



令和3年7月9日
14:00-16:00

第48回 日本毒性学会学術年会
シンポジウム 27 再生医療等製品に関する毒性評価

細胞加工製品の非臨床安全性評価に関する国内外の状況

国立医薬品食品衛生研究所
再生・細胞医療製品部
佐藤 陽治

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ならびに日本再生医療学会の公式な見解では必ずしもありません

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) ヒト細胞利用製品についてのガイドライン
- ・Reflection paper on stem cell-based medicinal products (EMA/CAT/571134/2009) 幹細胞利用製品についての留意点



FDA

- ・FDA-CTGTAC Meeting #45, Cellular Therapies Derived From Human Embryonic Stem Cells (hESCs)-
Considerations for Pre-Clinical Safety Testing and Patient Monitoring, April 2008 ES細胞由来製品の非臨床安全性試験
- ・Guidance for industry: Preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products (FDA 2013)
細胞治療・遺伝子治療製品の非臨床安全性試験についてのガイダンス



MHLW

- ・ヒト(自己)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)

EUのガイドラインにおける細胞加工製品の造腫瘍性に関する記述



EMA

- ・ **Guideline on human cell-based medicinal products (EMA/CHMP/410869/2006)**
 - 「細胞の形質転換のリスクが予見できる場合」には、造腫瘍性を評価すべき
 - 試験では、染色体異常の有無だけでなく、増殖能力にも焦点を当てるべき

- ・ **Reflection paper on stem cell-based medicinal products (EMA/CAT/571134/2009)**
 - 特に幹細胞を用いた製品を対象とした文書
 - 体性幹細胞にも多能性幹細胞にも腫瘍形成のリスクが内在
 - 培養条件が幹細胞のゲノムの不安定性に大きく影響する
 - iPS細胞やES細胞のような未分化で増殖性のある多能性幹細胞は、腫瘍形成のリスクが比較的高く、その残存を合理的なレベルにまで制限すべき。
 - 長期間の細胞培養が腫瘍形成性や染色体の安定性を評価するのに役立つかもしれない
 - テラトーマ形成は多能性幹細胞に固有のものである

米国のガイドラインにおける細胞加工製品の造腫瘍性に関する記述



FDA • FDA-CTGTAC Meeting #45, Cellular Therapies Derived From Human Embryonic Stem Cells Considerations for Pre-Clinical Safety Testing and Patient Monitoring, April 2008

- テラトーマ形成に関連したヒトES細胞のリスクに関する議論
- 「プロセスコントロールやロットリリースに使用されるアッセイには、腫瘍形成、不適切な分化、その他の安全上の懸念をもたらす可能性のあるヒトES細胞由来の細胞製品に混入する、許容できないレベルの未分化ES細胞やその他の細胞不純物を検出できる試験を組み込むべき」
(例: フローサイトメトリーやRT-PCRによる遺伝子発現解析)
- 製品細胞の生着性は動物実験でしか評価できないというスタンス
- 動物の免疫抑制の度合い、細胞の移植部位も腫瘍検出における感度に強く影響する

米国のガイドラインにおける細胞加工製品の造腫瘍性に関する記述



FDA

・Preclinical assessment of investigational cellular and gene therapy products (2013)

- 造腫瘍性に関連して考慮すべき要素
 - 分化状態のプロファイル、
 - 細胞の加工の程度、
 - 既存の宿主の悪性細胞から腫瘍形成を誘発する可能性、
 - 対象となる患者集団 が挙げられている。
- 最適な動物種を選択や、現在の動物モデルの安全性予測能力に関しては、科学的なコンセンサスが得られていない

ただし、

- 造腫瘍性を示すための動物実験では、十分な時間、細胞が生存していることが重要
- 意図した臨床解剖学的部位に製品を投与することを推奨
- 観察は十分な期間行うことを推奨

日本のガイドラインにおける細胞加工製品の造腫瘍性に関する記述



厚労省

ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する5指針（2012年）

➤ 必要に応じて非臨床的に安全性を確認する際の参考にすべき事項及び留意点の例：

1. 培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことや目的細胞以外の細胞が異常増殖していないことを明らかにすること。
4. 患者への適用により、製品中の細胞や混入する未分化細胞が異所性組織を形成する可能性、及びその安全性について検討、考察すること。その際、製品の種類や特性、投与経路、対象疾患、及び試験系の妥当性等を総合的に勘案すること。
6. 腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性に関して検討、考察すること。その際、製品の種類や特性、投与量・投与経路、生着部位、対象疾患及び試験系の妥当性等を総合的に勘案すること。また、腫瘍形成又はがん化の可能性がある場合には、期待される有効性との関係等を勘案して、使用することの妥当性及び合理性について明らかにすること。（注：造腫瘍性試験において最も重要なのは、最終製品が患者に適用された場合の製品の造腫瘍性を可能な限りの確に評価することである。しかし、十分な細胞数が得られない等の理由により最終製品を構成する細胞を用いることができず、中間製品の細胞を用いて最終製品の造腫瘍性を評価しなければならない場合も想定される。また、動物モデルを使用した造腫瘍性試験においては、細胞の分散や足場への接着、細胞密度、投与部位等の条件が最終製品と必ずしも一致するものではない。さらに、動物の種・系統・免疫状態による感度差もある。これらの事情を総合的に勘案して、最終製品の造腫瘍性を評価する必要がある。また、最終製品の造腫瘍性に起因する患者へのリスクについては、対象疾患を治療することによる患者へのベネフィット等とのバランスを踏まえて合理的に評価すること）

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 Meeting Minutes (hESC)-
- Considerations for the use of human pluripotent stem cell-derived products (FDA 2013)
- Guidance for industry



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0912006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

