

- 中家修一、早川堯夫、掛樋一晃 第 29 回日本糖質学会年会
11. エボラウイルス表面糖タンパク質中の N-及び O-結合型糖鎖解析 山田佳太、宇佐美克明、早川堯夫、掛樋一晃、入村達郎 第 29 回日本糖質学会年会
 12. 加齢に伴うラット血清糖タンパク質糖鎖の変化-加齢マーカーとしての糖鎖の可能性- 能登啓介、奥田茜、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 第 29 回日本糖質学会年会
 13. ヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する Polylactosamine-Carrier Protein のグライコプロテオーム解析 田中佑樹、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 第 59 回日本薬学会近畿支部大会
 14. 加齢により変動する血清糖タンパク質糖鎖の解析と加齢マーカーとしての可能性の検証 木下充弘、能登啓介、奥田茜、渡部沙木絵、早川堯夫、掛樋一晃 第 59 回日本薬学会近畿支部大会
 15. キャピラリー電気泳動を用いたヒト組織球性リンパ腫細胞に発現する Polylactosamine-Carrier Protein のグライコプロテオーム解析 田中佑樹、三ツ井洋輔、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 第 82 回日本生化学会大会
 16. フコシル化を回復させた HCT116 細胞上に観察される糖タンパク質糖鎖 梶直孝、山田佳太、田中佑樹、岩本竜昇、木下充弘、三善英知、森脇健太、早川堯夫、掛樋一晃 第 82 回日本生化学会大会
 17. 加齢に伴うラット血清糖タンパク質糖鎖の変化 能登啓介、奥田茜、渡部沙木絵、木下充弘、早川堯夫、掛樋一晃 第 82 回日本生化学会大会
 18. 鈴木 孝昌, Suresh Thirupathi, 押澤正, Ramesh Doss, 田邊 思帆里, 佐藤 陽治, 鈴木 和博 細胞・組織加工医薬品の品質評価および標準化に向けたプロテオーム解析技術の利用 日本ヒトプロテオーム機構 (JHUP0) 第 7 回大会 (平成 21 年 7 月 27-28 日、東京)
 19. 早川堯夫: 最近の局方における生物薬品各条及び生物薬品関連試験法の改正について. 第 3 回日本薬局方に関する説明会、東京、大阪 (2009.8, 2009.9)
 20. 早川堯夫: 第十六改正日本薬局方の方針、それから. 第 6 回医薬品 RS フォーラムシンポジウム、東京 (2009.12)
 21. 早川堯夫: 再生医療の現状と課題. 私立大学戦略的研究基盤形成事業第一回講演会、大阪 (2009.5)
 22. 早川堯夫: 再生医療: レギュラトリーサイエンス四方山話. CS スーパー特区 第 1 回分科会、東京女子医大 (2009.7)
 23. 早川堯夫: 幹細胞臨床研究における GTP/ (治験薬) GMP の考え方. ヒト幹細胞臨床研究指針見直し検討会、東京 (2009.7)
 24. Hayakawa T.: Japanese Regulations about Cell & Tissue Therapy. Italy in Japan 2009, Tokyo (2009.10)
 25. 早川堯夫: 再生医療実用化をにらんだ有効性・安全性・品質の考え方. 第 2 回ライフサイエンスセミナー、東京 (2009.11)
 26. 早川堯夫: 再生医療実用化をにらんだ有効性・安全性・品質の考え方. BTJ プロフェッショナルセミナー iPS 細胞

- 実用化への課題、東京 (2009.12)
27. 早川堯夫：再生医療製品の審査と指針について。「学術振興会再生医療の実用化」に関する研究開発専門委員会第3回委員会」、東京 (2010.1)
 28. Hayakawa T: Current Topics in Japan with Respect to Evaluation and Control of Biotechnology Products, WCBP 2010: Symposium on the Interface of Regulatory and Analytical Sciences for Biotechnology Health Products, Washington DC, USA (2010.1)
 29. 早川堯夫：これからの細胞治療・再生医療. バイオロジクスフォーラム第7回学術集会、東京 (2010.3)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得 なし

H-2. 実用新案登録 なし

H-3. その他 特記事項なし

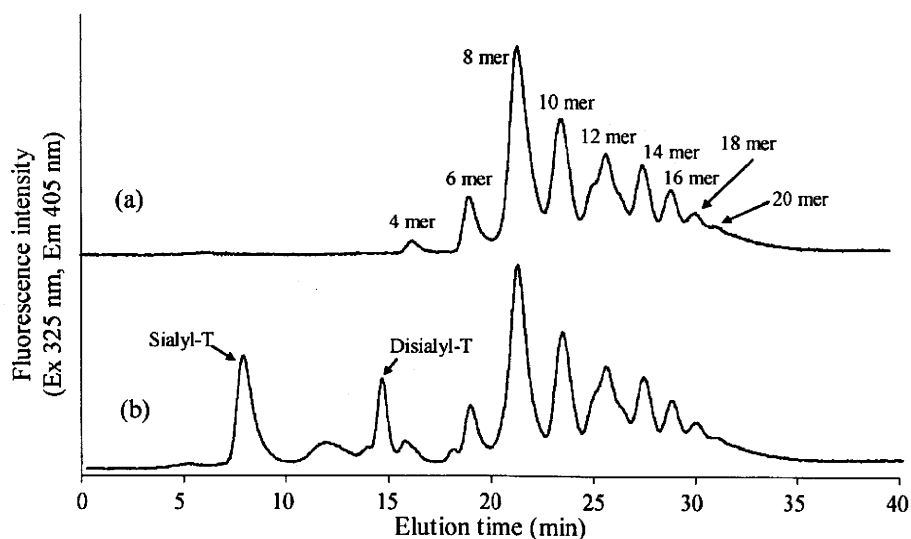


Fig.1 Serotonin affinity chromatography of HA oligosaccharides and mucin-type O-glycans. (a) 2AA-labeled HA oligosaccharides (4-20 mer) and (b) a mixture of mucin-type O-glycans from bovine fetuin and HA oligosaccharides. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-75 % solvent B) from 2 to 45 min and 75% solvent B from 37 to 45 min.

