

150周年記念特別衛研シンポジウム

令和6年10月18日

創立150周年を迎えた国立衛研のレギュラトリーサイエンス ～最新動向と展望～

細胞加工製品製造における重要品質特性を理解するための基盤研究



国立医薬品食品衛生研究所
再生・細胞医療製品部

三浦 巧

間葉系幹細胞（MSC）を用いた再生医療について

- **再生医療とは？**

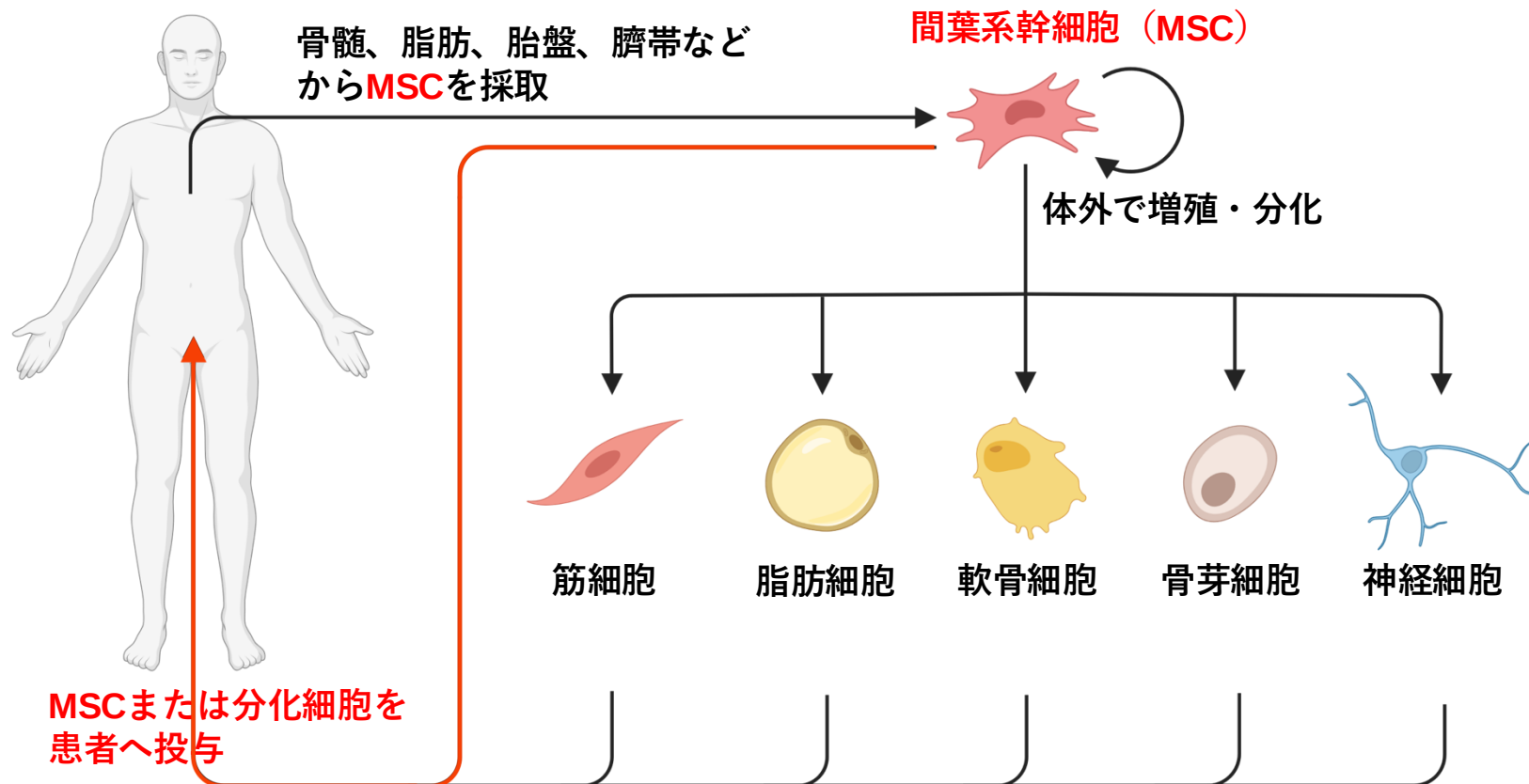
病気やけがなどで傷ついた組織や臓器を**細胞**を使って修復・再生する医療

- **再生医療等製品（細胞加工製品）とは？**

再生医療への使用を目的として、ヒトや動物の細胞に培養等の加工を施したもの

- **間葉系幹細胞（MSC）を使った再生医療の例**

MSCには、脂肪・骨・軟骨・筋肉・神経などの組織になる能力があるが、現在、再生医療で注目されているMSCの特性として、MSC自身が分泌する様々な物質が炎症や細胞死を抑えたり、再生を促したりする可能性があるため、MSCそのものを細胞加工製品として投与する治療法に期待が寄せられている。



間葉系幹細胞（MSC）を利用した細胞加工製品の開発状況と課題

➤ 間葉系幹細胞（MSC）を利用した再生医療等製品の開発状況

- 現在我が国で3品目（テムセル、ステミラック、アロフィセル）が、細胞加工製品（再生医療等製品）として製造販売承認
- 今後も、多くの疾病を対象としたMSC加工製品の開発が見込まれている

問題点

➤ 一方でMSCを用いた治療の有効性・作用機序が

不明確なものも多い。

機能も多様であり、特性解析も様々

- 免疫細胞機能の調節や血管新生（種々のサイトカインを産生）
- ホーミング作用（損傷・病変部位への自発的な集積）
- 組織再生（多分化能を有する）

➤ MSCはそもそも不均一な細胞集団

- 様々な組織（骨髄、脂肪、臍帯血、胎盤組織など）から単離
- 培養法がさまざま

承認日	販売名（会社名）	対象疾患
2021/9/27	アロフィセル注 （武田薬品工業株式会社）	クローン病
2018/12/28	ステミラック注 （ニプロ株式会社）	脊髄損傷
2015/9/18	テムセルHS注 （JCRファーマ株式会社）	急性移植片対宿主病（急性GVHD）

