

表2 米国・EUで承認済みのヒト細胞・組織加工製品の造腫瘍性関連試験（それぞれの審査概要から抽出・整理）

	製品名	細胞/足場材料	適用	造腫瘍性試験			核型分析	免疫不全動物を用いた他の試験(動物)	備考
				<i>in vivo</i> (動物)	軟寒天コロニー形成試験	細胞増殖特性解析			
米国	Carticel	自己軟骨細胞	軟骨損傷						
	Provenge	自己樹状細胞 (PAP 抗原提示)	転移性 前立腺がん					「自己由来製品なので」 非臨床安全性試験なし	
	laViv (azficel-T)	自己線維芽細胞	ほうれい線 解消 (美容整形)					「ヒトでの経験が豊富な ので」非臨床試験なし。なお 臨床試験中に腫瘍形成1例	
	HemaCord (HPC-C)	同種臍帯血由来 造血前駆細胞	造血幹細胞 移植			○		Colony forming unit 測定	
	Epicel	自己角化細胞/ マウス細胞層	熱傷	○ (ヌードマウス)	○		○ (ヌードマウス)	ヌードマウス・軟寒天 ともに陰性	
	Apligraf (Graftskin)	同種角化細胞+ 同種線維芽細胞/ ウシ由来コラーゲン	皮膚潰瘍	○ (ヌードマウス)			○ (hu-SCID マウス)	マスターセルバンクが ヌードマウスで陰性	
	Gintuit (Apligraf (Oral))	同種角化細胞/ ウシ由来コラーゲン	口腔軟組織 再生	○ (ヌードマウス)				マスターセルバンクが ヌードマウスで陰性	
	TransCyte (Dermagraft-TC)	同種線維芽細胞/ ナイロン基材	熱傷		○		○ (ヌードマウス)	軟寒天で陰性	
	Dermagraft	同種線維芽細胞/ ポリグラクチンメッシュ	皮膚潰瘍	○ (ヌードマウス)			○ (ヌードマウス)	ヌードマウスで陰性	
EU	OrCel	同種角化細胞+ 同種線維芽細胞/ ウシ由来コラーゲン	熱傷 表皮水疱症				○ (SCID マウス, ヌードマウス)		
				ChondroCelect	自己軟骨細胞	軟骨損傷			○ (ヌードマウス)

要ないと考えられる。

表2に欧米において薬事承認済みのヒト細胞・組織加工製品（すべてヒト体細胞加工製品）を示すと同時に、各製品の審査概要に記載されている造腫瘍性関連試験の内容を示す。ヌードマウスを用いた *in vivo* 造腫瘍性試験を実施している製品が4件ある。これらの試験では少量の造腫瘍性細胞が混入している場合でも結果はすべて偽陰性になってしまう可能性が高い。もちろん、結果が陰性であることにより、造腫瘍性の高い細胞が極端に大量（数十%程度）には混入していないことを確認することはできるが、それほどの混入ならば、より簡単に安価な細胞増殖特性解析で何らかの明らかな異常が認められるはずである。

ヒト体細胞・体性幹細胞加工製品は相同時の使用、非相同時の使用ともに、世界各地で臨床応用が進んでいるが、製品の投与を原因とする腫瘍形成の報告はほとんど存在せず、これまでに科学論文として報告されたものは、ヒト胎児由来神経幹細胞を用いた毛細血管拡張性運動失調症の治療により脳腫瘍が形成されたとするもの1件しかない⁶⁾。筆者らの知るところでは、ヒト成人由来体細胞・体性幹細胞の投与による腫瘍形成の報告はない。過去にヒト間葉系幹細胞の *in vitro* 培養時の自発的な悪性形質転換が4件報告されているが、このうち2件^{7, 8)} はがん細胞株のクロスコンタミネーションによるものであることが後に判明している。また、残りの2件^{9, 10)} では *in vitro* 培養時に細胞の不死化が検出されている。これらのことは、GMPによる最終製品への悪性腫瘍細胞のクロスコンタミネーション防止が重要であること、および細胞増殖特性の把握が重要であることを示している。したがって、GMPに準拠して培養・加工され、細胞増殖特性解析で異常がないことを確認した成人由来のヒト体細胞・体性幹細胞の移植については、非臨床安全性試験としての *in vivo* 造腫瘍性試験を行う必要性は高くないと考えられる。

1.3.5 造腫瘍性試験に関するまとめ

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今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適用かどうかで取捨選択する必要がある。

文 献

- 1) 薬食発 0907 第2号, 第3号, 第4号, 第5号, 第6号, 厚生労働省医薬食品局長通知別添
- 2) http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf

- 3) M. Ito *et al.*, *Blood*, 100, 3175 (2002)
- 4) K. Machida *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, 34, 123 (2009)
- 5) T. Kuroda *et al.*, *PLoS One*, 7, e37342 (2012)
- 6) N. Amariglio *et al.*, *PLoS Med.*, 6, e1000029 (2009)
- 7) D. Rubio *et al.*, *Cancer Res.*, 65, 3035 (2005)
- 8) GV. Røsland *et al.*, *Cancer Res.*, 69, 5331 (2009)
- 9) Y. Wang *et al.*, *Cytotherapy*, 7, 509 (2005)
- 10) DQ. Tang *et al.*, *Am. J. Stem. Cells.*, 1, 114 (2012)

第5章：再生医療分野の関連規制

第3節 FDAの動向

佐藤陽治, 村岡ひとみ
国立医薬品食品衛生研究所

(株)技術情報協会

『希少疾患/難病 の診断・治療と製品開発』 抜刷

第3節 FDAの動向

はじめに

再生医療に用いられる細胞・組織加工医薬品等は米国では351HCT/Pという製品の範疇に属する。細胞・組織加工医薬品等は、滅菌・精製などの処理が不可能なために感染症の伝播等の危険性を完全には排除し得ないおそれがあること、生きた細胞を含み極めて動的な特性を持つ先端的製品であって、品質や安全性の確保に未知・未経験の要素が多いことなどの理由から、重篤・致命的またはQOLを著しく損ない、かつ他に治療方法がないような稀少疾病・難病を適用対象として開発される場合が多い。本稿では、重篤・致命的または重度の衰弱をもたらす稀少疾病・難病に対する医薬品等(細胞・組織加工製品も含む)の迅速な実用化を目的とした、様々な米国の制度について概説するとともに、稀少疾患・難病に対する細胞・組織加工製品の早期実用化に関する最近のFDAの動向について紹介する。

1. 「ヒト細胞、組織または細胞・組織利用製品」(HCT/P)

日本で「細胞・組織利用医薬品等」¹⁾、「細胞組織製品」²⁾、または「細胞調製品」³⁾と呼ばれるものは、米国では「ヒト細胞、組織または細胞・組織利用製品」(HCT/P: human cells, tissues or cell/tissue-based product)という製品の範疇に含まれており、治験に限らず製品開発を目的としない臨床研究に対してもFDAが規制を行っている。HCT/Pは「ヒト細胞または組織を含む、またはヒト細胞または組織から成る品物であり、ヒト患者に対して埋植、移植、注入または導入することを目的としたもの」と定義されている(21CFR1271.3(d):連邦規則集第21編第1271.3(d)項)。HCT/Pは、公衆衛生サービス法(PHS Act: Public Health and Service Act)の側面からさらに2種類に大別される。すなわちPHS Act第361条に基づく「ヒト組織」(361HCT/P)と第351条に基づく「ヒト細胞治療薬および遺伝子治療薬」(351HCT/P)がある。HCT/Pのうち、21CFR1271.10(a)の要件すべて(表1)に該当する場合には361HCT/Pに該当し、そうでない場合には351HCT/Pに該当する。361HCT/Pは、販売承認申請が不要で、査察によって規制される。351HCT/Pのうち生細胞を含む製品は、日本における「細胞・組織加工医薬品等」^{4,5)}に相当し、米国内での臨床使用に際し、生物製剤または医療機器として品目毎に治験届および販売に関するFDAの承認が必要とされる。ある特定のHCT/Pが生物製剤、医療機器のどちらの範疇に属するかは作用の主様式(PMOA: Primary Mode of Action)に従って決定される。すなわち、細胞・組織の生化学的機能・免疫学的機能・代謝機能が主な作用様式となるならば生物製剤となり、逆に物理的・構造的機能が主な作用様式となるならば医療機器に分類される⁶⁾。2012年7月現在、FDAから販売承認を得ている351HCT/Pは表2の通りである。

