

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(案)

細胞組織加工製品専門部会 部会長 中畑龍俊

細胞組織加工製品専門部会 副部会長 岡野栄之

1. はじめに

独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)科学委員会細胞組織加工製品専門部会(以下、本専門部会と略)は、細胞組織加工製品に関し、iPS 細胞等の安全性に関する大きな懸念事項である「造腫瘍性」について、科学的見地から議論を重ね、とりまとめを行った。

細胞組織加工製品の開発を適切に推進するためには、科学的に想定される懸念事項に対し、現時点で認識し得る問題をできる限り整理した上で、実施可能性をも考慮した対応がなされるべきである。ただし、細胞組織加工製品の開発に関しては、今まさに様々な研究が進行中であり、現時点での知見は限られている。したがって、本専門部会は、可能な限りの現状分析と対応を提示するものの、近い将来関連データが集積された段階で随時検討を重ねる必要があることを併せて提言するものである。

「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または良性の腫瘍を形成する能力をいう。ヒト iPS 細胞やヒト ES 細胞は、元来、奇形腫形成という造腫瘍性を有しており、この点がヒト体細胞・体性幹細胞とは大きく異なる。これらの多能性幹細胞に由来する細胞組織加工製品においては、未分化の多能性幹細胞の残留・混入等により異所性組織や腫瘍が形成されるおそれがあるため、最終製品の造腫瘍性の評価と適切な管理が重要な課題である。

細胞組織加工製品の安全性を確保するために、今回、本専門部会は、「造腫瘍性」に焦点を当て関連する課題を整理した。具体的には、現時点でどのような科学的試験方法が存在するか、さらに、個別の試験方法の実力と限界についての現状をまとめ、考え得る対応案を提示した。したがって、本報告は細胞組織加工製品の開発に関する科学的見地からのまとめであって、細胞組織加工製品の薬事承認のための要件等を示すものではない。

2. 細胞組織加工製品における造腫瘍性

細胞組織加工製品の由来細胞の種類(体細胞、体性幹細胞、iPS 細胞等)は多様である。また、最終製品ごとに必要な細胞数は、例えば、網膜色素上皮細胞製品では 10^4 個、心筋細胞製品では $10^8 \sim 10^9$ 個と様々である。さらに、由来する細胞についても、自己、同種、及び

HLA ホモ接合型の同種のものが想定される。その上、細胞組織加工製品の臨床利用に際しては、その様態(例:細胞懸濁液や細胞シート等)、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、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。実際、このような考え方は、米国・EU の規制当局のガイドライン及び厚生労働省指針でも見て取れるが、現時点では細胞組織加工製品及びその由来細胞に関する造腫瘍性評価の公的ガイドラインは存在しない。(注1)

細胞組織加工製品の造腫瘍性を評価する上で、「製造に用いる(幹)細胞の造腫瘍性と最終製品の造腫瘍性との相関・因果関係は未解明である」という点は重要であり、多能性幹細胞をもとに製造される細胞組織加工製品に関して、ことに iPS 細胞由来細胞組織加工製品の場合、その由来する iPS 細胞ストック等における造腫瘍性と最終製品としての iPS 細胞等加工製品の造腫瘍性は区別して検討しなければならない。

3. iPS 細胞等に由来する細胞組織加工製品における未分化細胞・造腫瘍性細胞の混入及び造腫瘍性の評価

iPS 細胞等に分化を誘導して製造した最終製品が造腫瘍性を有する場合、その原因として、未分化な iPS 細胞等の混在、及び分化誘導の過程で造腫瘍性を有する細胞が生じた可能性が想定される。これら进行评估する方法としては幾つかの試験系が存在する。

造腫瘍性を持つおそれのある未分化 iPS 細胞等の混入进行评估する試験系としては、未分化多能性細胞特異的なマーカーの発現を指標にしたフローサイトメトリーや定量的 RT-PCR (qRT-PCR) が挙げられる。しかし、いずれも一定の頻度以下の未分化多能性幹細胞の混入は検出できず、最終製品を未分化多能性幹細胞培養条件に戻して培養して iPS 細胞等のコロニーが出現しないことの確認など新たな検査法の確立が重要である。

一方、これらの試験方法は、使用した未分化細胞マーカーを発現していない(すなわち想定外の)造腫瘍性細胞を検出することはできない。したがって、製造工程中において意図しない形質転換により生じる造腫瘍性を有する細胞をいかに検出するかは、重要な課題である。

