

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) 細胞加工製品の非臨床安全性評価に関する試験法開発

(英語) Development of testing methods for non-clinical safety assessment of human cell-processed products

研究開発実施期間: 令和3年7月1日～令和6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 薬品部 部長

(英語) National Institute of Health Sciences, Division of Drugs, Head

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

(1) 研究開発項目1: 細胞加工製品の特有のウイルス安全性上のリスクを評価する試験法の開発

細胞加工製品は、製造工程中にウイルスの不活化や除去が困難であることから、ウイルスの混入を確認するためのウイルス試験が重要である。新たなウイルス試験として、次世代シーケンサー (NGS) を用いた方法が注目されているが、試験系の確立には至っていない。そこで本研究は、細胞加工製品における NGS を用いたウイルス試験の確立を目的に検討を行った。細胞加工製品の原料となる細胞のゲノムに存在する内在性ウイルスやウイルスゲノムに類似したウイルス様配列が、外来性ウイルスの検出を困難にすることから、はじめに細胞由来の核酸からどのようなウイルスが偽陽性として検出されるのかを検討した。細胞加工製品として用いられているヒト間葉系幹細胞 (MSC) をモデル細胞として RNA-Seq を行い、得られた配列データ (リード) をウイルスデータベースにマッピングした結果、ヒト内在性レトロウイルスをはじめとする数多くのウイルス関連配列が検出された。また、測定原理の異なる2種類の NGS を用いたが、同じウイルスの配列が検出されるとは限らなかった。このことから、同一のサンプルであっても NGS の種類により検出されるウイルス配列が異なることが示され、用いる NGS ごとにバックグラウンドとして検出され得るウイルス配列を取得する必要があることが示唆された。次に、外来性ウイルスの検出の評価を行うために、アデノウイルス3型および11型 (Ad3, Ad11) をモデルウイルスとして用いた。Ad3 および Ad11 を感染させた MSC から抽出した RNA をサンプ

ルとして、NGS 解析を行った結果、Ad3 および Ad11 のウイルスゲノムに対応する配列に多くのリードがマッピングされた。そこで、各 Ad 感染 MSC から抽出した RNA を段階希釈し、HiSeq X ten における各 Ad の検出限界を検討した。その結果、Ad3 は 10^6 倍希釈まで検出され、Ad11 では 10^5 倍希釈まで検出された。このことから、MSC を対象とした RNA-Seq 解析における Ad3 および Ad11 の検出限界を明らかとし、NGS による外来性ウイルスの検出には血清型の影響は小さいことが示唆された。この他、MSC の細胞上清の NGS 解析も行った。細胞上清から核酸を抽出し NGS で解析したところ、細胞変性が観察される 1 週間以上前の上清から NGS でウイルスを検出することが可能であることがわかった。

感染させた Ad 以外にも細胞由来の核酸に起因するウイルス関連配列（偽陽性）が多く検出されたことから、パイプラインの最適化を行った。データベースに着目し、網羅性の高いデータベースからヒトへの感染性を有するウイルスに絞ったデータベースに変更した結果、各 Ad の検出性を損なうことなく、偽陽性のウイルスがほとんど検出されなかった。このことから、適切なデータベースを構築することが、真の混入ウイルスの検出に有用であることが示唆された。

