

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 Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) 多能性幹細胞由来分化細胞の造腫瘍性試験の評価項目案の策定研究
(英語) Proposal for a guide line of tumorigenicity test for pluripotent stem cell-derived cells

研究開発担当者 (日本語) 細胞療法研究開発センター センター長 川真田 伸
所属 役職 氏名： (英語) Research & Development Center for Cell Therapy, Director and Chairman
Shin Kawamata

実施期間： 平成 28 年 10 月 11 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 該当なし
開発課題名： (英語) Not applicable

研究開発分担者 (日本語) 該当なし
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

和文)

1) 分化細胞の移植による品質試験の実施

本項目では、iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞 (RPE) の NOG マウス皮下移植による長期組織培養下での RPE 移植組織の組織学的検討を行った。この RPE 組織検討を通じ ①分化の出発原材料となった iPS 細胞の品質の検討、②分化した RPE の品質の検討、③RPE 出荷時の判定基準の妥当性の検討、④出荷までに CiRA と分化誘導実施機関で行った検査の内容の検討を行った。具体的には臨床用 iPS 細胞株 QHJI01s01 由来の RPE 1x10⁶ 個を NOG マウスの皮下に 10 匹移植し、移植後 12 週目、24 週目の組織の剖検が終了した。採取した移植組織切片について組織像の観察を行った。剖検した全てのマウスにおいて、移植部位に腫瘍等は観察されず、各臓器にも特に異常は確認されなかった。HE 染色の結果、奇形腫の発生もなく、移植切片に RPE に分化しきれていない分化中間体組織や未分化組織も認められなかった。ただ細胞の増殖マーカーとして、抗 Ki67 抗体で免疫染色した結果、移植後 12 週目では陽性率が 5%と通常の RPE 移植(移植後 12 週目では 1-2%程度)より高い値を示したが、移植後 24 週目では Ki67 陽性率が 1%程度まで下落したため QHJI01s01 株由来 RPE の造腫瘍能は極めて低いと判断した。

2) CiRA での臨床実施に必要な遺伝子検査の検討/討議

移植組織の組織学的検討で異常組織像を認めた iPS 細胞株 FfI01 株由来 RPE と FfI01 株由来 NSC(Neural Stem Cell)について、2016 年 12 月 15 日 CiRA、慶応 (Skype) との合同会議を行った。この会議で methylation 異常のあった遺伝子 site の報告、SNP array での遺伝子異常検出結果、遺伝子異常 profile を統合した signal pathway 解析結果について CiRA から説明を受けた。

3) 拠点 A と協業して実施した造腫瘍性試験と拠点での遺伝子検査の評価

発がん遺伝子リスト (COSMIC + Shibata List) の有効性の評価を行った。QHJI01s01 株の BCOR 遺伝子 (Shibata List) の異常が SNV array で報告されたが、RPE に分化誘導した段階では BCRO 遺伝子の異常は報告されておらず、QHJI01s01 株由来の RPE における造腫瘍性試験においても異常は示さなかった。これらのことから、iPS 細胞を使用する際に過剰かつ不必要な検査を避けるためには iPS 細胞と iPS 細胞から分化誘導した細胞の両方について遺伝子検査に関するデータを蓄積し、最終製品の移植試験の結果を統合して必要な検査を選択する必要がある。

4) 情報共有を目的とした会議

iPS 細胞由来細胞製品の品質上の問題点と本課題で予定される作業内容についての情報の共有化のために班会議を行った。今年度は、拠点 A (京都大学 CiRA 高橋淳先生、理研 CBD 高橋正代先生、慶応義塾大学 中村雅也先生) と拠点 B (京都大学 CiRA 山中伸弥先生、高須直子先生) と個別に会議を行った。

英文)

1) In vivo quality control test of iPSC-derived differentiated cells.

