

Chapter 14

In Vitro Detection of Residual Undifferentiated Cells in Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells

Takuya Kuroda, Satoshi Yasuda, and Yoji Sato

Abstract

Human pluripotent stem cells (hPSCs) such as human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) are a leading candidate for regenerative medicine/cell therapies because of their capacity for pluripotency and unlimited self-renewal. However, there are significant obstacles preventing the clinical use of hPSCs. A significant safety issue is the presence of residual undifferentiated cells that have the potential to form tumors *in vivo*. Here, we describe the highly sensitive qRT-PCR methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial (RPE) cells derived from hiPSCs. qRT-PCR using probes and primers targeting *LIN28A* (*LIN28*) transcripts can detect residual undifferentiated cell levels as low as 0.002 % in hiPSC-derived RPE cells. We expect this method to contribute to process validation and quality control of hiPSC-derived cell therapy product.

Key words Human induced pluripotent stem cells, Retinal pigment epithelial cells, Tumorigenicity, *LIN28*, qRT-PCR

1 Introduction

Pluripotent stem cells such as human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) are pluripotent and have the ability to self-renew. Pluripotency is the ability to differentiate into a variety of cells and self-renewal is the ability to undergo numerous cell division cycles while maintaining cellular identity. Because of these two characteristics, it has been expected that these cell types will provide new sources for robust and continuous production of a variety of cells and tissues for regenerative medicine/cell therapy. Additionally, hiPSCs provide a possible solution to the ethical problems and the immune rejection of hESC-derived cells, thus raising novel avenues for patient-specific cell therapy. As previously reported [1, 2], many attempts are currently under way to differentiate hESCs and hiPSCs into various tissues. Cell therapy using hESCs or iPSCs has already entered

the scope of clinical application. Indeed, a clinical trial using hESC-derived-RPE cells for Stargardt's disease and the dry type of age-related macular degeneration (dry AMD) have been initiated [3]. Clinical research using autologous hiPSC-derived RPE for the wet type of age-related macular degeneration (wet AMD) is also being planned in Japan.

One of the most important issues in the development of a safe pharmaceutical or medical device derived from hPSCs is ensuring that the final product does not form tumors after implantation [4]. There are two primary concerns. First, the pluripotent stem cell-based product may be unstable and transform to produce a tumor under some specific environment though the genomic stability of differentiated cells derived from hESCs/hiPSCs is currently unclear. Second, the product derived from human pluripotent stem cells might contain residual undifferentiated stem cells that would eventually proliferate and form a teratoma [5]. To address this second concern, it is critical to develop highly sensitive assays for detection of residual undifferentiated stem cells in the final products, and to determine their lower limit of detection (LLOD). An evaluation study of the *in vivo* tumorigenicity assay using severe combined immunodeficiency (SCID) mice has shown that 245 undifferentiated hESCs spiked into 10^6 feeder fibroblasts produce a teratoma [6]. However, some *in vitro* assays, such as quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), flow cytometry, and immunohistochemistry, have been used to indicate the undifferentiated state of stem cells with various markers (such as *POU5F1* (*OCT3/4*), *NANOG*, *SOX2*, *LIN28*, *MYC* (*C-MYC*), *REX1*, *KLF4*, *TRA-1-60*, *TRA-1-81*, *SSEA-3*, and *SSEA-4*) [7, 8]. We have demonstrated that the qRT-PCR assay can successfully detect as low as 0.002 % residual undifferentiated hiPSCs in hiPSC-induced RPE cells using *LIN28* as a target gene (designated as the *LIN28*/qRT-PCR method) [9]. To the best of our knowledge, the *LIN28*/qRT-PCR method is the most sensitive of the previously reported other methods in detecting undifferentiated PSCs. In this chapter, the *LIN28*/qRT-PCR protocol used in our laboratories is described in detail.

2 Materials

1. Pipetman (2, 10, 20, 200, and 1,000 μ L).
2. Incubator, humidified, 37 °C, 5 % CO₂.
3. Sterile biosafety cabinet.
4. Liquid disposal system for aspiration.
5. Centrifuge.
6. Sampling tubes (1.5 mL).

7. Sterile serological pipets (5, 10, and 25 mL).
8. Sterile conical tubes (15 and 50 mL).
9. Cell culture plates (60 and 100 mm).
10. Tips (10, 20, 200, and 1,000 μ L).

2.1 Maintenance and Culture of hiPS, RPE Cell, and SNL Cell

1. The hiPSC line 201B7 induced by transducing *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, and *C-MYC* (RIKEN Cell Bank).
2. Normal human retinal pigment epithelial cells (Lonza Biologics, 00194987).
3. SNL cells (a mouse fibroblast STO cell line expressing the neomycin-resistance gene cassette and LIF, CELL BIOLABS, CBA-316).

2.2 Cell Culture

2.2.1 SNL Culture

1. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM).
2. Phosphate-buffered saline (PBS), calcium free, magnesium free.
3. Fetal bovine serum (FBS).
4. L-Glutamine.
5. Penicillin/streptomycin.
6. Gelatin: To make 0.1 % gelatin solution, dissolve 1.0 g of gelatin powder in 1,000 mL of distilled water, autoclave, and store at 4 °C.
7. SNL medium, 500 mL: Mix 500 mL DMEM, 38.5 mL FBS, 5.5 mL L-glutamine, and 3 mL penicillin/streptomycin.
8. 0.25 % Trypsin/EDTA solution.
9. Mitomycin C.

2.2.2 hiPSC Culture

1. Primate ES Cell medium (ReproCELL, RCHEMD001).
2. Penicillin/streptomycin.
3. Recombinant human FGF basic 146 aa (bFGF).
4. hiPSC medium, 500 mL: Mix 500 mL primate ES cell medium and 2.5 mL penicillin/streptomycin. Add 4 ng/mL bFGF into the medium before use. Store at 4 °C for up to 2 weeks.
5. PBS (*see* Subheading. 2.2.1).
6. CTK solution (ReproCELL, RCHETP002).
7. StemPro EZPassage.
8. Cell scraper.
9. 100 μ m cell strainer.

