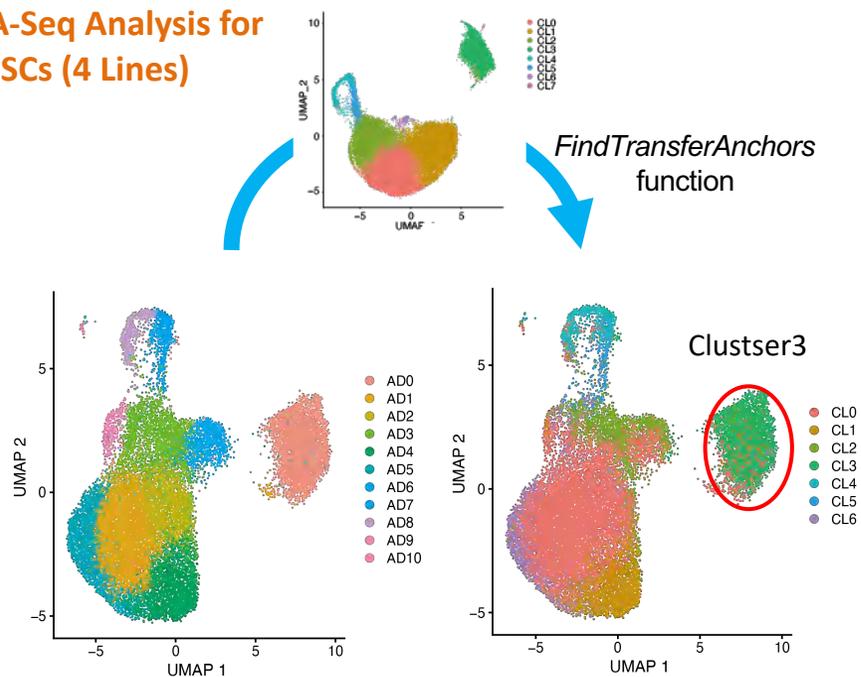


Expression of *LRRC75A* in AD-MSCs

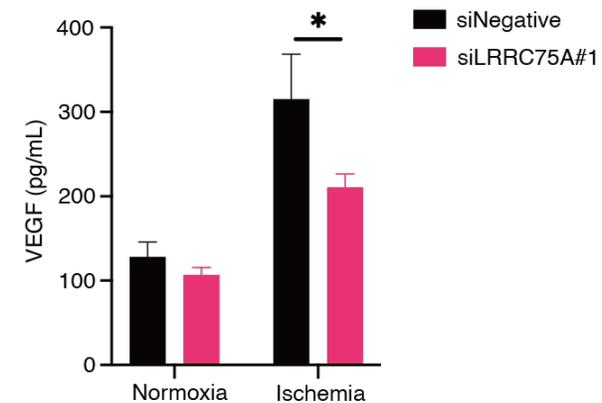


CL3-like cells in adipose-derived MSCs (AD-MSCs)

scRNA-Seq Analysis for AD-MSCs (4 Lines)



Suppression of VEGF secretion in AD-MSCs by *LRRC75A* siRNA



In AD-MSCs,

- CL3-like cells contribute to VEGF production under ischemia.
- The expression of *LRRC75A* is high in CL3-like cells.
- KD of *LRRC75A* suppresses the secretion of VEGF.

hMSC (ヒト間葉系幹細胞/間葉系間質細胞) 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「アイデア」としての *hMSC* = 『一般的な *hMSC*』



