

細胞ソースとしてはヒト体細胞に加え、近年ではヒト体性幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）などの幹細胞が対象とされてきている。また最近、生命倫理的問題や免疫学的な拒絶をクリアできると考えられる人工多能性幹細胞（iPS細胞）が登場し、再生医療が社会的に大きな期待を集めている。しかしながら細胞・組織加工製品は、臨床使用経験が少ないために知見の蓄積も乏しく、国内指針やICH、WHOなどの生物製剤製造国際ガイドライン等にある従来の品質・安全性評価法が役立たないケースが頻出しており、新たに適切な評価技術を樹立することが火急の課題となっている。本研究では、新たなガイドライン作成に資する細胞・組織加工製品、特に幹細胞加工製品の品質・安全性評価法の開発を行うことを最終目的とする。具体的には、幹細胞の加工過程における未分化細胞／異常細胞の混入は、幹細胞加工製品においてがん化を引き起こすとして最も懸念される。最終製品に含まれるこれらの細胞の高感度かつ定量的な測定方法は開発が遅れている。そこで、本研究では汎用性・定量性のある幹細胞加工製品の造腫瘍性試験法の開発を目指した実験研究を展開する。また細胞の培養・加工過程での細胞の形質安定性も考慮に入れる必要があることから、培養工程での遺伝子発現の動態解析による品質評価法および遺伝子安定性評価法の開発に関する研究を行う。さらに安全性上の懸念として、ヒト多能性幹細胞株間での各種目的細胞への分化のし易さ（分化プロベンシティ）のバラツキがある。原材料の細胞の分化プロベンシティの情報は細胞株の選択に必要不可欠であり、その評価系は最終製品を見据えた細胞バンクの構築に必要である。未分化細胞において分化プロベンシティの評価系を含んだ細胞特性解析法を確立することにより、幹細胞由来加工製品の品質の一定性・有効性・安全性のさらなる確保に繋がることが期待される。

行政への貢献

本研究の成果により幹細胞加工製品の有効性・安全性に関する品質評価に必要な指標・試験法が示され、製品の迅速かつ経済的な開発を推進することが可能になることにより、特に治療困難な重篤な疾患に対して期待の大きい再生医療・細胞治療が実用化され普及することに貢献できる。国民に安全かつ有用性の高い再生医療・細胞治療をいち早く提供するという厚生労働行政の施策に大きく寄与するものと考えられる。具体的には、以下のことが挙げられる。1) 幹細胞加工製品の合理的な製法、工程管理に必要な要件、品質評価方法の確立に貢献できる。2) 均一性・再現性を確保するための原材料（幹細胞株／バンク）のあり方において、より合理的な規格の設定が可能となり、適切な開発が推進される。3) 生命

科学の進歩に見合ったガイドラインや基準の策定及び改訂に役に立つ。4) 幹細胞加工製品の科学的規制に関する国際調和に貢献できる。5) 幹細胞加工製品の先進性、有用性に関する理解が深められる。

研究の進捗状況

平成24年度の研究としては、1. 「汎用性・定量性のある幹細胞加工製品の造腫瘍性試験法の開発を目指した実験研究」として、新規免疫不全動物NOGヘアレスマウスを用いた造腫瘍性試験法の開発にむけた動物コロニーの拡大、および試験方法の条件検討を行った。2. 「培養工程での遺伝子発現の動態解析に基づく品質・安全性評価指標の開発に関する研究」として、幹細胞の*in vitro*培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発を行い、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞のがん化と相関すると予想される遺伝子に関する機能解析を行った。3. 「製造工程における遺伝子安定性評価法の開発に関する研究」として次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析の性能評価を行った。また、4. 「幹細胞（未分化細胞）における分化プロベンシティの評価系の開発に関する研究」として、ヒト多能性幹細胞の分化プロベンシティを予測するための指標の同定の基盤となるデータの収集を行った。

1. 新規免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験法の開発

我々は、重度免疫不全動物であるNOGマウスとヌードマウスにおけるHeLa細胞単独、あるいはマトリゲルとの混合物のTPD₅₀（投与した動物の半数で腫瘍を形成するために必要な細胞数）を検討し、マトリゲルに検体細胞を懸濁してNOGマウスに投与することにより、ヌードマウスを用いた従来の国際ガイドラインにある方法より数千倍高感度で腫瘍細胞を検出することが可能であることを示すデータを得ている。実験動物中央研究所では、このNOGマウスをヘアレス化した系統を樹立しており、NOGマウスと同様の条件において造腫瘍性細胞の検出能力の検討を行った（その際の動物は、体外受精させた胚を仮親に移植して大量生産する手法を用いて作出した80匹以上の同一週齢雄動物を用いた）。雄NOGヘアレスマウスにおけるHeLa細胞のTPD₅₀は、ヌードマウスの1/11 ($3.7 \times 10^4 / 4.2 \times 10^5$)、マトリゲルを混合した場合は1/2000 ($2.1 \times 10^2 / 4.2 \times 10^5$)であり、NOGマウスにおけるそれらよりも高値であった。これは、導入したヘアレス遺伝子がBalb/cマウス由来であり、免疫不全度が僅かながら低下したことによると推測された。NOGヘアレスマウスはNOGマウスと比較し、目視・触診による腫瘍形成の検出が容易であり、造腫瘍性試験の効率化が期待される。

2. 幹細胞の*in vitro*培養工程における遺伝子発現の動態解析による品質評価技術の開発

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の*in vitro*培養時の遺伝子発現変化を網羅的に解析し、Ewing肉腫4種類 (Hs822.T, Hs863.T, RD-ES, SK-ES-1) を陽性対照として比較検討することにより、細胞のがん化の指標となり得る候補遺伝子として、これまでにCyclin D2, IGF2BP1など9遺伝子を見出している。そこで平成24年度は、hMSCへのCyclin D2, IGF2BP1の過剰発現によるhMSCの増殖能、老化及び染色体数等への影響について検討し、さらにhMSCの遺伝子発現パターンの変化について網羅的に解析した。その結果、Cyclin D2の強制発現によってhMSCの増殖が亢進され、遺伝子発現の網羅的解析により細胞増殖などに関わる遺伝子発現の有意な変化が認められた。Cyclin D2はhMSCでは細胞増殖に正に関与し、さらに細胞老化を遅らせることによって増殖の亢進に寄与した可能性も示された。遺伝子発現の網羅的解析でhMSCと発現パターンが似ていたHs822.T及びHs863.Tはほぼ正常な染色体数だったのに対し、RD-ES及びSK-ES-1はどちらも染色体数が大きく変化し、hMSCの遺伝子発現パターンとの類似性と同等の傾向が見られた。

3. 次世代シーケンサーを用いた細胞の遺伝的安定性評価指標の開発

細胞の遺伝的安定性評価を目的としたホールゲノムシ

ークエンスおよびエクソンシーケンスから得られるデータの品質評価および遺伝子変異検出の効率に関して、モデル細胞を用いた実データから検討を行った。その結果、点突然変異および小さな増幅、欠失変異に対する検出率および正確性の高さが確認できた。一方、大きな欠失、増幅ならびに転座などの複雑なリアレンジメントに関しては、通常の解析では検出が難しいことがわかり、これらに特化したデータ解析手法の検討が必要であることがわかった。

4. 分化プロペンシティを指標とした細胞特性解析法の開発

無フィーダー培養した未分化状態のヒトiPS細胞9株において網羅的なmRNA発現情報をジーンチップにより取得した。さらに細胞特性評価に用いる候補遺伝子の今後の絞り込みのため、iPS細胞株間で統計学的に有意に発現量の異なる遺伝子群を抽出した。ジーンチップデータを取得したヒトiPS細胞株から低吸着ディッシュ上で胚葉体を形成させRNAの抽出の後に、三胚葉マーカー遺伝子発現を定量的RT-PCRで測定し、各々の細胞株の分化プロペンシティを主成分分析により数値化した。その結果、第1主成分得点は中胚葉分化の正の指標および初期外胚葉分化の負の指標となることが示された。