2.2.3 Primary PRE Cell Culture

1. RtEBM Bullet Kit (RtEBM medium; Lonza).
2. PBS (*see* Subheading 2.2.1).
3. 0.25 % Trypsin/EDTA solution.
4. FBS (contained in RtEBM Bullet Kit).

**2.3 Total RNA
Extraction**

1. RNeasy Mini Kit.
2. QIAshredder.
3. RNase-free DNase set.
4. Cell scraper.

2.4 qRT-PCR

1. QuantiTect Probe one-step RT-PCR Kit.
2. 96-Well PCR plate.
3. Dual-labeled probe and primer.
4. TaqMan GAPDH control reagents, human.
5. Applied Biosystems 7300 Real Time PCR systems.

3 Methods

3.1 Cell Culture

**3.1.1 MMC-Treated
SNL Cells**

1. Add 3 or 5 mL of gelatin solution into a 60 or a 100 mm dish and incubate for 30 min.
2. Aspirate gelatin solution and use this dish as gelatin-coated dish.
3. Thaw quickly the 1×10^6 cells of cryopreserved SNL cells in water bath at 37 °C and suspend with 9 mL of SNL medium in a 15 mL tube.
4. Centrifuge the 15 mL tube at $170 \times g$ for 5 min and aspirate supernatant.
5. Suspend SNL cell pellet with 10 mL of SNL medium and transfer into a gelatin-coated 10 cm dish.
6. Culture in a humidified atmosphere of 95 % air with 5 % CO₂ at 37 °C (*see Note 1*).
7. When SNL cells reach confluence, add 12 µg/mL MMC and incubate for 2 h and 30 min.
8. Wash the MMC-treated SNL cells twice with 10 mL of PBS.
9. Detach the cells with 1 mL of 0.25 % trypsin/EDTA solution, add 10 mL of SNL medium, and then transfer into 15 mL tube.
10. Centrifuge the 15 mL tube at 170 g for 5 min and aspirate supernatant.
11. Suspend the cell pellet with 10 mL SNL medium, transfer the cell suspension to a 60 mm dish (5×10^5 cells/dish), and incubate in a humidified atmosphere of 95 % air with 5 % CO₂ at 37 °C for 1 day.

**3.1.2 hiPSC Culture
on Feeder Cells**

1. Culture hiPSC colonies in 60 mm dish (pre-seeded with MMC-SNL feeder cells) until colonies reach 70–80 % confluency. Aspirate the medium, and wash twice the cells with 5 mL of PBS per dish.

2. Remove PBS completely, add 0.5 mL CTK solution, and incubate at 37 °C for 3 min (*see Note 2*).
3. Aspirate CTK solution, and wash twice with 5 mL of PBS.
4. Remove PBS completely and add 5 mL of hiPSC medium.
5. Cut hiPSC colonies using EZPassage (*see Note 3*).
6. Detach hiPSC colonies using a cell scraper.
7. Resuspend the cell clump in 5 mL of hiPSC medium and through 100 µm cell strainer.
8. Transfer the cell clump suspension to a 15 mL tube. Centrifuge at $100\times g$ for 5 min, and then aspirate the supernatant.
9. Resuspend the cell clump in 5 mL of hiPSC medium and transfer the cell clump suspension onto a 60 mm dish that is pre-seeded with MMC-SNL feeder cells.
10. Incubate at 37 °C and 5 % CO₂ until cells reach 70–80% confluency (*see Note 4*).

3.1.3 Primary RPE Cell Culture

1. Culture primary RPE cells in 100 mm dish for 14 days.
2. Aspirate the medium, and wash the cells with 10 mL PBS.
3. Remove PBS completely, add 0.5 mL 0.25 % trypsin/EDTA solution, and incubate at 37 °C for 10 min. Add 10 mL RtEBM medium (with 2 % FBS), and then transfer the cell suspension to a 15 mL tube.
4. Centrifuge at $200\times g$ for 5 min, and then discard the supernatant.
5. Resuspend the cell in 5 mL of RtEBM medium (with 2 % FBS).
6. Seed 1×10^6 cells into a 60 mm dish (*see Note 5*).

3.2 RPE Cell Differentiation of hiPSCs

The procedure for differentiating hiPSCs into RPE cells was performed as previously described [9, 10].

3.3 Total RNA Extraction

1. Extract total RNA using the RNeasy Mini Kit, according to the manufacturer's instructions (*see Note 6*).
2. The lysate was homogenized using a QIAshredder and on-column DNase digestion was performed according to the manufacturer's instructions.
3. The RNA quantity and quality were determined by measuring the absorbance at 260 and 280 nm using NanoDrop. The RNA concentration was calculated and the RNA samples were stored at -80 °C.

3.4 One-Step qRT-PCR

1. PCR primers and dual-labeled probes are listed in Table 1.
2. Preparation of a reaction mix using the QuantiTect Probe RT-PCR kit. The primer and probe concentrations were

Table 1
qRT-PCR probes and primers [9]

Gene	Probe sequences (5' → 3')	Forward primer sequences (5' → 3')	Reverse primer sequences (5' → 3')
<i>NANOG</i>	TGCTGAGGCCTTCTGCGTCACACC	CTCAGCTACAAACAGGTGAAGAC	TCCCTGGTGGTAGGAAGAGTAAA
<i>OCT3/4</i>	CGGACCACATCCTTCTCGAGCCCAAGC	GAAACCCACACTGCAGCAGA	TCGCTTGCCCTTCTGGCG
<i>LIN28</i>	CGCATGGGGTTTCGGCTTCCTGTCC	CACGGTGCGGGCATCTG	CCTTCCATGTGCAGCTTACTC
<i>REX1</i>	AGCAAACACCTGCTGGACTGTGAGCAC	CCATCGCTGAGCTGAAACAAA	CCTCCAGGCAGTAGTGATCTG
<i>C-MYC</i>	TTGTTCCCTCCTCAGAGTCGCTGCTGGT	GCTCCATGAGGAGACACCG	CCACAGAAACAACATCGATTTCTTC
<i>SOX2</i>	CTCGCAGACCTACATGAACGGCTCGC	GCGCCCTGCAGTACAACCTC	CGGACTTGACCACCGAACC
<i>KLF4</i>	ACCTGCGAACCACACAGGTGAGAAAC	CCTACACAAAGAGTTCCCATCTCA	CCGTCCCAGTCACAGTGGTA

