

多能性幹細胞由来移植細胞の安全性評価研究

実施予定期間：平成 22 年度～平成 26 年度

総括責任者：井村 裕夫（公益財団法人先端医療振興財団・理事長）

研究代表者：西川 伸一（公益財団法人先端医療振興財団・再生医療研究開発部門・部門長）

I. 概要

先端医療振興財団は、iPS 細胞由来細胞による網膜変性疾患の再生医療治療を計画している。その移植細胞の開発における最も大きな障害は、多能性幹細胞由来移植細胞に共通かつ本質的な問題である腫瘍原性である。現在はその評価方法の標準化はされておらず、安全性基準も不明確である。

本研究では、多能性幹細胞由来細胞の安全性評価、特に腫瘍原性と他家細胞移植時の免疫原性の評価についての検討を行い、標準化に向けた提案を行う。最終的な目標は、iPS 細胞由来移植細胞による臨床研究を開始することである。

1. 機関の現状

a. スーパー特区における取組内容について

先端医療振興財団では、統合化迅速研究（ICR：Integrative Celerity Research）として、基礎研究から事業化までの抜本的かつ一貫した実用化を目指した研究・開発を行っている。また再生医療の実用化と社会還元を目的として、ICR の手法を用いた以下の活動に取り組んでいる。

- (1) 再生医療の実用化を支援する基盤を構築する。
- (2) 再生医療分野における医師主導治験を実施する。
- (3) ゴールを見据えながら、基礎研究を効率的に推し進めて実用化を目指す活動を行う。

ICR から得られる成功体験を通じ、再生医療製品の評価指標を設定、それを国際標準化するとともに、再生医療周辺産業の育成に資することを目指している。

b. 機関の実施している革新的な医薬品等に関する研究開発の状況、国内外における位置付けについて

先端医療振興財団におけるヒト多能性幹細胞由来細胞製剤として、現在 iPS 細胞由来網膜細胞を移植することによる網膜変性疾患に対する再生医療治療の開発が進行中である。

本シーズに関しては、幹細胞からの目的細胞への分化誘導方法に関するオリジナルな方法を開発、当該方法及び当該製造物に関する知的財産は確保しており、日本国内はもちろん世界的にも、製品化にむけ最先端の位置にある。網膜細胞については、非臨床試験の段階ではあるが、GMP 基準による細胞製造への対応準備中である。本シーズは、最先端の研究成果を基にした新規の細胞製剤であり、数年後のヒト臨床研究の開始を現実的な目標として開発を進めている。そのためにも、非臨床安全性試験データ収集のパッケージング・デザインとそのデータ収集は緊急の課題である。

2. 計画構想の内容

本研究において主に使用する原材料としてのヒト多能性幹細胞は、線維芽細胞あるいは臍帯血細胞にセンダイウイルス感染あるいはプラスミドにより山中 4 因子を導入・樹立した iPS 細胞であり、当該細胞樹立過程での知的財産は我が国固有のものである。最終的な移植細胞は、網膜色素上皮細胞あるいは視細胞である。またヒト組織由来試料は貴重であることから、パイロット・スタディーとしてあるいは対照細胞として必要に応じヒト ES 細胞、マウス ES 細胞、マウス iPS 細胞なども使用することとする。

iPS 細胞由来細胞製剤にかかる安全性評価の中で本研究において検討するのは、

- a. 造腫瘍（瘤）能：未分化細胞の残存と多能性再獲得性、腫瘍（瘤）の転移可能性
- b. 免疫原性：投与・移植後の超急性拒絶、急性拒絶及び慢性拒絶、ならびに反復投与による拒絶獲得性である。以下に詳述する。

a. 腫瘍原性

多能細胞由来移植細胞の安全性指標としては、特に腫瘍原性に関する安全性評価が重要であり、主に議論すべき論点は、未分化細胞の残存と多能性再獲得性である。多能性幹細胞は奇形腫形成が定義であるため、それ自身が腫瘍形成細胞としての側面を持つ。したがって、安全性を保證するためには分化を完全に誘導し、未分化細胞を残さないようにする、あるいは残存可能数を設定する必要がある。

