



令和5年3月8日
大阪大学 東京ランチ, 日本橋, 東京

第4回 細胞製造コトづくりシンポジウム 「細胞製造工程の安定化を議論しよう」

CQAの特定とその評価に関する技術

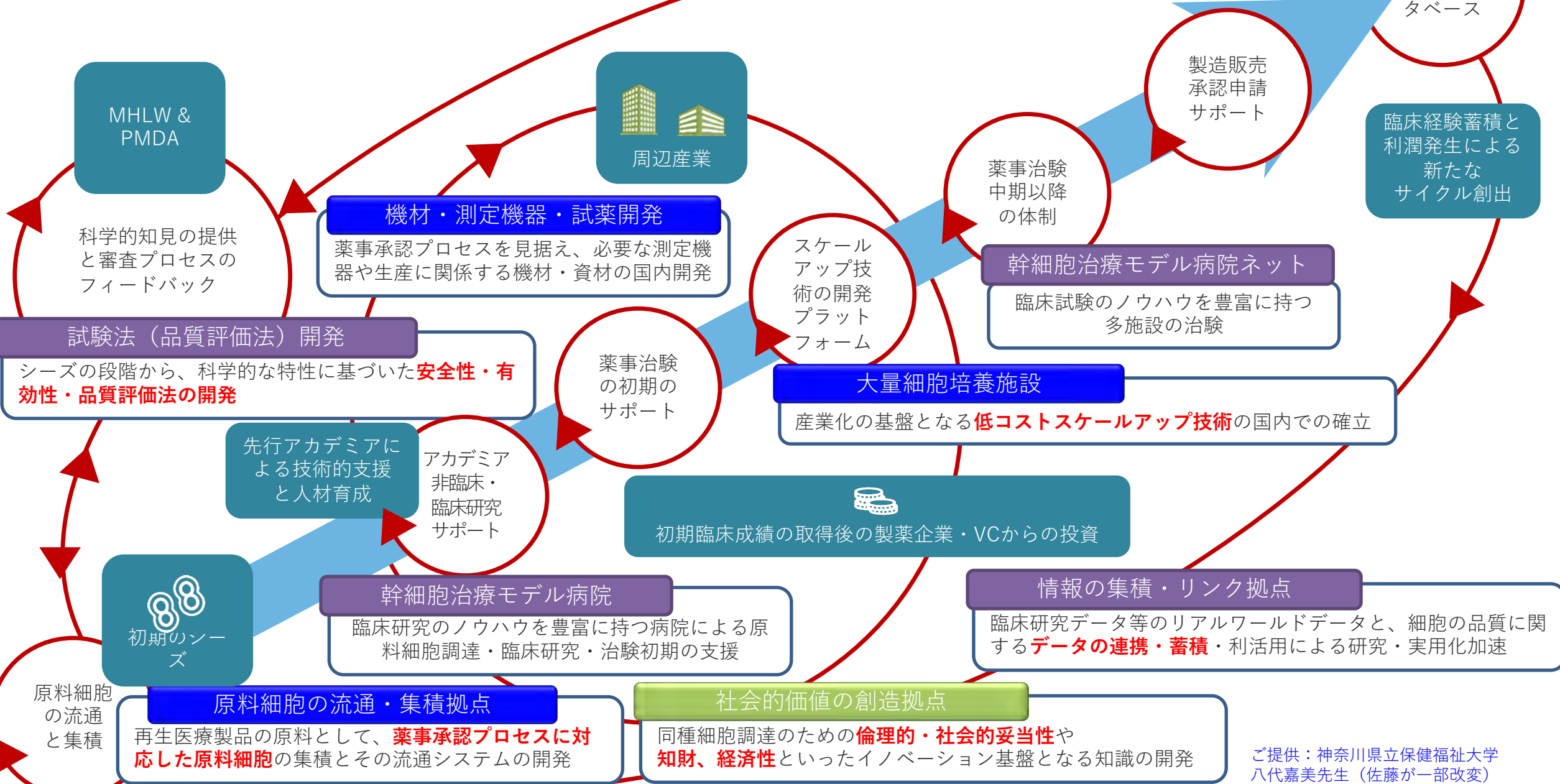
佐藤 陽治

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部長

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の公式な見解では必ずしもありません。なお、本演題の発表に関して開示すべきCOIはありません。

再生医療を患者まで届けるための基盤

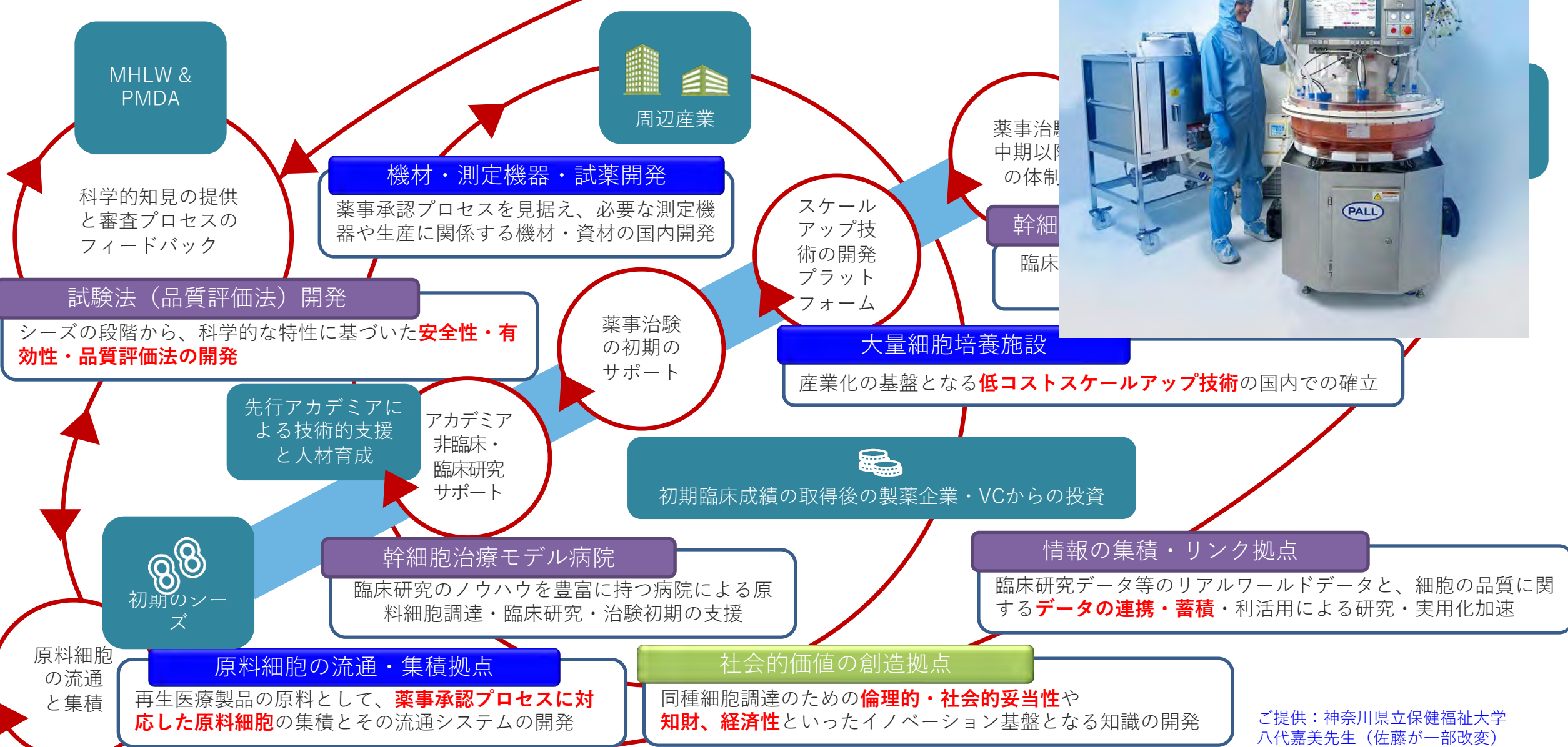
シーズを社会へと送り出す基盤の構築と蓄積したノウハウの循環



ご提供：神奈川県立保健福祉大学
八代嘉美先生（佐藤が一部改変）

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



ご提供：神奈川県立保健福祉大学
八代嘉美先生（佐藤が一部改変）



An Evolving Cell Manufacturing Industry Strategy

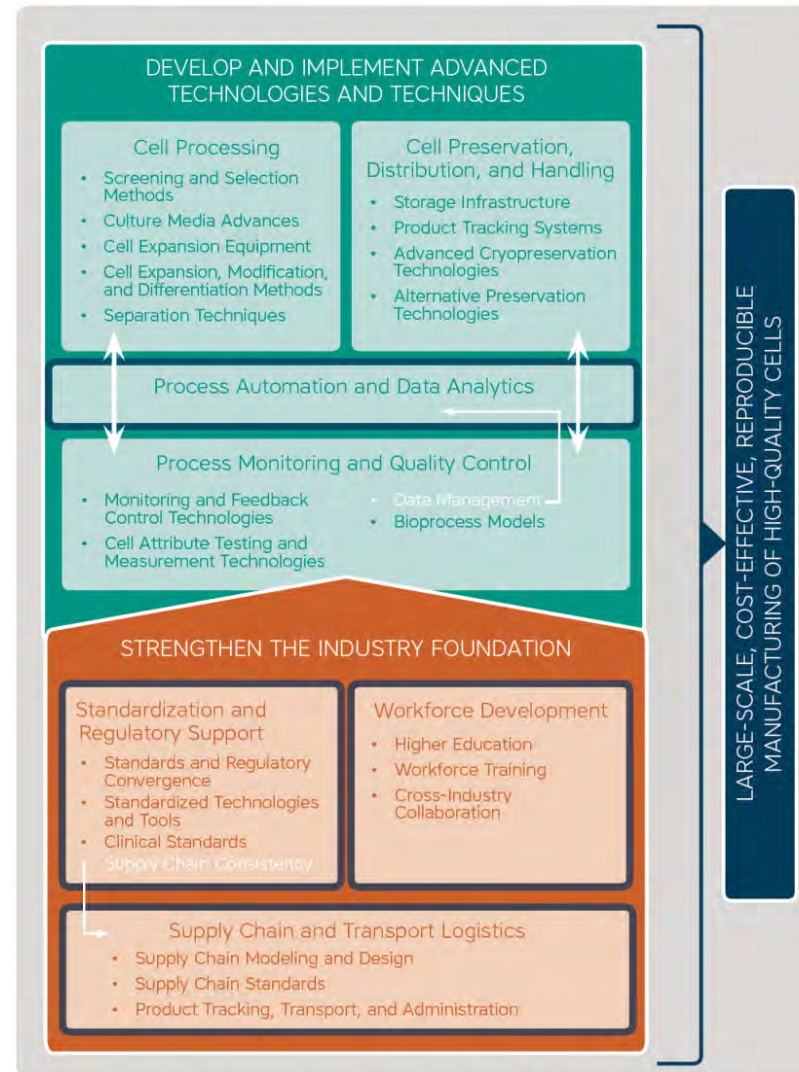
This roadmap update includes a refined strategy for achieving the cost-effective, large-scale, reproducible manufacturing of high-quality cells in response to recent cell manufacturing advances, the industry and clinical outlook, and emerging needs in the cell manufacturing industry. Industry changes and growth have necessitated revisions to the following cell manufacturing activity areas, which are the focus of this roadmap update:

Process Automation and Data Analytics — Big data analytics holds significant promise to help identify critical quality attributes (CQA) and improve cell manufacturing processes, leading to efficient closed-system automation of unit operations and eventually whole bioprocesses. To realize these capabilities, the cell manufacturing community must improve measurement tools and electronic systems for data collection, develop or adopt advanced tools and systems for real-time data analytics, and collect more robust data from throughout the manufacturing process—from cell harvesting to delivery—both from the cells themselves as well as the process and the supply chain. Assessing cell function post-administration and the effect on the disease model in humans is also critical for identifying CQAs.

Supply Chain and Transport Logistics — The quality, affordability, and availability of cell-based products depends on the robustness of the cell manufacturing supply chain and the reliability and speed of product transport. To optimize the cell manufacturing supply chain, the cell manufacturing community should accelerate activities for advancing supply-chain-wide data collection, cell tracking technologies, and supply chain modeling. Given the importance of the supply chain and transport logistics to advancing cell manufacturing, this focus area was pulled out into its own activity area in the updated roadmap.

Standardization and Regulatory Support — With increased NIST and FDA focus on standards for cell-based products, and the launch of the International Standards Coordinating Body (SCB) for Gene, Cell, and Regenerative Medicines and Cell-based Drug Discovery, the cell manufacturing community should work to inform ongoing standards development activities that will increase the consistency of industry terminology, data collection and management, cell processing, and workforce training and certification. In particular, these regulatory entities should work with professional societies, patient advocates, clinicians, and industry to establish comprehensive, standardized clinical data registries to facilitate sharing of clinical outcomes and cell characterization data that can further accelerate identification of CQAs and inform updates to regulations and guidance.

Workforce Development — Given the rapid growth of cell manufacturing, it is becoming even more critical for the cell manufacturing community to leverage and align existing higher education and workforce training programs and to continuously assess and ensure that training programs are focused on skillsets that industry needs most.



*Activities related to Cell Processing; Cell Preservation, Distribution, and Handling; and Process Monitoring and Quality Control are not discussed in this roadmap update document but remain areas of NCMC focus. Please see the complete roadmap for activities in these areas.

2017

Roadmap Update to Achieving Large-Scale, Cost-Effective, Reproducible Manufacturing of High-Quality Cells

July 2017

About this Document

This document is designed to serve as an update to the *Achieving Large-Scale, Cost-Effective, Reproducible Manufacturing of High-Quality Cells* roadmap, which was published in June 2016 and launched by the White House Office of Science, Technology, and Policy (OSTP). This roadmap update provides a revised cell manufacturing industry strategy in response to recent cell manufacturing advances, the industry and clinical outlook, and emerging needs in the cell manufacturing industry. Both the roadmap and this update were developed by the National Cell Manufacturing Consortium (NCMC) with funding from the National Institute of Standards and Technology (NIST) Advanced Manufacturing Technology Consortia (AMTech) program.

The cell manufacturing industry has been changing rapidly since NCMC held workshops in 2015 to inform roadmap development. In the past two years, new cell-based therapies have received regulatory agency approval and others have demonstrated promising

This roadmap update focuses primarily on four areas that have been significantly impacted by industry change since roadmap publication: **Process Automation and Data Analytics, Supply Chain and Transport Logistics, Standardization and Regulatory Support, and Workforce Development.**

Other roadmap activity areas—including sections on developing and implementing advanced technologies and techniques in Cell Processing; Cell Preservation, Distribution, and Handling; and Process Monitoring and Quality Control—remain relevant and are critical focus areas of NCMC efforts. Please reference the full roadmap document for activities in these areas.



Construction supported by:

 INDUSTRIAL STRATEGY

 European Union
European Regional Development Fund



CATAPULT

Cell and Gene Therapy

Press release: Construction completed on expansion phase, doubling capacity of Cell and Gene Therapy Catapult large scale manufacturing centre in Stevenage

Completion builds on the success of first six clean rooms which have seen exceptional demand. The manufacturing centre's additional 6 modules will continue to accelerate the growth of the industry in the UK.

24.09.19

[Manufacturing \(/article-tags/manufacturing\)](#)

Today, the Cell and Gene Therapy Catapult (CGT Catapult) celebrates the completion of six additional modules at its manufacturing centre in Stevenage. The success of the centre has seen the Cell and Gene Therapy Catapult accelerate the planned build-out of the expansion phase with an additional six clean rooms in the already constructed space on the second floor of the building.

Share



Sign Up



[\(/news\)](#)

The centre has been fully operational since April 2018 and achieved MHRA licensure in August 2018. Depending on the process, each module can accommodate 20 parallel autologous cell processes or a bioreactor process up to 1,000L bioreactors for allogeneic cell or viral vector manufacture. The first collaborators are expected to start benefitting from this new space at the beginning of 2020.

Backed by over £75 million of funding, including investment from the UK Government's Industrial Strategy Challenge Fund; the department of Business Energy and Industrial Strategy, from Innovate UK, the UK's innovation agency, and from the European Regional Development Fund, the centre is providing the infrastructure and expertise to enable companies to develop their manufacturing capabilities and systems for large scale, commercial cell and gene therapy supply. Companies currently collaborating at the centre are Adaptimmune, Autolus, Cell Medica, Freeline Therapeutics and TCR² Therapeutics.

> 100億円



Commercializing
Living Therapies



About Us ▾ Our Network ▾ Our Services ▾ Education

Our Services

Overview

Business Services

Technical Services

Facilities

Our Clients

Contact CDMO

Facilities

Located in Toronto's Discovery District, CCRM is in the heart of Canada's premier health care innovation hub, and is surrounded by over 30 world-class clinical and research institutions. With access to more than 140,000 students and scientists in Toronto, CCRM is deeply interconnected in a thriving biomedical cluster.

Our 40,000 ft² (~4,000 m²) home in the [MaRS Centre](#) houses on-site consultation offices, a large and fully-equipped containment level 2 (CL2) laboratory, and a stand-alone 20,000 ft² (~1,300 m²) Good Manufacturing Practices (GMP) facility.