研究の将来展望

これらの成果を更に展開することにより細胞・組織加

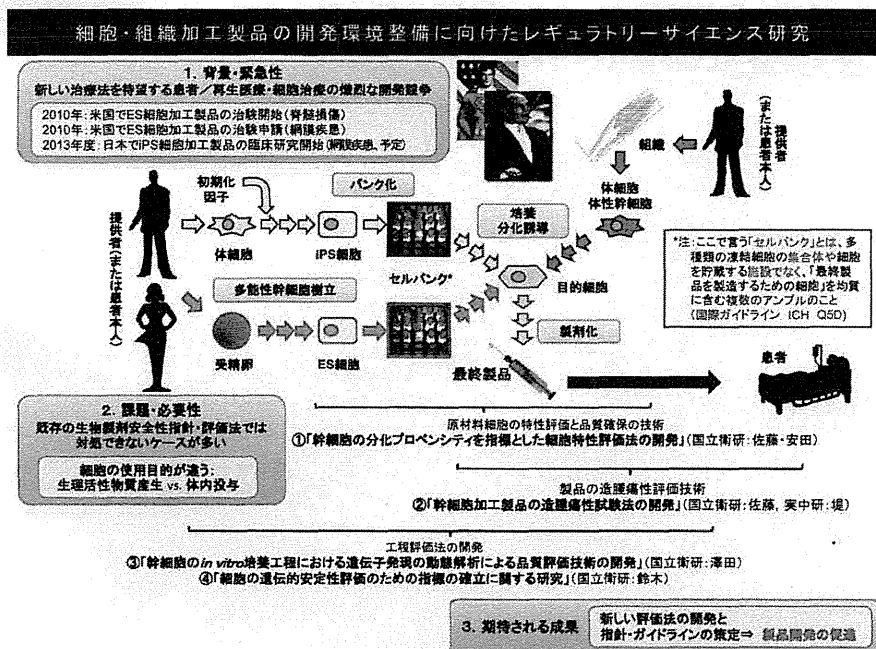


図 研究の背景・緊急性、課題・必要性および期待される成果

工製品の有効性・安全性に関する品質評価に必要な指標・評価法が示され、迅速で適切な製品開発・審査および再生医療の実用化推進に貢献できると考えられる。

謝辞：本研究の成果は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究」（H24-医薬-指定-027）によるものである。

本研究は、再生医療の実用化に向けた課題の解決を図ることを目的として、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究を実施した。本研究では、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究の重要性を認識し、その実現に向けた取り組みを進めた。本研究の成果は、再生医療の実用化に向けた課題の解決に貢献するものと考えられる。本研究は、再生医療の実用化に向けた課題の解決を図ることを目的として、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究を実施した。本研究では、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究の重要性を認識し、その実現に向けた取り組みを進めた。本研究の成果は、再生医療の実用化に向けた課題の解決に貢献するものと考えられる。

本研究は、再生医療の実用化に向けた課題の解決を図ることを目的として、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究を実施した。本研究では、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究の重要性を認識し、その実現に向けた取り組みを進めた。本研究の成果は、再生医療の実用化に向けた課題の解決に貢献するものと考えられる。

本研究は、再生医療の実用化に向けた課題の解決を図ることを目的として、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究を実施した。本研究では、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究の重要性を認識し、その実現に向けた取り組みを進めた。本研究の成果は、再生医療の実用化に向けた課題の解決に貢献するものと考えられる。

本研究は、再生医療の実用化に向けた課題の解決を図ることを目的として、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究を実施した。本研究では、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究の重要性を認識し、その実現に向けた取り組みを進めた。本研究の成果は、再生医療の実用化に向けた課題の解決に貢献するものと考えられる。

本研究は、再生医療の実用化に向けた課題の解決を図ることを目的として、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究を実施した。本研究では、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究の重要性を認識し、その実現に向けた取り組みを進めた。本研究の成果は、再生医療の実用化に向けた課題の解決に貢献するものと考えられる。

本研究は、再生医療の実用化に向けた課題の解決を図ることを目的として、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究を実施した。本研究では、細胞・組織加工製品の開発環境整備に向けたレギュラトリーサイエンス研究の重要性を認識し、その実現に向けた取り組みを進めた。本研究の成果は、再生医療の実用化に向けた課題の解決に貢献するものと考えられる。

タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化に向けて

斎藤嘉朗[#], 前川京子, 齊藤公亮, 佐藤陽治, 鈴木孝昌

Toward acceleration of drug development with proteomic and metabolomic biomarkers

Yoshiro Saito[#], Keiko Maekawa, Kosuke Saito, Yoji Sato, Takayoshi Suzuki

Biomarkers, reflecting disease states or predicting/assessing drug efficacy or adverse reactions, are expected to play pivotal roles in effective drug development and promoting proper usage of drugs. To accelerate biomarker identification and usage, administrative guidance can direct to design appropriate exploration, validation and utilization studies and show examination procedures. However, very limited number of guidance or its draft were released from Japanese, US and European regulatory authorities so far. From 2012, we have been conducting proteomic and metabolomic studies using blood and urine samples from human and rat, in order to establish draft guidance for sampling/storage of these biofluid and for extrapolation of biomarker candidates from animals in the non-clinical to humans in the clinical studies. The results are still partial and the rest of the analysis is ongoing. However, we developed sensitive proteomic system for urine and found large inter-sex differences in the proteomic profiles of rat. In addition, matrix-, sex- and generation-differences were also observed in the metabolite levels in human blood, some of which showed over 2-fold differences. We continue this regulatory science studies for contribution to accelerated novel biomarker findings and its usage by generation of the draft guidance.

Keywords: Biomarker, Biofluid, Drug development, Metabolomics, Proteomics

はじめに、バイオマーカーは、「客観的に測定され、評価される特性値であり、正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、または治療の処置に対する薬理学的反応の指標」と米国のバイオマーカー定義ワーキンググループにて定義されている¹⁾。臨床的な最終評価指標を、早期に、簡便に、かつ頑健に反映するサロゲート（代替え）マーカーとしての利用が医薬品開発において始まっている。疾患の状態や医薬品の有効性確保および安全性向上のための指標となり、医薬品開発が効率化されるため、バイオマーカーを利用した世界の臨床試験年間登録数は急増している²⁾。さらに医薬品の市販後においても、各患者における有効性を最大限に確保し、副作用を最小限に抑え

るために、その利用が期待されている。重篤な副作用は死亡や重い後遺症につながることもあり、バイオマーカーの診断費用を含めても医療経済学的に有用との研究結果もある³⁾。

バイオマーカー自体は、新しい概念ではなく、例えば肝障害におけるアラニンアミノトランフェラーゼ (ALT) や腎障害におけるクレアチニンなど、古くから用いられているものも多い。しかし臓器障害がある程度重篤になってからしか上昇が見られない、または臓器特異性が低いなど、問題が多いマーカーも使われており、臨床現場では問題となっている。そのため、より早期に軽症の段階で検出しうる新規バイオマーカーの探索が活発に行われている。

バイオマーカーとしては、遺伝子多型やmRNAレベル等のゲノムバイオマーカーに関する検討が多くなされており、近年ではマイクロRNAも注目されている。しかし、遺伝子多型に関しては、ヒトに固有であり、一部の代謝酵素を除いて非臨床試験段階で検討することは難しく、臨床試験段階で初めて十分なデータが得られる

[#] To whom correspondence should be addressed: Yoshiro Saito; Division of Medicinal Safety Science, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-9528; Fax: +81-3-3700-9788; E-mail: yoshiro@nihs.go.jp

ため、医薬品開発の初期から利用することは難しい。一方で、血液や尿などの体液に含まれるタンパク質⁴⁾や内在性代謝物⁵⁾は、種差が報告されている分子が一部存在するものの、非臨床で用いられる動物から、臨床におけるヒトへの外挿は、多くの場合、理論的に可能と考えられる。

1. バイオマーカーとしての要件

医薬品開発において有用なバイオマーカーは、

- 1) 種差なく共通して変化し、非臨床から臨床への外挿が可能、
- 2) 疾病や医薬品の有効性および安全性と、その早期段階から感度・特異度高く相関、
- 3) 食事や運動等の環境要因を含め、目的とする要因以外による影響を受けにくい、

ものと考えられる。さらにバイオマーカーを適切に評価するためには、正確度および精度高く測定することが必要であり、これには

- 4) 生体試料を測定する機器や方法（バイオアナリシス）の要件
- 5) 測定する試料の品質に関する要件

も重要となる。しかしバイオマーカーの利用はまだ緒に就いたばかりであり、各製薬会社がその利用方法を模索している状態である。

2. 行政的な動向

各国の規制当局である日本の厚生労働省/医薬品医療機器総合機構、米国・食品医薬品庁（FDA）、欧州・医薬品庁（EMA）もバイオマーカーについては注目しており、その積極的な利用を促進するため、いくつかのガイダンス等が公開されている。しかし、そのほとんどはゲノムバイオマーカーを対象にしており、タンパク質や内在性代謝物は対象外となっているものが多い。また、手続きに関する記載が多く、評価要件など技術的なものは少ない。

ゲノムバイオマーカーに関しては、その定義を「正常な生物学的過程、発病過程、及び/または治療的介入等への反応を示す指標となる、DNAもしくはRNAの測定可能な特性」としたゲノム薬理学における用語集について（ICH E15）⁶⁾を始め、ゲノムデータの申請方法（FDA）⁷⁾、バイオマーカーと診断法の同時開発（EMA）⁸⁾、臨床試験の研究デザインやデータ解析方法（EMA, FDA）^{9, 10)}、薬物動態解析におけるゲノムバイオマーカー利用のスキーム（EMA）¹¹⁾、医薬品の製造販売後監視におけるゲノムバイオマーカー利用の課題（EMA）¹²⁾、試料採取や保管・測定法・データ処理（EMA, FDA）^{13, 14)}に関するガイダンス（または案、コンセプトペーパーやリフレク

