

平成26年度厚生労働科学研究委託費

再生医療実用化研究事業

無血清培養法により製造した同種滑膜間葉系幹細胞由来

三次元人工組織の薬事承認申請に資する非臨床試験

成果報告書

研究代表者 名井 陽

平成27年(2015年)3月

本報告書は、厚生労働省の科学研究委託事業による委託業務として、大阪大学が実施した平成26年度「無血清培養法により製造した同種滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織の薬事承認申請に資する非臨床試験(26220201)」の成果を取りまとめたものです。

平成26年度厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）
企業の協力を得ながらプロトコルを組む治験又は非臨床試験
（ 2 6 2 2 0 2 0 1 ）

「無血清培養法により製造した同種滑膜間葉系幹細胞由来
三次元人工組織の薬事承認申請に資する非臨床試験」
成果報告書

名井 陽

大阪大学医学部附属病院未来医療開発部

未来医療センター・准教授/副センター長

吉川 秀樹

大阪大学大学院医学系研究科 整形外科学・教授

中村 憲正

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター・招へい教授

辻 紘一郎

株式会社ツーセル・取締役

目次

・研究組織

研究組織の構成	1
---------------	---

・総括研究報告

研究要旨	2
------------	---

1. 研究の目的	2
----------------	---

2. 研究の実施計画	3
------------------	---

適正な手続きで入手した滑膜由来間葉系幹細胞の無血清培養技術の開発・評価	3
---	---

gMSC の作成、品質管理、非臨床試験の実施	3
------------------------------	---

滑膜 MSC の安定性の検討・各種組織構成細胞への分化誘導の検討	3
--	---

3. 研究の実施内容	4
------------------	---

適正な手続きで入手した滑膜由来間葉系幹細胞の無血清培養技術の開発・評価	4
---	---

gMSC の作成、品質管理、非臨床試験の実施	6
------------------------------	---

滑膜 MSC の安定性の検討・各種組織構成細胞への分化誘導の検討	6
--	---

4. 研究の実施結果と考察、今後の課題	7
---------------------------	---

適正な手続きで入手した滑膜由来間葉系幹細胞の無血清培養技術の開発・評価	7
---	---

gMSC の作成、品質管理、非臨床試験の実施	16
------------------------------	----

滑膜 MSC の安定性の検討・各種組織構成細胞への分化誘導の検討	16
--	----

5. まとめ	19
--------------	----

・添付資料

gMSC のウサギ膝関節腔内埋植による埋植試験の予備試験 最終報告書	20
--	----

研究組織の構成

区分	研究者名	所属研究機関	職名
研究代表者	名井 陽	大阪大学医学部附属病院未来医療開発部未来医療センター	准教授・副センター長
研究分担者	吉川 秀樹	大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学（整形外科）	教授
研究分担者	中村 憲正	大阪大学臨床医工学融合研究教育センター	招へい教授
研究分担者	辻 紘一郎	株式会社ツーセル	取締役

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）

「無血清培養法により製造した同種滑膜間葉系幹細胞由来
三次元人工組織の薬事承認申請に資する非臨床試験」

総括研究報告書

研究代表者 名井 陽 大阪大学医学部附属病院 准教授

【研究要旨】

我々は滑膜由来の間葉系幹細胞（以下、MSC）を培養し、立体的な構造をとらせたスキャフォールドフリー三次元人工組織（以下TEC）を作製し、動物実験において関節軟骨損傷の治療に有効であることを示し、現在、TECによる関節軟骨損傷治療法についての臨床研究を実施中である。今後、本技術の実用化を目指すに当たり、同種の滑膜由来MSCを用いた軟骨損傷治療法の治験の実施に向けて、大阪大学整形外科、同附属病院未来医療センター、株式会社ツーセルは協力体制を構築し、同社らが開発した新規無血清培地を利用した高品質な同種滑膜由来MSCを用いたTEC（以下、gMSC）の非臨床試験を実施した。また、この非臨床試験を実施するに当たり、PMDAとの相談で確立された「本品の原料である細胞ソース（滑膜細胞）の入手手続きと管理体制」をもとに、大阪大学医学部附属病院における滑膜組織の入手方法の確立、CPCを利用したGMP準拠MSC樹立法および品質管理法の確立、幹細胞バンクの設置、運用手順の確立を経て、細胞を非臨床試験に提供した。本研究では、5名の関節鏡手術患者から同意が得られてドナースクリーニングを実施し、3名から滑膜を入手して、滑膜MSC3株を樹立した。3株について無菌試験、マイコプラズマ試験、エンドトキシン試験、細胞数、生存率、細胞純度試験（FACS）、ウイルス試験を含む品質検査、規格検査を実施した。その内1株はサイトメガロウイルス抗体擬陽性との判定であったため、動物における安全性試験の対象から除外した。局所刺激性および全身毒性に関する安全性試験は、ウサギを用いた膝関節内埋植予備試験を実施し、移植部位以外に大きな影響は見られないことを確認した。滑膜由来MSCの分化誘導能については、骨、軟骨、脂肪への分化能を予備的に確認した。

1. 研究の目的

我々は滑膜由来の間葉系幹細胞（以下、MSC）を培養し、立体的な構造をとらせたスキャフォールドフリー三次元人工組織（以下TEC）による関節軟骨損傷治療法の実用化を目指して臨床研究を実施中（関節軟骨病変に対する自己滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織移植法）である。当該臨床研究は、自己滑膜MSCを有血清培地にて培養しているが、株式会社ツーセルらが開発した新規無血清培地の技術を応用して、この滑膜MSCを

自己から同種に変更し、無血清培地で培養することで、均一で高品質の同種滑膜由来のTEC（以下、gMSC）を開発し、企業での製品化を通じて、実用化を目指している。

本委託業務では、同種滑膜由来MSCを用いた再生医療技術を確立するために、PMDAとの相談で確立された「本品の原料である細胞ソース（滑膜細胞）の入手手続きと管理体制」をもとに滑膜組織より樹立させたMSCをバンク化させ、その細胞を用いて非臨床試験を実施し、その安全性、有効性を検討することを目的とする。

このうち、大阪大学ではプロジェクトの総合的推進及びドナーの選定と滑膜の採取、MSC培養およびバンク化に関わる技術開発、非臨床試験の実施を、株式会社ツーセルでは、MSC培養およびバンク化に関わる技術開発、gMSCの作成、品質管理、非臨床試験の実施を行う。