以上のような課題は、生産性向上の妨げとなる

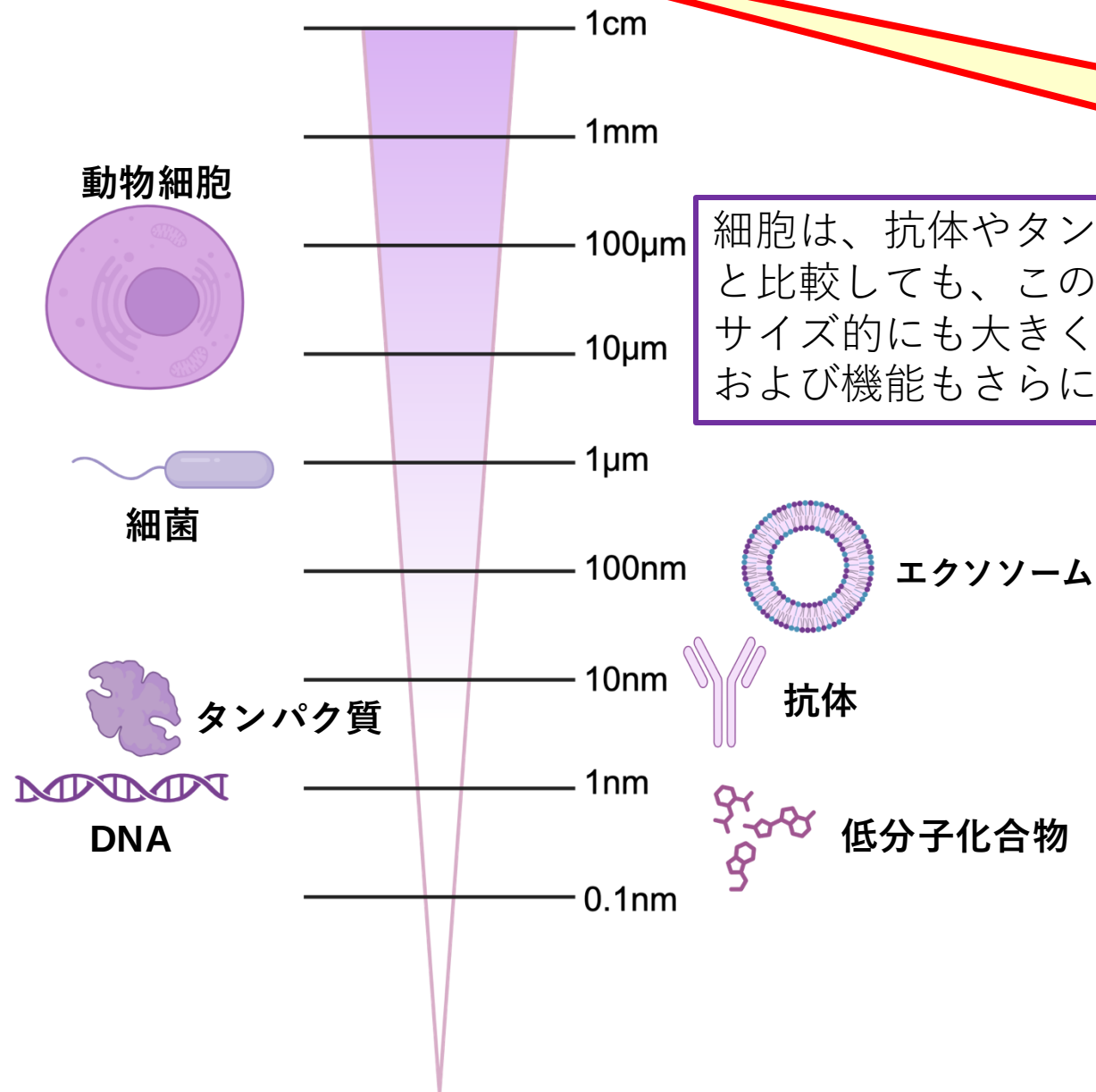
では、MSCを用いた細胞加工製品の実用化のためには、何をどう評価すべきなのか？

細胞加工製品（再生医療等製品）の実用化での課題

- 有効性と安全性
- 有効性と安全性の確保の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
- 適切な規格・試験法にもとづく製造設計・機械化・自動化
- 確固とした製造設計・機械化・自動化による生産性向上
- 生産性向上による収益向上・医療の持続可能性確保

主成分である細胞の特性を知らないと、何を監視・管理すべきか分からない！

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

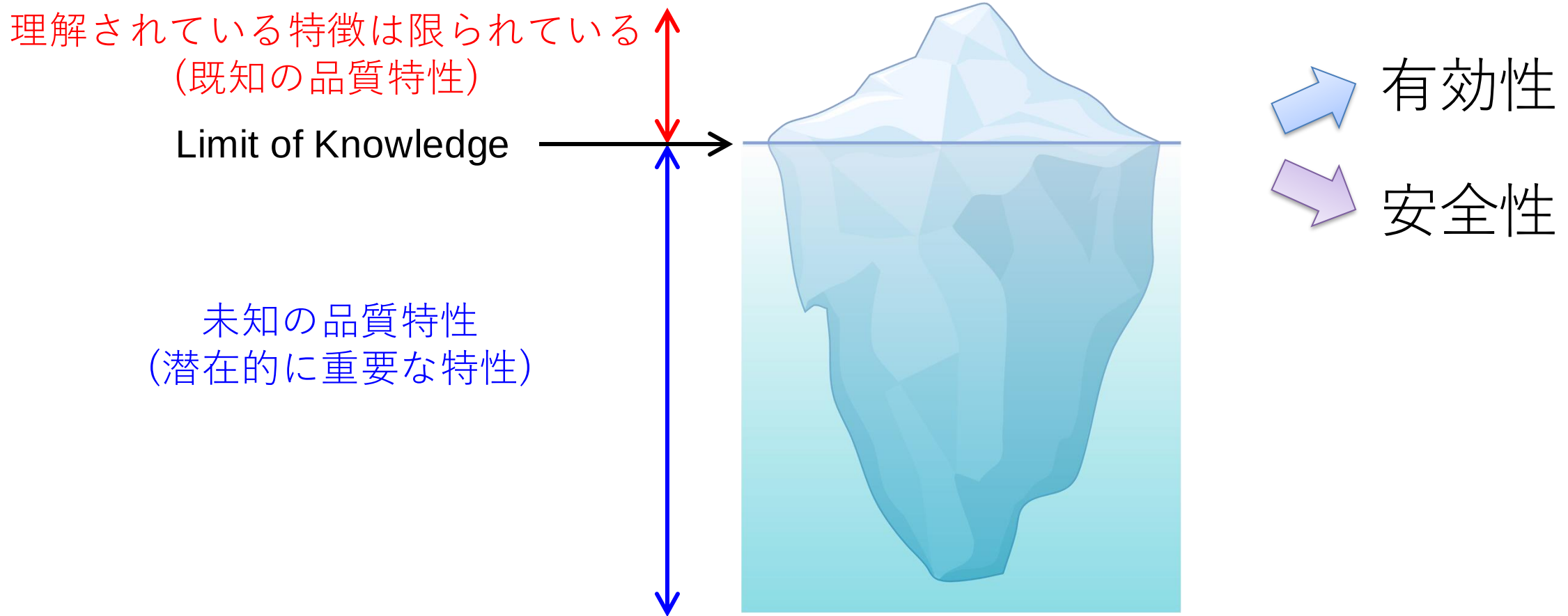


細胞は、抗体やタンパク質と比較しても、このようにサイズのにも大きく、構造および機能もさらに複雑

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）の品質特性の探索における課題



（観察可能な）品質特性に関するデータのみで、製法変更前後における品質の同等性を評価・保証することは難しいと予想される

「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)

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

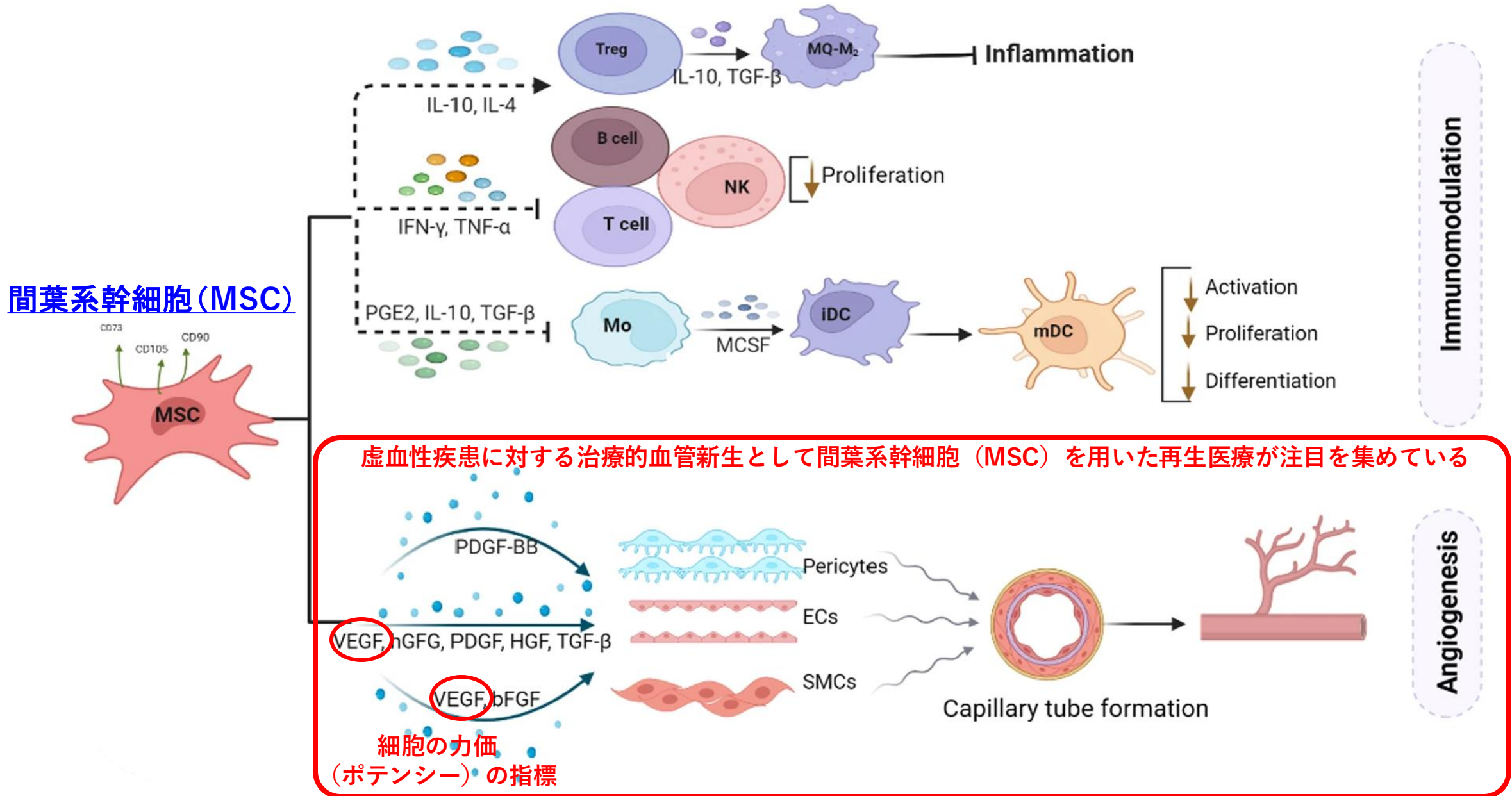
⁸Life Science Technology Project, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, Kawasaki, Japan