表1 361HCT/Pであるための要件(21CFR1271.10(a))

(1) HCT/Pの処理が最小限*(minimal manipulation)
(2) HCT/Pが、細胞・組織の採取部位と同等な部位への適用(homologous use)にのみ限定される場合で、そのことが表示、宣伝等に反映されている
(3) 製造工程に他の物質(水、クリスタロイド、滅菌剤、保存料、または貯蔵剤を除く)と細胞または組織との複合体化が含まれず、かつ水、クリスタロイド、滅菌剤、保存料、または貯蔵剤の添加によって当該HCT/Pに関して新たな臨床上の安全の上での懸念を生じない
(4) 以下の何れかに該当する場合: 1) HCT/Pに全身的な作用がなく、その主たる機能として生細胞の代謝活性に依存することがない場合;または 2) HCT/Pに全身的な影響がある、またはその主たる機能として生細胞の代謝活性に依存することがある場合で: i) 自己への使用を目的とする場合; ii) 一親等または二親等の血縁関係の同種のための使用である場合;または iii) 生殖目的の使用である場合
*注:最低限の処理(minimal manipulation)の要件(21CFR1271.3(f)) ⁷⁾ ① 構造のある組織については、再建、修復または置換における当該組織の有用性に関して組織本来の特性に変化を与えるものではないこと;また、 ② 細胞ないし構造のない組織については、細胞または組織の本来の生物学的特性に変化を与えるものではないこと

表2 FDAの販売承認を得ている351HCT/P(2012年7月現在)

製品名	細胞/足場材料	適用	分類	承認
Carticel	自己軟骨細胞	軟骨損傷	生物製剤	BLA
Provenge	自己樹状細胞 (PAP抗原提示)	転移性 前立腺がん	生物製剤	BLA
laViv (azficel-T)	自己線維芽細胞	ほうれい線解消 (美容整形)	生物製剤	BLA
HemaCord (HPC-C)	同種臍帯血	造血幹細胞移植	生物製剤	BLA
Cintuit (Apligraf (Oral))	同種角化細胞 /ウシ由来コラーゲン	歯肉再生	生物製剤	BLA
Epicel	自己角化細胞 /マウス細胞層	熱傷	医療機器	HDE
Apligraf (Graftskin)	同種角化細胞 +同種線維芽細胞 /ウシ由来コラーゲン	皮膚潰瘍	医療機器	PMA
TransCyte (Dermagraft-TC)	同種線維芽細胞 /ナイロン基材	熱傷	医療機器	PMA
Dermagraft	同種線維芽細胞 /ポリグラクチンメッシュ	皮膚潰瘍	医療機器	PMA
OrCel	同種角化細胞 +同種線維芽細胞 /ウシ由来コラーゲン	熱傷 表皮水疱症	医療機器	PMA(熱傷) およびHDE (表皮水疱症)

2. 351HCT/Pの臨床試験・販売承認審査

治験(商業目的)か臨床研究(非商業目的)かに拘わらず、販売未承認の351HCT/Pの臨床試験を行う場合には、FDAに申請を行わなければならない。日米EU医薬品規制調和国際会議ICHのGCP(Good Clinical Practice)に基づいた米国GCP(21CFR50.56)を順守する必要がある。FDAでは生物製剤に分類される製品はCBER(Center for Biologics Evaluation and Research)の所管となり、医療機器に分類される製品はCDRH(Center for Devices and Radiological Health)の所管となるが、医療機器と分類される351HCT/Pに関しては、CBERとCDRHが連携して相談・審査にあっている。生物製剤としての351HCT/Pの場合は、cGMP(Current Good Manufacturing Products)とcGTP(Current Good Tissue Practice)に従って製造し、研究用新薬IND(Investigational New Drug)申請の後に臨床試験を行い、生物製剤承認申請BLA(Biologics License Application)を通じて販売承認を得ることになる。一方、医療機器としての351HCT/Pの場合には、医療機器用のGMPであるQSR(Quality Systems Regulation)とcGTPに従い製造した製品について、研究用機器特例IDE(Investigational Device Exemption)申請の後に臨床試験を行い、市販前承認PMA(Premarket Approval)を通じて販売承認を得る。

3. 迅速承認制度

351HCT/Pに限らず、重篤な疾病を対象とした新規の医薬品、生物製剤および医療機器の迅速な上市を達成することを目的として、通常の販売承認審査以外に様々な審査制度を用意している。

3.1 医薬品・生物製剤

3.1.1 Fast Track Drug Development Program(ファースト・トラック制度)

重篤ないし致命的な疾病の治療薬で、かつアンメット・ニーズを充足することのできる可能性の高い製品の開発を促進し、審査を迅速に行うためのプログラム。「連邦食品医薬品化粧品法」(FD&C Act: Federal Food, Drug, and

Cosmetics Act) の Section 506 (21 U.S.C. 356) に基づく。IND 前から開発段階のいずれの時点でもファースト・トラックの指定は請求できる。ファースト・トラックの指定を受けると、FDA との相談のためのミーティングを優先的に持つことができる。また、申請資料を一括して提出するのではなく、分割して、試験結果が得られ次第提出できる。FDA は全データが揃わなくとも試験結果が提出され次第順次審査を行う。また、サロゲート・エンドポイント（簡便もしくは短期間に観察可能で、本来のエンドポイントを合理的に推測することが可能な評価項目）のデータに基づく評価を採用できることなども利点である⁸¹。

3.1.2 Accelerated Drug Approval Program (加速承認制度)

FD&C Act Section 506, 21 CFR 314 (新薬承認申請) および 21 CFR 601 (生物製剤承認申請) に基づく。重篤ないし致死的な疾病のための新薬については、十分に管理の行き届いた臨床試験によってサロゲート・エンドポイントに対する有効性、または生存や不可逆的病状以外のエンドポイントに対する有効性を示すことができれば販売承認がなされる場合がある。ただし、臨床研究は続行し、有用性を確認しなければならない。市販後調査も必要。

3.1.3 Priority Review Policy (優先審査制度)

CDER または CBER による優先的な審査により、審査期間を通常約 10 カ月のところから約 6 カ月に短縮させる制度。生物製剤の場合には、重篤または致死的な疾病の治療、診断または予防における有効性ないし安全性において有意な改善をもたらす製品、または有意な改善をもたらす可能性のある製品とみなされれば適用される⁸¹⁰。

3.1.4 Orphan Drug Designation (オーファン製品指定)

1983 年に「オーファンドラッグ法」(Orphan Drug Act) が制定され、対象患者が米国内で 20 万人以下の医薬品、または米国内に 20 万人以上患者がいるが開発して販売承認を得るまでの費用が米国内の売り上げでは賄えるということが合理的に考えて期待できないような医薬品・生物製剤については、これをオーファン製品として指定し、臨床研究に対する研究費支援、臨床研究費用の税控除、FDA に対する申請手数料の免除、および 7 年間の市場独占権を認めている。オーファン製品指定の審査はオーファン製品開発室 (OOPD: Office of Orphan Products Development) で行われる。FDA の情報サイト <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/oopd> によれば、現在、少なくとも 80 程度の HCT/P がオーファン製品指定を受けていることが分かる。ただし、オーファン製品 (生物製剤) として FDA から販売承認を受けた HCT/P はまだない。

