



令和4年3月1日
Web開催

第13回JBFシンポジウム
細胞・遺伝子治療製品開発におけるバイオアナリシスの貢献

**MEASURE: 細胞加工製品の造腫瘍性関連試験の開発と
コンセンサス形成のための官民コンソーシアム**

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

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公式な見解では必ずしもありません。

再生医療等製品(細胞加工製品)の実用化における主な科学的課題 何を評価すべきなのか？

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

細胞加工製品の品質・非臨床安全性に関する日米欧の主なガイドライン

EMA



- Guideline on human cell-based medicinal products (EMA/CHMP/410869/2006)
- Reflection paper

FDA



- FDA-CTGTAC Considerations
- Guidance for industry on human embryonic stem cell-derived products (hESCs)- products (FDA 2013)

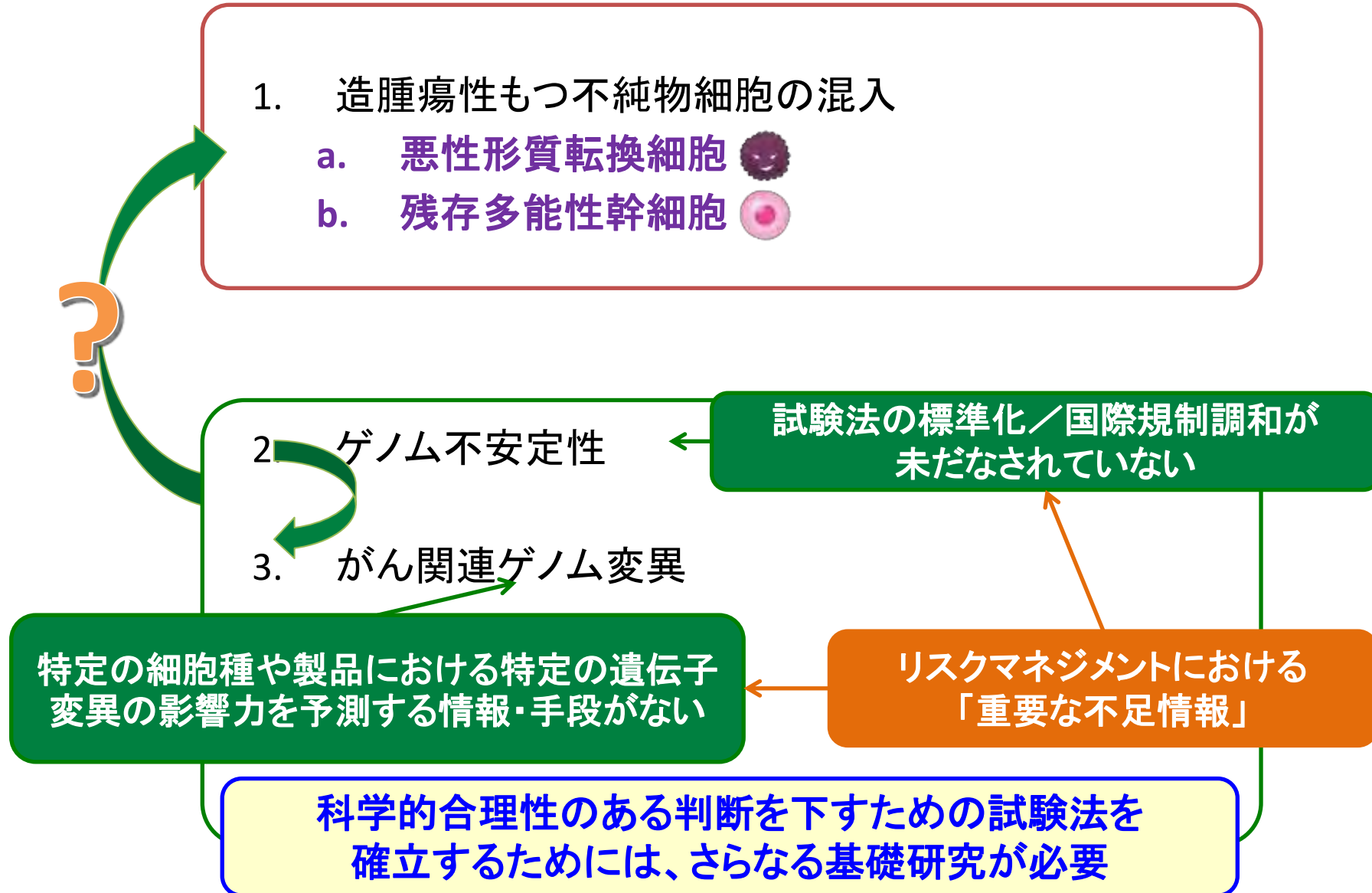
MHLW



- ヒト(自己)由来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 (薬食発第0208003号別添2008年2月8日)
- ヒト(同種)由来細胞や組織を加工した医薬品又は医療機器の品質及び安全性の確保に関する指針 (薬食発第0912006号別添2008年9月12日)
- 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 (薬食発0907第2号別添2012年9月7日)
- ヒト(同種)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 (薬食発0907第3号別添2012年9月7日)
- ヒト(自己)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 (薬食発0907第4号別添2012年9月7日)
- 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 (薬食発0907第5号別添2012年9月7日)
- ヒトES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 (薬食発0907第6号別添2012年9月7日)

造腫瘍性関連試験の
性能やプロトコールに関する
詳細な記載がない

細胞加工製品（多能性幹細胞加工製品）の腫瘍形成リスクに関する潜在的ハザード



細胞加工製品（多能性幹細胞加工製品）の腫瘍形成リスクに関する潜在的ハザード

1. 造腫瘍性もつ不純物細胞の混入

- a. 悪性形質転換細胞 
- b. 残存多能性幹細胞 

免疫不全動物を用いた
in vivo 造腫瘍性試験
(& 体内分布試験)

in vitro (or in vivo) 試験

- 感度が十分な試験法があれば、定量的評価が可能
- 造腫瘍性は生着部位における微小環境に依存

「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」



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

- 目次
- はじめに
 - 本文書の位置づけ
 - 用語の定義
 - 一般的留意点
 - ヒトES/iPS細胞加工製品のための造腫瘍性関連試験
 - 原料・原材料の品質特性解析のための造腫瘍性試験
 - 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
 - 中間製品・最終製品の未分化多能性幹細胞検出試験
 - in vitro*試験
 - in vivo*試験
 - 中間製品・最終製品の形質転換細胞検出試験
 - in vitro*試験
 - in vivo*試験
 - 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
 - 試験動物の選択
 - 対照細胞の選択
 - 試験動物の数
 - 細胞投与の部位と投与細胞の数および態様
 - 観察期間
 - 投与部位の観察
 - 投与部位の病理学的評価
 - 結果の解釈
 - 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
 - 原料・原材料の品質特性解析のための造腫瘍性試験
 - 最終製品のための造腫瘍性関連試験の留意点
 - 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)

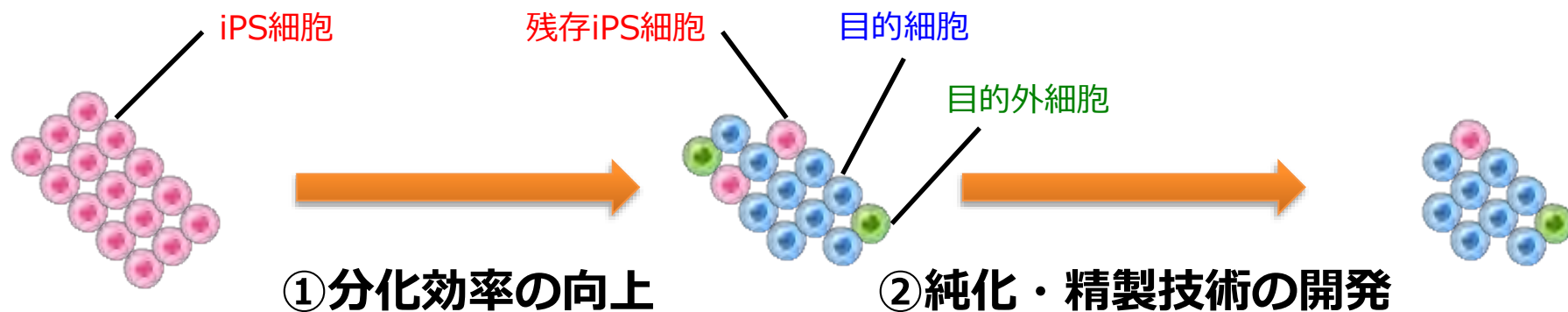
ヒト細胞加工製品中に混在する未分化多能性幹細胞及び形質転換細胞について、その**代表的検出試験例**を示すと同時に、これらの試験の中から、特定のヒト細胞加工製品の品質・安全性評価のために実施する**試験を選択する際に留意すべき事項**を示すもの