2. 研究の実施計画

適正な手続きで入手した滑膜由来間葉系幹細胞の無血清培養技術の開発・評価

a. プロジェクトの総合推進

実施中の自己滑膜由来細胞を用いた臨床研究で得た知見を生かしつつ、滑膜MSCを自己から同種に、培養方法を有血清培地から無血清培地での培養に変更する。大阪大学と株式会社ツーセルは本委託業務を含む実用化プロジェクト全体に関して、その方法、進捗、体制などについて、密接な協議を行いながら遅滞なく推進する。また、薬事に関しては必要に応じ、PMDA等の相談を利用して適切な対応を行う。

b. ドナーの選定と滑膜の採取、MSC培養およびバンク化に関わる技術開発・評価

将来の商用利用のためのマスターセルバンクを構築する際に想定しているドナーの基準に適合する患者に対して、非臨床研究目的での利用に関するインフォームドコンセントを取得し、本院の整形外科で実施される膝関節手術で採取された余剰の滑膜組織からMSCを分離し、無血清培地を用いて大量に培養増幅し、バンクとして保存する。この際、バンク化に至るまでの工程のフィージビリティについて検討する。また、将来想定している工程内検査を実施し、細胞の品質に関するデータを蓄積する。さらに、間葉系幹細胞の多方面における移植・再生医療分野への応用実用化に資するため、「ヒト滑膜由来間葉系幹細胞」を学内外の研究者にも供するバンキングの体制を整える。

gMSCの作成、品質管理、非臨床試験の実施

滑膜MSCを、無血清培地を用いて増幅培養した後、さらに無血清培地を用いて高密度培養を行うことで、自らの細胞とマトリックスのみで構成される三次元人工組織、gMSCを作製する。得られた滑膜MSCまたはgMSCを用いて、核型分析試験、軟寒天コロニー形成試験、ウサギを用いた埋植試験、免疫不全マウスを用いた造腫瘍試験を実施し、非臨床の安全性評価を行う。

滑膜MSCの安定性の検討・各種組織構成細胞への分化誘導の検討

a . 滑膜MSCの安定性の検討

長期凍結保存することにより細胞の品質が変化しないかを検討するため、一定期間保存した滑膜MSCを溶解して再培養し、細胞形態、細胞倍加時間、生細胞率、gMSC作成可能性等を評価する。

b . 各種組織構成細胞への分化誘導法の検討確立

骨髄由来間葉系幹細胞等で確立されてきた特定組織（骨、軟骨、靭帯、神経、皮膚、血管、脂肪、結合組織等）構成細胞への分化誘導法がヒト滑膜MSCに応用可能かを評価する。必要に応じ埋植試験等の動物実験を行って分化誘導の評価を行う。

3 . 研究の実施内容

適正な手続きで入手した滑膜由来間葉系幹細胞の無血清培養技術の開発・評価

a . プロジェクトの総合推進

実施中の自己滑膜由来細胞を用いた臨床研究で得た知見を生かしつつ、滑膜MSCを自己から同種に、培養方法を有血清培地から無血清培地での培養に変更した。以下詳細を述べる。

大阪大学医学部医学倫理委員会の承認のもと、本院の整形外科で膝の手術予定のある患者から各種非臨床試験に資する滑膜組織を入手し、未来医療センター細胞培養加工施設（CPC）で滑膜組織からMSCを樹立、増幅培養を行い、最終製品であるgMSCの作製を試みた。一連の作業を通じて、ドナースクリーニング、同種移植を前提とした適切な生体組織採取手順の確認、gMSC製造のための品質管理試験、安全性試験を行い、治験実施までに必要な各種データを取得し総合的な評価の資料とした。また、将来的に未来医療センターCPCを治験薬製造施設として予定しているため、GCTP省令（治験薬GMP）に則って実施できるかPMDAによる調査も行った。

製造の過程で得られたMSCの一部については将来の商用利用を目指したマスターセルバンクとして凍結保存し、今後大阪大学主体で実施予定の臨床用グレードのMSCバンク事業創設に向けた基礎的なデータの一部として学内研究者への譲渡を開始し、軟骨損傷以外の疾患への適応に向けた基礎研究に資した。

大阪大学と株式会社ツーセルは本委託業務を含む実用化プロジェクト全体に関して、その方法、進捗、体制などについて、密接な協議を行った。以下詳細を述べる。

大阪大学（医師、治験コーディネーター、研究員）、及び株式会社ツーセル（研究員）間で品質、安全性の確保、倫理的妥当性について検証を重ね、試験全体の流れを確認した。また本試験においては本院の整形外科で実施中の臨床研究の関係者が多く含まれているため、既の実績が豊富であるが、自己から同種、培地の相違、ヒト幹指針による臨床研究から治験のためのデータ取得といった変更点も多いの

で、その点を重点的に見直した。

定期的に製造、品質管理試験、手順に関する報告、相談、修正を行い治験に向けた連携体制を確立した。確立後、未来医療センター内で株式会社ツーセルが行う再生医療製品製造をモデルケースとしてPMDAによる訪問確認（2015/1/28-1/30）を受けた。

b. ドナーの選定と滑膜の採取、MSC培養およびバンク化に関わる技術開発・評価

将来の商用利用のためのマスターセルバンクを構築する際に想定しているドナーの基準に適合する患者に対して、本院の整形外科で実施される膝関節手術で採取された余剰の滑膜組織からMSCを分離し、無血清培地を用いて大量に培養増幅し、バンクとして保存した。

保存したMSCの培養は、株式会社ツーセルが開発した無血清培地を用いたことから、無血清培地によるMSC樹立、増幅技術については株式会社ツーセルの技術を基盤とした。一方、バンク化の運営主体は大阪大学とし、MSCバンク化に必要な技術の移管・共有を大阪大学と株式会社ツーセルの両者で行った。また、マスターセルバンク構築に必要な細胞保存室をCPCエリア内に導入し、品質維持、不測の事態への対応を目的とした24時間体制のモニタリング環境、非常時のバックアップ用機材を設置した。

この際、バンク化に至るまでの工程のフィージビリティについて検討した。また、将来想定している工程内検査を実施し、細胞の品質に関するデータを蓄積した。

具体的には、マスターセルバンクとして凍結保存する細胞の培養工程内検査について、試験項目及び暫定的な規格値を設定し、工程毎に試験を行った。組織から得られた細胞のバンク化までの増殖能、感染症検査、MSCとしての純度試験、軟骨分化能の試験を実施した。また、中間製品から大量に増幅培養し、高密度播種して作製したgMSCの湿重量、細胞数、生存率、MSCとしての純度試験、最終製品時点での感染症検査に関しても試験を実施した。

研究目的の幹細胞バンクとして、大阪大学内の研究者に非臨床試験目的で細胞を供給する体制の整備を併せて行った。バンク細胞の提供にあたり、共同研究者に対してMSCバンキングの主旨及び提供方法等について説明会を行った。提供依頼者は、匿名化したドナー情報リスト（年齢、性別、継代数等）から希望のロットを選択し、インフォームドコンセントの取得内容に則する研究計画書等必要書類の提出を行うなどの手続き及び書式を決定し、運用を開始した。未来医療センターは研究目的等を確認後、順次、MSCの配布を行っている。また、細胞培養時の技術相談等を受ける体制を整えた。

gMSCの作成、品質管理、非臨床試験の実施

滑膜MSCを、無血清培地を用いて増幅培養した後、さらに無血清培地を用いて高密度培養を行うことで、自らの細胞とマトリックスのみで構成される三次元人工組織、gMSCを作製する。得られた滑膜MSCまたはgMSCを用いて、ウサギを用いた埋植試験(予備試験)を以下の通り実施した。(予備試験実施報告書添付)