3.2 医療機器

すべての資料を一括して提出する通常の PMA に加え、出来るだけ早く機器の販売を可能にするための方法として申請書の早い時期から申請者と協力する方法として、Modular PMA, Streamlined PMA, Product Development Protocol (PDP) がある。また、稀少疾病・障害のために使用する医療機器の開発促進策として、人道機器特例承認 (HDE: Humanitarian Device Exemption) がある。

3.2.1 Modular PMA (モジュラー PMA)

申請者は PMA を、製造、前臨床試験、臨床試験等に細分化したモジュール (部分) に分解する。モジュールは個別に完成され、順次 FDA に提出・審査される。最初の段階で、モジュール提出計画 (PMA シェル) を策定し、内容に関して申請者と FDA とで合意する必要がある。各モジュールを受理した後、ただちに審査を開始する。最後のモジュールが提出された時には、審査の多くが終了しているので、審査が手早く終わることが期待できる。なお、審査料は最初の PMA モジュールを提出する前に支払う。モジュラー PMA は、PMA 申請書提出が間近である場合や、機器の設計が流動的で変更する可能性が高い場合には不向きである。

3.2.2 Streamlined PMA (簡素化 PMA)

簡素化 PMA は CDRH の臨床検査機器課で始められた方法である。従来型 PMA 同様に PMA 資料を一括提出するが、FDA が機器の技術・用途をよく理解している場合に適用される。簡素化 PMA 審査は、FDA ガイダンスまたは FDA が評価済みの公開の審査方法がある場合や、類似製品の審査経験を FDA が豊富に持つ場合に用いることが適当であるとされる。

3.2.3 PDP (Product Development Protocol, 製品開発プロトコール)

21 CFR 814.19 に規定される販売承認を得るための方法。FDA が製品開発プロトコールを完成したことを公示したクラス III 医療機器は PMA 承認を持つとみなされる。試験開始前にプロトコール(仮説、目的、エンドポイント等)を根拠として承認する。PDP の過程に進む製品としては、技術が業界で十分確立しているものが理想的である。

3.2.4 HDE (Humanitarian Device Exemption, 人道使用機器特例承認)¹¹⁾

21 CFR 814.100-126 に規定される。人道使用機器 (HUD, Humanitarian Use Device) とは、米国内で年間 4 千人以下が罹患ないし発症する疾病または病態の治療または診断において患者にとって有益で、他に有効な機器が存在しない医療機器と定義される。このような稀な疾病に対する医療機器の開発の費用は、患者の数が少ないゆえに売り上げによって回収することが難しいことから、政府による開発振興策が講じられている。HUD 指定もオーファン製品指定と同様に OOPD で行われる。HUD として販売するためには、HDE (人道使用機器特例承認) 申請を CDRH に提出し、承認を得なければならない。HDE 申請は内容的に PMA 申請に類似しているが、PMA にある有効性に関する要件を免除される点特徴的である。すなわち、有効性を合理的に立証する臨床試験結果は必要とされない。ただし安全性についての評価は必要で、機器によって不合理または明らかな病気・障害のリスクに患者をさらすようなことがないこと、想定されるベネフィットが病気・障害のリスクを上回ること、現在利用可能な機器や代替治療法のリスク・ベネフィットを考慮すること、が必要とされる。他に HDE に特徴的なこととして、使用される医療施設の倫理委員会 (IRB) の承認が必要であることが挙げられる (21 CFR 814.124)。機器が HDE 承認を受けていれば、患者へのインフォームドコンセントは要求されない。なお HUD の製造については QSR 準拠が原則であるが、免除請求が可能で、FDA の判断で QSR 準拠を免除されることがある。なお、FD&C Act Section 520 (m) (21 U.S.C. 360j) によって、実費以上の値段で販売して利益を得ることは禁止されている。ただし、2007 年小児用医療機器安全性・改善法 (The Pediatric Medical Device Safety and Improvement Act of 2007, Public Law 110-85) により、小児の患者ないし小児の集団への適用を目的とし、2007 年 9 月 27 日以降に承認された HUD については、既定の出荷数を超えない範囲で利益目的に販売しても構わない。HDE の審査期間は 75 日以内と規定されている。これまでに医療機器として販売承認を受けた 351 HCT/P の中では、培養皮膚製品である Epicel と OrCel が、それぞれ熱傷と表皮水疱症の適用において HDE 承認を受けている (表 2)。

4. FDA オーファン製品開発室

1983 年に成立したオーファンドラッグ法には、稀少な疾病・病態の診断、予防または治療を目的とした製品の開発を連邦政府がサポートすることが国の方針であるということが明示されている。本法律に対応するための組織として、FDA にはオーファン製品開発室 (OOPD) がある。OOPD の任務は、稀少疾病用製品 (医薬品、生物製剤、医療機器、医療用食品 (医師の監視下でのみ使用でき疾病や栄養管理用として特別に使用される食品)) の開発と評価を推進することであり、オーファン指定の申請のあった製品について、科学的データおよび臨床データに基づき、当該製品が稀少疾病用製品に該当するかどうか、および公的に開発を推進すべきかどうかについての評価が行われている。また OOPD は稀少疾病に関し、産官学および患者団体の意見集約の場としても機能している。

5. 販売未承認の製品の臨床利用

上記制度の他に、米国では未承認の生物製剤および医療機器の臨床利用は、重篤・致命的・代替療法のない疾病に対する緊急的もしくは人道的使用において認められている。これはあくまで例外的な措置(広い意味でのコンパッションエート・ユース(人道的使用))であって、基本的には研究ではないものの、臨床試験としてFDAに登録する必要がある。生物製剤に関しては、通常のIND申請を行うことができない緊急時、臨床プロトコル外の患者、特定の個人患者に使用することが可能である。医療機器に関しては、臨床試験中の緊急時での使用、臨床試験の基準外の患者への使用、臨床試験途中の患者の追加、臨床試験完了後で販売承認前使用が可能になっている。

6. FDA 安全性・イノベーション法

2012年7月、「FDA 安全性・イノベーション法」(FDASIA: Food and Drug Administration Safety and Innovation Act)が成立した。この法律は、革新的な医薬品、医療機器、ジェネリック医薬品およびバイオ後続品の審査料を徴収するFDAの権限やその他の制度改革について定めたものであり、再生医療/細胞・組織利用製品の開発・実用化にも大きな影響を与えるものになると考えられる。

6.1 審査料

FDASIAでは製薬業界とFDAとの間で審査料の交渉が可能なが明文化されている。また、2013-2017会計年度の間も継続して医薬品審査の促進を目的とした審査料を徴収する権限をFDAに認めている。審査料の値上げと引き換えに、FDAは「審査の迅速性の確保」「審査過程における申請者とのコミュニケーションの緊密化」「稀少疾病等の患者とのコミュニケーションの拡充」「組織パフォーマンスの自己評価」を実施することになる。また、ジェネリック医薬品およびバイオ後続品の審査料についてはFDASIAで初めて明文化された。

6.2 ファースト・トラックと加速承認

FDASIAには、重篤・致命的な疾病の治療を目的とした医薬品の審査・承認プロセスに関する改正がいくつか記されており、これらの改正により、再生医療/細胞・組織利用製品の審査も加速されると期待される。FDASIAでは、ファースト・トラックの指定を受けた医薬品等の開発振興および審査促進をFDAに求めている。また、加速承認制度を強化し、ファースト・トラック指定製品を含めた難病治療薬の販売承認審査を迅速化するための仕組みの整備も求めており、FDAは関連ガイダンス案をFDASIAの発効から1年以内に作成し、その翌年に正式に発出することが求められている。

さらにFDASIAでは、重篤な疾病・病態の治療を目的とし、かつ既存の治療方法よりも明らかに優れていることが予備的な臨床データによって示された治療法を「打開的治療法」(Breakthrough Therapy)とし、その指定を受けた医薬品の開発と審査の促進もFDAに求めており、FDAは打開的治療法に関するガイダンス案をFDASIA発効後18カ月以内に作成し、その翌年に正式に発出することが求められている。