先端医療(再生医療等)の実用化で必要なこと

**「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: 研究背景

- 細胞加工製品の品質・安全性を考える上で特有かつ重要な評価項目の一つとして、製品中の細胞に起因する腫瘍形成の問題がある。
- 細胞加工製品については、動物試験での感受性の種差および異種拒絶反応により非臨床試験のヒトへの外挿性に大きな課題があり、製品の臨床での使用経験が乏しいことから、腫瘍形成リスク評価を考える際には、腫瘍発生リスクを惹起するハザードを測定・定量する試験法が重要になる。



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

MEASURE: 研究の目的

細胞加工製品のリスクのうち特に、腫瘍形成(造腫瘍性)リスクの評価に焦点を当て、官民共同のチームにより

- ① 腫瘍発生リスクを惹起するハザードとその評価の考え方を、国内外動向を踏まえつつ整理するとともに、
- ② 造腫瘍性関連試験法について、標準プロトコールを作成し、多施設において比較・検証することにより、

当該試験法の有用性・再現性を明らかにするとともに、

その結果をもとに国際的枠組みにおいて提言を行い、国際標準化を図る。

なおこれと並行して、造腫瘍性評価に関連したオープン・イシューとして残されている課題である

- ③ 投与後の製品由来細胞の「体内動態評価」について、考え方を整理し先導的に国内外に提示することにより、国際協調の素地の醸成を図る。

MEASURE: 研究体制

“MEASURE”

Multisite **E**valuation Study on **A**nalytical Methods for Non-clinical **S**afety Assessment of h**U**man-derived **RE**generative Medical Products

ヒト由来再生医療等製品の非臨床安全性評価のための分析法に関する多施設検証研究

MEASURE 1 (第1期:2016-2019年度), MEASURE 2 (第2期:2020-2022年度)

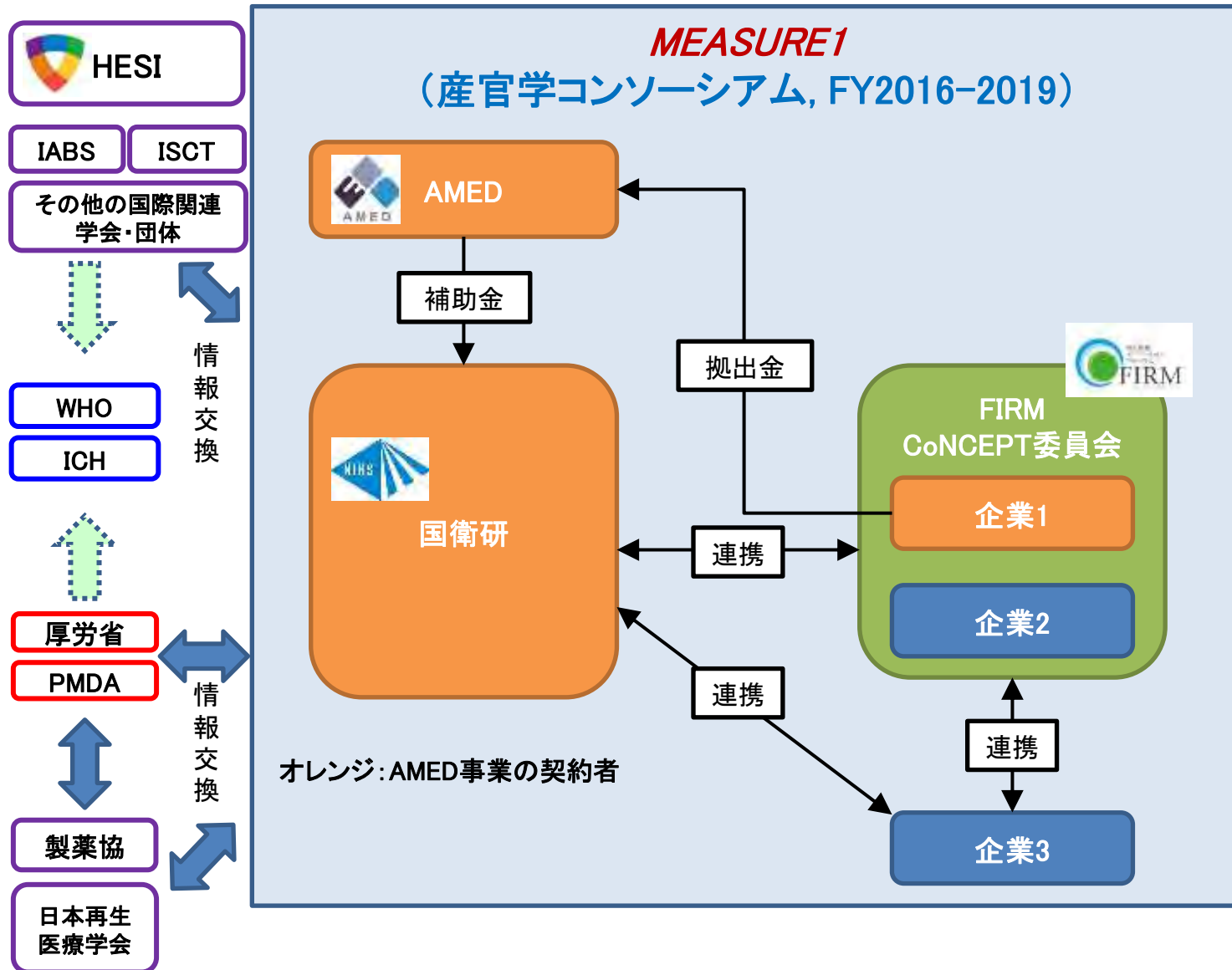
“FIRM-CoNCEPT”

Committee for **N**on-**C**linical Safety **E**valuation of **P**luripotent Stem Cell-derived **T**herapeutic Products, **F**orum for **I**nnovative **R**egenerative **M**edicine

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

MEASURE

(Multisite Evaluation Study on Analytical Methods for Non-clinical Safety Assessment of Human-derived Regenerative 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
協和キリン株式会社

企業2

FIRM会員の
研究協力者および
研究補助者

企業3

FIRM会員以外の
研究協力者および
研究補助者(主にCRO)

MEASURE1 での研究成果

Cytotherapy, 2019; 21: 1095–1111



International Society
ISCT
Cell & Gene Therapy

REVIEW

Cytotherapy 2019;21:1095-1111.

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

Y. SATO¹, H. BANDO^{2,*}, M. DI PIAZZA³, G. GOWING⁴, C. HERBERTS^{5,i}, S. JACKMAN⁶,
G. LEONI⁷, S. LIBERTINI⁸, T. MACLACHLAN⁹, J.W. MCBLANE¹⁰,
L. PEREIRA MOURIÈS¹¹, M. SHARPE⁷, W. SHINGLETON^{12,i}, B. SURMACZ-CORDLE⁷,
K. YAMAMOTO¹³ & J.W. VAN DER LAAN^{5,*}

TOPICS

再生医療 2019;18:328-337.

ヒト人工多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性に関して
品質評価・非臨床評価の観点から考慮すべきポイント

Points to Consider for the Quality/Nonclinical Assessment of Tumorigenicity in Cell
Therapy Products Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells

坂東 博人¹⁾, 佐藤 陽治²⁾, 吉田 俊彦³⁾, 柴田 孝⁴⁾, 下山 敦子⁴⁾, 藤井麻衣子⁴⁾,
久保田幸治⁵⁾, 佐藤 卓朗⁷⁾, 秋吉竜太郎⁷⁾, 辻本 伸治⁶⁾, 安武 幹智⁶⁾,
下野 知性¹⁰⁾, 瀧里 篤志¹¹⁾, 渡辺 夏巳¹²⁾



Contents lists available at ScienceDirect
Regenerative Therapy

Regenerative Therapy 2021;18:202-216.

Review

Biodistribution studies for cell therapy products: Current status and
issues

Yoshiteru Kamiyama¹, Yoichi Naritomi¹, Yui Moriya¹, Syunsuke Yamamoto²,
Tsukasa Kitahashi³, Toshihiko Maelawa³, Masahiro Yahata³, Takeshi Hanada⁴,
Asako Uchiyama⁴, Akari Noumaru⁴, Yoshiyuki Koga⁴, Tomoaki Higuchi⁵, Masahiko Ito⁵,
Hiroyuki Koimatsu⁵, Sosuke Miyoshi⁵, Sadaaki Kimura⁶, Nobuhiro Umeha⁶, Eriko Fujita⁶,
Naoko Tanaka⁶, Taku Sugita⁶, Satoru Takayama⁶, Akihiko Kuragi⁶, Satoshi Yasuda⁶,
Yoji Sato⁶

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス (PSATRS, 51(5), 256~262 (2020))

総説

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2020;51:256-262.

ヒト多能性幹細胞由来の再生医療製品開発における
造腫瘍性評価に関する日米欧三種の規制の状況

我妻 昭彦¹⁾, 渡辺 武志²⁾, 龍谷 高敏³⁾, 福原 良文⁴⁾, 安田 智⁵⁾, 佐藤 陽治⁶⁾



CYTOTHERAPY

journal homepage: www.isct-cytotherapy.org

International Society
ISCT
Cell & Gene Therapy®

FULL-LENGTH ARTICLE

Regulatory Policies

Cytotherapy 2021;23:176-183.

