

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名：（日本語）再生医療実用化研究事業
（英語）Research Project for Practical Application of Regenerative Medicine

補助事業課題名：（日本語）特定細胞加工物/再生医療等製品の品質確保に関する研究
（英語）Research on quality assurance of specified cell products/regenerative medicine products

補助事業担当者（日本語）国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官 新見 伸吾
所属 役職 氏名：（英語）National Institute of Health Sciences, Division of Biological Chemistry and Biologicals, research fellow, Shingo Niimi

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 29 年 3 月 31 日

分担研究（日本語）
分担課題名：（英語）

補助事業分担者（日本語）
所属 役職 氏名：（英語）

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

1. 細胞採取機関における採取環境・採取方法に関するアンケート調査の実施と実態把握

平成 27 年度に実施した、細胞加工物の原料となる細胞・組織採取に関するアンケート結果について、平成 28 年度は採取部位におけるドナーの侵襲度に応じた分類を行い、リスク評価を行った。その結果、採取環境はリスクに応じて適切に実施されていると推測するが、医療行為の実施における手順書の準備及び教育訓練の記録が不十分であることが示唆された。これらの要点については、第 16 回日本再生医療学会総会において発表を行った。

2. 無菌性保証及び工程等の微生物汚染リスク低減のあり方に関する研究

2.1. 細胞加工物の製造における微生物汚染リスクの検証実験：

本項目では、細胞培養の加工施設において想定される微生物の汚染源について、拡散並びに製品や環境に及ぼす影響を検証した。平成 28 年度は、安全キャビネット採用施設における、チェンジオーバーとして必要な汚染物の除去の仕方及び日常清掃における初期化手順を明らかにした。安全キャビネットについては、並行して、設置環境（ISO クラス 7 区域）や動作において留意が必要であることを明らかにした。これらの要点については、第 16 回日本再生医療学会総会において提言を行った。また、平成 28 年度経済産業省ガイドライン作成事業において、ガイドライン作成（標準化）に向けた情報の共有を行った。

2.2 再生医療等製品の無菌操作法ガイドライン（案）の作成：

本項目では、平成 22 年度厚生労働科学研究『無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針』を参考にして、再生医療等製品の無菌操作法ガイドライン（案）（以下、文章案）の作成を行った。平成 28 年度は、再生医療等製品に合わせた要求事項の考え方を整理し、章構成を最適化（変更）することで文章案を完成させた。文章案は、本事業における成果として、公開可能な形でまとめることができた。一方で、無菌操作環境の構築方法、及び、その検証方法（プロセスシミュレーションテスト）の条件については、規制要件としての議論を重ねる必要があり、今後他の研究班に引き継がれ、最終のガイドラインとする予定である。

3. 細胞加工物等の品質評価法の検証

本研究では、細胞加工物/再生医療等製品の安全性評価におけるゲノム解析について、次世代シーケンサーを用いたゲノム評価系の有用性について検討を行った。モデルケースとして健康人由来 iPS 細胞の培養維持期に生じた一塩基変異（SNV）を検出するために、次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析を実施し、iPS 細胞を 3 継代培養した後に新たに検出される SNV の数をカウントすることで、継代間の SNV の数の変動を解析した。その結果、3 継代ごとで新たに生じた SNV の数は、エキソーム領域上においては約 50～120 個であり、他の iPS 細胞株についても同程度の SNV の出現頻度であることが確認された。また、細胞種間での SNV の均一度・不均一度を情報量理論に基づいた指数によって評価することが可能であることも確認できた。この手法では、SNV の数のみをカウントした解析よりも多くの情報量が加味されていることから、SNV の存在に基づいた細胞特性を理解するうえで効果的であることが示唆された。

英文

1. Implementation of a questionnaire survey on the collection procedure and processing environment at medical institution to grasp the actual conditions

Implementation of the questionnaire survey had been completed in FY 2015, and the results were summarized in a whole. Moreover, reclassification of the results according to the invasion risks of which a donor receive by the collection region or method was carried out, and investigated in FY 2016. The results exhibited that almost of medical institutions chooses a suitable processing environments and proper disinfection procedures. Meanwhile, a mark point about the necessity of record for quality management was raised in regards to the education and training

of medical practice to confirm a skill for collection procedure of raw material. These results were announced at the 16th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine.

