

【別添様式】

革新的医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業
最終報告書（平成25年度～28年度）

研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

研究事業名	多能性幹細胞由来細胞最終製品（エンドプロダクト）の類似性判断の根拠とそれをふまえた自家、他家移植における非臨床試験パッケージの検討
分類	医薬品主体・医療機器主体・再生医療主体
<p>1. 研究の概要</p> <p>(1) 高品質の移植用網膜色素上皮細胞を得られる iPS 細胞特性の評価法確立</p> <p>研究代表者のグループが実施しているヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮 (RPE) 細胞移植の臨床研究に関連し、ヒト iPS 細胞の樹立(細胞の初期化)、さらに iPS 細胞から分化誘導した RPE 細胞の作製の際に生じる染色体へのランダム変異の有無を検査し、臨床応用への安全性を評価及び担保できる iPS 細胞や分化誘導細胞の評価基準を確立する為、様々な解析を実施する。</p> <p>一例として Transcriptome 解析がある。具体的には、iPS 細胞の樹立、RPE 細胞の作製並びに機能評価は理研 CDB 高橋研究室にて実施し、mRNA のコピー数(転写量)と転写開始点を探索することが可能な 5'Cap 構造を利用した CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 解析を、iPS 細胞と RPE 細胞を用いて実施する。mRNA コピー数の増減が有意に認められる遺伝子群の中からデータ間と細胞特性との相関解析を通して評価マーカーを同定する。また、腫瘍原性を獲得した場合に異常な転写開始点がいくつかの遺伝子座で発生することが知られているので、樹立した iPS 細胞群で異常な転写開始点を有する遺伝子 locus が存在するかどうかを特定する。解析データを細胞表現型(iPS 細胞の核型・分化能、RPE 細胞の機能特性や純度等)に対して随時、feedback を行い、細胞特性を特異的に定義できる次世代評価法確立を目指す。</p> <p>(2) 人材交流とガイドライン作出のための意見交換</p> <p>人材交流では、世界初となる iPS 細胞を用いた再生医療において、特に眼科領域の治療について細胞品質や治験デザインの基準をどう考えるかを意見交換し相互の理解を深める。細胞品質については、これまでの研究により研究室内外に多くの知見が蓄積している。これらを集約しこれまでのガイドラインを再検討する。また臨床研究で得られた経験を踏まえて、網膜再生医療の治療デザインについて臨床医と統計家で検討を行う。この検討会自体を PMDA との人材交流の一環ともする。</p>	

2. 研究の概要及び成果について

(1) ガイドライン等の策定に必要な試験・研究

(平成 25 年度)

■ 必要な細胞サンプルの準備

(ア) 倫理審査委員会による承認

使用する iPS 細胞は健常人または網膜変性疾患患者等のドナーの細胞より作製するが、先行していた患者等 iPS 細胞作製研究は協力臨床機関である先端医療センター病院及び理化学研究所神戸 CDB のそれぞれの倫理委員会の承認をすでに受けていた。本研究では理化学研究所 横浜研究所の次世代シーケンサーを用いた網羅的 RNA 解析を行うため、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて実施する必要がある。そのため、理研神戸・横浜それぞれの倫理委員会にて追加の承認を得るとともに、iPS 細胞の元になった体細胞を提供した被験者より研究に関する再同意を取得した。

(イ) 特性解析を考慮したサンプル準備

本研究の性質上、世界初の患者への iPS 細胞由来 RPE 移植のための臨床研究を準備する理研神戸と次世代シーケンサーを活用した RNA の網羅的解析の豊富な経験・データを有する理研横浜との相互理解のもと、研究に供されるサンプルの準備が必要であった。理研横浜における解析部門が ISO9001 を取得するなど、QA/QC を担保する解析データを創出する取り組みを行っているため、解析サンプルの特性に基づいた綿密な協議を行った。具体的には iPS 細胞や RPE の培養特性、RNA の不安定な特性に基づくサンプル処理法、網羅的解析に必要なサンプル量、さらには、得られる膨大な塩基配列データを元に有効なデータを抽出するためにバイオインフォマティクス解析の専門家を交え、比較群の有用性を担保し活用するサンプルが決定された。2013 年には CAGE のパイロット試験に供する 11 サンプル、本解析用に 50 サンプルを作製した。

