



令和3年12月17日

第4回 医薬品毒性機序研究会  
シンポジウム4 多様な医薬品モダリティに対応する毒性研究

# 再生・細胞医療に用いられる細胞加工製品の 造腫瘍性評価のための試験法開発

国立医薬品食品衛生研究所  
再生・細胞医療製品部  
佐藤 陽治

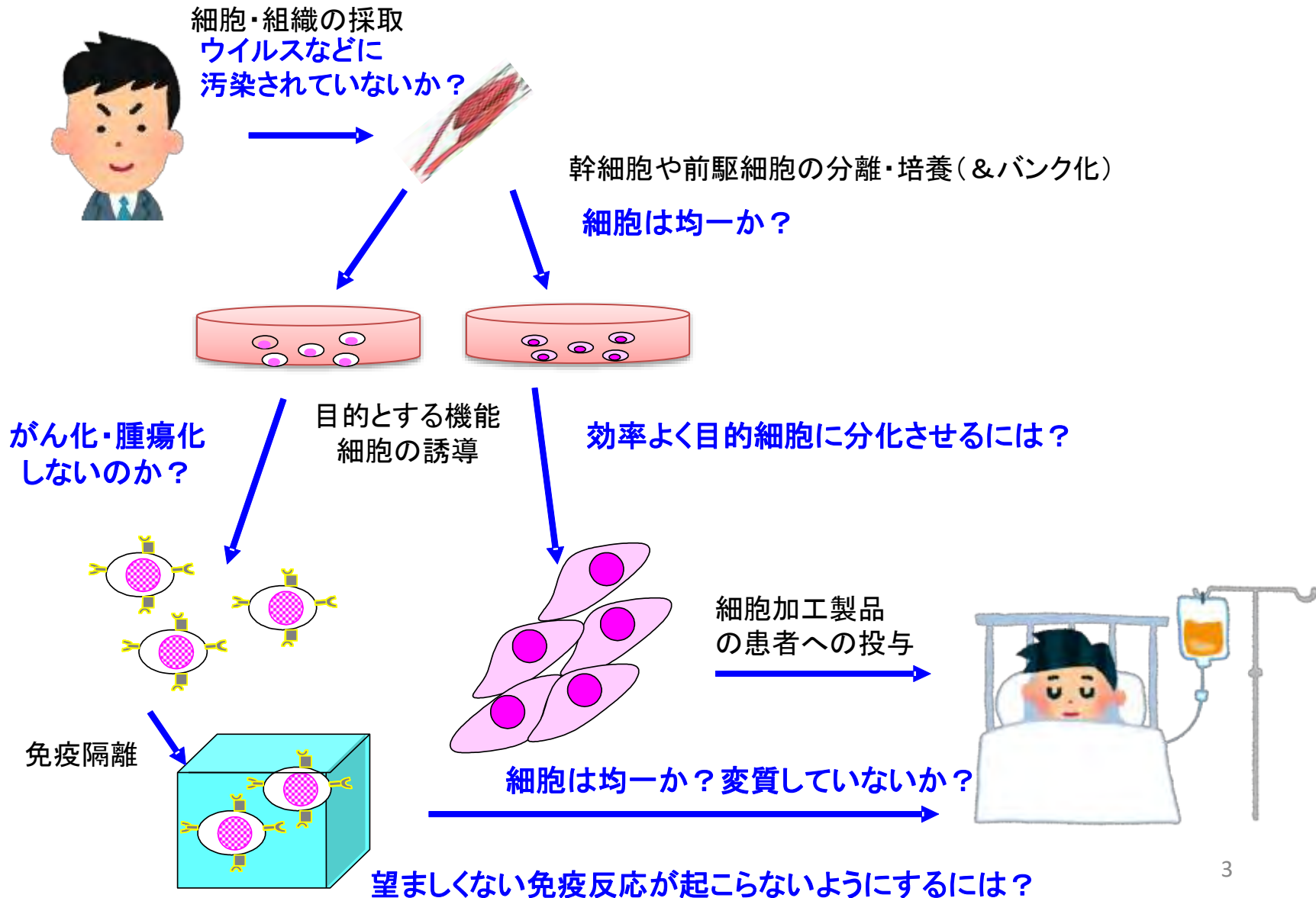
本発表で述べられている見解は発表者の私見であって、国立医薬品食品衛生研究所  
ないし厚生労働省の公式な見解では必ずしもありません

# 再生・細胞医療に用いられる細胞加工製品の 造腫瘍性評価のための試験法開発

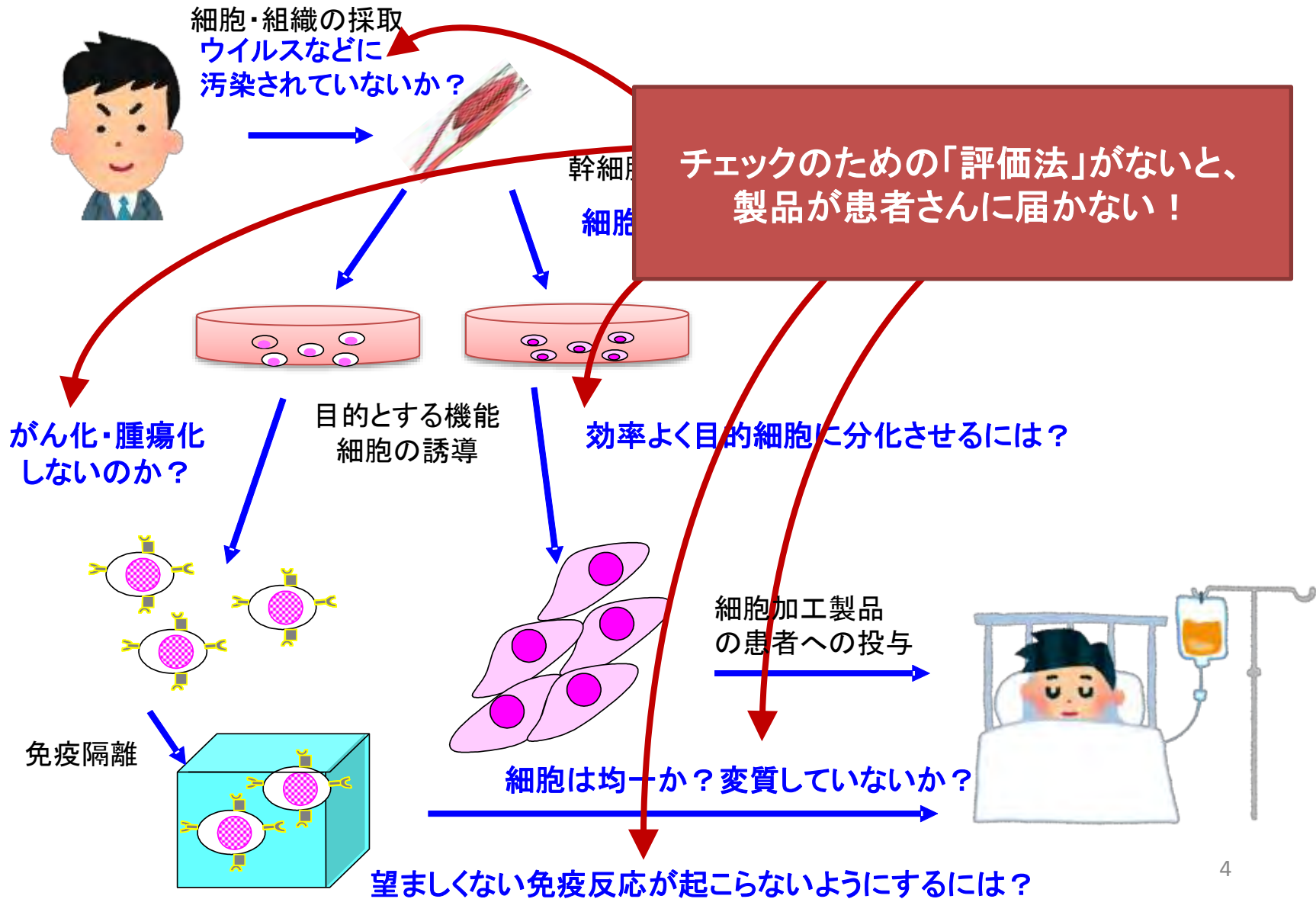
国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部  
佐藤 陽治

