

可能性

このうち、抗原性の問題、造腫瘍性の課題については後にまとめて考察する（C-11, C-12 項参照）。2)及び3)に関連しては、いわゆる安全性薬理試験のようなアプローチとして考えるのが適切かも知れない。なお、評価すべき製品がヒト由来のものであるので、一般に実験動物としては免疫不全動物を用いるのが適切と思われる。

#### C-5 非臨床有効性（POC）試験

非臨床有効性試験は、開発された個別の新規製品が対象とする疾病に対して期待される機能発現、作用持続性及び医療製品として期待される臨床効果の実現可能性（Proof-of-Concept:POC）を示すこと、体内動態に関する試験等により、製品中の細胞・組織の生存期間、効果持続期間を推測し、目的とする効果が十分得られることを明らかにすること、製品の用法（投与方法）について、動物実験を通してその合理性を明らかとすること、特定の部位（組織等）に直接適用又は到達して作用する場合には、その局在性を明らかにすることなどを目的に試験、評価するものであり、ケース・バイ・ケースのアプローチになることはむしろ必然とさえいえる。このような中で、あえてMCPを挙げるとすれば、次の様な事項であろう（Table 5）。

- 1) 技術的に可能で、科学的に合理的な範囲で、実験動物や細胞等を用いて、期待される効果や体内動態等を検討。POCを示す
- 2) 適切な製品モデル/疾患モデル動物の合理的活用

- 3) 当該製品の効力又は性能による治療が他の治療法と比較したときはるかに優れて期待できることが国内外の文献又は知見等により合理的に明らかにされている場合には、治験開始段階では、必ずしも詳細な実験的検討は必要とされない

#### C-6 臨床試験開始にあたっての考慮事項

MCPは元来、共通の認識、技術基盤のもとでいかに効率的、効果的に臨床試験に至るかの方策である。一方、臨床試験は、適切な試験デザイン及びエンドポイントを設定して実施する必要がある、目的とする細胞・組織の由来、対象疾患及び適用方法等を踏まえて適切に計画することが重要である。その意味で、個々の製品に関する臨床試験の技術要件自体は、まさにケース・バイ・ケースで扱われるべきものであるので、臨床試験自体のMCPというのは中心課題ではない。

しかし、MCPもしくは上乘せ方策を考える際、あるいは製品の品質、安全性を評価する際、目指す製品の臨床試験の内容を抜きにしては適正な対応はとれない。また、ヒト細胞を有効成分とする製品による再生医療という先端医療技術の医療上の可能性はヒトで試験してみなければ確かめられないという点と、どのようにすれば科学的合理性、倫理的妥当性、社会的理解、認知のもとで試験を開始することが出来るかという点の兼ね合いをどこに求めるかは、概念的にも技術的にも大きな課題である。この臨床試験の入り口に至るまでと開始に至る隘路を解消するための考え方の整理を試み

てみたい。

### C-6-1 非臨床安全性評価に必要な臨床試験計画案

ヒト細胞加工製品の治験を開始するに当たって支障となる品質及び安全性上の問題が存在するか否かの段階における安全性については、臨床上の有用性を勘案して評価されるものである。その際、少なくとも以下の項目を踏まえながら評価することになる。

- 1 対象疾患
- 2 対象とする被験者及び除外すべき被験者の考え方
- 3 ヒト細胞加工製品及び併用薬の適用を含めた、被験者に対して行われる治療内容(注:投与・移植した細胞の機能を維持・向上・発揮させるために併用する薬剤が想定される場合、当該薬剤の作用を *in vitro* あるいは *in vivo* で検証すること)。
- 4 既存の治療法との比較を踏まえた臨床試験実施の妥当性
- 5 現在得られている情報から想定される製品並びに患者のリスク及びベネフィットを含め、被験者への説明事項の案

### C-6-2 臨床試験開始の決定に際してのリスク分析の留意点と倫理

臨床試験開始の決定に際しては単に製品や医療技術のリスク評価のみならず、患者のリスク評価、リスクコミュニケーションを含めたリスク分析の適正な活用と、患者の意志尊重が重要な要素となる。すなわち、明らかに想定される製品のリスクを現在の学問・技術を駆使して排除し、その科学的妥当性を明らかにした上で、なお残る「未知のリスク」と、重篤で生命を脅かす疾患、

身体の機能を著しく損なう疾患、身体の機能や形態を一定程度損なうことにより QOL を著しく損なう疾患などに罹患し、従来の治療法では限界があり、克服できない患者が「新たな治療機会を失うことにより被るかも知れないリスク」とのリスクの大小を勘案し、かつ、これらすべての情報を開示した上で患者の自己決定権に委ねるという視点を持つこと、すなわち、リスク・期待されるベネフィットの情報を開示した上で治験に入るかどうかの意思決定は患者が行うという視点を入れて評価することが望まれる。

### C-6-3 先端医療としての再生医療のリスク・ベネフィット概念

前項で「リスク・期待されるベネフィットの情報を開示した上で治験に入るかどうかの意思決定は患者が行うという視点を入れて評価することが望まれる」と述べた。これが現在の先端医療としての再生医療のリスク・ベネフィット概念としてどのように認識すべきかについて改めて考察する。前項で述べたことと重なる部分も多いが、重要なポイント何点かを次に列挙する。

- 1) 患者は重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患、身体の機能や形態を一定程度損なうことにより QOL を著しく損なう疾患などに罹患し、従来の治療法では限界があり、克服できず、また時間の経過による悪化というきわめて大きなリスクを背負っている。どんな形、程度でも回避・軽減できればベネフィットである。
- 2) 製品等のリスクは対象疾患等との関係で大小が評価されるべき相対的なもの

であり、対応如何では軽減する。

- 3) 原材料、製法及び製品自体から明らかに想定されるリスクは現在の学問・技術を駆使して可能な限り排除することは前提であるが、科学的関心から製品のリスク自体を問うと際限がない。ケース・バイ・ケースでそれぞれの相対的リスクやリスク軽減を明確にして製品や医療技術をリスク評価すべきである。
- 4) 医療（患者）に焦点をあてた科学的合理性に基づき、患者の持つリスクと、製品や医療技術のもつ相対的なリスクを勘案した総合的なリスク評価が必要である。
- 5) 何よりも、新規療法はヒトでやってみなければわからない。
- 6) 治療しないことのリスク、すなわち「患者が新たな治療機会を失うことにより被るかも知れないリスク」と適用することのリスクの大小を勘案し、すべての情報を開示して徹底的に説明した上で、患者さんの自己決定権に委ねる視点が重要ではないか？