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

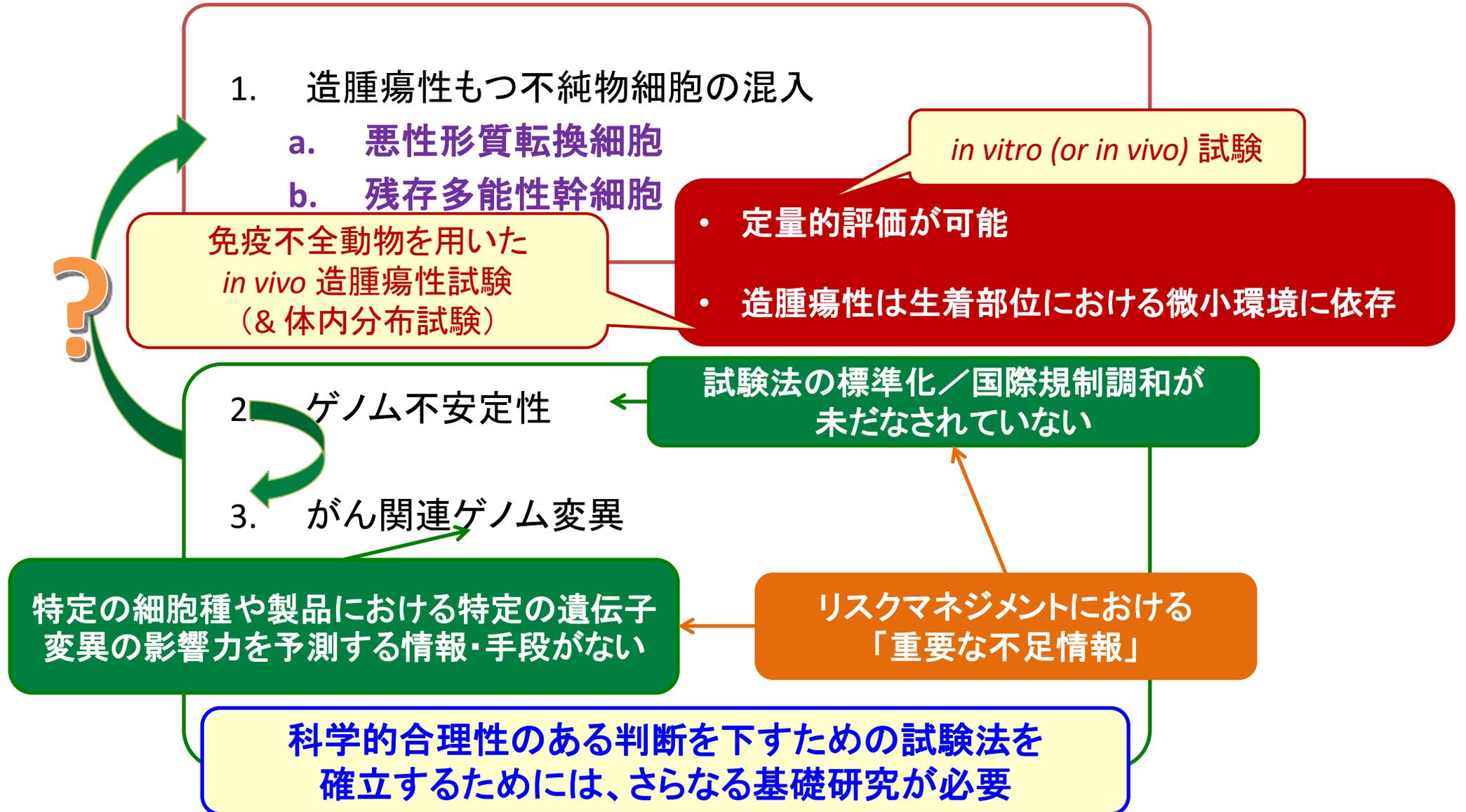


では、具体的にどうすれば造腫瘍性の評価ができるのか？

・・・ガイドライン文書からはよくわからない



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



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

in vitro (or in vivo) 試験

免疫不全動物を用いた
in vivo 造腫瘍性試験
(& 体内分布試験)

- 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

免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験 (*in vivo* 造腫瘍性試験)



評価目的	移植部位の微小環境の影響	形質転換細胞の検出	未分化多能性幹細胞の検出
動物	1種で十分 免疫不全マウス(例:NOG)またはラット(例:ヌードラット)		
例数	10匹/群(観察終了時)		
投与方法	単回		
用量 (細胞数)	物理的・構造的・手技的限界という意味の最大耐用量(MTD)	投与可能な最大用量(MFD)	
投与の 経路・部位	基本的には 臨床投与相当経路・部位	MFDを最大化できる部位(例:皮下)	
観察期間	陽性群の結果が安定するまでまたは出来るだけ長期間	16週間以上	17~30週間
陽性対照	がん細胞由来株または多能性幹細胞株	がん細胞由来株 (例:HeLa)	多能性幹細胞株 (例:ヒトiPS細胞)

造腫瘍性細胞を検出するための試験 (*in vitro* 造腫瘍性試験)



残存未分化多能性幹細胞の検出試験法

プラットフォーム	所要時間	感度
フローサイトメトリー	1 日	0.1% (ヒトiPS細胞 / 網膜色素上皮細胞)
定量性RT-PCR	6 時間	0.002% (ヒトiPS細胞 / 網膜色素上皮細胞)
ドロップレットデジタルPCR	数時間	0.001% (ヒトiPS細胞 / 心筋細胞)
高効率培養法による直接検出法	約1週間	0.01-0.001% (ヒトiPS細胞 / 間葉系幹細胞)



悪性形質転換細胞の検出試験法

プラットフォーム	所要時間	感度
軟寒天コロニー形成試験	3-4 週間	0.02% (HeLa細胞 / 間葉系幹細胞)
デジタル軟寒天コロニー形成試験	3-4週間	0.00001% (HeLa細胞 / 間葉系幹細胞)
増殖特性解析	4 週間以上	0.0001% (HeLa細胞 / 間葉系幹細胞)





ヒトiPS細胞由来移植細胞の臨床応用開始

神戸新聞(2014/9/12)

iPSから網膜細胞 世界初の移植手術実施 神戸



先崎基徳センター病院(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(岡)は12日午後、人工多能性幹細胞(iPS)から作られた網膜細胞を、目の病気で失明していた患者に移植する世界初の手術を実施した。iPS細胞から作った網膜細胞は、移植された後、視力が回復したと発表された。

iPS角膜、世界初の移植=大阪大、安全性や視力回復を検証

さまざまな細胞に変わる人工多能性幹細胞(iPS細胞)から角膜の細胞を作り、けがや病気で角膜が傷ついた患者に移植する臨床研究を進めている大阪大は29日、患者に移植したと発表した。iPS細胞から作った角膜細胞は世界で初めて、移植された患者の視力が回復したと発表された。



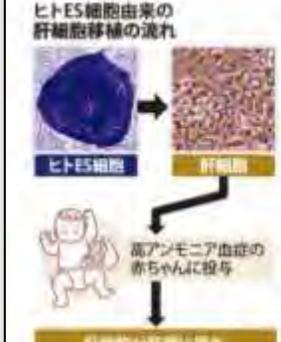
iPS再生医療、心臓で世界初の手術実施 阪大



大阪大学の澤方剛教授らは27日、iPS細胞から育てた心臓の細胞をシート状にし、重症心不全患者に移植する世界初の手術をしたと発表した。患者は手術後、心臓機能が回復したと発表された。

ES細胞国内初治療成功 重い病の赤ちゃんに肝細胞移植 成育研

国立成育医療研究センター(東京)は、ヒトES細胞(胚性幹細胞)から作った肝細胞を、重い肝臓病の赤ちゃんに移植して治療する臨床試験(治験)に成功したと発表した。センターによると、ヒトES細胞を使った治療は日本初、ES細胞由来の肝細胞をヒトへ移植したのは世界でも初めてだという。




残存iPS細胞／造腫瘍性細胞の検出試験法の開発で貢献

ヒトiPS/ES細胞を使った再生医療の開発



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 [2021年7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
ドパミン神経前駆細胞	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	(同種)ES細胞	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	-
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	-
角膜内皮代替細胞	同種iPS細胞	水疱性角膜症	慶応義塾大学	臨床研究	2021	-

造腫瘍性細胞を検出するための試験 (*in vitro* 造腫瘍性試験)



残存未分化多能性幹細胞の検出試験法

プラットフォーム	所要時間	感度
フローサイトメトリー	1 日	0.1% (ヒトiPS細胞 / 網膜色素上皮細胞)
定量性RT-PCR	6 時間	0.002% (ヒトiPS細胞 / 網膜色素上皮細胞)
ドロップレットデジタルPCR	数時間	0.001% (ヒトiPS細胞 / 心筋細胞)
<u>高効率培養法による直接検出法</u>	約1週間	0.01-0.001% (ヒトiPS細胞 / 間葉系幹細胞)



悪性形質転換細胞の検出試験法

プラットフォーム	所要時間	感度
軟寒天コロニー形成試験	3-4 週間	0.02% (HeLa細胞 / 間葉系幹細胞)
デジタル軟寒天コロニー形成試験	3-4週間	0.00001% (HeLa細胞 / 間葉系幹細胞)
増殖特性解析	4 週間以上	0.0001% (HeLa細胞 / 間葉系幹細胞)

