

サブテーマ名：CPC（細胞培養センター）を利用した血液・血管の再生研究

小テーマ名：トランスレーショナルリサーチに向けた細胞療法の基盤整備

テマリーダー：(財)先端医療振興財団、客員研究員、中畑 龍俊

研究従事者：(財)先端医療振興財団、客員研究員、前川 平

(財)先端医療振興財団、主任研究員、伊藤 仁也

(財)先端医療振興財団、主任研究員、田中 宏和

(財)先端医療振興財団、特別研究員、小林 典孝

(財)先端医療振興財団、特別研究員、鈴木 秀文

(財)先端医療振興財団、技術員、初山 麻子

(財)先端医療振興財団、技術員、丸山 京子

(財)先端医療振興財団、特別技術員、高田のぞみ

(財)先端医療振興財団、特別技術員、鹿村 真之

● 研究の概要

ヒト造血幹細胞の ex vivo 増幅は移植医療のみならず、遺伝子治療や血液細胞の製造などの再生医療にも貢献すると考えられる。我が国の臍帯血移植数は 2400 例を突破したが、依然生着不全などの合併症の頻度が高いのが現状である。移植の成功には輸注総細胞数よりも CD34 陽性細胞などより未分化な細胞をできるだけ多く移植することが、生着率のみならず生存率にまで寄与することが明らかになってきた。採取できる臍帯血量が限られる臍帯血移植に造血幹細胞増幅技術を応用することは理にかなった方法である。このように細胞を体外で加工するセルプロセッシングは GTP (Good tissue practice) に基づいて行わなければならない。基礎研究でのベンチ技術をそのまま臨床研究に用いる細胞プロセッシングに移行する試みは大変な時間と労力を有する。当研究グループでは臍帯血に含まれる CD34 陽性細胞をサイトカインで ex vivo に増幅し、免疫不全マウス中でヒト血液細胞を再構築できる能力が 4.3 倍優れていることを証明した。この基礎研究の成果を臍帯血移植に応用するため、地域結集共同研究事業において、GTP に基づいた細胞製造法の開発、増幅、加工された臍帯血の安全性、効果の評価、そしてセルプロセッシングセンターに代表される細胞治療製剤の作業環境の整備をテーマにトランスレーショナルリサーチを行っている。

1. フェーズ I

(1) 研究の目標

GMP に準拠した細胞治療製剤の製造法の確立を目標とした。細胞治療製剤における GMP とは製造の途中で混入する病原物質を防いだり、原材料に含まれるウイルスの混入を防ぎ、安全な製剤を製造するとともに製造毎に細胞の機能が一定な安定な製剤を製造するための基準である。我々は臍帯血に含まれる造血幹細胞を SCF (Stem cell factor), TPO (Thrombopoietin), FL (Flk-2/Flt-3 ligand), IL-6, 可溶性 IL-6 受容体を用いて ex vivo で増幅する基礎研究の成果をヒトに対する臍帯血移植に応用するトランスレーショナルリサーチを開始した。このための基盤整備として①GMP に準拠した製造法の確立、②品質管理法の確立、③安全な製造環境の構築、をテーマに分担して研究を行った。

(2) 実施内容

1) GMP に準拠した製造法の確立

基礎研究で得られた細胞培養の技術とヒトを対象とした臨床研究に応用するためのセルプロセッシングは実際には大きな隔りがある。培地の無血清化をはじめ、医薬品レベルの原材料の使用、Large scale での大量培養法の確立、操作に伴う細菌やウイルスの混入を防ぐための閉鎖系培養システムの開発などを確立する必要がある。我々は兵庫臍帯血バンクの協力により提供された臍帯血中より CD34 陽性細胞を分離して、Clinical grade の細胞培養法の検討を行った。

2) 品質管理法の確立

体外で培養した細胞の安全性については、細菌やウイルスの混入の有無、倍数体の形成や、染色体の転座などの構造異常、遺伝子異常の有無、がん化、生理活性物質の分泌能、アレルギー誘発性やアトピー反応など、生体に投与した際の影響を予測し、事前に検討する必要がある。わが国においては「細胞・組織を利用した医療用具または医薬品の品質および安全性の確保について（医薬品発第 906 号：1999 年 7 月 30 日）、「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する指針」（医薬発第 1314 号：2000 年 12 月 26 日）に必要な品質管理法の概要が示されており、我々はこれに従い安全性の検討を行い、前臨床試験としての安全性試験、品質管理試験法の開発を行った。