悪性形質転換細胞を検出するための試験系としては、軟寒天コロニー形成試験、フォーカス形成試験、成長因子非依存性増殖アッセイ、ヌードマウスへの皮下移植による造腫瘍性試験(注1 WHO TRS878 を参照)等が挙げられるが、これらの方法はもともと細胞株ないしセル・バンクのような比較的均一な細胞集団の特性解析を目的としており、ごく少数の造腫瘍性を有する細胞に起因する造腫瘍性を評価するためには、ヒトへの外挿性も含め、十分な感度があるかどうかには注意する必要がある。

造腫瘍性細胞を包括的かつ高感度で検出する試験法としては、NOG マウスもしくは NSG マウス等の重度免疫不全マウスへの皮下移植による造腫瘍性試験が考えられる。ただし、こ

これらの系における定量化の方策・標準化は未整備である。

細胞組織加工製品に関する上記の試験系はすべて、最終製品における造腫瘍性を有する細胞の混入量あるいは有無を試験するものである。上述の通り最終製品は多様な要素を持つと想定されるので、個々の最終製品ごとに、許容される造腫瘍性細胞の混入量を考察し、それを検出する試験法を確立した上で、カットオフ値を定める必要がある。(注2)

iPS 細胞等加工製品の造腫瘍性に関する一つの懸念として、「生着する微小環境が腫瘍形成に影響を及ぼすか否か」が挙げられる。これを非臨床で検証する系としては、重度免疫不全マウス等を用い、ヒトでの適用部位に相当する部位に当該製品を適用して造腫瘍性を試験する方法が考えられる。ただし、その臨床への外挿性は未だ検証されておらず今後の課題である。

4. iPS 細胞等に由来する細胞組織加工製品の製造に用いるヒト(同種)由来 iPS 細胞の造腫瘍性の評価と管理

iPS 細胞ストックは、特定の最終製品の製造を想定して開発されているものではなく、多様な最終製品の製造に用いることを想定したヒト(同種)由来 iPS 細胞のコレクションである。米国NIH等、海外でもヒト iPS 細胞コレクションが樹立されつつある。そこで、本専門部会では、一般論として、このようにコレクションされた臨床用ヒト iPS 細胞の造腫瘍性をどのように評価、管理すべきかについて議論した。

最終製品の造腫瘍性の評価は、上述の通り、重要であるが、最終製品の造腫瘍性は、その由来 iPS 細胞コレクションにおける個々の iPS 細胞の造腫瘍性及び最終製品に至る分化誘導のプロセス(製造工程)に依存する可能性がある。共通の iPS 細胞からそれぞれ固有の特性を持つ多様な最終製品が製造されると同時に、多数の患者に同一の最終製品が適用される可能性も想定される。最終製品中の細胞の分化度・増殖性等の特性によって、または適用される母集団が大きくなることによって腫瘍を発症する患者が出現してくるおそれがある。したがって、この場合、製造に用いる iPS 細胞について造腫瘍性の評価を厳密に行う必要がある。ヒトの iPS 細胞が発がんに関与するとした場合、主な懸念事項として、「継続的な細胞増殖を誘導する遺伝子異常」と「ゲノムの不安定性」が考えられ、これらについて討議した。

「継続的な細胞増殖を誘導する遺伝子異常」は、いくつかの発がんに関与する遺伝子変異の積み重なりによる異常と考えられている。したがって、発がんに関与する遺伝子変異を持つ細胞が患者に導入された場合、がんの発症リスク上昇が懸念される。iPS 細胞の遺伝子異常誘発に関して、レトロウイルスを用いた遺伝子導入では必ずホストのゲノムに遺伝子が組み込まれるが、それに比べ、現在行われているプラスミド(エピソーマルベクター)による遺伝子導入ではホストのゲノムに遺伝子が導入される確率は低い。しかしながら、ホストのゲノムに遺伝子やプラスミド断片が導入される可能性は否定できないため、導入の手法は問わずに iPS 細胞の作製に用いた初期化遺伝子がホストのゲノムに組み込まれていないことを検証することが重要となる。初期化遺伝子等の残留が、PCR によって検出できるような場合には、そ

