



2024年2月15日

国立感染症研究所 検定・検査教育講習会

細胞加工製品の品質・安全性の考え方

国立医薬品食品衛生研究所
再生・細胞医療製品部
安田 智

「再生医療等製品」とは

『医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律』（薬機法）における「再生医療等製品」とは、次に掲げる物（医薬部外品及び化粧品を除く）であって、政令で定めるものをいう。

一 次に掲げる医療又は獣医療に使用されることが目的とされている物のうち、人又は動物の細胞に培養その他の加工を施したもの

イ 人又は動物の身体の構造又は機能の再建、修復又は形成

ロ 人又は動物の疾病の治療又は予防

二 人又は動物の疾病の治療に使用されることが目的とされている物のうち、人又は動物の細胞に導入され、これらの体内で発現する遺伝子を含有させたもの

「再生医療」と「細胞治療」

「再生医療」



加齢、疾病、損傷、または先天的障害により、組織・器官が**失った機能を修復ないし置換することを目的に**、機能的かつ生きている組織を作り出すプロセス

[ヨーロッパ科学財団の定義]

「細胞治療」



体外で加工または改変された自己由来、同種由来または異種由来の**細胞を投与することによって**ヒトの疾病または損傷を予防、処置、治療ないし緩和すること

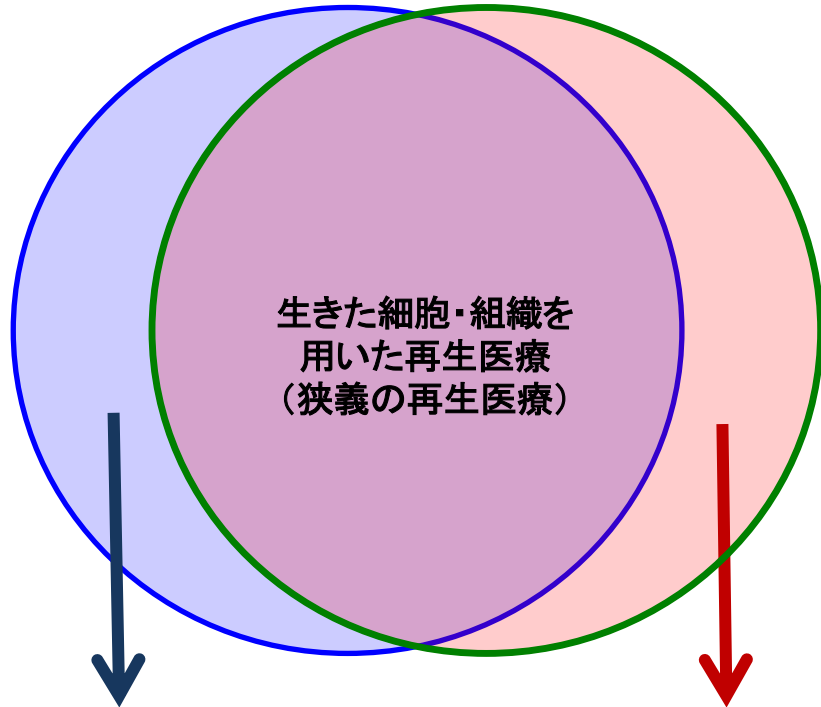
[米国食品医薬品局(FDA)の定義]

再生医療
regenerative medicine

細胞治療
cell therapy



細胞加工製品
(細胞加工物)



加工(培養・活性化・分化誘導など)



細胞・組織
[輸血・移植医療]



生きた細胞を使わない再生医療
(例:細胞を活性化させる因子を投与し、
患者の体内で組織を再生させる方法)

臓器や組織の再生を目的としない細胞治療
(例:免疫細胞の投与によるがん治療)

再生医療
regenerative medicine

細胞治療
cell therapy

「薬事法」→「薬機法」
(平成26年11月)

再生医療等製品

遺伝子治療用製品
細胞加工製品
(細胞加工物)

生きた細胞・組織を用いた再生医療
(狭義の再生医療)

加工(培養・活性化・分化誘導など)

あり

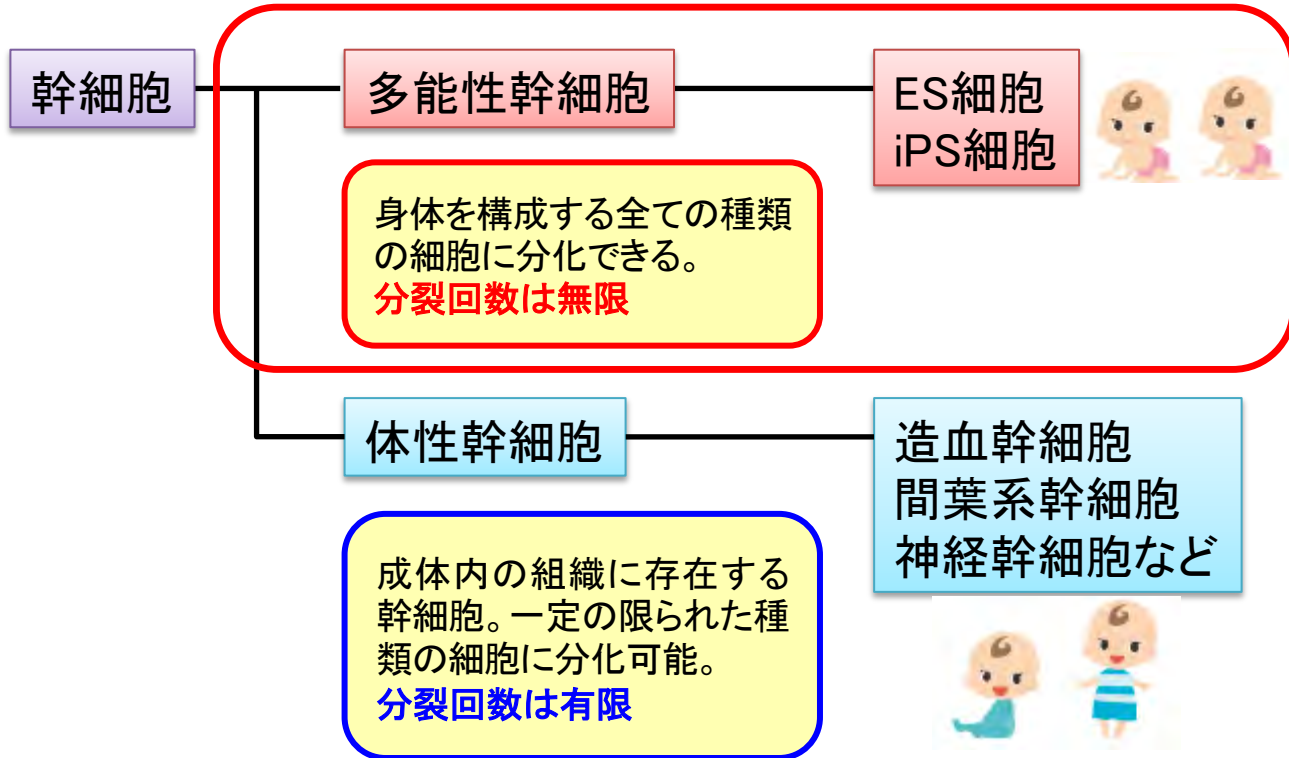
なし

細胞・組織
[輸血・移植医療]

生きた細胞を使わない再生医療
(例:細胞を活性化させる因子を投与し、
患者の体内で組織を再生させる方法)

臓器や組織の再生を目的としない細胞治療
(例:免疫細胞の投与によるがん治療)

再生医療のための「幹細胞」



ヒトiPS/ES細胞由来移植細胞の臨床応用

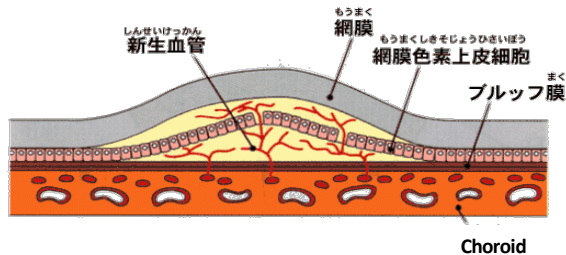


国内で実施が承認されたヒトiPS/ES細胞加工物を使用した臨床研究及び治験 [2023年10月現在]

移植細胞	原料ヒト細胞	適応疾患	実施施設	臨床研究/治験	実施承認	FIH試験
網膜色素上皮細胞	自己iPS細胞	滲出型加齢黄斑変性	先端医療センター病院	臨床研究	2013	2014
網膜色素上皮細胞	同種iPS細胞	滲出型加齢黄斑変性	神戸市立医療センター <i>etc.</i>	臨床研究	2017	2017
ドバミン神経前駆細胞	同種iPS細胞	パーキンソン病	京都大学	医師主導治験	2018	2018
血小板	自己iPS細胞	再生不良性貧血	京都大学	臨床研究	2018	2019
角膜上皮細胞	同種iPS細胞	角膜上皮幹細胞疲弊症	大阪大学	臨床研究	2019	2019
肝細胞	ES細胞(同種)	先天性尿素サイクル異常症	国立成育医療研究センター	医師主導治験	2019	2019
心筋細胞	同種iPS細胞	虚血性心筋症	大阪大学	医師主導治験	2019	2020
神経前駆細胞	同種iPS細胞	脊髄損傷	慶応義塾大学 <i>etc.</i>	臨床研究	2019	2021
網膜視細胞	同種iPS細胞	網膜色素変性症	神戸市立神戸アイセンター病院	臨床研究	2020	2020
NKT細胞	同種iPS細胞	再発・進行頭頸部がん	千葉大学・理化学研究所	医師主導治験	2020	2020
軟骨	同種iPS細胞	膝関節軟骨損傷	京都大学	臨床研究	2020	2021
心筋細胞	同種iPS細胞	拡張型心筋症	慶応義塾大学	臨床研究	2020	-
網膜色素上皮細胞	同種iPS細胞	網膜色素上皮不全症	神戸市立神戸アイセンター病院	臨床研究	2021	2022
抗GPC3-CAR発現NK細胞	同種iPS細胞	卵巣がん	京都大学・国立がん研究センター	医師主導治験	2021	2021
角膜内皮細胞	同種iPS細胞	水疱性角膜症	慶応義塾大学	臨床研究	2021	2023
血小板	同種iPS細胞	血小板減少症	メガカリオン・京都大学・CiRA-F	企業治験	2021	2022
心筋細胞	同種iPS細胞	虚血性心不全	ハートシード・慶応義塾大学	企業治験	2021	2023
網膜色素上皮細胞	同種iPS細胞	網膜色素上皮裂孔	住友ファーマ・ヘリオス	企業治験	2023	-

滲出型加齢黄斑変性治療のためのiPS細胞由来網膜色素上皮細胞

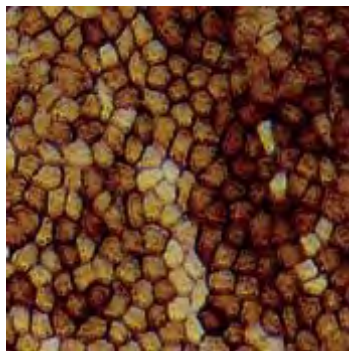
滲出型加齢黄斑変性



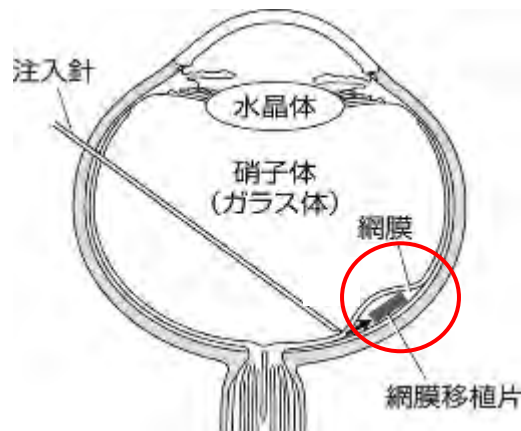
臨床研究は、理化学研究所と先端医療センター病院（神戸市）で行いました（2014年に世界初となるiPS細胞由来移植細胞のFIH試験を実施）。



症状



ヒトiPS細胞から分化した網膜色素上皮(RPE)細胞



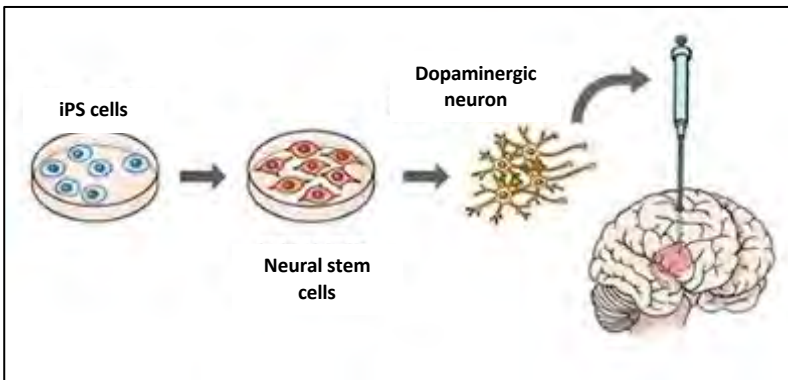
移植RPE細胞による治療

パーキンソン病治療薬としてのiPS細胞由来ドーパミン作動性神経細胞

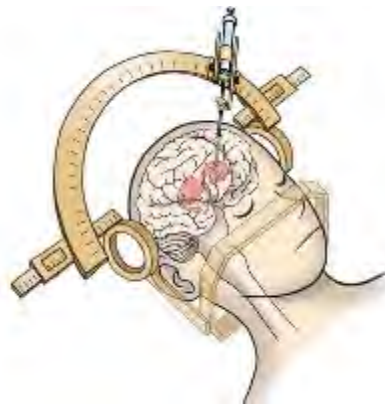
パーキンソン病

パーキンソン病は、黒質と呼ばれる脳の一部で神経細胞が失われることで発症します。その結果、脳内のドーパミンという化学物質が減少します。パーキンソン病の3つの主な症状は以下の通りです：