作業環境の構築（Cell Processing Center の整備）

CPC（Cell Processing Center）とはヒト細胞組織医薬品の製造および品質管理を行う施設であり、原材料受け入れから製品の出荷までの細胞加工の全ての工程をここで行う。先端医療センターでは FDA の GTP（Good Tissue Practice）Guideline、EU-GMP 規準など内外の文献学的考察と東京大学医科学研究所などで国内で先行した CPC の視察を行い、研究棟 5 階に細胞治療、再生医療に特化した臨床研究用 CPC を建築した。フェーズ I 研究においては、CPC の性能評価およびバリデーション法の開発、環境衛生試験法の開発を行い、ヒト細胞組織医薬品の製造施設として適当かどうかの評価を行った。また、環境衛生試験を施行し、作業員の入室手順、更衣、清掃法、作業人員数等の規準を定めた。

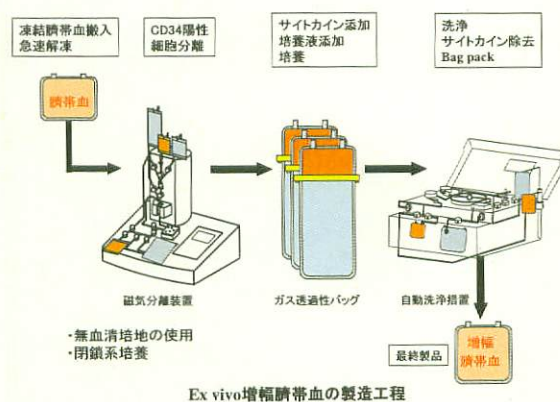
(3) 成 果

1) GMP に準拠した製造法の確立

無血清培養法の開発においては、FDA にて治験申請が行われている 3 種の培養液を比較検討を行った。

また閉鎖系培養系として同時に培養 bag や無菌細胞洗浄装置の開発も同時に行い、tube & bag 培養システムにて閉鎖系培養法を確率した。造血幹細胞の性質は自己複製能と分化能をともに持ち合わせていることが特徴である。造血幹細胞の ex vivo 増幅においては、増幅に伴い分化が進行してしまう難しさがある。基礎研究で得られた知見をもとに無血清、閉鎖培養系で Large scale における、造血幹細胞の機能的検討も行った。

この結果、造血幹細胞の ex vivo 増幅培養において分化を抑え、未熟性を保つ至適な細胞密度、サイトカイン濃度、至適培養日数が存在することがわかり、その結果総細胞数で約 100 倍、そのうち

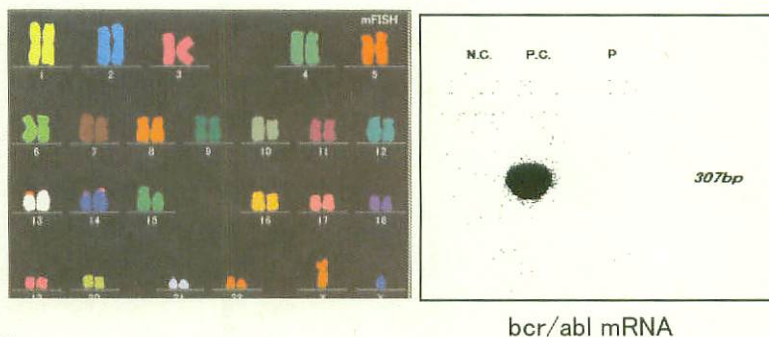


未熟性な細胞の指標となる CD34 陽性細胞の増幅率で約 30 倍、コロニー形成細胞数で約 50 倍増幅することに成功し、基本培養系を確立した。

2) 品質管理法の確立

前臨床試験としての安全性試験を行った。臍帯血 CD34 陽性細胞を 12 日間 Ex vivo 増幅させた細胞の形態、表面抗原の解析より芽球は 35.3%を占め CD34 陽性細胞は 43.9%であった。顆粒球、単球、赤芽球、巨核球前駆細胞は認められるが T 細胞、B 細胞などのリンパ球は出現していなかった。また増幅細胞における染色体異常は G バンド分染法、multi-color FISH 法を用いて解析した。分裂期の 30 細胞中に数的異常、構造異常ともに認めなかった。

