



平成28年9月26日・30日

第22回GLP研修会

再生医療等製品の造腫瘍性関連試験法

国立医薬品食品衛生研究所
再生・細胞医療製品部

安田 智(東京会場), 佐藤 陽治(大阪会場)

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必ずしもありません

「レギュラトリーサイエンス」

『科学技術の成果を人と社会に役立てることを目的に、
根拠に基づいた確かな予測、評価、判断を行い、
科学技術の成果を人と社会との調和の上で
最も望ましい姿に調整するための科学』

—第4期 科学技術基本計画(平成23年8月19日, 閣議決定)—

Regulatory Scienceが必要な主な理由の一つ

- 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
 - ⇒新しいタイプの製品が登場しても、その安全性・有効性・品質を評価する方法がない
(例:再生医療、遺伝子治療、核酸医薬)
- 技術の進歩により新しいタイプの分析ツールが開発されても、医薬品の評価法として使えるのかがわからない
 - ⇒新しいタイプの分析ツールを医薬品評価に用いた時の能力と限界がわからない
(例:次世代シーケンサー、デジタルPCR)

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

レギュラトリーサイエンスにおける 試験法・評価法の一般的な留意点

- 信頼性
 - 感度・検出限界
 - 特異性・精度など

⇒ 試験結果の解釈に不可欠
「分析科学」の問題

- 有用性・必要性・実用性
 - 製品の品質や臨床上の物事の判別に使用できるか
 - 判別自体が製品製造・臨床適用における意思決定の科学的根拠として必要か
 - コスト(費用・時間)との兼ね合い

⇒ 試験・評価を行う目的から科学的に合理性を考える

再生医療等製品(特に細胞加工製品)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. 臨床試験のデザインと解釈
13. 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

前臨床段階での
安全性・有効性の予測

臨床評価の
あり方

造腫瘍性試験の国際ガイドライン



- World Health Organization. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks.
WHO technical report series, No 978 Annex 3
(Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, No. 878)
http://www.who.int/biologicals/vaccines/TRS_978_Annex_3.pdf

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

WHO TRS 978の造腫瘍性試験



適用対象

▶ 生物製剤製造用の動物細胞基材

- セル・バンク: 製品製造終了時(終了後)の細胞,
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
- 細胞種: 二倍体細胞株、幹細胞株、連続継代性細胞株

「患者に直接移植する」または「細胞・組織利用製品の原料となる」
動物由来の生細胞は対象外

WHO TRS 978での造腫瘍性試験の目的



- 生物薬品用細胞基材となるセルバンクの造腫瘍性の程度又は有無を正確に把握すること

「造腫瘍性の程度的大幅な変化又はその有無に変化が生じた」



「細胞特性に何らかの異常が起こった」

- 既知／未知のウイルス感染、変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発がん遺伝子活性化etc.・・・原因が何であれ、
- セルバンクの**安定性上の異常発生を検出するための方策として、**
- 造腫瘍性を細胞特性指標の一つとして評価し、**品質管理に活用**

細胞加工物の造腫瘍性試験

<目的別に3種類ありうる>

①原料等となる細胞基材(例: ES/iPS細胞など)の品質管理のための試験

⇒WHO TRS 978適用可能

②中間製品／最終製品の品質管理のための試験(不純物としての造腫瘍性細胞の検出)

③最終製品の非臨床安全性評価のための試験

最終製品
中間製品

Q1「目的外細胞として造腫瘍性細胞が含まれる？」

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

Q2「どのくらいのES/iPS細胞が残存しているのか？」

qRT-PCR、フローサイトメトリー、直接培養法

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

混在する形質転換細胞の検出法

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週間またはそれ以上
利点	<ul style="list-style-type: none"> 直接的 臨床適用相当部位の微小環境での造腫瘍性を評価可能 <p style="text-align: center;">↓</p> 非臨床安全性試験に適用可能	<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"> 悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる 	<ul style="list-style-type: none"> 安価で簡便 良性も悪性も幅広く不死化細胞を検出
欠点	<ul style="list-style-type: none"> 費用と時間がかかる 専用動物施設が必要 良性不死化細胞検出不能 	<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 	<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 	<ul style="list-style-type: none"> 造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 (良性と悪性を区別できない)
LLOD または 検出力	hMSCに 1/1E+6(0.0001%) の割合で混入するHeLa細胞(10個)を検出可能	hMSCに 1/1E+3(0.1%) の割合で混入するHeLa細胞(計算上は0.02%)	hMSCに 1/1E+7(0.00001%) の割合で混入するHeLa細胞を検出可能	① hMSCに 1/1E+6(0.0001%) の割合で混入するHeLa細胞 ② 脂肪由来幹細胞に 1/1E+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

