



令和元年10月7日

関西再生医療産業コンソーシアム(KRIC)基礎セミナー

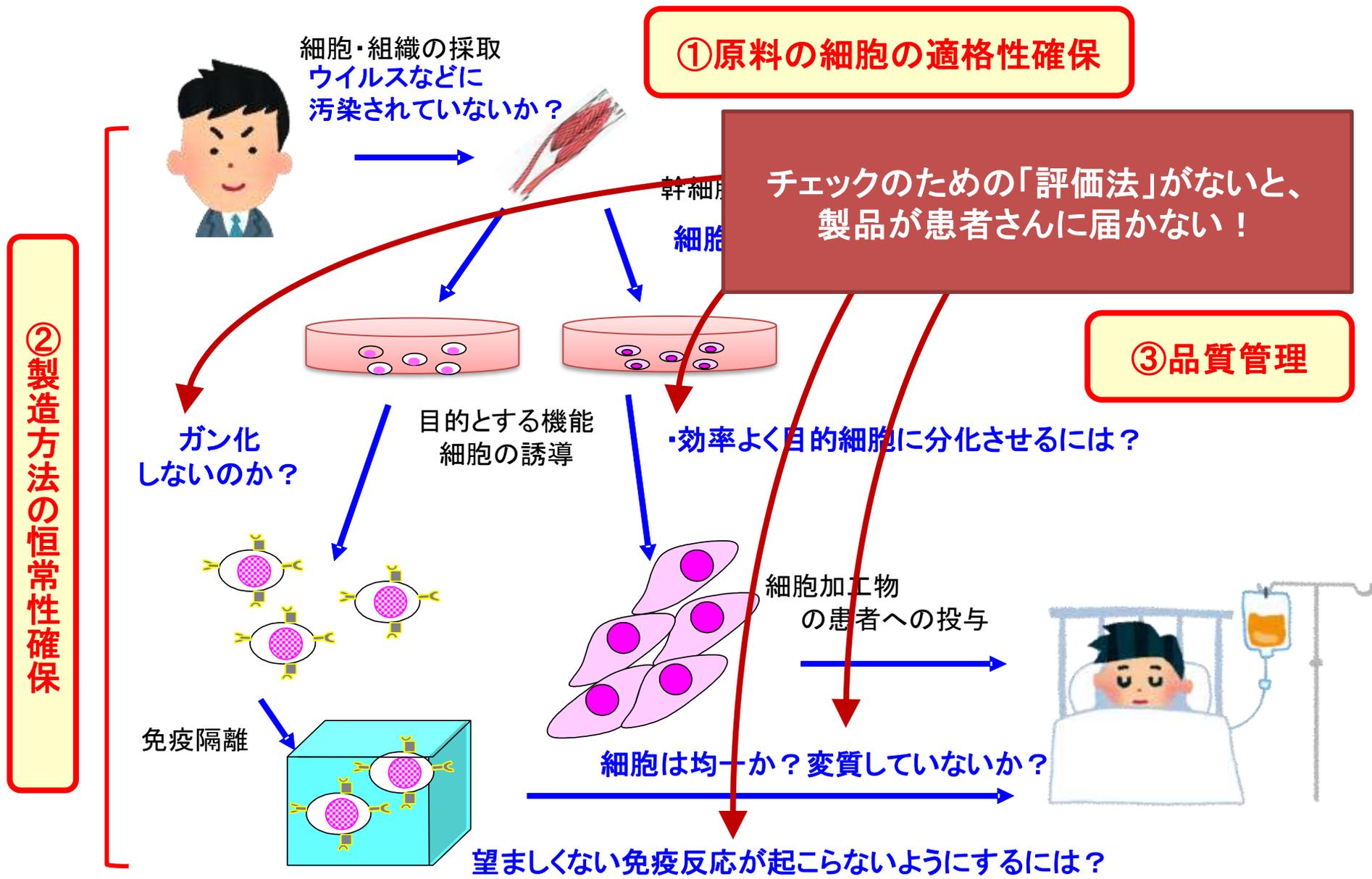
細胞加工製品の安全性・品質評価の 考え方について

国立医薬品食品衛生研究所
再生・細胞医療製品部

安田 智

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

細胞加工製品(再生医療等製品)の品質・有効性・安全性の確保



- 1. ヒト細胞加工製品における造腫瘍性関連試験法ガイドライン**
- 2. ヒトiPS細胞株の分化傾向予測マーカー**

**1. ヒト細胞加工製品における造腫瘍性関連
試験法ガイドライン**

2. ヒトiPS細胞株の分化傾向予測マーカー

何をどう評価すべきなのか？

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

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

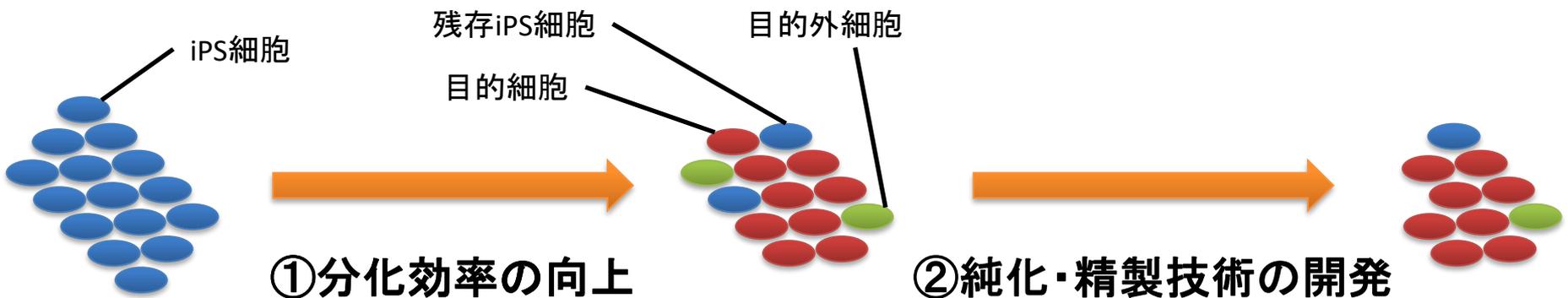
非臨床段階での
安全性・有効性の予測

臨床評価の
あり方

ヒトES/iPS細胞加工製品の品質・安全性

- 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
- 加工に伴う**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・造腫瘍性細胞の**除去・残留を確認する試験法が不可欠**

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)

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

薬生機審発0627第1号
令和元年6月27日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長
（ 公 印 省 略 ）

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ガイドラインについて

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、代表的検出試験例及び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ガイドラインを、別紙のとおり作成しましたので、貴管下関係業者等に対し周知方御配慮願います。

なお、本ガイドラインは、現時点における科学的知見に基づく基本的考え方をまとめたものであり、学問上の進歩等を反映した合理的根拠に基づいたものであれば、必ずしもここに示した方法を固守するよう求めるものではありません。

「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
 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

⇒従来のバイオロ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、フローサイトメトリー、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」

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ール)

「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

- 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)

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+ポドカリキシン)	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

5.2.1. 中間製品・最終製品の未分化多能性幹細胞検出試験

5.2.1.2. *in vivo* 試験

- 製品中の未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在は、適切な細胞特性指標を用いて *in vitro* 試験で検査し、評価することが望ましい。ただし、製品における未分化ヒト ES/iPS 細胞の混在量は、免疫不全動物での造腫瘍性を指標にして評価することも必須ではないが可能である。
- 投与部位については、手技が簡単で、手技熟練度による結果のバラツキを防ぐこと、多くの製品細胞を投与することが可能であること、かつ、容易に腫瘍形成の時間経過を観察することができることから、**背部皮下が一般的に用いられる。**
- 試験時又は事前に検討する陽性対照群においては、異なる用量の未分化ヒト ES/iPS 細胞を含む細胞試料を移植した複数の群を設定し、**最低腫瘍形成用量(TPD_{min}:minimum tumor-producing dose)と腫瘍出現までの期間を確認する必要がある。**観察期間については、陽性対照群の中のTPD_{min}における腫瘍形成確率が一定値に達する時点を十分超える期間とする。
- なお一般には、未分化 ES/iPS 細胞検出 *in vivo* 試験は、中間製品・最終製品の形質転換細胞検出試験(5.2.2.2.項)を兼ねて実施するのが現実的である。

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

5.2.2.中間製品・最終製品の形質転換細胞検出検出試験

5.2.2.2. *in vivo* 試験

- 製品中の腫瘍形成能を持つ形質転換細胞の混在は、**適切な細胞特性指標を用いて *in vitro* 試験で検査し、評価することが望ましい**。ただし、製品における形質転換細胞の混在量は免疫不全動物での造腫瘍性を指標にして評価することも必須ではないが可能である。
- 中間製品又は最終製品における形質転換細胞の混在量を評価する際には、陽性対照細胞とする形質転換細胞を設定する必要がある。
- 本試験はあくまで、中間製品又は最終製品における**造腫瘍性細胞の混在の有無を評価するものであって、ヒトでの悪性腫瘍化を直接評価する試験ではないこと**を認識しておく必要がある。
- なお、形質転換細胞の造腫瘍性に対して移植部位の微小環境が影響を与えることが知られている。したがって、例えば背部皮下移植試験を行う場合、皮下移植以外の投与での臨床使用が想定されている製品については、**背部皮下移植では腫瘍を形成しない形質転換細胞の存在の可能性を考慮したうえで製品のリスク評価を行うこと**。

「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

- 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・原材料の品質特性評価・品質管理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混在を評価するための試験
 - 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
 - 試験動物の選択
 - 対照細胞の選択
 - 試験動物の数と性別
 - 試験検体の投与部位と検体中の細胞数及び検体の形態
 - 観察期間
 - 投与部位の観察
 - 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・原材料の品質特性評価・品質管理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 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)

最終製品の非臨床安全性試験

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①

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。

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②

- 物理的障害を生ずるなどの理由により**当該部位に対する投与細胞数に限界がある場合には、可能であれば投与部位を変更するのではなく、動物とヒトとの間の当該投与部位の相対的スケール比に応じた投与細胞数の調節などを検討する。**
- ただし、**前臨床段階での試験結果のヒトへの外挿性を検討するときには、ヒト体内局所微小環境を形成する液性因子や受容体タンパク質等の要素はそれぞれ高いヒト特異性を示し、生着部位の微小環境が動物においてどの程度モデル化できているかが不明であることにも留意する。**

