

細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究

佐藤陽治[#], 堤秀樹^{*}, 澤田留美, 鈴木孝昌, 安田智

Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-processed products

Yoji Sato[#], Hideki Tsutsumi^{*}, Rumi Sawada, Takayoshi Suzuki, Satoshi Yasuda

Regenerative medicine is regarded as innovative therapy for severe diseases and damages caused by tissue loss and functional impairment. In Japan, regenerative medicine is one of the most important subjects issued by Council for Science and Technology Policy and also referred to in Medical Innovation of New Growth Strategy. Cell/tissue-processed products are living cells, which have been manipulated or processed for the purpose of regenerative medicine, and are extensively developing. Human somatic cells, somatic stem cells, embryonic stem cells, and induced pluripotent stem cells are cell sources used for regenerative medicine. Since we lack in experiences with cell/tissue-processed products, technical development of safety and quality assessment is urgently needed. National Institute of Health Sciences has carried out a mission of Regulatory Science and worked on safety assessment of pharmaceuticals and medical devices and their guideline development. The objective of our study is to develop safety and quality assessment methods for cell/tissue-processed products derived from stem cells, based on recent progresses in life science. We are currently developing methods to evaluate products as follows; a) useful and quantitative tumorigenicity tests to detect contamination of undifferentiated and/or abnormal cells in products, b) quality assessment by gene expression analysis and detection of genetic stability in a manufacturing process, and c) analysis of quality attributes associated with propensity of undifferentiated cells to set acceptable criteria of cell banks. We will be able to provide indicators to control the quality, efficacy and safety of stem cell-processed products and support efficient and economical promotion of the products. Especially, this study would help translate stem cell science into therapeutic products to patients with severe and life-threatening diseases, consequently contributing to administrative policy of Ministry of Health, Labor and Welfare.

Keywords: cell/tissue-processed products, induced pluripotent stem (iPS) cells, regenerative medicine

研究目的

再生医療は、身体の一部の機能不全や欠損による重篤な疾患や障害を治療できる革新的な方法として注目されており、総合科学技術会議の提言や「新成長戦略」のメディカルイノベーションなどにおいても最重要課題とさ

れている。平成25年1月11日閣議決定の『日本経済再生に向けた緊急経済対策』でも、iPS細胞等を用いた再生医療等に係る研究開発・実用化を支援する環境整備に取り組むことが明記されている。平成25年2月には再生医療等の新規医療産業の国際競争力を高める司令塔機能として、内閣官房に『健康・医療戦略室』が設置された。また、平成25年4月26日成立の『再生医療推進法』には、再生医療の迅速かつ安全な研究開発及び提供並びに普及の促進に関する施策を総合的に策定及び実施する責務を国が有することが示されている。

再生医療（や細胞治療）に使用することを目的に生きた細胞を加工して製造される製品は細胞・組織加工製品と呼ばれ、国内外で活発に研究・開発が行われている。

[#] To whom correspondence should be addressed:

Yoji Sato; Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501; Tel: +81-3-3700-9373; Fax: +81-3-3700-9373; E-mail: yoji@nihs.go.jp

^{*} Testing Services Department, Central Institute for Experimental Animals

細胞ソースとしてはヒト体細胞に加え、近年ではヒト体性幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）などの幹細胞が対象とされてきている。また最近、生命倫理的な問題や免疫学的な拒絶をクリアできると考えられる人工多能性幹細胞（iPS細胞）が登場し、再生医療が社会的に大きな期待を集めている。しかしながら細胞・組織加工製品は、臨床使用経験が少ないために知見の蓄積も乏しく、国内指針やICH、WHOなどの生物製剤製造国際ガイドライン等にある従来の品質・安全性評価法が役立たないケースが頻出しており、新たに適切な評価技術を樹立することが火急の課題となっている。本研究では、新たなガイドライン作成に資する細胞・組織加工製品、特に幹細胞加工製品の品質・安全性評価法の開発を行うことを最終目的とする。具体的には、幹細胞の加工過程における未分化細胞／異常細胞の混入は、幹細胞加工製品においてがん化を引き起こすとして最も懸念される。最終製品に含まれるこれらの細胞の高感度かつ定量的な測定方法は開発が遅れている。そこで、本研究では汎用性・定量性のある幹細胞加工製品の造腫瘍性試験法の開発を目指した実験研究を展開する。また細胞の培養・加工過程での細胞の形質安定性も考慮に入れる必要があることから、培養工程での遺伝子発現の動態解析による品質評価法および遺伝子安定性評価法の開発に関する研究を行う。さらに安全性上の懸念として、ヒト多能性幹細胞株間での各種目的細胞への分化のし易さ（分化プロペンシティ）のバラツキがある。原材料の細胞の分化プロペンシティの情報は細胞株の選択に必要不可欠であり、その評価系は最終製品を見据えた細胞バンクの構築に必要である。未分化細胞において分化プロペンシティの評価系を含んだ細胞特性解析法を確立することにより、幹細胞由来加工製品の品質の一定性・有効性・安全性のさらなる確保に繋がることが期待される。