の細胞の造腫瘍性が高まっていることが懸念される。PCR については、検出感度を把握した上で実施することが重要であり、実施可能性にも留意した上で、できるだけ高感度であることが望ましい。なお、プラスミド断片の挿入について検出可能な新規検査法(アレイ、全ゲノムシーケンス、濃縮トラップ法等)の開発も望まれる。また、エピソードベクターに含まれるプロモーター及びエンハンサー配列はゲノムに挿入された際に内在性遺伝子を活性化させる危険性がある。そのため、初期化遺伝子に加えてプロモーター及びエンハンサー配列の有無についても PCR で検査することが望ましい。

iPS 細胞が樹立された後、基礎的な情報として、核型、及び全エクソンの塩基配列に異常がないか確認しておくべきと考えられる。現時点で発がんへの関与が判明している遺伝子を【表 1】に例示する。これらの遺伝子の変異やそれに基づくアミノ酸置換が iPS 細胞で生じていないこと(新たな付加変異がないこと)の確認は重要である。ただし、発がんへの関与が報告されている遺伝子は【表 1】以外にも存在し、また、がん関連遺伝子に関する知見・情報は日々刷新されている。したがって、【表 1】の内容は随時更新する必要があることを付記する。他方、がん遺伝子及びがん抑制遺伝子を網羅的に確認することは実際上困難である。また、確認対象の遺伝子の設定の仕方によっては実際の発がんへの寄与が極めて少ない遺伝子の変異のみを含むような iPS 細胞までも最終製品の製造に用いるには不適切として排除することになり、合理的でなくなるおそれがある。試験に際しては、細胞の種類、製造方法、あるいは対象疾患や使用目的等も踏まえて、COSMIC 等の既存のがんゲノム変異データベースも参考にして、合理的な範囲で確認対象とする遺伝子を決める必要がある。

もう一つの大きな問題は「ゲノムの不安定性」である。ゲノムの不安定性により、生体内でがんにとって有利なクローンがセレクションされると考えられている。がん細胞にとってゲノムの不安定性は進化の駆動力であり、一般的に、がんは全てゲノムの不安定性を獲得していると考えられる。長期的にはゲノムの不安定性は発がんに大きく寄与するものと考えられ、このことは iPS 細胞に外来性のがん原性遺伝子が残るかどうかとは異なる問題であることに留意する必要がある。また、ES 細胞が初期胚由来であるのに対して、iPS 細胞は分化細胞を人為的にリプログラミングするため、エピジェネティックな構造も含め、不安定性がより高いことが考えられる。

ヒトにおける多くのがんは、増殖に強く寄与する遺伝子(おそらく数個から 20 個程度)の変異が蓄積して生じるため、晩発性の発がんが促進されないようにするためには、通常の細胞よりもゲノムの変異率が上がっていないことを確認しておく必要がある。例えば、基礎的なデータとして、iPS 細胞を継代培養した際のゲノムの変異率について、通常の細胞レベルと比較してどの程度であるかを確認しておくことは有用と考えられる。確認方法の一例としては、経時的なエクソンシーケンスが挙げられる。例えば、元の細胞と 10 継代後の細胞の全エクソンを比較し、その変異率を通常の細胞のレベルと比較するというやり方等が考えられる。また、分化誘導を行う場合には、分化誘導後のゲノム(エクソン)の変異率のデータも有用と考えられる。

なお、染色体の構造異常を来すものと、塩基配列異常を来すものは必ずしもオーバーラップしない。したがって、継代培養後のゲノム(エクソン)の配列情報は核型解析の情報の代替にはならない。

また、臨床用ヒト iPS 細胞ストック作製においては、幾つかの遺伝子を導入したことに伴う事象と、培養に伴うゲノムの不安定性の2種類の問題が考えられるが、現時点の科学では、両者を区別することなく、導入操作時及び継代した後のゲノムの不安定性について確認することが現実的である。全エクソン解析は、ゲノム変異におけるサブポピュレーションの解析も行えることから、この目的に使用することが可能と考えられる。

臨床用ヒト iPS 細胞ストックの造腫瘍性に関し、遺伝子レベルでの確認を行う場合、ゲノムの変異や同一人物由来の体細胞の遺伝子配列のある程度の多様性が、健常人にも認められることは注意すべきである。iPS 細胞の作製過程で新たに生じた変異を同定し、それががん関連のアミノ酸変異を起こすものかという視点での検討も必要である。ドナー由来の変異の取扱いについては慎重に対応する必要があるが、同意を取得した範囲を踏まえて、細胞組織加工製品の安全性を確保するよう適切に対応する必要がある。

5. おわりに

本専門部会では、今回、細胞組織加工製品の開発において懸念されるリスクとして「造腫瘍性」を取り上げ、特にiPS細胞に焦点を絞って議論を行った。その結果、現段階での造腫瘍性リスクに関する知識及びその評価法についての一定の整理がなされた。

本専門部会においては、iPS 細胞等に由来する細胞組織加工製品の造腫瘍性について、そのリスクをゼロにすることは現在の科学技術では困難であること、また、一方で、疾患というリスク及びその時間的経過により増大するリスクを抱えた患者から細胞組織加工製品の実用化が期待されていることについては明確なコンセンサスが得られた。そのことを承知した上で、現時点で活用可能な手段を合理的な範囲で活用し、できるだけリスクを減らすよう努力する必要がある。本報告書は、このような観点で、現時点での見解をまとめたものである。