Process Development Suite:

At 10,000 ft² (~930 m²), our laboratory is based on a modular design that includes a large, fully-flexible process hall enabling us to mimic advanced biologics manufacturing workflows and practices. This process hall is central to the capabilities of the [Centre for Advanced Therapeutic Cell Technologies \(CATCT\)](#) — an advanced manufacturing centre of excellence focused on addressing the many challenges associated with cell and gene therapy manufacturing. The CATCT is jointly supported by [GE Healthcare](#) and the [Federal Economic Development Agency for Southern Ontario \(FedDev Ontario\)](#).



Bioreactor systems in CCRM's lab.



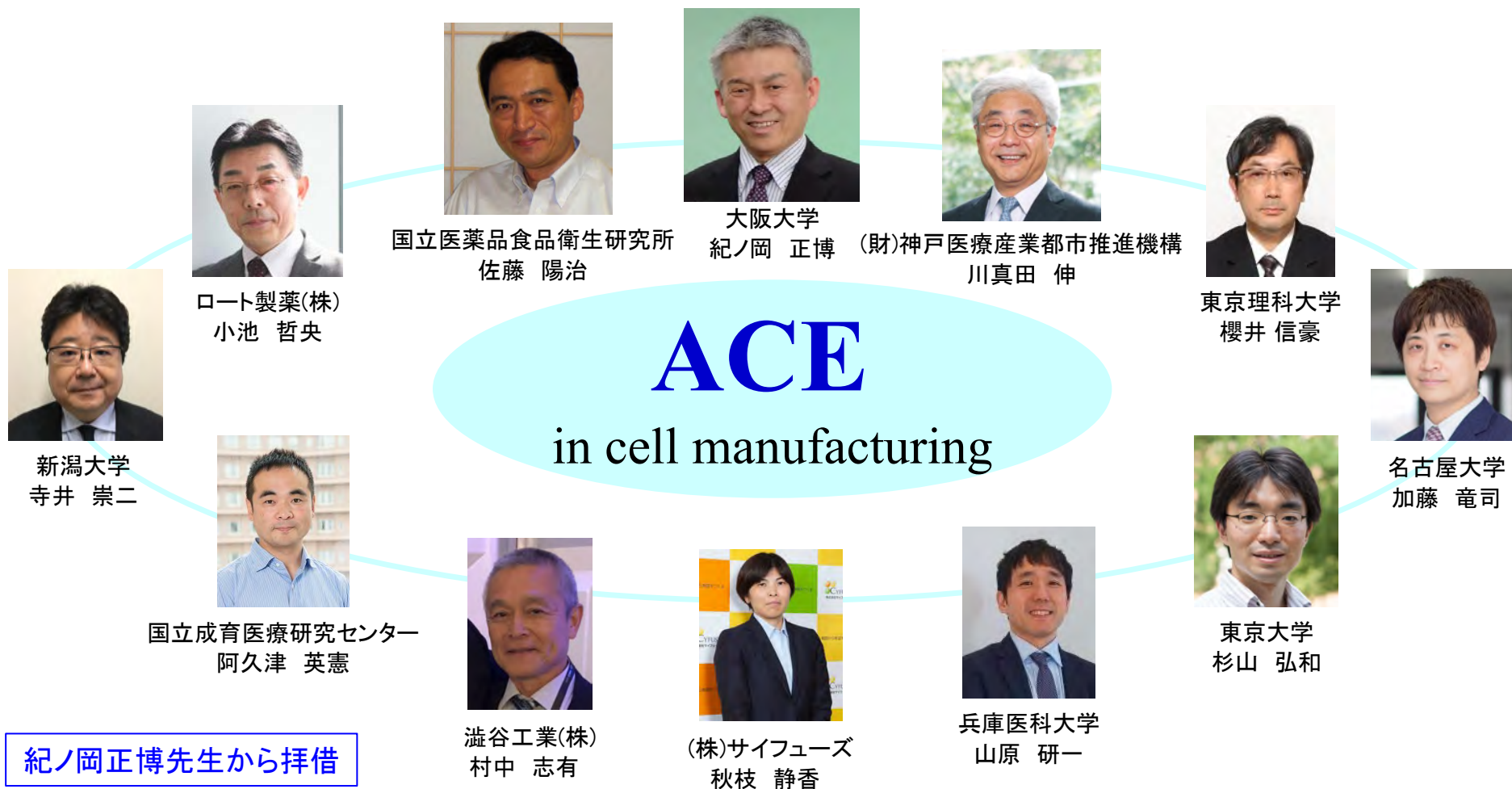
CCRM staff in the lab.

<https://www.ccrm.ca/cdmo-facilities>

ヒト細胞加工製品の製造に向けたQbDに基づく管理戦略の構築と 新たな核となるエコシステムの形成

Establishment of QbD-based control strategy and
Advanced Core Ecosystem in cell manufacturing
(ACE in cell manufacturing)

プロジェクトリーダー

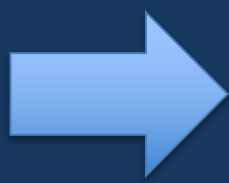


紀ノ岡正博先生から拝借

Q1: **スケールアップ技術／QbD製造**に必要なものは何か？

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 (バイオ医薬品向け)

“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。”

In vitro アッセイのみで済ませることはできないか？

開発者からすれば追加試験は避けたい

「ヒト細胞加工製品の製造工程の変更に伴う同等性／同質性評価に関する指針」(案)

- 1.0 緒言
- 1.1 本指針の目的
- 1.2 背景
- 1.3 適用対象
 - 1.3.1 適用対象製品
 - 1.3.2 適用対象製品の特徴
- 1.4 一般原則及びヒト細胞加工製品における基本的考え方
 - 1.4.1 一般原則
 - 1.4.2 ヒト細胞加工製品の同等性／同質性評価作業における基本的考え方
- 2.0 指針
- 2.1 同等性／同質性評価作業に関する留意事項

- 2.2 品質に関する留意事項
 - 2.2.1 分析法
 - 2.2.2 特性解析
 - 2.2.3 規格及び試験方法
 - 2.2.4 最終製品の品質の安定性
- 2.3 製造工程に関する留意事項
- 2.4 開発段階における製造工程変更時の同等性／同質性
- 2.5 非臨床試験及び臨床試験に関する留意事項
 - 2.5.1 非臨床試験及び臨床試験を計画する際考慮すべき要素
 - 2.5.2 試験の種類
- 3.0 用語集
- 4.0 参考文献
- Q&A

「ヒト細胞加工製品の製造工程の変更に伴う同等性／同質性評価に関する指針」(案)

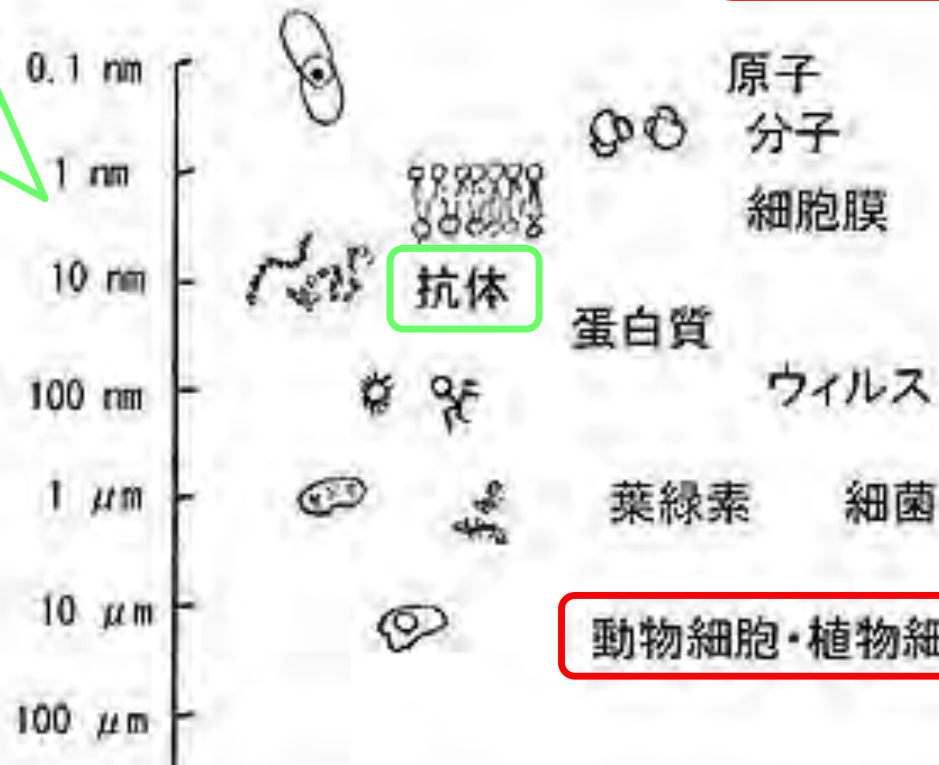
同等／同質

製造工程変更前後のヒト細胞加工製品が品質特性において高い類似性を有し、ヒト細胞加工製品の安全性、あるいは有効性に望ましくない影響が生じていないことをいう。多くのヒト細胞加工製品の場合、原料細胞及び成分としての加工細胞が複雑かつ集団として不均一であること、及び製品の作用機序が必ずしも完全には明らかではないことから、最終製品の規格や品質特性の分析のみならず、必要に応じて実施される非臨床試験や臨床試験のデータにも基づき判断する必要がある場合がある。

細胞は非常に複雑

寸法の目安

これからのお話はとても小さな世界の事柄です。
ナノの世界です。
抗体は蛋白質の一種で、1nm-5nmというとても小さい大きさです。



評価すべき個々の細胞が
複雑である

なおかつ
評価すべき細胞は
不均質集団
= 輪をかけて複雑

Q1: **スケールアップ技術／QbD製造**に必要なものは何か？

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**

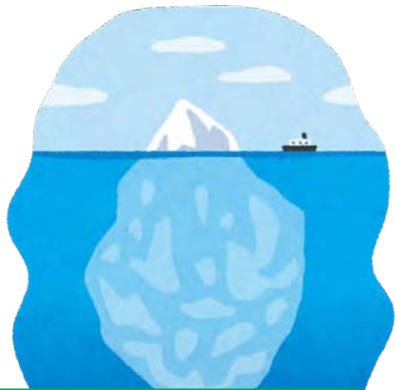
Q2: **品質の同等性／同質性**に必要なものは何か？

細胞加工製品の「**重要品質特性（CQA）**」

& CQAを基盤とする「**規格及び試験方法**」（Specifications [ICH Q6B]）

大きな問題

細胞加工製品の場合、
すべてのCQAを網羅することは極めて困難



CQAの「**同定**」と「**検出・測定**」ためのツールが必要

CQAを探索・評価する際の課題

➤ 安全性関連のCQA(ハザードの質と量)

➤ 有効性関連のCQA



CQAの「同定」と「検出・測定」ためのツールが必要

CQAを探索・評価する際の課題

➤ 安全性関連のCQA(ハザードの質と量)

不均質な分布を示すハザード・有害不純物を漏れなく
検出できているか？測定法の感度を理解しているか？

=偽陰性(&偽陽性)の回避

特に、患者の体内で増殖する可能性のあるハザード
(例: ウイルス、**造腫瘍性細胞**)
の検出感度の理解は必須

ヒトES/iPS細胞加工製品の 腫瘍形成リスクに関するハザード(危害要因)

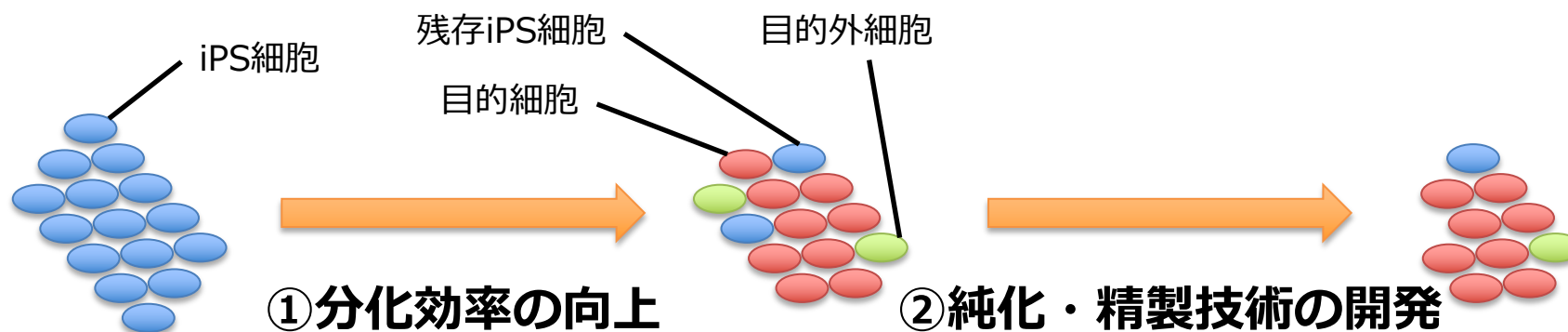


未分化なES/iPS細胞には腫瘍形成能（造腫瘍性）があることから、
残存ES/iPS細胞による造腫瘍性のリスクが存在する。



培養に伴う**造腫瘍性形質転換細胞**の出現の可能性もある。


未分化ES/iPS細胞・造腫瘍性細胞の残存・混入を防止する工夫が必要



**③製品の「実用化」には、未分化ES/iPS細胞や造腫瘍性形質転換細胞の
除去・残留を確認する試験法が不可欠**

腫瘍形成リスク関連の試験法（動物を使った方法）



評価目的	移植部位の微小環境の影響	形質転換細胞の検出	未分化多能性幹細胞の検出
動物	1種で十分 免疫不全マウス(例:NOG)またはラット(例:ヌードラット)		
例数	10匹/群(観察終了時)		
投与方法	単回		
用量 (細胞数)	物理的・構造的・手技的限界 という意味の最大耐用量 (MTD)	投与可能な最大用量(MFD)	
投与の 経路・部位	基本的には 臨床投与相当経路・部位	MFDを最大化できる部位(例:皮下)	
観察期間	陽性群の結果が安定するま でまたは出来るだけ長期間	16週間以上	17~30週間
陽性対照	がん細胞由来株または 多能性幹細胞株	がん細胞由来株 (例:HeLa)	多能性幹細胞株 (例:ヒトiPS細胞)
検出限界		100/1E+7 (0.0001%) (HeLa/hMSC)	100/1E+6 (0.01%) (hiPSC/NHDF)

腫瘍形成リスク関連の試験法（動物を使わない方法）

残存未分化多能性幹細胞の検出試験法



プラットフォーム	所要時間	感度
フローサイトメトリー	1 日	0.1% (ヒトiPS細胞／網膜色素上皮細胞)
定量性RT-PCR	6 時間	0.002% (ヒトiPS細胞／網膜色素上皮細胞)
ドロップレットデジタルPCR	数時間	0.001% (ヒトiPS細胞／心筋細胞)
高効率培養法による直接検出法	約1週間	0.01-0.001% (ヒトiPS細胞／間葉系幹細胞)



悪性形質転換細胞の検出試験法



プラットフォーム	所要時間	感度
軟寒天コロニー形成試験	3-4 週間	0.02% (HeLa細胞／間葉系幹細胞)
デジタル軟寒天コロニー形成試験	3-4週間	0.00001% (HeLa細胞／間葉系幹細胞)
増殖特性解析	4 週間以上	0.0001% (HeLa細胞／間葉系幹細胞)



選択的分化細胞傷害性ウイルスベクターによる混在iPS細胞(ハザード)の濃縮 研究の背景及び目的

未分化なES/iPS細胞には腫瘍形成能(造腫瘍性)があることから、ヒトES/iPS細胞加工製品においては残存ES/iPS細胞による造腫瘍性のリスクが存在する。

移植細胞量

10^4

10^5

10^6

10^7

10^8

10^9

未分化細胞の
検出限界

$1/10^4$

$1/10^5$

$1/10^6$

$1/10^7$

$1/10^8$

$1/10^9$

網膜再生
角膜再生

脊髄再生

心筋再生

検出限界の壁
(0.001%)

国立衛研で開発された未分化ES/iPS細胞検出法(～H26)

- ・ 定量RT-PCR/LIN28法(検出限界0.002%)
- ・ デジタルPCR/LIN28法(検出限界0.001%)
- ・ 造腫瘍性試験/NOGマウス(検出限界～0.001%)
- ・ ラミニン521/コロニー増幅法(検出限界0.01～0.001%)

サンプル中の標的遺伝子のコピー数、培養容器のサイズや、マウスに投与可能な細胞数などに限界があるため、既存の方法では検出限界の壁(0.001%)を越えることができない。

- ・ 製品の「実用化」には、ヒトES/iPS細胞の除去・残存を確認する試験法が不可欠であり、臨床研究開始のボトルネックとなっている。
- ・ 神経細胞や心筋細胞のヒトへの移植を想定した場合、既存の方法では未分化細胞の検出感度が足りないことが予想される。