被験物質：細切したgMSC あるいは細切したDiI-gMSC を注射筒1本あたりに0.25 g充填し、試験実施試験に送付。埋植量は0.25 g/片膝とした。

生存率：移植時に品質管理用のサンプルを用いて被験物質の生存率を3回測定したところ、それぞれ84.6%、84.6%、83.9%であった。

対照物質：ヒアルロン酸製剤を注射筒1本あたりに0.25 g充填し、試験実施施設に送付。埋植量は0.25 g/片膝とした。

なお、核型分析試験、軟寒天コロニー形成試験、ウサギを用いた埋植試験(本試験)については、PMDAの訪問確認による助言を精査検討の上、施設や書類の体制を充実させたいという実施が適当であると判断した。

滑膜MSCの安定性の検討・各種組織構成細胞への分化誘導の検討

a. 滑膜MSCの安定性の検討

長期凍結保存することにより細胞の品質が変化しないかを検討するため、一定期間保存した滑膜MSCを溶解して再培養し、細胞形態、細胞倍加時間、生細胞率、gMSC作成可能性等を評価した。

具体的には、P3で 8×10^6 cells/vialでSTEM-CELLBANKER®(タカラバイオ社、CB041)を用いて凍結保存した滑膜MSCの凍結直後、保存後3カ月、6カ月、12カ月、24カ月、(随時延長)という期間で融解培養し、融解時の細胞数、生存率及びその後の増殖率や作製したgMSCの品質検査を実施することで、どの程度の期間安定性を保つか検討した。

b. 各種組織構成細胞への分化誘導法の検討確立

骨髄由来間葉系幹細胞等で確立されてきた特定組織(骨、軟骨、靭帯、神経、皮膚、血管、脂肪、結合組織等)構成細胞への分化誘導法がヒト滑膜MSCに応用可能かを評価する。本年度は、細胞バンク樹立から、分化誘導法の検討を実施するまでの時間が限られていたため、骨、脂肪、軟骨組織への分化誘導能の検討を実施した。

骨芽細胞分化誘導および評価は、数種類の方法を平行して実施した。1) 無血

滑膜の骨分化誘導培地 STK3 (DSファーマ、KBDSTC103) を用い、滑膜 MSC を 5,000cells/cm² で 24 wellプレートに播種しコンフルエントまで増殖させた後に、無血清骨分化誘導培地 STK3 にて 21 日間培養を行った。培地交換は 2 ~ 3 日毎に行った。評価は Alizarin red (Sigma、40-1009-5-500ML-J) 染色法を用いた。2) 通常の DMEM (血清添加なし) または MSC 増殖用無血清培地 STK2 に骨分化誘導因子である Dexamethasone (wako) 100nM 、 Ascorbic acid (SIGMA) 50 μ M 、 -glycerophosphate (SIGMA) 10mM を添加した培地、さらにこれらに 1% ITS-A (wako) または BMP-2 (オステオファーマ) 200ng/ml を加えた効果も検討した。

軟骨への分化誘導に関しては、STK2 で培養した滑膜 MSC をアスコルビン酸を添加した培地で高密度培養し、シート状の組織 (gMSC) を作製した後に、DMEM (血清添加なし) に 1 % ITS、0.2mM アスコルビン酸を加えた培地に BMP2 : 200ng/ml、TGF β 3 : 10ng/ml、BMP2+TGF β 3、BMP2 で数日間分化誘導後に BMP2+TGF β 3 へ変更 (期間により 3 群設定) を加えた培地で 3 週間培養を行った。

4 . 研究の実施結果と考察、今後の課題

適正な手続きで入手した滑膜由来間葉系幹細胞の無血清培養技術の開発・評価

a . プロジェクトの総合推進

実施中の自己滑膜由来細胞を用いた臨床研究で得た知見を生かしつつ、滑膜 MSC を自己から同種に、培養方法を有血清培地から無血清培地での培養に変更した。

本院の整形外科で膝の手術予定の 5 名のドナー候補から試験参加の同意を取得し、全ての患者に対して、スクリーニングのため血液検査を行った。この試験は GLP グレードで行い、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、エイズウイルス、ヒト T 細胞白血病ウイルス、パルボウイルス B19、サイトメガロウイルス、EB ウイルス、梅毒、マイコプラズマ合計 9 項目全て外注した。その結果、5 例中 1 例でサイトメガロウイルス偽陽性のドナーが見つかった。サイトメガロウイルスは日本人の 60 ~ 90% が既感染であると言われており、通常は潜伏感染状態であるため陽性にはならないが、たびたび再活性化し、陽性反応が起こると言われている。今回は培養データ取得のため、この 1 例についても受け入れ、CPC 内で培養を行ったが、安全性試験については信頼性の観点から全ての項目で陰性となった別ドナーの細胞を用いた。また別の 1 例では余剰組織がなく、試験を中止し、もう 1 例では連絡の行き違いで採取が行われなかった。以下の表に滑膜組織に入手状況をまとめた。

表1 滑膜組織に入手状況

コード番号	採取可否	採取中止理由	備考
MB01-001			安全性試験に使用
MB01-002	×	余剰組織無し	
MB01-003			サイトメガロウイルス偽陽性のため培養のみ実施
MB01-004			
MB01-005	×	連係ミス	

組織採取を行った3例についてはウインドウピリオド後を考慮して3ヵ月後以降の外來受診日にスクリーニング時と同様の検査を行った。その結果、スクリーニング時と同じ判定結果になった。すなわちスクリーニング時検査をすり抜けた偽陰性のウイルスはなかったことが示唆された。

本院の整形外科で膝手術の患者から約500 mgの滑膜組織を採取後、輸送専用バックに入れて速やかにCPC内に搬送し、培養作業に取り掛かった。培養では全ての工程に対し、標準操作手順書(SOP)を準備して各操作に間違いが生じないようにダブルチェック体制を取って行った。株式会社ツーセルらが開発した生物由来原料基準に準拠した臨床用グレードの無血清培地STK1(臨床用)、及びSTK2(臨床用)を用いて継代回数5回(P0~P5)までの細胞数、生存率を下記の図1にまとめた。その結果、3例とも培養後期でも増殖能の低下は現れず、継代数によらず100%近い高い生存率を示した。今回の結果から鑑みて、最終製品であるgMSCを一個作製するのに 6.0×10^7 個の細胞が必要であることから算出すると1ドナー(約500 mg)の滑膜組織から1万個から10万個のgMSCを作製できることが明らかとなった。また、無血清培地STK1(臨床用)、及びSTK2(臨床用)も本試験に十分適用できる培地であることも分かり、安全で高品質な細胞を用意できることが示唆された。

