

- 12) World Health Organization: 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 [2014.7.23]
- 13) Kuroda T, Yasuda S et al: Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. PLoS One 2012. 7. e37342.
- 14) Ito M, Hiramatsu H et al: NOD/SCID/gamma(c) (null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood 2002. 100. 3175-3182.
- 15) Shultz LD, Lyons BL et al: Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. J Immunol 2005. 174. 6477-6489.
- 16) Machida K, Suemizu H, et al: Higher susceptibility of NOG mice to xenotransplanted tumors. J Toxicol Sci 2009. 34. 123-127.
- 17) (独)医薬品医療機器総合機構科学委員会. 細胞組織加工製品専門部会：iPS細胞等をもとに製造される細胞組織加工製品の造腫瘍性に関する議論のまとめ. 2013.8.20.
<http://www.pmda.go.jp/guide/kagakuiinkai/kagakuiinkai/h250820gijishidai/file/torimatome1.pdf> [2014.7.23]
- 18) Amariglio N, Hirshberg A, et al: Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. PLoS Med 2009. 6. e1000029.
- 19) Garcia S, Bernad A et al: Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 2010. 316. 1648-1650.
- 20) Torsvik A, Røslund GV, et al: Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. Cancer Res 2010. 70. 6393-6396.
- 21) Wang Y, Huso DL, et al: Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. Cytotherapy 2005. 7. 509-19.
- 22) Tang DQ, Wang Q, et al: In vitro generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. Am J Stem Cells 2012. 1. 114-127.

薬事法改正と再生医療等安全性確保法を踏まえた 再生医療／細胞治療の開発

(Overview of the New Japanese Regulatory Framework for the
Development of Regenerative Medicine/Cellular Therapy)

中島 啓行 (公財) 先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター 研究員

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 協力研究員

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

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

Tel & Fax : 03-3700-9373 E-mail : yoji@nihs.go.jp

1 はじめに

IPS細胞等による再生医療は、従来の方法では治療困難な疾病・損傷に対するブレイクスルーとして期待を集めている。我が国では成長戦略の一つに再生医療を掲げ、迅速かつ安全に再生医療を国民に届けられるよう平成25年には再生医療に関連した法律の整備が急速に進んだ。本稿では、再生医療の実現に向けた新しい法的枠組みとそれを踏まえた再生医療／細胞治療(再生医療等)の開発について概説する。

2 わが国の再生医療開発の制度的枠組み

わが国には、ヒトまたは動物の細胞に加工(培養・活性化・足場材料との複合化など)を施したものをを用いた再生医療等を実用化するための道筋として、「製品としての開発」と「医療としての開発」との二つのトラックがある。「製品としての開発トラック」では、薬事関連の法規制に基づき、治験を行った上で品質、有効性及び安全性を示し、厚生労働省の製造販売承認を受ける必要がある。

「医療としての開発」とは、医師・歯科医師がヒトまたは動物に由来する細胞加工物を調製し、これを自らの患者に投与するという形での臨床応用を指す。こうした臨床応用は、従来、『医師法』『医療法』等の医事関連法

規や『ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針』等の行政指針に従い、「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。

「製品としての開発トラック」では、薬事関連法規に記され、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)に従う必要があるが、「医療としての開発トラック」にはその必要がない。すなわち、「製品としての開発トラック」は「医療としての開発トラック」と比べ、ハードルが高い。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、持続可能性の面的問題があり、「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恐れがある。また、「保険外診療」は高額となりやすく、いずれの場合も多くの国民にとって享受が困難なものになってしまう恐れがある。広く国民がアクセスできるようにするためには、治験を通じた薬事承認を得て保険診療として実施されることが好ましい。また、国内で開発された再生医療等を国際的に展開することを考えた場合も、国際的調和のとれた基準に従った薬事治験を通じて承認を得る方が好ましい。