6.3 稀少疾病

稀少疾病治療薬の開発促進については上記の他にも幾つかの条項があり、例えば、稀少疾病の関係者(産業界、アカデミア、患者団体など)とFDAとの対話の機会を設けることや、審査に際して稀少疾病に関する外部専門家の意見を必要に応じて聴取することが求められている。また、小児稀少疾病(出生から18歳までに発症する稀少疾病)の治療薬開発には優先審査制度が適用されることになっている。

おわりに

FDASIAにあるように、米国はアンメット・ニーズを克服するための革新的医薬品・医療機器の開発と実用化の促進を国の方針とし、その実現のため、FDAには制度のさらなる改善が求められている。近年の科学の発展とともに、重篤・

致死的な稀少疾病に対する標的分子やバイオマーカーの同定・開発が行われるとともに、再生医療からのアプローチも多く試みられるようになり、これらを駆使した革新的な医薬品・医療機器の開発に期待が集まっている。医薬品・医療機器の安全性・有効性の判断にはリスクとベネフィットのバランスが重要であるが、その評価においては製品が革新的であればあるほど開発者にとっても審査側にとっても未知・未経験の要素が多くなる。そうした状況下で、稀少疾患・難病に苦しむ患者にいち早く新しい治療法を届けるにはどうしたらよいのか、という大きな問題の解決策を探る際、本稿で挙げた米国の制度における考え方が参考になると考えられる。


文 献

- 1) 平成 12 年 12 月 26 日医薬発第 1314 号別添 1「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」
- 2) 平成 15 年 5 月 20 日厚生労働省告示第 210 号「生物由来原料基準」
- 3) 平成 22 年 11 月 1 日厚生労働省告示第 380 号「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」
- 4) 平成 20 年 2 月 8 日薬食発第 0208003 号「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」
- 5) 平成 20 年 9 月 12 日薬食発第 0912006 号「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」
- 6) FDA Definition of Primary Mode of Action of a Combination Product. Federal Register Vol. 70, No. 164 August 25, 2005
- 7) FDA Guidance for Industry and FDA Staff : Minimal Manipulation of Structural Tissue Jurisdictional Update. September, 2006
- 8) FDA Guidance for Industry: Fast Track Drug Development Programs-Designation, Development, and Application Review. January, 2006
- 9) FDA/CDER MAPP 6020. 3 Review Classification Policy : Priority (P) and Standard (S). July 16, 2007
- 10) FDA/CBER SOPP 8405 Complete Review and Issuance of Action Letters. September 20, 2004
- 11) FDA Guidance for HDE Holders, Institutional Review Boards (IRBs), Clinical Investigators, and FDA Staff -Humanitarian Device Exemption (HDE) Regulation : Questions and Answers. July 8, 2010

Experimental Medicine

実験医学



 羊土社

[発行元]

株式会社 羊 土 社

〒101-0052

東京都千代田区神田小川町2-5-1

TEL 03(5282)1211(代表)

FAX 03(5282)1212

E-mail eigyo@yodosha.co.jp

URL <http://www.yodosha.co.jp/>

© YODOSHA CO., LTD.

本誌に掲載する著作物の複製権・上映権・譲渡権・公衆送信権(送信可能化権を含む)は(株)羊土社が保有します。本誌を無断で複製する行為(コピー、スキャン、デジタルデータ化など)は、著作権法上での限られた例外(「私的利用のための複製」など)を除き禁じられています。研究活動、診療を含み業務上使用する目的で上記の行為を行うことは大学、病院、企業などにおける内部的な利用であっても、私的使用には該当せず、違法です。また私的使用のためであっても、代行業者等の第三者に依拠して上記の行為を行うことは違法となります。

©copy <(社)出版者著作権管理機構 委託出版物>本誌の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前に、(社)出版者著作権管理機構(TEL: 03-3513-6969, FAX 03-3513-6979, e-mail: info@jcopy.or.jp)の同意を得てください。

2. 再生医療における細胞・組織加工製品の治験とレギュレーション

草川森士, 佐藤陽治

わが国では、再生医療に利用される細胞・組織加工製品の実用化には主に、治験を経て薬事承認を受けるルートと、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究」を経て先進医療・高度医療等に向かうルートがあるが、国民のアクセシビリティと産業化という面からは前者を採ることが必要になる。細胞・組織加工製品の治験に関しては、患者数の少ない難病を対象とすることが多い点や、挑戦的な研究開発である点などから医師主導治験の環境整備が期待される。本稿ではこれらとともに、治験開始にあたっての細胞・組織加工製品の品質・安全性確保や治験の実施における規制等について概説する。

はじめに

ヒト由来の細胞を用いた再生医療は、これまで治療が困難であった疾患・損傷の新たな突破口として熱い期待を集めている。再生医療においてヒトに投与することを目的に、生きた細胞または組織を加工して製造される製品は「細胞・組織加工医薬品/医療機器」(細胞・組織加工製品)と呼ばれる。現在までに世界で実用化されている細胞・組織加工製品は、皮膚や軟骨などの体細胞を培養・加工したものがほとんどであるが、

近年、体性幹細胞、ES細胞、iPS細胞を原材料とした新たな製品の開発も進んでいる。これら幹細胞に関する研究は日進月歩で進んでおり、新たな細胞の樹立、培養法、分化誘導技術など、急速に進展するバイオサイエンスの医療への応用は、治療を待つ患者のためという側面だけでなく新たな産業の創生という面でも高い関心を集めており、世界的にも激しい開発競争が展開されている。しかし、原材料や製造技術が何であれ、新たな細胞・組織加工製品の実用化が本当に可能かどうかを判断するには、実際にヒトで試し、科学的妥当

[キーワード&略語]

再生医療, 細胞・組織加工製品, 医師主導治験, ガイドライン

ES細胞: embryonic stem cells (胚性幹細胞)

GCP: good clinical practice

GLP: good laboratory practice

GMP: good manufacturing practice

GTP: good tissue practice

ICH: The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

iPS細胞: induced pluripotent stem cells (人工多能性幹細胞)

The Japanese regulatory framework for clinical trials of cell/tissue-engineered products

Shinji Kusakawa¹⁾/Yoji Sato²⁾: Foundation for Biomedical Research and Innovation¹⁾/Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences²⁾ (先端医療振興財団¹⁾/国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部²⁾)

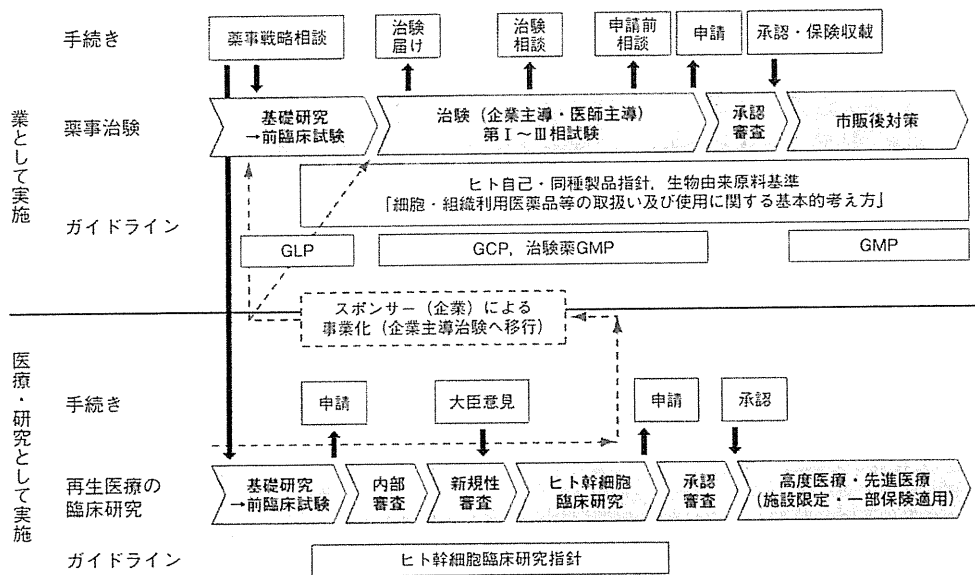


図1 日本における細胞・組織加工製品の開発から使用まで

再生医療を目的とした新規の細胞・組織加工製品の国内実用化には主に、治験を行い厚生労働省の製造販売承認を受けて保険適用医療として実現するルートと、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に則った臨床研究（ヒト幹細胞臨床研究）の成果に基づくルートが存在する。それぞれに係る手続き、ガイドラインを示している

