

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： 再生医療実用化研究事業
Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

補助事業課題名： 細胞加工製品の造腫瘍性評価における多施設共同研究
Multisite evaluation study on analytical methods for non-clinical safety
assessment of human-derived regenerative medical products

補助事業担当者 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長 佐藤 陽治

所属 役職 氏名： Yoji Sato, Head, Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute
of Health Sciences

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

分担研究 研究総括、造腫瘍性関連試験のバリデーション、安全性・品質試験の国内外動向調査
分担課題名： 及び国際連携活動
Research management, validation of tumorigenicity-associated tests, survey of
domestic and international trends in safety and quality assessment, and
international coordination

補助事業分担者 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長 佐藤 陽治

所属 役職 氏名： Yoji Sato, Head, Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute
of Health Sciences

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究では特に、細胞加工製品の造腫瘍性評価に焦点を当て、官民共同のチームにより、①腫瘍発生リスクを惹起するハザードとその評価の考え方を、国内外動向を踏まえつつ整理するとともに、②造腫瘍性関連試験法について、標準プロトコールを作成し、多施設において比較・検証することにより、当該試験法の有用性・再現性を明らかにし、その結果をもとに国際的枠組みにおいて提言を行い、国際標準化を図る。なお並行して、造腫瘍性評価に関連した2つの課題、③投与後の製品由来細胞の「体内動態評価」及び④原料や製法の変更前後の製品の「品質同等性評価」について、考え方を整理し先導的に国内外に提示することにより、国際協調の素地の醸成を図る。本研究プロジェクトを **MEASURE** と名付け、造腫瘍性評価並びに体内動態評価及び品質同等性評価に関する議論・調査を行うステップ 1 と、造腫瘍性関連試験法及び体内動態評価法に関する実験的検証を行うステップ 2 とに大きく分けて実施した。

[ステップ 1] 細胞加工製品の造腫瘍性リスク評価法について、日・米・欧のガイドラインを調査することにより比較を行った。3 極でコンセンサスを得られた評価方法・考え方はないのが現状であり、細胞加工製品の開発の加速化のためにも 3 極間での国際的な標準化が期待された。**Key Opinion Leader (KOL)** に対するインタビューにおいては、iPS 細胞のゲノム不安定性による造腫瘍性リスクについて意見を得た。ゲノム不安定の評価は未確立で、今後科学的な検証を進める必要があることが分かった。製品由来細胞の体内動態について、PMDA、FDA、EMA 及び ISSCR から発行されているガイドライン調査を行い、体内動態試験の位置づけの相違点をまとめた。細胞動態試験は、有効性や毒性/安全性データを裏付ける根拠資料として用いられるべきであるという点で共通していた。また体内動態試験法及び日米欧の臨床試験における体内動態評価の実施状況について調査を行った。体内動態試験の再生医療等製品開発上の意義、結果の取扱い、方法論等に関する情報収集を目的として、KOL に意見徴集・意見交換を実施した。品質同等性評価については、国内の法規制の状況整理と諸外国の調査を実施した上で、多能性幹細胞加工製品を中心に研究開発の進め方を品質の観点から総合的に議論した。しかしながら製品由来細胞の状態が多岐にわたっており、チームとして標準的見解を取り纏めることが困難であった。そこで検討結果に基づき、国内 KOL インタビューを実施して意見を得た。

造腫瘍性試験法に関して、調査結果から議論・考察し、多施設共同バリデーション試験において標準化すべき造腫瘍性試験を *in vivo* 試験および *in vitro* 試験において選定した。体内動態試験法に関して、最も簡便かつ汎用的である qPCR についてプロトコール作成のための予備試験を実施した。

[ステップ 2] ステップ 1 で選定した多施設検証すべき試験法である、未分化多能性幹細胞を検出するマウス造腫瘍性試験法、PCR 法及び培養増幅法と、形質転換細胞を検出するデジタル軟寒天コロニー検出法及び細胞増殖特性法について標準プロトコール作成に向けた予備的な試験の実施または検討を行った。基礎データ取得について、重度免疫不全 NOG マウスにマトリゲルおよびヒト間葉系幹細胞と共に HEK293 細胞株を皮下投与し、その造腫瘍性を検討した。

国際連携においては、本研究成果を広く海外にも周知する目的で、NPO 法人である健康環境科学研究機構 (HESI) や各種学会と連携し、欧米の企業や規制当局にも本活動の情報を共有した。

Especially focusing on tumorigenicity assessment of cell therapy products (CTPs), a national institute and private companies work together to provide sound science-based and globally acceptable consensus for safety evaluation policy in the R&D of products. The subjects of research are as follows: a) organizing the concept of hazards causing tumorigenicity risks and their evaluation considering domestic and international trends, b) establishment of standard protocols and multisite validation for tumorigenicity-associated tests to clarify its usefulness and repeatability, c) organizing and reporting the concept of biodistribution testing for transplanted cells, and d) organizing and reporting the concept of biocomparability evaluation for modification of ingredients and processing. This research project named as MEASURE is classified into two steps: step 1, search and discussion on the regulatory policy on tumorigenicity, biocomparability, and biodistribution evaluation; step 2, experimental multi-site joint research for tumorigenicity assessment.