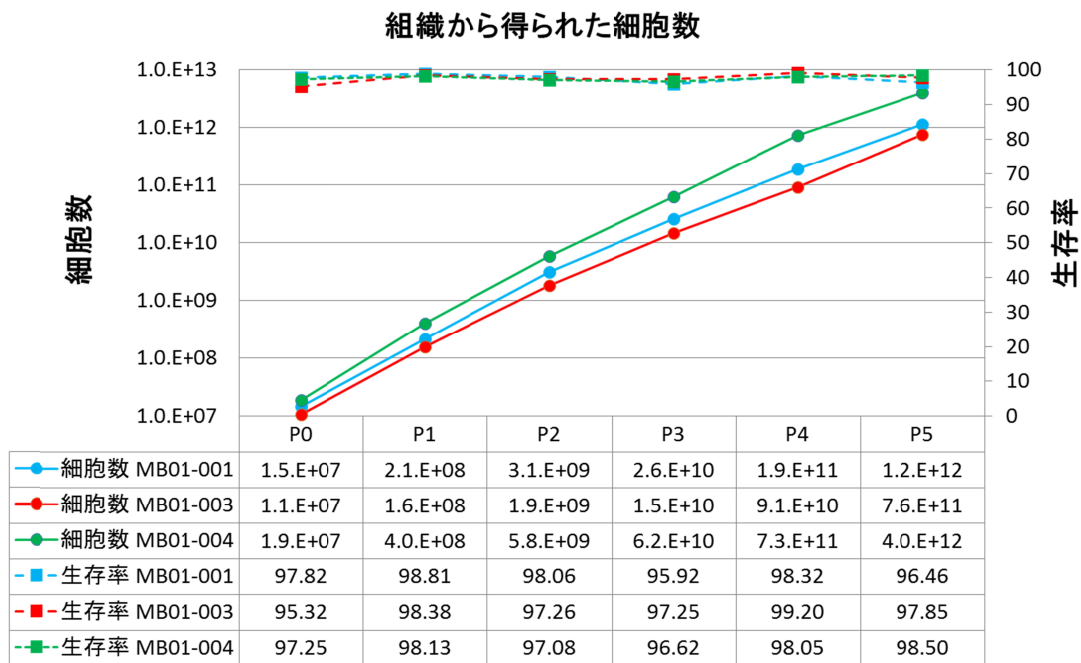


図1 提供された組織から得られた細胞数と生存率

大阪大学と株式会社ツーセルは本委託業務を含む実用化プロジェクト全体に関して、その方法、進捗、体制などについて、密接な協議を行い、遅滞なく推進できた。

医師、コーディネーター、看護師、研究者など立場の異なる関係者がお互いの知識、経験を持ち寄って体制を構築していくことは試験推進のためには非常に重要である。本試験においても、研究代表者の指揮のもと患者のリクルートからウインドウピリオド後の採血検査に関しては、医療関係者である医師、コーディネーター、看護師の3者間で紙媒体、電子カルテ等を用いて厳密な情報管理のもと共有できる体制を取り、培養や安全性試験は、医師、研究者とデータの情報共有を行った。医療行為と再生医療等製品製造の間の連携は特に盲点となりやすい点が多く存在し、製品の安全性や質の担保のため多くの議論を費やした。

また、薬事面に関して、PMDAによる訪問確認（2015/1/28-1/30）を受け表2に記載した13項目の助言を頂いた。本件に関する、最終的な報告は3月中に当局より文書通知を受ける事となっている。

表2 PMDAの訪問確認時の助言一覧

1	工程内管理試験に関するバリデーション（品質管理室）及び施設、機器、試験法に関するバリデーションの体制の整備する事。設備を共用する場合のルール作りとその遵守の徹底する事。
2	外部試験委託先の選定においては、試験法バリデーションを実施して、試験方法等の査察も実施。委託先との相互にサンプルの受け渡し等の取り決め、手順を確認しあう事。
3	モニタリング結果（作業時、否作業時）の把握を施設使用者、利用者共に把握・確認する事。スモークテスト等で最大入室許可人数での作業時の気流の確認を行う事。清掃も含めて使用している消毒剤の妥当性を確認する事。
4	CPCのゾーニングコンセプトを再確認し、更衣手順の見直しを行う事。（クラスCゾーン・最初の更衣室での追加更衣の必要性も考慮する事）
5	CPC施設の付着菌・落下菌の測定手順と試験結果について、使用者側での評価を行い、実施試験の意味・妥当性について、測定結果を踏まえて確認する事。
6	包装形態の最終容器を定め、輸送バリデーションを考慮する事。また、出荷可否判断の手順の整備も必要。
7	廃棄物の処理が、施設側の定められた手順で行われているかどうか使用者側も検証すべき。また、病院内での対応状況と規制との合致についても確認する事。
8	適切な人員の確保及び人員配置を行う事。
9	原材料（ボランティアから入手する滑膜組織）の記録整備を行う事。また、管理の方法〔責任体制（受け渡し）、セキュリティ、感染リスク〕も併せて、整備構築する事。
10	全体的に、自己点検を通してSOPの整備を進める事。
11	資材を保管するスペース（倉庫）を確保する事。
12	施設側の設備（安全キャビネット、インキュベータ等）校正については、その手順と頻度を規定し、実施計画のスケジュール管理を行う事。
13	施設・設備の緊急時の連絡体制（施設側・使用者側）を文書に明記し、確実に連絡が行える体制で運用できるようにする事。

- b . ドナーの選定と滑膜の採取、MSC培養およびバンク化に関わる技術開発・評価
 将来の商用利用のためのマスターセルバンクを構築する際に想定しているドナーの基準に適合する患者に対して、本院の整形外科で実施される膝関節手術で採取された余剰の滑膜組織からMSCを分離し、無血清培地を用いて大量に培養増幅し、バンクとして保存した。すなわちバンク用にストックされるヒト滑膜由来MSCは、GMPレベルで製造され、製造工程管理、ウイルス等の感染因子などの品質管理を徹

底し、トレーサビリティを全て確保し、高い品質を担保した。さらに、2次元コードラベル搭載のバイアルを採用することにより、検体の取り違えを防止している。将来的なGCTP省令に基づいた臨床研究用の細胞の準備も進めており、臨床研究を目指す研究者にとって、非臨床研究の段階から高品質な細胞を供給できるバンキングの存在は、大きな意義があると考えられる。

-aの結果でも述べたように今回は3例のドナーの細胞を培養した。商用利用のためのマスターセルバンクはgMSC作製における中間製品であるP2の細胞の一部を使用する計画であったため、3例ともそれぞれ作製した100本分のストックのうち、50本を非臨床試験用、残りを将来の商用利用を想定したアカデミアにおける再生医療等の研究に供与した。

この際、バンク化に至るまでの工程のフィージビリティについて検討した。また、将来想定している工程内検査を実施し、細胞の品質に関するデータを蓄積した。

これまでに得られた3株のMSCにおいて、工程毎の試験項目、規格値、試験結果、暫定的な規格に対する合否判断の一覧表（表3）を示す。細胞増殖能など、培養に関する暫定的に設定した規格値に関しては、すべて合格という結果を得た。感染症検査に関して、1株のみ、患者自身の血液検査でサイトメガロウイルスが偽陽性であったが、非臨床試験のため受け入れ、培養を実施した。中間製品、gMSC出荷の時点での感染症検査ではすべて陰性を確認したため、培養操作過程での感染はなかった。