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.

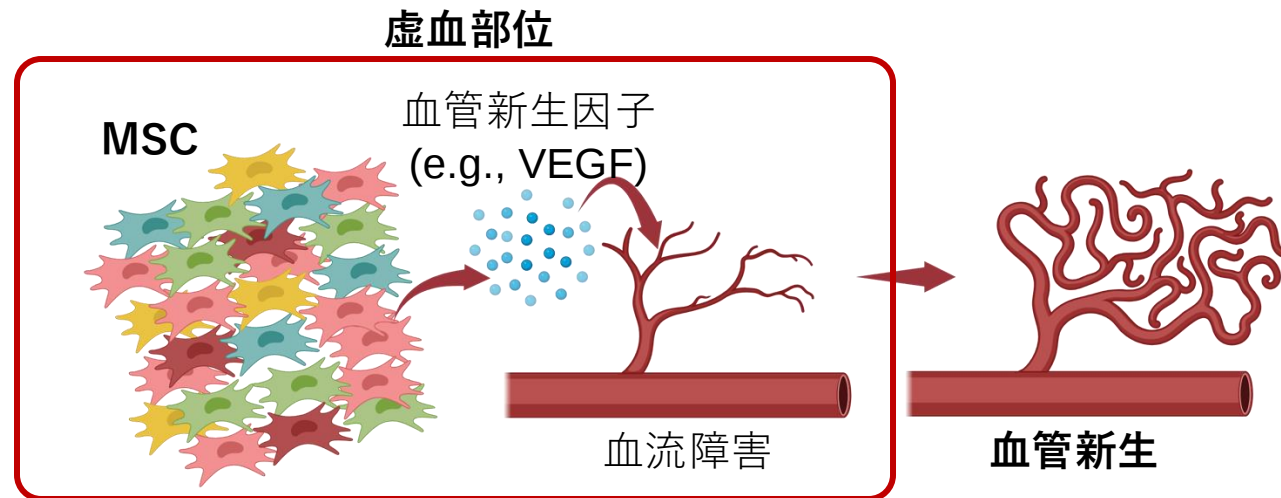
虚血性疾患に対するMSCを用いた治療効果の潜在的メカニズム



生着部位の環境を模した実験条件

【目的】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ーを探索することを試みた

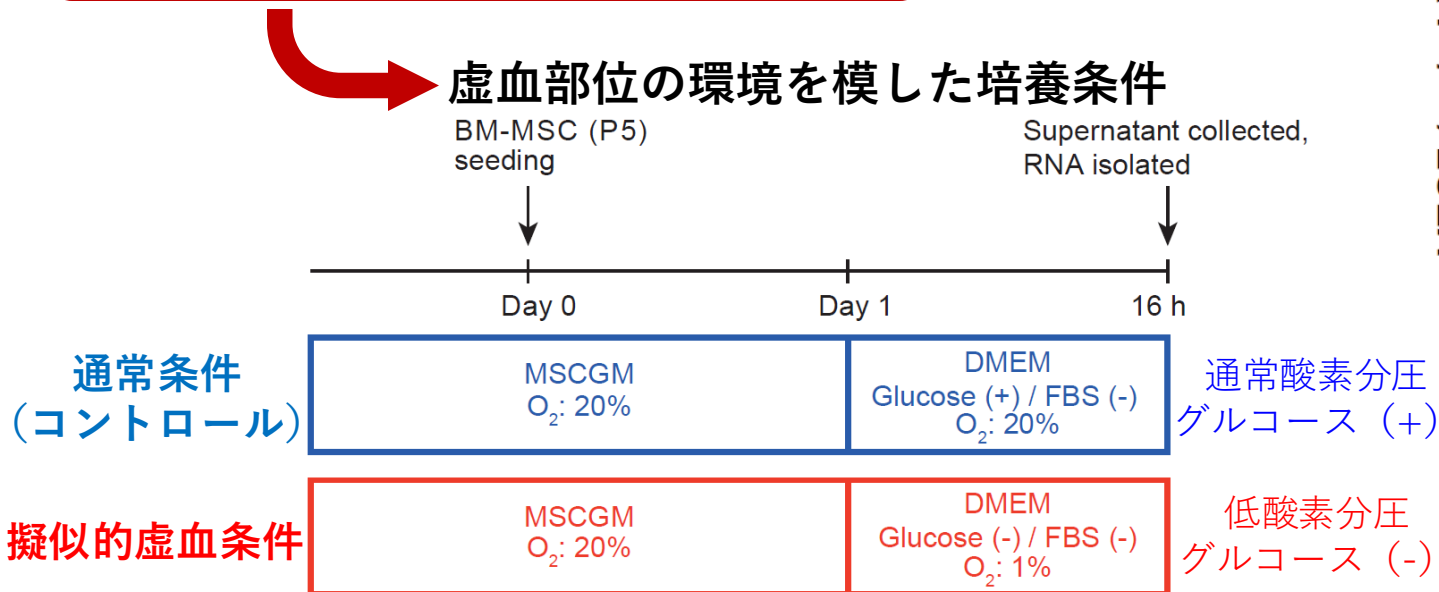
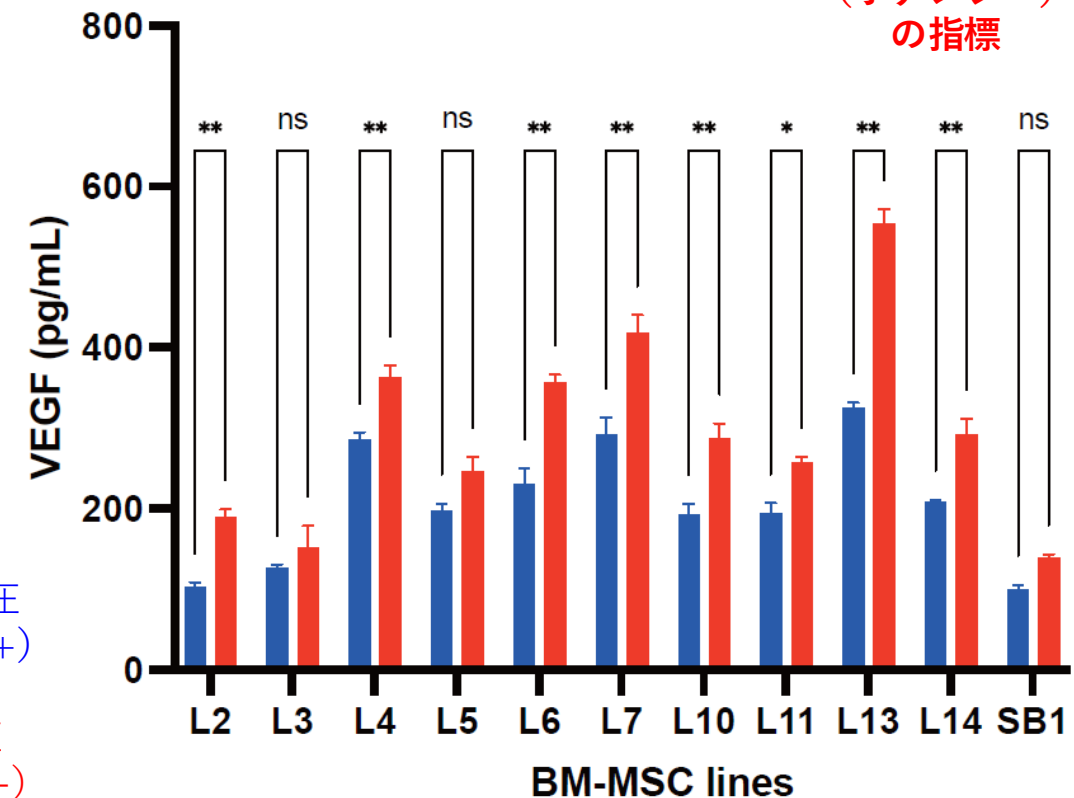
Miura T *et al.*, *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.



