



2013年4月25日

第5回 PMDA科学委員会 細胞組織加工製品専門部会

再生医療製品(細胞組織加工製品)の造腫瘍性評価

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
佐藤 陽治

本発表で述べられている見解は発表者の私見であって、国立医薬品食品衛生研究所
および厚生労働省の現在の公式な見解ではありません

造腫瘍性評価における留意点

重要なのは最終製品(を構成する細胞)の造腫瘍性

ステークホルダーが共有すべき認識

- 「**原材料となる(幹)細胞の造腫瘍性**」と「**最終製品の造腫瘍性**」との相関・因果関係は未解明
- 相関・因果関係は製品ごとに検討されるべきもの



例) ヒトがん細胞由来株を使った再生医療製品

Kondziolka *et al.*, *J Neurosurg.* 2005 Jul;103(1):38-45.

NT2 (ヒトテラトカルシノーマ細胞株) 由来神経細胞“LBS-Neurons”による
脳卒中治療の臨床試験 (ヒトでのPOCが得られず第2相までで中止)

・・・**重大な有害事象なし** (～24カ月間)

(レチノイン酸 & 増殖阻害剤で処理

⇒ ⇒ ⇒ 神経分化誘導 & 増殖細胞アポトーシス誘導)

安全性確保の上で最も重要なのは
「最終製品」の造腫瘍性

ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の //

ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の //

(厚生労働省 薬食発0907第 2・3・4号 平成24年9月7日)

第4章 非臨床安全性試験(抜粋)

「良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性については、製品の種類や特性、投与経路、生着部位、対象疾患、及び試験系の妥当性等を総合的に勘案して考察すること。必要に応じて適切な動物モデル等を利用した検討を行うこと。また、腫瘍形成又はがん化の可能性がある場合には、期待される有効性との関係等を勘案して、使用することの妥当性及び合理性について明らかにすること」

ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針

ヒトES細胞加工医薬品等の //

(厚生労働省 薬食発0907第 5・6号 平成24年9月7日)

第4章 非臨床安全性試験(抜粋)

「最終製品の細胞又は中間製品の細胞について、適切な動物モデル等を利用し、良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性に関して検討、考察すること。その際、製品の種類や特性、投与量・投与経路、生着部位、対象疾患及び試験系の妥当性等を総合的に勘案すること。また、腫瘍形成又はがん化の可能性がある場合には、期待される有効性との関係等を勘案して、使用することの妥当性及び合理性について明らかにすること」

いずれにせよ「造腫瘍性」についてのゼロリスクは求めている

ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する5指針 (厚生労働省 薬食発0907第2～6号 平成24年9月7日)

例：未分化iPS細胞の残存による腫瘍形成

はじめに(抜粋)

「(ヒト幹細胞加工医薬品等の)治験を開始するに当たっての基本的留意点は、当該製品にヒトへの適用により支障となる品質及び安全性上の明らかな問題が存在するか否か、臨床で得られた知見との関係性を照合できる程度に品質特性が把握され、その一定範囲の恒常性が確保されているか否かを確認することにある。その際、明らかに想定される製品のリスクを現在の学問・技術を駆使して排除し、その科学的妥当性を明らかにした上で、なお残る「未知のリスク」と、重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患、身体の機能や形態を一定程度損なうことによりQOLを著しく損なう疾患などに罹患し、従来の治療法では限界があり、克服できない患者が「新たな治療機会を失うことにより被るかもしれないリスク」とのリスクの大小を勘案し、かつ、これらすべての情報を開示した上で患者の自己決定権に委ねるという視点を持つこと、すなわち、リスク・期待されるベネフィットの情報を開示した上で、治験に入るかどうかの意思決定は患者が行うという視点を入れて評価することも重要である。」