[Step 1] As for evaluation of tumorigenicity risks of CTPs, we surveyed and compared guidelines issued by Japan, US and EU. Since three parties have built no consensus in testing methods or concepts for tumorigenicity of CTPs, international standardization was expected to promote the product development. Interviews with key opinion leaders (KOLs) allowed us to obtain opinions on tumorigenicity risks associated with genomic instability of iPS cells. As evaluation of the genomic instability has not been established, its scientific research should be advanced. As for biodistribution of transplanted CTPs, we surveyed guidelines issued by PMDA, FDA, EMA and ISSCR, and summarized their difference in positions of biodistribution testing. The biodistribution testing of CTPs seems to be commonly necessary for confirming efficacy and toxicity/safety of products. We also surveyed testing methods for biodistribution and states of the biodistribution evaluation in clinical research conducted in Japan, US and EU. Interviews with KOLs were performed to obtain information on the meaning of biodistribution testing for product development, handling of results, and testing methods. As for biocomparability of CTPs, we mainly discussed how to proceed with R&D of pluripotent stem cell (PSC)-derived products in respect of product quality after summarizing domestic regulation and surveying foreign countries. However, it was challenging for the team to organize standard views on biocomparability of CTPs, owing to variation of cell conditions. Interviews with KOLs was performed to obtain opinions based on the investigation.

Several methods for in vivo and in vitro tumorigenicity testing were selected to validate in multisite facilities, following discussion of results from investigation. As qPCR method was quite easy and generally used for biodistribution evaluation of CTPs, preliminary experiments using qPCR were performed to prepare a standard protocol.

[Step 2] We studied the in vivo and in vitro tumorigenicity-associated tests selected for multisite validation to prepare standard protocols. In vivo tumorigenicity testing, a PCR method, and a highly efficient amplification method were selected for detection of residual undifferentiated iPS cells. A digital soft agar colony formation assay and a cell growth analysis were selected for detection of transformed cells. To obtain basic data of TPD₅₀ for in vivo tumorigenicity testing, severe immunodeficient NOG mice were subcutaneously injected with HEK293 cells, mesenchymal stem cells and Matrigel, and their tumor formation was monitored.

Reporting on our activities, we internationally coordinated with the Health and Environmental Sciences Institute (HESI) and associated scientific societies, and shared information on our research project with companies and regulators in the US and EU.

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0件）

特記事項なし。

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Challenges for standardization of tumorigenicity-associated testing methods for human cell-based therapeutic products: introduction of a draft guidance document, 口頭, 安田智, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
2. Consideration for ensuring the quality and comparability of pluripotent stem cell-derived products, 口頭, 坂東博人, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
3. Draft protocols of in vivo and in vitro testing methods for tumorigenicity evaluation, 口頭, 我妻昭彦, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
4. Evaluation of biodistribution of pluripotent stem cell-derived products, 口頭, 三好荘介, 第16回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
5. FIRM-CoNCEPT supports “MEASURE”, 口頭, 山本恵司, World Stem Cell Summit 16, 2016/12/8, 国外.
6. 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.

(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。

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：再生医療実用化研究事業

Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名：細胞加工製品の造腫瘍性評価における多施設共同研究

Multisite evaluation study on analytical methods for non-clinical safety assessment of human-derived regenerative medical products

研究開発担当者 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長 佐藤 陽治

所属 役職 氏名： Yoji Sato, Head, Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences

実施期間：平成28年10月11日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 研究総括、造腫瘍性関連試験のバリデーション、安全性・品質試験の国内外動向調査
開発課題名： 及び国際連携活動

Research management, validation of tumorigenicity-associated tests, survey of domestic and international trends in safety and quality assessment, and international coordination

研究開発分担者 奈良岡 準、アステラス製薬株式会社 安全性研究所 室長

所属 役職 氏名： Jun Naraoka, Executive Director, Drug Safety Research Labs., Astellas Pharma Inc.

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究では特に、細胞加工製品の造腫瘍性評価に焦点を当て、官民共同のチームにより、①腫瘍発生リスクを惹起するハザードとその評価の考え方を、国内外動向を踏まえつつ整理するとともに、②造腫瘍性関連試験法について、標準プロトコールを作成し、多施設において比較・検証することにより、当該試験法の有用性・再現性を明らかにし、その結果をもとに国際的枠組みにおいて提言を行い、国際標準化を図る。なお並行して、造腫瘍性評価に関連した2つの課題、③投与後の製品由来細胞の「体内動態評価」及び④原料や製法の変更前後の製品の「品質同等性評価」について、考え方を整理し先導的に国内外に提示することにより、国際協調の素地の醸成を図る。本研究プロジェクトをMEASUREと名付け、造腫瘍性評価並びに体内動態評価及び品質同等性評価に関する議論・調査を行うステップ1と、造腫瘍性関連試験法及び体内動態評価法に関する実験的検証を行うステップ2とに大きく分けて実施した。