性のある有効性・安全性および品質の検証がなされなければならない。

細胞・組織加工製品の国内実用化の道筋

再生医療を目的とした新規の細胞・組織加工製品の国内実用化には、主に2つのルートがある(図1)。1つは、治験を行った上で厚生労働省の製造販売承認を受けて保険適用医療として実現するルート、言い換えれば薬事法上の「業」としての実用化である。もう1つは、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に則った臨床研究(ヒト幹細胞臨床研究)の成果に基づく、先進医療^{※1}・高度医療^{※2}評価制度による医療、もしくは保険適用外医療としての実用化であり、これらは医療法・医師法の下で行われる「医療行為」として実施される。ただし先進医療・高度医療評価制度による医療の場合、実施可能な医療機関に限られると同時に製品の品質にばらつきが生じる可能性があり、また、開発に多くの投資を要する新規製品を用いた保険適用外医療は高額となりやすいため、いずれの場合も多く国民が簡単には享受できない恐れが

ある。したがって、国民が広くアクセスできるという観点からすれば、治験を通じて薬事法上の承認を得る必要がある。また、ヒト幹細胞臨床研究は手続きや費用などの面で治験よりも実施が比較的容易であるものの、治験の国際ガイドライン(ICH-GCP)に沿った国内GCP(good clinical practice)ガイドライン(後述)の準拠が義務ではなく、得られたデータを製品の薬事承認申請資料としてそのまま使用できない場合が多い。つまり、新規の細胞・組織加工製品に関して、ヒト幹細胞臨床研究で有効性・安全性を確認してから産業化をめざして薬事承認を得ようとしても、多くの

※1 先進医療

未だ保険診療の対象に至らない先進的な医療技術について、安全性、有効性等を確保するために一定の施設基準を設定し、保険診療との併用を認められるもの。

※2 高度医療(第3項先進医療)

高度医療評価制度の制定において定められた、薬事法の承認等が得られていない医薬品・医療機器の使用を伴う先進的な医療技術を、一定の要件の下に「高度医療」として認め、保険診療と併用できる。

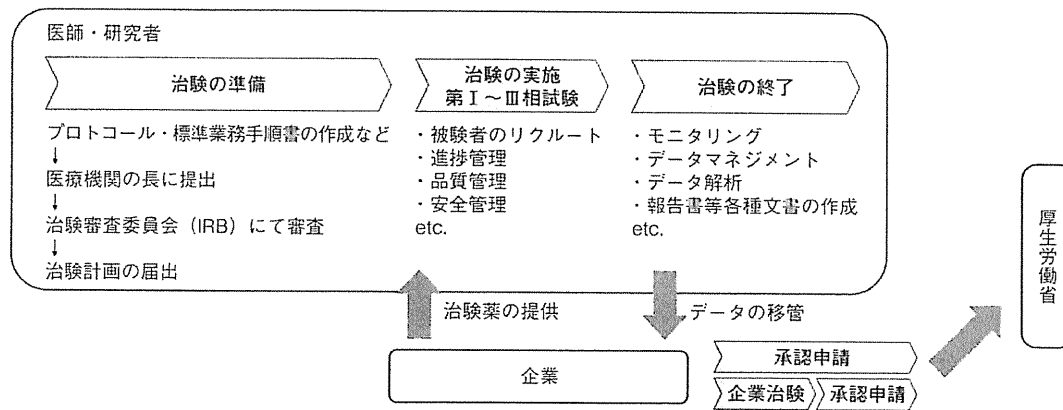


図2 医師主導治験の流れ

医師主導治験は、医師・研究者や医療機関が主体となって企画・実施する治験である。医療機関は企業から未承認の医薬品または医療機器の提供を受け治験を実施し、そのデータを企業に提供し承認申請に進んでいく

場合には、GCPに則った治験をやり直さなければならない。(ちなみに、欧米ではわか国のような「治験」(商業目的の臨床試験)と「臨床研究」(医療・研究目的の臨床試験)という区別はなく、すべての臨床試験はICH-GCPに準じた各国の規制に従う必要がある。したがって、大学等における非商業的な臨床試験にも多くの資金・労力が必要となるものの、企業への技術移転が日本よりスムーズに進みやすいしくみだといわれている)

2 医師主導治験

わか国では10年ほど前まで、治験を企画・実施する主体は企業のみということになっていたが、平成14年7月公布の改正薬事法により、医師・歯科医師も自ら主体となって治験を企画・実施することが可能となった(医師主導治験; 図2)。医師主導治験が可能となった背景としては、海外ですでに承認済み、あるいはすでに標準的な製品として確立されている医薬品・医療機器について、わか国の臨床現場においても必要性があるが、採算性等の問題から国内企業が治験を実施しない場合があるという実態があった。そうした製品について、医師自らが治験を実施することが可能となり薬事承認への道が開かれたことで、状況が改善されることが期待されている。再生医療および細胞・組織加工製品に関しては、患者数の少ない難病の治療に向け

た研究開発や、治療方法の概念が新しい挑戦的な研究開発になるケースがほとんどであり、また、国内外ですでに承認されている製品について適応拡大を目的とする場合も考えられ、さらに製品の有効性・安全性が未知数で企業が着手しにくい故に国内開発が遅れるという懸念もある。わか国における再生医療および細胞・組織加工製品の開発の多くは、大学等の研究機関の研究者(の臨床研究)により行われる場合が多いという事情も考えると、医師主導治験の積極的実施は、医師が開発した治療法・製品を一般に普及するための効果的な方策となると考えられる。医師主導治験の実施には、医師のデータ・技術の企業への橋渡しのしくみ(実施医療機関の体制整備費、治験薬の製造、プロトコール作成、データ管理業務、治験相談等の費用を補助する等の支援、研究費など)をさらに充実させる必要もあり、平成19年度から開始されている「新たな治験活性化5カ年計画」¹⁾等の中で、文部科学省・厚生労働省は日本医師会治験促進センターや中核病院・拠点医療機関等と協力し、医師主導治験を含めたわか国の治験実施の環境整備に努めている。

3 治験開始に関する規制・制度

新規の細胞・組織加工製品を治験でヒトに使用する際には、開発者は治験実施に適うだけの安全性と品質をあらかじめ示す必要がある。先ごろまでわか国では、

治験でヒトに使用する前に製品の安全性と品質の「確認」を厚生労働大臣に求める過程（確認申請）が必要とされていた。ただし、確認申請は手続きに時間がかかることが難点とされるなどの理由で平成23年に廃止され、現在はこれに代わる制度として医薬品・医療機器薬事戦略相談（薬事戦略相談）が導入されている。薬事戦略相談は、医薬品医療機器総合機構（PMDA）が細胞・組織加工製品等の先端的医薬品・医療機器の開発初期段階から、品質・安全性に係る相談を受け付けて、薬事承認に向けて必要な試験の詳細などを対面助言するものであり、治験・製品開発の迅速化に向けた今後の運用が注目される。