未分化幹細胞を除去する方法としては、高効率の分化誘導、細胞表面抗原を利用した細胞選別などが一般的であり、個々の目的分化細胞に依存して方法の開発と検討がなされてきた。本研究においても多能性幹細胞（iPS 細胞）から色素上皮細胞と視細胞の分化誘導に既に成功しているが、高効率化と未分化細胞の除去は、製造工程の詳細を決定する段階で残された最重要課題のひとつである。ただし網膜色素上皮細胞に関しては、目視により容易に判別がつくことから、色素上皮細胞のコロニーを直接マニュアルで単離・増幅する方法の開発に成功しており、極めて純度の高い色素上皮細胞の調製が可能である。今後は、単離・増幅した色素上皮細胞の純度等の性質の解析が課題である。

医薬発第 0208003 号通知および同 0912006 号通知においては、造腫瘍試験が求められており、その実施方法として免疫不全マウスへの移植実験がある。これまで体性幹細胞非臨床安全性試験においては、肉眼的に腫瘍形成が判定しやすいためヌードマウスを用いた造腫瘍試験ガイドラインにより試験が行われてきた。しかし、免疫不全マウスにも様々な程度があり、基準は明確でない。例えば、重度免疫不全マウスとして汎用される NOD/SCID とそれを基に作製されたより重度の免疫不全マウスである NOG (NOD/SCID IL2R^γ null) (T および B 細胞に加えて NK 細胞も欠損) を比較すると、癌細胞あるいは ES 細胞を皮下移植した場合の腫瘍化の程度に顕著な差異があることが知られている。すなわち NOG マウスは、より広い範囲のヒト癌細胞が増殖できる環境を付与されたマウスであり、残存未分化細胞の検出感度を上げることができる。

また *in vitro* における細胞の腫瘍化能を検出する方法

の確立も重要である。なぜならば、動物を使用した造腫瘍試験はコスト・時間とも莫大であり、*in vitro* における試験結果が *in vivo* 試験結果に外挿できれば、今後の自己由来 iPS 細胞を用いる細胞製剤化にむけた大きな展開が期待できるからである。上記 *in vitro* 試験の有力な候補のひとつとして、一般に癌細胞の検出に利用される軟寒天コロニー形成試験が挙げられる。これは、形質転換した癌細胞が足場非依存性の増殖能を持つことを利用した検出方法である。未分化の多能性幹細胞は癌細胞と類似した性質を持つことから、この方法により検出できる可能性が高い。いずれにしても、*in vitro* において腫瘍化能を持つ未分化細胞を定量化（細胞数の測定）する方法の確立は本研究の重要な課題である。

以上のような個々具体的な方法の検討と改善を行ったうえで、多能性幹細胞由来細胞の腫瘍原性に関して必要な試験（評価）には以下の3段階があると考えられる。

- (1) 予定している投与方法と投与場所において、許容される未分化幹細胞の数を調べる。
- (2) 移植細胞集団中に含まれる可能性のある未分化幹細胞の数が許容数を十分に下回る。
- (3) 最終試験として移植細胞を免疫不全マウスに移植した後に腫瘍化能が検出できない。

