# 再生医療製品向け新規ウシ血小板溶解物「NeoSERA®」開発と医療応用

Development and clinical application of a new adult bovine-derived platelet lysate "NeoSERA" for regenerative medicical products

# 山原 研一 Kenichi Yamahara (Associate Professor)

兵庫医科大学 先端医学研究所 医薬開発研究部門 准教授 Laboratory of Medical Innovation, Institute for Advanced Medical Sciences, Hyogo College of Medicine

## 浜田 彰子 Akiko Hamada (Researcher)

兵庫医科大学 先端医学研究所 医薬開発研究部門 研究員 Laboratory of Medical Innovation, Institute for Advanced Medical Sciences, Hyogo College of Medicine

# 藤盛 好啓 Yoshihiro Fujimori (Professor)

兵庫医科大学 先端医学研究所 医薬開発研究部門 教授 Laboratory of Medical Innovation, Institute for Advanced Medical Sciences, Hyogo College of Medicine

#### 梅沢 晃 Ko Umezawa (Division Manager)

株式会社ジャパン・バイオメディカル 事業部長 Japan Biomedical Co., Ltd.

# 須藤 稔太 Toshita Sudo (CEO)

株式会社ジャパン・バイオメディカル 代表取締役 Japan Biomedical Co., Ltd.

# キーワード ••• 品質、GMP、日本薬局方、原材料管理



#### はじめに

我々は、新しい再生医療向け原材料として、胎児ウシ血清 (Fetal Bovine Serum:以下、FBS)に代わる、安全性・安定性・ 品質を高め、独自開発した国産ウシ血小板溶解物「NeoSERA®」 を開発している。同時に、NeoSERA®を原材料とするヒト羊膜由来間葉系幹細胞(以下、羊膜MSC)の製剤化と急性GVHD(移植片対宿主病) およびクローン病に対する医師主導治験を開始した (UMIN試験ID UMIN000029945、UMIN000029841) 1.21。 本稿では、NeoSERA®開発の経緯とその特徴、再生医療を中心とした医療応用の可能性を概説する。



# NeoSERA®の開発経緯

FBSは、細胞培養技術を用いて製造されるワクチンなどの医薬品及び再生医療等製品向けに、細胞培養用添加剤のスタンダードとして汎用されている。しかし、1980年代後半英国から始まった牛海綿状脳症(Bovine spongiform encephalopathy:

以下、BSE)の発生は、FBSの生産に影響を及ぼした。2001年の我が国でのBSE発生報告を契機に、医薬品等の安全性を確保するため、2003年から生物由来原料に対し、細菌やウイルス等の安全性確保のための基準(「生物由来原料基準」(平成15年5月20日厚生労働省告示第210号))が定められることとなった。同基準では、医薬品等向けの反すう動物に由来する原材料に関し、地理的BSEリスク評価に基づき、原産国が規定された。この結果、BSEが発症した我が国は利用可能な原産国ではなくなり、我が国でも一部実施されていた細胞培養用途のウシ血清の製造は途絶えることとなった。。

その後、発生経路となる飼料の規制強化等によりBSEの発生は1992年をピークに大幅に減少し、2016年には年間2頭の発生まで減少しており(国際獣疫事務局 World Organisation for Animal Health:以下、OIE HPより<sup>4)</sup>)、BSEリスクは世界的に大幅に低下している。2013年5月OIEは日本や米国等を新たにBSEの「無視できるリスク国」に指定し、2014年の生物由来原料基準の改定(平成26年9月26日厚生労働省告示第375号)では、反すう動物由来原料等の利用可能な原産国を、OIEの指定するBSEが「無視できるリスク国」としたことで、現状国産のウシ血清が医薬品や再生医療等製品の原材料として使用できる状況にある。

現在我が国で上市されている再生医療等製品のうち、ジェイス、ジャック、テムセル、ハートシートといった多くの製品で、その原材料としてFBSを使用しているり。この理由は、FBSが細胞培養用添加剤のスタンダードであることに加え、細胞培養コストが無血清培地よりも低額であることも理由と考えられる。しかしながら、FBSは不特定多数の胎児ウシの血液抽出物であり、場合によっては感染胎児由来のウシ血液の混入もあり得ることから、①BSE原因であるプリオン混入のリスク、②ロット差、③結果、細胞増殖性が劣る、といった、①安全性、②安定性、③品質における問題点が以前から指摘されている。また、胎児ウシからという、倫理的に大きな問題のある手法により採取されていることもクローズアップされているり。