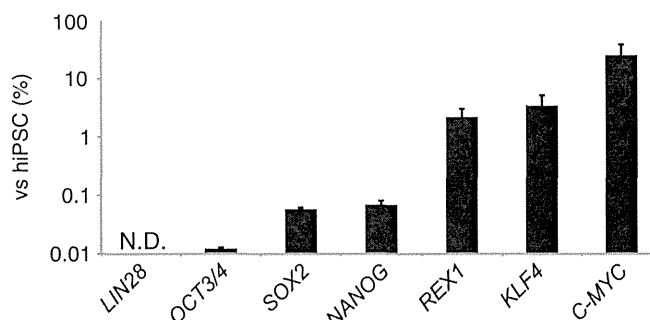


Fig. 1 The relative mRNA expressions in primary RPE cells of *LIN28*, *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *REX1*, *KLF4*, and *C-MYC* were determined by qRT-PCR analysis [9]. All values are expressed as mRNA levels relative to those in undifferentiated hiPSCs. Results are means \pm standard deviation ($n=3$)

determined to be 400 nM and 100 nM, respectively, in a final reaction volume of 25 μ L. 250 ng of total RNA (5 μ L of 50 ng/ μ L total RNA) was used as template (*see Note 7*). Prior to amplification, the contents of each reaction were mixed by spinning the plate for 2 min at 700 $\times g$. The optimal thermal cycling conditions were 50 $^{\circ}$ C for 30 min and 95 $^{\circ}$ C for 15 min followed by 45 cycles of 94 $^{\circ}$ C for 15 s and 60 $^{\circ}$ C for 1 min.

3.5 Quantification

Data analysis based on a standard curve method: A 201B7 total RNA dilution series (10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 0.003, and 0.001 ng/ μ L) was prepared as a standard curve.

Target gene expression levels were normalized to those of the GAPDH transcript, which were quantified using TaqMan human GAPDH control reagents.

3.6 Detection of Undifferentiated hiPSCs Using qRT-PCR

3.6.1 Identification of Highly Selective Markers for Undifferentiated hiPSCs

To identify highly selective markers for undifferentiated hiPSCs, we compared the *OCT3/4*, *KLF4*, *C-MYC*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28*, and *REX1* mRNA levels in hiPSCs and primary RPE cells (Fig. 1). Primary RPE cells were found to endogenously express *C-MYC* at 25.49 % of the levels observed in hiPSC, which was consistent with the previous finding that MEF expressed *C-MYC* at approximately 20 % of levels observed in mouse ES cells [11]. *KLF4* and *REX1* expression levels in primary RPE cells were 3.51 % and 2.23 %, respectively, compared with hiPSCs. However, there was more than a 1,000-fold difference in *NANOG* (0.07 %), *SOX2* (0.06 %), *OCT3/4* (0.01 %), and *LIN28* (not detected) gene expression between primary RPE cells and hiPSCs. These results suggested that the latter four genes are useful in detecting hiPSCs in RPE cells.

3.6.2 hiPSC-Spiked Sample Analyzed Using the Lin28/qRT-PCR Method

We then conducted two sets of qRT-PCR assays to evaluate the utility of these marker genes to detect spiked hiPSCs in primary RPE cells. We first measured *NANOG*, *OCT3/4*, and *LIN28* mRNA levels in five lots of primary RPE cells (the negative control)

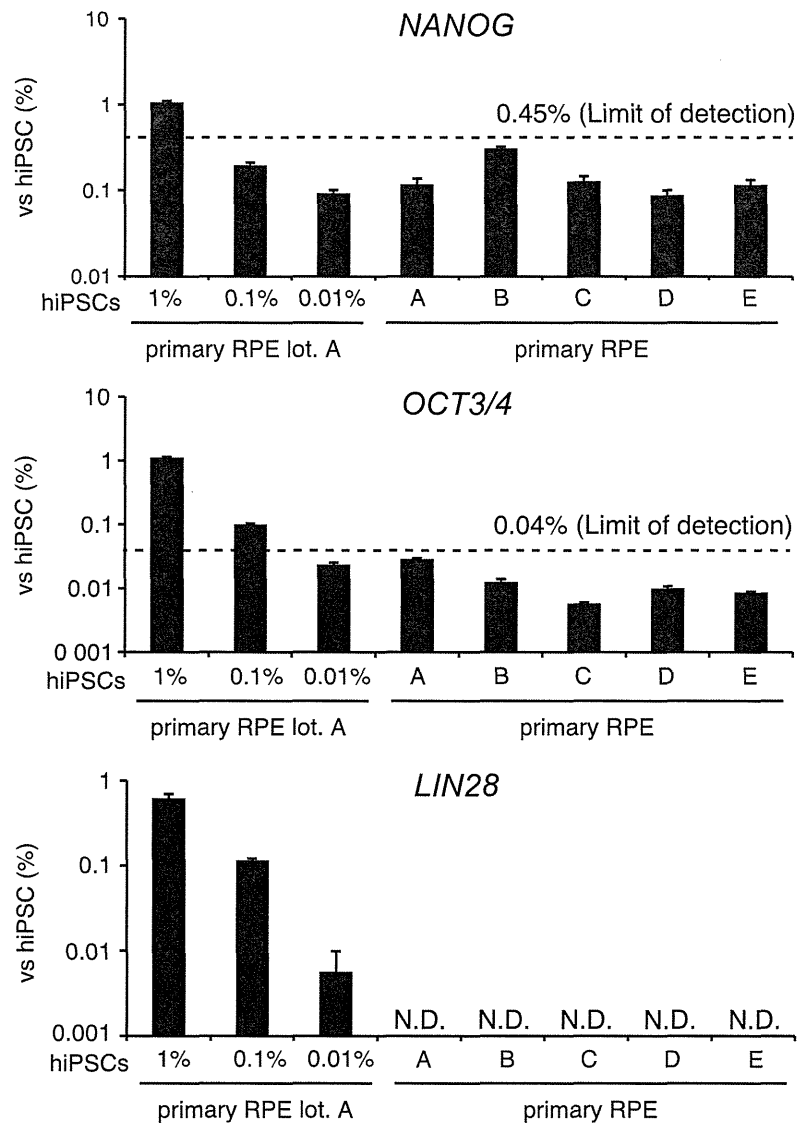


Fig. 2 qRT-PCR analysis of hiPSCs spiked into primary RPE cells and five lots of primary RPE cells [9]. Single-cell hiPSCs were spiked into primary RPE cells, and total RNA was isolated from the mixed cells. The mRNA levels of *NANOG*, *OCT3/4*, and *LIN28* are shown as a relative expression. Limit of detection was calculated as the mean plus 3.3-fold the standard deviation of the measurement of the five lots of primary RPE cells. All values are expressed as mRNA levels relative to those in undifferentiated hiPSCs. Results are means \pm standard deviation ($n=3$)