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 4ロット

臍帯由来 *hMSC*
5ロット

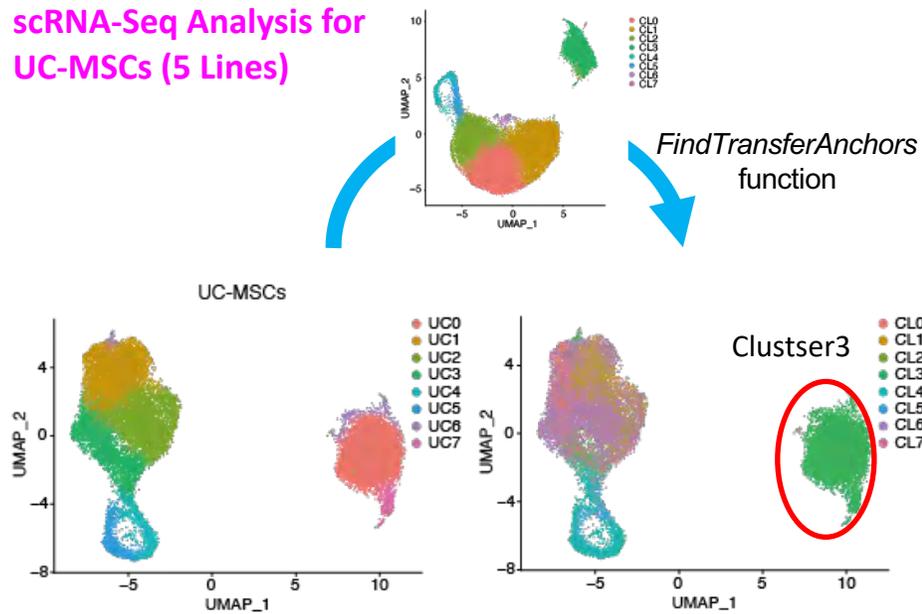
研究で使った
特定ロットの *hMSC*
(= 特定の検体)

↑
トレーニングセット

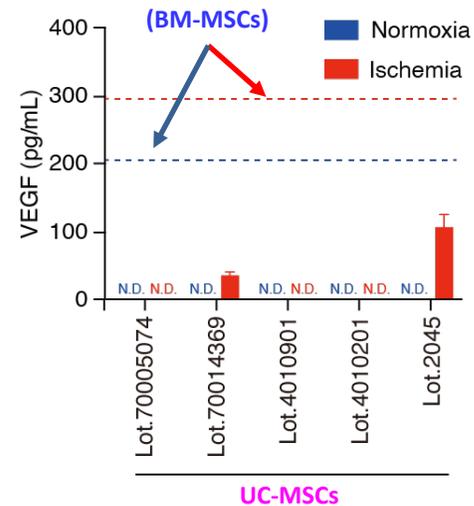
↑
テストセット

CL3-like cells in umbilical cord-derived MSCs (UC-MSCs)

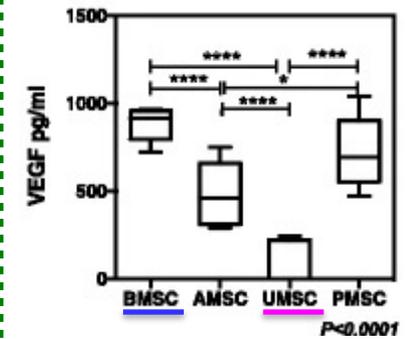
scRNA-Seq Analysis for UC-MSCs (5 Lines)



VEGF Production in Each Line (Normoxia/Ischemia)