Multisite studies for validation and improvement of a highly efficient
culture assay for detection of undifferentiated human pluripotent stem
cells intermingled in cell therapy products

Takeshi Watanabe^{1,2,*}, Satoshi Yasuda³, Shinji Kusakawa³, Takuya Kuroda³,
Mayumi Futamura^{2,4}, Mitsuhide Ogawa^{2,5}, Hidemi Mochizuki^{2,6}, Eri Kikkawa^{2,7},
Hatsue Furukawa^{2,8}, Masato Nagaoka^{2,9}, Yoji Sato³



その他にも
投稿準備中の論文あり
(各分析法バリデーション結果)

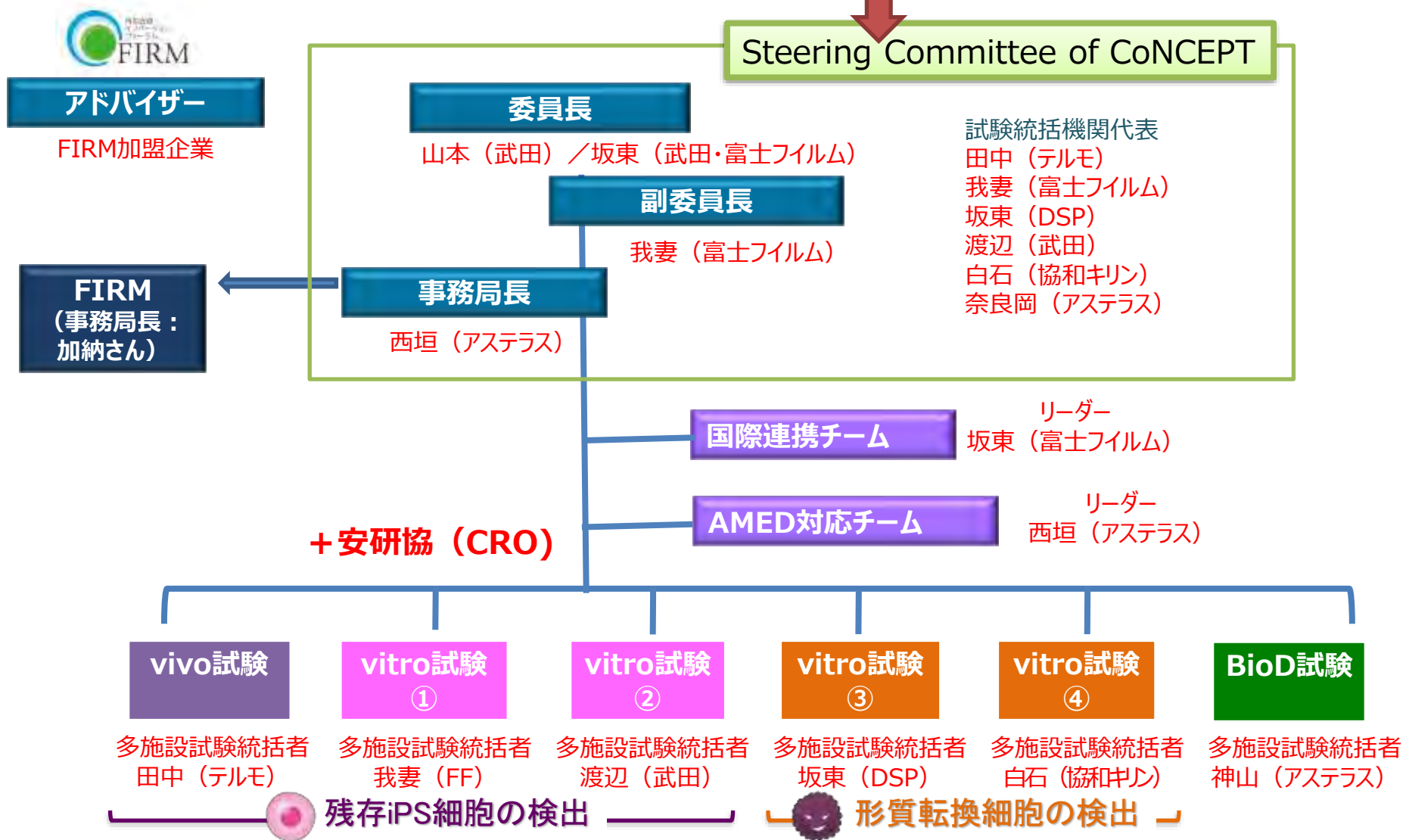
国際連携のもとに細胞加工製品の腫瘍発生リスクとその評価のグローバルな考え方を整理した
ポジションペーパーを発表すると共に、海外に先んじて造腫瘍性・体内動態評価に関する調査研
究と試験法の多施設比較・検証を、国立衛研とFIRM-CoNCEPTとの官民共同体制で実施した。

MEASURE1 (2016-2019年度)実験コンソーシアム組織図

(リーダーのみ記載)



AMED研究課題 研究開発代表者：佐藤陽治・・・研究総括、各試験の技術指導／予備予備条件検討、国際連携



FIRM
アドバイザー
FIRM加盟企業

FIRM
(事務局長: 加納さん)

試験統括機関代表
田中 (テルモ)
我妻 (富士フィルム)
坂東 (DSP)
渡辺 (武田)
白石 (協和キリン)
奈良岡 (アステラス)

混在する未分化iPS細胞の検出法



In Vitro Assays

Assays/ Platform	Flow cytometry	qRT-PCR	Droplet Digital PCR	Highly Efficient Culture Assay
Positive control	iPS cells	iPS cells	iPS cells	iPS cells

In Vivo Assay

Assays/Platform	Tumorigenicity Test
Animals	NOG mice
Route	Subcutaneous transplantation
Positive control	iPS cells
Duration	17-30 weeks
Pros	Direct evaluation in micro environment (expected clinical use site)
Cons	High cost, Long time, Especial facility, Low through put, Histopathological evaluation to confirm tumor origin from whether residual undifferentiated iPS cells or transformed cells
Sensitivity	to detect 1000 hiPS cells in 2.5/10 ⁵ hRPE with 50% probability
Reference	Kanemura et al., Sci Rep. 2013; Kawamata et al., J Clin Med. 2015

テルモ(リーダー)
アステラス製薬
ボゾリサーチセンター
シミックファーマサイエンス
DIMS医科学研究所
薬物安全性試験センター
富士フィルム
iHeart Japan
イナリサーチ

協和キリン
日本バイオリサーチセンター
日精バイリス
新日本科学
大日本住友製薬
タカラバイオ
武田薬品工業
国立医薬品食品衛生研究所
【リーダー以下順不同】

MEASUREで多施設検証を実施



1. 混在未分化iPS細胞の*in vivo*検出法が多施設性能検証

試験の標準プロトコール:

- Purpose: Confirm test procedures in **4 studies at 4 sites** (CROs)
- Animal: **NOG mouse**
- Dose:
- Group size:
- Dosing:
- Study duration:
- Parameters:

*in vitro*試験系との感度比較のため

考えた中で *in vivo* 試験で
最も高感度を達成しうる
投与プロトコール

ヒト新生児繊維芽細胞中に混在するヒトiPS細胞を
マトリゲルとROCK阻害剤存在下に検出する試験

Unpublished Data

1. 混在未分化iPS細胞の*in vivo*検出法が多施設性能検証

本試験の結果：

Tumor incidence in male (upper) and female (lower)

A

B

C

D

Unpublished Data

1. 混在未分化iPS細胞の*in vivo*検出法が多施設性能検証

本試験から得られた結論：





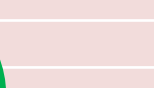
- 4施設で得られたTPD₅₀値は、雌雄とも15～100（約0.0015～0.01% = 1/67,000 ～ 1/10,000）の範囲内であった。
- TPD₅₀値には雌雄差は見られなかった。
- 高用量群では、腫瘍形成の早期化の傾向がみられた。

混在する未分化iPS細胞の検出法



In Vitro Assays

In Vivo Assay

Assays/ Platform	Flow cytometry 	qRT-PCR 	Droplet Digital PCR 	Highly Efficient Culture Assay 	Assays/Platform	Tumorigenicity Test 
Positive control	iPS cells	iPS cells	iPS cells	iPS		
Duration	1 day	6 hours	6 hours	about		
Marker	TRA-1-60 etc	Lin28	Lin28	-		
Pros	Simple/quick	Simple/quick, High sensitivity	Simple/quick, High sensitivity	Direct de High sen		
Cons	Low sensitivity, Indirect detection, Difficulty in the manual selection of marker thresholds	Indirect detection, Lin28 expression is noted in some differentiated cells	Indirect detection, Lin28 expression is noted in some differentiated cells	Time-co Low thro		
Sensitivity	0.1%	0.002%	0.001%	0.01-0.001		
Reference	Kuroda et al., PLoS ONE. 2012	Kuroda et al., PLoS ONE. 2012	Kuroda et al., Regen Ther. 2015	Tano et al., PLoS ONE. 2014		