#### C-6-4 薬事法下における先端的再生医療の臨床試験として考慮すべき視点

再生医療において最も重要な論点のひとつが、薬事法下で製品を開発していく際に、臨床治験に至るまで必要とされるデータ内容と量、治験で求められるデータ内容と量、とくに後者に関してはヒト幹細胞指針に沿って行われた臨床試験データすら使えない、あるいは資料として認められないということであった。そのため、薬事法下で取り扱うことが、先端的医療としての再生医療の発展を損ねる要因になっており、例えば再

生医療法と言った先端的再生医療の特殊性、実情に則すよう特化したルールで再生医療を扱うべきという議論が度々為されてきた。しかし、法律の制定には多くの努力と時間が必要である。そこで現行制度の中でも視点を変え、薬事法の解釈運用を柔軟にすることで隘路を解消するための問題点整理と今後の方向性について考察した。

##### C-6-4-1 薬事法の根底となる概念としての公衆衛生上の視点

品質・有効性・安全性確保を含めて薬事法の根底となる概念は基本的には公衆衛生上の視点に基づいていると思われる。すなわち、製造販売承認後には大勢の顔の見えない患者に適用されても効能・効果的には普遍性があり、安全性面では問題を最少限度に止めることを想定した評価のあり方、考え方を採用していると思われる。例えば治験データは代表的予測例にすぎない。したがってより多くの患者に対しより確実な予測を可能にするには厳密な信頼性保証が必要である。品質規格の厳密な設定や恒常性確保が強調されるのは、治験で評価された安全性・有効性を品質として継続的に担保していくためである。

##### C-6-4-2 先端的再生医療においては薬事法に個別型医療の視点を取り込み解釈運用することが重要

当面の再生・細胞医療の試行例の多くは、重篤な疾患、希少疾病等が対象でかつ少数例に対して、きわめて高度な専門医が、直接患者さんに向き合い、その症状を診ながら先端的治療を施そうとするまさに個別型医療である。そして研究・治験の実施が患者さんに治療結果として直接反映する。ま

た、製品は小規模な個別生産が多く、試料は少量できわめて貴重である。細胞の採取と移植は専門医が行う医療行為であり、製品の品質については専門医が最もすぐれた判定者であることも多い。こうした実情を鑑みると従来の公衆衛生型の概念ややり方をそのまま当てはめると合理的ではないところが少なからず生ずることになる。これに対して欧米では患者本位に立つ様々な対処法を整備している。わが国でも従来の公衆衛生上の視点からみた厳密な踏襲ではない柔軟なアプローチ、評価法、保険・補償制度を検討すべきではないか。患者の現状を少しでも救済するとの考え、新たな選択肢提供の考え、その蓄積が次の進歩・発展への足掛かりになるとの見方で支援すべきと考える。もし、従来と同じ要件充足を求めるなら、支援体制の充実が必要不可欠である。

#### C-7 細胞種別 MCP と上乘せ方策

原材料となる細胞種をカテゴリー別に見ると、Table 6 に示したように、「自己」と「同種」、「体性幹細胞」、「iPS (様) 細胞」、「ES 細胞」がある。正確には前二者のいずれかと後二者のいずれかの組み合わせになる。

MCP という観点から考えた場合には、典型的には GTP のようにすべての細胞種間に通底し適用されるべき MCP とカテゴリーを同じくする細胞種内での MCP がある。本研究では主に前者を対象としてきた。

後者に関しては、最近「ヒト (自己) 体性幹細胞加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針 (案)」、「ヒト (同種) 体性幹細胞加工医薬品等の品質・安全性確保に関

する指針 (案)」、「ヒト (自己) iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針 (案)」、「ヒト (同種) iPS (様) 細胞加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針 (案)」、「ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質・安全性確保に関する指針 (案)」という形で各細胞種別のフルパッケージ版が公表されている。

ここで新ためてその経緯を振り返ることにする。

再生医療用製品の実用化の為に必要な要件を開発早期から示すことは、医学研究者や企業が研究・開発を合理的、効率的、効果的に進め、より迅速に実用化するために必須である。また、規制側としても、予想される製品の評価を認識を共有しながら円滑に進めるために必要である。そこで、厚生労働省は 2006 年から厚生労働科学研究班(班長:早川堯夫)による検討を行った。その結果、2008 年 2 月及び 9 月にそれぞれ自己及び細胞・組織加工医薬品等全般に関する指針「ヒト(自己)由来細胞・組織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)(以下自己親指針と称する)」及び「ヒト(同種)由来細胞・組織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)(以下同種親指針と称する)」を通知として発出するに至った。

その間、特にヒト由来の多能性細胞、すなわち間葉系幹細胞などの体性幹細胞、胚性幹細胞(ES 細胞)が細胞・組織加工医薬品等の重要な素材としての研究対象となってきた。さらに山中からはヒト人工多能性幹細胞(ヒト iPS 細胞)の作製に成功し、分化した細胞を人為的にリプログラミング(初期化)できることを示した。これは細胞の分化・脱分化が人為的に自在に

操作できる可能性を示唆する金字塔であり、その活用により、生命現象解明のための基礎研究、病因や発症機構解明などの医学研究、毒性・薬効評価系確立などを通じた創薬研究、さらに再生医療の実用化にも無限の可能性が拓かれた。iPS 細胞が細胞・組織を加工医薬品等の素材としてきわめて大きな脚光を浴びることになった。

こうした状況下で、わが国発の技術開発である iPS 細胞をはじめ、各種幹細胞に由来する製品の薬事法下での臨床応用に向けて、研究・開発、品質・安全性の観点からヒトに適用しても差し支えないかの評価に関わる確認 (First-in-Man・治験開始の前提条件を充たしているかの評価・確認) 等を効率的、効果的、合理的に行う上で、必要と思われる技術、製造方法、特性解析方法、品質管理方法及び安定性、並びに非臨床安全性及び有効性に関する留意事項及びデータに関する指針の作成が強く要望された。

これに対応するため平成 20 年度から厚生労働科学研究事業「ヒト幹細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質・安全性確保に関する研究班(班長:早川堯夫)」が実施された。研究では、ヒト幹細胞の細胞・組織加工医薬品等への利用に関連した学問・技術の進歩、倫理上の重要ポイント、各種規制、国際動向等を調査・研究し、適切な安全性評価基準の作成や規制のあり方を検討することにより、ヒト幹細胞由来製品の実用化の推進を図ることを目的としていた。

その結果、「自己親指針」をベースとして、ヒト(自己)体性幹細胞及びヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等に関するそれぞれの指針案(中間報告)を作成した。また、「同種親指針」をベースとして、ヒト(同種)体性幹細胞、ヒト ES

