

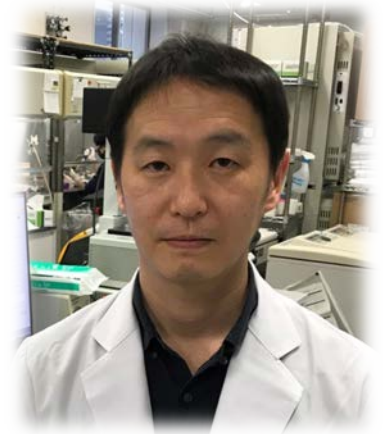
横浜市立大学大学院医学研究科 臓器再生医学
岡本理志先生へのiPS細胞由来ミニ肝臓の製造に関するインタビュー

インタビュー実施日：2021年2月8日

横浜市立大学 谷口 英樹 特別契約教授（東京大学医科学研究所 附属幹細胞治療研究センター 再生医学分野 教授）らの研究グループは、ヒトiPS細胞から3種類の細胞（肝臓細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞）を分化誘導し、ヒトiPS細胞由来ミニ肝臓（肝臓オルガノイド）の製造に成功している（参考文献1, 2）。

味の素(株)は、横浜市立大学大学院医学研究科 臓器再生医学との共同研究において、臨床使用可能な生物由来原料基準（生原基）に該当する成分を含まない分化誘導サプリメントStemFit® For Differentiationの開発に成功し、製品化を行った。本製品は横浜市立大学のiPS細胞由来ミニ肝臓の製造に関するプロジェクトでも採用頂いている（図1）。

この度味の素(株)は、本プロジェクトの細胞製造をご担当されている岡本先生にインタビューを実施し、iPS細胞由来ミニ肝臓の製造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。



横浜市立大学大学院医学研究科
臓器再生医学
岡本 理志 先生

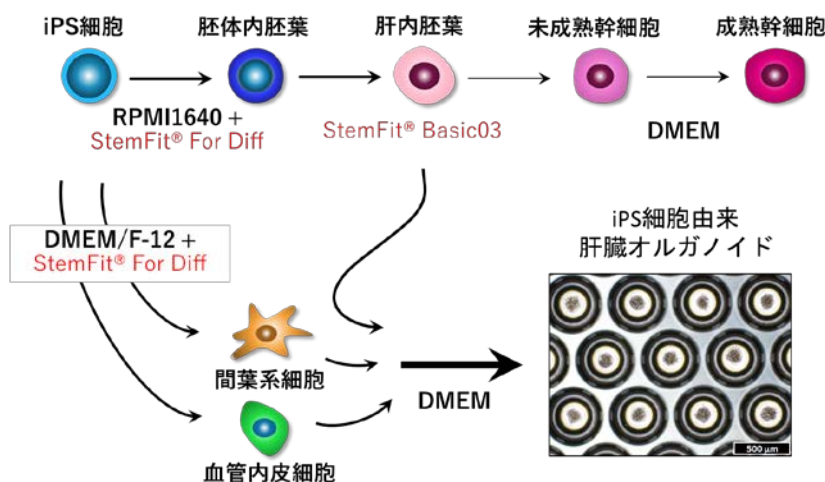


図1 肝臓オルガノイド作成法と臨床用培地の開発



分化誘導サプリメント
StemFit® For Differentiation

—ご研究の概況と今後の臨床試験に向けた取り組みについて

我々の研究では、ヒトiPS細胞から肝臓の前駆細胞を含む3種類の細胞（肝内胚葉細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞）を分化誘導し、これらをマイクロウェルが刻まれた特殊な培養プレート内で混合播種することで、直径130µm程度の小さな肝臓オルガノイドを作製している。現在、この肝臓オルガノイドを肝疾患を有する患者様に投与し治療を行うための研究を進めている。対象疾患は現在のところは、尿素サイクル異常症と肝硬変の2つに絞り、各々の臨床試験に関して準備を進めている。前者を対象とした治療法開発においては、これまでに肝臓オルガノイドの製造方法および品質評価方法が決定しており、動物モデルを用いた安全性や有効性評価についても確認済みである。現在は、その試験計画について特定認定再生医療等委員会にて審査中である。後者の肝硬変治療に関しては、基本的な細胞製造方法や有効性評価については確認済みであり、現在は臨床試験を進めるための開発段階である。

