

早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	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指針 (案) —ヒト体性幹細胞, iPS (様) 細胞又は ES 細胞を加工して製造される医薬品等 (ヒト幹細胞加工医薬品等) の非臨床試験及び臨床試験について—	再生医療	10	267-72	2011
Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Watanabe K, Ono K, Shimizu S, Hayakawa T, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y.	AW551984: a novel regulator of cardiomyogenesis from pluripotent embryonic cells.	<i>Biochem J.</i>	437	345-55	2011
Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H, Nishida M.	TRPC3-mediated Ca ²⁺ influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	409	108-13	2011
Yuan, Y., Maeda, Y., Terasawa, H., Monde, K., Harada, S., Yusa, K.	A Combination of Polymorphic Mutations in V3 Loop of HIV-1 gp120 Can Confer Noncompetitive Resistance to Maraviroc.	<i>Virology,</i>	413	293-9	2011
Maeda, Y., Yoshimura, K., Miyamoto, F., Kodama, E., Harada, S., Yuan, Y., Harada, S., Yusa, K.	In vitro and In vivo Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry Inhibitors.	<i>J. AIDS Clin. Res.</i>	S2	S2-004	2011
遊佐敬介, 山口照英, 川崎ナナ	ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	42	444-7	2011
遊佐敬介, 新見伸吾, 橋井則貴	バイオ医薬品の外来性感染物質について	<i>Pharm. Tech. Jpn.</i>	28	941-6	2012

Luan Y, Kogi M, Rajaguru P, Ren J, Yamaguchi T, Suzuki K, Suzuki T	Microarray analysis of responsible genes in increased growth rate in the subline of HL60 (HL60RG) cells.	<i>Mutation Res.</i>	731	20-9	2012
Ramadan A, Suzuki T	Detection of Genotoxicity of Phenolic Antioxidants, Butylated hydroxyanisole and tert-Butylhydroquinone in Multiple Mouse Organs by the Alkaline Comet Assay.	<i>J. American Science</i>	8	722-7	2012
Uchida M, Ishii I, Hirata K, Yamamoto F, Tashiro K, Suzuki T, Nakayama Y, Ariyoshi N, Kitada M.	Degradation of filamin induces contraction of vascular smooth muscle cells in type-I collagen matrix honeycombs.	<i>Cell Physiol Biochem.</i>	27	669-80	2011

再生医療と細胞特性

鈴木和博

Regenerative medicine and characteristics of stem cells

Kazuhiro Suzuki

Recently, regenerative medicine has attracted much attention as a newly developed medical technology capable of treating various previously untreatable diseases. Research in this field has been rapidly and competitively conducted, and a large national budget has been disbursed. In particular, great expectations exist for the establishment of iPS cells as a new method that should contribute to regenerative medicine. A new regulatory framework for controlling this new technology is necessary to ensure the efficacy and safety for all people involved, including patients, physicians, and biologic suppliers. An official meeting for the establishment of such a framework was organized by the MHLW between 2009 and 2010. In this article, the discussions held at the meeting and the conclusions that were made are explained. Furthermore, some interesting molecular features of stem cells for regenerative medicine will be introduced.

Keywords: regenerative medicine, regulatory framework, stem cells

1. 再生医療とは

再生医療は、患者の細胞や組織を体外で培養して増殖・分化させた後、患者に戻して様々な疾患を治療する方法である¹⁾。図1では、骨髄液に含まれる間葉系幹細胞および造血幹細胞の例を示した。細胞の提供者（ドナー）は、現在は患者本人の場合が多いが、角膜などのように、他人の細胞が使用できる場合もある。なお、培養を伴わない臓器移植や輸血などは、通常、「再生医療」には含まない。

再生医療は以前には不可能と思われてきた医療のため「夢の医療」とも言われるが、その現実味が出てきたことから、近年社会的に大きな注目を集めている。その理由としては、(1)他に治療法のない重篤な疾患（心臓病や神経疾患など）に対する新たな治療法として期待できる、(2)移植治療のための臓器は供給が少ないが、それに代わる治療資材を提供できる可能性がある、(3)体外での人為的な細胞培養・分化の実現など、急速に進展するバイオサイエンスの応用として関心がもたれる、(4)iPS細胞（人工多能性幹細胞）が樹立され、多様な細胞を試験

管内で誘導できる可能性がある、(5)国の科学技術政策の主要な柱として大きな予算が運用されている、(6)あらたな産業分野として経済効果が期待できる、などである。日本が国際的に競争できる分野としての期待も大きい。この数年、総合科学技術会議の提言や各省の科学技術関連施策において、つねに最重要課題のひとつとなっている。また2011年度からは文部科学省、厚生労働省、経済産業省が共同で「再生医療実現化ハイウエイ構想」を打ち出して予算化し、実用化の加速を目指した大きなプロジェクトがスタートした。

具体的に進展がある分野のひとつとして、心疾患の治療例がある。大阪大学のグループは、筋芽細胞で作成した細胞シートを機能低下した心臓に適用し、心機能の回復に成功した²⁾。患者の骨髄等から間葉系幹細胞などの体性幹細胞を採取して培養し、増殖させてから心臓の不全部位に注入し、心機能の回復に成功した例も複数の施設で行われ、成功したと報告されている^{3,4)}。一方、東京女子医大のグループは口腔粘膜細胞等に由来する細胞シートを角膜、心筋組織や食道などの障害に適用して治療に成功している⁵⁾。いずれも少数の臨床研究例であることや、その治療法が有効であることのメカニズムが十分解明されたわけではない点は注意を要する。心疾患に適用した筋芽細胞シートは、当初の予想とは異なり、投与した細胞自体がもつ物理的な収縮機能ではなく、投与細胞由来のサイトカインがレシピエントの心筋に対して治

To whom correspondence should be addressed:

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

療効果があったことによることが明らかになった。心臓に注入した幹細胞も、心筋に分化したのか、あるいはサイトカインを分泌して機能しているのかは今後の検討課題となっている⁶⁾。メカニズムの解明は、科学に基づいた医療を行っていくためには必須であり、また更なる研究開発の進展にも寄与することになる。

ここで重要なのは細胞の取り扱いである。いずれの場合も、体外で細胞を培養しているが、細胞の採取から培養・分化誘導などを経て患者に投与されるプロセスにおいては、感染性因子の混入が生じる可能性があるため、高度な安全性管理が必須となる。カビやバクテリアは直ちに分かることが多いが、ウイルスやマイコプラズマ等にも十分な注意を払わなければならない。また、上記の成功例はいずれも臨床研究として特別な予算と計画のもとに高度な専門家チームが行ったもので、保険適用にもなっていないことなどとともに、まだ一般に普及可能な段階ではない。現時点で過剰な期待をするべきではないが、意欲的な研究者や臨床家が新しい治療法を目指してチャレンジし、確かな実績を積み重ねつつある。米国では既にジェロン社が脊髄損傷の治療にヒト胚性幹細胞を臨床応用しているため、その結果も注意深く見守りたい。

他方、日本では一部に公的な規制を受けない自由診療の形で、美容整形などとともに「再生医療」が行われている実態もある。様々な事故やトラブルも起きて、再生医療学会は2011年1月に公的な規制から外れた「医療」は受けられないよう、注意喚起の声明を出すに至った。

2. 再生医療の規制

再生医療は医療のひとつとして、当然、従来からの医療に関する一般的な法的規制を受ける。また、再生医療に用いる製品は生きている細胞を含むという特殊性があり、従来の医薬品や医療機器とは別の規制が必要との認識から、2000年12月に、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」(1314号指針)がまとめられた。背景として、まだ経験したことがない先端的な領域であること、治療対象となり得る疾患の組織は多種多様なこと、使用が想定される細胞も由来や分化程度など様々であること、さらには重篤かつ稀少な疾患を対象とすることが多いこと、などから、規制も一律ではなく「ケースバイケース」で柔軟にかつ科学的に考えるという精神が強調されている。2000年の時点でこの薬事法の規制が実現したことは意義があった。2006年9月に施行された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」は臨床家に対するガイドラインだが、この薬事法指針1314号を広く援用し、安全性を重視した指針となっている。その後、2008年には自己と他家を区別した改訂指針が出され、感染性因子や免疫原性に関する注意事項が科学的に整理された。さらに現在では、多能性幹細胞(ES/iPS細胞)の臨床応用も社会的な認知が進んだことを背景に、指針案が公表されている。細胞提供者が患者本人の場合と他人(他家)の場合、細胞も多能性幹細胞と体性幹細胞の場合を区別して整理し、それぞれの注意事項をまとめている。「細胞組織加工製品」という独特の薬事法用語も、再生医療規制の領域で定着した観がある。この分野の急速な進展に