投与細胞量の多い再生医療製品の品質評価および実用化には、**既存の方法の検出限界を超えた新たな残存ES/iPS細胞の検出法が必須。**

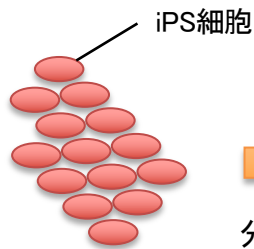
目的細胞を選択的に除去することによる造腫瘍性未分化細胞の高感度検出法の開発

残存iPS細胞の選択的濃縮

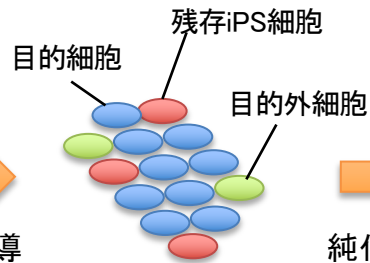


iPS細胞以外を標的とした細胞傷害性ウイルスベクターによって**選択的にiPS細胞を残す**

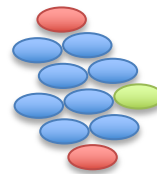
残存iPS細胞を高感度に検出可能



原料



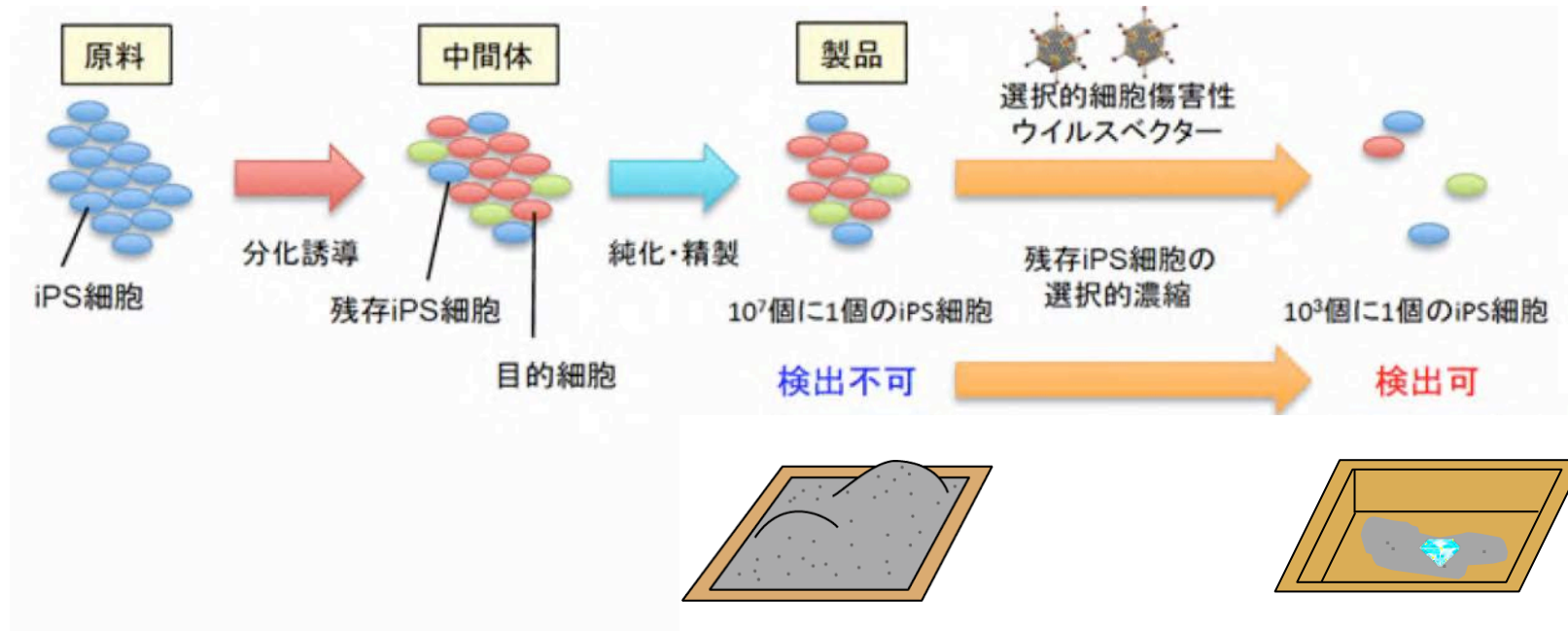
中間体



製品

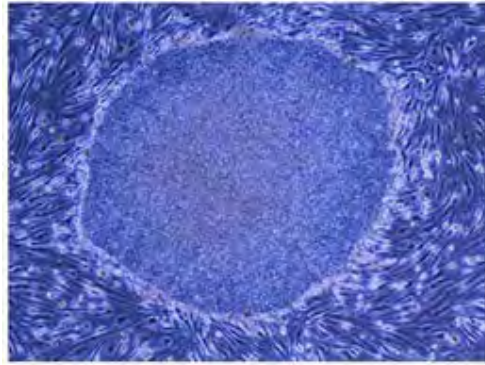
ヒトiPS細胞に由来する分化細胞に残存・混入する未分化なiPS細胞(造腫瘍性細胞)の検出方法の開発

選択的分化細胞傷害性ウイルスベクターによる混在iPS細胞(ハザード)の濃縮



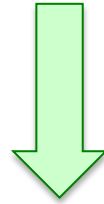
大量の目的細胞(砂場の砂)の中に紛れているiPS細胞(砂場に落とした宝石)を探すのは大変だが、
選択的分化細胞障害性ウイルスベクターによって目的細胞(砂)を除去すれば、
iPS細胞(宝石)を見つけやすくする

選択的分化細胞傷害性ウイルスベクターによる混在iPS細胞(ハザード)の濃縮 研究の背景及び目的



iPS細胞

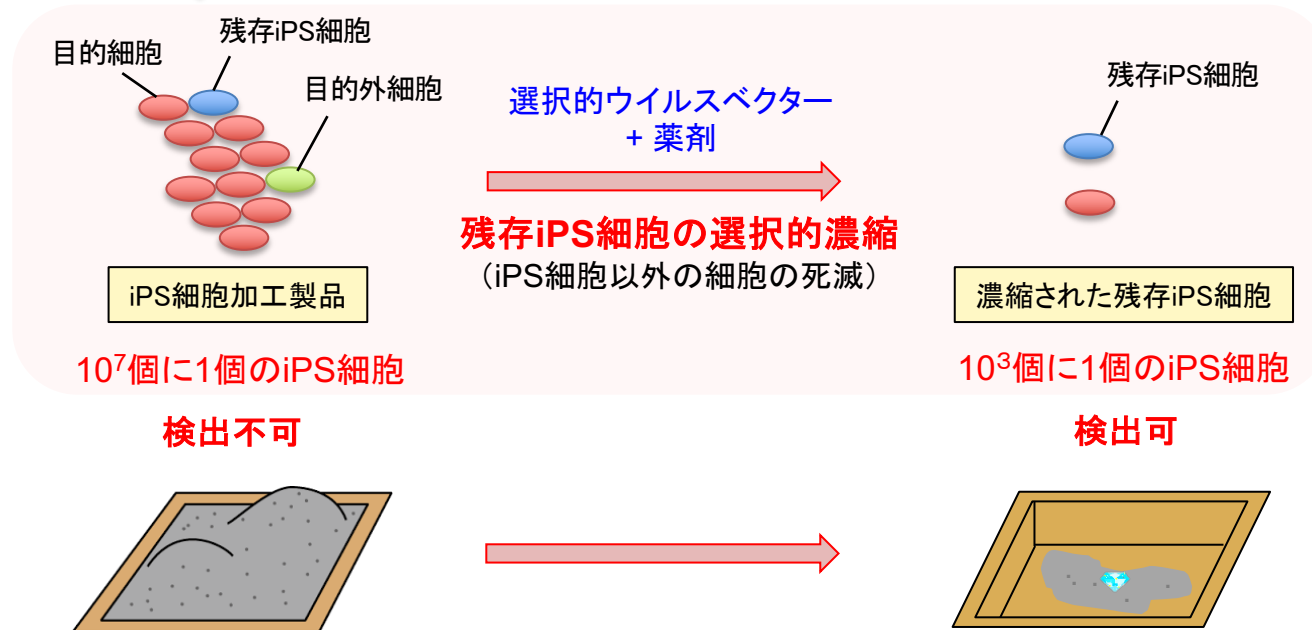
導入遺伝子を強力に発現させるために一般的に用いられているCMVプロモーターは、ヒト多能性幹細胞では不活化している
(Norrman K, et al., PLoS One. 2010;5:e12413.)



薬剤応答性
自殺遺伝子



CMVプロモーター下流に自殺遺伝子を挿入したベクター
を作製すれば、残存iPS細胞の選択的濃縮が可能ならず



選択的分化細胞傷害性ウイルスベクターによる混在iPS細胞(ハザード)の濃縮 実験材料

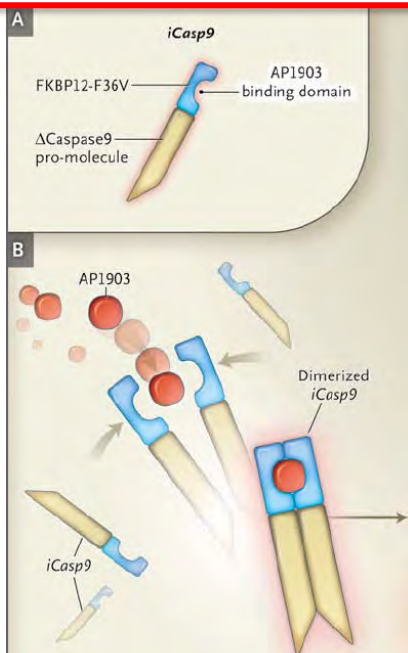
薬剤応答性自殺遺伝子の選択

単純ヘルペスウイルス1型-チミジンキナーゼ(HSV-TK)遺伝子

HSV-TKは、抗ウイルス薬として汎用されているガンシクロビル(GCV)をリン酸化し、DNA合成阻害活性を有する毒性物質に変化させるため、このHSV-TK遺伝子を導入された細胞は、GCV投与によりアポトーシスを起こし死滅する。

【本研究で使用する上での問題点】

- ・目的分化細胞(心筋細胞)は増殖活性が低下しているので、DNA合成を阻害してもアポトーシスを起こさない可能性がある
- ・Bystander effectがある(リン酸化されたGCVはgap junctionを通過して隣接細胞にも取り込まれる)ため、HSV-TKを発現しないiPS細胞にも自殺効果がでる可能性がある



iCaspase 9

ヒトFK506結合タンパク質(薬剤との親和性を高くするためにF36Vの変異が入っている)とCaspase 9の組換え融合タンパク質。AP1903存在下で二量体化し、Caspase 3を活性化する。活性化されたCaspase 3はDNAのフラグメント化等を起こし、アポトーシスを誘導する(**細胞増殖は必要ない**)

ヒトiPS細胞に由来する分化細胞(心筋細胞)に残存・混入する未分化なiPS細胞(造腫瘍性細胞)の検出方法の開発

選択的分化細胞傷害性AAVウイルスベクターによる混在iPS細胞(ハザード)の濃縮

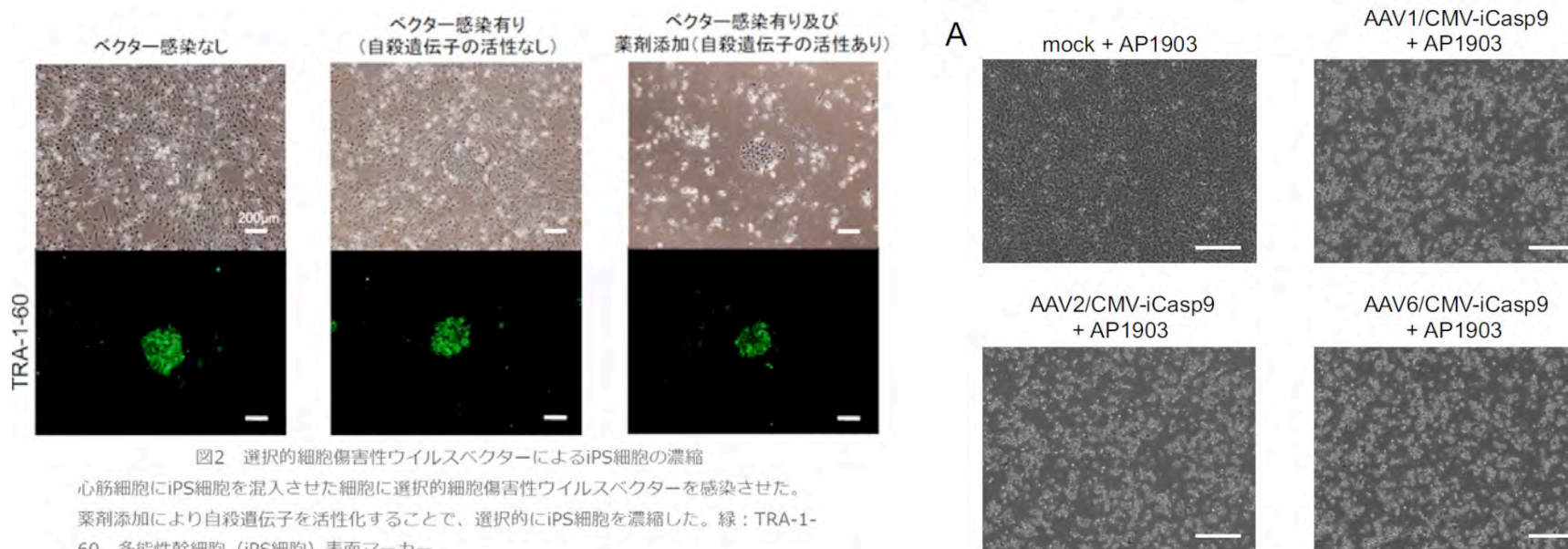
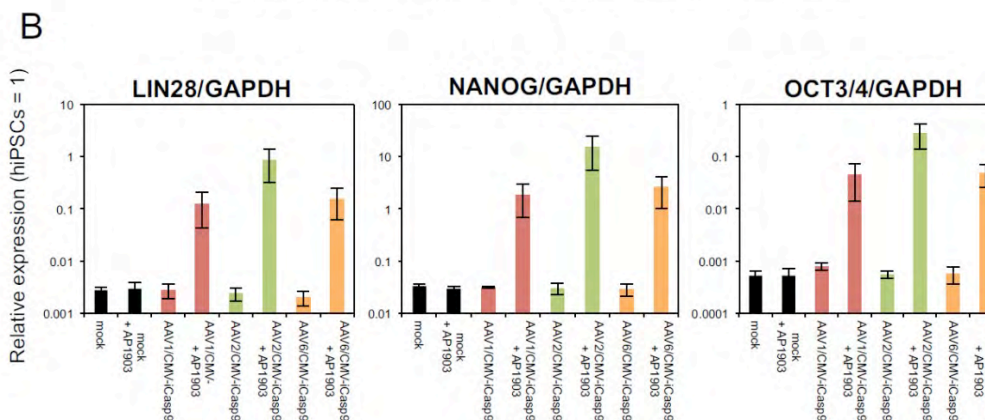


図2 選択的分化細胞傷害性ウイルスベクターによるiPS細胞の濃縮

心筋細胞にiPS細胞を混入させた細胞に選択的分化細胞傷害性ウイルスベクターを感染させた。薬剤添加により自殺遺伝子を活性化することで、選択的にiPS細胞を濃縮した。緑：TRA-1-60、多能性幹細胞(iPS細胞)表面マーカー

未分化細胞マーカーの発現量が高い→
=残存する未分化な細胞の濃縮を示唆
(未分化マーカー遺伝子のmRNA換算で
数十～数百倍の濃縮)



CQAを探索・評価する際の課題

➤ 安全性関連のCQA(ハザードの質と量)