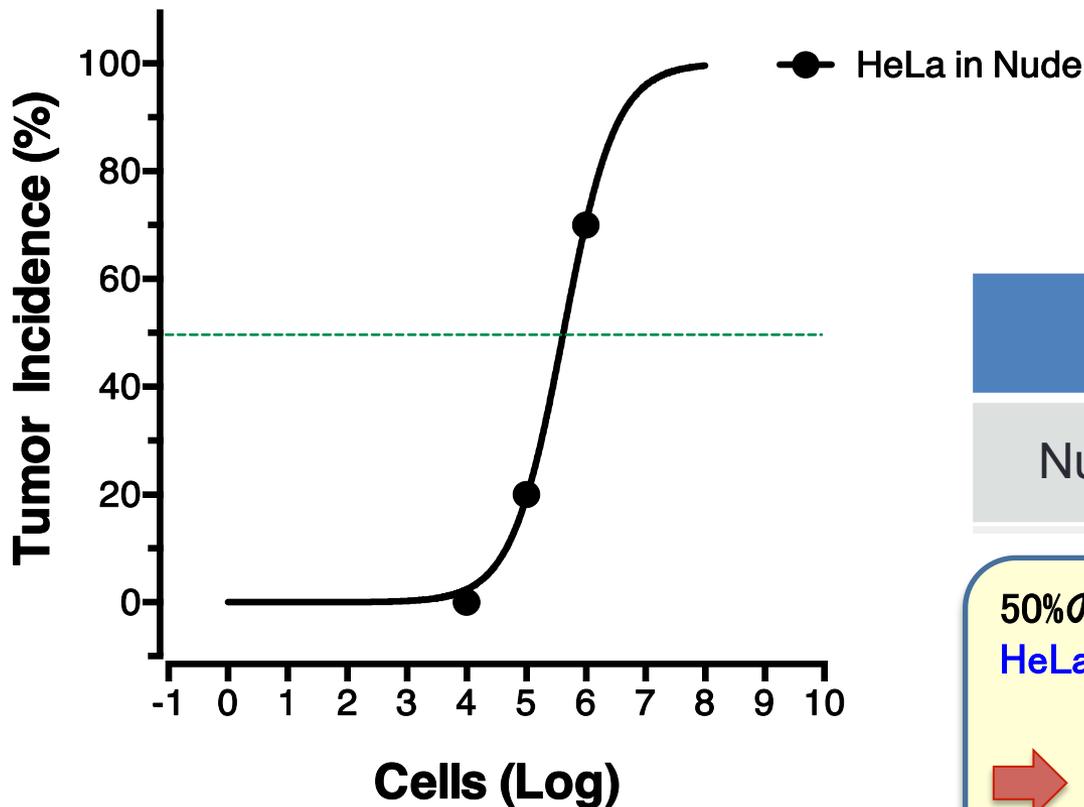
HeLa細胞単独皮下投与試験 (WHO TRS 978で推奨のヌードマウス試験の感度)

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
(*細胞加工物の品質・安全性評価は対象外)



Nodule Formation

16 weeks after Subcutaneous Administration



	TPD50
Nude	4.0×10^5

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

➔ 細胞加工物の品質・安全性評価
には十分な感度とは言えない

重度免疫不全マウスを用いた造腫瘍性試験系



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- \square 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

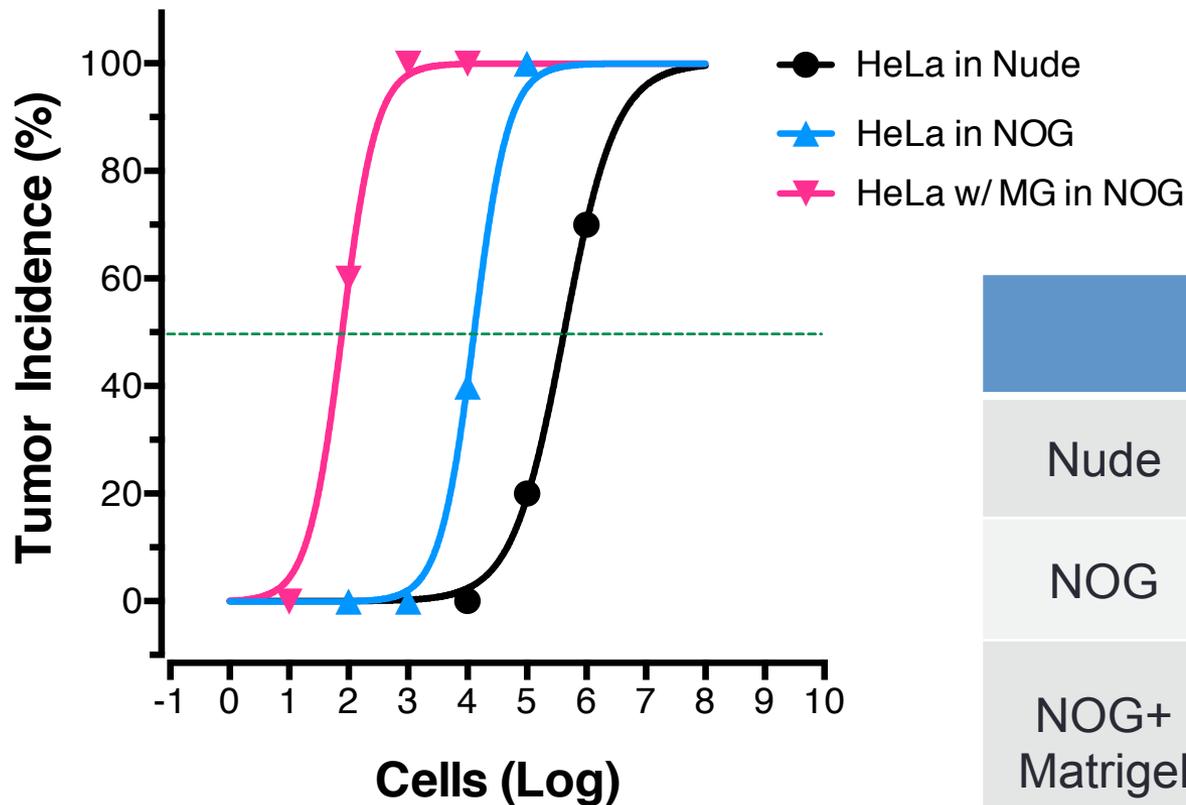
細胞・組織加工製品の造腫瘍性の定量化の方策の検討／標準化が必要

検討課題： 検出限界／感度／精度の分析的検討、陽性・陰性コントロールの在り方、投与細胞数、投与経路、投与方法、観察期間、ノードマウスとの比較試験など

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	4.0×10^5	1
NOG	1.3×10^4	25
NOG+ Matrigel	7.9×10	5,000

in vivo検出法

正常細胞(ヒト間葉系幹細胞)に混入するHeLa細胞の検出

Kusakawa et al., *Regen Therapy* 2015;1:30-7.