細胞、ヒト(同種)iPS(様)細胞に関するそれぞれの指針案(中間報告)を作成し、公表した(再生医療, 9(1) 116-180, 2010)。これをベースにさらに諸外国での状況、その後の当該分野の進歩、さまざまな観点からの論議を踏まえて最終案(以下本指針案と略する)を作成した。これらの案は、現在パブコメを経て、やがて正式通知として発出されようとしている。

この作成過程からも想像されるように、すべての細胞種間に通底し適用されるべき技術要件については可能な限り、整合性を持たせている。一方、カテゴリーを同じくする細胞種内と特殊性はそれぞれ固有の指針として示している。

これらを参考にしつつ、一方では、細胞種に拘わらず通底する MCP 及び各細胞種別 MCP を作成していくのが最も合理的である。当然各細胞種別で特色のあるところはケース・バイ・ケース、上乘せ分での MCP となると考えられる。基本は Table 6 に示したような各細胞種別の特性に基づき考慮されていくことになると考えられる。

この中で、自己体性幹細胞製品や同種体性幹細胞製品の MCP については、基盤的なこととしてすでに本研究に網羅されている。

ES 細胞/iPS 細胞等についても基本的な技術要件は明らかにされている。しかし、細部にわたっては、さらに理解、解釈を深めるべき点あるいは臨床研究や臨床応用をめぐるいくつかの論点が残されている。そこで今後への展開も含め、本研究で論考を進めることとした。

#### C-7-1 ヒト ES 細胞の樹立培養技術の現状と臨床利用における課題

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と思われる。

#### C-7-1-1 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、安全性確保にかん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。

##### C-7-1-1-1 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、文科省指針にも続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さだめたうえで臨床利用を可能とすべきである。文科省指針が基礎研究のためのものであることから、文科省指針下で作成された細胞株について臨床利用できないのではないかとの議論も提起されている。しかしながら、再生研の樹立計画では提供者への説明文にも将来的な臨床利用の可能性が記載されており、この研究計画の文科省指針に対する適合性は専門委員会による審議を含む厳格な二重審査の上、文部科学大臣に確認されている。従って文科省指針下で樹立された細胞株の臨床利用に関して、指針への適合性には問題無いと考えられる。

##### C-7-1-1-2 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。

##### C-7-1-1-3 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。

#### C-7-1-1-4 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。

平成 22 年 11 月に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(以下、ヒト幹指針)」が改正され、ES/iPS 細胞の臨床研究への道筋がつけられたことになる。しかしながら、ES 細胞の樹立・利用に関しては別途定めることとされている。しかしながら、匿名化に関しては、臨床研究に用いられる試料については連結可能匿名化が原則とさ

れており、文科省指針との整合性をとることが困難である。

連結情報が必要とされる局面は ES 細胞の臨床利用においてはほとんど考えられないことは上記のとおりであるが、連結可能匿名化とする場合においては提供者の不安の軽減などについて適切な対応がとられる必要がある。

#### C-7-1-2 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。

##### C-7-1-2-1 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。

凍結胚の解凍し胚盤胞まで培養する行程は胚を提供する医療機関によりことなる可能性があり、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

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。

#### C-7-1-2-2 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行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)、mTeSRTM1 (Stemcell Technologies)、StemPro hESC SFM (Invitrogen)、HESc-GRO (Millipore)などが代表的なものである。

これらの報告のある培養液について、International Stem Cell Initiative (ISCI) による国際的な性能の比較研究が行われた。この研究では、世界的な研究をリードしている 4 箇所の研究機関が共同して合成系培養液の性能の比較を、同一の細胞株と各研究機関で樹立された細胞株を並行して培養することで、同一条件でどの培養液が幅広い細胞株に適用可能かどうかを比較検討した。すべての研究機関で H9 細胞を対照細胞として用い、5 種類の合成系培地 hESF9 (Cell Science & Technology Institute)、mTeSRTM1 (Stemcell Technologies)、StemPro hESC SFM (Invitrogen)、HESc-GRO (Millipore)の比較検討が行われた。10 継代後に細胞表面抗原の発現を指標に未分化状態の維持を解析した。この共

同研究には我々が樹立したヒト ES 細胞 KhES-1, KhES-3 が用いられている。結果は、いずれの研究機関に置いても mTeSR1 と StemPro が比較的良好な結果を示しており、従来の我々の結果を支持するものとなっている。

これらの培養液が実際に臨床研究などのヒトへの ES 細胞の利用に適合するかどうかについては、さらなる検討が必要である。上記の 2 培養液には、BSA など動物由来の成分が含まれており、市販品についてはこれらが必ずしも BSE 非汚染国由来とは限定されていない。また動物由来成分をヒト由来蛋白質に置き換える試みもなされているが、日本においてヒト化培養液の利用は困難であると考えられる。いずれの場合においても品質管理上の観点からは、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、さらなる研究開発が必要である。

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。我々はすでにリコンビナント ヒト ラミニン蛋白質を接着基質として利用可能であることを示しているが、ラミニンは巨大な蛋白質であるため生産・精製が困難で結果として一般的には非常に高価である。これに変わりうるものとして化学合成ポリマーやポリマーとペプチドの複合体を ES 細胞の接着基質として利用出来ることが報告されてきている。現状ではどれくらい幅広い細胞株で利用できるか明らかでないが、今後はこれらの合成基質の利用が進むものと期待されて



いる (Fig 2)。

#### C-7-1-2-3 感染性物質の混入の可能性

先に述べたように、培養環境を合成系にする努力は重ねられており、短期間の維持培養に関しては受容可能な性能を持つと考えられるものもある。しかし、細胞株の樹立や良好な維持培養には依然として、マウス繊維芽細胞のフィーダーの使用が好ましいと考えるものも多い。これまでに樹立され様々な研究に利用されている細胞株の多くでは、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場合や、培養経歴のなかにマウスなどの異種細胞の接触や、動物由来成分に接した可能性が否定でき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、その後に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。

したがって、このような細胞の利用を想定して、検査すべき項目を明瞭にすることが必要である。

#### C-7-1-2-4 ゲノム・エピゲノム安定性

ES/iPS 細胞の臨床利用においてはその増殖過程で生じるゲノム・エピゲノム変化がどのような影響を及ぼすかを考慮する必要がある。細胞が分裂・増殖する過程でゲノムに何らかの変化が生じることは不可避であり、それ自体は人の体内でも起こる自然な現象である。実際大半の変化は中立