臨床的に白血病の核型異常において頻度の高い 3 種類の白血病キメラ遺伝子の有無を RT-PCR で調べた結果、これらの遺伝子は検出されなかった。増幅培養細胞におけるサイトカイン産生能は、培養終了後の細胞を洗浄後、培養液中に 24 時間浮遊させた。浮遊液をウエス



タンプロット法により、79 種類のサイトカインについて半定量的に解析を行った。この結果、IL-1, INF- γ , SCF, SDF-1, NAP-2 を少量産生し、IL-8 産生能は比較的高いレベルで産生することを確認した。In vivo の安全性試験は NOD/SCID マウスに増幅した臍帯血を移植し、6 ヶ月間観察し、ヒト細胞の分布、炎症、腫瘍化などの病理所見を検討した。ヒト細胞は骨髄の他、リンパ節、肝臓、脾臓に分布したが炎症、腫瘍、変成などの所見は認められず一定の安全性を確認した。

3) 作業環境の構築 (Cell Processing Center の整備)

CPC ハードの整備においては、細胞処理を行う NASA Class10,000 のクリーンルームを 2 基配置し、原材料、資材保管室、製品保管室、前室および更衣室を設置した。クリーンルーム内は温湿度および室間圧差などがモニタリングされており、安全に細胞加工が行われるような環境が提供されるような設計になっている。また、各部屋の浮遊菌、付着菌、浮遊塵埃数を測定する環境衛生試験を行い、入室手洗い規準、更衣規準を定めた。さらには、クリーンアップ時の清掃法および定期清掃法を検査データに基づいて検討を行った。

2. フェーズ II

(1) 研究の目標

フェーズ I で確立した Clinical grade の細胞製造の方法を実際の臍帯血バンクに保存された臍帯血を用い、CPC で培養する実製造試験を通じて、標準作業手順書などの文書体系の整備、製品としての規格の設定を行い、臨床研究に耐えうる安全性と機能的安定性を持つ細胞製剤の製造法を完成させる。

(2) 実施内容

1) GMP に準拠した製造法の確立

平成 14 年までに確立した臍帯血幹細胞の閉鎖系無血清培養を CPC 内で培養し、製造工程の最終確認を行い、標準作業手順書等の文書を整備した。また実際に臍帯血バンクに保存されている凍結臍帯血を原材料として実製造試験を行い、臍帯血バンクネットワークのシステムを利用した ex vivo 増幅臍帯血移植の臨床研究が可能かどうかの検証を行った。

2) 品質管理法の確立

平成 14 年までに前臨床試験としての安全性の検証を行ってきたが、フェーズ II においては、製造毎の製品の安全性と機能評価を行う規格試験法を開発し、出荷基準を作成した。

3) 作業環境の構築 (Cell Processing Center の整備)

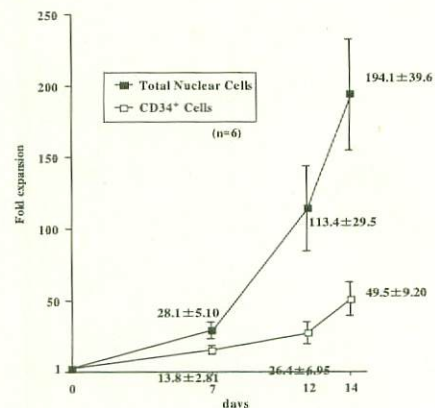
実製造の場において、環境衛生試験を実施し、作業中における塵埃数、浮遊菌数、付着菌数が基準を満たすものであるかどうかの検証を行った。

(3) 成 果

1) GMP に準拠した製造法の確立

現在臍帯血バンクで凍結保存された臍帯血 (New York Blood Bank system) を兵庫臍帯血バンク、東海臍帯血バンクより提供を受け試験を行った。臨床研究においては、提供された臍帯血の $2 \times 10^7/\text{kg}$ 相当にあたる量をそのまま移植し、残った単核球より CD34 陽性細胞に分離し、増幅培養を 12 日間行い患者に追加移植するプロトコルを作成した。