不均質な分布を示すハザード・有害不純物を漏れなく
検出できているか？測定法の感度を理解しているか？

=偽陰性(&偽陽性)の回避

➤ 有効性関連のCQA

有効性を裏付ける細胞機能とリンクした細胞特性を

薬理

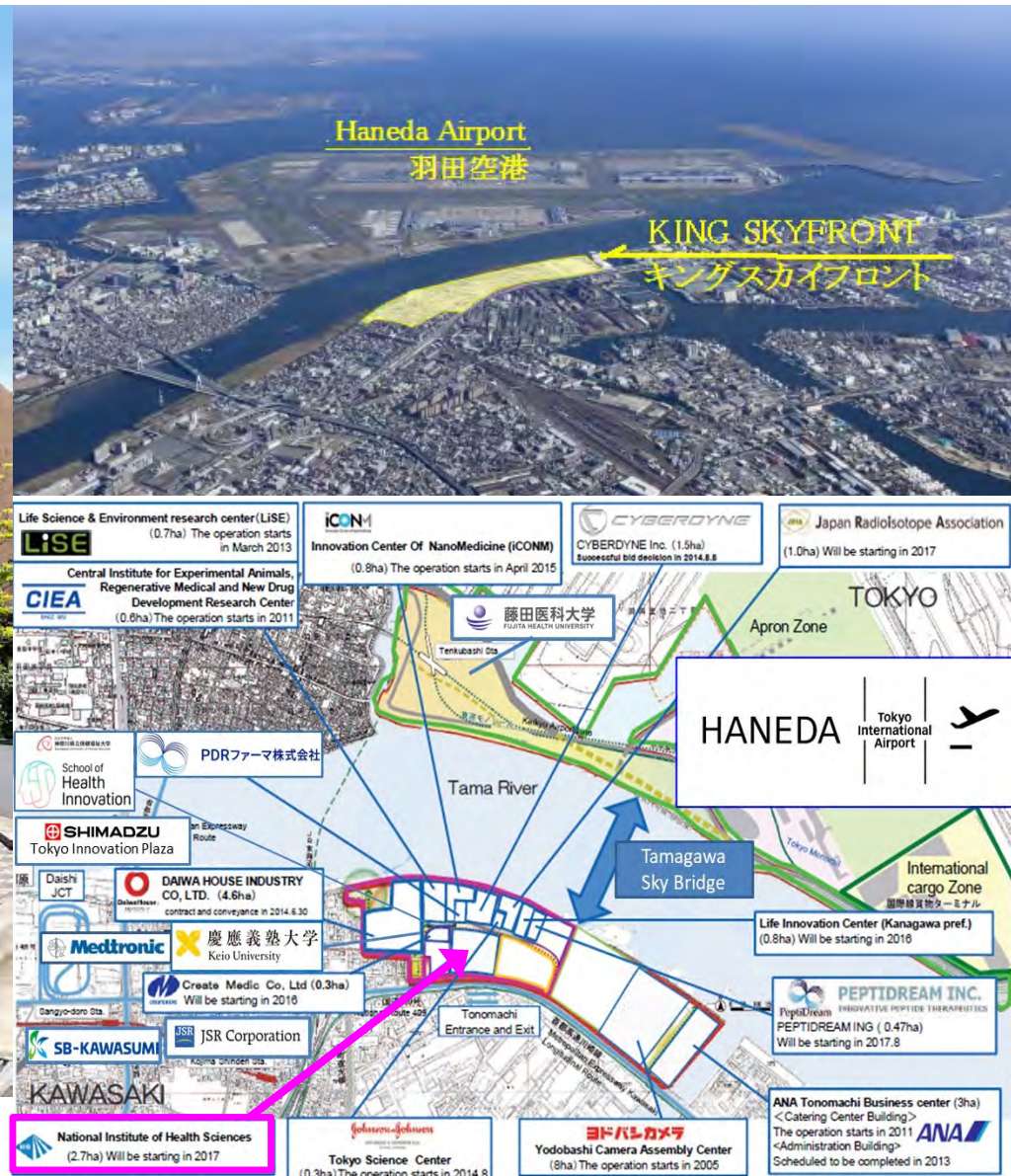
いかに同定する(掘り当てる)か？

… **作用機序**が明確でない製品の場合は、とても難しい



国立医薬品食品衛生研究所

現所在地:川崎市殿町国際戦略拠点(2017年度~)



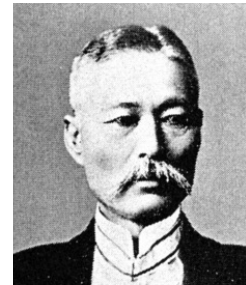
- 1874年「東京司薬場」として設立
- 日本で最も古い国立試験研究機関

➤ 歴代所長

テトロドトキシン
分離成功

東京帝都復興計画

エフェドリン発見者



永松東海(初代)、柴田承桂(2代)、後藤新平(5代)、
長井長義(6代)、田原良純(7・9代)...

石館守三(16代)、内山充(21代)、寺尾允男(22代)、
首藤紘一(23代)、長尾拓(24代)、
合田幸広(30代・現所長)



ハンセン病治療薬
としての「プロミン」
(グルコスルホン
ナトリウム)の開発

日本初の世界的
ブロックバスター
「ヘルベッサ」
(塩酸ジルチアゼム)
の開発

150年前の薬学 vs. 戦後の薬学(～現在)

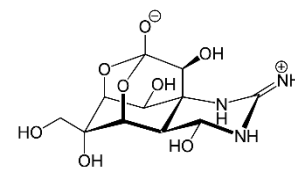
有効成分・作用主体が同定されて初めて
薬理学や毒性学が始まる



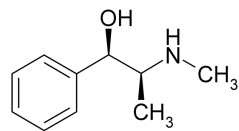
麻黄



フグ



テトロドトキシン



エフェドリン

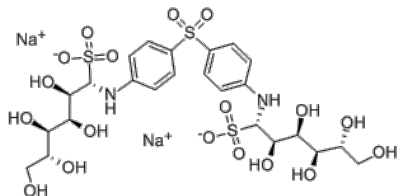


ヘルベッサー
(ジルチアゼム)

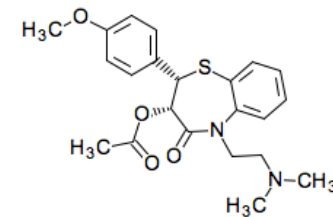


長井長義(6代)、田原良純(7・9代)…
石館守三(16代)、

長尾拓(24代)、



プロミン
(グルコスルホンナトリウム)



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・細胞集団の不均質性を理解するための技術領域

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、

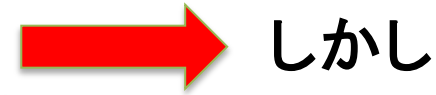
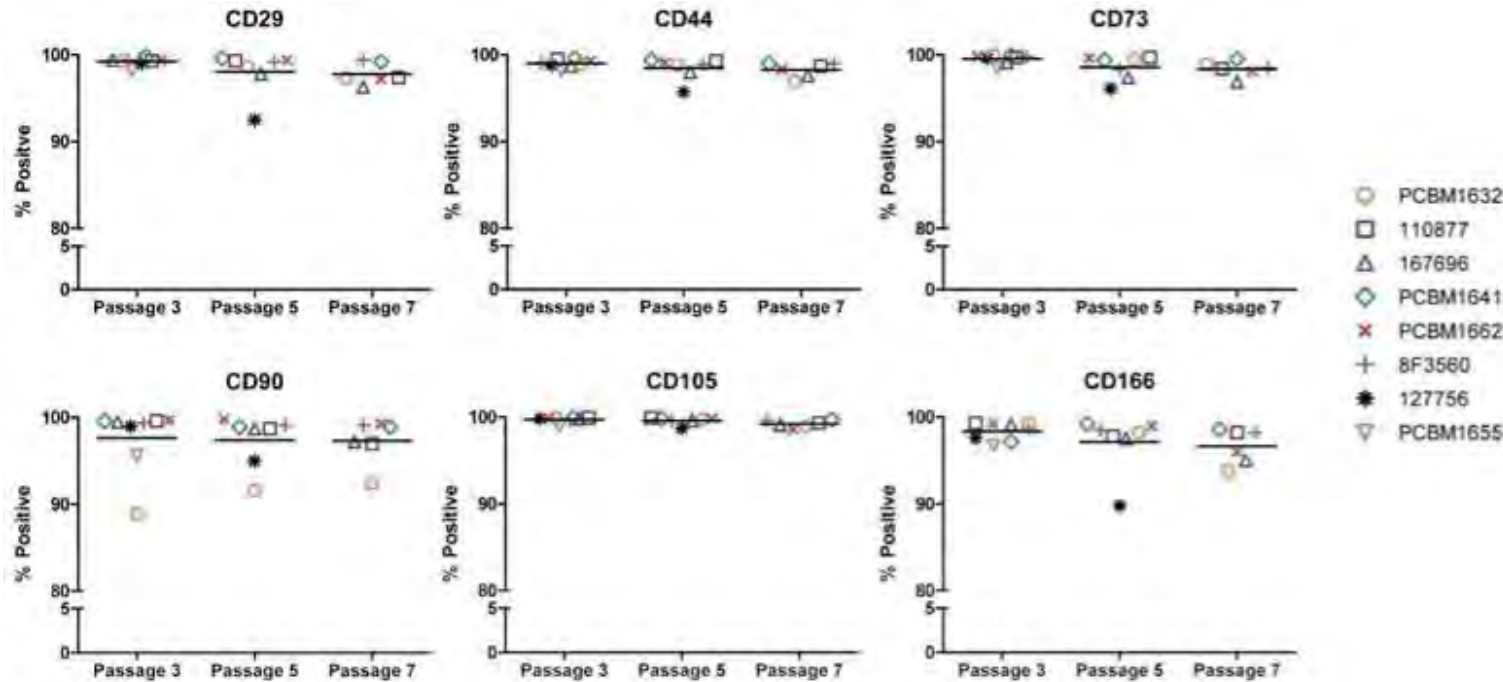
有効性に関連するCQA(重要品質特性)を発見しやすくなる

(・・・と期待できる)

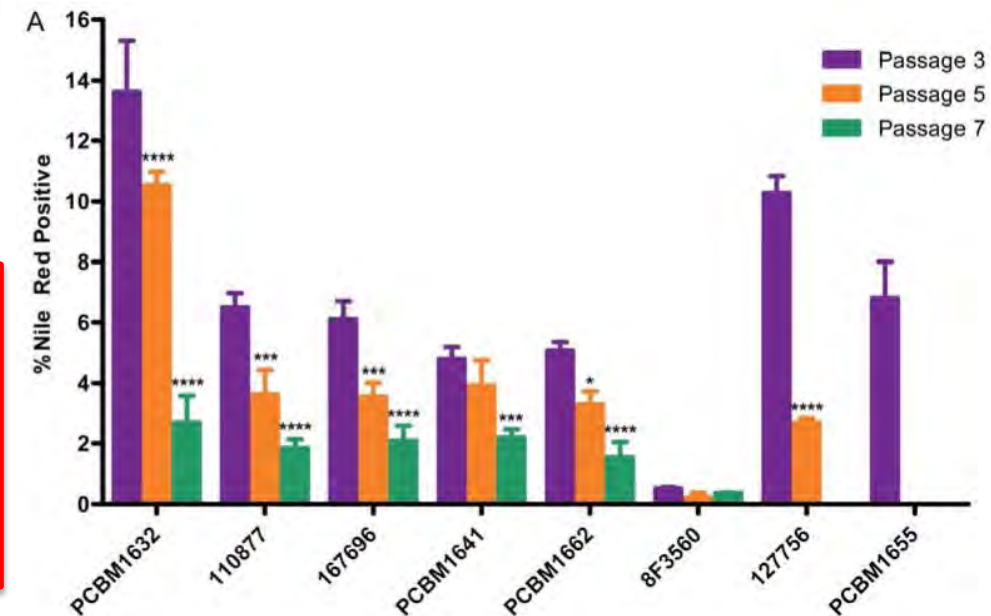
有効性を予測できる品質特性でなければ、 同等性／同質性評価のための有効性関連CQAにはならない

事例) MSCでは継代を重ねても細胞表面マーカーの発現が維持される。

Lo Surdo JL *et al.*,
Cytotherapy.
2013;15:1527-40.



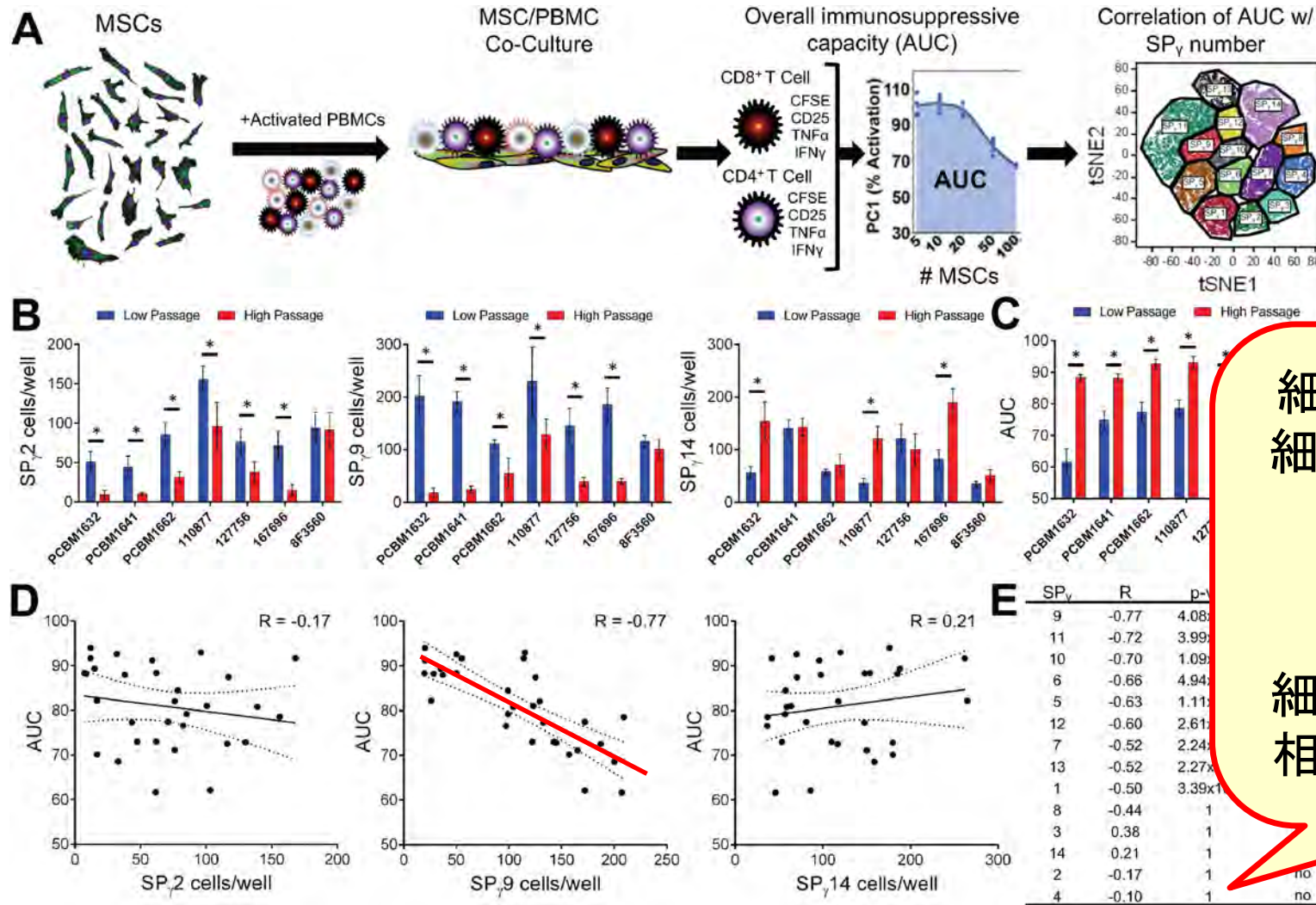
これらのMSCの脂肪細胞分化能は、
ドナーによるばらつきと、
継代数増加による低下の両方を示す。



MSCに「脂肪細胞への分化能」を期待する製品
の場合は、従来のCD抗原マーカーでは
同等性／同質性評価はできない。

不均質性を「見える化」する技術

例) 画像解析



Marklein RA *et al.*,
Cytotherapy.
2019;21:17-31.

細胞の不均質性を、
細胞形態の画像から
数値化

細胞機能(有効性)と
相関する特徴を同定

IFN γ 刺激後の間葉系幹細胞の形態的特徴を手掛かりに、
その免疫抑制活性を予測することができる

不均質性を「見える化」する技術

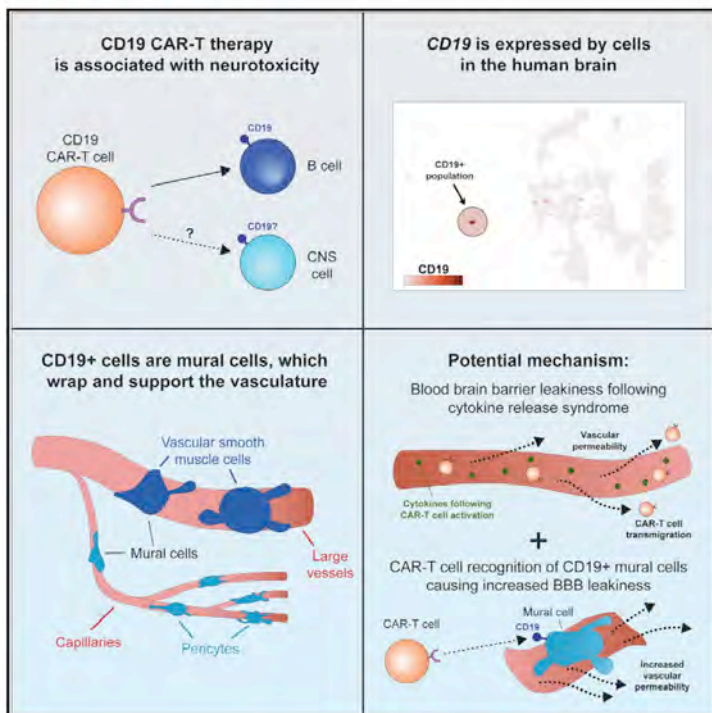
例) シングルセル・トランスクリプトーム解析

Cell

Single-Cell Analyses Identify Brain Mural Cells Expressing CD19 as Potential Off-Tumor Targets for CAR-T Immunotherapies

<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2820%2931013-8>

Graphical Abstract



Authors

Kevin R. Parker, Denis Migliorini, Eric Perkey, ..., Howard Y. Chang, Avery D. Posey, Jr., Ansuman T. Satpathy

Correspondence

denis.migliorini@hcuge.ch (D.M.), satpathy@stanford.edu (A.T.S.)