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①

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。

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

5.3.2. 対照細胞の選択

- 免疫不全動物を用いた *in vivo* 造腫瘍性試験では、製品細胞又は陰性対照細胞となるヒト二倍体細胞に陽性対照細胞をスパイクした陽性対照群が設けられていることが望ましい。
- **陽性対照細胞の種類は、製品中に含まれている造腫瘍性細胞として何を想定するかによって異なる**。製品中に含まれている造腫瘍性細胞の特性が予め推定されており、かつこれに類似する表現型を示す細胞株が利用可能な場合には、その細胞株を選択する。
- **そのような細胞株が利用可能でない場合は、腫瘍形成能が良く研究され認知されているHeLa細胞等を陽性対照細胞として使用する**。
- **陽性対照群が設定できない場合には、試験結果が陰性であっても真の陰性なのか偽陰性なのかの評価が困難になる点、つまり、期待する性能の試験が実施できたのか、及び試験結果によってどのような評価が可能であるのかという点を説明する必要が生じることに留意し、造腫瘍性試験の実施の意義を検討する**。

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

5.3.5. 観察期間

- 観察期間の長さは、陽性対照群の有無や移植細胞及びその分裂により生じた細胞の体内での推定生存期間などによって異なる。
- 陽性対照細胞を最終製品又は同じ細胞種の正常細胞のような陰性対照細胞にスパイクした陽性対照群のある場合は、試験時又は事前検討において、陽性対照群の中で腫瘍形成が認められる TPD_{min} を確認すること。 TPD_{min} における腫瘍形成確率が一定値に達する時点を十分超えた時点まで観察することにより、造腫瘍性の有無を判断することができる。
- 陽性対照群がある場合でも、最終製品中の細胞の遺伝的安定性が低いことが明らかな場合など、投与後に生着部位において投与された細胞が形質転換することにより腫瘍が形成されることが強く懸念される場合には、より長期の観察が必要になると考えられる。
- 陽性対照群の有無の他に、動物種、系統、病態、免疫抑制状態なども勘案し、合理的に説明可能な観察期間を設定すること。

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

5.3.8. 結果の解釈

- 製品細胞投与群において腫瘍形成が認められた場合には、腫瘍を構成する細胞がヒト由来の細胞であるか否かについて明らかにするとともに、製品中の造腫瘍性細胞の混在量を確認しつつ、製品の製法や品質規格の変更を検討すること。
- 製品細胞投与群において腫瘍形成が認められなかった場合には、偽陰性の可能性について、陽性対照細胞の TPDmin 値などから考えられる *in vivo* 造腫瘍性試験の性能を踏まえて考察する。
- 試験結果の解釈は、あくまで混在造腫瘍性細胞の造腫瘍性を陽性対照細胞と同等と仮定した上でなされるものであることに留意すること。

まとめ

- 「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)が、厚生労働省医薬・生活衛生局医療機器審査管理課長通知として、令和元年6月27日に発出された。
- 本ガイドラインは、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に参考と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している。
- 同時に、本ガイドラインは、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している。

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

1. ヒト細胞加工製品における造腫瘍性関連
試験法ガイドライン

2. ヒトiPS細胞株の分化傾向予測マーカー

何をどう評価すべきなのか？

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

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

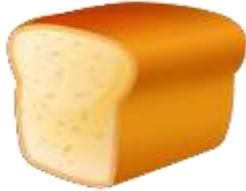
最終製品の品質確保

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



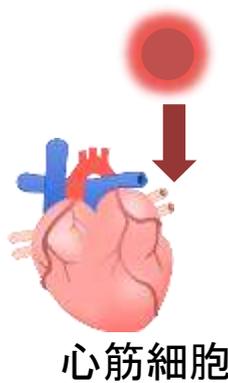
清酒酵母



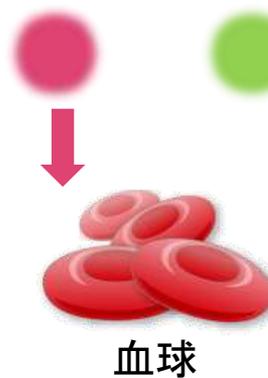
目的に合った酵母を使い分けることで、各品目で高品質な(美味しい)製品を作ることができる
「素材へのこだわり」「至高の素材」「厳選素材」「選び抜かれた素材」



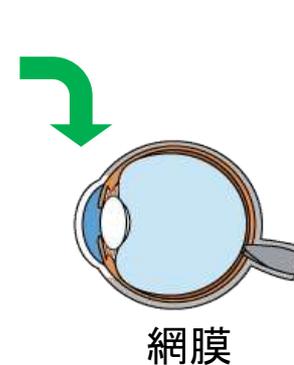
神経細胞



心筋細胞



血球

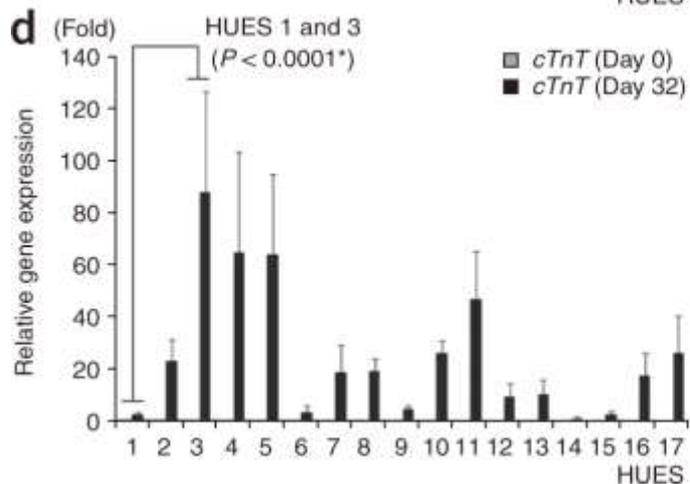
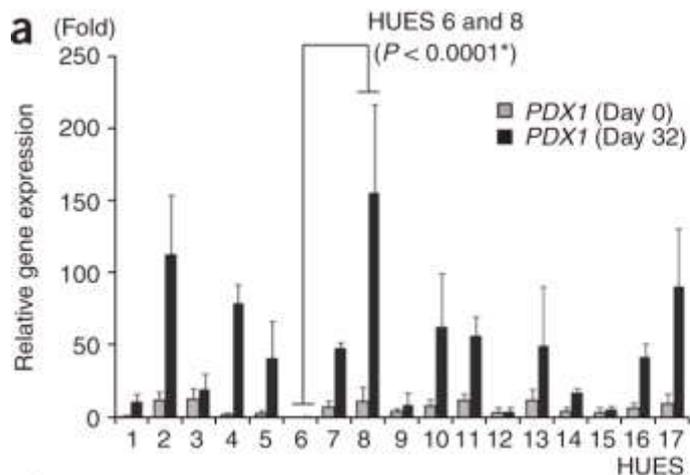


網膜

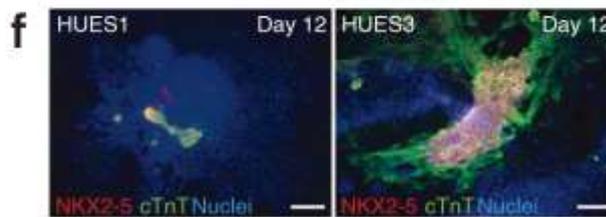
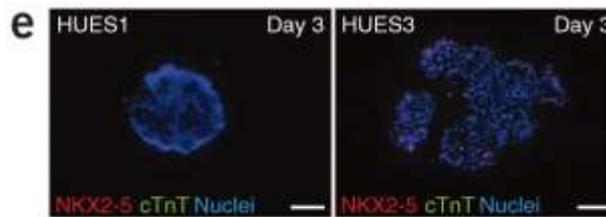
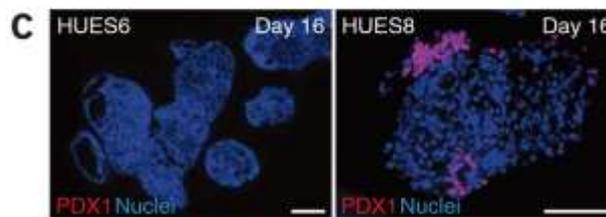
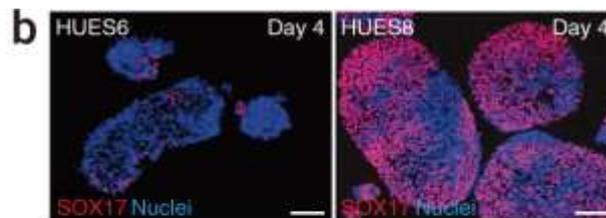
「高い再現性で品質の高い最終製品(分化細胞)を製造(誘導)する」
という目的に適った素材(例:専用のiPS細胞株)を選択することが重要

ヒトES細胞株の分化傾向の違い

膵臓前駆細胞
マーカー



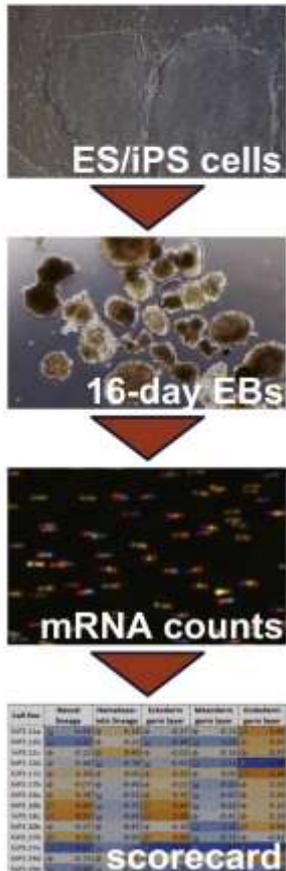
心筋細胞
マーカー



Nat Biotechnol 26, 315-5 (2008)

ヒトES細胞株間で膵島細胞や心筋細胞への分化の程度は大きく異なる

ヒトiPS細胞株の分化傾向の違い



Cell line	Neural lineage	Hematopoietic lineage	Ectoderm germ layer	Mesoderm germ layer	Endoderm germ layer
hiPS 11a	-0.69	0.18	-0.37	-0.23	0.83
hiPS 11b	-1.17	-0.23	-0.96	-1.03	0.47
hiPS 11c	-0.22	0.40	-0.03	-0.16	0.37
hiPS 15b	-0.48	-0.78	-0.63	-1.11	-2.49
hiPS 17a	0.19	0.05	0.33	0.00	1.16
hiPS 17b	-0.07	-0.48	-0.02	-0.83	0.20
hiPS 18a	0.28	-0.52	0.31	-0.67	0.20
hiPS 18b	0.80	-0.72	0.84	-0.62	0.15
hiPS 18c	0.93	-0.65	1.05	-0.41	0.10
hiPS 20b	-0.37	-0.47	-0.30	-1.16	0.56
hiPS 27b	0.52	-0.50	0.68	-0.71	-0.42
hiPS 27e	-1.61	-1.04	-2.12	-1.82	-3.27
hiPS 29d	-0.25	-0.04	0.00	-0.11	0.83
hiPS 29e	-0.99	-0.60	-1.15	-1.14	-1.08