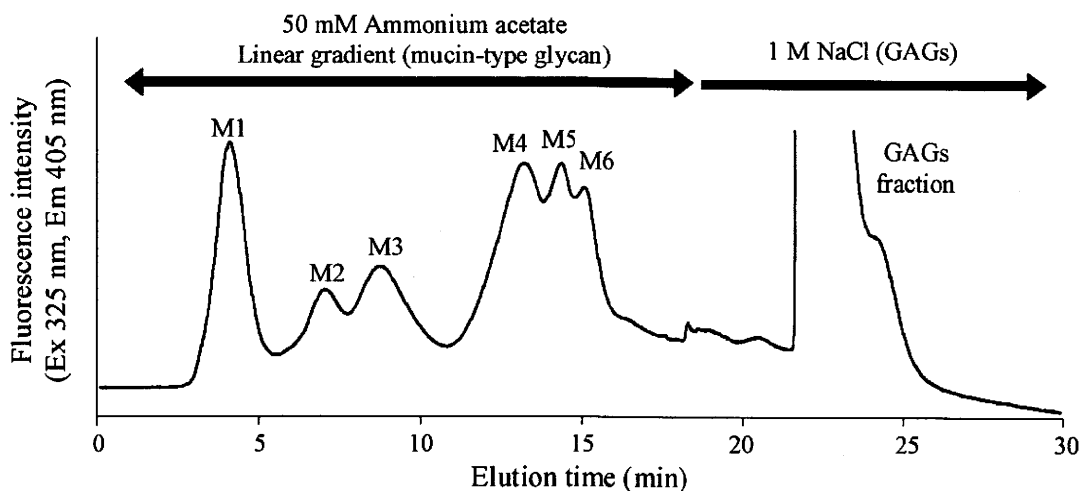


Fig.2 Serotonin affinity chromatography of O-linked glycans derived from HCT116 cell. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-40 % solvent B) from 2 to 20 min and 1 M NaCl from 20 to 45 min.

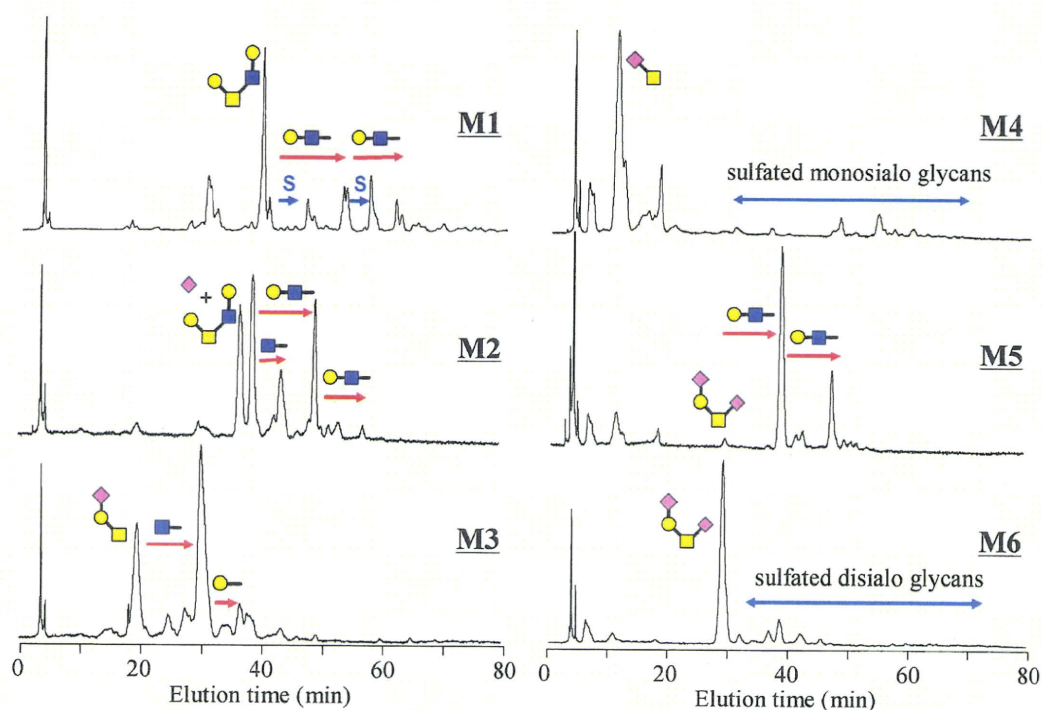


Fig.3 NP-HPLC analysis of mucin-type O-glycans from HCT116 cell. Analytical conditions: column, TSK-GEL Amide-80 (4.6 x 250 mm). flow rate, 0.8 mL/min. eluent, solvent A, 0.1% CH₃COOH in MeCN. solvent B, 0.2% CH₃COOH/0.2% triethylamine in water. gradient conditions: a linear gradient (15-50 % solvent B) from 5 to 85 min.

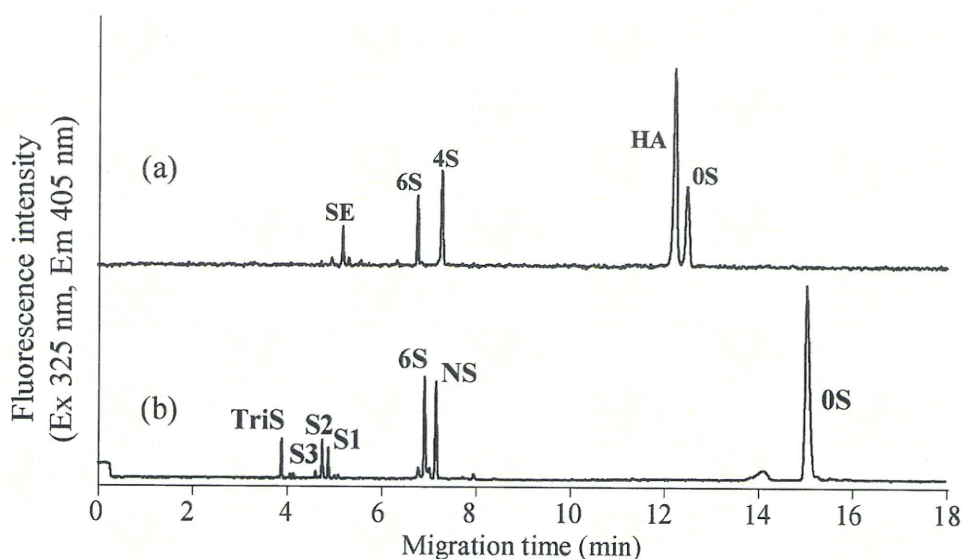
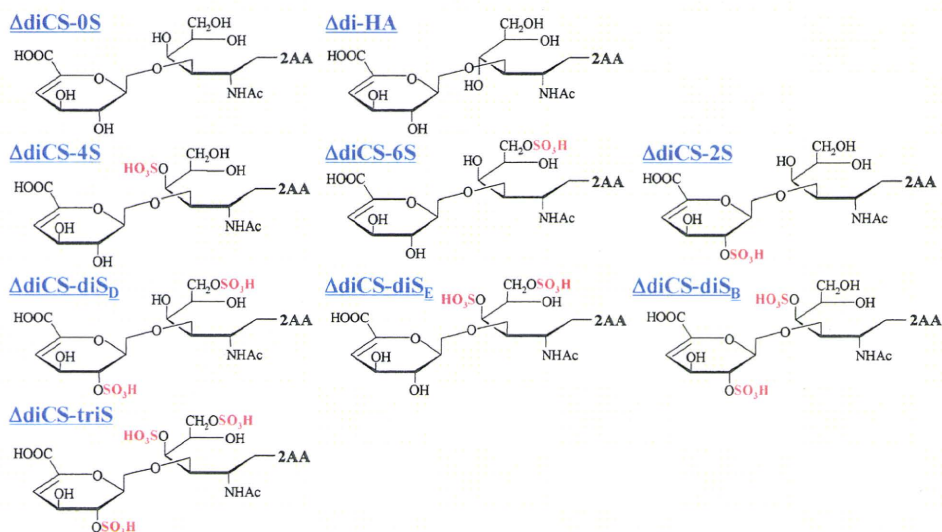