身体の特定の部分が不随意に揺れる、動きが鈍くなる、筋肉が硬くなり柔軟性が失われる。

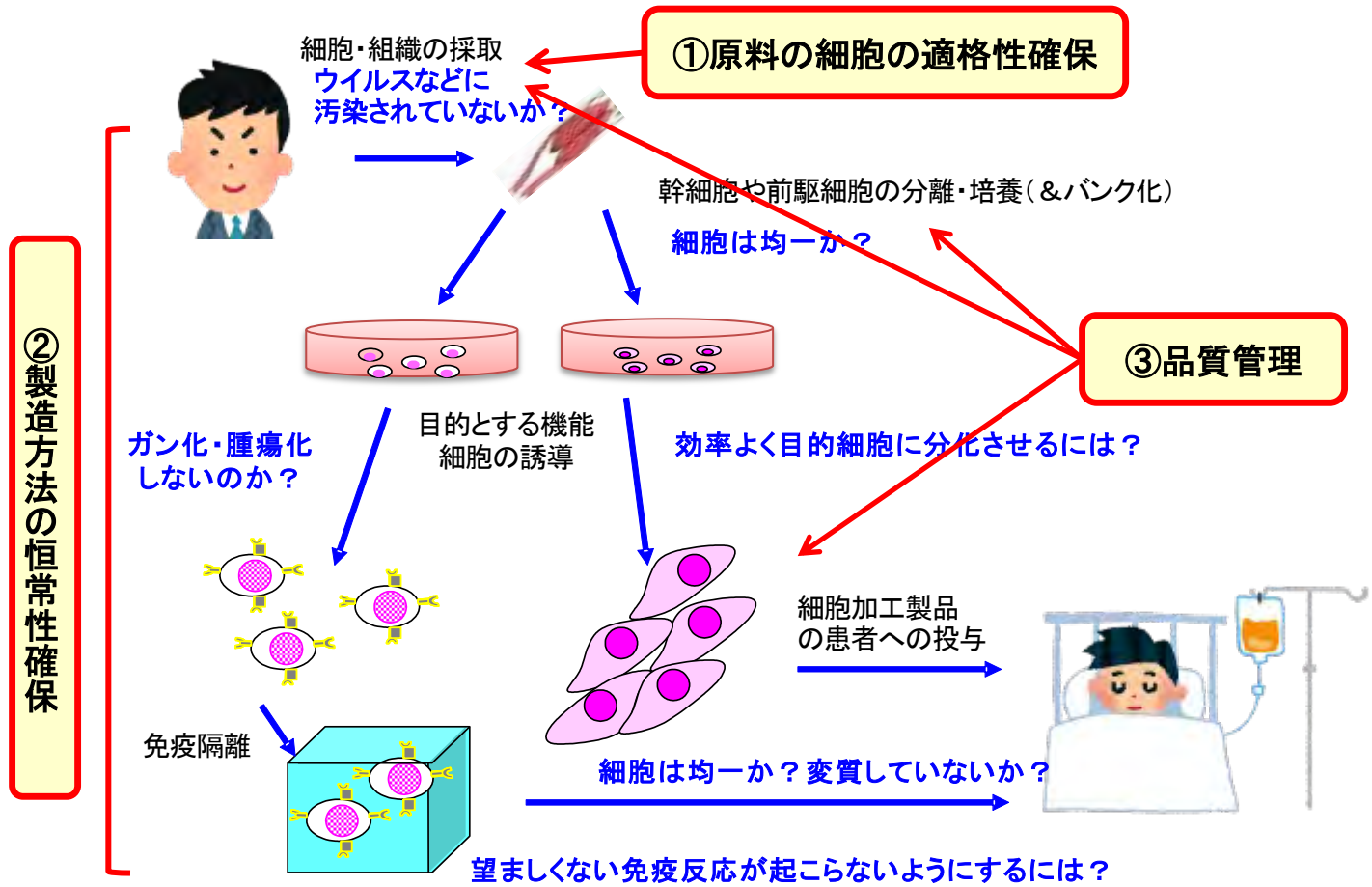


2018年8月に京都大学で治験開始（FIH試験は2018年11月に実施）。
米国においても2023年10月に治験開始。

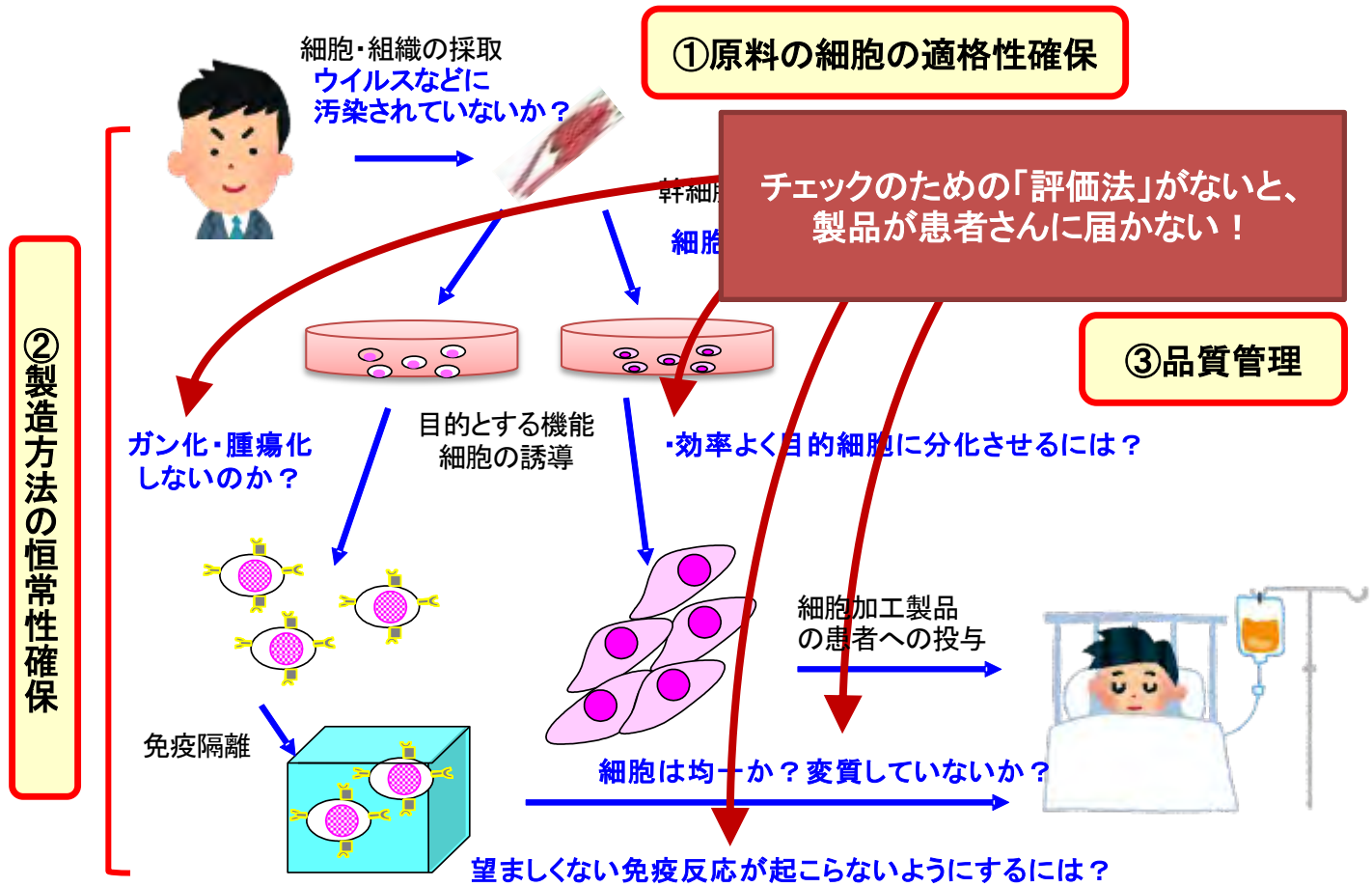


(画像) 患者さんの頭蓋骨に直径12mmの穴を開け、専用の装置で細胞を注入します。

再生医療製品（細胞加工製品）の品質・安全性の確保



再生医療製品（細胞加工製品）の品質・安全性の確保



何をどう評価すべきなのか？

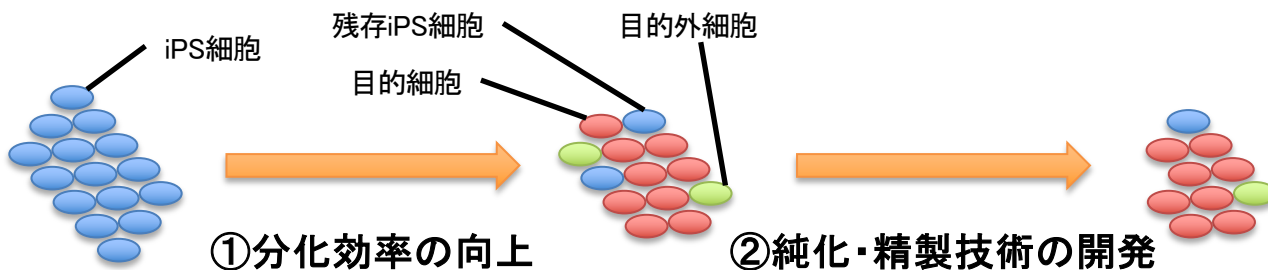
再生医療等製品(細胞加工物)の実用化における主な科学的課題

1. ウイルス安全性(同種由来 vs. 自己由来)
 2. 原材料として供される細胞の特性解析と適格性
 3. 細胞基材以外のヒト又は動物起源由来製造関連物質の適格性
 4. 細胞基材としてのセル・バンクの樹立と管理のありかた
 5. 最終製品の品質の再現性を達成するための包括的な製造戦略、製造工程評価
 6. 最終製品を構成する細胞の有効成分としての特性解析
 7. 最終製品の必須品質特性の同定と規格設定(最終製品の品質管理)
 8. 製法／セル・バンクの変更による新旧製品の同等性の検証
 9. 非臨床安全性試験・非臨床POC試験のデザインと解釈
 10. 造腫瘍性試験のデザインと解釈(特にES/iPS細胞由来製品)
 11. 最終製品の免疫原性評価
 12. 投与細胞の体内での分布・挙動
 13. 臨床試験のデザインと解釈
 14. 有効性・安全性のフォローアップのあり方
- 原料の
安全性・適格性
- 最終製品の品質確保
- 非臨床段階での
安全性・有効性の予測
- 臨床評価の
あり方

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

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可能か？

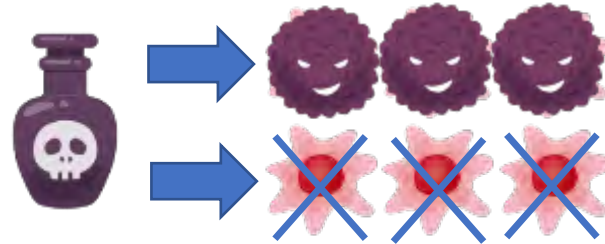
…実はよく知られていなかった



化学物質の毒性 vs. 細胞加工製品の造腫瘍性

- 化学物質の毒性

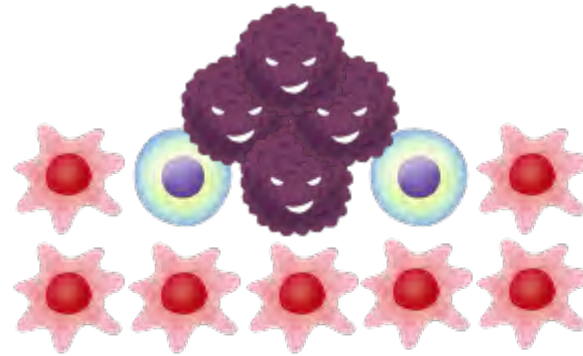
化学物質の体(細胞・組織・臓器)に対する悪影響



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



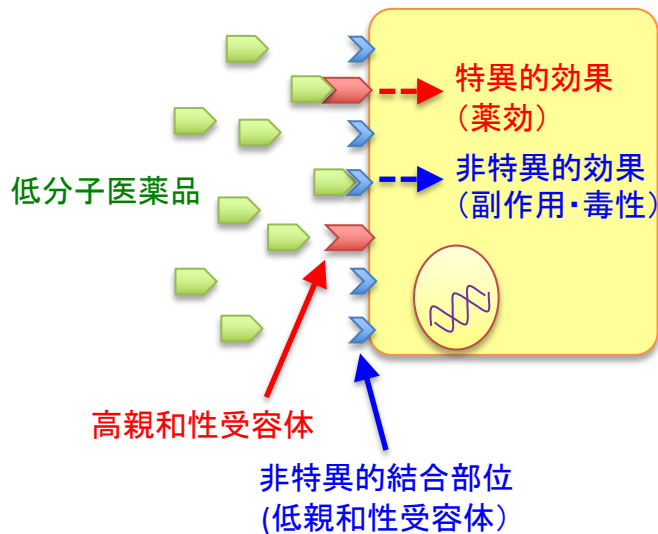
従来の低分子医薬品の毒性学の考え方を、 細胞加工製品の *in vivo* 造腫瘍性試験に当てはめてはいけない

低分子医薬品の
毒性学

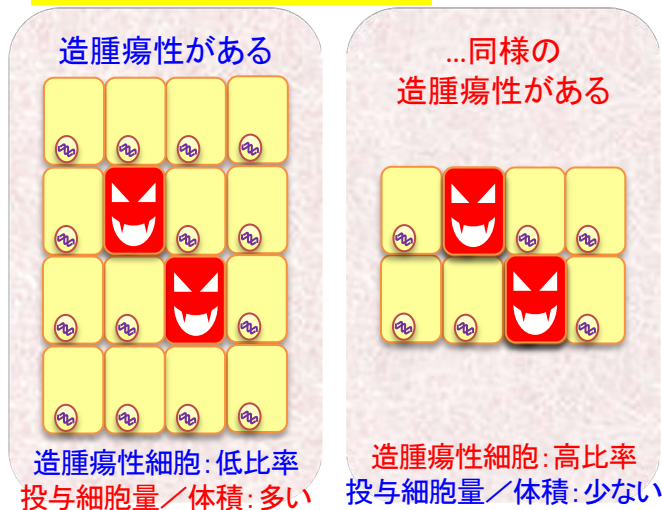
プリンシプルが
全く異なる

細胞加工製品の
造腫瘍性試験

副作用・毒性の主な原因は、
一定濃度（高濃度）の低分子医薬品が、細胞
の非特異的結合部位（低親和性受容体）に「質量作用の法則」に従って結合することによる。

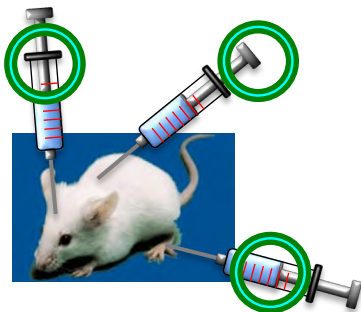


造腫瘍性の主な原因は、
造腫瘍性細胞の存在（または発生）である。
製品の造腫瘍性を決定するのは、生着環境
における製品細胞（に含まれる造腫瘍性細胞）
の絶対数であり、製品細胞の濃度（体積
換算の相対細胞数）ではない。



従来の低分子医薬品の毒性学の考え方を、 細胞加工製品の *in vivo* 造腫瘍性試験に当てはめてはいけない

低分子医薬品の
毒性学

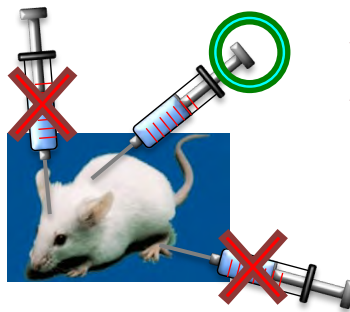


多くの場合、
任意の投与量
(例: 臨床投与量×安全係数)
の検体を
任意の部位
(例: 臨床投与相当部位)
に投与することができる

in vitro 試験法で
代替可能

細胞加工製品の
造腫瘍性試験

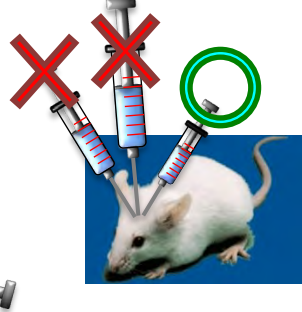
投与量優先



投与細胞数をできるだけ
多くするならば、
多くの場合、
投与部位が制限される
(例: 皮下)

不純物としての造腫瘍性
細胞の高感度での検出
に利用可能

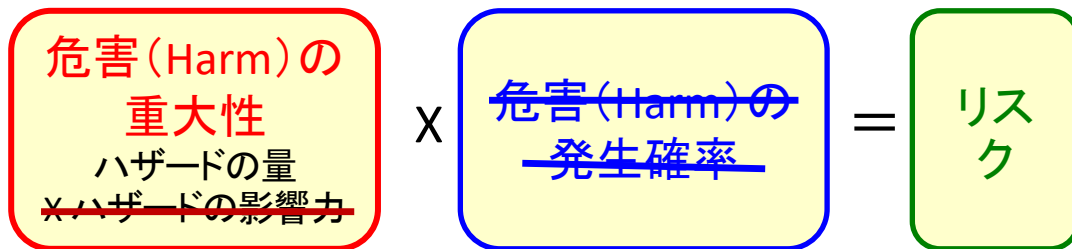
投与部位優先



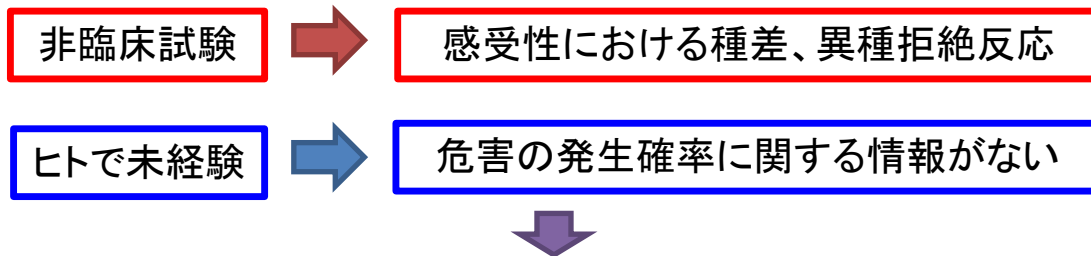
臨床投与相当部位に投与
するならば、
多くの場合、
投与細胞数が制限される
(⇒ 感度低下)