例：現在の技術では排除しきれない又は検出限界未満の残存未分化iPS細胞による腫瘍形成

「造腫瘍性」・・・リスクの実体は何か？

腫瘍による物理的障害	悪性腫瘍形成
<ul style="list-style-type: none">● 最終製品中への不死化細胞の混入（未分化ES/iPS細胞も含む） <p>⇒ 組織の圧迫等 （腫瘍が良性であっても問題） ・・・関節、脊髄などのケース</p>	<ul style="list-style-type: none">● 最終製品中へのがん細胞の混入 <p>・・・腫瘍悪性度の最終判断は 病理学的検討による</p> <p>テラトーマ（良性腫瘍） vs. テラトカルシノーマ（悪性腫瘍）</p>



考慮すべき要素

- 当該製品を使用しない場合に予想される患者の予後（**患者の治療機会喪失のリスク**）
- **リスク・マネジメント・プラン**
（フォローアップ計画、外科的除去・化学療法・免疫抑制剤中止等の有効性）

原材料の「造腫瘍性」に基づく製品分類

- ヒトES/iPS細胞加工製品
 - ・・・原材料の細胞に造腫瘍性がある
- ヒト体細胞/体性幹細胞加工製品
 - ・・・原材料の細胞に造腫瘍性が(殆ど)ない

ヒトES/iPS細胞加工製品の造腫瘍性試験

- **意義**: ヒトでの生着部位での腫瘍形成能を考察する材料
- **投与**: 目的分化細胞
(+前駆細胞+残存ES/iPS細胞+他の目的外細胞)
- **検討事項**:
 1. 「どのくらいヒトES/iPS細胞が残存しているか？」
 2. 「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が発生しているか？」
 3. 「投与細胞が、生着する微小環境において腫瘍を形成するか？」

ヒトES/iPS細胞加工製品の造腫瘍性

1.「ヒトES/iPS細胞が残存しているか？」

- *in vitro*試験で評価可能

(例)

- qRT-PCR(未分化細胞マーカー発現)
- フローサイトメトリー(未分化細胞マーカー発現)

ヒトES/iPS細胞加工製品の造腫瘍性

2. 「造腫瘍性形質転換細胞が発生しているか？」

- *in vitro*試験で評価可能

(例)

- 細胞増殖特性評価

(既定培養期間を越える培養時の増殖異常の検出)

- 軟寒天コロニー試験

(足場非依存的増殖細胞の検出)

- 十分高感度ならば*in vivo*試験でも評価可能

In vitro 造腫瘍性関連試験の性能比較

Kuroda et al., PLoS One 2012;7(5):e37342

アッセイ	qRT-PCR	フローサイトメトリー	軟寒天コロニー形成試験
測定項目	分化多能性マーカー遺伝子の発現	分化多能性マーカータンパク質の発現	コロニー形成
目的	未分化な多能性細胞の検出	未分化な多能性細胞の検出	足場非依存的細胞増殖(悪性形質転換細胞)の検出
時間	6時間	1日	30日
利点	<ul style="list-style-type: none"> ●迅速 ●簡便 ●定量的 ●高感度 	<ul style="list-style-type: none"> ●迅速 ●個々の細胞を解析 	<ul style="list-style-type: none"> ●安価
欠点	<ul style="list-style-type: none"> ●間接的 ●既知のマーカー遺伝子を発現している細胞以外は検出不能 	<ul style="list-style-type: none"> ●間接的 ●既知のマーカー分子を発現している細胞以外は検出不能 ●ゲーティングが結果に影響 	<ul style="list-style-type: none"> ●間接的 ●ヒト多能性幹細胞には適用不可能(分散誘導性細胞死)
検出限界	RPE(網膜色素上皮細胞)中の0.002%以下のhiPSC(LIN28)	RPE中の0.1%のhiPSC(TRA-1-60)	RPE中の1%のPA-1細胞(ヒトテラトカルシノーマ由来細胞)

ヒトES/iPS細胞加工製品の造腫瘍性

3.「生着する微小環境において腫瘍を形成するか？」

*in vivo*試験が必要

造腫瘍性試験の国際ガイドライン

- WHO “Requirements for Use of Animal Cells as in vitro Substrates for the Production of Biologicals” in WHO Expert Committee on Biological Standardization, 47th Report (1998) (technical report series number 878, TRS 878)
<http://www.who.int/biologicals/publications/trs/en/>
[http://www.who.int/biologicals/Cell Substrates clean version 18 April.pdf](http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf) (改訂版)