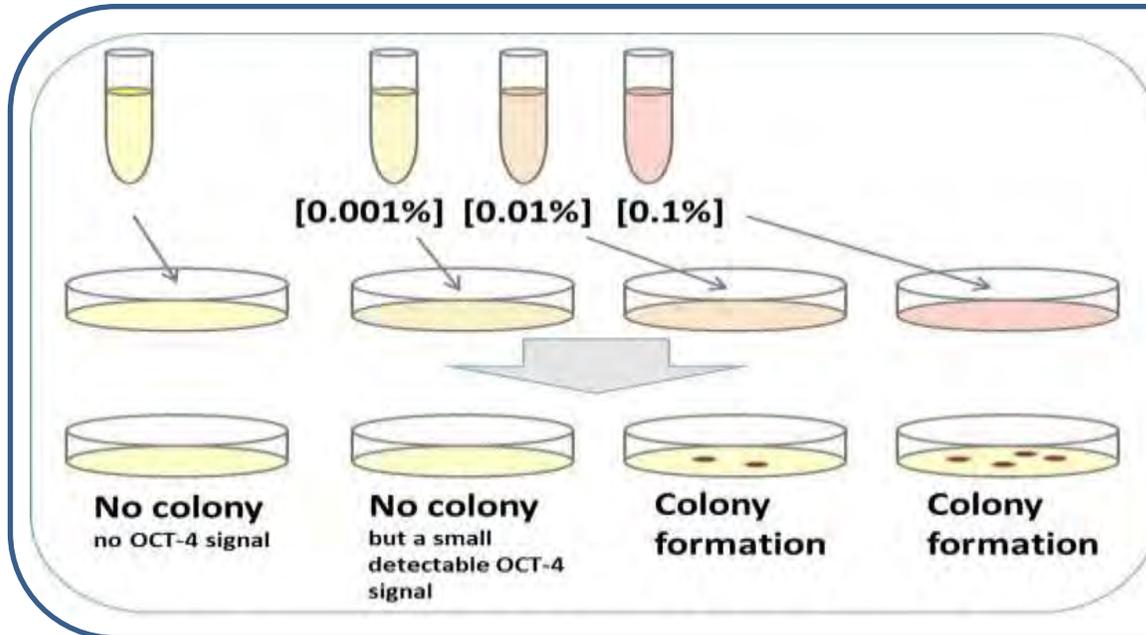


OPEN Neural Stem Cell Tumorigenicity and Biodistribution Assessment for Phase I Clinical Trial in Parkinson's Disease

Garitaonandia *et al*, *Sci Rep*. 2016; **6**: 34478

PSC

Received: 13 June 2016
Accepted: 24 September 2016



The clinical grade ISC-hpNSC were grown either a pure population or spiked with 0.001, 0.01 and 0.1% undifferentiated hpSC under the culture condition which favors the growth of hpSC.

After one week, the presence of the hpSC colonies was confirmed by flow cytometry of OCT-4 expression

Conclusion: contamination of product with undifferentiated hpSC is below 0.001%

造腫瘍性細胞を検出するための試験 (*in vitro* 造腫瘍性試験)



残存未分化多能性幹細胞の検出試験法

プラットフォーム	所要時間	感度
フローサイトメトリー	1 日	0.1% (ヒトiPS細胞 / 網膜色素上皮細胞)
定量性RT-PCR	6 時間	0.002% (ヒトiPS細胞 / 網膜色素上皮細胞)
ドロップレットデジタルPCR	数時間	0.001% (ヒトiPS細胞 / 心筋細胞)
高効率培養法による直接検出法	約1週間	0.01-0.001% (ヒトiPS細胞 / 間葉系幹細胞)



悪性形質転換細胞の検出試験法

プラットフォーム	所要時間	感度
軟寒天コロニー形成試験	3-4 週間	0.02% (HeLa細胞 / 間葉系幹細胞)
デジタル軟寒天コロニー形成試験	3-4週間	0.00001% (HeLa細胞 / 間葉系幹細胞)
増殖特性解析	4 週間以上	0.0001% (HeLa細胞 / 間葉系幹細胞)



Production, safety and efficacy of iPSC-derived mesenchymal stromal cells in acute steroid-resistant graft versus host disease: a phase I, multicenter, open-label, dose-escalation study

“The residual undifferentiated iPSC assay was performed to quantitate residual undifferentiated stem cells by TaqMan Gene Expression Assay (qRT-PCR) targeting *LIN28*, a gene associated with the pluripotent stem cell state.

Test samples were subjected to a procedure that selectively amplifies the growth of undifferentiated iPSCs in a background of MSCs, to increase the sensitivity of qRT-PCR for residual iPSC detection. This step involves culturing the product in E8CM with a ROCK inhibitor on Laminin 521/E-Cadherin-coated cultureware for 6 d.”

“The *in vitro* tumorigenicity assay using soft agar colony formation was performed as follows. Cells from the test sample plus a positive control (HT-1080 cells) and a negative control (WI-38) were plated at concentrations of both 1×10^5 and 1×10^6 cells per Petri dish and incubated for 14 d. Photographs were taken of each dish after 14 d to confirm colony formation in the positive control, no colony formation in the negative control and to ascertain relative colony growth in the test sample (at both cell concentrations for each).”



高効率培養法と定量RT-PCRによる
残存未分化多能性幹細胞の検出



軟寒天コロニー形成試験による
悪性形質転換細胞の検出



「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

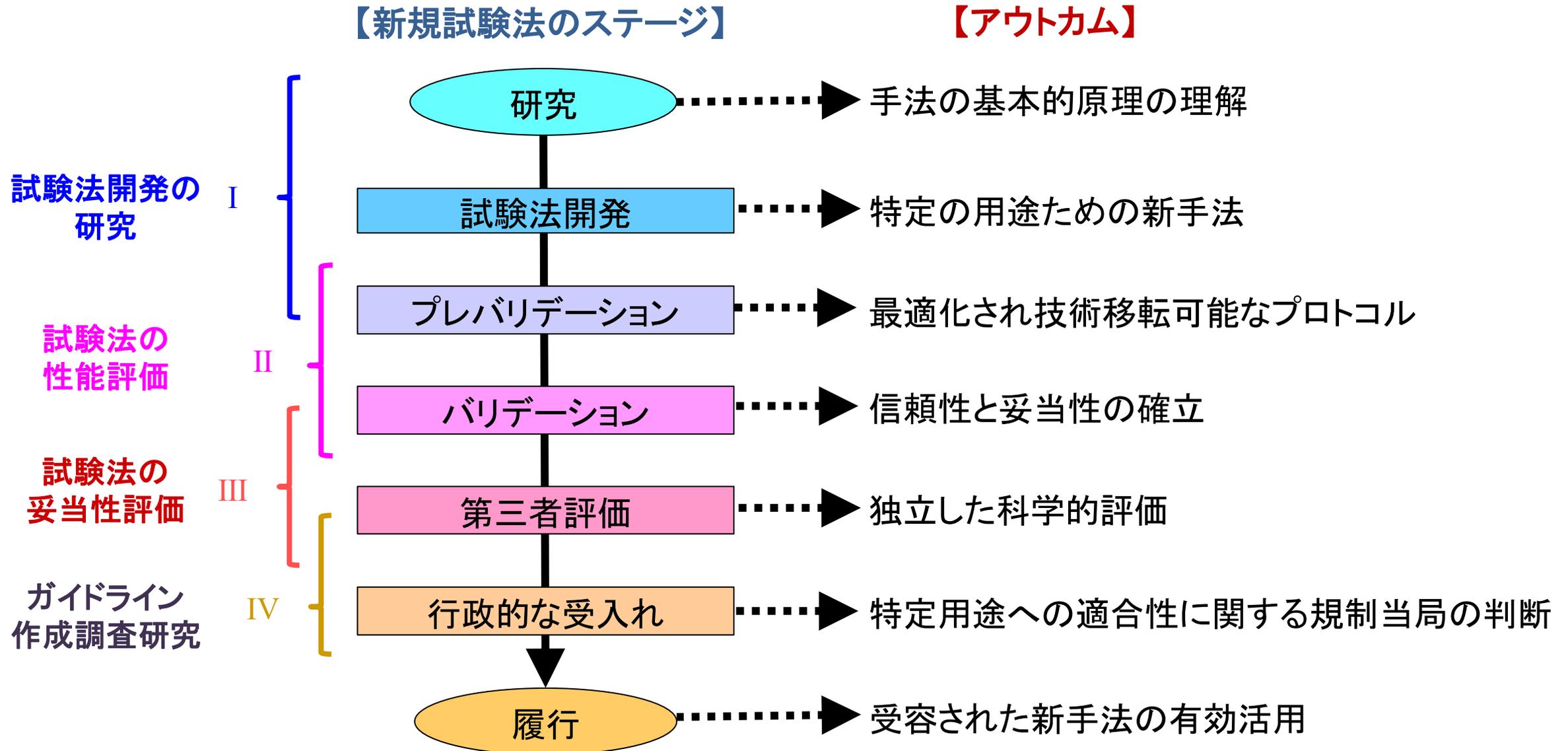
“パブリックコメント”と“造腫瘍性”で検索

目次

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・原材料の品質特性解析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定量のための試験
 - 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での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
 - 5.3.4. 細胞投与の部位と投与細胞の数および態様
 - 5.3.5. 観察期間
 - 5.3.6. 投与部位の観察
 - 5.3.7. 投与部位の病理学的評価
 - 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・原材料の品質特性解析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 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