生着部位で造腫瘍性を
発揮しうる細胞(の親細胞)
の検出のために利用
可能

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？



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

造腫瘍性関連ガイドラインの策定

臨床研究 再生医療等安全性確保法トラック

- 幹細胞・再生医学戦略作業部会
(文科省、H27.8.7)
 - 再生医療の安全性確保に関する考え方についての早急な整理の必要性
 - 細胞の遺伝子変異の研究は不十分で腫瘍化の可能性についても未解明であるとの指摘
 - iPS細胞等を用いた臨床研究を実施する際の移植細胞の安全性評価の在り方に係る研究
(厚労省・福井班、H27.12~)
 - 造腫瘍性を含む安全性に関し、臨床研究における評価指標・基準の当面の考え方に関する議論
- 「特定認定再生医療等委員会におけるヒト多能性幹細胞を用いる再生医療等提供計画の造腫瘍性評価の審査のポイント」
(H28.6.13, 厚労省医政研発課長通知、R3.3.9, 改訂)

薬機法トラック

- 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業(厚労省、H24~28)

【採択課題】

- 阪大院(医) 心筋・角膜・軟骨製品
- 国成育セ(研究所) ES細胞由来製品

再生医療等製品(ヒト細胞加工製品)のための未分化・形質転換細胞の検出試験ガイドライン案策定合同WG(H27~28)

未分化・形質転換細胞の検出、*in vivo*造腫瘍性試験の方法・留意点について議論

「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」

(R1.6.27, 厚労省薬生機審発課長通知)

主に考え方(←)

(→)主に具体的試験法

ともに両トラックで共通に利用可能なものとなるのが理想的

1. はじめに

- ヒト細胞加工製品中に混在する形質転換細胞及び未分化多能性幹細胞等の造腫瘍性細胞はハザードであり、その存在量及び種類の情報を把握することは、ヒト細胞加工製品の品質及び安全性の確保において重要である。
- 本文書は、ヒト細胞加工製品の品質及び安全性を非臨床的に評価する際の参考にすべき事項及び留意点のうち、特に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である。

「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」（薬生機審発0627第1号別添、令和元年6月27日）

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細胞加工製品ののための造腫瘍性関連試験
 - 5.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理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混在を評価するための試験
 - 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における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. 試験動物の数と性別
 - 5.3.4. 試験検体の投与部位と検体中の細胞数及び検体の形態
 - 5.3.5. 観察期間
 - 5.3.6. 投与部位の観察
 - 5.3.7. 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のための造腫瘍性関連試験
 - 6.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験
 - 6.2. 最終製品の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 混在する未分化ES/iPS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)

ヒト細胞加工製品の造腫瘍性関連試験

<目的別に3種類ある>

①原料・原材料の品質特性評価・品質管理のための造腫瘍性試験

⇒従来のバイオリジクスの細胞基材のためのアプローチ(WHO TRS 978)が適用可能

②中間製品又は最終製品の造腫瘍性細胞の混在を評価するための試験

③最終製品細胞のヒトにおける生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験

最終製品

中間製品

Q1「どのくらいの未分化ES/iPS細胞が残存しているのか？」

高感度in vivo試験、qRT-PCR、フローサイトメリー、直接培養法等

Q2「目的外細胞として形質転換細胞が含まれる？」

高感度in vivo試験、細胞増殖特性評価、軟寒天コロニー形成試験等

Q3「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか？」

高感度in vivo試験

「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」（薬生機審発0627第1号別添、令和元年6月27日）

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

原材料の品質管理

- 5.1. 原料・原材料の品質特性評価・品質管理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混在を評価するための試験
 - 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における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. 試験動物の数と性別
 - 5.3.4. 試験検体の投与部位と検体中の細胞数及び検体の形態
 - 5.3.5. 観察期間
 - 5.3.6. 投与部位の観察
 - 5.3.7. 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・原材料の品質特性評価・品質管理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

製造における中間製品・最終製品の品質管理

最終製品の非臨床安全性試験

- 表1 混在する未分化ES/iPS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ル)

5.2. 中間製品又は最終製品の造腫瘍性細胞の混在を評価するための試験 混在する未分化ES/iPS細胞の検出・定量法

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	qRT-PCR
目的	造腫瘍性細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化の多能性細胞の検出
所要時間	17-30週間	1日	約6時間
利点	<ul style="list-style-type: none"> 直接的 臨床適用相当部位への移植により微小環境での造腫瘍性を評価できる 	<ul style="list-style-type: none"> 短時間・簡便 個々の細胞を解析し、マーカー分子の発現量を評価可能 簡便 	<ul style="list-style-type: none"> 迅速 簡便 高感度
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> 費用と時間がかかる 専用動物施設が必要 スループットが低い 腫瘍の由来が形質転換細胞か多能性幹細胞かを区別するには、病理的評価等が必要 	<ul style="list-style-type: none"> 間接的 ゲーティングが結果に影響 	<ul style="list-style-type: none"> 間接的 個々の細胞でのマーカー分子発現レベルは評価できない
検出能力又は検出限界	hrPE2.5 x 10 ⁵ 個中に 1,000個(0.4%) の割合で混入するhiPS細胞を50%の確率で検出	hrPE中の 0.1% のiPS細胞 (マーカー:TRA-1-60)	hrPE中の 0.002%以下 のiPS細胞 (マーカー:LIN28)
出典	Kanemura <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2013	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012	Kuroda <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2012

試験法	Droplet Digital PCR	GlycoStem-HP法	Essential-8/LN521培養増幅法
目的	未分化の多能性細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化の多能性細胞の検出
所要時間	約6時間	3時間以下 (培養上清回収から測定まで)	約1週間
利点	<ul style="list-style-type: none"> 迅速 簡便 高感度 	<ul style="list-style-type: none"> 細胞非破壊的 簡便 高スループット 	<ul style="list-style-type: none"> 直接的 簡便 残存iPS細胞の特性解析が可能
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> 間接的 個々の細胞でのマーカー分子発現レベルは評価できない 	<ul style="list-style-type: none"> 間接的 個々の細胞でのマーカー分子発現レベルは評価できない 培地成分が結果に影響 	<ul style="list-style-type: none"> 時間がかかる スループットが低い
検出能力又は検出限界	ヒト心筋細胞中の 0.001% のiPS細胞 (マーカー:LIN28)	HEK293T中の 0.05% のiPS細胞 (マーカー:H3+ボドカリキシン)	hMSC中の 0.01-0.001% のiPS細胞 (ヒト胚葉体中の 0.1-0.01% のiPS細胞)
出典	Kuroda <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Tateno <i>et al.</i> , <i>Sci Rep.</i> 2014	Tano <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2014

5.2. 中間製品又は最終製品の造腫瘍性細胞の混在を評価するための試験 混在する形質転換細胞の検出・定量法

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週間以上
利点	<ul style="list-style-type: none"> 直接的 高感度 臨床適用相当部位の微小環境での造腫瘍性を評価可能 	<ul style="list-style-type: none"> 安価 悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる 	<ul style="list-style-type: none"> 高感度 悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる 	<ul style="list-style-type: none"> 安価 簡便 良性も悪性も幅広く不死化細胞を検出
欠点・留意点	<ul style="list-style-type: none"> 費用と時間がかかる 専用動物施設が必要 腫瘍の由来が形質転換細胞か多能性幹細胞かを区別するには、病理的評価等が必要 <i>in vivo</i> 造腫瘍性を示さない 不死化細胞は検出不能 	<ul style="list-style-type: none"> 造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 浮遊系細胞には使えない 悪性形質転換細胞以外の不死化細胞は検出不能 	<ul style="list-style-type: none"> 造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 浮遊系細胞には使えない 良性不死化細胞検出不能 イメージスキャナーが高価 悪性形質転換細胞以外の不死化細胞は検出不能 	<ul style="list-style-type: none"> 造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 悪性形質転換細胞の有無を区別できない
検出能力 又は 検出限界	hMSCに $1/10^6$ (0.0001%) の割合で混在するHeLa細胞 (10個)を17%の確立で検出可能	hMSCに $1/10^3$ (0.1%) の割合で混在するHeLa細胞 (計算上の検出限界は0.02%)	hMSCに $1/10^7$ (0.00001%) の割合で混在するHeLa細胞	① hMSCに $1/10^6$ (0.0001%) の割合で混入するHeLa細胞 ② 脂肪由来幹細胞に $1/10^5$ (0.001%) の割合で混入する不死化脂肪由来幹細胞
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	① Kono <i>et al.</i> , <i>Biologicals.</i> 2015 ② Hasebe-Takada <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2016

5.3. 最終製品のヒトにおける生着部位での腫瘍形成能を評価するための試験

生着部位での投与細胞の腫瘍形成能については生着部位での *in vivo* 造腫瘍性試験を行う以外に評価方法はない。その場合に考慮すべき点としては、

- a. 試験動物の選択
- b. 対照細胞の選択・試験系の検出能力
- c. 試験動物の数
- d. 試験検体の投与部位と検体中の細胞数及び検体の形態
- e. 観察期間
- f. 投与部位の観察
- g. 投与部位の組織学的評価、投与ヒト細胞の同定や生着していたことの確認、分化度を示す組織学的評価
- h. 結果の解釈法

などが挙げられる。特に投与部位は、**可能な範囲でヒトでの投与部位に相当する部位を選択**することを考慮する。これは、生着部位の微小環境の違いによって腫瘍形成能や、腫瘍のタイプが異なるおそれがあり、ヒトへの外挿性を考えるときに問題となる可能性があるためである。

造腫瘍性評価に関する留意点

造腫瘍性関連試験系は、**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ことに注意
- 各試験法の能力と限界を理解した上で、リスク判断・リスクマネジメント立案&IC受領

製品中に混在する造腫瘍性細胞の高感度検出法の多施設検証

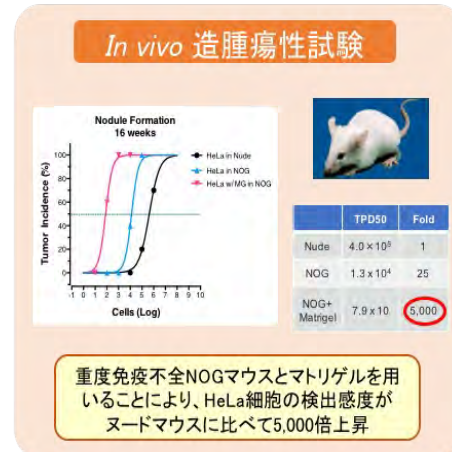
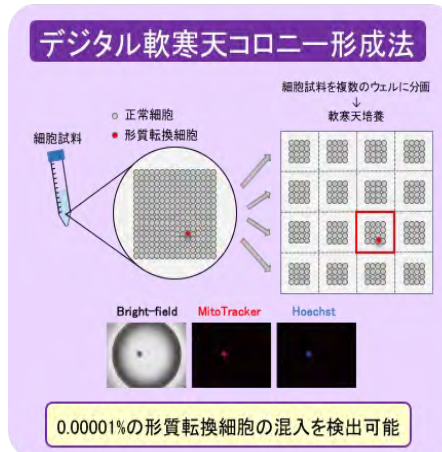
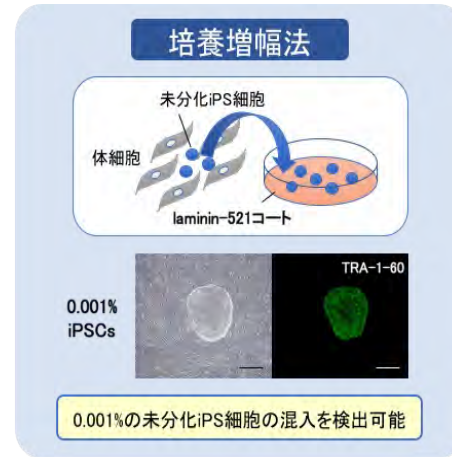
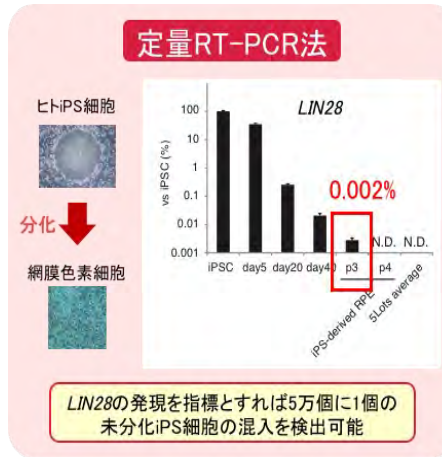
当部発の様々な
試験法(例)

残存ES/iPS細胞
の検出試験法

悪性形質転換細胞
の検出試験法

標準化に必要なこと

分析能の多施設検証
& コンセンサス



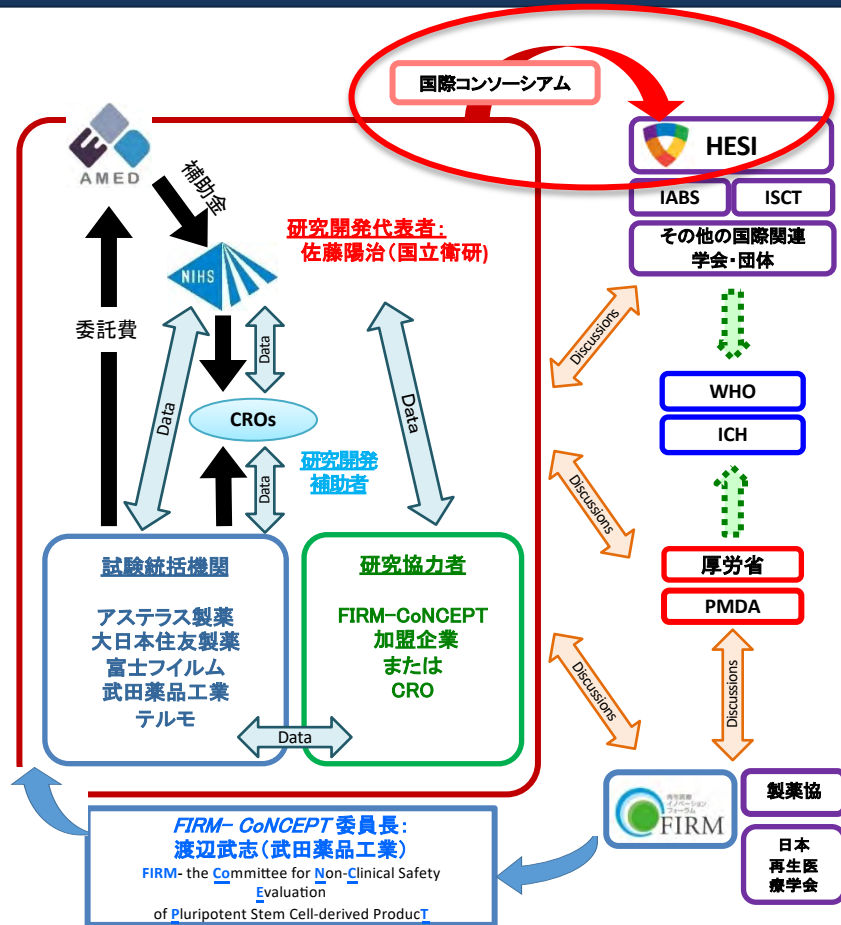
開発した試験法の多施設検証(官民共同研究)

細胞加工製品の腫瘍形成リスク評価に関する官民共同研究(2020~2022年度AMED医療研究開発推進事業費補助金)

プロジェクト名: MEASURE2

(Multisite Evaluation Study on Analytical Methods for Non-clinical Safety Assessment of Human-derived Regenerative Medical Products 2)

細胞加工製品における造腫瘍性ハザード検出試験法の国際標準化とアプリケーションの拡大



品質・安全性に関する国際的コンセンサス形成

NGOs / Consortia:



eatris

European infrastructure
for translational medicine



HESI.