富士フイルム(リーダー)
 Axcelead Drug Discovery Partners
 理研ジェネシス
 住化分析センター
 タカラバイオ
 武田薬品工業
 国立医薬品食品衛生研究所
 【リーダー以下順不同】



MEASUREで多施設検証を実施

2-1. 混在する未分化iPS細胞の *in vitro* 検出法 (ddPCR)

Droplet Digital PCR:

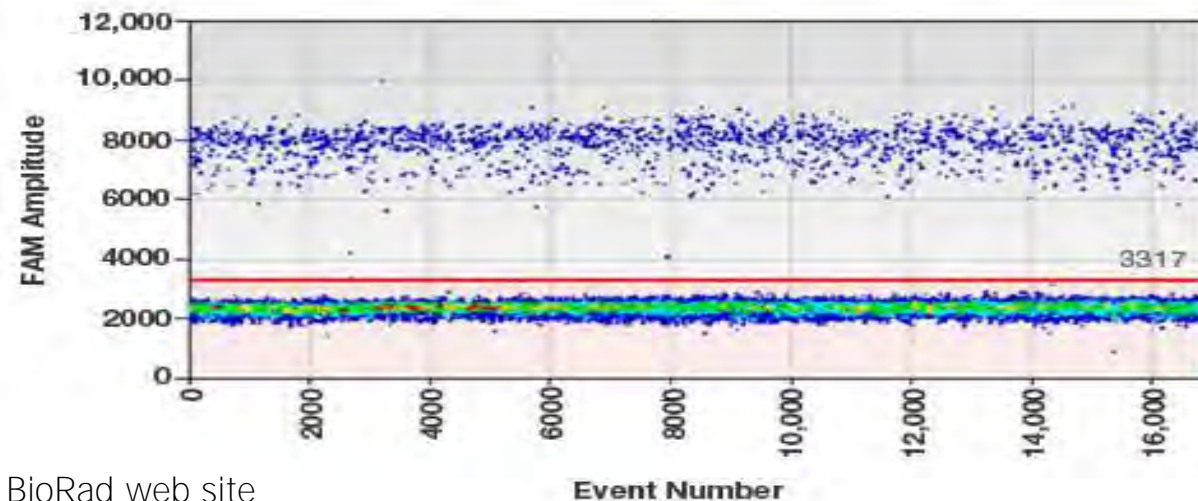
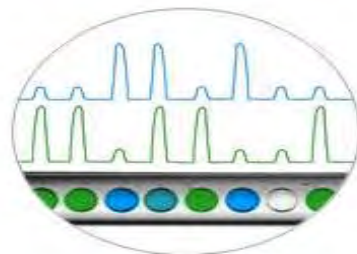
液滴を利用して微量のDNA(RNA)を検出する方法

測定原理:

- 特殊な試薬を用いて大量の液滴を作成(1万滴以上)
- 各液滴中でPCR反応を起こす
- 検出器は蛍光で各液滴の陽性・陰性を判断
- 検量線を必要とせずに絶対量を定量できる
- 得られる結果は右図のようになる



Droplet Reader



2-1. 混在する未分化iPS細胞の *in vitro* 検出法 (ddPCR)

標準プロトコール :

Equipment: Droplet digital PCR: QX200 (BioRad)

Cells:

hiPSCs: ChiPSC18 (Cellartis; virus vector)

based on global accessibility and high level of quality assurance

non-PSCs : primary human retinal pigment epithelial (RPE) cells

Marker gene: *LIN28* (Amplicon size 134bp)

F-Primer:

Probe:

Unpublished Data

Spike Conc.	No. of hiPSC	No. of RPEc
0.1%	5,000	5×10^6
0.03%	1,500	5×10^6
0.01%	500	5×10^6
0.003%	150	5×10^6
0.001%	50	5×10^6
0.0003%	15	5×10^6
0%	0	5×10^6

2-1. 混在する未分化iPS細胞の *in vitro* 検出法 (ddPCR)



試験結果





Unpublished Data

結論: 各施設の検出限界は 0.001% 以下 (LLOD=average of RPE + 3SD)

混在する未分化iPS細胞の検出法



In Vitro Assays

Assays/ Platform	Flow cytometry 	qRT-PCR 	Droplet Digital PCR 	Highly Efficient Culture Assay 
Positive control	iPS cells	iPS cells	iPS cells	iPS cells
Duration	1 day	6 hours	6 hours	about a week
Marker	TRA-1-60 etc	Lin28	Lin28	-
Pros	Simple/quick	Simple/quick, High sensitivity	Simple/quick, High sensitivity	Direct detection, High sensitivity
Cons	Low sensitivity, Indirect detection, Difficulty in the manual selection of marker thresholds	Indirect detection, Lin28 expression is noted in some differentiated cells	Indirect detection, Lin28 expression is noted in some differentiated cells	Time-consuming, Low throughput
Sensitivity	0.1%	0.002%	0.001%	0.01-0.001%
Reference	Kuroda et al., PLoS ONE. 2012	Kuroda et al., PLoS ONE. 2012	Kuroda et al., Regen Ther. 2015	Tano et al., PLoS ONE. 2014

In Vivo Assay

武田薬品工業(リーダー)
Axcelead Drug Discovery Partners
ボゾリサーチセンター
シミックファーマサイエンス
イナリサーチ
ヘリオス*
タカラバイオ*
東ソー*
Ig-M**
国立医薬品食品衛生研究所
【リーダー以下順不同】

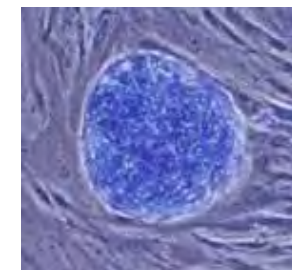
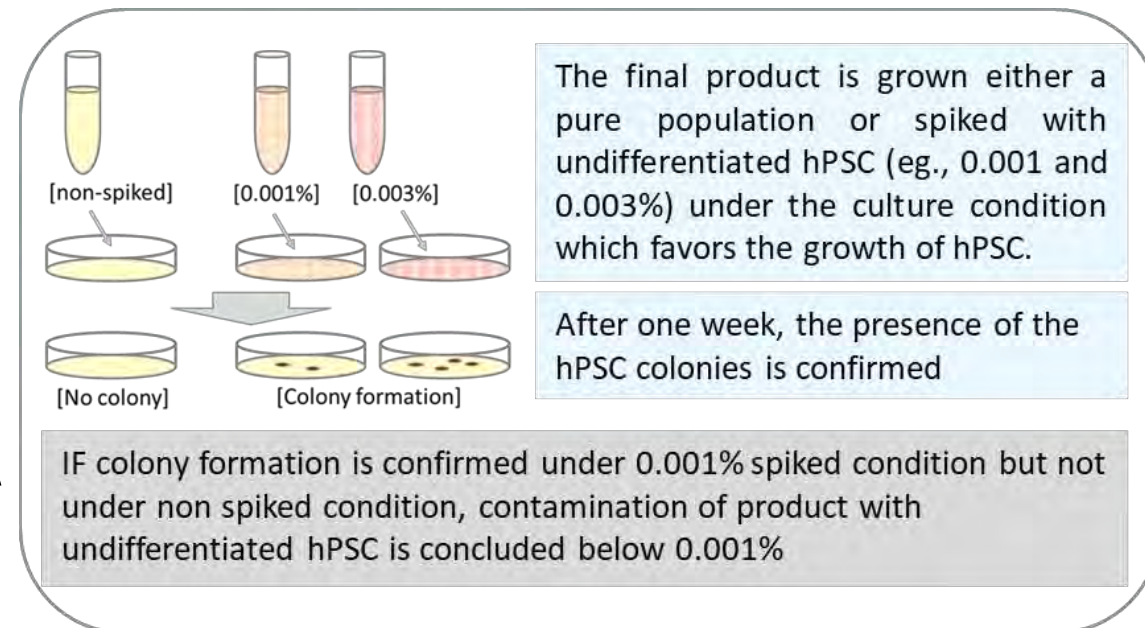
*MEASURE1のみ, **MEASURE2のみ

MEASUREで多施設検証を実施

2-2. 混在する未分化iPS細胞の *in vitro* 検出法 (HEC)

Highly efficient culture assay (HEC assay)

- ✓ 多能性幹細胞 (PSC) の増殖に適した高効率培養系を用いて、PSCコロニーを検出する *in vitro* アッセイ (Tano *et al.*, PLoS One. 2014;9: e110496)。
- ✓ 高感度なアッセイで、単一PSCに由来するコロニーを識別することにより、PSCを直接検出することができる。
- ✓ “HEC assay” は、あらゆる多能性幹細胞加工製品に適用可能であり、多能性幹細胞加工製品の造腫瘍性評価に関する規制当局の要求事項に基づいて実施されていることが報告されている [1]。