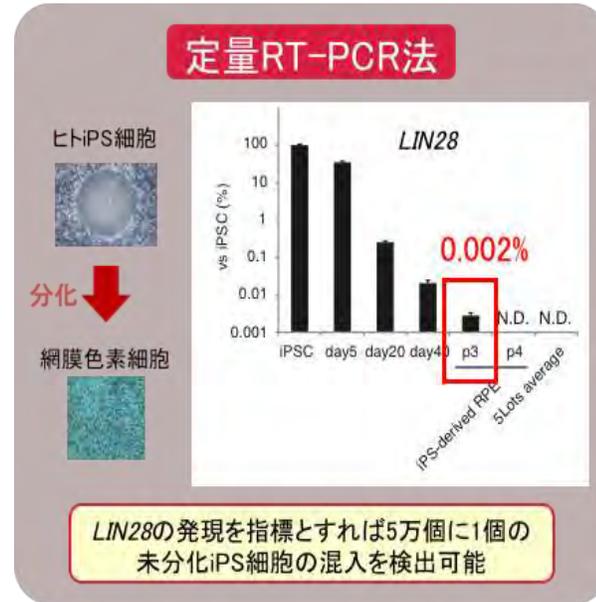
試験法の開発からバリデーションおよび行政的受入れ／標準化までの流れ



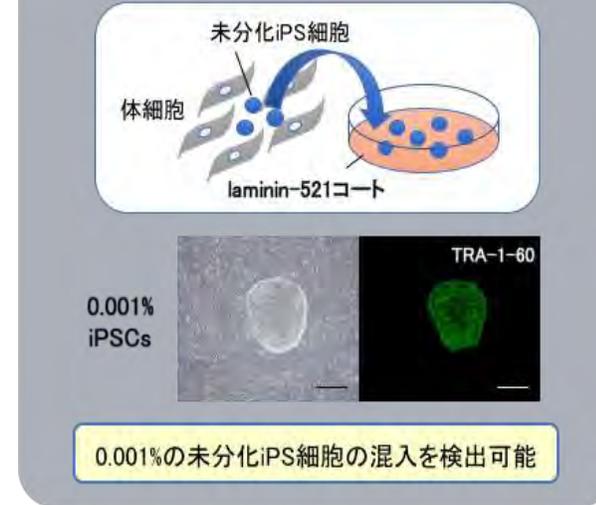
製品中に混在する造腫瘍性細胞の高感度検出法(例)



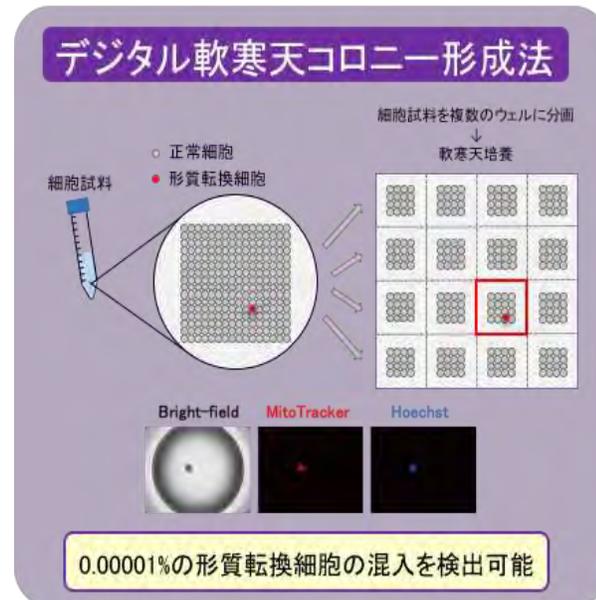
残存ES/iPS細胞の検出



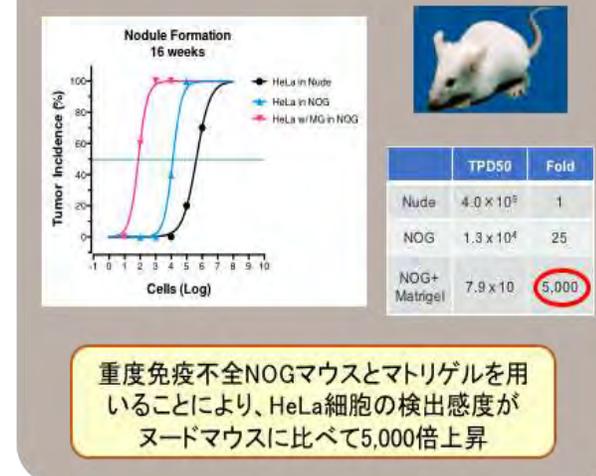
高効率培養法



悪性形質転換細胞の検出

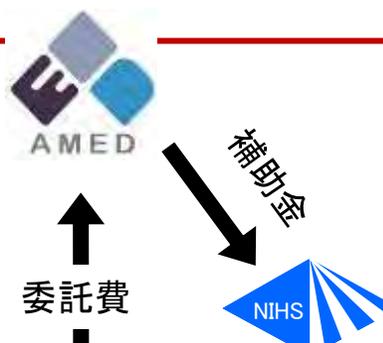


In vivo 造腫瘍性試験

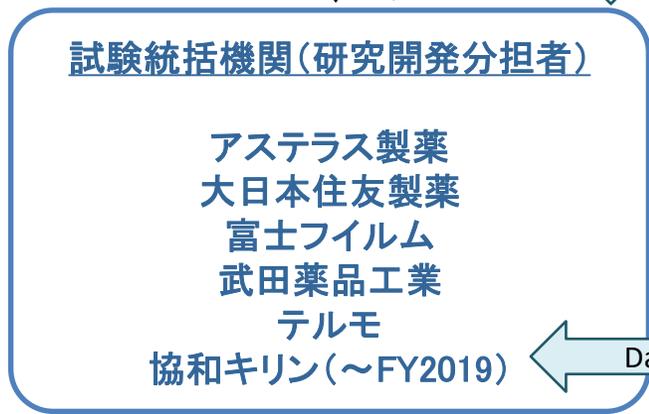
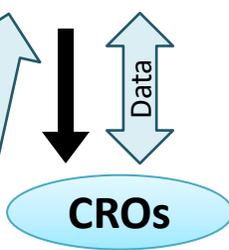