**CT-TRACS
Members**

(2022 data)

Universities/ Research Centers:

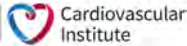


Memorial Sloan Kettering
Cancer Center



The University
Of
Sheffield.

Stanford



Universiteit
Leiden



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH



HESI.

>100 Participants

>30 Organizations

Government & Regulatory bodies:



Medicines Evaluation Board



National Institutes
of Health



NIST

National Institute of
Standards and Technology

CTPs developers, tool providers:



AstraZeneca



charles river



janssen



NOVARTIS



SANOFI



Courtesy of Dr. Lucilia Mouriès, HESI



CT-TRACS (Cell Therapy: TRACKing, Circulation and Safety) Committee

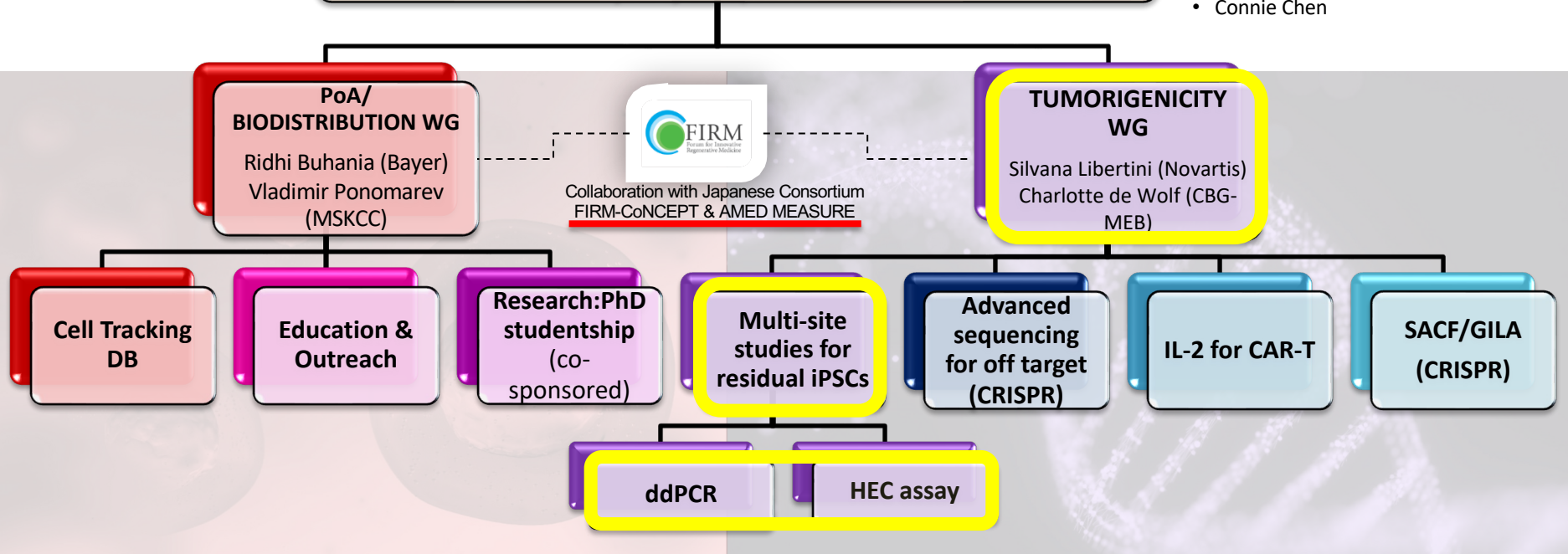
*To facilitate the translation of cell-based therapies to the clinic by driving the development of **tools, methods and knowledge** required to evaluate safety and fate of therapeutic cells.*

Co-Chairs

- Mick Fellows (AstraZeneca)
- Tineke van der Hoorn (CBG-MEB)

HESI Staff

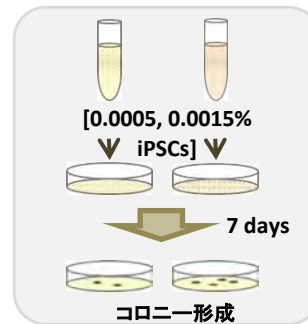
- Lucilia Mouriès
- Connie Chen



国際実験コンソーシアムにおける培養増幅法(HECアッセイ法)の検証①

International evaluation study of a highly efficient culture assay for detection of residual human pluripotent stem cells in cell therapies

Takeshi Watanabe*¹, Satoshi Yasuda², Connie L Chen³, Louise Delsing⁴, Mick D Fellows⁵, Gabor Foldes^{6,7}, Shinji Kusakawa², Lucilia Pereira Mourie's³ & Yoji Sato²



細胞:

未分化iPSC細胞:

iPSC:

Number of spiked cells:

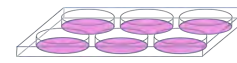
ChiPSC18

0 cells 5 cells 15 cells

分化細胞 (バックグラウンド細胞):

iCell Cardiomyocytes (FUJIFIRM Cellular Dynamics)

Number of background cells: 1×10^6 /well, 6 well plate



Well: Laminin 521-coated
Medium: Essential 8 Flex w/ CEPT

培養条件 (分散誘導性アポトーシス阻害剤):

CEPT (Chroman 1, Emricasan, Polyamines, Trans-ISRIB)

ウェル数/試験回数:

2 wells for 0 cells, 4 wells for 5 or 15 cells, x 3 experiments

施設数 (4施設):



AstraZeneca



Imperial College London,



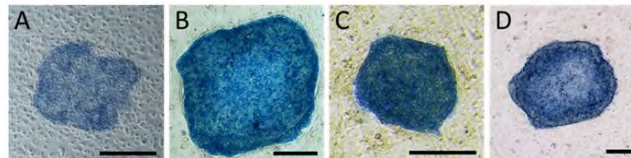
NIHS,



Takeda Pharmaceuticals

国際実験コンソーシアムにおける培養増幅法(HECアッセイ法)の検証②

培養後のコロニー形成像
(アルカリホスファターゼ染色)



Number of spiked hiPSC (%)		5 (0.0005)	
	Number of hiPSC colonies	Colony formation rate (%)	True positive rate for detecting hiPSC colonies (%)
			Single
Facility A	2.6±0.2	53±4	93
Facility B	2.1±0.9	42±19	88
Facility C	3.3±0.9	67±18	96
Facility D	2.7±1.2	53±25	93
Overall	2.7±0.9	54±19	92±4



iPS細胞5個スパイク
(0.0005%)

Number (%) of spiked hiPSC		15 (0.0015)	
	Number of hiPSC colonies	Colony formation rate (%)	True positive rate for detecting hiPSC colonies (%)
			Single
Facility A	6.9±3.0	46±20	100
Facility B	5.1±1.2	34±8	99
Facility C	12.1±2.5	81±17	100
Facility D	7.3±0.9	48±6	100
Overall	7.9±3.3	53±22	100±0



iPS細胞15個スパイク
(0.0015%)

iPS細胞由来心筋細胞を用いた4施設の検証で、5個のiPS細胞の検出(0.0005%)が可能であり、真陽性率は繰り返しなしにおいても平均92%の数値を示した。



感度と頑健性を確認。

まとめ

再生医療等製品

- 新しいタイプの製品なので新しいタイプの特性を持つ
- 既存の品質・安全性試験法が適用できるとは限らない
- ヒト細胞を含む製品の場合、免疫拒絶や動物種差があるので非臨床試験でリスクの重大性を評価することが難しい
- 先端的な(=経験の浅い)製品なので、これまでの医薬品等にはない新しいタイプのリスク(例:造腫瘍性)については、リスクの発生確率の予測も難しい
- 「重要な有害要因(ハザード)」の同定とそれがどの程度低減されているかがリスク評価の基本

⇒「重要な有害要因」を定量し、最終製品の段階でどの程度低減できているかを測定する方法がないと、実用化は非常に難しい

レギュラトリーサイエンス⇒製品の評価法の開発と検証

何をどう評価すべきなのか？

再生医療等製品(細胞加工物)の実用化における主な科学的課題

1. ウイルス安全性(同種由来 vs. 自己由来)
2. 原材料として供される細胞の特性解析と適格性
3. 細胞基材以外のヒト又は動物起源由来製造関連物質の適格性
4. 細胞基材としてのセル・バンクの樹立と管理のありかた
5. 最終製品の品質の再現性を達成するための包括的な製造戦略、製造工程評価
6. 最終製品を構成する細胞の有効成分としての特性解析
7. 最終製品の必須品質特性の同定と規格設定(最終製品の品質管理)
8. 製法／セル・バンクの変更による新旧製品の同等性の検証
9. 非臨床安全性試験・非臨床POC試験のデザインと解釈
10. 造腫瘍性試験のデザインと解釈(特にES/iPS細胞由来製品)
11. 最終製品の免疫原性評価
12. 投与細胞の体内での分布・挙動
13. 臨床試験のデザインと解釈
14. 有効性・安全性のフォローアップのあり方

原料等の
安全性・適格性

最終製品の品質確保

非臨床段階での
安全性・有効性の予測

臨床評価の
あり方

「生きた素材」を使った「ものづくり」

パン酵母



ビール酵母

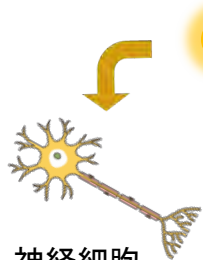
ワイン酵母



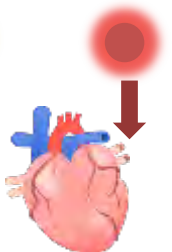
清酒酵母



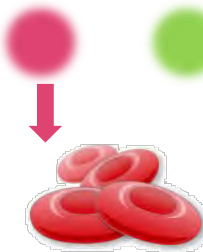
目的に合った酵母を使い分けることで、各品目で高品質な(美味しい)製品を作ることができる
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



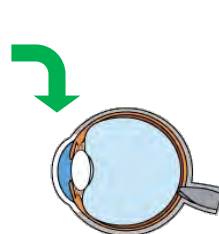
神経細胞



心筋細胞



血球



網膜

「高い再現性で品質の高い最終製品(分化細胞)を製造(誘導)する」
という目的に適った素材(例:専用のiPS細胞株)を選択することが重要

ヒトES/iPS細胞の分化傾向

ES/iPS細胞は株間で分化のしやすさ(分化傾向)に

大きな**バラツキ**がある



ES/iPS細胞由来再生医療製品の品質に影響

(分化抵抗性による未分化細胞の残存など)

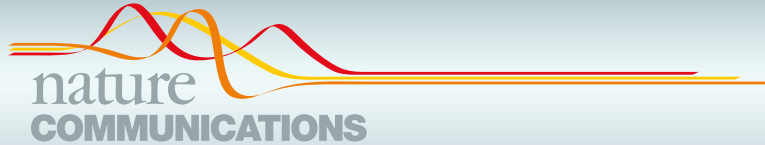
分化傾向のバラツキに対する解決方法

- より高効率な分化誘導法を開発する
- より高効率に分化するiPS細胞を樹立する
- **目的細胞に分化しやすいiPS細胞を選別する**

分化傾向予測マーカーの同定

→ **分化誘導前**に目的細胞になりやすい株の選択が可能

ヒトiPS細胞の三胚葉への分化傾向




ARTICLE

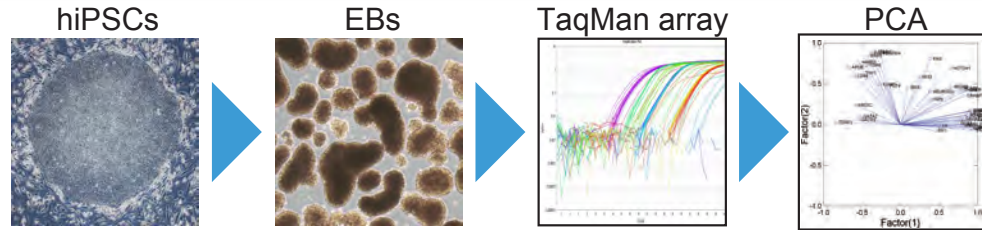
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09511-4>

OPEN

SALL3 expression balance underlies lineage biases in human induced pluripotent stem cell differentiation

Takuya Kuroda¹, Satoshi Yasuda ¹, Shiori Tachi^{1,2}, Satoko Matsuyama^{1,3}, Shinji Kusakawa¹, Keiko Tano¹, Takumi Miura¹, Akifumi Matsuyama³ & Yoji Sato^{1,2,4,5}

分化傾向の順位付け

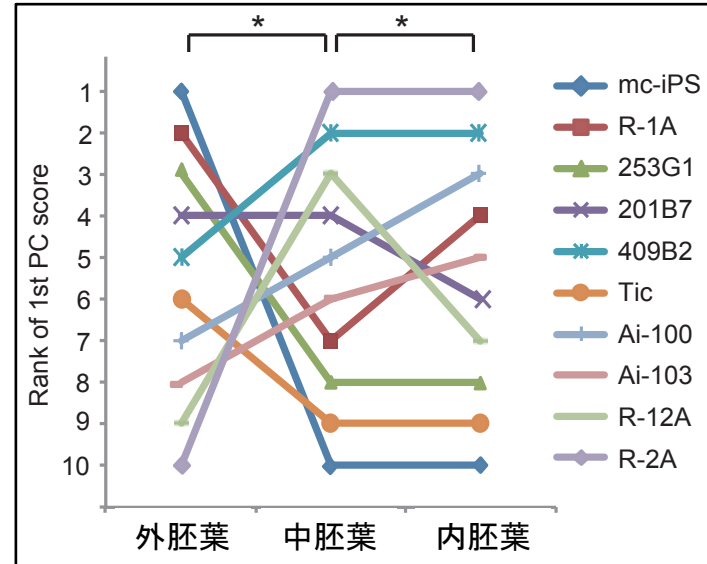


外胚葉マーカー:45遺伝子 中胚葉マーカー:56遺伝子
 内胚葉マーカー:27遺伝子

第一主成分得点

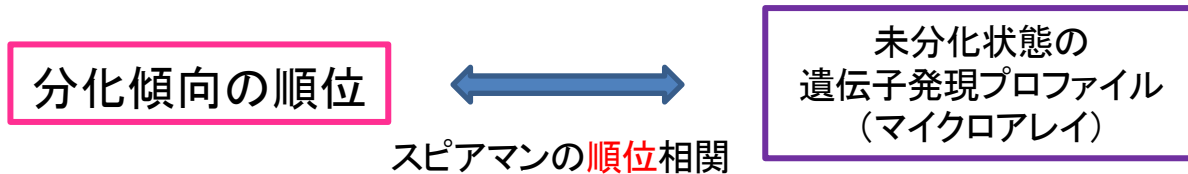
Cell line	Differentiation lineage		
	Ectoderm	Mesoderm	Endoderm
201B7	23.5	1.5	1.2
253G1	23.8	-12.6	-9.5
409B2	-11.8	18.5	9.3
Ai-100	-17.7	0.9	5.6
Ai-103	-18.0	0.2	3.0
mc-iPS	28.5	-32.2	-18.1
R-1A	25.4	-2.5	4.4
R-2A	-20.3	41.1	18.4
R-12A	-19.1	12.1	-0.4
Tic	-14.3	-27.0	-13.8