Strain	Group	Tumor incidence at indicated HeLa cell dose at week 16					TPD ₅₀ at week16
		0	1×10	1×10 ²	1×10 ³	1×10 ⁴	
NOG	HeLa/hMSC (1×10 ⁶)	0/6	0/6	3/6	6/6	6/6	1.0×10 ²
NOG	HeLa/hMSC (1×10 ⁷)	0/6	1/6	2/6	-	(6/6) ^a	1.8×10 ²

a: Since not all animals inoculated with the highest dose (10²) have formed tumors, it was assumed that the tumor incidence of animals at an even higher dose step (a dummy set of data) would have been 100%.

∴ Not tested



マトリゲルとNOGマウスを用いた方法では、ヒト間葉系幹細胞中にof 1/10,000-1/50,000 または 1/1,000,000の割合で混入するHeLa細胞を、それぞれ50%および17%の確率で検出できる

例えば、1%の確率で偽陰性の判定をしてしまうことを許容した上で、HeLa細胞相当の造腫瘍性細胞が1/10⁶以上の割合で混入していないことを示すには、
[log0.01/log(1-0.17)=] 25匹に10⁷個ずつ投与し、1匹も腫瘍形成がないことを確認すればよい

ヒト細胞加工製品の造腫瘍性試験

<目的別に3種類ありうる>

①原料等となる細胞基材(例: ES/iPS細胞など)の品質管理のための試験

⇒WHO TRS 878適用可能

②中間製品／最終製品の品質管理のための試験(不純物としての造腫瘍性細胞の検出)