2. Research for maintenance of aseptic processing environment to reduce microbial contamination risks

2.1. Experiments on the contamination risks of microorganisms in aseptic processing of the cell manufacturing: In this section, influence of the assumable contamination risks to be diffused at the aseptic area or the final product in the cell processing facility (CPF) which was adopted safety cabinets (BSCs) was investigated. An assessment the diffusion mechanism of droplet and mist in the BSC had been carried out, and a maintenance method which constructs a procedure for the routine cleaning of aseptic area at the end of a process was clarified in FY 2016. In parallel, it was clarified that caution is required about the operational movement of operators at adjacent space to aseptic area in the BSC. These points of the information were made recommendations at the 16th Congress of Japanese Society for Regenerative Medicine, and have been also shared toward the preparation of guidelines for standardization.

2.2 Preparation of a guideline (draft) for aseptic operation in manufacturing for cell-based products which regulatory approved: In this section, a guideline (draft) of aseptic operation methods for regenerative medicine has been prepared by referring to the contents of "Guidance on the Manufacture of Sterile Pharmaceutical Products by Aseptic Processing" from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. In FY 2016, we have organized the idea of requirements in aseptic manufacturing according to cell-based products for regenerative medicine, and a draft of guideline was completed by optimizing (changing) the chapter composition from the referred guidance. Meanwhile, it suggested that the verification method and practice standard, which confirm the aseptic environment and processing, needed more discussions to adopt as a regulatory requirement.

3. Research on quality assessment method for cell-based product

In this study, we verified the usefulness of the genomic instability evaluation system using the next generation sequencer (NGS) on the safety assessment of products such as regenerative medicine products. In order to detect single nucleotide variant (SNV) that newly occurred every 3 passages in iPS cells, we performed whole exome sequence analysis using NGS. As a result, the number of SNVs newly occurred every 3 passages was about 50 to 120 on the exome region, and the frequency of appearance of SNVs was same level as that in other cell lines. It was also found that the heterogeneity of SNVs among cell types could be indicated by an index based on entropy (information theory). These results suggested that our genomic instability evaluation system using NGS might be useful to understand the cell characteristics based on the presence of SNV.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 5 件、国際誌 6 件）

1. Hasebe-Takada N, Kono K, Yasuda S, Sawada R, Matsuyama A, Sato Y. Application of cell growth analysis to the quality assessment of human cell-processed therapeutic products as a testing method for immortalized cellular impurities. (2016) *Regen. Ther.* 5, 49-54.
2. Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, Kanazawa H, Seki T, Nakajima K, Kishino Y, Okada M, Hirano A, Kuroda T, Yasuda S, Sato Y, Yuasa S, Sano M, Suematsu M, Fukuda K. Glutamine oxidation is indispensable for survival of human pluripotent stem cells. (2016) *Cell Metab.* 23, 1-12.
3. Hayakawa T, Harris I, Joung J, Kanai N, Kawamata S, Kellathur S, Koga J, Lin YC, Maruyama Y, McBlane J, Nishimura T, Renner M, Ridgway A, Salmikangas P, Sakamoto N, Sato D, Sato Y, Toda Y, Umezawa A, Werner M, Wicks S. Report of the International Regulatory Forum on Human Cell Therapy and Gene Therapy Products. (2016) *Biologicals.* 44, 467-79.
4. Kitajima N, Numaga-Tomita T, Watanabe M, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, Sumimoto H, Mori Y, Nishida M. TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. (2016) *Sci. Rep.* 6, 37001.
5. Numaga-Tomita T, Kitajima N, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, Sumimoto H, Mori Y, Nishida M. TRPC3-GEF-H1 axis mediates pressure overload-induced cardiac fibrosis. (2016) *Sci. Rep.* 6, 39383.
6. 佐藤陽治. 日本発の再生医療技術によるイノベーションを進めるには (2016) 再生医療 15 (3), 241.
7. 三浦巧, 佐藤陽治. 「実験用の細胞培養と臨床用の細胞培養（製造）の違いと考え方」, (2016) 細胞培養の基礎知識と細胞培養基材の利用・開発の留意点, 情報機構, 70-84,
8. 新見伸吾 他 17 名 国内外における再生医療等製品の承認の現状～審査報告書から見た再生医療等製品に求められる品質、有効性、安全性の確保～. *Pharm Tech Japan* 32, 768-789 (2016)
9. M Mizutani, H Samejima, H Terunuma, M Kino-oka, Experience of contamination during autologous cell manufacturing in cell processing facility under the Japanese Medical Practitioners Act and the Medical Care Act, *Regenerative Therapy*, 2016, Vol. 5, 25-30.
10. 水谷 学, 紀ノ岡正博, 製造のモニタリング評価, *Bio Industry*, 2016, Vol. 33, No. 9, 49-57.
11. 水谷 学, 紀ノ岡正博, 製造のモニタリング評価, 再生医療・細胞治療のための細胞加工評価技術, CMC 出版, 2016, pp. 114-123.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 水谷 学, 紀ノ岡正博, 新見 伸吾, 特定細胞加工物の原料となる細胞・組織採取の実態に係る調査, 第 16 回日本再生医療学会総会（仙台）, 2017 年 3 月, ポスター, 国内.
2. 再生医療等製品（細胞加工製品）の品質・安全性・有効性確保のための科学, 口頭, 佐藤陽治, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.