to determine the LLOD. Limit of detection was calculated as the mean plus 3.3-fold the standard deviation of the measurement of the five lots of primary RPE cells [12]. The LLOD for *NANOG* and *OCT3/4* mRNA was 0.45 % and 0.04 %, respectively, compared with hiPSCs (Fig. 2). The LLOD for *LIN28* could not be calculated because no fluorescent signal for *LIN28* expression was detectable in the primary RPE cells. These results along with

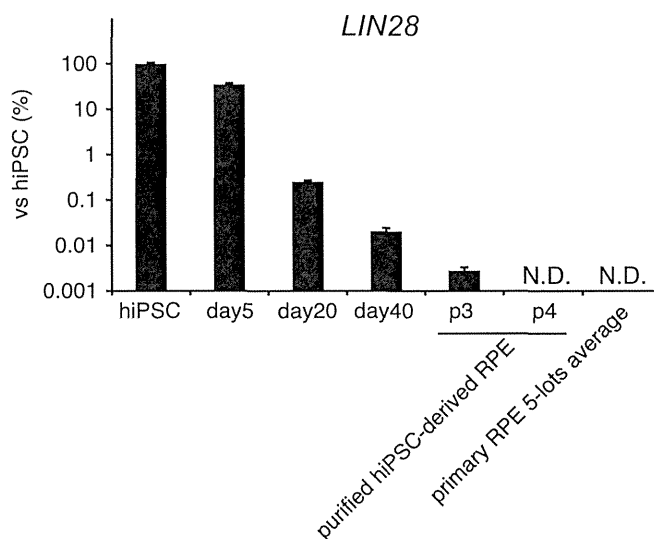


Fig. 3 *LIN28* expression of hiPSCs differentiating into RPE and purified hiPSC-derived RPE cells (passages 3 and 4) [9]. All values are expressed as mRNA levels relative to those in undifferentiated hiPSCs. Results are means \pm standard deviation ($n=3$)

experiments spiking 2.5×10^4 (1%), 2.5×10^3 (0.1%), and 2.5×10^2 (0.01%) hiPSCs into 2.5×10^6 primary RPE cells (Fig. 2) indicated that measuring *NANOG*, *OCT3/4*, and *LIN28* expression using qRT-PCRs detected at least 1%, 0.1%, and 0.01% contamination of residual undifferentiated hiPSCs in RPE cells, respectively.

3.6.3 hiPSC-Derived RPE Analyzed Using the *LIN28*/qRT-PCR Method

We examined whether qRT-PCR analysis of *LIN28* was able to detect residual undifferentiated cells in differentiated RPE cells from hiPSCs. Total RNA extracted from the differentiating cells (days 5, 20, and 40) and purified hiPSC-derived RPE cells (passages 3 and 4) underwent qRT-PCR analysis. The *LIN28* mRNA level was continuously downregulated during the differentiation process, being 0.02% that of hiPSCs at day 40. In early passage culture (passage 3) after purification, *LIN28* was still significantly expressed at a level 0.002% that of hiPSCs. From passage 4 onward, however, there was no detectable level of *LIN28* expression observed in hiPSC-derived RPE cells (Fig. 3). These results suggest that the *LIN28*/qRT-PCR method detects 0.002% of residual undifferentiated hiPSCs in hiPSC-induced RPE cells, which indicates that a single hiPSC in 5.0×10^4 RPE cells is detectable.

4 Notes

1. Change the medium every 3 days until the next passage step.
2. To prevent inactivation of CTK, do not warm 37°C before use. Make sure that feeder cells are dissociated, while hiPS colonies

- remain attached on the plate. Then, remove CTK solution as soon as possible to maintain good viability of the harvested cell.
3. Cuts hiPS colonies into uniform-sized pieces for reproducible and optimal passaging.
 4. Change the medium every day until the next passage step.
 5. Next day, make sure that RPE cells are attached on plate, and change the medium with RtEBM medium (without FBS). Change the medium every 2–3 days until the next passage step.
 6. In the spiking study, 201B7 and RPE cells were mixed at a defined cell number, before total RNA extraction.
 7. If sufficient total RNA sample were not available, it is possible to use 50 ng total RNA as qRT-PCR template.

References

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391): 1145–1147
2. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5): 861–872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
3. Lu B, Malcuit C, Wang S, Girman S, Francis P, Lemieux L, Lanza R, Lund R (2009) Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 27(9):2126–2135. doi:10.1002/stem.149
4. Ben-David U, Benvenisty N (2011) The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 11(4): 268–277. doi:10.1038/nrc3034
5. Knoepfler PS (2009) Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells* 27(5):1050–1056. doi:10.1002/stem.37
6. Hentze H, Soong PL, Wang ST, Phillips BW, Putti TC, Dunn NR (2009) Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res* 2(3):198–210. doi:10.1016/j.scr.2009.02.002
7. Noaksson K, Zoric N, Zeng X, Rao MS, Hyllner J, Semb H, Kubista M, Sartipy P (2005) Monitoring differentiation of human embryonic stem cells using real-time PCR. *Stem Cells* 23(10):1460–1467. doi:10.1634/stemcells.2005-0093
8. Wright AJ, Andrews PW (2009) Surface marker antigens in the characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 3(1): 3–11. doi:10.1016/j.scr.2009.04.001
9. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y (2012) Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One* 7(5):e37342. doi:10.1371/journal.pone.0037342
10. Osakada F, Jin ZB, Hiram Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, Sasai Y, Takahashi M (2009) In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J Cell Sci* 122(Pt 17):3169–3179. doi:10.1242/jcs.050393
11. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26(1):101–106. doi: 10.1038/nbt1374
12. James NM, Jane CM (2005) *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* Fifth edition. Harlow: Person Education Limited