試験法の性能の多施設検証 (バリデーション) の官民共同研究

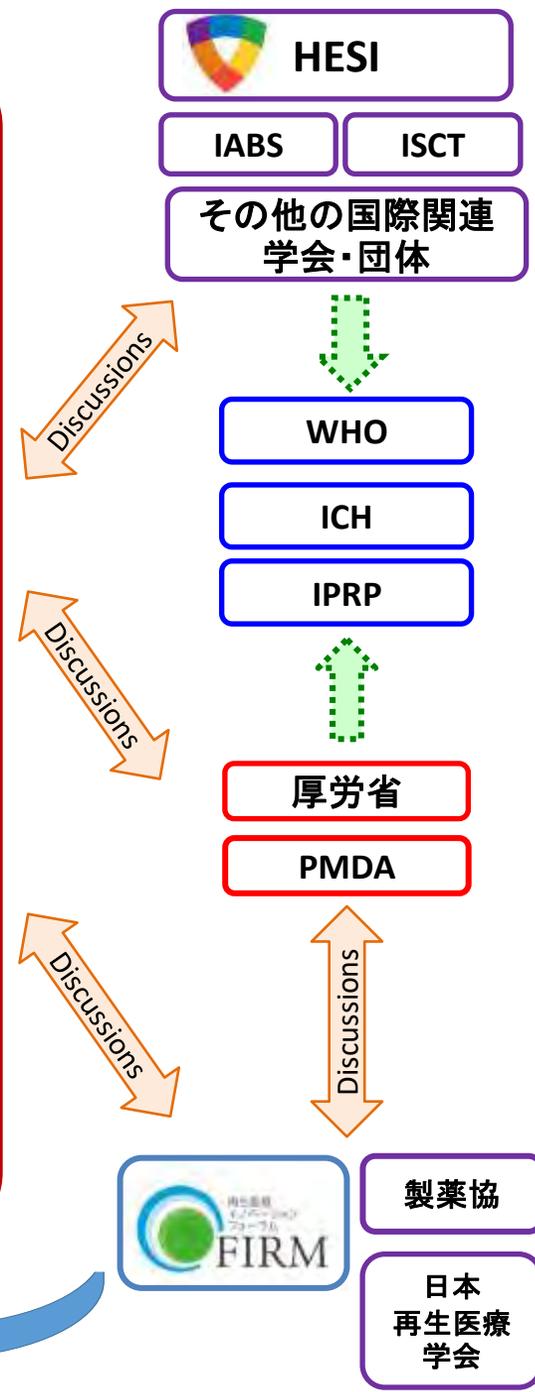
MEASURE
(**M**ultisite **E**valuation Study on **A**nalytical
Methods for Non-clinical **S**afety
Assessment of **H**uman-derived
Regenerative Medical Products)



研究開発代表者:
佐藤陽治(国衛研)



FIRM-CoNCEPT 委員長: 渡辺武志(武田薬品)
FIRM- the **C**ommittee for **N**on-**C**linical Safety **E**valuation
of **P**luripotent Stem Cell-derived **P**roduct



残存未分化多能性幹細胞の検出感度上昇のための 高効率培養法の改良

ARTICLE IN PRESS

Cytotherapy 000 (2020) 1–8

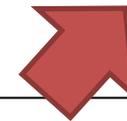
Contents lists available at ScienceDirect

 **CYTOTHERAPY**

journal homepage: www.isct-cytotherapy.org

International Society
ISCT
Cell & Gene Therapy®

分化細胞500万個に1個の
割合でのiPS細胞残留も検出
(世界最高感度更新)



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

¹ Drug Safety Research and Evaluation, Takeda Pharmaceutical Company Limited, Fujisawa, Japan

² The Committee for Non-Clinical Safety Evaluation of Pluripotent Stem Cell-Derived Product, Forum for Innovative Regenerative Medicine, Tokyo, Japan

³ Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences, Kawasaki, Japan

⁴ Drug Discovery Support Division, Tsukuba Research Institute, BoZo Research Center Inc, Tsukuba, Japan

⁵ CMIC Bioresearch Center, CMIC Pharma Science Co, Ltd, Hokuto, Japan

⁶ Research Planning Section, Ina Research Inc, Ina-shi, Japan

⁷ Research Division, HEALIOS K.K., Kobe, Japan

⁸ Integrated & Translational Science, Axcellead Drug Discovery Partners, Inc, Fujisawa, Japan

⁹ Life Science Research Laboratory, Tosoh Corporation, Ayase-shi, Japan

A B S T R A C T

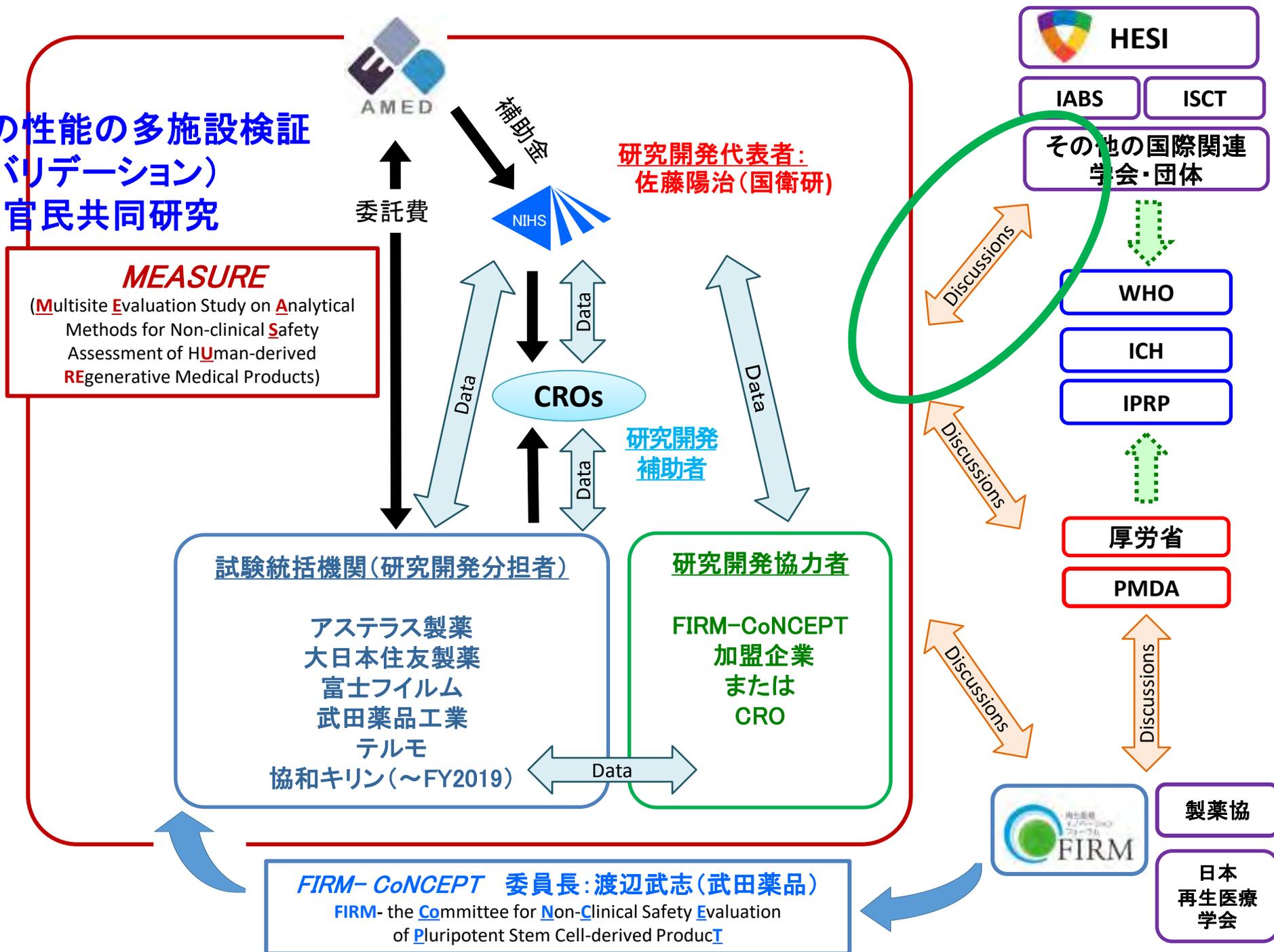
Background aims: The Multisite Evaluation Study on Analytical Methods for Non-Clinical Safety Assessment of Human-Derived Regenerative Medical Products (MEASURE) is a Japanese experimental public-private partnership initiative, which aims to standardize methodology for tumorigenicity evaluation of human pluripotent stem cell (hPSC)-derived cell therapy products (CTPs). Undifferentiated hPSCs possess tumorigenic potential, and thus residual undifferentiated hPSCs are one of the major hazards for the risk of tumor formation from hPSC-derived CTPs. Among currently available assays, a highly efficient culture (HEC) assay is reported to be one of the most sensitive for the detection of residual undifferentiated hPSCs.

