

## iPS 細胞由来 RPE に関する評価指標 補遺 (案)

革新的医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業 報告書

多能性幹細胞由来網膜色素上皮 (RPE) の品質・安全性評価に関する留意点と課題 (案)

## 1 はじめに

平成 24 年度から厚生労働省・独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (以下「PMDA」という。) により「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」が開始された。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では、平成 25 年度より本事業に採択され、iPS 細胞由来網膜色素上皮 (RPE) の品質評価方法に関する研究を進めるとともに、「滲出型加齢黄斑変性に対する自家 iPS 細胞由来 RPE シート移植に関する臨床研究 (UMIN000011929) (以下、「本臨床研究」)」を開始し、平成 26 年 9 月には世界に先駆けて患者自身から作製した iPS 細胞由来の RPE 細胞シートを患者の網膜色素上皮に移植する臨床応用を実施した。

本書は、本事業のこれまでの成果及び本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取りまとめたものである。

## 2 本書の位置付け

本書は、平成 25 年 5 月 29 日付薬食機発 0529 第 1 号「自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標」及び平成 26 年 9 月 12 日付薬食機参発 0912 第 2 号「同種 iPS (様) 細胞由来網膜色素上皮細胞に関する評価指標」に示された多能性幹細胞に由来する RPE 細胞をヒトに移植するにあたっての品質・安全性評価の考え方を、前述の臨床研究の実施により得られた品質・安全性評価の知見や経験を踏まえて補完するものである。

本書は、技術開発の著しい iPS 細胞等を加工した製品を対象とするものであることを勘案し、留意すべき事項を網羅的に示したものではなく、現時点で考えられる点を示している。よって、今後の更なる技術革新や知見の集積等を踏まえ改訂されるものであり、製造販売承認申請内容に関して拘束力を有するものではない。製品の評価にあたっては、個別の製品の特性を十分理解した上で、科学的な合理性をもって柔軟に対応することが必要である。

なお、本書は、多能性幹細胞由来 RPE 細胞の安全性評価の考え方について、主に iPS 細胞から分化誘導した RPE について取り扱うが、ES 細胞から RPE を分化誘導する場合や、その他の方法 (例えばダイレクトリプログラミング法) においても、考え方は参考となる場合がある。

### 3 品質・安全性評価において留意すべき点

#### 3.1 ハザード管理 (細胞の造腫瘍性について)

一般的な製品製造と同じく、ヒト細胞加工製品においても、ハザード分析及び管理は必要であり、また、ハザードについても「明らかなハザード」と「潜在的ハザード」を区別して考える必要がある。多能性幹細胞由来加工製品における「明らかなハザード」とは、最終製品中に、目的外細胞として悪性形質転換細胞 (増殖異常を示す細胞) や、iPS 細胞を含むその他の増殖を続ける分化が完了していない細胞が混在している場合が考えられる。目的細胞が RPE 細胞の場合には、RPE65 や Bestrophin-1 などの RPE 特異的マーカーを用いた免疫染色による純度試験及び、幹細胞マーカーである Lin28 の発現を定量 PCR により検出することで高感度 (検出限界 0.02%) に未分化の細胞を検出する試験系を用いて未分化細胞否定試験を行う。

さらに、造腫瘍性を評価するための試験として、重度免疫不全マウスを用いる *in vivo* 移植試験や各種 *in vitro* 試験 (例えば細胞増殖試験、軟寒天コロニー形成試験等) から科学的合理性のある検出試験系を選択、実施し、ここから得られる知見をもとに「明らかなハザード」の規模とその安全性対策の検討を行う。一方で、混在する目的外細胞のリスクの大きさを評価し、期待されるベネフィットと比較して十分に小さいことを確認しておくことが必要である。「潜在的ハザード」としては、最終製品における遺伝子変異 (特に腫瘍に関連するドライバー変異) 及びゲノム上の大きな欠失や挿入があげられる。これらについては、前述の明らかなハザードが回避されている治療プロトコールにおいて、ベネフィットと比較して許容可能であるか十分に検討することが必要である。