3. 不死化網膜色素上皮細胞マーカーIRM1の機能解析, 口頭, 黒田拓也, 安田智, 中島啓行, 松山さと子, 高田のぞみ, 草川森士, 梅澤明弘, 松山晃文, 川真田伸, 佐藤陽治, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.
4. 再生医療等臨床研究データベースシステム(RMeD-Japan)の整備, 口頭, 佐藤陽治, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
5. 次世代シーケンサーによる細胞加工製品の新規ウイルス試験法の開発, 口頭, 遊佐敬介, 前田洋助, 佐藤陽治, 苑宇哲, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
6. 臨床応用に向けたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の凍結保存法の開発, ポスター, 大橋文哉, 宮川繁, 吉田昇平, 齋藤充弘, 福嶋五月, 増田茂夫, 伊東絵望子, 伊勢岡弘子, 石川烈, 鮫島正, 佐藤陽治, 澤芳樹, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
7. ヒト間葉系幹細胞の分化フラストレート培養における網羅的遺伝子発現解析, 澤田留美, 森山幸祐, 河野健, 田中和沙, 佐藤陽治, 江端宏之, 佐々木沙織, 久保木タッサニーヤ, 木戸秋悟, ポスター, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
8. ヒト神経前駆細胞の悪性形質転換細胞検出試験, ポスター, 草川森士, 安田智, 黒田拓也, 佐藤陽治, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.
9. フィーダー細胞 SNL76/7 が産生する内在性レトロウイルスの安全性について, ポスター, 苑宇哲, 前田洋助, 佐藤陽治, 遊佐敬介, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.
10. Scientific challenges for the safety of cell-based therapeutic products—Development of testing methods for tumorigenicity assessment—, 口頭, 佐藤陽治, World Stem Cell Summit 16, 2016/12/8, 国外.
11. ヒト間葉系幹細胞の培養力学場応答性に関する網羅的遺伝子発現解析, ポスター, 澤田留美, 河野健, 田中和沙, 佐藤陽治, 森山幸祐, 江端宏之, 佐々木沙織, 久保木タッサニーヤ, 木戸秋悟, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016/11/22, 国内.
12. Recent developments in regulation for cell therapy in Japan, 口頭, 佐藤陽治, 3rd International Alliance for Biological Standardization Conference on Cell Therapy, 2016/11/2, 国外.
13. Japanese guidance on risk assessment of raw materials, 口頭, 佐藤陽治, 3rd International Alliance for Biological Standardization Conference on Cell Therapy, 2016/11/2, 国外.
14. 再生・細胞医療の実用化におけるレギュラトリーサイエンスの役割, 口頭, 佐藤陽治, 「かながわ再生・細胞治療産業化ネットワーク」キックオフフォーラム, 2016/10/27, 国内.
15. Current regulatory issues on tumorigenicity assessment of human pluripotent stem cell-derived products in Japan, 口頭, Sato Y, ISCI workshop: origins & implications of pluripotent stem cell (epi)genetic instability and a symposium: to honor the work of Leroy Stevens, 2016/10/15, 国外.
16. 再生医療等製品の造腫瘍性関連試験法, 口頭, 佐藤陽治, 第22回 GLP 研修会(大阪), 2016/9/30, 国内.
17. 再生・細胞医療製品の品質と安全性の評価について, 口頭, 佐藤陽治, 創薬薬理フォーラム第24回シンポジウム, 2016/9/29, 国内.
18. 遺伝子治療の安全性評価—ゲノム編集技術の応用における留意点—, 口頭, 佐藤陽治, 第68回日本生物工学会大会, 2016/9/28, 国内.
19. 再生医療等製品(細胞加工製品)の品質・安全性確保と規制, 口頭, 佐藤陽治, 第26回日本医療薬学会年会, 2016/9/19, 国内.
20. Scientific Challenges for the safety, efficacy and quality of cell-based therapeutic products, 口頭, Sato