筆頭演者は、本演題の発表に関して開示すべきCOIはありません。

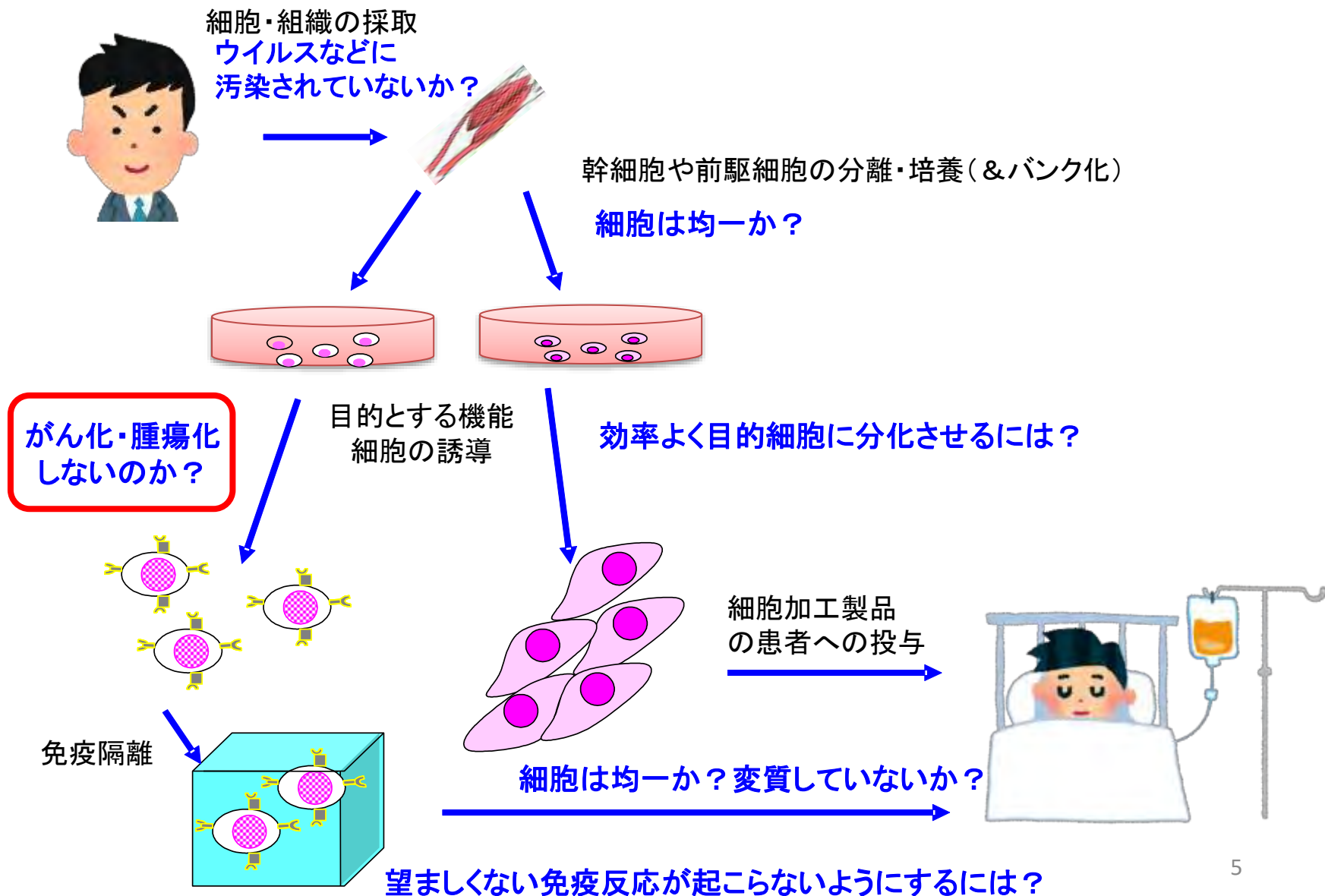
# 細胞加工製品(再生医療等製品)の製造



# 細胞加工製品(再生医療等製品)の製造



# 細胞加工製品(再生医療等製品)の製造



# 再生医療等製品(細胞加工製品)の造腫瘍性評価の問題点

再生医療等製品(細胞加工製品)は生きた細胞を含む

＝製品中の細胞が異常増殖をして腫瘍を形成する恐れ

・・・ここまでは誰もが理解できる



では、どうすれば造腫瘍性の評価ができるのか？

・・・実はよく知られていない



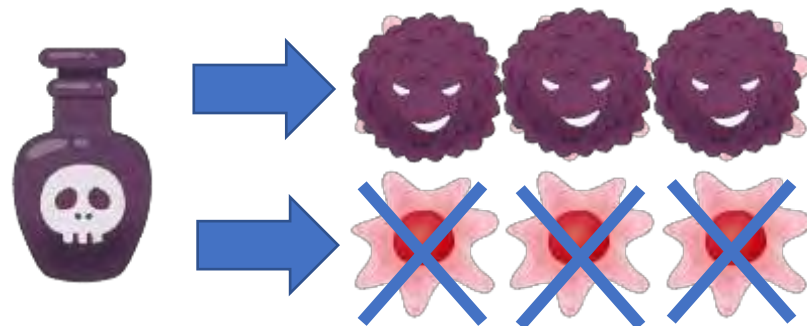
# 新規医薬モダリティ(再生医療等)の実用化に必要なこと

**①「新しい製品には新しい考え方を」**

# 低分子医薬品の毒性 vs. 細胞加工製品の造腫瘍性

- 低分子医薬品の毒性

低分子医薬品の体(細胞・組織・臓器)に対する悪影響

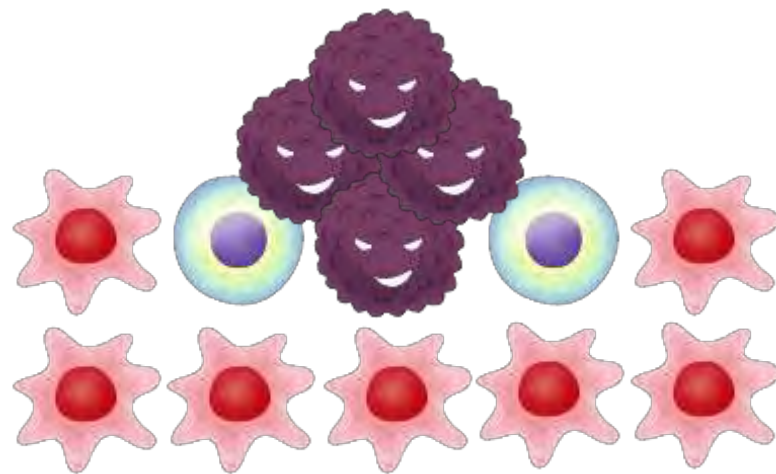


新しいタイプのリスク  
= 従来の評価法が  
そのまま使えるとは限らない

- 細胞加工製品の造腫瘍性

ヒトの体に移植した細胞集団が、

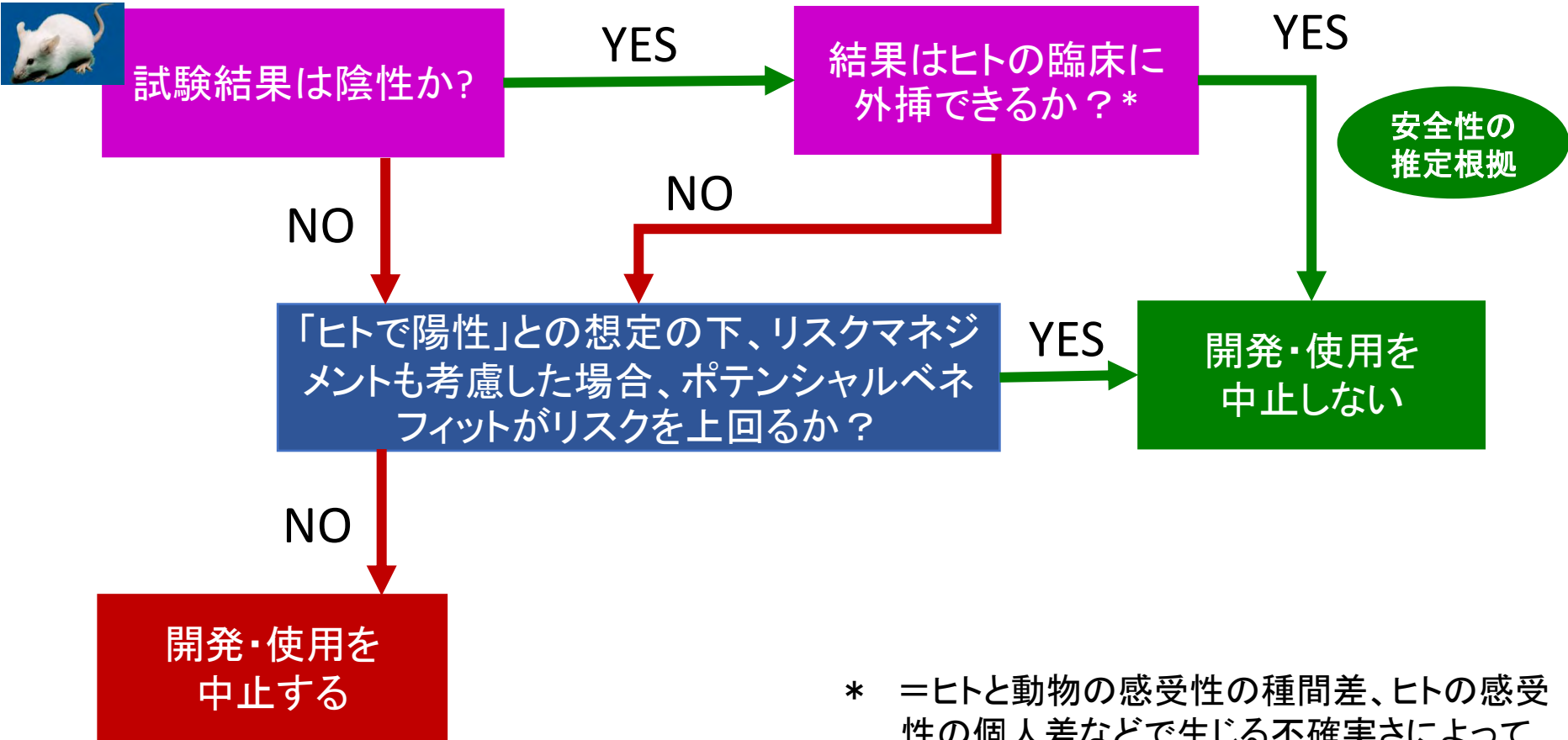
自ら増殖することにより腫瘍を作ってしまう能力





# 従来の低分子医薬品の毒性試験における 結果の解釈・意思決定の流れ

大量投与(例:臨床量の100倍)

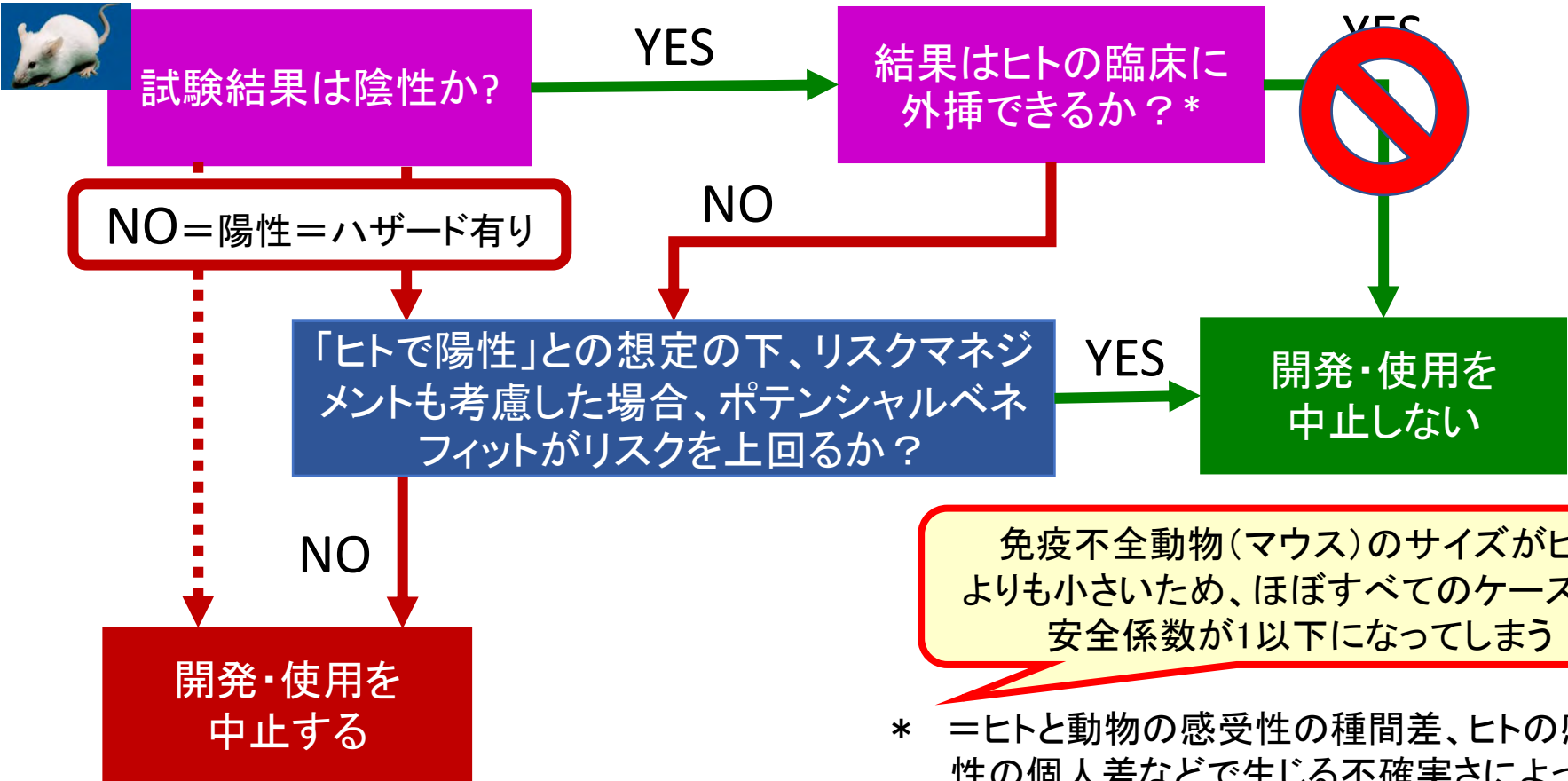


低分子医薬品の毒性試験は、  
「動物での結果をヒトでの安全性推定の根拠とし、  
臨床試験に進むこと」を期待して実施する

\* =ヒトと動物の感受性の種間差、ヒトの感受性の個人差などで生じる不確実さによって、リスクが小さく見積もられることがないように、  
**安全係数(不確実係数)**  
が組み入れられているか？

# 細胞加工製品のin vivo造腫瘍性試験における 結果の解釈・意思決定の流れ

限定的投与量(臨床量以下)



細胞加工製品のin vivo造腫瘍性試験は、「動物での結果をヒトでの安全性推定の根拠とし、臨床試験に進む」というポジティブな活用はできない

免疫不全動物(マウス)のサイズがヒトよりも小さいため、ほぼすべてのケースで、安全係数が1以下になってしまう

\* =ヒトと動物の感受性の種間差、ヒトの感受性の個人差などで生じる不確実さによって、リスクが小さく見積もられることがないように、安全係数(不確実係数)が組み入れられているか？

# 全く新しいヒト細胞加工製品のFirst-in-Human試験の前に リスク緩和策として何ができるか？

$$\begin{array}{c} \text{危害(Harm)の} \\ \text{重大性} \\ \text{ハザードの量} \\ \text{×ハザードの影響力} \end{array} \times \begin{array}{c} \text{危害(Harm)の} \\ \text{発生確率} \end{array} = \text{リスク}$$

## ヒト細胞加工製品の場合



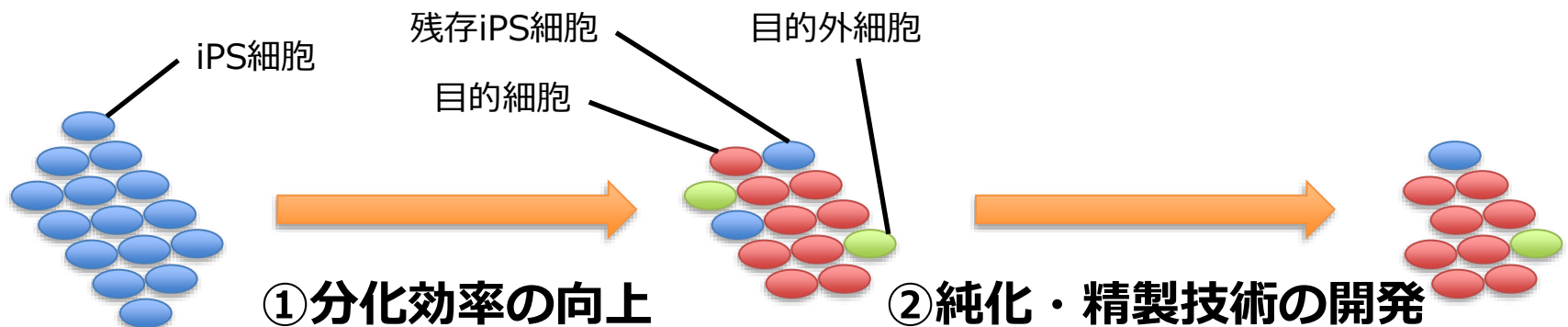
ヒト細胞加工製品のリスク緩和のための基本戦略は...

ハザードを同定・定量し、可能な範囲で低減すること

# ヒトES/iPS細胞加工製品の 腫瘍形成リスクに関するハザード(危害要因)

- **未分化なES/iPS細胞には腫瘍形成能（造腫瘍性）**があることから、  
残存ES/iPS細胞による造腫瘍性のリスクが存在する。
- 培養に伴う**造腫瘍性形質転換細胞**の出現の可能性もある。

**未分化ES/iPS細胞・造腫瘍性細胞の残存・混入を防止する工夫が必要**



**③製品の「実用化」には、未分化ES/iPS細胞や造腫瘍性形質転換細胞の  
除去・残留を確認する試験法が不可欠**

## ②「目的に適った評価法を探す・作る」

# 開発・審査のバイオニア期

「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針に係るQ&Aについて」(平成20年, 厚労省審査管理課事務連絡)より

腫瘍形成及びがん化の可能性について考慮し明らかにすることとされているが、どのようにすれば良いのか。

細胞・組織の由来、加工方法等を考慮し、また、これまでに得られている知見を踏まえて、例えば、以下のような方法により、腫瘍形成及びがん化の可能性について評価すること。

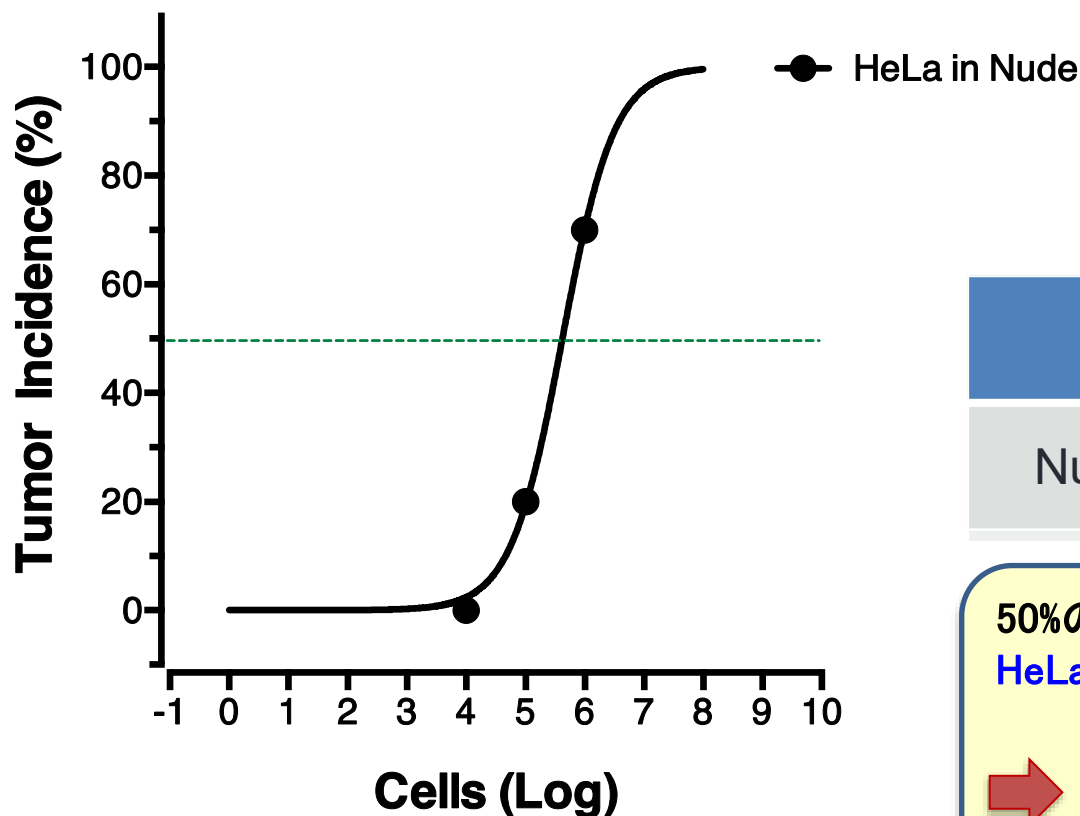
- ・核型分析
- ・継代数を重ね培養しても細胞特性に変化がないことの確認
- ・軟寒天培地法
- ・免疫不全動物の皮下に細胞を移植し腫瘍形成の有無の確認

# HeLa細胞単独皮下投与試験 (WHO TRS 978で推奨のヌードマウス試験の感度)

WHO TRS 978: 生物製剤\*製造時に細胞基材として用いられる細胞株の品質評価ガイドライン  
(\*再生医療製品の品質・安全性評価は対象外)