まず(1)に関しては、免疫拒絶がないあるいは極めて小さい条件のもとで、移植細胞集団中に一定数の未分化幹細胞を加え、免疫不全マウスに投与することにより腫瘍化能を調べる。これは、医薬品におけるいわゆる添加回収実験に相当するものである。仮に1個の未分化細胞が含まれているだけでも腫瘍化の可能性があることが明らかになれば、臨床応用は難しいと考える。なぜなら、実際に投与する細胞集団中に未分化細胞が1個も含まれていないことを証明することは極めて困難だからである。例えば、マトリゲルと細胞を混合した状態で NOG マウスに皮下移植すると、1-2個の癌細胞あるいはES細胞が含まれているだけでも腫瘍形成が起こることが報告されている。このことは、マトリゲルに混合した状態で皮下移植するという条件では、多能性幹細胞由来移植細胞を用いることは安全性の観点から極めて困難であることを意味する。すなわち、移植細胞集団（例えば、 10^6 の体性細胞）中に一定数の未分化幹細胞（例えば、1, 10, 50）を加え、腫瘍化能を調べることが重要である。最終的には、個々のケースで予定している投与方法と投与場所において（本研究においては眼の網膜）、本実験を実施することが望ましい。

また(2)に関しては、まず軟寒天コロニー形成試験のような *in vitro* の方法により、移植細胞集団中に含まれる未分化幹細胞の数を評価する。その数が上記の許容数を十分に下回ることを示す必要がある。

さらに最終的には(3)、移植細胞を免疫不全マウスに投与することで、腫瘍原性の試験をする必要がある。免疫不全の程度は強い方が望ましい。また分化細胞が生体内で未分化細胞に脱分化する可能性は常に考慮する必要がある。

以上のように本研究においては、一般的な方法の検討と改善を行ったうえで、本研究で予定している移植細胞と移植方法に関して腫瘍原性を評価する予定である。さらに、移植細胞の状態（懸濁液かシート）あるいは移植時期なども考慮に入れる必要がある。

b. 免疫原性

自家細胞以外の細胞製剤では、免疫拒絶が常に大きな問題となる。他家細胞の免疫原性について、投与場所につい

ての免疫原性の説明をすることは問題ないが、低 HLA-I (MHC-I) なので免疫原性が低いなどという説明は不十分であり、可能な限り免疫原性の定量化を行うべきと考える。

本研究では、多能性幹細胞に関して、未分化および分化後の細胞のそれぞれについての免疫原性を定量化する方法として、T細胞活性化の定量を試みる。

3. 実施期間終了時における具体的な目標

網膜変性疾患に対する再生医療治療としては、自家 iPS 細胞を用いる移植治療（色素上皮細胞）と他家 iPS 細胞を用いる移植治療（視細胞）の両方を計画している。まず自家 iPS 細胞を用いた移植治療に関してヒト幹細胞指針適合臨床研究を実施し、その後他家 iPS 細胞を用いた移植治療の開発を行う。

したがって、自家 iPS 細胞由来移植細胞（網膜色素上皮細胞）に関して、腫瘍原性試験などの安全性試験が終了し移植細胞の安全性に関する規格が設定されていること、またこれらの安全性の試験結果が非臨床有効性試験に反映（有効性データと安全性データとの統合）された臨床プロトコルが策定され、臨床試験実施可能な状況にあること、を期間終了時の具体的な目標とする。

4. 実施期間終了後の取組

自家 iPS 細胞を用いる移植治療（色素上皮細胞）については、本研究実施期間内の臨床試験実施開始を目標としていることから、いかに質の高い臨床研究が実施できるかが極めて重要な課題である。またその後は、治験あるいは高度医療を経て治験を実施し、当該医療の普及を目指す。この目標のため、現時点から事業化を見据えた開発戦略の策定（ICRの促進）が重要である。

他家 iPS 細胞を用いる移植治療（視細胞）については、ヒト幹細胞指針申請のために必要十分な安全性データ（主に腫瘍原性と免疫原性）を取得し、可能な限り早く臨床研究を開始することが課題である。

5. 期待される波及効果

多能性幹細胞（ES細胞、iPS細胞）は、未分化細胞の大きな増幅が可能であり、かつ多種類の細胞への分化が可能であることから、今後の再生医療において最も期待される細胞種である。現時点で多能性幹細胞由来移植細胞の開発にとつての最大の障害は細胞の腫瘍原性（造腫瘍能）である。また免疫原性のデータは、他家体性幹細胞移植に関する有用な情報を提供できる。これらの安全性に関する評価法が標準化されれば、開発における具体的な目標・課題が明確になり、多能性細胞を用いたすべての開発案件を大きく促進することになる。本提案案件は、わが国の細胞培養分野での国際競争力の増強と細胞規格の国際標準化に寄与すると考えている。