Y, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society-Asia Pacific meeting 2016, 2016/9/5, 国外.

21. Update on Japan's regulation of cell-based therapeutic products, 口頭, Sato Y, Stem Cell & Regenerative Medicine Global Congress 2016, 2016/8/23, 国外.
22. ヒト細胞加工製品の造腫瘍性試験及び造腫瘍性細胞検出試験—関連ガイドラインの作成状況—, 口頭, 佐藤陽治, 第 43 回日本毒性学会学術年会, 2016/7/1, 国内.
23. Assessment of genetic instability in human induced pluripotent stem cells during long-term cell culture, ポスター, Miura T, Okamura K, Yasuda S, Umezawa A, Sato Y, International Society for Stem Cell Research 2016 Annual Meeting, 2016/6/23, 国外.
24. Association of line-1s expression with apobec3b genotypes in human mesenchymal stem cells. ポスター, Kono K, Sawada R, Sato Y. International Society for Stem Cell Research 2016, 2016/6/23, 国外.
25. 再生医療等製品（細胞加工物）の品質とその確保のための規制, 口頭, 佐藤陽治, 神戸医療産業都市クラスター交流会, 2016/4/27, 国内.
26. 紀ノ岡正博, 細胞を育むことを志向する研究と実践する臨床培養士への期待, 第 16 回日本再生医療学会総会（仙台）, 2017, 口頭.
27. 千葉 友樹, 天野健太郎, 川下 泰範, 曾根大二郎, 野口 展士, 水谷 学, 紀ノ岡正博, 細胞培養加工施設における無菌操作等区域の清浄度維持に係るリスクの検討, 第 16 回日本再生医療学会総会（仙台）, 2017, ポスター.
28. 水谷 学, 野口 展士, 紀ノ岡正博, ピペット操作における飛沫により発生するリスクに関する研究, 第 16 回日本再生医療学会総会（仙台）, 2017, ポスター.

（３）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 再生医療の安全性評価のための科学—新しい医療製品のリスクの発生源をどう測るか—, 口頭, 佐藤陽治, 「リスクコミュニケーションのモデル形成事業」市民シンポジウム 再生医療の未来を創る～リスクとベネフィットを考える～, 2016/12/23, 国内.
2. 再生医療の安全性評価のための科学—新しい医療製品のリスクの発生源をどう測るか—, 口頭, 佐藤陽治, 「リスクコミュニケーションのモデル形成事業」市民シンポジウム 再生医療・遺伝子治療の未来へ～リスクとベネフィットを考える～, 2016/7/23, 国内.
3. 紀ノ岡正博, 細胞製造性を鑑みた細胞生産システムの構築, 平成 28 年度 AMED 再生医療公開シンポジウム（東京）, 2017/2/2, 国内.
4. 紀ノ岡正博, 再生医療製品の製造におけるコトづくり, 第 4 回再生医療産業化展（大阪）, 2017/2/16, 国内.