行政への貢献

本研究の成果により幹細胞加工製品の有効性・安全性に関する品質評価に必要な指標・試験法が示され、製品の迅速かつ経済的な開発を推進することが可能になることにより、特に治療困難な重篤な疾患に対して期待の大きい再生医療・細胞治療が実用化され普及することに貢献できる。国民に安全かつ有用性の高い再生医療・細胞治療をいち早く提供するという厚生労働行政の施策に大きく寄与するものと考えられる。具体的には、以下のことが挙げられる。1）幹細胞加工製品の合理的な製法、工程管理に必要な要件、品質評価方法の確立に貢献できる。2）均一性・再現性を確保するための原材料（幹細胞株／バンク）のあり方において、より合理的な規格の設定が可能となり、適切な開発が推進される。3）生命

科学の進歩に見合ったガイドラインや基準の策定及び改訂に役に立つ。4）幹細胞加工製品の科学的規制に関する国際調和に貢献できる。5）幹細胞加工製品の先進性、有用性に関する理解が深められる。

研究の進捗状況

平成24年度の研究としては、1.「汎用性・定量性のある幹細胞加工製品の造腫瘍性試験法の開発を目指した実験研究」として、新規免疫不全動物NOGヘアレスマウスを用いた造腫瘍性試験法の開発にむけた動物コロニーの拡大、および試験方法の条件検討を行った。2.「培養工程での遺伝子発現の動態解析に基づく品質・安全性評価指標の開発に関する研究」として、幹細胞の*in vitro*培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発を行い、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞のがん化と相関すると予想される遺伝子に関する機能解析を行った。3.「製造工程における遺伝子安定性評価法の開発に関する研究」として次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析の性能評価を行った。また、4.「幹細胞（未分化細胞）における分化プロペンシティの評価系の開発に関する研究」として、ヒト多能性幹細胞の分化プロペンシティを予測するための指標の同定の基盤となるデータの収集を行った。

1. 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発

我々は、重度免疫不全動物であるNOGマウスとヌードマウスにおけるHeLa細胞単独、あるいはマトリゲルとの混合物のTPD₅₀（投与した動物の半数で腫瘍を形成するために必要な細胞数）を検討し、マトリゲルに検体細胞を懸濁してNOGマウスに投与することにより、ヌードマウスを用いた従来の国際ガイドラインにある方法より数千倍高感度で腫瘍細胞を検出することが可能であることを示すデータを得ている。実験動物中央研究所では、このNOGマウスをヘアレス化した系統を樹立しており、NOGマウスと同様の条件において造腫瘍性細胞の検出能力の検討を行った（その際の動物は、体外受精させた胚を仮親に移植して大量生産する手法を用いて作出した80匹以上の同一週齢雄動物を用いた）。雄NOGヘアレスマウスにおけるHeLa細胞のTPD₅₀は、ヌードマウスの1/11（ $3.7 \times 10^4 / 4.2 \times 10^5$ ）、マトリゲルを混合した場合は1/2000（ $2.1 \times 10^2 / 4.2 \times 10^5$ ）であり、NOGマウスにおけるそれらよりも高値であった。これは、導入したヘアレス遺伝子がBalb/cマウス由来であり、免疫不全度が僅かながら低下したことによると推測された。NOGヘアレスマウスはNOGマウスと比較し、目視・触診による腫瘍形成の検出が容易であり、造腫瘍性試験の効率化が期待される。