表3 工程内検査及び結果一覧

工程	試験項目	規格値	試験結果（～の3株）	合否
組織採取前	術前検査	HBV, HCV, HIV, HTLV, パルボB19, EBV, サイトメガロウイルス, 梅毒, マイコプラズマ 陰性	サイトメガロウイルス偽陽性以外は陰性 陰性 陰性	非臨床試験のため受け入れ 合格 合格
	ウインドウピリオド後の検査	HBV, HCV, HIV, HTLV, パルボB19, EBV, サイトメガロウイルス, 梅毒, マイコプラズマ 陰性	サイトメガロウイルス偽陽性以外は陰性 陰性 陰性	非臨床試験のため受け入れ 合格 合格

製造工程 (組織受入れ)	組織輸送培地の 無菌試験及びマ イコプラズマ否 定試験	無菌試験 陰性	陰性 陰性 陰性	合格 合格 合格	
		マイコプラズマ試験 陰性	陰性 陰性 陰性	合格 合格 合格	
	組織輸送培地の エンドトキシン 試験	1.0 EU/mL以下	1.0 EU/mL以下 1.0 EU/mL以下 1.0 EU/mL以下	合格 合格 合格	
(滑膜組織からの初代 培養)	製造工程 2	細胞数 (P0-P1継代時)	回収細胞数 2×10 ⁴ cells/cm ² 以上	3.56×10 ⁴ cells/ cm ² 4.90×10 ⁴ cells/ cm ² 3.15×10 ⁴ cells/ cm ²	合格 合格 合格
		生存率 (P0-P1継代時)	70 %以上	95.32 % 97.82 % 97.25 %	合格 合格 合格
(滑膜組織由来MSCの継代培養)	製造工程 3	細胞数 (P1-P2継代時)	PDL換算2以上/1継代(5日間換 算)	3.89 3.86 4.41	合格 合格 合格
		生存率 (P1-P2継代時)	70 %以上	98.38 % 98.81 % 98.13 %	合格 合格 合格
		細胞数 (P2-P3継代時)	PDL換算2以上/1継代(5日間換 算)	3.55 3.85 3.86	合格 合格 合格
		生存率 (P2-P3継代時)	70 %以上	97.26 % 98.06 % 97.08 %	合格 合格 合格
		細胞数 (P3-凍結保存 時)	PDL換算2以上/1継代(5日間換 算)	3.00 3.09 3.41	合格 合格 合格
		生存率 (P3-凍結保存 時)	70 %以上	97.25 % 95.92 % 96.52 %	合格 合格 合格

製造工程 (中間製品保存)	細胞純度試験	MSC マーカー (CD13, CD44, CD73, CD90) の発現を確認造血細胞系マーカー (CD11b, CD34, CD45) の発現を認めない	~ MSCマーカー陽性 造血細胞マーカー陰性	合格 合格 合格
		脂肪細胞混入否定試験	陰性 陰性 陰性	合格 合格 合格
		骨芽細胞の混入否定試験	陰性 陰性 陰性	合格 合格 合格
	無菌試験及びマイコプラズマ否定試験	無菌試験 陰性	陰性 陰性 陰性	合格 合格 合格
		マイコプラズマ試験 陰性	陰性 陰性 陰性	合格 合格 合格
	培地のエンドトキシン試験	1.0 EU/mL以下	陰性 陰性 陰性	合格 合格 合格
	ウイルス試験	HBV, HCV, HIV, HTLV, パルボ B19, EBV, サイトメガロウイルス	陰性 陰性 陰性	陰性 陰性 陰性
gMSC軟骨分化能確認試験	非臨床試験のデータ等を参考に今後決定する予定	分化誘導後のGAG値の増加を確認済	—	
製造工程 (中間製品融解・継代 培養)	生存率	70 %以上	95.15 % 96.61 % 97.22 %	合格 合格 合格
	細胞数 (P4-P5継代時)	PDL換算2以上/1継代 (5日間換算)	2.61 2.84 3.56	合格 合格 合格
	生存率 (P4-P5継代時)	70 %以上	99.20 % 98.32 % 98.05 %	合格 合格 合格

	細胞数 (P5-gMSC 作 製 時)	PDL換算2以上/1継代(5日間換 算)	3.07 2.62 2.44	合格 合格 合格
	生存率 (P5-gMSC 作 製 時)	70 %以上	97.85 % 96.46 % 98.50 %	合格 合格 合格
(gMSCの作製) 製造工程6	外観検査	目視による確認で異物、不純 物の混入がないこと	なし なし なし	合格 合格 合格
製造工程7 (gMSCの回収) 出荷前試験	無菌試験及びマ イコプラズマ否 定試験	無菌試験(3日判定) 陰性(未来医療に依頼)	未実施 陰性 陰性	— 合格 合格
		マイコプラズマ試験(NAT法) 陰性	陰性 陰性 陰性	合格 合格 合格
	培地のエンドト キシン試験	日局法(比濁法) 1.0 EU/mL以 下	1.0 EU/mL 以下 1.0 EU/mL 以下 1.0 EU/mL 以下	合格 合格 合格
	細胞数	非臨床試験のデータ等を参考 にして今後決定する予定	5.08×10 ⁷ cells 4.10×10 ⁷ cells 3.93×10 ⁷ cells	
	生存率	70 %以上	87.50 % 94.61 % 78.48 %	合格 合格 合格
	湿重量	0.75 g以上	1.26 g 1.11 g 1.09 g	合格 合格 合格
製造工程7(gMSCの回 収) 出荷後試験	培地の無菌試験 及びマイコプラ ズマ否定試験	無菌試験 陰性	陰性 陰性 陰性	合格 合格 合格
		マイコプラズマ試験 陰性	陰性 陰性 陰性	陰性 陰性 陰性

輸送液の無菌試験及びマイコプラズマ否定試験	無菌試験 陰性	陰性 陰性 陰性	合格 合格 合格
	マイコプラズマ試験 陰性	陰性 陰性 陰性	合格 合格 合格
輸送液のエンドトキシン試験	日局法（比濁法）1.0 EU/mL以下	1.0 EU/mL 以下 1.0 EU/mL 以下 1.0 EU/mL 以下	合格 合格 合格
細胞純度試験	MSC マーカー（CD13, CD44, CD73, CD90）の発現を確認造血細胞系マーカー（CD11b, CD34, CD45）の発現を認めない	~ MSCマーカー陽性 造血細胞マーカー陰性	合格 合格 合格

（ ~ : それぞれMB01-003, MB01-001, MB01-004株を示す）

非臨床研究を目的とした細胞バンクとしては、学内研究者からもMSCバンク利用の要望があるため、準備が整い次第、順次配布を開始する予定である。自己由来の細胞は、検体量の限界や品質のばらつき、細胞樹立に時間がかかるなどのデメリットが挙げられるが、あらかじめドナーの基準に適する患者より余剰組織を採取し、臨床研究にも対応できる高い品質で製造した細胞を常時大量にストックすることが可能になれば、将来的には同種細胞治療など再生医療技術に大きく貢献すると考えられる。