[ステップ1] 細胞加工製品の造腫瘍性リスク評価法について、日・米・欧のガイドラインを調査することにより比較を行った。3極でコンセンサスを得られた評価方法・考え方はないのが現状であり、細胞加工製品の開発の加速化のためにも3極間での国際的な標準化が期待された。Key Opinion Leader (KOL) に対するインタビューにおいては、iPS細胞のゲノム不安定性による造腫瘍性リスクについて意見を得た。ゲノム不安定の評価は未確立で、今後科学的な検証を進める必要があることが分かった。製品由来細胞の体内動態について、PMDA、FDA、EMA及びISSCRから発行されているガイドライン調査を行い、体内動態試験の位置づけの相違点をまとめた。細胞動態試験は、有効性や毒性/安全性データを裏付ける根拠資料として用いられるべきであるという点で共通していた。また体内動態試験法及び日米欧の臨床試験における体内動態評価の実施状況について調査を行った。体内動態試験の再生医療等製品開発上の意義、結果の取扱い、方法論等に関する情報収集を目的として、KOLに意見徴集・意見交換を実施した。品質同等性評価については、国内の法規制の状況整理と諸外国の調査を実施した上で、多能性幹細胞加工製品を中心に研究開発の進め方を品質の観点から総合的に議論した。しかしながら製品由来細胞の状態が多岐にわたっており、チームとして標準的の見解を取り纏めることが困難であった。そこで検討結果に基づき、国内KOLインタビューを実施して意見を得た。

造腫瘍性試験法に関して、調査結果から議論・考察し、多施設共同バリデーション試験において標準化すべき造腫瘍性試験をin vivo試験およびin vitro試験において選定した。体内動態試験法に関して、最も簡便かつ汎用的であるqPCRについてプロトコール作成のための予備試験を実施した。

[ステップ2] ステップ1で選定した多施設検証すべき試験法である、未分化多能性幹細胞を検出するマウス造腫瘍性試験法、PCR法及び培養増幅法と、形質転換細胞を検出するデジタル軟寒天コロニー検出法及び細胞増殖特性法について標準プロトコール作成に向けた予備的な試験の実施または検討を行った。基礎データ取得について、重度免疫不全NOGマウスにマトリゲルおよびヒト間葉系幹細胞と共にHEK293細胞株を皮下投与し、その造腫瘍性を検討した。

国際連携においては、本研究成果を広く海外にも周知する目的で、NPO法人である健康環境科学研究機構(HESI)や各種学会と連携し、欧米の企業や規制当局にも本活動の情報を共有した。

Especially focusing on tumorigenicity assessment of cell therapy products (CTPs), a national institute and private companies work together to provide sound science-based and globally acceptable consensus for safety evaluation policy in the R&D of products. The subjects of research are as follows: a) organizing the concept of hazards causing tumorigenicity risks and their evaluation considering domestic and international trends, b) establishment of standard protocols and multisite validation for tumorigenicity-associated tests to clarify its usefulness and repeatability, c) organizing and reporting the concept of biodistribution testing for transplanted cells, and d) organizing and reporting the concept of biocomparability evaluation for modification of ingredients and processing. This research project named as MEASURE is classified into two steps: step 1, search and discussion on the regulatory policy on tumorigenicity, biocomparability, and biodistribution evaluation; step 2, experimental multi-site joint research for tumorigenicity assessment.

[Step 1] As for evaluation of tumorigenicity risks of CTPs, we surveyed and compared guidelines issued by Japan, US and EU. Since three parties have built no consensus in testing methods or concepts for tumorigenicity of CTPs, international standardization was expected to promote the product development. Interviews with key opinion leaders (KOLs) allowed us to obtain opinions on tumorigenicity risks associated with genomic instability of iPS cells. As evaluation of the genomic instability has not been established, its scientific research should be advanced. As for biodistribution of transplanted CTPs, we surveyed guidelines issued by PMDA, FDA, EMA and ISSCR, and summarized their difference in positions of biodistribution testing. The biodistribution testing of CTPs seems to be commonly necessary for confirming efficacy and toxicity/safety of products. We also surveyed testing methods for biodistribution and states of the biodistribution evaluation in clinical research conducted in Japan, US and EU. Interviews with KOLs were performed to obtain information on the meaning of biodistribution testing for product development, handling of results, and testing methods. As for biocomparability of CTPs, we mainly discussed how to proceed with R&D of pluripotent stem cell (PSC)-derived products in respect of product quality after summarizing domestic regulation and surveying foreign countries. However, it was challenging for the team to organize standard views on biocomparability of CTPs, owing to variation of cell conditions. Interviews with KOLs was performed to obtain opinions based on the investigation.

Several methods for in vivo and in vitro tumorigenicity testing were selected to validate in multisite facilities, following discussion of results from investigation. As qPCR method was quite easy and generally used for biodistribution evaluation of CTPs, preliminary experiments using qPCR were performed to prepare a standard protocol.

[Step 2] We studied the in vivo and in vitro tumorigenicity-associated tests selected for multisite validation to prepare standard protocols. In vivo tumorigenicity testing, a PCR method, and a highly efficient amplification method were selected for detection of residual undifferentiated iPS cells. A digital soft agar colony formation assay and a cell growth analysis were selected for detection of transformed cells. To obtain basic data of TPD₅₀ for in vivo tumorigenicity testing, severe immunodeficient NOG mice were subcutaneously injected with

HEK293 cells, mesenchymal stem cells and Matrigel, and their tumor formation was monitored.