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系統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。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: <i>LIN28</i>	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。

特定のマーカー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であるが、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 ~ 10^6 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 :

〈レクチャー1-1〉再生医療

再生医療・細胞治療に使用する細胞加工物の品質・安全性評価の原則と造腫瘍性の考え方

三浦 巧 佐藤 陽治

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部

1. はじめに

再生医療・細胞治療(再生医療等)を実用化するためには、製品となりうる細胞の品質が保証され、治療における安全性が確保されることが極めて重要である。当たり前のことではあるが、再生医療・細胞治療のリスクとベネフィットを勘案し、リスクゼロを求めるあまり実用化を遠ざけるような不合理な規制を設けてはいけない。本稿では、ヒト細胞加工物^{*1}の規制の原則とされる「リスクベースアプローチ(Risk-Based Approach)」の考え方について概説する。また、現在、再生医療等に用いる細胞加工物の原料・原材料^{*2}として、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)やヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)が使用されようとしている。これらヒト多能性幹細胞は、動物体内に移植された際に腫瘍を形成する能力、いわゆる「造腫瘍性」を元来の特性として保持しているため、多能性幹細胞を原料とした細胞加工物においては、未分化細胞や造腫瘍性細胞の混入・残留による異所性組織形成や腫瘍形成及びがん化を防止することが求められており、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が新規かつ重要な課題となっている。本稿では、現在ヒト多能性幹細胞加工製品を含むヒト細胞加工物の開発が精力的に進むなか、その造腫瘍性評価の現状と課題についても概説する。

2. 再生医療・細胞治療に必要とされる品質・安全性確保

2.1 再生医療、細胞治療、細胞加工物について

再生医療(Regenerative Medicine)とは、「加齢、

疾病、損傷、または先天的障害により組織あるいは器官が失った機能を修復ないし置換することを目的に、機能的かつ生きて組織を作り出すプロセス」として定義することができる。つまり、病気やけがなどで機能不全に陥った組織や器官を再生させる医療である。一方、細胞治療(Cell Therapy)とは、「体外で加工または改変された自己由来、同種由来または異種由来の細胞を投与することによってヒトの疾病または損傷を予防、処置、治療あるいは緩和すること」として定義することができる²⁾。つまり、生体内から取り出した細胞を、薬として再び体内へ投与することによる治療戦略のことである。「再生医療」と「細胞治療」は、同じ治療戦略として言及されることが往々にしてある。その理由としては、生きた細胞・組織を用いる医療という意味で、両者は狭義の再生医療として同義に捉えることができるからである。しかしながら、「再生医療」と「細胞治療」の両カテゴリーに重ならない治療法が存在することも理解しておく必要がある。たとえば、細胞増殖分化因子の投与によって内性幹細胞を活性化あるいは分化させることによる組織再生などは、生きた細胞を使わない治療法であるため、細胞治療ではなく再生医療として分類される。逆に、がん細胞治療における免疫細胞治療などは、臓器や組織の再生を目的としない細胞治療であるため、再生医療のカテゴリーには属さない(図1)。再生医療・細胞治療の目的のために用いられる細胞は、培養・活性化・分化誘導などの加工を施した細胞(細胞加工物)と、加工を施していない細胞(輸血や移植に用いる細胞や組織など)に大別される(図1)。再生医療等に使用さ

*1 再生医療等に使用されることが目的とされている物のうち、人または動物の細胞に培養その他の加工を施したものは、平成25年11月に成立した『再生医療等安全性確保法』では、「細胞加工物」と呼ばれる。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』に則った開発及び製造販売がなされるものは、同法の下では医薬品・医療機器とは別の新規製品カテゴリー「再生医療等製品」の2類型のうち1つと分類される。この類型は、従来、「細胞・組織加工製品」(または「再生医療製品」)と呼ばれてきたものである。「再生医療等製品」のもう一方の類型は、従来「遺伝子治療製品」(または「遺伝子治療薬」)と呼ばれた製品群である。なお、再生医療等に用いられる「細胞加工物」のうち「再生医療等製品」でないものは、「特定細胞加工物」と呼ばれ、『再生医療等安全性確保法』の規制の対象となる(図1参照)。

*2 薬事規制においては、「原材料」とは、「原料または材料」を指すのではなく、医薬品等の製造に使用する原料または材料の由来となるものを指す。

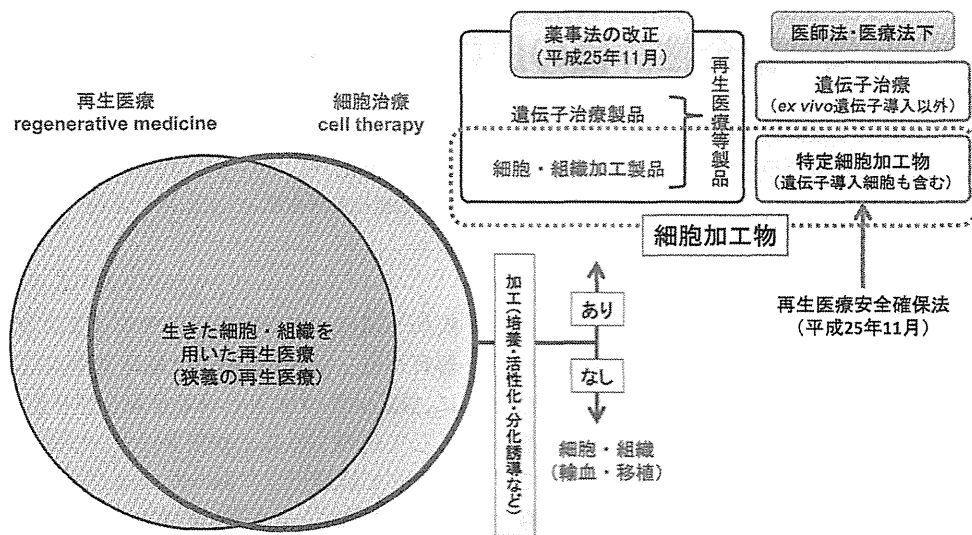


図1 再生医療、細胞治療、細胞加工物、再生医療等製品、特定細胞加工物について

れることを目的とした細胞加工物の開発は国内外で精力的に進められており、近い将来には細胞加工物を用いた医療が数多く実現されると期待されている。

国内において、このような再生医療等を目的とした細胞加工物の実用化には、以下に掲げる2つのルートがある。1つは、治験を行ったうえ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『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』（通称『医薬品医療機器等法』、平成25年11月に『薬事法』を改正・改称）に則った「業」としての実用化である。もう1つは、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、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』及び『再生医療等の安全性の確保等に関する法律』（通称『再生医療等安全性確保法』、平成25年11月成立）の下の「医療行為」として実施される（図1）。

