

山口大学大学院医学系研究科 消化器内科

高見太郎准教授への自己骨髄由来間葉系幹細胞を用いた肝臓再生医療の臨床研究に関するインタビュー

インタビュー実施日：2020年6月12日

山口大学大学院 医学系研究科 消化器内科学 坂井田 功 教授・高見 太郎 准教授（インタビュー当時）らは、肝硬変に対する自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の実現に向けて取り組まれている。2003年11月に世界で初めて実施された自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法¹⁾では、全身麻酔より採取した約400mLの骨髄液を使用して、非培養の全骨髄単核球細胞分画を点滴で投与する治療法にて実施された。その後国内外の共同研究を経て、その治療法の安全性と有効性が証明されたことで、現在、本治療は先進医療Bとして承認されている。しかしながら全身麻酔で400mL採取するのは侵襲度が高いことから、2008年より少量の骨髄液から間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell: MSC）を培養して投与する低侵襲な肝臓再生療法の研究に取り組まれている。当初は培養した細胞を末梢静脈から投与する方法で実施したが、安全性は確認されたものの有効期間がそれほど長くなかったため、治療法の改良を行い、同じ細胞を肝動脈から肝臓に直接投与の方が肝機能の改善が良いことを橋渡し研究で確認された。そのような研究を経て、現在は少量の自己骨髄液から培養したMSCを用いた肝臓再生療法を再生医療安全性確保法のもとで行う臨床研究に取り組まれており、医師主導治験（自己完結型肝硬変再生療法）の準備を進めている。



山口大学大学院医学系研究科
消化器内科学 准教授
（インタビュー実施時）
高見 太郎 先生

味の素(株)は、坂井田教授・高見准教授との共同研究（2019年度には寄附講座・肝臓再生基盤学、澁谷工業株式会社）において、臨床使用可能な生物由来原料基準に該当する成分を含まない間葉系幹細胞用培地StemFit® For Mesenchymal Stem Cell（MSC）の開発に成功し、製品化した。本製品は坂井田教授らの医師主導治験で使用される。山口大学医学部 消化器内科のこれまでの肝臓再生療法のご研究に関しては、MSCを用いた再生医療の領域で大変注目されており、この度味の素(株)は、高見准教授にインタビューを実施し、肝臓再生療法に関する最先端のご研究や臨床研究・治験に向けた取り組みに関して御話を伺った。

－ご研究の概況と医師主導治験に向けた取り組みについて

現在の状況としては、少量の自己骨髄液から単離し培養したMSCを使った肝臓再生療法の臨床研究を再生医療安全性確保法のもとで行っている。約60mLの骨髄液からMSCを、我々の附属病院にある再生・細胞治療センターで細胞培養アイソレータ（CPI）の中で手培養して、患者様に肝動脈から投与する肝臓再生療法である。10%ウシ胎児血清（Fetal bovine serum: FBS）入りの培地を使用しており細胞の規格試験に合格したものを患者様の肝動脈から血管造影の手技で投与している。現在この臨床研究で既に2例を実施しており、骨髄液の採取～細胞培養～細胞投与に伴う有害事象は認められていない。また詳細は言及できないが、一定の有効性を確認できている状況であるため、より早期に培養骨髄細胞を再生医療等製品として薬事承認を取得することを目指して、医師主導治験に向けた準備を進めている。今年3月末までにPMDA相談を複数回実施し、生物由来原料基準や品質、非臨床安全性試験データ、治験実施計画に関する対面助言を経て、これら合意を得た。今年6月に山口大学のIRBに治験申請をして、その承認が得られ次第、治験届を提出する計画であり、少なくとも今年下半期には医師主導治験を開始したい。

－臨床研究用の細胞を製造するにあたり重要であったこと

患者様の骨髄液を使用しているため、採取できる量が限られている。そのため限られた原料で、高い有効性を発揮させるには、品質の良い細胞を多く製造し、より確実に標的臓器に届けることが必要であると考えた。そこで、細胞を標的臓器である肝臓に確実に届けるために、投与ルート末梢静脈投与から肝動脈投与に変更することを着想し、この妥当性を動物モデルで確認した。また質の高い細胞を製造するために、細胞の劣化が進行していない継代数の少ない細胞を使用している。2008年から本プロジェクトを開始し、できることとして細胞の投与経路の変更を行ったが、細胞をより高品質にすることが依然として課題であった。これまで使用していた培地はγ滅菌照射をしたニュージーランド産のFBSを添加した培地であったが、味の素(株)とStemFit® For MSCの共同開発に取り組み、その課題解決となったことは非常に有り難く有意義な取り組みとなった。また現在は自己骨髄細胞であるが、これまでの細胞品質に関する知見は、他家細胞を用いた治療開発等にも活きると考えている。