Fig.4 CE analysis of unsaturated disaccharides from HCT116 cell. Analytical conditions; Capillary, fused silica (40 cm x 50 μ m.i.d). Buffer, 100 mM Tris-phosphate buffer (pH 3.0). Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 10 sec). Temperature, 25 °C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

CS and HA unsaturated disaccharides



HS unsaturated disaccharides

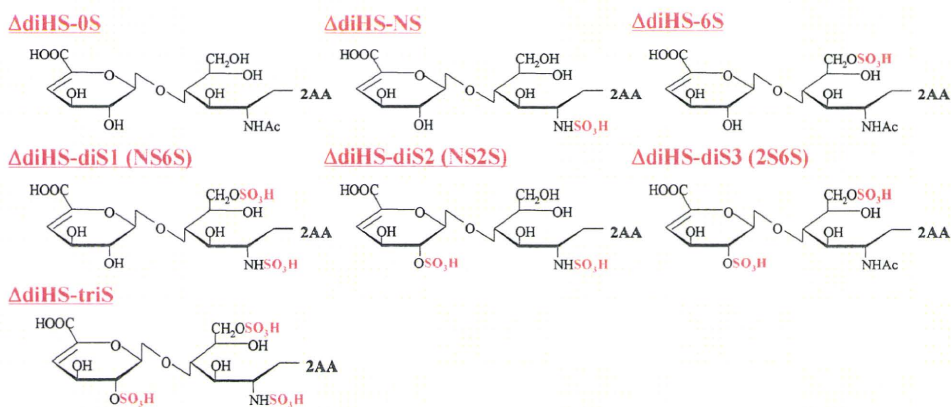


Fig.5 Structures of unsaturated disaccharides from CS and HS.

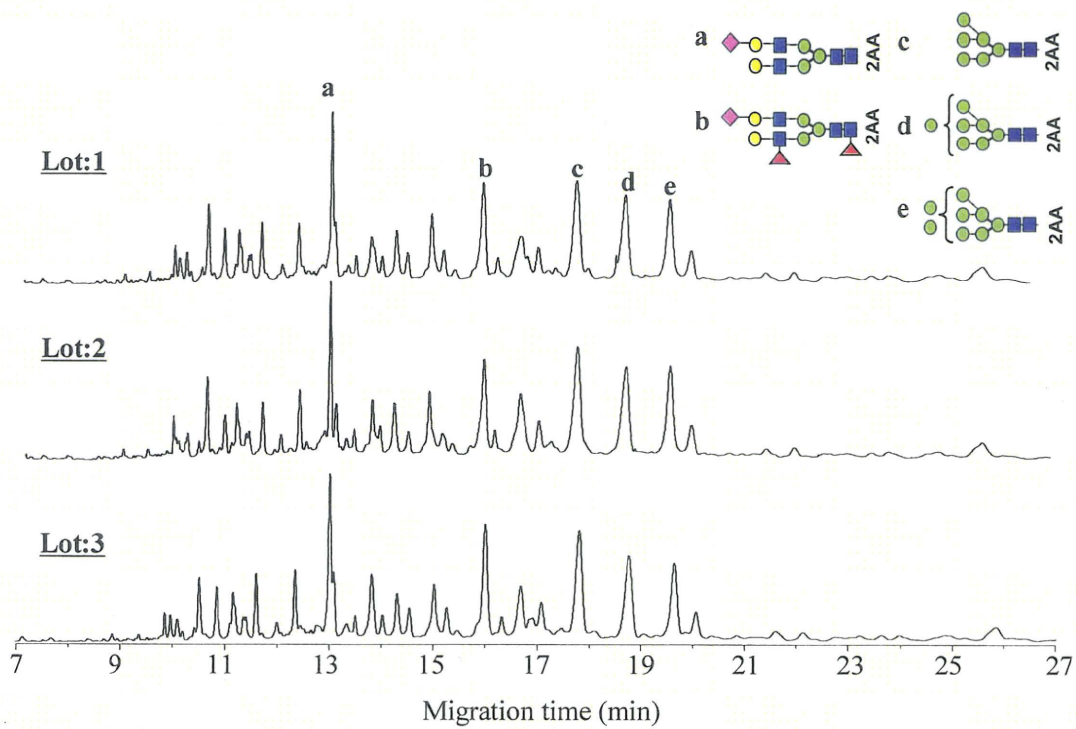


Fig.6 CE analysis of N-linked glycans derived from MKN45 cells. Analytical conditions; capillary, DB-1 capillary (40 cm x 100 μ m.i.d). Buffer, 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 10 %PEG70000. Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 5 sec). Temperature, 25 $^{\circ}$ C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