（４）特許出願

記載項目なし。

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実用化研究事業
(英語) Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

補助事業課題名： (日本語) 特定細胞加工物／再生医療等製品の品質確保に関する研究
(英語) Research on quality assurance of specified cell products/ regenerative medicine products

補助事業担当者 (日本語) 再生・細胞医療製品部 部長 佐藤陽治
所属 役職 氏名： (英語) Division of Cell-Based Therapeutic Products, Head, Yoji Sato

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 細胞加工物等の不均質性、運搬・輸送時の脆弱性、実生産における変動要因等を勘案した製品・原料資材の規格及び試験検査のあり方に関する研究
分担課題名： (英語) Research on standards and testing of products or raw materials considering fluctuation factors in heterogeneity of processed cell products, vulnerability at transportation, and actual production

補助事業分担者 (日本語) 再生・細胞医療製品部 部長 佐藤陽治
所属 役職 氏名： (英語) Division of Cell-Based Therapeutic Products, Head, Yoji Sato

II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者： 国立医薬品商品衛生研究所・生物薬品部・新見伸吾 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2 件、国際誌 5 件)

1. Hasebe-Takada N, Kono K, Yasuda S, Sawada R, Matsuyama A, Sato Y. Application of cell

- growth analysis to the quality assessment of human cell-processed therapeutic products as a testing method for immortalized cellular impurities. (2016) *Regen. Ther.* 5, 49-54.
2. Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, Kanazawa H, Seki T, Nakajima K, Kishino Y, Okada M, Hirano A, Kuroda T, Yasuda S, Sato Y, Yuasa S, Sano M, Suematsu M, Fukuda K. Glutamine oxidation is indispensable for survival of human pluripotent stem cells. (2016) *Cell Metab.* 23, 1-12.
 3. Hayakawa T, Harris I, Joung J, Kanai N, Kawamata S, Kellathur S, Koga J, Lin YC, Maruyama Y, McBlane J, Nishimura T, Renner M, Ridgway A, Salmikangas P, Sakamoto N, Sato D, Sato Y, Toda Y, Umezawa A, Werner M, Wicks S. Report of the International Regulatory Forum on Human Cell Therapy and Gene Therapy Products. (2016) *Biologicals.* 44, 467-79.
 4. Kitajima N, Numaga-Tomita T, Watanabe M, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, Sumimoto H, Mori Y, Nishida M. TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. (2016) *Sci. Rep.* 6, 37001.
 5. Numaga-Tomita T, Kitajima N, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, Sumimoto H, Mori Y, Nishida M. TRPC3-GEF-H1 axis mediates pressure overload-induced cardiac fibrosis. (2016) *Sci. Rep.* 6, 39383.
 6. 佐藤陽治. 日本発の再生医療技術によるイノベーションを進めるには (2016) 再生医療 15 (3), 241.
 7. 三浦巧, 佐藤陽治. 「実験用の細胞培養と臨床用の細胞培養 (製造) の違いと考え方」, (2016) 細胞培養の基礎知識と細胞培養基材の利用・開発の留意点, 情報機構, 70-84,

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 再生医療等製品 (細胞加工製品) の品質・安全性・有効性確保のための科学, 口頭, 佐藤陽治, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.
2. 不死化網膜色素上皮細胞マーカーIRM1 の機能解析, 口頭, 黒田拓也, 安田智, 中島啓行, 松山さと子, 高田のぞみ, 草川森士, 梅澤明弘, 松山晃文, 川真田伸, 佐藤陽治, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.
3. 再生医療等臨床研究データベースシステム (RMeD-Japan) の整備, 口頭, 佐藤陽治, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
4. 次世代シーケンサーによる細胞加工製品の新規ウイルス試験法の開発, 口頭, 遊佐敬介, 前田洋助, 佐藤陽治, 苑宇哲, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
5. 臨床応用に向けたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の凍結保存法の開発, ポスター, 大橋文哉, 宮川繁, 吉田昇平, 齋藤充弘, 福嶋五月, 増田茂夫, 伊東絵望子, 伊勢岡弘子, 石川烈, 鮫島正, 佐藤陽治, 澤芳樹, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
6. ヒト間葉系幹細胞の分化フラストレート培養における網羅的遺伝子発現解析, 澤田留美, 森山幸祐, 河野健, 田中和沙, 佐藤陽治, 江端宏之, 佐々木沙織, 久保木タツサニーヤ, 木戸秋悟, ポスター, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
7. ヒト神経前駆細胞の悪性形質転換細胞検出試験, ポスター, 草川森士, 安田智, 黒田拓也, 佐