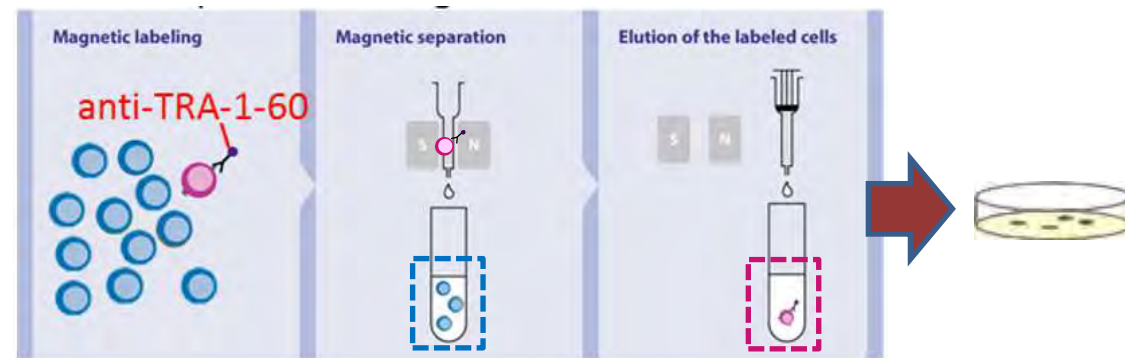


[1] Garitaonandia et al, Sci Rep, 6: 34478 (2016)

2-2. 混在する未分化iPS細胞の *in vitro* 検出法 (HEC)

MEASURE1 で得られた結果 [2]

- ✓ MEASURE1のマルチサイト研究により以下のことが確認された:
 - hiPSC株 (3種類のhiPSC細胞株) および培養条件 (2種類の培養条件) を変化させた場合の下方検出限界は**0.001% (= 1/100,000)**であった。
 - MACS前処理により未分化なhiPSC集団が濃縮され、その結果、**0.00002% (=1/5,000,000)**の検出感度が達成された。



[2] Watanabe et al, Cytotherapy, 23: 176-183 (2021)

MEASURE2 の目指すところ



- ✓ コロニー形成率を向上させるための培養条件の改善
- ✓ 多能性幹細胞由来の分化細胞を用いたアッセイの検証
- ✓ MACSプロセスの最適化

混在する形質転換細胞の検出法



In Vitro Assays

In Vivo Assay

Assays/ Platform	Conventional soft agar colony formation	Digital soft agar colony formation	Cellular In
			
Positive control	HeLa cells	HeLa cells	HeLa
Duration	3 to 4 weeks	3 to 4 weeks	4 weeks
Assay principle	Conventional SACF assay based on anchorage-independent cell growth	Image-based screening system for the SACF assay using a high-content cell analyzer	The analysis of senescence passaging rates of controls
Pros	Low cost	High sensitivity	High sensitivity Low cost
Cons	Low sensitivity	High cost (needs image scanner)	Time-consuming
Sensitivity	0.02%	0.00001%	0.0001%
Reference	Kusakawa et al., Regen Ther. 2015	Kusakawa et al., Sci Rep. 2015	Kono et al., Hasebe-Tanaka, Regen Ther 2016

大日本住友製薬(リーダー)
 アステラス製薬
 第一三共
 GEヘルスケア*
 LSIM安全科学研究所
 田辺三菱製薬*
 住化分析センター
 武田薬品工業*
 Axcelead Drug Discovery Partners*
 国立医薬品食品衛生研究所
 【リーダー以下順不同】
 * MEASURE1のみ



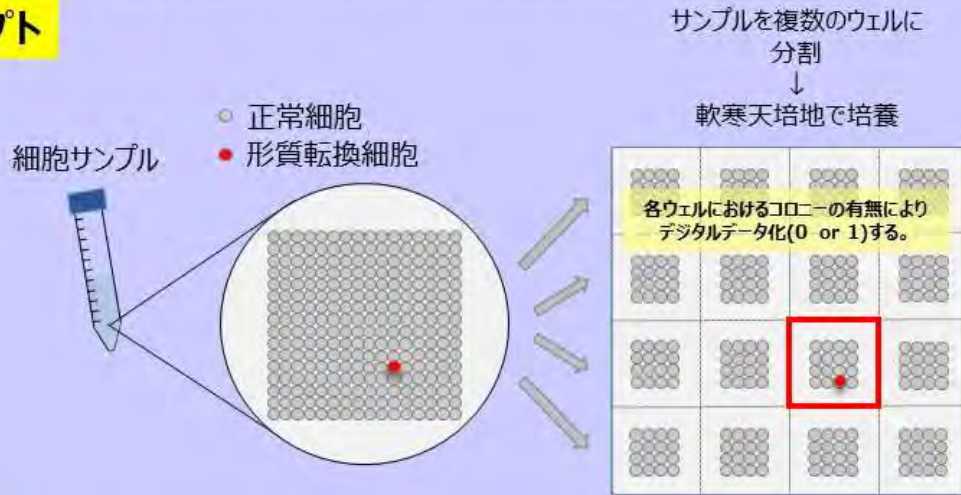
MEASUREで多施設検証を実施

3-1. 混在する形質転換細胞の *in vitro* 検出法 (D-SACF)



デジタル軟寒天コロニー形成試験法 測定コンセプト&手順

コンセプト



サンプルを複数ウェルに分割、培養し、各ウェルにおけるコロニーの有無をデジタルデータ化することにより、検出感度を大幅に向上させることができる

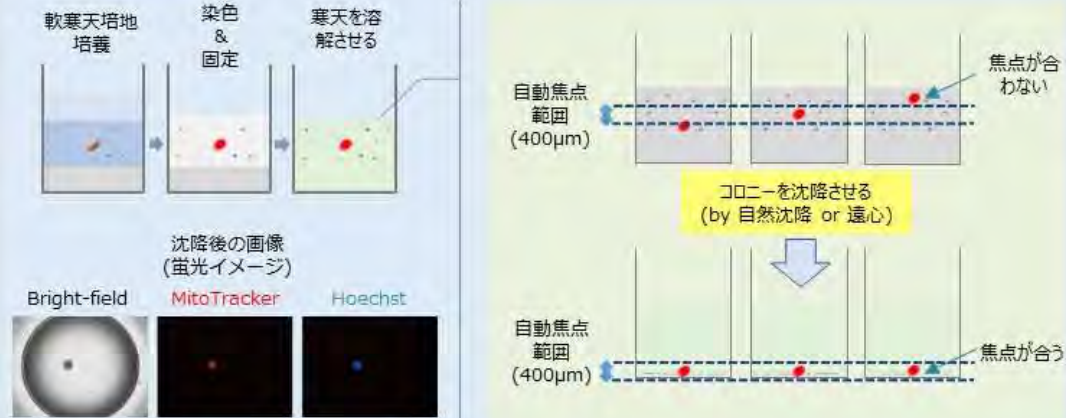
低いS/N比



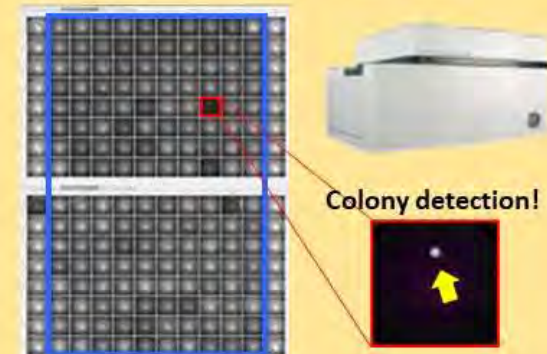
高いS/N比

手順

軟寒天培地培養 & サンプル調製



イメージングアナライザーを用いて、コロニー形成をハイスループットで検出する



3-1. 混在する形質転換細胞の *in vitro* 検出法 (D-SACF)



アッセイ法	軟寒天コロニー形成法	デジタル軟寒天コロニー形成法
陽性対照	HeLa細胞	HeLa細胞
試験期間	3~4週間	3~4週間
アッセイ原理	悪性形質転換細胞が足場非依存的に増殖する特性を利用し、形成されるコロニー数を目視でカウント	悪性形質転換細胞が足場非依存的に増殖する特性を利用し、形成されるコロニーの検出にイメージアナライザーを利用
利点	安価	高感度
欠点	低感度 浮遊細胞は適応不可	高価 (イメージアナライザーが必要) 浮遊細胞は適応不可
感度 (検出下限)	0.02%	0.00001%
参考文献	Kusakawa et al., Regen Ther. 2015	Kusakawa et al., Sci Rep. 2015