Differentiation propensity: ■ high ■ medium ■ low

↑
↗
→
↘
↓

Cell 144, 439-452 (2011)

ヒトiPS細胞株間でも神経系、造血系、三胚葉への分化の程度は大きく異なる

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

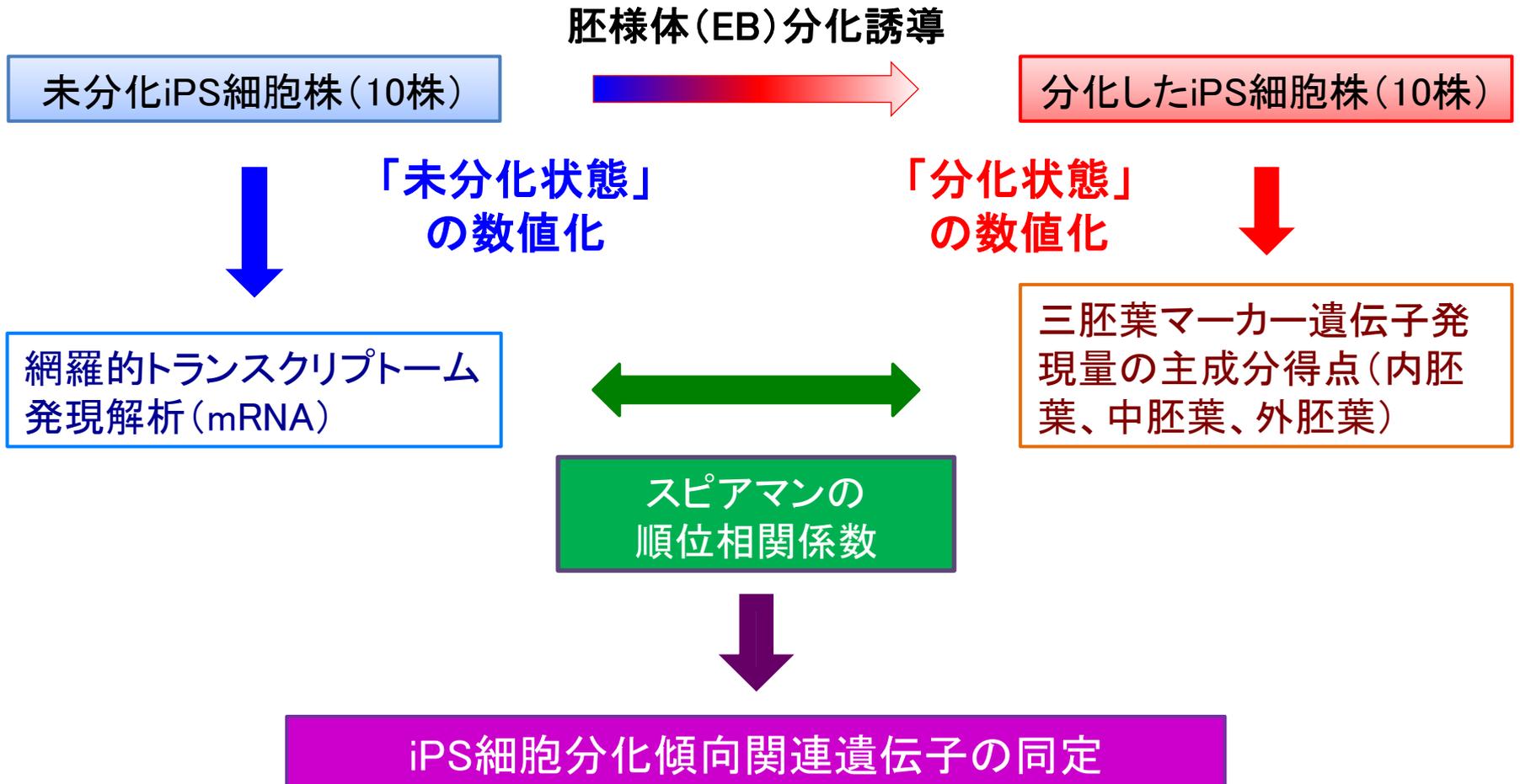
Article | [Open Access](#) | Published: 15 May 2019

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

Takuya Kuroda, Satoshi Yasuda, Shiori Tachi, Satoko Matsuyama, Shinji Kusakawa, Keiko Tano, Takumi Miura, Akifumi Matsuyama & Yoji Sato 

Nature Communications **10**, Article number: 2175 (2019) | [Download Citation](#) 

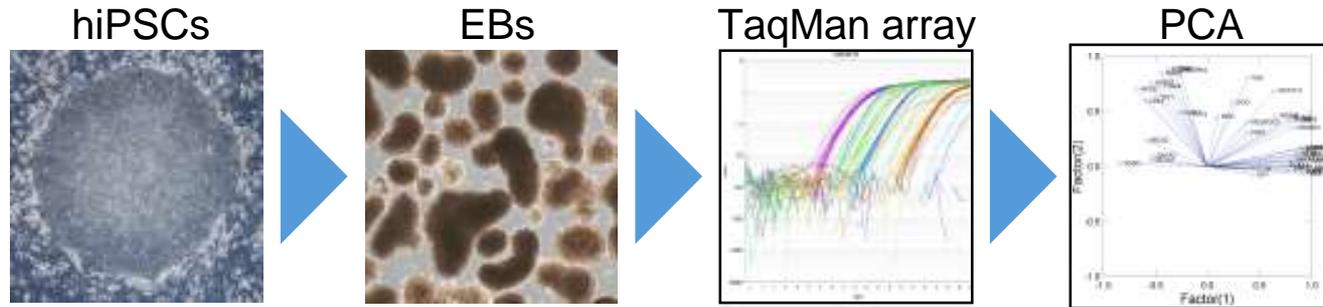
分化傾向予測マーカーの探索



ヒトiPS細胞株

iPS細胞株名	由来細胞	導入遺伝子	導入方法
201B7	皮膚線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
253G1	皮膚線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4	レトロウイルス
409B2	皮膚線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc Lin28, p53 shRNA	エピゾーマル ベクター
HiPS-RIKEN-1A (R-1A)	臍帯由来線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
HiPS-RIKEN-2A (R-2A)	臍帯由来線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
HiPS-RIKEN-12A (R-12A)	臍帯由来線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4	レトロウイルス
Human mc-iPS (mc-iPS)	脂肪幹細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	プラスミド
Tic	肺線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
ATCC-DYR0100 hiPSC (Ai-100)	皮膚線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス
ATCC-HYR0103 hiPSC (Ai-103)	肝線維芽細胞	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス

分化傾向の順位付け

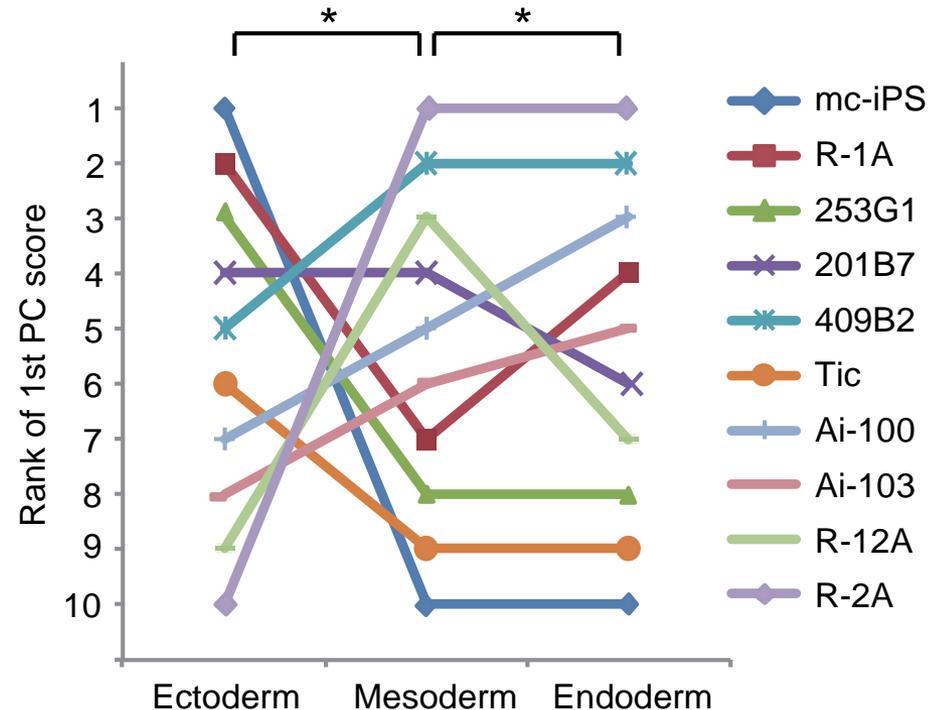


外胚葉マーカー:45遺伝子 中胚葉マーカー:56遺伝子 内胚葉マーカー:27遺伝子

第一主成分得点

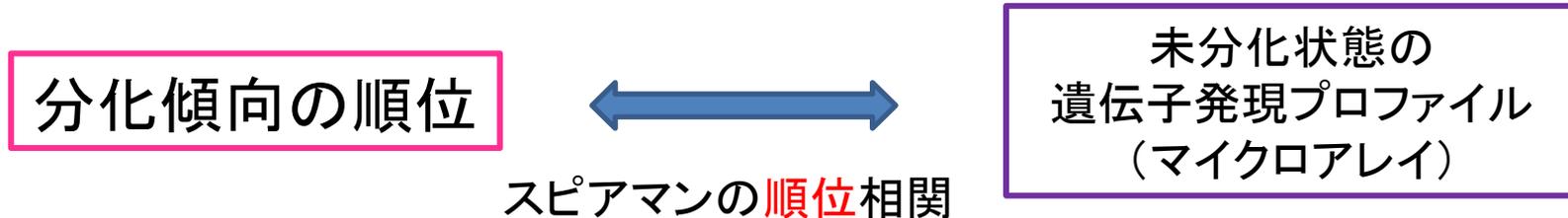
Cell line	Differentiation lineage		
	Ectoderm	Mesoderm	Endoderm
201B7	23.5	1.5	1.2
253G1	23.8	-12.6	-9.5
409B2	-11.8	18.5	9.3
Ai-100	-17.7	0.9	5.6
Ai-103	-18.0	0.2	3.0
mc-iPS	28.5	-32.2	-18.1
R-1A	25.4	-2.5	4.4
R-2A	-20.3	41.1	18.4
R-12A	-19.1	12.1	-0.4
Tic	-14.3	-27.0	-13.8