ションペーパーを含む）が公開されている。

一方、タンパク質や内在性代謝物に関してのガイダンスは、ほとんど無い。適格性確認のための資料における用法の記載要領、構成及び様式を定めた「医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発におけるバイオマーカー（ICH E16）」¹⁵⁾はゲノム以外のバイオマーカーを明示的には適用範囲としていないが、この文書に記載される原則は、タンパク質等の他のバイオマーカーについても適用可能としている。これ以外には、組織学的知見を陽性対照としたFDAの概要的ガイダンス案¹⁶⁾しかなく、実データを反映した明確な評価要件がないため、その探索・検証・利用は個別に模索している状態である。

このようにバイオマーカーの有用性を担保するための評価要件が確立していない状況では、不適切な試料の利用や不的確なバイオマーカーの利用により、かえって医薬品開発の遅延や混乱を招く可能性がある。今後は、ゲノム同様、タンパク質や内在性代謝物に関しても、測定試料の品質要件を始めとする多くのガイダンスを策定する必要がある。しかし、その策定の基礎となるデータは非常に乏しいのが現状である。

3. 体液中のタンパク質および内在性代謝物をバイオマーカーとする場合の、ガイダンス案策定に向けて

3-1. 研究班の目的、構成と期待される成果

平成24年度より厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の確立研究（研究代表者：斎藤嘉朗、研究分担者：熊谷雄治（北里大学）、鈴木孝昌、前川京子）」が開始された。本研究は、血液・尿中のタンパク質および内在性代謝物バイオマーカーの医薬品開発における利用を促進するための評価要件案作成の一環として、特に問題となる測定用試料の採取条件、および非臨床動物で見出されたバイオマーカーのヒトへの外挿性に関する評価要件案の作成を最終目標として、1) バイオマーカーの開発動向調査、2) 測定用血液・尿の採取等に関する要件の明確化、3) 動物モデルおよびヒト試料を用いた外挿性に関する実践的検討と、注意すべき評価要件の明確化、等を行うものである（図）。本研究の遂行により、血液・尿中のタンパク質および内在性代謝物バイオマーカーの測定用試料採取、および非臨床試験から臨床試験への外挿に関する評価要件案が作成され、ガイダンス等として発出されると、本邦におけるバイオマーカーの開発および利用推進につながり、医薬品開発を効率化して新薬創出の増加に結びつくと期待される。またこれら試料採取に関する要件案および非臨床から臨床への外挿に関する評価要件案は、世界的にも例がなく、国際的にも

血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する 評価要件の確立研究

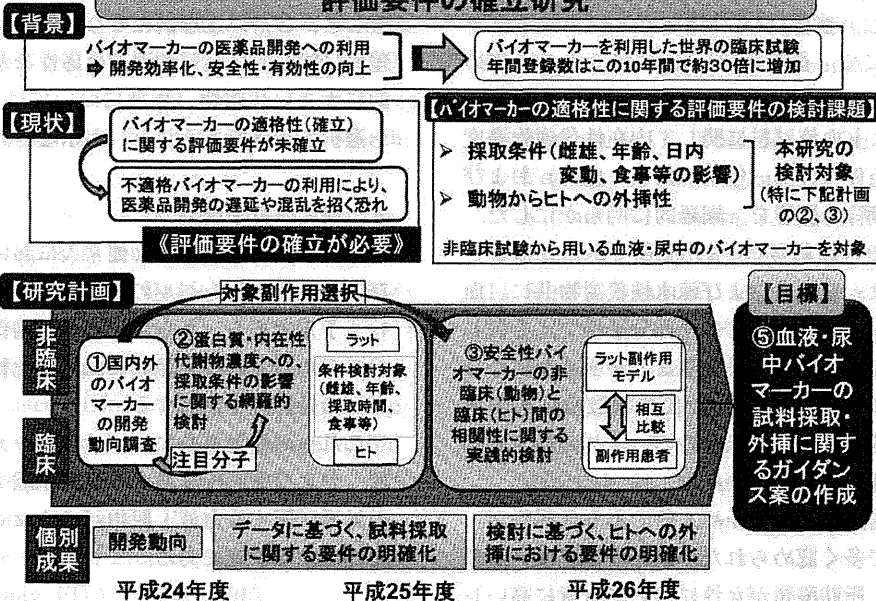


図 研究の背景、目的と計画

貢献できる研究である。

3-2. 研究の進捗状況

現在、三年計画の一年目が終了した段階であるが、下記の成果を挙げている。

3-2-1. バイオマーカーの開発動向調査

開発動向としては、腎障害マーカーとして尿中Kim-1等の新規バイオマーカーが有用であることが報告されている¹⁷⁾。さらにタンパク質マーカーとしては、抗がん剤ゲムシタビンによる重篤な血液毒性(好中球減少および血小板減少)の発症と血中のハプトグロビンのレベルが有意に相関すること¹⁸⁾、血清中のアポリポ蛋白タンパク質Eのレベルが89%の正確性で薬物性肝障害患者と健常人を区別しうること¹⁹⁾等が報告されている。代謝物マーカーとしては、薬物性肝障害に関して、血中ALT+γ-GT+グルタミルシトルリンのレベルがマーカーとなりうること²⁰⁾、急性腎障害患者の血清を対象とした研究でアシルカルニチンや数種のアミノ酸レベルの増加、リゾホスファチジルコリンの減少²¹⁾が報告されている。

3-2-2. プロテオミクス解析による尿中タンパク質に関する検討

ショットガンプロテオミクス法では、トリプシン消化後にタンパク質およびペプチド混合試料を、液体クロマトグラフ-質量分析計(LC-MS)で分析するが、尿中に

は高発現量のタンパク質があり、そのため微量のタンパク質は検出できない²²⁾。そこで、雄ラット尿を用いて、有機溶媒による簡便な高発現タンパク質の除去に関する前処理条件の検討を行った。収率は低くなるものの高発現のタンパク質を効率的に除去し、低濃度のタンパク質を中心に一回の分析で700種以上を同定しうる系を構築した。これを用いて、ラット尿中のプロテオーム解析を行った。雌雄間の比較では、予想されたように差が認められ、特に雌雄のいずれかのみで発現が認められるタンパク質が、同定タンパク質数の約1/3程度を占めた。食事影響については、比較的小さいものであった。従って、非臨床試験に用いるラットの尿を対象としたタンパク質バイオマーカーの探索と候補の選択に当たっては、性差を十分考慮に入れる必要があると示唆された。一方、食事影響については、重要でないと考えられた。

さらに平成25年度の解析としては、高齢群の一部の個体において、ばらつきの原因となる高発現量のタンパク質の存在が明らかとなり、注意が必要であることが示唆されている。

3-3. メタボロミクス解析による血中内在性代謝物に関する検討

内在性代謝物は親水性の高いもの(糖リン酸や核酸等)から低いもの(リン脂質やトリアシルグリセロール等)まで、その分子論的な性質は多様である。このため、現在の技術では一つの方法で全ての種類の内在性代謝物を

測定することは不可能であり、複数の方法を組み合わせる必要がある。本研究では、大きく親水性代謝物と疎水性代謝物に分類し、前者はLC/MSとガスクロマトグラフ質量分析計にて、後者はLC/MSにて、カラム等の条件を変えて測定を行った。

まず絶食後のヒト血液試料に関し、内在性代謝物濃度への採取・背景条件（性別、年齢、血漿・血清）および保管条件（凍結融解）の影響を、網羅的に明らかにした。測定可能であった代謝物数は、約550種である。血漿と血清間の比較では、親水性および疎水性代謝物共に、血液凝固に関係する代謝物群などの一部分子種で、そのレベルが血漿・血清間で大きく異なることが明らかになった。2倍以上のレベル差を示した代謝物数は、若年男性、老年男性、若年女性、老年女性のいずれの群でも30種程度で、親水性代謝物が多かった。

男女差に関しては、有意なレベル差のある代謝物が、老年よりも若年で多く認められた。若年ではアミノ酸類が男性において、脂肪酸類が女性において有意に高いレベルを示した。また年齢にかかわらず、女性でスフィンゴミエリンレベルが有意に高い傾向を示した。男女間で2倍以上の差があった代謝物は、若年血漿、老年血漿、若年血清、老年血清で、それぞれ数種であった。

年齢（30歳程度と60歳程度）に関しては、レベルに有意な差のある代謝物は、男性よりも女性で多く認められた。女性では、黄体ホルモン代謝物等が若年において、胆汁酸代謝物やトリアシルグリセロール等が老年において有意に高いレベルを示した。若年・老年間で2倍以上の差があった代謝物は、男性血漿、男性血清、女性血漿、女性血清で、それぞれ10種程度であった。

さらに若年男性の血漿と血清に関し、凍結融解回数（2回と10回）による相違について検討を行った。凍結融解を繰り返した場合、親水性代謝物では、血清と比べ血漿で大きなレベルの変化が認められる分子種が多かった。一方、疎水性代謝物では、血漿・血清ともに、ほぼすべてのリン脂質分子種等で、20-30%程度のレベル減少が認められた。