3 再生医療関連法の成立

平成 25 年、我が国では再生医療に関する規制を大きく変化させる 3 つの法律、『再生医療推進法』、『医薬品医療機器等法』、および『再生医療等安全性確保法』が公布された（平成 26 年中に施行開始）。

『再生医療推進法』（正式名称『再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするための施策の総合的な推進に関する法律』）は、再生医療の実用化を促進するための基本理念や国の責務等を規定したもので、再生医療の実用化に向けて、研究開発や普及を促進する責務を国が有する事が明記されている。

『医薬品医療機器等法』（『薬機法』とも呼ばれる。正式名称『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』）は、『薬事法』の改正に伴って法律名が変更されたものである。同法では、従来対象とされてきた医薬品、医療機器に次いで再生医療等製品が第 3 のカテゴリーとして加えられた。再生医療等製品のうち、一定の要件を満たすものについては、条件及び期限付きで製造販売承認を得る事が出来るようになるなど、迅速な実用化に向けた特別な規制が適用される。また、『再生医療安全性確保法』（正式名称『再生医療等の安全性の確保等に関する法律』）は、医師・歯科医師による、加工した細胞を用いた医療行為を規制するものである。同法により、医師・歯科医師は細胞の加工を企業へ外部委託する事が可能となる一方、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等に提出しなければならなくなる。

3.1 『医薬品医療機器等法』

今般の薬事法改正に伴い、再生医療に関連した内容を含め、下記の 3 点について追加・修正が行われた。

- 医薬品、医療機器等に係る安全対策の強化
- 医療機器の特性を踏まえた規制の構築
- 再生医療等製品の特性を踏まえた規制の構築

本稿では特に、再生医療等製品に係わる「再生医療等製品の特性を踏まえた規制の構築」について述べる。

(1) 「再生医療等製品」の定義

医薬品医療機器等法では、「再生医療等製品」は以下のように定義されている。

- 一 次に掲げる医療又は獣医療に使用されることが目的とされる物のうち、人又は動物の細胞に培養その他の加工を施したもの
- イ 人又は動物の身体の構造又は機能の再建、修復又は形成
- ロ 人又は動物の疾病の治療又は予防
- 二 人又は動物の疾病の治療に使用されることが目的とされる物のうち、人又は動物の細胞に導入され、これらの体内で発現する遺伝子を含有させたもの

上記一と二は、それぞれ再生医療製品（細胞・組織加工製品）、遺伝子治療製品（遺伝子治療薬、遺伝子導入コンストラクト）と従来呼ばれてきた製品を指しており、これらを併せたものが再生医療等製品である。ちなみに、イとロはそれぞれ従来、組織工学製品、細胞治療薬と呼ばれてきた製品を指す。なお、人又は動物由来の細胞の投与を伴わない広義の再生医療を目的として使用される製品（細胞増殖分化因子、足場材料など）は、再生医療等製品の定義に含まれず、従来と同じ規制を受ける。

(2) 再生医療等製品の条件及び期限付き承認制度

再生医療等製品は、バイオテクノロジー・幹細胞学といった新しい技術要素が含まれると同時に、生きた細胞を含むため、品質に化合物のような均質性を求められないという特徴がある。新しい技術要素が含まれるということは、開発者にも規制当局にも評価経験が乏しいことを意味する。品質の不均質性と乏しい評価経験ゆえに、有効性を確認するためのデータの収集・評価には通常の医薬品よりも多くの時間を要すると推定される。このような再生医療等製品の特性を踏まえた上で、安全性を確保しつつ、迅速な実用化・普及（『再生医療推進法』）が図られるよう、本法律では次の条件のもと期限付きで早期に承認できる仕組みを導入している。即ち、