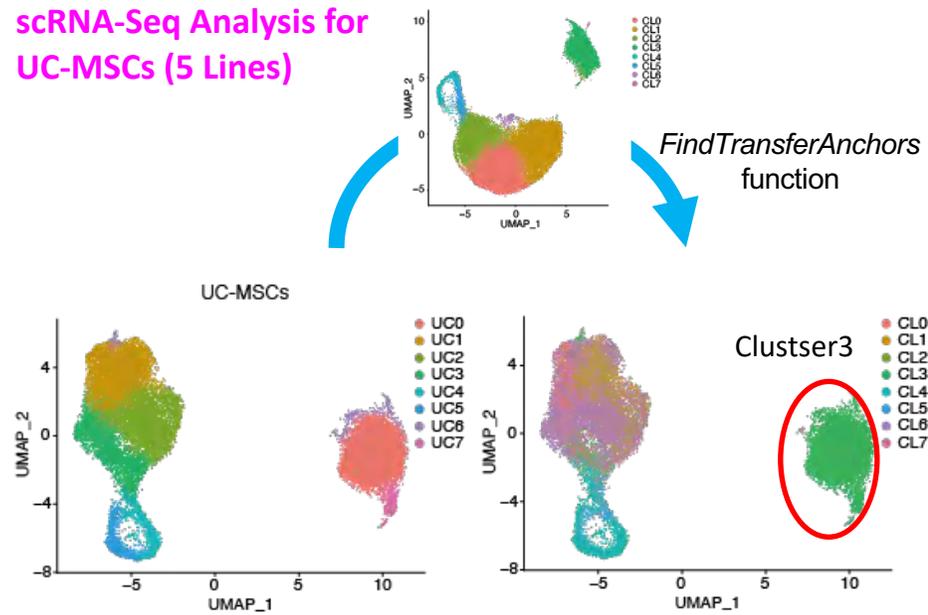
Data from Another Group (Normoxia)



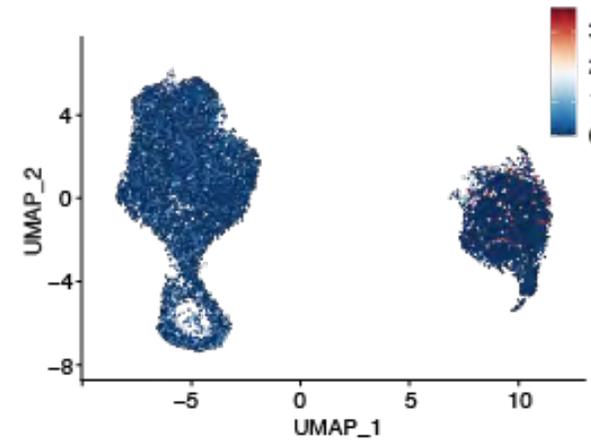
Du WJ, et al. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:163.

CL3-like cells in umbilical cord-derived MSCs (UC-MSCs)

scRNA-Seq Analysis for
UC-MSCs (5 Lines)



Expression of *LRRC75A* in UC-MSCs



Significantly fewer cells express high levels of
LRRC75A in CL3-like cells.

hMSC (ヒト間葉系幹細胞/間葉系間質細胞) 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「アイデア」としての *hMSC* = 『一般的な *hMSC*』



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 4ロット

臍帯由来 *hMSC*
5ロット

研究で使った
特定ロットの *hMSC*
(= 特定の検体)

CONSISTENT

CONSISTENT

CONSISTENT

↑
テストセット

↑
トレーニングセット

本日の結論

- 細胞加工製品の原料や有効成分である細胞は複雑で不均質・不均一であるため、認識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物質特性(重要原料特性)(CMA)や重要品質特性(CQA)をすべて特定・管理することはできない可能性が高い。
- 細胞加工製品の原料(例:iPS細胞)の特性の理解、隠れたCMAの採掘・同定、ならびに
- 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・同定、および作用機序の理解には、細胞集団間の不均質性(例:iPS細胞株間)や細胞集団内の不均一性(例:MSCの亜集団)をその効力・有効性にもとづき分類・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、各種のトランスクリプトーム解析や画像解析に基づき、力価／有効性と関連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(確固としたCQAに基づく製造設計や規格・in house の重要管理項目の設定)、およびこれらによる合理的で柔軟な製法変更の実現に役立つと考えられる。
- これらは、知財(新規作用機序・有効成分)や薬価(画期性加算・有用性加算)の獲得にもつながりうる。
- つまり、細胞加工製品の価値向上、品質や供給の安定性・継続性が期待できるということです。



