

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 細胞製造の発展に向けた細胞形態情報解析の深化

氏名 竹本 悠人

論文内容の要旨

近年の幹細胞研究・遺伝子工学技術の発展により、新たな医薬品モダリティとして再生医療等製品の開発・発展が進んでいる。再生医療等製品には従来の低分子医薬品やバイオ医薬品では治療が困難であった疾患や損傷の治療を可能にする成果が多数報告されており、アンメットメディカルニーズに向かう新たな創薬開発の重要開発品と位置付けられてきている。再生医療等製品の中でも、再生医療・細胞治療を支える細胞源の一つに間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC)がある。MSCは、脂肪組織や骨髄など多様な組織から採取が可能であり、*in vitro*での培養が比較的容易である。さらに、培養制御技術を駆使することで骨・軟骨・脂肪組織などへの分化、免疫細胞の箇条応答の抑制、治療部位での再生促進などの機能が報告されると共に、がん化しにくい細胞であることが知られており、再生医療・細胞治療分野において最も多くの研究事例と臨床実績に裏付けられた治療用細胞であるとも言える。近年は自家に留まらず、他家由来細胞を用いた再生医療等製品として承認・上市されており、MSCの工業規模での細胞製造は、複数の製薬企業および細胞製造受託機関にとって重要な事業となりつつある。

治療用細胞の商用生産までには、段階的な開発ステージが存在する。第1のステージは、アカデミアや研究機関で実施される基礎研究のための細胞製造であり、ラボスケールの細胞培養実験と言える。第2のステージは、一部の臨床研究や治験を目指すアカデミアやスタートアップが取り組む、GMP (Good Manufacturing Practice)準拠を視野に入れているが完全対応までは至らずに遷移期のラボスケールの細胞製造である。第3のステージはラボスケールの細胞製造から本格商用生産を見据えて技術移転を進め、恒常的な商用生産に至るステージであり、本格的な大量製造や一部自動化などを視野に入れた製造プロセスの開発と確立が実施される。第4のステージは、商用生産を実現した施設が、さらなる恒常的生産体制への改善や、スケールアップ・スケ

ールアウトなどの事業拡大へと進むステージであり、細胞製造はより多施設や国際的な連携を必要とするステージとなる。細胞製造は、ICH-Q10 などにも記述されるこれらの医薬品開発・製造ステージの変遷にそって実製造が進むが、現状は各ステージ間に大きな技術的ギャップが存在し、各ステージ遷移の過程で必要以上の経費と時間が浪費されている現状がある。これは、製造スケールが本格化する度に、製造プロトコルの再現性が得られず、工程開発を研究レベルまで出戻りしてしまうという現実であり、製薬企業および細胞製造受託機関はこのギャップを埋めるための技術開発および標準化に大きな期待を寄せている。

このような細胞製造の産業化を阻む大きな要因に、細胞培養という製造基本技術がその有史以来、熟練者の感覚や経験に高度に依存して発展してきたことが挙げられる。特に細胞品質をモニタリングし、日々の品質判定を行う技術は、現在もなお、顕微鏡観察による「細胞の形」の評価と判定に依存しているという現実がある。製造対象となる細胞は、生き物であるがゆえに不安定かつ常に変化する存在であり、今も研究途上の対象であるため明確な品質規定方法が確立されていない。このような状況でも細胞培養が世界中で実現している現状は、「細胞の形」という見た目の情報に細胞培養の品質管理に関わる情報が含まれていることは間違いがない。しかし、現状ではまだこの「細胞の形」を客観的に定量評価し、先端工学技術と融合してその操作を自動化する試みは発展途上にあり、あまり多くの研究事例が無い。

我々の研究グループでは、経時的に取得した細胞位相差画像を基に、生きた細胞の定量的な状態や応答を評価できる「細胞形態情報解析技術」を開発し、細胞品質の異常を定量的かつ自動的に判別・予測する技術の細胞製造における品質管理方法としての有効性を示してきた。近年では、細胞製造産業の発展のスピードが非常に速く、多くの企業や研究施設から、細胞製造プロセスの様々なステージを一気通貫的に品質管理するための課題が持ち込まれるようになっていた。これらの課題からは、細胞形態情報解析技術において検証しきれなかった「より大きなスケールを視野に入れた細胞製造工程の管理」や「スケールアウトを視野にいれた細胞品質管理のデジタルトランスフォーメーション」を実現するための技術開発が必要だと考えられた。

そこで筆者は、上述した様々な細胞製造ステージへと発展を続ける細胞製造現場を支える品質管理技術としての細胞形態情報解析を深化させるため、「細胞製造の発展」を視野にいれた実用生産や生産規模拡大における重要な課題として以下の2点に注目し、細胞形態情報解析としての新技術開発と解析技術として根幹的原理の見直しを行った。