Methods: MEASURE first validated the detection sensitivity of HEC assay and then investigated the feasibility of magnetic-activated cell sorting (MACS) to improve sensitivity.

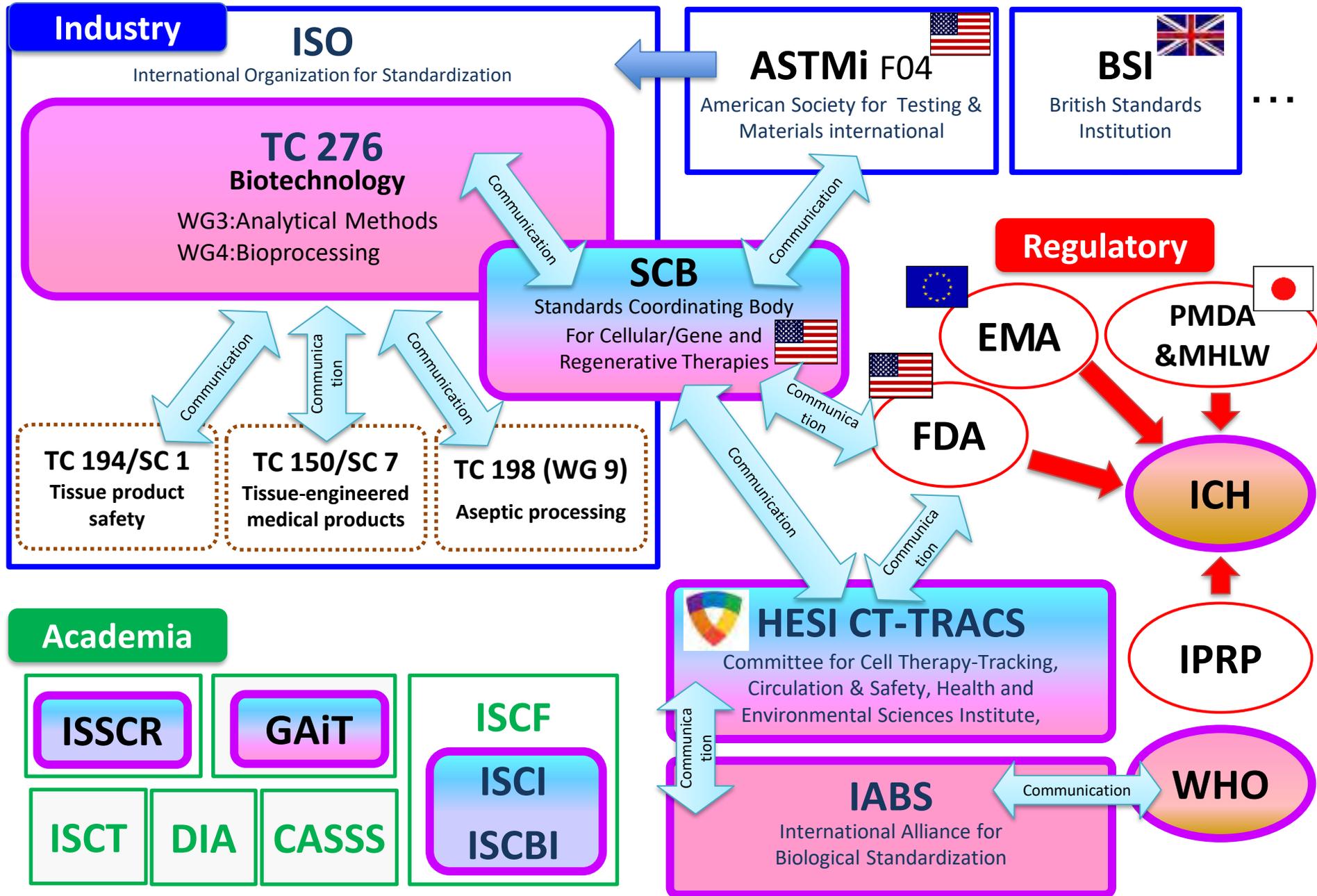
Results: The multisite experiments confirmed that the lower limit of detection under various conditions to which the human induced pluripotent stem cell lines and culture medium/substrate were subjected was 0.001%. In addition, MACS concentrated cells expressing undifferentiated cell markers and consequently achieved a detection sensitivity of 0.00002%.

Conclusions: These results indicate that HEC assay is highly sensitive and robust and that the application of MACS on this assay is a promising tool for further mitigation of the potential tumorigenicity risk of hPSC-derived CTPs.

試験法の性能の多施設検証 (バリデーション) の官民共同研究



細胞加工製品の試験法に関する国際調和・標準化の議論のプラットフォーム



NGOs / Consortia:



eatris

European Infrastructure
for translational medicine



CT-TRACS Members

HESI. (2021 data)

Universities/ Research Centers:

Imperial College
London

KINGS
College
LONDON
University of London



Memorial Sloan Kettering
Cancer Center

Newcastle
University



The
University
Of
Sheffield.

Stanford



Cardiovascular
Institute

UCL



Universiteit
Leiden



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH



>70 Participants

>30 Organizations

Government & Regulatory bodies:



c B G
M E B
Medicines Evaluation Board



National Institutes
of Health



National Institute for Public Health
and the Environment
Ministry of Health, Welfare and Sport

NIST
National Institute of
Standards and Technology

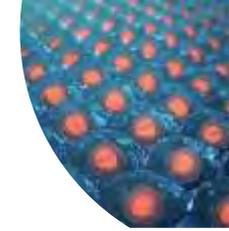
CTPs developers, tool providers:





HESI CT-TRACS 造腫瘍性ワーキンググループのポジションペーパー

Tumorigenicity Assessment of Cell Therapy Products: The Need for Global Consensus and Points to Consider