- 藤陽治, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.
8. フィーダー細胞 SNL76/7 が産生する内在性レトロウイルスの安全性について, ポスター, 苑宇哲, 前田洋助, 佐藤陽治, 遊佐敬介, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.
 9. Scientific challenges for the safety of cell-based therapeutic products—Development of testing methods for tumorigenicity assessment—, 口頭, 佐藤陽治, World Stem Cell Summit 16, 2016/12/8, 国外.
 10. ヒト間葉系幹細胞の培養力学場応答性に関する網羅的遺伝子発現解析, ポスター, 澤田留美, 河野 健, 田中和沙, 佐藤陽治, 森山幸祐, 江端宏之, 佐々木沙織, 久保木タッサニーヤ, 木戸秋悟, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016/11/22, 国内.
 11. Recent developments in regulation for cell therapy in Japan, 口頭, 佐藤陽治, 3rd International Alliance for Biological Standardization Conference on Cell Therapy, 2016/11/2, 国外.
 12. Japanese guidance on risk assessment of raw materials, 口頭, 佐藤陽治, 3rd International Alliance for Biological Standardization Conference on Cell Therapy, 2016/11/2, 国外.
 13. 再生・細胞医療の実用化におけるレギュラトリーサイエンスの役割, 口頭, 佐藤陽治, 「かながわ再生・細胞治療産業化ネットワーク」キックオフフォーラム, 2016/10/27, 国内.
 14. Current regulatory issues on tumorigenicity assessment of human pluripotent stem cell-derived products in Japan, 口頭, Sato Y, ISCI workshop: origins & implications of pluripotent stem cell (epi)genetic instability and a symposium: to honor the work of Leroy Stevens, 2016/10/15, 国外.
 15. 再生医療等製品の造腫瘍性関連試験法, 口頭, 佐藤陽治, 第 22 回 GLP 研修会(大阪), 2016/9/30, 国内.
 16. 再生・細胞医療製品の品質と安全性の評価について, 口頭, 佐藤陽治, 創薬薬理フォーラム第 24 回シンポジウム, 2016/9/29, 国内.
 17. 遺伝子治療の安全性評価—ゲノム編集技術の応用における留意点—, 口頭, 佐藤陽治, 第 68 回日本生物工学会大会, 2016/9/28, 国内.
 18. 再生医療等製品(細胞加工製品)の品質・安全性確保と規制, 口頭, 佐藤陽治, 第 26 回日本医療薬学会年会, 2016/9/19, 国内.
 19. Scientific Challenges for the safety, efficacy and quality of cell-based therapeutic products, 口頭, Sato Y, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society-Asia Pacific meeting 2016, 2016/9/5, 国外.
 20. Update on Japan's regulation of cell-based therapeutic products, 口頭, Sato Y, Stem Cell & Regenerative Medicine Global Congress 2016, 2016/8/23, 国外.
 21. ヒト細胞加工製品の造腫瘍性試験及び造腫瘍性細胞検出試験—関連ガイドラインの作成状況—, 口頭, 佐藤陽治, 第 43 回日本毒性学会学術年会, 2016/7/1, 国内.
 22. Assessment of genetic instability in human induced pluripotent stem cells during long-term cell culture, ポスター, Miura T, Okamura K, Yasuda S, Umezawa A, Sato Y, International Society for Stem Cell Research 2016 Annual Meeting, 2016/6/23, 国外.
 23. Association of line-1s expression with apobec3b genotypes in human mesenchymal stem cells. ポスター, Kono K, Sawada R, Sato Y. International Society for Stem Cell Research 2016, 2016/6/23, 国外.
 24. 再生医療等製品(細胞加工物)の品質とその確保のための規制, 口頭, 佐藤陽治, 神戸医療産業都市クラスター交流会, 2016/4/27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 再生医療の安全性評価のための科学—新しい医療製品のリスクの発生源をどう測るか—, 口頭, 佐藤陽治, 「リスクコミュニケーションのモデル形成事業」市民シンポジウム 再生医療の未来を創る～リスクとベネフィットを考える～, 2016/12/23, 国内.
2. 再生医療の安全性評価のための科学—新しい医療製品のリスクの発生源をどう測るか—, 口頭, 佐藤陽治, 「リスクコミュニケーションのモデル形成事業」市民シンポジウム 再生医療・遺伝子治療の未来へ～リスクとベネフィットを考える～, 2016/7/23, 国内.

