

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・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) 細胞加工製品の腫瘍形成リスク評価に関する官民共同研究
(英語) Public-private joint study on risk evaluation of tumor formation of cell-based therapeutic products

研究開発実施期間: 令和2年4月1日～令和5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) Head, Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

(日本語)

ヒト iPS 細胞やヒト ES 細胞といった多能性幹細胞は、様々な種類の細胞に分化できる多能性と自己増殖能を併せ持つことから、移植による疾病治療を目的とする細胞加工製品の原材料として利用されている。しかしながら、細胞加工製品の品質・安全性上の問題として造腫瘍性が挙げられ、特に多能性幹細胞に由来する製品において、製品中の未分化細胞や形質転換細胞の混在に起因する腫瘍形成が懸念される。これらの課題の解決に向けて、国立医薬品食品衛生研究所と再生医療イノベーションフォーラム多能性幹細胞安全性評価委員会 (FIRM-CoNCEPT) を中心とした官民共同プロジェクト「細胞加工製品の腫瘍形成リスク評価に関する官民共同研究」(MEASURE2) では、造腫瘍性評価法の国際標準化を目指した活動、各種試験法の改善・改良と多施設検証及び遺伝的不安定性評価法の調査・検証を実施している。具体的には、①HESI CT-TRACS (健康環境科学機構 細胞治療委員会) をプラットフォームとした国際コンソーシアム活動を通じた細胞加工製品の造腫瘍性ハザード検出試験法の性能評価、②造腫瘍性関連試験法と体内動態評価試験法の技術的な改善・改良、③遺伝的不安定性試験法の調査研究・検証、を実施している。また②においては、*in vitro* 未分化多能性細胞検出試験法、*in vitro* 形質転換細胞検出試験法及び細胞体内動態評価試験法の 3 つのサブグループに分かれて活動している。合計 5 チームが MEASURE2 では組織されており、各チームリーダーを拠出企業 5 社が分担する体制になっている。各チームでの活動は以下の通りである。

【1. 国際コンソーシアム活動を通じた細胞加工製品の造腫瘍性ハザード検出試験法の性能評価】

本テーマでは、細胞加工製品特有のリスク評価に関する試験法における国際的コンセンサスの形成と標準化を図ることを目的に、HESI CT-TRACS (Cell Therapy TRACKing, Circulation, & Safety Technical Committee) と連携し、*in vitro* 未分化多能性幹細胞検出試験法である droplet digital PCR (ddPCR) 法及び培養増幅法 (HEC アッセイ) を評価する国際コンソーシアムを形成している。それぞれ 8 者および 4 者の産官学機関が参画しており、国内外の試験研究機関による多施設検証試験を進めた。これらの試験法について MEASURE で用いた試験プロトコールを基にして、iPS 細胞由来心筋細胞に混在する未分化 iPS 細胞を検出する際の性能評価を行い、検出限界及び施設間差を検討した。ddPCR 法においては、STEP1 として、1 施設で調製した同一の RNA サンプルを用いて、全施設で未分化 iPS 細胞の候補マーカー遺伝子の検出を行い、データ解析方法等について議論を行った。次に STEP2 として、各施設でスパイク試験と RNA 抽出を行い、マーカー遺伝子の発現を ddPCR で測定して、一貫した試験の全工程を通しての施設間差を検討した。ddPCR 法は検出感度がよく、精度において再現性も高いことが示された。また細胞をスパイクする工程が、施設間でのばらつきの大きな要因であることが示唆された。HEC アッセイにおいては、2 施設での手技確認のための予備試験を経て、全施設でサンプルを調製・培養し、未分化 iPS 細胞に由来するコロニー形成数を測定した。国際多施設検証の試験結果を取り纏めて、検出感度や偽陰性率を考察し、論文を公表した。

【2. *in vitro* 未分化多能性細胞検出試験法の技術的な改善・改良および多施設検証】

in vitro 未分化多能性細胞検出試験法の一つとして考案されている培養増幅法、すなわち、「ヒト多能性幹細胞の培養に適した条件下でコロニー形成を促すことで、製品に混在する未分化多能性幹細胞を高感度に検出する試験法 (HEC アッセイ)」に関して、より堅牢な試験系とするため、培養条件改善によるコロニー形成率の向上を目的とした検討を実施した。その結果、Chroman 1, Emericasan, Polyamines 及び Trans-ISRIB (CEPT) 添加時において、Y-27632 添加時に比べて、コロニー形成率が良好であるとの成績を得た。次に、系の高感度化に資する MACS 前処置において使用する多能性細胞マーカーの最適化について、多施設で検証した。具体的には、MACS 実施時に多能性幹細胞のソーティングに使用するマーカーについて、そのソーティング効率を、Tra-1-60、SSEA-4 あるいは CD326 並びにこれら 3 種のマーカーを混合して使用した場合で比較した (計 5 施設)。iPS 細胞 2 株で検討した結果、いずれの施設においても同様の結果が得られ、ソーティング効率は Tra-1-60、CD326 及び SSEA-4 の順で高く、また、3 種を混合して使用した場合においても、Tra-1-60 を単独で使用した場合と比較して、その効率に明確な向上はみられなかった。