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

Cytotherapy 2019;21:1095-1111

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

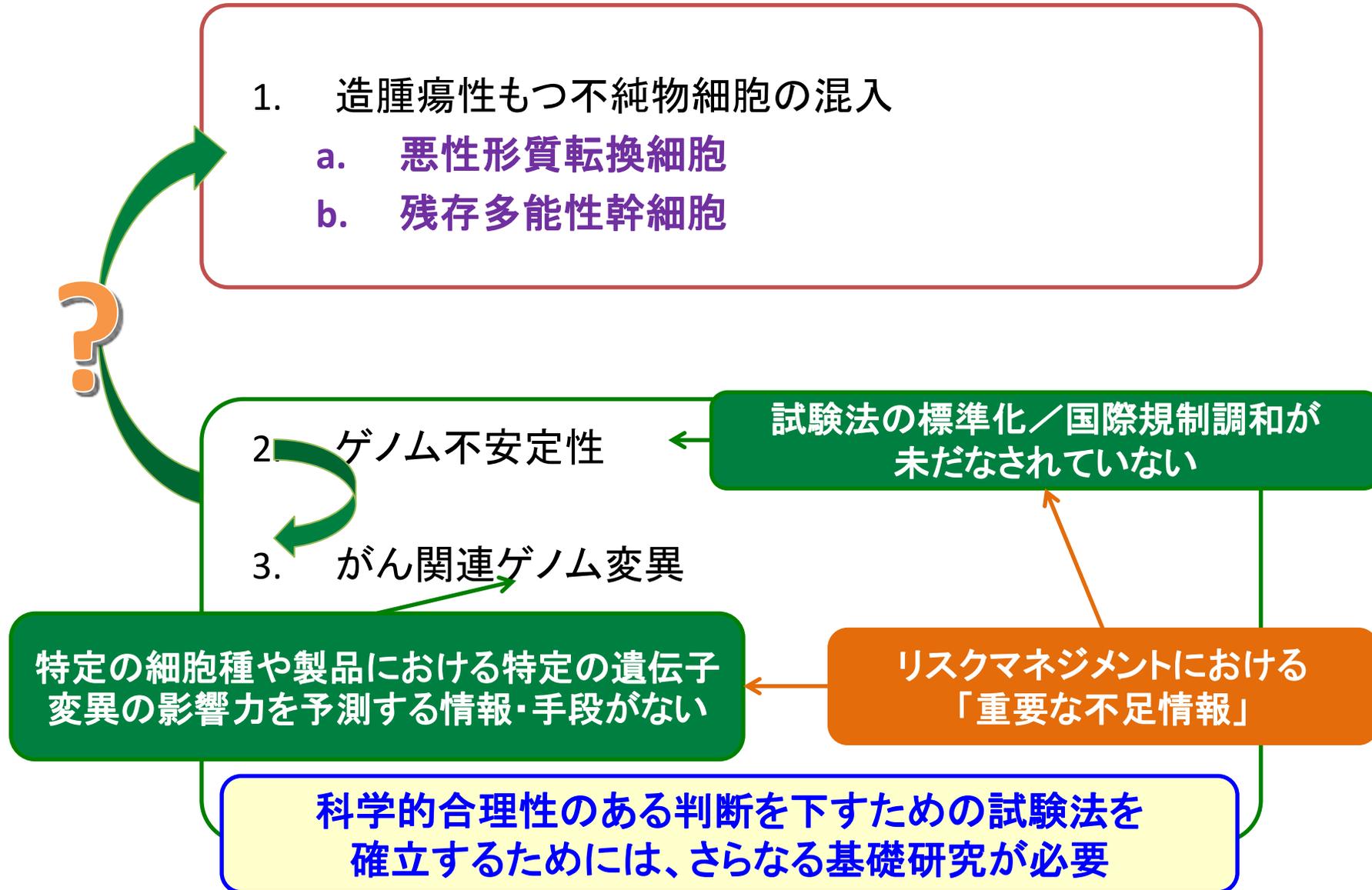
¹Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences, Kawasaki, Japan, ²FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan, ³Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Ridgefield, Connecticut, USA, ⁴FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc., Madison, Wisconsin, USA, ⁵Medicines Evaluation Board, Utrecht, The Netherlands, ⁶Charles River Laboratories, Horsham, Pennsylvania, USA, ⁷Cell and Gene Therapy Catapult, London, UK, ⁸Novartis Institutes for BioMedical Research, Basel, Switzerland, ⁹Novartis Institutes for BioMedical Research, Cambridge, Massachusetts, USA, ¹⁰Medicines & Healthcare Products Regulatory Agency, London, UK, ¹¹Health and Environmental Sciences Institute (HESI), Washington, DC, USA, ¹²GE Healthcare, Cambridge, UK, and ¹³Takeda Pharmaceutical Company Limited, Tokyo, Japan

欧州医薬品庁(EMA)非臨床安全性部会の座長

Abstract

Pluripotent stem cells offer the potential for an unlimited source for cell therapy products. However, there is concern regarding the tumorigenicity of these products in humans, mainly due to the possible unintended contamination of undifferentiated cells or transformed cells. Because of the complex nature of these new therapies and the lack of a globally accepted consensus on the strategy for tumorigenicity evaluation, a case-by-case approach is recommended for the risk assessment of each cell therapy product. In general, therapeutic products need to be qualified using available technologies, which ideally should be fully validated. In such circumstances, the developers of cell therapy products may have conducted various tumorigenicity tests and consulted with regulators in respective countries. Here, we critically review currently available *in vivo* and *in vitro* testing methods for tumorigenicity evaluation against expectations in international regulatory guidelines. We discuss the value of those approaches, in particular the limitations of *in vivo* methods, and comment on challenges and future directions. In addition, we note the need for an internationally harmonized procedure for tumorigenicity assessment of cell therapy products from both regulatory and technological perspectives.

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



iPS細胞の安全性、どう担保？ 治験が「抜け穴」状態

🔒 有料会員記事

後藤一也、戸田政考、市野塊、合田祿 2020年6月7日 7時30分



シェア



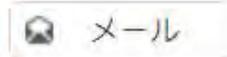
ツイート

list



BIブックマーク

3



メール



印刷



iPS細胞の治験について説明する大阪大の澤芳樹教授（左）=1月、大阪府吹田市



iPS細胞の実用化に向けた安全性確認で、4年前につくった臨床研究のガイドラインが厳しく、本来なら実用化前の最終段階に行う臨床試験（治験）の方が規制の一部が緩いという逆転が起きている。人工的につくったiPS細胞を移植に使うことへの懸念があったためだが、厳しすぎて研究の足かせになっているという声もある。臨床研究をせずに治験を始める例も増え、iPS細胞の安全性確認のあり方が議論になっている。

再生医療の実用化を促進する制度的枠組み



再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律【議員立法】平成25年4月26日成立、5月10日公布・施行

再生医療の研究開発から実用化までの施策の総合的な推進を図る

自由診療

臨床研究

製造販売

再生医療等安全性確保法

【平成25年11月20日成立、11月27日公布】

【平成26年11月25日施行】

再生医療等の安全性の確保等を図るため、再生医療等の提供機関及び細胞培養加工施設についての基準を新たに設ける。

薬機法（医薬品医療機器等法）

【平成25年11月20日成立、11月27日公布】

【平成26年11月25日施行】

再生医療の実用化に対応できるように、再生医療等製品の特性を踏まえた承認・許可制度を新設するため、改正を行う。

迅速性

細胞培養加工について、医療機関から企業への外部委託を可能に

再生医療等製品の特性に応じた早期承認制度の導入

安全性

再生医療等のリスクに応じた三段階の提供基準と計画の届出等の手続、細胞培養加工施設の基準と許可等の手続を定める

患者への説明と同意、使用の対象者に関する事項の記録・保存など市販後の安全対策

安全な再生医療を迅速かつ円滑に

多くの製品を、より早く

「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, 厚労省医政局研究課長通知／R3.3.9改訂)

【対象】再生医療等安全性確保法の下で臨床使用されるヒト多能性幹細胞加工物

【構成】

1. 原材料としての多能性幹細胞に求められる安全性等の審査のポイント

(1) 余剰胚又は原料細胞についての確認事項(倫理面・品質面)

(2) 原材料となる多能性幹細胞における造腫瘍性関連ゲノム所見

2. 多能性幹細胞由来特定細胞加工物の造腫瘍性評価の審査のポイント

(1) 臨床利用を目的とした原材料の確認事項

(2) 最終加工物の*in vitro*試験に関する確認事項

(3) 最終加工物の*in vivo*試験に関する検討事項

(4) リスクマネジメントプランの妥当性の確認

(5) ポテンシャルベネフィットの観点からの提供計画の妥当性についての確認

3. 参考情報

Assessing the Safety of Human Pluripotent Stem Cells and Their Derivatives
for Clinical Applications

Peter W. Andrews,^{1,*} Uri Ben-David,² Nissim Benvenisty,³ Peter Coffey,^{4,5} Kevin Eggan,^{6,7,8,9}
Barbara B. Knowles,^{10,11} Andras Nagy,^{12,13} Martin Pera,^{14,15,16,17,22} Benjamin Reubinoff,¹⁸
Peter J. Rugg-Gunn,^{19,20} and Glyn N. Stacey²¹

Stem Cell Reports | Vol. 9 | 1–4 | July 11, 2017

“...there is no current international consensus about how they (epigenetic and genetic variants) should be addressed. Indeed, it is important to recognize that in many cases we currently lack relevant information to allow an appropriate assessment of potential risks.”

各遺伝子変異のリスクを評価するための情報がない

The human body is a mosaic of different genomes

Survey finds that 'normal' human tissues are riddled with mutations.