Reporting on our activities, we internationally coordinated with the Health and Environmental Sciences Institute (HESI) and associated scientific societies, and shared information on our research project with companies and regulators in the US and EU.

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 0 件）

特記事項なし。

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Challenges for standardization of tumorigenicity-associated testing methods for human cell-based therapeutic products: introduction of a draft guidance document, 口頭, 安田智, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
2. Consideration for ensuring the quality and comparability of pluripotent stem cell-derived products, 口頭, 坂東博人, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
3. Draft protocols of in vivo and in vitro testing methods for tumorigenicity evaluation, 口頭, 我妻昭彦, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
4. Evaluation of biodistribution of pluripotent stem cell-derived products, 口頭, 三好荘介, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
5. FIRM-CoNCEPT supports “MEASURE”, 口頭, 山本恵司, World Stem Cell Summit 16, 2016/12/8, 国外.
6. 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.

(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。

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： 再生医療実用化研究事業

Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名： 細胞加工製品の造腫瘍性評価における多施設共同研究

Multisite evaluation study on analytical methods for non-clinical safety assessment of human-derived regenerative medical products

研究開発担当者 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長 佐藤 陽治

所属 役職 氏名： Yoji Sato, Head, Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences

実施期間： 平成28年10月11日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 研究総括、造腫瘍性関連試験のバリデーション、安全性・品質試験の国内外動向調査
開発課題名： 及び国際連携活動

Research management, validation of tumorigenicity-associated tests, survey of domestic and international trends in safety and quality assessment, and international coordination

研究開発分担者 渡辺 武志、武田薬品工業株式会社 薬剤安全性研究所 主席研究員

所属 役職 氏名： Takeshi Watanabe, Associate Director, Drug Safety Research Evaluation, Takeda Pharmaceutical Company Limited

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究では特に、細胞加工製品の造腫瘍性評価に焦点を当て、官民共同のチームにより、①腫瘍発生リスクを惹起するハザードとその評価の考え方を、国内外動向を踏まえつつ整理するとともに、②造腫瘍性関連試験法について、標準プロトコールを作成し、多施設において比較・検証することにより、当該試験法の有用性・再現性を明らかにし、その結果をもとに国際的枠組みにおいて提言を行い、国際標準化を図る。なお並行して、造腫瘍性評価に関連した2つの課題、③投与後の製品由来細胞の「体内動態評価」及び④原料や製法の変更前後の製品の「品質同等性評価」について、考え方を整理し先導的に国内外に提示することにより、国際協調の素地の醸成を図る。本研究プロジェクトをMEASUREと名付け、造腫瘍性評価並びに体内動態評価及び品質同等性評価に関する議論・調査を行うステップ1と、造腫瘍性関連試験法及び体内動態評価法に関する実験的検証を行うステップ2とに大きく分けて実施した。

[ステップ1] 細胞加工製品の造腫瘍性リスク評価法について、日・米・欧のガイドラインを調査することにより比較を行った。3極でコンセンサスを得られた評価方法・考え方はないのが現状であり、細胞加工製品の開発の加速化のためにも3極間での国際的な標準化が期待された。Key Opinion Leader (KOL) に対するインタビューにおいては、iPS細胞のゲノム不安定性による造腫瘍性リスクについて意見を得た。ゲノム不安定の評価は未確立で、今後科学的な検証を進める必要があることが分かった。製品由来細胞の体内動態について、PMDA、FDA、EMA及びISSCRから発行されているガイドライン調査を行い、体内動態試験の位置づけの相違点をまとめた。細胞動態試験は、有効性や毒性/安全性データを裏付ける根拠資料として用いられるべきであるという点で共通していた。また体内動態試験法及び日米欧の臨床試験における体内動態評価の実施状況について調査を行った。体内動態試験の再生医療等製品開発上の意義、結果の取扱い、方法論等に関する情報収集を目的として、KOLに意見徴集・意見交換を実施した。品質同等性評価については、国内の法規制の状況整理と諸外国の調査を実施した上で、多能性幹細胞加工製品を中心に研究開発の進め方を品質の観点から総合的に議論した。しかしながら製品由来細胞の状態が多岐にわたっており、チームとして標準的見解を取り纏めることが困難であった。そこで検討結果に基づき、国内KOLインタビューを実施して意見を得た。

造腫瘍性試験法に関して、調査結果から議論・考察し、多施設共同バリデーション試験において標準化すべき造腫瘍性試験をin vivo試験およびin vitro試験において選定した。体内動態試験法に関して、最も簡便かつ汎用的であるqPCRについてプロトコール作成のための予備試験を実施した。

[ステップ2] ステップ1で選定した多施設検証すべき試験法である、未分化多能性幹細胞を検出するマウス造腫瘍性試験法、PCR法及び培養増幅法と、形質転換細胞を検出するデジタル軟寒天コロニー検出法及び細胞増殖特性法について標準プロトコール作成に向けた予備的な試験の実施または検討を行った。基礎データ取得について、重度免疫不全NOGマウスにマトリゲルおよびヒト間葉系幹細胞と共にHEK293細胞株を皮下投与し、その造腫瘍性を検討した。