■ High □ Medium ■ Low

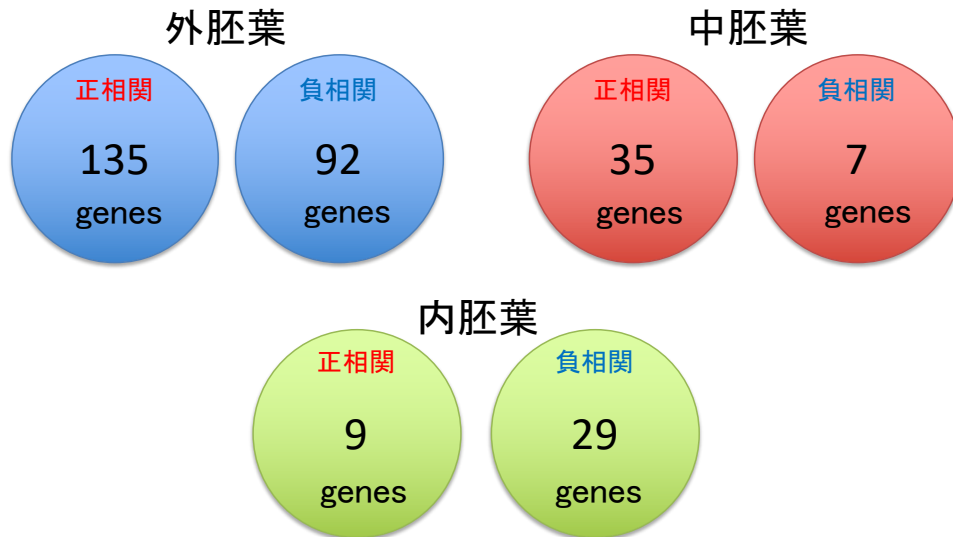


スピアマンの順位相関解析

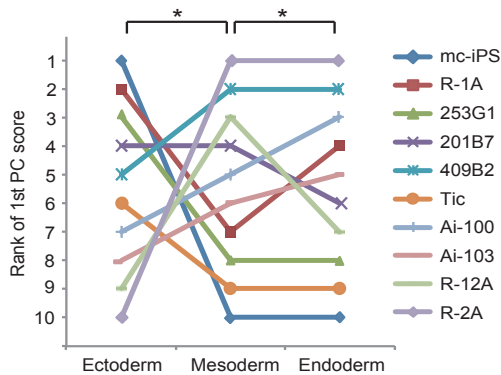
分化傾向と相関のある遺伝子の同定



分化傾向予測マーカー候補遺伝子



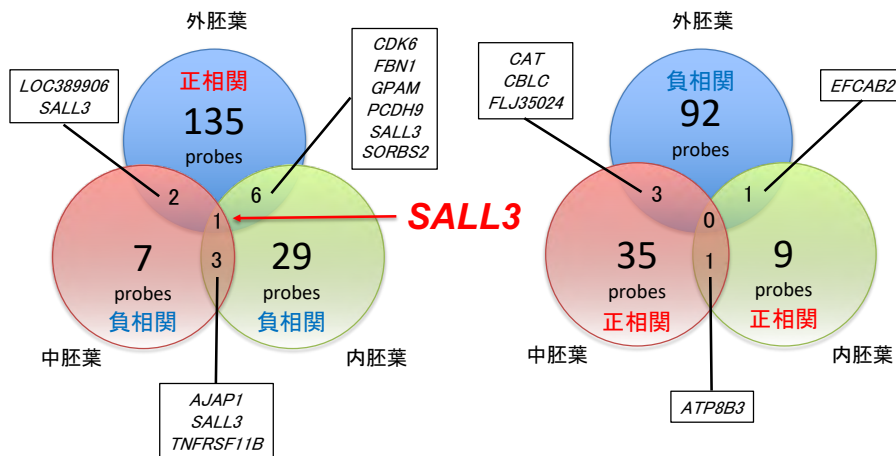
ヒトiPS細胞の分化傾向マーカー SALL3



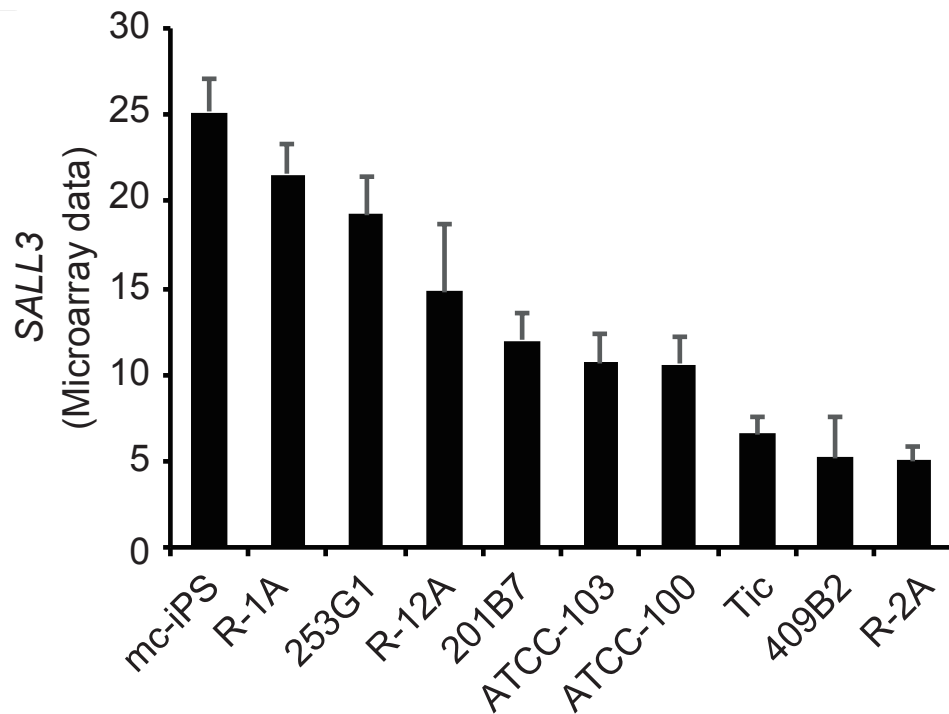
外胚葉になりやすい株は中・内胚葉になりにくい
 中・内胚葉になりやすい株は外胚葉になりにくい

仮説

外胚葉 ↔ 中・内胚葉で逆の相関を示す遺伝子
 = 機能的に分化に関与

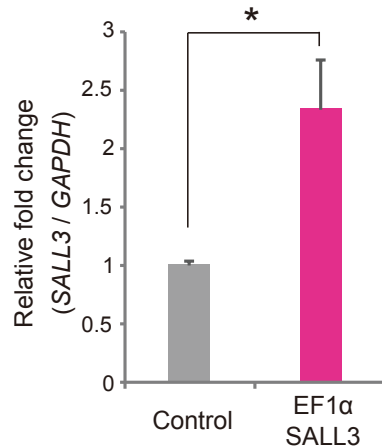
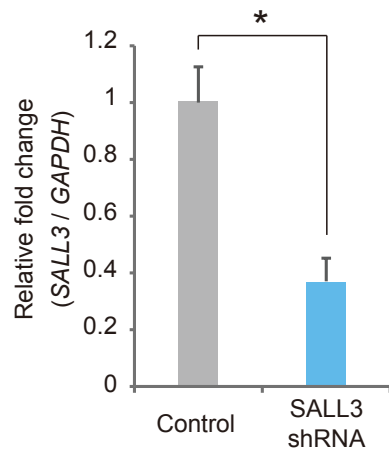


ヒトiPS細胞株におけるSALL3発現

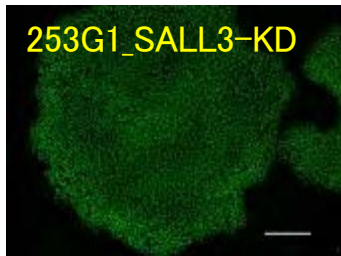


SALL3 mRNA発現量は、ヒトiPS細胞株間で最大5倍程度の差がある。

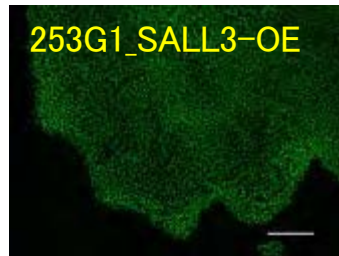
253G1 SALL3-KD, SALL3-OE株



OCT3/4

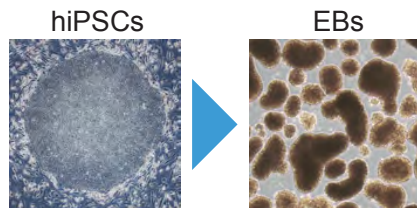


253G1_SALL3-KD



253G1_SALL3-OE

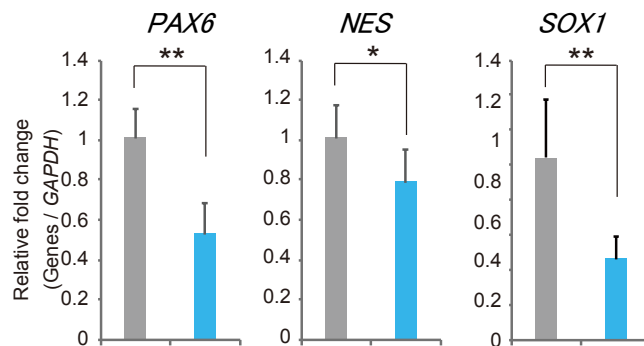
253G1 SALL3KD株 EB分化



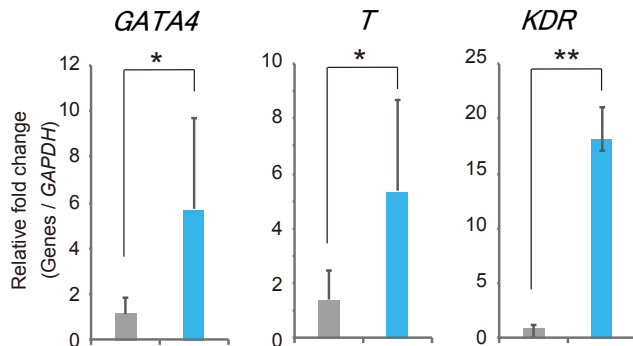
Control shRNA

SALL3 shRNA

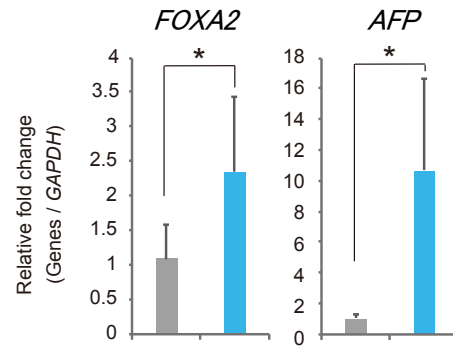
外胚葉マーカー



中胚葉マーカー

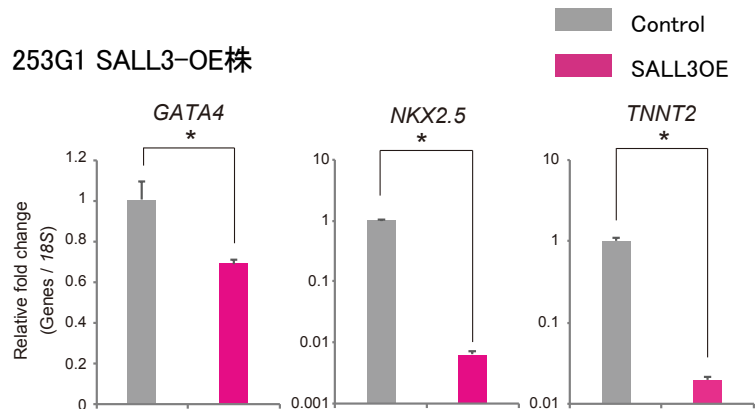
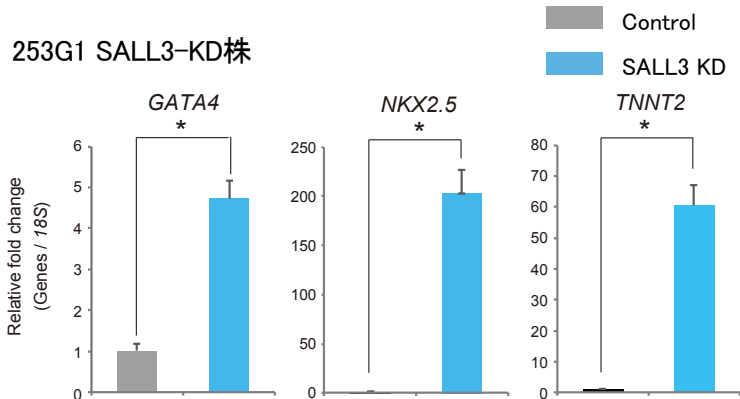
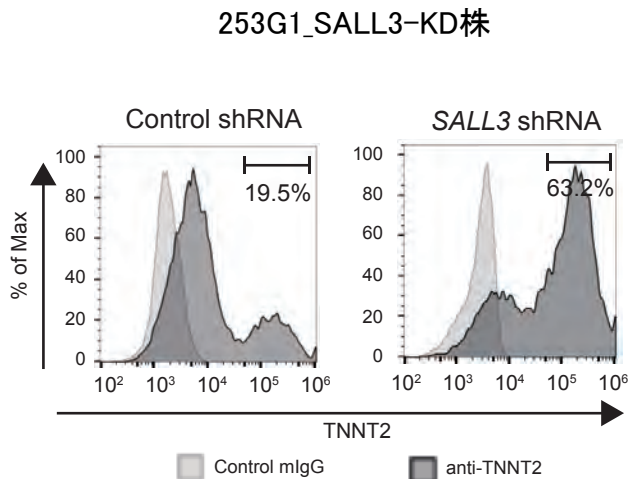


内胚葉マーカー



253G1 SALL3 KD/OE株 心筋分化誘導

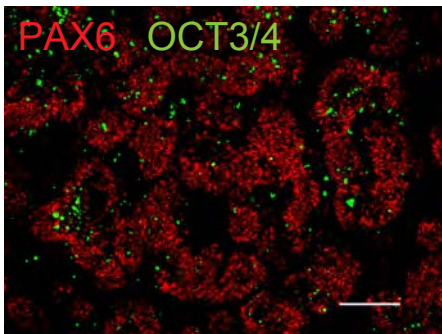
心筋分化誘導 (Day14)



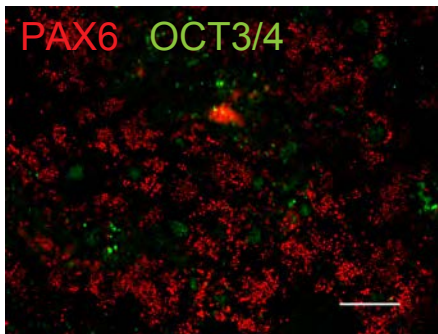
253G1 SALL3 KD/OE株 神経分化誘導

神経分化誘導 (Day10)