## Nodule Formation 16 weeks after Subcutaneous Administration



	TPD50
Nude	$4.0 \times 10^5$

50%の確率で腫瘍を形成させるためでも  
HeLa細胞が40万個も必要

➡ 細胞加工製品の品質・安全性評価  
には十分な感度とは言えない

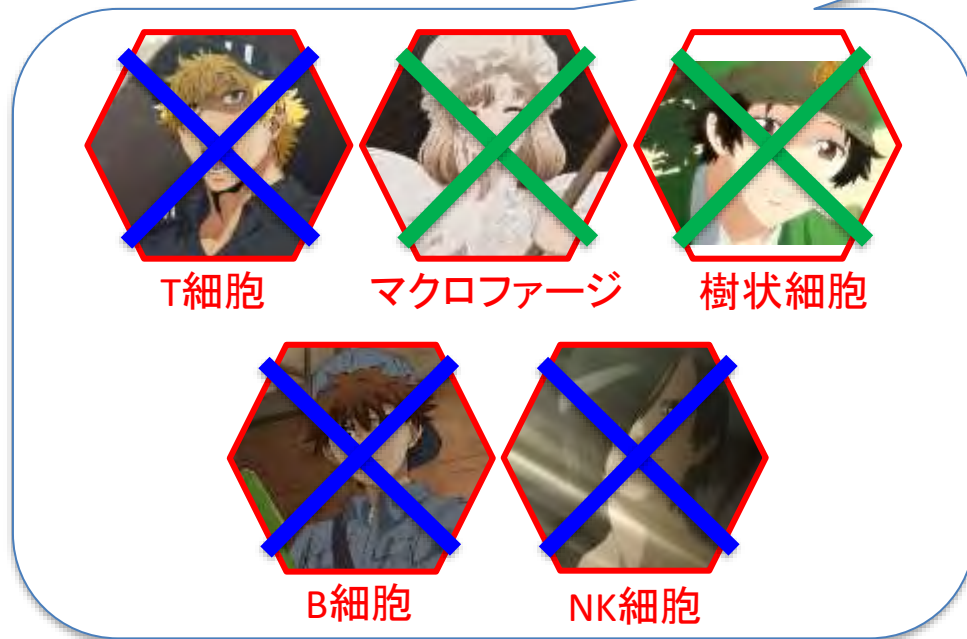
# 重度免疫不全動物への移植実験

(公財)実験動物中央研究所との共同研究

ヒト由来の細胞の造腫瘍性を動物実験で確認するには動物側の免疫拒絶を押さえておく必要がある。

NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jicマウス(NOGマウス)は、(公財)実験動物中央研究所で開発されたマウス系統で、

免疫系の細胞が無いまたは重度機能不全を起こしている  
=ヒトの細胞を移植しても、拒絶反応が少ない



造腫瘍細胞あり



ヒト由来細胞

造腫瘍細胞なし

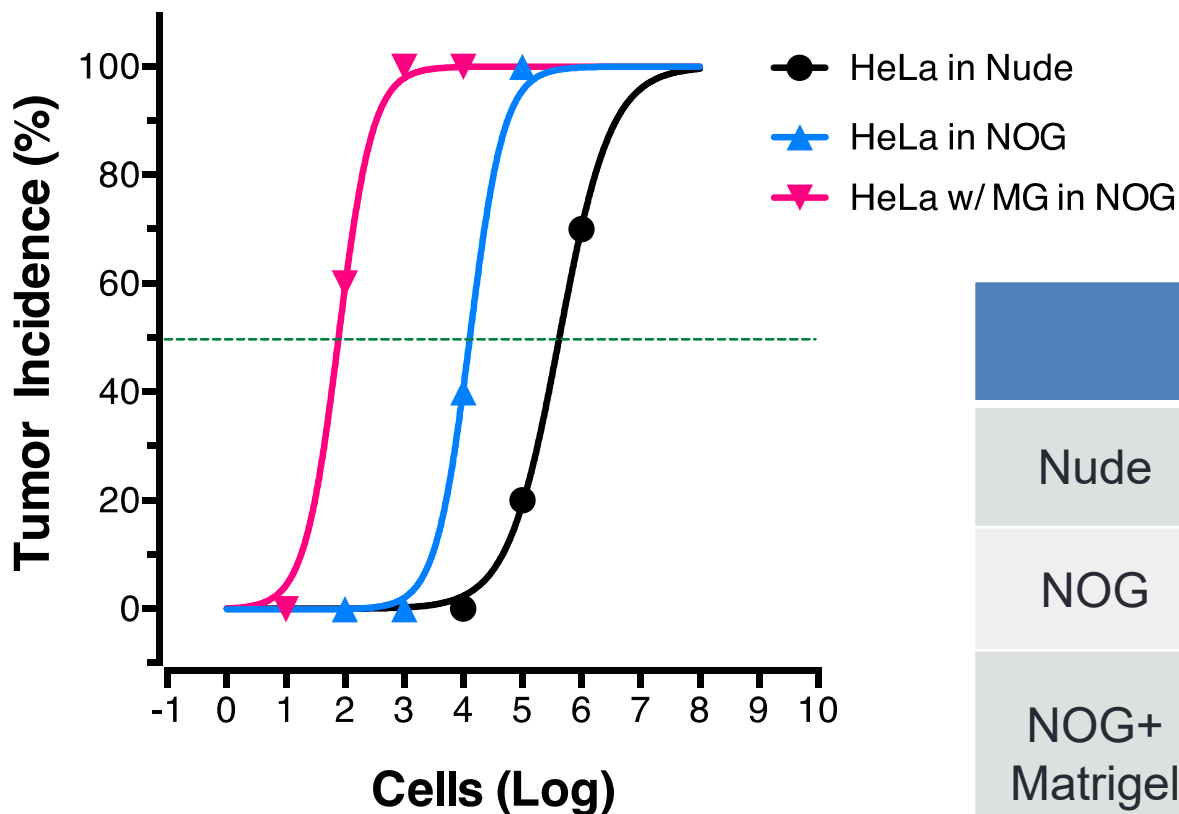




# HeLa細胞単独皮下投与試験(ヌードマウスとの感度の比較)



## Nodule Formation 16 weeks after Subcutaneous Administration



	TPD50	Fold
Nude	$4.0 \times 10^5$	1
NOG	$1.3 \times 10^4$	25
NOG+ Matrigel	$7.9 \times 10$	5,000

**③「各評価法の能力と限界を知る」**

# 開発・審査のバイオニア期

「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針に係るQ&Aについて」(平成20年, 厚労省審査管理課事務連絡)より

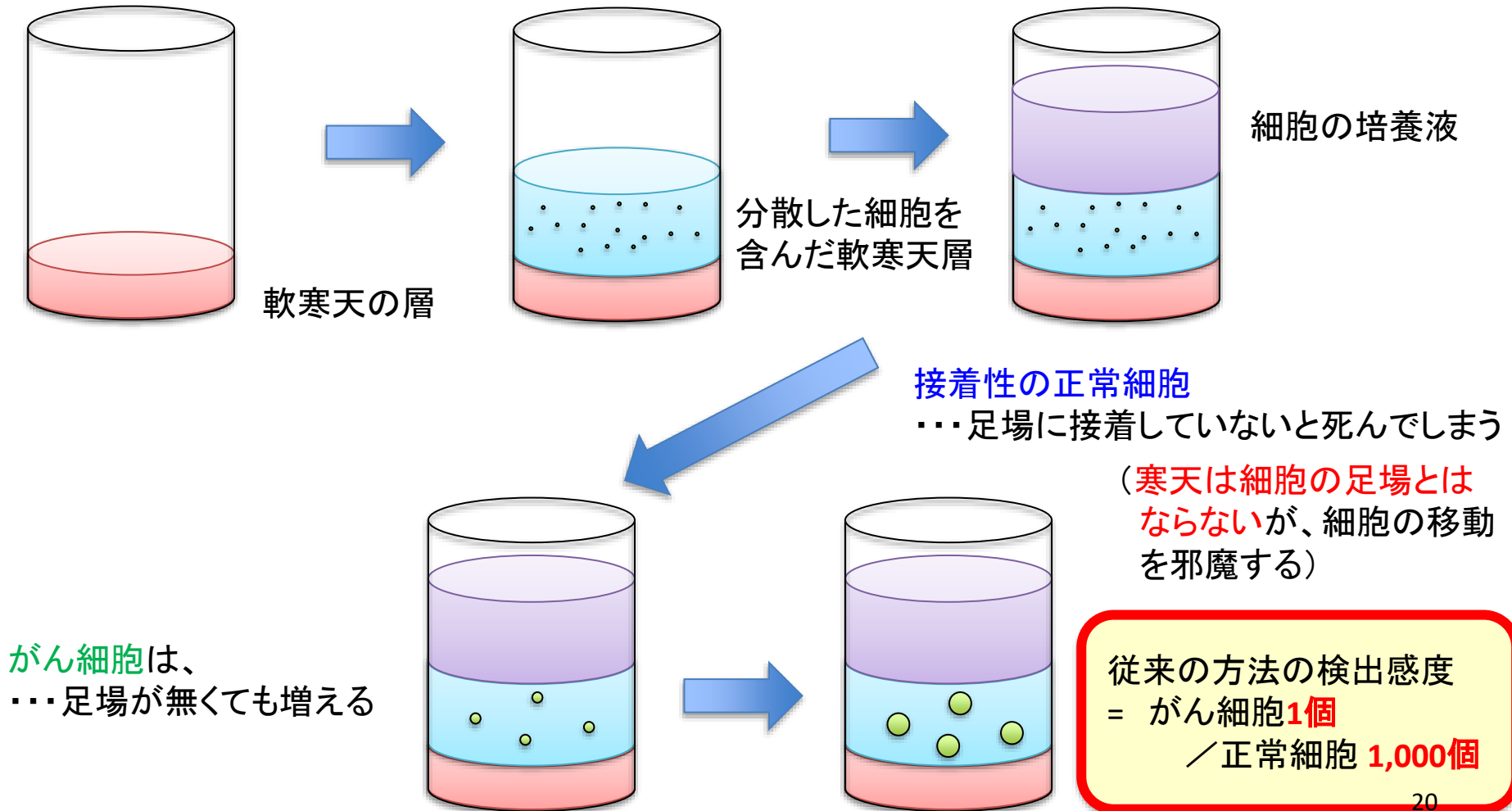
腫瘍形成及びがん化の可能性について考慮し明らかにすることとされているが、どのようにすれば良いのか。

細胞・組織の由来、加工方法等を考慮し、また、これまでに得られている知見を踏まえて、例えば、以下のような方法により、腫瘍形成及びがん化の可能性について評価すること。

- ・ 核型分析
- ・ 継代数を重ね培養しても細胞特性に変化がないことの確認
- ・ 軟寒天培地法
- ・ 免疫不全動物の皮下に細胞を移植し腫瘍形成の有無の確認

# 軟寒天コロニー形成試験

試験目的: 足場非依存的増殖(悪性形質転換細胞)の検出

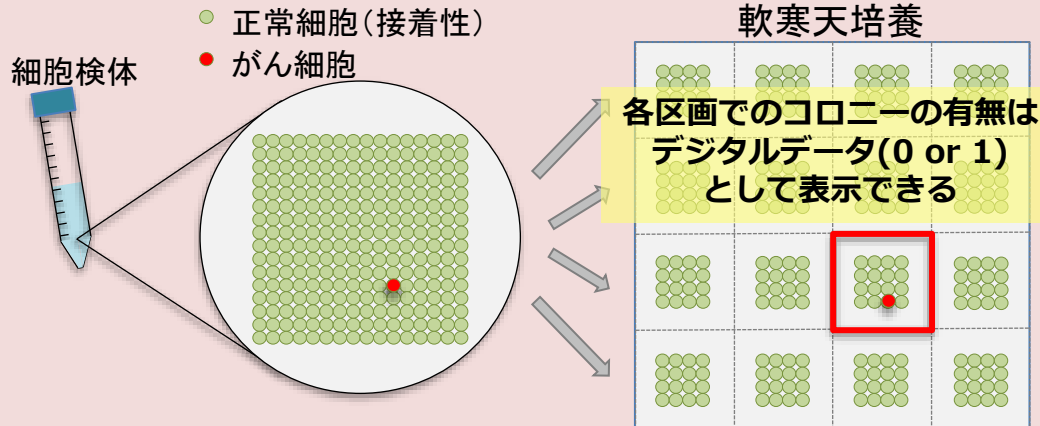


# デジタル軟寒天コロニー形成試験：感度向上の取り組み

Kusakawa S, et al. Sci Rep. 2015;5:17892.

## コンセプト

検体を多数の区画に分ける  
(がん細胞が区画あたり1個以下なるように)



一般に、検出シグナルの強さ(S)とバックグラウンド・ノイズの強さ(N)の比率(S/N)が高いほど、感度がよい

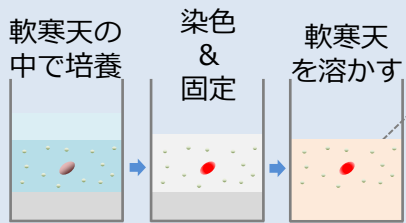
低 S/N 比



高 S/N 比

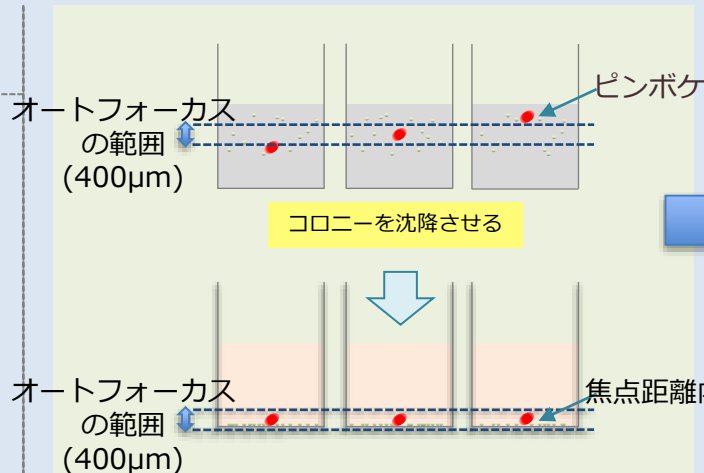
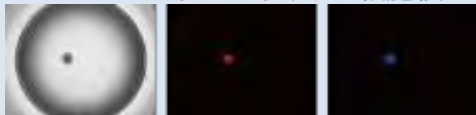
## 測定方法

### 軟寒天培養 & サンプル調製

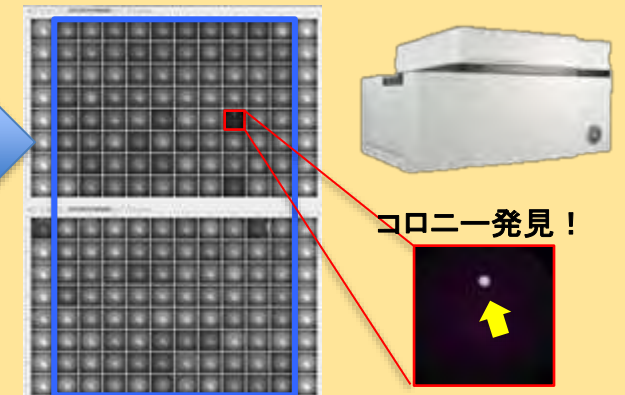


沈降後の様子  
(蛍光イメージ)