(2) 研究開発項目 2：浮遊細胞製品に混在する形質転換細胞の高感度検出法の開発及び性能評価

患者由来 T 細胞の ex vivo 遺伝子導入によりキメラタンパク質を発現させ、標的のがん細胞を傷害する CAR-T 細胞療法の開発が活発に行われている。しかしながら、レンチウイルスベクターのゲノム挿入変異に誘発される T 細胞の腫瘍形成が懸念されており、浮遊培養細胞製品において形質転換細胞の混在を確認する試験法の確立が望まれている。通常、正常なヒト T 細胞は細胞増殖において IL-2 依存性を示すが、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型により形質転換が生じると、IL-2 非依存性を示すことが報告されている。したがって T 細胞の IL-2 非依存的増殖を確認することが、細胞の形質転換を判断する一つの指標になりうると考えられる。本研究では、T 細胞製品をモデルとして浮遊細胞製品に混在する形質転換細胞の高感度検出法の開発と性能評価を行った。令和 3 年度は、市販されているヒト末梢血単核細胞から抗 CD3/CD28 ビーズによる活性化刺激と MACS を用いた精製によって T 細胞を調製し、培地への IL-2 添加の有無で、短期間に正常 T 細胞の増殖に明瞭な差が見られる培養法を見出し、正常 T 細胞の IL-2 依存性が確認できる系を確立した。令和 4 年度は、一般的に入手可能な浮遊培養形質転換細胞株から、IL-2 産生能がなく且つ IL-2 の影響を受けずに増殖性を示す、本試験法のポジティブコントロール細胞として最適な T 細胞株のスクリーニングを行い、MOLT-4 細胞を選出した。昨年度に最適化した培養条件下で、IL-2 非存在下で MOLT-4 細胞の正常 T 細胞へのスパイク試験を行い、0.01% の混在を検出できることを確認した。また ddPCR を用いた PTEN 遺伝子の変異解析により、増殖を示した細胞は MOLT-4 細胞であることを確認した。令和 5 年度は、CAR-T 細胞製品をモデルとした本試験法の妥当性を確認した。ヒト末梢血単核細胞から T 細胞を単離して、CAR 発現レンチウイルスベクターを導入し、CAR-T 細胞製品モデルを作製した。作製した CAR-T 細胞に、形質転換細胞のポジティブコントロール細胞として MOLT-4 細胞をスパイクし、IL-2 無添加培地による培養を行い、経時的に細胞数を計測した。28 日間の培養により、0.01% の混在する MOLT-4 細胞の検出が可能であることが示された。この検出感度は、正常 T 細胞の場合と同様であった。本研究により、IL-2 非依存的細胞増殖特性解析法は、浮遊培養細胞に混在する形質転換細胞を高感度に検出することが示され、ポジティブコントロール細胞を用いた性能評価を実施することにより、CAR-T 細胞製品の品質・安全性試験として検証可能であることが示唆された。

(3) 研究開発項目 3：最終製品中の加工細胞の形質転換リスクを惹起する潜在的ハザードとしてのゲノム不安定性を評価するための試験法の開発

細胞のがん化過程において様々な遺伝子の変異が複合的に蓄積（変異の蓄積=ゲノムの不安定化）することが、がん化の発生に大きく寄与していることが知られている。つまり、「ゲノムの不安定性」は理論上、いかなる細胞加工製品においてもがん化を惹起するハザードになると考えられる。しかしながら、「ゲノムの不安定性」を客観的・定量的に示す指標が存在しないのが現状である。本研究では、ゲノム不安定性を客観的に評価するための確固たるゲノム評価法を開発するとともに、当該評価法の汎用性の検証を目指した。まず、ゲノム不安定性細胞株の培養前後における DNA アリル頻度のデータをエキソーム解析に基づいて収集し、DNA アリル頻度の変動をゲノム変異多様度指数（ H' ）として換算する系の構築を試みた。健康人由来 iPS 細胞と DNA 除去修復機構が破綻した疾患 iPS 細胞を同条件にて培養し、3 継代後に新たに検出された SNV のゲノム変異多様度指数（ H' ）を算出した。ゲノム変異多様度指数（ H' ）は低頻度アリルの SNV の種数の影響を受けやすいことから、健康人由来 iPS 細胞と比較し、疾患 iPS 細胞は培養に伴い様々な種類の SNV が多く出現していることが、ゲノム変異多様度指数（ H' ）の結果より予想された。次に、疾患 iPS 細胞において検出された SNV において、COSMIC リストに記載されている遺伝子に関して、3 継代の間に変異の蓄積が確認された遺伝子数を解析した。その結果、変異の蓄積が認められた遺伝子の中に、ゲノム安定性維持に関連する遺伝子（ATR、MSH6、Rad21 など）、がん抑制遺伝子（TP53、TP63、BCOR など）などが含まれていたことが明らかとなった。以上の結果は、DNA 除去修復機構の破綻に伴い、結果としてゲノム構造の安定性保持に関連した様々な遺伝子に対しても変異の蓄積が誘発されたことが示唆された。次に、上述のゲノム変異多様度指数（ H' ）の妥当性の検証ために、以下の 2 つの検証実験を設定した。① がん抑制遺伝子である TP53 にゲノム編集によって変異を導入した iPS 細胞を作製し、培養前後における SNV の多様性におよぼす影響を多様度指数（ H' ）によって評価したところ、正常 iPS 細胞株と比較して、TP53 の機能が破綻した iPS 細胞株において SNV の多様度（ H' ）は、有意ではないが高い傾向であることが認められた。以上の結果は、TP53 の機能破綻によって及ぼされたゲノム変動の程度を、ゲノム変異多様度指数（ H' ）として評価可能であることを示唆している。② 次に①の結果を踏まえ、ゲノム不安定性の指標としてゲノム変異多様度指数（ H' ）が妥当であるかを更に検証するために、他の様々ながん抑制遺伝子を欠損させた別のヒト細胞種を用いて、全エクソーム領域における DNA 変異の変動を、上述と同様の手法により検討した。その結果、コントロール株と比較して、TP53 欠損株に加えて PMS2 欠損株においても、細胞増殖あたりの SNV の多様度指数（ H' ）に有意な上昇が認められた。また、CDKN2A と MHL1 の欠損株においても、継代後の SNV の多様度指数（ H' ）に大きな変動がみられた。以上の結果より、細胞の培養期で生じる SNV の多様度指数（ H' ）の差異は、ゲノム不安定性の程度の指標になりうると考えられた。