■ CAGE 解析（網羅的 RNA 転写開始点解析）

(ア) 次世代シーケンサーを活用した CAGE 解析プラットフォームの構築

本解析により得られるデータの信頼性を担保するべく、サンプル処理の効率化およびサンプル間の誤差の排除のため、解析部門では CAGE 解析用の試薬のキット化、工程の SOP 化、試薬調整ロボットの有効活用などを経てプラットフォームが構築された。

(イ) 解析データサーバーの構築

本解析により、次世代シーケンサーから膨大な塩基配列データが産出される。今後のデータの増大化およびデータベース化を担保した大容量データサーバーが構築された。（理研予防医療・診断技術開発プログラム新設準備金 1 億円の投資を含む。）

(平成 26 年度)

■ iPS 細胞および RPE 細胞の特性解析に必要なサンプルの準備

前年度までに準備したサンプルに加え、本年 9 月に行われた加齢黄斑変性の患者に対する第一例目の iPS 細胞由来 RPE シート移植臨床研究の検体について、解析準備を開始した。また臨床研究第一例目の移植にあたり移植に使用した iPS 細胞および RPE 細胞のホールゲノムシーケンスやメチローム解析を京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) と共同で実施した。RPE のメチローム解析について、コントロールとして海外ドナー眼由来の RPE を林崎チームから神戸を通して CiRA に提供した。

■ CAGE 解析 (網羅的 RNA 転写開始点解析)

前年度までに構築した次世代シーケンサーを活用した CAGE 解析プラットフォーム及び解析データサーバーを使用して、各種サンプルから RNA を抽出し、CAGE ライブリーの調製と次世代シーケンサーによるデータ取得を行い、データ品質を評価した。具体的には RPE シート作製時に発生することがある間質細胞様細胞がどのような遺伝子発現プロファイルを持った細胞から発生するのか、培養条件が生み出すのかを検討するために、数名のドナー皮膚線維芽細胞より作製したフィーダー細胞、iPS 細胞、iPS 細胞由来 RPE 細胞と、間質細胞様細胞についての解析を実施した。その結果、39 サンプルに由来する良好な CAGE データを得た。CAGE 解析の結果からは、適切な CAGE プロファイルが得られていることが示された。

■ 眼科先端医療治験デザイン研究会

網膜再生医療の臨床試験デザインについて、眼科医と統計家などの意見を集約し検討する研究会を 5 回開催した。

(平成 27 年度)

■ iPS 細胞および RPE 細胞の特性解析

臨床研究第 1 例目および 2 例目の実施にあたり作製した iPS 細胞および RPE 細胞のホールゲノムシーケンスやメチローム解析を CiRA と共同で実施した。

■ CAGE 解析 (網羅的 RNA 転写開始点解析)

前年度までに加え、primary の RPE 細胞など参照データとなる 30 の良好な CAGE データを得た。臨床研究第 1 例目のサンプルを含むこれら合計 69 サンプルの網羅的包括的なトランスクリプトームのデータセットは将来の再生医療研究の発展に資する貴重な基盤となる。

臨床研究の被験者を含む複数名のドナー由来の細胞を含め、CAGE データを総合的に詳細な解析を進めた。その結果、フィーダー細胞、iPS 細胞、RPE 細胞ともにそれぞれのクラスターに集積し、細胞種毎にかなり類似したプロファイルを持つ細胞が得られていることが確認できた。細胞間のばらつきの程度や細胞の品質を表すマーカーの探索を

進める準備が整った。

■ iPS ゲノム変異解析

iPS 細胞の全ゲノムデータを公開データベースから入手し、iPS 細胞樹立過程におけるゲノムの変異特性の解析に着手した。

(平成 28 年度)

■ iPS 細胞および RPE 細胞の特性解析

臨床研究の結果について、再生医療臨床研究における移植細胞の安全性評価の考え方について盛り込んだ論文を発表した。(Mandai et al., 2017, NEJM)。また、CiRA の作製した HLA ホモの iPS ストックを用いた他家 iPS 細胞由来 RPE 移植の臨床研究について実施準備を進め、ホールゲノムシーケンス等を行い、他家第 1 例目の移植を実施した。

■ CAGE 解析 (網羅的 RNA 転写開始点解析)