6. 生命倫理・安全面への配慮について

先端医療センター研究所において実施する動物を用いた非臨床試験は、すべて「動物実験委員会」で承認を受けて行う。また遺伝子組み換え実験については、「遺伝子組換え実験安全委員会」の承認を受けて行う。

ヒト由来組織・細胞を用いて行う非臨床研究あるいは臨床研究については、先端医療センターの「研究推進委員会」および該当する倫理委員会（再生医療審査委員会）で倫理面等の審議・承認を得て実施される。その際、ヒト由来組織・細胞の提供者あるいは被験者には、研究あるいは試験の内容について十分な説明を行うとともに、文書による同意を得ることとする。研究内容および同意文書の内容については、ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則である

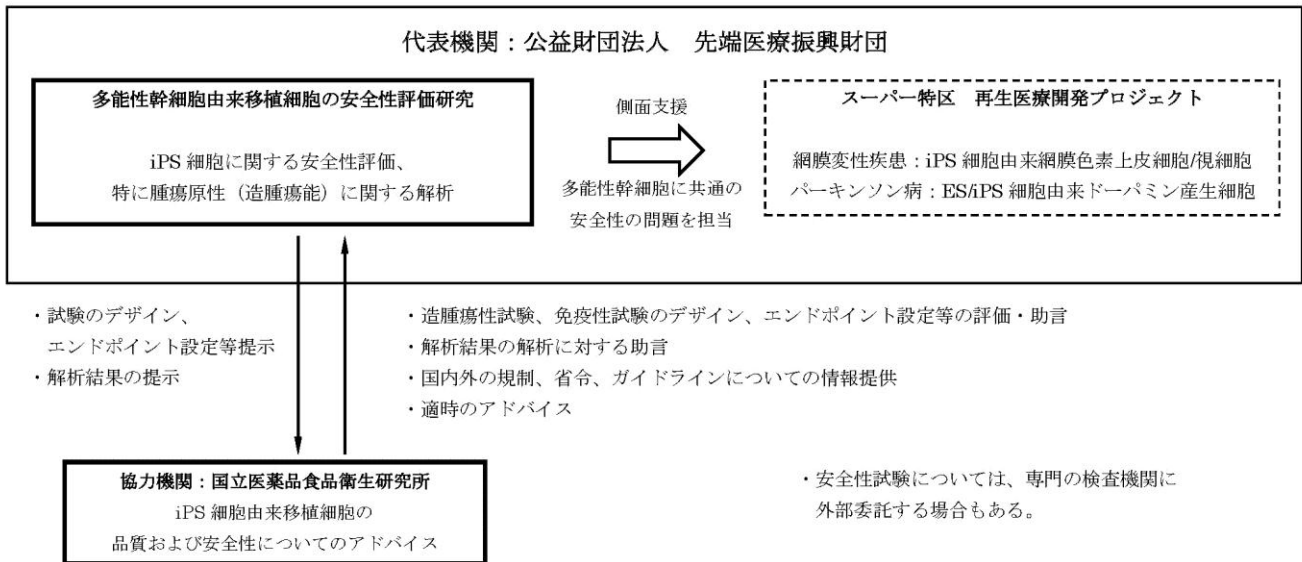
「ヘルシンキ宣言」、および本邦における関連指針・省令 に則していることを確認する。

7. 実施体制

本研究における実施体制は以下である。

実施体制図

- 提案課題名 「多能性幹細胞由来移植細胞の安全性評価研究」
- 総括責任者名 井村 裕夫
- 代表機関名 公益財団法人 先端医療振興財団
- (実施予定期間： 平成22年度～平成26年度)