(4) 特許出願

なし

IV. 成果の概要（非公開）

＊ II の総括研究報告の内容以外で、非公開とする成果の概要を記載してください。

（1）補助事業成果の概要

再生医療は、難治性疾患や機能不全に陥った組織や器官の根本的な治療が可能となる革新的な医療システムとして大きな期待が寄せられているが、極めて新しい医療システムということもあり、その実現のためには解決すべき課題も多い。中でも、iPS 細胞等を用いた再生医療を実現するにあたり、移植細胞の安全性評価のあり方に関しては現在活発な議論が展開されている。例えば、移植細胞の造腫瘍性検査においては、免疫不全マウスへの移植実験や、軟寒天コロニー形成試験などの測定方法が存在する。特に最近では、移植される細胞の遺伝子が不安定になり将来腫瘍になる危険性の有無を評価することも重要な関心事項の一つとなっている。しかしながら、腫瘍関連遺伝子 1 個に変異が存在するからと言って、必ずしも将来腫瘍化するとは限らないため、遺伝子変異解析による移植細胞の腫瘍化（安全性）を予見することは極めて困難であり、遺伝子変異を持つ細胞の安全性に関しては、世界的にもまだ結論は出ていない。本研究では、移植細胞の安全性評価におけるゲノム解析について、次世代シーケンサーを用いた細胞加工物/再生医療等製品におけるゲノム評価系の意義について検討を行った。

昨年度までに、モデルケースとして健常人由来 iPS 細胞（454E2）の培養維持期に生じた一塩基変異（SNV）を検出するために、次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析を実施し、各々の SNV に関するアリル頻度の継代に伴った変動について検討を行った。結果として、アリル頻度に基づいた変異の変動は、①継代に伴って変異率が上昇しているパターン、②継代に伴って変異率が減少しているパターン、③変異率 50%前後で一定しているパターンの 3 パターンに大別することができた。しかしながら、このような特定の変異箇所に着目したアリル頻度の変動は、細胞集団内における特定の亜集団の存在をモニターしているに過ぎないことが予想され、上述のアリル頻度の変動がゲノム不安定の程度を反映しているとは考えにくい。そのため、今年度は、iPS 細胞（454E2）の 3 継代ごとでの SNV のアリル頻度に着目するのではなく、3 継後に新たに検出された SNV の数をカウントすることで、継代間の SNV の数の変動を解析した。解析に使用した SNV 解析ツールは、低頻度のアリル頻度解析に適している Strelka を使い、全エクソン領域に対するシーケンスデータ量を 15Gb とし、9%以上のアリル頻度の SNV を抽出するという解析条件を設定した。その結果、3 継代ごとで新たに生じた SNV の数は、エキソーム領域に限定した場合平均して 80.8 個であり、細胞分裂あたりで換算すると 1 回の細胞分裂で 5.6 個の SNV が生じることが確認された。次に、iPS 細胞（454E2）以外の細胞種（HeLa 細胞、間葉系幹細胞、DNA 修復機構が破綻した疾患 iPS 細胞）において、同様に 3 継後に新たに検出された SNV 数の比較を行った結果、HeLa 細胞の SNV 数が最も少ないことが確認された。このことは、HeLa 細胞においては均一な細胞集団であること、あるいは新規に SNV が生じることがなく、継代後にはほとんど新しい変異が蓄積されることが示唆された。また、細胞分裂速度を考慮しても、細胞種間での SNV 数の出現傾向はそれぞれの細胞種間において同じであった。即ち、変異の蓄積などの原因により増殖優位性を獲得した細胞が細胞集団内に出現した場合、ある一定の期間の培養後には均一な集団となり（クローン化）、遺伝子的には不安定であるが細胞集団的には安定な状態になることが判明した。従って、低アリル頻度の存在も考慮した SNV の数の変動をモニターすることで、遺伝的不安定性および細胞集団の状態を評価することが可能となることが判明した。また、生物多様性を類推する多様性指数をもとに、細胞集団内のエキソーム領域における SNV アリル頻度に基づいた多様性評価を検証したとこ