(1) Development of a test method to assess the potential viral safety risks of cell therapy products

Virus tests to ensure free of viral contamination is important for cell-processed products because it is difficult to inactivate or remove viruses during the manufacturing process. A method using a next-generation sequencer (NGS) has attracted attention as a new method, but a test system has not yet been established. Therefore, this study was conducted to establish a virus test using NGS in cell-processed products. Since endogenous viruses and virus-like sequences in the genomes of the cells interfere with the detection of exogenous viruses, we first examined what viruses can be detected in nucleic acids extracted from the cells. We performed RNA-Seq using human mesenchymal stem cells (MSCs) as a model of cell processing products and mapped the obtained sequence data

(reads) to a viral database. Although two types of NGS with different measurement principles were used, the same viral sequences were not always detected. Next, to evaluate the detection of exogenous viruses, adenovirus types 3 and 11 (Ad3 and Ad11) were used as model viruses, and RNA-Seq analysis of MSCs infected with Ad3 and Ad11 showed many reads mapped to sequences corresponding to the Ad3 and Ad11 viral genomes. Therefore, RNA extracted from each Ad-infected MSC was step-diluted and the detection limit of each Ad in HiSeq X ten was examined. As a result, Ad3 was detected up to 10^6 -fold dilution, and Ad11 was detected up to 10^5 -fold dilution. In addition, NGS analysis of MSC cell supernatants was also performed. Nucleic acids were extracted from cell supernatants and analyzed by NGS, and it was found that the virus could be detected by NGS from supernatants more than one week before the cytopathic effect was observed. Since many virus-like sequences (false positives) were detected in the non-infected cells, we optimized the pipeline of data analysis. We altered a highly comprehensive database to a database focused on viruses that are infectious to humans, and as a result, few false positive viruses were detected without compromising the detectability of each Ad. This suggests that constructing an appropriate database is useful for detecting truly contaminating viruses.

(2) Development and performance evaluation of a highly sensitive detection method for transformed cells existed in non-adherent cell products

Currently, CAR-T cell products are being actively developed in both domestic and overseas markets, but there is increasing concern about tumor formation in T cells induced by genomic insertion mutations of lentiviral vectors. Therefore, it is required to establish a test method to detect the transformed cells existed in non-adherent cells, such as T cells. It is known that normal human T cells exhibit IL-2 dependence in cell proliferation, whereas transformed T cells exhibit IL-2-independence. Hence, confirming the ability of IL-2-independent proliferation in T cells could be one indicator for detecting transformed T cells. In this study, we established an IL-2-independent cell proliferation analysis method by using MOLT-4 cells as a positive control for transformed cells. This method was also indicated to be useful for quality and safety testing of CAR-T cell products.

(3) Development of a test method to assess genomic instability as a potential hazard in the cell therapy products

“Genomic instability” might theoretically be a potential cancer-causing hazard in any cell therapy products. However, there is currently no objective and quantitative indicator of “genomic instability. In this study, we aimed to develop a robust assessment method to objectively evaluate genomic instability and to validate the versatility of this assessment method. We established a novel method to assess the genomic instability level as the genomic mutational diversity index (H') using the allele frequencies of SNVs arising before and after the culture in cell lines with genomic instability. To verify the validity of the genomic mutation diversity index (H'), we calculated the H' of TP53 mutant iPS cell

lines before and after culture. As a result, the H' in TP53 mutant iPS cell lines was increased compared with normal iPS cell lines. Furthermore, a similar trend was also observed in various cells deficient in other cancer suppressor genes, indicating that changes in SNV diversity index (H') during the cell culture period may be an indicator of genomic instability.