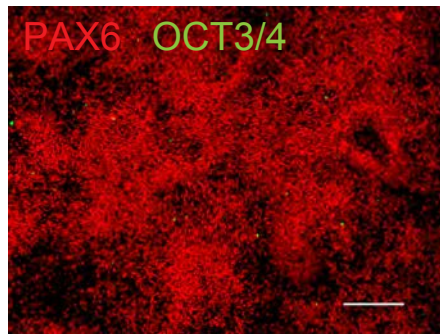
PAX6: 外胚葉マーカー



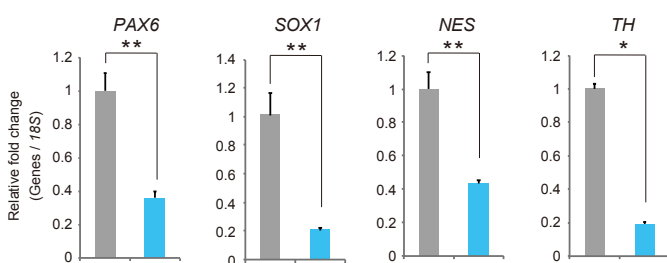
253G1



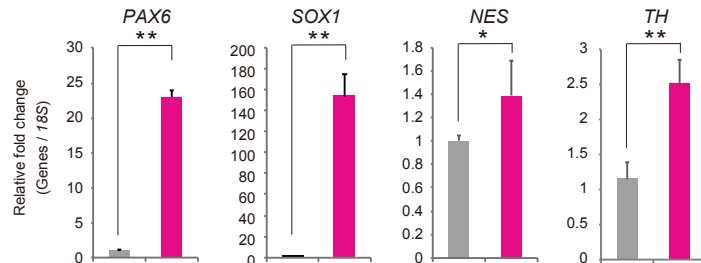
253G1_SALL3-KD



253G1_SALL3-OE



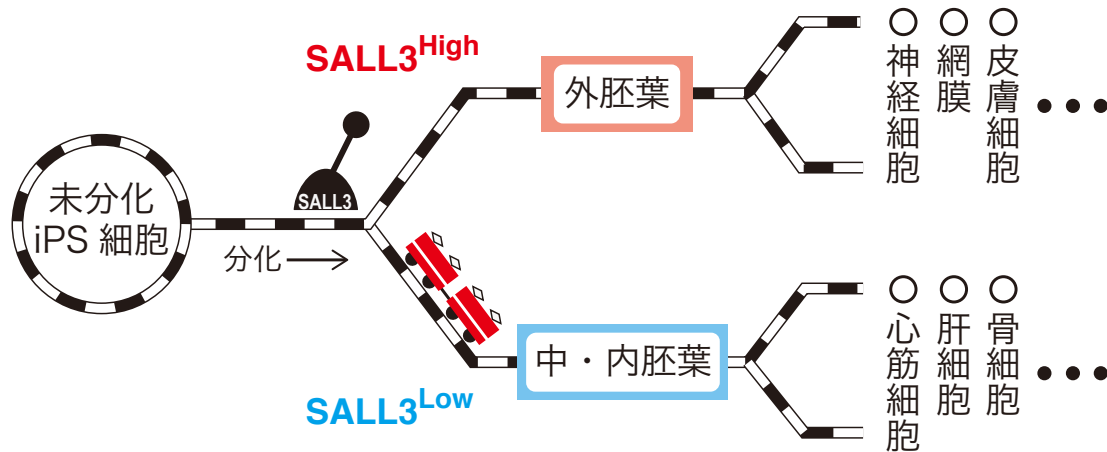
Control
SALL3 KD



Control
SALL3OE

小括

ヒトiPS細胞はSALL3の発現が高いと外胚葉に分化しやすく、
逆に発現量が低いと中・内胚葉に分化しやすい



SALL3は分化傾向を調節する分岐器(ポイント)の機能を持つ。

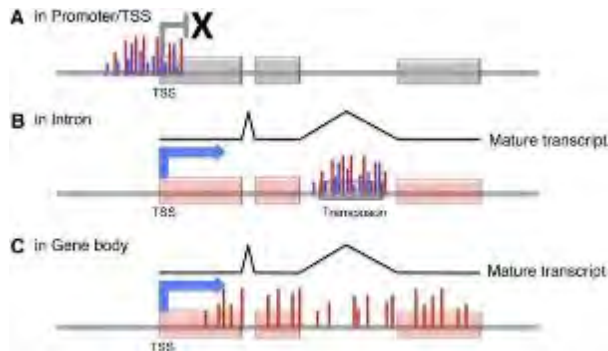
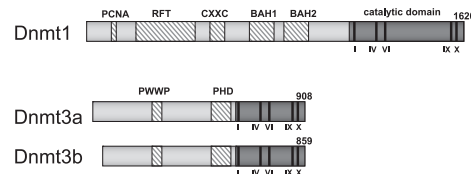
DNAメチル化

エピジェネティクス・・・DNA配列の変化を伴わず、後天的な修飾により遺伝子発現が制御され維持される仕組み。DNAのCpG配列のシトシンがメチル化修飾されるDNAメチル化や、ヒストン修飾が挙げられる。

DNA methyltransferase

複製DNAのメチル化の維持

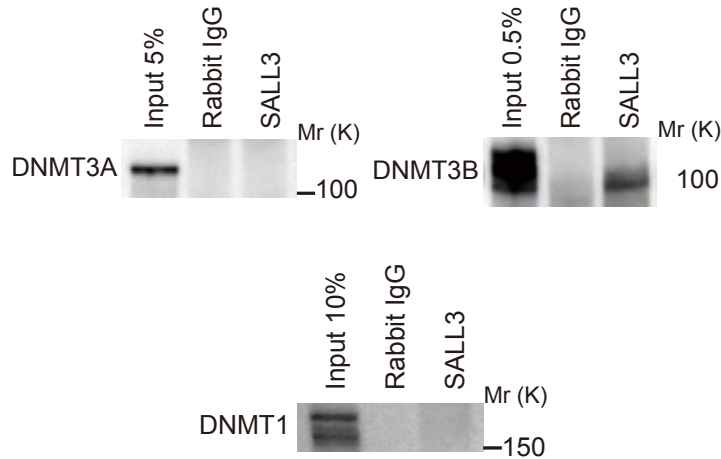
発生時における新規のメチル化



- (A)一般的に、DNAのメチル化によって転写因子の結合が阻害され遺伝子発現が抑制される
- (B)イントロンのDNAメチル化によってトランスポゾンスキップする
- (C)Gene bodyのDNAメチル化は転写を促進する(DNMT3B)

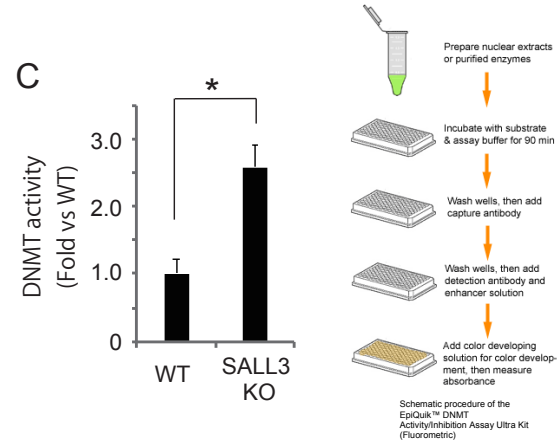
SALL3はDNMT3Bと結合しメチル化活性を調節する

SALL3抗体を用いた免疫沈降実験



SALL3は3種類のDNMTタンパク質のうち
DNMT3Bとのみ結合している

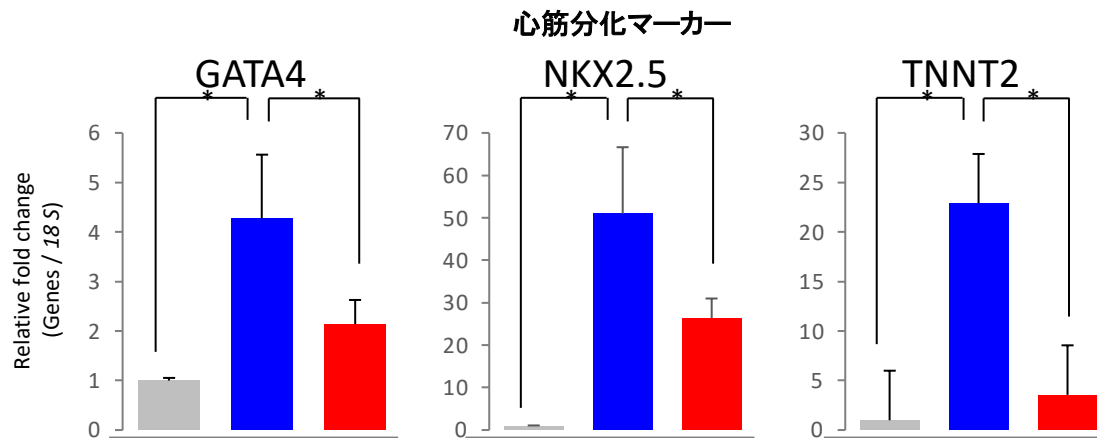
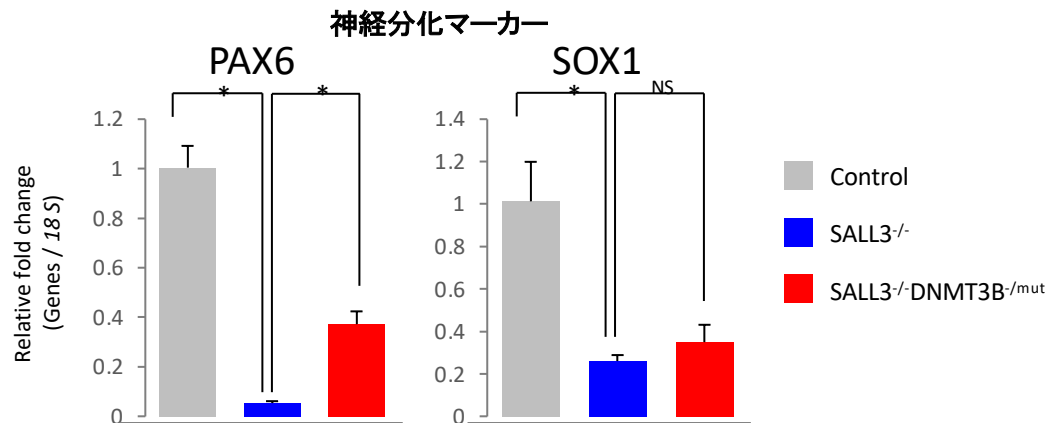
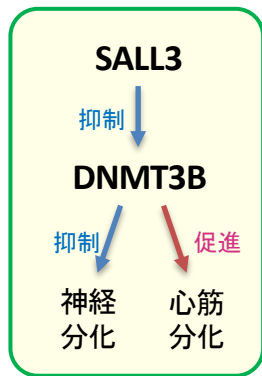
核画分を使ったDNMT活性測定



SALL3KO株の核画分のDNMT活性は
WT株よりも高い

SALL3はDNMT3BのDNMT活性を阻害していることが予想される

DNMT3B発現抑制はSALL3欠損を部分的に補う



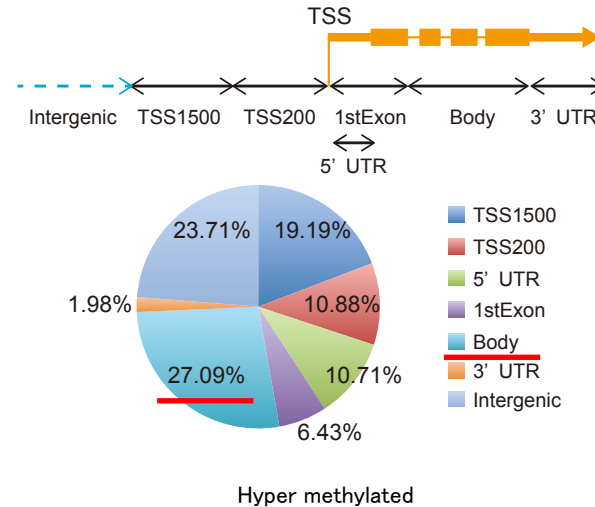
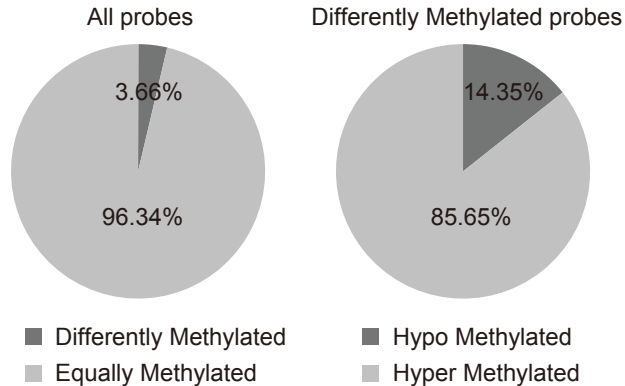
DNAメチル化解析(ビーズアレイ)



Illumina Human methylation 450 Bead Chip

DNAサンプル内の個々のCpGサイトを調べるためにデザインされた、ターゲット特異的な長鎖プローブ(45万種類)が結合したビーズを使用して、バイサルファイト処理したゲノムDNAの定量的ジェノタイプピングにより測定

WT vs 253G1 SALL3 KD



SALL3はGene bodyのメチル化に関与することが示唆された

パスウェイ解析

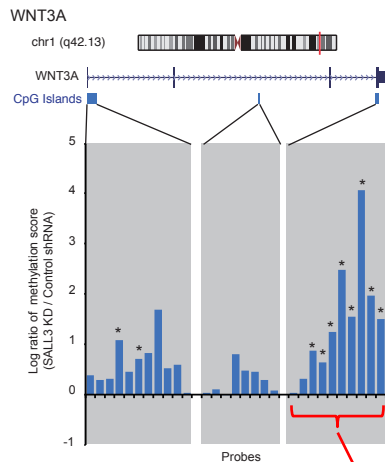
Pathway	-log(P-value)	Overlap	Molecules
Axonal Guidance Signaling	1.01E-10	18.2 % (83/457)	ABLIM1, ABLIM2, ADAM11, ADAM19, ADAMTS2, ADAMTS7, ADAMTS9, ARHGEF6, ARHGEF12, ARPC1B, BMP4, BMP7, BMP8A, BMP8B , C9orf3, CDK5, DPYSL5, ECE2, ECEL1, EFNA3, EPHA2, EPHA8, EPHA10, EPHB1, EPHB2, EPHB3, FZD5 , GDF7, GLI2, GLI3, GNA14, GNAO1, HHIP, KLB, LIMK1, LINGO1, MYL5, NFATC4, NOTUM, NTF3, NTN1, NTNG2, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PIK3R6, PITRM1, PLCB1, PLCB2, PLCD1, PLXND1, PRKAR1B, PRKCA, PRKCB, PRKCG, RHOD, ROBO3, SEMA3E, SEMA4A, SEMA6C, SHANK2, SLIT1, SRGAP3, SUFU, TUBA8, TUBA1A, TUBB3, TUBB4A, UNC5A, UNC5C, UNC5D, VEGFB, WNT1, WNT6, WNT11, WNT10A, WNT10B, WNT2B, WNT3A, WNT5A, WNT5B, WNT7B, WNT9B
Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons	4.61E-07	24.3 % (28/115)	CAMK1D, CAMK2B, CAMK2D, GRIA3, GRIN1, GRIN2C, GRIN2D, GRIN3B, GRM1, GRM5, GRM6, ITPR1, KCNH2, KCNN4, KCNQ2, KCNQ3, KLB, NOTUM, NTRK2, PIK3R6, PLCB1, PLCB2, PLCD1, PRKAR1B, PRKCA, PRKCB, PRKCG, SRC
Basal Cell Carcinoma Signaling	5.13E-07	29.2 % (21/72)	APC2, BMP4, BMP7, BMP8A, BMP8B, FZD5 , GLI2, GLI3, HHIP, SUFU, WNT1, WNT6, WNT11, WNT10A, WNT10B, WNT2B, WNT3A, WNT5A, WNT5B, WNT7B, WNT9B
Human Embryonic Stem Cell Pluripotency	5.12E-06	21.0 % (30/143)	BMP4, BMP7, BMP8A, BMP8B , FOXO1, FZD5 , KLB, LEFTY1, NODAL, NTF3, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PIK3R6, S1PR5, SMAD6, SPHK1, TGFB1, UTF1, WNT1, WNT6, WNT11, WNT10A, WNT10B, WNT2B, WNT3A, WNT5A, WNT5B, WNT7B, WNT9B
Molecular Mechanisms of Cancer	7.97E-06	15.5 % (61/394)	ADCY2, ADCY4, ADCY9, ARHGEF3, ARHGEF4, ARHGEF6, ARHGEF12, ARHGEF19, BMP4, BMP7, BMP8A, BMP8B , CAMK2B, CAMK2D, CDH1, CDK5, CDK6, CDK20, CDKN2C, CTNNA2, DHH, FOXO1, FZD5 , GAB2, GNA14, GNAO1, HIPK2, IHH, KLB, LRP1, MAP2K6, MAPK13, PIK3R6, PLCB1, PLCB2, PRKAR1B, PRKCA, PRKCB, PRKCG, RALGDS, RASGRF1, RHOD, RHOF, RHOT2, SMAD6, SRC, SUFU, SYNGAP1, TAB1, TGFB1, WNT1, WNT6, WNT11, WNT10A, WNT10B, WNT2B, WNT3A, WNT5A, WNT5B, WNT7B, WNT9B