一規制医学の観点から苦勞された点、重要であった点

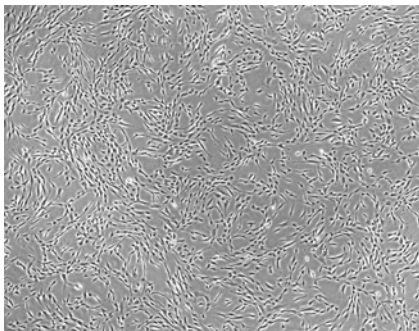
細胞製造のために使用する原材料・非細胞成分の生物由来原料基準適合性や安全性の評価に関しては、PMDAの助言を受けながら手探りで対応してきました。PMDAの先生方にはとても感謝している。特に、造腫瘍試験と一般毒性試験を同じ非臨床モデルで実施できたのは、GLP試験のコスト削減やスケジュールの短縮という点で非常に良かった。細胞の最大投与量を設定するための予備試験をまず実施し、その次の体内動態試験において、私たちが治療に用いた細胞に関しては、投与してから一定期間すると体内からクリアランス（消失）することを確認した。そのため、投与細胞が消失した一定期間後に、同じ非臨床モデル検体を使って腫瘍形成の有無評価と一般毒性評価を実施することができた。また今回の我々の治験は単回投与であるが、体内動態試験で体内から投与細胞がクリアランスされたことが確認されたため、ある一定間隔をあけて投与すれば、単回投与の繰り返しとみなすことができ、反復毒性試験が省略できる可能性があるとのこと示唆もあり、大変勉強になった。今後、反復投与を行うことを見据えると、FBSを使用して培養した細胞投与では、最終製品に一定量のFBS残留があるとアレルギー反応が出る懸念があるため、無血清培地に切り替えていくのが望ましいと考える。再生医療等製品に応じて、それぞれで最適な試験の組み立て方は異なるが、事前にPMDAと試験計画の議論を十分に行った上で非臨床安全性試験を開始することが、コスト削減や期間短縮につながると考えている。

一細胞の品質管理について

MSCを長期継代すると、細胞の老化（細胞形態が扁平大型化して増殖性が低下する現象）やMSCが持つ抗炎症作用の低下が認められ、細胞の質が低下すると考えられており、実際に我々の検討でも経験していた。よって細胞の継代数に関しては、これまで我々の製造では、StemFit® For MSCを使用することで効率的に細胞を増殖させることが可能となったため、細胞の継代数は3回と低く抑えることができていた。またStemFit® For MSCでは、我々がMSCの特性評価を行う上で重要視している、MSC本来の機能（炎症性サイトカインの発現が低値、抗炎症性サイトカインの発現が高値、細胞の老化マーカーが低値）が維持されることが確認できている。

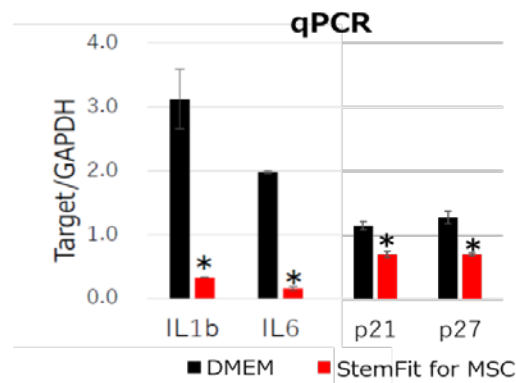
細胞の品質を確認する上では、一般的な指標である無菌試験やマイコプラズマ否定試験、ウィルス否定試験、エンドトキシン試験、細胞の形態学的特徴（目視）、生細胞数、細胞生存率、細胞の表面抗原マーカーを測定している。MSCの品質を評価する上で、細胞の特性解析として測定すべき項目（細胞表現マーカー、タンパク質、遺伝子）は、未だ一般的に確立されていない状況であるが、これまでにTSG6高発現MSCは肝線維化改善効果が高いことを確認している²⁾ (Ref. Fig.1-3)。これまでの臨床研究や今回の医師主導試験は、ある程度探索的な位置づけであるため、測定すべき項目に関しても引き続き検討していく予定であり、MSCの特性解析を行う上で標準的な評価指標を確立していきたい。