不均質性・不均一性の「見える化」や 適切な原料細胞・有効成分細胞・作用機序の理解



湘南Health Innovation Park

横浜市立大学

神奈川県庁



理化学研究所



横浜市立大学
鶴見キャンパス

神奈川県立
保健福祉大



国立衛研 KISTEC殿町



羽田空港

KISTEC



国立成育医療
研究センター



慶應義塾日吉キャンパス



慶應義塾新川崎タウンキャンパス

慶應義塾殿町タウンキャンパス

藤田医科大学東京
先端医療研究セン
ター



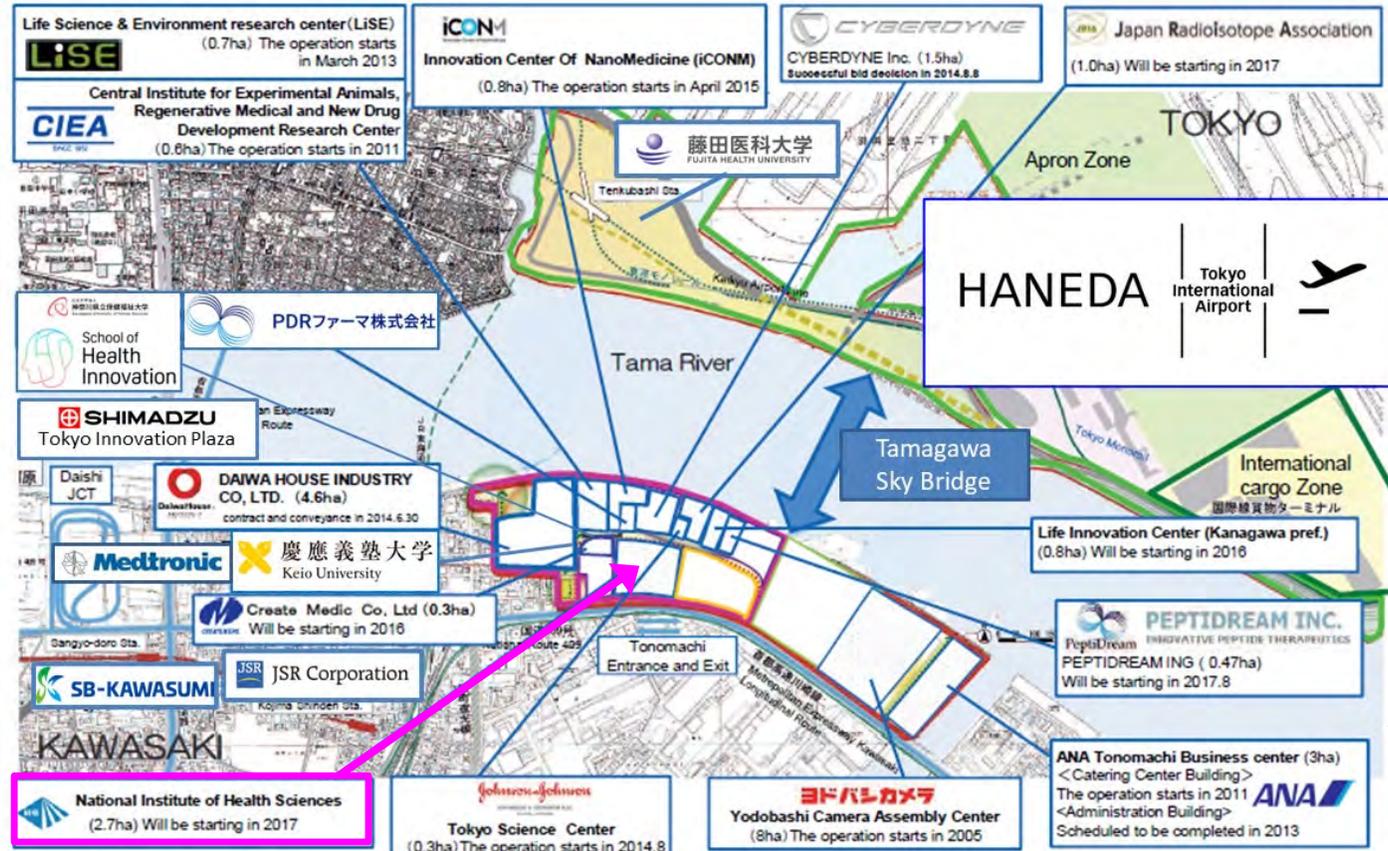
ご質問があれば・・・



佐藤陽治

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部

E-mail: yoji@nihs.go.jp

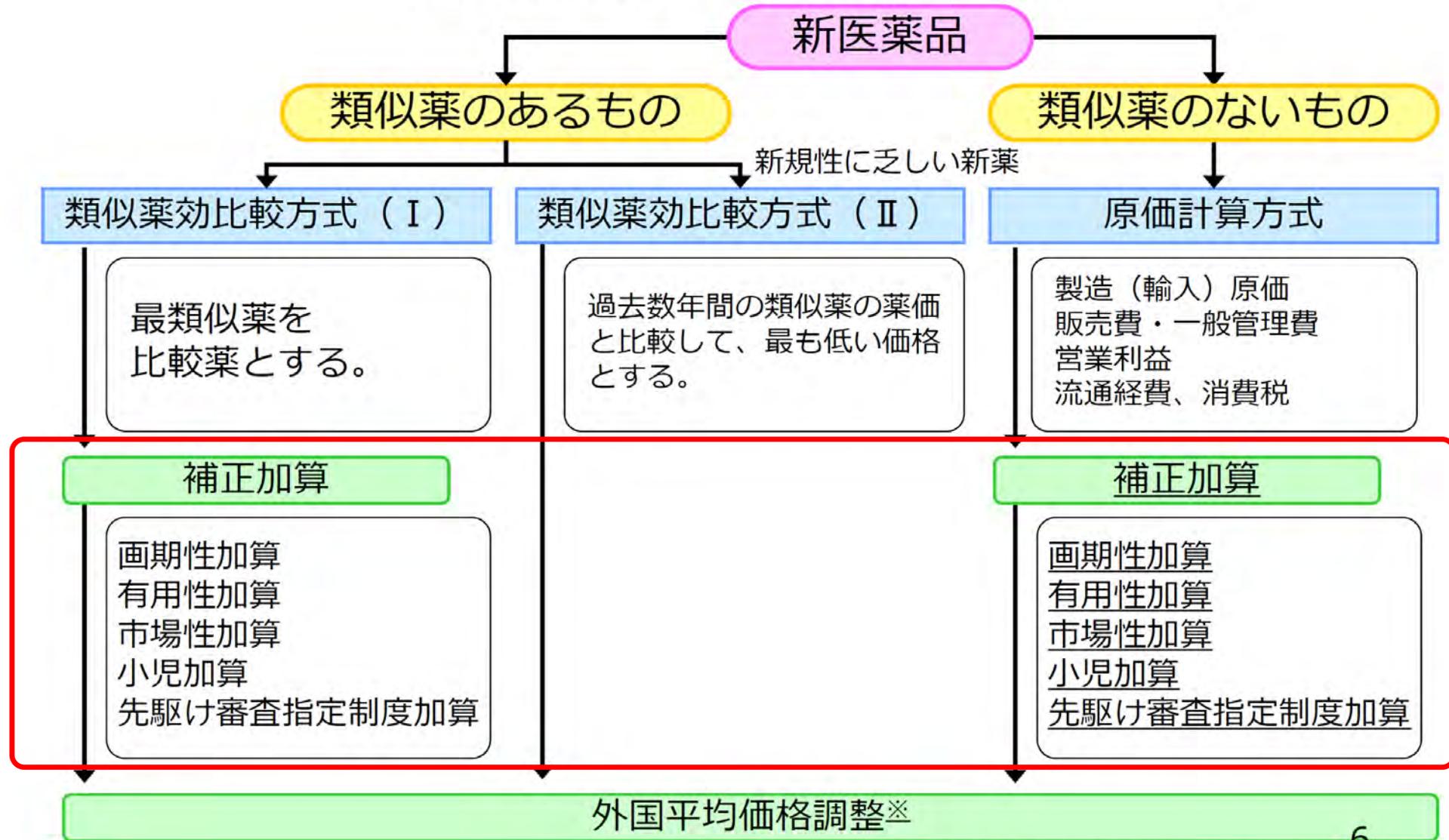


* <https://www.oag.com/hubfs/air-canada-787.jpg>

** <http://www.city.kawasaki.jp/en/page/0000038680.html> を改変

補足資料