2.2 細胞加工物の品質・安全性評価の原則

「細胞加工物」は、複雑で動的な特性を持つ生きた細胞をもとに製造され、細胞の単離法や培養法（培養環境）などにより最終製品中の細胞の性質も多種多様となる点、また高度な精製や滅菌の工程を導入することがほぼ不可能である点などから、従来の品質管理、非臨床試験、臨床試験のやり方がそのまま適用できるとは限らない。例えば、自家培養皮膚製品においても、その原材料、製造工程、最終製品の

形態、使用法は各国において異なり、品質・安全性の確保には、合理的なリスク分析を基礎にしたケースバイケースの対応が常に必要となる（表1）。つまり、細胞加工物を適用される患者のリスクとベネフィットを考慮したうえで、その実用化を規制することが望ましい。したがって、再生医療・細胞治療製品の規制の原則は「リスクベースアプローチ（Risk-Based Approach）」であるとされている。「リスクベースアプローチ」とは、対象となる各製品の性質に固有、かつその品質・安全性・有効性に関連するリスク要因を探り当てることをベースにし、その影響の度合いを科学的に評価することにより規制の方針・内容を定めるアプローチ法のことである。日米欧医薬品規制調和国際会議（ICH）における品質リスクマネジメント・ガイダンス（Q9）においても、この原則は採用され、「リスクベースアプローチ」は今日の医薬品規制の一般的な原則となっている。そのため欧米では、再生医療等で利用される細胞加工物はこの原則に基づき、かつ製品の多様性を踏まえ、細胞の由来（自家 vs. 他家）あるいは使用目的（非商業的臨床試験[大学病院等での介入的臨床研究] vs. 商業的臨床試験[製品開発を目的する治験]）等の条件に関わらず、臨床試験開始も販売も品目ごとに、薬事関連法規に基づいた審査・承認の対象となっている^{3,4)}。リスクベースアプローチに基づいた合理的かつ包括的な規制の枠組みが、細胞加工物における

表1 細胞・組織加工製品の多様性の例(「自己由来」[皮膚]製品に限定)

製 品	対象疾患	細胞種/足場材料	使用法/使用目的	国 名
Epicel (Genzyme Biosurgery)	真皮深層熱傷 もしくは全層熱傷	自己角化細胞 /マウス線維芽細胞	植皮され、 表皮の代替となる。	アメリカ
ジェイス (J-TEC)	重症熱傷	自己表皮細胞 /マウス線維芽細胞	シート状に培養した 表皮細胞を受傷部位に移植	日本
Holoderm (Tego Science)	熱傷、尋常性白斑、 母斑、潰瘍、 肥厚性瘢痕	自己表皮細胞 /マウス線維芽細胞	植皮され、真皮の再生促進。	韓国
AutoCel (Modern Cell & Tissue Technologies)	熱傷、潰瘍、 形成外科による変形	自己表皮細胞	細胞懸濁液を噴霧して使用。	韓国
LASERSKIN (Fidia Advanced Biopolymer)	真皮深層熱傷 もしくは全層熱傷	自己表皮細胞 /ヒアルロンベンジルエステル	真皮・表皮を含む 皮膚の代替として植皮。	イタリア
Myskin (Altrika)	熱傷、潰瘍、 難治性外傷	自己角化細胞 /シリコンシート (増幅時にマウス細胞と共培養)	受傷部位に貼付	イギリス
CellSpray (Avita Medical)	熱傷、外傷、瘢痕	自己表皮基底膜細胞 [自己血清]	細胞懸濁液として使用。 患部に浸潤・増殖し、 治癒を促進。	イギリス、 オーストラリア
EpiDex (Euroderm GmbH)	慢性皮膚潰瘍	自己外毛根鞘由来幹細胞	ディスク状で患部表面 50~70%を覆い、 表皮細胞を増殖。	ドイツ

安全性
したケー
)。つま
クとベネ
を規制す
療・細胞
アプローチ
る。「リ
各製品の
性に関連
にし、そ
より規制
とである。
ける品質
おいても、
ローチ」は
ている。そ
る細胞加工
性を踏まえ、
的(非商業
研究]vs.商
]等の条件
ごとに、薬
となってい
いた合理的
物における

イノベーション及び製品開発を、不合理な規制の障壁により妨げられることなく推進させることに役立つと考えられている。我が国でも、平成24年9月に発出された「ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性確保に関する5指針(自己体性幹細胞、同種体性幹細胞、自己iPS(様)細胞、同種iPS(様)細胞、ES細胞)」のまえがきに、治験開始における基本的な考え方として、明らかに想定される製品のリスクを現在の学問・技術を駆使して排除し、その科学的妥当性を明らかにしたうえで、製品に付随するリスクの「所在」と「その重み」だけではなく、「患者が新たな治療機会を失うことにより被るかもしれないリスク」すなわち医療としてのリスクを勘案することとあり、少なくとも薬事ルートではリスク分析に基づいた品質・安全性評価が重視されている⁵⁻⁹⁾。また同5指針のまえがきでは、リスク・期待されるベネフィットの情報を開示したうえで、治験に入るかは患者の自己決定権に委ねるという視点を合わせて評価することの重要性も示されている。

前述の通り、再生医療等に用いる「細胞加工物」は生きた細胞であり、その特性は多様である。そのため、再生医療・細胞治療に関わる特定のリスク(造腫瘍性、治療の失敗など)と、それに関連するリスクファクターは、製品に固有で複数である場合が多く、特定のリスク及びリスクファクターを同定する