リスク評価については、対象疾患の特性を踏まえた検討を行うことが重要である。網膜変性疾患の多くは生命を脅かす疾患とは言えないが、身体の機能を損なうことにより患者の QOL を著しく損なうものである。従来の治療法では限界があり、克服できない患者が「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」も含めて、リスクの大小を勘案した上で、リスクとベネフィットのバランスを評価することが必要である。

#### 3.2 最終製品における安全性評価/安全性対策の考え方

再生医療等製品の安全性基準は、由来となる細胞 (体性幹細胞、ES 細胞、iPS 細胞など) に依存するのではなく、実際に移植される最終製品に含まれる構成細胞の特性、投与経路等を含む製品の使用方法、疾患に対する製品の作用機序 (MoA: Mode of Action)、症例の状態 (移植される先の環境)、万が一有害事象が発生した場合の対応策の有無等を踏まえて議論されるべきである。すなわち a) 移植細胞が体内で生着せず短期間で消失する治療、b) 移植細胞が長期に生存するが増殖はしない治療、c) 移植細胞が長期に

## iPS 細胞由来 RPE に関する評価指標 補遺 (案)

生存し分裂を続ける治療、に分類して考えることが妥当と考えられる。細胞が短期で消失する治療であれば安全性の確保は比較的容易である。体性幹細胞を用いる治療は多くがこれに当てはまる。移植細胞が長期に生存するが細胞分裂は長く続かない治療であれば、*in vivo* の造腫瘍試験を以て腫瘍形成能を判定できる。しかし移植細胞が長期に渡って生存し分裂を続ける場合は、生体内で遺伝子変異が生じ、形質転換が起きる確率がより高まるので、移植する前の細胞において、腫瘍を引き起こす可能性がある遺伝子変異を検索しておくことは重要であると考えられる。RPE 細胞移植は b) にあてはまることから、*in vivo* 造腫瘍性試験を以て評価を行うことが妥当であり、遺伝子変異を確認する必要性は大きくないと考えられる。ただし、免疫不全マウス・ラットを用いた RPE の網膜下（臨床投与経路）移植については、小動物ゆえに手術侵襲が大きく、結果判定が困難となる可能性があることに留意が必要である。

また、細胞移植後、晩発性に生じる腫瘍は、a) 腫瘍の増殖が緩やかで発見が遅くなる場合、b) 体内で分裂を繰り返す細胞が新たな遺伝子変異を獲得して腫瘍形成能を持つ場合、c) 何らかの外的・内的要因によるエピジェネティクスの変化が起きる場合が考えられる。RPE 細胞移植は外部から観察できる眼への移植であることから a) の可能性は低く、また前述のように b) には当てはまらない。c) のリスクについては体内の他の細胞と同程度である。

### 3.3 RPE 細胞における安全性の考え方～本臨床研究における事例から～

RPE 細胞はこれまで眼外に転移した悪性腫瘍の報告がなく、増殖能が限定的であり、さらに抗腫瘍作用のある Pigment epithelium-derived factor (PEDF) を自ら分泌している。また移植場所である眼内は、同じく抗腫瘍作用のあるレチノイン酸で満たされており、腫瘍を作りにくい環境である。

また、RPE 細胞は最終分化細胞であり、多能性幹細胞から分化誘導した RPE 細胞もまた、体細胞として得られる RPE 細胞と同様の特性を備えていることが示されている。

本臨床研究においては、これらの RPE の特性及び厚生科学審議会科学技術部会の意見を踏まえ、iPS 細胞由来 RPE の安全性評価に関し、以下の試験を実施した。

#### ◆ 規格として設定した試験

- ① 無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験
- ② 純度試験（免疫染色）
- ③ 未分化細胞検出試験（qRT-PCR for Lin 28）
- ④ プラスミド残存検出試験（qRT-PCR）

## iPS 細胞由来 RPE に関する評価指標 補遺 (案)

- ⑤ In vivo 造腫瘍試験 (重度免疫不全マウスへの移植)
- ⑥ 核型解析 (\*iPS 細胞の段階で実施)

