

# 細胞治療薬の製造における 力価試験の役割

細胞療法は臨床試験で非常に明るい兆しが示されていますが、これらの治療薬の大規模製造には未だに解決すべき課題があります。すなわち、製造された細胞製剤の生物学的力価を保証するための厳しい品質管理が求められます。一般的に医薬品の力価試験では、任意の用量で特定の反応を引き出す薬剤の能力を測定します。常に一つの定量的なバイオリジカルアッセイによって力価を評価できることが望ましいですが、細胞療法は複雑で、また患者ごとに異なる個別化治療となることも多いため、簡単ではありません。

細胞治療と遺伝子治療は薬ごとに最適な活性評価法が異なるため、米国食品医薬品局（FDA）は、細胞製剤と遺伝子治療薬について特定の評価方法を規定していません。また、アッセイ方法についての推奨や承認基準の提示も行っていない。

以前は、細胞治療薬の承認には、エンドトキシン試験と無菌性試験が必須で生物学的力価試験は副次的なものと考えられていました。ペンシルベニア大学医学部および Abramson Cancer Center の Carl June 医学博士は「多くのグループは、販売証明にチェック済みの印を入れるためだけに、安価で技術的にも簡単な方法を選択していた」と述べています。

しかし現在では、第三者機関、医師、そして患者の全員が、細胞療法という高額な治療法に対して、良好な臨床奏功性を担保する納得のいくデータの提出を求めています。ファンクショナルアッセイによる力価試験は、腫瘍に対する細胞傷害活性の評価において、大きな役割を担うことになると考えられます。

## Additional Info

力価評価に関する詳細については、こちらの xCELLigence RTCA アプリケーションノートをご覧ください。

細胞製剤の製造と品質管理のための適切な力価試験のデザインを行う第一歩は、それぞれの製剤に応じて“効力”を定義することです。

「シンプルに保つこと」ロイヤル・フリー病院の細胞・遺伝子・組織療法センターのディレクタでありユニバーシティ・カレッジ・ロンドン細胞・組織療法学部の教授である Mark Lowdell 博士はそう述べています。「手の込んだ複雑なアッセイは、ほとんどの場合、再現性と信頼性のある結果を得ることができません」

ジョージア工科大学、免疫工学センターのディレクタである Krishnendu Roy 博士はこう付け加えています。「ヒト疾患の複雑な病態を再現できることが望ましいですが、医薬品の製造という観点では、コストとのバランスを維持することが非常に重要です。」

例えば CAR-T 細胞療法において、細胞表面の CAR の発現は簡単に測定できます。しかしこれは、CAR-T 細胞の機能を直接反映するものではありません。すなわち、CAR の発現を測定するだけで、標的抗原を発現する腫瘍細胞に対して十分な細胞傷害能をもつことを保証することはできません。in vivo で抗腫瘍活性を評価しないのであれば、CAR-T 細胞表面の CAR 分子の発現をみるだけでは十分とは言えません。

Lowdell 博士は間葉系幹細胞 (MSC) 療法の臨床試験に関わった経験を持ちます。TNF 関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL) を発現する MSC は、その腫瘍微小環境への浸潤能と MSC そのものもつ非免疫原性のため、効率的な細胞療法となりえます。この臨床試験では、細胞に TRAIL を発現させるために MSC 細胞バンクが用いられました。その品質管理試験では、TRAIL を発現する細胞の割合とその発現量を評価基準として用いました。



「医薬品の製造に使うという観点では、ヒトにおける複雑な疾患の再現とコストのバランスをとることが非常に重要です。」

ジョージア工科大学、  
免疫工学センターディレクタ  
Krishnendu Roy 博士

機能的な力価試験は、腫瘍微小環境または腫瘍に罹患した組織におけるその他の細胞を考慮することなく設計されることがよくあります。*in vitro* のファンクショナルアッセイは、しばしば腫瘍微小環境やその組織に存在する腫瘍以外の細胞の影響を考慮せずデザインされることがあります。もしも試験をデザインする際に、それらの因子を考慮することができれば、患者に対する有効性の予測向上に役立つと考えられます。

Roy 博士は次のように述べています。「我々の最終的な目標は個別化医療です。単に全般的な患者の平均状態を考慮に入れることよりも、もっと優れたものを最終的に設計することです。がん症例において生物学的力価試験に患者の生検サンプルを使用できれば、微小環境全体とはいかなくても、患者固有の状態を考慮に入れることが可能になります。」

あるいは、アッセイ開発の段階で、患者の大規模コホートを用いて検証することで、患者間の違いを理解し、それを考慮したアッセイをデザインすることが可能かもしれません。

### アッセイバリデーションにおける留意点

アッセイの再現性、堅牢性および簡便性は、施設間や研究室間での結果の一貫性を保証する

ために重要な要素です。どんなタイプのアッセイであれ、低い変動係数 (CV) と高いシグナルノイズ (S/N) 比が得られることが理想です。試験担当者、あるいは使用する細胞、試薬、装置、マイクロチップなどのプラットフォームに起因するデータのバラつきはできるだけ最小限に抑える必要があります。