SALL3は、発生に重要な**WNT関連遺伝子**、**BMP関連遺伝子**のメチル化を制御する可能性が示された

WNT3A, WNT5Aのメチル化

WNT3A

メチル化アレイ

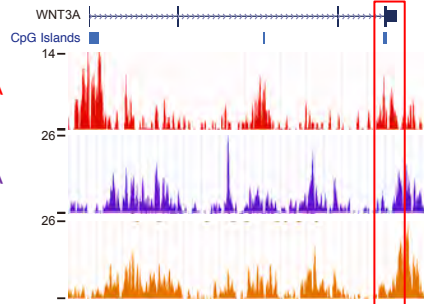


ChIP-Seq

253G1 Control shRNA
anti-SALL3

253G1 Control shRNA
anti-DNMT3B

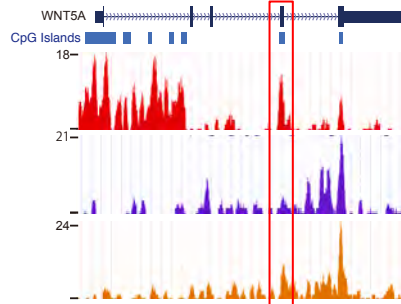
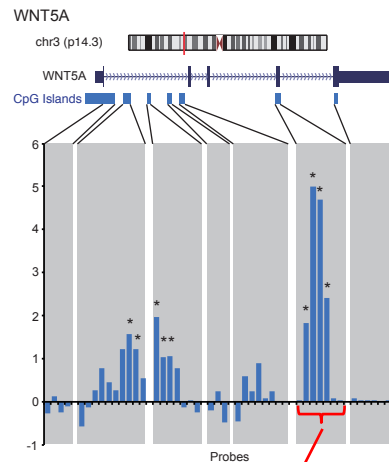
253G1 SALL3 KD
anti-DNMT3B



WNT5A

WNT5A

WT株に比べて、
SALL3 KD株では
WNT3A, WNT5Aの
Gene bodyメチル化
が有意に上昇してい
る

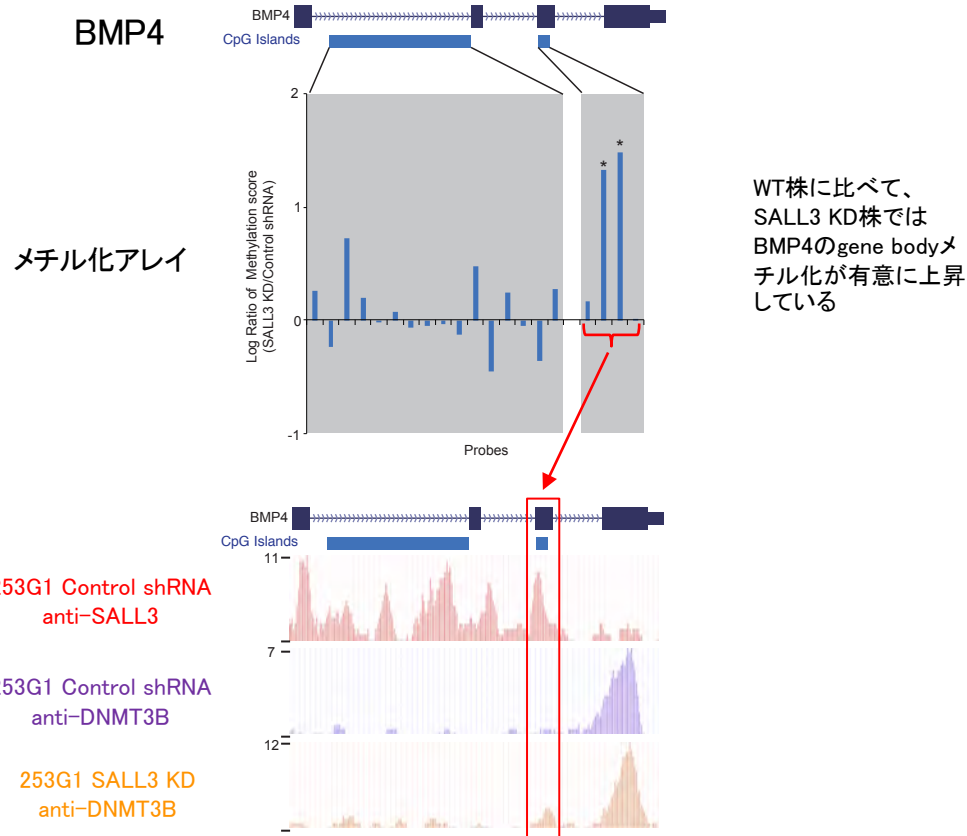


SALL3はCpG island
に結合する

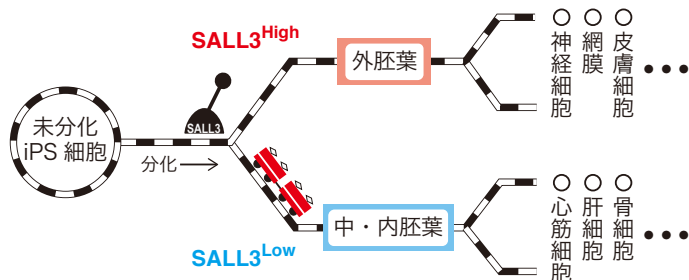
DNMT3Bの結合部位は
SALL3と一部重複する

SALL3のKDにより
DNMT3Bの結合量が上
昇した部分とメチル化が
上昇した部分は一部一
致する

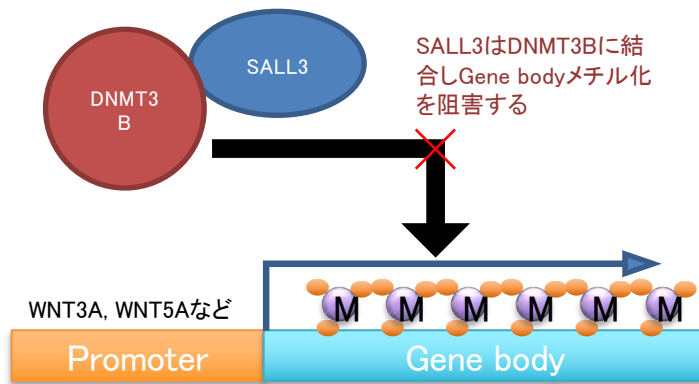
BMP4のメチル化



まとめ



SALL3は分化傾向を調節する分岐器(ポイント)の機能を持つ。



SALL3はDNMT3BのGene bodyメチル化を阻害している。

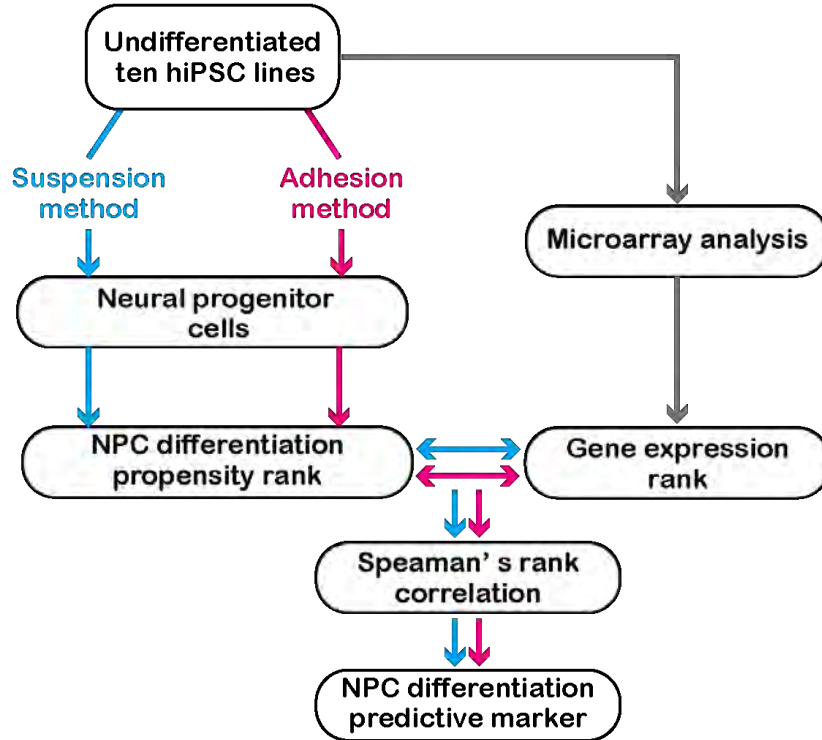
scientific reports



OPEN ***ROR2* expression predicts human induced pluripotent stem cell differentiation into neural stem/progenitor cells and GABAergic neurons**

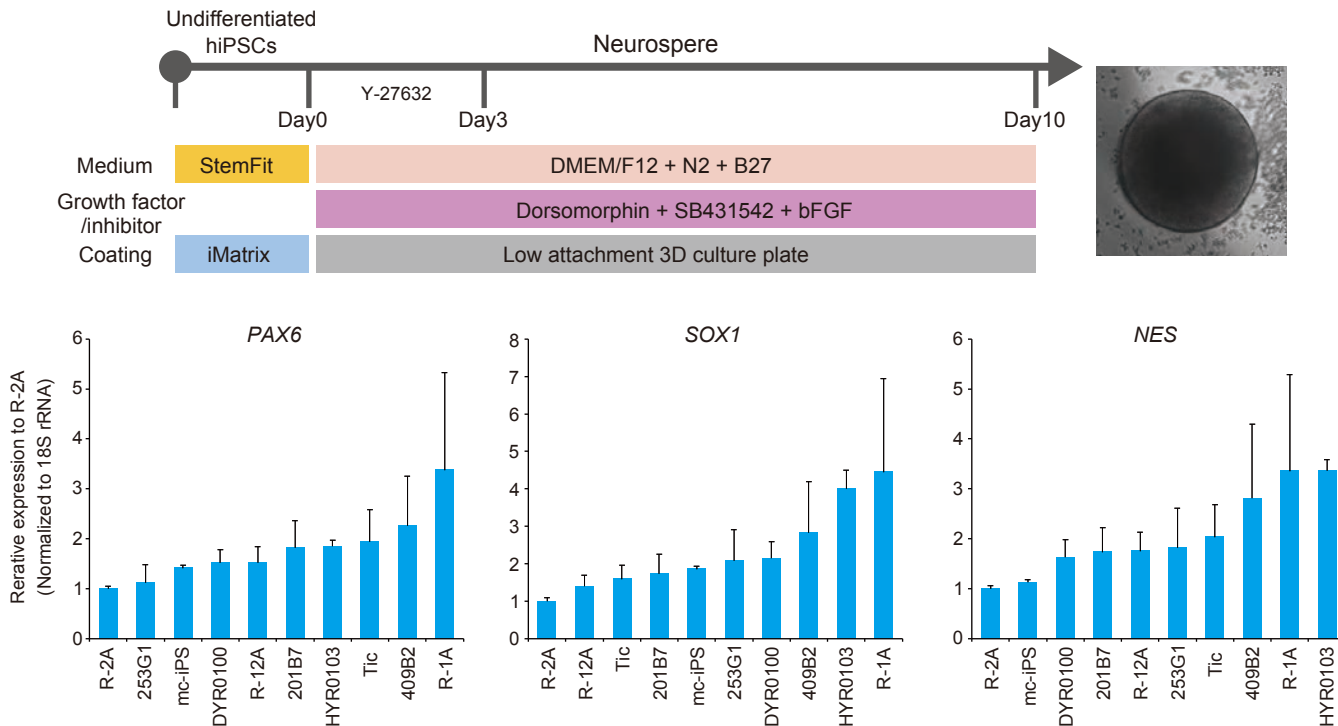
Takuya Kuroda^{1,2}, Satoshi Yasuda^{1,2,3}, Satoko Matsuyama^{1,4}, Takumi Miura^{1,2,5}, Rumi Sawada¹, Akifumi Matsuyama⁴, Yumiko Yamamoto⁶, Masaki Suimye Morioka⁶, Hideya Kawaji^{6,7}, Takeya Kasukawa⁶, Masayoshi Itoh⁶, Hidenori Akutsu⁵, Jun Kawai^{2,6} & Yoji Sato^{1,2,3,8,9}✉

NPC分化予測マーカーの探索方法



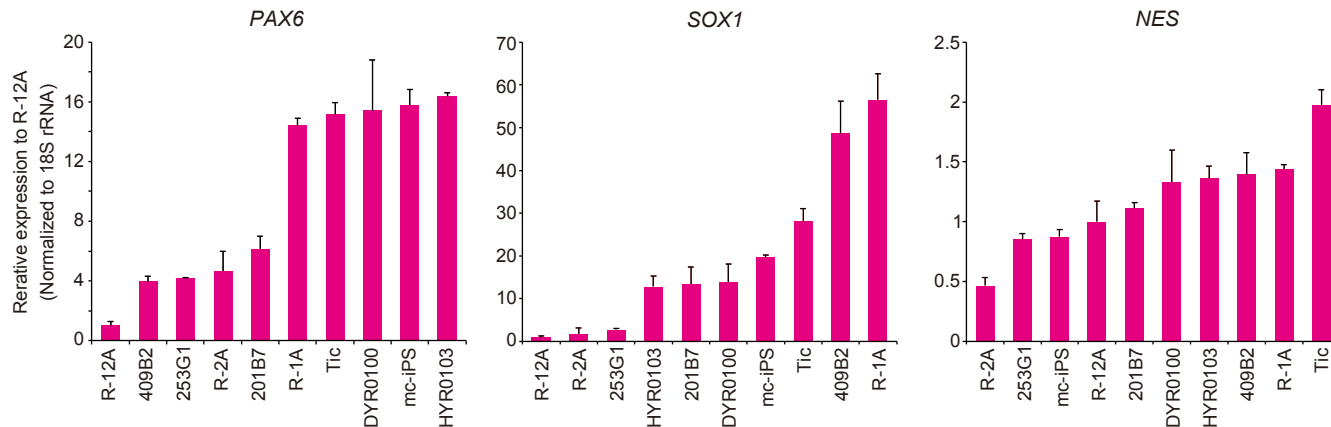
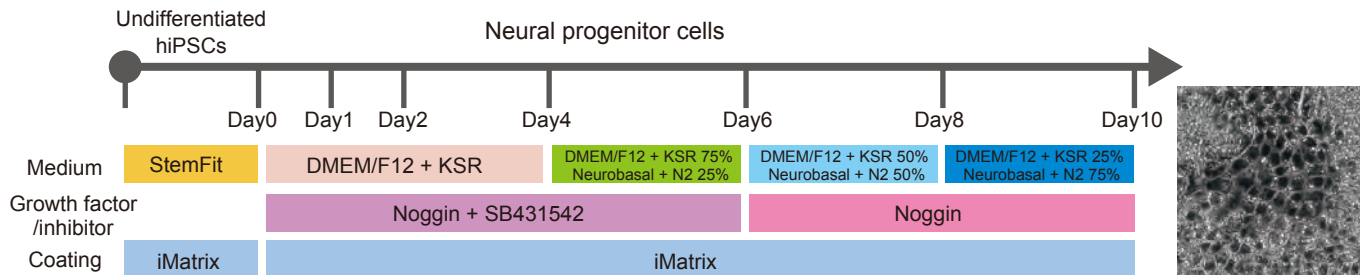
神経前駆細胞(NPC)への分化誘導は浮遊培養法と接着培養法の2種類で行い、両方の分化方法で共通して相関のある遺伝子を選択することによりNPC分化予測マーカーを同定した。

10株のhiPSC細胞株のNPC分化誘導（浮遊培養法）



分化しやすさ = PAX6, SOX1, NESの発現量を元に評価

10株のhiPSC細胞株のNPC分化誘導 (接着培養法)