概略・・・「ヌードマウス等の動物10匹に 10^7 個投与してHeLaなどと比較」
(～16週間)

WHO TRS 878の造腫瘍性試験

(2010年改訂版)

http://www.who.int/biologicals/BS2132_CS_Recommendations_CLEAN_19_July_2010.pdf

適用対象

- **生物製剤製造用の動物細胞基材**
 - 所定の継代数以上にわたって培養したMCB, 最初に樹立したWCB
 - 二倍体細胞株、幹細胞株、連続継代性細胞株
- **患者に移植する「動物由来生細胞」及び「細胞・組織利用製品の原料となる細胞」は対象外**

細胞・組織加工製品を対象とした造腫瘍性試験ガイドラインは存在しない

WHO TRS 878 では 「何の」造腫瘍性を評価するのか？

- 生物薬品製造用細胞基材 (WHO TRS 878)

連続継代性細胞株等のセルバンク(均一集団)の造腫瘍性
↑ (目的: 造腫瘍性の変化 = バンクの品質異常)

- 細胞・組織加工製品

最終製品の(混入する細胞に起因する)造腫瘍性

ごく少数の未分化・造腫瘍性細胞に起因する造腫瘍性を検出するにはWHO-TRS878よりも高感度な系が必要



重度免疫不全マウスを用いた造腫瘍性試験系(例)

● NOD/SCID/ γ C^{null}(NOG)マウス

- T、BおよびNK細胞欠失、補体活性消失、マクロファージや樹状細胞の機能不全
- **国産**(実験動物中央研究所が樹立、2002年に報告)



NOD/SCID/IL2rgKO(NSG)マウス

- T、BおよびNK細胞欠失など、NOGと類似した表現型
- 米国Jackson Labが樹立、2005年に報告

<その他SCID/Beigeや、Rag2- γ C double-knockout (DKO)なども、T、B、NK細胞欠失>



- ノードマウス等、従来の免疫不全動物に比べ、**ヒトの細胞や組織の生着性が著しく高く**、ヒト癌細胞を高率に生着させることが可能



ただし、科学的リスク評価のためには

細胞・組織加工製品の造腫瘍性の**定量化の方策**の検討／**標準化**が必要

検討課題： 検出限界／感度／精度、陽性・陰性コントロール、投与細胞数、投与経路、観察期間、ノードマウスとの比較試験、免疫状態の差の影響など

ヒトES/iPS細胞加工製品の造腫瘍性

3.「生着する微小環境において腫瘍を形成するか？」

- *in vivo*試験が必要
 - 最終製品の主成分が分化細胞の場合：
ごく少数の未分化・造腫瘍性細胞に起因する腫瘍を検出するには既存GL (WHO-TRS878)よりも高感度な系が必要
(その場合は検出限界・感度・精度等の性能について独自に評価が必要)
 - 投与部位： 可能ならば、ヒトでの投与部位に相当する部分
 - 投与細胞数： 可能ならば、ヒトでの投与量の10-100倍
(種差・個体差の安全係数)
 - 物理的障害を生ずるなどの理由で投与数に限界がある場合：
可能ならば、投与部位を変えるのではなく、動物とヒトとの間の当該投与部位の相対的スケール比に応じて投与数を調節する
- = 生着する微小環境と投与細胞との相互作用による腫瘍形成の可能性を考察することを優先する

ヒト体細胞(体性幹細胞)加工製品

~~ヒトES/iPS細胞加工製品~~の造腫瘍性試験

- **意義:** ヒトでの生着部位での腫瘍形成能を考察する材料
- **投与:** 目的分化細胞
(+前駆細胞+~~残存ES/iPS細胞~~+他の目的外細胞)
- **検討事項:**
 1. ~~「どのくらいヒトES/iPS細胞が残存しているか？」~~
 2. 「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が発生しているか？」
 3. 「投与細胞が、生着する微小環境において腫瘍を形成するか？」