なお、iPS 細胞等に由来する細胞組織加工製品については、分化誘導過程での造腫瘍性の増強の有無やエピジェネティックな要因による造腫瘍性等、今回、議論していない課題も存在し、今後の議論が必要と考えられる。また、臨床適用される最終製品は多様な形態となることが想定され、その特性を踏まえて適用すべき試験を適切に選択した上で、臨床適用においてはできるだけ長期フォローを行うことが必要と考えられる。

細胞組織加工製品の開発は日進月歩である。先端的な分野であるほど、「誰もが未経験」であるために、品質や安全性確保は困難になる。その克服には、既存の評価技術の活用を諮ると共に新規評価法の開発を継続的に推進する努力が必要である。本専門部会では、今後も細胞組織加工製品の品質、有効性及び安全性をいかに評価するか、について最新の知識を収集し、かつ叡智を集めて議論をつくしながら、現時点で利用可能な科学技術の可能性と限界について科学的コンセンサスを醸成する努力を継続して行く所存である。

表1 がん関連遺伝子の例 (Gene Symbol で表示)

ABL1	CBFA2T3	ERCC4	GATA1	MEN1	NUP214	SH3GL1
ABL2	CBLB	ERCC5	GATA3	MET	NUP98	SMAD4
ACVR1B	CBLC	ERCC6	GNA11	MITF	PALB2	SMARCA4
AFF3	CCND1	ETV4	GNAQ	MLH1	PAX8	SMARCB1
AKAP9	CCND2	ETV6	GNAS	MLH3	PBRM1	SMO
AKT1	CCND3	EVI1	GOLGA5	MLL	PDE4DIP	SOCS1
AKT2	CDC73	EWSR1	GOPC	MLL2	PDGFB	SRGAP3
ALK	CDH1	EXT1	GPC3	MLL3	PDGFRA	SRSF2
APC	CDH11	EXT2	H3F3A	MLLT3	PDGFRB	SS18
ARHGEF12	CDK6	EZH2	HMGA1	MPL	PIK3CA	STAT3
ARID1A	CDKN2A	FAM123B	HMGA2	MSH2	PIK3R1	STK11
ARID2	CDKN2C	FANCA	HNF1A	MSH6	PIM1	SUFU
ASXL1	CDX2	FANCB	HRAS	MUTYH	PLAG1	SUZ12
ATF1	CEBPA	FANCC	IDH1	MYB	PML	SYK
ATM	CHEK1	FANCD2	IDH2	MYC	PMS2	TCF3
ATR	CHEK2	FANCE	IKZF1	MYCL1	POLE	TCL1A
ATRX	CIC	FANCF	IL2	MYCN	POLH	TET2
AXIN1	COL1A1	FANCG	IL7R	MYD88	PPARG	TFG
AXIN2	CREB1	FANCI	IRF4	MYST3	PPP2R1A	TLX1
BAP1	CREBBP	FANCI	JAK2	NCOA2	PRKAR1A	TNFAIP3
BCL11A	CTNNB1	FANCL	JUN	NCOA4	PTCH1	TP53
BCL11B	CYLD	FANCM	KDM5C	NF1	PTEN	TPR
BCL2	DAXX	FANCP	KDM6A	NF2	PTPN11	TSC1
BCL3	DDB2	FBXW7	KDR	NFE2L2	RAD51C	TSC2
BCL6	DDIT3	FEV	KIT	NFKB2	RAF1	TSHR
BCOR	DDX5	FGFR1	KRAS	NIN	RB1	USP6
BCR	DDX6	FGFR1OP	LCK	NONO	REL	VHL
BHD	DEK	FGFR2	LMO2	NOTCH1	RET	WRN
BLM	DICER	FGFR3	MAF	NOTCH2	RNF213	WT1
BMPR1A	DNMT3A	FH	MAFB	NPM1	ROS1	XPA
BRAF	EGFR	FLCN	MAML2	NR4A3	RUNX1	XPC
BRCA1	ELK4	FLT3	MAP2K4	NRAS	SDHB	ZNF521
BRCA2	EP300	FOXL2	MDM2	NSD1	SDHD	
CARD11	ERBB2	FOXP1	MDM4	NTRK1	SETD2	
CARS	ERCC3	FUS	MED12	NTRK3	SF3B1	