■ High □ Medium ■ Low



スピアマンの順位相関解析

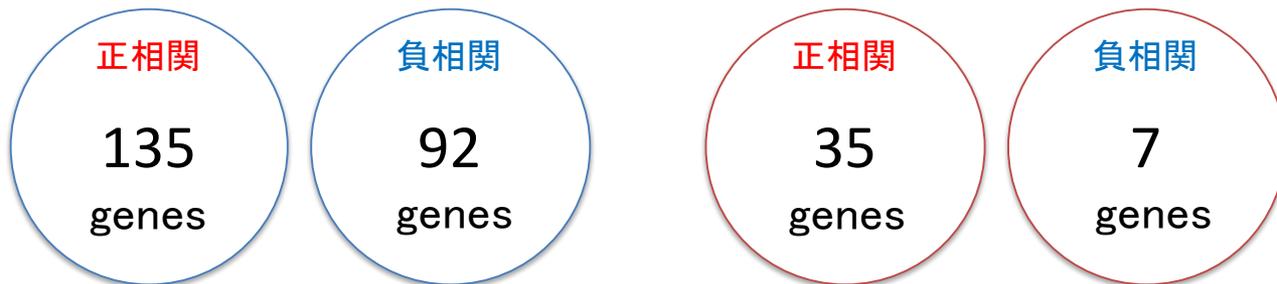
分化傾向と相関のある遺伝子の同定



分化傾向予測マーカ候補遺伝子

外胚葉

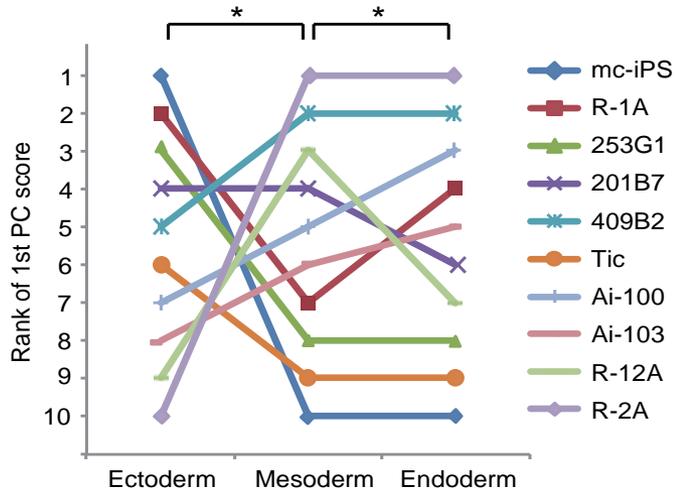
中胚葉



内胚葉



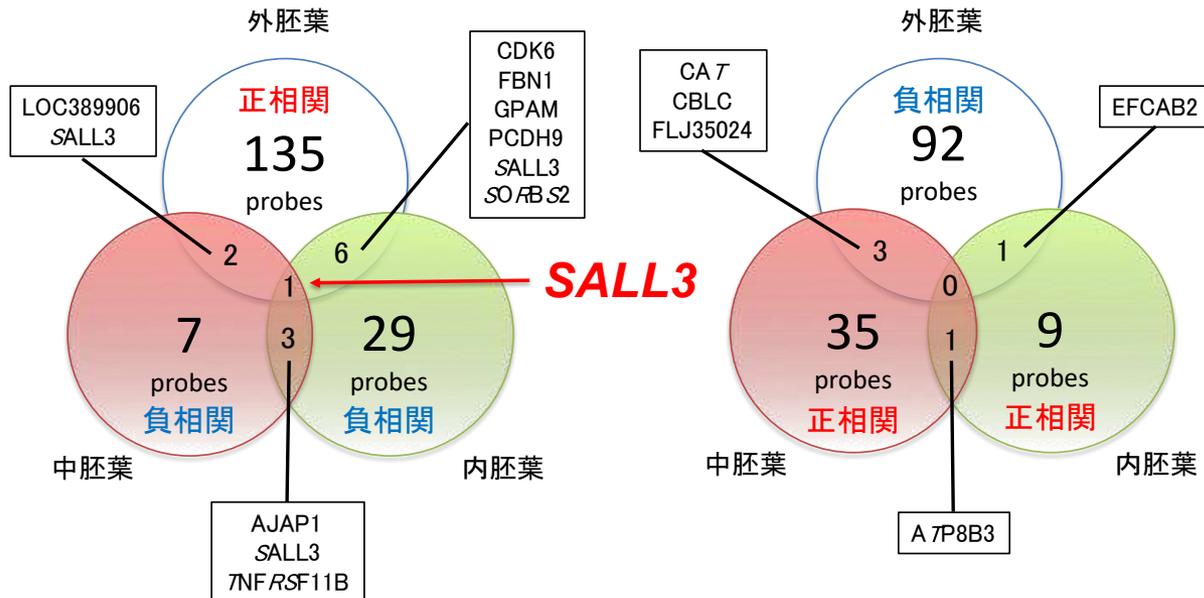
ヒトiPS細胞の分化傾向マーカー SALL3



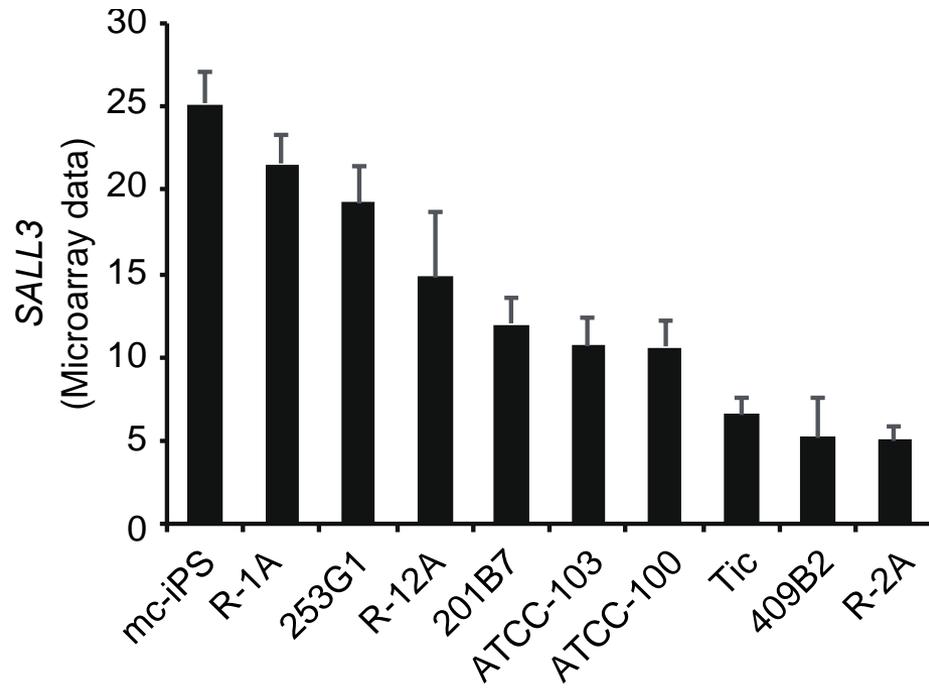
外胚葉になりやすい株は中・内胚葉になりにくい
 中・内胚葉になりやすい株は外胚葉になりにくい

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



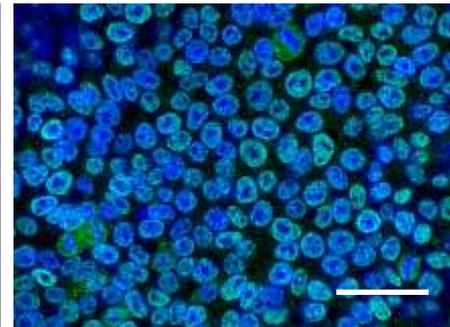
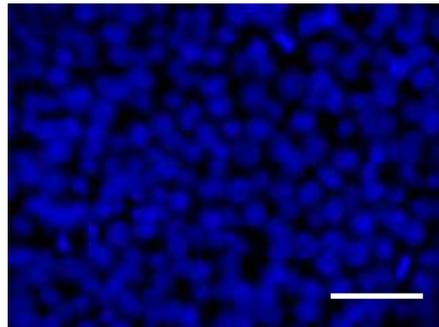
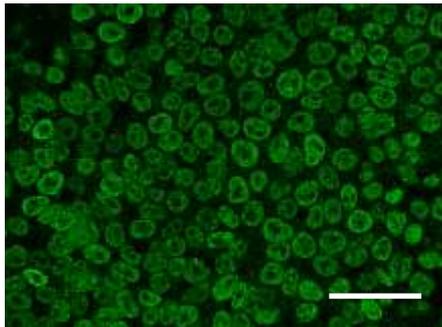
ヒトiPS細胞株におけるSALL3発現



α -SALL3

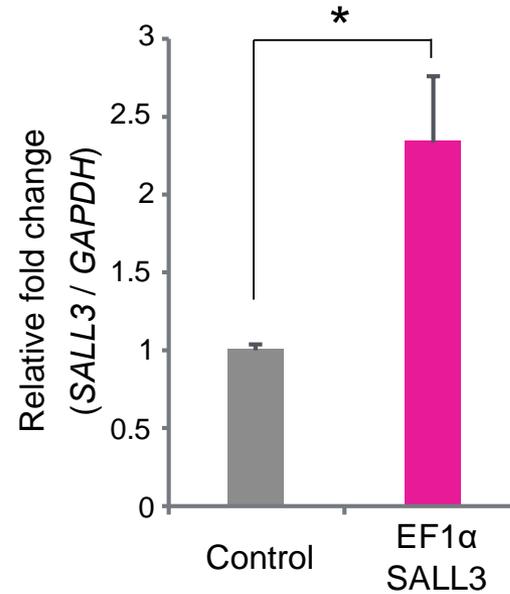
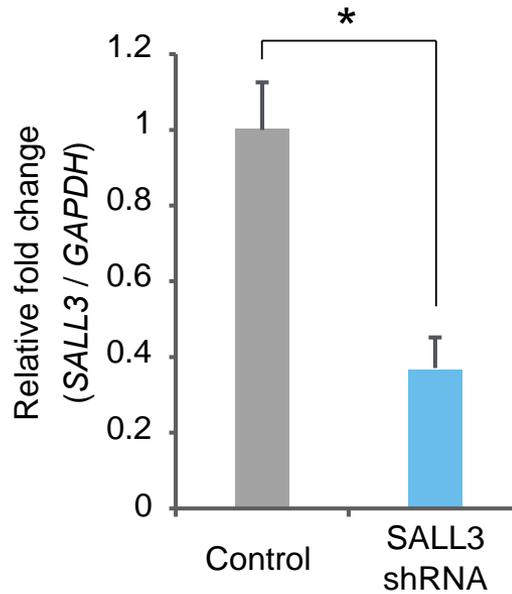
DAPI