的であり細胞の機能や生存・増殖には影響を及ぼすことはないと考えられるが、きわめてまれに発がんなどに至ることがあるのも事実である。よって、培養過程で起こるゲノム・エピゲノム変異のモニタリングとその評価をいかに行うかは重要な問題である。

この問題への一つのアプローチとして、ISCI による国際共同研究として多数のヒト ES 細胞株について培養初期と長期継代後の細胞のゲノム解析が行われ、我々の ES 細胞についてのデータを含めその結果が論文発表された(Nature Biotechnology 2011 Nov 27;29(12):1132-1144)。その結果、核型のような巨視的なレベルにおいても高頻度に変異が認められる染色体や染色体領域が明らかにされた。この中には従来から知られている 12 番、17 番染色体のトリソミーも含まれていた (Fig. 3)。このほか 1 番、2 番染色体においても増幅が見られるなど、全体的には遺伝子増幅が主な変異であることが明らかにされている。また 20 番染色体のごく微少な領域の増幅も検出され、関与する遺伝子についても推定されている。これらの変異は、未分化細胞の増殖や生存に何らかのアドバンテージがある細胞が培養過程で濃縮されていったものと考えられている。その意味では、癌化などが懸念される変異である可能性も考えられるが、一方で分化誘導後の移植に用いられる細胞の安全性に及ぼす影響に関しては情報は得られない。

エピゲノム変異に関してはこれまでのところこのような大規模な比較研究は行われておらず、どのような傾向が見られるかは明らかでない。そのため当面は品質管理

項目として取り扱うことは適切とは言えない。

いずれについても、未分化維持培養下で顕在化する変化が医療上の有効性安全性に及ぼす影響は予測が困難であり、当面は移植組織を用いた前臨床研究による安全性有効性の評価が最も重要である状況には変化は無いと考えられる。

12 番染色体トリソミーと X 染色体の重複が認められる。これらは比較的高頻度で観察される変異である。このほか 17 番染色体のトリソミーも観察されることの多い変異である。染色体変異のようなゲノム異常は細胞にとって最適化されていない培養条件で維持された場合により高頻度で観察される傾向があるようである。しかしながらこれらの変化が分化細胞にどのような影響があるか明らかでない。

### C-7-1-3 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。

安全性の過剰な追求は患者の治療を受

ける機会の損失にもなりかねない。ES/iPS 医療は少なくともその初期過程においてはハイリスクなものにならざるを得ないことを考慮したうえで、被験者への同意を前提として、速やかな臨床応用が可能になる制度構築が望まれている。

### C-7-1-4 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。感染性因子の混入についてはドナースクリーニングが一定の役割を果たすが、特に ES 細胞においてはヒト胚への感染可能性がきわめて低いこと、未分化細胞での維持感染はほとんど考えられないことから、現実的なリスクとはならないだろう。ES/iPS 細胞のバンキング時に、既知のウイルスについて否定試験を行うことで、ドナースクリーニングに変えることが可能である。未知のウイルス等の可能性は排除できないが、臓器移植や輸血と比較し著しく危険性が高いとは考えられないことから、ES/iPS 医療に付随する不可避のしかしきわめて微少なリスクと位置づけられる。樹立培養過程で懸念される異種動物由来の因子についても、define された条件下で一定期間培養する、スクリーニングを行うことで現実的には排除されると考えられ、リスクを過剰で評価する必要性ははばないといえる。

どのように行われるにしても、ES/iPS 細胞の臨床応用はその初期段階では本質的にリスクの高いものと言わざるを得ない。その中で、ドナー由来や培養過程で混入する感染性因子によるリスクは相対的に低

いと考えて良い。安全性についての過剰な要求は患者が治療を受ける機会を失することにもつながることから、リスク・ベネフィットについてバランスのとれた判断が求められる。当然のことではあるが、可能性のあるものだけでなく未知のものも含めてリスクについて患者への十分な説明を行うことが前提となることは言うまでもない。

ES/iPS細胞の臨床利用がもう遠い将来の話では無くなっている以上、一定の科学的合理性をもって安全性の評価基準を設定することが必要となっている。特に、ウイルス感染の可能性排除などの技法に関しては早急な基準作りが求められている。

#### C-7-2 細胞治療に用いる最終産物の作成に必要なヒトES細胞を確保するために最小限必要な要件

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用いた細胞治療など再生医療応用への期待が世界的に高まってきた。本プロジェクトが開始した2009年では、米国FDAがGeron社によるヒトES細胞を用いた脊髄損傷患者に対する第1相臨床試験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時であった。そして、翌2010年10月ついにヒトES細胞を用いた第1相臨床試験が急性脊髄損傷に対して始まった。米国Geron社を中心としたグループが、ヒトES細胞H1細胞株を原材料としたオリゴデンドロサイト前駆細胞株(GRNOPC1)を対象に亜急性期の胸部脊髄損傷患者の病辺部に移植する試験であった。さらに、米国Advanced Cell Technology (ACT)社は、ヒ

トES細胞由来網膜色素上皮(RPE)細胞を若年性遺伝性黄斑ジストロフィー症(シュタルガルト病)と萎縮型加齢黄斑変性症の2疾患に対して第1/2相臨床試験を開始した。現時点(2012年3月)において、Geron社臨床試験は4例(注:2011年11月にGeron社は経済的理由により、ヒトES細胞による臨床開発から撤退)そして、ACT社臨床試験は5例(米国4例、英国1例)が実施されている。

・シュタルガルト病

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01469832?term=MA09hRPE&rank=3>

・萎縮型加齢黄斑変性症

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01344993?term=DRy+AMD&rank=1>

ACT社臨床試験の経過は、プレリミナリーレポートとしてLancet誌で、安全性と若干の有効性が確認されたと報告されている(参考文献1)。

わが国で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た。

##### C-7-2-1 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; FIM) の際には、組織幹細胞とは若干異なる評価が必要である。

#### C-7-2-2 ES 細胞を用いる臨床応用の流れ

ヒト幹細胞を用いた細胞治療を日本で行う場合、実用化への出口に向けては、主に以下の 2 つの方法がある。1 つは薬事法に基づき、FIM となる臨床試験から治験 (医師主導型治験または企業治験) を行い製造販売承認を申請し臨床利用を目指すラインがあり、もう 1 つは、医師法に基づき治療法に関する臨床研究を行い、治療施設が限定される高度医療・先進医療として細胞治