いずれの施設でもヒト間葉系幹細胞 (hMSC) に混入した**0.0001% (=1,000,000)** の HeLa細胞を検出できた

- 試験実施には技術的熟練を要する
- 細胞の死骸の凝集がおきやすくコロニーとの鑑別に手間がかかる。



データがバラつく要因

より簡便な方法への改善・改良が必要



MEASURE2での取り組み

混在する形質転換細胞の検出法



In Vitro Assays

Assays/ Platform	Conventional soft agar colony formation	Digital soft agar colony formation	Cellular Immortality Testing
Positive control	HeLa cells	HeLa cells	HeLa cells
Duration	3 to 4 weeks	3 to 4 weeks	4 weeks or more
Assay principle	Conventional SACF assay based on anchorage-independent cell growth	Image-based screening system for the SACF assay using a high-content cell analyzer	The analysis of cell senescence/growth after serial passaging (compare the growth rates of hMSC w/wo positive controls after 5 passages)
Pros	Low cost	High sensitivity	High sensitivity, Low cost
Cons	Low sensitivity	High cost (needs image scanner)	Time-consuming
Sensitivity	0.02%	0.00001%	0.0001%
Reference	Kusakawa et al., Regen Ther. 2015	Kusakawa et al., Sci Rep. 2015	Kono et al., Biologicals. 2015 Hasebe-Takada et al. Regen Ther 2016

In Vivo Assay

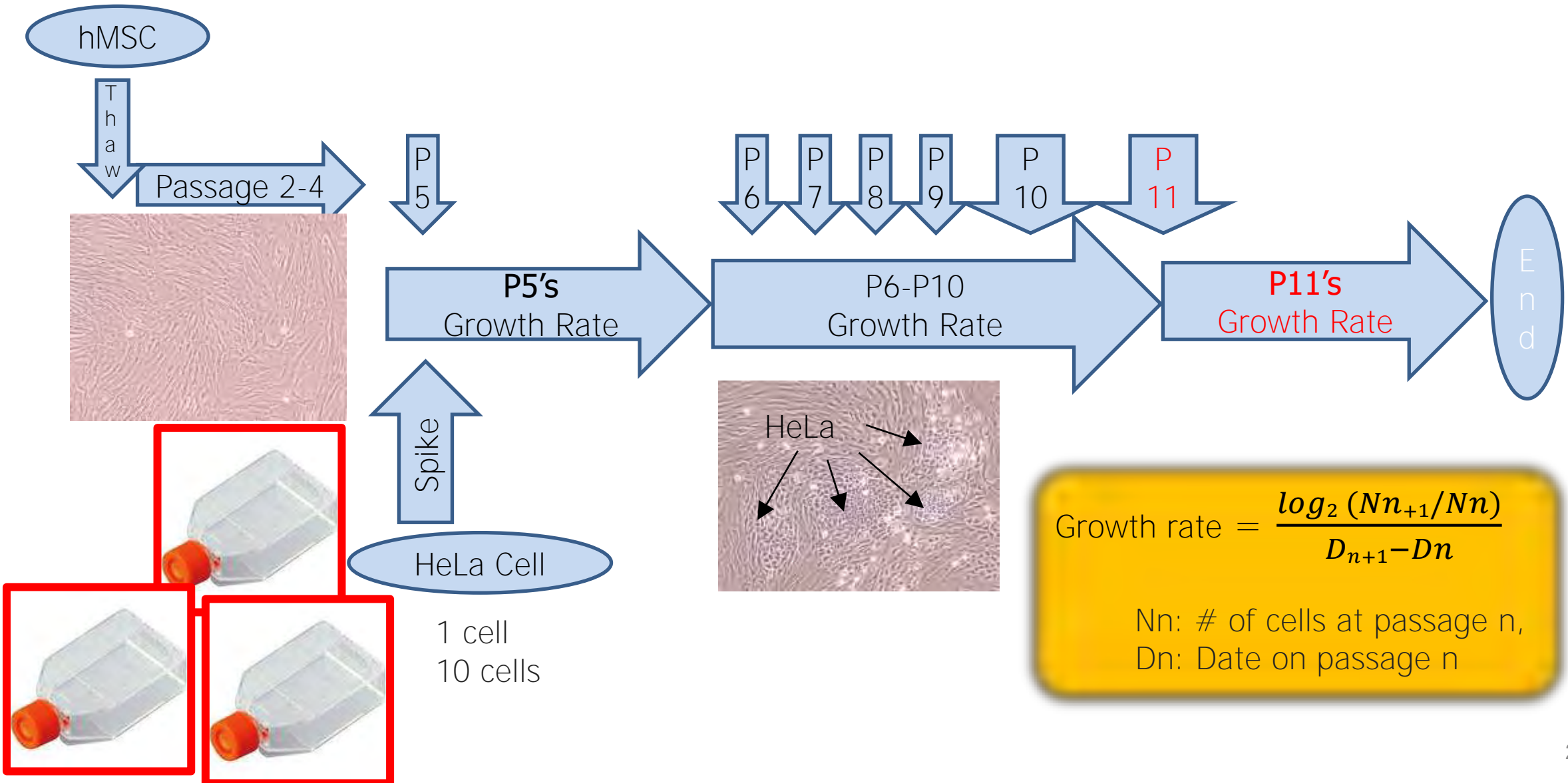
Assays/Platform	Tumorigenicity Test
Animals	NOD mice
Route	
Dose	
Protocol	
Consistency	
Sensitivity	
Reference	

協和キリン(リーダー)
ボゾリサーチセンター
ヘリオス
Ig-M
国立医薬品食品衛生研究所
【リーダー以下順不同】



MEASUREで多施設検証を実施

3-2. 混在する形質転換細胞の *in vitro* 検出法 (CIT)



3-2. 混在する形質転換細胞の *in vitro* 検出法 (CIT)



標準プロトコール :

Unpublished Data

3-2. 混在する形質転換細胞の *in vitro* 検出法 (CIT)



試験結果：

Unpublished
Data

- 10^6 個のhMSCに1個または10個のHeLa細胞（それぞれ **0.0001% (= 1/1,000,000)** と **0.001% (= 1/100,000)**）を接種した場合、4回継代後に増殖速度の加速が検出されるという、独立した3施設からの結果は一貫していた。
- 1細胞 (**0.0001% (= 1/1,000,000)**) 接種群では、7/9群で成長速度の加速が検出された。

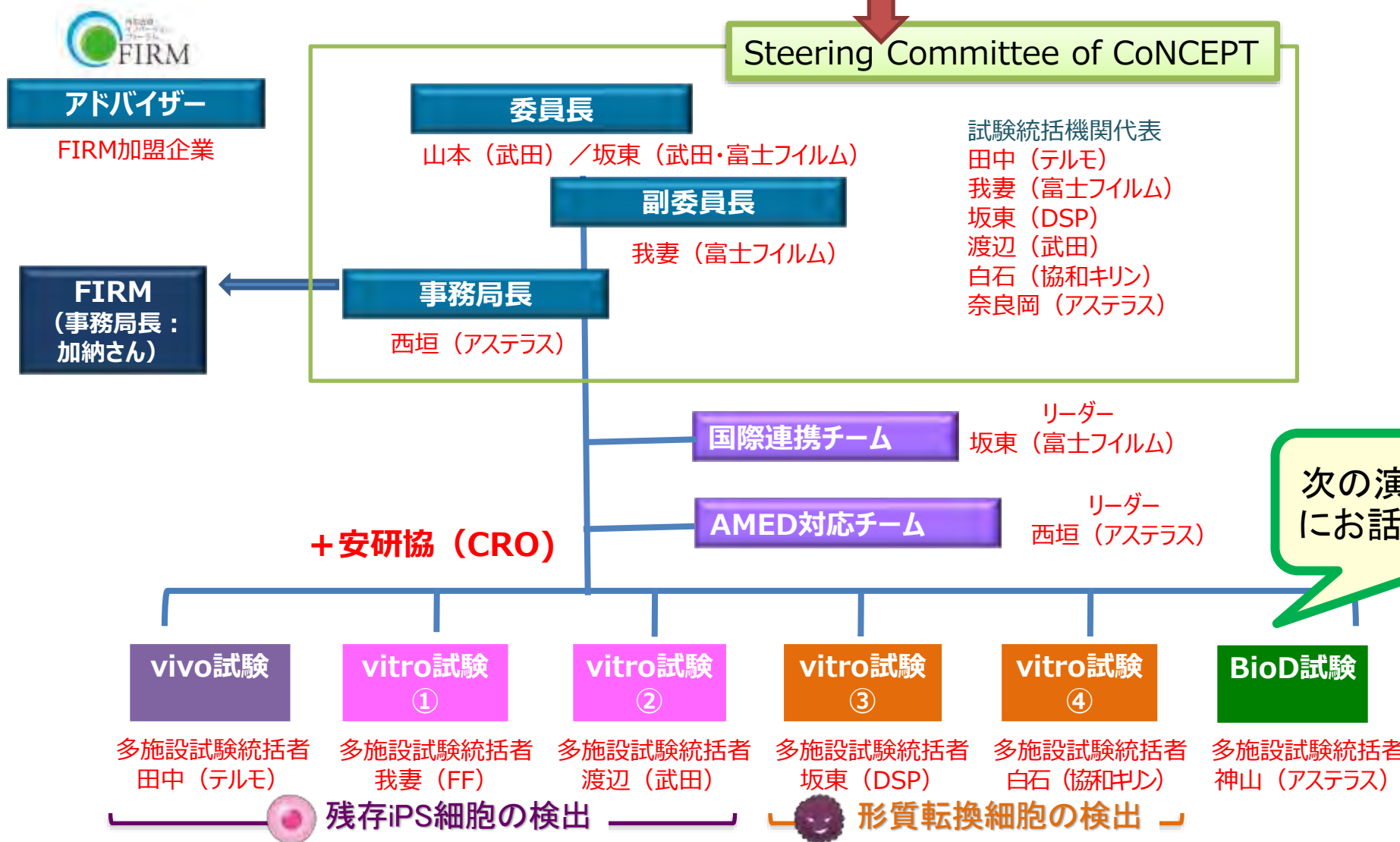
単純な試験だが、検出感度はかなり高い

MEASURE1 (2016-2019年度)実験コンソーシアム組織図

(リーダーのみ記載)