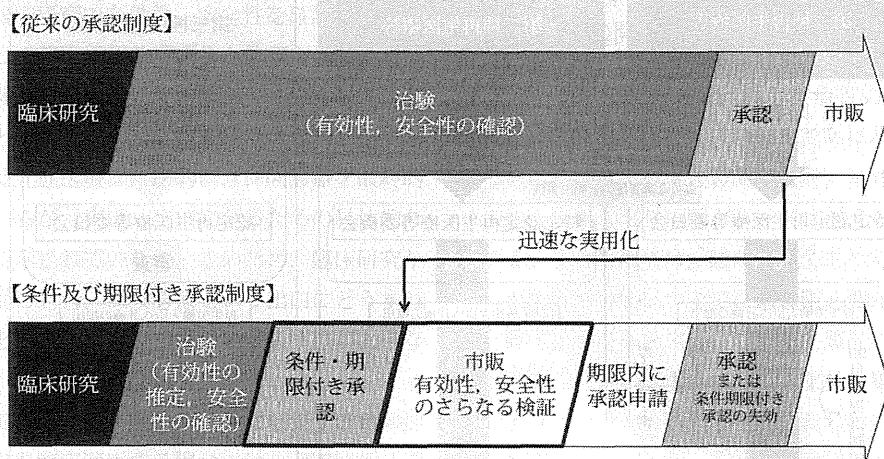


図1 再生医療等製品の早期実用化に対応した承認制度

- 再生医療等製品が均質でないこと
- 効能、効果又は性能を有するものと推定されるものであること
- 効能、効果又は性能に比して著しく有害な作用を有することにより再生医療等製品としての使用価値がないと推定されるものでないこと

の3要件を全て満たす場合、厚生労働大臣は厚生労働省に設置されている薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて、その適正な使用の確保に必要な条件及び7年を超えない範囲内の期限を付して製造販売承認を与える事が可能となる(図1)。なお、通常の製造販売承認を得るには、市販後に有効性と更なる安全性を検証し、期間内に再度承認申請を行う必要がある。

3.2 『再生医療等安全性確保法』

これまで、民間クリニック等で「自由診療」という形で行なわれてきた再生医療等は、厚生労働省のガイドラインに基づいて実施される臨床研究と異なり、実質的な規制が無く、その実態は不明であった。規制の無い日本へ海外から幹細胞を持ち込んで患者に投与し、その後

患者が死亡する事例などもあり、再生医療等の安全面でのルール化が課題となってきた。そこで、再生医療等安全性確保法では、ヒトまたは動物由来の加工細胞(細胞加工物)を用いる自由診療および臨床研究などの保険外診療を対象として、人の生命及び健康に与える影響の程度に応じて再生医療等を3段階に分類し、それぞれ必要な手続きを定めている(図2)。

なお、再生医療等に用いられる細胞加工物のうち『医薬品医療機器等法』が定める「再生医療等製品」以外、すなわち『再生医療等安全性確保法』の対象となるものを、「特定細胞加工物」と呼ぶ。『医薬品医療機器等法』では遺伝子導入コンストラクトは、投与様式に拘わらず再生医療等製品に分類されるが、遺伝子導入コンストラクトを直接ヒトの体に投与する医療は、細胞加工物を投与するものではないという理由で『再生医療等安全性確保法』の対象とはならない。一方、*ex vivo* 遺伝子治療は、体外で遺伝子導入された細胞加工物を体に投与するという意味で、『再生医療等安全性確保法』の対象となる。

(1) 再生医療等の分類

① 第一種再生医療等

人に未実施などの高リスクな医療等(iPS細胞/ES細胞等の使用を想定)。医療機関から申請された提供計画は、特定認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で