造腫瘍性試験なしに患者に投与

「造腫瘍性はない」というコンセンサスがある

日本ではこれらは「移植医療」

「業」として製造販売するなら
製品ごとの製造販売承認が必要

ヒト体細胞・組織を利用した製品の区分

日本 	細胞・組織	細胞・組織	細胞・組織加工製品 (医薬品・医療機器)	細胞・組織加工製品 (医薬品・医療機器)
米国 	細胞・組織 (または361HCT/P)**	351HCT/P (医薬品・医療機器)	351HCT/P (医薬品・医療機器)	351HCT/P (医薬品・医療機器)
EU 	細胞・組織	ATMP (医薬品)	ATMP (医薬品)	ATMP (医薬品)
最小限以上の加工 (実質的加工)	無し	無し	有り	有り
細胞の使われ方	Homologous Use	Non-Homologous Use	Homologous Use	Non-Homologous Use

注：GTPはこれら全てに適用。「ヒト幹細胞臨床研究指針」で言う「細胞調製品」は「細胞・組織利用製品」と実質的に同義。

**「全身的な作用がある」「ドナーと患者の間に血縁関係がない」などの条件によっては351HCT/Pと見なされる場合がある。

細胞増殖特性解析等で、加工による「不死化細胞(造腫瘍性獲得の初期段階)の発生・混入」が否定できれば十分では？

加工による造腫瘍性細胞の出現・混入の可能性が問題

製品ごとの販売承認が必要

セル・バンクの品質管理が主目的

欧米で承認済みのヒト体細胞加工製品の造腫瘍性試験 (それぞれの審査概要等から抽出・整理)

	製品名	細胞/足場材料	適用	造腫瘍性試験			核型分析	免疫不全動物を用いた他の試験(動物)	備考
				in vivo (動物)	軟寒天コロニー形成試験	細胞増殖特性解析			
USA	Carticel	自己軟骨細胞	軟骨損傷						
	Provence	自己樹状細胞 (PAP抗原提示)	転移性前立腺がん						「自己由来製品なので」非臨床安全性試験なし
	laViv (azficel-T)	自己線維芽細胞	ほうれい線解消 (美容整形)						「ヒトでの経験が豊富なので」非臨床試験なし、なお臨床試験中に腫瘍形成1例
	HemaCord (HPC-C)	同種臍帯血造血前駆細胞	造血幹細胞移植			○			Colony forming unit測定
	Epicel	自己角化細胞 / マウス細胞層	熱傷	○ (ヌードマウス)	○		○	○ (ヌードマウス)	ヌードマウス・軟寒天ともに陰性
	Apligraf (Graftskin)	同種角化細胞 + 同種線維芽細胞 / ウシ由来コラーゲン	皮膚潰瘍	○ (ヌードマウス)			○	○ (hu-SCIDマウス)	MCBがヌードマウスで陰性
	Gintuit (Apligraf (Oral))	同種角化細胞 / ウシ由来コラーゲン	口腔軟組織再生	○ (ヌードマウス)					MCBがヌードマウスで陰性
	TransCyte (Dermagraft-TC)	同種線維芽細胞 / ナイロン基材	熱傷		○			○ (ヌードマウス)	軟寒天で陰性
	Dermagraft	同種線維芽細胞 / ポリグラクチンメッシュ	皮膚潰瘍	○ (ヌードマウス)			○	○ (ヌードマウス)	ヌードマウスで陰性
	OrGel	同種角化細胞 + 同種線維芽細胞 / ウシ由来コラーゲン	熱傷 表皮水疱症					○ (SCIDマウス, ヌードマウス)	
EU	ChondroCelect	自己軟骨細胞	軟骨損傷			○	○ (ヌードマウス)	既定期間を越えた培養で細胞老化確認	

[Cancer Res 2009;69(13):5331-9]

Research Article

Long-term Cultures of Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Frequently Undergo Spontaneous Malignant Transformation

Gro Vatne Røsland,¹ Agnete Svendsen,¹ Anja Torsvik,¹ Ewa Sol-Heike Immervoll,^{3,5} Josef Mysliwietz,⁸ Joerg-Christian Tor
Per Eystein Lønning,^{4,6} Rolf Bjerkvig,^{1,9} and Christian

Letter to the Editor

**Spontaneous Malignant Transformation
of Human Mesenchymal Stem Cells
Reflects Cross-Contamination: Putting
the Research Field on Track – Letter**

Cancer Res 2010;70:6393-6396.