Merge

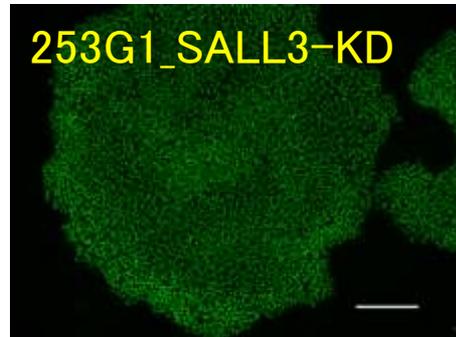


Scale bar: 50 μ m

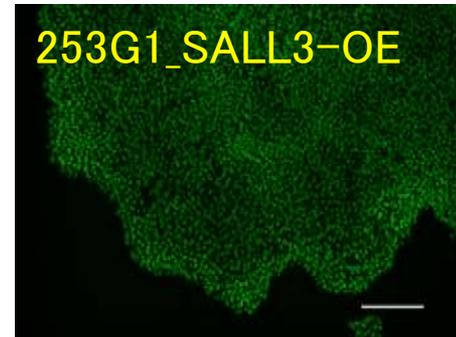
253G1 SALL3-KD, SALL3-OE株



OCT3/4

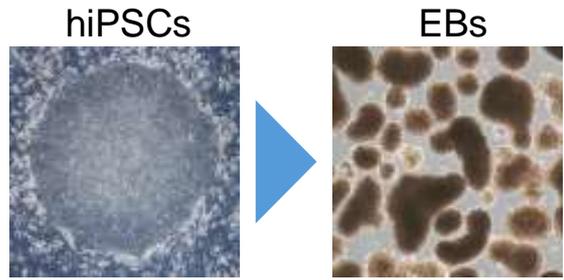


253G1_SALL3-KD



253G1_SALL3-OE

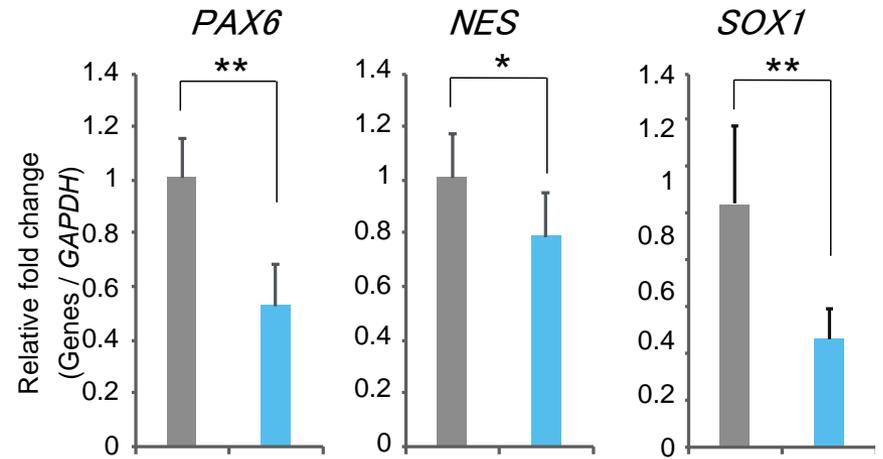
253G1 SALL3KD株 EB分化



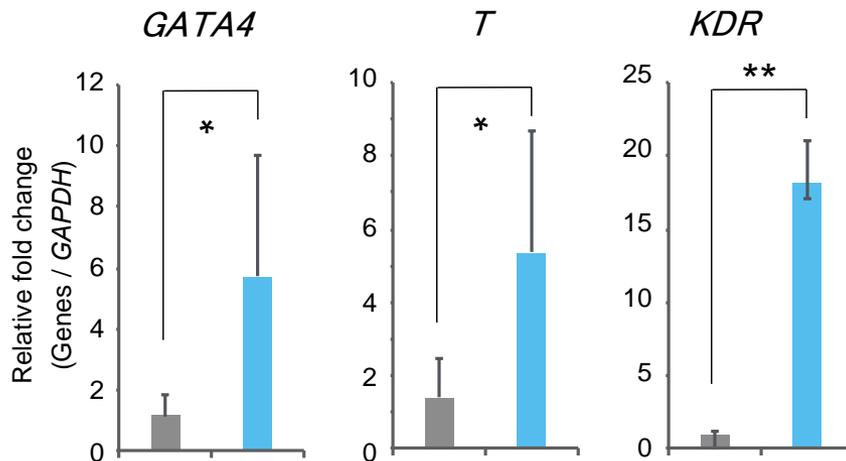
Control shRNA

SALL3 shRNA

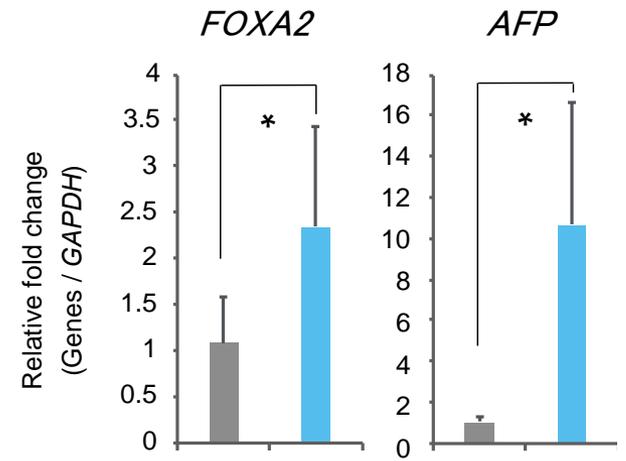
外胚葉マーカー



中胚葉マーカー



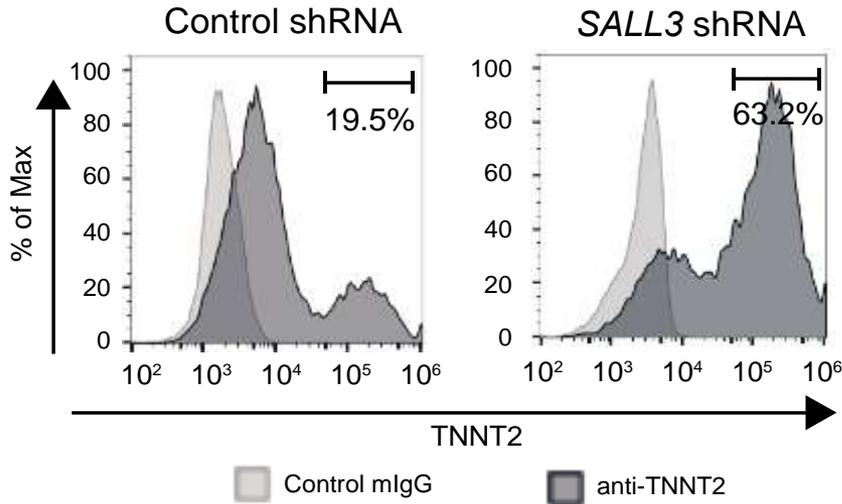
内胚葉マーカー



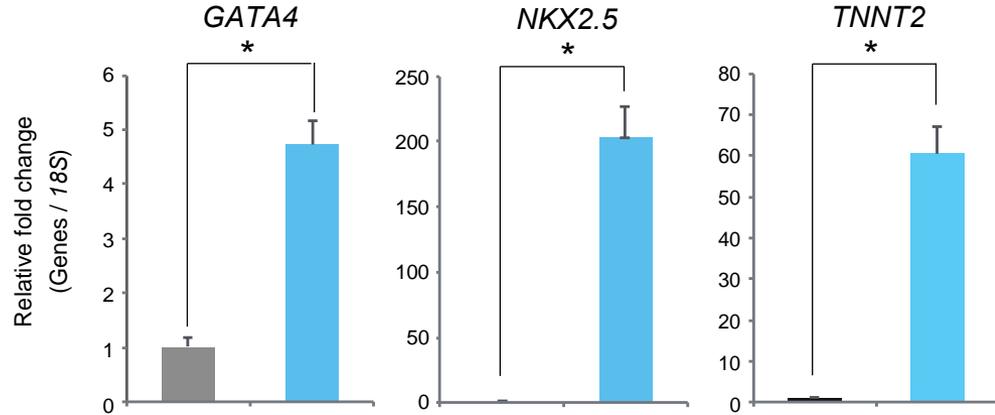
253G1 SALL3 KD/OE株 心筋分化誘導

心筋分化誘導 (Day14)

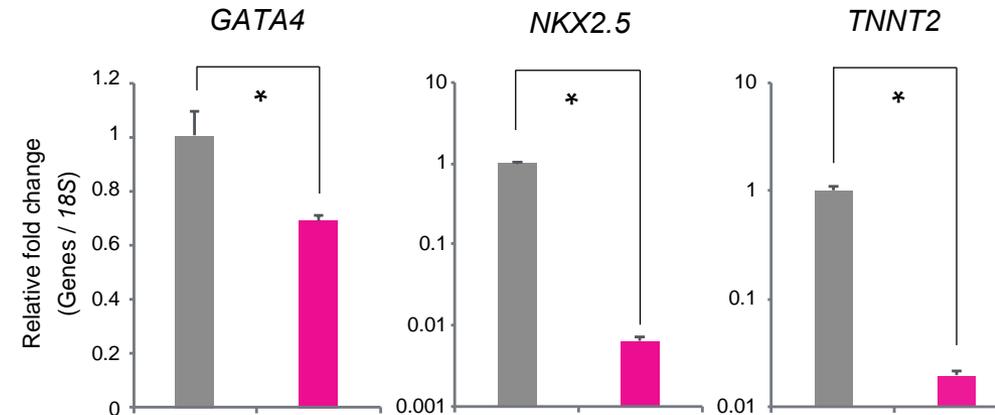
253G1_SALL3-KD株



253G1 SALL3-KD株



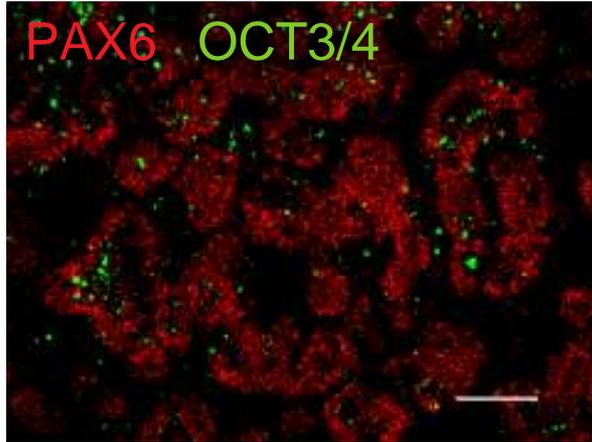
253G1 SALL3-OE株



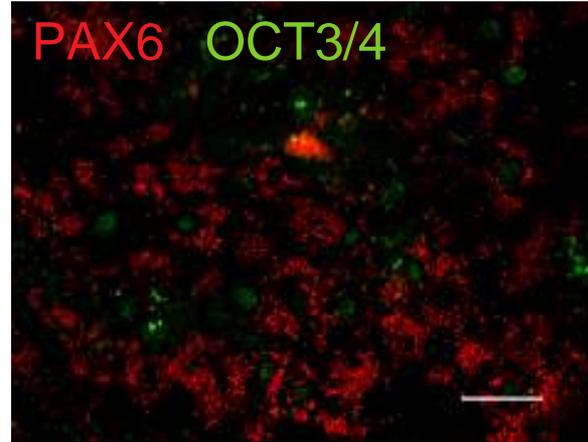
253G1 SALL3 KD/OE株 神経分化誘導

神経分化誘導 (Day10)