これらの背景を踏まえ、我々は国産の成牛の血液を加工することにより、FBSの欠点をすべて打ち消す、①安全、②安定、③高品質な、医薬品・再生医療等製品向け血清の開発を目指した。ヒントとなったのは、増殖因子を豊富に含む、ヒト血液由来の血小板溶解物である。ヒト血小板溶解物は、ヒト細胞、特にMSCの培養用添加剤としての使用が多数報告されている他で、多くの製品が市販されている。そこで我々は、成牛から血小板を抽出し、血清化処理を施した国産ウシ血小板溶解物「NeoSERA®」を開発し(特許第6212723号)、その製造販売を手がける株式会社ジャパン・バイオメディカルを立ち上げた(https://www.japanbiomedical.jp)。

NeoSERA®の安全性は、ジャパン・バイオメディカルの専用牛舎にて、獣医による定期的な健康確認を受け、管理された成牛から採取された血液を原料として製造することで、完全なトレーサビリティを実現している。また、アメリカ合衆国農務省(United States Department of Agriculture:USDA)規則9CFR§113.420および欧州医薬品庁(European Medicines Agency:EMEA)規則EMEA/CVMP/743/00に従い、ウイルス不活化を含む滅菌を目的に30kGy以上のγ線照射を実施しており、生物由来原料基準の規程を満たす安全な細胞培養用血清である(平成29年4月17日 医薬品医療機器総合機構(Pharmaceuticals and Medical Devices Agency:以下、PMDA)再生医療等製品材料適格性確認書取得 薬機審長発第0417002号)。

また、安定性は、単一プロトコルにて、少数の成牛からの繰り返し採血から得られた血小板溶解物をプールした上で分注製造することにより、ロット間差を最小限にしている。品質に関しても、採血から分注まで閉鎖系(分注のみ安全キャビネットでの操作)にて製造することで無菌性を担保し、常にエンドトキシンは検出感度以下であり、コンタミネーションによる品質低下は皆無としている。

# 03

#### NeoSERA®を用いた細胞培養

NeoSERA®の使用に関し、注意すべき点はFBSと大きな差はなく、MEM等の基礎培地への添加剤(~10%)として細胞培養に

用いることを推奨している。特にMSCについては、ヒト血小板溶解物同様、その増殖性は旺盛であり、5%程度の添加でFBSと同等の増殖を認めることが多い。

一方、NeoSERA®使用の主な注意点として、以下が挙げられるが、詳細はhttps://www.japan-biomedical.jp/how-to-use-neoseraを参照してほしい。

- ①NeoSERA®は解凍により沈殿物が析出することがあるが、 製品の品質には問題なく、気になるようであれば、遠心や 0.22μmフィルター操作で除去を行う。
- ②FBSからNeoSERA®への変更は、3継代程度の馴化操作が必要である。具体的には、FBSとNeoSERA®の混合比率を3継代の間に75%:25%→50%:50%→25%:75%と段階的に変化させる方法を推奨している。馴化の際、細胞の増殖が速くなった場合であっても継代時の播種密度は大きく変更することなく、細胞をよく観察し、適切な継代のタイミングを決めることをおすすめしたい。



#### NeoSERA®の性能

NeoSERA®の主成分である血小板溶解物は、Plateletderived growth factor (PDGF)、Transforming growth factor β(TGF-β)、Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)、Epidermal growth factor (EGF)等の増殖因子が豊富に含まれており<sup>9)</sup>、細胞培養用添加剤として相応しい。そこで、再生医療分野で広く検討されているヒトMSCおよびワクチン製造に汎用されている細胞株について、NeoSERA®の性能に関しFBSと比較検討した。

## ≪ヒトMSCにおけるNeoSERA®による増殖性≫

ヒト骨髄MSCおよびヒト羊膜MSCにおいて、NeoSERA®およびFBSをぞれぞれ10%添加した $\alpha$ MEMにて培養し、増殖曲線を作成した。培養7日目の培養写真・増殖曲線を図1に示す。

ヒト骨髄MSCおよびヒト羊膜MSCの培養写真(図1(A)(B))において、FBSおよびNeoSERA®で培養した細胞の形態に明確な差は認めなかった。増殖曲線(図1(C)(D))の結果から、ヒト骨髄・羊膜MSCの培養において、NeoSERA®はFBSよりも高い増殖性を有することが示されたことから、細胞製剤化におけるメリットである、短時間で多くの細胞を得ることが期待される。