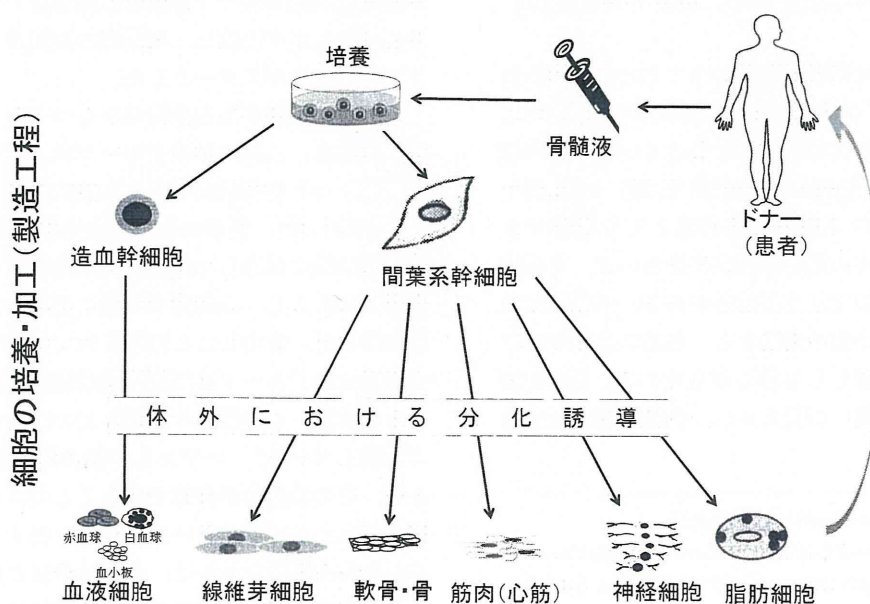


図1 再生医療の概念図（骨髓細胞利用の例）

呼応してガイドラインは常に改訂が検討されており、その流れは今後も続くと思われる。

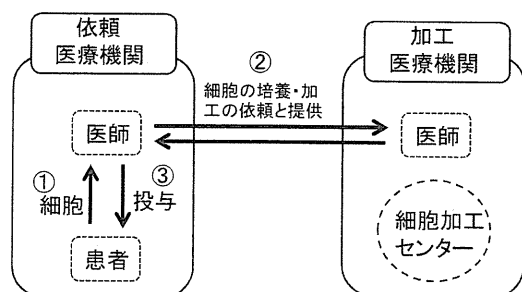
一方、小泉内閣の「規制緩和」拡大の中で、再生医療の現場で薬事法が足枷になっているという議論が起こった（2008年末の規制改革会議の提言）。すなわち、患者の細胞を医療機関の間で運搬すると薬事法の規制がかかることになり、その規制項目を全て、現場の医師に遵守させるのは現実的ではないという。そこで厚生労働省は2009年4月に「再生医療における制度的枠組みに関する検討会」を立ち上げた⁷⁾。以下、筆者も委員となったこの検討会の議論を紹介したい。検討会の期間は当初より二年間と設定され、メンバーとしては、医師や関連分野の専門家だけでなく、製薬会社、患者団体、弁護士等まで含む幅広い構成で、事務局は1年目を厚労省医政局研究開発振興課、2年目を同省医薬食品局審査管理課が担当し、医薬品医療機器総合機構や経済産業省、文部科学省の再生医療関連分野担当者もオブザーバー参加するという大規模な会であった。多数用意された傍聴席も企業関係者等で毎回満席であった。

1年目の検討事項としては、患者の細胞を採取した医療機関が、その細胞をどのように扱えば、薬事法には拘束されずに、かつ安全に、医療に使えるかについて議論した。実際には、製造業のかかわらない医療機関同士であれば可能であるという大枠で、安全性が担保される要件について討議を重ねた（図2-(1)）。この場合、細胞は患者自身の自己細胞のみで他家由来の細胞は含まない。当時、長いこと基礎研究を重ねてきて、異動後この種の規制に携わってまだ2年弱程度の筆者には、大規模な会議にもかかわらず何ともスケールの小さい細かなテーマ設定と思われた。しかし会を重ねていくうちに、実に多

くの問題が浮き彫りになっていった。細胞の取り扱いはいできるだけ GMP レベルの安全性を確保した方がよい、というまっとうな議論の一方で、自由診療関係者の委員からは細胞の培養を依頼する先として、医療法のもとで民間業者も可能とできるのではないかと。一方、IRB 審査を経て臨床研究として行われている実験的治療も、成功例は大々的に報じられるが、その陰でうまくいかない例がたくさんあること、先進医療として認められれば一部保険適用にはなるものの、現行の保険制度では経済的な手当として大きな限界があり著しく予算不足であること、など普段あまり意識していない深い問題があることが実感させられた。治療結果の評価についても多くの議論があり、時々見られるメディアなどへの公表とは別に、第三者の専門家による客観的な評価が必要とされた。衛研にとって身近な薬事承認を受けた唯一の製品である培養皮膚（商品名ジェイス）は、火災時などの重症熱傷患者が対象だが、患者一人に保険で使えるのは30枚までと限られており、多くの場合、その製造ベンチャー企業が救命に必要な追加枚数を自主負担していること、その輸送には無菌性は勿論、温度（10度から25度の間）や時間（56時間以内の使用）など、厳密に管理されていることなど、技術的なことにまで議論は及んだ。結局、再生医療が行えるレベルの医療機関同士を前提として、患者に直接の責任を持つ主治医が、他の医療機関に属する経験十分な医師に細胞の培養や薬物処理などの加工を委託することは可能であるとし、その細胞取扱いは専用の細胞加工センター（CPC）において細胞の品質を確保するためのいくつかの要件を満たして行うこととされた。2010年3月に発出された局長通知（ガイドライン）では、生々しい議論は漂白されて、抽象的で一般的な表現にはなっているが、複数の医療機関が関与する場合でも医療としては一体の体制をとるべきであることや、臨床研究として行われる医療も治験を目指すことを前提に行われるべきと、当然ながら安全性重視、薬事規制尊重の立場をとっている。

2年目は、1年目より広範囲に現行規制上の問題を洗い出し、国際動向も踏まえて、今後の規制のあり方全般を課題とした。特に、再生医療や遺伝子治療など先端的な医療技術を応用した製品については、治験審査の前の段階で主として安全性をチェックする「確認申請」が課せられているが、日本固有の制度でもあり、見直しが狙いに乗せられた。当部の佐藤陽治室長が5回にわたる海外調査の結果を報告したり、欧米の規制当局者を招いて説明を聞き議論を重ねて、各国が再生医療の実用化・製品化に前向きに努力をしていることが明らかになった。日本では、これほど iPS 細胞がメディアに取り上げられ、国に予算手当てされても、再生医療全体としては、

平成21年度の検討課題：



再生・細胞医療の共同での診療（薬事規制の対象外）

図2 「再生医療における制度的枠組みに関する検討会」の課題

(1)複数医療機関の共同での診療における細胞の取り扱い（21年度）

開発研究予算の面でも、審査に当たる人材の量や質の面でも、制度の面でも、全体のインフラが米国やEUとともに競争できるレベルではないことを認識させられた。もちろん、日本は日本のスタイルで先端医療の実現を図るしかないが、バイオサイエンスの基礎研究のすそ野が広がっていない文化的な違いとさえ思えた。また2年目は製薬企業委員からの発言も多く、審査が遅いことや基準が分かりにくいことなどが厳しく指摘された。最初から保険適用を目指さず自由診療の正当化・拡大を図る立場と、保険収載を目指して薬事審査を積極的に受けようとする立場は根本的に異なるはずだが、検討会では両者ともPMDAや厚生労働省に対して批判的という、妙に足並みが揃った印象があったかもしれない。はじめから保険適用を目指さない自由診療は厳しく規制し、保険収載を目指して薬事審査（客観的な評価）を受けようとする企業は応援するという、両者を区別した原則的な立場をとりたい。真に国民全体に普及するには、保険制度を前提とするのが当然だから。

最終回の2011年2月18日の検討会では、韓国のベンチャー企業が京都に開設した施設で死亡事故が起こったこと、それが影響力の大きいNatureのNewsに取り上げられたことが大きな話題となった⁸⁾。日本の医療制度においては、現在でも公的な規制が届かない「医師の裁量権」領域が厳然とあり、そこに国外の企業が観光とセットした「医療ツーリズム」を組んで富裕層相手に不透明な「医療」を行い、商売をする余地が生まれている。検討会では、当然ながら厳しい規制をかける必要性が強調された。座長自ら厚生労働省による実態把握を糺したが、現在に至るも国（行政）によってどのような対応がなされたのかは不明である。政治性も帯びるこの領域だが、行政が毅然とした態度を取れないことは情けないと言わざるを得ない。薬事規制を緩める方向で見直すより、医師法・医療法を、国民の安全が守られるよう見直す方が先であろう。

確認申請は、開発者にとっては治験審査並みの高いハ

平成22年度の検討による制度変更:

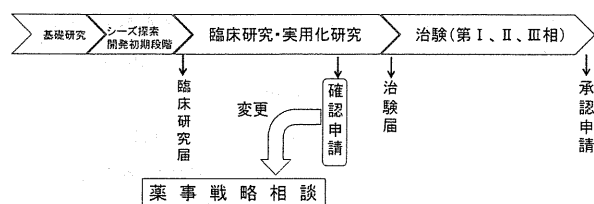


図2 「再生医療における制度的枠組みに関する検討会」の課題

(2)確認申請から薬事戦略相談へ (22年度)