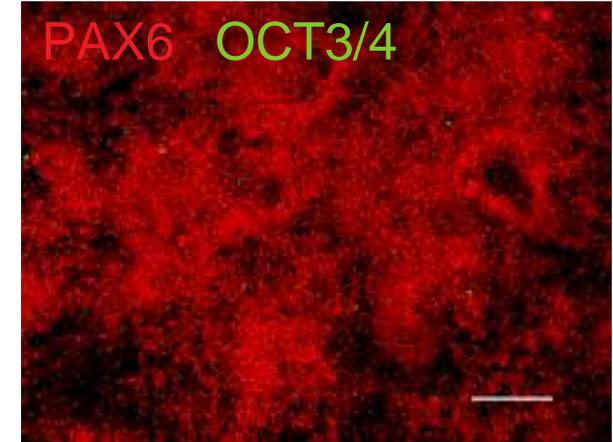
PAX6: 外胚葉マーカー



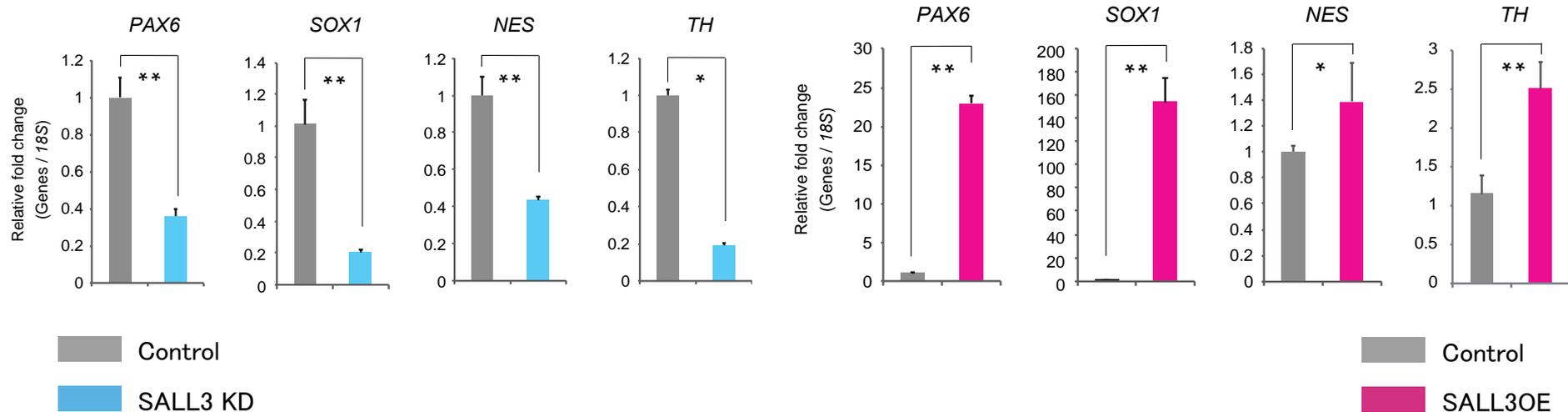
253G1



253G1_SALL3-KD

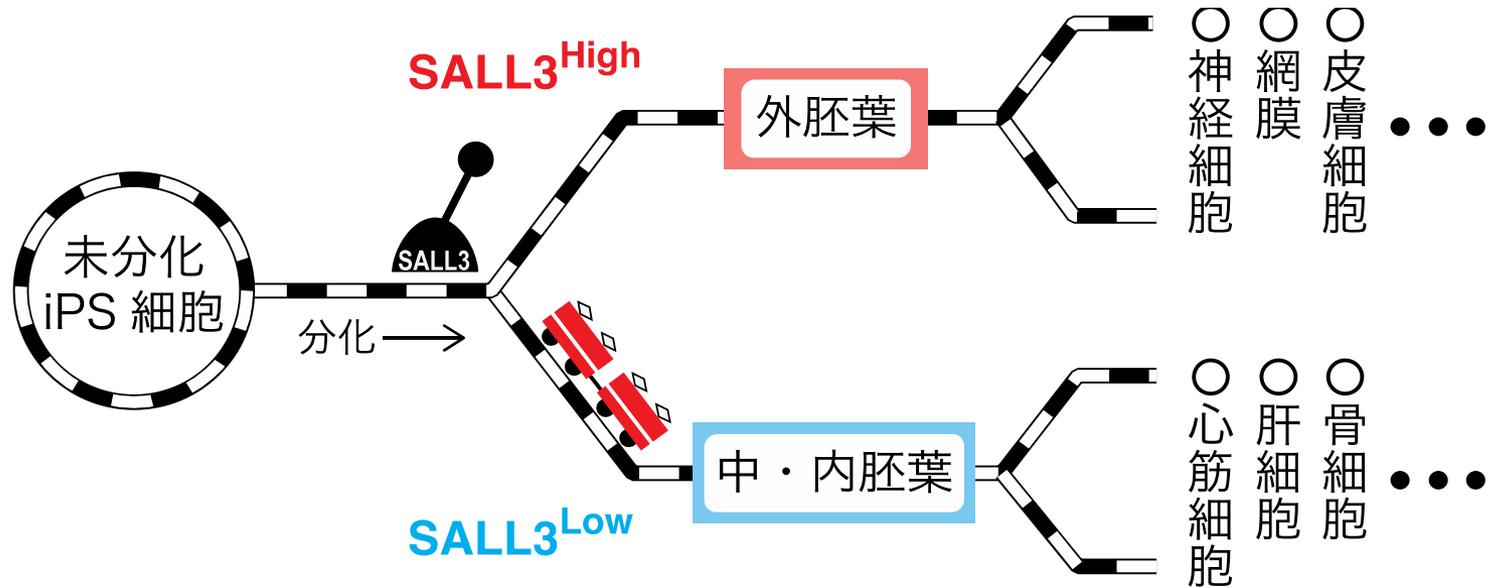


253G1_SALL3-OE



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。

SALL3 Interacts with DNMT3A and Shows the Ability To Inhibit CpG Island Methylation in Hepatocellular Carcinoma^{∇†}

Yuko Shikauchi,¹ Akio Saiura,² Takahiko Kubo,¹ Yasuharu Niwa,¹ Junji Yamamoto,²
Yaeko Murase,¹ and Hirohide Yoshikawa^{1*}

Department of Epigenetic Carcinogenesis¹ and Department of Surgery,² The Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, 3-10-6, Ariake, Koto-ku, Tokyo 135-8550, Japan

Received 25 May 2008/Returned for modification 26 June 2008/Accepted 2 January 2009

The mechanisms of aberrant CpG island methylation in oncogenesis are not fully characterized. In particular, little is known about the mechanisms of inhibition of CpG island methylation. Here we show that sal-like 3 (SALL3) is a novel inhibitory factor for DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3A). SALL3 binds to DNMT3A by a direct interaction between the double zinc finger motif of SALL3 and the PWWP domain of DNMT3A. SALL3 expression reduces DNMT3A-mediated CpG island methylation in cell culture and in vitro. CpG island methylation is enhanced in SALL3-depleted cells. Consistently, DNMT3A from SALL3-depleted cells increases methyltransferase activity in vitro. Binding of DNMT3A to chromatin is reduced or increased by SALL3 expression or depletion, respectively, accounting for the mechanism by which SALL3 inhibits DNMT3A-mediated CpG island methylation. We also show that SALL3 is inducible by BMP-4 and silenced by associated DNA methylation in hepatocellular carcinoma (HCC). Our results suggest that silencing of SALL3 results in acceleration of DNA methylation in HCC. This functional characterization of SALL3 sheds light on regulatory mechanisms for DNMT3A and provides new strategies to inhibit aberrant methylation in cancer.

肝細胞がんにおいてSALL3はDNMT3Aに結合し、CpGアイランドのメチル化を阻害することが報告されている。

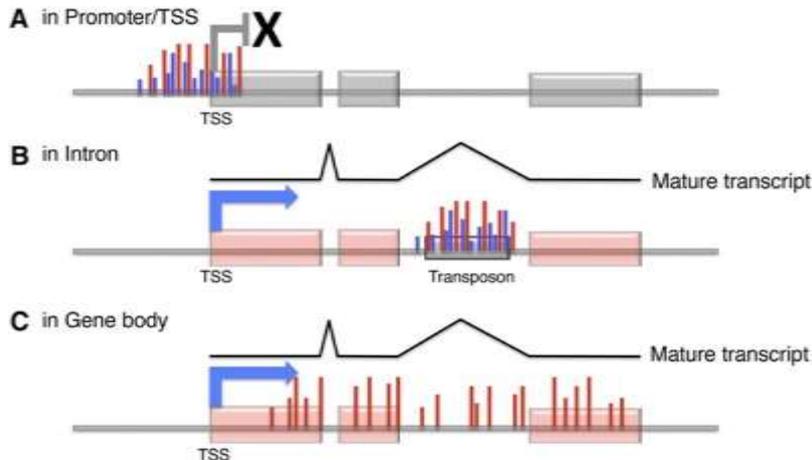
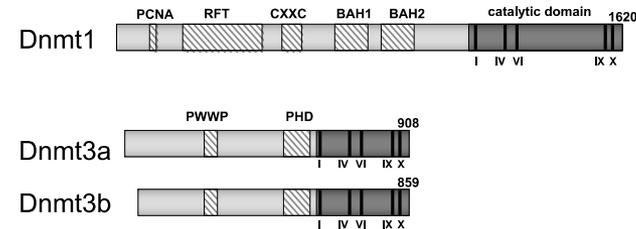
DNAメチル化