虚血下骨髄由来MSC (BM-MSC) 11ロット におけるVEGF分泌能の評価

■ コントロール
■ 虚血処理

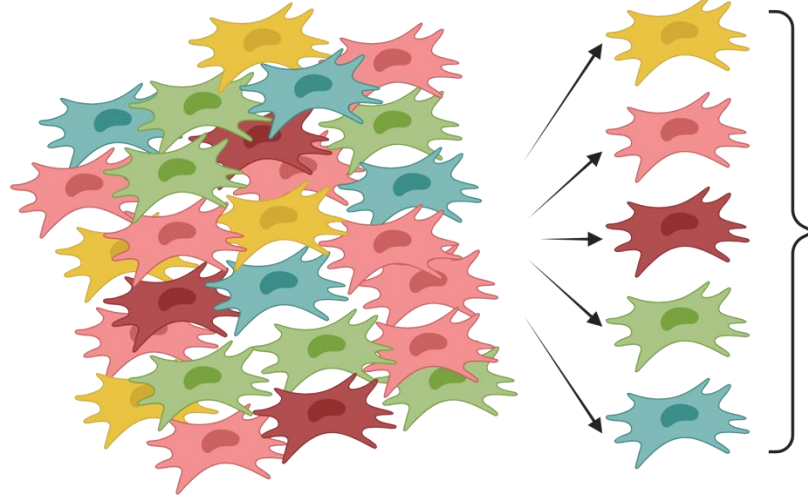
細胞の力価
(ポテンシー)
の指標



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

骨髄由来MSC (BM-MSC)



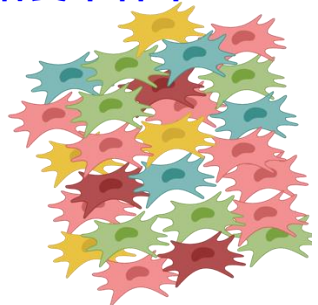
不均質な細胞集団において
虚血時のVEGF産生に寄与する細胞はどれ？

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



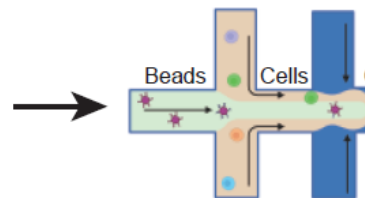
BM-MSC 11ロットにおいてシングルセル・トランスクリプトーム解析を実施

通常培養条件下でのBM-MSC

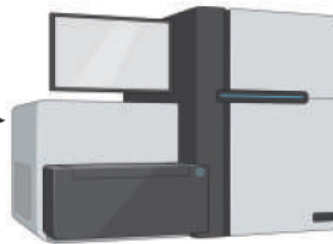


BM-MSCs (P5)