※平成24年4月1日、財団法人先端医療振興財団を名称変更し、公益財団法人先端医療振興財団に移行した。

本研究における主な参画者は以下である。

参画者リスト

氏名	所属部局・職名	当該構想における役割
◎井村 裕夫	公益財団法人先端医療振興財団・理事長	総括責任者
◎西川 伸一	公益財団法人先端医療振興財団 再生医療研究開発部門・部門長	研究代表者
○川真田 伸	公益財団法人先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門、副事業統括	腫瘍原性試験、免疫原性試験の立案・評価
松山 晃文	公益財団法人先端医療振興財団 再生医療開発支援部・部長	安全性規格の設定立案
郷 正博	公益財団法人先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門・専門役	腫瘍原性試験、免疫原性試験の立案・評価
○佐藤 陽治	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬品部・部長	腫瘍原性試験、免疫原性試験、安全性規格の設定についての助言

8. 各年度の計画と実績

a. 平成 22 年度

・計画

本年度は、数年後の臨床研究開始を目標としている加齢黄斑変性症に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植を実施するために必要とされる安全性評価、特に造腫瘍性の評価を開始する。最終的な製造工程がまだ決定されていないことから予備実験的な側面もあるが、造腫瘍能に関しては既に十分な評価が可能と考えられる。主要な評価項目は以下である。

・iPS 細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞の調製(単離と増幅)

・色素上皮細胞の純度等の解析

・未分化幹細胞残存可能性の検討

・免疫不全マウスに対する iPS 細胞および色素上皮細胞の投与による腫瘍形成能の評価

・iPS 細胞の未分化状態(基底状態)の規格化の検討

・実績

本年度は、自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植の安全性評価として、造腫瘍性試験を開始した。最終的な製造工程の詳細にはまだ未確定の部分もあるが、安全性評価は一次及び二次試験を実施することを予定しており、本年度に開始した試験は一次試験に対応する。一次試験は、一般的に iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の造腫瘍性を評価するもので、二次試験は、臨床試験で使用する移植細胞と同等の iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞を評価するものである。主な実績は以下である。

・レトロウイルス、センダイウイルス、プラスミドベクターのそれぞれにより樹立した iPS 細胞から網膜色素上皮細胞を分化誘導し、単離・増幅を行った。

・単離・増幅した色素上皮細胞について、FACS、抗体染色及び RT-PCR の方法により、未分化 iPS 細胞の残存可能性を検討した。その結果、市販の網膜色素細胞と同程度の検出レベルであった。

・造腫瘍性を有する対照細胞 (HeLa 細胞、iPS 細胞等) を用い、各種免疫不全マウスの腫瘍形成に関する感度を比較検討した。その結果、移植細胞をマトリゲルと混合し NOD-scid マウスに移植する方法の感度が最も高かった。

・iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞 (1 x 10⁶) をマトリゲルと混合し NOD-scid マウスに移植することにより、造腫瘍性試験を実施した(現在までに約 60 匹)。現在まで、移植部位に腫瘍形成等の腫瘍形成を疑わせる事象は発現していない。

・NOD-scid マウスには、移植細胞とは無関係に胸腺及び脾臓肥大が頻繁に起きることが明らかになったことから、NOG マウスを使用する試験系の検討を開始した。

・低酸素条件、MAPK 及び GSK 阻害等による iPS 細胞の基底状態の作製を行い、その遺伝子発現・染色体 DNA の解析等を行った。

・安全性に関する国内外の規制動向、研究成果の情報発信のために、ウェブサイト「多能性幹細胞安全情報サイト」を開設した。

b. 平成 23 年度

・計画

初年度(平成 22 年度)の研究内容を継続するとともに、最終的に決定した製造工程に基づいて調製された色素上皮細胞に関しても同様の試験を開始する。

・実績

本年度は、前年度から継続し、自家 iPS 細胞由来網膜色

素上皮 (RPE) 細胞移植の安全性評価としての造腫瘍性試験の一次試験を終了し、二次および三次試験を開始した。主な実績は以下である。

・腫瘍原性を有している HeLa 細胞を、直接、あるいは、マトリゲルと混合して重度の免疫不全マウスである NOG マウスに皮下移植して造腫瘍性を評価した。その結果、マトリゲルと混合して NOG マウスに皮下移植する試験は、極めて高感度の造腫瘍性試験であることが示された。