以上の結果、健常人というバックグラウンドレベルで、各条件につき2倍以上の差が認められた代謝物は、バイオマーカーの探索・診断の際に十分注意すべきであると考えられた。また、臨床におけるバイオマーカー診断に際しては、検体を選択することは不可能であり、検体間において普遍的なバイオマーカーが求められる。したがって、内在性代謝物をバイオマーカーとして測定する際には、1) 血液試料として、血漿・血清のいずれでも利用可能だが、親水性代謝物の場合は凍結融解の影響を考慮すると血清が望ましく、疎水性代謝物の場合は、血液凝固過程の影響を受けにくい血漿が望ましいこと、

2) 検出率が高く、試料背景間および各試料背景内における差異の小さい代謝物をバイオマーカーとして選択すること、3) 以上を満たせない場合には、これら背景的差异に対して、病気や薬剤反応性などによる差異が相対的に大きい代謝物（程度については、今後、検討予定）を選択すべきであること、が示唆された。

4. 研究の将来展望

今後は、健常ラットと健常人におけるタンパク質および内在性代謝物レベルの相違（外挿性）について検討を行う予定である。さらに、特定の副作用に関し、ラットのモデル系と副作用患者の試料を比較して、副作用マーカーの外挿性を検討する。

これらの知見を基に、バイオマーカーの測定用試料採取、および非臨床試験から臨床試験へのバイオマーカーの外挿に関する血液・尿中バイオマーカーの評価要件案を作成する予定である。

5. おわりに

総合科学技術会議は平成25年4月17日の会議で、「個別化医療の世界的研究開発競争における日本の出遅れ、および創薬力の低下」を指摘している。本邦におけるバイオマーカー探索・同定とその医薬品開発への応用の早期実現は、まさに待ったなしの状況である。本研究の遂行によるガイダンス案の作成は、バイオマーカー評価の一部ではあるが、国としての基準を示すものとなり、本邦におけるバイオマーカー開発とその利用を通じた医薬品開発の活性化につながると期待される。今後とも医薬品の品質、有効性および安全性を確保するための研究機関として、医薬品の開発と適正使用の推進に向けた適切な規制のための研究という社会的な役割を十分に果たしていきたい。

謝辞：本研究の成果は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の確立研究」（H24-医薬-指定-028）によるものである。

引用文献

- 1) Biomarkers Definitions Working Group.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89-95 (2001).
- 2) Phillips, K.A., Van Bebbber, S. and Issa, A.M.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 463-9 (2006).
- 3) Dong, D., Sung, C., Finkelstein, E.A.: *Neurology*. 79, 1259-67 (2012).
- 4) Feng, Z., Prentice, R. and Srivastava, S.: *Pharma-*

- cogenomics*. 5, 709-19 (2004).
- 5) Kell, D.B.: *Expert Rev. Mol. Diagn.* 7, 329-33 (2007).
 - 6) ゲノム薬理学における用語集. 薬食審査発第0109013号, 薬食安発第0109002号, 平成20年1月9日
 - 7) Pharmacogenomic Data Submission. FDA, March 2005.
 - 8) Reflection paper on co-development of pharmacogenomic biomarkers and Assays in the context of drug development (Draft). EMA/CHMP/641298/2008, 24 June 2010.
 - 9) Reflection paper on methodological issues associated with pharmacogenomic biomarkers in relation to clinical development and patient selection (Draft). EMA/446337/2011, 9 June 2011.
 - 10) Clinical Pharmacogenomics: Premarket Evaluation in Early-Phase Clinical Studies and Recommendations for Labeling. FDA, January 2013.
 - 11) Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/37646/2009, 12 December 2011.
 - 12) Concept paper on key aspects for the use of pharmacogenomic methodologies in the pharmacovigilance evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/917570/2011, 15 December 2011.
 - 13) Reflection paper on pharmacogenomic samples, testing and data handling. EMEA/CHMP/PGx-WP/201914/2006, 15 November 2007.
 - 14) Pharmacogenomic Data Submission-Companion Guidance (Draft). FDA, August 2007.
 - 15) 医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発における バイオマーカー：適格性確認のための資料における用法の記載 要領, 資料の構成及び様式. 薬食審査発0120第1号, 薬食安発0120第1号, 平成23年1月20日.
 - 16) Use of histology in biomarker qualification studies (Draft). FDA, December 2011.
 - 17) Fuchs, T.C. and Hewitt, P.: *AAPS J.* 13, 615-31 (2011).
 - 18) Matsubara, J., Ono, M., Negishi, A., Ueno, H., Okusaka, T., Furuse, J., Furuta, K., Sugiyama, E., Saito, Y., Kaniwa, N., Sawada, J., Honda, K., Sakuma, T., Chiba, T., Saijo, N., Hirohashi, S. and Yamada, T.: *J. Clin. Oncol.* 27, 2261-8 (2009).
 - 19) Bell, L.N., Vuppalandhi, R., Watkins, P.B., Bonkovsky, H.L., Serrano, J., Fontana, R.J., Wang, M., Rochon, J., Chalasani, N.; US Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN) Research Group.: *Aliment Pharmacol. Ther.* 35, 600-12 (2012).
 - 20) Soga, T., Sugimoto, M., Honma, M., Mori, M., Igarashi, K., Kashikura, K., Ikeda, S., Hirayama, A., Yamamoto, T., Yoshida, H., Otsuka, M., Tsuji, S., Yatomi, Y., Sakuragawa, T., Watanabe, H., Nihei, K., Saito, T., Kawata, S., Suzuki, H., Tomita, M. and Suematsu, M.: *J Hepatol.* 55, 896-905 (2011).
 - 21) Sun, J., Shannon, M., Ando, Y., Schnackenberg, L.K., Khan, N.A., Portilla, D., Beger, R.D.: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 893-4, 107-113 (2012).
 - 22) Decramer, S., Gonzalez de Peredo, A., Breuil, B., Mischak, H., Monsarrat, B., Bascands, J.L. and Schanstra, J.P.: *Mol. Cell. Proteomics.* 7, 1850-62 (2008).

ヒト人工多能性幹細胞由来移植細胞の製造管理のための *in vitro* 造腫瘍性評価系の開発

佐藤 陽治

In Vitro Tumorigenicity Tests for Process Control of Health Care Products Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells

Yoji Sato

*Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences;
1-18-1 Kami-yoga, Setagaya-ku 158-8501, Japan.*

(Received August 30, 2013)

The goal of pharmaceutical sciences is to deliver effective and safe medicinal products to patients. To achieve this goal, we need to ensure the efficacy, safety and quality of the products. Currently, many attempts are made to utilize human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) in regenerative medicine/cell therapy. There are significant obstacles, however, preventing the clinical use of hiPSC-derived products. One of the most obvious safety issues is the presence of residual undifferentiated cells that have tumorigenic potential. Therefore, the assessment and control of the tumorigenicity of hiPSC-derived products is essential in order to prevent tumor development by residual pluripotent stem cells after implantation. We recently examined three *in vitro* assay methods to detect undifferentiated cells: soft agar colony formation assay, flow cytometry assay and quantitative real-time polymerase chain reaction assay (qRT-PCR). Although the soft agar colony formation assay was unable to detect hiPSCs, the flow cytometry assay using anti-TRA-1-60 antibody detected 0.1% undifferentiated hiPSCs that were spiked in primary retinal pigment epithelial (RPE) cells. Moreover, qRT-PCR with a specific probe and primers was found to detect a trace amount of *LIN28* mRNA, which is equivalent to that present in a mixture of a single hiPSC and 5.0×10^4 RPE cells. Our findings provide highly sensitive and quantitative *in vitro* assays essential for facilitating safety profiling of hiPSC-derived RPE cells for their clinical use.

Key words—induced pluripotent stem cell; regenerative medicine; tumorigenicity; safety; quality control

1. はじめに

近年、ヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ES細胞) やヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS細胞) といった多能性幹細胞に由来する分化細胞を移植することによる再生医療・細胞治療の開発が活発化している。ヒト iPS細胞を用いた再生医療に関連する科学技術の進歩は目覚ましく、平成19年に京都大学・山中伸弥博士らによる世界初のヒト iPS細胞樹立の報告があった後、早くも平成25年7月には、神戸の理化学研究所と先端医療センター病院による渗出性加齢黄斑変性症の治療を目的としたヒト自己 iPS細胞由来網

膜色素上皮細胞を用いた臨床研究計画が厚生労働大臣の了承を受け、疾患治療を目的とした世界初の iPS細胞由来移植細胞のヒトへの投与が平成26年夏にも行われる予定となっている。ヒト iPS細胞由来移植細胞の臨床応用に社会的な期待は非常に高く、平成25年4月には iPS細胞などを使った再生医療の実用化を目指した「再生医療推進法」が成立し、平成25年6月に閣議決定された「日本再興戦略」でも「iPS細胞等の再生医療の研究と実用化推進のための研究を集中的かつ継続的に推進する」と記されている。しかし、その実用化に必要な品質及び安全性を評価・確保するための基盤技術の整備はまだ十分とはいえないのが現状である。本稿では、ヒト iPS細胞由来移植細胞の品質・安全性の確保を目的とした試験法の概略と、われわれのこれまでの試験法開発の経験の一部を紹介する。

The author declares no conflict of interest.