AMED研究課題 研究開発代表者：佐藤陽治・・・研究総括、各試験の技術指導／予備予備条件検討、国際連携



アドバイザー

FIRM加盟企業

FIRM
(事務局長: 加納さん)

試験統括機関代表
田中 (テルモ)
我妻 (富士フィルム)
坂東 (DSP)
渡辺 (武田)
白石 (協和キリン)
奈良岡 (アステラス)

リーダー
坂東 (富士フィルム)

リーダー
西垣 (アステラス)

残された課題

- MEASUREで検証した試験法の国際標準化を目指すには、国内だけではなく海外の試験研究機関と共同した体制を新たに構築し、同一プロトコールによる試験法の性能評価を参画機関で実施し、有用性を確認・共有する必要がある。
- また、これまで多施設で検証を進めてきた造腫瘍性試験法と体内動態評価試験法においても科学的に改善が期待される課題が残されており、その解決に向けて早急に取り組むべきである。
- 造腫瘍性との関連が示唆されている細胞加工製品における遺伝的不安定性の評価方法は未だ確立しておらず、その考え方を整理して国内外に提示し、国際協調の素地の醸成を図る必要がある。

“MEASURE2”

Multisite **E**valuation Study on **A**nalytical Methods for
Non-clinical **S**afety Assessment of h**U**man-derived **RE**generative Medical Products **2**

AMED再生医療実用化研究事業（H28年度）
AMED医薬品等規制調和・評価研究事業（H29～R元年度）

「細胞加工製品の造腫瘍性評価に関する多施設共同研究」

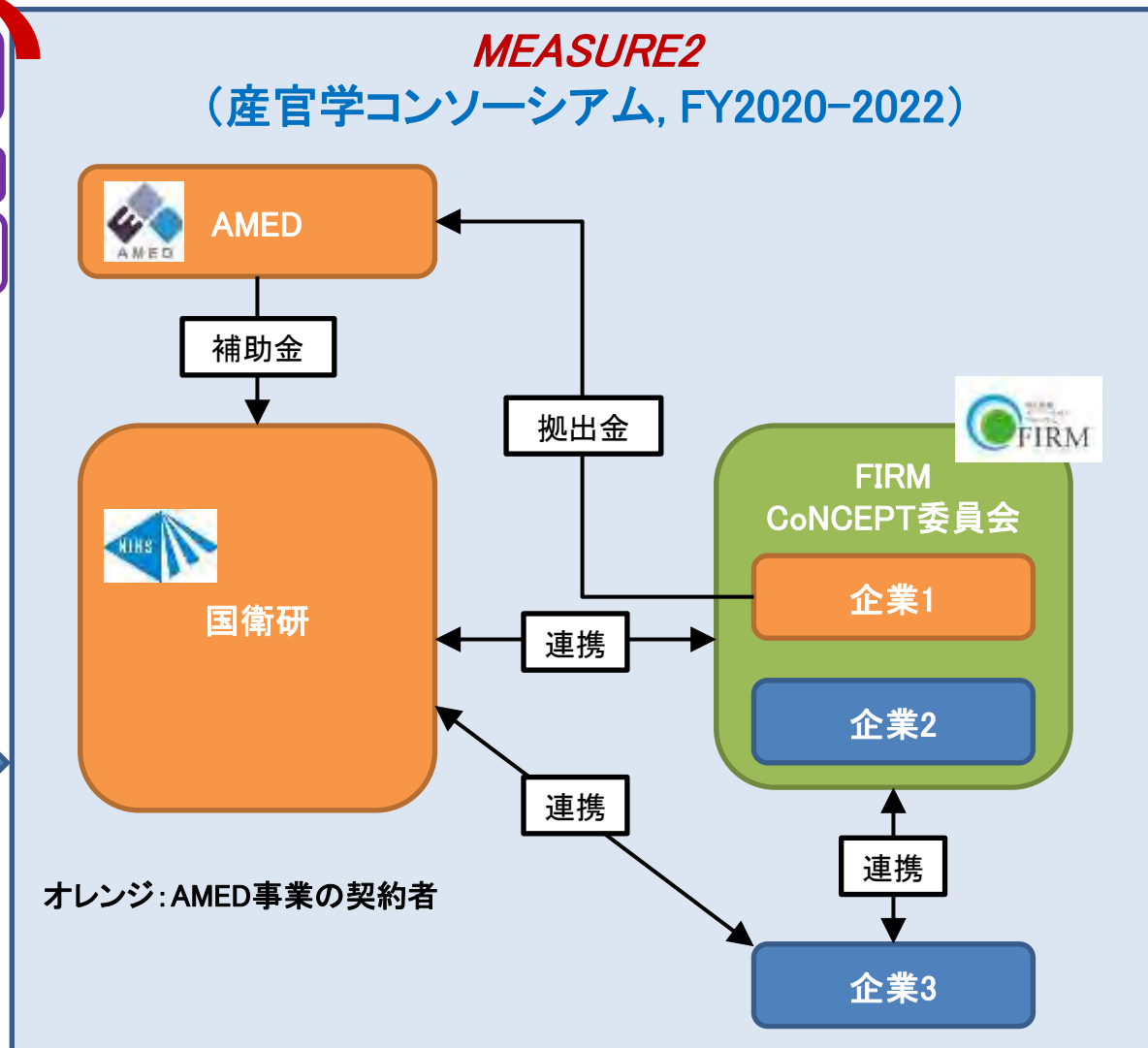
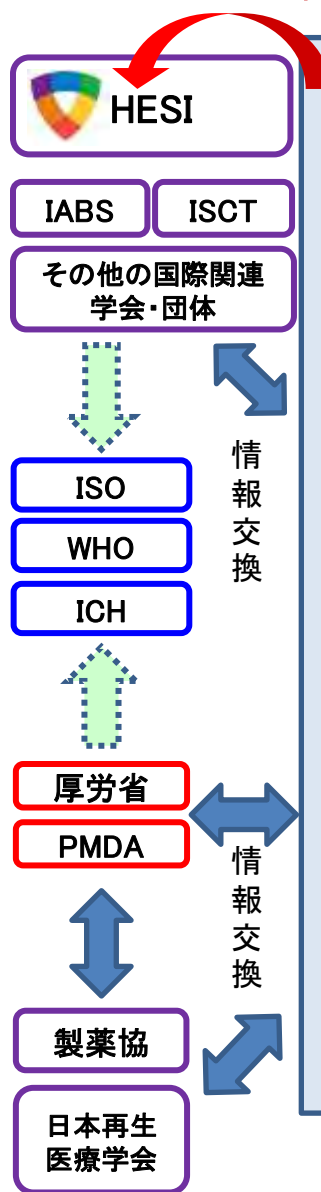
MEASURE

AMED医薬品等規制調和・評価研究事業（R2～4年度）

「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」

MEASURE “2”

HESI CT-TRACS国際実験コンソーシアム



MEASURE

(Multisite Evaluation Study on Analytical Methods for Non-clinical Safety Assessment of Human-derived Regenerative 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
- Miraris Regenerative Medicine株式会社
- 新日本科学株式会社

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(主にCRO)

HESI CT-TRACS* Membership



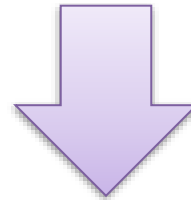
Committee members and collaborators from
 > 25 organizations across EU, Japan and USA.