ードルに見えるという。多くの議論の末、「安全性を早い段階で担保したい」という確認申請の精神は、開発早期の段階から規制側と相談できる新たな仕組みを創設することで活かされると集約された。その相談制度を薬事戦略相談という（図2-(2)）。治験のプロトコールも、この相談内容に含まれる。また、医療機器か医薬品かの分類によって経済的負担が異なるので開発側には早期に明確にしてほしいという要望もあったが、両者で異なる審査基準があるわけではなく、また研究途上の分野の製品故、審査中にProof of Concept (POC) が変わってくる場合もあり得るので（例えば、先述の心筋治療において当初は細胞シートの収縮力という物理的な機能が想定されていたが、その後の研究で作用本体は細胞シートが放出するサイトカインであることが明らかになったように）、全ての製品につき最初から明確に分類するのは困難な場合もあろう。確認申請は、1999年に創設されて以来、13件の申請を受け、このうち9件を確認してきたが、2011年夏には廃止となり代わって薬事戦略相談が立ち上がる運びとなった。「懇談会」も併設され、実際にどのような分野を主な相談対象に選定するかといった基本方針をまとめる。

一方、最終報告書には審査側と学会がともに開発状況や問題点を把握し共有することが重要であることも盛り込まれ、意見交換の場を設定することが有用とされた。実際、2011年3月の再生医療学会では国立衛研が主催して、具体的な事例をあげての意見交換会が開かれ、予想を大幅に上回る大盛会であった。再生医療の関係者は実用化への関心が高い。少しでもスムーズに有効で安全な新製品が出てくることを期待したい。

なお、規制関連に詳しい情報サイトとして、2011年3月から当部の細胞治療担当の第二室において、「多能性幹細胞安全情報サイト」をスタートした（http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp_sec2/sispsc/html/index.html）。日本では胚性幹細胞の利用に関しては制限が多かったが、今後それも見直されているので、あらたな規制がととのい次第、情報発信する予定である。また、上記の検討会の全ての資料や議事録は<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000008zaj.html>に公開されている。

3. 再生医療に用いられる細胞

1) 細胞の種類と分化

再生医療に用いる細胞としては、皮膚や軟骨のように機能的な分化を終えた細胞を体外で増殖させる場合もあるが、一般的には傷んだ組織の再生に繋がる分化能をもつ細胞がイメージされよう。すなわち、未分化の状態で増殖能をもつ細胞であり、生物学的には幹細胞と呼ばれ

る。幹細胞は全ての組織に分化できる多能性幹細胞と、特定の組織への分化に限定された体性幹細胞（組織幹細胞）とに大別される。前者には、初期胚の内部細胞塊から樹立する胚性幹細胞（ES細胞）と、人為的な細胞誘導で作成する人工多能性幹細胞（iPS細胞）があり、後者の例としては造血幹細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞など各組織に少量含まれる未分化状態の前駆細胞がある。幹細胞は、他の一般的な体細胞と異なり、テロメラーゼを発現して、細胞分裂に際してテロメアの長さを維持している。

iPS細胞は2006年にマウスの系で4種の転写因子遺伝子を繊維芽細胞に導入することによって樹立され⁹、翌年にはヒトの細胞でも樹立に成功した¹⁰。その樹立過程は、分化を終えた細胞の分化プログラムがリセットされるように観察されることからリプログラミングと呼ばれる。iPS細胞のゲノムDNAのメチル化パターンはES細胞と類似し、細胞ひとつから個体発生まで可能なことがマウスで示されている。当初はレトロウイルスを利用してため、宿主のゲノムにランダムに挿入されてしまうことから、遺伝子治療の副作用として知られる「がん化の危険性」が指摘され、実際、移入した多くのマウスでがん化したことが報告された。そこで、宿主DNAを傷つけない方法がいろいろ工夫され、相次いで報告されている。ゲノムには挿入されにくいプラスミド¹¹やゲノムに挿入されないセンダイウイルス¹²を使う方法、転写因子をコードする核酸ではなく転写因子そのもの（タンパク質）を使う方法¹³、さらにはマイクロRNAを使う方法¹⁴などである。他方、ラットのiPS細胞を脾臓欠損マウスの初期胚に注入することにより、マウスの体内にラットの脾臓を作ること成功したと報告され¹⁵、三次元の臓器を作成する方法として注目されている。iPS細胞に関する報告は、誘導効率の上昇に成功したとする論文も含めて、枚挙にいとまがないほどである。本稿執筆中には、未受精卵細胞の転写因子 Glis 1 の遺伝子を利用することにより、発がんリスクの低いiPS細胞を高効率で作ることができると報告された¹⁶。

一方、iPS細胞の実用化には、その都度、患者由来のiPS細胞を作成して「よいiPS細胞株」を選ぶより、細胞をバンクにストックしておくことが有効と考えられている。組織適合性抗原 HLA が偶然一致する確率は数万分の一とされるが、バンク化には HLA のクラス I の A と B、およびクラス II の DR 抗原に関する homozygote のドナーを選んで数十株程度樹立すれば80%の日本人をカバーできると計算されている^{17,18}。ただ、リプログラミングの過程でゲノムコピー数の変化¹⁹、遺伝子の突然変異²⁰、エピジェネティック変化²¹が生じやすいことが報告され、現在は目的に応じた質のよいiPS細胞の選抜・

樹立が重要な課題となっている。日本では加齢性黄斑変性の網膜症への臨床応用が近いと期待されている²² (http://www.kcgh.gr.jp/~ophthal/frame_f_topics.html)。一方、最近 iPS 細胞は自己由来でも免疫系による排除を受けることがマウスの系で報告された²³。iPS 細胞によって形成されたテラトーマへの T 細胞の浸潤を中心に ES 細胞と比較・観察したもので、その一般性などは今後検証されようが、「質のよい細胞」を選ぶ場合の参考になる報告ではある。先述の Glis 1 の報告といい、iPS 細胞の品質の問題が、バイオサイエンス研究の最先端において大きな関心事となっている。

なお、iPS細胞は、再生医療への応用のみでなく、*in vitro* で扱える疾患モデル細胞としても、医薬品の効果や安全性を検討する試験系細胞としても重要である。また、細胞の分化過程において転写因子の発現が別の転写因子の発現調節にかかわるというカスケード機構の解析に好適であり、その分野の基礎研究の進展が期待される。iPS細胞を経ないで直接分化させる「ダイレクトリプログラミング」も研究されているが、単に短時間で分化細胞を調製できるだけでなく、分化機構解明への貢献が期待される。

もっとも早くから研究の進んだ幹細胞として、造血幹細胞がある。種々の血液疾患や放射線障害などのケースに行われる骨髓移植は、この造血幹細胞の機能に依存したものである。図3に示すように、造血幹細胞は自己増殖能をもつとともに、あらゆる血液細胞に分化できる。その分化は、そのステージに応じた種々のサイトカインや転写因子によって調節されていることが明らかになっている。筆者は自然免疫の食細胞について基礎研究をした経験があるが、転写因子 PU.1 のレポーターベクターを組み込んだ CFU-GM 相当の HL-60 細胞をクローニングし、好中球様に分化させると、その過程で PU.1 活性が一過性に上昇した後、元のレベルに戻るのを観察した^{24,25}。外から加えた G-CSF の顕著な分化促進効果とともに、*in vitro* でも分子レベルで血液細胞の分化を再現したり解析することが可能であることを体験的に理解できた。造血幹細胞については、このような整った分化図が描かれているが、他の多くの幹細胞については不明な点が多い。再生医療の本格化をバックグラウンドとして、発生・分化の解析が進んでおり、当部の安田主任研究官らは新たな心筋分化調節因子 AW551984 を見だし、Wnt β -catenin シグナルと転写因子 Nkx2.5 の発現を繋げるものであることを明らかにした²⁶。非常に競争の激しい分野であり、このような分子レベルの知見が今後急速に蓄積されるのは確実である。

2) 細胞の運動制御シグナル

iPS細胞の写真は必ず凝集している。ES細胞も含めて、一般に多能性幹細胞は細胞同士が強く結合して相互作用しつつ分化・増殖していく。人為的に細胞をばらばらに分離すると、プレッキングと呼ばれる激しい細胞膜運動を起こして死んでしまい、*in vitro*での取り扱いが困難であることが知られていた。最近、ROCK阻害剤処理により細胞を処理すると、分離細胞の生存率が著しく向上することが分かった²⁷⁾。ROCK阻害剤により、プレッキングが抑えられた結果であり、細胞同士が結合している場合は、やはりプレッキングが抑えられた状態になっている。ほとんど全ての細胞は、細胞運動を制御する情報伝達系をもち、置かれた環境に応じて正あるいは負の調節を行って、自己の運動および種々の細胞応答を実行している。

ROCK阻害剤とは、様々な細胞運動のシグナルにおいて中心的な役割を果たすことが明らかになっている低分子量Gタンパク質RhoのエフェクターであるRho-kinase (Rhoによって活性化されるタンパク質リン酸化