療を行うラインとがある。これまで、医師法に基づく既存のヒト幹細胞による臨床研究は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(厚生労働省、平成 18 年 9 月 1 日施行) に則って行われてきたが、新たな幹細胞技術の成果としてヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞等が開発され、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の改訂版が施行された (平成 22 年 11 月 1 日) (新ヒト幹指針と略す)。ヒト幹細胞による再生医療では、医師法下で行われる臨床研究と薬事法下での臨床試験・治験という異なる規制環境が存在するものの双方で取り扱われる幹細胞製品は、そもそも、ヒトに初めて適用する FIM という観点から制度によらない適切な取扱い基準、つまり必要最低限の要件は共通するはずである。薬事法下での細胞・組織加工医薬品等の治験における GTP (Good Tissue Practice) については「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」(厚生省医薬安全局長通知 医薬発第 1314 号別添 1, 平成 12 年 12 月 26 日) (<別添 1>) に含まれるとされる。医師法下での新ヒト幹指針では、治験薬 GMP と GTP に準拠したもので治験開始時と同じレベルの品質管理と安全性確保を求める基準が整備され、厚生労働大臣の確認を受けた臨床研究の実施計画書と同一の内容で治験開始ラインへ移行が可能となった。さらに、再生医療の進展とともに、自己及び同種細胞由来の細胞製品に関する技術要件をより明確にするために、医薬発第 1314 号が改正され「ヒト (自己) 由来細胞・組織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)」(自己指針) 及び「ヒト (同種) 由来細胞・組織加工医

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）」（同種指針）が発せられた。近年、ヒト間葉系幹細胞、ヒト ES 細胞、さらにヒト iPS 細胞による臨床応用を目指した研究の進展はめざましく、これらに特化した留意事項について検討しそれぞれの品質と安全性に根ざした指針整備が必要となる状況になっている。ヒト ES 細胞に関する指針は、ヒト ES 細胞はいずれに対しても同種移植となることからヒト同種由来細胞の系譜として細胞治療の品質及び安全性に関する基本的な技術要件について「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）－総則，原材料及び製造関連物質，製造工程に関する留意事項について－」が提示され、ヒト ES 細胞に対する具体的な指針が示されてきた。

### C-7-2-3 ヒト ES 細胞を用いる臨床研究の現状（応用）

ヒト ES 細胞は生殖補助医療の過程で治療に用いられなくなった胚（余剰胚）から樹立される。現在、本邦においては、ヒト ES 細胞樹立は、「ヒト ES 細胞の樹立及び分配に関する指針（文部科学省告示第八十六号）」に則って行われる。臨床研究に用いることを考慮した場合のインフォームド・コンセントを含めた倫理的手続きと安全性確保に関する技術的課題に関しては、「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」の平成 21 年度分担報告書（末盛博文：P70-）に詳しい。ここでは、胚盤胞から ES 細胞を樹立する過程を初期の細胞株化過程と拡大培養過程に分け、臨床研究応用を見据えた場合考慮しなければならない項目に

ついて述べる。例えば成育医療センターでは、ヒト ES 細胞樹立研究を行っているが、初期の細胞株化過程とは、胚盤胞の内部細胞塊から増殖を認めた細胞塊を非酵素的に分離・継代していく過程である。非酵素的に細胞継代を行うため、細胞を増やすことの確実性はあるが十分な細胞数を得ることはできない。細胞が一定数得られ、酵素的細胞継代によっても培養維持できるようになることを拡大培養過程としている。この過程で、出発原料としての各種検査を行い、細胞を増やし保存するマスターセルバンク化を行う。フィーダー細胞を使用する場合はガイドラインを参考にして、その特性と微生物学的安全性を担保する必要がある。

マスターセルバンク化する細胞の品質管理では規格試験と特性解析試験が行われる。セルバンクの安全性と品質に係る試験をすることで最終製品までの製造工程における安全性を担保することを本質的な目的としている。規格試験項目については、ACT 社臨床試験でヒト ES 細胞由来網膜色素上皮細胞を作製し治験を行った報告を参考にすると、核型試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、各種ウイルス試験（参考文献 2）が上げられる。特性解析試験としては、未分化度試験（マーカー；OCT4, SOX2, NANOG, REX1 等の定量解析）と形態観察（ヒト ES 細胞に特徴的な扁平円形コロニー集団を維持している）による細胞純度試験が考えられる。

ヒト ES 細胞の培養にはフィーダー細胞が必要となる。我々の培養工程においては、フィーダー細胞としてマウス 13 日齢胎児由来の線維芽細胞（MEF 細胞）を使用した。MEF 細胞のバンク化の必要性も想定され、

生物由来原料基準：動物由来細胞組織製品原料基準への適合が求められる。

ヒト ES 細胞およびフィーダー細胞の培養に使用する製品の品質証明の確保は必須であり、特に牛由来製品の場合原産地証明も必要である。細胞外基質成分、細胞継代時に使用する酵素や凍結保存液についても品質証明が求められる。

#### C-7-2-4 ヒト ES 細胞の再生医療応用に必要な技術的要件

ヒト ES 細胞を臨床応用に用いるために必要な技術的要件として主に以下の 4 つが上げられる。①均一な細胞性質を保つ培養工程を確立することが必要で、培養過程で未分化状態が維持されている性質の保証が必要である。通常、基本的な技術として十分に備わっているはずである。②細胞の品質基準と管理体制を整備する。細胞の品質検査としては、規格試験とミニマムな特性解析試験が行われる。③長期培養工程における細胞品質の管理と評価法の確立と④感染性因子混入リスクの管理である。

ES 細胞の内在する特性として分化多能性があるが、細胞移植の際に懸念される腫瘍化の試験を出発原料の段階で行う意義があるか検討が必要である。分化誘導して得られる最終製品内に奇形腫形成能を有する細胞の混入の有無を確認することは重要であるが、出発原料としての段階で内在特性である造腫瘍性確認試験に意義を見出すことは難しい。ただし、ES 細胞が移植対象になるような条件であれば、造腫瘍性試験として形成した奇形腫内に明らかな悪性組織の有無や移植したレシピエント免疫不全マウスの移植以外の組織や臓器に転移性を示す

所見の有無等を行う必要はあるかもしれない。

#### C-7-2-5 ヒト ES 細胞を用いる臨床応用の課題

臨床応用を見据えたヒト ES 細胞の出発原料は、初期の細胞株化段階におくことで既存の細胞株をゼノフリー培養環境、フィーダーフリー培地や無血清培地などの特定の条件に適応化させた細胞株を規格試験と特性解析を行いマスターセルバンク化することが可能と考えられる。