国際連携においては、本研究成果を広く海外にも周知する目的で、NPO法人である健康環境科学研究機構(HESI)や各種学会と連携し、欧米の企業や規制当局にも本活動の情報を共有した。

Especially focusing on tumorigenicity assessment of cell therapy products (CTPs), a national institute and private companies work together to provide sound science-based and globally acceptable consensus for safety evaluation policy in the R&D of products. The subjects of research are as follows: a) organizing the concept of hazards causing tumorigenicity risks and their evaluation considering domestic and international trends, b) establishment of standard protocols and multisite validation for tumorigenicity-associated tests to clarify its usefulness and repeatability, c) organizing and reporting the concept of biodistribution testing for transplanted cells, and d) organizing and reporting the concept of biocomparability evaluation for modification of ingredients and processing. This research project named as MEASURE is classified into two steps: step 1, search and discussion on the regulatory policy on tumorigenicity, biocomparability, and biodistribution evaluation; step 2, experimental multi-site joint research for tumorigenicity assessment.

[Step 1] As for evaluation of tumorigenicity risks of CTPs, we surveyed and compared guidelines issued by Japan, US and EU. Since three parties have built no consensus in testing methods or concepts for tumorigenicity of CTPs, international standardization was expected to promote the product development. Interviews with key opinion leaders (KOLs) allowed us to obtain opinions on tumorigenicity risks associated with genomic instability of iPS cells. As evaluation of the genomic instability has not been established, its scientific research should be advanced. As for biodistribution of transplanted CTPs, we surveyed guidelines issued by PMDA, FDA, EMA and ISSCR, and summarized their difference in positions of biodistribution testing. The biodistribution testing of CTPs seems to be commonly necessary for confirming efficacy and toxicity/safety of products. We also surveyed testing methods for biodistribution and states of the biodistribution evaluation in clinical research conducted in Japan, US and EU. Interviews with KOLs were performed to obtain information on the meaning of biodistribution testing for product development, handling of results, and testing methods. As for biocomparability of CTPs, we mainly discussed how to proceed with R&D of pluripotent stem cell (PSC)-derived products in respect of product quality after summarizing domestic regulation and surveying foreign countries. However, it was challenging for the team to organize standard views on biocomparability of CTPs, owing to variation of cell conditions. Interviews with KOLs was performed to obtain opinions based on the investigation.

Several methods for in vivo and in vitro tumorigenicity testing were selected to validate in multisite facilities, following discussion of results from investigation. As qPCR method was quite easy and generally used for biodistribution evaluation of CTPs, preliminary experiments using qPCR were performed to prepare a standard protocol.

[Step 2] We studied the in vivo and in vitro tumorigenicity-associated tests selected for multisite validation to prepare standard protocols. In vivo tumorigenicity testing, a PCR method, and a highly efficient amplification method were selected for detection of residual undifferentiated iPS cells. A digital soft agar colony formation assay and a cell growth analysis were selected for detection of transformed cells. To obtain basic data of TPD₅₀ for in vivo tumorigenicity testing, severe immunodeficient NOG mice were subcutaneously injected with

HEK293 cells, mesenchymal stem cells and Matrigel, and their tumor formation was monitored.

Reporting on our activities, we internationally coordinated with the Health and Environmental Sciences Institute (HESI) and associated scientific societies, and shared information on our research project with companies and regulators in the US and EU.

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 0 件）

特記事項なし。

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Challenges for standardization of tumorigenicity-associated testing methods for human cell-based therapeutic products: introduction of a draft guidance document, 口頭, 安田智, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
2. Consideration for ensuring the quality and comparability of pluripotent stem cell-derived products, 口頭, 坂東博人, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
3. Draft protocols of in vivo and in vitro testing methods for tumorigenicity evaluation, 口頭, 我妻昭彦, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
4. Evaluation of biodistribution of pluripotent stem cell-derived products, 口頭, 三好荘介, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
5. FIRM-CoNCEPT supports “MEASURE”, 口頭, 山本恵司, World Stem Cell Summit 16, 2016/12/8, 国外.
6. 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.

(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。

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： 再生医療実用化研究事業

Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名： 細胞加工製品の造腫瘍性評価における多施設共同研究

Multisite evaluation study on analytical methods for non-clinical safety assessment of human-derived regenerative medical products

研究開発担当者 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長 佐藤 陽治

所属 役職 氏名： Yoji Sato, Head, Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences

実施期間： 平成 28年 10月 11日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 研究総括、造腫瘍性関連試験のバリデーション、安全性・品質試験の国内外動向調査
開発課題名： 及び国際連携活動

Research management, validation of tumorigenicity-associated tests, survey of domestic and international trends in safety and quality assessment, and international coordination