酵素)を特異的に阻害する薬剤で、具体的にはY-27632などである。図4に示すように、ROCKはミオシン軽鎖、ERMタンパク質、中間径フィラメントなど多くの細胞骨格系タンパク質のリン酸化を亢進し、細胞運動を活性化する²⁸⁾。また、筆者が研究経験のあるLIMキナーゼコフィリン系に対しても、その上流で作用しアクチン細胞骨格の調節にも関与する²⁹⁻³²⁾。ROCK阻害剤は、このような細胞運動の制御シグナルの大本を抑えることにより、プレッキングという激しい「死のダンス」から細胞を救ったものと考えられる。また、細胞を分離することにより生じた「細胞解離シグナル」は、AbrというGTP交換促進タンパク質を介してRhoに伝えられることが、RNAiの手法を用いた実験から示唆されている²⁷⁾。

細胞骨格系は細胞内で極めて高密度にネットワークを作り、細胞質が単なる水ではなくセミノリッドと呼ばれるゾル状態を生み出している。単に細胞運動の制御だけでなく、細胞内輸送、サイトカイン産生などの細胞応答³³⁾、さらには転写制御にまで深く関わるシステムで、

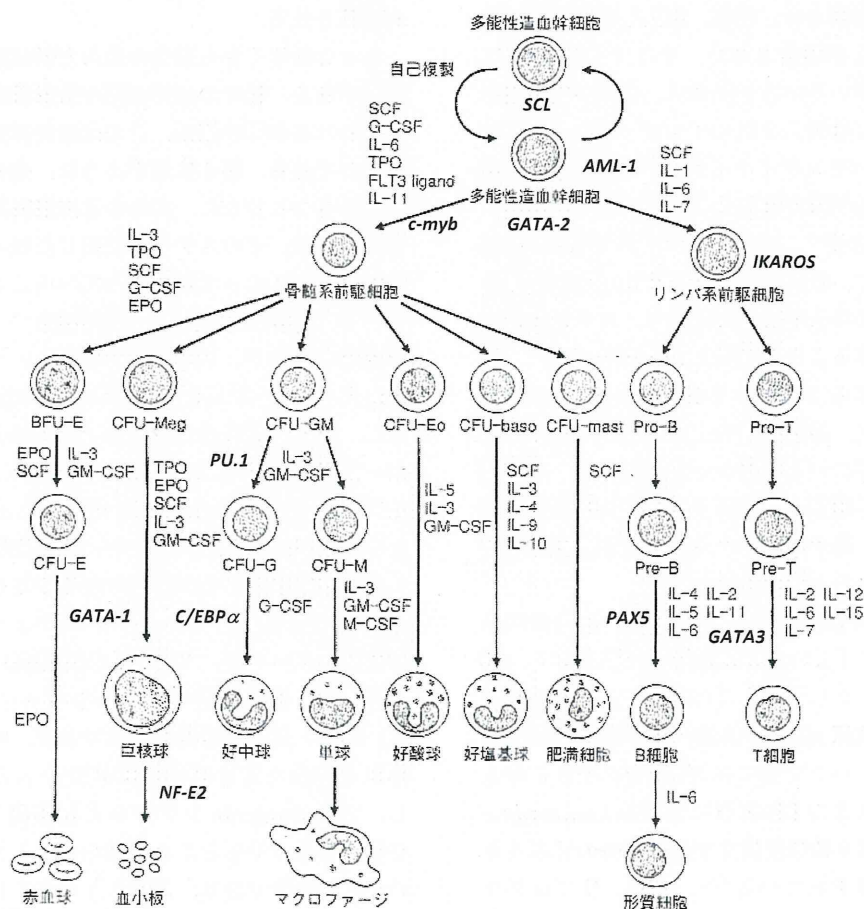


図3 造血幹細胞の分化とその制御因子 (サイトカインは標準表記で、転写因子は太字イタリックで示す)

遺伝子発現は核内アクチン細胞骨格に依存している³⁴。前項で記した β -catenin も、もともと細胞骨格タンパク質として知られていたものが、シグナル分子としても機能することが明らかになった例である。再生医療に用いられる細胞は、増殖や分化が正常に行われることが必須であり、細胞骨格シグナル伝達システムが正常に機能しなければ使えない。再生医療に用いる細胞の研究は、学術的な基礎研究としても、品質管理というレギュラトリーサイエンスとしても、両面で興味深い。

3) 幹細胞ニッチ

現在のところ実際に臨床で使われている細胞としては、間葉系幹細胞や造血幹細胞などの体性幹細胞が多い。それらは生体の各組織において、量的にはわずかな細胞として、特定の決まった領域に存在していることが明らかになりつつある。すなわち、幹細胞の特徴である増殖能と分化能の両方を維持する環境で、体性幹細胞が必要に応じて増殖や分化をするよう高度なコントロールを受ける微小環境であり、ニッチ (Niche) と呼ばれる。外部から生体に投与した幹細胞は、そのニッチに遊走する場合も多く (ホーミングと呼ばれる)、またニッチから離脱して然るべき領域に移動するなど、幹細胞が運動することが前提となる。事実、先述の Rho ファミリーに属する cdc42 を欠損した造血幹細胞はニッチへの定着や接着が障害されている³⁵。以前、ニッチは仮説にすぎなかったが、近年、蛍光標識法などを利用して *in vivo* でも細胞を個別に特定する手法が開発され、ニッチの構成細胞やニッチ機能を担う分子群が明らかにされ

てきた。特に、造血幹細胞については、骨髓中での局在や動態について解析が進んでいるので、ここではその概略を紹介する。

一般に幹細胞は酸化ストレスなどに感受性が高く、大量の放射線被曝は造血幹細胞の障害をもたらすことも周知のところとなっている。細胞の代謝回転、組織再生に重要な幹細胞は、生体内ではこのようなストレスを受けにくい環境に存在している。血液細胞という比較的寿命の短い細胞を大量に供給する造血システムは、最も堅牢な組織である骨の内部に構築されている。骨髓中では血管は血管内皮細胞一層のみからなる類洞構造を形成し、血管内への細胞の進入が容易な構造となっている。造血幹細胞は、この類洞血管の内皮細胞に接して存在し、一部は分化して血流に入るが、この領域は血流に近いため酸化ストレスやカルシウム濃度が比較的高く、幹細胞は分化しやすいと考えられる。骨髓中には、血管から離れた領域として内骨膜領域があり、そこには骨形成を担う骨芽細胞が多く存在する。造血幹細胞は、この骨芽細胞に結合して静止期 (G_0 期) を保っていることが明らかにされた。血流からの酸化ストレスを受けにくく、静止状態を保持するのに適していると考えられている。すなわち、造血幹細胞は骨髓中の二つの領域、血管性ニッチと内骨膜ニッチの両方に存在し、両領域間を移動すると考えられている (図5)³⁶。最近、いずれの領域においてもケモカイン CXCL12 (SDF-1) を高発現している細網細胞 (CXCL12-abundant reticular cell: CAR cell) が造血幹細胞のケモカイン受容体 CXCR4 を介して結合していることが明らかになり、CAR cell は、血管性ニッチ

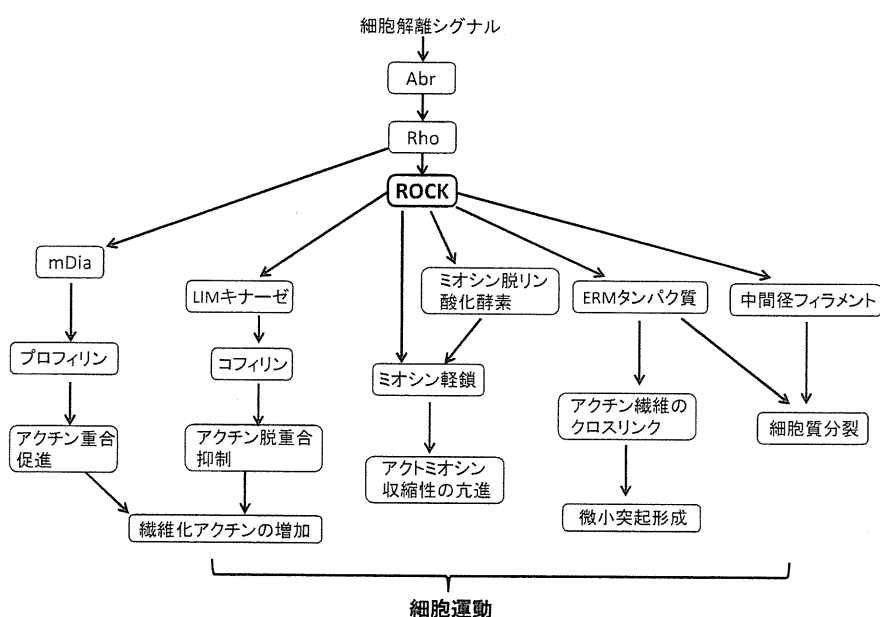


図4 細胞運動の制御シグナル (ROCK を中心として)

においては血管内皮細胞と、内骨膜ニッチでは骨芽細胞と結合していることが示された。内骨膜ニッチにおいては、造血幹細胞は骨芽細胞とインテグリンやカドヘリンを介して結合し、多くは静止期を保っている。トロンボポエチン (THPO) やアンギオテンシン-1 (Ang-1) などのサイトカインが、幹細胞のそれぞれの特異的受容体 MPL や Tie2 を介した刺激により静止状態や結合程度の調節をしている可能性が示唆されている。また、骨芽細胞に作用して間接的に幹細胞の数や機能を制御する因子もある (PTH, Wnt, BMP など)。