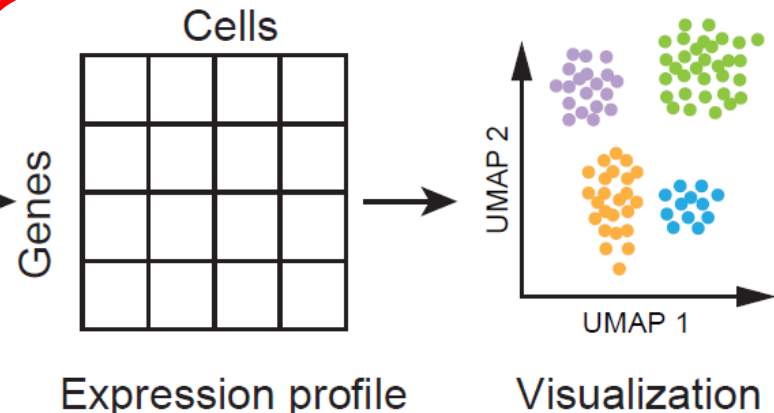
11ロット



Single cell libraries



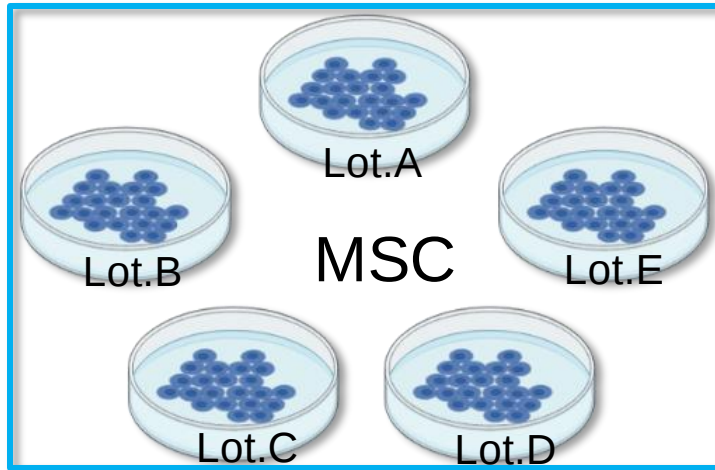
Sequencing



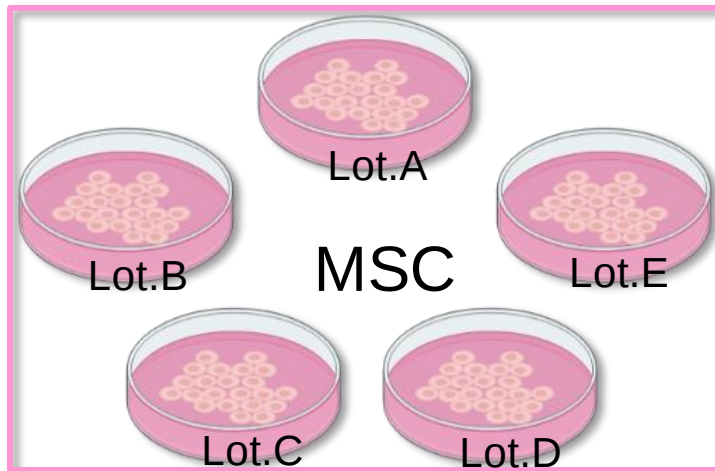
個々の細胞の遺伝子発現パターンで細胞を分類
「不均一性に見える化」

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

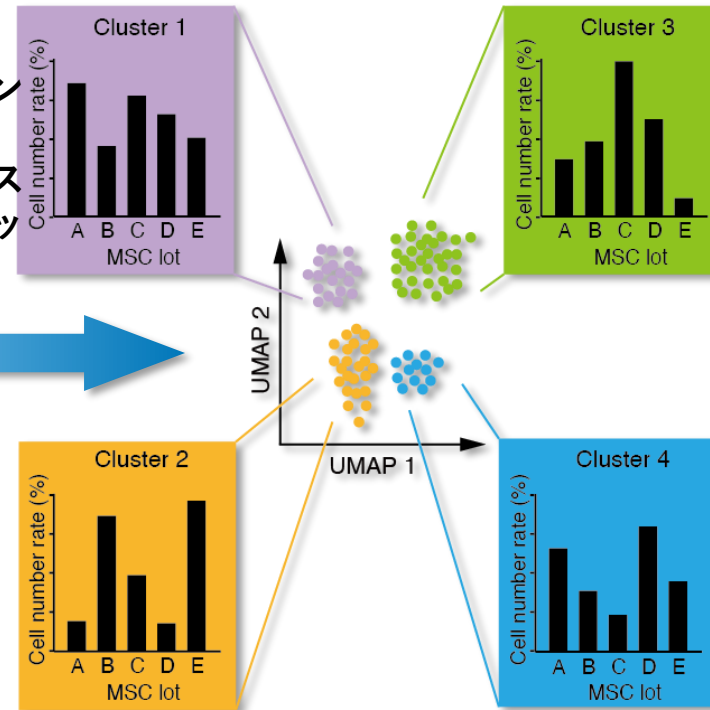
通常酸素環境下培養



擬似的虚血環境下培養

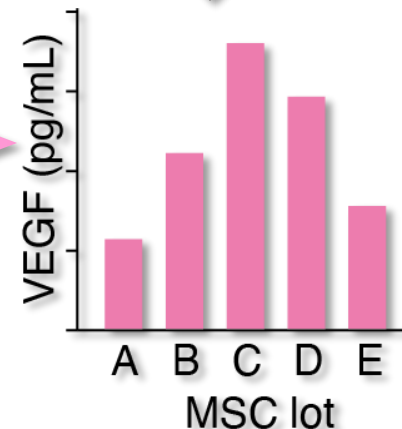


全ロットにおいてシングルセルRNA-Seq解析を実施し、各クラスター内に占める各ロットの存在比を求める
(横軸)



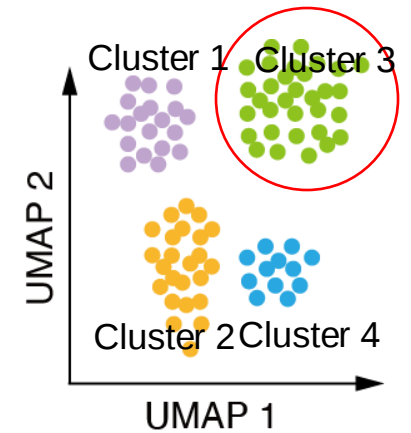
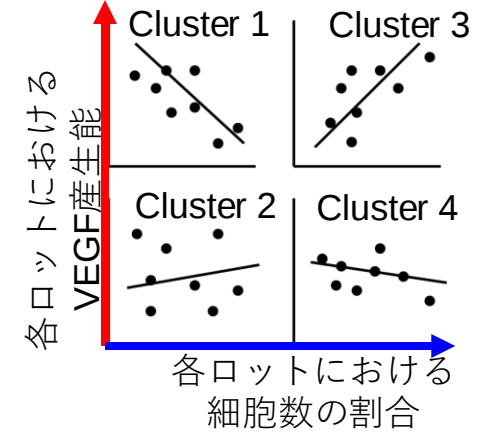
相関関係
機能と相関する細胞群の同定

各ロットにおけるVEGF産生能 (縦軸)



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

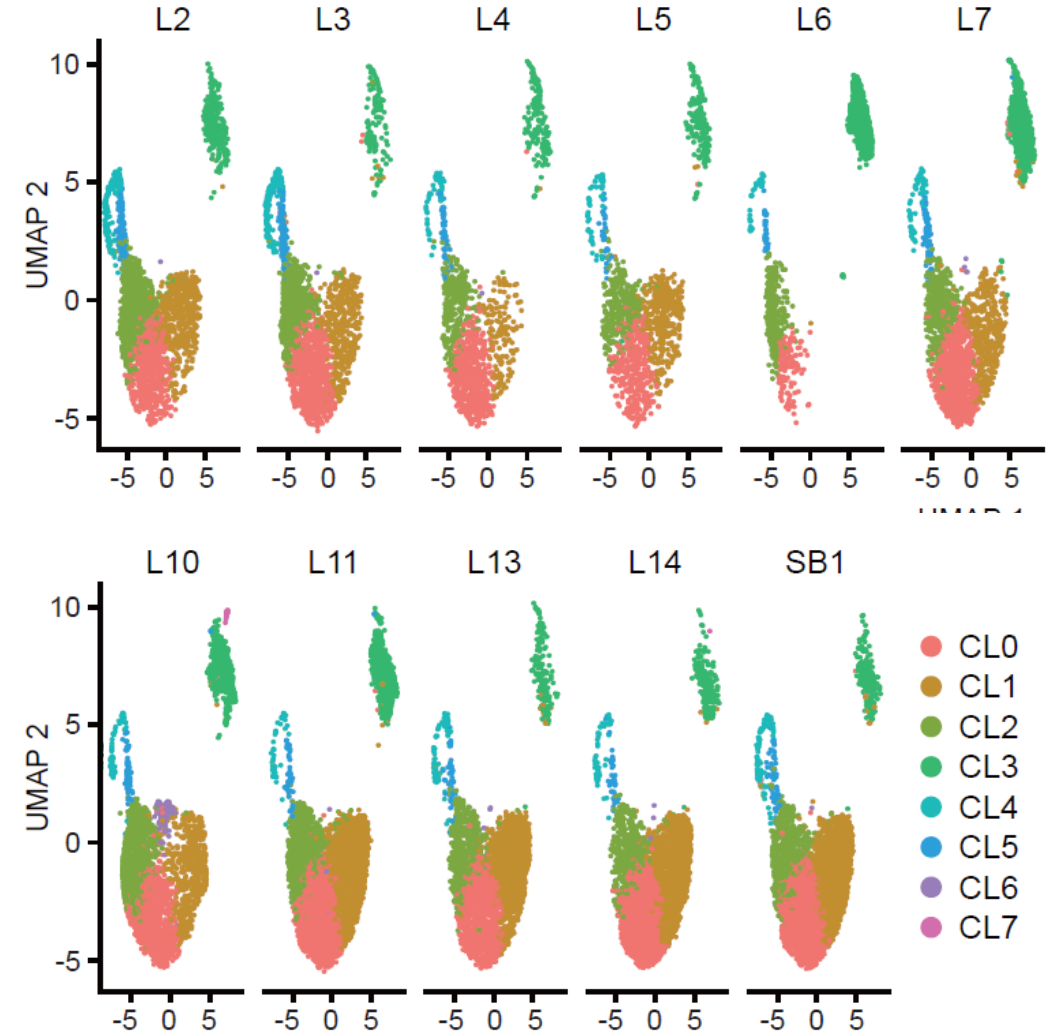
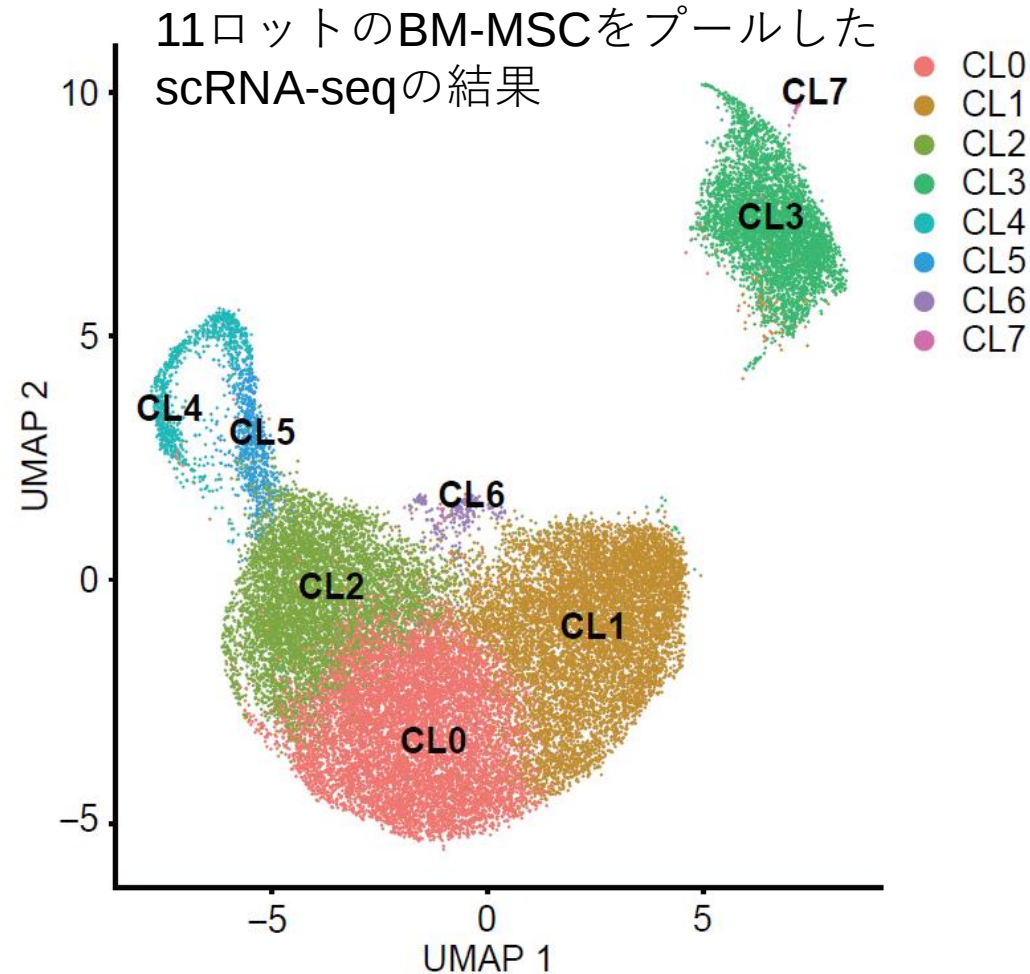