新医薬品の薬価算定方式



※原価計算方式又は類似薬効比較方式 (I) のうち薬理作用類似薬がない場合に限る。

補正加算

画期性加算（70～120%）

次の要件を**全て満たす**新規収載品

- イ 臨床上有用な新規の作用機序を有すること。
- 類似薬又は既存治療に比して、高い有効性又は安全性を有することが、客観的に示されていること。
- ハ 当該新規収載品により、当該新規収載品の対象となる疾病又は負傷の治療方法の改善が客観的に示されていること。

有用性加算（Ⅰ）（35～60%）

画期性加算の**3要件のうち2つの要件を満たす**新規収載品

有用性加算（Ⅱ）（5～30%）

次の**いずれかの要件を満たす**新規収載品

- イ 臨床上有用な新規の作用機序を有すること。
- 類似薬又は既存治療に比して、高い有効性又は安全性を有することが、客観的に示されていること。
- ハ 当該新規収載品により、当該新規収載品の対象となる疾病又は負傷の治療方法の改善が客観的に示されていること。
- ニ 製剤における工夫により、類似薬又は既存治療に比して、高い医療上の有用性を有することが、客観的に示されていること。

複数の補正加算に該当する場合

$$\text{加算額} = \text{算定値} \times (a1 + a2 + \dots)$$

市場性加算（Ⅰ）（10～20%）

次の要件を全て満たす新規収載品

- イ 希少疾病用医薬品であって、対象となる疾病又は負傷に係る効能及び効果が当該新規収載品の主たる効能及び効果であること。
- 当該新規収載品の比較薬が市場性加算（Ⅰ）の適用を受けていないこと

市場性加算（Ⅱ）（5%）

次の要件を全て満たす新規収載品

- イ 当該新規収載品の主たる効能及び効果が、市場規模が小さいものとして別に定める薬効に該当すること。
- 当該新規収載品の比較薬が市場性加算（Ⅰ）又は市場性加算（Ⅱ）の適用を受けていないこと

小児加算（5～20%）

次の要件を全て満たす新規収載品。但し、国内で小児効能に係る臨床試験を実施していない場合等は除く。

- イ 当該新規収載品の主たる効能及び効果又は当該効能及び効果に係る用法及び用量に小児（幼児、乳児、新生児及び低出生体重児を含む。）に係るものが明示的に含まれていること。
- 当該新規収載品の比較薬が小児加算の適用を受けていないこと。