In Brief

Single-cell RNA sequencing analysis shows that CD19, primarily considered as a B cell-specific surface antigen, is expressed in human brain mural cells that are critical for blood-brain-barrier integrity, suggesting that this cell population may contribute to the neurotoxicity of CD19-directed immunotherapy including CAR-T.

Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia

<https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1709919>

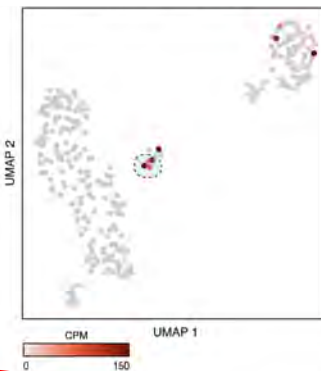
A Subgroup Analysis of Severe Cytokine Release Syndrome



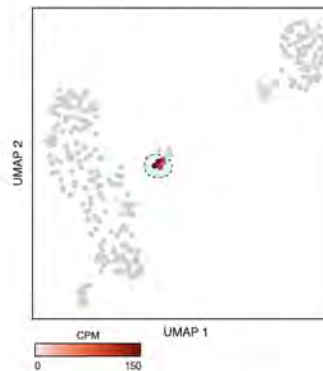
B Subgroup Analysis of Severe Neurotoxic Effects



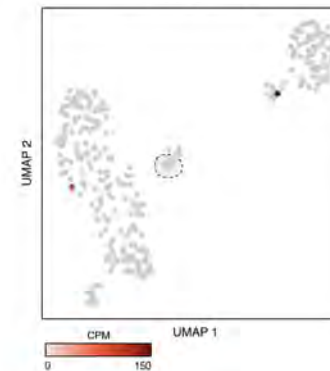
CD19 (CAR-T target)



CD248 (pericytes)



CD79A (B cells)

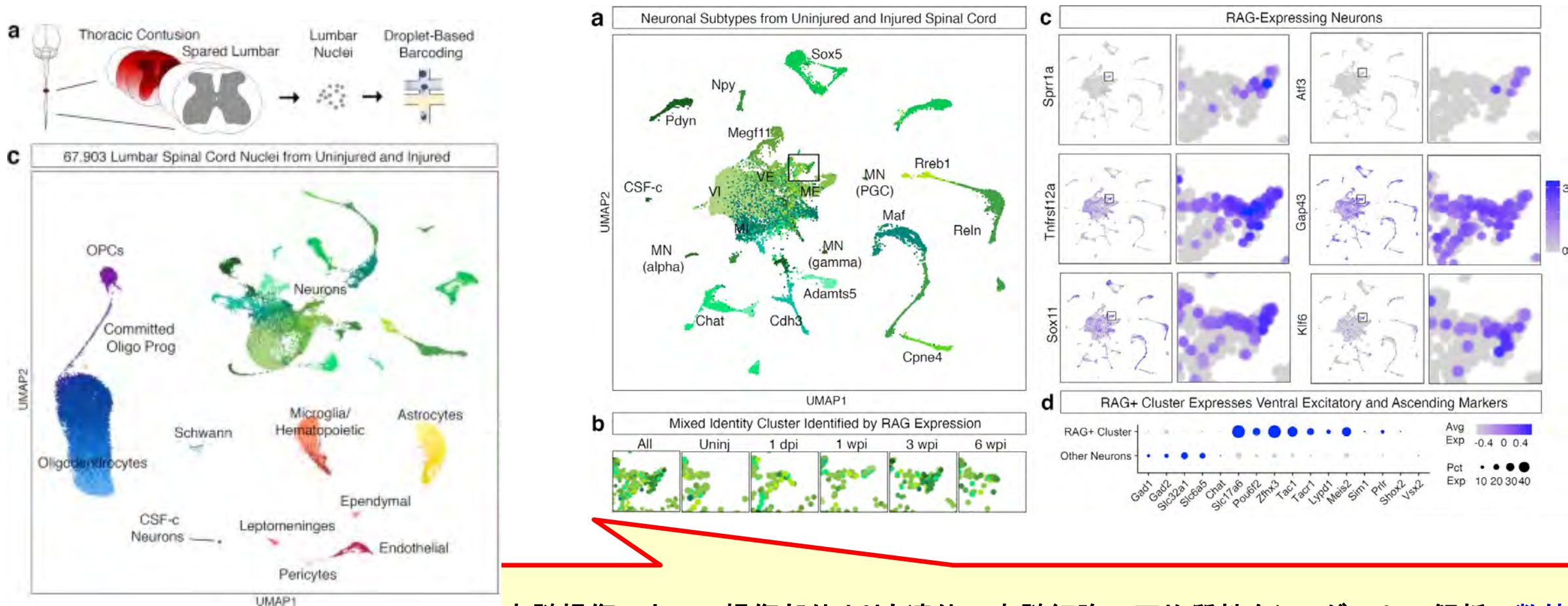


ヒト脳を構成する細胞の不均質性をシングルセル解析で数値化
 ヒト脳血管壁細胞がCD19を発現 → CAR-T細胞の神経毒性と関連?

不均質性を「見える化」する技術

例) シングルセル・トランスクリプトーム解析

Matson KJE *et al. Nat Commun. 2022;13:5628.*



脊髄損傷マウスの損傷部位よりも遠位の脊髄細胞の不均質性をシングルセル解析で**数値化**
 神経細胞集団中の**小さな亜集団**が、**脊髄再生と関連する遺伝子群**を選択的に発現

CQAを探索・評価する際の課題

➤ 安全性関連のCQA(ハザードの質と量)

不均質な分布を示すハザード・有害不純物を漏れなく
検出できているか？測定法の感度を理解しているか？

=偽陰性(&偽陽性)の回避

➤ 有効性関連のCQA

有効性を裏付ける細胞機能試験を実施した新

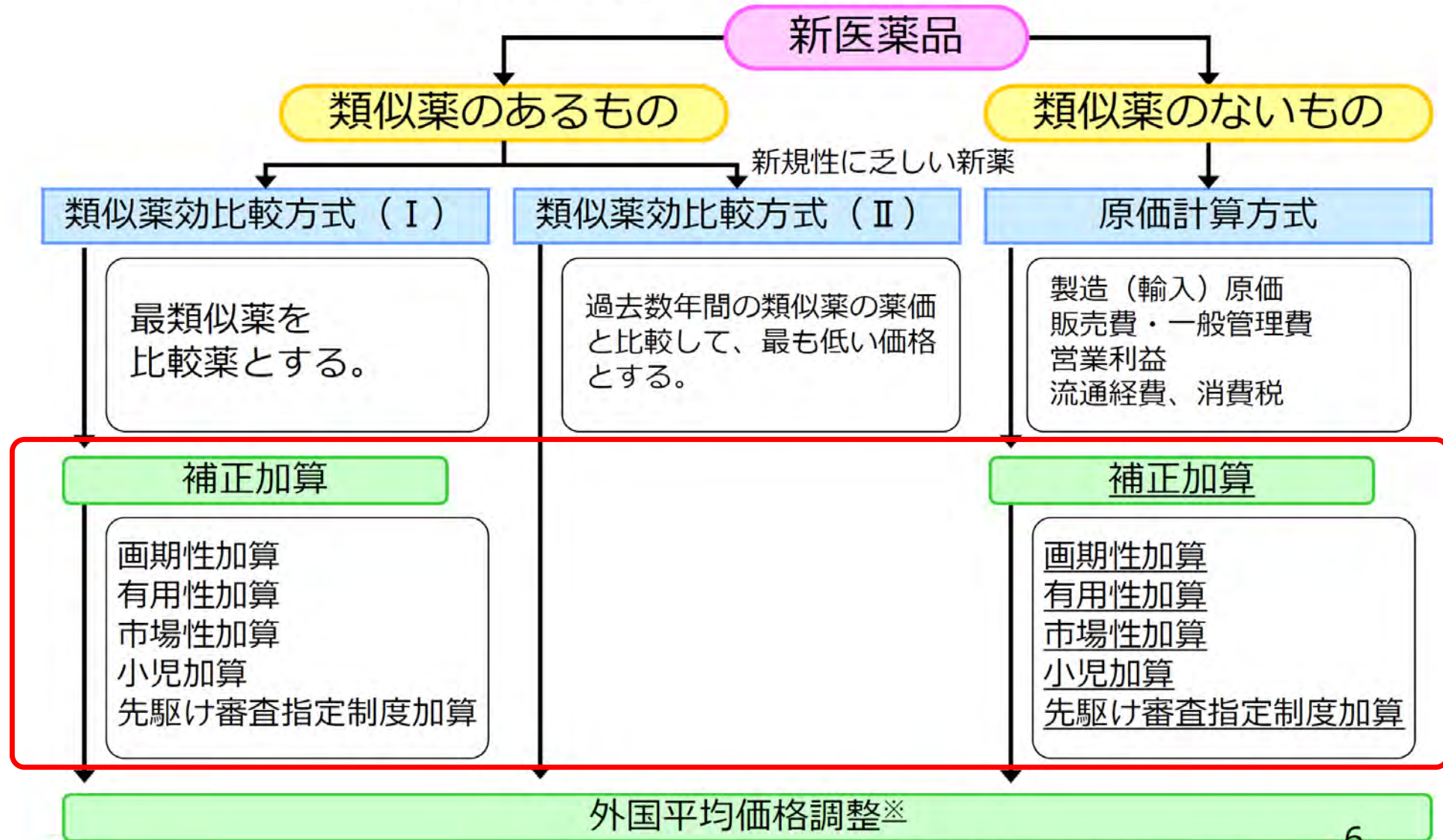
いかに同定する(掘り当てる)か？

薬理

… 作用機序が明確でない製品の場合は、とても難しい

ビジネスの
持続可能性にも
大きく影響

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

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。

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。

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。

画期性加算・有用性加算

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。

ロ 類似薬又は既存薬との比較において、

ハ 当該新規薬が、
副作用の軽減、

ニ 製剤におよぼす
療上の改善

細胞の作用機序・不均質性の理解



知財獲得や画期性加算・有用性加算
= 製品価値の上昇



- 市場優位性獲得
- 投資吸引力上昇
- 供給の持続可能性確保

・・・などが期待できる

学問としての「再生医学」の研究

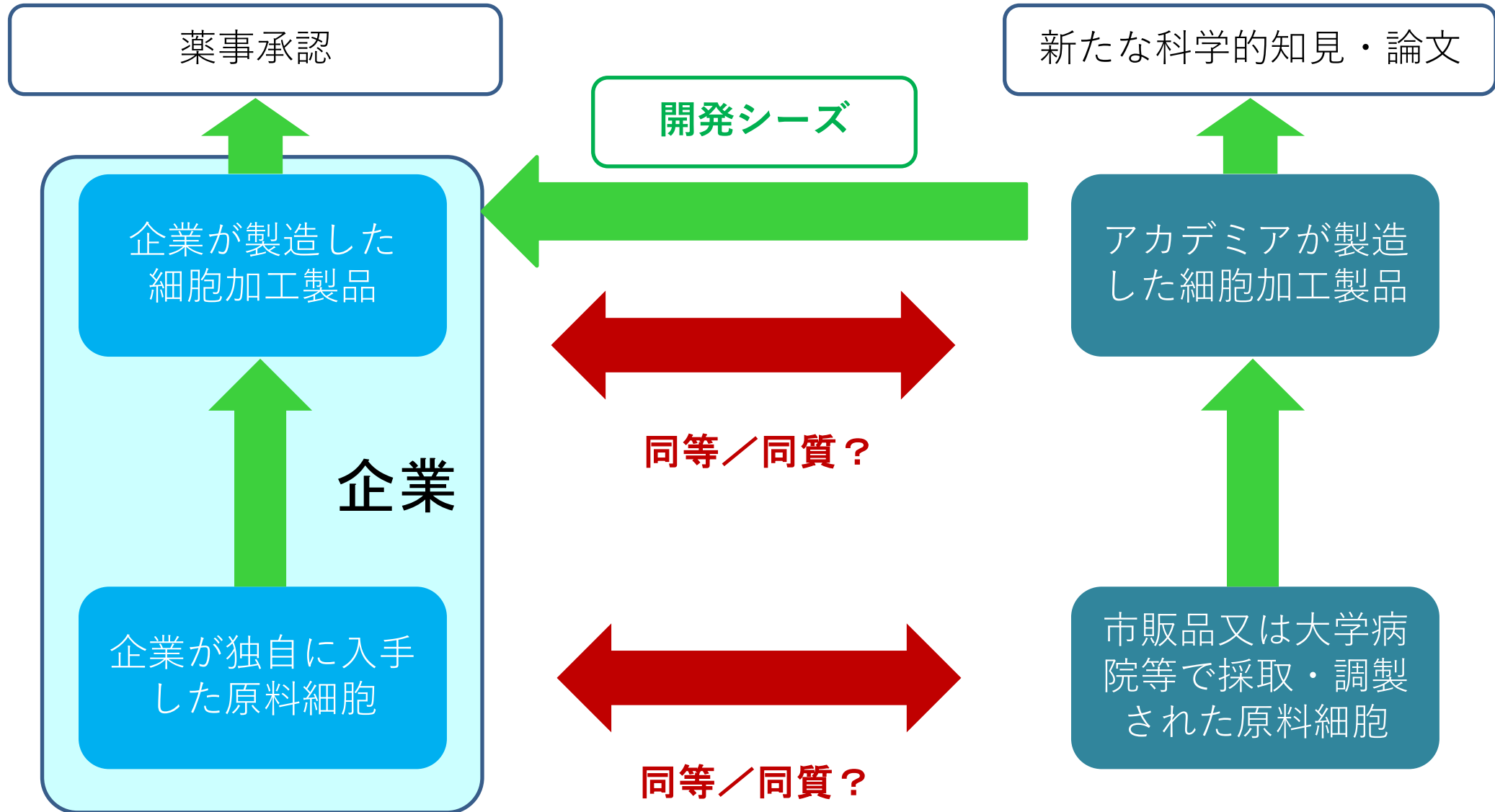
研究領域が発展するにつれて、求められる答えは変化する

- **基礎研究** 「細胞の何が理解できたか？」
- **応用研究** 「どんな細胞ができるのか？どんな医療に使えるそうなのか？」
- **臨床研究** 「できた細胞は本当に医療に使えるのか？安全か？有効か？」
- **実用化研究** 「医療に使う細胞をいかに安く・大量に作り、流通させるか？」