ことは容易ではない。そのため、各リスクファクターについては、開発中の製品に関連することが明らかになされたリスクに対する寄与について評価する必要がある。このようにして同定されたリスクとリスクファクターとの組み合わせをプロファイリングすることによって、各リスクに固有のプロファイルが明らかになると考えられる。プロファイリングの例として、細胞加工物のリスクとリスクファクターを表2にまとめてみたので、参照して頂きたい。

2.3 「医療としての開発」と「製品としての開発」の共通プラットフォーム

我が国における再生医療・細胞治療の開発は、従来の医薬品や医療機器とは異なり、大学等の研究機関の研究者の臨床研究により行われるケースが多い。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ガイドライン等の国際的ガイドラインに沿った国内基準への準拠が義務付けられていない。このため、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出来ない場合が多く、再生医療の最終的な出口である保険診療には結びつかない。

一方、「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

表2 細胞・組織加工製品のリスク分析の例

		一般MCP	臨床研究	薬事開発	リスクファクター	リスク
1	ドナーの適格性(感染性因子・既往歴)	○	●	●	細胞の起源(自己vs.同種)	感染因子伝播
2	ドナーに関する記録, 診断・検査結果, 細胞の検査内容, インフォームド・コンセントの記録の作成, トレーサビリティ確保	○	○	○		
3	採取者, 採取医療機関の技術要件	○	○	○		
4	採取部位, 採取方法の妥当性, 取り違い・クロスコンタミネーション	○	○	○		
5	ドナーのインフォームド・コンセント&個人情報保護	○	○	○		
6	ドナーの安全性確保のための, 細胞・組織採取時の試験検査	○	○	○		
7	最終細胞・組織の保存方法及び取り違い防止策	○	○	○		
8	採取細胞・組織の運搬方法	○	○	○		
9	採取記録の作成及び保管方法	○	○	○		
10	培地成分, 血清, 抗生物質, 成長因子, フィーダー細胞等, 細胞の処理に用いる試薬等の適格性・規格	△	●	●	動物由来成分の接触・残存, 抗生物質の残存	感染因子伝播, 有害免疫反応
11	細胞・組織以外の原材料の品質及び安全性	△	●	●	非細胞成分の安全性, 細胞・組織との相互作用	有害免疫反応, 毒性, 物理的障害
12	細胞に遺伝子工学的改変を加える場合		*1	△	導入因子残存	有害な細胞形質転換
13	細胞にタンパク質を導入する場合など		△	△	導入因子残存	有害な細胞形質転換
14	原材料としてのES細胞株		*2	△	造腫瘍性細胞の残存	造腫瘍性, 有害免疫反応, 感染因子伝播
15	ロット構成の有無とロットの既定			○		
16	製造方法	△	△	○		
17	加工した細胞の特性解析	○	○	○		
18	最終製品の形態・包装・出荷・配送	△	△	○		
19	製造方法の恒常性	○	○	○	細胞の起源(自己vs.同種), 遺伝的不安定性(染色体異常発生)	自己由来製品の品質のばらつき, 有害な細胞形質転換
20	製法変更			○		
21	最終製品の品質管理	○	○	○	患者数	不良製品の拡散
22	安定性	△	△	○	不安定性	有効性の消失
23	非臨床安全性試験	○	●	●	未分化・造腫瘍性細胞の残存・発生, 免疫原性物質の残存, 生理活性物質分泌能	造腫瘍性, 異所性組織形成, 有害免疫反応
24	効力・性能を裏付ける試験(非臨床POC)	○	○	○		
25	体内動態試験		●	△	投与方法, 製品態様, 投与部位, 投与細胞数	有害な体内分布
26	臨床試験	○	●	●	対象疾患の重篤度・緊急度(処置しない場合の患者の予後), 医療従事者の熟練度, リスク・マネジメント・システムの存否	治療機会の逸失, 治療の失敗, 有害事象発生時の不十分な対応

*1 遺伝子治療臨床研究に該当する可能性

*2 指針改定まで保留

○: 必須, △: 場合により必要, ●: リスク・ベース・アプローチによるケース・バイ・ケースの対応

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仕組みだと言われている。日本国内で行われる臨床研究の場合、ICHガイドラインに準拠していなければ、その成果をグローバルに普及させることは困難である。

我が国における「臨床研究」と「治験」との間の壁という問題の解決方法の一つとしては、日本の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。我が国では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)。このような医師主導治験の積極的実施は、再生医療の実用化においても効果的な方策となると考えられるが、現状ではまだ、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至っていない。

このような状況下で、再生医療等の臨床研究を保険診療へ効率的に結び付けて行くためには、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が必要である。そのためには、臨床研究か治験かを問わず、再生医療等での利用を目的としたすべての細胞加工物に最低限必要な共通の要件や基準・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)」¹⁰⁾と呼ばれており、再生医療等においては「医療としての開発」から「製品としての開発」において、切れ目なく移行することを可能にするプラットフォームとなる。再生医療等での利用を目的とした細胞加工物のMCPについて、具体的な事項をすべての関係者が合意かつ共有し、開発早期段階から着実に進める体制を整備すること、また、状況に応じ柔軟に運用することが、再生医療等の真の実用化、すなわち、保険診療対象とするためのカギになると考えられる。

3. 再生医療等の適正な実用化のための 造腫瘍性試験の現状

3.1 造腫瘍性とは

「造腫瘍性」は、多くの生物由来医薬品等に関わ

るリスクの中でも、再生医療等に用いられる細胞加工物に特徴的なリスクとして挙げられる。「造腫瘍性(tumorigenicity)」の意味は、動物に移植された細胞集団が増殖することにより悪性または良性の腫瘍を形成する能力のことであり、「腫瘍原性(Oncogenicity)」や「がん原性(Carcinogenicity)」とは区別される。ヒトES細胞株やヒトiPS細胞株を樹立した際には、初期胚内の多能性幹細胞の性質をどのくらい保っているかを確認する必要がある。その際、細胞の多能性を評価する一つの手法として、免疫不全動物に未分化な多能性幹細胞を移植後に形成された腫瘍(テラトーマ)が、内・中・外胚葉系の様々な細胞種から構成されていることを確認することにより、移植した細胞の多能性を評価する解析法がある。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細胞加工製品においては、未分化なES/iPS細胞の残留・混入に起因する腫瘍形成がリスクとなる¹¹⁾。