国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

e-mail: yoji@nihs.go.jp

本総説は、日本薬学会第133年会シンポジウム S30-106 で発表した内容を中心に記述したものである。

2. ヒト iPS 細胞由来移植細胞の品質・安全性確保の上での課題

現在、ヒト iPS 細胞由来移植細胞のような「細胞・組織加工製品」（最近は「再生医療製品」ともいう）の国内実用化には、主に 2 つのルートがある。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、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成 22 年厚生労働省告示第 380 号）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・高度医療評価制度による医療、若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。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 good clinical practice（GCP）ガイドラインの準拠が義務ではなく、得られたデータを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。また臨床研究と自由診療全般において言えることであるが、医療費が高額になりやすいことに加えて、長期フォローアップが困難であり、有効性のネガティブデータも公開され難い傾向があるという問題点があり、安全性・有効性情報が蓄積されないことが指摘されている。

いずれのルートをとるにせよ、ヒト iPS 細胞由来移植細胞の製造の流れは、大まかに、原材料となる体細胞の採取、体細胞の培養、iPS 細胞株の樹立、目的とする機能細胞への誘導、製剤化ということになる。こうした製造工程の中での品質・安全性上の主要な課題としては例えば、「体細胞やその他の原材料のウイルス等による汚染の有無の評価」、
「体細胞やその他の原材料の品質特性評価」、
「樹立した iPS 細胞の品質特性の評価・管理」、
「分化誘導後の目的細胞の品質特性の評価・管理」、
「目的細胞投与後の免疫応答対策」といったものが挙げられるが、中でも、ヒト iPS 細胞由来移植細胞に懸念されている課題は、「細胞の造腫瘍性の評価・管理」である。

3. ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の造腫瘍性の評価

「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又は良性の腫瘍を形成する能力を言う。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・外胚葉系の様々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。つまり、ヒト ES/iPS 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 ES/iPS 細胞を加工して製造される医薬品・医療機器（平成 25 年 5 月衆議院提出の薬事法改正案では「再生医療等製品」の一種となる）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が惹起されるリスクがあり、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。このことは、可能な限り最終製品で用いられる目的細胞を純化し、残存する未分化な ES/iPS 細胞を除去する工夫が必要であることを意味し、実際、その取り組みに関する報告はこれまでに多く存在する。¹⁻⁶⁾

注意しなければならないことは、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の実用化・品質評価においては、こうした取り組みと同時に、未分化の ES/iPS 細胞の混入・残留量を高感度で確認する方法や、最終製品に混入・残留した未分化の ES/iPS 細胞等の造腫瘍性細胞に起因する安全性上の問題の評価方法が必要だということである。しかしながら、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞に関する造腫瘍性評価方法の開発とその体系化・標準化は、ES/iPS 細胞から特定の細胞種への効率的な分化誘導法の開発や、残存 ES/iPS 細胞の除去方法の開発などに比べて著しく立ち遅れており、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞を用いた再生医療・細胞治療の実現における最大の隘路と



佐藤陽治

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・部長、博士（薬学）。1995 年に東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了後、米国シンシナティ大学医学部・ポスドク。'98 年に国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部・研究員として着任の後、遺伝子細胞医薬部・主任研究官、同・室長を経て、'12 年より現職。

して残されたままの状態にある。この問題の解決なしには、ほとんどの場合、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の実用化・産業化の達成はほぼ不可能である。

4. WHO の造腫瘍性試験ガイドライン

「造腫瘍性評価方法の開発とその体系化・標準化が立ち遅れている」と上で述べたが、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が1つだけ存在する。それは、世界保健機関（World Health Organization; 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」⁷⁾ というものである。WHO TRS 878 にある造腫瘍性試験の内容は、極めて大雑把に言えば、「ヌードマウス等の動物 10 匹に 10^7 個の細胞を投与して 16 週間観察し、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タンパク質製剤など、ヒトを対象に *in vivo* 又は *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又は動物由来の細胞株である。「患者に移植する細胞」及び「治療を目的に患者に移植する細胞株の原料となる細胞」は、WHO TRS 878 の対象外とされており、その特性解析においては規制当局等との議論が必要とされている。

WHO TRS 878 における造腫瘍性試験の目的は、生物薬品用細胞基材となる細胞株の均一なバンク（セル・バンク）の造腫瘍性の程度又は有無を正確に把握することにある。造腫瘍性の程度の大幅な変化又はその有無に変化が生じた場合、細胞特性になん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・発がん遺伝子活性化など、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 1 つとして評価し、品質管理に活用することが必要とされているわけであり、試験の目的が非常に限定されたものであることに注意しなければならない。

5. ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の造腫瘍性試験

ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の製造における造腫瘍性試験の目的は何か、ということについて、改めて考えてみたい。実は、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の製造における造腫瘍性試験には、目的別に以下の 3 種類があり得る。①原料の品質管理のための造腫瘍性試験、②製造工程管理のための造腫瘍性試験、③最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験、である。以下にこれら 3 種の造腫瘍性試験の特徴と方法について述べる。

5-1. 原料（細胞基材）の品質管理のための造腫瘍性試験 ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株は、文字通り、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の原料である。これらはヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞という生物製剤の一種を製造するための細胞基材である。したがって、これらにおける「造腫瘍性」とは、すなわち生物製剤の原材料（細胞基材）の品質特性の 1 つと捉えることができる。

ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の原料としてのヒト ES/iPS 細胞バンクの造腫瘍性における懸念事項は、WHO TRS 878 におけるセル・バンクの品質管理の考え方と同様に、「セル・バンクの造腫瘍性が既定の範囲内にあるか？」ということになる。ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の原料としてのヒト ES/iPS 細胞バンクの造腫瘍性の意味づけは WHO TRS 878 における細胞基材の造腫瘍性の意味づけとほぼ同じであることから、その評価方法についても、WHO TRS 878 の方法を準用することが可能であると考えられる。

5-2. 製造工程（中間製品）管理のための造腫瘍性試験 ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の中間製品となる細胞集団には、目的細胞ないしその前駆細胞に加え残存多能性幹細胞及びその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。中間製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」とは、製造工程管理のための指標としての意味合いがある。製造工程管理における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト ES/iPS 細胞が残存しているか」ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」という 2 点がある。

中間製品の中に「どのくらいヒト ES/iPS 細胞が残存しているか」ということに関しては、ES/iPS

細胞のマーカー遺伝子ないしマーカータンパク質を利用した方法により評価することが可能である。手技としては後述する定量 RT-PCR やフローサイトメトリーなどが挙げられる。これらの方法の詳細については後で述べる。

中間製品の中に「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということを評価するための方法としては、例えば細胞増殖特性の評価（不死化細胞の検出）や軟寒天コロニー形成試験（足場非依存性増殖細胞の検出、後述）が挙げられる。造腫瘍性形質転換細胞の検出に *in vivo* 造腫瘍性試験系を活用することも考えられるが、最終製品（ないし中間製品）の中に含まれるわずかな造腫瘍性細胞を検出する必要があるため、WHO TRS 878 の方法よりも十分に低い検出限界を備えている必要がある。検出限界の低い試験系としては、T 細胞、B 細胞及び NK 細胞を欠失した NOD/SCID/ γ Cnull (NOG) など、ヌードマウスよりも免疫力の低下した重度免疫不全マウス系統を利用することが考えられる。⁸⁻¹⁰⁾ ただし新規動物モデルを用いた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方法の検討と、その標準化が必要である。

5-3. 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験 ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の最終製品中の細胞集団、すなわち「投与細胞」には、目的細胞に加え、混入する前駆細胞や残存多能性幹細胞及びその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。また、最終製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」には、ヒトでの生着部位での腫瘍形成能を考察する材料であることが要求される。すなわち、最終製品における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト ES/iPS 細胞が残存しているか」ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに加え、「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」ということが挙げられる。最終製品の中に「どのくらいヒト ES/iPS 細胞が残存しているか」、「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに関しては、ES/iPS 細胞のマーカー遺伝子又はマーカータンパク質の検出、細胞増殖特性の評価、軟寒天コロニー形成試験などで評価できる可能性がある。

一方、「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を

形成するか」という懸念については、*in vivo* 造腫瘍性試験が必要となる。その場合に考慮すべき点としては、①試験系の検出限界、②投与細胞数、③投与部位などが挙げられる。投与部位については可能ならばヒトでの投与部位に相当する部位を選択すべきである。もしも、物理学的障害を生ずるなどの理由により当該部位に対する投与細胞数に限界がある場合には、可能であれば投与部位を変更するのではなく、動物とヒトとの間の当該投与部位の相対的スケール比に応じて投与細胞数を調節する。すなわち、生着する微小環境と投与細胞との相互作用による腫瘍形成の可能性を考察することを優先する。免疫特権、炎症、虚血など、特殊な投与環境における細胞の挙動は動物モデルにおける *in vivo* での評価でなければ、考察することが困難だからである。