③最終製品の非臨床安全性評価のための試験

最終製品
中間製品

Q1「目的外細胞として造腫瘍性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

Q2「どのくらいのES/iPS細胞が残存しているのか？」

qRT-PCR、フローサイトメトリー、直接培養法

Q3「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか？」

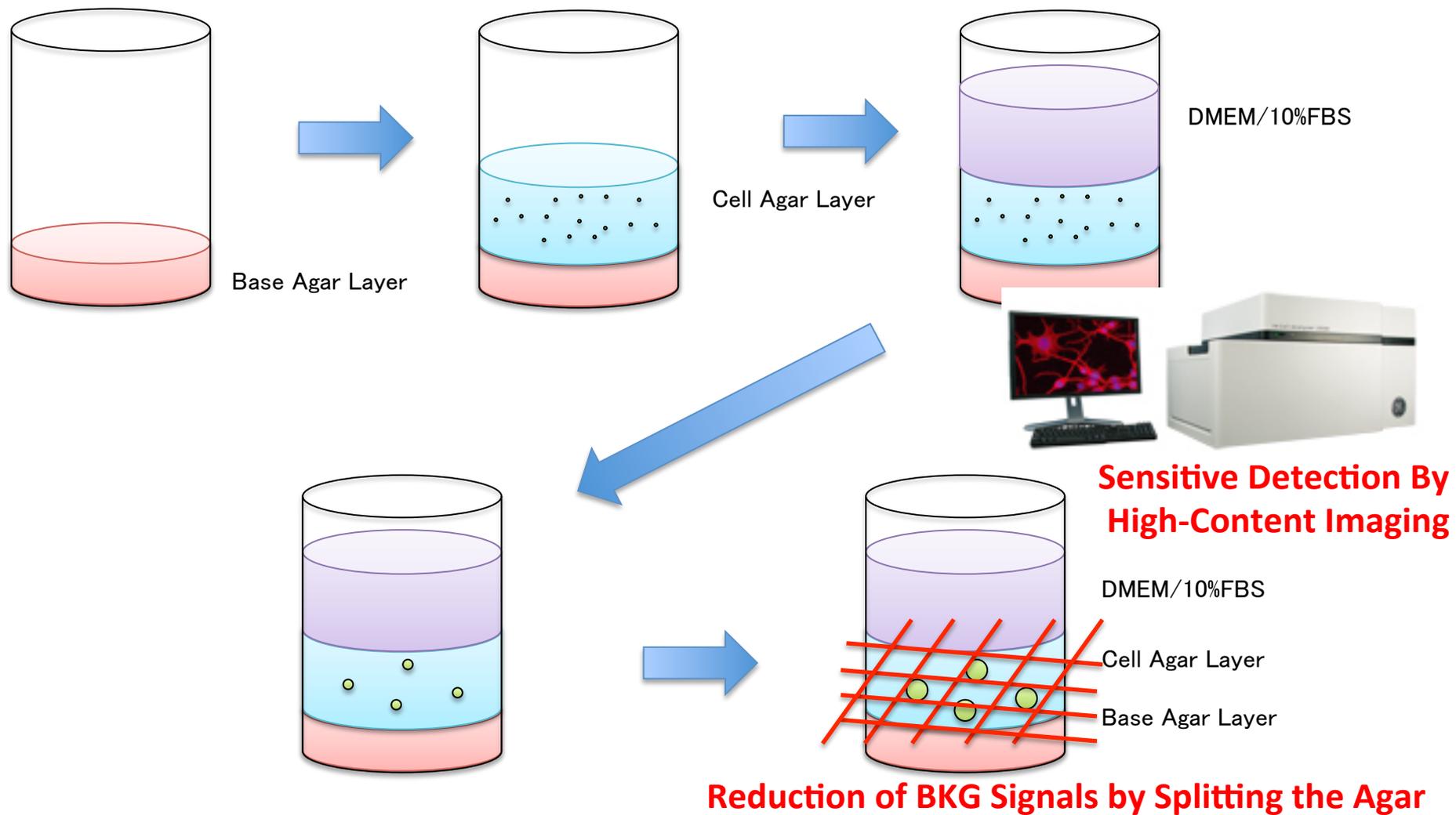
高感度in vivo試験

混在する形質転換細胞の検出法

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週間またはそれ以上
利点	<ul style="list-style-type: none"> 直接的 臨床適用相当部位の微小環境での造腫瘍性を評価可能 <p style="text-align: center;">↓</p> 非臨床安全性試験に適用可能	<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"> 悪性形質転換細胞を単離・特性解析できる 	<ul style="list-style-type: none"> 安価で簡便 良性も悪性も幅広く不死化細胞を検出
欠点	<ul style="list-style-type: none"> 費用と時間がかかる 専用動物施設が必要 良性不死化細胞検出不能 	<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 	<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 	<ul style="list-style-type: none"> 造腫瘍性細胞の有無は間接的に判断 (良性と悪性を区別できない)
LLOD または 検出力	hMSCに 1/1E+6(0.0001%) の割合で混入するHeLa細胞(10個)を検出可能	hMSCに 1/1E+3(0.1%) の割合で混入するHeLa細胞(計算上は0.02%)	hMSCに 1/1E+7(0.00001%) の割合で混入するHeLa細胞を検出可能	◎ hMSC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	◎ Kono <i>et al.</i> , <i>Biologicals.</i> 2015 ◎ Hasebe-Takada <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2016

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



in vitro検出法

軟寒天コロニー形成試験を応用した 正常細胞集団中に混入する悪性形質転換細胞の超高感度検出法

単一造腫瘍性細胞のデジタル計数法(デジタル軟寒天コロニー形成試験)