我々は、上記④感染性因子混入リスクの管理として、品質・安全性向上のため、次世代の培養システムであるヒト ES 細胞樹立と培養維持工程全てにおいて異種成分にふれることがない培養システムを構築し、樹立した ES 細胞 (SEES4) の特性解析では非ヒト型のシアル酸 (Neu5Gc) の発現も検出できない品質であることを示した。次世代の製造工程と細胞品質評価へ発展していく基盤が整備されている。

#### C-7-2-6 考察および結論

ヒト ES 細胞を用いた細胞治療における細胞及び細胞調整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整・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、もう一つはこのヒト ES 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、調整、出荷において、感染、試料取違えや異物混入等の

予防策をまとめた GTP が整備される。細胞の調整・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、ヒト幹細胞や調整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、調整工程中における汚染の防止等を図ることは当然ながらヒト ES 細胞を用いた細胞治療にも必須である。ヒト ES 細胞は臨床応用に用いるマスター 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 社の治験では、移植後 1 年のフォローアップ検査で細胞移植による合併症、移植部位の変化、移植免疫反応や移植による想定外の神経学的症状は無く、安全性に関する問題は認められていないと報告されている。

ヒト ES 細胞のように新しい幹細胞技術を用いた臨床応用は、人体への影響について未知の部分もあるため、その安全性及び倫理性の確保に対して盤石な体制をとらなければならない。一方で、これまでに治療法すらなかった疾患にも効果が期待できる治療法となりうる。対象疾患毎で様々なケースが考えられ、欧米におけるヒト細胞・組織加工製品の規制原則とされる Risk-Based Approach の考え方も本邦におけるヒト ES 細胞の臨床試験の申請と施行に重要であると考えられる。

### C-7-3 臨床使用を目的とした人工多能性幹細胞（iPS 細胞）又は人工多能性幹細胞様細胞（iPS 様細胞）

#### C-7-3-1 再生医療の素材としてのヒト iPS 細胞とヒト iPS 様細胞

言うまでもなく再生医療の究極の目的は治療である。したがって、常に治療（目的）から発想する考え方、アプローチが肝要であり、どのような疾患を対象に、どのような製品を開発するかが第一義的課題である。iPS 細胞の作製による細胞の分化・脱分化に関するパラダイム

シフトは、再生医療への応用に無限の可能性(手段)を提供するが、このことは、初期化の程度や特定iPS細胞の標準化が全ての再生医療への応用の前提であるということを必ずしも意味する訳ではない。初期化の程度を一定にすることができ、iPS細胞の標準化ができることは、再生医療に利用される細胞・組織加工医薬品等の創製のための特性が明かな原材料、すなわち重要な素材(手段)の1つの提供という大きな意義を持つ。しかし、全ての製品のもとが、特定の iPS 細胞でなければならないという必然性はない。ある個別の製品に対して、素材として適切な細胞があれば、それで良い。重要なことは、細胞の分化・脱分化が人為的に操作できるというパラダイムの中で、ある特定の治療(目的)に叶う品質・有効性・安全性を有する最終製品を製造するのに適切な素材として人工的に誘導された多能性の細胞が適切に位置づけられることである。どの細胞から、どの手段で、どの程度初期化(多能性化)した細胞を得て、どのような分化誘導で、どのような細胞を経て目的細胞に至るかが、各開発研究関係者の挑戦課題であると思われる。

以上のような趣旨のもと、「ヒト iPS 細胞」に加え、「ヒト iPS 様細胞」という概念が出されている。それぞれの細胞は暫定的に次のように定義されている。「ヒト iPS 細胞」とは、ヒト体細胞を遺伝子導入・タンパク質導入・薬剤処理等により人為的に初期化して得られる細胞又は当該細胞の分裂により生ずる細胞であって、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞に分化する性質を有し、かつ、自己複製能力を維持しているもの又はそれに類する能力を有することが推定されるものをいう。また、「ヒト iPS 様細胞」とは、ヒト体細胞を遺伝子導入・タンパク質導入・薬剤処理等により人為的に脱分化して得られる

細胞又は当該細胞の分裂により生ずる細胞であって、少なくとも内胚葉、中胚葉又は外胚葉の一部の細胞に分化する性質を有し、自己複製能力を維持しているもの又はそれに類する能力を有することが推定されるものを指す。

#### C-7-3-2 iPS(様)細胞と医薬品製造基材/中間細胞株

C-8 項で述べるように「医薬品等製造基材」は一般に製品製造の出発原料たる「細胞バンク」として樹立され、管理される。中間細胞株がバンクとして利用されることもある。

iPS(様)細胞そのものが上記のような意味での安定的な「医薬品製造基材/バンク」と位置づけられることは必ずしも一般的ではないかも知れない。

#### C-7-3-3 より安全なヒトiPS(様)細胞の作成とその限界

iPS細胞又はiPS様細胞(以下いずれかを指して iPS(様)細胞という)由来製品においては、最終製品における未分化細胞の存在が異所性組織形成や腫瘍形成・がん化の可能性など安全性上の重要な関心事である。これは元来 iPS 細胞の最大の特徴の裏返しであり、iPS 細胞のレベルで、これに対策を講ずることは、きわめて困難であると考えられる。iPS 細胞を作製するために用いる誘導剤の改良などにより、安全性上懸念される外因的な要因を取り除くことで「より安全な iPS 細胞」を作製することは可能であり、望ましいことと考えられる。しかし、iPS 細胞を特徴できる固有の内因性の要素を取り除くことは原理的に二律背反であり、困難である。また、「外因性因子の改良により樹立されたより安全な iPS 細胞」は改良前のものに比較して、「より安全な最終製品の出発原料



料」にはなりえるが、テラトーム形成にアイデンティティがあるような内因性の固有の特性によるものに関しては、「より安全な iPS 細胞」というものそのものが存在しないのではないかと考えられる。したがって、将来的には iPS 細胞レベルでの安全性を主題にするのではなく、製品からみた対策、すなわち、ある製品によっては iPS 細胞そのものよりも、iPS 細胞が持つ特性の必要部分を取り出したような「iPS 様細胞」を原材料にしたり、製造工程や工程管理を工夫することにより、より安全性の高い最終製品を創出する戦略や戦術が大きな意味を持つてくるのではないかと考えられる。それ故、可能な限り、セル・バンクや中間製品段階等での徹底的な解析により、目的外の未分化細胞混在の可能性を否定するか、あるいは、目的細胞から未分化細胞の効果的分離・除去法や不活化法の開発、適用により、混在の可能性を最小限にする努力が求められる。さらに、投与経路等の選択も安全性上の懸念を最小限にするための有用な方策であると思われる。適切な体性幹細胞から iPS(様)細胞、iPS(様)細胞からより安全、安定、特性が明確で、適切な原材料となり得る任意の体性幹細胞の作製を可能にする技術や品質・特性解析技術の開発も重要性である。個々の細胞由来 iPS(様)細胞の多能性や分化できる細胞の種類を予め見極める「検査技術」や、効率よく確実に目的とする細胞に分化誘導したり、分化細胞を未分化細胞から分離する「加工技術」の研究開発は、新たなビジネスチャンスを生むことになると考えられる。