Nature (NEWS on 06 June 2019)

<https://www.nature.com/articles/d41586-019-01780-9>

RESEARCH ARTICLE

RNA sequence analysis reveals macroscopic somatic clonal expansion across normal tissues

Keren Yizhak¹, François Aguet¹, Jaegil Kim¹, Julian M. Hess¹, Kirsten Kübler^{1,2,3}, Jenna Grimsby¹, Rustana Frazer¹, Hallel Zhang¹, Nicholas J. Haradynala^{1,2}, Daniel Rosebrock¹, Dimitri Ljivitz¹, Xiao Li¹, Ella Arich-Landkof^{1,2}, Noam Shores¹, Chip Stewart¹, Ayellet V. Segrè^{1,2,4}, Phillip A. Branton⁵, Paz Polak⁶, Kristin G. Ardlie¹, Gad Getz^{1,2,3,7}

¹Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA

²Center for Cancer Research, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA

³Harvard Medical School, Boston, MA, USA

⁴Ocular Genomics Institute, Department of Ophthalmology, Massachusetts Eye and Ear, Boston, MA, USA

⁵Biorepositories and Biospecimen Research Branch, Cancer Diagnosis Program, National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA

⁶Oncological Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai Hospital, New York, NY, USA

⁷Department of Pathology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA

✉ Corresponding author. Email: gadgetz@broadinstitute.org

→ Hide authors and affiliations

Science | 07 Jun 2019
Vol. 364, Issue 6444, eaaw0726
DOI: 10.1126/science.aaw0726

Somatic mosaicism in normal tissues

Somatic cells can accumulate mutations over the course of an individual's lifetime. This generates cells that differ genetically at specific loci within the genome. To explore how this genetic diversity in individuals contributes to disease, Yizhak *et al.* developed a method to detect mutations from RNA sequencing data (see the Perspective by Tomasetti). Applying this method to Cancer Genome Atlas samples and normal samples from the Genotype-Tissue Expression (GTEx) project generated a tissue-specific study of mutation accumulation. Somatic mutations were detected in nearly all individuals and across many normal human tissues in genomic regions called cancer hotspots and in genes that play a role in cancer. Interestingly, the skin, lung, and esophagus exhibited the most mutations, suggesting that the environment generates many human mutations.

腫瘍化する細胞を識別する方法は今のところない

“Researchers now need to find ways to sort out

which of those cells will become tumours and which are ‘normal’ ”

Cristian Tomasetti, Johns Hopkins Medicine



「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, 厚労省医政局研究課長通知／R3.3.9改訂)

【対象】再生医療等安全性確保法の下で臨床使用されるヒト多能性幹細胞加工物

【構成】

1. 原材料としての多能性幹細胞に求められる安全性等の審査のポイント

- (1) 余剰胚又は原料細胞についての確認事項(倫理面・品質面)
- (2) 原材料となる多能性幹細胞における造腫瘍性関連ゲノム所見

2. 多能性幹細胞由来特定細胞加工物の造腫瘍性評価の審査のポイント

- (1) 臨床利用を目的とした原材料の確認事項
- (2) 最終加工物の*in vitro*試験に関する確認事項
- (3) 最終加工物の*in vivo*試験に関する検討事項
- (4) リスクマネジメントプランの妥当性の確認
- (5) ポテンシャルベネフィットの観点からの提供計画の妥当性についての確認

3. 参考情報

3. 参考情報

問題提起1

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していない**。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。

3. 参考情報(続き)

問題提起2

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リル頻度)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、製品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製品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。

3. 参考情報(続き)

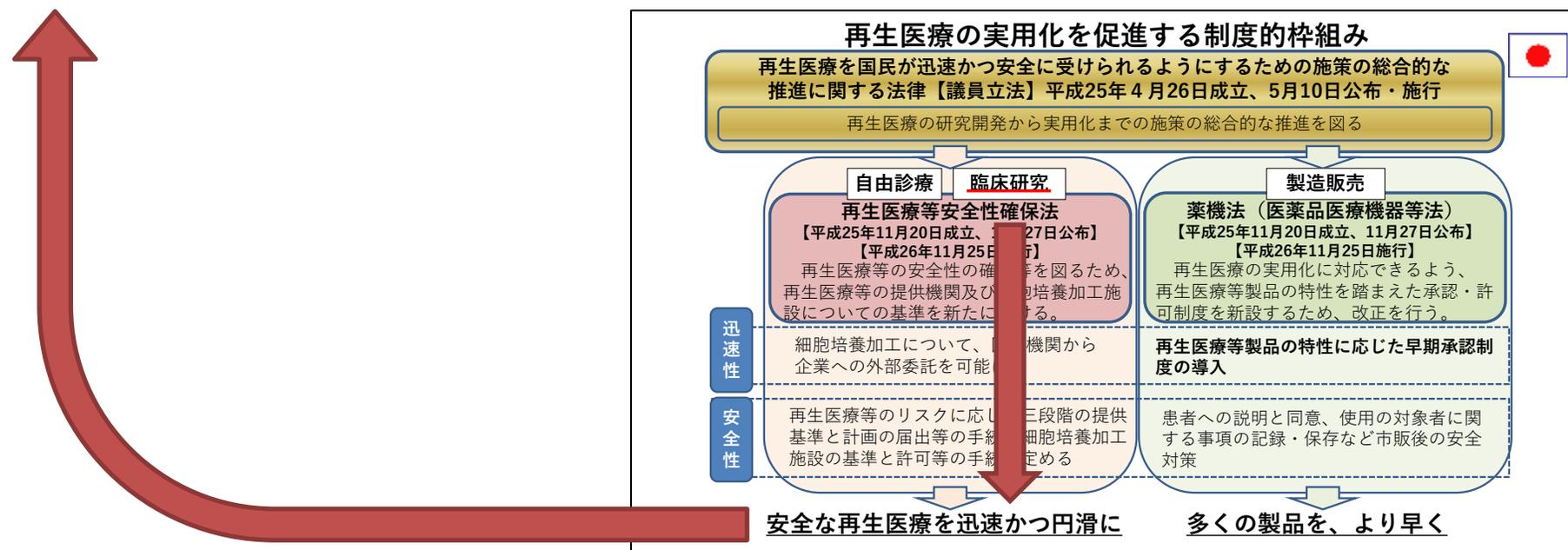
ただし、特に多能性幹細胞由来特定細胞加工物については、新規性が極めて高くリスク予測が困難なため、安全性確保のための議論の参考情報(reassuranceのための補完情報)として、腫瘍発生その他の有害事象との関連性が既知の遺伝子変異について、あらかじめ確認しておくことが望ましい。すなわち、低アリル頻度遺伝子変異の分析学的検出限界など、試験法の性能を明らかにした上で、上記①～③を確認することが望ましい。①～③の変異が検出された場合の多能性幹細胞由来特定細胞加工物の臨床投与の判断については、患者の重篤度、治療の緊急性等を踏まえて判断する。

多能性幹細胞加工物の遺伝子変異解析の位置づけ
＝Reassuranceのための参考情報

緒言

「多能性幹細胞由来特定細胞加工物のリスクを評価する際に求められる非臨床試験のうち造腫瘍性評価の要件は、いまだ定まっていない。本報告書の内容は、今後得られる基礎研究の成果、さらには臨床投与患者における注意深い観察、その検体解析で得られる知見を積み上げることにより、常に検証、修正されるべきである。

本報告書は、多能性幹細胞由来特定細胞加工物を用いた治療法を安全かつ可及的速やかに患者のもとに届けるため、将来の開発に寄与する科学的データを集積することを目的としている。」



謝 辞

国立医薬品食品衛生研究所
再生・細胞医療製品部の皆様

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
ならびにAMED MEASURE1/2プロジェクトの皆様

HESI CT-TRACSメンバーの皆様

実験動物中央研究所 伊藤守所長ならびに所内の先生方

大阪大学大学院医学系研究科 澤芳樹先生
ならびに研究室の先生方

大阪大学大学院薬学研究科 水口裕之先生

大阪はびきの医療センター 松山晃文先生

昭和薬科大学 宇都口直樹先生・小泉直也先生

神戸医療産業都市推進機構 川真田伸先生

ご清聴ありがとうございました！

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

E-mail: yoji@nihs.go.jp

*