細胞試料を複数画分に分割

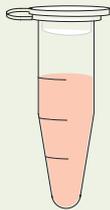


悪性形質転換細胞が1つのウェルあたり1個以下となるように濃度調整して軟寒天培養



各画分におけるコロニーの有無を解析し、コロニーを含む画分数及び
単一悪性形質転換細胞のコロニー形成率から混入細胞数を推定する

多量の細胞からなる試料



複数画分へ分割して培養



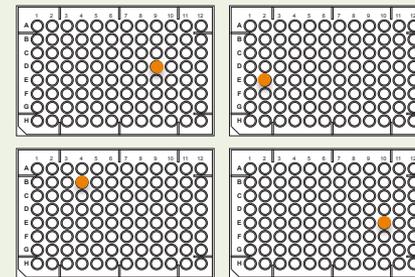
※画像はイメージです



コロニーの有無をハイスループットに解析



コロニーを含む画分数から混入量を推定



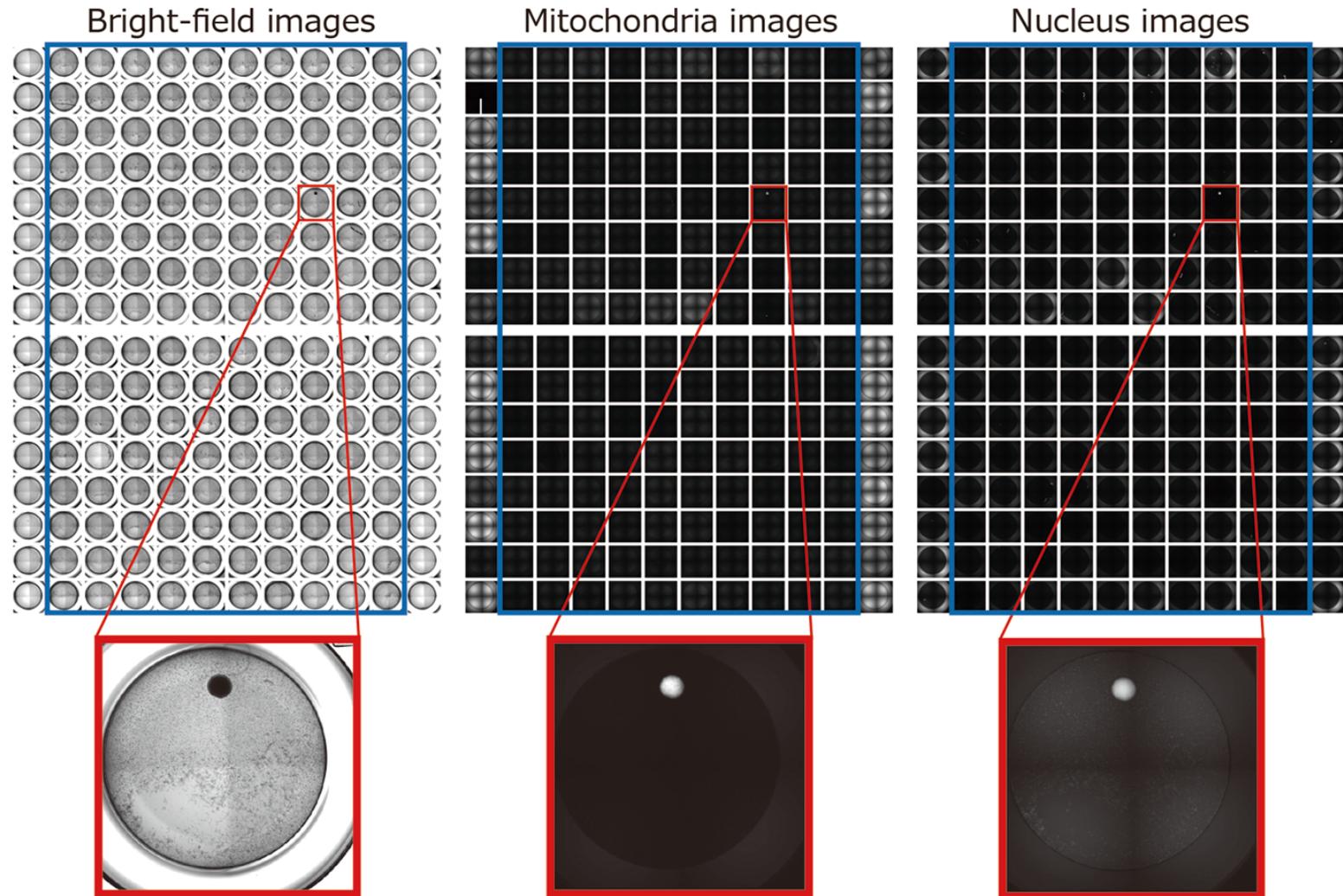
● positive well

・HeLa細胞レベルの悪性形質転換細胞の場合、~1千万分の1の割合での混入細胞を検出することが可能

・細胞試料を分画及び播種するウェル数、プレート数を増やすことにより、適宜、検出感度を向上させることができる

High-throughput imaging with the *IN Cell Analyzer 2000*

Cell preparation : HeLa 1 / MSC 10,000,000 → 160wells (HeLa 0.0125 / MSC 62,500 / well)



Colonies derived from 0.00001% (1/10,000,000) HeLa cells in hMSCs are detectable.

試料に悪性形質転換細胞が陽性対照同様に混入するとした場合の結果の解釈

HeLa 1 cell / MSC 10,000,000 cells (HeLa 0.00001%混入) を160ウェルに分割して培養 6サンプル実施

No. of colonies per well	Samples (HeLa 1 cell in 10,000,000 MSCs, n=6)						Average	Probability distribution of the number of wells
	1	2	3	4	5	6		
0	159	160	159	159	160	159	159.3	0.9956
1	1	0	1	1	0	1	0.7	0.0044

デジタル軟寒天コロニー形成試験では、ヒト間葉系幹細胞中に $1/10^7$ の割合で混入するHeLa細胞由来のコロニーを、低い確率ではあるが、検出することが可能

「陽性対照同様に悪性細胞を含む細胞製品の細胞を分散し、陽性対照同様にウェルに播種した後、ある一つのウェルを測定した結果、コロニーが認められない」という確率から(ここでは**0.9956**)、**160**ウェルを測定しても全くコロニーが検出されない確率(=混入を検出し損なう確率) x が導かれる(ここでは $x=0.9956^{160}=0.4938$)

また、 n 回の試行の全てにおいて、コロニーが検出されない確率(=混入を検出し損なう確率) y は

$$y = \frac{1}{n} \text{と表される。ゆえに } n = \log y / \log x \text{と表せる。}$$

例えば、1%の確率で偽陰性になることを許容できるとすると、

$$\log(0.01)/\log(0.4937)=6.526 \text{であることから、}$$

HeLa細胞相当の造腫瘍性細胞が $1/10,000,000$ の割合で混入していないことを示すには、

「総数 10^7 個の細胞を2枚のプレート(160ウェル)に分注・播種し、コロニー形成を観察する」という作業を7回試行し、1個もコロニーが検出されないことが確認できればよい

ヒト細胞加工製品の造腫瘍性試験

<目的別に3種類ありうる>

①原料等となる細胞基材(例: ES/iPS細胞など)の品質管理のための試験

⇒WHO TRS 878適用可能

②中間製品／最終製品の品質管理のための試験(不純物としての造腫瘍性細胞の検出)