・一次試験について、マウス移植後 6 ヶ月までの経過観察を行った。その結果、移植部位における腫瘍形成等の腫瘍形成を疑わせる現象は観察されなかった。また、NOD-SCID マウスに発生した胸腺腫の組織学的解析を行い、移植細胞の増殖に起因する現象ではないことを確認した。

・プラスミド (エビゾーマルベクター) により樹立した iPS 細胞から、財団 CPC 施設で RPE 細胞への分化誘導、単離及び増幅を実施し、二次及び三次試験用細胞を調製した。

・二次および三次試験用 RPE 細胞の免疫不全マウスへの移植試験を行った。RPE 細胞への分化誘導中の iPS 細胞あるいは RPE 細胞を被験細胞としてヌードマウスあるいは NOG マウスへ皮下移植した。

・RPE 細胞の品質の *in vitro* 評価のために、軟寒天コロニー形成試験、FACS、抗体染色、定量的 RT-PCR 等を用いた未分化幹細胞の検出条件を検討した。定量的 RT-PCR を用いて未分化細胞マーカーの Lin28 により未分化 iPS 細胞 0.01% の混入を検出できることを明らかにした。

・RPE 細胞の培養上清の iPS 細胞に対する増殖抑制効果を検討した結果、未分化 iPS 細胞に対する分化促進効果と細胞死誘導効果が認められた。その効果が、RPE 細胞が分泌する PEDF 因子による可能性について検討した。

・多能性幹細胞の最も未分化な iPS 細胞の基底状態について、遺伝子発現、染色体 DNA の状態を分子生物学的に検討した。その結果、基底状態は、品質のバラツキが比較的少ない iPS 細胞調製に有用である可能性が示された。

・米国と欧州における多能性幹細胞の安全性評価・規制についての調査を行い、多能性幹細胞の造腫瘍性を中心とした安全性評価についての国際的基準の動向に関する情報収集を行った。さらに、ウェブサイト「多能性幹細胞安全情報サイト」から、日・米・欧の規制動向、及び本プログラムの成果・技術情報等を発信した。

c. 平成 24 年度

・計画

前年度(平成 23 年度)の研究内容を継続・終了させることにより、「ヒト幹細胞指針」に適合するために必要十分な安全性試験(特に、造腫瘍能に関して)データを取得する。

d. 平成 25 年度

・計画

網膜色素変性症に対する他家 iPS 細胞由来視細胞移植を実施するために必要とされる安全性評価、特に造腫瘍性と免疫原性の評価を本格的に開始する。

e. 平成 26 年度

・計画

前年度(平成 25 年度)の研究内容を継続し、最終的に決定した製造工程に基づいて調製された視細胞に関しても同様の試験を開始する。

9. 年次計画

取組内容	1年度目	2年度目	3年度目	4年度目	5年度目	実施期間 終了後
<p>iPS細胞に関する 安全性評価、特に 腫瘍原性（造腫瘍 能）に関する解析 （代表機関：公益 財団法人先端医療 振興財団）</p> <p>iPS細胞由来移植 細胞の品質および 安全性についての 助言 （協力機関：国立 医薬品食品衛生研 究所）</p>	腫瘍原性試験 免疫不全マウス を用いた検討					
	未分化幹細胞検 出方法（軟寒天コ ロニー形成試験 など）の検討					
	免疫原性試験 通常マウスを用 いた検討					
	安全性品質規格 の設定と非臨床 試験			安全性規格の設 定		