細胞・組織加工製品は、薬事法上の取扱い方法の分類からすれば「特定生物由来製品」とみなされる可能性が他の製品よりも高く、そうなれば保健衛生上の危害の発生または拡大を防止するための措置を講ずることが必要となってくる。また、先端的製品であるために臨床使用経験や情報の蓄積が乏しく、製品の態様も多種多様であることから、リスクの判断が難しい。したがって細胞・組織加工製品の開発においては、規制当局が評価基準を作成し、研究開発を実施する企業・研究者のみならず審査官に対しても適用することにより、評価基準に対する理解を各者が共有することが重要である。表にそれらの評価基準を含む、再生医療に係わる通知・指針等を示す。現在わが国には、細胞・組織加工製品の品質・安全性確保についての主幹となるガイドラインとして、①「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」（以下「基本的考え方」）、②「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」（以下「ヒト自己製品指針」）および③「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」（以下「ヒト同種製品指針」）がある。「基本的考え方」は、細胞・組織を取り扱う際の基本的要件を示すとともに、細胞・組織加工製品の品質・安全性、並びに細胞・組織の取扱いに関する科学的および倫理的妥当性を確保することを目的とし、細胞・組織加工製品の承認後のみならず、治験時においても適用される。「基本的考え方」の中で細胞・組織加工製品の安全性に関して最も強調されているのは、細菌、真菌、ウイルス等の汚染の危険性への対策である。なお、日本

のGTP（good tissue practice）は、「基本的考え方」と「生物由来原料基準」（表）とで形成されている。「ヒト自己製品指針」および「ヒト同種製品指針」は、それぞれヒト（自己）由来およびヒト（同種）由来の細胞・組織加工製品の品質および安全性確保のための基本的な技術要件についてまとめたもので、製造販売承認申請時にのみならず、治験開始の際に求められる資料について記されている。ヒト（自己）由来製品とヒト（同種）由来製品との間の根本的な差異は、自己由来の細胞・組織を用いる場合には、その細胞・組織を介する感染症伝播のリスクおよび免疫学的な問題が理論上ないことである。しかし、自己由来であっても製造工程におけるクロスコンタミネーションの問題や、製造従事者・医療従事者等の安全上の問題は同種由来の場合と同様に存在する。また、培養工程においてウイルスが増殖するリスクを考慮することが必要な場合もある。さらに、自己由来の場合、個別製品の製造となるので、それらの品質のばらつきを最小限にとどめる工夫が必要な反面、製品レベルでの各種試験の実施に試験検体の量的制約がある。それらに留意した合理的な品質確保の方策（製造工程のより厳密な恒常性維持・管理など）を採用する必要がある。また、自己由来であっても、遺伝子改変細胞の場合には相応の留意が必要である。なお、近年その研究成果が注目されているヒト体性幹細胞、ヒト胚性幹細胞（ES細胞）、ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）等のヒト幹細胞を加工した製品については、より早期に実用化するために、これらに特化した留意事項について記した指針案が最近作成されており²⁾～⁶⁾、近日中に最終的な指針が公表される予定となっている。

承認申請時に厚生労働大臣に提出する非臨床安全性試験の結果は、GLP（good laboratory practice；表）を遵守し信頼性が確保されたものであることが原則であるが、治験開始に際して提出する非臨床安全性試験データは、必ずしもGLPに従って取得されたものである必要はない。ただし、最終的に承認申請時にはGLPに従っていることが求められるので、治験計画提出時に準拠しておくことによって試験の重複を省くことができる。

表 再生医療/細胞・組織加工製品の開発に係わる主な省令、通知、指針等

文書名	初版/最新版(平成24年1月現在)	備考
ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針	平成18年7月3日厚生労働省告示第425号/平成22年11月1日厚生労働省告示第380号	ヒト幹細胞臨床研究が社会の理解を得て、適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、かつ、科学的知見に基づいた有効性及び安全性を確保するための指針。
生物由来原料基準	平成15年5月20日厚生労働省告示第210号/平成17年3月31日厚生労働省告示第177号	医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器に使用されるヒトや動物に由来する原料又は材料について、製造に使用される際に講ずべき必要な措置に関する基準を定めることにより、医薬品等の品質、有効性及び安全性を確保することを目的とする。
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	平成12年12月26日医薬第1314号別添1	「生物由来原料基準」と併せてGTPを形成する、細胞・組織を取り扱う際の基本的要件を示すとともに、細胞・組織を利用した製品の品質・安全性、並びに細胞・組織の取扱いに関する科学的及び倫理的妥当性を確保することを目的とする。
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	平成20年2月8日薬食発第0208003号	ヒト細胞・組織を加工した医薬品又は医療機器について品質及び安全性の確保のための基本的な技術要件について定めたもの。細胞提供者が自己(患者本人)の場合と同種(他人)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。
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	平成20年9月12日薬食発第0912006号	
医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令	平成9年3月26日厚生省令第21号/平成20年厚生労働省令第114号	GLP省令。非臨床試験施設の構造設備、標準操作手順書等の作成、動物の管理、プロトコルや最終報告書の作成などを規定。承認申請時に提出する非臨床安全性試験の結果はGLPに従っていることが原則。
医療機器の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令	平成17年3月23日厚生労働省令第37号/平成20年厚生労働省令第115号	
医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令	平成16年12月24日厚生労働省令第179号	GMP省令。医薬品及び医薬部外品の製造販売承認の要件として、医薬品及び医薬部外品の製造所における製造管理・品質管理の基準を定めたもの。
医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令	平成16年12月17日厚生労働省令第169号	QMS省令(医薬品のGMP省令に相当)。医療機器及び体外診断用医薬品の製造販売承認の要件として、医療機器及び体外診断用医薬品の製造所における製造管理・品質管理の基準を定めたもの。
治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準(治験薬GMP)	平成20年7月9日薬食発第0709002号別添	治験薬GMP。企業から提供を受けた医薬品を治験薬として取り扱う際の製造管理・品質管理等の基準。
ヒト(自己)細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について	平成20年3月27日薬食監麻発第0327025号	ヒト自己由来細胞・組織加工製品のGMP。患者本人から直接細胞・組織を採取するという特殊性等を踏まえた製造管理・品質管理の考え方。
医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令	平成9年3月27日厚生省令第28号/平成21年3月31日厚生労働省令第68号	GCP省令。治験を依頼する者、治験を自ら(医師主導治験)実施しようとする者に係る「治験の準備に関する基準」及び「治験の管理に関する基準」、治験を実施する医療機関が行うべき「治験を行う基準」などを定めたもの。
医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令	平成17年3月23日厚生労働省令第36号/平成21年3月31日厚生労働省令第68号	

4 治験の科学的信頼性・安全性確保と倫理的実施に関する規制・制度

薬事法では、治験を依頼する者(企業主導治験)、治

験を自ら実施しようとする者(医師主導治験)は、厚生労働大臣に治験計画を届け出なければならないと定めている。治験はこの計画の届け出後30日過ぎないと実施できない。治験計画に問題があり開始を中止する

必要がある場合には、この30日の間に厚生労働省からその旨の指示がある。

細胞・組織加工製品を含む医薬品・医療機器の治験は、「ヒトを対象とした医学研究のための倫理規定」いわゆる「ヘルシンキ宣言」で言う「ヒトを対象とした医学研究」であり、治験に参加する者の人権と安全の確保が絶対条件である。また、科学的に適切に設計されたものであることも不可欠である。承認申請時に厚生労働省に提出する治験データは、GCP省令(表)と呼ばれる治験の取扱い基準に適合するものでなければならない。

GCP省令には、治験を依頼する者、治験を自ら実施(医師主導治験)しようとする者に係る「治験の準備に関する基準」および「治験の管理に関する基準」、治験を実施する医療機関が行うべき「治験を行う基準」などが定められており、プロトコルの妥当性、被験者の安全性・個人情報保護、倫理性などを確保しつつ、科学的に適正で信頼性の高い試験データが得られるように臨床試験を行うための基準となっている。