また今後は、バンキング細胞種についても、滑膜由来間葉系幹細胞のみならず、臍帯由来の幹細胞等についても検討し、同種移植等の再生医療分野における技術応用発展に必要な細胞リソースの供給という観点から、学内外の研究者及び営利機関に対し広く提供していくことを視野に入れ、MSCバンクを整備、確立していきたいと考えている。

gMSCの作成、品質管理、非臨床試験の実施

ウサギを用いた埋植予備試験を実施した結果、被験物質（gMSC）埋植により生じた変化は関節内の変化を除き、一過性であった。関節内の変化は滑膜主体であり、他の組織に影響は認められなかった。これらのことから、gMSC をウサギ膝関節腔内に埋植し、局所刺激性及び全身毒性を評価する本試験の実施は可能と判断した。今後、施設及び書類体制の整備が整った段階で、核型分析試験、軟寒天コロニー形成試験も含め、ウサギを用いた埋植試験（本試験）を行う事とした。埋植予備試験の実施方法や結果の詳細については、本報告書の別添資料として、添付した。

滑膜MSCの安定性の検討・各種組織構成細胞への分化誘導の検討

a . 滑膜MSCの安定性の検討

長期凍結保存することにより細胞の品質が変化しないかを検討するため、一定期間保存した滑膜MSCを溶解して再培養し、細胞形態、細胞倍加時間、生細胞率、gMSC作成可能性等を評価した。

得られた3株の中間製品（P3）を融解した際の細胞数及び生存率を下記グラフに示す。（図2）12週保存までのデータを得て細胞数、生存率ともに著しい減少はみられていない。

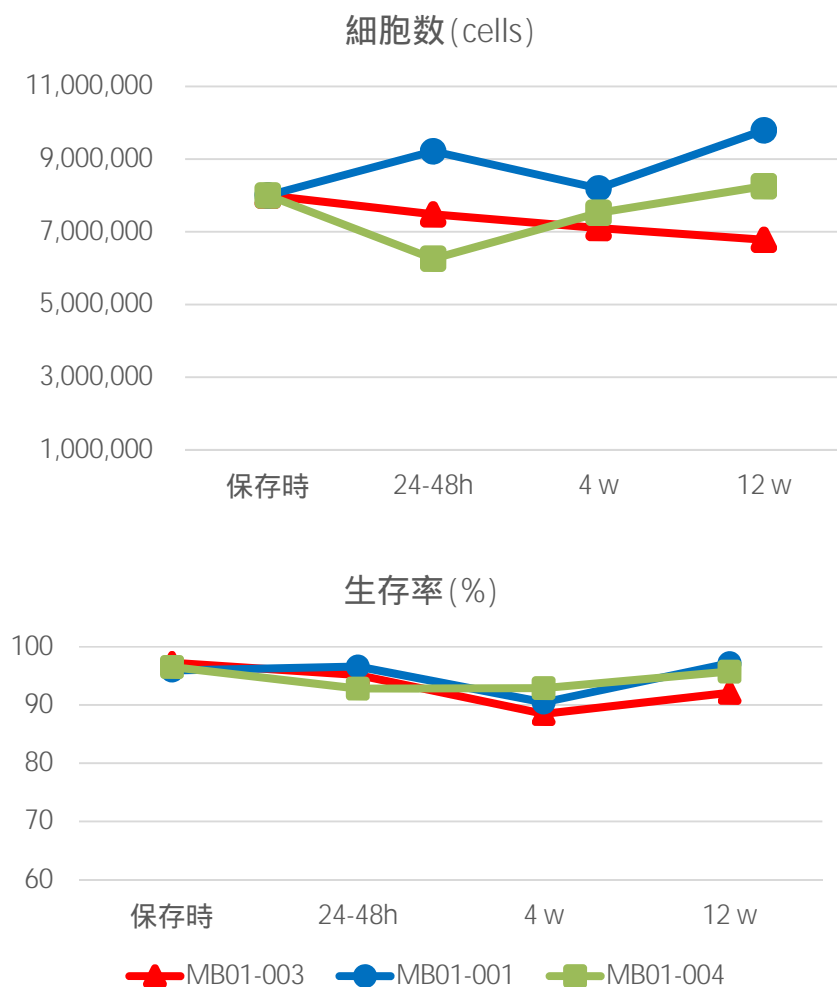


図2 . 中間製品融解時データ

b . 各種組織構成細胞への分化誘導法の検討確立

骨芽細胞分化誘導無血清培地STK3を用いた骨芽細胞分化誘導は、21日後 Alizarin red染色で評価したところ、MB01-003, MB01-001, MB01-004株のいずれも良好な石灰化が確認され、骨基質産生が行われていることが確認された(図3)。一方、DMEM(血清なし)またはSTK2をベースに、従来法であるDexamethasone、Ascorbic acid、 β -glycerophosphateを利用した骨芽細胞分化誘導は、培養開始2週間後にALP染色で評価を行った。現在まで、ALP染色の定性評価までの結果が得られているが、それによると、DMEMに比べSTK2に骨分化誘導因子を添加した群のほうが、ALP活性が高い傾向があった。BMP-2の添加による骨分化促進効果は見られなかった(図4)。

脂肪分化誘導については、21日後にOil red染色によって評価したところ、3株とも陽性像が見られ、脂肪分化能が確認された(図3)。

軟骨分化能については、現在まで、g MSCを得てから、軟骨分化誘導を実施して評価中である。現在のところ、肉眼的には軟骨様の白色組織片がin vitroで得られており、この組織学的検討を進めている(図5)。