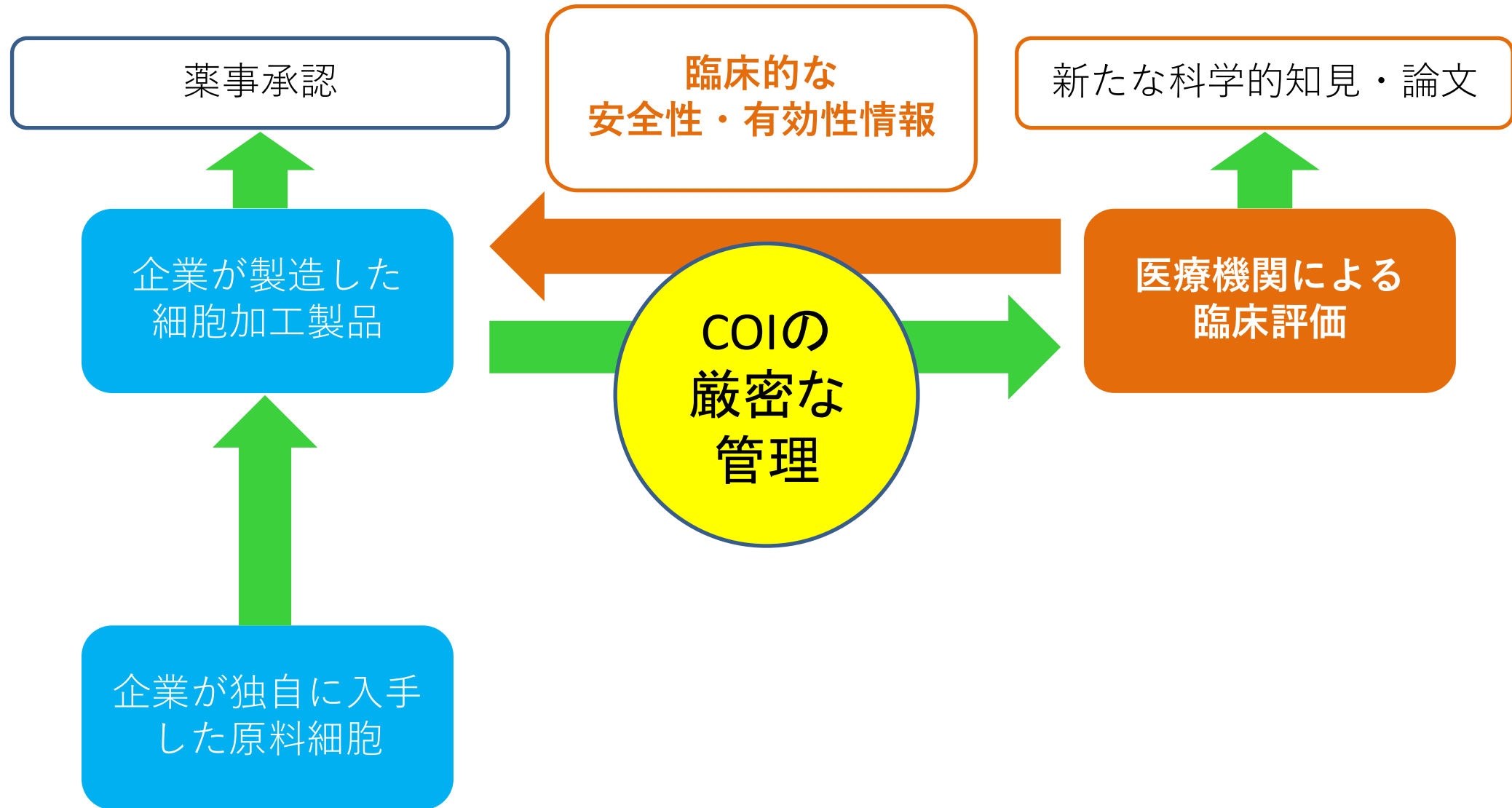


- **基礎研究** 『製品の作用機序』『細胞集団の不均質性』を理解する

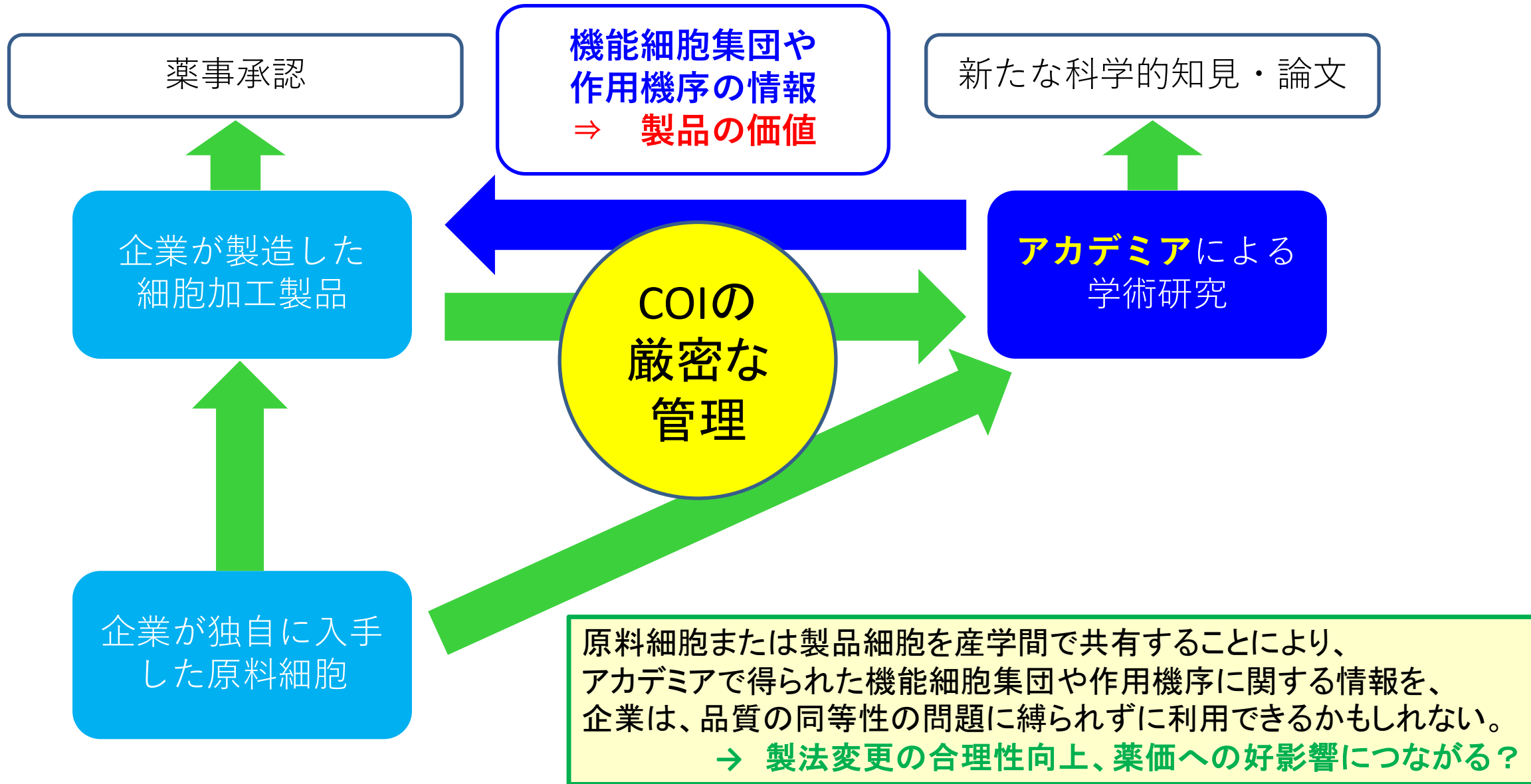
従来の細胞加工製品の開発 (1)



従来の細胞加工製品の開発 (2)



不均質性の「見える化」や機能細胞・作用機序の理解



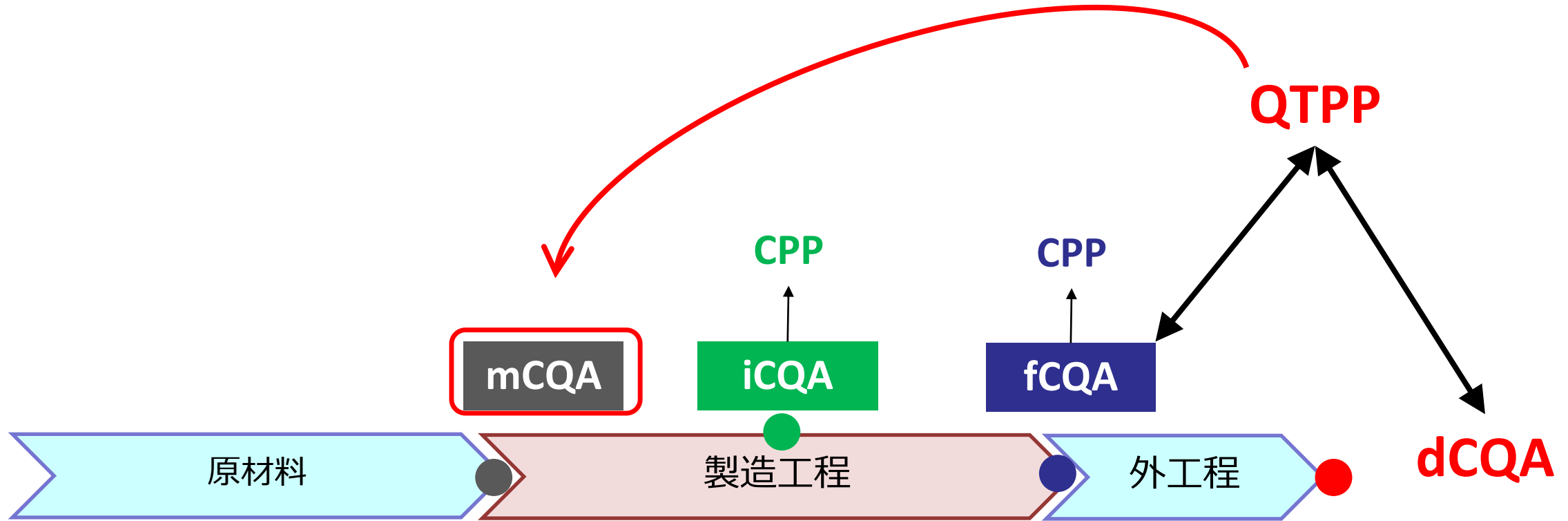
“...、多くの人々が「そもそも**価値とは何か？**」を理解していません。
価値を理解していないと、次のようなことが起こります。”

- 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



田尻 望 (カクシンCEO、戦略コンサルタント)
PRESIDENT Online 2022/12/11
<https://president.jp/articles/-/64232?page=2>

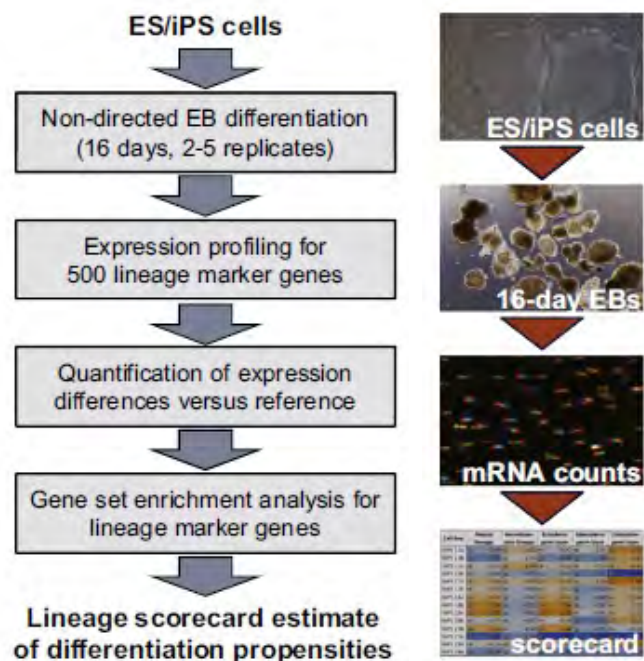
原材料のCQA (mCQA)の探索



「目的に適った細胞基材／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



「多能性」は確かにあるが、株間で「分化傾向」がさまざま

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？

細胞基材のセルバンクでは「目的に適った分化傾向」を品質特性とする必要があるかもしれない

「生きた素材」を使った「ものづくり」

ウイスキー酵母



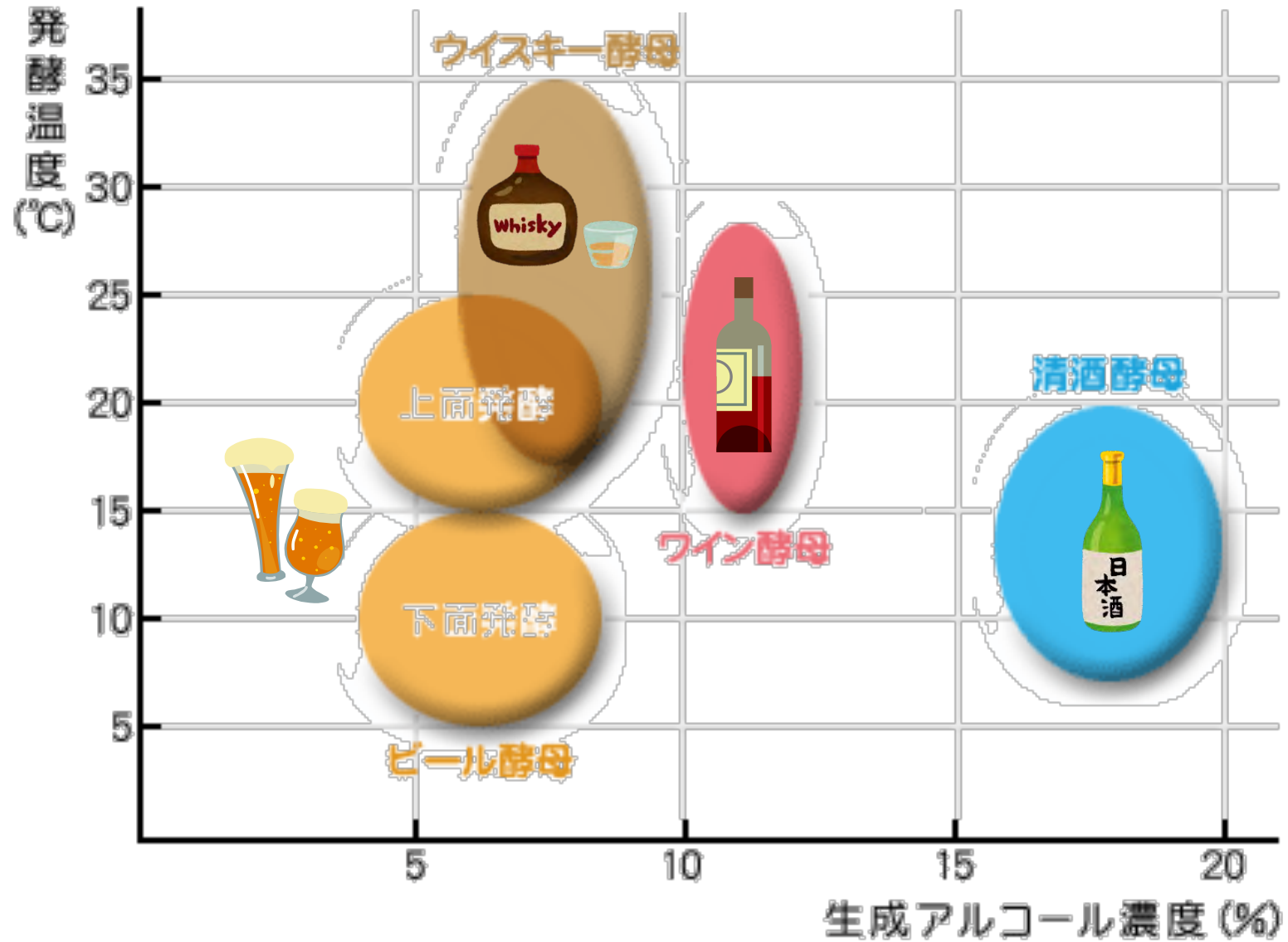
ビール酵母

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



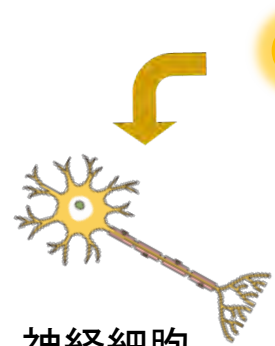
ビール酵母

ワイン酵母

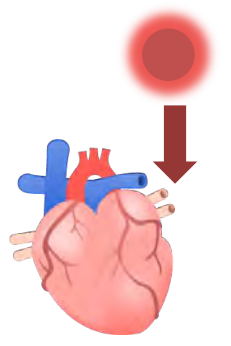


清酒酵母

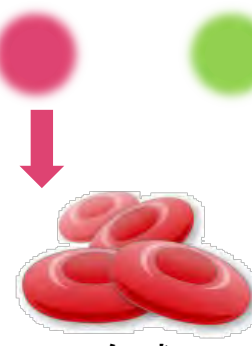
目的に合った酵母(素材)を使い分けることで、各品目で美味しい(高品質な)製品を作ります
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



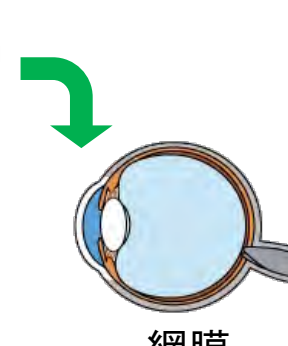
神経細胞



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10年でいど？
では「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○○○らしい味わい』