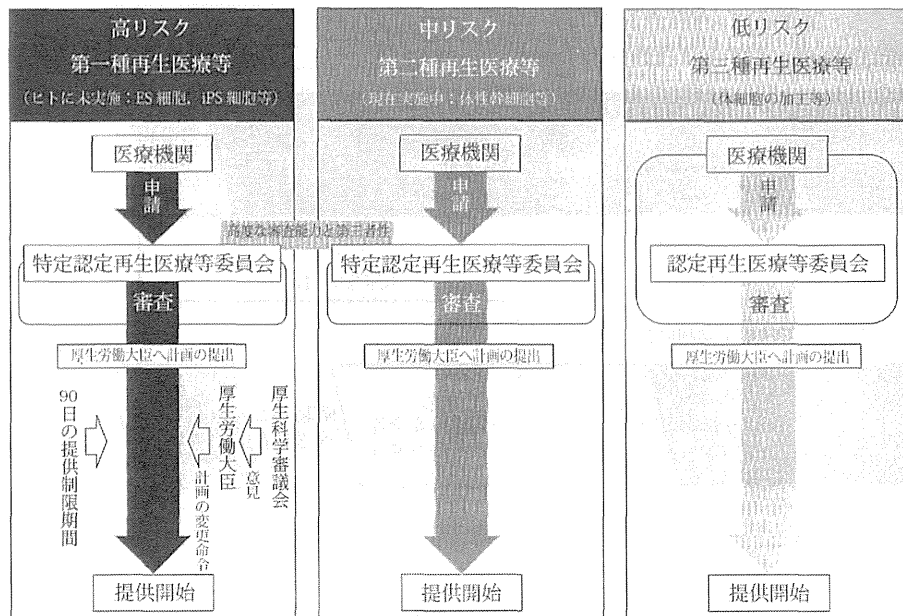


図2 リスクに応じた再生医療等提供の手続き

厚生労働大臣に提出して実施する。ただし、一定の提供制限期間（90日）を設け、その期間内に厚生労働大臣が厚生科学審議会の意見を聴いて安全性等について確認する。提供計画が安全性等の基準に適合していないときは、計画の変更が厚生労働大臣によって命令される。

② 第二種再生医療等

現在、人に実施中などの中リスクな医療等（体性幹細胞等の使用を想定）。提供計画について特定認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施する。

③ 第三種再生医療等

第一種と第二種以外のリスクの低い医療等（体細胞等の使用を想定）。提供計画について認定再生医療等委員会の意見を聴いた上で、厚生労働大臣に提出して実施する。

ただし、実際の分類には様々なリスク要因を考慮した総合的な判断が必要になる。なお、上記の認定再生医療等委員会とは、再生医療等技術や法律の専門家等の有識者からなる合議制の委員会で、一定の手続きにより厚生労働大臣の認定を受けたものである。特定認定再生医療等委員会は、認定再生医療等委員会のうち、特に高度な

審査能力、第三者性を有するものである。

(2) 特定細胞加工物の製造の許可等

従来、再生医療に必要な細胞の培養・加工は医療機関でのみ認められていたが、再生医療等安全確保法では、外部企業への委託が可能となり、許可を受けた施設（医療機関等の場合は届出制）ならば再生医療等に使用する細胞の加工培養を行なうことが出来るようになる。なお、この法律に基づき医師の責任の下で実施される細胞の培養・加工の委託については、『医薬品医療機器等法』の適用外になり、再生医療等製品と区別される。

4 再生医療等の開発

4.1 わが国の再生医療実用化の問題点と医師主導治験¹⁾

我が国における再生医療・細胞治療の開発は、大学等の研究機関の研究者の臨床研究によって行なわれることが多い。「医療としての開発トラック」における臨床研究は、ICHガイドラインに沿った国内の薬事関連基準への準拠の義務は無く、手続きや費用の面で治験よりも実

施が比較的容易だからである。ただし、新規の再生医療等に関して、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、薬事関連基準に則った治験をやり直さなければならず、時間と費用がかかる。臨床研究の結果を根拠として実施される先進医療は、法的には保険診療を最終的な出口としているが、実は、出口に至るための具体的な道筋がどこにも示されていない。このため、臨床研究から始まった開発の場合、保険診療という出口にどうすれば効率的にたどり着くことができるかという点が大きな課題となっている。