明視野 ミトコンドリア 細胞核



### 高容量の細胞イメージ測定装置を使ってコロニーを検出

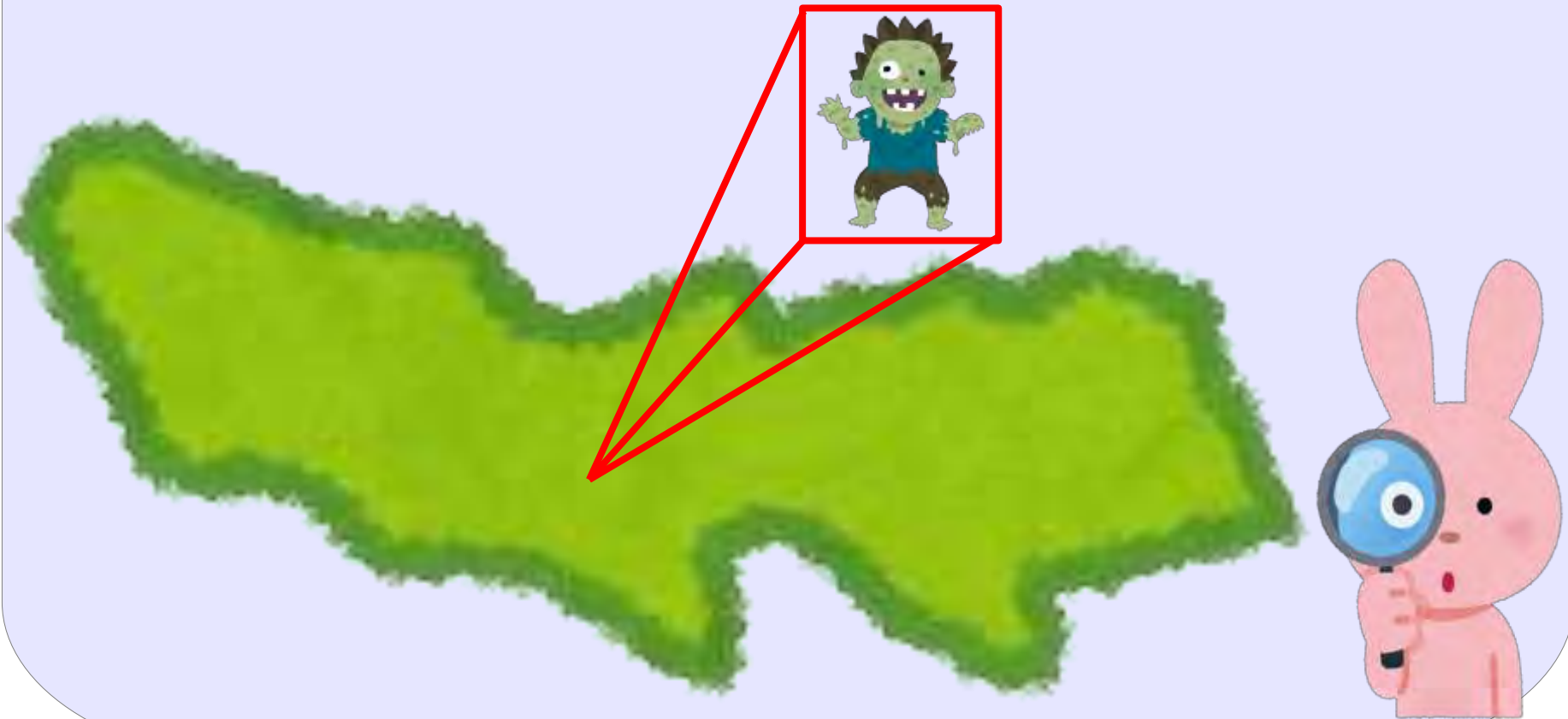


# 正常細胞中に微量に混在するがん細胞を検出する技術

(1000万分の1の割合で混在するがん細胞を検出することが可能に)

イメージ:

東京都(人口約900万人)の中から1人のゾンビを見つけ出すことが可能な技術



# 混在形質転換細胞の検出法の能力と限界

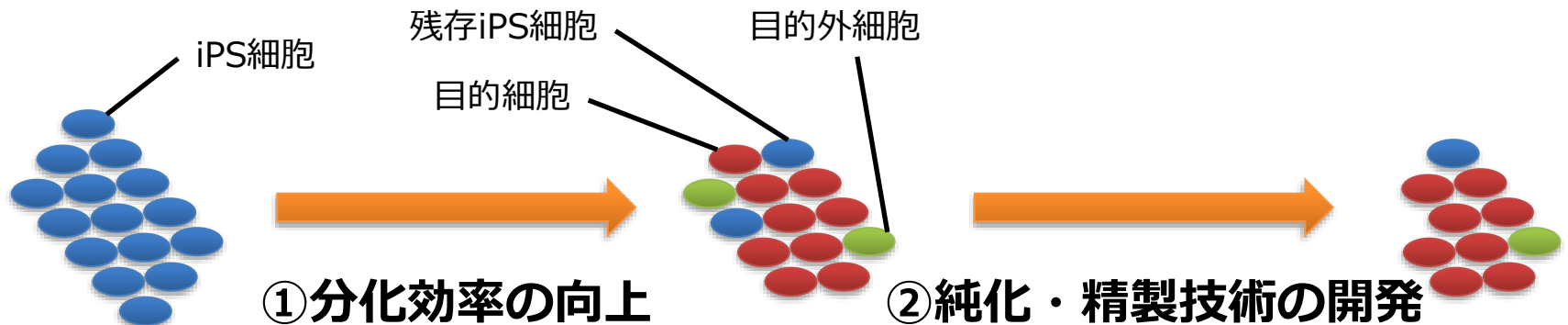
試験法の「能力と限界を知る」ことが大切

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (NOG x Matrigel, 皮下投与)	軟寒天コロニー形成試験	デジタル 軟寒天コロニー形成試験	細胞増殖特性解析
目的	造腫瘍性細胞の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞)の検出	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞)の検出	不死化細胞 (形質転換細胞)の検出
所要時間	16週間以上	3-4週間	3-4週間	4週間またはそれ以上
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>直接的</li> <li>臨床適用相当部位の微小環境での造腫瘍性を評価可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>安価</li> <li>悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>安価で簡便</li> <li>良性も悪性も幅広く不死化細胞を検出</li> </ul>
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> <li>費用と時間がかかる</li> <li>専用動物施設が必要</li> <li>良性不死化細胞検出不能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断</li> <li>浮遊系細胞には使えない</li> <li>良性不死化細胞検出不能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断</li> <li>浮遊系細胞には使えない</li> <li>良性不死化細胞検出不能</li> <li>イメージスキャナーが高価</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断</li> <li>(良性と悪性を区別できない)</li> </ul>
検出限界 または 検出能力	hMSCIに $1/1E+6$ (0.0001%) の割合で混入するHeLa細胞 (10個)を17%の確率で検出	hMSCIに $1/1E+3$ (0.1%) の割合で混入するHeLa細胞 (計算上は0.02%)	hMSCIに $1/1E+7$ (0.00001%) の割合で混入するHeLa細胞を検出可能	hMSCIに $1/1E+6$ (0.0001%) の割合で混入するHeLa細胞。脂肪由来幹細胞に $1/1E+5$ (0.001%) の割合で混在する不死化脂肪由来幹細胞は検出可能
出典	Kusakawa <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Kusakawa <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Kusakawa <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2015	Kono <i>et al.</i> , <i>Biologicals.</i> 2015&2017 Hasebe-Takada <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2016

# ヒトES/iPS細胞加工製品の 腫瘍形成リスクに関するハザード(危害要因)

- **未分化なES/iPS細胞には腫瘍形成能（造腫瘍性）**があることから、  
残存ES/iPS細胞による造腫瘍性のリスクが存在する。
- 培養に伴う**造腫瘍性形質転換細胞**の出現の可能性もある。

未分化ES/iPS細胞・造腫瘍性細胞の残存・混入を防止する工夫が必要



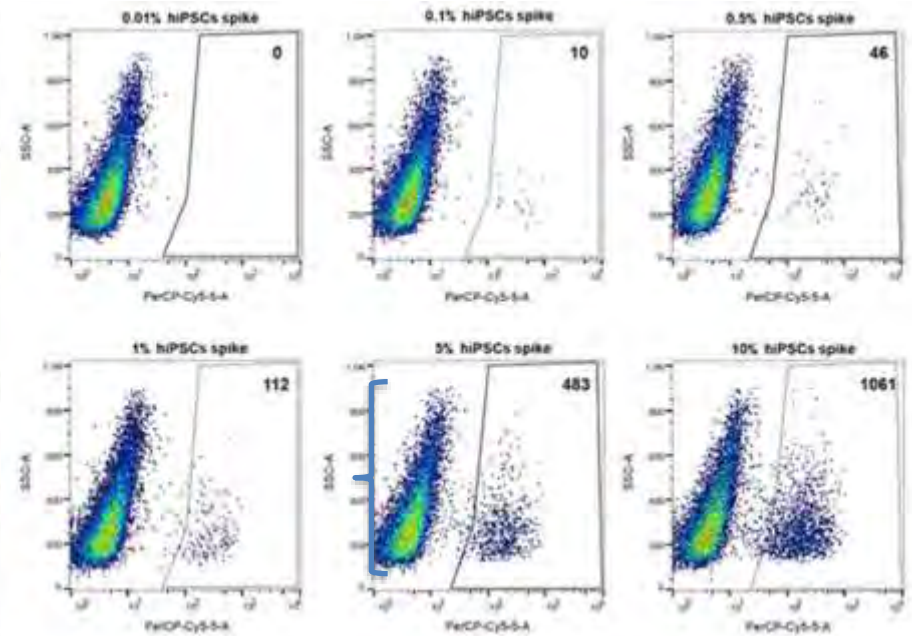
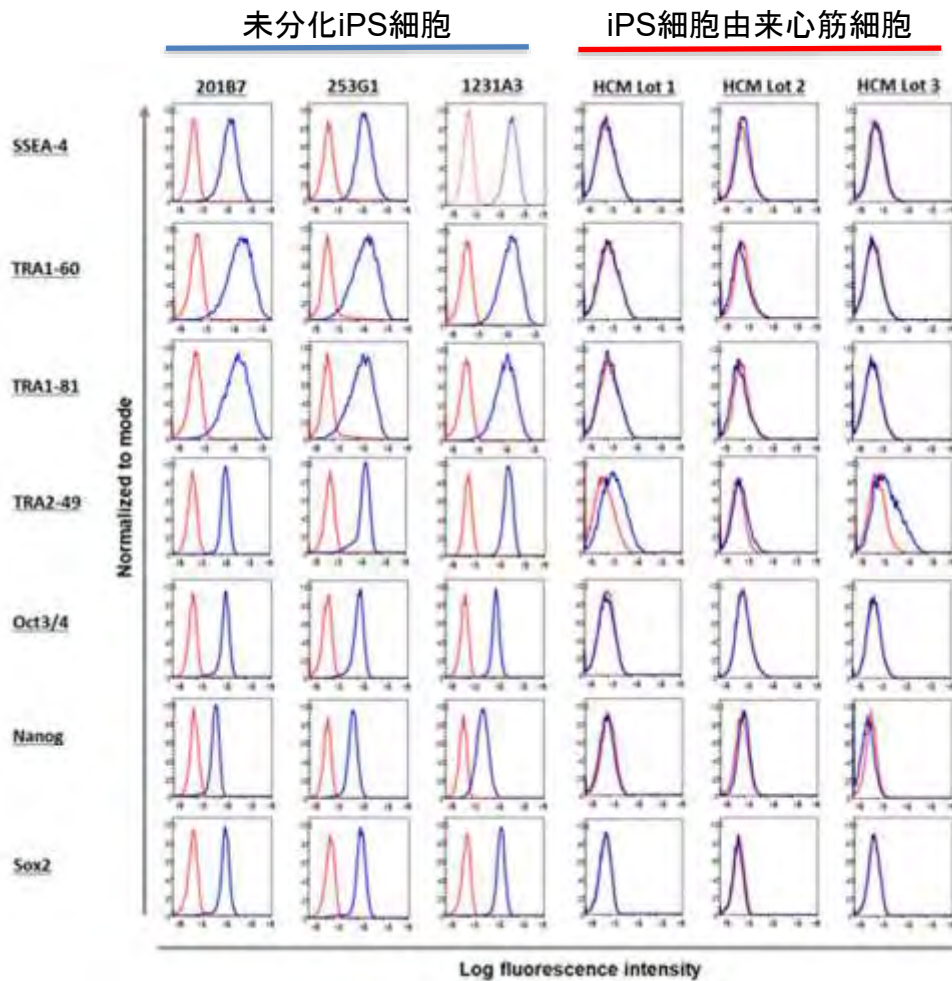
③製品の「実用化」には、未分化ES/iPS細胞や造腫瘍性形質転換細胞の  
除去・残留を確認する試験法が不可欠