Fig.1



StemFit® For MSCで培養された
骨髄由来MSCの顕微鏡画像

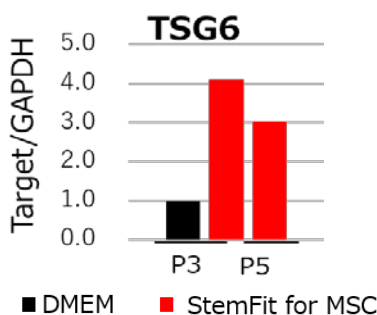
Fig.2



骨髄由来MSCのqPCR解析

StemFit For MSCにて培養されたMSCは、10%FBS含有DMEM群と比較し、低い炎症性遺伝子発現 (IL1b, IL6) と老化マーカー遺伝子発現 (p21, p27) を示した。* p値 < 0.05

Fig.3



TSG6遺伝子のqPCR解析

StemFit For MSCにて培養されたMSCは、10%FBS含有DMEM群と比較し、高いTSG6遺伝子発現が維持された。

一 培地、成長因子などの選定基準、選定の際に注意すべき点

FBSの使用は、前述の通り、頻回投与を想定している場合は望ましくないのは明らかであり、FBSの抱える課題としては、安定供給のリスク、ロット間差やそれによる細胞製品のロット間差、また臨床使用時のγ滅菌照射コストなどが挙げられる。またFBS中にも細胞培養に不要な成分が入っている可能性があり、我々の実験結果からも胎児血清であるものの炎症を惹起する可能性が示唆されている。また、成長因子等のタンパク質素材を使用する場合は、リコンビナントタンパク質を使用する配慮が必要であり、その製造過程においても、使用原料や製造工程が確認できるように選定することが重要である。これらの原材料の選定に関しては、基礎研究の段階から臨床での使用を想定して、なるべく初期の頃に切り替えた方が、後々切り替えによって発生するリスク回避になると考える。当科でも根幹となる培地等は臨床を見据えて、コストはかかっても初期の研究段階から取り入れるようにしている。

一 StemFit® For MSCの使用感について

前述の通り、StemFit® For MSCを使用してMSCを培養することで、効率的に臨床用の細胞を増殖させることができ、またMSCの機能に関しても高く維持することが実現した。また味の素(株)との共同研究の取り組みから、安定的に培養を行うためのポイントも見出すことができた：一般に細胞の継代作業の際にはトリプシンを使用する。FBS添加培地には、その不活化因子が入っているため気が付かなかったが、無血清培地にはトリプシン不活化因子が入っていない。そこでStemFit® For MSCを使用する際は、継代作業において新規培地にトリプシンがキャリアオーバーしないよう、トリプシン除去をしっかりと行う。

一 今後のご研究の展望

当科の肝硬変に対する肝臓再生療法は、私自身は受け継いだものであり、当科で長年取り組んできた研究です。今回、自己完結型肝硬変再生療法の取り組みにおいて、味の素(株)とStemFit® For MSCを共同開発し、これを使用することで高品質な細胞を培養することが可能となったことを含めて、治験に進めることを嬉しく思う。一日でも早く、我々の再生医療等製品が薬事承認を取得し、多くの肝硬変患者様にお届けできることを願っている。本プロジェクトは肝硬変が対象ですが、他の臓器線維症の治療にも展開できたら良いと考えている。

【参考文献】

- 1) *Stem Cells*. 2006 Oct; 24 (10) :2292-8
- 2) *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2020 May; 66 (3): 213-223

Eat Well, Live Well.



▶ お問い合わせ

味の素株式会社 アミノ酸部 バイオフィーマソリューションズグループ

✉ stemfit@asv.ajinomoto.com

関連製品はこちら