# ≪ワクチン製造用細胞株におけるNeoSERA®による増殖性≫

細胞バンクより入手したアフリカミドリザル腎臓由来細胞株 Vero細胞およびヒト胎児肺由来細胞株MRC-5細胞において、NeoSERA®(3ロット)およびFBSを細胞株のデータシートに基づき推奨される基礎培地に添加し培養を行い、増殖曲線を作成した。培養4あるいは5日目の培養写真・増殖曲線を図2に示す。

VeroおよびMRC-5の培養写真(図2(A)(B))において、FBS

# 特 集 再生医療関連技術

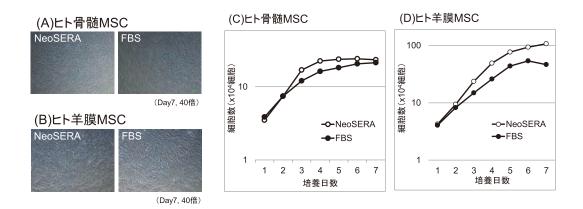


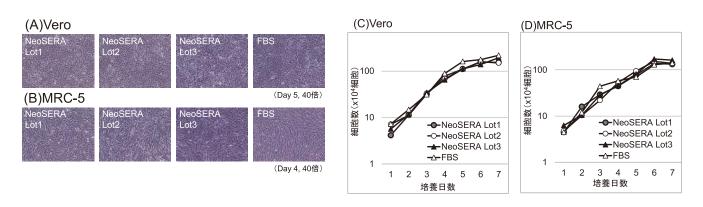
図1 NeoSERA®およびFBS添加によるヒト骨髄・羊膜MSCにおける増殖性

(A)ヒト骨髄MSC培養写真(NeoSERA®、FBS:それぞれ40倍)

(B)ヒト羊膜MSC培養写真(NeoSERA®、FBS:それぞれ40倍)

(C)ヒト骨髄MSC増殖曲線(片対数)

(D)ヒト羊膜MSC増殖曲線(片対数)



- 図2 NeoSERA®およびFBS添加によるVero·MRC-5における増殖性
- (A) Vero培養写真(NeoSERA® 3ロット、FBS:それぞれ40倍)
- (B) MRC-5培養写真(NeoSERA® 3ロット、FBS:それぞれ40倍)
- (C) Vero增殖曲線(片対数)
- (D) MRC-5増殖曲線(片対数)

およびNeoSERA®で培養した細胞の形態に明確な差は認めなかった。増殖曲線(図2(C)(D))の結果から、3ロットのNeoSERA®とFBSとの間に増殖性の差を認めなかった。



#### NeoSERA®を原材料とした羊膜MSC製剤開発

我々はこれまでの基礎的研究において、羊膜MSCが強力な免疫・炎症抑制効果を有することを示してきた<sup>10,11)</sup>。例えば、急性移植片対宿主病(Graft versus host disease:以下、GVHD) モデルを用いた評価において、ヒト羊膜MSCの静脈内投与は急性GVHDの病態を改善することを示し、その理由の1つに羊膜MSCが有する高いプロスタグランジンE2産生能が考えられた<sup>12)</sup>。また、その発症に免疫学的機序が関与する炎症性腸疾患については、デキストラン硫酸ナトリウム投与によるモデル動物

において、羊膜MSCの静脈内投与が治療効果を示すことを見いだしている<sup>13)</sup>。

我々は、これら急性GVHDおよびクローン病モデルにおける非臨床試験の結果を踏まえ、羊膜MSCの製剤化と急性GVHD・クローン病に対する臨床試験実施をめざし、細胞調製施設での羊膜MSCの大量培養技術開発に着手した。1つ目の課題として、羊膜MSCの単離法の確立が必要であった。羊膜は羊水側からみて、基底膜に裏打ちされる一層の上皮細胞と、その下にある細胞外基質層があり、細胞外基質には羊膜1gあたり100万個以上のMSCが含まれる。そこで、羊膜から羊膜MSCのみを効率的に採取する方法として、基底膜を壊さない程度に細胞外基質のみを分解できる酵素の配合を決定し、知財化した(図3、特許第6512759号)。この酵素配合で羊膜を処理することにより、上皮細胞+基底膜は残る一方、MSCは酵素液に浮遊した状態となり、メッシュにて簡単に上皮細胞とMSCを分離することが可能とな