これまでに蓄積した全 CAGE データの解析を継続し、それぞれの細胞種のプロファイルから、それぞれの細胞種を効率良く区別することのできるマーカー遺伝子候補 7 種が抽出された。これら小数の遺伝子の発現状態を測定することで、iPS 細胞やフィーダー細胞、間質細胞様細胞の混入を評価できる可能性が示唆された。

■ iPS ゲノム変異解析

iPS 細胞の全ゲノムデータを詳細に解析し、樹立過程で発生する変異はヘテロクロマチン領域に偏っており、癌形質の獲得など細胞機能に影響を与える可能性は大きくないことが示唆された。結果を学術誌に投稿した。

(2) ガイドライン等の策定

(平成 25 年度)

CAGE 解析のパイロットスタディにより、iPS 細胞由来 RPE の様々なラインについて個人の差、iPS 作成方法の違いなどの検討が行われ、その解析結果をもとに、クラスタリングを行ったところ、iPS 作成方法の違い、iPS 細胞の作成および維持培養時のフィーダー細胞の違いによる差が認められただけでなく、サンプル調整から次世代シーケンス解析に至る全行程の Validation に資する経験も得られた。これらの知見・経験を元に、CQA (Critical Quality Attributes: 重要品質特性) を得るべく、次年度用解析サンプルの準備がなされ、解析データ蓄積への礎を構築することができた。

(平成 26 年度)

■ 細胞の品質評価

特性解析に資する解析データの蓄積を開始し、今後さらにインフォマティクス解析を進め、細胞間のばらつきの程度や細胞の品質を表すマーカーの探索を進める準備が整った。ガイドライン創出に向け、レギュラトリーサイエンスの観点から研究実施および研究成果の活用に必要な専門知識の共有を図ることができた。ガイドライン創出に向けたワーキンググループなどでの議論の土台を作ることができた。

■ 臨床における有効性評価

眼科医、臨床統計家、PMDA を集めて行った治験デザイン研究会では、眼科医にとっては治験デザインの考え方、統計家、PMDA にとっては眼科検査の特性などの理解につながり、網膜細胞移植というまったく新しい治療の効果の考え方、承認のあり方などを深く議論することができ、それぞれの分野の者も納得する治験デザインを考えることができた。

(平成 27 年度)

■ 細胞の品質評価

臨床研究の 1 例目、2 例目の全ゲノムシーケンス、エピゲノム解析、single cell PCR の結果と *in vivo* 造腫瘍試験の結果、さらに文科省の幹細胞・再生医学戦略作業部会での議論を含めて 2013 年に自己細胞、2014 年に同種細胞について報告された厚生労働省次世代医療機器評価指標検討会 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標について、NIHS、PMDA 担当者を含めて議論し、ガイドライン創出の議論をスタートした。また造腫瘍試験に関してなど PMDA において戦略相談事前面談を行った。

■ 臨床における有効性評価

前年度までに治験デザインを考える会で検討した治験デザインについて治験実施企業と議論検討した。

(平成 28 年度)

■ 細胞の品質評価

引き続き人材交流により NIHS や PMDA と共にガイドライン創出に向け、レギュラトリーサイエンスの観点から研究を実施し、iPS 細胞と分化させた目的細胞や混入する他の細胞を効率良く区別することのできるマーカー遺伝子についての検証を進めた。ガイドラインの完成には至らなかったが、本事業のこれまでの成果及び臨床研究の事例を踏まえ、多能性幹細胞由来 RPE 細胞の品質及び安全性評価のための留意点を報告書としてとりまとめた (別紙)。

■ 臨床における有効性評価

本事業において検討した治験デザインをベースに効果判定の基準について議論を深めていくために、日本眼科学会においてワーキンググループを立ち上げた。

3. 研究の組織体制及び人材交流実績等について

(1) 組織体制

(平成 25～28 年度)

(ア) 総括研究代表者

理化学研究所 多細胞システム形成研究センター (理研 CDB ; 神戸)
網膜再生医療研究開発プロジェクト プロジェクトリーダー 高橋政代

(イ) 副総括研究代表者

理化学研究所 産業連携本部 予防医療・診断技術開発プログラム (理研 PMI ; 和光) プログラムディレクター 林崎良英

(ウ) 人材交流

医薬品医療機器総合機構 (PMDA)
国立医薬品食品衛生研究所 (NIHS)