ろ、細胞種間の SNV の多様度（エントロピー）の差異がより顕著になり、SNV 数のみをカウントした解析よりも優れていることが示唆された。この手法では、SNV の数および位置、その SNV のアリル頻度の情報を考慮しており、細胞のゲノム不安定性をパラメトリックに表すことが可能であると考えられた。

（2）当該年度における項目の実施状況及びマイルストーンの達成状況

（補助事業計画書のⅡ.3. 担当別補助事業概要に対応）

（1）細胞加工物等におけるゲノム不安定性に基づいた品質評価法の検証

実施状況は上述の通りであり、遅延なく進捗できた

マイルストーン達成度：100%

（2）継代以外の変動要因について検証

実施状況は上述手法に準じて凍結融解などの変動要因についても解析し、遅延なく進捗できた

マイルストーン達成度：100%

（3）データベース等の整備関連

【 該当： 有 ・ 無■】

（4）特許出願

【 該当： 有 ・ 無■】

V. 活動（班会議・運営委員会等の活動等）

プロジェクト全体会議：2回（平成28年8月5日、平成29年3月27日）

VI. 実施体制

【計画様式3】補助事業参加者リストの通り

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 再生医療実用化研究事業
(英語) Research Project for Practical Application of Regenerative Medicine

研究開発課題名：(日本語) 特定細胞加工物/再生医療等製品の品質確保に関する研究
(英語) Research on quality assurance of specified cell products/regenerative medicine products

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学 大学院工学研究科 教授 紀ノ岡 正博
所属 役職 氏名：(英語) Masahiro Kino-oka, Professor,
Graduate School of Engineering, Osaka University

実施期間：平成 26 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)
開発課題名：(英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要(総括研究報告)

研究開発代表者：新見 伸吾 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌 件、国際誌 件)

1. M Mizutani, H Samejima, H Terunuma, M Kino-oka, Experience of contamination during autologous cell manufacturing in cell processing facility under the Japanese Medical

Practitioners Act and the Medical Care Act, Regenerative Therapy, 2016, Vol. 5, 25–30.

2. 水谷 学, 紀ノ岡正博, 製造のモニタリング評価, Bio Industry, 2016, Vol. 33, No. 9, 49-57.
3. 水谷 学, 紀ノ岡正博, 製造のモニタリング評価, 再生医療・細胞治療のための細胞加工評価技術, CMC 出版, 2016, pp. 114-123.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 紀ノ岡正博, 細胞を育むことを志向する研究と実践する臨床培養士への期待, 第 16 回日本再生医療学会総会 (仙台), 2017, 口頭.
2. 水谷 学, 紀ノ岡正博, 新見 伸吾, 特定細胞加工物の原料となる細胞・組織採取の実態に係る調査, 第 16 回日本再生医療学会総会 (仙台), 2017, ポスター.
3. 千葉 友樹, 天野健太郎, 川下 泰範, 曾根大二郎, 野口 展士, 水谷 学, 紀ノ岡正博, 細胞培養加工施設における無菌操作等区域の清浄度維持に係るリスクの検討, 第 16 回日本再生医療学会総会 (仙台), 2017, ポスター.
4. 水谷 学, 野口 展士, 紀ノ岡正博, ピペット操作における飛沫により発生するリスクに関する研究, 第 16 回日本再生医療学会総会 (仙台), 2017, ポスター.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 紀ノ岡正博, 細胞製造性を鑑みた細胞生産システムの構築, 平成 28 年度 AMED 再生医療公開シンポジウム (東京), 2017/2/2, 国内.
2. 紀ノ岡正博, 再生医療製品の製造におけるコトづくり, 第 4 回再生医療産業化展 (大阪), 2017/2/16, 国内.

(4) 特許出願

記載項目なし。