研究開発分担者 坂東 清子、大日本住友製薬株式会社 前臨床研究所 所長

所属 役職 氏名： Kiyoko Bando, Senior Director, Preclinical Research Laboratories, Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究では特に、細胞加工製品の造腫瘍性評価に焦点を当て、官民共同のチームにより、①腫瘍発生リスクを惹起するハザードとその評価の考え方を、国内外動向を踏まえつつ整理するとともに、②造腫瘍性関連試験法について、標準プロトコールを作成し、多施設において比較・検証することにより、当該試験法の有用性・再現性を明らかにし、その結果をもとに国際的枠組みにおいて提言を行い、国際標準化を図る。なお並行して、造腫瘍性評価に関連した2つの課題、③投与後の製品由来細胞の「体内動態評価」及び④原料や製法の変更前後の製品の「品質同等性評価」について、考え方を整理し先導的に国内外に提示することにより、国際協調の素地の醸成を図る。本研究プロジェクトをMEASUREと名付け、造腫瘍性評価並びに体内動態評価及び品質同等性評価に関する議論・調査を行うステップ1と、造腫瘍性関連試験法及び体内動態評価法に関する実験的検証を行うステップ2とに大きく分けて実施した。

[ステップ1] 細胞加工製品の造腫瘍性リスク評価法について、日・米・欧のガイドラインを調査することにより比較を行った。3極でコンセンサスを得られた評価方法・考え方はないのが現状であり、細胞加工製品の開発の加速化のためにも3極間での国際的な標準化が期待された。Key Opinion Leader (KOL) に対するインタビューにおいては、iPS細胞のゲノム不安定性による造腫瘍性リスクについて意見を得た。ゲノム不安定の評価は未確立で、今後科学的な検証を進める必要があることが分かった。製品由来細胞の体内動態について、PMDA、FDA、EMA及びISSCRから発行されているガイドライン調査を行い、体内動態試験の位置づけの相違点をまとめた。細胞動態試験は、有効性や毒性/安全性データを裏付ける根拠資料として用いられるべきであるという点で共通していた。また体内動態試験法及び日米欧の臨床試験における体内動態評価の実施状況について調査を行った。体内動態試験の再生医療等製品開発上の意義、結果の取扱い、方法論等に関する情報収集を目的として、KOLに意見徴集・意見交換を実施した。品質同等性評価については、国内の法規制の状況整理と諸外国の調査を実施した上で、多能性幹細胞加工製品を中心に研究開発の進め方を品質の観点から総合的に議論した。しかしながら製品由来細胞の状態が多岐にわたっており、チームとして標準的見解を取り纏めることが困難であった。そこで検討結果に基づき、国内KOLインタビューを実施して意見を得た。

造腫瘍性試験法に関して、調査結果から議論・考察し、多施設共同バリデーション試験において標準化すべき造腫瘍性試験をin vivo試験およびin vitro試験において選定した。体内動態試験法に関して、最も簡便かつ汎用的であるqPCRについてプロトコール作成のための予備試験を実施した。

[ステップ2] ステップ1で選定した多施設検証すべき試験法である、未分化多能性幹細胞を検出するマウス造腫瘍性試験法、PCR法及び培養増幅法と、形質転換細胞を検出するデジタル軟寒天コロニー検出法及び細胞増殖特性法について標準プロトコール作成に向けた予備的な試験の実施または検討を行った。基礎データ取得について、重度免疫不全NOGマウスにマトリゲルおよびヒト間葉系幹細胞と共にHEK293細胞株を皮下投与し、その造腫瘍性を検討した。

国際連携においては、本研究成果を広く海外にも周知する目的で、NPO法人である健康環境科学研究機構(HESI)や各種学会と連携し、欧米の企業や規制当局にも本活動の情報を共有した。

Especially focusing on tumorigenicity assessment of cell therapy products (CTPs), a national institute and private companies work together to provide sound science-based and globally acceptable consensus for safety evaluation policy in the R&D of products. The subjects of research are as follows: a) organizing the concept of hazards causing tumorigenicity risks and their evaluation considering domestic and international trends, b) establishment of standard protocols and multisite validation for tumorigenicity-associated tests to clarify its usefulness and repeatability, c) organizing and reporting the concept of biodistribution testing for transplanted cells, and d) organizing and reporting the concept of biocomparability evaluation for modification of ingredients and processing. This research project named as MEASURE is classified into two steps: step 1, search and discussion on the regulatory policy on tumorigenicity, biocomparability, and biodistribution evaluation; step 2, experimental multi-site joint research for tumorigenicity assessment.

[Step 1] As for evaluation of tumorigenicity risks of CTPs, we surveyed and compared guidelines issued by Japan, US and EU. Since three parties have built no consensus in testing methods or concepts for tumorigenicity of CTPs, international standardization was expected to promote the product development. Interviews with key opinion leaders (KOLs) allowed us to obtain opinions on tumorigenicity risks associated with genomic instability of iPS cells. As evaluation of the genomic instability has not been established, its scientific research should be advanced. As for biodistribution of transplanted CTPs, we surveyed guidelines issued by PMDA, FDA, EMA and ISSCR, and summarized their difference in positions of biodistribution testing. The biodistribution testing of CTPs seems to be commonly necessary for confirming efficacy and toxicity/safety of products. We also surveyed testing methods for biodistribution and states of the biodistribution evaluation in clinical research conducted in Japan, US and EU. Interviews with KOLs were performed to obtain information on the meaning of biodistribution testing for product development, handling of results, and testing methods. As for biocomparability of CTPs, we mainly discussed how to proceed with R&D of pluripotent stem cell (PSC)-derived products in respect of product quality after summarizing domestic regulation and surveying foreign countries. However, it was challenging for the team to organize standard views on biocomparability of CTPs, owing to variation of cell conditions. Interviews with KOLs was performed to obtain opinions based on the investigation.