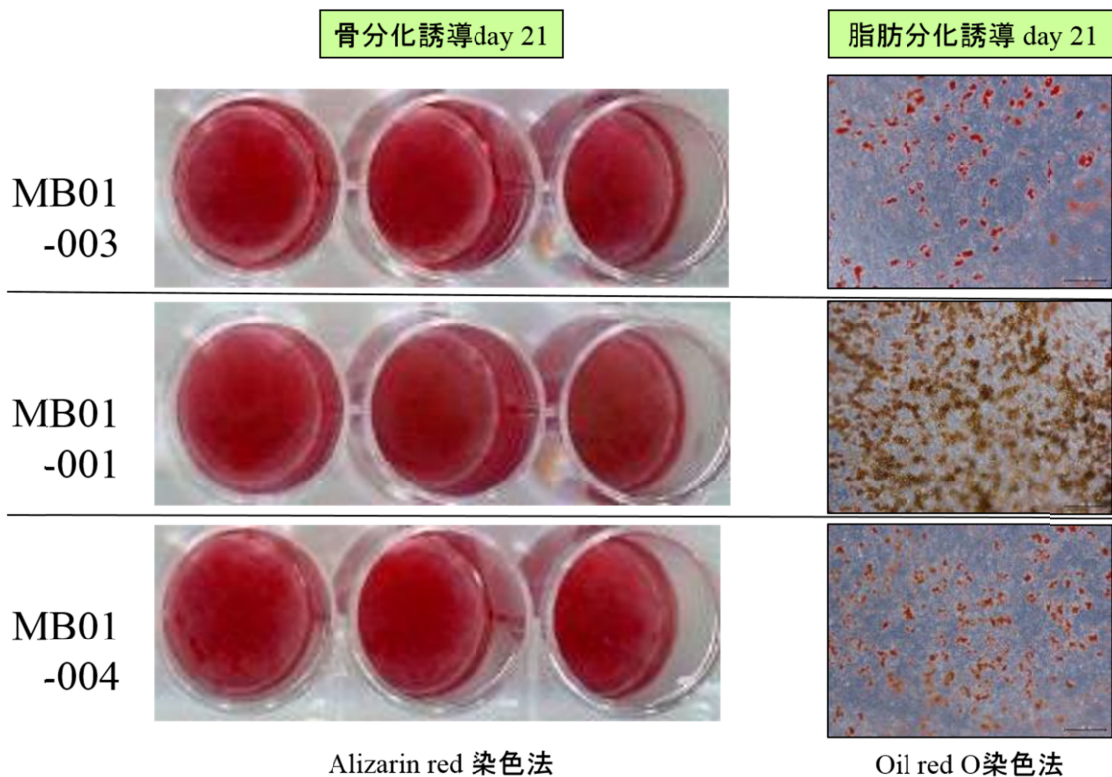


図3. 骨分化、脂肪分化後の染色像

培養21日目のアリザリンレッド染色およびオイルレッドO染色像。骨分化誘導は、無血清骨分化誘導培地STK3を用いた。

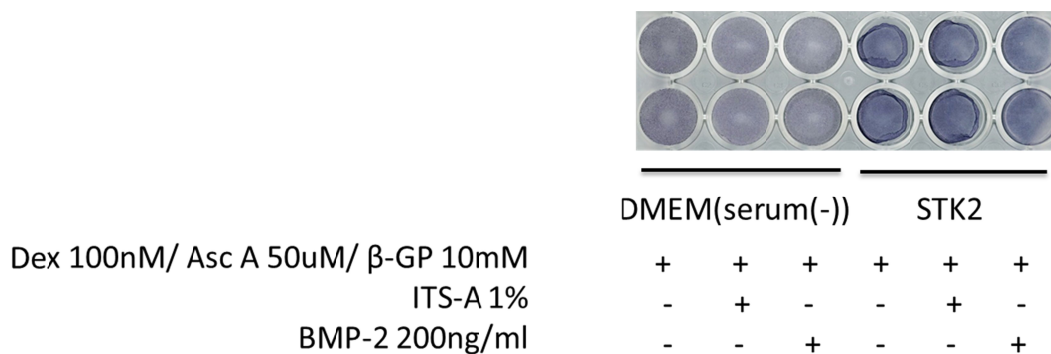


図4. デキサメサゾンによる骨芽細胞分化誘導

通常のDMEM（血清添加なし）またはMSC増殖用無血清培地STK2に骨分化誘導因子である Dexamethasone(wako) 100nM、Ascorbic acid (SIGMA) 50 μ M、 β -glycerophosphate(SIGMA) 10mMを添加した培地、さらにこれらに1%ITS-A (wako) またはBMP-2 (オステオファーマ) 200ng/mlを加えた培養系で骨芽細胞分化誘導を行い、ALP染色で定性評価を行った。いずれもALP陽性を示し、骨芽細胞分化誘導が見られていたが、STK2培地をベースに使用したものでALP活性が高い傾向が見られた。BMP-2を添加することの上乗せ効果は見られなかった。



BMP2 200ng/ml	+	-	+	+	+	+
TGFβ3 10ng/ml	-	+	+	+	+	+
BMP2単独による前培養日数	0	0	0	3	6	9

図5 . 滑膜由来MSCから作成した g MSCの軟骨分化誘導

肉眼的には、マトリックスを豊富に有する組織が得られている。

5 . まとめ

再生医療の実用化において、安全で高品質な細胞製剤を容易に入手して利用できる同種細胞製品に大きな期待がかかっているが、安全な細胞の調達、受入体制整備、安全なヒト幹細胞の大量培養技術や長期的な保存体制の確立などたくさんの課題も存在する。本研究では、PMDAとの相談で確立した「本品の原料である細胞ソース（滑膜細胞）の入手手続きと管理体制」をもとに非臨床試験実施するため、滑膜組織より樹立させたMSCのマスターセルバンクを構築した。

MSCは多様な分化能を有することが明らかとなっているだけでなく、移植片対宿主病（GVHD）などの免疫反応に対して抑制的に働くことなどから、様々な同種細胞治療への応用が期待されている。本研究で確立したバンクの滑膜MSCは、未来医療センターの臨床用細胞培養施設(CPC)を利用してGMP準拠レベルの品質で培養した細胞であり、トレーサビリティも確保しており、将来の臨床研究や治験、産業利用に向けた非臨床研究に提供できる。これらの細胞は、本研究の非臨床研究の結果から、高い品質を有していること、予備的ながら埋植試験で問題が無いこと、多分化能を有していることが示唆されており、多方面での産業化を目指した研究に資するものと考えられる。また、軟骨再生に関しては、本研究の結果をもとに、さらに必要な非臨床安全性試験等を追加すると同時に、GCTP準拠で治験用再生医療等製品の製造する体制の準備、治験プロトコルおよび体制の準備を行い、PMDAのマスターファイル登録を予定している臨床用無血清培地を用いて大量供給可能な世界初の同種間葉系幹細胞製剤の治験に向けて準備を進める。また、本研究で開発する高品質のMSCバンクはアカデミアにおける再生医療等の研究にも供することが可能であり、学内外への細胞の提供を行っていく。

本研究の成果に関連して、公表された刊行物はない。

gMSC のウサギ膝関節腔内埋植による埋植試験の予備試験

最終報告書

作成日 2015年2月19日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目次

	頁
1. 最終報告書作成者署名	4
2. 表題	5
3. 試験番号	5
4. 試験委託者	5
5. 試験施設	5
6. 試験目的	5
7. 遵守した動物の福祉に関する指針等	5
8. 試験責任者	5
9. 試験担当者 (gMSC 生存率の測定)	5
10. 試験日程	6
11. 資料及び標本の保存	6
12. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと	6
13. 試験従事者及び業務分担	7
14. 要約	8
15. 材料及び方法	9
15.1 被験物質及び対照物質	9
15.1.1 被験物質 1	9
15.2 被験物質 2	9
15.3 対照物質	9
15.4 被験物質及び対照物質の調製	10
15.5 細胞数及び生存率の測定	10
15.6 試験系	10
15.6.1 動物種及び系統	10
15.6.2 動物入手日, 性別, 週齢, 入手匹数, 入手後 1 日の体重範囲	10
15.6.3 埋植時の週齢	10
15.6.4 供給源	10
15.6.5 検疫及び馴化	10
15.6.6 個体識別法	10
15.6.7 群分け法	11
15.6.8 環境条件及び飼育管理	11
15.6.9 飼料	11
15.6.10 飲料水	11
15.7 埋植	11
15.7.1 埋植部位及びその選択理由	11