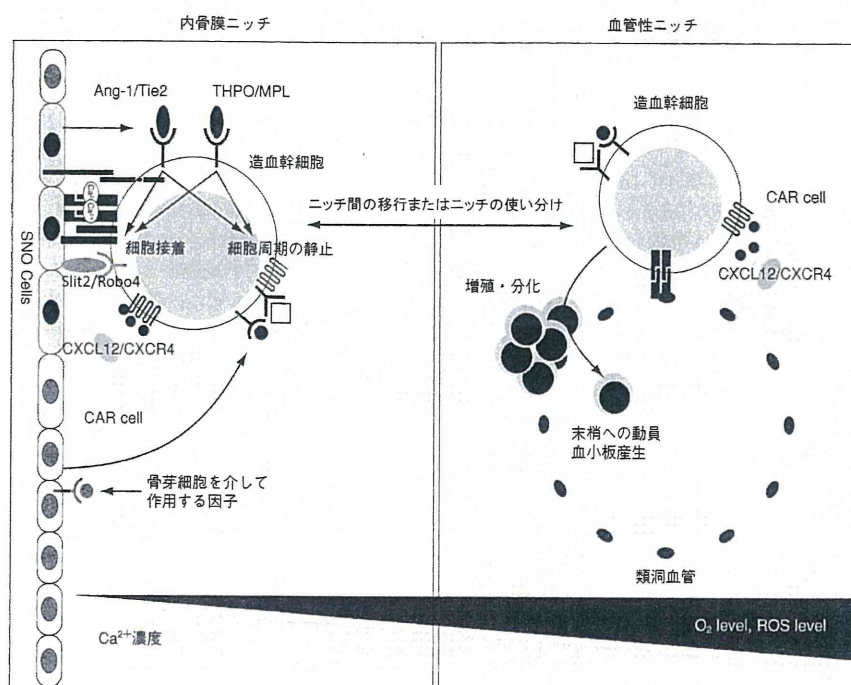
このような特別な微小環境で保持されているというのは幹細胞の重要な特性の一つである。幹細胞は不均等分裂して、一方は未分化の性質を保持し、他方は分化していくと考えられているが、その独特の分裂様式もこのニッチの環境が支えている可能性がある。造血幹細胞のニッチに関しては、図5のようなモデル図を描くことが可能な段階になってはいるが、生理的な状態での細胞の動態制御機構に関してはまだ不明な点が多く、今後の研究の進展が期待される。ニッチの分子的理解は、幹細胞生物学的に興味深いだけでなく、幹細胞を制御する手法の開発や、ニッチの異常による疾患の解明・治療にも役に立つ。実際、CXCR4の阻害剤 Mozobil は2008年に米国において血液中への造血幹細胞の動員促進薬として承認されている。また最近では、上皮増殖因子受容体シグナ

ルの阻害剤エルロチニブも、cdc42の阻害を介して造血幹細胞の末梢血液中への動員を促進すると報告された²⁷⁾。

おわりに

筆者は、かねてより血液細胞の分化にも関心を寄せて基礎研究を行っていた。細胞の分化を人為的にコントロールできる時代になって、再生医学が興隆してくる状況には関心を寄せてきた。遺伝子細胞医薬部に異動してからは、規制の立場からも仕事をするようになった。再生医療は先端的で広範な分野だけに、既存の規制や枠組みでは対応できない部分が多い。新たな枠組み作りの議論を通して、思いのほか広範な問題を把握・理解することができた。この分野は基礎研究の進展があってこそその先端医療であることを実感している。本文でも述べたように、新たな基礎研究成果が続々と報告されており、関心は一層深くなっていく。規制に関しては、異なる立場から入り組んだ議論となって出口が探しにくいこともあるが、科学的立場に立ち返って、常識的に普通に考えるという基本が案外有効であるように思える。

本稿は、遺伝子細胞医薬部、代謝生化学部、機能生化学部での研究経験をもとに書いた。各部において、ともに研究してきた多くの職場仲間には深く感謝している。特に、前遺伝子細胞医薬部長の山口照英博士には、約24



新井文用「幹細胞とニッチ」(実験医学増刊2008 Vol.26, P.86)より改変

図5 造血幹細胞ニッチ

年間、白血球の基礎研究から再生医療の規制に関することまで、実に多くの面でご協力いただいた。記して感謝したい。(2011年6月28日 脱稿)

参考文献

- 1) 実験医学増刊「再生医療の最前線2010」(中辻憲夫, 中内啓光監修, 羊土社)
- 2) 澤 芳樹:「細胞シートによる心筋症治療」, 日本臨床, **68**, 719-725 (2010)
- 3) 永谷憲蔵, 北村惣一郎:「心不全」, 日本臨床, **66**, 978-983 (2008)
- 4) 杉崎弘江, 竹内 純:「心臓再生医療を目指した幹細胞・前駆細胞からの利用状況と応用戦略」, 実験医学増刊, **28**(2), 62-69 (2010)
- 5) 松浦勝久, 岡野光夫:細胞シート工学からみた再生医療, 再生医療, **10**(1), 12-24 (2011)
- 6) Loffredo, F. S., Steinhauser, M. L., Gannon, J. and Lee, R. T.: *Cell Stem Cell*, **8**, 389-398(2011)
- 7) 規制動向調査報告書「多能性幹細胞ー再生医療ならびに医薬品創製への活用と規制の動向ー」(ヒューマンサイエンス振興財団 平成22年3月)
- 8) *Nature*, **468**, 485(2010)
- 9) Takahashi, K. and Yamanaka, S.: *Cell*, **126**, 663-676 (2006)
- 10) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S.: *Cell*, **131**, 861-872 (2007)
- 11) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S.: *Science*, **322**, 949-953(2008)
- 12) Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M.: *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*, **85**, 348-62 (2009)
- 13) Zhou, H., Wu, S., Young, J. J., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., Siuzdak, G., Schöler, H. R., Duan, L., Ding, S.: *Cell Stem Cell*, **4**, 381-384(2009)
- 14) Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, Nishikawa S, Tanemura M, Mimori K, Tanaka F, Saito T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M.: *Cell Stem Cell*, **8**, 633-638(2011)
- 15) Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H: *Cell*, **142**, 787-799(2010)
- 16) Maekawa, M., Yamaguchi, K., Nakamura, T., Shibukawa, R., Kodanaka, I., Ichisaka, T., Kawamura, Y., Mochizuki, H., Goshima, N., and Yamanaka, S.: *Nature*, **474**, 225-229(2011)
- 17) Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K.: *Nat. Biotechnol.*, **26**, 739-740 (2008)
- 18) Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J., Saji, H., Yamanaka, S.: *Nat. Methods*, **8**, 409-412(2011)
- 19) Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Närvä E, Ng S, Sourour M, Hämläinen R, Olsson C, Lundin K, Mikkola M, Trokovic R, Peitz M, Brüstle O, Bazett-Jones DP, Alitalo K, Lahesmaa R, Nagy A, Otonkoski T.: *Nature*, **471**, 58-62(2011)
- 20) Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, Canto I, Giorgetti A, Israel MA, Kiskinis E, Lee JH, Loh YH, Manos PD, Montserrat N, Panopoulos AD, Ruiz S, Wilbert ML, Yu J, Kirkness EF, Izpisua Belmonte JC, Rossi DJ, Thomson JA, Eggan K, Daley GQ, Goldstein LS, Zhang K.: *Nature*, **471**, u63-67(2011)
- 21) Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, Antosiewicz-Bourget J, O'Malley R, Castanon R, Klugman S, Downes M, Yu R, Stewart R, Ren B, Thomson JA, Evans RM, Ecker JR.: *Nature*, **471**, u68-73(2011)
- 22) Jin ZB, Okamoto S, Mandai M, Takahashi M.: *J. Genet.*, **u88**, u417-424(2009)
- 23) Zhao, T., Zhang, Z. -N., Rong, Z., Xu, Y.: *Nature*, **474**, 212-215(2011)
- 24) Watanabe, H., Adachi, R., Kusui, K., Hirayama, A., Kasahara, T., and Suzuki, K.: *Int. Immunopharmacol.*, **3**, 1601-1608(2003)
- 25) Suzuki, K., Adachi, R., Hirayama, A., Watanabe, H., Otani, S., Watanabe, Y., and Kasahara, T.: *Brit. J. Haematol.*, **130**, 681-690(2005)
- 26) Yasuda, S., Hasegawa, T., Hosono, T., Sato M., Watanabe, K., Ono, K., Shimizu, S., Hayakawa, T., Yamaguchi, T., Suzuki, K., and Sato, Y.: *Biochem. J.*, **437**, 345-355(2011)
- 27) Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, Muguruma K, Nakano T, Suga H, Ueno M, Ishizaki T, Suemori H, Narumiya S, Niwa H, Sasai Y.: *Cell Stem Cell*, **7**, 225-239(2010)
- 28) Amano, M., Nakayama, M., and Kaibuchi, K.: *Cytoskeleton*, **67**, 545-554(2010)
- 29) Suzuki, K., Yamaguchi, T., Tanaka, T., Kawanishi,