# ヒトiPS細胞に由来する分化細胞(心筋細胞)に残存・混入する未分化なiPS細胞(造腫瘍性細胞)の検出方法の開発

## 未分化細胞マーカー分子に対する抗体によるフローサイトメリーによる評価

iPSC:心筋細胞=1:1,000 (0.1%) の混在を検出



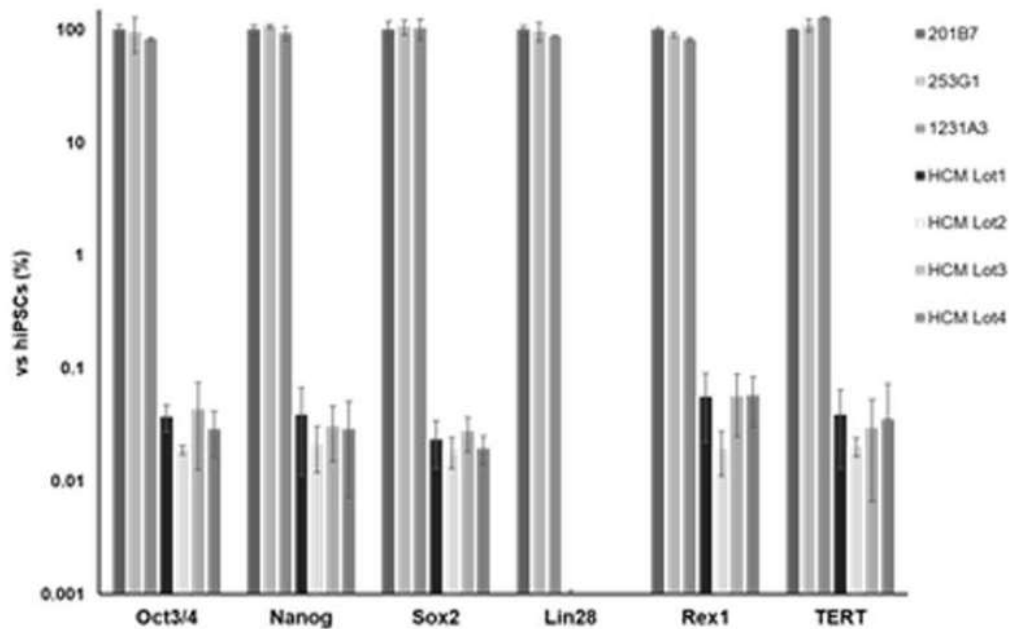
↑  
iPS細胞スパイク実験による  
検出限界評価

←未分化細胞マーカー分子に対する抗体  
によるiPS細胞の残存評価

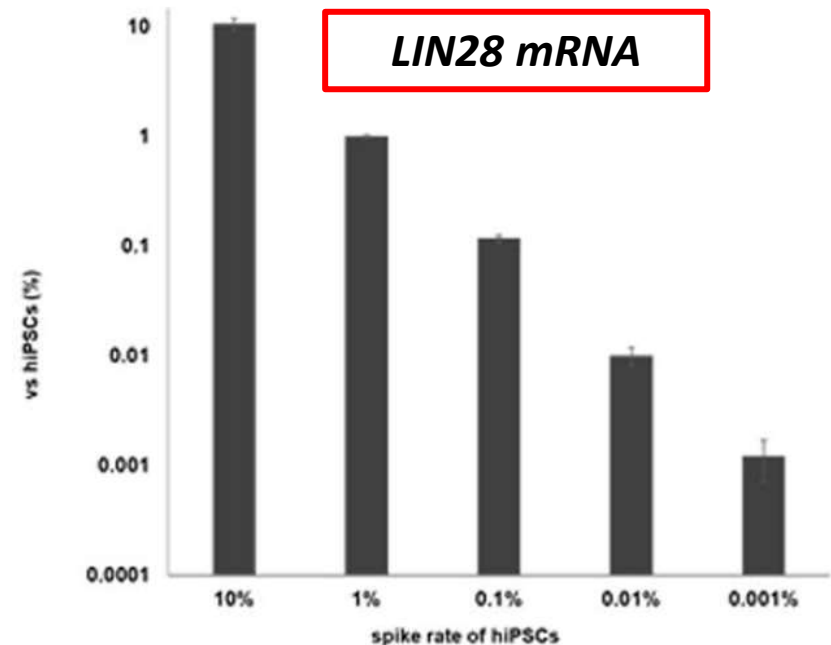
# ヒトiPS細胞に由来する分化細胞(心筋細胞)に残存・混入する未分化なiPS細胞(造腫瘍性細胞)の検出方法の開発

## 遺伝子発現(Real Time qRT-PCR)解析による評価

### 未分化細胞マーカー遺伝子の発現



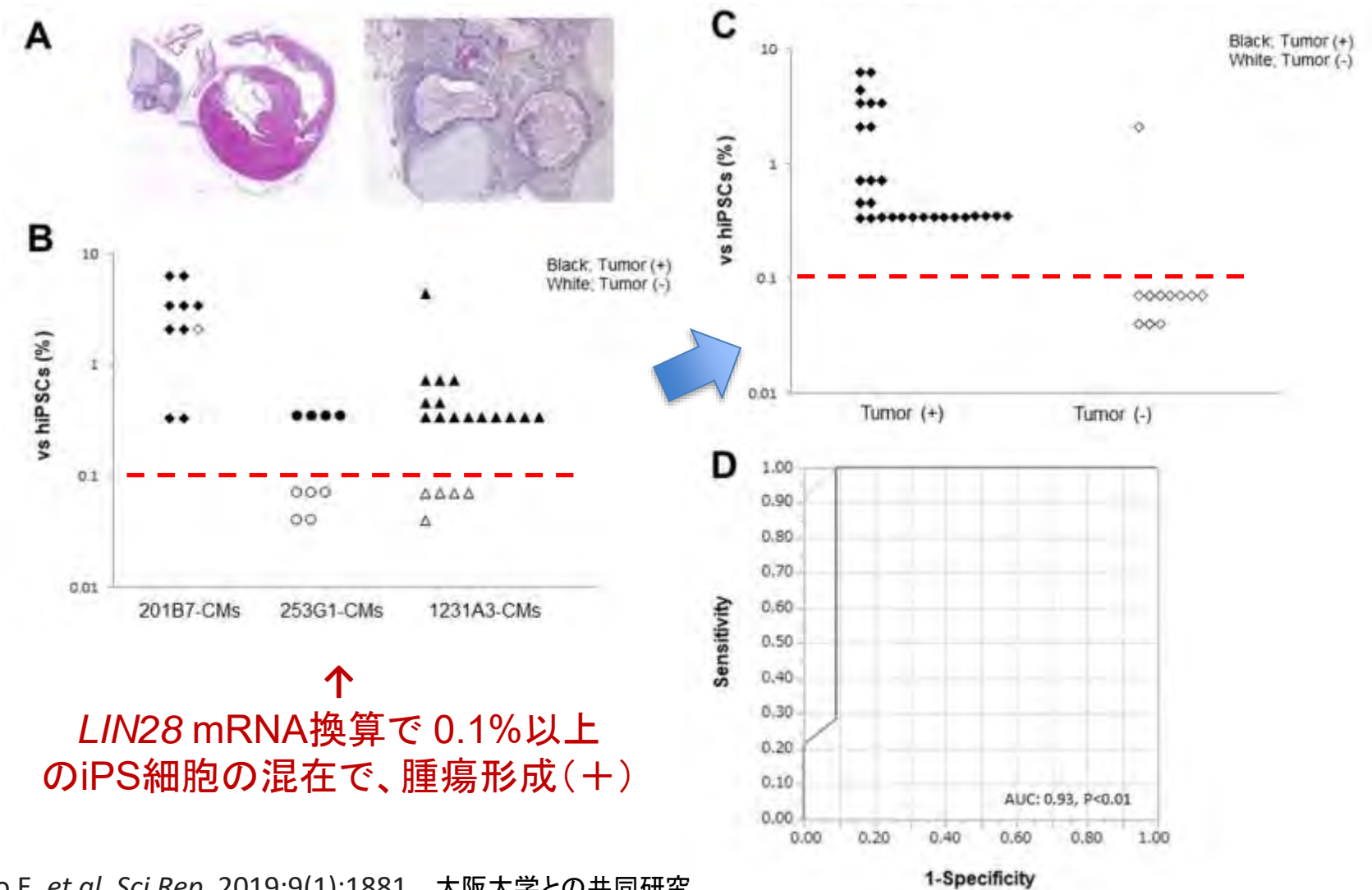
### iPS細胞スパイク実験による検出限界の評価



↑  
iPSC:心筋細胞=1:100,000  
の混在を検出可能

# ヒトiPS細胞に由来する分化細胞(心筋細胞)に残存・混入する未分化なiPS細胞(造腫瘍性細胞)の検出方法の開発

重度免疫不全動物(♂ヌードラット)への1E+7個細胞のシートの移植実験による評価(4カ月)



# 混在する未分化iPS/ES細胞の検出法

試験法の「能力と限界を知る」ことが大切

試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (NOG x Matrigel, 皮下投与)	フローサイトメトリー	GlycoStem-HP法
目的	造腫瘍性細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出
所要時間	12-16週間	1日	3時間以下 (培養上清回収から測定まで)
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>直接的</li> <li>微小環境での造腫瘍性を評価できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>短時間・簡便</li> <li>個々の細胞を解析</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>非破壊的</li> <li>簡便</li> <li>高スループット</li> </ul>
欠点・注意点	<ul style="list-style-type: none"> <li>費用と時間がかかる</li> <li>専用動物施設が必要</li> <li>臨床適用相当部位の微小環境での造腫瘍性を評価可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>間接的</li> <li>既知のマーカ分子を発現する細胞以外は検出不能</li> <li>ゲーティングが結果に影響</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>間接的</li> <li>個々の細胞でのマーカ分子発現レベルは評価できない</li> <li>培地成分が結果に影響</li> </ul>
LLOD または 検出力	hrPE2.5E+5個中に <b>1,000個(0.4%)</b> の割合で混入するhiPS細胞 を50%の確率で検出	hrPE中の <b>0.1%</b> のiPS細胞 (マーカ:TRA-1-60)	HEK293T中の <b>0.05%</b> のiPS細胞 (マーカ:H3+ポドカリキシン)
出典	Kanemura <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2013 Yasuda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2018	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012	Tateno <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2014

試験法	qRT-PCR	Droplet Digital PCR	Essential-8/LN521培養増幅法
目的	未分化の多能性細胞の検出	未分化の多能性細胞の検出	未分化の多能性細胞の検出
所要時間	6時間	数時間	約1週間
利点	<ul style="list-style-type: none"> <li>迅速</li> <li>簡便</li> <li>高感度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>迅速</li> <li>簡便</li> <li>高感度</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>直接的</li> <li>簡便</li> <li>残存iPS細胞の特性解析が可能</li> </ul>
欠点・注意点	<ul style="list-style-type: none"> <li>間接的</li> <li>個々の細胞でのマーカ分子発現レベルは評価できない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>間接的</li> <li>個々の細胞でのマーカ分子発現レベルは評価できない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>時間がかかる</li> <li>スループットが低い</li> </ul>
LLOD または 検出力	hrPE中の <b>0.002%以下</b> のiPS細胞 (マーカ:LIN28)	ヒト心筋細胞中の <b>0.001%</b> のiPS細胞 (マーカ:LIN28)	hMSC中の <b>0.01-0.001%</b> のiPS細胞 (ヒト胚葉体中の <b>0.1-0.01%</b> のiPS細胞)
出典	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012	Kuroda <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Tano <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2014



# 「ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関する留意点」

## 目次

1. はじめに
  2. 本文書の位置づけ
  3. 用語の定義
  4. 一般的留意点
  5. ヒトES/iPS細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験
    - 5.1. 原料・原材料の品質特性解析のための造腫瘍性試験
    - 5.2. 中間製品又は最終製品の造腫瘍性細胞の定量のための試験
      - 5.2.1. 中間製品・最終製品の未分化多能性幹細胞検出試験
        - 5.2.1.1. *in vitro*試験
        - 5.2.1.2. *in vivo*試験
      - 5.2.2. 中間製品・最終製品の形質転換細胞検出試験
        - 5.2.2.1. *in vitro*試験
        - 5.2.2.2. *in vivo*試験
    - 5.3. 最終製品細胞のヒトでの生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験
      - 5.3.1. 試験動物の選択
      - 5.3.2. 対照細胞の選択
      - 5.3.3. 試験動物の数
      - 5.3.4. 細胞投与の部位と投与細胞の数および態様
      - 5.3.5. 観察期間
      - 5.3.6. 投与部位の観察
      - 5.3.7. 投与部位の病理学的評価
      - 5.3.8. 結果の解釈
  6. ヒト体細胞／体性幹細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験
    - 6.1. 原料・原材料の品質特性解析のための造腫瘍性試験
    - 6.2. 最終製品のための造腫瘍性関連試験の留意点
  7. 遺伝的安定性に関する一般的留意点
- 参考文献  
表1 残存する未分化iPS/ES細胞の検出法の詳細  
表2 混入する形質転換細胞の検出法の詳細  
参考情報(各種試験法プロトコール)

厚生労働省  
薬生機審発0627第1号通知, 令和元年6月27日

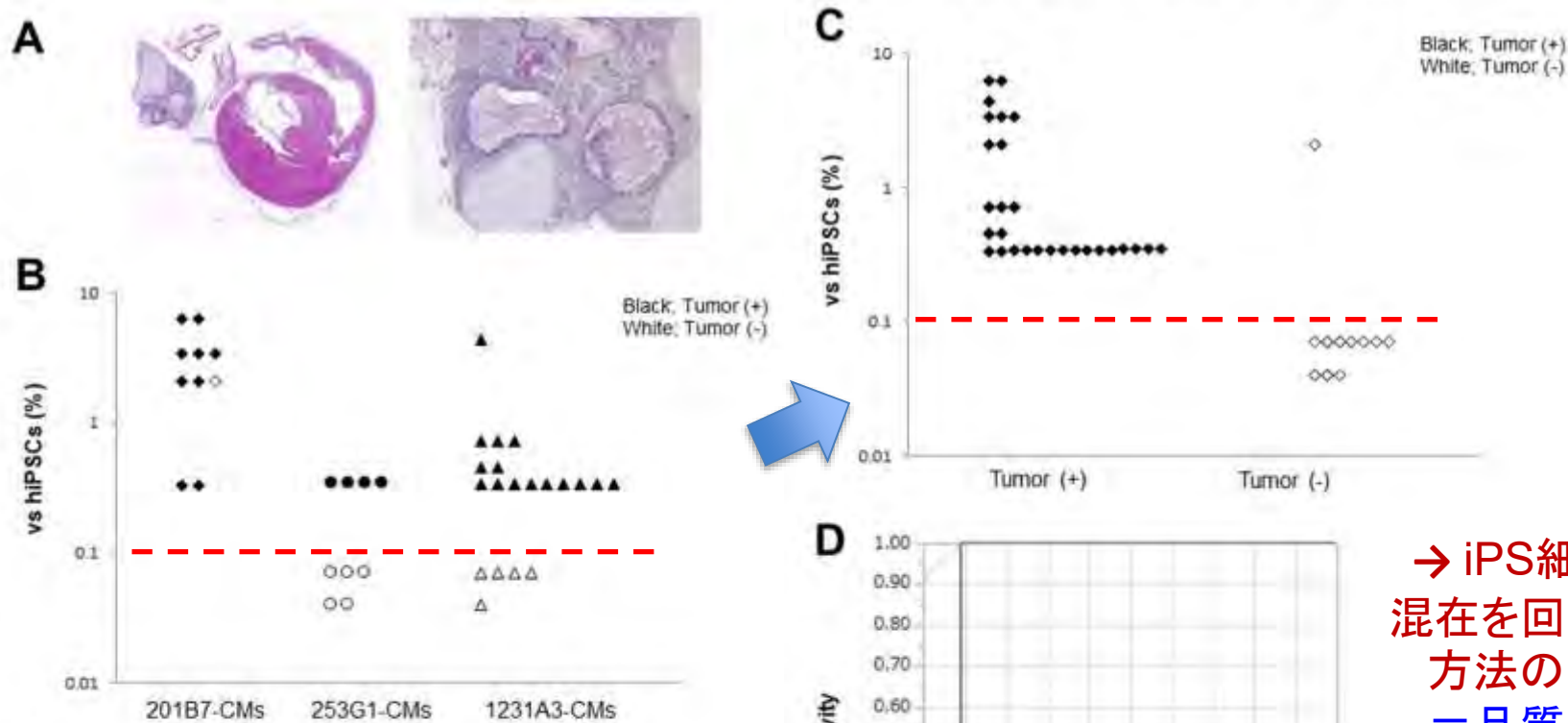
同日付パブコメ回答  
もご覧ください

“パブリックコメント”と“造腫瘍性”で検索

ヒト細胞加工製品中に混在する未分化多能性幹細胞及び形質転換細胞について、その**代表的検出試験例**を示すと同時に、これらの試験の中から、特定のヒト細胞加工製品の品質・安全性評価のために実施する**試験を選択する際に留意すべき事項**を示すもの