【3. *in vitro* 形質転換細胞検出試験法の技術的な改善・改良および多施設検証】

デジタル軟寒天コロニー形成試験法は、足場非依存的増殖を示す悪性形質転換細胞を高感度に検出する試験法であるが、細胞を懸濁させた寒天培地を作製することに技術的熟練を要することが課題となっている。そのため、細胞の遊走制御と均一な分散を可能とするポリマーを培地に添加する三次元培養法 (新法) で、従来のデジタル軟寒天コロニー試験 (従来法) と同等に形質転換細胞の検出が可能か検討を行った。予備的検討で得た知見をもとに手順の最適化を行い、再度コロニー形成率 (HeLa 細胞とヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の共培養で 1 個の HeLa 細胞から生成される割合) を算出する実験を行ったところ、施設間のばらつきを軽減することができた。確立した新法の標準プロトコールで、 10^7 個の hMSC に混入させた 1 個の HeLa 細胞 (0.00001%) の検出を試みた。従来法と比較して培養手技が簡便になったことで操作性が著しく向上し、より低濃度の混入の検出も容易になり、全施設で HeLa 細胞を検出することができた。さらに、腫瘍性細胞の検出能の汎用性の検討のため、HeLa 以外の形質転換細胞株 (MIA-PaCa-2、PANC-1、HepG2) の検出能についても検討した。MIA-PaCa-2、PANC-1 ではコロニーが検出されたが、細胞株によってコロニー形成率は異なった。また、HepG2 ではコロニーが検出できなかった。添加剤法は従来法を代替し得る有用な方法であること、複数種類の腫瘍性細胞の検出が可能である

ことが示された。

【4. 細胞体内動態評価試験法の技術開発および多施設検証】

非臨床での細胞体内動態評価試験法として Alu-qPCR 法の多施設検証が既に実施され、精度・真度が明らかになったが、その他の利用可能な細胞体内動態評価技術についての信頼性・有用性の検証は未だなされていない。これまで Alu-qPCR 法での検証で一部の臓器では qPCR の定量性への阻害作用を示し、その程度には施設間差が認められた。本課題点を解決するために digital PCR 法による定量的な測定系の立ち上げを行った。まず、細胞体内動態評価に使用可能と考える digital PCR 用の PCR primer を設計し、分析法バリデーションの予備検討試験を多施設で実施した。これらの細胞体内動態評価用に設計した digital PCR 用の PCR primer を用いて、分析法バリデーション試験を多施設で実施した結果、測定施設間で定量性に大きな差は認められなかった。次に統一した試験法で免疫不全マウスにヒト間葉系幹細胞を 2.0×10^7 cells/kg を静脈内投与後 1、4 及び 24 時間に血液、脳、腎臓、肝臓、肺、皮膚、脾臓、心臓、投与部位（尾）から組織を採取した。その後、核酸抽出ならびにヒト由来細胞検量線に用いた qPCR 法（3 施設）および digital PCR 法（4 施設）によりマウス組織中のヒト細胞濃度を測定した。免疫不全マウスに静脈内投与したヒト間葉系幹細胞は、いずれの施設においても概ね同様の組織分布を示し、採取臓器のうち細胞が最も多く分布した組織は肺であった。本検討結果から、Alu 配列による qPCR 法および digital PCR 法の定量的な評価を実施し、生体内分布評価に適応可能な試験法であると考えられた。また、qPCR 法と digital PCR 法を比較検討の結果、定量範囲や阻害効果を含めた両方の特徴を把握することができた。

【5. 遺伝的不安定性試験法の調査研究及び検証】

遺伝的不安定性試験法に関する調査研究結果は、ゲノム不安定性評価の考え方の現状、各国の規制動向、既承認または臨床試験中の細胞加工製品で実際に実施されたゲノム不安定性に関連する評価方法、腫瘍形成リスクの予測に有用と考えられる評価方法として、それぞれまとめた。細胞加工製品の腫瘍形成リスク評価法の一つとして用いられているがん関連遺伝子での一塩基置換や挿入・欠損変異の検出試験については、非臨床 in vivo 造腫瘍性試験や、臨床での投与後の腫瘍形成の予測能を示す文献は見つけられなかった。国内外の規制文書では、未分化多能性幹細胞の残存や形質転換細胞出現による腫瘍形成は重要な潜在的リスクであると記載されているものの、具体的なゲノム不安定性試験方法については記載されていなかった。既承認または臨床試験中の細胞加工製品では、主に核型解析や全ゲノムシーケンシングが実施されていたが、これらの試験により遺伝子変異や染色体異常を検出できたとしても、腫瘍化を予測できるとは必ずしも言えないと考えられた。一方で、腫瘍形成予測に有用と考えられる新たなゲノム不安定性評価法に関する報告がいくつか認められた。以上の調査研究の結果については論文発表を行った。