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



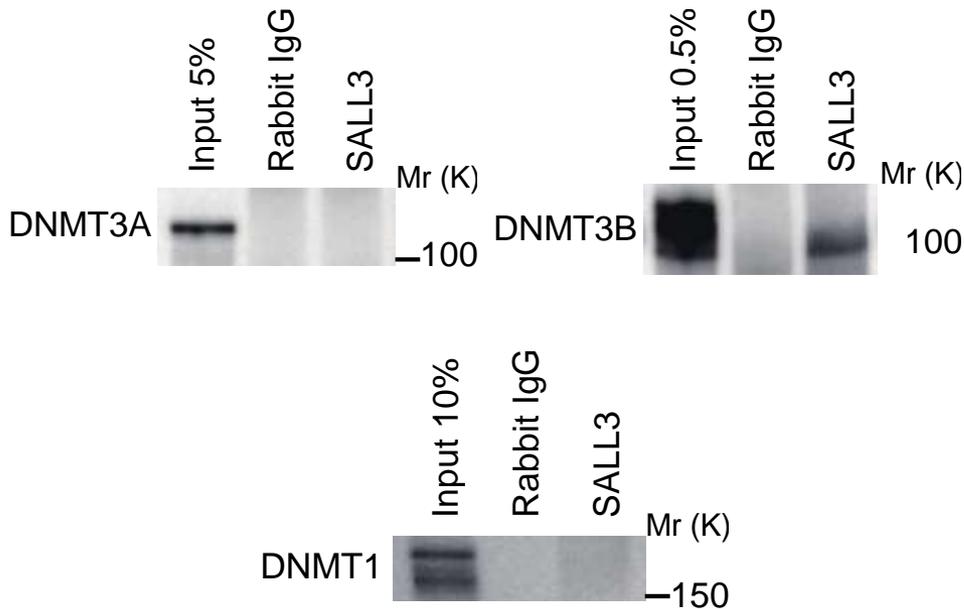
(A)一般的に、DNAのメチル化によって転写因子の結合が阻害され遺伝子発現が抑制される

(B)イントロンのDNAメチル化によってトランスポゾンをスキップする

(C)Gene bodyのDNAメチル化は転写を促進する(DNMT3B)

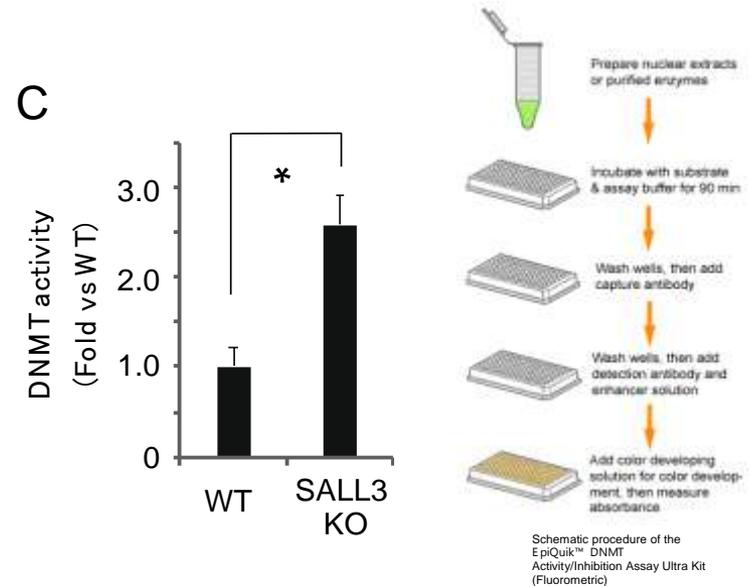
SALL3はDNMT3Bと結合しメチル化活性を調節する

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



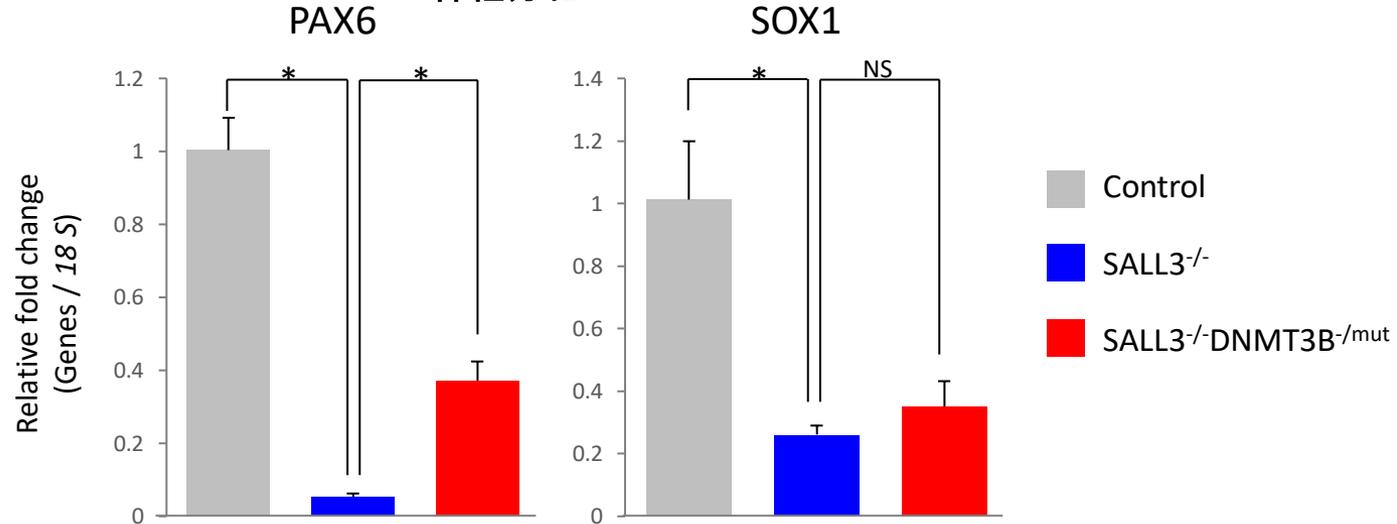
SALL3KO株の核画分のDNMT活性は
WT株よりも高い

SALL3はDNMT3BのDNMT活性を阻害していることが予想される

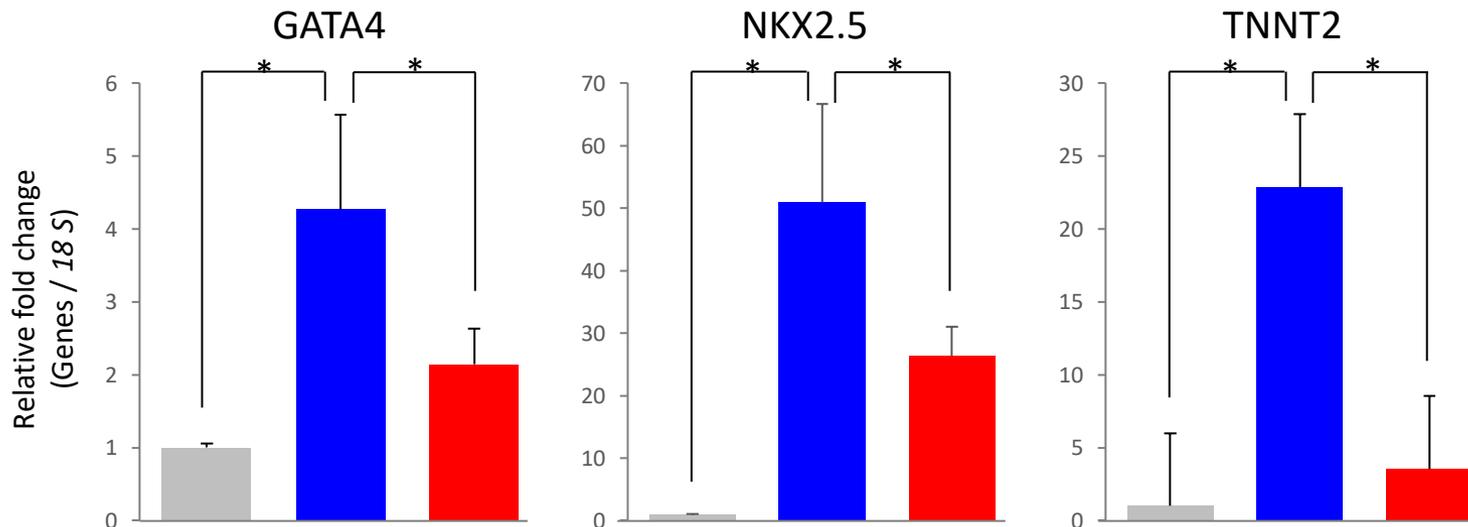
DNMT3B発現抑制はSALL3欠損を部分的に補う



神経分化マーカー



心筋分化マーカー



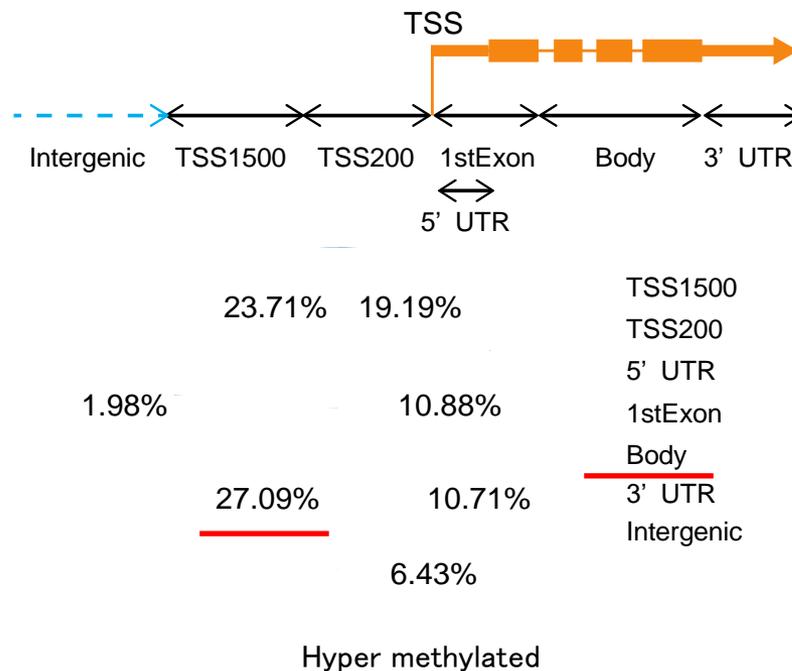
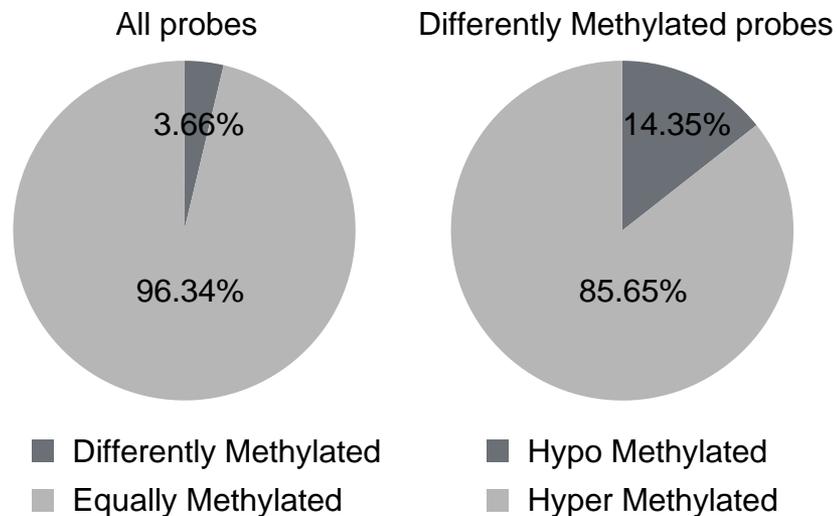
DNAメチル化解析(ビーズアレイ)