- T., Nishimaki-M., T., Yamamoto, K., Tsuji, T., Irimura, T., Hayakawa, T., and Takahashi, A.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 19551-19556 (1995)
- 30) Matsui, S., Matsumoto, S., Adachi, R., Kusui, K., Hirayama, A., Watanabe, H., Ohashi, K., Mizuno, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., and Suzuki, K.: *J. Biol. Chem.*, **277**, 544-549 (2002)
- 31) Adachi, R., Takeuchi, K., and Suzuki, K.: *J. Biol. Chem.*, **277**, 45566-45571 (2002)
- 32) Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S.: *Science*, **285**, 895-898 (1999)
- 33) 「細胞骨格と接着」(編集: 貝渕弘三他, 共立出版, 2006年)
- 34) Wu, J. I. and Crabtree, G. R.: *Science*, **316**, 1710-1711 (2007)
- 35) Yang, L., Wang, L., Geiger, H., Cancelas, J. A., Mo, J., and Zheng, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5091-5096 (2007)
- 36) 長澤丘司, 杉山立樹: 「造血幹細胞ニッチ」, 再生医療, **8**(2), 16-23 (2009)
- 37) Ryan, M. A., Nattamai, K. J., Xing, E., Schleimer, D., Daria D, Sengupta, A., Köhler, A., Liu, W., Gunzer, M., Jansen, M., Ratner, N., Le Cras, T. D., Waterstrat, A., Van Zant, G., Cancelas, J. A., Zheng, Y., Geiger H.: *Nat. Med.*, **16**, 1141-1146 (2010)

ヒト多能性幹細胞を使った再生医療・細胞治療における造腫瘍性試験の現状

Tumorigenicity testing of products derived from human pluripotent stem cells



佐藤陽治(写真) 黒田拓也

Yoji SATO¹ and Takuya KURODA^{1,2}

国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部¹,
先端医療振興財団先端医療センター研究部門再生医療基盤研究グループ²

◎ヒト胚性幹細胞(ES細胞)やヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)などの、いわゆるヒト多能性幹細胞を原材料として細胞・組織加工製品を製造し、再生医療・細胞治療へ応用しようとする試みが、現在、国内外で非常に活発に進んでいる。ヒト多能性幹細胞は動物体内に移植された際に腫瘍を形成する能力、いわゆる“造腫瘍性”を元来の特性として保持しており、ヒト多能性幹細胞を原材料とした医薬品・医療機器においては、未分化細胞の混入・残留による異所性組織形成や、腫瘍形成や癌化を防止すること、すなわち最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。しかし、患者に投与する動物またはヒト由来の生細胞を対象にした造腫瘍性試験のガイドラインはいまのところ存在しない。本稿ではヒト多能性幹細胞加工製品の開発が精力的に進むなかで、その造腫瘍性の評価法の現状と課題について概説する。



細胞・組織加工製品、ヒト多能性幹細胞、造腫瘍性、非臨床安全性試験

ヒト胚性幹細胞(ES細胞)やヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)などの“多能性幹細胞”は、その幅広い多能性ゆえに、いままで入手が困難であった各種細胞を作製することのできる素材となることが期待され、またその無限の自己複製能ゆえに、ひとたび目的細胞への効率的分化誘導方法が確立すれば、細胞・組織加工医薬品などの原材料として再生医療・細胞治療に利用できる細胞を大量かつ安定して供給することが可能となると期待されている。すでに2011年1月にアメリカでは、ヒトES細胞を加工した医薬品の再生医療における活用例として、世界初の治験(脊髄損傷治療)が開始され、2011年7月には同じくアメリカで、網膜疾患治療を目的としたヒトES細胞加工製品の治験が開始されている。

また、2007年に山中らによって世界初のヒトiPS細胞が樹立されたことを契機に、細胞のプログラミングを人為的に操作・制御できる時代が到来し、新規細胞基材、新規製造関連資材、新規製

造方法、新規適用法など、あらたなイノベーションを推進し、再生医療・細胞治療へ応用しようとする研究展開が国内外できわめて活発化している。このなかに実用化に有望と考えられるシーズも数多くあり、たとえば、近年中にはわが国においてiPS細胞を加工して作製した網膜色素上皮細胞を加齢黄斑変性の患者らに対して臨床応用することが開始されると期待されている。

このような、一昔前には実現が想定されていなかった製品(多能性幹細胞加工製品)の開発には、多能性幹細胞に関するイノベーションの進展とともに登場してくるリスクの評価法や、多能性幹細胞加工製品に特有の品質・安全性確保のための基盤技術が必須である。本稿では、多能性幹細胞加工製品に特有かつ重要な安全性上の関心事として、とくに造腫瘍性の評価の現状と課題について紹介することにする。

● 多能性幹細胞の造腫瘍性

“造腫瘍性(tumorigenicity)”とは、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力をいう。ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株を樹立した際には、どのくらい初期胚内の多能性幹細胞の性質を保っているかを確認する必要があるが、その際、細胞の多能性の証明は通常、免疫不全動物に細胞を移植して動物体内でのテラトーマ(teratoma; 奇形腫)の形成を確認し、移植した細胞が内・中・外胚葉系のさまざまな細胞種に分化することを示すことによってなされている(「サイドメモ 1」参照)。つまり、ヒト多能性幹細胞は造腫瘍性を元来の特性として保持しており、この点がヒト体細胞・体性幹細胞とは大きく異なる。したがって、ヒト多能性幹細胞を原材料とした医薬品・医療機器においては、未分化細胞の混入・残留により異所性組織形成や腫瘍形成・癌化が惹起される可能性があり、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。

● 造腫瘍性試験の国際ガイドライン

—— “何の” 造腫瘍性か

現在、細胞の造腫瘍性試験に関する国際的なガイドラインとして唯一存在するのは、世界保健機関(WHO)の生物薬品標準化専門委員会第 47 次報告(1998)(Technical Report Series No. 878, TRS 878)にある Annex I 『生物薬品製造用の *in vitro* 基材としての動物細胞の使用の要件』¹⁾である。日米欧医薬品規制調和国際会議(ICH)のガイドライン『生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基材の由来、調製および特性解析』(ICH Q5D, 医薬審 873 号, 平成 12 年 7 月 14 日)²⁾も、このガイドラインに記載

された方法を援用している。WHO TRS 878 にある造腫瘍性試験の内容は、きわめて大雑把に言えば「ヌードマウスなどの動物 10 匹に 10^7 個の細胞を投与して 3 週間ないし 12 週間観察する。陽性対照としては Hela 細胞などを用いる」というものであるが、注意しなければならないのは、その適用対象と目的である。

WHO TRS 878 の造腫瘍性試験の適用対象は、あくまでワクチンや蛋白質製剤など、ヒトを対象に *in vivo* または *ex vivo* で投与される生物薬品を製造する際に *in vitro* 基材として用いられるヒトまたは動物由来の連続継代性細胞株(不死化細胞株)である。また、造腫瘍性試験の目的は、生物薬品用細胞基材となるセルバンク(「サイドメモ 2」参照)の造腫瘍性の程度または有無を正確に把握することである。造腫瘍性の程度的大幅な変化、またはその有無に変化が生じた場合、細胞特性に何らかの異常が起こったという指標となる。つまり、既知あるいは未知のウイルス感染、変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発癌遺伝子活性化など、原因はいずれにせよ、セルバンクの安定性上の異常が発生したことを検出するための方策として、セルバンクの造腫瘍性を細胞特性指標のひとつとして評価し、品質管理に活用することが必要とされるわけである。

生物薬品の製造には通常、二段式の細胞基材のセルバンキングシステム、すなわちマスターセル

サイド メモ 1

テラトーマ(奇形腫)

多能性幹細胞が増殖分化して形成する、内・中・外胚葉のさまざまな細胞種が無秩序に集合した腫瘍。自然発生的には主として性腺に生じるが、体の各部に生じることもある。

サイド メモ 2

セルバンク

生物薬品の分野でいう“セルバンク”とは、最終製品を製造するための細胞を均質に含む複数のアンプルのことを指す。多種類の細胞株や組織を凍結して取り揃えたものや、それらを貯蔵する施設(ATCC, 理研 BRC, 臍帯血バンク, 骨髄バンクなど)を指すものではない点に注意。大本の細胞を一定の培養条件下で最低限の継代数を経て増殖させることにより調製したセルバンクをマスターセルバンクといい、マスターセルバンクから一定の条件で培養して得られる均質な細胞懸濁液を分注して調製した、実際の医薬品製造に使用されるセルバンクをワーキングセルバンクという。

バンクおよびワーキングセルバンクの確立が必要であるが、WHO TRS 878 では上で述べた目的に則した形で、造腫瘍性試験はマスターセルバンクまたはワーキングセルバンクの細胞を所定の継代数以上にわたって培養したときに実施することが求められている。ひるがえってみれば、WHO TRS 878 は患者に移植するヒトまたは動物に由来する生細胞、すなわち再生医療や細胞治療においてヒトに投与される細胞・組織加工製品は対象とはしていない。また、WHO TRS 878 における“造腫瘍性”とは、具体的にいえば「動物モデルに移植された細胞集団が、移植部位および(または)離れた転移部位で増殖することにより腫瘍を形成する能力」のことであって、ヒトにおけるリスクの直接的指標、すなわち「ヒトに移植された細胞集団が腫瘍を形成する能力」ではない。