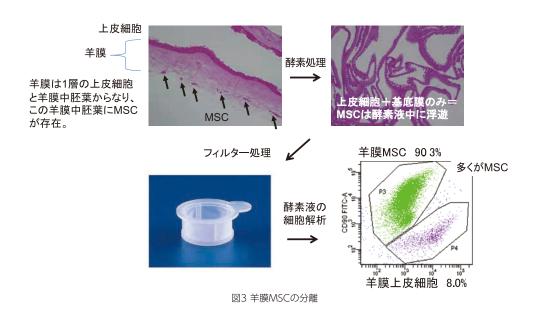




図4 NeoSERA®を原材料とした羊膜間葉系幹細胞の製剤化

り、FACSによるソーティングといった特別な操作なしに、遠心機のみで簡単に羊膜MSCのみ純化することに成功した。

2つ目の課題として、羊膜MSCの大量培養法の確立があった。まず、PMDA薬事戦略相談(現RS戦略相談)にて羊膜MSCの治験製品化に向け、概要書内容、特に原材料に関する相談から始まった。当時は旧薬事法の時代であり、再生医療等製品に対する明確なルールが十分には整備されておらず、更に著者にとって初めての経験ばかりで、手探りの状態であった。特に最も苦労したのは生物由来原料基準である。以前の同基準に関し、前述のごとく、羊膜MSCの原材料であるウシ血清はBSEを考慮し原則オセアニア産に限られること、更に無菌性、特にウイルスに関する規程が明確でなく、どのような資料をそろえれば良いか分からず、苦労した。結果的に、このときの努力・知識のお陰で、NeoSERA®を開発することに成功し、これを原材料とする羊膜MSC製剤の開発につながった。とりわけ、製法確立において、ロット差が無く、

細胞増殖性に優れたNeoSERA®を用いることで、FBSと比較し、 ①ロットチェックが不要、②製造工程が短期化、③大量培養が可能となり、大量製造が容易な製法の確立につながった(図4)。



#### 羊膜MSC製剤の急性GVHD・クローン病に対する 第I/II相医師主導治験と大学発ベンチャーの創業

このような流れの中で、試験名「同種造血幹細胞移植後に発症したステロイド抵抗性急性移植片対宿主病(急性GVHD)を対象としたAM01(羊膜由来間葉系幹細胞)の第I/II相試験」に関する治験実施計画を確定し、兵庫医科大学病院臨床研究審査委員会の承認(承認番号217851号)を経て、2017年11月厚生労働大臣に治験届を提出した(UMIN試験ID:UMIN000029945)。また、同時に計画していたクローン病に対する治験「既存治療で効果不十分の中等症の活動期クローン病患者を対象としたAM01

# **特 集** 再生医療関連技術

(羊膜由来間葉系幹細胞)の第I/II相試験」も同年9月に治験届を提出するに至った(UMIN試験ID:UMIN000029841)。

治験の概要であるが、既存の治療に抵抗性の、造血幹細胞移植後の急性GVHD・クローン病患者に対しAM01の静脈内投与を行い、その安全性評価を主たる評価とし、有効性を副次評価することを目的とする。投与方法は、AM01を下記の投与量に従って、急性GVHDは0日目、7日目、14日目、21日目に、クローン病は0日目、7日目のみ点滴で静脈内投与する。

低用量群 1.0×10<sup>6</sup> 個 /kg:0、7、(14、21)日目 高用量群 4.0×10<sup>6</sup> 個 /kg:0、7、(14、21)日目

用量は低用量群から開始し、少なくとも3例の低用量群での安全性に関し、独立した組織である効果安全性評価委員会にて確認された後に高用量群へ移行し、高用量群での安全性を確認することとしている。

羊膜MSC AM01を用いた急性GVHD・クローン病に対する医師主導治験であるが、他家MSCということもあり、治験継続には多額の資金が必要である。そこで、治験の円滑な実施、更には羊膜MSC AM01製剤の製造・研究開発サポートを目的としたベンチャー会社として2018年2月に株式会社シーテックスを立ちあげ、同年4月には兵庫医科大学初・発ベンチャーとしての認定を受けた(https://www.c-tex.jp)。今後、増資による資金を活用し、治験製品AM01の円滑な製造を目指すと共に、急性GVHD・クローン病以外の疾患への応用<sup>14</sup>、再生医療等製品として早期の製造販売承認取得を進めていきたい。

# NeoSERA®の今後

細胞培養技術を用いて製造される医薬品・再生医療等製品において、NeoSERA®を原材料とすることで、我々の羊膜MSC製剤のように、製品の安全性の強化、培養期間の短縮による低コスト化を実現できるものと考えており、我が国だけでなく世界展開を視野に、積極的な販売展開を行っていきたいと考えている。現在、NeoSERA®のGMP製造化、更には豪州産の製造に取り組んでおり、近い将来、製品化される予定である。NeoSERA®をFBSの代替品として幅広い研究者・技術者に使用して頂き、我々にフィードバックを頂くことで、よりよい製品になるものと考えており、ご協力頂ければ幸いである。