③最終製品の非臨床安全性評価のための試験

最終製品
中間製品

Q1「目的外細胞として造腫瘍性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

Q2「どのくらいのES/iPS細胞が残存しているのか？」

qRT-PCR、フローサイトメトリー、直接培養法

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

混在する未分化iPS/ES細胞の検出法

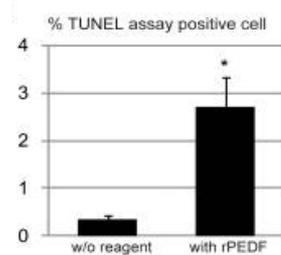
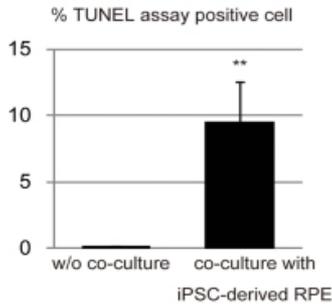
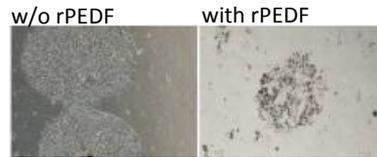
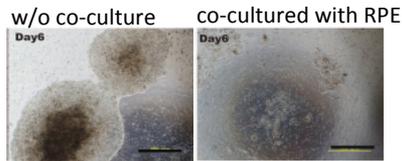
試験法	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験 (NOG x Matrigel, 皮下投与)	フローサイトメトリー	GlycoStem-HP法
目的	造腫瘍性細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化な多能性幹細胞の検出
所要時間	12-16週間	1日	3時間以下 (培養上清回収から測定まで)
利点	<ul style="list-style-type: none"> 直接的 微小環境での造腫瘍性を評価できる 	<ul style="list-style-type: none"> 短時間・簡便 個々の細胞を解析 	<ul style="list-style-type: none"> 非破壊的 簡便 高スループット
欠点・注意点	<ul style="list-style-type: none"> 費用と時間がかかる 専用動物施設が必要 臨床適用相当部位の微小環境での造腫瘍性を評価可能 ⇒非臨床安全性試験に応用可能 	<ul style="list-style-type: none"> 間接的 既知のマーカ分子を発現す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 個々の細胞でのマーカ分子発現レベルは評価できない 培地成分が結果に影響
LLOD または 検出力	hRPE2.5E+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:TRA-1-60)	HEK293T中の 0.05% 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	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"> 迅速 簡便 高感度 	<ul style="list-style-type: none"> 迅速 簡便 高感度 	<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・注意点	<ul style="list-style-type: none"> 間接的 個々の細胞でのマーカ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分子発現レベルは評価できない 	<ul style="list-style-type: none"> 時間がかかる スループットが低い
LLOD または 検出力	hRPE中の 0.002%以下 のiPS細胞 (マーカ:LIN28)	ヒト心筋細胞中の 0.001% のiPS細胞 (マーカ:LIN28)	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>PLoS ONE.</i> 2012	Kuroda <i>et al.</i> , <i>Regen Ther.</i> 2015	Tano <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE.</i> 2014

JST「健康研究成果の実用化加速のための研究・開発システム関連の隘路解消を支援するプログラム」 『多能性幹細胞由来移植細胞の安全性評価研究』（平成22-26年度）

先端医療振興財団との共同研究

Kanemura *et al. Sci Rep* 2013

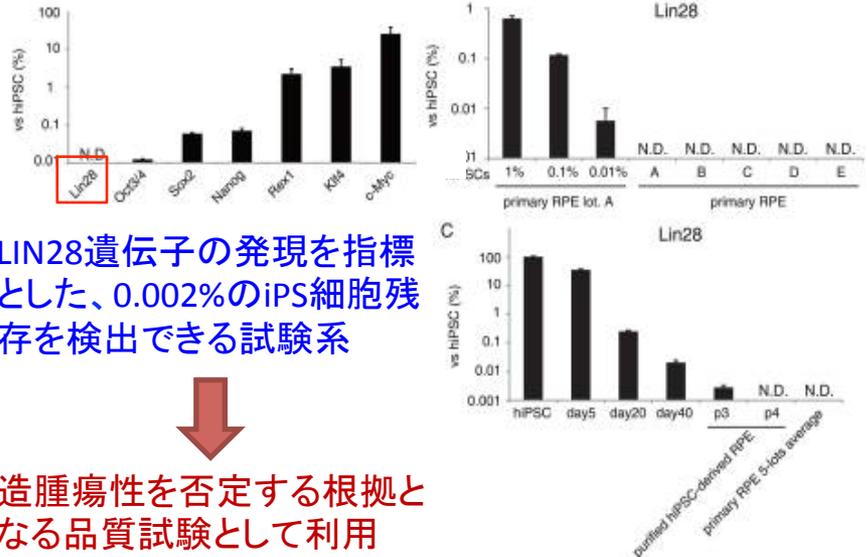


網膜色素上皮細胞はPEDF分泌を介して
iPS細胞の成長を阻害



*in vivo*試験プロトコルのデザインに活用
(網膜下でなく皮下投与の方が高感度)

Kuroda *et al. PLoS ONE* 2012



iPSから網膜細胞 世界初の移植手術実施 神戸

ツイート 48 | おすすめ 103 | 印刷



会見で笑顔を見せる高橋政代プロジェクトリーダー＝12日夜、神戸市中央区港島中町6（撮影・峰大二郎）

先端医療センター病院（神戸市中央区）と理化学研究所発生・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細胞）から網膜の細胞を作り、目の難病患者の網膜を再生させる臨床研究で、兵庫県内の70代女性に1例目の移植手術を実施した。iPS細胞から作った細胞が人の体に移植されるのは世界初。同病院は「患者の状態は安定し、成功と考えている」とし、今後は腫瘍がでないかなどの安全検証する。

神戸新聞
(2014/9/12)

臨床研究
視力が急激

ヒト細胞加工製品の造腫瘍性試験

<目的別に3種類ありうる>

①原料等となる細胞基材(例: ES/iPS細胞など)の品質管理のための試験

⇒WHO TRS 878適用可能

②中間製品／最終製品の品質管理のための試験(不純物としての造腫瘍性細胞の検出)

③最終製品の非臨床安全性評価のための試験

最終製品

中間製品

Q1「目的外細胞として造腫瘍性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

Q2「どのくらいのES/iPS細胞が残存しているのか？」

qRT-PCR、フローサイトメリー、直接培養法

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

In vivo造腫瘍性試験による非臨床安全性評価における留意点

<試験デザイン>

- 動物モデルの特性
 - 免疫抑制状態
 - 検出限界
 - 結果の精度
 - 陽性 (& 陰性) 対照細胞
- 試験プロトコル
 - 観察期間
 - 投与部位・投与経路
(微小環境の影響)
- 細胞の体内分布
 - 移植細胞の残存期間
 - 移植細胞の遊走