虚血下VEGF産生能と相関のある細胞群 (クラスター) の特定

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

scRNA-seqを実施した細胞：BM-MSCs (P5)
通常酸素分圧
グルコース (+)

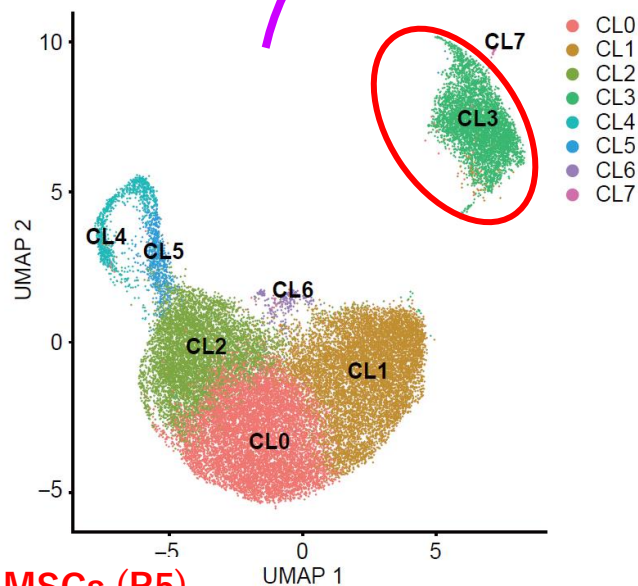
Miura T *et al.*, *Stem Cells Transl Med.* 2023;**12**:379-390.



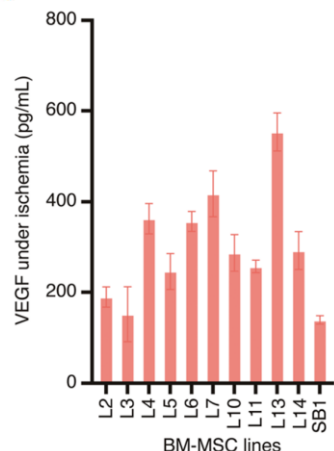
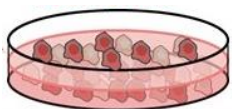
虚血下VEGF分泌に寄与する細胞集団（クラスター）の特定

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

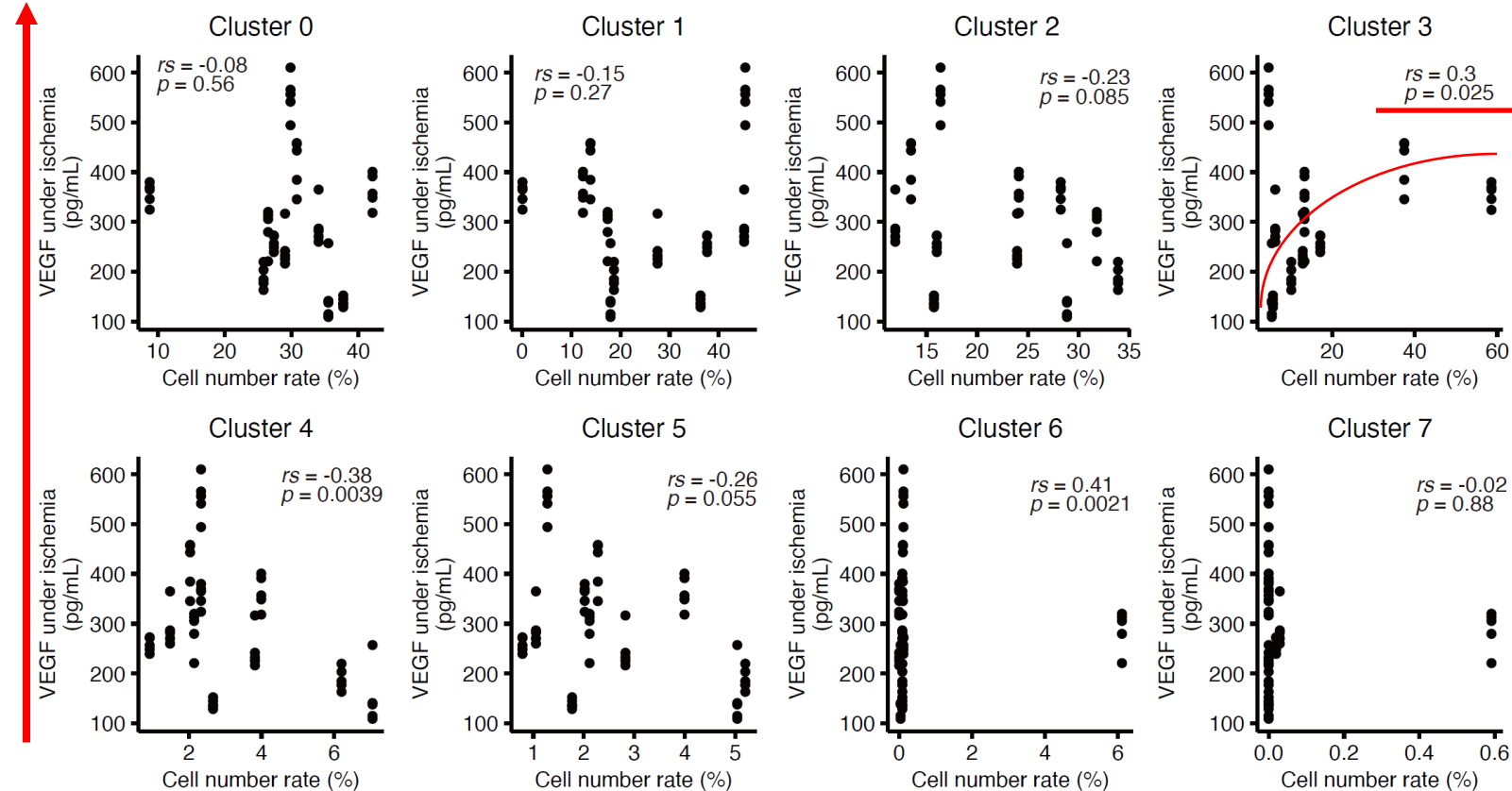
BM-MSCs (P5)
通常酸素分圧
グルコース (+)