(エ) iPS 細胞および RPE 細胞作製、RNA 抽出

理研 CDB ; 神戸

(オ) CAGE 解析

理化学研究所 ライフサイエンス基盤研究センター機能性ゲノム解析部門
(理研 CLST-DGT ; 横浜)

(カ) バイオインフォマティクス解析

理化学研究所 情報基盤センター (理研 ACCG ; 和光、横浜)

(キ) 理研横断型研究コーディネート

理研 PMI ; 和光、横浜

(2) 人材交流の状況・効果

(平成 25 年度)

- PMDA 再生医療製品等審査部より審査専門員 嶽北和宏氏が、理化学研究所 CDB へ PMDA 在籍派遣職員として人材交流を開始。
- 理化学研究所産業連携本部 予防医療・診断技術開発プログラムより向後泰司が非常勤特任職員 (週 1 回出勤) として、PMDA と人材交流を開始 (配属先: 再生医療製品等審査部)。
- NIHS 遺伝子細胞医薬部 佐藤陽治部長と研究内容およびガイドライン創出に関する相談を開始。

- 研究代表者である高橋政代がPMDAにてセミナーを実施。

第1回：12月5日（木）17：00～18：30

iPS細胞の網膜疾患への応用と産業化

第2回：2月18日（火）17：00～18：30

iPS細胞由来網膜色素上皮移植—適応、手術

第3回：3月25日（火）16：30～18：00

網膜細胞治療 非臨床試験の実際と問題

（平成26年度）

- 引き続きPMDA再生医療製品等審査部より審査専門員 嶽北和宏氏が、理化学研究所CDBへPMDA在籍派遣職員として人材交流を実施。
- 引き続き理化学研究所産業連携本部 予防医療・診断技術開発プログラムより向後泰司を非常勤特任職員としてPMDAに派遣。
- NIHS 遺伝子細胞医薬部 佐藤陽治部長と、研究内容およびガイドライン創出に関する相談を実施。
- 眼科先端医療治験デザイン研究会を開催。PMDA 嶽北氏参加。
 - プレ会議：2013年12月26日（木）
 - 第1回：2014年2月19日（水）
 - 第2回：2014年4月2日（水）
 - 第3回：2014年5月27日（火）
 - 第4回：2014年7月8日（火）
 - 第5回：2014年9月17日（火）
- iPS細胞由来RPE移植についてのPMDA薬事戦略相談事前面談実施。

（平成27年度）

- 引き続きPMDA再生医療製品等審査部より審査専門員 嶽北和宏氏が、理化学研究所CDBへPMDA在籍派遣職員とし定期的に人材交流。臨床研究の状況の報告、検討を実施。
- NIHS 佐藤陽治部長、PMDA担当者を含めてガイドライン案作成及びマーカー検証実験に関する会議、メールでの議論を実施。
- 同種iPS細胞由来RPE細胞浮遊液の治験についてPMDA薬事戦略相談事前面談実施。

（平成28年度）

- 理化学研究所多細胞システム形成研究センター網膜再生医療研究開発プロジェクトより森永千佳子を常勤特任職員としてPMDAに派遣（配属先：再生医療製品等審査部）。iPS細胞を用いる再生医療等製品の開発に際し、品質及び安全性に関する

考え方について開発者の立場と規制当局の立場からの意見交換を行い、相互に理解を深めた。

- NIHS 佐藤陽治部長らとガイドライン案作成及びマーカー検証実験に関する会議、メールでの議論を実施。

4. その他（論文等を含む）

- Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. N. Engl. J. Med. 376:1038-46. 2017
- Yoshihara M., Hayashizaki Y., Murakawa Y. Genomic stability of iPSCs: challenges towards their clinical applications. Stem Cell Reviews and Reports 2016 Sep 5
- Yoshihara M., Araki A., Kasama Y., Hoki Y., Sunayama M., Nishida K., Kawaji H., Hayashizaki Y., Abe M., Murakawa Y. Hotspots of de novo point mutations in induced pluripotent stem cells. In revision in Cell Reports

【注】

1. 報告書は、日本工業規格A4の用紙を用いて、各項目の記載量に応じて、適宜、欄を引き伸ばして記載願います。
2. 報告書中2. 及び3. の項目については、これまでの経緯等を、原則、年度毎に記載願います。
3. 報告書は、要点を簡潔に記載し、参考情報等は、適宜、別添資料として添付願います。最終的に、厚生労働省HP等で公表を予定しています。