Several methods for in vivo and in vitro tumorigenicity testing were selected to validate in multisite facilities, following discussion of results from investigation. As qPCR method was quite easy and generally used for biodistribution evaluation of CTPs, preliminary experiments using qPCR were performed to prepare a standard protocol.

[Step 2] We studied the in vivo and in vitro tumorigenicity-associated tests selected for multisite validation to prepare standard protocols. In vivo tumorigenicity testing, a PCR method, and a highly efficient amplification method were selected for detection of residual undifferentiated iPS cells. A digital soft agar colony formation assay and a cell growth analysis were selected for detection of transformed cells. To obtain basic data of TPD₅₀ for in vivo tumorigenicity testing, severe immunodeficient NOG mice were subcutaneously injected with

HEK293 cells, mesenchymal stem cells and Matrigel, and their tumor formation was monitored.

Reporting on our activities, we internationally coordinated with the Health and Environmental Sciences Institute (HESI) and associated scientific societies, and shared information on our research project with companies and regulators in the US and EU.

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 0 件）

特記事項なし。

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Challenges for standardization of tumorigenicity-associated testing methods for human cell-based therapeutic products: introduction of a draft guidance document, 口頭, 安田智, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
2. Consideration for ensuring the quality and comparability of pluripotent stem cell-derived products, 口頭, 坂東博人, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
3. Draft protocols of in vivo and in vitro testing methods for tumorigenicity evaluation, 口頭, 我妻昭彦, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
4. Evaluation of biodistribution of pluripotent stem cell-derived products, 口頭, 三好荘介, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
5. FIRM-CoNCEPT supports “MEASURE”, 口頭, 山本恵司, World Stem Cell Summit 16, 2016/12/8, 国外.
6. 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.

(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。

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： 再生医療実用化研究事業

Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名： 細胞加工製品の造腫瘍性評価における多施設共同研究

Multisite evaluation study on analytical methods for non-clinical safety assessment of human-derived regenerative medical products

研究開発担当者 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長 佐藤 陽治

所属 役職 氏名： Yoji Sato, Head, Division of Cell-Based Therapeutic Products, National Institute of Health Sciences

実施期間： 平成28年10月11日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 研究総括、造腫瘍性関連試験のバリデーション、安全性・品質試験の国内外動向調査
開発課題名： 及び国際連携活動

Research management, validation of tumorigenicity-associated tests, survey of domestic and international trends in safety and quality assessment, and international coordination

研究開発分担者 我妻 昭彦、富士フイルム株式会社 R&D 統括本部再生医療研究所 研究マネージャー

所属 役職 氏名： Akihiko Azuma, Research Manager, Regenerative Medicine Research Laboratory, Research & Development Management Headquarters, FUJIFILM Corporation.

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究では特に、細胞加工製品の造腫瘍性評価に焦点を当て、官民共同のチームにより、①腫瘍発生リスクを惹起するハザードとその評価の考え方を、国内外動向を踏まえつつ整理するとともに、②造腫瘍性関連試験法について、標準プロトコールを作成し、多施設において比較・検証することにより、当該試験法の有用性・再現性を明らかにし、その結果をもとに国際的枠組みにおいて提言を行い、国際標準化を図る。なお並行して、造腫瘍性評価に関連した2つの課題、③投与後の製品由来細胞の「体内動態評価」及び④原料や製法の変更前後の製品の「品質同等性評価」について、考え方を整理し先導的に国内外に提示することにより、国際協調の素地の醸成を図る。本研究プロジェクトをMEASUREと名付け、造腫瘍性評価並びに体内動態評価及び品質同等性評価に関する議論・調査を行うステップ1と、造腫瘍性関連試験法及び体内動態評価法に関する実験的検証を行うステップ2とに大きく分けて実施した。

[ステップ1] 細胞加工製品の造腫瘍性リスク評価法について、日・米・欧のガイドラインを調査することにより比較を行った。3極でコンセンサスを得られた評価方法・考え方はないのが現状であり、細胞加工製品の開発の加速化のためにも3極間での国際的な標準化が期待された。Key Opinion Leader (KOL) に対するインタビューにおいては、iPS細胞のゲノム不安定性による造腫瘍性リスクについて意見を得た。ゲノム不安定の評価は未確立で、今後科学的な検証を進める必要があることが分かった。製品由来細胞の体内動態について、PMDA、FDA、EMA及びISSCRから発行されているガイドライン調査を行い、体内動態試験の位置づけの相違点をまとめた。細胞動態試験は、有効性や毒性/安全性データを裏付ける根拠資料として用いられるべきであるという点で共通していた。また体内動態試験法及び日米欧の臨床試験における体内動態評価の実施状況について調査を行った。体内動態試験の再生医療等製品開発上の意義、結果の取扱い、方法論等に関する情報収集を目的として、KOLに意見徴集・意見交換を実施した。品質同等性評価については、国内の法規制の状況整理と諸外国の調査を実施した上で、多能性幹細胞加工製品を中心に研究開発の進め方を品質の観点から総合的に議論した。しかしながら製品由来細胞の状態が多岐にわたっており、チームとして標準的見解を取り纏めることが困難であった。そこで検討結果に基づき、国内KOLインタビューを実施して意見を得た。