平成20年に出された内閣府規制改革会議第三次答申には、再生医療関連にも多くの指摘事項があった。これを受けて厚生労働省は平成21・22年度に「再生医療における制度的枠組みに関する検討会」を設置した。その報告書(1)「再生・細胞医療に関する臨床研究から実用化への切れ目ない移行を可能とする制度的枠組みについて」⁷⁾には、わが国のGCP省令は国際的に調和されたICH-GCPに基づいているが、その運用面においては欧米と比べて負担が多いとの指摘があること、厚生労働省では治験契約の規定の見直しなどその改善を図ってきたこと、並びに今後とも治験の実施状況を見つつ必要な改善を検討していくことが必要であることなどが述べられている。質の高い細胞・組織加工製品を迅速に開発する方策として今後どのように治験の制度・運用を改善すべきか、動向を注目しながら幅広い議論を行うことが必要だと考えられる。

おわりに

ヒトES細胞を原材料とする世界初の製品の臨床試験を実施していた米国Geron社は、平成23年11月に臨床試験の中止に加え、再生医療事業からの撤退を発表した。その理由として、高コストの問題と規制の問題(規制の複雑さとそれによるコストへの影響など)を挙げている。国内においても、再生医療事業を行うバイオベンチャー企業にとって規制の壁は高いとされ、新たな製品の開発は苦戦を強いられており、撤退を余儀なくされる企業が後を絶たない。また、日本の治験は海外よりさらに高コストであるため、臨床試験の実施・販売承認取得を最初に海外、特に欧米でめざすケースが多くなっている。自国発の製品・技術の恩恵をいち早く国内の患者・国民が享受できないという事態は憂慮すべき問題である。その解決には産・官・学だけでなく「医療現場」と「患者・国民」を含めたすべての関係者が協力し、「画期的な細胞・組織加工製品を治療を待ち望む患者さんのもとに届ける」という共通の目標に向かって治験等の制度・運用を改善する努力を続けることが必要だと考えられる。

文献

- 1) 「新たな治験活性化5カ年計画」について
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/03/s0330-5.html>
- 2) 早川堯夫ほか：再生医療，10：91-98，2011
- 3) 早川堯夫ほか：再生医療，10：107-117，2011
- 4) 早川堯夫ほか：再生医療，10：99-106，2011
- 5) 早川堯夫ほか：再生医療，10：118-128，2011
- 6) 早川堯夫ほか：再生医療，10：129-140，2011
- 7) 医政発0428第7号・薬食発0428第1号厚生労働省医政局長・医薬食品局長通知別添1
http://www.mhlw.go.jp/bunya/iryuu/dl/tuuti_230428.pdf

<筆頭著者プロフィール>

草川森士：先端医療振興財団・研究員。明治大学農学部卒、東京大学大学院医学系研究科修了。博士(医学)。国立成育医療研究センター研究所・研究員を経て、平成23年より現職。専門は幹細胞生物学、神経科学。現在、幹細胞の分化の研究を行うとともに、国立医薬品食品衛生研究所の協力研究員として「多能性幹細胞安全情報サイト」(URL：<http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec2/sispsc/html/index.html>)の運営に携わっています。

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling

Mariko Moriyama^{1,2†}, Hiroyuki Moriyama^{1*†}, Ayaka Ueda¹, Yusuke Nishibata¹, Hanayuki Okura², Akihiro Ichinose³, Akifumi Matsuyama² and Takao Hayakawa¹

Abstract

Background: Adipose tissues contain populations of pluripotent mesenchymal stem cells that also secrete various cytokines and growth factors to support repair of damaged tissues. In this study, we examined the role of oxidative stress on human adipose-derived multilineage progenitor cells (hADMPCs) in neurite outgrowth in cells of the rat pheochromocytoma cell line (PC12).

Results: We found that glutathione depletion in hADMPCs, caused by treatment with buthionine sulfoximine (BSO), resulted in the promotion of neurite outgrowth in PC12 cells through upregulation of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and fibroblast growth factor 2 (FGF2) transcription in, and secretion from, hADMPCs. Addition of *N*-acetylcysteine, a precursor of the intracellular antioxidant glutathione, suppressed the BSO-mediated upregulation of BMP2 and FGF2. Moreover, BSO treatment caused phosphorylation of p38 MAPK in hADMPCs. Inhibition of p38 MAPK was sufficient to suppress BMP2 and FGF2 expression, while this expression was significantly upregulated by overexpression of a constitutively active form of MKK6, which is an upstream molecule from p38 MAPK.

Conclusions: Our results clearly suggest that glutathione depletion, followed by accumulation of reactive oxygen species, stimulates the activation of p38 MAPK and subsequent expression of BMP2 and FGF2 in hADMPCs. Thus, transplantation of hADMPCs into neurodegenerative lesions such as stroke and Parkinson's disease, in which the transplanted hADMPCs are exposed to oxidative stress, can be the basis for simple and safe therapies.

Keywords: Human adipose-derived multilineage progenitor cells, Adult stem cells, Reactive oxygen species, p38 MAPK, Neurite outgrowth, BMP2, FGF2, Neurodegenerative disorders

Background

Mesenchymal stem cells (MSCs) are pluripotent stem cells that can differentiate into various types of cells [1-6]. These cells have been isolated from bone marrow [1], umbilical cord blood [2], and adipose tissue [3-6] and can be easily obtained and expanded *ex vivo* under appropriate culture conditions. Thus, MSCs are an attractive material for cell therapy and tissue engineering.

Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, also referred to as human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells (hADMPCs), are especially advantageous because they can be easily and safely obtained from lipoaspirates, and the ethical issues surrounding other sources of stem cells can be avoided [4-6]. Moreover, hADMPCs have more pluripotent properties for regenerative medical applications than other stem cells, since these cells have been reported to have the ability to migrate to the injured area and differentiate into hepatocytes [4], cardiomyoblasts [5], pancreatic cells [7], and neuronal cells [8-10]. In addition, it is known that hADMPCs secrete a wide variety of cytokines and

* Correspondence: moriyama@phar.kindai.ac.jp

[†]Equal contributors

¹Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

Full list of author information is available at the end of the article

growth factors necessary for tissue regeneration including nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), fibroblast growth factors (FGFs), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) [11-14].

Recently, several groups have reported that hADMPCs facilitate neurological recovery in experimental models of stroke [9,10,15] and Parkinson's disease [16]. Despite the superiority of hADMPCs over other stem cells, the potential use of hADMPCs for the treatment of these neurodegenerative disorders has not been fully investigated. It has been reported that administration of

hADMPCs in animal models of acute ischemic stroke markedly decreased brain infarct size, improved neurological function by enhancing angiogenesis and neurogenesis, and showed anti-inflammatory and anti-apoptotic effects [9,10]. These effects were due in part to increased secretion levels of VEGF, HGF and bFGF under hypoxic conditions [13], indicating the role of hADMPCs in reducing the severity of hypoxia-ischemic lesions.

In addition to hypoxic stress, ischemic lesions are generally subject to inflammation, which leads to the generation of reactive oxygen species (ROS) [17,18]. ROS are