なお、欧米では、ヒト・動物の細胞に培養その他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て承認を得なければならない。

このような欧米のシステムは、大学等における非営利的な臨床試験においても多くの資金・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言われている。従って、上記課題の解決の方法の一つとしては、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ことが考えられる。かつてわが国では、治験を企画・実施する主体は企業のみとされていたが、平成14年7月の薬事法改正および平成15年6月のGCP改正により、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）。この医師主導治験の積極的な実施は、医師が開発した医療・製品を一般に普及するための効果的な方策になると考えられる。医師主導治験の体制強化のため、文部科学省と厚生労働省は「臨床研究・治験活性化5か年計画2012」等において、臨床研究・治験に精通する医師の育成、関連企業との連携によるGCP等に準拠した医薬品・医療機器の開発体制の確保、および治験を実施する際の資金の充実などに努めている。しかしながら、欧米のように全ての臨床研究を医師主導治験に置換する環境には至っていない、というのが我が国の現状である。

4.2 「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」を繋ぐ道

こうした状況下で、再生医療等の臨床研究を効率的に保険診療へ結び付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、出来る限り治験グレードに揃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全てに最低限必要かつ共通の要件や基準・評価技術を定め、これに各製品の種類・特性、対象疾患、開発段階等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等は「ミニマム・コンセンサス・パッケージ (MCP)」と呼ばれている²⁾。MCPを「製品としての開発トラック」と「医療としての開発トラック」の切れ目のない移行のための共通プラットフォームとして活用することで、効率的かつ合理的な再生医療等の開発が可能になると考えられる。

平成25年に『医薬品医療機器等法』と『再生医療等安全性確保法』が成立したことに伴い、日本の再生医療等の開発環境は大きな転換期を迎えようとしている。こうした規制の中において、MCPの具体像をすべてのステークホルダーで共有し、『再生医療等安全性確保法』下の臨床研究であっても、MCPを踏まえた開発を着実に実施できる体制を整備・運用することが、今後、再生医療等の効率的な開発のカギになると筆者らは考えている。

参考文献

- 1) 村岡ひとみ, 佐藤陽治. *Geriatric Medicine* (老年医学) 52, 237-239 (2014)
- 2) 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 (2012年5月9日) <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000029kw0-att/2r9852000002a0tg.pdf>

2014年度
日本再生医療学会

Johnson & Johnson
Innovation Award

ヒト多能性幹細胞加工製品に残存する 未分化多能性幹細胞の高感度検出法の開発

Development of highly sensitive methods for detection of residual undifferentiated pluripotent stem cells in products derived from processing of human pluripotent stem cells

佐藤 陽治

Sato, Yoji

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部

E-mail: yoji@nihs.go.jp

Summary

Human pluripotent stem cells (hPSCs), e.g. human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), have promising potential as raw materials of cell-based therapeutic products. However, there are some technical challenges that must be overcome before their clinical use. One of the challenges is the lack of highly sensitive methods for detection of residual undifferentiated hPSCs that have tumorigenic potential. We characterized and established *in vitro* assays for detection of tumorigenic/undifferentiated cells in hiPSC-derived products. The soft agar colony formation assay appeared unable to detect hiPSCs, presumably attributable to dissociation-induced apoptosis, a unique property of hPSCs. 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 was found to detect a trace amount of *LIN28* mRNA, which is equivalent to that present in a mixture of a single hiPSC and about 50,000 RPE cells. Our studies provide highly sensitive and quantitative *in vitro* assays for safety/quality profiling of hPSC-derived products.