3.2 造腫瘍性国際ガイドライン

現在唯一存在する造腫瘍性国際ガイドラインは、世界保健機関(WHO)の生物薬品標準化専門委員会第47次報告(1998)(Technical Report Series No. 878、TRS 878)にあるAnnex I「生物薬品製造用の*in vitro*基材としての動物細胞の使用の要件」の2010年改訂版¹²⁾である(以下、WHO TRS 878とする)。このWHO TRS 878にある造腫瘍性試験の概要は、「ヌードマウス等の動物10匹に10⁷個の細胞を投与して16週間観察する。陽性対照としてはHeLa細胞などを用いる。」というものである。ただし、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*または*ex vivo*で投与される生物薬品を製造する際に*in vitro*細胞基材として用いられるヒトまたは動物由来の細胞株であり、その目的はこれらの細胞株の品質管理である。つまり、患者に移植する生細胞は、再生医療等での利用を目的とした細胞加工物を含め対象外となる。WHO TRS 878における造腫瘍性試験の目的は、より具体的には、生物薬品用細胞基材となるセル・バンクの造腫瘍性の程度または有無を正確に把握することにある。セル・バンクの安定性に異常が生じたことを検出するための方策として、造腫瘍性を細胞特性の指標の一つとして評価し、品質管理に活用するということである。つまり、WHO TRS 878の試験は、細胞株という均一な

表3 主な造腫瘍性関連試験
in vivo試験法

試験法	測定事項	目的	利点	欠点
ヌードマウスへの移植	腫瘍形成	造腫瘍性細胞の検出	・ 定量化の方策が整備 (WHO TRS 878)	・ 時間(数週間~数カ月)・費用がかかる ・ 膵がん、乳がん、グリア細胞腫、リンパ腫、白血病細胞に由来する細胞株は腫瘍を形成しない ・ 僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
NOD-SCID マウスへの移植			・ ニードマウスよりも高感度	・ 時間(数週間~数カ月)・費用がかかる ・ 定量化の方策が未整備 ・ 胸腺腫を自然発症
NOG/NSG マウスへの移植			・ INOD-SCID よりも高感度/胸腺腫なし	・ 時間(数週間~数カ月)・費用がかかる ・ 定量化の方策が未整備

in vitro試験法

試験法	測定事項	目的	利点	欠点
細胞増殖特性解析 (所定培養期間を超えた培養)	細胞増殖速度	不死化細胞の検出	・ 簡便・安価 ・ 時にはヌードマウスよりも『高感度』(不死化していても腫瘍形成のないケース)	・ 僅かな不死化細胞の混入の検出には時間がかかる
フローサイトメトリー	細胞マーカー蛋白質発現	造腫瘍性細胞・未分化細胞の検出	・ 短時間(~1日)・簡便 ・ 時には軟寒天コロニー試験よりも『高感度』 ・ 細胞を識別・分離・回収できる	・ 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない=マーカー(-)の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ ・ ゲートの掛け方で結果がばらつく
qRT-PCR	細胞マーカー遺伝子発現		・ 短時間(~1日)・簡便 ・ 時にはフローサイトメトリーよりも『高感度』	・ 特定のマーカー発現細胞だけしか検出できない=マーカー(-)の造腫瘍性細胞を見逃すおそれ
軟寒天コロニー形成試験	コロニー形成	足場非依存的増殖の検出	・ in vivo試験より短時間(数週間~1カ月程度) ・ 安価 ・ 時にはヌードマウスよりも『高感度』	・ 浮遊系細胞に使用できない ・ 僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない ・ ヒトES/iPS細胞は検出不能(分散誘導性細胞死)
核型分析	染色体の数・サイズ・形	染色体/遺伝子異常の検出	・ 技術的に確立 ・ 外部機関による受託解析もあり ・ 細胞の遺伝的安定性について評価可能 ・ 外部機関による受託解析もあり ・ 細胞の遺伝的安定性について評価可能	・ 相関性の問題 =「染色体や特定遺伝子の異常」と「造腫瘍性」との相関は未解明 ・ 僅かに含まれる造腫瘍性細胞を検出できない
染色体CGH及びアレイCGH	ゲノムDNAのコピー数異常			
蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)分析	特定遺伝子の位置・コピー数			
次世代シーケンサー	遺伝子配列			

細胞集団の造腫瘍性評価を対象としており、細胞加工物(中にごくわずかに存在する造腫瘍性細胞に起因する)の造腫瘍性の評価とは目的が異なるため、そのまま転用することには感度等の面で問題がある。

3.3 細胞加工物における造腫瘍性

細胞加工物の由来細胞の種類(例:体細胞、体性幹細胞、iPS細胞等)は多様である。さらに、由来する細胞については、自己、同種、及びHLAホモ接合型の同種のものなどが想定される。再生医療製品の臨床利用に際しては、その態様(例:細胞懸濁液や細胞シート等)も様々なものとなり、最終製品ごとに必要な細胞数も異なる(例:網膜色素上皮細胞製品では 10^4 個、心筋細胞製品では $10^8 \sim 10^9$ 個)。その上、適用の経路、適用部位、免疫抑制剤の使用

の有無、患者の病状の緊急性等についても、様々なケースが想定される。したがって、このような多様性に基づき、造腫瘍性の評価においては、総合的な考察が求められる。

3.4 ヒトES/iPS細胞加工製品における造腫瘍性評価

ヒトES/iPS細胞加工製品の製造における造腫瘍性試験には、目的別に、①原料・原材料(注2)の品質管理のための造腫瘍性試験、②製造工程(中間製品)評価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、の3種類が想定される。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試験系またはin vivo試験法がある(表3)ので、これら

を利
れの
3
ヒ
ト
る。
生物
で、
質特
ヒト
管理
TRS
と同
内に
パン
細胞
唆さ
iPS
する
造腫
品質
つ
可
る
と
集
存
が
品
残
て
2点
の
ES
は、
遺
で
RT
利
腫
に
や