

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12711

研究課題名（和文）iPS細胞由来加工物の製造工程のリデザイン

研究課題名（英文）Redesign of the manufacturing process for iPS cell-derived processed products.

研究代表者

高柳 泰 (Takayanagi, Hiroshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：50578250

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では細胞加工物の製造にリスクマネジメントの考え方を取り入れて重要品質特性（CQA）を設定し、その値を管理しながら工程の改良を検討した。研究の進め方としては、CQA値をiPS細胞からの分化誘導効率（%）と規定し、CQA値測定を含む細胞純化工程を中心に工程全体を大きく3つに区分し、前後の工程を管理しながら各工程の改良を検証した。分化誘導培養は閉鎖系システムによる工数簡略化、細胞純化は無標識での細胞分取、シート作製では培養期間と細胞密度の管理による最終製品調製をそれぞれ検証し、適正なCQA値を保持したまま各改良が適用可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リスクマネジメントに基づく工程管理については、CQA値を軸として管理するスタイルが細胞加工物に対しても実際に適用可能であると示すことが出来た。工程の改良内容については、開始当初は蛍光標識の組合せ変更など既存手法での対応を想定していたが、検討の過程で無標識セルソーターや閉鎖系培養システムなど新規技術を取り入れることにつながった。これらの改良手法は、無標識セルソーターであれば生物由来原料不使用による感染持込および残留に起因するリスク解消、閉鎖系培養システムであれば製造作業負担の低減のみならず製造施設簡易化による大幅なコスト削減など、再生医療実用化に付随した課題解決策を提示することが出来た。

研究成果の概要（英文）：In this study, the concept of risk management was incorporated into the production of cell processed products, the Critical Quality Attributes (CQAs) were set, and process improvements were examined while controlling the values. The CQAs were defined as the efficiency of differentiation induction from iPS cells (%), and the entire process was divided into three major processes, with the cell purification process, including the measurement of CQA values, at the centre, and the improvement of each process was verified while controlling the processes before and after the purification process. The following improvements were verified: simplification of the number of steps by using the closed system for differentiation induction culture, labelled-free cell sorting for cell purification, and final product preparation by controlling the culture period and cell density for sheet production, respectively.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 iPS細胞 特定細胞加工物 製造工程 QbD セルソーター CQA

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

当研究室では iPS 細胞から眼組織全体の発生を再現する画期的な分化誘導方法を開発し、この技術を基盤として角膜上皮細胞シートを作製する工程を確立した¹。同技術については既に臨床応用段階に入っており、2019年より First-in-human 臨床研究（JRCT 認定番号:NA8140001）（図1.参照）を開始した。臨床

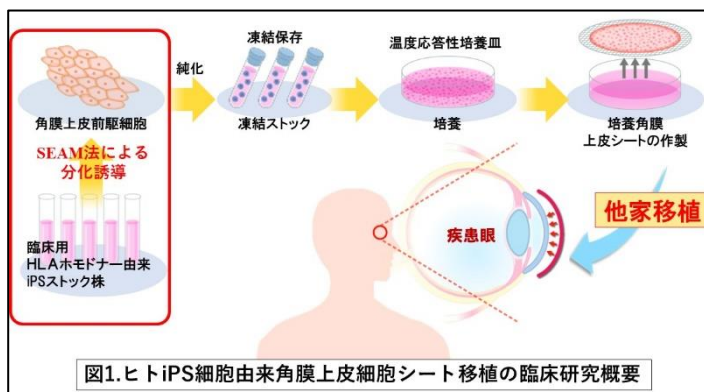


図1.ヒトiPS細胞由来角膜上皮細胞シート移植の臨床研究概要

研究における細胞培養加工施設での製造では、使用する細胞の継代数など条件を限定して分化誘導を行うことで効率的な細胞の純化・分取、および適切な品質の最終品を作製することができた。しかし今後の実用化を考慮すると、より効率的な製造工程に改良する必要があると考えられた。また近年、細胞を主原料とする製品の製造に対しても、医薬品製造のようにリスクマネジメントの観点を開発段階から取り入れる設計思想（QbD: Quality by Design）が推進されている。このような背景から、本研究においてリスクマネジメントの考え方を導入しつつ製造工程の改良を試みるに至った。