2. 幹細胞の*in vitro*培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の*in vitro*培養時の遺伝子発現変化を網羅的に解析し, Ewing肉腫4種類 (Hs822.T, Hs863.T, RD-ES, SK-ES-1) を陽性対照として比較検討することにより, 細胞のがん化の指標となり得る候補遺伝子として, これまでにCyclin D2, IGF2BP1など9遺伝子を見出している. そこで平成24年度は, hMSCへのCyclin D2, IGF 2 BP 1の過剰発現によるhMSCの増殖能, 老化及び染色体数等への影響について検討し, さらにhMSCの遺伝子発現パターンの変化について網羅的に解析した. その結果, Cyclin D2の強制発現によってhMSCの増殖が亢進され, 遺伝子発現の網羅的解析により細胞増殖などに関わる遺伝子発現の有意な変化が認められた. Cyclin D2はhMSCでは細胞増殖に正に関与し, さらに細胞老化を遅らせることによって増殖の亢進に寄与した可能性も示された. 遺伝子発現の網羅的解析でhMSCと発現パターンが似ていたHs822.T及びHs863.Tはほぼ正常な染色体数だったのに対し, RD-ES及びSK-ES-1はどちらも染色体数が大きく変化し, hMSCの遺伝子発現パターンとの類似性と同様の傾向が見られた.

3. 次世代シーケンサーを用いた細胞の遺伝的安定性評価指標の開発

細胞の遺伝的安定性評価を目的としたホールゲノムシ

ークエンスおよびエクソンシーケンスから得られるデータの品質評価および遺伝子変異検出の効率に関して, モデル細胞を用いた実データから検討を行った. その結果, 点突然変異および小さな増幅, 欠失変異に対する検出率および正確性の高さが確認できた. 一方, 大きな欠失, 増幅ならびに転座などの複雑なリアレンジメントに関しては, 通常の解析では検出が難しいことがわかり, これらに特化したデータ解析手法の検討が必要であることがわかった.

4. 分化プロペンシティを指標とした細胞特性解析法の開発

無フィーダー培養した未分化状態のヒトiPS細胞9株において網羅的なmRNA発現情報をジーンチップにより取得した. さらに細胞特性評価に用いる候補遺伝子の今後の絞り込みのため, iPS細胞株間で統計学的に有意に発現量の異なる遺伝子群を抽出した. ジーンチップデータを取得したヒトiPS細胞株から低吸着ディッシュ上で胚葉体を形成させRNAの抽出の後に, 三胚葉マーカー遺伝子発現を定量的RT-PCRで測定し, 各々の細胞株の分化プロペンシティを主成分分析により数値化した. その結果, 第1主成分得点は中胚葉分化の正の指標および初期外胚葉分化の負の指標となることが示された.

研究の将来展望

これらの成果を更に展開することにより細胞・組織加

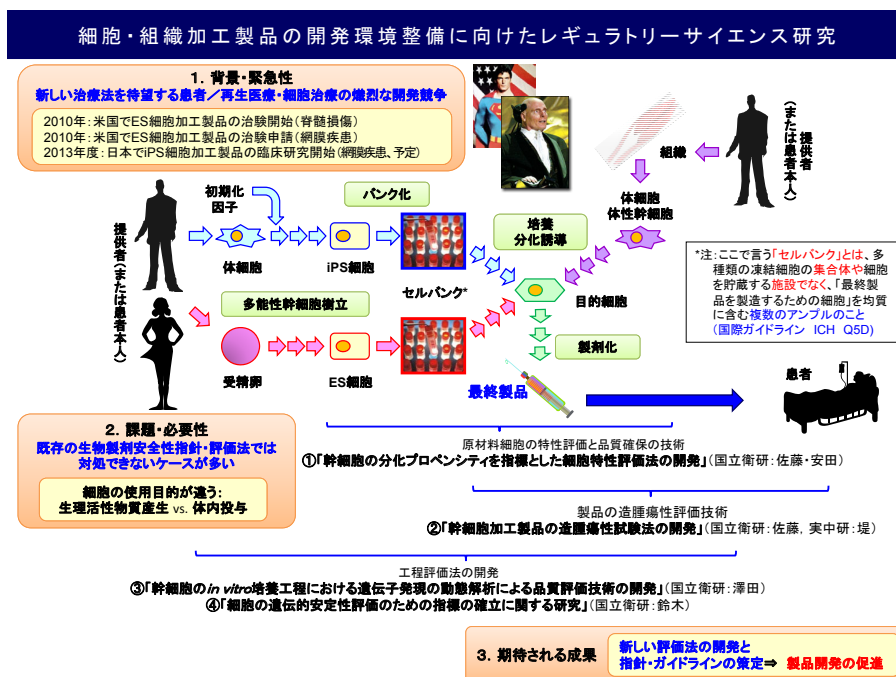


図 研究の背景・緊急性, 課題・必要性および期待される成果

工製品の有効性・安全性に関する品質評価に必要な指標・評価法が示され、迅速で適切な製品開発・審査および再生医療の実用化推進に貢献できると考えられる。

謝辞：本研究の成果は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究」（H24-医薬-指定-027）によるものである。