KEY WORDS

iPS 細胞 再生医療 造腫瘍性 安全性 品質管理

はじめに

現在、ヒトES細胞やヒトiPS細胞といった多能性幹細胞に由来する移植細胞を用いた再生医療・細胞治療の開発が世界中で広く展開されており、難病治療への期待が高まっている。しかし、ヒト多能性幹細胞由来移植細胞に関する汎用性の高い品質・安全性評価方法の開発とその体系化・標準化が大きく立ち遅れており、実用化における隘路となっている。特に大きな問題としては、移植細胞中に残存する未分化なヒト多能性幹細胞に起因する製品の造腫瘍性の評価法・管理法が確立されていないことが挙げられる。こうした方法の確立なしには、どのようなヒト多能性幹細胞由来移植細胞であれ、実用化・産業化を達成することは非常に難しい。

本稿では、ヒト多能性幹細胞由来移植細胞の品質・安全性の確保の上で重要な、未分化細胞の残存の評価方法に関し、ヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞での例を中心に我々のこれまでの経験を紹介する。[本稿は、第13回日本再生医療学会総会(平成26年3月)でのJohnson & Johnson Innovation Award受賞講演をもとに記述したものである。]



多能性幹細胞由来移植細胞の造腫瘍性

「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腫瘍を形成する能力をいう¹⁾。ヒトES細胞やヒトiPS細胞を樹立した時には、細胞の多能性(多分化能)を確認する目的で、免疫不全動物に細胞を移植し、その体内でのテラトーマ(teratoma; 奇形腫)の形成、すなわち移植した細胞が3つの胚葉系の様々な細胞種に分化することを確認する。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持っていることになる。この点がヒト体細胞・体性幹細胞と大きく異なる。したがって、ヒト多能性幹細胞由来移植細胞においては、未分化な多能性幹細胞の混入・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る。このことは、移植細胞中に残存する未分化な多能性幹細胞を可能な限り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²⁾⁻⁷⁾。しかし、忘れられがちだが、ヒト多能性幹細胞由来移植細胞の実用化・品質評価においては、実際に未分化な多能性幹細胞が除去できたかを確認する手段、すなわち未分化な多能性幹細胞の混入・残留量を高感度で確認する方法も重要であり、必要である。こうした方法の開発は、多能性幹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、残存未分化多能性幹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、ヒト多能性幹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隘路として残されたままの状態にある。

多能性幹細胞・造腫瘍性細胞の検出

ヒト多能性幹細胞由来移植細胞は、通常、目的とする細胞以外にその前駆細胞や残存多能性幹細胞およびその他の目的外細胞が含まれていると考えられる。こうした細胞集団における造腫瘍性に関するリスクファクターとしては、「ヒト多能性幹細胞の残存」および「造腫瘍性形質転換細胞の出現・混入」の2点が挙げられる。

「ヒト多能性幹細胞の残存」に関しては、多能性幹細胞のマーカー遺伝子ないしマーカー蛋白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 (qRT-PCR)やフローサイトメトリーなどが挙げられる。一方、「造腫瘍性形質転換細胞の出現・混入」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。造腫瘍性細胞の検出を目的とした方法として、*in vivo*造腫瘍性試験系(製品を免疫不全動物に移植して腫瘍形成を評価する方法)を活用することも考えられるが、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、十分に高い感度を備えている必要がある。検出感度の高い試験系としては、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システムを利用することが考えられる⁸⁾⁻¹⁰⁾。ただし新規免疫不全動物モデルを用いた方法は、高価かつ時間がかかる点が問題とされ、また評価方法が未整備であり、その標準化・体系化が課題となっている。

造腫瘍性関連*in vitro*試験¹⁾

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。それぞれの長所と短所を*in vivo*試験法と併せて表にまとめた。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、最終製品の非臨床安全性という面での造腫瘍性の評価よりも、原材料の品質の安定性、または製造過程における製品の遺伝的安定性を評価する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