#### C-7-3-4 ヒト(自己・同種)iPS(様)細胞加工製品特有の製造・評価のポイント

ヒト iPS(様)細胞加工製品は、ヒト体

細胞より人為的に作製された各種 iPS(様)細胞を人為的に分化誘導し、得られた特定の細胞をそのまま利用、あるいはさらに加工することにより製造されること、また、その製造方法、中間製品や目的細胞の種類及び特性、臨床上の適用法は多種多様であることに特徴がある。また、当然、その増殖性の高さ、多機能性に起因する長所と短所がある。iPS 細胞加工医薬品等の場合、①細胞(出発素材)の特性としての造腫瘍性、製品における未分化細胞の残存などによる②異所性の組織形成、③不適切な分化/造腫瘍性、④目的外の表現型発現に特に留意すべきことは言うまでもない。また、④同種の場合に免疫原性/免疫拒絶反応に対する留意も必要である。iPS細胞株樹立や増殖、分化等の過程で使用される動物由来成分による動物抗原が検出される製品における抗原性にも注意する必要がある。なお、自己由来 iPS 細胞と同種由来 iPS 細胞に対する技術要件の違いについては、すでに他項で示したとおりである。

Fig. 4 にヒト iPS(様)細胞加工医薬品等の製造、評価のポイントを改めてまとめた。

#### C-8 細胞バンクの概念と技術要件 MCP

生物起源の医薬品等(バイオリジクス)は、原材料において非特定起源からの由来や複雑さのために品質特性解析及び管理が必ずしも必要十分にはなし得ず、最終製品においても量的制約や複雑な品質特性のために、必要十分な管理ができないことが多い。それらを補完する上で、あらゆるバイオリジクスに通底する最も重要な概念及び方策は、製造工程の一定性・恒常性を確保するということである。その中核をなす最も重要な要素は、全工程のある段階において、最も徹底した品質特性解析

及び管理が可能で、次の段階へのステップを常に確実にかつ安定して進行させ、ゴールとしての最終製品に向かうことを可能にするベースキャンブたる医薬品製造基材である。

細胞・組織加工医薬品等の安定的な製品製造における最も理想的なベースキャンブは、十分に解析され、安定で、増殖性を有し、更新も、安定供給も可能で、かつ目的細胞に適切に分化できる細胞(バンク)や中間細胞株である。ある製品開発戦略としては、原材料段階での困難な検査や解析結果にウエイトをおくよりも、細胞バンクや中間製品としての細胞株(中間細胞株:バンク)を適切に、確実に樹立することが、安全な最終目的製品を安定的に製造する上で重要であり、むしろ科学的にも合理的な場合がある。もちろん、そのような方策を選択した場合は、その利点と妥当性を説明しておく必要がある。その際、別の表現型を示す細胞株を段階的に樹立する際は、それぞれの細胞株樹立までの方法(分化誘導方法、目的とする細胞の分離・培養及び株化の方法、細胞株樹立までの各段階での培地、培養条件、培養期間及び収率等)を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにする必要がある。このような中間細胞株の品質の均質性及び安定性を保持するため、各種細胞特性指標(細胞純度、形態学的評価、表現型特異的マーカー、核型、細胞増殖特性、分化能など)のうちから重要特性指標を同定してその基準を設定するとともに、設定された基準による品質を維持したまま増殖が可能な継代数又は分裂回数を示す必要がある。

Fig.5 には iPS 細胞由来製品を例に製造過程で想定される細胞バンクの位置づけ、概念を図示した。

## C-9 普遍的に利用可能な新規細胞特性解析手法及び品質評価手法開発(網羅的糖鎖プロファイリング法)

再生医療」の実用化に向けては、製品の品質や安全性等を確保する上で、多種多様で固有の特性を有するヒト体細胞、ヒト幹細胞、人工多能性幹細胞や ES 細胞などの原材料としての細胞、中間製品としての細胞、最終製品としての特定の細胞、あるいは混在する可能性がある細胞等の様々な特性を把握し、これらの細胞を確認・同定、識別したり、細胞の品質を管理する方法論の存在あるいは新たな開発とそれらの有効活用が必要である。すなわち、様々な特性を持つ細胞のタンパク質や糖鎖を迅速、簡便、かつ特異的・定量的に解析、識別する方法を開発することは、再生医療実用化を加速するうえで不可欠である。

再生医療における細胞の特性・品質の管理では、細胞表面上のタンパク質が分化あるいは未分化マーカーとして専ら利用されている。一方、細胞表面の糖タンパク質糖鎖は糖鎖遺伝子の発現パターン変動から、細胞表面における糖鎖構造が変化し、さらに細胞の分化度等によっても変化することから分化あるいは未分化マーカーとしても期待できる。

一方、iPS 細胞などの各種幹細胞を利用する再生医療実用化における課題として、その細胞治療材料としての有用性だけでなく、細胞への異種動物由来成分の混入による抗原性などの安全性の面においてもいくつかの問題が残されている。このような各種幹細胞の安全面での対策においても糖鎖を指標とする評価技術の有用性に期待が寄せられるが、これまでに糖鎖を指標とした幹細

胞の安全性評価基準策定に関する検討は殆どされていない。

以上のような背景の下、本研究が目指す MCP あるいはケース・バイ・ケースにおける上乘せ方策において、産・学・官が共通に参照でき活用できる評価技術としてのコンセンサス・パッケージを策定すること、すなわち、細胞特性解析&品質評価に関して普遍的に使える評価試験法や評価指標と評価基準を策定すること、また、必要に応じて新たな評価技術を開発することはきわめて重要と考えられる。

そこで本研究では、個別細胞特性解析、品質評価・管理、未分化細胞等混在細胞検出、目的細胞精製（又は目的外細胞除去）技術等、品質・安全性確保等に普遍的な新規細胞解析技術開発例として網羅的糖鎖プロファイリング法の開発とその有用性と適用可能性について検討した。