『○○○はうまさで百三十年』



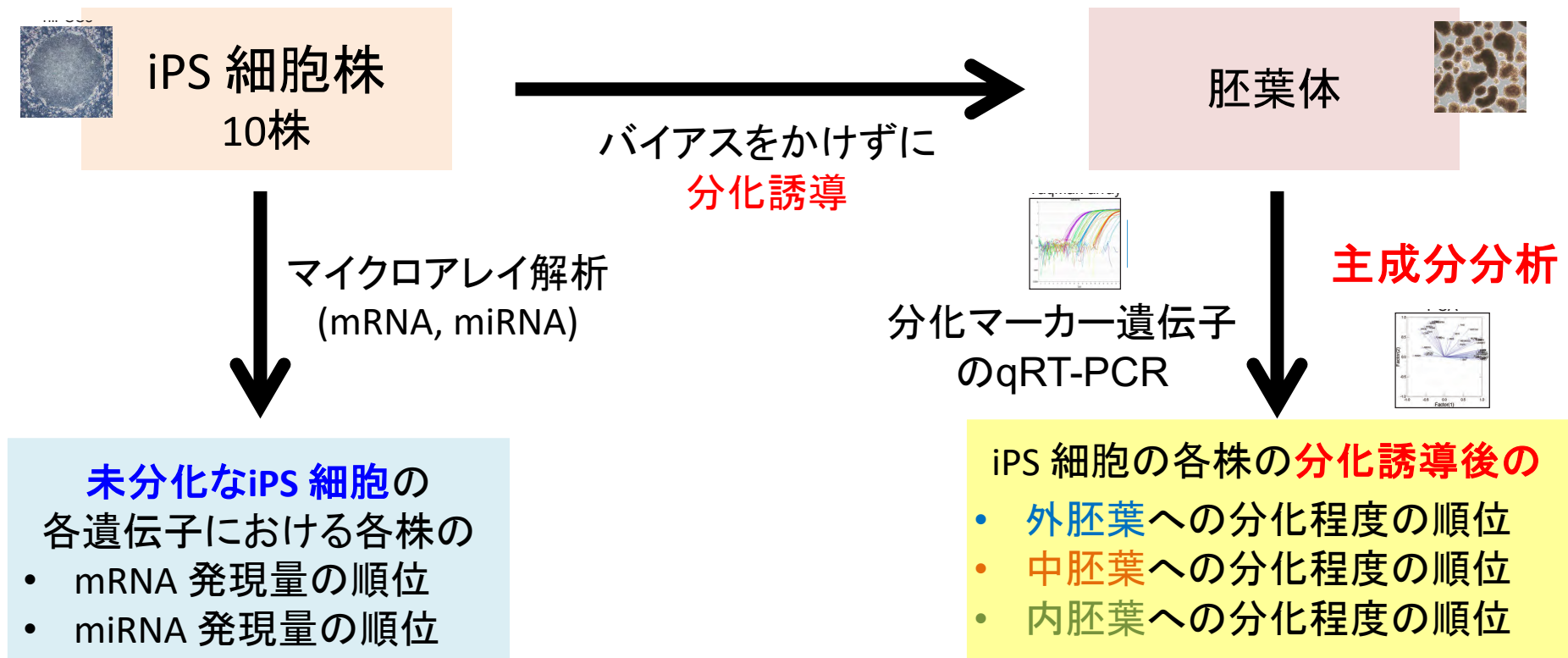
では、どうしたら「良い素材」を選ぶことができるのか？

品質特性指標 バイオマーカー

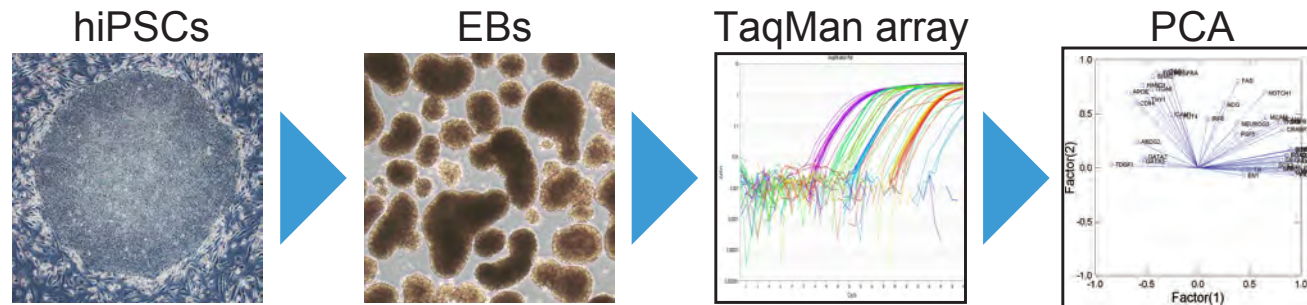
最終目的細胞に再現性高く、高効率に分化するヒト多能性幹細胞を選抜するための、ヒト多能性幹細胞中の特性指標を探し出し、原料の規格設定に利用

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

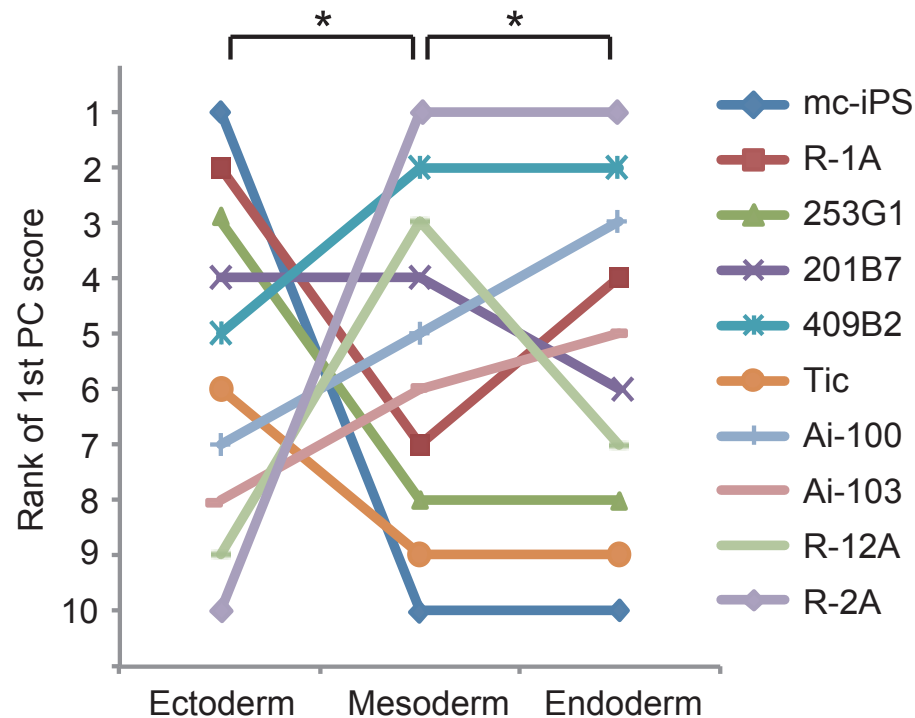


外胚葉マーカー:45遺伝子 中胚葉マーカー:56遺伝子 内胚葉マーカー:27遺伝子

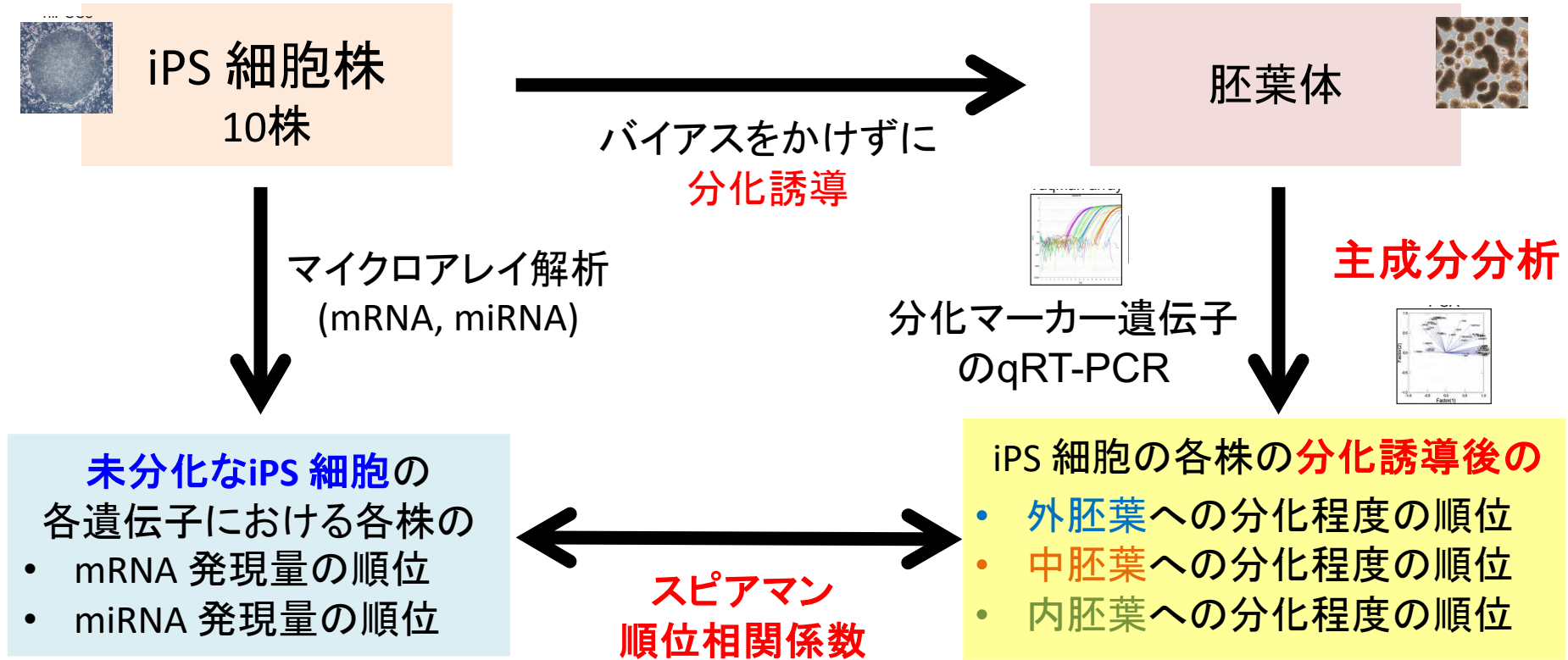
第一主成分得点

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



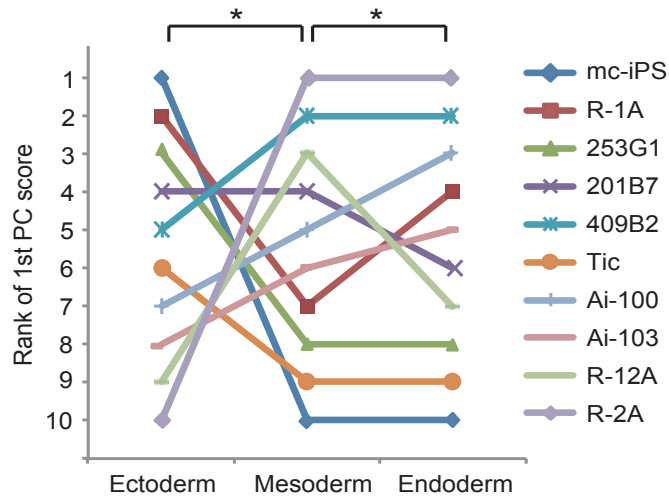
iPS細胞分化傾向マーカーの探索



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

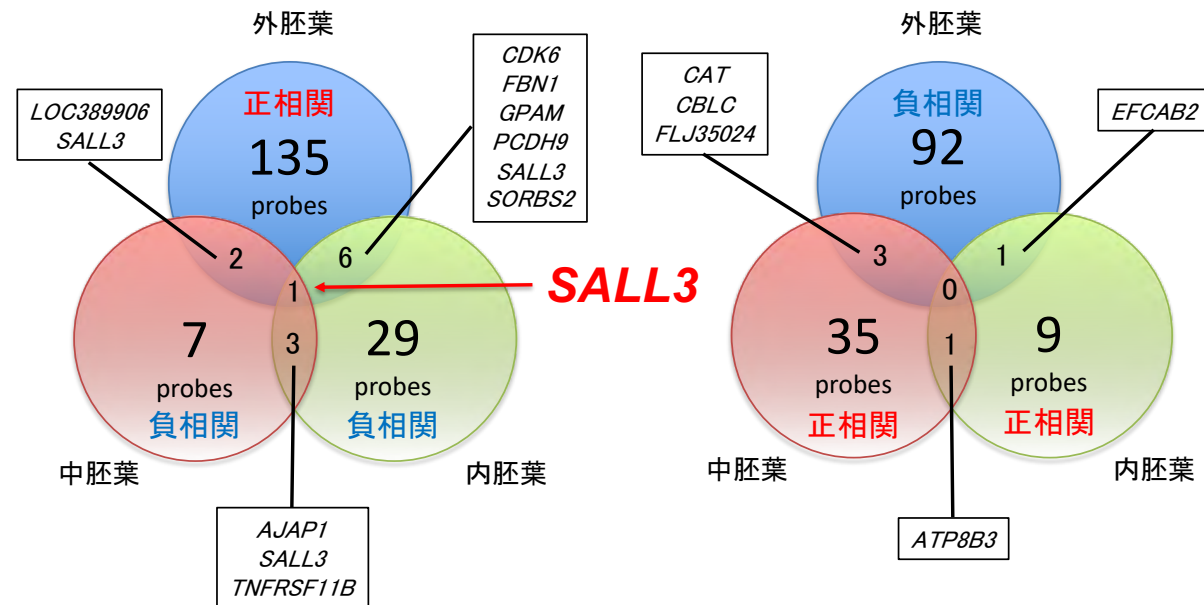
iPS細胞の分化傾向マーカー SALL3



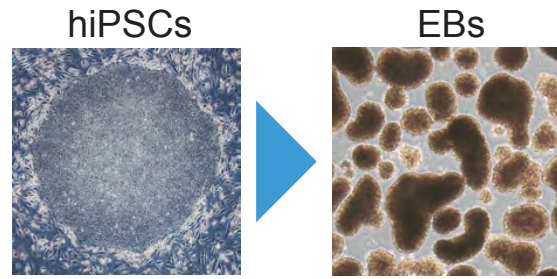
外胚葉になりやすい株は中・内胚葉になりにくい
 中・内胚葉になりやすい株は外胚葉になりにくい

