

日本医療研究開発機構 医薬品規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）ヒト又は動物細胞加工製品の品質・安全性・有効性確保のための評価法開発及びガイドライン策定に関する研究
（英語）Studies on development of quality, safety, and efficacy assessment methods and guidelines for human/animal cell based therapeutic products

研究開発実施期間：平成30年4月1日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）佐藤 陽治
（英語）Yoji Sato

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長
（英語）National Institute of Health Sciences, Division of Cell-Based Therapeutic Products, Head

II 研究開発の概要

1. 異種由来移植用細胞（動物細胞加工製品）のウイルス安全性確保

平成28年、「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」が改定され、動物細胞加工製品のヒトへの臨床利用が可能になった。すでに糖尿病患者を対象としたブタ膵島移植が計画されるなど、今後、動物細胞加工製品の開発が活発化すると予想されている。本研究では、ブタ由来製品で最も懸念されているブタ内在性レトロウイルス（PERV）に関して、ヒトに感染するリスクのあるウイルスのみを検出できる新規試験法の開発を行った。

ヒト293細胞とブタPK15細胞と共培養し、PK15細胞の持つPERVを293細胞に感染させた。このPERV感染293細胞からRNAを抽出し、次世代シーケンサー（NGS）によってmRNAの配列を解析することで（RNA-Seq解析）、293細胞に感染したPERV配列を同定した。また、PK15細胞のゲノム配列もNGSによって決定した。293細胞のmRNAから検出されたPERV配列をPK15細胞のゲノム上で探し、ブタゲノムのどのPERVが実際に293細胞に感染したか明らかにした。またPK15細胞のRNA-Seq解析を行い、293細胞に感染したPERVの発現を確認したところ、293細胞に感染したPERVは100%近い領域がmRNAとして発現しており、検出されるリード数も多いことがわかった。現在の試験では、内在性レトロウイルスは、感染性があるか、ないか？ウイルスタンパク質の活性が高いかどうか？等

か評価できないが、NGS を用いることにより、ヒト細胞に感染力のある内在性レトロウイルスのコピー数や発現量を評価することができることを示した。

2. ヒト間葉系幹細胞の再生医療等製品の原料等としての特性解析法の開発

ヒト間葉系幹細胞 (MSC) は、自己複製能や内・中・外胚葉系細胞への分化能だけでなく損傷部位への集積能 (遊走能)、液性因子分泌能及び免疫調節作用等を持つことが知られている。MSC は再生医療等製品の原料等としての利用が期待されており、MSC 加工製品を用いて様々な疾患を対象とした複数の治験が国内外で現在進行中である。

本研究では、MSC に期待される細胞遊走能やサイトカイン産生能等に及ぼす生体内環境による影響について検討することによって、MSC の再生医療等製品の原料等としての特性解析法の開発の際に留意すべき試験項目や試験法を探索することを目的とした。

骨髄由来 (BM)、脂肪由来 (AD)、羊膜由来 (AM) の MSC を用いて、MSC の性能や特性と関連する 1) 細胞遊走能、2) サイトカイン産生能、3) 虚血応答性について、生体内環境 (足場) や *in vitro* 培養期間の及ぼす影響について検討した。細胞遊走能については、由来によって差がみられ、TGF β シグナル伝達の亢進や MMP1 等の発現レベルの変化もみられた。サイトカイン産生能に及ぼす MSC の由来や足場 (コラーゲンゲル) の影響については、MSC の性能と関連すると推察される複数のサイトカインについて検討し、サイトカインによって MSC の由来や足場による影響に違いがみられた。培養期間の影響としては、コラーゲンゲル上での MSC の培養により、培養期間の長さに伴う細胞老化に関連する遺伝子群の発現レベルの増加を抑え、IL-6, MCP-1 産生量増加も抑える事がわかった。さらに、虚血応答性に関しては、コラーゲンゲル上での培養により、血管系の発達や血管内皮細胞の遊走等に関連する遺伝子群の発現レベルが有意に上昇することが認められ、また、培養期間が長くなることにより MSC の虚血応答性が下がることがわかった。