#### C-9-1 細胞 O-結合型糖鎖の解析技術開発（平成 21 年度）

糖タンパク質糖鎖のうちタンパク質のアスパラギン残基に結合する N 結合型糖鎖の解析については、コアタンパク質より糖鎖を切断し、蛍光標識化し HPLC や MS を解析する手法が広く浸透している。一方、O-結合型糖鎖の解析は、アルカリ還元法により O-結合型糖鎖を遊離し、HPLC や MS により解析する方法が一般的である。しかしながら同じ O 結合型糖鎖でも、GalNAc を介しコアタンパク質に結合するムチン型糖鎖と Xyl を介しコアタンパク質に結合する GAG 型糖鎖は、糖鎖の物理化学的な特性の違いから、分離分析については異なる手法を用いて行われてきた。本項では研究室で開発した高速糖鎖自動切断装置

“AutoGlycoCutter (AGC)” とセロトニンアフィニティークロマトグラフィーを組合わせたムチン型糖鎖の比較糖鎖プロファイリング技術を PG 型糖鎖解析へ応用を図った。

#### C-9-1-1 培養細胞の O-結合型糖鎖の解析

ヒト大腸癌細胞 HCT116 の O-結合型糖鎖混合物についてセロトニンアフィニティークロマトグラフィーによる分画を試みた。結果を Fig.6 に示す。その結果、3 分～16 分の間にシアル酸残基数の異なるムチン型糖鎖と考えられる 6 つのピークが観察された。一方、1M NaCl の溶出により 22 分～26 分に GAG 型糖鎖と考えられるピークが観察された。観察された各ピークを分画し、順相 HPLC とキャピラリー電気泳動により分析した。

順相 HPLC では、M1～M6 の全ての分画においてムチン型糖鎖が観察された (Fig. 7 Table 7)。M1 分画ではムチン型 Core2 構造を持つ 4 糖 (Gal $\beta$ 1-3[Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6]GalNAc) を主とし、さらにラクトサミンユニット (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) が 1~2 ユニット付加したオリゴ糖が観察された。M2 分画では Core2 骨格を持つ 4 糖に N-アセチルノイラミン酸が付加したモノシアロオリゴ糖を主とし、さらにラクトサミンユニットが 1~2 ユニット付加したオリゴ糖が観察された (Fig. 7, Table 7)。M3 分画ではシアリル T 抗原糖鎖が観察され、シアリル T 抗原糖鎖に N-acetylglucosamine が付加したオリゴ糖の含量が最も高かった。M4～M6 のうち、M4 分画は、N-アセチルノイラミン酸と Galactose から構成されるオリゴ糖であり、AGC においてピーリング反応により生じた分解物であった (Fig. 7, Table 7)。一方、M5 と M6 分画のオリゴ糖はいずれも N-A

セチルノイラミン酸を 2 残基持つジシアロオリゴ糖であり、M5 は Core2 骨格を持つ 4 糖およびさらにラクトサミンユニット 2 ユニットが付加した 6 糖の非還元末端に N-アセチルノイラミン酸を 2 残基持つオリゴ糖であった (Fig. 7, Table 7)。一方、M6 はジシアリル T 抗原糖鎖が主要なオリゴ糖であった。なお、1MNaCl によって溶出される 20 分以降の分画にはムチン型糖鎖は全く観察されなかった。

1MNaCl によって溶出される分画は、脱塩濃縮後、3 種類の GAG 型糖鎖加水分解酵素を組合わせて不飽和二糖とし蛍光標識化して、キャピラリー電気泳動法による 2 糖組成分析を実施した。Fig. 8a に HCT116 細胞由来の 1M NaCl 溶出分画を Chondroitinase ABC により消化し、蛍光標識後 CE により分析した結果を示す。また、フェログラム上で観察された各不飽和二糖の構造を Fig. 9 に示す。不飽和二糖標準品の分析結果との比較、および標準品の添加実験により各ピークを同定した結果、12 分付近のピークは硫酸基を持たない  $\Delta$ di-HA および  $\Delta$ diCS-0S、7 分付近のピークは硫酸基を 1 残基有する  $\Delta$ diCS-4S および  $\Delta$ diCS-6S、そして 5 分付近のピークは硫酸基を 2 残基有する  $\Delta$ diCS-SE であった。また、Heparitinase 1 および Heparitinase 2 の同時消化で得られた HS 由来の不飽和二糖を CE により分析した結果 (Fig. 8b)、15 分に硫酸基を持たない  $\Delta$ diHS-0S が、7 分に硫酸基を 1 残基有する  $\Delta$ diHS-NS、 $\Delta$ diHS-6S、 $\Delta$ diHS-2S が、4.5 分に硫酸基を 2 残基有する  $\Delta$ diHS-S1、 $\Delta$ diHS-S2、 $\Delta$ diHS-S3 が、そして 3.7 分に  $\Delta$ diHS-TriS が観察された。以上の結果、HCT116 では硫酸基を持たない  $\Delta$ diCS-0S や  $\Delta$ diHS-0S により構成される GAG 鎖を多く含むと考えられた。培養癌細胞をはじめと

する生体試料から抽出したサンプルを解析する際、試料由来と考えられる不純物のピークなどが観察され、ピークの同定や定量が困難となることが多い。しかし、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーにより分画された GAG 糖鎖分画では培養癌細胞由来の GAGs 不飽和二糖を高精度に解析できた。なお、ムチン型糖鎖分画 (M1~M6) を酵素消化し 2 糖組成分析した結果、GAGs 由来不飽和二糖のピークは観察されなかったことから、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーを用いることで、培養癌細胞由来の O-結合型糖鎖群からムチン型糖鎖と GAGs を簡便に分画できることがわかった。また得られた各分画について NP-HPLC、MALDI-TOF MS、CE および各種酵素消化を組み合わせることで培養癌細胞中のムチン型糖鎖と GAG の両方を含む O-結合型糖鎖混合物を一挙に定量的かつ網羅的に解析できる手法を開発することができた。O-結合型糖鎖は N-結合型糖鎖に比べ、不均一性が高く種々の 2 次修飾等を受け易く、細胞の生物学的特性を把握しやすいため、細胞特性解析のための指標として有用であることがわかった。

#### C-9-2 糖タンパク質糖鎖解析技術の細胞特性解析への適用可能性の検証 (平成 21 年度)

糖鎖を指標としてヒト幹細胞や人工多能性幹細胞の評価基準を策定するためには、広く一般的に用いられる糖鎖解析技術を利用して、細胞の糖タンパク質糖鎖を解析し、評価法としての実行可能性を明らかにしておかなければならない。本項では開発済みの糖鎖解析技術の細胞評価法としての実行可能性を評価するとともに、10 種類のヒト培養癌細胞をモデルとして N-結合型糖鎖