<対象製品>

- 製品の特性
 - 同一性
 - 純度
 - 細胞生存率
 - 剤形
 - 非細胞成分

<対象患者>

- 対象患者集団
 - 自己、同種、異種
 - 免疫状態
 - 病態
 - 標的器官・組織のサイズ
 - 投与部位・投与経路
 - 期待される細胞残存期間

製品の投与部位・投与経路

Bailey AM (CBER/FDA) *Sci Transl Med* 2012: 4:147fs28

“..., an animal study that evaluates a route of product administration that is different from what is proposed clinically may not adequately account for the influence of the local host microenvironment, which could affect the product’s ability to form tumors. For instance, results generated from the subcutaneous implantation of a cell-based RM product may not accurately reflect the bioactivity of a product that is intended for intracranial implantation in humans”



臨床投与部位に相当する部位での細胞の挙動を評価

核型解析/Omics/NGSに関する議論

今月に入り、京都大学iPS細胞研究所が「iPS細胞ストック」の細胞を病気の治療用として外部機関に提供し始めた。これらのiPS細胞から作った網膜や神経の細胞は患者の体内に入るため、がんに関連した遺伝子の変異がないかなどを詳しく調べている。ただ、どこまで確認すれば安全なのかの判断はなかなか難しい。

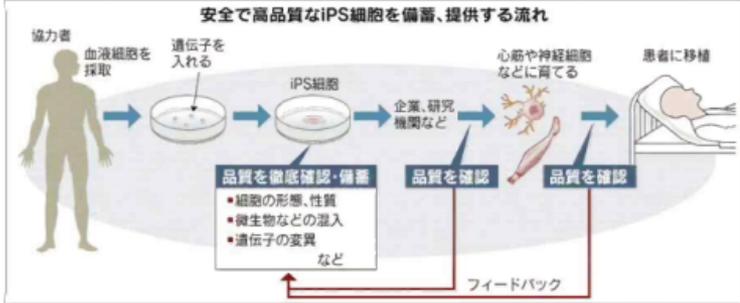
「ストック」とは備蓄や保管の意味で、高品質で安全な細胞をセブチマイナス196度の液体窒素で冷凍保存しておく。ただし、そんなことが必要なのか。iPS細胞は皮膚や血液の細胞に遺伝子を入れて作られ、いくらでも増やせて様々な細胞に育つ能力があると言われる。とはいえ、高品質な治療用細胞を得られるわけではない。

移植までに半年以上昨年、理化学研究所プロジェクトリーダーの高橋政代さんが世界で初めてiPS細胞を再生医療に使った目の難病治療の臨床研究では、患者のiPS細胞を作るのに約4カ月かった。網膜の細胞に育て、移植用シートにするのにさらに半年を要した。費用は5000万円を越えた。

これほど時間やコストがかかることは治療の普及は望めない。たとえば、交通事故などで骨髄損傷になった人にiPS細胞から作った神経細胞を移植する場合、治療効果が高いとされる事故後、2〜4週間に細胞の準備が間に合わない。

そこで、京大教授でiPS細胞

治療用、外部機関に提供開始



iPS備蓄 安全性は



脳研究所の所長を務める山伸弥さんが中心となり、あらかじめiPS細胞を作っておくことにした。

他人のiPS細胞を使うと、免疫の働きで拒絶反応が起きる恐れがある。日本人の多くは共通する免疫タイプを持つ人を探してiPS細胞を作れば、この問題を解決できる。現状では備蓄してあるiPS細胞は日本人の17%に拒絶反応なしで使える。2017年度末までに15割をカバーできるようにする。

iPS細胞から作った治療用細胞は患者の体内に入れるので、医薬品並みの厳重な品質と安全性が求められる。京大は空気清浄機能を備えた専用の細胞調製施設で作製している。できたiPS細胞は、まず顕微鏡で確認する。様々な細胞に育つ能力をきちんと持つかは、特定の目印物質を通して検査する。

それでは、移植後のがんができるリスクなどはわからない。判断に役立つと注目されているのが遺伝子解析。細胞のゲノム(全遺伝情報)を臨床まで調べ、遺伝子を構成する塩基の配列のクセ(変異)や、細胞

がん化リスク、ゲノム解析／「どこまで確認」難しく

分裂の際に複製された遺伝子の誤り(変異)を抽出する。配列は同じでも化学的変化が起きてないかを見る「エピジェネティクス」解析も、がんとの関係が疑われるものは使わない。理研が臨床研究に使用したiPS細胞も、京大iPS細胞研究が徹底的にゲノム解析した。iPS細胞ストックの細胞もすべてゲノムを調べ、山伸弥さんが品質を最終判断するという。ただ、解析には高価な装置をフル稼働させなければならぬ。

さらに問題なのが、変異とがんとの関係が必ずしも明確ではない点だ。「健康な人でも年齢とともに多様な変異が蓄積されていく」(山中さん)。解析技術が進み精度が上がれば変異も見つかりやすくなり、がんとの関係のないのが原因に使えないと判断してしまう可能性がある。

iPS細胞に気になる遺伝子変異が見つかっても、治療に必要な細胞を作る過程で性質の変化や変異が起きうる。高橋さんは「遺伝子がこうだから大丈夫、という手紙ではかえって危険だ」と指摘する。動物実験などを繰り返し、がんがでないのを確認する、とこそ大切だとも。