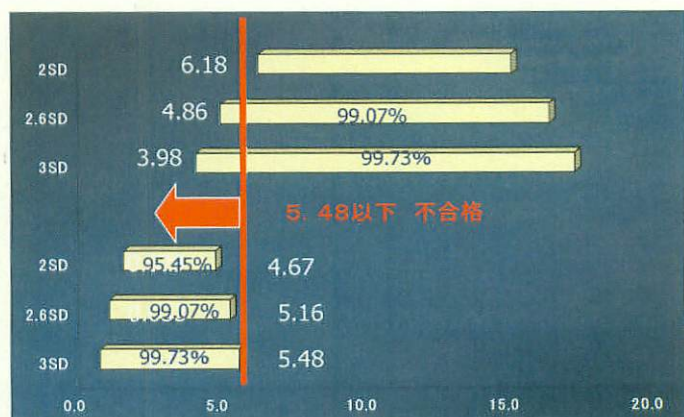
これに基づき、様々な単核球数の臍帯血を CPC 内で CD34 陽性細胞に分離し、培養を行った。上図のグラフのように、実製造レベルにおいても 12 日間で総細胞数が 113.4 ± 29.5 倍、CD34 陽性細胞で 26.4 ± 6.95 倍、コロニー形成細胞数で 72.9 ± 12.4 倍の増幅率を得ることを確認した。これにより実際の臍帯血バンクネットワークのシステムにのった臨床研究が可能であると判断された。



Ex vivo expansion with serum free medium by closed system

2) 品質管理法の確立

細胞治療製剤における品質管理法は通常の製剤のようにサンプリングした資料を統計学的処理した方法を用いられない。生きた細胞を原材料として用いるため、個体差が生じたり、滅菌操作ができない理由から品質を管理し、保証するためには当然全数検査になる。我々は毎製造毎に規格試験を行い、出荷合格基準を定めた。



原材料受け入れ試験は、臍帯血の総細胞数、CD34 陽性細胞絶対数の規格を設け、セルプロセッシングに最低必要な細胞数の確保を行うとともにウイルス否定試験 (HBV, HCV, HIV-1, HIV-2, HTLV-1, Parvo virus B19) を Multiplex PCR 法にて迅速診断する方法を開発した。さらに臍帯血以外の原材料受け入れは培地に関しては Daudi 細胞株の増殖活性を ATP アッセイを用いて間接的に性能評価する系を作成した。

また、出荷時検査には無菌試験は細菌培養を行うため、出荷時までには判定できないため、マイコプラズマ否定試験、 β -D-グルカン試験、エンドトキシン試験を迅速に行う系を開発し、最終製品を6時間以内で出荷判定を行うことが可能となった。

3) 作業環境の構築 (Cell Processing Center の整備)

フェーズ II 研究においては、CPC ソフトの開発を中心に行った。具体的には製造における製造組織、作業員教育マニュアルの作成と GMP 文書体系を整備した。

文書体系の整備においては、いわゆる3管理基準書 (製造管理基準書、品質管理基準書、製造環境管理基準書) と1標準書 (製品標準書) を作成し、製造部門と品質管理部門に分け、それぞれ標準作業手順書を作成した。

標準作業手順書は、製造操作手順書、機器操作手順書、品質管理検査手順書に分類した。また標準作業手順書に沿った形で指図書、記録書を作成し、製造、検査はそれぞれ2名の作業員によるダブルチェック体制を構築し、人為的ミスを防ぐようにしている。

また作業環境の確保では、細胞操作室、安全キャビネット、CO₂ インキュベータの清掃、消毒法を環境衛生試験に基づいて定め、作業モニタリングにおいて浮遊塵埃、付着菌、浮遊菌は規格内に収まるようになり、一定の製造技術を身につけることができた。



3. 今後の展望

本事業にて一定の製造技術、品質管理技術、作業環境の確保が担保されたと考えられ、平成 18 年より『急性白血病に対する同種臍帯血由来 Ex vivo CD34 陽性細胞移植に関する臨床第 I 相/前期第 II 相試験』を開始する予定である。また、ex vivo 増幅した臍帯血を用いた臨床研究をさらに進めて医薬品化すべく確認申請していく予定である。

さらに、セルプロセッシングに必要な機器、デバイスの開発を推し進め細胞治療製剤、再生医療の基盤整備を今後とも推進していく予定である。