## ◆ 追加実施した試験 1

- ⑦ PCR 法による感染症検査 (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, トキソプラズマ、結核、梅毒、クラミジア、マイコプラズマ、HTLV-1, HTLV-2, BK ウイルス、JC ウイルス、パルボウイルス B19、HBV, HCV, HIV-1, HIV-2)
- ⑧ in vitro ウイルス試験 (指標細胞: MRC-5, Vero C1008, HeLa)
- ⑨ ゲノム解析
  - エクソーム解析による一塩基変異 (SNV) の検出
  - SNP アレイによる CNV 解析
  - キャプチャーシーケンス (遺伝子導入用プラスミド配列の検出)

## ◆ 追加実施した試験 2 (共同研究として CiRA が中心となり実施)

- ⑩ プラスミド残存の否定 (全ゲノムシーケンス、定量 PCR、キャプチャーシーケンス再解析)
- ⑪ ゲノム不安定性、CNV、構造異常の否定 (全ゲノムシーケンス)
- ⑫ 危険な SNV 及び挿入欠失変異 (Indel) の否定 (全ゲノムシーケンス)
- ⑬ 危険な亜集団の否定 (全ゲノムシーケンス)
- ⑭ 主要癌抑制遺伝子の異常メチル化の否定 (全ゲノムバイサルファイトシーケンシング及び Infinium 解析によるエピゲノム解析)
- ⑮ Single cell RT-PCR による均一性の評価

これらの試験の結果から、以下の考察を得た。

- 1) プラスミド残存検出試験においては⑩全ゲノムシーケンスにおいてプラスミド配列が検出された細胞株は、④定量 PCR により残存が検出された細胞株と一致しており、検査方法としては、より簡便で信頼度の高い定量 PCR を用いることが妥当であると考えられた。
- 2) 全ゲノムシーケンスで検出された SNV 及び Indel に、⑪⑫に関しては、オリジン (iPS 作製前のドナーの線維芽細胞) との比較により iPS 樹立以降に生じたものか、もともとドナー細胞に含まれていたものかについて、詳細な検証を行った。その結果、大部分の変異はオリジンにもモザイクに存在することが確認された。しかし一方で、データの解釈については、その信頼性や判断の基準

## iPS 細胞由来 RPE に関する評価指標 補遺 (案)

となる情報の蓄積が未だ不十分であることから、現時点ではこれらの解析結果を以て臨床応用の妥当性を評価するに足りるレベルにはないと考えられた。

- 3) 同様に⑬危険な亜集団の否定、⑭エピゲノム解析についても、再検査により結果が異なる、評価のために比較対象とすべきデータが無いなど、判断基準とするレベルに達していないと考えられた。
- 4) Single cell PCR による細胞純度は、②免疫細胞化学的に判定した純度と同じ結果であり、免疫細胞化学的検査法で妥当であると考えられる。
- 5) 追加解析の結果は、少なくとも RPE においては、現時点では、Critical Quality Attributes (CQA) の観点からの評価が必要十分であり、追加で実施した解析方法はそれらを超えるものではないことを示すものである。

### 3.4 新規の細胞特性解析技術

技術開発の著しい本分野においては、既存の評価技術の活用をはかると共に、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。本臨床研究でも、移植細胞の評価に関する新しい試みとして、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンスや、エピゲノム解析を実施した。しかしながら、これらの解析については、最新技術の活用という側面から一定の意義は見出せるものの、得られたデータについては、現時点ではいづれも、臨床応用の妥当性を判断するレベルにはないことが示された。今後、これらを活用して行くためには、データの蓄積を進めつつ、試験の精度を高め、バリデートされた試験系を構築することが重要である。

なお、将来的に細胞加工物の品質評価や規格設定のために有用である可能性を持つその他の評価手法としては、例えば以下のものが挙げられる。

- トランスクリプトーム解析 (CAGE 法など)
- 1 分子 DNA ゲノムマッピングシステム (Irys System)

## 4 移植治療の評価方法

評価判定においては臨床的有用性 (Clinical Benefit Response, CBR) の概念に基づく総合的評価を行うことが妥当であると考えられる。