6. 造腫瘍性関連 *in vitro* 試験—われわれの検討の結果—¹¹⁾

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* 試験系があるが、それぞれに長所と短所がある。この点についてわれわれが検討した結果を *in vivo* 試験法と併せて Table 1 にまとめた。なお、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については、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、最終製品の造腫瘍性を評価するというよりも、原材料の品質又は製造過程における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言える。

軟寒天コロニー形成試験は、がん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。この試験系では、細胞のクランプ残存や寒天中での凝集による足場依存的細胞増殖を防ぐためには単一細胞への分散が重要である。一方、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持つことが知られている。そこで、ヒト iPS 細胞が軟寒天培地中で増殖するかどうかについてわれわれが検討したところ、単一細胞に分散したヒト iPS 細胞は軟寒天培地中では増殖しないこと

Table 1. Comparison of the Tumorigenicity-associated Assays

Assay	Soft agar colony formation assay	Flow cytometry	qRT-PCR	<i>In vivo</i> tumorigenicity assay using SCID mice ¹²⁾
Measurement standard	Colony formation	Expression of marker protein for pluripotency	Expression of marker gene for pluripotency	Tumor formation
Purpose	Detection of anchorage independent growth	Detection of undifferentiated pluripotent cells	Detection of undifferentiated pluripotent cells	Detection of tumorigenic or undifferentiated pluripotent cells
Time	30 d	1 d	6 h	12–16 w
Advantage	Inexpensive	Rapid Analyzing individual cells	Rapid and simple Quantitative Highly sensitive	Direct Analyzing tumor formation in a specific microenvironment
Disadvantage	Indirect Not applicable to hiPSCs	Indirect Detecting only the cells that express the known marker molecules Gating techniques strongly influence the result	Indirect Detecting only the cells that express the known marker genes	Costly Time-consuming
LLOD	1% of PA-1	0.1% of hiPSC (TRA-1-60)	$\leq 0.002\%$ of hiPSC* (Lin28)	245 undifferentiated hESCs with 10 ⁶ feeder fibroblasts (0.025%)

* Not based on the calculation found in Ref. 13) because the background signal from the negative controls (primary RPE cells) was not detectable.

が明らかとなった。ヒト ES/iPS 細胞の分散誘導性アポトーシスを抑制されている ROCK 阻害剤 Y-27632 存在下で検討した場合も、軟寒天培地中での増殖は認められなかった。これらの結果から、軟寒天コロニー形成試験は未分化なヒト iPS 細胞の混入を検出する目的には適さないということが示唆された。

次に、試験系が機能していない可能性を否定するため、及び正常細胞中への悪性形質転換細胞の混入に関する検出限界を検討するために、軟寒天培地中でのヒト卵巣テラトカルシノーマ細胞 PA-1 のコロニー形成を評価したところ、播種した細胞数が多くなるに伴って検出された PA-1 細胞のコロニーの数も多くなっていた。一方、陰性コントロールとして初代培養ヒト網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium; RPE) 細胞を用い、ウェルあたり 1×10^4 個の細胞を播種したところ、30 日間の培養でもコロニーは認められなかった。次に今回の軟寒天コロニー形成試験系における PA-1 細胞の検出感度を評価した。正常細胞のモデルケースとして初代培養 RPE 細胞を用い、試験系の検出限界を求める目的で、これに 1%, 0.5%, 0.25% の割合で PA-1 細胞を添加するスパイク実験を実施した。その結果、1

% の割合で PA-1 細胞を添加することにより、20 日の間にコロニー形成が認められたが、0.5% ないし 0.25% の割合で PA-1 細胞を添加した場合は、コロニー形成が検出されるまでに 30 日を要した。ネガティブコントロール (初代培養 RPE 細胞のみ) と比較して計算した場合、軟寒天コロニー形成試験系を用いて正常細胞 (初代培養 RPE 細胞) 中に混入する PA-1 細胞を検出するには、混入率が RPE 細胞の数の 1% 以上必要であることが明らかとなった。

特定のマーカータンパク質を指標に未分化ヒト iPS 細胞を検出する系として、フローサイトメトリーがある。正常細胞のモデルケースとして初代培養 RPE 細胞を用いてわれわれが検討したところでは、未分化細胞マーカーとされる Oct3/4, Sox2 及び TRA-1-60 に対する特異的抗体によって、未分化 iPS 細胞と分化細胞とが峻別できることが確認された。特に、TRA-1-60 は未分化 iPS 細胞だけでなく、胚性がん細胞 (embryonal carcinoma) でも発現しているとされており、品質・安全性評価の上で有用と考えられる。初代培養 RPE 細胞に iPS 細胞をスパイクする実験により、正常細胞 (初代培養 RPE 細胞) に混入する未分化細胞の検出限界を検

討した結果、0.1%以上の混入量であれば有意な検出シグナルが得られることが明らかとなった。

定量性 RT-PCR は、特定のマーカー遺伝子発現を指標に未分化ヒト iPS 細胞を検出する高感度な系だと当然のように考えられるが、どのマーカーが最適であるか、そして検出感度はどのくらいか、ということに関する情報は意外なことにほとんどない。そこでわれわれは、未分化細胞に選択的に発現するとされる遺伝子として *OCT3/4*, *KLF4*, *C-MYC*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28*, *REXI* を選び、これらの中でどの遺伝子発現が未分化細胞の混入指標として最適か、最適な遺伝子を使用した場合の混入未分化細胞の検出限界はどのくらいかを、検討した。正常細胞のモデルケースとしては、軟寒天コロニー形成試験及びフローサイトメトリーのときと同様に初代培養 RPE 細胞を用いた。検討の結果、初代培養 RPE 細胞であっても、*C-MYC*, *KLF4* 及び *REXI* は、ヒト iPS 細胞での発現を 100%とした場合、数%-25%のレベルで発現していることが明らかとなった。基礎科学としての細胞生物学・分子生物学の視点に立てば、この程度の発現量の差でも「未分化細胞選択的発現」と言えるかもしれない。しかしながら、患者あたりの 1 回の投与量が 10^4 - 10^9 個とされる iPS 細胞由来移植細胞の中にわずかに残留する iPS 細胞の検出を行うには、この程度の選択性では全く不十分である。一方、*OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28* の初代培養 RPE における遺伝子発現量は、対 iPS 細胞比で 1/1000 未満であった。RPE 細胞に iPS 細胞をスパイクして検討した結果、*OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG* を指標にした iPS 細胞の検出限界はそれぞれ、0.01%, 0.06%, 0.07% であった。*LIN28* については、初代培養 RPE 中の発現が全く検出されなかったため、「ネガティブコントロールのシグナル値の平均値+標準偏差の 3 倍」という通常の方法により下方検出限界を求めることはできなかった。しかしながら、スパイク実験及びヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞を用いた検討から、0.002%程度の iPS 細胞が混入した際にも *LIN28* の有意な発現シグナルが観測されることが明らかとなっている。すなわち、*LIN28* を指標にすれば、約 5 万個 RPE 中に 1 個の割合で混入する未分化 iPS 細胞を検出できることになる。この方法は、われわれの知り得る限り、分化細胞中の残存ヒト iPS 細胞の検出方

法としては、学術論文として公表されている方法の中で最も感度が高く、平成 25 年 8 月から開始されている神戸の理化学研究所と先端医療センター病院の自己 iPS 細胞由来 RPE 細胞を用いた臨床研究計画の中でも品質管理試験として採用されるに至っている。現在われわれは、プローブや酵素などの反応条件及び測定方法の改良により、更なる感度の上昇を試みているところであり、将来的には、iPS 細胞由来 RPE 細胞だけでなく、より汎用性の高い iPS 細胞由来移植細胞の評価方法に発展することが期待される。

なお、不死化細胞を *in vitro* で検出する系としては、上に紹介した方法のほか、所定の培養期間を超えて細胞を培養し、その増殖特性を解析する試験がある。これらを組み合わせて未分化細胞及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等によって製品毎に判断されるべきだと考えられる。

7. おわりに

ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞のような細胞・組織加工製品（再生医療製品）を対象にした造腫瘍性試験ガイドラインはいまだに存在しない。したがって、現時点では、細胞・組織加工製品の中でも特に造腫瘍性に関して懸念の強い製品について、本稿で挙げたタイプの異なる試験を複数実施し、総合的に判断すべきであると考えられる。なお、個別の製品で示すべき具体的評価事項は、原材料や製品の特徴・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毎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、各試験法的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及びインフォームド・コンセントの受領を行うことが重要であると考えられる。

われわれが開発した定量性 RT-PCR の方法において iPS 細胞の混入の指標として用いられる *LIN28* は、幹細胞の自己複製能の維持に関与していると言われており、京都大学の山中伸弥博士のグループとヒト iPS 細胞の樹立で先陣争いをしていたウィスコンシン大学のジェームズ・トムソン博士のグルー