リスク情報で選択を

安全性と原価の問題は文部科学省の作業部会でも検討中だ。自治医科大学の水井良三さんは8月上旬の作業部会で「iPS細胞はほかの細胞に比べ性質にはばらつきがある。ゲノムデータをもっと検討すべき」と強調した。「iPS細胞だから変異が起きやすい」というのは間違っていると山中さんと、動物実験に重きを置く高橋さんと意見が食い違った。

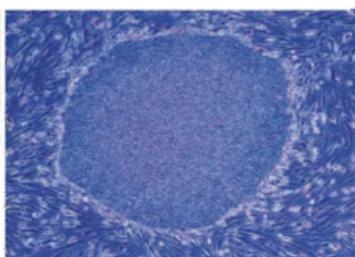
iPS細胞ストックは様々な病気の治療への利用を想定しており、すべてに安全に使えると証明するのは難しい。治療成績にまで責任を負うと、身動きがとれなくなってしまう。国立医薬品食品衛生研究所部長の佐藤陽治さんは「どの細胞株にも変異があるのがリスク要因を示し、その情報をもとにユーザーが自らの責任で目的に合った最適な細胞を選ぶのが現実的」と話す。編集委員 安藤淳

遺伝子変異

遺伝子は塩基という物質の配列(塩基配列)で構成され、生命の営みに必要なタンパク質を作り出す。配列の異常や、特定の遺伝子が多すぎるといった単的な異常を変異と呼び、ゲノム(遺伝情報)の不安定性をさすられる。健康な人でも細胞分裂を繰り返すとともに変異が蓄積される。がんにも様々な変異が関与し、代表的なものだけで200以上知られるが、複数の組み合わせで発症し環境要因も絡むと複雑だ。iPS細胞や移植する細胞の品質評価の際に、がんのリスクを判断するために変異を確認するが、どこから先が安全かという線引きは難しい。



「ストック」からの細胞提供を始めた京大iPS細胞研究所(写真左) 山中教授が作製したiPS細胞



Regulatory Scienceが必要な主な理由の一つ

- 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
 - ⇒ 新しいタイプの製品が登場しても、その安全性・有効性・品質を評価する方法がない
(例: 再生医療、遺伝子治療、核酸医薬)
- 技術の進歩により新しいタイプの分析ツールが開発されても、医薬品の評価法として使えるのかどうかがわからない
 - ⇒ 新しいタイプの分析ツールを医薬品評価に用いた時の能力と限界がわからない
(例: 次世代シーケンサー、デジタルPCR)

次世代シーケンサーは確かに“State-of-the-Art Tool” (先端技術) であるが、はたして“Best Science”なのか？

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

NGS情報の現時点での位置づけ

厚労省医政研発0613第3号(平成28年6月13日)より抜粋

- ヒト細胞では培養により核型変化などの遺伝子変異が生じることが知られている。核型が安定しているヒト二倍体線維芽細胞でさえも一塩基遺伝子多型(SNP)アレイによる解析では若干の変異を示し、また非二倍体の核型が、明らかな正常組織においても時々観察されることがある。in vitro で観察される核型異常細胞やその他の遺伝子変異を持つ細胞の安全性に関しては、世界的にもまだ結論は出ていない。遺伝的安定性のベースラインとなる遺伝子情報は、細胞種や培養方法によって異なる。継代培養において遺伝子複製の絶対的安定性を示す細胞はない。したがって、潜在的ハザードである遺伝的不安定性を最小限にするため培養期間及び継代回数を制限し、培養条件の方法や変更の影響に対するリスク評価を行うべきである。
- 次世代シーケンサー等の先端技術によるゲノム情報・エピゲノム情報については、遺伝子変化(変異のタイプとそのアレル頻度)に対する検出感度と適切なコントロールの入手可能性を今後の課題として検討しつつ、造腫瘍性との関連性について科学的検証を進め、試験法として利用することの妥当性を評価すべきである。
- なお、特定細胞加工物の造腫瘍性等の安全性との関連性が科学的に明らかになった変異に関しては、例えば、
 - ① 超長期培養後、既知の腫瘍関連SNV/Indel やCNVを検出するための検査
 - ② 超長期培養後、既知の腫瘍関連エピゲノム変化を検出するための検査
 - ③ 対象疾患との関連性又は特定細胞加工物中の分化細胞の機能異常との相関が既知の遺伝子変異を検出するための検査といった検査を実施することにより、特定細胞加工物の安全性向上が期待される。
- ただし、特に多能性幹細胞由来特定細胞加工物については、新規性が極めて高くリスク予測が困難なため、安全性確保のための議論の参考情報(reassuranceのための補完情報)として、腫瘍発生その他の有害事象との関連性が既知の遺伝子変異について、あらかじめ確認しておくことが望ましい。すなわち、低アレル頻度遺伝子変異の分析学的検出限界など、試験法の性能を明らかにした上で、上記①～③を確認することが望ましい。①～③の変異が検出された場合の多能性幹細胞由来特定細胞加工物の臨床投与の判断については、患者の重篤度、治療の緊急性等を踏まえて判断する。

造腫瘍性評価に関するまとめ

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

Contact Information



安田 智 (東京会場)

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 第3室 室長

E-mail: yasuda@nihs.go.jp

佐藤 陽治 (大阪会場)

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長

E-mail: yoji@nihs.go.jp

「多能性幹細胞安全情報サイト」<http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec2/sispsc/html/index.html>