<p>Regulatory bodies:</p>	<p>Universities/ Research Centers:</p>
<p>Gov./Consortia/NGO:</p>	<p>Developers (Therapies and Tools), CROs:</p>

* Cell Therapy-TRacking, Circulation & Safety Technical Committee, Health and Environmental Sciences Institute

研究目的と内容①

1. HESI CT-TRACSにおける国際コンソーシアム活動を通じて、細胞加工製品の造腫瘍性ハザード検出試験法の性能評価を官民共同の多施設で実施し、当該試験法の再現性・有用性を明らかにし、細胞加工製品特有のリスク評価に関する試験法におけるコンセンサスの形成と国際標準化を図る。



【MEASURE2】

武田薬品工業
大日本住友製薬
住化分析センター
Axcelead Drug Discovery Partners
Minaris Regenerative Medicine
Bio-Rad
国立医薬品食品衛生研究所

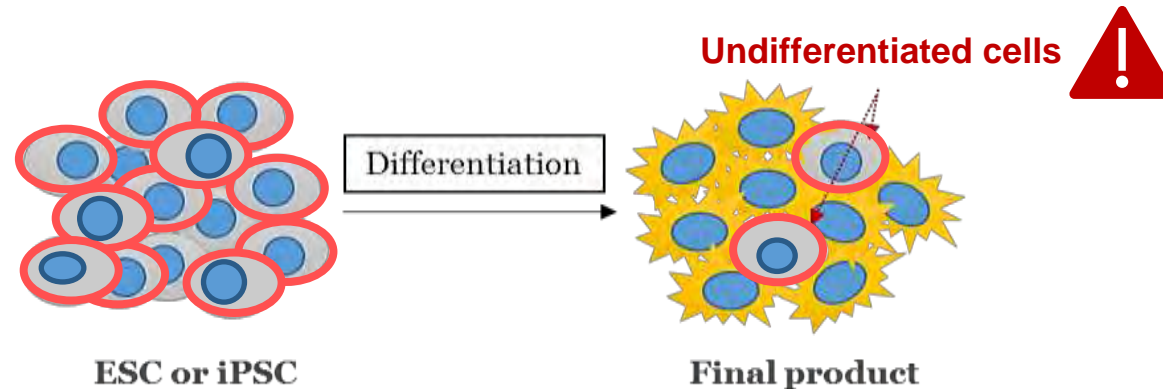
【HESI CT-TRACS】

Novartis
CGT Catapult
Imperial College London
AstraZeneca
etc.

【順不同】

HESI CT-TRACS をプラットフォームとして、デジタルドロップレットPCRや培養増殖法（HECアッセイ）といった in vitro未分化多能性幹細胞検出試験法を対象とした多施設比較・評価を実施し、試験法の有用性を確認・共有する。

残存する未分化iPSCを測定する *in vitro* の手法の検証・改善に焦点



Cells: iPSCs (source cells); **iPSC-derived functional cells (cardiomyocytes)**

Methods:

1) **Team ddPCR:** 5 sites confirmed

- Endpoints: measure several biomarkers of iPSCs

2) **Team HEC assay :** 4 sites confirmed

- Endpoint: identification of iPSC colonies by Alkaline Phosphatase staining (colony counts)

研究目的と内容②

2. これまで多施設で比較・検証してきた造腫瘍性関連試験法と体内動態評価試験法について技術的な改善と改良を行い、簡便性、汎用性、感度等を更に向上させた評価試験法を開発・確立し、試験法のアプリケーションの拡大を促すと共に国際的な技術優位性を得ることを目指す。



- *in vitro*未分化多能性細胞検出試験法(HECアッセイ)
- *in vitro*形質転換細胞検出試験法(デジタル軟寒天コロニー形成試験法)
- 細胞体内動態評価試験法

研究目的と内容③

3. 細胞加工製品の遺伝的不安定性試験法に関する国内外の動向調査を行い、
遺伝的不安定性評価法とその考え方を整理し報告する。

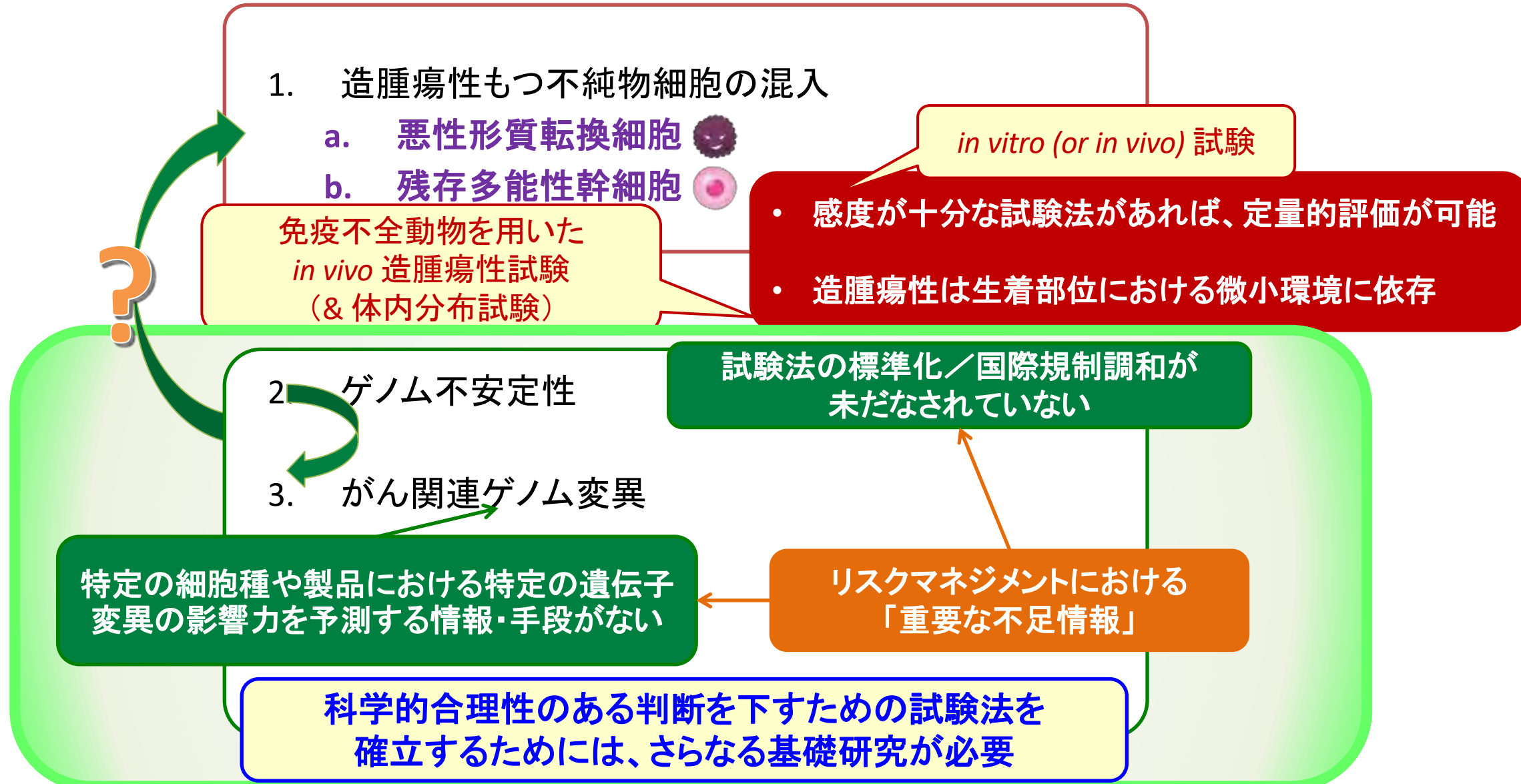


テルモ(リーダー)
武田薬品工業
大日本住友製薬
イナリサーチ
日精バイリス

エスアールエル
iHeart Japan
国衛研
【リーダー以下順不同】

遺伝的不安定性試験法の調査研究

細胞加工製品（多能性幹細胞加工製品）の腫瘍形成リスクに関する潜在的ハザード



MEASURE2での研究項目

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**

1. 国際コンソーシアム活動を通じた造腫瘍性ハザード検出試験法の性能評価

我妻昭彦

(富士フィルム)

坂東博人

(Minaris Regenerative Medicine)

坂東清子

(大日本住友製薬)

2. *in vitro*未分化多能性細胞検出試験法の技術的改善・改良および多施設検証

3. *in vitro*形質転換細胞検出試験法の技術的改善・改良および多施設検証

渡辺武志

(武田薬品工業)

FIRM CoNCEPT委員長

神山佳輝

(アステラス製薬)

4. 細胞体内動態評価試験法の技術開発および多施設検証

田中直子

(テルモ)

5. 遺伝的不安定性試験法の調査研究



- 国内で開発される細胞加工製品の国際展開の効率化
- 製品開発における国際的技術優位性の獲得
- 国際ガイドライン作成におけるイニシアチブ獲得

科学的で合理的な再生医療等
製品の開発及び実用化の促進

謝 辞

- 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) のメンバー企業の皆様
- MEASURE 1/2 にご参加・ご協力くださった、日本安全性試験受託研究機関協議会の会員企業及びその他の国内企業の皆様
- HESI CT-TRACS の共同研究にご参加くださった海外企業・アカデミアの皆様
- MEASURE 1 の調査・インタビューにご協力くださいました有識者の先生方
- 再生医療イノベーションフォーラム (FIRM) の事務局の皆様
- AMED 規制科学推進課／再生医療研究開発課の皆様
- PMDA 再生医療製品等審査部の皆様
- 厚生労働省 医療機器審査管理課の皆様
- 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部の皆様

に心から御礼申し上げます

ご清聴ありがとうございました