# ヒトiPS細胞に由来する分化細胞(心筋細胞)に残存・混入する未分化なiPS細胞(造腫瘍性細胞)の検出方法の開発

重度免疫不全動物(♂ヌードラット)への1E+7個細胞のシートの移植実験による評価(4カ月)



LIN28 mRNA換算で0.1%以上のiPS細胞の混在で、腫瘍形成(+)

→ iPS細胞の混在を回避する方法の開発 = 品質確保 (→ 阪大)

... 国衛研には別の仕事がある = 品質評価

# 「10万分の1 (0.001%)の壁」

網膜再生  
角膜再生

脊髄再生

心筋再生

移植細胞数

1個の未分化細胞を検出する  
のに必要な検出限界

$10^4$

$10^5$

$10^6$

$10^7$

$10^8$

$10^9$

$1/10^4$

$1/10^5$

$1/10^6$

$1/10^7$

$1/10^8$

$1/10^9$

## 国立衛研で開発された未分化ES/iPS細胞検出法

- 定量RT-PCR/LIN28法 (検出限界0.002%)
- デジタルPCR/LIN28法 (検出限界0.001%)
- ラミニン521/コロニー増幅法 (検出限界0.01~0.001%)
- 造腫瘍性試験/NOGマウス (検出限界~0.001%)

- サンプル中の標的遺伝子のコピー数
- 培養容器のサイズ
- 研究室スケールで培養可能な細胞数
- マウスに投与可能な細胞数

などに限界があるため、

既存の方法では検出限界の壁(0.001%)を越えることが難しい。

検出限界の壁  
(0.001%)

- 製品の「実用化」には、ヒトES/iPS細胞の除去・残存を確認する試験法が不可欠であり、臨床研究開始のボトルネックとなっている。
- 神経細胞や心筋細胞のヒトへの移植を想定した場合、既存の方法では未分化細胞の検出感度が足りないことが予想される。

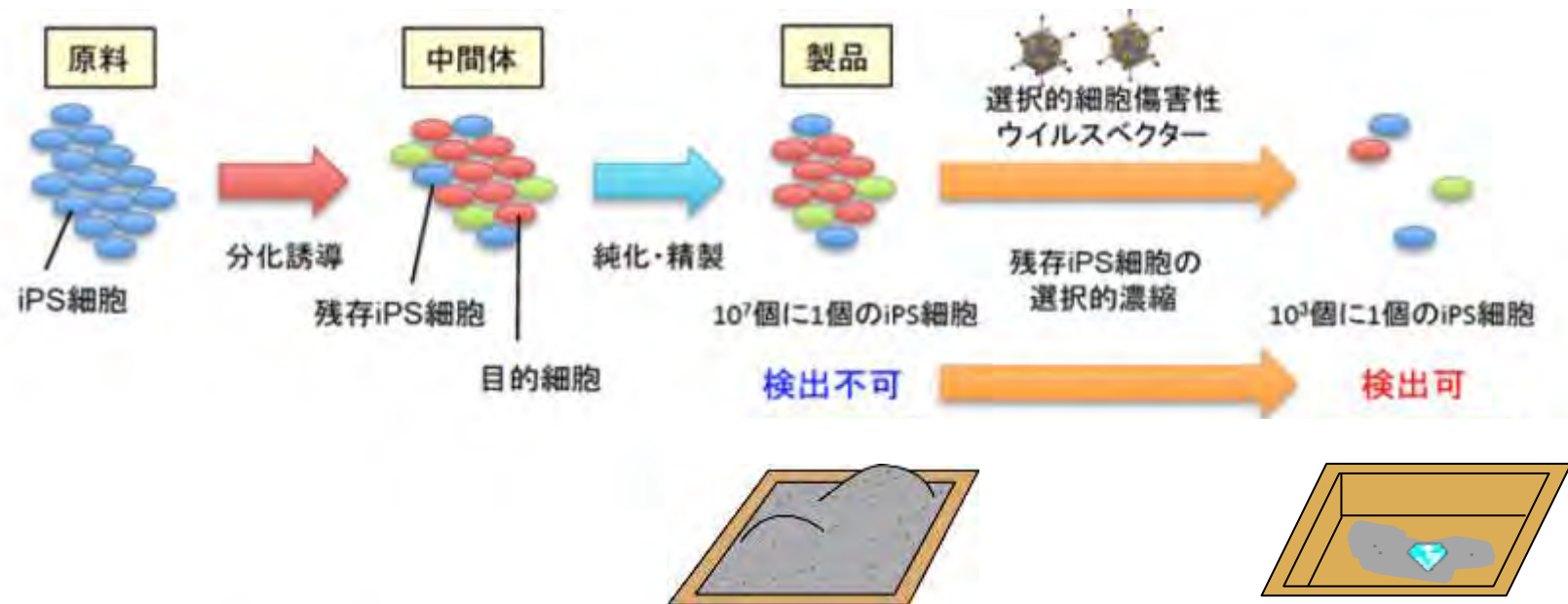
投与細胞量の多い再生医療製品の品質評価および実用化には、

**既存の方法の検出限界を超えた**

**新たな残存ES/iPS細胞の検出法が必要。**

# ヒトiPS細胞に由来する分化細胞に残存・混入する未分化なiPS細胞(造腫瘍性細胞)の検出方法の開発

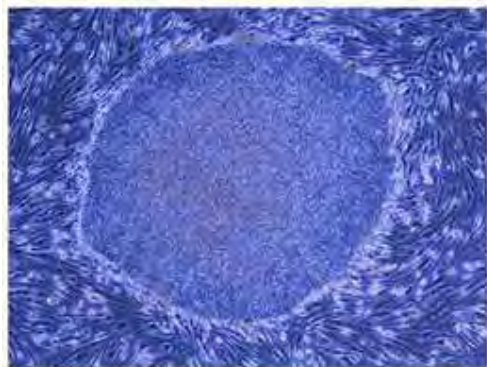
## 選択的分化細胞傷害性ウイルスベクターによる混在iPS細胞(ハザード)の濃縮



大量の目的細胞(砂場の砂)の中に紛れている iPS細胞(砂場に落とした宝石)を探すのは大変だが、  
選択的分化細胞傷害性ウイルスベクターによって目的細胞(砂)を除去すれば、  
iPS細胞(宝石)を見つけやすくする

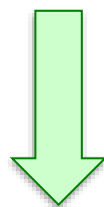


# 選択的分化細胞傷害性ウイルスベクターによる混在iPS細胞(ハザード)の濃縮 研究の背景及び目的



iPS細胞

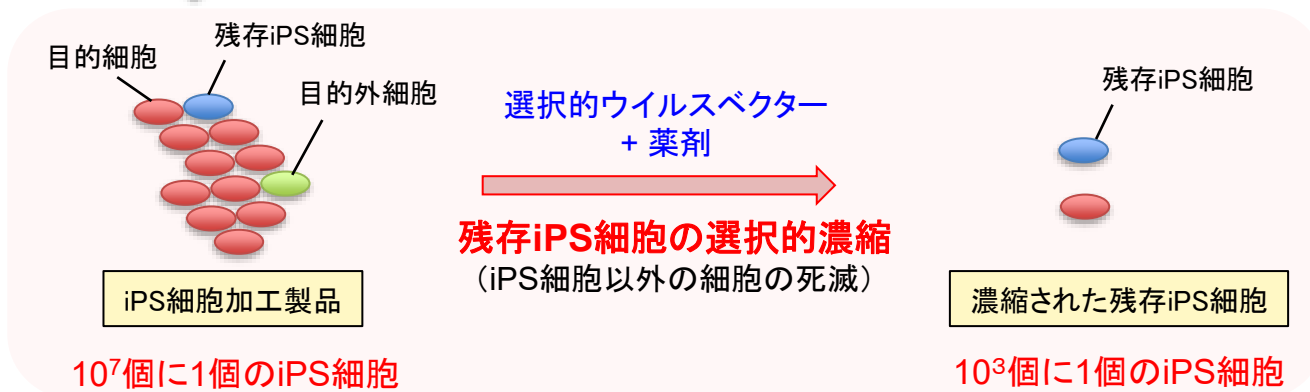
導入遺伝子を強力に発現させるために一般的に用いられているCMVプロモーターは、ヒト多能性幹細胞では不活化している  
(Norrman K, et al., PLoS One. 2010;5:e12413.)



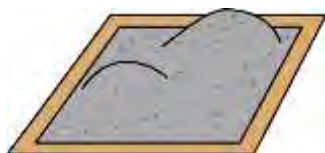
薬剤応答性  
自殺遺伝子



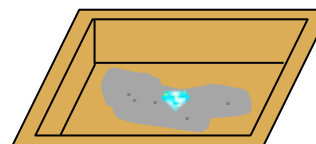
CMVプロモーター下流に自殺遺伝子を挿入したベクター  
を作製すれば、残存iPS細胞の選択的濃縮が可能ならず



検出不可



検出可



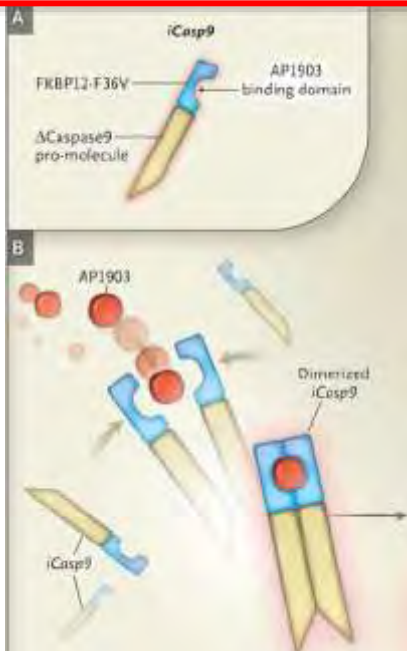
## 薬剤応答性自殺遺伝子の選択

### 単純ヘルペスウイルス1型-チミジンキナーゼ(HSV-TK)遺伝子

HSV-TKは、抗ウイルス薬として汎用されているガンシクロビル(GCV)をリン酸化し、DNA合成阻害活性を有する毒性物質に変化させるため、このHSV-TK遺伝子を導入された細胞は、GCV投与によりアポトーシスを起こし死滅する。

### 【本研究で使用する上での問題点】

- ・目的分化細胞(心筋細胞)は増殖活性が低下しているので、DNA合成を阻害してもアポトーシスを起こさない可能性がある
- ・Bystander effectがある(リン酸化されたGCVはgap junctionを通過して隣接細胞にも取り込まれる)ため、HSV-TKを発現しないiPS細胞にも自殺効果がでる可能性がある



## iCaspase 9

ヒトFK506結合タンパク質(薬剤との親和性を高くするためにF36Vの変異が入っている)とCaspase 9の組換え融合タンパク質。AP1903存在下で二量体化し、Caspase 3を活性化する。活性化されたCaspase 3はDNAのフラグメント化等を起こし、アポトーシスを誘導する(**細胞増殖は必要ない**)

# ヒトiPS細胞に由来する分化細胞(心筋細胞)に残存・混入する未分化なiPS細胞(造腫瘍性細胞)の検出方法の開発

## 選択的分化細胞傷害性AAVウイルスベクターによる混在iPS細胞(ハザード)の濃縮

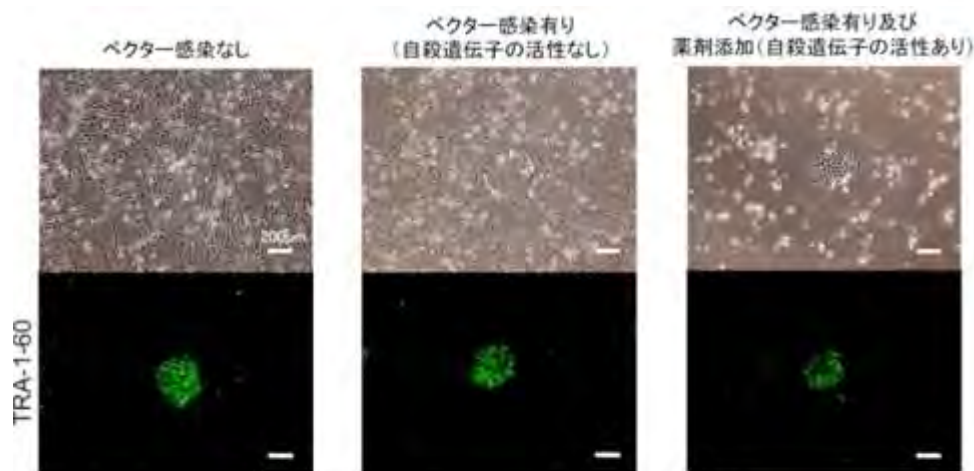
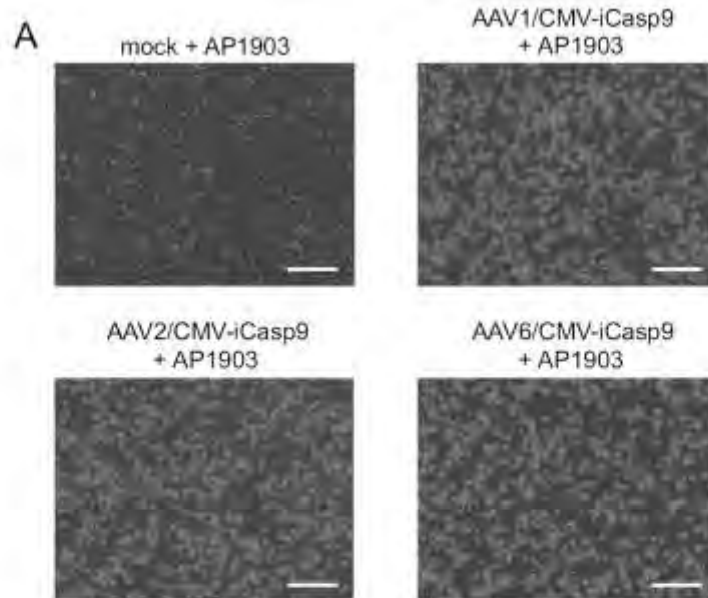
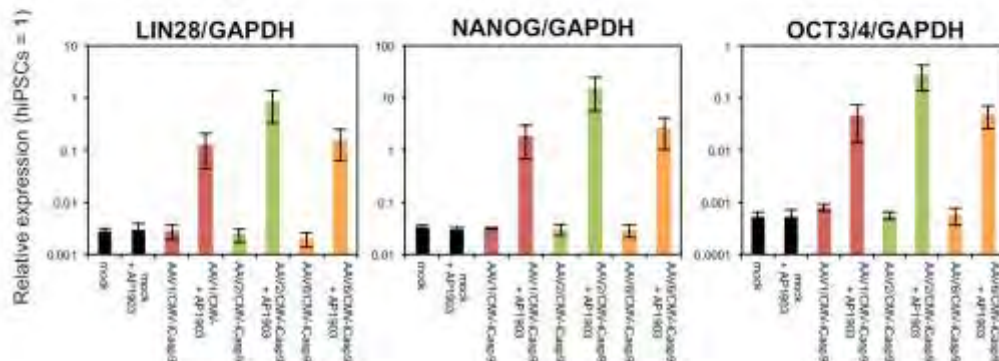