2. 研究の目的

医薬品の開発・製造においては研究段階から実用化を視野に入れ、効率化のためクリティカルな重要管理項目に着目した工程設計が行われるようになって来ている。本研究では医薬品製造の設計思想を細胞製品にも応用し、製造工程に影響を与える重要管理項目を考慮して製造工程を改良し、効率的な製造工程の確立を行うことを目的として実施することとした。本研究が対象とするヒト iPS 細胞由来角膜上皮細胞シートの製造においては分化誘導により形成された眼オルガノイドから目的とする角膜上皮細胞を分取・純化する工程が、製造効率や最終製品の品質に直結する最もクリティカルな工程である（図2.参照）と考えられたため、この細胞純化工程において測定される目的細胞の割合＝分化誘導効率を重要品質特性：CQAと規定して管理しながら、製造工程を見直すこととした。また、本品製造の重要工程である細胞分取の方法の改良も併せて検討することとした。

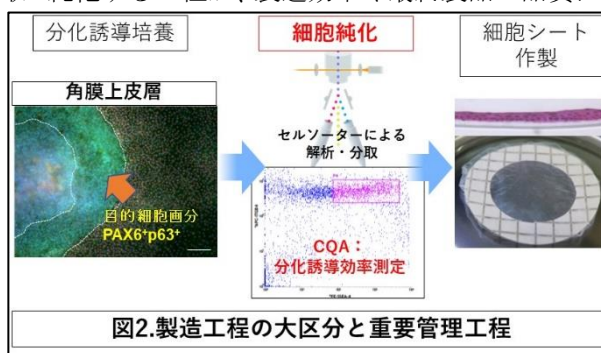


図2.製造工程の大区分と重要管理工程

3. 研究の方法

リスクマネジメントに基づき製造工程の改良を行う本研究の進め方として、判定基準と設定した重要品質特性：CQA＝分化誘導効率と、その測定を含む細胞純化工程を中心に据えて検討を進めることとした（図3.参照）。CQA 値の管理をすることでその前後の工程も含め、適用した手法が適正に機能するかを判定しながら、製造工程全体を主に3つに区分して各工程の改良を検討した。

1) 細胞純化工程について、管理の中心となる CQA を分化誘導効率＝目的細胞の割合として実測値を測定、取得する重要工程と位置づけた。CQA 値を測定し、それ以前の工程が適切に進行したかの判定を行うだけでなく、適正な CQA 値を得た中間体細胞のみをその後の工程に進めることで、最終製品の質を担保することにもつながる。この工程自体の改良として、当初は蛍光

標識の組合せの見直しを想定していたが、その検討過程において新たに無標識で細胞を識別、分取可能なセルソーター：ゴーストサイトメトリー（協力：シンクサイト株式会社）の適用検討を加えることとして、これを本製造に当てはめることの適切性を検証することとした。

2) 分化誘導工程については、iPS 細胞から本開発品を構成する角膜上皮型細胞を含む眼オルガノイドを形成する、本技術の基盤となる部分であり、約 3 カ月の長期培養を要し製造期間の大部分を占める工程でもある。本工程を細胞加工施設内で行うことは時間とコストを多量に要するため、予てより作業の簡略化、工数低減による負担軽減が望まれていた。今回の本研究では、事業化に向けた大きなコスト改善も見込める閉鎖式培養システム（協力：東京大学医学部附属病院ティッシュエンジニアリング部）について、新たに試行した。本試行の結果は、その後の細胞純化工程における CQA 値の測定により、その適不適を管理することとした。

3) CQA 値測定後となるシート作製工程については、適切な CQA 値を得た中間体の細胞のみを用いることで最終製品の質を確保することとなるが、製造ごとの微細な細胞増殖の差異等を緩衝、吸収して製造の安定性を向上させることを目標に、播種密度と無血清培養期間における細胞増殖度合いを管理項目として製造の進行調整を行い、最終製品の細胞密度を判定基準として適切性を検証した。

4. 研究成果

本研究開始当初、製造工程改良については、蛍光標識の組合せ変更など既存手法内での対応を想定していたが、検討の過程で下記のようにゴーストサイトメトリーや閉鎖系培養システムなどの新規技術を取り入れることに繋がり、細胞由来製品の実用化についてメリットの大きい改新を示すことが出来た。本研究で見出した可能性は更なる新規研究、実用化開発へ繋げていけるものとする。

1) 細胞純化工程について、CQA 値となる分化誘導効率を蛍光標識で測定管理した上で無標識セルソーティングを試行し、最終製品を作製、評価した（図 4.参照）。CQA 値に関しては、従来製造データより 10.0%以上を確保していれば、質量ともに適正な純化細胞を分取できることが掴めていたが、本試行においても 10.0%を超える値を示す検体を用い、該当細胞画分の細胞形態・構造データを取得した。取得データに基づき、改めて無標識での細胞純化を実際に行ったところ、最終製品の製造に充分量の細胞の分取に成功した。さらに純化細胞を用いて、製造工程を進め作製した最終製品を解析したところ、主として角膜上皮細胞から成る細胞加工物であることを確認した。本工程の改良内容については、