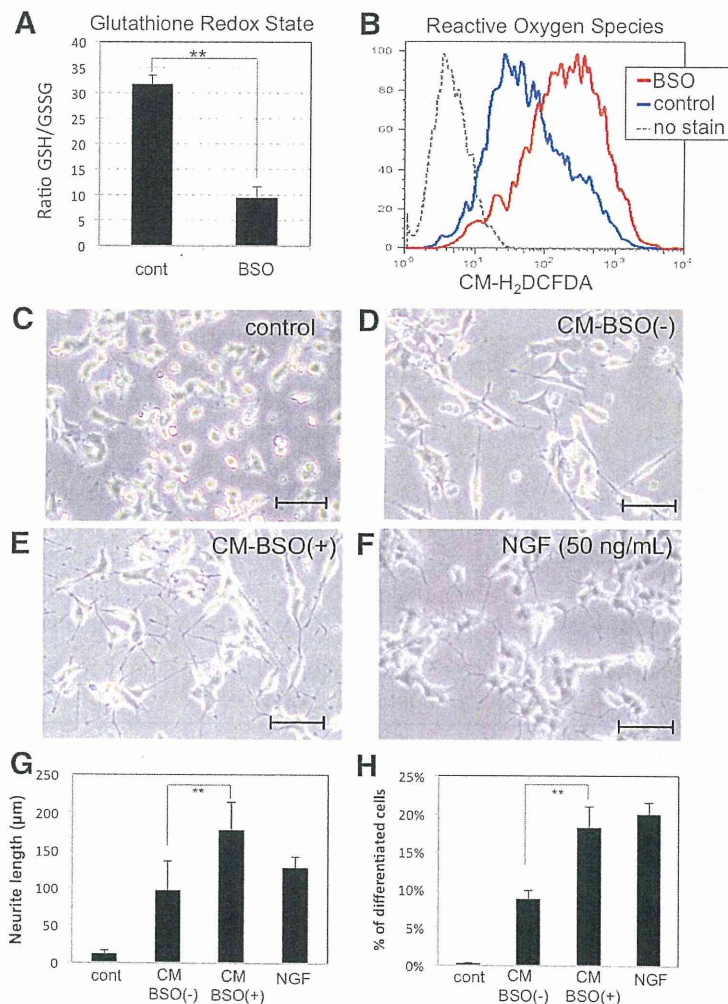


Figure 1 Conditioned medium from hADMPCs exposed to oxidative stress induces neurite outgrowth in PC12 cells. (A, B) Decrease of the reduced/oxidized glutathione ratios and increase in the intracellular ROS levels in hADMPCs treated with BSO. hADMPCs were treated with 1 mM BSO for 16 h, and cellular GSH/GSSG levels (A) or ROS (H₂O₂) levels (B) were analyzed. (C-G) Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by conditioned medium from BSO-treated hADMPCs. PC12 cells were induced to differentiation by changing medium to differentiation medium alone (C), CM-BSO (-) (D), CM-BSO (+) (E), or differentiation medium with NGF (50 ng/mL) (F) for 2 days. Scale bars, 200 μm. (G) One hundred individual neurites were measured in each sample using Dynamic Cell Count Analyzer BZ-H1C (Keyence, Osaka, Japan) and average neurite length was calculated. **, P < 0.01 (Student's t test). (H) Percentage of neurite-bearing PC12 cells and average neurite length were measured. **, P < 0.01 (Student's t test).

generated as a natural byproduct of normal aerobic metabolism, and mitochondrial respiration, together with oxidative enzymes such as plasma membrane oxidase, is considered to be the major intracellular source of ROS production [19]. Although appropriate levels of ROS play an important role in several physiological processes, oxidative damage initiated by excessive ROS causes many pathological conditions including inflammation, atherosclerosis, aging, and cancer. Neuronal cells are especially vulnerable to oxidative stress, and numerous studies have examined the crucial roles of oxidative stress in neurodegenerative disorders such as stroke [17,18], Alzheimer's disease [20,21], and Parkinson's disease [22,23]. In these diseases, microglia, the macrophages of the central nervous system (CNS), are activated in response to a local inflammation [24] and generate large amounts of reactive oxygen and nitrogen species, thereby exposing nearby neurons to stress [18,25]. Thus, the influence of oxidative stress generated by neurodegenerative lesion on hADMPCs needs to be further studied.

In this study, we examined the role of oxidative stress on hADMPCs in neurite outgrowth in cells of the rat pheochromocytoma cell line (PC12). Upon treatment with buthionine sulfoximine (BSO), an inhibitor of the rate-limiting enzyme in the synthesis of glutathione, hADMPCs accumulated ROS, which resulted in the upregulation of expression levels of the neurotrophic factors BMP2 and FGF2. Our present data thus provide new insights into understanding the mechanism of how hADMPCs exposed to oxidative stress contribute to neurogenesis, and this may explain the effects of stem cell transplantation therapy with hADMPCs in treating ischemic stroke.

Results

hADMPCs exposed to oxidative stress stimulate neurite outgrowth in PC12 cells

hADMPCs were treated with 1 mM BSO for 24 h; a group of hADMPCs that were not given any treatment was used as the control group. As shown in Figure 1A and B, BSO treatment resulted in significant reduction of intracellular reduced glutathione levels, followed by accumulation of intracellular reactive oxygen species (ROS) in hADMPCs. To investigate whether accumulation of ROS affects secretion of cytokines from hADMPCs, conditioned medium from BSO-treated (CM-BSO (+)) or BSO-untreated (CM-BSO (-)) hADMPCs was added to PC12 cells. As expected, addition of NGF significantly induced neurite outgrowth in the PC12 cells (Figure 1E, G, H). hADMPCs, like other mesenchymal stem cells derived from bone marrow or adipose tissue, may secrete many cytokines including NGF, BDNF and FGF2, and this may account for the slight induction of neurite outgrowth seen in the CM-

BSO (-) treated cells (Figure 1D, G, H). In contrast, the number and length of neurite outgrowth of PC12 cells in CM-BSO (+) (Figure 1E) was markedly enhanced compared with those in CM-BSO (-) (Figure 1D, E, G, H).

Conditioned medium from BSO-treated hADMPCs activates Erk1/2 MAPK and Smad signaling in PC12 cells

To investigate which intracellular signaling pathways were involved in the neurite outgrowth of PC12 cells in CM-BSO (+), we used western blotting to determine the phosphorylation levels of Erk1/2 MAPK, p38 MAPK, Smad1/5/8 and Akt in PC12 cells in various culture conditions. NGF significantly activated Erk1/2 MAPK and Akt signaling pathway (Figure 2). In contrast, Erk1/2 MAPK was not activated in PC12 cells exposed to CM-BSO (-), while an increase in phosphorylated Smad1/5/8 was observed. Interestingly, CM-BSO (+) treatment led to both a significant increase in Smad1/5/8 phosphorylation levels as well as activation of the Erk1/2 MAPK

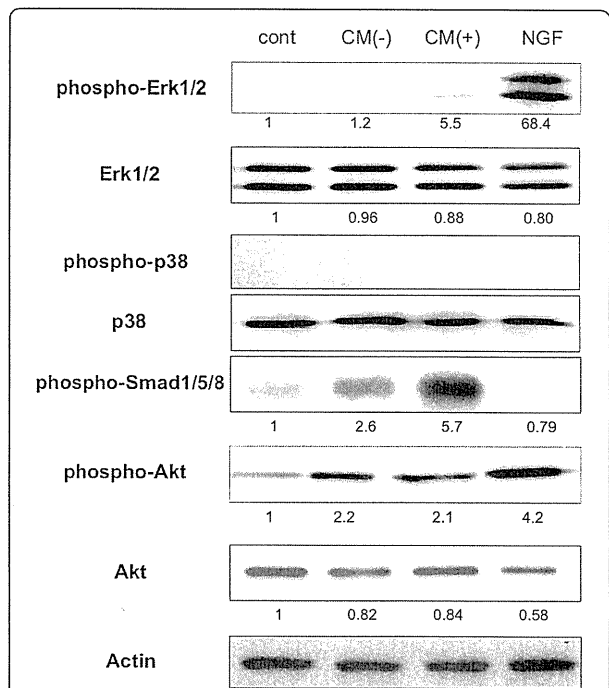


Figure 2 Erk1/2 MAPK and Smad1/5/8 are activated in PC12 cells cultured in conditioned medium from BSO-treated hADMPCs. Western blot analysis of PC12 cells cultured in differentiation medium alone (cont), CM-BSO (-), CM-BSO (+), or differentiation medium with NGF (50 ng/mL) for 1 h. Proteins extracted from each cell culture were resolved by SDS-PAGE, transferred to a membrane, and probed with anti-phosphorylated Erk1/2 (phospho Erk1/2), anti-Erk1/2, anti-phosphorylated p38 (phospho p38), anti-p38, anti-phosphorylated Smad1/5/8 (phospho Smad1/5/8), anti-phosphorylated Akt (phospho Akt) and anti-Akt. Actin was analyzed as an internal control. Numbers below blots indicate relative band intensities as determined by the ImageJ software.