細胞加工製品の次世代シーケンサー（NGS）を用いた遺伝的不安定性評価においては、バリデーションが実施されている適切な試験法は未だ確立されていないことが課題になっている。特異性の高い二本鎖 DNA 切断（DSB）検出法である INDUCE-seq 法の確立を実施し、HESI CT-TRACS における DSB 検出法の活用に関する 2 つの大きな議論、1) ゲノム編集の非特異的効果の評価と 2) 細胞の遺伝的不安定性の評価、のうち後者に貢献した。DSB 誘導剤である calicheamicin で処理した MRC5 細胞において、内部標準 PhiX を用いた INDUCE-seq 法によりゲノムでの切断部位数を算出し、抗 γ H2AX 抗体を用いた免疫染色像との相関を確認した。DSB 誘導剤は iPS 細胞においてアポトーシスを生じさせ、DNA のラダー化を引き起こすことが考えられたため、ゲノム編集技術を用いて、AAVS1 領域を標的とする gRNA と Cas9 タンパク質を iPS 細胞に導入した。シーケンサーとして NextSeq500 を利用することにより、DSB が生じたオンターゲット配列リードと標的配列と類似性のあるオフターゲット配列リードを検出することができた。これらの実験で得られたデータは、今後の遺伝的不安定性評価の考え方の提案に資すると考えられる。

本研究において、国立医薬品食品衛生研究所と FIRM-CoNCEPT を中心として、iPS 細胞由来製品の造腫瘍性評価に係る多施設検証 (MEASURE プロジェクト) を実施し、国際連携として HESI CT-TRACS をプラットフォームとした国際コンソーシアムにおいて活動した。多施設検証を実施することにより、各種試験法の性能と限界が明らかになり、データと経験が共有されて試験法への理解が深まったことは、製品の品質・安全性評価におけるステークホルダー間のコンセンサス形成に繋がる成果である。再生医療のような先端的な医療モダリティについては、安全性や品質の確保のための個別の評価技術の国際標準化を推進することが、規制当局の評価・意思決定の効率化・迅速化に有効である。本プロジェクトの成果は、将来の造腫瘍性試験の国際標準化に資するものであり、国際規制調和が促進されることが期待される。

(英語)

Tumorigenicity is a quality and safety issue for cell-based therapeutic products. To address this issue, the public-private joint project "Public-private joint study on risk evaluation of tumor formation of cell-based therapeutic products" (MEASURE2), led by the National Institute of Health Sciences (NIHS) and the committee for non-clinical safety evaluation of pluripotent stem cell-derived product of the Forum for Innovations in Regenerative Medicine (FIRM-CoNCEPT), has been working to develop an international standard for tumorigenicity testing. This project is conducting activities aimed at international standardization of evaluation methods, improvement and multicenter validation of various test methods, and investigation and validation of genetic instability evaluation methods. Specifically, (1) performance evaluation of test methods for detection of tumorigenic hazards in cell-based therapeutic products through international consortium activities with HESI CT-TRACS (Health and Environmental Sciences Institute Cell Therapy Committee) as a platform, (2) technical improvement and refinement of tumorigenicity-related test methods and pharmacokinetic evaluation test methods, and (3) research and validation of genetic instability test methods. (1) In international consortium activities, we conducted a multicenter validation of the sensitivity and accuracy of the in vitro undifferentiated pluripotent stem cell detection assay (ddPCR and HEC assay) for detecting undifferentiated iPS cells mixed with differentiated cells derived from iPS cells in an international framework and published a paper. (2) In the technical improvement and refinement of the test method, for the highly efficient culture method (HEC assay), increase in colony formation rates and optimization of pluripotent cell markers used in MACS pretreatment, which contribute to the high sensitivity of the system, was conducted at multiple institutions. For the transformed cell detection assay, we demonstrated that the three-dimensional culture method using polymer added to the culture medium is a useful alternative to the conventional method and can detect multiple types of malignant transformed cells. For the cellular biodistribution evaluation method, we conducted a multicenter validation study of the qPCR method and the digital PCR method and demonstrated that both methods are applicable to the evaluation of biodistribution. (3) In the research and validation study on genomic instability testing, we presented a paper on the current status of regulations on genomic instability evaluation and the challenges and future of evaluation methods. For the validation, we evaluated the performance of the INDUCE-seq method, a double-strand DNA break detection method, and discussed the results at HESI CT-TRACS.

In this study, the implementation of the multi-center validation clarified the performance and limitations of various test methods, shared data and experiences, and deepened understanding of the test methods, which is an achievement that leads to consensus building among stakeholders in the evaluation of product quality and safety. For advanced medical modalities such as regenerative medicine, promoting international standardization of individual evaluation techniques to ensure safety and quality will be effective in

increasing the efficiency and speed of evaluation and decision-making by regulatory authorities. It is expected that the results of this project will contribute to the future international standardization of tumorigenicity testing and promote international regulatory harmonization.