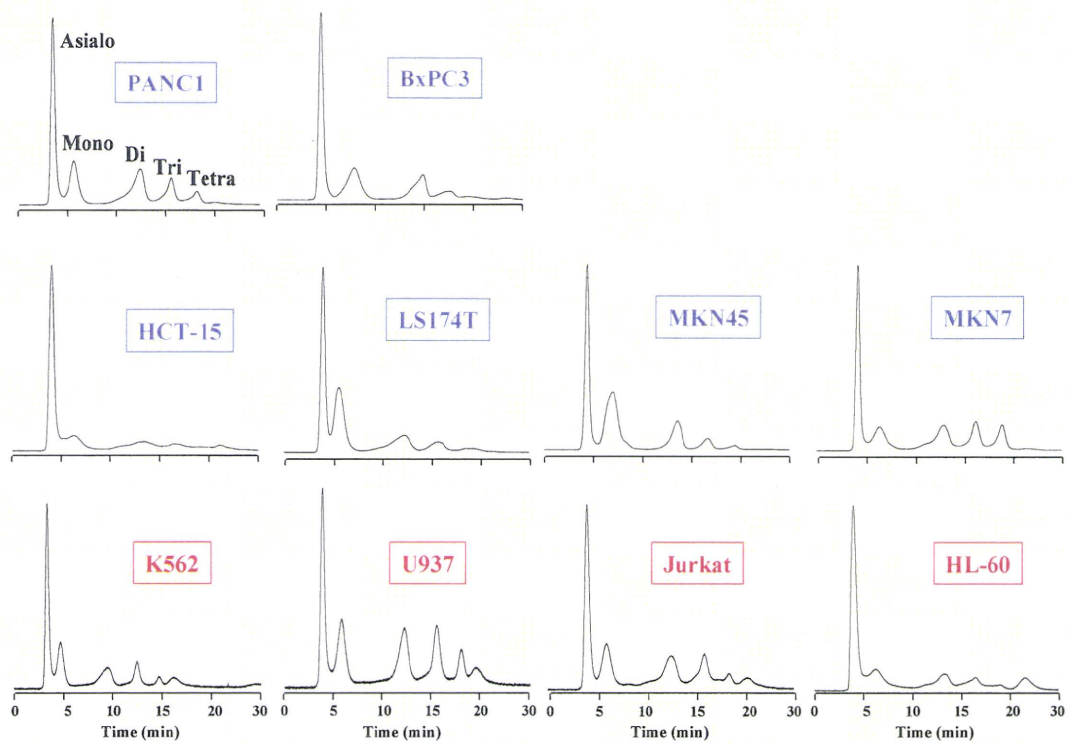


Fig.7 Serotonin affinity chromatography of N-linked glycans derived from various cancer cell lines. Analytical conditions; column, LA-serotonin (4.6 x 150 mm). flow rate, 0.5 mL/min. eluent; solvent A, water. solvent B, 50 mM Ammonium acetate in water. gradient conditions, a linear gradient (5-75 % solvent B) from 2 to 45 min and 75% solvent B from 37 to 45 min.

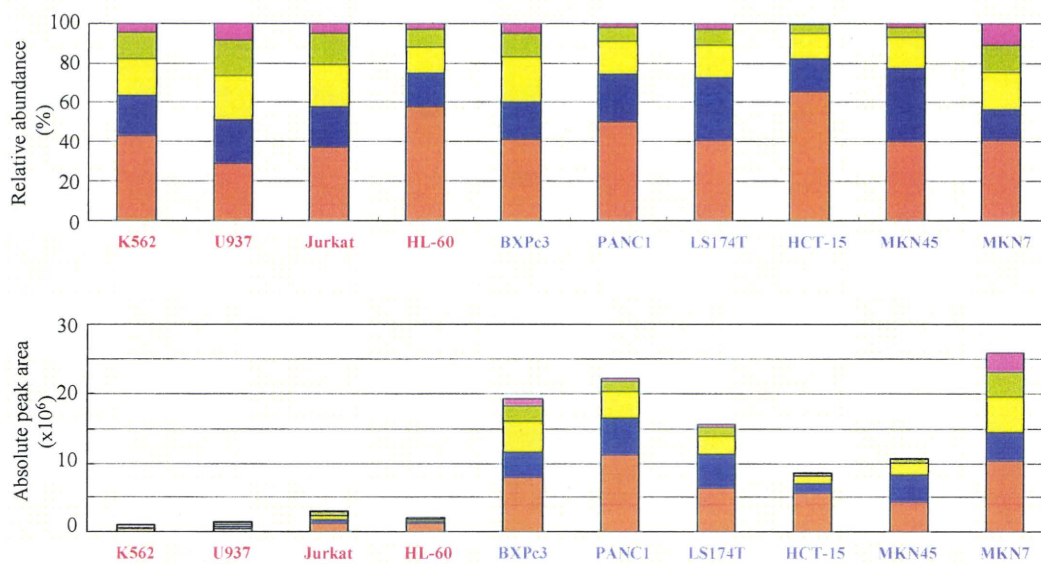


Fig.8 Comparison of the amounts of N-linked glycans expressed on cancer cells
 Orange, asialo-; blue, monosialo-; yellow, disialo-; green, trisialo-; pink,
 tetrasialo-glycans.