#### 引用文献

- S. Otagiri S, S. Ohnishi S, A. Miura A, et alH. Hayashi, I. Kumagai, Y. M. Ito, T. Katsurada, S. Nakamura, R. Okamoto, K. Yamahara, K. Y. Cho, T. Isoe, N. Sato, N. Sakamoto., Evaluation of amnion-derived mesenchymal stem cells for treatment-resistant moderate Crohn's disease: study protocol for a phase I/II, dual-centre, open-label, uncontrolled, dose-response trial. BMJ Open Gastroenterol 52018;5:, e000206 (2018).
- 2) K. Yamahara K, A. Hamada A, T. Soma T, R. Okamoto, M. Okada, S. Yoshihara, K. Yoshihara, K. Ikegame, H. Tamaki, K. Kaida, T. Inoue, Y. Ohsugi, H. Nishikawa, H. Hayashi, Y. M. Ito, H. Iijima, S. Ohnishi, D. Hashimoto, T. Isoe, T. Teshima, H. Ogawa, N. Sato, Y. Fujimori, et al. Safety and efficacy of amnion-derived mesenchymal stem cells (AMO1) in patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: a study protocol for a phase I/II Japanese trial. BMJ Open 2019;9, :e026403 (2019).
- 3) 組合だより.. 中標津農業協同組合・中標津町農業共済組合. Volume 9, 1993:6 (1993).
- 4) World Organisation for Animal Health, BSE situation in the world and annual incidence rate, https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/bse-situation-in-the-world-and-annual-incidence-rate/(参照 2020-1-31).
- 5) PMDA 医薬品医療機器総合機構,承認情報 再生医療等製品 審査報告書・申請資料 概要,https://www.pmda.go.jp/review-services/drug-reviews/review-information/ctp/0002.html (参照 2020-1-31).
- C. E. A. Jochems CE, J. B. F. van der Valk JB, F. R. Stafleu FR, V. Baumans, et al. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? Altern. Lab Anim. 2002;30, :219-27 (2002).
- E. Rubio-Azpeitia E, I. Andia I. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. Muscles Ligaments Tendons J. 2014;4, :52-62 (2014).
- 8) T. Burnouf T, D. Strunk D, M. B. C. Koh MB, et al., K. Schallmoser, Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? Biomaterials 2016;76, :371-387 (2016).
- 9) C. Doucet C, I. Ernou I, Y. Zhang Y, et al., J.-R. Llense, L. Begot, X. Holy, J.-J. Lataillade, Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. J. Cell. Physiol. 2005;205(2), :228-236 (2005).
- 10) S. Ishikane S, K. Yamahara K, M. Sada M, et al. K. Harada, M. Kodama, H. Ishibashi-Ueda, K. Hayakawa, K. Mishima, K. Iwasaki, M. Fujiwara, K. Kangawa, T. Ikeda, Allogeneic administration of fetal membranederived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. J. Mol. Cell. Cardiol. 2010;49(5),:753-761 (2010).
- 11) M. Ohshima M, K. Yamahara K, S. Ishikane S, et al., K. Harada, H. Tsuda, K. Otani, A. Taguchi, M. Miyazato, S. Katsuragi, J. Yoshimatsu, M. Kodama, K. Kangawa, T. Ikeda, Systemic transplantation of allogenic fetal membrane-derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. J. Mol. Cell. Cardiol. 2012;53(3),:4420-428 (2012).
- 12) K. Yamahara K, K. Harada K,, M. Ohshima M, et al. S. Ishikane, S. Ohnishi, H. Tsuda, K. Otani, A. Taguchi, T. Soma, H. Ogawa, S. Katsuragi, J. Yoshimatsu, M. Harada-Shiba, K. Kangawa, T. Ikeda, Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. PLoS PLOS One ONE 2014;9, :e88319 (2014).
- 13) R. Onishi R, S. Ohnishi S, R. Higashi R, et al., M. Watari, K. Yamahara, N. Okubo, K. Nakagawa, T. Katsurada, G. Suda, M. Natsuizaka, H. Takeda, N. Sakamoto, Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Severe Colitis in Rats. Cell Transplant. 2015;24,: 2601-2614 (2015).
- 14) Y. Imai Y, K. Yamahara K, A. Hamada A, et al., Y. Fujimori, K. Yamanishi, Human amnion-derived mesenchymal stem cells ameliorate imiquimodinduced psoriasiform dermatitis in mice. J. Dermatol. 2019;46(3), :276-278 (2019).