継続製造した場合の安定性等に未だ不透明な部分は残るものの、無標識での新規細胞純化手法が本開発品の製造にも適用可能であると示すことが

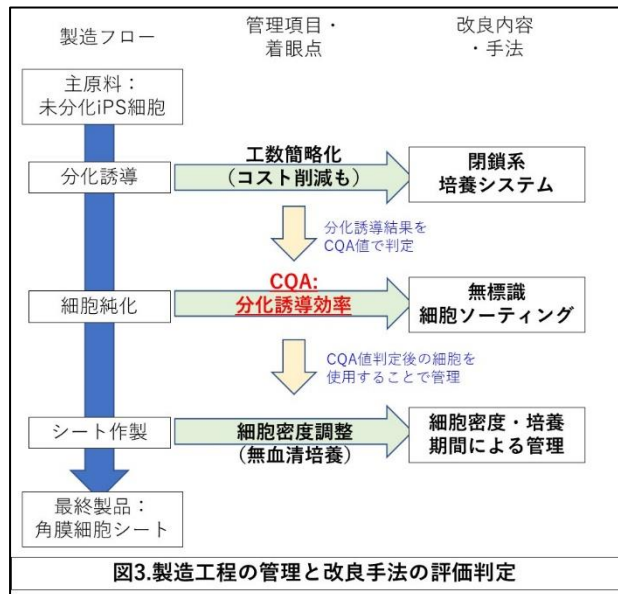


図3.製造工程の管理と改良手法の評価判定

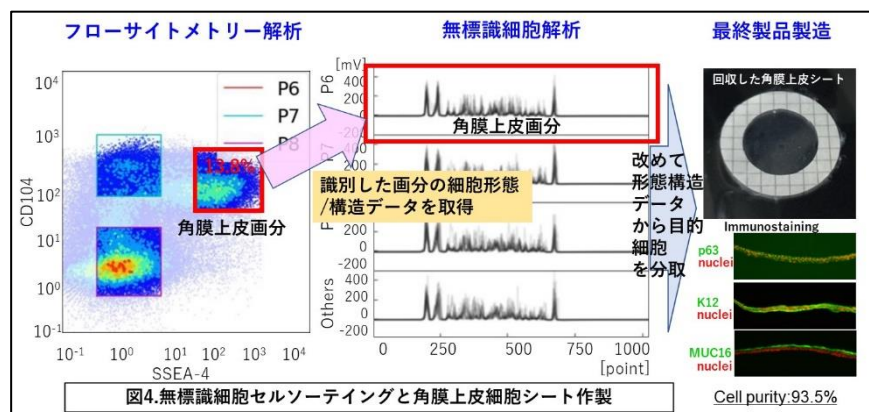
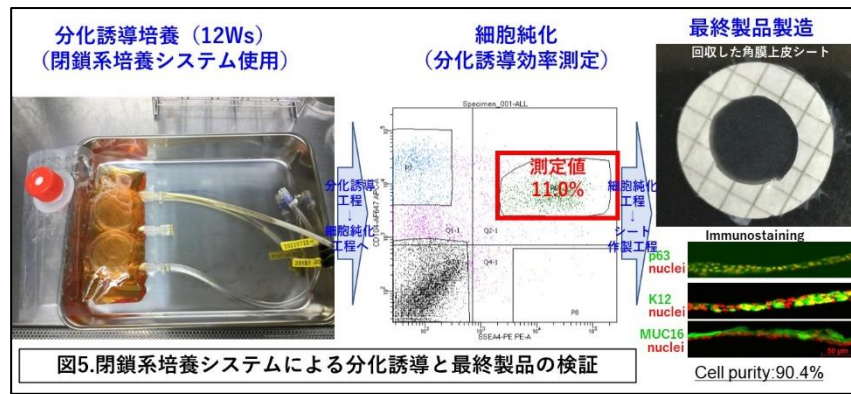


図4.無標識細胞セルソーティングと角膜上皮細胞シート作製

出来た。

2) 分化誘導工程については、閉鎖系培養システムの適用による、主として工程簡略化のための試行と検証を実施した(図5参照)。分化誘導工程については、CQA 値を取得する重要管理工程の細胞