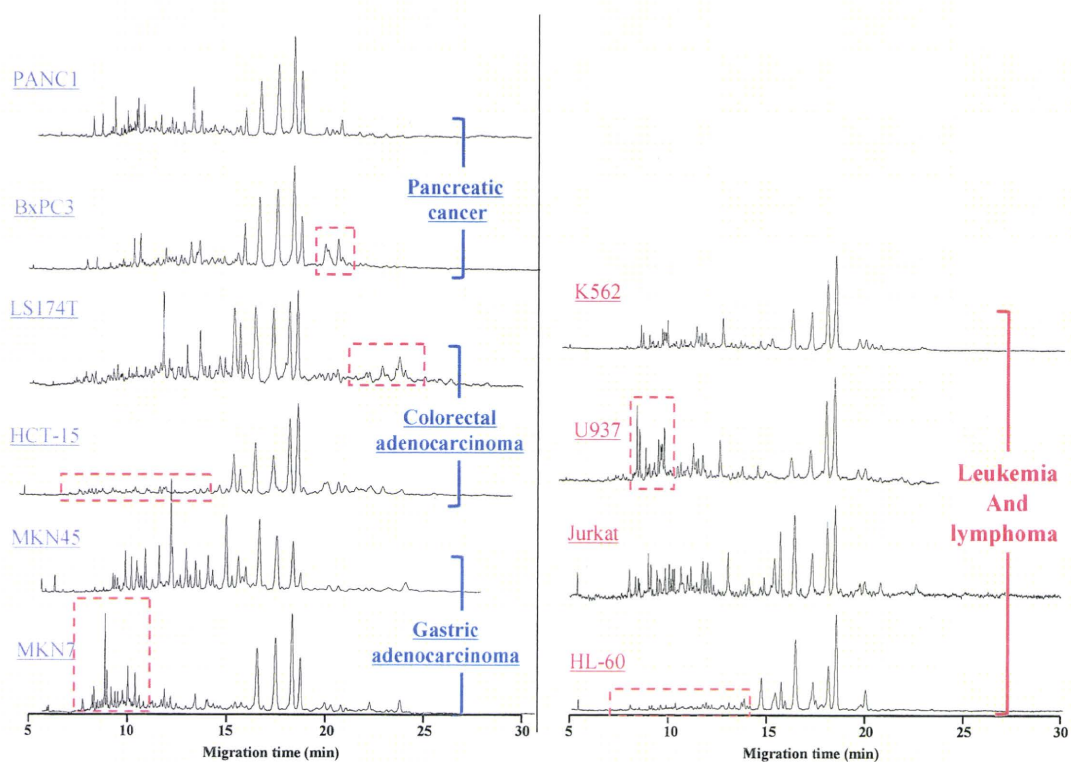


Fig.9 CE analysis of N-linked glycans derived from various cancer cells. Analytical conditions; capillary, DB-1 capillary (40 cm x 100 μ m.i.d). Buffer, 100 mM Tris-borate buffer (pH 8.3) containing 10 %PEG70000. Applied voltage, 25 kV. Injection, pressure method (1.0 psi, 5 sec). Temperature, 25 $^{\circ}$ C. Detection, He-Cd laser induced fluorescent detection (Ex: 325 nm, Em: 405 nm).

Table 1 Mucin-type O-glycans observed in HCT116 cell.

M1		M4	
504	Gal-GalNAc-2AA	1815	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 {NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA
546	GlcNAc-GalNAc-2AA	1969	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + SO $_3$
625	GlcNAc-GalNAc-2AA + SO $_3$	2180	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 {NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_3$ β 1-6} GalNAc-2AA
706	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA	2335	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_4$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + SO $_3$
786	Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + SO $_3$	2546	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 {NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_4$ β 1-6} GalNAc-2AA
868	Gal β 1-3 (Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA	M5	
949	Gal β 1-3 (Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + SO $_3$	1450	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 (NeuAc α 2-6Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA
1234	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA	1815	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 {NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA
M2		M6	
1158	Gal β 1-3 (Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc	1085	NeuAc α 2-3Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc-2AA
1361	Gal β 1-3 (GlcNAc-Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc	1238	Gal β 1-3 (Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc + SO $_3$
1523	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc	1440	Gal β 1-3 (GlcNAc-Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc + SO $_3$
1888	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc	1450	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 (NeuAc α 2-6Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA
2253	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_4$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc	1604	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + SO $_3$
2618	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_3$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc	1684	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + 2SO $_3$
M3		1764	Gal β 1-3 {(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA + NeuAc + 3SO $_3$
633	NeuAc α 2-6GalNAc-2AA	2260	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 {NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_3$ β 1-6} GalNAc-2AA
795	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc-2AA	2626	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 {NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_4$ β 1-6} GalNAc-2AA
998	NeuAc α 2-3Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA	2106	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 {NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_2$ β 1-6} GalNAc-2AA
1160	Gal β 1-3 (Gal-GlcNAc β 1-6)GalNAc-2AA + NeuAc	2471	NeuAc α 2-3Gal β 1-3 {NeuAc α 2-6(Gal-GlcNAc) $_3$ β 1-6} GalNAc-2AA

Table 2 Relative abundances of five N-linked glycans from three different lots of MKN45 cells

	Peak Area (%)				SD	RSD
	Lot1	Lot2	Lot3	Average		
a	20.5	17.9	20.4	19.6	1.47	7.51 %
b	19.7	18.2	17.9	18.6	0.915	4.91 %
c	22.5	23.9	22.4	22.9	0.854	3.72 %
d	21.5	22.1	22.3	21.9	0.386	1.76 %
e	15.9	17.9	16.3	16.9	1.02	6.06%

Table 3 Expression level of three characteristic glycan species on cancer cells

	MKN45	MKN7	PANCI	BxPC3	HCT15	LS174T	U937	K562	Jurkat	HL-60
Bisecting GlcNAc	+	+	+	++	+	+	++	++	-	+
Polylectosamine -type	+	-	++	++	++	+	+	+	++	+++
Sulfated glycans	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Table 4 調査対象となった欧米規制当局

訪問先	米国食品医薬品局(FDA, Food and Drug Administration) 米国国立衛生研究所(NIH, National Institute of Health) (アメリカ合衆国・メリーランド州)
訪問日	平成 21 年 11 月 17-18 日、
訪問先	欧州医薬品庁(EMA, European Medicines Agency) (イギリス・ロンドン市)
訪問日	平成 21 年 10 月 21 日
訪問先	フランス保健製品衛生安全庁 (AFSSAPS, Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) (フランス・サンドニ市)
訪問日	平成 21 年 10 月 22 日
訪問先	国際生物薬品学会(IABS, International Association for Biologicals) (スイス・ジュネーブ市)
訪問日	平成 21 年 10 月 24-25 日
訪問先	ドイツ・ポール・エールリッヒ研究所(PEI, Paul Ehrlich Institut) (ドイツ・ランゲン市)
訪問日	平成 21 年 12 月 7-9 日

Table 5 Hospital Exemption と Special Exemption との主な違い

Hospital Exemption	Special Exemption
● Reg (EC) No 1394/2007 Article 28 (Dir 2001/83/EC Article 3 (7))が根拠	● Dir 2001/83/EC Article 5 (1)が根拠
● ATMP の製造と使用は同一 EU 加盟国内	● 国産品でも輸入品でもよい
● ATMP は医療従事者が発注	● 医師、歯科医師その他の処方者が処方
● ATMP は個別の処方に応じた特注品であって、その製造は「非反復的」	● 特殊な需要がある(同等な作用を持つ承認済みの製品がない)
● ATMP は一か所の病院内で使用	● 使用場所に関する規定なし

要旨

ヒト ES 細胞を中心に、その樹立培養技術の現状をふまえて、その臨床利用において問題となりうる部分を抽出し検討を行った。培養技術に関しては主に動物由来成分の品質管理についてさらなる検討が必要であるが、問題となり得る部分の多くは合理的に解決が可能であると思われる。一方、基礎研究から臨床研究へスムーズに展開するためには、指針・規則等の検討が必要になると思われる。

A. 研究目的

ヒト ES/iPS 細胞を中心とした、多能性幹細胞の臨床研究や企業における製造承認を目指した開発を行う上で細胞由来製品の評価を効率的かつ合理的に行うために必要となる共通の施設、行程、評価や管理に関わる留意事項について、最新の科学的、技術的な知見を踏まえた整理/分析を行う。これにより、行程や管理基準についての標準化を目指して、必要に応じて各種技術の検証や改良を試みる。最終的に、産学官が共通に参照可能な、各要素に関する評価基準のミニマム・コンセンサス・パッケージの基盤とすることを目的とする。