⇒ 「細胞が悪性形質転換するか」の問題ではなく、「製造工程管理」「GMP」の問題である

ただし、成人由来の加工体細胞・体性幹細胞の移植による腫瘍形成を報告した科学論文はない

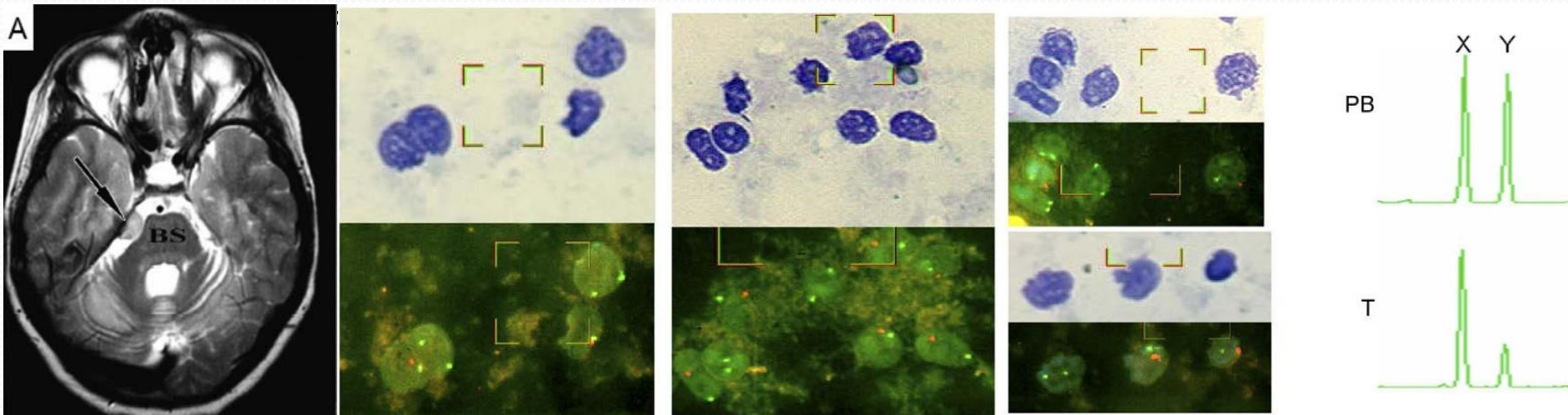
体性幹細胞を用いた治療による腫瘍形成

副作用

例：毛細血管拡張性運動失調症患者への神経幹細胞移植治療

(Amariglio N *et al. PLoS Med.* 2009;6(2):e1000029.)

患者(♂)：9・10・12歳の時にモスクワで、
小脳・くも膜下腔に**ヒト胎児**神経幹細胞を移植
13歳で脳腫瘍と診断



まとめ

- 細胞・組織加工製品を対象とした造腫瘍性試験ガイドラインは存在しない
- 既存ガイドラインであるWHO-TRS 878 における造腫瘍性試験は、均一な生物製剤製造用細胞基材の造腫瘍性を評価することを目的としており、ごく僅かに含まれる細胞に起因する細胞・組織加工製品の造腫瘍性評価にそのまま転用することには無理がある
- 重度免疫不全マウスを用いた造腫瘍性の定量的評価には、現段階では自前での分析学的評価が必要
- 造腫瘍性試験系は、試験系の能力と限界を踏まえ、個別の製品で示すべき目的に合うかどうかで取捨選択

- 懸念の強い製品については、タイプの異なる試験をいくつか実施して総合的に
- 適切な試験(を組み合わせた)結果・評価についても、ヒトでの結果を完全に保証するものではない
- 各試験法の能力と限界を理解したうえで、リスク判断・リスクマネジメント立案&IC受領