MSC の性能や特性の一部である細胞遊走能やサイトカイン産生、虚血応答性に対し、MSC の由来、及び *in vitro* 培養における足場環境や培養期間が影響を及ぼすことが示された。原料等としての MSC の特性解析法を定める際の留意すべき点として、目的の再生医療等製品 (最終製品) から期待される MSC の性能を選定し、目的に合った性能評価のための MSC の由来や培養条件 (培養期間や足場環境等) を定めることが重要であろう。

3. ヒト細胞加工製品中に僅かに混在する悪性形質転換細胞の高感度検出法のアプリケーションの開発

ヒト細胞加工製品において製造時の形質転換細胞の混入は、製品の安全性の上で懸念される。軟寒天コロニー形成試験法は、形質転換細胞の足場非依存性増殖能を利用し、*in vitro* で形質転換細胞を検出する試験として広く知られている。近年さらに感度が高いデジタル軟寒天コロニー形成試験法が開発されたが、どのような形質転換細胞がどのくらい検出可能であるかの性能については、まだ十分に検討されていない。本研究課題では、デジタル軟寒天コロニー形成試験法の性能評価において、陰性コントロール細胞として再生医療等製品としての使用が期待されている体細胞および体性幹細胞を、陽性コントロール細胞として研究で一般に用いられる形質転換細胞株等を検討し、情報の蓄積と公開を行う。また同時に簡便性を高めた悪性形質転換細胞の高感度検出法も開発する。デジタル軟寒天コロニー形成試験法の性能評価の一環として、各種形質転換細胞株をヒト線維芽細胞やヒト間葉系幹細胞といった陰性コントロール細胞にスパイクし、性能評価試験を実施し、コロニー形成率等の基礎的なデータを取得した。さらに従来の軟寒天培地の代わりに新規ポリマーを添加した液体培地を用いる新しい三次元細胞培養法の検討を行った。形質転換細胞である HeLa 細胞と正常細胞である MRC-5 との新規培地での共培養時において、HeLa 細胞の高頻度なコロニー形成が認められたことから、新規三次元培養法の有用性が

強く示唆された。各種形質転換細胞を用いて従来の軟寒天ゲル法とのコロニー形成能等の比較を行い、細胞種によってはそれぞれの方法でコロニー形成のしやすさが異なる等、試験法を製品の評価に適用する上での留意点を明らかにした。新たな悪性形質転換細胞の高感度検出試験法として標準プロトコールの作成と試験法のバリデーションが今後期待される。

4. 潜在的ハザードとしてのゲノム安定性を定量的に評価するための新しい細胞特性指標の確立

現在、ヒト iPS 細胞を原材料とした再生医療等製品の開発が国内外において活発に行われている。しかしながら、ヒト iPS 細胞由来細胞加工製品は従来の医薬品などとは全く異なる新しいタイプの製品であるため、安全性や品質の評価方法が十分に確立されているとは言い難い。特に、ヒト iPS 細胞の特性に起因したゲノム不安定性のリスク評価のあり方に関しては、国内外において継続的に議論が展開されているものの、未だ画一的な結論を得るまでには至っていないのが実情である。本分担研究課題は、次世代シーケンサー（NGS）を用いた細胞加工製品のゲノム評価系の意義について検討を行った。まず、培養細胞におけるゲノム不安定性の評価系を確立することを目指し、ゲノム不安定性を惹起する陽性対象細胞株として DNA 修復機構が破綻したヒト iPS 細胞を樹立し、NGS を用いた全エクソーム解析による変異解析を実施した。具体的には、DNA 修復機構が破綻したヒト iPS 細胞株について、短期または長期間培養した細胞群における DNA 変異を全エクソーム解析により検出し、DNA 変異の数の動的変動に及ぼす培養期間の影響について検証した。その結果、DNA 修復機構が破綻したヒト iPS 細胞株における DNA 変異の数的変動は正常なヒト iPS 細胞株よりも著しく高いことが観察された。一方で、培養に伴って生じた、あるいは消失した DNA 変異の数と培養期間との間には顕著な相関は認められなかった。このことから、本研究で樹立された DNA 修復機構が破綻したヒト iPS 細胞株は、長期間培養した場合においても、細胞集団内の個々の細胞の増殖性が乱れることなく一定の DNA 変異率を維持（ゲノムを安定に維持）しながら増殖していることが示唆された。また、複数種類の正常な iPS 細胞株を異なる培養条件下で長期間培養し、継代後に新規に生じた変異、及び、継代後に消失した変異の数を、上述と同様に NGS を用いた全エクソーム解析により経時的に評価し、培養条件の違いが細胞のゲノム恒常性の乱れに与える影響についても解析を行った。その結果、異なる培養条件間における iPS 細胞の DNA 変異の数には、著しい違いが認められた。このことは、培養条件が異なるとゲノム恒常性に乱れが生じることを示唆している。しかしながら、同一培養条件においては DNA 変異の量的変動が一定であったことを考慮すると、異なる培養条件間で観察された DNA 変異の量的差違は NGS 解析系の技術的バイアスに起因している可能性も否定できないため、DNA 変異を NGS において比較評価する場合には、細胞の培養条件を含めた一連の NGS 解析パイプラインを統一することが望ましいと考えられた。