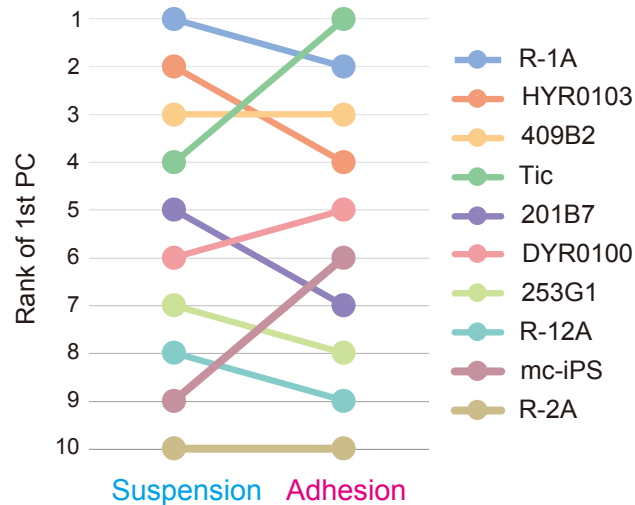
分化しやすさ = PAX6, SOX1, NESの発現量を元に評価

NPCへの分化傾向の順位付け

第一主成分得点 (PC1)

		Diffrentiation	
		Suspension	Adhesion
Cell line	R-1A	3.33	1.88
	HYR0103	1.85	0.64
	409B2	1.19	0.68
	Tic	-0.26	1.92
	201B7	-0.50	-0.59
	DYR0100	-0.60	0.54
	253G1	-0.83	-1.47
	R-12A	-0.91	-1.58
	mc-iPS	-1.19	0.05
	R-2A	-2.07	-2.06

PC1順位 → 分化傾向の順位

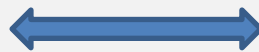


PAX6, SOX1, NESの遺伝子発現を主成分分析(PCA)を行い第一主成分得点(PC1)を算出し、PC1の高い株をNPC分化傾向の高い株と定義した。

NPCへの分化予測マーカー候補遺伝子の同定

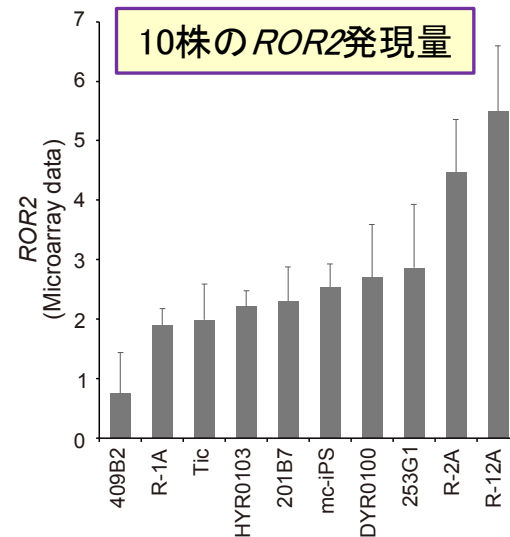
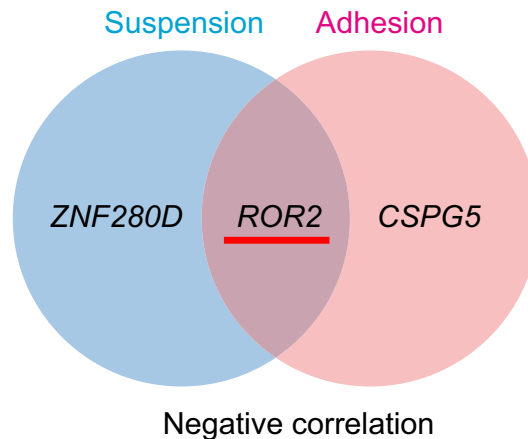
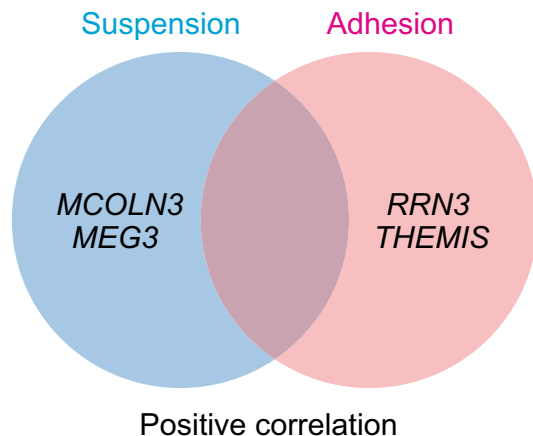
分化傾向と相関のある遺伝子の同定

分化傾向の順位



未分化状態の
遺伝子発現プロファイル
(マイクロアレイ)

スピアマンの順位相関

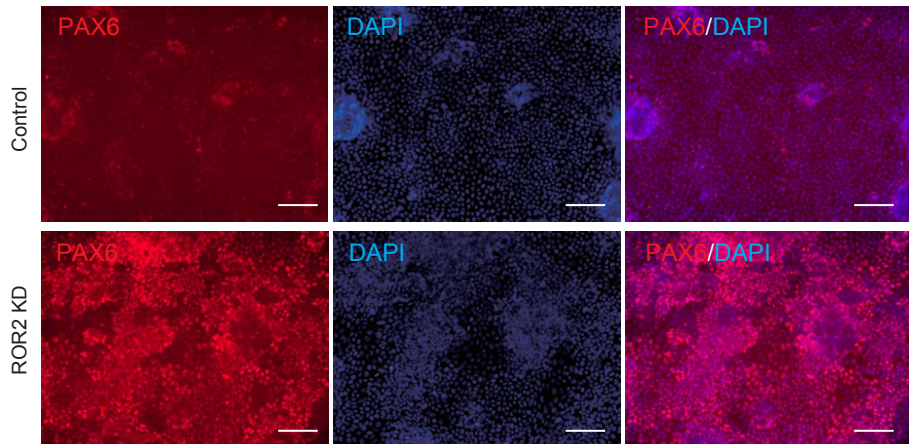
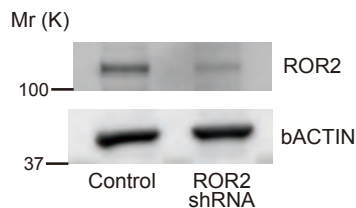


ROR2の発現抑制はNPCへの分化を促進する

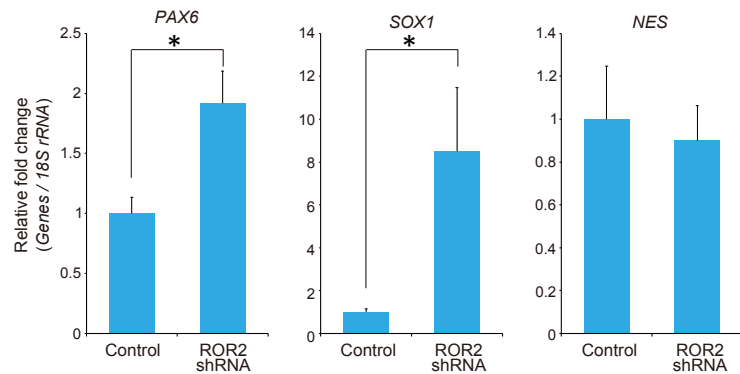
ROR2

受容体型チロシンキナーゼ。
Wnt5a/Ca²⁺シグナル伝達に重要な役割を果たすWnt受容体であると報告されている。

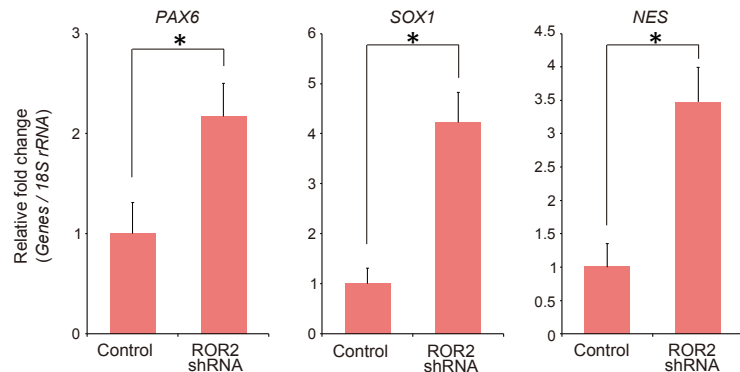
ROR2 Knock-down株の
作製(親株: R-2A株)



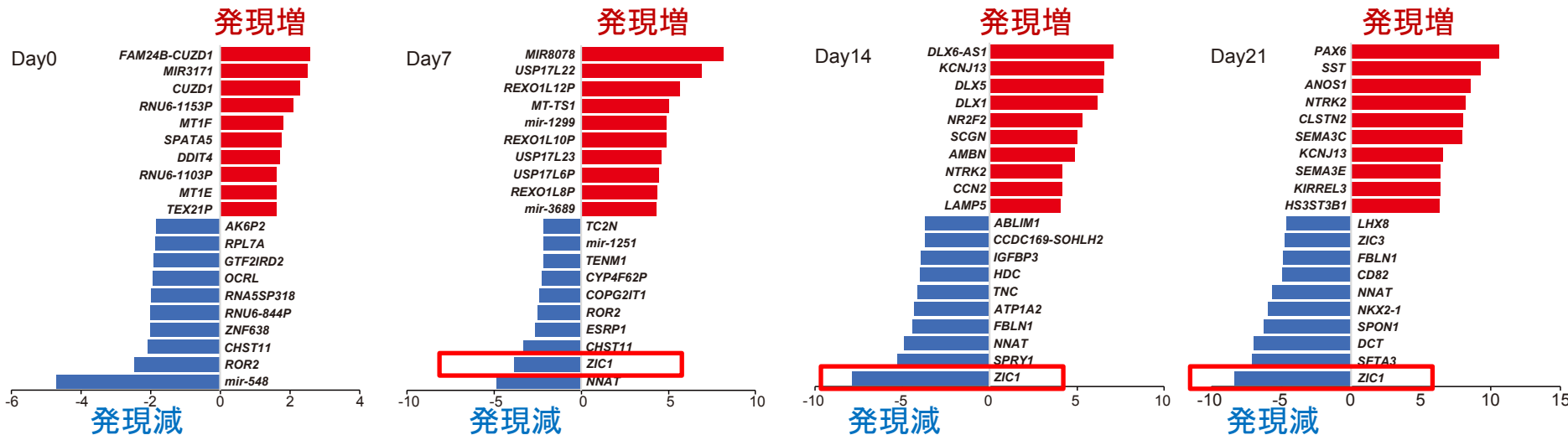
浮遊培養



接着培養



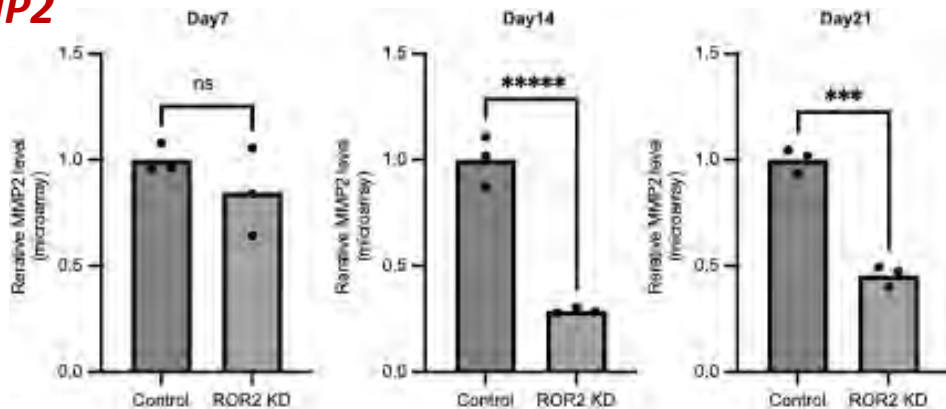
ROR2KD細胞のNPC分化過程における経時的・網羅的遺伝子発現解析



ROR2ノックダウン細胞では、神経堤 (neural crest) の分化に重要な転写因子である **ZIC1** が著しく抑制されていた

ROR2は分化過程における上皮間葉転換(EMT)に機能的に寄与する

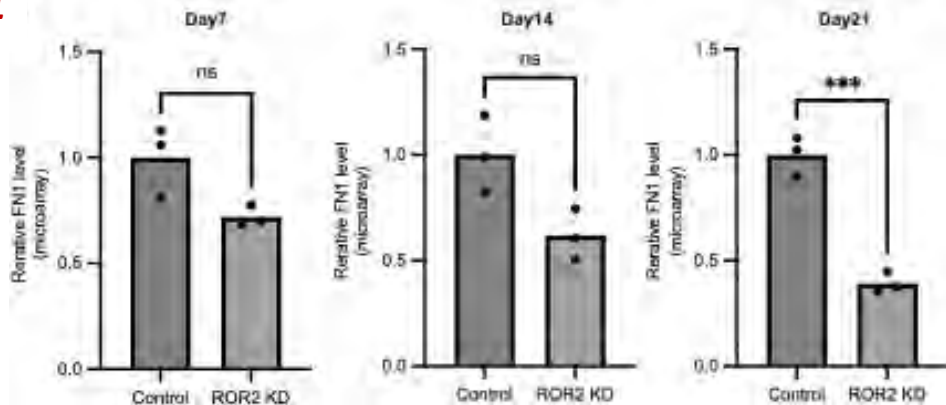
MMP2



- EMTは神経堤の形成において重要な役割を果たすことが報告されている。

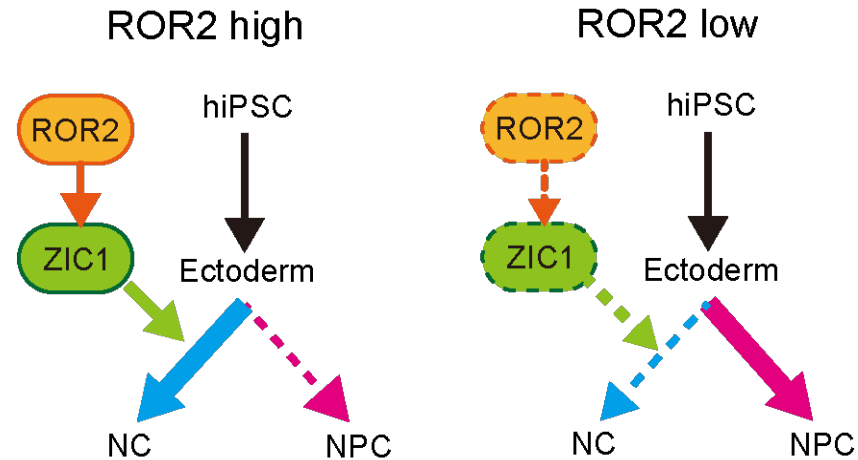
- *ROR2* ノックダウン株のNPC分化において、EMT関連遺伝子であるMMP2とFN1遺伝子の発現が抑制された。

FN1



まとめ

- 2種類のNPC分化誘導法で共通して有意な負相関を示す遺伝子としてNPC分化予測マーカーROR2を同定した。
- ROR2をノックダウンすると、NPC分化が促進されることから、ROR2は機能的にNPC分化に関与し、汎用性が高いマーカーであることが示唆された。
- ROR2ノックダウン株では、NPC分化過程において神経堤（NC）の分化に重要なZIC1の発現が、著しく抑制されていた。
- ROR2は分化過程における上皮間葉転換（EMT）を制御することにより、iPS細胞からNPCへの分化に影響を及ぼすことが示唆された。



謝辞(敬称略)

国立医薬品食品衛生研究所

佐藤 陽治
黒田 拓也
松山 さと子
三浦 巧
澤田 留美
河野 健
草川 森士
田埜 慶子
平井 孝昌

大阪はびきの医療センター

松山 晃文

理化学研究所

森岡 勝樹
粕川 雄也
山本 由美子
伊藤 昌可

東京都医学総合研究所

川路 英哉

神奈川県立産業技術総合研究所

河合 純

国立成育医療研究センター

阿久津 英憲

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(FIRM- CoNCEPT)

渡辺 武志

HESI CT-TRACS Tumorigenicity WG

Connie L. Chen
Louise Delsing
Mick Fellows
Gabor Foldes
Lucilia Mouries

Contact Information



もしご質問がありましたら、こちらまでご連絡ください。

安田 智

国立医薬品食品衛生研究所

再生・細胞医療製品部

E-mail: yasuda@nihs.go.jp