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



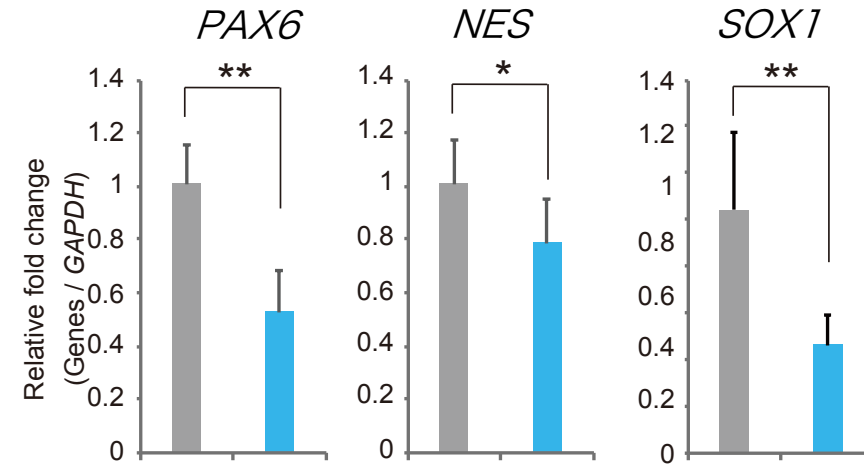
253G1 SALL3KD株 EB分化



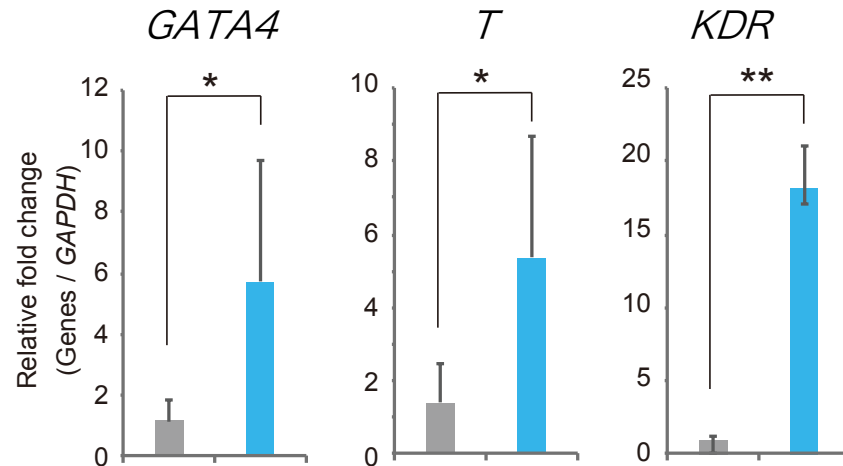
Control shRNA

SALL3 shRNA

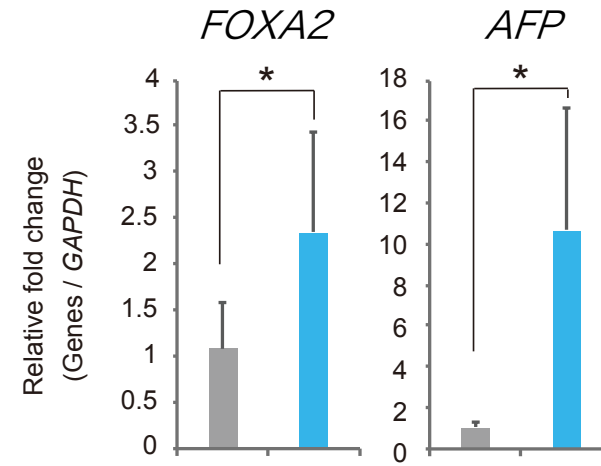
外胚葉マーカー



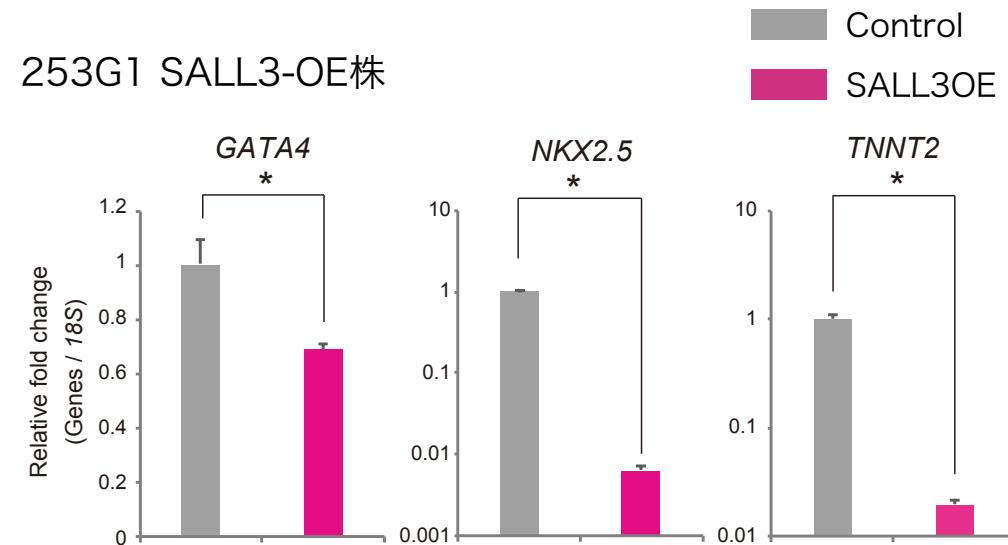
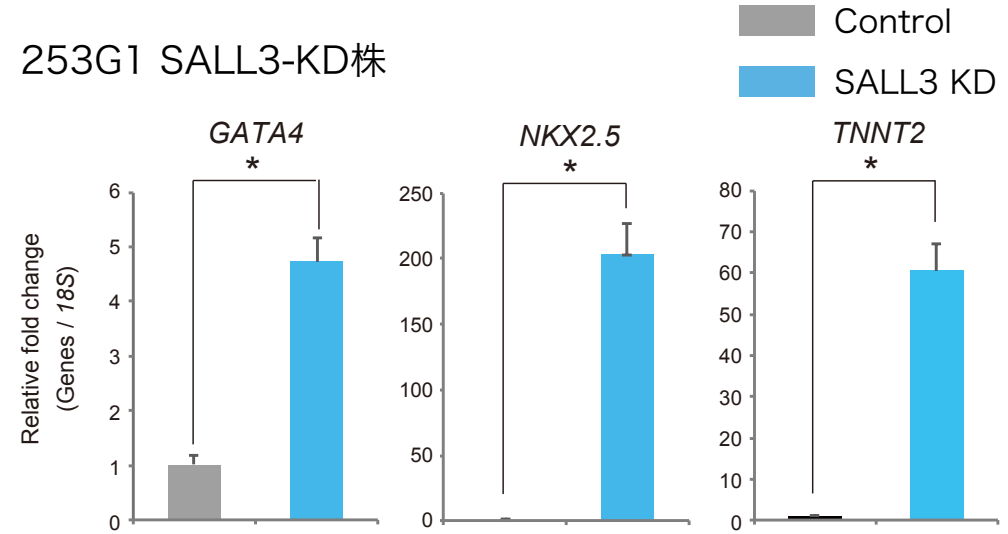
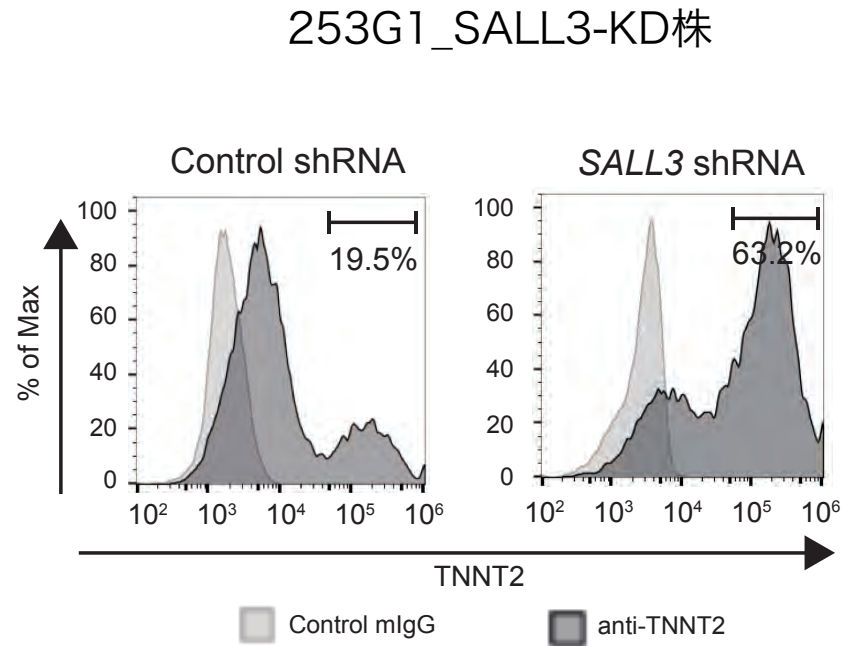
中胚葉マーカー



内胚葉マーカー



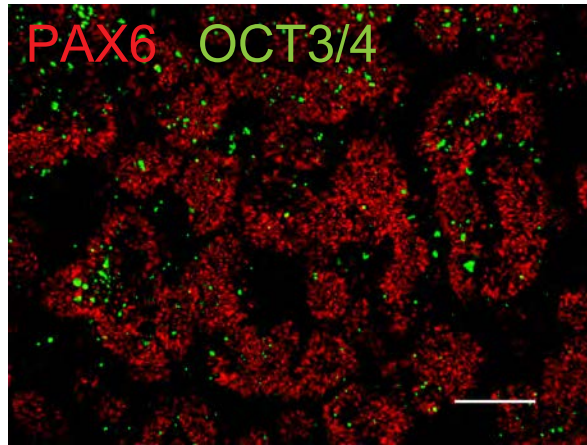
253G1 SALL3 KD/OE株 心筋分化誘導



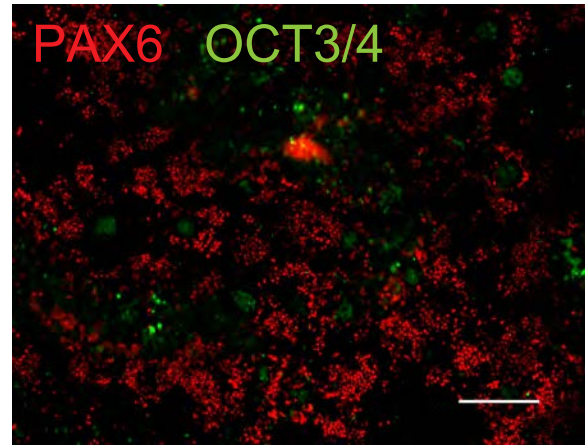
253G1 SALL3 KD/OE株 神経分化誘導

神経分化誘導 (Day10)

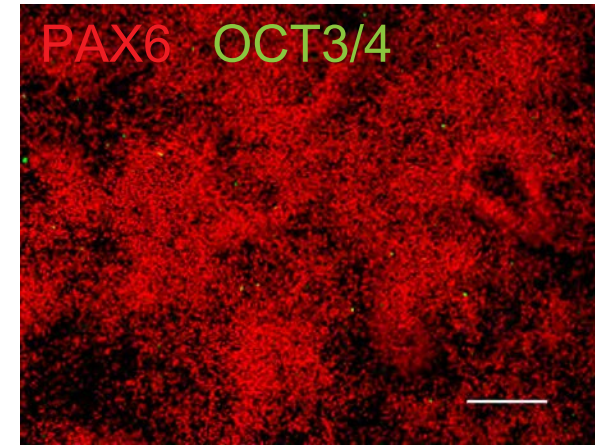
PAX6: 外胚葉マーカー



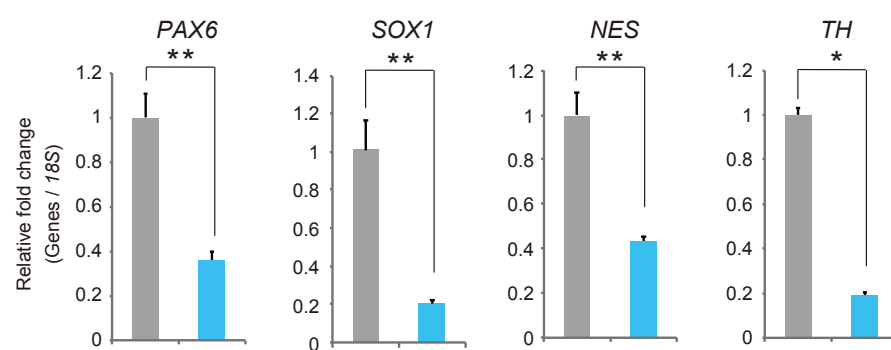
253G1



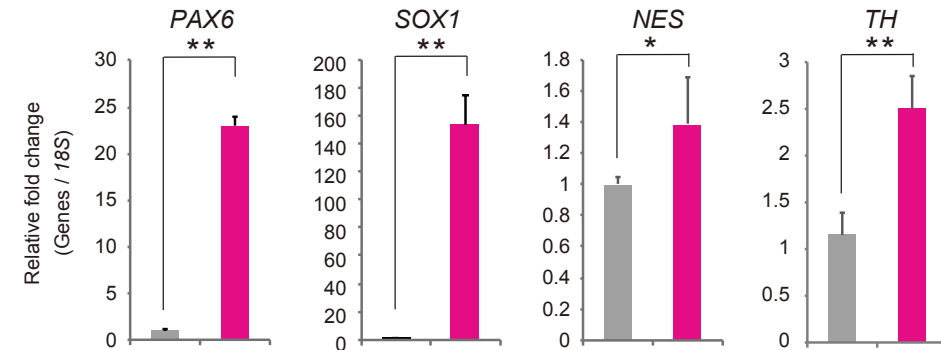
253G1_SALL3-KD



253G1_SALL3-OE



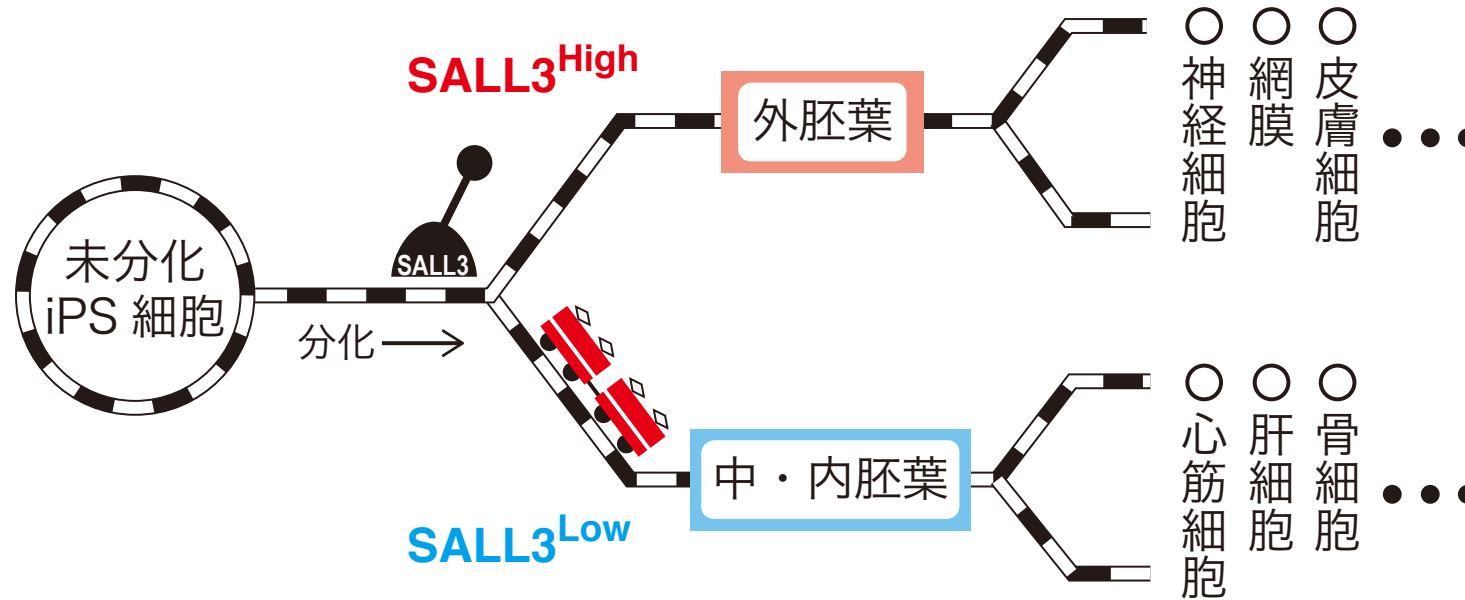
Control
SALL3 KD



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。

『勝ち続ける「仕組み」をつくる 瀬祭の口ぐせ』

旭酒造会長 桜井弘志 (KADOKAWA刊)

「経験と勘」を見える化する

データ化が「経験と勘」を凌駕する



謝 辞

国立医薬品食品衛生研究所
再生・細胞医療製品部の皆様

再生医療イノベーションフォーラム
多能性幹細胞安全性評価委員会
ならびにAMED MEASURE1/2プロジェクトの皆様

HESI CT-TRACSメンバーの皆様

実験動物中央研究所 伊藤守所長ならびに所内の先生方

大阪大学大学院医学系研究科 澤芳樹先生
ならびに研究室の先生方

大阪大学大学院薬学研究科 水口裕之先生

大阪はびきの医療センター 松山晃文先生

昭和薬科大学 宇都口直樹先生・小泉直也先生

神戸医療産業都市推進機構 川真田伸先生



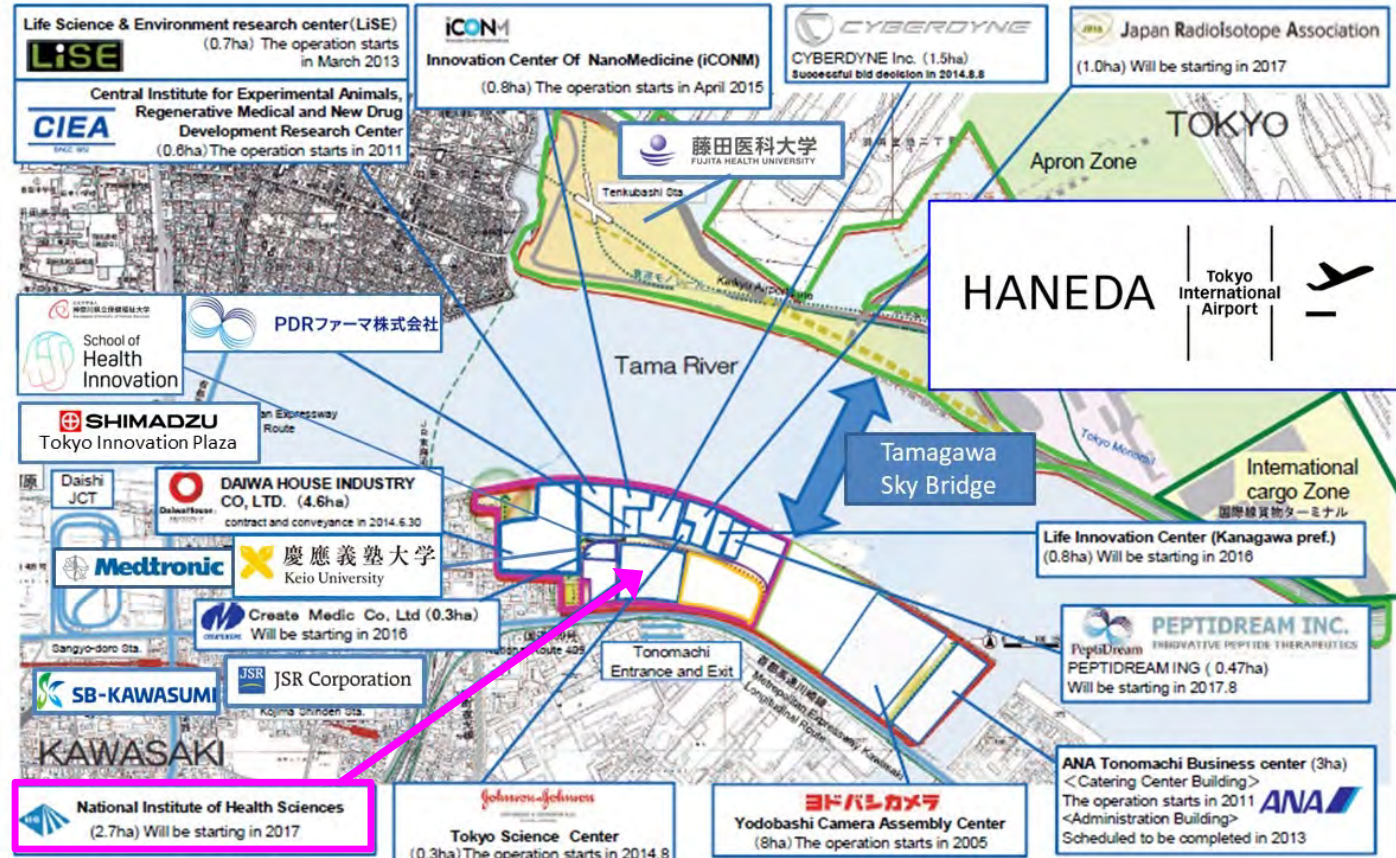
ご清聴、ありがとうございました



佐藤陽治

国立医薬品食品衛生研究所 再生細胞医療製品部

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