5. ヒト ES/iPS 細胞加工製品中に僅かに残存する未分化 ES/iPS 細胞の高感度検出法のアプリケーションの開発

未分化な iPS 細胞は造腫瘍性を有することから、ヒト iPS 細胞加工製品中に iPS 細胞が残存した場合、腫瘍形成のリスクが存在する。そのため、未分化な iPS 細胞の除去・残存を確認する試験法が不可欠である。我々はこれまでに、心筋細胞などの分化細胞のみ死滅させる選択的細胞傷害性ウイルスベクターを用い、ヒト ES/iPS 細胞加工製品中に残存する未分化ヒト ES/iPS 細胞を濃縮して検出する新しい技術の実現可能性を示した。本研究では、神経前駆細胞に対しても開発したウイルスベクターが利用できるのか検討し、ヒト ES/iPS 細胞加工製品中に残存する未分化 ES/iPS 細胞の高感度検出法としての確立を目指した。

まず、CMV プロモーター下流に薬剤応答性自殺遺伝子を搭載した各種選択的細胞傷害性ウイルスベクターを用いて、不死化神経前駆細胞に対する細胞傷害性を検討した。その結果、アデノウイルス (Ad)

ベクターを作用した細胞において、約 90%の高い薬剤依存的な細胞傷害を示した。iPS 細胞を添加した不死化神経前駆細胞を用いて、細胞傷害性 Ad ベクターおよび薬剤作用後の生存細胞における未分化マーカー (TRA-1-60 および rBC2LCN) の発現量をフローサイトメトリーを用いて測定した。その結果、未分化マーカー陽性細胞率は、コントロールと比較して約 14 倍増加した。また、ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞における未分化マーカー陽性細胞率も、細胞傷害性 Ad ベクターおよび薬剤作用により、約 39 倍増加した。これらのことから、細胞傷害性 Ad ベクターは神経前駆細胞中の未分化細胞を 10 倍以上濃縮可能であることが示された。したがって、本手法は iPS 細胞加工製品中の残存未分化細胞の検出感度の向上に有用であると考えられる。

1. Viral safety for xenogenic cell-based therapeutic products

In 2016, Japan's Ministry of Health, Labor and Welfare revised its guideline for xenotransplantation in Japan, allowing the transplantation of non-human animal cells, tissues, and organs into humans, which hadn't been allowed. Along with this, the clinical use of animal cell-processed therapeutic products has been possible. At present, a porcine islet product for the treatment of type I diabetes is currently under development in Japan. As porcine cells possess endogenous retrovirus (PERV), which can replicate in human cells in vitro, the potential transmission of PERV has raised concerns in the case of products that use living pig cells as raw materials. Although several PERV sequences exist in the porcine genome, not all have the ability to infect human cells. Therefore, polymerase chain reaction analysis, which amplifies a portion of the target gene, may not accurately assess the infection risk. Here, we determined porcine genome sequences and evaluated the infectivity of PERVs using high-throughput sequencing technologies. RNA sequencing was performed on both PERV-infected human cells and porcine cells, and reads mapped to PERV sequences were examined. The normalized number of the reads mapped to PERV regions was able to predict the infectivity of PERVs, indicating that it would be useful for evaluation of the PERV infection risk prior to transplantation of porcine products.

2. Development of characterization analysis for human mesenchymal stem cells as raw materials for regenerative medicine products

Owing to human mesenchymal stem cells (MSCs) immunosuppressive, angiogenic, and tissue regeneration abilities and multilineage differentiation potential, MSCs are being used in cell therapy and regenerative medicine. The purpose of this study was to search for test items and test methods that should be noted when developing a characterization analysis for MSCs as raw materials for regenerative medicine products.