B. 研究方法

再生医科学研究所では、ヒト胚の提供をうけてヒト ES 細胞の作成から培養、研究者への細胞株の分配を行うバンク事業に至るまでの行程を一貫して行っている。これらの確立されたプロセスについて、ヒト ES 細胞を中心に、まず臨床応用の初期段階において必要となるその品質や安全性の確保のための要件を、関連する法規・指針、最新の科学技術、国際的動向などをふまえて、標準化を目指した分析を行うと同時のその妥当性について検証を行い、必要であれば改良を行う。

臨床利用を目的としたヒト ES 細胞の Master Cell Bank (MCB)の構築を想定した場合、その評

価基準策定は以下の様なステップに分割することができる。

1. ヒト胚の提供
2. ES 細胞株の樹立
3. 増殖と凍結保存、融解

およびこれらに加え適当な段階で細胞の品質評価を行うことになる。

それぞれの段階について、関連する指針等や技術的要件を分析・評価する

(倫理面への配慮)

京都大学再生医科学研究所におけるヒト ES 細胞株の樹立研究と使用研究は、政府指針に沿った文部科学大臣からの確認をすでに受けている。本研究はこれらの研究に含まれるものである。

C. 研究結果

1. ヒト胚の提供に関わる問題点

ES 細胞作成の「原材料」となるヒト胚に関してはヒト由来組織の利用という観点からの倫理的問題と、安全性確保に関する技術上の問題の二つについて適切な基準を設定する必要がある。

1. 1 指針上の問題点

ヒト ES 細胞の作成はこれまで文科省指針である「ヒト胚性幹細胞の樹立及び分配に関する指針」により行われている。臨床研究に用いるヒト ES 細胞の作成も原則としてこの文科省指針と同

様の基準で行うことが妥当であると考えられる。文科省指針はこれに基づき作成された ES 細胞を医療に利用することを禁じるものではないが、基本的に基礎研究を想定した指針になっており、たとえば細胞株の分配は ES 細胞の使用研究指針（文科省）に従い届け出のあった研究計画に対してのみ可能とされている。臨床研究を実施する研究機関は文科省指針に従いすでにヒト ES 細胞研究を行っている場合がほとんどであると考えられるため、文科省指針に基づき作成された細胞株であっても、臨床利用が不可能とするわけでは必ずしもないと言える。いずれにせよ基礎から臨床に至るまで細胞株を途切れることなく使用できる環境を整備することが、ES 細胞の臨床利用に必要な不可欠である。同様の理由から、これまでに作成されている細胞株に関しても安全性に関わる適切な管理基準を定め、臨床利用を可能とすべきである。

1. 2 インフォームド・コンセント (IC)に関わる問題

凍結胚の提供の同意を得るために必要となる説明内容は文科省指針に規定されており、基本的には同様の説明がなされれば問題ないと考えられる。説明の際に臨床目的や医薬品製造などへの利用が将来的に想定されることが説明文書等に記載されていれば、同意書の項目として「臨床利用に同意」を設定する必要性はないと考えられる。

1. 3 凍結胚の安全性に関する問題

凍結胚の提供者は組織幹細胞の臨床利用などで想定されるドナーとは本質的に異なり、その病歴は ES 細胞の安全性に直接影響するわけではない。また、不妊治療の患者は通常 HCV, HIV などの感染についてスクリーニングされており、凍結胚のこれらのウイルスによる汚染の可能性は相

当に低いと言える。その一方で、凍結胚の提供の手続きは不妊治療終了後に開始されるため、求められる検査項目等を完全に満たしていないケースもあり得る。

上記に加え不妊治療で用いられる手技は医療機関ごとにまちまちであり、またたとえば用いた薬品類のロットなどの記録が不完全である場合も予想される。

これらを考慮して、凍結胚については品質管理基準をあらかじめ設定することは適切でなく、個々の事例について合理的に判断されるべきである。

1. 4 匿名化に関する問題

ドナーと提供された組織の連結可能性が求められる理由のうち大きなものとして、提供後にドナーが何らかの疾患を発病した場合に、レシピエントへの対応が必要となる場合が想定されていることがある。たとえば、遺伝性疾患を発病したような場合が挙げられるだろう。しかしながら ES 細胞の場合はドナーと胚は遺伝的には親子関係にあり、連結可能とする必要性はほとんど存在しない。よってドナーと ES 細胞の連結情報を保持する必要性は乏しい。

2 ES 細胞株の樹立と培養に関する問題

以下に培養技術上の問題点をあげる。

2. 1 胚培養と細胞株樹立

ES 細胞株の樹立、凍結胚の解凍・培養、胚盤胞からの内部細胞塊の単離、内部細胞塊の培養と株化、のステップから構成される。

凍結胚を解凍し胚盤胞まで培養する工程は胚を提供する医療機関により異なる可能性があり、またそれぞれの医療機関でとられている手法をそのまま導入することになる。そのため、品質管理が困難な試薬等が使用されている場合も想定

される。個別に評価することが必要になるだろう。

内部細胞塊の単離には、抗血清や動物補体を用いた免疫手術法や機械的に分離する手法などが用いられている。機械的分離法が好ましいと考えられるが、免疫手術法など他の方法も排除されるべきではない。一般に樹立過程ではマウス繊維芽細胞などをフィーダーとして用いることで、効率よく細胞株を作成することができると考えられている。一旦樹立された細胞株は、後述するようなフィーダーフリーでの培養が可能であると考えられる。これら、動物由来成分・細胞などを用いる場合の安全性確保については、後工程での品質管理により担保する方法が有効であると考えられる。

2. 2 完全合成培地によるヒト ES 細胞の培養

ES 細胞の医療利用には培養工程の品質管理が重要である。従来は FBS や純度の低いヒトを含めた動物由来成分などを含む培養液が用いられてきたが、これらは品質管理の観点から様々な問題があるため、化学合成品やリコンビナントタンパクへの置き換えが好ましいと考えられる。このような目的でこれまでに様々な合成系培養液が開発され、市販品としても流通している。hESF9 (Cell Science & Technology Institute)、mTeSR1 (Stemcell Technologies)、StemPro hESC SFM (Invitrogen)、HESc-GRO (Millipore) などが代表的なものである。

今回我々はこれらの培養液についてその性能の評価を行った。

それぞれの培養液について、数継代~10継代程度の培養を行い、未分化状態の維持を形態的に判別した。mTeSR1 と StemPro 培養液については比較的安定的に未分化性を維持した培養は可能であったが、他の培養液について、用いる細胞株により、分化傾向が認められ、安定に培養でき