This year, we have conducted histological examination of iPSC cell-derived retinal pigment epithelial cells (RPE) which were transplanted subcutaneously into NOG mice. With this test, the followings were studied: (1) check the quality of iPSC cells as a starting material of differentiation, (2) check the proliferation and degree of maturation of differentiated RPE, (3) check the reliability of shipping criteria for iPSC-derived RPE, (4) review a set of genetic tests conducted at CiRA iPSC cell stock.

1×10^6 of iPSC cells QHJI01s01-derived RPE cells were transplanted subcutaneously into 10 NOG mice, and 5 implanted tissues were examined histologically at 12 weeks and 24 weeks after transplantation respectively. No tumorigenic event was observed in all mice monitored and in major organs examined (heart, lung, kidney, liver, spleen, uterus/ testis, brain). Histological examination by HE staining showed that no teratoma or no RPE intermediate cells was found in transplanted tissue. Immunostaining with the anti-Ki67 antibody that could evaluate the proliferation rate of transplanted cells at the time of sacrifice showed the ratio of Ki67 positive cells were around 5% at 12 weeks after transplantation, which is higher than average (around 1% at 12 weeks). However, this ratio dropped to around 1% when examined at 24 weeks. Altogether, we concluded that the potential to form tumor from transplanted QHJI 01s01-derived RPE was very low or trivial.

2) Discussion on the genetic test at CiRA

Method and results of genetic analysis on Ffi01-derived RPE or Ffi01-derived NSC (neural stem cell) were discussed at the joint meeting with CiRA and Keio University (via Skype) on December 15, 2016. In this meeting, abnormal methylation status and genetic abnormality detected at certain regions, possible signaling pathways activated via commonly observed abnormal epigenetic and genetic status in these products and the result of mitochondria sequence was reported from genetic testing team of CiRA and discuss the efficacy and usability of the test results.

3) Evaluation of efficacy of genetic tests performed at clinical sites.

Efficacy of oncogenic genes list (genes in COSMIC plus Shibata list) was evaluated. Abnormality of *BCOR* gene (in Shibata list) in QHJI 01s01 was reported by the SNV array. However, such abnormality of *BCOR* gene in QHJI 01s01-derived RPE was not reported and in vivo transplantation study of QHJI 01s01-derived RPE showed no abnormality. Therefore, to avoid excess and unnecessary testing at the stage of starting material iPSCs based on regulatory science, we need to accumulate data related to genetic testing on both iPSCs and their differentiated products and combine the result of transplantation testing of final product to address the scope and depth of required testing for a starting material (iPSC) and final products respectively.

4) Organizing information sharing meeting

Testing data sharing among iPSCs supplying organization and clinical institution that differentiated and generate iPSC-derived final products for clinical use is essential to improve the quality and safety of iPSCs-derived products. As the quality of iPSCs-derived product greatly influenced by the quality of iPSC as a starting material. This year, meetings were arranged separately with teams for iPSC-derived Dopamine Neuron by Professor Jun Takahashi, CiRA, RPE by Team leader Masayoshi Takahashi of RIKEN CBD, Neural Stem Cell by Professor Masaya Nakamura of Keio University and iPSC cell stock organized by Professors Shinya Yamanaka and Naoko Takasu of CiRA and discuss the point to consider in respective project.

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 0 件、国際誌 2 件）

1. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration

Mandai M, Kawamata S, Takahashi M et al. N Engl. J Med. 2017 Mar 16;375(11) 1038-1046

2. Report of the International Regulatory Forum on Human Cell Therapy and Gene Therapy

Products, T Hayakawa, S Kawamata et al. Biologicals 2016 44, 476-479

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

平成 28 年度 AMED 再生医療公開シンポジウムにて「多能性幹細胞由来分化細胞の造腫瘍性試験の評価項目案の策定研究」のポスター発表、2017/2/2、東京 TKP ガーデンシティ品川

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特記事項なし

(4) 特許出願

特記事項なし