プがヒト体細胞から iPS 細胞を誘導する際に用いた初期化因子の 1 つとして有名な遺伝子である。また、細胞分化促進因子又はがん抑制因子として知られるマイクロ RNA の一種、let-7 のプロセッシングを阻害するとも言われている。¹⁴⁾ ヒト生殖細胞腫瘍では *LIN28* が過剰発現しているとの報告¹⁵⁾もあることから、*LIN28* はヒト iPS 細胞の未分化性のマーカーとしてだけでなく生殖細胞腫瘍の悪性度のマーカーとしても有用であることが示唆される。われわれの予備的な定量性 RT-PCR を用いた検討によれば、*LIN28* はヒト iPS 細胞においては高発現しているものの、生殖組織以外の多くのヒト組織において発現が全く認められていない。すなわち、分化細胞においては「極度に厳密な」発現制御が行われていることになる。しかしながら、その意義とメカニズムは全く明らかではない。これらを明らかにすることは、細胞の未分化性、多分化能、分化の制御機構という基礎研究の大きな課題に対して重要なインプットとなることが強く予想される。われわれの *in vitro* 評価法の開発目的は「薬学」としての iPS 細胞由来移植細胞の品質・安全性確保のためであったが、そうした視点からの技術開発研究（実用化研究）を続けることで、運よく、医薬品実用化の出口との関連を説明し易い、すなわち実用化の点からも基礎研究の対象としても重要と考えられる因子 (*LIN28*) を同定することができた。「薬学」の本質は安全で有効な医薬品を迅速に患者のもとに届ける方策を探ることである。したがって医薬品の実用化のための評価技術開発研究は「薬学」の要であって、非常に重要である。しかし、そうした視点のみならず、得られた成果の「生物学」的な意義づけを考え、それをきっかけに開始される基礎研究によって、新しい薬のシーズや標的分子の発見という新しいフロンティアに到達することができるかもしれないという希望を持つことも、「薬学」をエンジョイするには非常に重要な要素だと私は感じている。

謝辞 本総説で紹介した研究において終始多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました西川伸一先生 (AASJ)、川真田 伸先生 (先端医療振興財団)、高橋政代先生 (理研 CDB)、また多くのご協力を頂きました国立医薬品食品衛生研究所の皆様に謹んで感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Lee M. O., Moon S. H., Jeong H. C., Yi J. Y., Lee T. H., Shim S. H., Rhee Y. H., Lee S. H., Oh S. J., Lee M. Y., Han M. J., Cho Y. S., Chung H. M., Kim K. S., Cha H. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **110**, E3281–E3290 (2013).
- 2) Schuldiner M., Itskovitz-Eldor J., Benvenisty N., *Stem Cells*, **21**, 257–265 (2003).
- 3) Chung S., Shin B. S., Hedlund E., Pruszk J., Ferree A., Kang U. J., Isacson O., Kim K. S., *J. Neurochem.*, **97**, 1467–1480 (2006).
- 4) Tang C., Lee A. S., Volkmer J. P., Sahoo D., Nag D., Mosley A. R., Inlay M. A., Ardehali R., Chavez S. L., Pera R. R., Behr B., Wu J. C., Weissman I. L., Drukker M., *Nat. Biotechnol.*, **29**, 829–834 (2011).
- 5) Choo A. B., Tan H. L., Ang S. N., Fong W. J., Chin A., Lo J., Zheng L., Hentze H., Philp R. J., Oh S. K., Yap M., *Stem Cells*, **26**, 1454–1463 (2008).
- 6) Tohyama S., Hattori F., Sano M., Hishiki T., Nagahata Y., Matsuura T., Hashimoto H., Suzuki T., Yamashita H., Satoh Y., Egashira T., Seki T., Muraoka N., Yamakawa H., Ohgino Y., Tanaka T., Yoichi M., Yuasa S., Murata M., Suematsu M., Fukuda K., *Cell Stem Cell*, **12**, 127–137 (2013).
- 7) World Health Organization (WHO). “Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks, Proposed replacement of TRS 878, Annex 1.”: (http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf), cited 26 October, 2013.
- 8) Ito M., Hiramatsu H., Kobayashi K., Suzue K., Kawahata M., Hioki K., Ueyama Y., Koyanagi Y., Sugamura K., Tsuji K., Heike T., Nakahata T., *Blood*, **100**, 3175–3182 (2002).
- 9) Machida K., Suemizu H., Kawai K., Ishikawa T., Sawada R., Ohnishi Y., Tsuchiya T., *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 123–127 (2009).
- 10) Kanemura H., Go M. J., Nishishita N., Sakai N., Kamao H., Sato Y., Takahashi M.,

- Kawamata S., *Sci. Rep.*, **3**, 2334 (2013).
- 11) Kuroda T., Yasuda S., Kusakawa S., Hirata N., Kanda Y., Suzuki K., Takahashi M., Nishikawa S., Kawamata S., Sato Y., *PLoS One*, **7**, e37342 (2012).
- 12) Hentze H., Soong P. L., Wang S. T., Phillips B. W., Putti T. C., Dunn N. R., *Stem Cell Res.*, **2**, 198–210 (2009).
- 13) Miller J. N., Miller J. C., “Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry,” 5th ed., Person Education Limited, Harlow, 2005.
- 14) Nam Y., Chen C., Gregory R. I., Chou J. J., Sliz P., *Cell*, **147**, 1080–1091 (2011).
- 15) West J. A., Viswanathan S. R., Yabuuchi A., Cunniff K., Takeuchi A., Park I. H., Sero J. E., Zhu H., Perez-Atayde A., Frazier A. L., Surani M. A., Daley G. Q., *Nature*, **460**, 909–913 (2009).

特集 高齢者医療における再生医療の可能性

総説

2. 再生医療・細胞治療の臨床研究から実用化までの道のり

村岡ひとみ 佐藤 陽治

KEY WORD

■再生医療 ■臨床研究 ■先進医療 ■治験 ■薬事法

SUMMARY

■わが国では、再生医療など(再生医療または細胞治療)の実用化には、「臨床研究」を経て「先進医療」や「保険外診療」に向かうルートと、「再生医療等製品」の治験を経て薬事承認を受けるルートがあるが、国民のアクセシビリティや国際展開という面から考えると、前者のルートの真の出口も後者を経た保険診療だとされている。ただし、わが国における再生医療などの開発は、医薬品などの国際ガイドラインに沿った国内基準への準拠が義務ではない臨床研究からスタートすることが多く、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という問題を克服することが大きな課題となっている。

はじめに

超高齢化社会では、加齢に伴って引き起こされる種々の難治性疾患に対する医療の提供が課題であり、特に、失われた機能の回復への期待は大きい。近年のヒト胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)などの多能性幹細胞の登場によって、失われた組織の再生を目指す再生医療が現実のものとして考えられるようになってきたが、このような新しい概念をこれまでの医療や医薬品の規制の枠組みの中で実用化することは容易ではない。

再生医療・細胞治療の開発の道筋

わが国において、ヒトまたは動物の細胞に培養そのほかの加工を施したものをを用いた再生医療など(再生医療または細胞治療)を実用化するための道筋には、「医療としての開発トラック」

と「製品としての開発トラック」との2つがある。医師・歯科医師が自らの患者に「医療」を施すことを目的に、ヒトまたは動物の細胞に医師・歯科医師が自ら加工を施し、これを患者に投与することはこれまで、「医師法」「医療法」などの医事関連法規や「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」などの行政指針に従い、「臨床研究」およびその結果を踏まえた「先進医療」(保険診療との併用が認められる保険外診療)あるいは「保険外診療」として行われてきた。ちなみに、平成25年成立の「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(通称「再生医療新法」)施行後は、医師・歯科医師は細胞の加工を外部の「特定細胞加工物製造業者」に委託することが可能となる一方で、そのリスク区分に応じて、再生医療等提供計画を厚生労働大臣などに提出しなければならない。

一方、ヒトまたは動物の細胞に培養そのほかの加工を施し、再生医療などに用いられること

■むらおか ひとみ(国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部/さとう ようじ(国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部部長、名古屋市立大学大学院薬学研究科客員教授、大阪大学大学院薬学研究科招聘教授、九州大学大学院薬学研究科客員教授)

を目的とした製品(再生医療等製品)を開発するトラックでは、「薬事法」の規制を受け、薬事法に基づき、治験を行った上で品質、有効性および安全性を示し、厚生労働省の製造販売承認を受けなければならない。なお、平成25年改正の「薬事法」の施行に伴い、法律名が「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」(略称「医薬品医療機器等法」)に変更されるとともに、再生医療等製品(遺伝子治療用製品を含む)は、医薬品からも医療機器からも独立した第3の категорияとして分類される。再生医療等製品のうち、申請に関わる再生医療等製品が均一でない場合、治験により効能、効果または性能を有すると推定され、安全性の確認が行われたものは、条件および期限付製造販売承認を得ることができるようになるなど、特別な規制が適用される。