BM-MSCs (P5)
低酸素分圧
グルコース (-)



(横軸)
各ロットにおいて各クラスターに属する細胞の割合

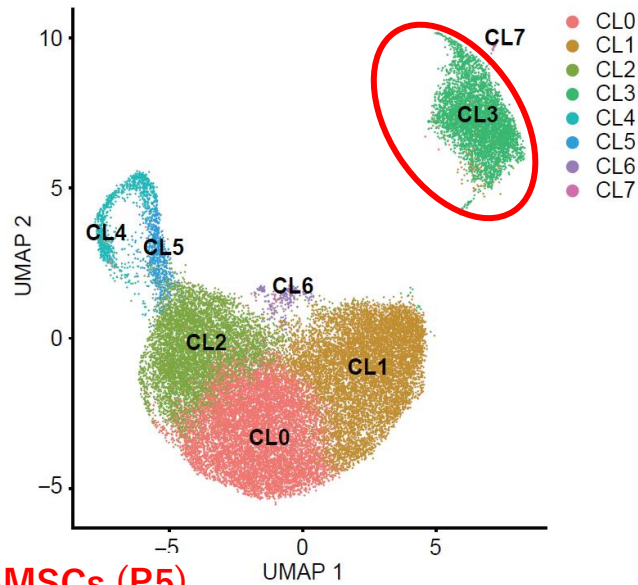


(縦軸)
虚血条件下でのVEGF分泌

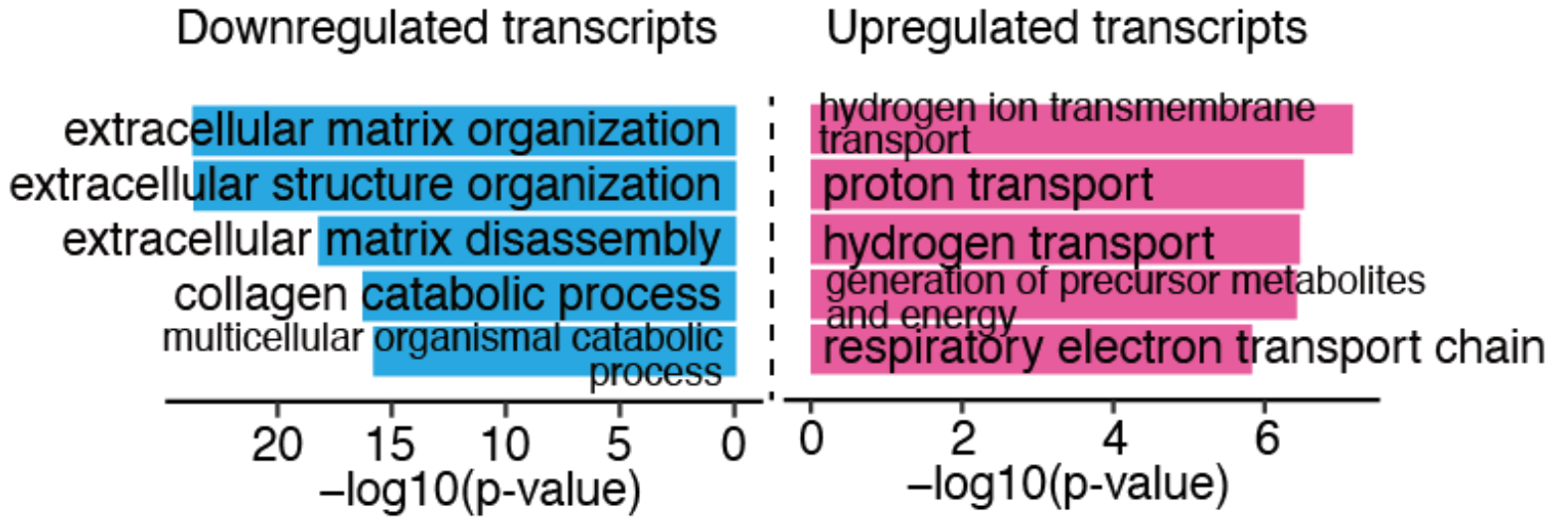
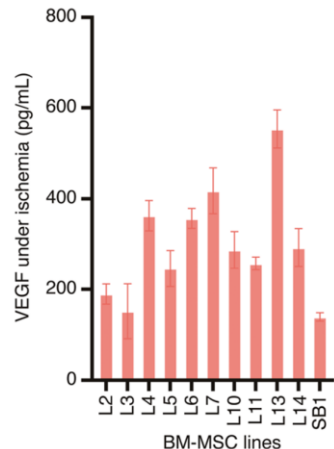
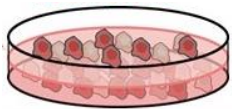
GO解析によるクラスター3の生物学的機能の推定

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

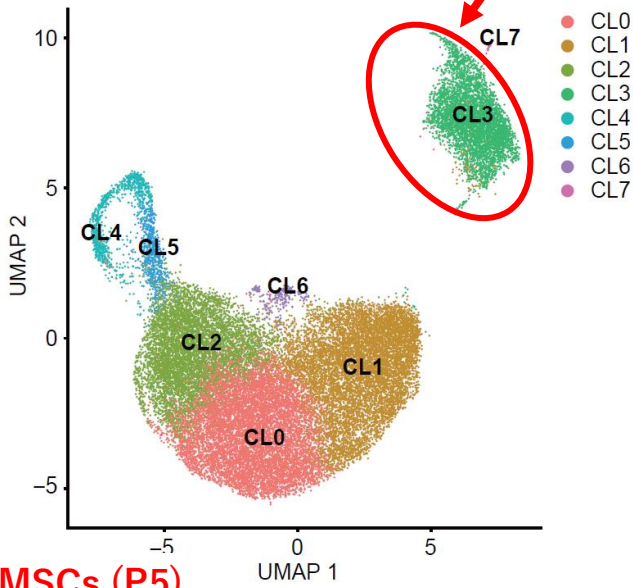
クラスター3は、高い遊走能を有し、ミトコンドリア機能が増強された（間葉系的な状態にある）細胞集団であることが示唆された

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

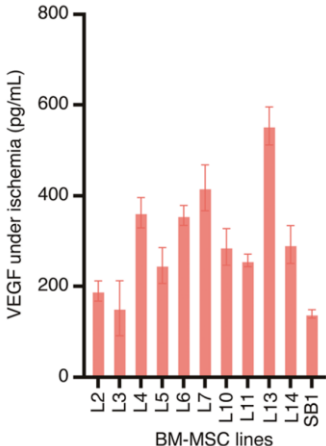
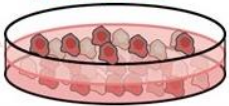
つまり、血管新生・VEGF分泌の再現性を期待するなら、
クラスター3の細胞集団を確保できるように製造する

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 (-)