造腫瘍性試験法に関して、調査結果から議論・考察し、多施設共同バリデーション試験において標準化すべき造腫瘍性試験をin vivo試験およびin vitro試験において選定した。体内動態試験法に関して、最も簡便かつ汎用的であるqPCRについてプロトコール作成のための予備試験を実施した。

[ステップ2] ステップ1で選定した多施設検証すべき試験法である、未分化多能性幹細胞を検出するマウス造腫瘍性試験法、PCR法及び培養増幅法と、形質転換細胞を検出するデジタル軟寒天コロニー検出法及び細胞増殖特性法について標準プロトコール作成に向けた予備的な試験の実施または検討を行った。基礎データ取得について、重度免疫不全NOGマウスにマトリゲルおよびヒト間葉系幹細胞と共にHEK293細胞株を皮下投与し、その造腫瘍性を検討した。

国際連携においては、本研究成果を広く海外にも周知する目的で、NPO法人である健康環境科学研究機構（HESI）や各種学会と連携し、欧米の企業や規制当局にも本活動の情報を共有した。

Especially focusing on tumorigenicity assessment of cell therapy products (CTPs), a national institute and private companies work together to provide sound science-based and globally acceptable consensus for safety evaluation policy in the R&D of products. The subjects of research are as follows: a) organizing the concept of hazards causing tumorigenicity risks and their evaluation considering domestic and international trends, b) establishment of standard protocols and multisite validation for tumorigenicity-associated tests to clarify its usefulness and repeatability, c) organizing and reporting the concept of biodistribution testing for transplanted cells, and d) organizing and reporting the concept of biocomparability evaluation for modification of ingredients and processing. This research project named as MEASURE is classified into two steps: step 1, search and discussion on the regulatory policy on tumorigenicity, biocomparability, and biodistribution evaluation; step 2, experimental multi-site joint research for tumorigenicity assessment.

[Step 1] As for evaluation of tumorigenicity risks of CTPs, we surveyed and compared guidelines issued by Japan, US and EU. Since three parties have built no consensus in testing methods or concepts for tumorigenicity of CTPs, international standardization was expected to promote the product development. Interviews with key opinion leaders (KOLs) allowed us to obtain opinions on tumorigenicity risks associated with genomic instability of iPS cells. As evaluation of the genomic instability has not been established, its scientific research should be advanced. As for biodistribution of transplanted CTPs, we surveyed guidelines issued by PMDA, FDA, EMA and ISSCR, and summarized their difference in positions of biodistribution testing. The biodistribution testing of CTPs seems to be commonly necessary for confirming efficacy and toxicity/safety of products. We also surveyed testing methods for biodistribution and states of the biodistribution evaluation in clinical research conducted in Japan, US and EU. Interviews with KOLs were performed to obtain information on the meaning of biodistribution testing for product development, handling of results, and testing methods. As for biocomparability of CTPs, we mainly discussed how to proceed with R&D of pluripotent stem cell (PSC)-derived products in respect of product quality after summarizing domestic regulation and surveying foreign countries. However, it was challenging for the team to organize standard views on biocomparability of CTPs, owing to variation of cell conditions. Interviews with KOLs was performed to obtain opinions based on the investigation.

Several methods for in vivo and in vitro tumorigenicity testing were selected to validate in multisite facilities, following discussion of results from investigation. As qPCR method was quite easy and generally used for biodistribution evaluation of CTPs, preliminary experiments using qPCR were performed to prepare a standard protocol.

[Step 2] We studied the in vivo and in vitro tumorigenicity-associated tests selected for multisite validation to prepare standard protocols. In vivo tumorigenicity testing, a PCR method, and a highly efficient amplification method were selected for detection of residual undifferentiated iPS cells. A digital soft agar colony formation assay and a cell growth analysis were selected for detection of transformed cells. To obtain basic data of TPD₅₀ for in vivo tumorigenicity testing, severe immunodeficient NOG mice were subcutaneously injected with

HEK293 cells, mesenchymal stem cells and Matrigel, and their tumor formation was monitored.

Reporting on our activities, we internationally coordinated with the Health and Environmental Sciences Institute (HESI) and associated scientific societies, and shared information on our research project with companies and regulators in the US and EU.

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 0 件）

特記事項なし。

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Challenges for standardization of tumorigenicity-associated testing methods for human cell-based therapeutic products: introduction of a draft guidance document, 口頭, 安田智, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
2. Consideration for ensuring the quality and comparability of pluripotent stem cell-derived products, 口頭, 坂東博人, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
3. Draft protocols of in vivo and in vitro testing methods for tumorigenicity evaluation, 口頭, 我妻昭彦, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
4. Evaluation of biodistribution of pluripotent stem cell-derived products, 口頭, 三好荘介, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
5. FIRM-CoNCEPT supports “MEASURE”, 口頭, 山本恵司, World Stem Cell Summit 16, 2016/12/8, 国外.
6. 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.

(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。