ない場合があった。株毎に適切な培地を選択することで培養が可能になると考えられる。培養液と異なり培養基質については、ヒト細胞を用いるものの他、多くでマウスガン細胞由来のマトリックスが使用されており、これらを原材料としての適合性の検討、代替物の開発などが必要である。

2. 3 感染性物質の混入の可能性

原材料レベルであるいは樹立培養過程で用いられた原材料が規定を満足していることを示せない可能性が考えられる。またマウスなど異種細胞をフィーダーに使用した履歴がある場合も考えられる。しかしながら、その後十分な品質管理下で一定期間培養後に、ウイルス検査をおこなう、またマウスゲノムの混入について否定試験で示されたならば、マウス細胞をフィーダーとして培養した履歴があっても問題はないと考えられる。

D. 考察

ES/iPS細胞のいずれの場合にも、比較的長期間にわたる培養増殖が想定される。そのため培養期間を通じて感染性物質の混入などを排除するシステムの構築が不可欠である。一方品質管理水準の高い培養液を用いた場合に、若干の細胞の性質の変化も認められる。このことは、通常用いられる培地成分を、より品質管理されたものに置き換えることにより ES 細胞に何らかの影響を及ぼす可能性を示唆するものと考えられる。性質の変化が細胞の安全性とどの程度関連しているかは今後の研究の進展を待つことになるが、厳格な品質管理を要求することで、逆に安全性を損ねる可能性もあることを認識する必要があるだろう。

E. 結論

ES/iPS細胞の臨床利用における技術上の諸問題の多くは解決されつつあるといえ、一定の科学的合理性をもって評価基準を設定することが可能と考えられる。一方で、ES細胞に関しては文科省指針等との整合性の確保を考慮することが、基礎研究から臨床応用までをシームレスに展開する上で重要になるだろう。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. 高田圭、末盛博文 医療応用に適した ES 細胞培養システム 実験医学 2010;28:204-208.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書 阿久津英憲

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金
「再生医療実用化加速に資する評価基準ミニマム・コンセンサス・パッケージ策定
に関する研究」

分担研究者 阿久津英憲 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所生殖・細胞医療
研究部 室長

研究要旨：ヒト多能性幹細胞である ES 細胞や iPS 細胞は細胞治療などの再生医療応用
へ向け社会の期待は非常に高い。多能性幹細胞を用いた細胞治療応用に際して、これまで
先導している組織幹細胞に対して ES/iPS 細胞自身の持つ特性に起因した考慮点が存在す
る。細胞作成から応用の過程で最小限必要な細胞解析要件、加工段階での要件、安全性・
有効性評価段階での要件をヒト ES 細胞を中心に報告する。

A. 研究目的

1998 年にウィスコンシン大学の Thomson
らによって多能性幹細胞であるヒト ES 細胞
の樹立が報告されて以来、ヒト多能性幹
細胞をツールとした細胞治療など再生医療
への応用の期待が世界的に高まってきた。
更に、倫理的に慎重な手続きを要するヒト
胚を用いず獲得できる iPS 細胞樹立が 2007
年に山中らにより報告され、とりわけ難治
疾患に対する社会の再生医療への関心と期
待は一気に高まってきた。ヒト ES 細胞研究
は、樹立・培養維持に関する“Methodology”、
発生・分化研究や未分化メカニズム研究な
どの“Basic Biology”, “Mechanisms”、そし
て細胞治療や創薬・薬剤毒性検定システム
などの“Application”とが連関して展開、推
進してきた。そして、米国 FDA は Geron 社

によるヒト ES 細胞を用いた脊髄損傷患者
に対する臨床研究 (Phase I) を承認して世
界で初めての細胞治療がまさに始まろうと
している。ES/iPS 細胞臨床研究に係る考慮
する点は、細胞を育て移植するという細胞
調製工程に係る点と ES/iPS 細胞自身の持
つ特性に起因する考慮が存在する。

多能性幹細胞を用いた細胞治療応用に際
して、最小限必要な細胞解析要件、加工段
階での要件、安全性・有効性評価段階での
要件等現状と展望を検討していく。

B. 研究方法及び研究結果

1. 多能性幹細胞について

「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指
針」はヒト幹細胞を用いた臨床研究を対象
としており、この適応となるヒト幹細胞は、

ヒトから採取された細胞又はそれより由来する細胞で多分化能と自己複製能力を有する細胞である。造血系幹細胞や間葉系幹細胞などの組織幹細胞及びそれらを含む細胞集団が主な対象となる。分化能力の観点から組織幹細胞は外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉系組織全てに分化する能力を持つとする報告は無いものの、胚葉を越えて様々な細胞へ分化することができ可塑性も示すものが存在することが報告されている。組織幹細胞は多分化能性 (Multipotency) 幹細胞である。一方、ES 細胞や iPS 細胞は三胚葉系組織全てに分化する能力を持ち、組織幹細胞より高度な多分化能性 (Pluripotency) を持つ幹細胞である。更に、ES/iPS 細胞は適切な培養環境下では無限に増殖可能な自己複製能を持つ。細胞治療を主とした再生医療の確実な成功には、大量の正常な細胞を獲得することが要求され増殖能の高い ES/iPS 細胞は大いに期待される。多分化能性 (Pluripotency) を保持したまま無限に増殖可能な ES/iPS 細胞は生物学的性質としては非常に興味深く、より臨床に根ざした医科学研究領域でも非常に有用なツールであると考えられるが、細胞治療などの再生医療へ応用する場合 ES/iPS 細胞が高い多分化能性及び自己複製能を持つが故に含有する腫瘍化などの問題を考慮し臨床研究 (First in Man) の際には、組織幹細胞とは若干異なる評価が必要である。

2. ES/iPS 細胞を用いる臨床研究の現状(制

度)

ES/iPS 細胞を用いる細胞治療の臨床研究を行うに当たっては、薬事法の下で確認申請ののち治験を行う方法と臨床研究により First in Man trial を行う場合が想定される。現段階において医師法の範囲内で行われるヒト幹細胞臨床研究を対象とする「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」では ES 及び iPS 細胞が規制されていないが、「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案 (中間報告)」と自己及び同種に関する「ヒト 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案 (中間報告)」のヒト多能性幹細胞を用いた再生医療へ向け指針案の中間報告が提出された。