尿素サイクル異常症の場合は血管を通じて細胞を肝臓に投与するが、シングルセルで投与した場合、大部分の移植細胞は肝臓に留まるものの、少数の細胞は肝臓以外の臓器へ移行してしまう安全性の課題がある。それに対して肝臓オルガノイドを移植することで、他臓器への移行は殆ど見られなくなるため、安全性の面からも移植細胞をオルガノイド化させるのは大変有用な手法だと考えている。

一これまでの臨床用の細胞製造において重要な点、苦労された点

研究開発初期は、研究グレード且つ小スケールで開発を行っていたが、iPS細胞の培養ではStemFit® AK03Nを、その後の分化誘導ではStemFit® For Differentiationを使用することで、Animal-origin freeな試薬を採用し、培養プロトコル自体は非常に安定していた（参考文献3）。一方で、細胞製造を想定して小スケールから大スケールにスケールアップすると、培養が不安定になり、再現良く実施できないことがあった。何がその不安定性の原因となるのか、原因究明にかなりの時間と労力を要した。細胞培養における安定性を確保する上で、細胞剥離および細胞播種の工程が最重要であることを突き止めた。酵素を使用した細胞剥離方法、ピペティングの回数、細胞カウントの方法、培養ディッシュのコーティング方法、細胞播種後の拡散方法に関して、細かく標準化を行い、培養関係者が同一の作業を行えるようなプロトコル化とトレーニングを実施し、その結果培養を安定化させることが可能となった。また、肝臓オルガノイドの培養は、特殊なディッシュ内で行うが、培地交換の際に培地を添加するとオルガノイドが別のウェルに飛散してしまうことがしばしばあった。オルガノイドが他のウェルのオルガノイドと融合すると、規定のサイズよりも大きくなり、移植安全性の観点からも課題となっていた。オルガノイドが飛散しない培地交換手技の確立にも注力して取り組んだ。具体的には、培地交換の流速をゆっくりかつ一定になるように制御して行うようにしている。

我々の細胞培養加工施設に関しては、複数のアイソレーターをベルトコンベア式の自動搬送装置で繋いだ他に類を見ないような特殊な装置である（図2）。ベルトコンベア式の自動搬送装置があることで、細胞や培地、消耗品等、培養に必要なものを各アイソレーター間でやり取りできるようになっている。アイソレーターは、培養操作する場所のみならず、培養に必要な資材を大量且つ無菌的に保管できるユニットも装備しており、細胞の大量製造に対応可能な設備となっている。

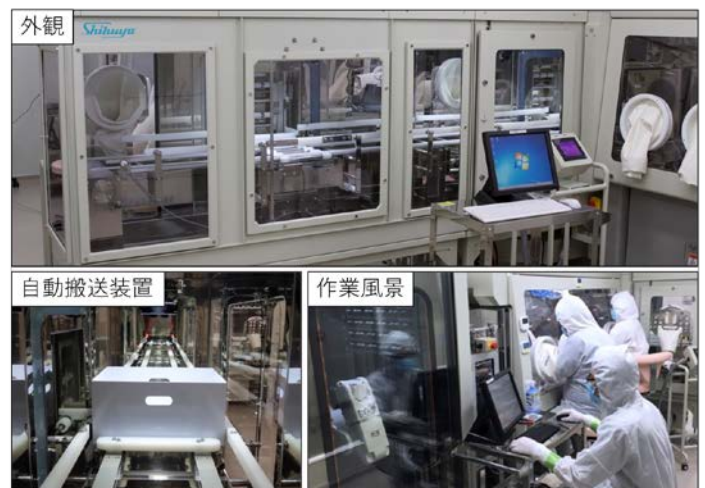


図2 細胞培養加工施設

一臨床用の細胞製造法を構築する上で、規制の観点から重要な点、苦労された点

研究開発の初期段階から、生原基対応を意識して培地などの必要試薬の選定を行っており、味の素との共同開発によって分化誘導サプリメントも開発してきた。我々の研究チームには規制対応に関する専門家がいなかったため、生原基の情報や非臨床試験の実施に関してはPMDAや外部の有識者の意見を取り入れながら手探りで進めてきた。成長因子に関しては、Animal-origin freeの試薬が各メーカーから比較的多く販売されているが、分化誘導試薬に関しては、FBSやKSR、B27等の血清代替試薬、その他のヒト動物由来成分が含まれている試薬が広く使用されており、その部分のAnimal-origin freeな試薬への置き換えが実質困難であったが、味の素とAnimal-origin freeな分化誘導サプリメントであるStemFit® For Differentiationを共同開発したことで課題解決され、非常に重要な取り組みであったと感じている。