15.7.2 埋植方法.....	11
15.7.2.1 麻酔及び剪毛.....	11
15.7.2.2 埋植.....	11
15.7.2.3 埋植後の管理.....	12
15.7.2.4 埋植量,埋植時刻,埋植回数及び埋植期間.....	12
15.8 群構成.....	12
15.9 観察及び検査項目.....	12
15.9.1 観察期間.....	12
15.9.2 一般状態観察.....	12
15.9.3 体重測定.....	12
15.9.4 摂餌量測定.....	12
15.9.5 剖検.....	13
15.9.6 病理組織学的検査.....	13
15.10 統計学的方法.....	13
16. 試験成績.....	13
16.1 一般状態.....	13
16.2 体重.....	13
16.3 摂餌量.....	13
16.4 剖検.....	13
16.5 病理組織学的検査.....	13
17. 考察.....	14
Table 1 Clinical signs in rabbits.....	15
Table 2 Body weights of rabbits.....	16
Table 3 Food consumption in rabbits.....	17
Table 4 Necropsy findings in rabbits.....	19
Table 5-1 and 5-2 Histopathological findings in rabbits 7 days after placement.....	20
Table 5-3 and 5-4 Histopathological findings in rabbits 29 days after placement.....	22
Photo.1 ~ 8.....	24
Attachment 1-1 ~ 1-3 「輸送後の gMSC 細胞生存率測定方法」.....	27

1. 最終報告書作成者署名

試験番号：011134P

表 題：gMSCのウサギ膝関節腔内埋植による埋植試験の予備試験

株式会社日本バイオリサ チセンタ 羽島研究所

試験責任者

2. 表題

gMSC のウサギ膝関節腔内埋植による埋植試験の予備試験

3. 試験番号

011134P

4. 試験委託者

株式会社ツーセル

〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3 広島大学・霞総合研究棟

306 TEL/FAX:082-257-5749

委託担当者:長谷川 森一

5. 試験施設

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島六丁目 104 番地

TEL:058-392-6222, FAX:058-392-1284

6. 試験目的

gMSC のウサギ膝関節腔内埋植による埋植試験の実施に先立ち,その予備試験を行った。

7. 遵守した動物の福祉に関する指針等

厚生労働省通知 科発第 0601001 号(平成 18 年 6 月 1 日)「厚生労働省の所管する実施機関に おける動物実験等の実施に関する基本指針」

「株式会社日本バイオリサーチセンター実験動物の管理および福祉に関する規定」(平成 19 年 4 月 2 日,平成 26 年 5 月 1 日改正)

「株式会社日本バイオリサーチセンターヒト由来試料を用いる実験に関する指針」(平成 24 年 3 月 1 日,平成 26 年 1 月 6 日改定)

当試験計画は,試験施設の動物実験委員会及びヒト由来試料実験倫理審査会で審査されたものである。

8. 試験責任者

加藤 英男

株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島六丁目 104 番地

(E-mail:kato.hideo@nisshin.com, TEL:058-392-6222, FAX:058-392-1284)

9. 試験担当者(gMSC 生存率の測定)

株式会社ツーセル

松本 昌也

10. 試験日程

試験開始日	2014年10月3日
動物入手日	2014年10月8日
gMSC 受領日	2014年10月27日
群分け日	2014年10月27日
埋植日	2014年10月28日
剖検日	
埋植後7日	2014年11月4日
埋植後29日	2014年11月26日
病理組織所見最終化日	2015年1月9日
試験終了日	2015年2月19日

11. 資料及び標本の保存

当試験において試験施設で発生するすべての資料及び標本は、株式会社日本バイオリサーチセンター羽島研究所の資料保存施設に最終報告書提出日より5年間保存する。その後の措置については、試験委託者と協議の上、決定する。

12. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

- (1) 空調設備点検のため、動物飼育室の湿度が2014年11月19日の14時04分～46分の間、許容範囲(40.0～70.0%)を逸脱し、最高74.7%となった。湿度の逸脱幅は僅かであり、動物の一般状態に異常は認められなかったため、試験成績に及ぼす影響はないと判断した。
- (2) 埋植には、14G サーフロー留置針を用いる予定であったが、それよりも内径が小さい18Gでも被験物質が通過することを確認した。そのため、18Gを用いた方が刺入部位の物理的侵襲を小さくすることが可能であるため、18G サーフロー留置針を用いて埋植した。18G サーフロー留置針を用いて埋植したが、全例とも埋植に問題なかったため、試験成績に及ぼす影響はないと判断した。

13. 試験従事者及び業務分担

加藤 英男

(試験計画書の作成, 検体の埋植, 試験操作の確認, 最終報告書の作成)

田中 勝幸, 曾我 高臣, 杉本 真知子, 渡邊 誠

(一般状態観察, 体重測定, 摂餌量測定, 動物の一般飼育管理)

伊藤 格, 今井 順, 遠藤 克己

(剖検, 病理組織標本作製, 病理組織学的検査)

杉山 亘秀

(被験物質の管理)

松本 昌也(株式会社ツール)

(gMSC 生存率の測定)

14. 要約

gMSC を 4 匹のウサギ左右膝関節腔内に埋植し、一般状態観察、体重測定、摂餌量測定を行い、膝関節の肉眼観察及び病理組織学的検査を行った。観察期間は、埋植後 7 日及び埋植後 29 日とした。対照としてヒアルロン酸ナトリウム架橋体制剤(サイビスク)を同様に投与した。gMSC 及び DiI-gMSC とも膝関節当たり 0.25 g 投与した。また、gMSC の組織局在を目的に投与した DiI-gMSC (膝関節当たり 0.25 g) の膝関節は、未染標本を作製し、試験委託者に送付した。

1. 一般状態、体重及び摂餌量では、対照群、gMSC 群及び DiI-gMSC 群とも、埋植の影響を認めたが、埋植後 7 日までには消失する一過性のものであった。

2. 膝関節の肉眼観察では、対照群、gMSC 群及び DiI-gMSC 群とも、異常は認められなかった。

3. 病理組織学的検査では、埋植後 7 日に対照群及び gMSC 群とも滑膜の増殖、滑膜の炎症細胞の浸潤が認められたが、gMSC 群の方が対照群よりも変化が強かった。その他、対照群で無構造の好塩基性遊離体が、gMSC 群で細胞性の好酸性遊離体が認められた。

以上、gMSC 埋植により生じた変化は、関節内の変化を除き、一過性であった。関節内の変化は、滑膜主体であり、他の組織に影響は認められなかった。これらのことから、gMSC をウサギ膝関節腔内に埋植し、局所刺激性及び全身毒性を評価する本試験の実施は可能と判断した。