Roy 博士は言います。「例えば、現行の方法では、ある腫瘍細胞株を選択して、その細胞株と CAR-T 細胞を共培養し、CAR-T 細胞により腫瘍細胞が認識され殺傷される過程を測定します。しかしこれは必ずしも優れた機能解析とは言えません。特に固形腫瘍をターゲットとしている場合、このようなアッセイは患者ごとに異なる病状や腫瘍環境の違いを反映していません」

腫瘍微小環境の腫瘍以外の細胞を含めた共培養系の構築、あるいは三次元培養を用いることができれば、この問題を克服できるかもしれません。その他にもさまざまな方法によって、*in vivo* での傷害活性の予測性を高められる可能性があります。しかし、これらはすべて、製造工程に移行する際には複雑性にもつながります。いずれにしても、現行の方法はシンプルではあるものの、*in vivo*における機能性を完全には反映していないことは常に頭に入れるべき問題です。

Lowdell 博士によると、INKmune™ と呼ばれる細胞治療製品の力価試験では、NK 細胞の活性を測定しています。この製剤は“off-the-shelf”であり、製造工程は個々の患者の違いを考慮していません。そのため、事前にスクリーニングされた正常 NK 細胞のドナープールが活性を示すために使用されています。自家細胞を用いた製品の場合、変動を低下または制御するための唯一の方法は、標準化された標的または分子を用いることです。

陽性および陰性コントロールの構築もアッセイ適格性評価の一部とするべきです。自家細胞製剤では、変動の主な要因はドナーの違いです。例えば、フローサイトメトリーでは、抗体を結合させたビーズをアッセイが正しく行われたことの証明として使用できます。抗体はビーズと細胞の両方に結合します。ビーズは規定した領域に入る必要があり、ビーズがその領域に入るということは、適切な抗体と抗体量が増えられたこと、そしてオペレータが試験を正しく実施したことを示します。内部コントロールを用いた場合、サンプル間の不規則性はアッセイの技術的な失敗ではなく、生体の変動に起因することがあります。

## リアルタイム細胞アッセイの役割

細胞治療薬の製造工程は、数日から数週間という非常に長い時間がかかります。Roy 博士はこう述べています。「この長い製造工程の途中で、細胞挙動と表現型の変化が起きることがあります。リアルタイム細胞アッセイはこの工程中に継続的なフィードバックをもたらし、これがそのバッチの品質検証および製造コストの削減に役立つため非常に有益です。」

また、研究開発 (R&D) 段階においては、有効性を左右する細胞特性の違いがどこにあるのかを知るのに非常に重要です。これらの品質特性のリアルタイム測定は、高い力価をもつ細胞の製造を保證するものと考えられます。

何を測定すれば細胞治療薬の力価を効果的に予測し得るかは今もなお研究が進められているところです。Roy 博士は次のように続けます。「遺伝子改変細胞製剤では狙った修飾が確実に起きていることを野生型との比較により確認します。CAR-T 細胞では、細胞生存率、表面マーカー発現および細胞傷害活性が測定され、最終製品が評価されています。しかし、この一連の測定では、これらの細胞が特定の患者に対して実際に有効性があるかどうかを示してはけません。」

アジレントが開発した xCELLigence リアルタイム細胞解析 (RTCA) 装置では、長期間のリアルタイムアッセイが可能です。リアルタイムアッセイは、細胞の活性を数時間または数日にわたって同じウェルから連続的に測定します。そのため、シングルタイムポイントで行うアッセイ (エンドポイントアッセイ) よりもその細胞の活性を正確に評価できます。もちろんエンドポイントアッセイも貴重な情報を提供しますが、このアッセイ法は細胞が測定時点よりも後で標的細胞を殺傷した場合に、*in vivo* での活性予測ができないことがあります。

また、バックグラウンドノイズの高いキリングアッセイでは、細胞療法のための優れた細胞をうまく同定できないことが多くあります。さらに、xCELLigence RTCA アッセイは非常に高感度であり、ターゲット細胞に対するエフェクター細胞の細胞傷害



「シンプルに保つことが大切。手の込んだ複雑なアッセイは、ほとんどの場合、再現性と信頼性のある結果を得ることができません」

ロイヤル・フリー病院、細胞・遺伝子・組織療法  
センターディレクター、ユニバーシティ・カレッジ・  
ロンドン、細胞・組織療法学部教授  
Mark Lowdell 博士

活性を低いエフェクター細胞：ターゲット細胞比（ET 比）で評価することができます。そのため、生理的条件に近い状況で測定を行うことが可能で、*in vivo* における患者反応の予測性を向上できる可能性があります。また、ET 比が低いことで、貴重な細胞の数を減らして測定できるため、同時により多くの条件を検証することができます。