表 造腫瘍性関連試験の比較

試験法	軟寒天コロニー形成試験	フローサイトメトリー	qRT-PCR	<i>in vivo</i> 造腫瘍性試験*
目的	足場非依存的増殖(悪性形質転換細胞)の検出	未分化な多能性幹細胞の検出	未分化の多能性幹細胞の検出	悪性形質転換細胞および未分化な多能性幹細胞の検出
期間	30日	1日	6時間	12~16週間
利点	●安価	●短時間・簡便 ●個々の細胞を解析	●迅速 ●簡便 ●定量的 ●高感度	●直接的 ●微小環境での造腫瘍性を評価できる
欠点	●間接的 ●浮遊系細胞には使えない ●ヒトiPS細胞検出には使用不可能(分散誘導性細胞死)	●間接的 ●既知のマーカ分子を発現する細胞以外は検出不能 ●ゲーティングが結果に影響	●間接的 ●既知のマーカ分子を発現する細胞以外は検出不能	●費用と時間がかかる
下方検出限界	網膜色素上皮細胞中の1%のPA-1細胞(ヒトテラトカルシノーマ由来細胞)	網膜色素上皮細胞中の0.1%のiPS細胞マーカー: TRA-1-60	網膜色素上皮細胞中の0.002%以下のiPS細胞マーカー: LIN28	10 ⁶ 個のフィーダー細胞中に含まれる245個(0.02%)の未分化ES細胞

(*Hentze H, et al: Stem Cell Res 2: 198-210, 2009)

中での凝集による足場依存的細胞増殖を防ぐという意味で、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、単一細胞に分散したヒトiPS細胞の軟寒天培地中での増殖を検討したところ、分散誘導性アポトーシスを抑制するといわれているROCK阻害剤Y-27632存在下であっても、軟寒天培地中での増殖は認められなかった。すなわち、軟寒天コロニー形成試験は未分化なヒト多能性幹細胞の混入を検出する目的には不適であるということが確認された。次に、モデルケースとして初代培養ヒト網膜色素上皮細胞(RPE細胞)にヒト卵巣テラトカルシノーマ細胞株PA-1を一定量添加した標本を用い、正常細胞中への悪性形質転換細胞の混入に関する軟寒天コロニー形成試験の検出限界を検討した。その結果、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。

特定のマーカ蛋白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

用いて我々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および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。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。

qRT-PCRは、特定のマーカ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であるが、どのマーカが最適であるか、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これまでほとんどなかった。そこで我々は、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, REX1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およびフローサイトメトリーの時と同様、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*および*REX1*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。しかしながら、患者1回あたりの投与量が $10^4 \sim 10^9$ 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細胞における遺伝子発現量は、対iPS細胞比で1/1,000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細胞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、スパイク実験およびヒト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50,000個RPE細胞中に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、我々の知り得る限り、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。

おわりに

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未だに存在しない。したがって、現時点では、再生医療製品の中でも特に造腫瘍性に関して懸念の強いヒトiPS細胞由来移植細胞をはじめとする製品については、本稿で挙げたような、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。なお、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上で、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と考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導をくださいました西川伸一先生、川真田伸先生、松山晃文先生、郷正博先生をはじめとする先端医療振興財団の先生方および高橋政代先生をはじめとする理化学研究所の先生方、品質・安全性の考え方について多くのご示唆を下さいました近畿大学 早川堯夫先生、一丸となって多くの実験に取り組んでくださった安田智先生、黒田拓也先生、草川森士先生他、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

- 1) World Health Organization : 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), 2010
- 2) Lee MO, Moon SH, Jeong HC, et al : Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** : E3281-E3290, 2013
- 3) Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N : Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene. *Stem Cells* **21** : 257-265, 2003
- 4) Chung S, Shin BS, Hedlund E, et al : Genetic selection of sox1GFP-expressing neural precursors removes residual tumorigenic pluripotent stem cells and attenuates tumor formation after transplantation. *J Neurochem* **97** : 1467-1480, 2006
- 5) Tang C, Lee AS, Volkmer JP, et al : An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cell. *Nat Biotechnol* **29** :