がん関連遺伝子に関し、Cancer Research 72:636-644, 2012 及び外部有識者(柴田龍弘先生)提出資料(※)より作成。

※:外部有識者提出資料は、家族性腫瘍の原因遺伝子として報告されているもの(米国 NCBI の OMIM(Online Mendelian Inheritance in Man)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>))、これまでの報告からがんにおいて最初の体細胞変異と想定されるもの及びがん変異データベース(英国サンガーセンターの COSMIC(<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>))等において高頻度に認められる(上位20位)遺伝子(全てのがん種についての全体集合)をリスト化した資料。

注1:細胞組織加工製品の品質・安全性確保に関しては、既に厚生労働省より「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」(平成20年2月8日薬食発第0208003号)、「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」(平成20年9月12日薬食発第0912006号)、「ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第2号)、「ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第3号)、「ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第4号)、「ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第5号)、「ヒトES細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」(平成24年9月7日薬食発0907第6号)などの指針が発出されている。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として唯一存在するのは、世界保健機関(WHO)の生物製品標準化専門委員会第47次報告(1998)(Technical Report Series No. 878, TRS 878)Annex I「生物製品製造用の *in vitro* 基材としての動物細胞の使用の要件」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」というものであり、この試験の目的は、生物製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。造腫瘍性の程度的大幅な変化又はその有無に変化が生じた場合、細胞特性に何らかの異常が起こった指標となる。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一つとして評価し、品質管理に活用することがWHO TRS 878では必要とされている。ここで注意しなければならないのは、その適用対象である。WHO TRS 878の適用対象は、あくまでワクチンやタンパク質製剤など、ヒトに投与される生物製品を製造する際に *in vitro* 基材として用いられるヒト又は動物由来の細胞であって、「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、対象外とされている。

注2:iPS細胞等加工製品中の未分化iPS細胞ないし造腫瘍性細胞の混入の評価の最終的な目的は、製品中の細胞の増殖異常の検出にある。したがって、iPS細胞等加工製品の場合、厚生労働省の指針である「ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第4号)及び「ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について」(平成24年9月7日薬食発0907第5号)に例示されている非臨床安全性試験に関する確認事項の中でも「培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことや目的細胞以外の細胞が異常増殖していないことを明らかにすること」が重要となる。

<参考> 委員名簿・開催日程等

1. 委員名簿（敬称略）

飯原 弘二	国立循環器病研究センター 脳血管部門長・脳神経外科部長
○岡野 栄之	慶應義塾大学医学部 生理学教室 教授
尾崎 博	東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
澤 芳樹	大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座心臓血管外科学 教授
榛村 重人	慶應義塾大学医学部 准教授
末盛 博文	京都大学 再生医科学研究所 胚性幹細胞研究分野 准教授
高田 英俊	九州大学大学院医学研究院 成長発達医学 准教授
高橋 和利	京都大学 iPS 細胞研究所 講師
豊田 雅士	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター 研究副部長
◎中畑 龍俊	京都大学 iPS 細胞研究所 副所長
中村 利孝	独立行政法人国立国際医療研究センター 総長特任補佐
松井 茂之	名古屋大学大学院医学系研究科 教授
間野 博行	東京大学大学院医学系研究科 教授
森尾 友宏	東京医科歯科大学大学院 発生発達病態学分野 准教授
※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

（◎：部会長 ○：副部会長 ※：臨時委員）

2. 開催日程等

○第三回細胞組織加工製品専門部会

開催日時：平成 24 年 12 月 26 日

検討事項：提供された話題を踏まえ討議

話題提供：高橋和利委員 iPS 細胞の品質評価について

○第四回細胞組織加工製品専門部会

開催日時：平成 25 年 2 月 6 日

検討事項：提供された話題を踏まえ討議

話題提供：間野博行委員 発がんメカニズムとその検証法

○第五回細胞組織加工製品専門部会

開催日時：平成 25 年 4 月 25 日

検討事項：提供された話題を踏まえ討議

話題提供：佐藤陽治臨時委員 再生医療製品（細胞組織加工製品）の造腫瘍性評価

○第六回細胞組織加工製品専門部会

開催日時：平成 25 年 5 月 15 日

検討事項：提供された話題を踏まえ討議

外部有識者からの話題提供：公益財団法人先端医療振興財団 松山晃文氏
再生医療とレギュラトリーサイエンス

○第七回細胞組織加工製品専門部会

開催日時：平成 25 年 7 月 16 日

検討事項：提供された話題を踏まえ討議及び造腫瘍性について取りまとめ

外部有識者からの話題提供：国立がん研究センター 柴田龍弘氏
iPS 細胞における造腫瘍性リスク評価に関して
日本医科大学 島田隆氏
遺伝子治療の現状と課題