本研究で注目した1つ目の課題は、品質劣化によるロットの製造ライン脱落である。MSCは過継代により、細胞老化を引き起こす。これにより、増殖が停止し製造ラインから脱落せざる得ない状態になる。2つ目の課題は、膨大かつ複数バッチデータ解析のロバスト性向上である。細胞製造の黎明期が故に、これまでに細胞画像のデータ統合に言及した文献は少なく、多施設間で得られるようなバッチエフェクトを含む大規模細胞画像データのロバストな解析手法は未だ確立されていない。以上のことから、

細胞製造の実応用の為の細胞形態情報解析研究として、基礎的な知見・手法の検証を行う必要性があると考え、本研究を実施した。

本論文は 4 章で構成される。

第 1 章では、細胞性医薬品製造の現状と求められる技術、従来の細胞画像解析技術における技術的課題を整理し、本研究の技術的概要と位置づけ、その可能性と求められる開発の方向性を論じた。

第 2 章では、長期培養の為の細胞形態情報解析の開発として、①過継代培養データを用いた品質劣化検出モデルの開発、②限界継代数予測モデルの開発を行い、これら 2 つのアプローチについてまとめた。

MSC を用いた治療では 1 回あたり 10 億細胞以上必要となり、自家・他家治療に関わらず、複数回の継代による細胞の増幅が必須である。しかしながら、MSC は過継代を行うと、テロメアの短縮、酸化ストレスにより細胞老化を引き起こし、形態の肥大化、増殖能・分化能・免疫抑制能が低下することが知られている。よって、細胞老化による品質劣化は、細胞性医薬品の品質不安定性の原因の一つとして課題となっており、製造の効率・コストの観点からも培養初期での品質劣化の予測が求められている。さらに、これまでに機械学習を用いた品質評価手法を提唱してきたが、高精度なモデルを構築する為のデータ量に関しての検証は行われておらず、実製造現場での応用実現性については議論されていなかった。本章では、アプローチ①：過継代培養データを用いた品質劣化検出モデルの開発として、形態情報を基に異常度スコアを測定し、細胞老化によって引き起こされる品質劣化を定量的に検出可能なモデルを構築し、その有効性を示した。具体的には、Mahalanobis-Taguchi (MT)法を用いて、標準サンプルと定めた高品質サンプル（継代数 3）を基に標準データ空間を構築することで、測定対象データ（継代数 3~9）の異常度スコアを算出できる手法を開発した。具体的には、培養開始 6 時間後での形態情報から算出された異常度スコアと増殖・分化能の劣化傾向が一致し、長期培養での品質劣化サンプルを早期に検出できるモデルとして実用的な評価手法となる可能性を示した研究事例を記した。また、アプローチ②：限界継代数予測モデルの開発として、高純度 MSC クローンを用いて、継代数 1 の形態情報を基に機械学習モデルを構築し、拡大培養過程で生じる限界継代数の違いを高精度に予測可能であることを示した。さらに、機械学習モデルの精度と学習に用いるデータ数の検証を行うことで、具体的な撮影条件を明確化し、実製造への応用実現性を示した。

第 3 章では、実応用の為のロバスト細胞形態情報解析手法の開発として、培養容器内で生じる局所的な細胞密度を定量評価する Neighbor Score を開発し、細胞形態情報と増殖能への影響評価を行い、大規模データセット解析に含まれる細胞形態情報におけるバイアス・ノイズの分析と、そのリスクを回避するための新たな解析技術を開発した。

細胞培養実験において、播種工程の制御は難しく、人による操作では培養基材に細胞が不均一な位置に接着することで播種ムラが生じることがある。細胞培養の標準的

なプロトコルでは播種ムラを避ける為の操作が推奨されているが、細胞形態・細胞品質への影響は経験的な知見しかなく、定量的な違いは明らかになっていない。本章では、第一に「細胞間距離情報と細胞形態情報の関係」について定量的な比較を行い、細胞形態情報という計測データを、自発的形態 (**Spontaneous cell morphology**) と強制的形態 (**Forced cell morphology**) の 2 つの生物現象として捉えることで、細胞形態情報がどんな現象を表現しているかをデータとして整理し、細胞の **Potency** の表現から細胞培養環境の表現へと意味が転換していることを見出した。この概念に基づき、細胞形態情報が自発的か強制的かを画像解析から詳細に定量評価するための新規指標 **Neighbor Score** を開発し、大規模データセット解析の機械学習におけるデータクレンジング・データ統合の有効性について詳細に解析し、よりロバストな細胞収率予測モデルを構築する情報学的コンセプトを構築した。

第 4 章では本論文を通じて開発された細胞製造の為の細胞形態情報解析の有効性と課題について考察し、今後の実応用に向けた本手法の可能性について総括した。