一細胞の品質管理について

これまでの検討により、iPS細胞の継代数が増えると、分化誘導した細胞中の未分化iPS細胞残存率が増えることが明らかとなったため、iPS細胞の継代数は必要最小限に抑えることにしている。研究開発の段階でも、ワーキングセルバンク（WCB）を構築し、分化誘導を実施する度にWCBを起眠し、決められた継代数で分化誘導を開始している。StemFit® AK03Nは、iPS細胞を効率的に増殖させることが可能であるため、WCBを短い継代数で構築し、起眠後も短期間で分化誘導を開始できるという点で非常に助かっている。

またこれまでの検討により、安定な細胞製造を達成するためにプロトコルの最適化が図られている。当研究室では、WCB起眠日、細胞の継代日、分化誘導の開始日等の作業に関して、曜日を固定した培養スケジュールで回すことができおり、培養担当者および試験担当者が混乱することなく効率的に作業を実施できている。その結果、肝臓オルガノイド製造後の動物モデルへの移植評価においても、試験スケジュールを管理し易くなっている。製造工程における品質管理としては、分化細胞特異的マーカーの発現だけでなく、細胞のバラつきを確認し得るマーカーを見出し、細胞の品質試験系の構築に取り組んでいる。最終製品の肝臓オルガノイドは、サイズ管理を行っている。StemFit® AK03NやStemFit® For Differentiationをはじめとする安定した性能を有する試薬の採用と、培養手技の標準化を確立したことによって、バラつきの少ない安定した細胞製造を達成できている。

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

研究開発の初期段階では、研究用試薬を使用して培養系を構築していたが、プロトコールの大枠が構築された比較的早期の段階で、生原基対応した成長因子類への置き換えを進めてきた。試薬メーカーによっては、試薬の情報提供まで時間を要したり、結果的に情報が得られないこともあり、その場合はそれらが可能となる別の試薬に置き換えてきた。試薬選定の際は、生原基対応や再生医療等製造を意識して製品開発しているメーカーで、且つ必要な情報提供・当局対応サポートを行ってくれるメーカーの製品を進んで採用することが重要と考えている。

一 StemFit® For Differentiationの使用感について

StemFit® For Differentiationを使用すると、安定した分化誘導が可能であり、使い勝手の良さを感じている。我々のプロジェクトでは、肝臓オルガノイドの製造にあたって、ヒトiPS細胞から三種類の細胞を分化誘導するが、そのいずれの分化誘導においてもStemFit® For Differentiationを使用することができるため、非常に汎用性の高いサプリメントであると感じている。また、培養系のスケールアップにおいても安定した培養が実現できているのは、小スケールの段階から、本サプリメントを採用して分化誘導系を構築していること、さらにはStemFit® For Differentiation が化学的組成の明らかな (chemically-defined) サプリメントであるためと考えている。

一 今後のご研究の展望

先述のiPS細胞由来の肝臓オルガノイドを用いた尿素サイクル異常症治療および肝硬変治療の臨床試験実施に向けた研究開発に関して、着実に進めていく予定である。その後に関しては、肝臓オルガノイドを用いた再生医療を広く普及させるために、より大量製造を可能とする体制の整備を行っていく計画である。肝臓オルガノイドの大量製造の課題として、現在は全て人の手による培養の作業であるため、培養の自動化も検討していきたい。また幅広く共同研究を行うことや、適応疾患拡大を目指した開発を進めていきたいと考えている。

肝臓オルガノイドの保存や輸送時の安定性検討については既に取り組んでおり、尿素サイクル異常症治療に向けた最終製品の輸送に関しては、数時間の安定輸送が可能であることは確認済みである。さらに長時間の輸送安定性データの取得や、工業化による大量製造へ向けた凍結保存の検討についても実施中である。

肝硬変治療に関しては、尿素サイクル異常症に使用する肝臓オルガノイドに更に手を加えて別の機能を付加した細胞製品の開発を進めている。また、オルガノイドの構成細胞を変えることで、機能向上や機能付加を行う研究も継続している。機能向上させた肝臓オルガノイドにより、さらに多くの肝疾患への応用も視野に入れ、幅広く研究開発を進めていく計画である。

【参考文献】

- 1) Nature 2013 Jul 25;499 (7459):481-484
- 2) Cell Reports 2017 Dec 5;21 (10):2661-2670
- 3) Scientific Reports 2020 Oct 21;10 (1):17937

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