Lowdell 博士は次のように説明しています。「ハイスループットの xCELLigence RTCA アッセイは、継続的に細胞傷害能を測定できる素晴らしい機能的な力価試験です。INKmune では、まず NK 細胞に対して抵抗性のあるターゲット細胞を xCELLigence E-plate で増殖し、次にプールしたドナー NK 細胞を添加して、何も起こらないことを示します。そしてその24 時間後に INKmune を加えます。加えた INKmune が有効であれば、NK 細胞が機能変化を起こし、次の 5 日間でターゲット細胞に対する細胞傷害がみられます。」

### セルベースアッセイ対動物実験

一般的に、動物実験は、複雑かつ長期間、そして高コストです。動物実験は、ヒトにおける疾患過程を反映または予測しないことがよくあります。Roy 博士は次のように指摘しています。「細胞療法の製造工程では、その力価試験に動物は使えません。細胞を用いた *in vitro* アッセイが細胞製剤の機能を測定するための代替となります。ヒト疾患を忠実に再現できれば、そのアッセイは製造工程に重要な役割を担うことになるでしょう。」

動物を試験に用いる重大かつ根本的な問題は、ヒト細胞と他の哺乳類細胞の相同性の乏しさにあります。ヒト由来のエフェクター細胞を患者の血管に注射した場合、この細胞は腫瘍微小環境の特異的な分子に結合し、免疫応答を活性化させ、これが標的腫瘍細胞の殺傷につながります。ヒトのエフェクター細胞をげっ歯類に注射した場合、ヒト由来エフェクター細胞とげっ歯類リガンドとの結合はヒト腫瘍微小環境におけるそれとは異なり、患者での抗腫瘍活性を予測できないことがあります。

動物試験のもう一つの課題は、腫瘍モデル動物を作製する際に起こる免疫応答の増強です。一般的に腫瘍モデル動物の作製では、急速に分裂する腫瘍細胞株を動物に注射し、塊を形成させます。これに続いて、この腫瘍細胞が急性炎症反応を起こします。一方、患者の腫瘍局所で起きているのは、腫瘍微小環境中の免疫抑制因子による慢性的な免疫反応です。急性免疫反応と慢性免疫反応は、免疫学的アウトプットが異なります。したがって、動物モデルで認められる免疫反応は、患者における製品の効力と有効性を示さないことがあります。

Lowdell 博士は言います。「英国規制委員会は、xCELLigence RTCA システムを用いたダイナミックな腫瘍細胞増殖試験データを見て感動していました。私は、リアルタイム細胞解析法は、特性解析における力価試験または出荷前試験として、医薬品開発と製造の両方にこれからはますます用いられることになると思っています。」

### 安全性スクリーニング

汚染や無菌性に対するスクリーニングはルーチンで行われていますが、その他の安全性のスクリーニングが課題になっています。細胞療法の有害事象の理解は今もなお進行中で完全には解明されていません。

同種由来の細胞製剤は移植片対宿主病 (GVHD) のリスクがあります。もう一つのリスクは全身性の炎症性反応症候群であるサイトカイン放出症候群 (CRS) です。CRS はウイルスなどの感染症で起こることが知られていますが、養子 T 細胞療法を行った場合にも起こることがあります。CRS は患者固有の免疫状態の違いに依存するため、予測することが困難です。

細胞療法は、がんなどの生命を脅かす疾患の治療に用いられますが、患者の生存の改善よりも毒性リスクが上回ることがよくあります。患者に何のベネフィットをもたらさない毒性と、治療が利いた結果生じた毒性とは大きな違いがあります。後者は治療薬が腫瘍を殺しているという指標となりえます。Lowdell 博士は次のように述べています。「私たちが実際にコントロールしないとイケないのは、予測できない副作用なのです。実際に、有害事象の一部は治療によって引き起こされた反応である場合があるため、薬効のある薬剤をスクリーニングによって最終的に除外しないとイケないことがあります。」

Roy 博士は次のように述べています。「我々は、*in vitro* モデルで有効性を検証する際に、臨床試験と相関し得る予測因子を常に探しています。CAR-T 細胞について言えば、神経毒性と CRS が一部の症例に起こる理由が解明され始めていますが、これらの患者での毒性発現を予測できるところまでは行きついていません。」

Roy 博士は次のように続けています。「患者の 20 ~ 30 % は CAR-T 療法が役に立ちません。我々のセンターをはじめ、その他の研究所でも多くの未解決の問題の解明に取り掛かっています。品質特性解析に話は戻りますが、最も力価と有効性が高くかつ安全な細胞治療薬の特性とはどのようなものでしょうか我々は、バイオ医薬品時代から多くを学んできました。その中の一つとして、安全性を含めた治療奏功性を高く予測できるパラメーターについて、早期に考える必要があります。」 ■