(注：原材料であるヒト多能性幹細胞株自体は連続継代性細胞であり、かつ通常はセルバンクを構成しているため、その造腫瘍性は現行の WHO TRS 878 の適用対象となるとも考えられる。したがって、原材料としてのヒト多能性幹細胞株は、セルバンクの一連の特性解析のなかで、3 胚葉系への分化能の確認という意味だけでなく、WHO TRS 878 の意図するところに則った造腫瘍性評価が必要になるかもしれない。ただし、2010 年 7 月に公開された WHO TRS 878 Annex I の改正案³⁾では、患者に移植する細胞だけでなく、治療を目的に患者に移植する細胞株の原料となる細胞も対象外とされ、その特性解析においては規制当局などとの議論が必要とされており、今後の改正作業の行方に注目しておく必要がある。)

WHO TRS878の細胞・組織加工製品への転用

ヒト多能性幹細胞加工製品を含む細胞・組織加工製品のリスクとしては「最終製品をヒトに投与した際に製品中の細胞が腫瘍を形成する可能性」がある。すなわち、ヒト多能性幹細胞を分化誘導せずにそのまま患者に投与するような特殊なケースを除いた多くの場合、最終製品に存在するわずかな未分化細胞・異常細胞に起因する造腫瘍性を評価しなければならない。その場合には“造腫瘍

性”とはいっても、WHO TRS 878 にあるような「連続継代性細胞株のセルバンク(均一集団)の造腫瘍性」とは区別して理解する必要がある。しかし現実には前述のように、造腫瘍性試験のガイドラインは WHO TRS 878 しか存在しない。そこで、WHO TRS 878 の方法を細胞・組織加工製品に転用することができないか、という課題が生まれてくる。この課題を考える前に、WHO TRS 878 の方法、すなわち「ヌードマウスなどの動物に 10^7 個の細胞を投与」の根拠について触れてみたい。

造腫瘍性の単位としては、 TPD_{50} というものが使われる。これは“tumor producing dose at the 50% endpoint”の略で、動物に移植した際に 50% の確率で腫瘍を形成するのに必要な細胞数のことである。たとえば、Endo-CA(ヒト子宮内膜癌細胞由来)、A549(ヒト肺癌細胞由来)、Hela(ヒト子宮頸癌細胞由来)、293(ヒト胎児腎細胞由来)のヌードマウスでの TPD_{50} 値はそれぞれ 10 、 3×10^3 、 3×10^4 、 3×10^6 個程度といわれており、一言に“造腫瘍性”といっても細胞株によってその強さは大きく異なる^{4,5)}。WHO TRS 878 における“ 10^7 個”の根拠は、293 細胞のようにヌードマウスにおける造腫瘍性が低い(= TPD_{50} 値の高い)連続継代性細胞株の場合には、すくなくとも 10 匹中数匹のヌードマウスにおいて腫瘍形成を検出するには 10^7 個程度は接種する必要があるということにある。なお、Hela 細胞程度の造腫瘍性細胞ならば、 10^7 個投与すればすべてのマウスで腫瘍を形成するはずで、広く使用されている株でもあるため、陽性対照として利用できることになる。

ヒト多能性幹細胞加工製品としてヒト多能性幹細胞由来分化細胞をヒトに投与する場合、もっとも少ない細胞数で治療可能と考えられている網膜疾患治療用の網膜色素上皮細胞でも 1 回の移植に数万個は必要とされ、脊髄損傷治療に用いる神経細胞や心不全治療に用いる心筋細胞ではこれよりも桁違いに多くの細胞数が必要だといわれている。たとえば、ここでヒト細胞・組織加工製品の最終製品中の細胞の 1 万分の 1 が Hela 細胞並み、または 293 細胞並みの造腫瘍性をもっていると仮定し、上述の TPD_{50} 値を考慮すれば、半数のヌー

ドマウスで腫瘍を形成させるためには単純計算でそれぞれ 3×10^8 , 3×10^{10} 個程度の細胞が必要とされることになる。つまり、WHO TRS 878にある方法(10^7 個接種)では、ヒト細胞・組織加工製品にわずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない可能性が高い。言い換えれば、WHO TRS 878にある既存の方法では、結果はすべて偽陰性になってしまうおそれがある。

● 重度免疫不全マウスの利用

ヒト細胞・組織加工製品中にわずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出するためには、より高感度な動物を用いるという選択肢がある。その有力な候補としては、Rag2- γ C double-knockout(DKO)⁶⁾, NOD/SCID/ γ C^{null}(NOG)⁷⁾, NOD/SCID/IL-2rgKO(NSG)⁸⁾などの重度免疫不全マウス系統があげられる。これらのマウスはT細胞, B細胞およびNK細胞を欠失しており、ヌードマウスなどの従来の免疫不全マウスと比べてヒトの細胞や組織の生着性が高く、ヒト癌細胞を非常に高い効率で生着させることが可能といわれている^{9,10)}。これらの重度免疫不全マウスを利用することにより、ヒト細胞・組織加工製品中に残留・混入するわずかな造腫瘍性細胞を検出することが可能となる可能性は高い。ただし、現時点ではその方法は未確立であり、科学的リスク評価のためには細胞・組織加工製品の造腫瘍性の定量化の方策の検討と、その標準化が必要である。試験系開発における検討課題としては、試験系の検出限界・感度・精度の分析的検討、陽性・陰性コントロールのあり方、投与細胞数、投与経路、投与方法、観察期間、ヌードマウスとの比較などがあげられる。

● 造腫瘍性関連 *in vitro* 試験

細胞集団の造腫瘍性、あるいは細胞集団中の造腫瘍性細胞を検出する系としていくつかの*in vitro* 試験系があり、それぞれに長所と短所がある。それらを*in vivo* 試験法と合わせて表1にまとめた。核型分析などの染色体異常を検出することを目的とする試験は技術的に確立されているものの、得られた結果と細胞の造腫瘍性との相関性

が低いことが多く、造腫瘍性を評価するというよりも製品の遺伝的安定性を評価するという目的で実施されるべきものといえる。

軟寒天コロニー形成試験は、癌細胞の多くが足場非依存的に増殖するのに対して接着性正常細胞は足場が存在しないとアポトーシス(アノイキス)を起こすという性質を生かした試験系で、細胞を分散して軟寒天に封入し、足場非依存的な細胞増殖を検出する試験である。ただし、ヒトES細胞やヒトiPS細胞はトリプシン処理などによる分散によってアポトーシスを起こす特異な性質をもつことが知られており¹¹⁾、ヒト多能性幹細胞加工製品の場合、単純には軟寒天コロニー形成試験を適用できない。著者らは、分散誘導性アポトーシスを抑制するといわれるROCK阻害剤存在下にヒトiPS細胞を分散、軟寒天中に播種した経験があるが、それでもコロニー形成は認められなかった(未公表データ)。

フローサイトメトリーや定量性RT-PCR(qRT-PCR)は、特定のマーカー蛋白質・マーカー遺伝子の発現を指標に未分化細胞または造腫瘍性細胞を短時間で検出する簡便な系で、フローサイトメトリーの場合は細胞を分離・回収できる点、qRT-PCRはその高い感度が利点である。著者らは、初代培養ヒト体細胞中にヒトiPS細胞を添加して検討した結果、フローサイトメトリーでは0.1%、qRT-PCRの場合には0.01%の存在比のヒトiPS細胞を有意に検出することができることを明らかにしている(投稿準備中)。

不死化細胞を*in vitro* で検出する系としては、所定の培養期間を超えて細胞を培養し、その増殖特性を評価する試験がある。これらを組み合わせて未分化細胞および不死化細胞の存在を否定できれば、最終製品の造腫瘍性はかなり低いことが示唆されるが、臨床試験に進むことの妥当性は、投与細胞数、投与部位、リスクマネジメントプラン、あるいは*in vivo* 造腫瘍性試験データなどによって製品ごとに判断されるべきと考えられる。