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

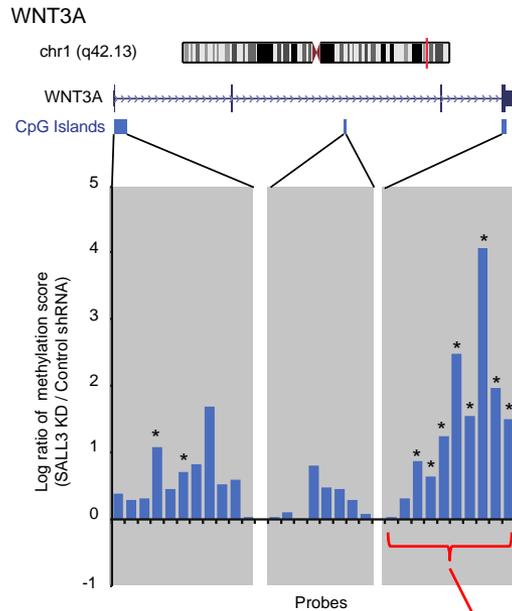
Pathway	-log(P-value)	Overlap	Molecules
Axonal Guidance Signaling	1.01E-10	18.2 % (83/457)	ABLIM1, ABLIM2, ADAM11, ADAM19, ADAMTS2, ADAMTS7, ADAMTS9, ARHGEF6, ARHGEF12, ARPC1B, BMP4, BMP7, BMP8A, BMP8B , C9orf3, CDK5, DPYSL5, ECE2, ECEL1, EFNA3, EPHA2, EPHA8, EPHA10, EPHB1, EPHB2, EPHB3, FZD5 , GDF7, 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

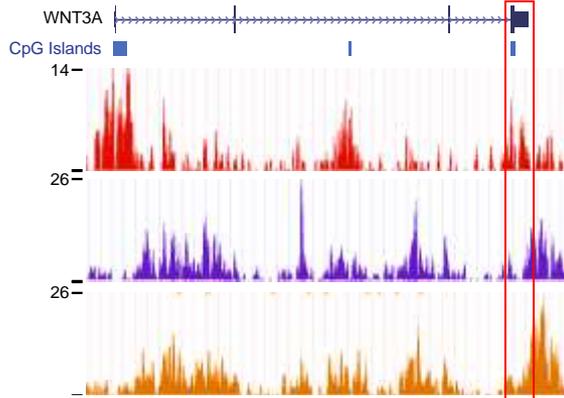


ChIP-Seq

253G1 Control shRNA
anti-SALL3

253G1 Control shRNA
anti-DNMT3B

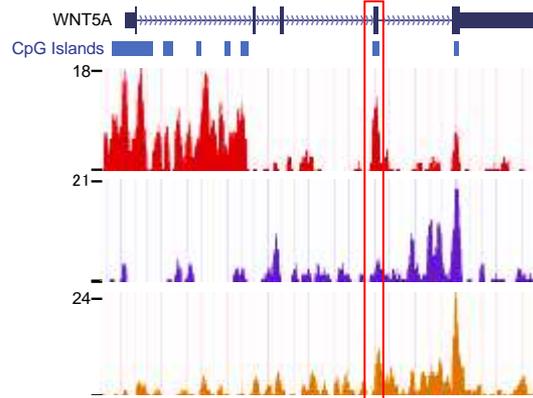
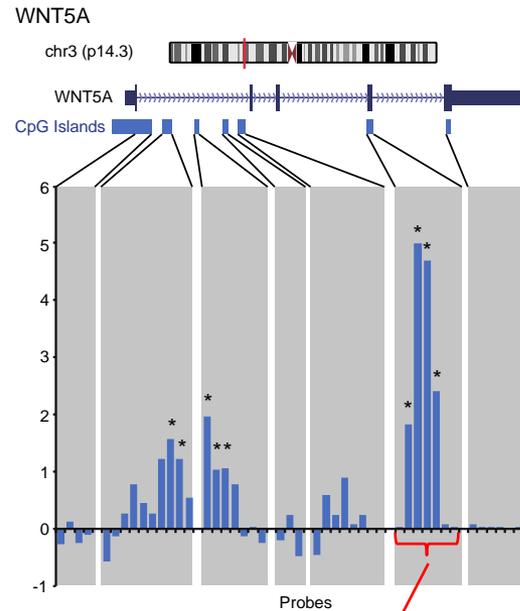
253G1 SALL3 KD
anti-DNMT3B



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



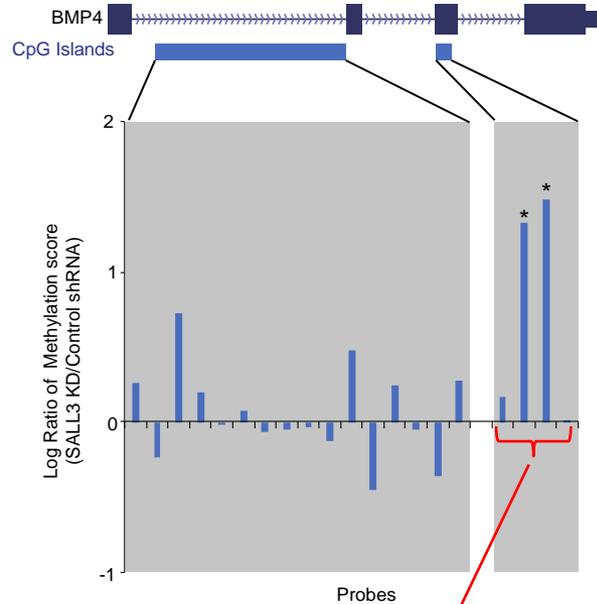
SALL3はCpG islandに
結合する

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

BMP4



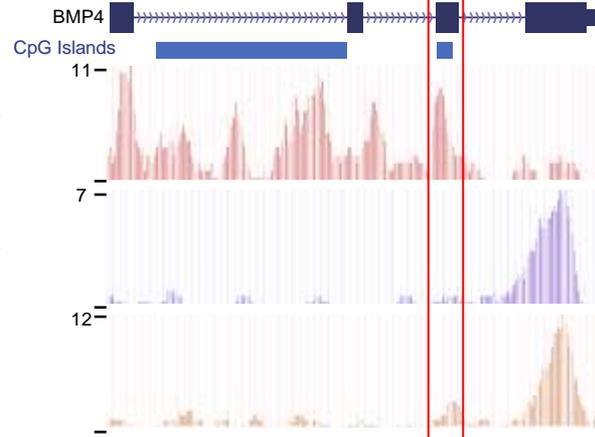
メチル化アレイ

WT株に比べて、
SALL3 KD株では
BMP4のgene bodyメチル化が有意に上昇している

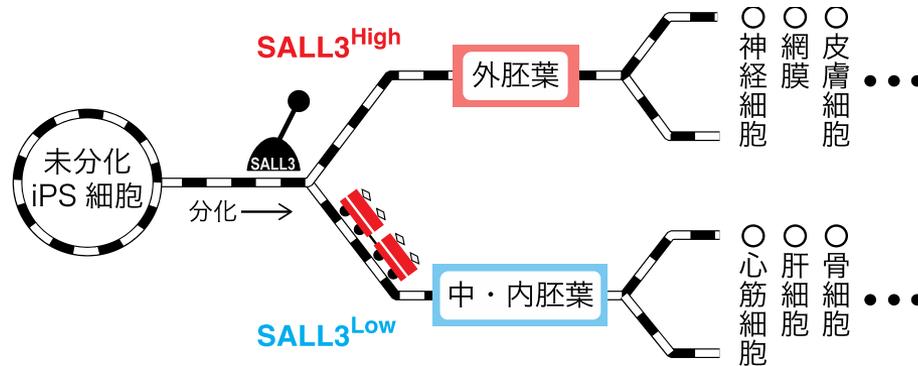
253G1 Control shRNA
anti-SALL3

253G1 Control shRNA
anti-DNMT3B

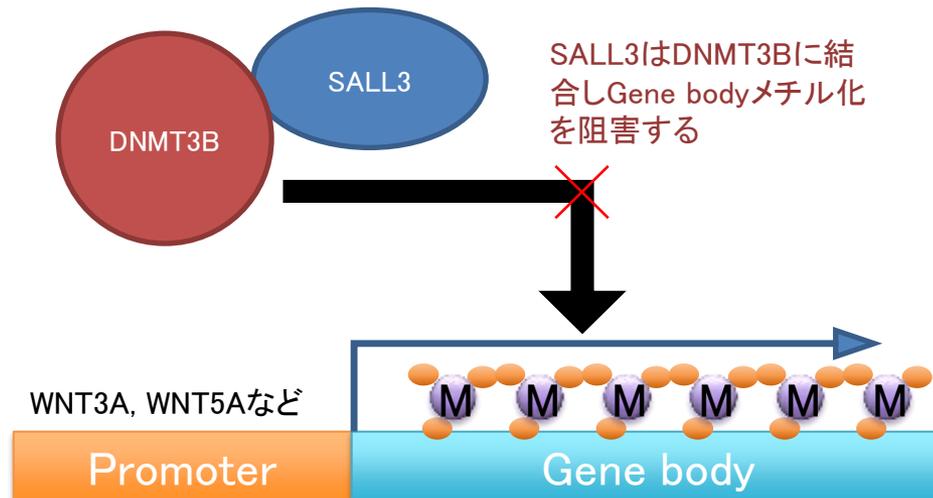
253G1 SALL3 KD
anti-DNMT3B



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。

謝 辞

国立医薬品食品衛生研究所

佐藤 陽治

黒田 拓也

城 しおり

松山 さと子

草川 森士

田埜 慶子

三浦 巧

藤田医科大学

松山 晃文