基礎研究及び臨床応用に関しても iPS 細胞を先導する形で進んでいる ES 細胞に関して報告する。わが国ではヒト ES 細胞を用いる細胞治療に対して薬事法上の治験届けがなされたものは無く、臨床研究についても指針が策定中である。国際的にみると、ヒト ES 細胞樹立が報告されて 10 年後の 2008 年に国際幹細胞学会 (ISSCR) が ES 細胞を含むヒト幹細胞を用いる臨床研究に関するガイドライン (Guidelines for the Clinical Translation of Stem Cell Research) を公表した。

3. ES/iPS 細胞を用いる臨床研究の現状(応用)

ヒト ES 細胞株由来細胞による臨床研究に関しては、既に米国 Geron 社による ES 細

胞株由来オリゴデンドロサイト (Oligodendrocyte) 前駆細胞による脊髄損傷患者への臨床研究に対して米国 FDA が IND として承認を与えている。第二例目として米国 ACT (Advanced Cell Technology) 社がヒト ES 細胞株由来網膜色素上皮細胞を用いる遺伝性黄斑ジストロフィー (シユタルガット病) に対する臨床研究を申請中である。

4. ES/iPS 細胞を用いる臨床研究の課題

十分な治療効果と安全性を担保した細胞治療にとって重要な課題は、治療に足る十分な細胞数を得ることであり、その細胞と細胞由来製品調製工程では品質管理と追跡可能性が確保され、各種の汚染を防いで良質な細胞を提供しなければならない。通常自己移植利用が多く保存を必要とするケースが極めて少ない組織幹細胞とは異なり、ヒト ES/iPS 細胞は基本的に未分化幹細胞のマスター細胞バンクが必須であり、細胞治療に供する ES/iPS 細胞株由来細胞 (幹細胞または前駆細胞) の保存も行われる。バンク化する幹細胞は規格化された明確な基準に則って、目的の機能をもつ十分量の細胞を創出することを保証しなければならない。ヒト多能性幹細胞の場合、培養で未分化状態を維持されている性質と細胞調製工程でも細胞の品質を迅速に評価する品質管理施策を策定することは重要である。細胞は品質検査 (染色体核型解析、特異マーカー解析 (RNA からタンパク質レベル) や生物学的特徴評価も含めた細胞機能性評価、

網羅的遺伝子発現プロファイリング、CGH などのゲノム安定性評価、エピジェネティックス (DNA メチル化) 解析などがあり、最近では糖鎖に関してもアレイやチップ等による網羅的な解析の有用性も報告されており、エピジェネティックス解析でもヒストンタンパク質の修飾解析も幹細胞の特異性を見出す解析として汎用化されてきている。また、細胞由来製品として応用する細胞集団から不適切な細胞を除去する方法を確立することも重要である。未分化細胞のままでは治療に適さないことがあり、分化誘導した細胞を細胞治療ツールとして用いる方が適切であることが多い。適切な細胞集団を抽出していくにはポジティブセレクションによる方法で現時点での最善の方法により選択していくべきである。

C. 考察および結論

ヒト ES/iPS 細胞を用いた細胞治療における細胞及び細胞調製工程で考慮すべき点としては大きく 2 つに分けられる。一つは、他の組織幹細胞を用いる場合のように細胞の調製・加工工程や移植・投与工程等に係る多くの細胞治療が含有するリスクであり、もう一つはこの ES/iPS 細胞の性質に起因する事象である。前者については、組織幹細胞を用いた臨床研究において細胞・組織を製品化する際の取扱いに関する基準として細胞組織由来製品の採取、調製、出荷において、感染、試料取違いや異物混入等の予防策をまとめた GTP が整備される。細胞の調製・加工工程や移植・投与工程等に係

る安全性を担保するために、ヒト幹細胞や調製工程に由来する感染症の伝播の危険性が懸念されるため、細菌、真菌、ウイルス等に汚染されていない原料の使用、調製工程における汚染の防止等を図ることは当然ながらヒト ES/iPS 細胞を用いた細胞治療にも必須である。ヒト ES 細胞は樹立の段階から考慮されるべきで、臨床研究に用いるマスターES 細胞株が整備される必要がある。次に、臨床応用に際し考慮する事項として ES 細胞の性質がある。ヒト ES 細胞は正常染色体核型をもつ多能性幹細胞であり、適切な培養条件の下、高度な多分化能性を保持したまま無限に増殖できる細胞である。しかし、通常の細胞治療では多能性を保持した細胞状態で投与することはなく、目的とする機能を有する細胞への分化を行い治療に用いることになる。1) 異所性の分化や目的としない細胞への分化、2) 腫瘍化(奇形種)、3) 他家移植になるため GVHD、4) 免疫抑制剤等の服用による影響などが考えられる。ヒト ES 細胞は分化誘導処置をして移植することになり、具体的には ES 細胞そのものではなく標的分化途上の幹細胞あるいは前駆細胞が評価・移植の対象となる。腫瘍化の危険性に関しては、これまでのマウスやヒト ES 細胞研究において癌化した報告は一例もない。細胞治療における腫瘍化のリスクは奇形種(良性腫瘍)の形成であり、万が一奇形種が形成されたら移植する場所により解剖学的、組織学的、機能的な障害を引き起こす可能性がある。分化誘導した細胞の現在の腫瘍化形成能を否

定する可能な品質評価解析をおこないつつ、完全にその可能性を排除できない点も考慮し ES 細胞株由来細胞の製造工程や工程管理を先端の知見と技術を応用しより安全性の高い最終製造物を提供することが重要であり、当然ながら移植後の被投与患者のフォローアップは一定年数行うべきである。Geron 社の治験は、ヒト ES 細胞から Oligodendrocyte 前駆細胞を分化誘導し (GRNOPC1 細胞)、脊髄損傷発症(胸椎 T3-T10) から 7-14 日目の患者さんに移植するストラテジーで行われる。他家移植になるため、免疫抑制剤の使用のもと細胞が移植され、移植後 10 年は被検者のフォローアップをする計画となっている。細胞自体 (GRNOPC1) のモデル動物を使用した安全性に関する検定では、異所性分化や奇形種形成は観察されず(移植後 1 年)、移植によって生じる健康をそこなう可能性に関しても検証を行っている。細胞治療による想定内のリスクを検証し、少なくともそのリスクが発生しないことを確認できる条件で治療が行われるが、想定外のリスクに関しては今後行われるヒト ES 細胞の実際の治験を注視する必要がある。

細胞治療におけるあらたな開発要素としては、これまでの細胞製造・調製工程、動物実験や細胞治療プロトコルを再評価し、用いる細胞の特徴的な性質を理解したうえで、移植後の体内での長期的な細胞動態や機能そして腫瘍化等も含めた性質を十分に考慮した検定・評価系を構築していく必要がある。