● おわりに

ヒト多能性幹細胞加工製品を含む細胞・組織加工製品を対象にした造腫瘍性試験ガイドラインは

表 1 おもな造腫瘍性関連試験の能力と限界

試験法	測定事項	評価事項	利点	欠点
In vivo 試験法				
ヌードマウスへの移植	腫瘍形成	造腫瘍性細胞の検出	• 定量化の方策が整備 (WHO TRS 878)	• 時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる • 膀胱癌, 乳癌, グリア細胞腫, リンパ腫, 白血病細胞に由来する細胞株は腫瘍を形成しない • わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
NOD-SCID マウスへの移植			• ヌードマウスよりも高感度	• 時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる • 定量化の方策が未整備 • 胸腺腫を自然発症
DKO/NOG/NSG マウスへの移植			• NOD-SCID よりも高感度(?) / 胸腺腫なし	• 時間 (数週間～数カ月)・費用がかかる • 定量化の方策が未整備
In vitro 試験法				
細胞増殖特性解析 (所定培養期間を超えた培養)	細胞増殖速度	不死化細胞の検出	• 簡便・安価 • ときにはヌードマウスよりも“高感度” (不死化していても腫瘍形成のないケース)	• わずかな不死化細胞の混入の検出には時間がかかる
フローサイトメトリー	細胞マーカー蛋白質発現	造腫瘍性細胞・未分化細胞の検出	• 短時間 (～1 日)・簡便 • ときには軟寒天コロニー試験よりも“高感度” • 細胞を識別・分離・回収できる	• 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない • ゲートのかけ方で結果がばらつく
qRT-PCR	細胞マーカー遺伝子発現		• 短時間 (～1 日)・簡便 • ときには flow cytometry よりも“高感度”	• 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない
軟寒天コロニー形成試験	コロニー形成	足場非依存的増殖の検出	• in vivo 試験より短期間 (数週間～1 カ月程度) • 安価 • ときにはヌードマウスよりも“高感度”	• 浮遊系細胞に使用できない • わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない • ヒト ES/iPS 細胞は検出不能 (分散誘導性細胞死)
核型分析	染色体の数・サイズ・形	染色体異常の検出	• 技術的に確立	• 相関性の問題 (染色体異常 ↔ 造腫瘍性) • わずかに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
染色体 CGH およびアレイ CGH	ゲノム DNA のコピー数異常			
蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 分析	特定遺伝子の位置・コピー数			

いまのところ存在しない。WHO TRS 878 の造腫瘍性試験は対象・目的が異なるため、細胞・組織加工製品の造腫瘍性評価にそのまま転用することには無理がある。解決策としては、重度免疫不全マウスの利用が考えられ、重度免疫不全マウスを

用いた造腫瘍性の定量的評価法の開発と標準化が目下の課題である。造腫瘍性関連試験には *in vitro* の試験系もあり、各試験系の能力と限界を科学的に踏まえ、個別の製品で示すべき具体的な評価事項にかなうかどうかで取捨選択し、懸念の強

い製品についてはタイプの異なる試験を複数実施して総合的に判断すべきと考えられる。なお、個別の製品で示すべき具体的評価事項は、原材料や製品の特性、対象疾患、リスクマネジメントプランなどを勘案して製品ごとに判断されるものである。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く、各試験法の能力と限界を理解したうえでリスク評価、リスクマネジメント立案およびインフォームドコンセントの受領を行うことが重要である。

謝辞：本説の執筆にあたりご助言をいただきました近畿大学薬学総合研究所所長・早川堯夫先生、および国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部のメンバーに深く感謝いたします。

文献/URL

- 1) WHO Expert Committee on Biological Standardiza-

tion, 47th Report, 1998(Technical Report Series No. 878).(http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_878.pdf)

- 2) 厚生省医薬安全局審査管理課長通知(医薬審第 873 号, 平成 12 年 7 月 14 日)「生物製品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来, 調製及び特性解析」について. (http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5d_00_7_14.pdf)
- 3) WHO/BS/10.2132 Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks, 2010(Proposed replacement of TRS 878, Annex 1).(http://www.who.int/biologicals/BS2132_CS_Recommendations_CLEAN_19_July_2010.pdf)
- 4) Lewis, A. M. Jr. et al.: *Cancer Lett.*, **93** : 179-186, 1995.
- 5) Lewis, A. M. Jr.: Regulatory implications of neoplastic cell substrate tumorigenicity. (http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/5-4188S1_2.PPT)
- 6) Garcia, S. et al.: *Immunity*, **11** : 163-171, 1999.
- 7) Ito, M. et al.: *Blood*, **100** : 3175-3182, 2002.
- 8) Ishikawa, F. et al.: *Blood*, **106** : 1565-1573, 2005.
- 9) Machida, K. et al.: *J. Toxicol. Sci.*, **34** : 123-127, 2009.
- 10) Quintana, E. et al.: *Nature*, **456** : 593-598, 2008.
- 11) Ohgushi, M. et al.: *Cell Stem Cell*, **7** : 225-239, 2010.

* * *

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

American Heart
Association®



Learn and Live SM

Cilostazol Suppresses Angiotensin II–Induced Vasoconstriction via Protein Kinase A –Mediated Phosphorylation of the Transient Receptor Potential Canonical 6 Channel

Kinue Nishioka, Motohiro Nishida, Marina Ariyoshi, Zhong Jian, Shota Saiki, Mayumi Hirano, Michio Nakaya, Yoji Sato, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto, Katsuya Hirano, Ryuji Inoue and Hitoshi Kurose

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011, 31:2278-2286: originally published online July 28, 2011

doi: 10.1161/ATVBAHA.110.221010

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association.
7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2011 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/31/10/2278>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2011/07/28/ATVBAHA.110.221010.DC1.html>

Subscriptions: Information about subscribing to Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is online at

<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:

journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at

<http://www.lww.com/reprints>

Cilostazol Suppresses Angiotensin II–Induced Vasoconstriction via Protein Kinase A–Mediated Phosphorylation of the Transient Receptor Potential Canonical 6 Channel

Kinue Nishioka, Motohiro Nishida, Marina Ariyoshi, Zhong Jian, Shota Saiki, Mayumi Hirano, Michio Nakaya, Yoji Sato, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto, Katsuya Hirano, Ryuji Inoue, Hitoshi Kurose

Objective—The goal of this study was to determine whether inhibition of transient receptor potential canonical (TRPC) channels underlies attenuation of angiotensin II (Ang II)–induced vasoconstriction by phosphodiesterase (PDE) 3 inhibition.

Methods and Results—Pretreatment of rat thoracic aorta with cilostazol, a selective PDE3 inhibitor, suppressed vasoconstriction induced by Ang II but not that induced by KCl. The Ang II–induced contraction was largely dependent on Ca^{2+} influx via receptor-operated cation channels. Cilostazol specifically suppressed diacylglycerol-activated TRPC channels (TRPC3/TRPC6/TRPC7) through protein kinase A (PKA)–dependent phosphorylation of TRPC channels in HEK293 cells. In contrast, we found that phosphorylation of TRPC6 at Thr69 was essential for the suppression of Ang II–induced Ca^{2+} influx by PDE3 inhibition in rat aortic smooth muscle cells (RAoSMCs). Cilostazol specifically induced phosphorylation of endogenous TRPC6 at Thr69. The endogenous TRPC6, but not TRPC3, formed a ternary complex with PDE3 and PKA in RAoSMCs, suggesting the specificity of TRPC6 phosphorylation by PDE3 inhibition. Furthermore, inhibition of PDE3 suppressed the Ang II–induced contraction of reconstituted ring with RAoSMCs, which were abolished by the expression of a phosphorylation-deficient mutant of TRPC6.

Conclusion—PKA-mediated phosphorylation of TRPC6 at Thr69 is essential for the vasorelaxant effects of PDE3 inhibition against the vasoconstrictive actions of Ang II. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2278–2286.)

Key Words: angiotensin II ■ diacylglycerol ■ phosphodiesterase ■ phosphorylation
■ transient receptor potential canonical

Peripheral vascular tone is controlled mainly by agonist stimulation via the sympathetic nerve system, the renin-angiotensin-aldosterone system, and inherent myogenic contraction.¹ Increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in response to neurotransmitters and hormones triggers contraction of vascular smooth muscle cells (VSMCs).² Stimulation of G_q protein-coupled receptor activates phospholipase C and induces production of 2 second messengers, inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG).³ IP_3 mobilizes Ca^{2+} release from the internal Ca^{2+} stores through stimulation of IP_3 receptors, leading to a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Depletion of Ca^{2+} stores by IP_3 -mediated Ca^{2+} release then induces subsequent Ca^{2+} entry through activation of store-operated Ca^{2+} channels.⁴ A variety of evidence has implied the important roles of

store-operated Ca^{2+} channels in vascular tone regulation.⁵ In contrast, DAG is primarily thought to activate protein kinase C, but it also plays a more direct role in activating Ca^{2+} entry,⁶ and recent reports have implied that DAG-mediated Ca^{2+} influx also participates in vascular tone regulation.^{7–9} However, it is unclear which pathway is involved in agonist-induced contraction of aortic VSMCs.

Cilostazol, a selective phosphodiesterase (PDE) 3 inhibitor, is clinically used as an antiplatelet drug and is also applicable to patients with intermittent claudication and arteriosclerosis obliterata.^{10–12} Cilostazol has been shown to induce vascular relaxation through a protein kinase A (PKA)–dependent decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of VSMCs.^{13,14} Several PKA target proteins responsible for suppression of agonist-induced vascular contraction have been reported.^{15–18}

Received on: December 2, 2010; final version accepted on: July 12, 2011.

From the Department of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences (K.N., M. Nishida, M.A., S.S., M. Nakaya, H.K.) and Division of Molecular Cardiology, Research Institute of Angiocardiology, Graduate School of Medical Sciences (M.H., K.H.), Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka, Japan; Departments of Physiology (Z.J., R.I.) and Pharmacology (S.K., T.I.), School of Medicine, Fukuoka University, Jyonan-ku, Fukuoka, Japan; Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences, Setagaya, Tokyo, Japan (Y.S.).

Correspondence to Hitoshi Kurose, PhD, Department of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan. E-mail kurose@phar.kyushu-u.ac.jp

© 2011 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.221010

Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org> by YOJI SATO on May 13, 2012