図2 選択的細胞傷害性ウイルスベクターによるiPS細胞の濃縮

心筋細胞にiPS細胞を混入させた細胞に選択的細胞傷害性ウイルスベクターを感染させた。薬剤添加により自殺遺伝子を活性化することで、選択的にiPS細胞を濃縮した。緑: TRA-1-60、多能性幹細胞 (iPS細胞) 表面マーカー



B



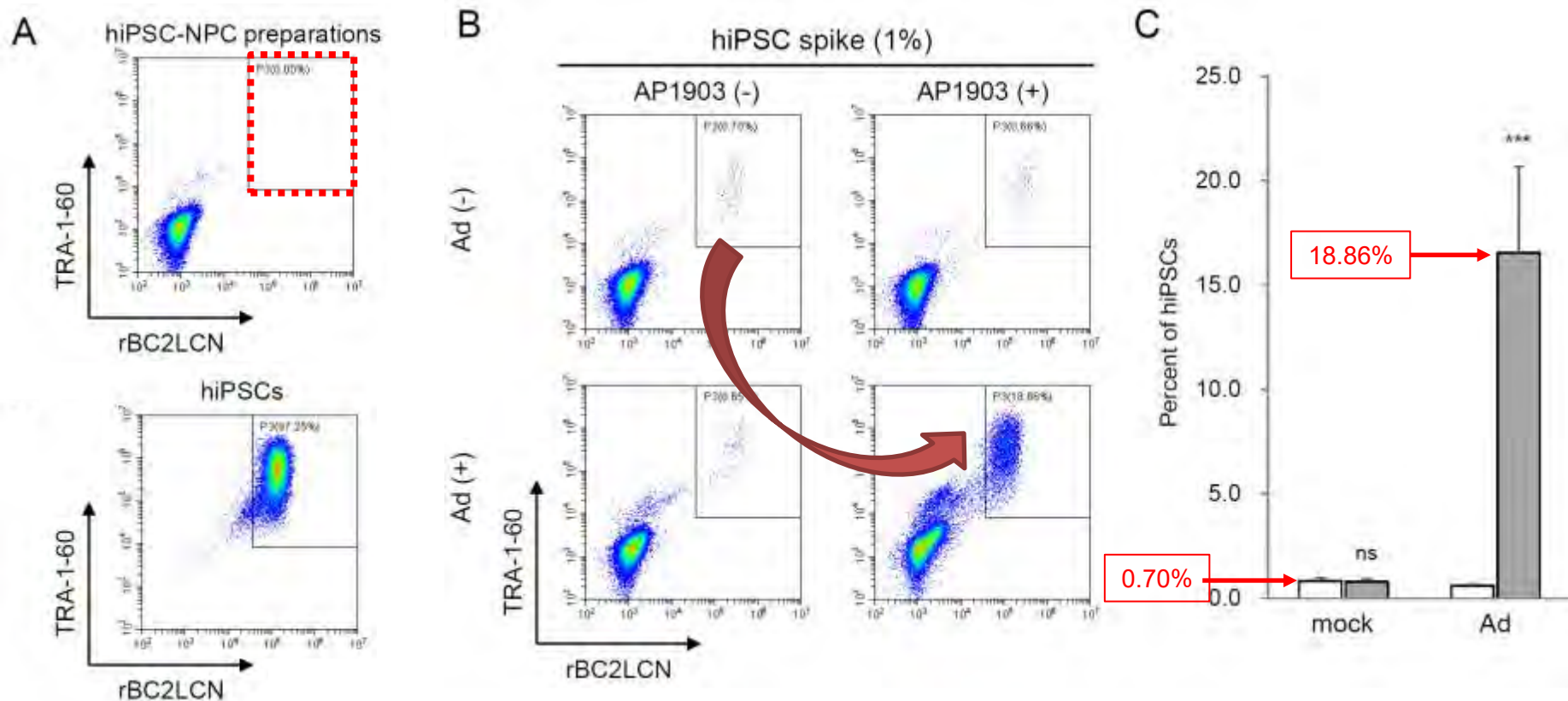
未分化細胞マーカーの発現量が高い→  
=残存する未分化な細胞の濃縮を示唆  
(未分化マーカー遺伝子のmRNA換算で  
数十～数百倍の濃縮)

【注意】古い分化プロトコールでの結果です。  
=臨床用にはさらに残存量を下げています。

# ヒトiPS細胞に由来する分化細胞(神経前駆細胞)に残存・混入する未分化なiPS細胞(造腫瘍性細胞)の検出方法の開発

## 選択的分化細胞傷害性Adウイルスベクターによる混在iPS細胞(ハザード)の濃縮

Hirai T, et al. *Sci Rep.* 2021;11:11407

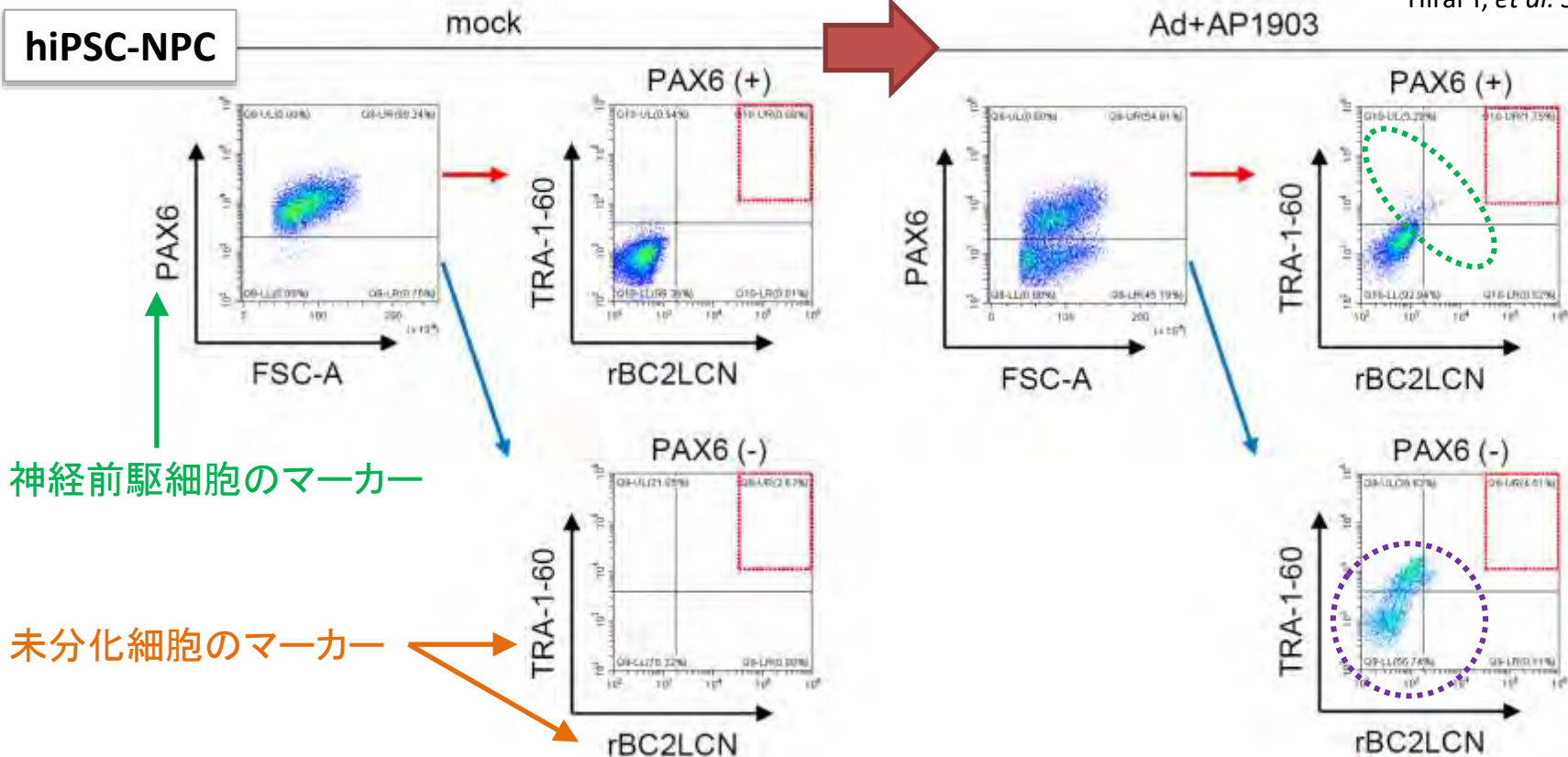


1%の割合でスパイクしたiPS細胞(測定値0.70%)は、Ad + AP1943処理で27倍(測定値18.86%)濃縮された。

# ヒトiPS細胞に由来する分化細胞(神経前駆細胞)に残存・混入する未分化なiPS細胞(造腫瘍性細胞)の検出方法の開発

## 選択的分化細胞傷害性Adウイルスベクターによる混在iPS細胞(ハザード)の濃縮

Hirai T, et al. *Sci Rep.* 2021; 11:11407



個々の細胞を見ると、生存細胞の中には未分化マーカー (TRA-1-60, rBC2LCN) で強く染まるもの (赤枠の中=iPS細胞) は見つからない。むしろ、マーカーで弱く染まる細胞、つまり神経前駆細胞に分化途中の細胞 (PAX6(+)) と他の細胞種に分化している細胞 (PAX6(-)) が濃縮

⇒ 目的細胞を選択的に殺傷するツールで、iPS細胞だけでなく、ごく微量の非目的細胞の量も評価できる

# 再生医療の実現化で重要なこと

「有効性・安全性の確保」

「移植細胞（細胞加工製品）の品質の確保」



③「各評価法の能力と限界を知る」



②「目的に適った評価法を作る」



①「新しい製品には新しい考え方を」

レギュラトリーサイエンス（評価科学）

# ヒトiPS細胞由来移植細胞の臨床応用開始



神戸新聞 (2014/9/12)

## iPSから網膜細胞 世界初の移植手術実施 神戸



先端医療センター病院（神戸市中央区）と理化学研究所再生・再生科学総合研究センター（同）は12日午後、人工多能性幹細胞（iPS）を用いた、目の研究で、移植手術が完了した。移植手術は、網膜細胞が失明の原因となっている患者の視力を回復させるなどの有効性を期待する。

最良で実績を誇る高橋政代（神戸市中央区）と理化学研究所再生・再生科学総合研究センター（同）は12日午後、人工多能性幹細胞（iPS）を用いた、目の研究で、移植手術が完了した。移植手術は、網膜細胞が失明の原因となっている患者の視力を回復させるなどの有効性を期待する。

大阪朝日新聞 (2014/7/27)

## iPS角膜、世界初の移植 = 大阪大、安全性や視力回復を検証

さまざまな細胞に変わる人工多能性幹細胞（iPS細胞）から角膜の細胞を作り、けがや病気で角膜が傷ついた患者に移植する臨床研究を進めている大阪大は29日、患者に移植手術を行ったと発表した。iPS細胞から作った角膜移植は世界で初めて。移植手術は7月25日午後、大阪大の西田孝二教授（眼科）らのチームが実施した。iPS細胞の安全性や視力回復を検証する。移植手術は7月25日午後、大阪大の西田孝二教授（眼科）らのチームが実施した。iPS細胞の安全性や視力回復を検証する。



人工多能性幹細胞（iPS細胞）から作った角膜移植は世界で初めて。移植手術は7月25日午後、大阪大の西田孝二教授（眼科）らのチームが実施した。iPS細胞の安全性や視力回復を検証する。

## iPS再生医療、心臓で世界初の手術実施 阪大



大阪大学の澤方樹教授らは27日、iPS細胞から育てた心臓の細胞をシート状にし、重症心不全患者に移植する世界初の手術をしたと発表した。重症心不全患者に移植する世界初の手術をしたと発表した。重症心不全患者に移植する世界初の手術をしたと発表した。重症心不全患者に移植する世界初の手術をしたと発表した。

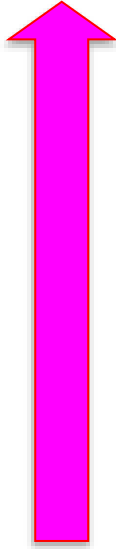
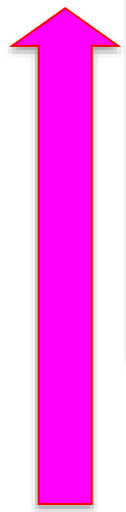
## ES細胞国内初治療成功 重い病の赤ちゃんに肝細胞移植 成育研

### ヒトES細胞由来の肝細胞移植の流れ



国立成育医療研究センター（東京）は、ヒトES細胞（胚性幹細胞）から作った肝細胞を用いた肝臓病の赤ちゃんに移植して治療する臨床試験（治験）に成功したと発表した。センターによると、ヒトES細胞を使った治療は日本初。ES細胞由来の肝細胞をヒトへ移植したのは世界でも初めてだという。

治療の対象は、有毒なアンモニアを肝臓で分解できない先天性酵素リイソル異化症で「高アンモニア血症」となった赤ちゃん。治療の重症度は、8000〜4万4000人に1人だという。重症の場合、根本的な治療には肝臓移植が必要だが、新生児は重い合併症の恐れがあり、体重6キログラム以上になる生後数カ月を待たなければ安全な手術ができない。