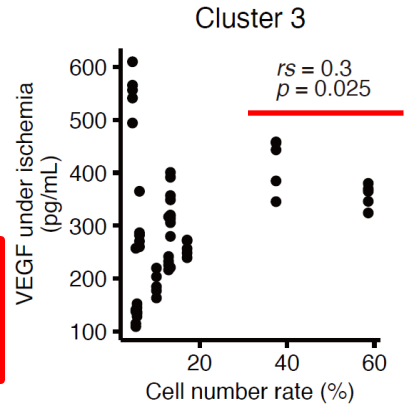
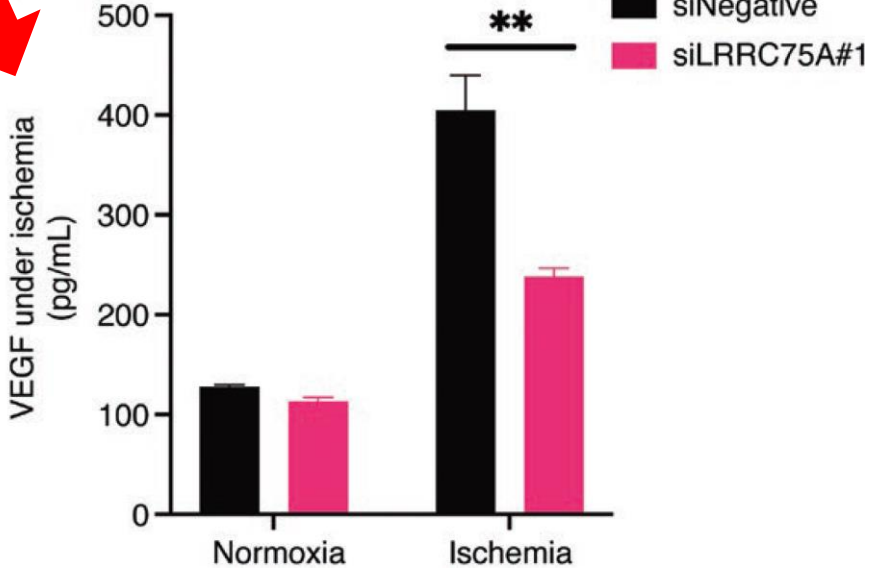


CL 3 で発現上昇している遺伝子
トップ20

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

隠れていたCQAs

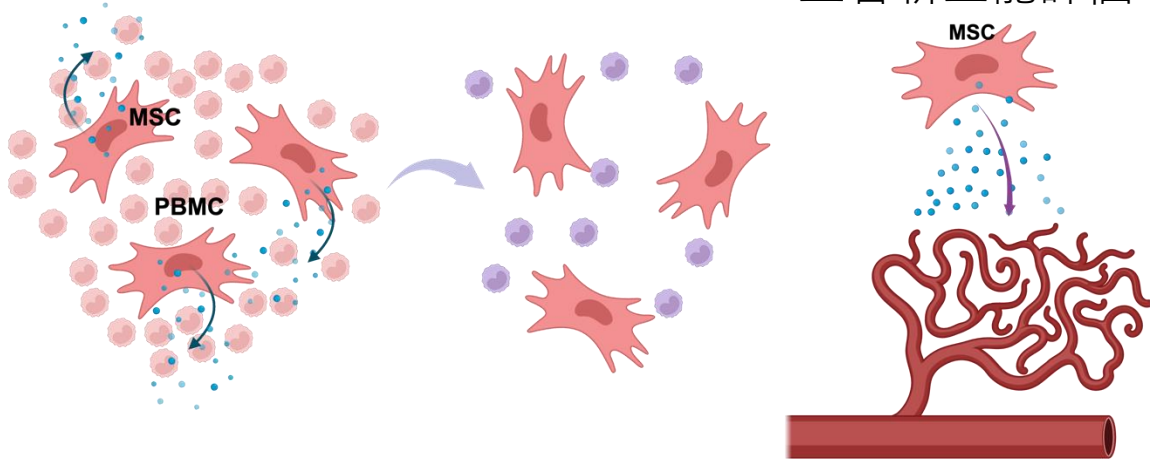
*LRRC75A*は虚血環境下の
VEGF分泌に生理的に寄与



ヒトMSCの有効性に関連する特性

免疫抑制能評価

血管新生能評価

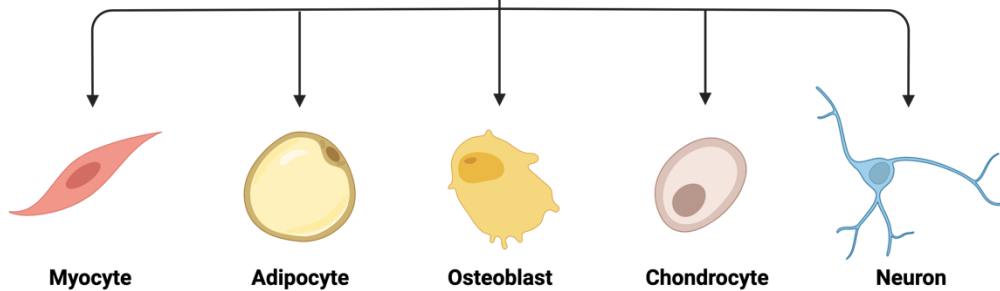


分化能評価

Mesenchymal stem cell (MSC)

Self renewal

Differentiation

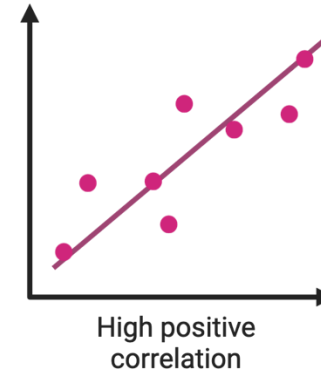


有効性を高い精度で評価可能なポテンシーアッセイの開発が必要

個々の細胞における遺伝子発現や細胞形態などの特徴をシングルセルレベルで解析

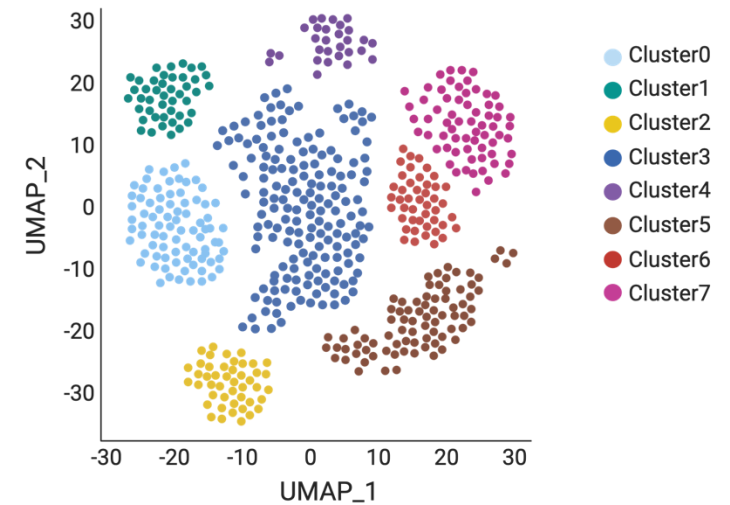
ロット間の機能
vs.
細胞集団内の各ロットの存在比

相関解析

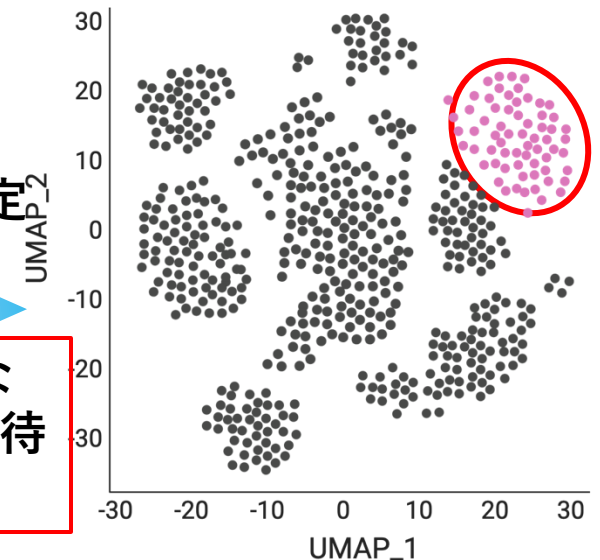


MSCの有効性に寄与する細胞集団および分子マーカーの特定が可能となる

ヒトMSC加工製品の潜在的な品質特性の同定への応用が期待される



細胞集団を正確に分類（不均一性の「見える化」）するためには、複数ロットのMSCが必要



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。

(Figure cartoons were generated using BioRender.com.)

ご清聴有り難うございました