純化より前の工程となるため、閉鎖系システムを用いた製造工程を実施し、その後に CQA 値を測定して改良手法の適否を判定することとした。12 週間に及ぶ分化誘導工程を経て得られたオルガノイドを細胞純化工程で解析し分化誘導効率=CQA 値を測定したところ、11.0%の適性値を得られた。そのため、その後の製造工程も進行させ、得られた最終製品について評価した結果、適切な品質を保持していることが確認出来た。本改良によって、分化誘導工程は培地交換作業の頻度が大幅に減少(1回/2-3日から1回/2-4週)したことで、特に長期に及ぶ製造工程の負担が大きく軽減すると考えられた。

3) シート作製工程では、前半に血清培養で細胞を増殖させたのち、後半で血清培養に切り替えて重層化による組織形成を促すことで、最終品である iPS 細胞由来角膜上皮細胞シートを作製することが出来る。細胞密度を工程内での管理項目と設定し、細胞培養実施による検証を行った。以前には一部で細胞密度の低すぎる細胞シートが出来るケースが認められたため、播種時の細胞密度と無血清培養期間を調整して、前半工程で適切な密度(confluent)まで細胞が増えた状態を確認したのちに血清培養に切り替えるという進行ルールへ変更したところ、適切な細胞密度を保持した細胞シートを安定して形成することが出来た。その際、血清培養期間が変動(3~7日間)しても、重層化した細胞シートを維持、形成出来ることも確認した。この検討段階で適正なシートとして作製したものをを用いることで、前臨床研究²における移植時の免疫特性評価試験を実施することが出来た。また、“1. 開発当初の背景”に前述した iPS 角膜上皮細胞シート移植の First-in-human 臨床研究(2019-2022)において実施した免疫特性評価試験は、本管理ルールに則り安定して作製、供給した一定品質の細胞シートを検体に用いることで評価を適正に遂行することが出来た。

以上のように本研究では、製造工程中に管理項目を設定してその管理値を元に適否判定を行い、製造を進行させることで最終品の質を確保するという思想に基づく工程の改良を、細胞加工物の製造を対象に実施し、その基礎となる作法を示すことが出来た。さらに各工程の改良として検証し適用可能性を示した新規技術については、今後特に大きな発展性が見込まれる。細胞純化工程の改良では全く新たに無標識での細胞分取技術に取り組み、特に新規性の高い改良要素を見出すことに成功した。当該技術は細胞加工物の製造への応用だけでなく、再生医療を含む基礎的研究として新たな分野への発展性も含むため、新規の研究として展開させることも検討中である。分化誘導培養の簡易化を目的に適用した閉鎖系培養システムについては、本研究で示したような工程簡易化だけでなく、閉鎖系システムであることを活用して細胞加工施設を簡略化することにこそ大きな意義があると考えられる。現在の再生医療等製品の製造コストの多くを占める施設設置・維持費が削減できれば再生医療の提供価格は劇的に下がり、世界へ発展、普及を急加速させることも可能となる。本研究での同システム試行の成功により、現在も日本が優位性を保つ iPS 細胞を用いた再生医療技術の普及、発展に利する開発に先鞭をつけることが出来た。

〈引用文献〉

1. Hayashi R *et al.* Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. *Nat Protoc.* 2017 Apr;12(4):683-696.
2. Yoshinaga Y *et al.* Long-term survival in non-human primates of stem cell-derived, MHC-unmatched corneal epithelial cell sheets. *Stem Cell Reports.* 2022;17(7):1714-29.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshinaga Y, Soma T, Azuma S, Maruyama K, Hashikawa Y, Katayama T, Sasamoto Y, Takayanagi H, Hosen N, Shiina T, Ogasawara K, Hayashi R, Nishida K.	4. 巻 17(7)
2. 論文標題 Long-term survival in non-human primates of stem cell-derived, MHC-unmatched corneal epithelial cell sheets.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports.	6. 最初と最後の頁 1714-1729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2022.05.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okawa Ryoma, Sogawa Koushirou, Shiozaki Motoko, Yachiku Kenji, Miura Takanori, Shibata Takashi, Ezoe Sachiko	4. 巻 21
2. 論文標題 The effects of continuous exposure to low-dose chlorine dioxide gas on the characteristics of induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 250 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.07.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高柳 泰
2. 発表標題 ddPCRシステムを用いた再生医療用細胞加工物の造腫瘍性評価と品質管理
3. 学会等名 パイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)ライフサイエンス Droplet Digital PCR Symposium 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片山朋彦, 高柳泰ら
2. 発表標題 角膜分化誘導効率に関与するヒト多能性幹細胞の特性についての評価
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高柳 泰
2. 発表標題 細胞加工物の製造における工程管理システムと手書き記録書の並行運用
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関