Using bone marrow-, adipose-, and amniotic membrane-derived MSCs, we revealed the effects of scaffold (collagen gel) and in vitro culture period on cell migration ability, cytokine production ability, and ischemia responsiveness, which are related to the performance and characteristics of MSCs. When determining the characterization analysis method for MSCs as raw materials, it is important to select the expected MSCs performance from the target regenerative medicine products (final products) and to select the origin of the MSCs and culture conditions (culture period, scaffold environment, etc.) for performance evaluation that suits the purpose.

3. Application development to detect small amounts of residual transformed cells contained in human cell therapy products

Contamination with transformed cells of human cell therapy products during manufacturing is concerned in terms of safety. The soft agar colony forming assay is widely known as a test for detecting transformed cells in vitro by utilizing the scaffold-independent proliferative ability of transformed cells. We investigated a new three-dimensional cell culture method using a liquid medium to which a new polymer was added instead of the conventional soft agar medium. Frequent colony formation was observed during co-culture of transformed HeLa cells and normal cells MRC-5 in a new medium, which strongly suggests the usefulness of the novel three-dimensional culture method. Furthermore, we compared its colony forming ability with that of the conventional soft agar gel method using various transformed cells and clarified points to consider when applying. Preparation of standard protocols and validation of the new test method is expected in the future.

4. Establishment of novel test method for quantitatively evaluating genomic instability as potential hazard of

tumorigenicity

Currently, the human iPS cell-based products is being actively developed in Japan and overseas. However, safety and quality assessment methods for human iPS cell-based products are not well established. Especially, there are no standard test methods for assessing the risk of genomic instability in human iPS cells. In this study, we investigated whether the genomic instability of the cell-based therapy products could be evaluated using a next-generation sequencer (NGS). Firstly, in order to establish an evaluation test method for genomic instability in the cultured cells, we analyzed DNA mutations in the genomically unstable iPS cells by whole exome sequencing (WES) using NGS. As a result, it was observed that the numerical variation of DNA mutations in the genomically unstable iPS cell lines was significantly higher than that in the normal human iPS cell line. On the other hand, the difference between the number of DNA mutations that arisen or disappeared during the culture period was not observed in both the genomically unstable iPS cell lines and the normal iPS cell lines. Next, we also analyzed the effect of culture conditions on the maintenance of genomic homeostasis in the culture cells. As a result, the number of DNA mutations was significantly different among iPS cells cultured under various culture conditions, suggesting that the genomic homeostasis in the culture cells is disturbed by the difference of culture conditions. Therefore, when comparing DNA mutations evaluated by NGS in each experiment, researchers should consider the differences of a series NGS analysis pipeline including cell culture conditions.

5. A selective cytotoxic adenovirus vector for concentration of pluripotent stem cells in human pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells

Highly sensitive detection of residual undifferentiated pluripotent stem cells is essential for the quality and safety of cell-processed therapeutic products derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). We previously reported the generation of an adenovirus (Ad) vector and adeno-associated virus vectors that possess a suicide gene, inducible Caspase 9 (iCasp9), which makes it possible to sensitively detect undifferentiated hiPSCs in cultures of hiPSC-derived cardiomyocytes. In this study, we investigated whether these vectors also allow for detection of undifferentiated hiPSCs in preparations of hiPSC-derived neural progenitor cells (hiPSC-NPCs), which have been expected to treat neurological disorders. To detect undifferentiated hiPSCs, the expression of pluripotent stem cell markers was determined by immunostaining and flow cytometry. Using immortalized NPCs as a model, the Ad vector was identified to be the most efficient among the vectors tested in detecting undifferentiated hiPSCs. Moreover, we found that the Ad vector killed most hiPSC-NPCs in an iCasp9-dependent manner, enabling flow cytometry to detect undifferentiated hiPSCs intermingled at a lower concentration (0.002%) than reported previously (0.1%). These data indicate that the Ad vector selectively eliminates hiPSC-NPCs, thus allowing for sensitive detection of hiPSCs. This cytotoxic viral vector could contribute to ensuring the quality and safety of hiPSCs-NPCs for therapeutic use.