「製品としての開発トラック」では、薬事法に記され、かつ医薬品国際ガイドライン(ICHガイドライン)に沿った国内基準(例えば Good Laboratory Practice (GLP), Good Manufacturing Practice (GMP)/Quality Management System (QMS), Good Clinical Practice (GCP) など)に従う必要がある。すなわち、その必要がない「医療としての開発トラック」と比べ、費用も時間も余計にかかる。ただし、「医療」としての「臨床研究」は、研究費が尽きれば実施不可能になるという点で持続可能な医療ではないことが問題である。「先進医療」では実施可能な医療機関が限定されると同時に、製品の品質にばらつきが生じるおそれがあり、また「保険外診療」は、開発に多くの投資を要する新規製品を用いるために高額となりやすく、いずれの場合も多く国民が享受できないおそれがある。したがって、国民が広くアクセスできるようにするためには、治験を通じて薬事法上の承認を得て保険診療として実施されることが好ましい。

「先進医療」は、再生医療などの「医療としての開発トラック」における実用化の出口ととらえられることもあるが、実は「健康保険法等の一部を改正する法律」において「先進医療」は「厚生労働大臣が定める高度の医療技術を用い

た療養その他の療養であって、保険給付の対象とすべきものであるか否かについて、適正な医療の効率的な提供を図る観点から評価を行うことが必要な療養」とされており、真の出口とはされていない。同法律の示す真の実用化の出口はあくまで「保険診療」である。

なお、欧米では緊急時や治験などの例外を除き、ヒト・動物の細胞に培養そのほかの加工を施したものを臨床適用する場合には、「医療」か「製品」かの区別なく、ICHガイドラインに沿った薬事の基準に則って開発した上で、その有効性、安全性および品質について製品ごとに、規制当局の審査を受け承認を受けなければならない。したがって、日本国内で開発された再生医療などを国際的に展開することを考えた場合も、治験を通じて薬事法上の承認を得る方が好ましい。

再生医療の実用化の問題点と 医師主導治験

わが国における再生医療・細胞治療の開発は、大学など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。「医療としての開発トラック」における臨床研究は、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、ICHガイドラインに沿った国内基準への準拠が義務ではない。このため、再生医療などの実用化の最終的な出口が保険診療だということになると、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ことが問題である。

つまり、新規の再生医療・細胞治療に関して、臨床研究で有効性・安全性を確認してから産業化を目指して薬事承認を得ようとしても、多くの場合には、国際ガイドラインと整合性のある国内基準に則った治験をやり直さなければならない。また、臨床研究を行った結果を基に実施される先進医療も、前述の通り、法的には保険診療(と薬事承認)を最終的な出口としているが、出口に至るための具体的な道筋はどこにも示されていない。このため、保険診療という出口にたどり着くために乗り越えるべき技術的要件は

薬事法(および関連する基準・指針など)で明らかにされていても、臨床研究から始まった開発の場合、いかにすれば効率的にその要件を満たすことができるかという点が乗り越えられない壁となっている。

「医療」と「製品」の区別のない欧米では、「臨床研究」(医療・研究目的の臨床試験)と「治験」(商業目的の臨床試験)という区別はなく、すべての臨床試験は医薬品の国際ガイドラインに準じた各国の規制に従う必要がある。したがって、大学など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仕組みだといわれている。つまり、上記課題の解決の方法の1つとしては、大学病院や研究機関であっても、欧米のように最初から治験として開発するということが考えられる。わが国では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)。医師主導治験の積極的な実施は、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仕組み(実施医療機関の体制整備費、治験薬の製造、プロトコル作成、データ管理業務、治験相談などの費用を補助するなどの支援、研究費など)をさらに充実させる必要があることから、文部科学省・厚生労働省は「臨床研究・治験活性化5か年計画2012」などの中で、日本医師会治験促進センターや中核病院・拠点医療機関などと協力し、医師主導治験を含めたわが国の治験実施の環境整備に努めている。しかしわが国の現状としては、欧米のようにすべての臨床研究を医師主導治験に置換する環境にはなっていない。

「医療としての開発」と「製品としての開発」をつなぐ道

こうした状況下で、再生医療などの臨床研究

を効率的に保険診療へ結びつけて行くために必要なのは、臨床研究におけるデータと製品の質を、重要なポイントだけでも、できる限り治験グレードにそろえることだと考えられる。そのためには、臨床研究であっても治験であっても再生医療等製品のすべてに最低限必須・共通の要件や基準・評価技術を定め、これに各製品の種類・特性、対象疾患、開発段階などに応じた上乘せ方策を適用するというアプローチが有効だと考えられる。こうした最低限の要件などは「ミニマム・コンセンサス・パッケージ(MCP)」と呼ばれている¹⁾。再生医療などの開発においてMCPは、例えば臨床研究そのほかの「医療としての開発」と「製品としての開発」の切れ目のない移行を可能にする共通のプラットフォームともなると考えられ、その充実が重要と考えられる。

平成25年11月に「再生医療新法」と「医薬品医療機器等法」が成立したことに伴い、日本の再生医療などの開発環境は大きな転換期を迎えようとしている。平成26年2月現在、厚生労働省ではこれらの法律の施行に向けた政省令や基準・指針などの策定が進んでいるところである。こうした規制の中において、MCPの具体像の認識をすべてのステークホルダーで共有し、「再生医療新法」下の臨床研究であっても、少なくともそのMCPについては開発の早期から着実に踏まえることが可能となるような体制を整備し、柔軟に運用することが、今後、再生医療・細胞治療の臨床研究から真の実用化の出口としての保険診療に効率的に結びつけるためのカギになると筆者らは考えている。

文 献

- 1) 早川堯夫: ヒト幹細胞加工製品の品質及び安全性の確保について、厚生労働省 厚生科学審議会科学技術部会第18回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会(平成24年5月9日)。 <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000029kw0-att/2r9852000002a0tg.pdf> (平成26年2月15日アクセス)

TECHNOLOGY REPORT

Optimization of Slow Cooling Cryopreservation for Human Pluripotent Stem Cells

Takamichi Miyazaki,¹ Norio Nakatsuji,^{2,3} and Hirofumi Suemori^{1*}

¹Department of Embryonic Stem Cell Research, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8507, Japan

²Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University, Ushinomiya-cho, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

³Department of Development and Differentiation, Institution for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8507, Japan

Received 25 June 2013; Revised 25 October 2013; Accepted 8 November 2013

Summary: Human pluripotent stem cells (hPSCs) have the potential for unlimited expansion and differentiation into cell types of all three germ layers. Cryopreservation is a key process for successful application of hPSCs. However, the current conventional method leads to poor recovery of hPSCs after thawing. Here, we demonstrate a highly efficient recovery method for hPSC cryopreservation by slow freezing and single-cell dissociation. After confirming hPSC survivability after freeze-thawing, we found that hPSCs that were freeze-thawed as colonies showed markedly decreased survival, whereas freeze-thawed single hPSCs retained the majority of their viability. These observations indicated that hPSCs should be cryopreserved as single cells. Freeze-thawed single hPSCs efficiently adhered and survived in the absence of a ROCK inhibitor by optimization of the seeding density. The high recovery rate enabled conventional colony passaging for subculture within 3 days post-thawing. The improved method was also adapted to a xeno-free culture system. Moreover, the cell recovery postcryopreservation was highly supported by coating culture surfaces with human laminin-521 that promotes adhesion of dissociated single hPSCs. This simplified but highly efficient cryopreservation method allows easy handling of cells and bulk storage of high-quality hPSCs. *genesis* 52:49–55, 2014. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: ectoderm; tissue endoderm; tissue mesoderm; tissue other; tissue germ layer; process; early development; single cell dissociation; slow freezing

pluripotent stem cells (hiPSCs), have an infinite proliferative potential and capacity for differentiation into all cells of the three germ layers. For successful application of hPSCs in transplantation therapy or drug discovery, it is necessary to prepare large numbers of hPSCs with various genetic backgrounds (Serra *et al.*, 2012). There are several approaches to improve the yield of hPSCs, but cryopreservation is a key operation because it enables long-term preservation and easy transportation of cells. Currently, hPSCs are cryopreserved by vitrification or slow cooling (Heng *et al.*, 2005; Reubinoff *et al.*, 2001). Vitrification involves flash cooling directly in liquid nitrogen, and some studies have recovered 20–90% of undifferentiated hPSC colonies postcryopreservation (Li *et al.*, 2010; Suemori *et al.*, 2006). However, vitrification requires skilled manipulation and strict temperature control during storage and transportation, because of the small volumes of cryoprotectant used, making it impractical for large-scale storage of hPSCs. In contrast, conventional slow cooling controls the cooling rate at 1°C/min in freezing medium that

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*Correspondence to: Hirofumi Suemori, Department of Embryonic Stem Cell Research, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan. E-mail: hsuemori@frontier.kyoto-u.ac.jp

Contract grant sponsors: New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO), Japan; Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan

Published online 19 November 2013 in
Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI: 10.1002/dvg.22725

Human pluripotent stem cells (hPSCs), including human embryonic stem cells (hESCs) and human induced