（注）市場性加算（Ⅱ）にも該当する場合は、小児加算を優先。

先駆け審査指定制度加算（10～20%）

先駆け審査指定制度の対象品目として指定されたもの。

+

画期性加算・有用性加算

作用機序が明らかで、
既存治療／既存薬と
比較するRCTが前提

すべて満たす ↓ ↓ ↓ ↓ 画期性加算 70 | 120 %

2つの要件を満たす ↓ 有用性加算 (I) 35 | 60 %

いずれかの要件を満たす ↓ 有用性加算 (II) 5 | 30 %

イ 臨床上有用な新規の作用機序を有すること。

再生医療等製品では、**真の作用機序が不明確**である場合が多いと想定される

ロ 類似薬又は既存治療に比して、高い有効性又は安全性を有することが、客観的に示されていること。

単腕試験では類似薬・既存治療との**比較臨床データ**は得られない

ハ 当該新規収載品により、当該新規収載品の対象となる疾病又は負傷の治療方法の改善が客観的に示されていること。

改善の「確認」が必要。「推定」で「客観的に示されている」と言えるか？

ニ 製剤における工夫により、類似薬又は既存治療に比して、高い医療上の有用性を有することが、客観的に示されていること。

作用機序が明らかで、既存治療／既存薬と比較するRCTを前提とした
現行の補正加算制度では、条件・期限付き承認の再生医療等製品はかなり不利

国内初の遺伝子治療薬「コラテジェン」薬価60万円は高いか安い

更新日 2019/09/12

4mg 1.6mL 1瓶	600,360円
新薬収載希望者に	
予測年度	
(ピーク時)	
10年度	
予測本剤投与患者数	

9月10日、国内初の遺伝子治療薬「コラテジェン」が発売されました。注目された薬価は1回60万円となりましたが、投資家に「安すぎる」と受け止められ、アンジェスの株価は急落。アンジェスは本承認後の加算に期待するとともに、収益化に向けて海外展開を急ぐ考えです。

INDEX

- [1つの「日本初」と3つの「世界初」](#)
- [本承認後の加算に期待](#)
- [加算のあり方 中医協が検討](#)
- [収益最大化へ 米国開発急ぐ](#)

コラテジェンの薬価算定

算定方式	原価計算方式
製造原価	43万7582円
営業利益	7万6615円 (流通経費除く価格の14.9%)
流通経費	4万1692円 (消費税除く価格の7.5%)
消費税	4万4471円
補正加算	なし
算定薬価	4mg1.6mL 1瓶 60万360円
市場規模予測	投与患者数992人/販売額12億円 (ピーク時)

中医協総会 (2019年8月28日) の資料をもとに作成

再生医療等製品の価格算定は、投与形態などの製品特性から医薬品に近いと判断されたものは薬価の算定方式に沿って、医療機器に近いと判断されたものは医療機器の算定方式に沿って行われることになっています。再生医療等製品に特化した価格算定の仕組みは、今のところありません。

コラテジェンは医薬品に近いと判断され、薬価は製造原価に企業の利益や流通経費を積み上げる「原価計算方式」で算定。しかし、画期的な治療薬であるにもかかわらず、それを評価する「画期性加算」や「有用性加算」はつきませんでした。そもそもコラテジェンは、ごく小規模の臨床試験の結果をもとに5年間の条件・期限付きで承認されており、今はいわば「仮免許」の状態。加算がつかなかった背景には、データが乏しく現時点では有効性の評価が限定的であるという事情があります。

国内初の遺伝子治療薬「コラテジェン」薬価60万円は高いか安いのか

更新日 2019/09/12



コラテジェンの薬価算定

算定方式	原価計算方式
製造原価	43万7582円
営業利益	7万6615円 (流通経費除く価格の14.9%)
流通経費	4万1692円 (消費税除く価格の7.5%)
消費税	4万4471円
補正加算	なし
算定薬価	4mg1.6mL 1瓶 60万360円
市場規模予測	投与患者数992人/販売額12億円 (ピーク時)

中薬協総会 (2019年8月28日) の資料をもとに作成

コラテジェンは医薬品に近いと判断され、薬価は製造原価に企業の利益や流通経費を積み上げる「原価計算方式」で算定。しかし、画期的な治療薬であるにもかかわらず、それを評価する「画期性加算」や「有用性加算」はつきませんでした。そもそもコラテジェンは、ごく小規模の臨床試験の結果をもとに5年間の条件・期限付きで承認されており、今はいわば「仮免許」の状態。加算がつかなかった背景には、データが乏しく現時点では有効性の評価が限定的であるという事情があります。

“...、多くの人々が「そもそも価値とは何か？」を理解していません。
価値を理解していないと、次のようなことが起こります。”

- 価値を理解していないから、そもそも価値をつくれない
- 偶然に価値をつくれたとしても、繰り返し再現できない
- 再現できないから、仕組みにできない
- 仕組みにできないから、システムにできない
- システムにできないから、自動化できない
- 自動化できないから、生産性が低い
- 生産性が低いから、報酬も低い