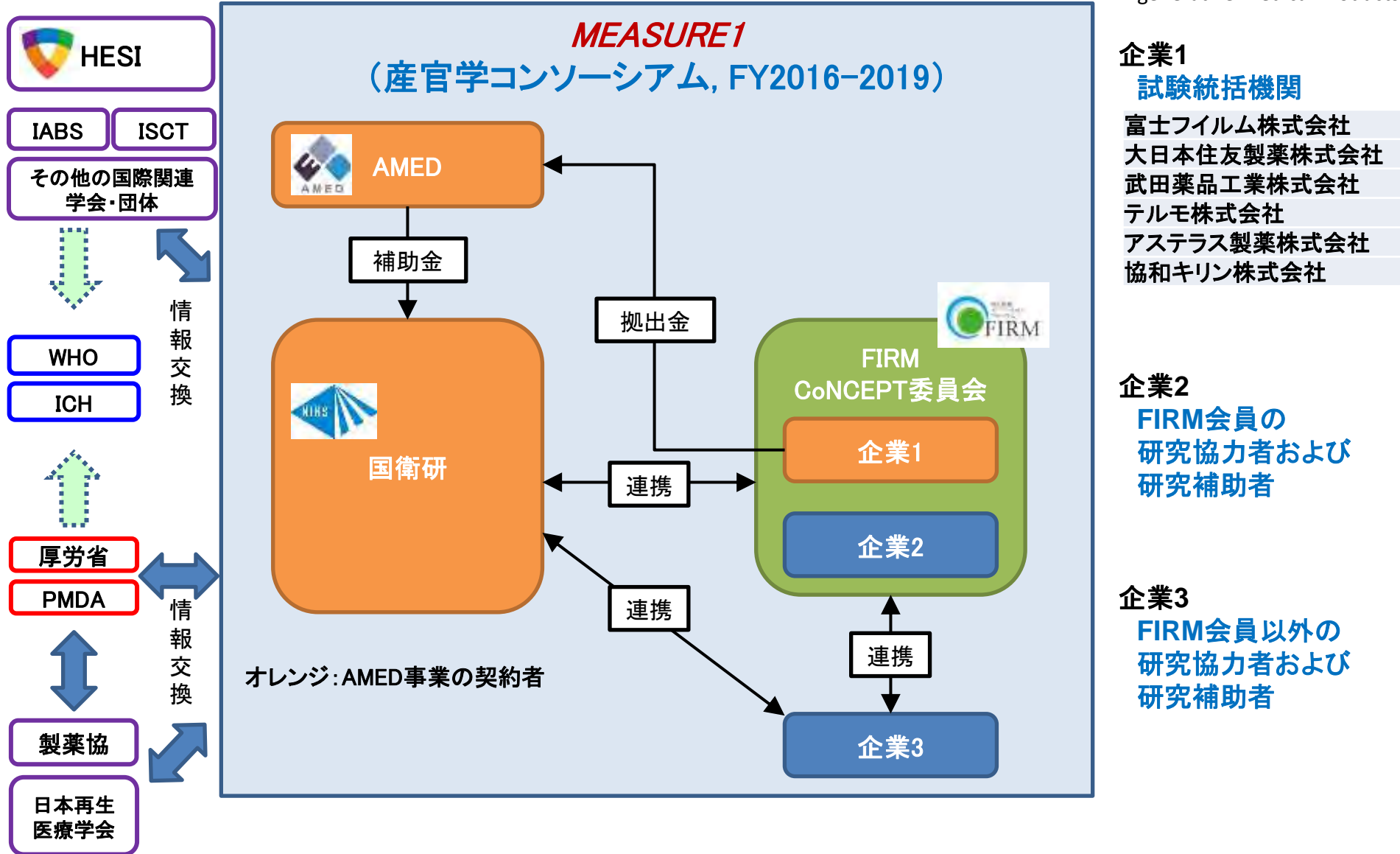
残存iPS細胞／造腫瘍性細胞の検出試験法の開発で貢献

**④「各評価法の再現性・汎用性を知る」  
(標準プロトコールを共有する)**



# MEASURE

(M)ultisite (E)valuation Study on  
(A)nalytical Methods for Non-  
clinical (S)afety Assessment of  
H(U)man-derived  
R(E)generative Medical Products)



# MEASURE

(M)ultisite (E)valuation Study on  
(A)nalytical Methods for Non-  
clinical (S)afety Assessment of  
H(U)man-derived  
R(egenerative) Medical Products)

## 企業1 試験統括機関

富士フイルム株式会社  
大日本住友製薬株式会社  
武田薬品工業株式会社  
テルモ株式会社  
アステラス製薬株式会社

## 企業2 研究協力者

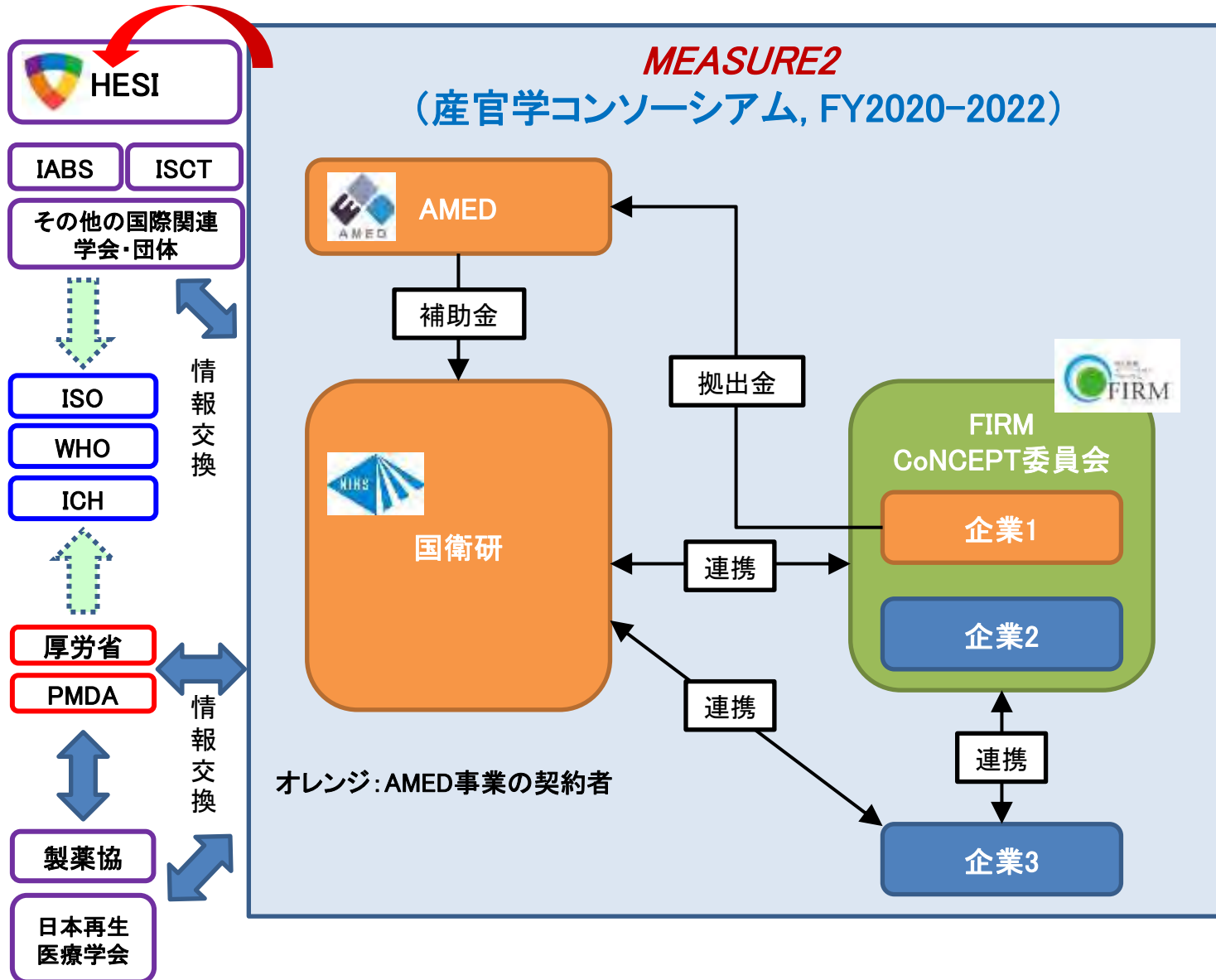
株式会社エスアールエル  
第一三共株式会社  
株式会社ヘリオス  
iHeart Japan株式会社  
昭和電工マテリアルズ株式会社  
株式会社 新日本科学

## 研究補助者

横河電機株式会社

## 企業3 FIRM会員以外の 研究協力者および 研究補助者

## HESI CT-TRACS国際実験コンソーシアム



# HESI CT-TRACS Membership



Committee members and collaborators from  
> 25 organizations across EU, Japan and USA.

(CT-TRACS Multi-Sector Membership, as of November 2020)

## Regulatory bodies:



## Universities/ Research Centers:



## Gov./Consortia/NGO:



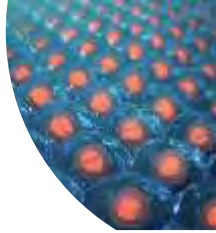
## Developers (Therapies and Tools), CROs:





HESI CT-TRACS 造腫瘍性ワーキンググループのポジションペーパー

# Tumorigenicity Assessment of Cell Therapy Products: The Need for Global Consensus and Points to Consider



Tumorigenicity assessment of cell therapy products: The need for global consensus and points to consider

Cytotherapy 2019;21:1095-1111

Y. SATO<sup>1</sup>, H. BANDO<sup>2,\*</sup>, M. DI PIAZZA<sup>3</sup>, G. GOWING<sup>4</sup>, C. HERBERTS<sup>5,†</sup>, S. JACKMAN<sup>6</sup>,  
G. LEONI<sup>7</sup>, S. LIBERTINI<sup>8</sup>, T. MACLACHLAN<sup>9</sup>, J.W. MCBLANE<sup>10</sup>,  
I. PEREIRA MOURIÉS<sup>11</sup>, M. SHARPE<sup>7</sup>, W. SHINGLETON<sup>12,†</sup>, B. SURMACZ-CORDLE<sup>7</sup>,  
K. YAMAMOTO<sup>1,3</sup> & J.W. VAN DER LAAN<sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences, Kawasaki, Japan, <sup>2</sup>FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan, <sup>3</sup>Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Ridgefield, Connecticut, USA, <sup>4</sup>FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc., Madison, Wisconsin, USA, <sup>5</sup>Medicines Evaluation Board, Utrecht, The Netherlands, <sup>6</sup>Charles River Laboratories, Horsham, Pennsylvania, USA, <sup>7</sup>Cell and Gene Therapy Catapult, London, UK, <sup>8</sup>Novartis Institutes for BioMedical Research, Basel, Switzerland, <sup>9</sup>Novartis Institutes for BioMedical Research, Cambridge, Massachusetts, USA, <sup>10</sup>Medicines & Healthcare Products Regulatory Agency, London, UK, <sup>11</sup>Health and Environmental Sciences Institute (HESI), Washington, DC, USA, <sup>12</sup>GE Healthcare, Cambridge, UK, and <sup>13</sup>Takeda Pharmaceutical Company Limited, Tokyo, Japan

欧州医薬品庁(EMA)非臨床安全性部会の座長

## Abstract

Pluripotent stem cells offer the potential for an unlimited source for cell therapy products. However, there is concern regarding the tumorigenicity of these products in humans, mainly due to the possible unintended contamination of undifferentiated cells or transformed cells. Because of the complex nature of these new therapies and the lack of a globally accepted consensus on the strategy for tumorigenicity evaluation, a case-by-case approach is recommended for the risk assessment of each cell therapy product. In general, therapeutic products need to be qualified using available technologies, which ideally should be fully validated. In such circumstances, the developers of cell therapy products may have conducted various tumorigenicity tests and consulted with regulators in respective countries. Here, we critically review currently available *in vivo* and *in vitro* testing methods for tumorigenicity evaluation against expectations in international regulatory guidelines. We discuss the value of those approaches, in particular the limitations of *in vivo* methods, and comment on challenges and future directions. In addition, we note the need for an internationally harmonized procedure for tumorigenicity assessment of cell therapy products from both regulatory and technological perspectives.

# 新規医薬モダリティの開発の上で なぜRegulatory Scienceが必須なのか？

- 技術の進歩により登場する新しいタイプの製品の開発の速さに評価法の開発が追いついていない。既存の試験法を適用することが本当に妥当なのかもよくわからない。

(例:再生医療、遺伝子治療、核酸医薬、ゲノム編集)

- 技術の進歩により新しいタイプの分析法が開発されても、医薬品の評価法として使えるのかがわからない

(例:次世代シーケンサー、シングルセル解析技術、人工知能)

Regulatory Science ⇒ 製品の評価法の開発とバリデーション(検証)

# 謝 辞

国立医薬品食品衛生研究所  
再生・細胞医療製品部の皆様

再生医療イノベーションフォーラム  
多能性幹細胞安全性評価委員会  
ならびにAMED MEASURE1/2プロジェクトの皆様

HESI CT-TRACSメンバーの皆様

実験動物中央研究所 伊藤守所長ならびに所内の先生方

大阪大学大学院医学系研究科 澤芳樹先生  
ならびに研究室の先生方

大阪大学大学院薬学研究科 水口裕之先生

大阪はびきの医療センター 松山晃文先生

昭和薬科大学 宇都口直樹先生・小泉直也先生

神戸医療産業都市推進機構 川真田伸先生

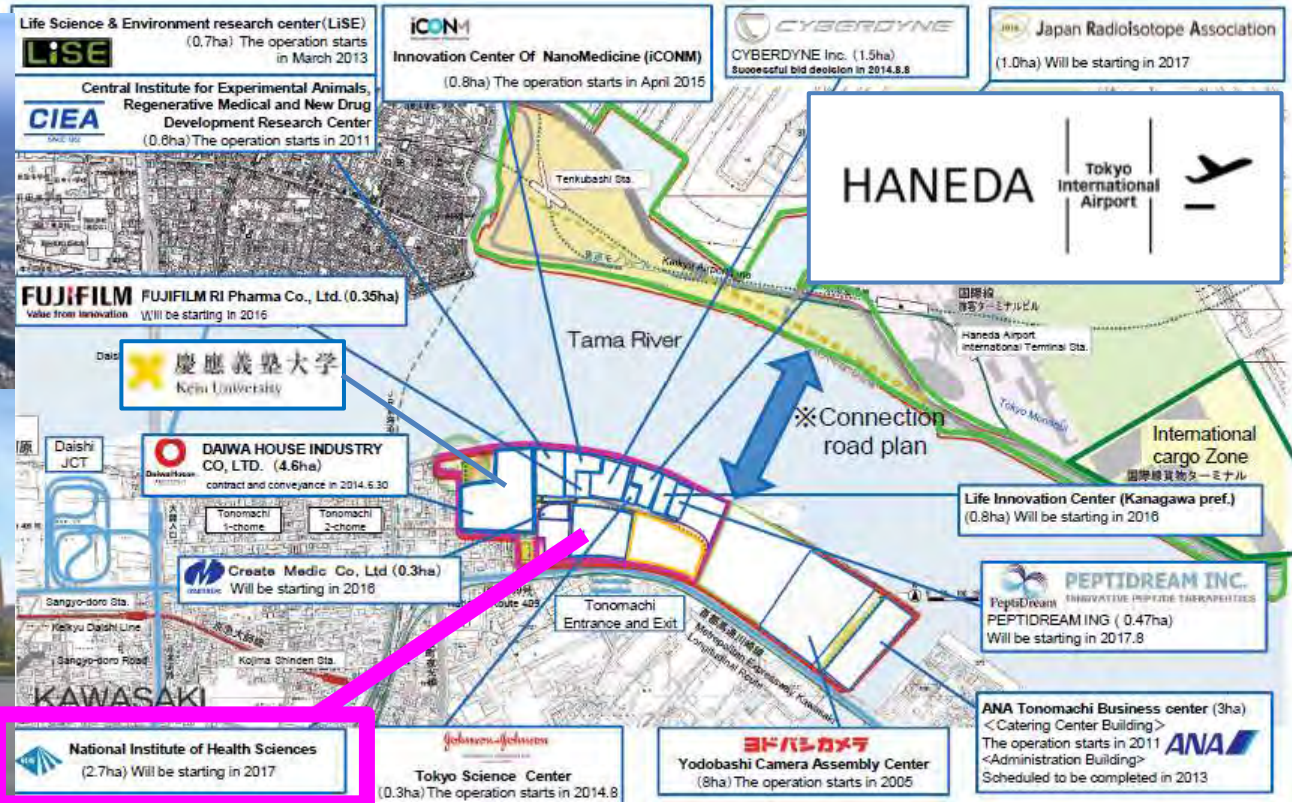
# ご清聴、ありがとうございました！



佐藤陽治

国立医薬品食品衛生研究所 再生細胞医療製品部

E-mail: [yoji@nihs.go.jp](mailto:yoji@nihs.go.jp)



\* <https://www.oag.com/hubfs/air-canada-787.jpg>  
 \*\* <http://www.city.kawasaki.jp/en/page/0000038680.html>