



平成26年3月5日

第13回日本再生医療学会総会

ヒト多能性幹細胞加工製品に残存する 未分化多能性幹細胞の高感度検出法の開発

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
佐藤 陽治

本発表で述べられている見解は発表者の私見であって、国立医薬品食品衛生研究所
および厚生労働省の現在の公式な見解では必ずしもありません

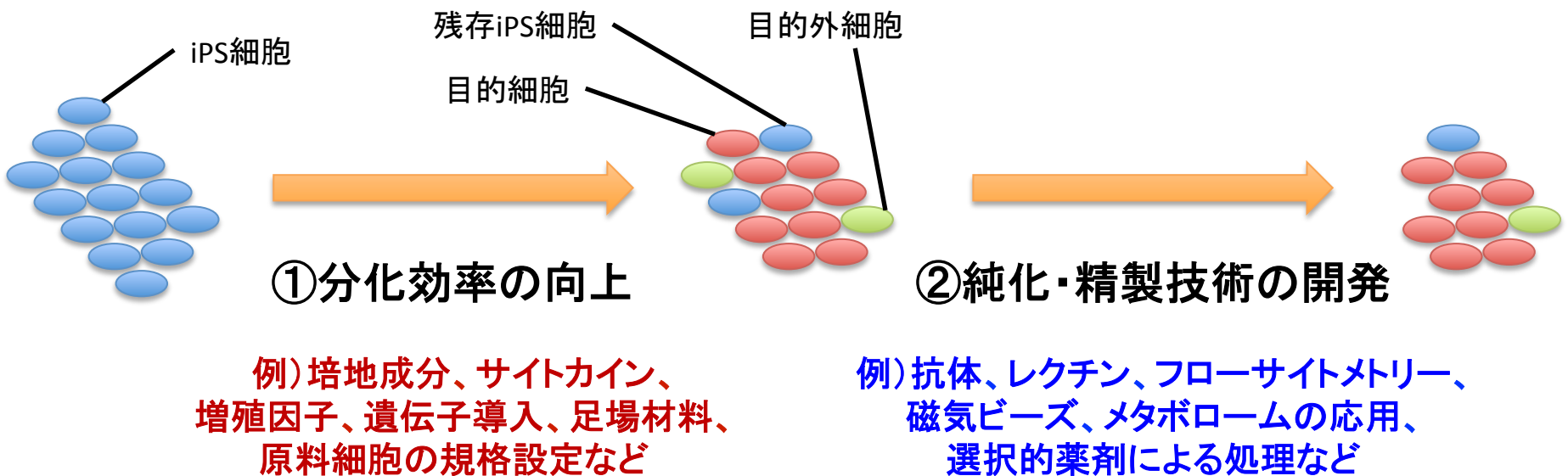
造腫瘍性をもとにした再生医療製品の分類

- ヒトES/iPS細胞加工製品
 - ・・・原料となる細胞に造腫瘍性がある
- ヒト体細胞/体性幹細胞加工製品
 - ・・・原料となる細胞に造腫瘍性がない

ヒトES/iPS細胞加工製品の品質・安全性

- 未分化なES/iPS細胞には**腫瘍形成能(造腫瘍性)**があることから、**残存ES/iPS細胞**による造腫瘍性のリスクが存在する
- 加工に伴う**造腫瘍性形質転換細胞**の出現の可能性もある

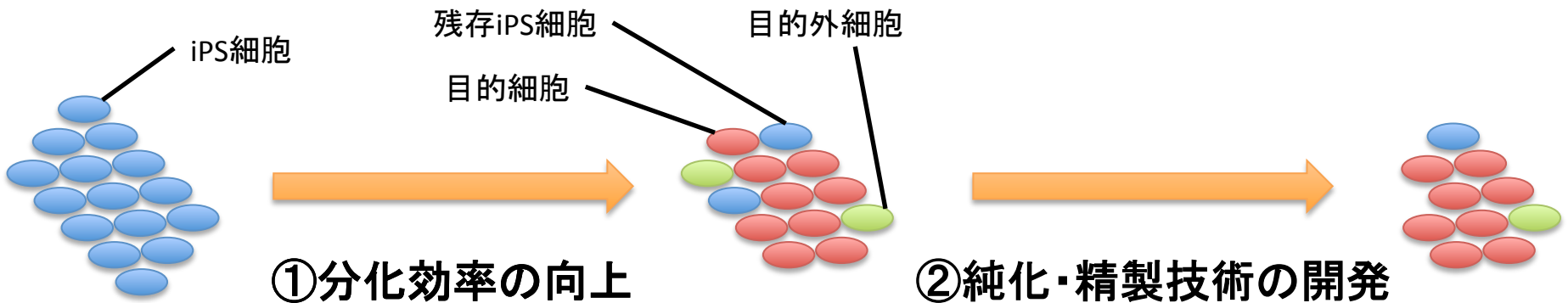
未分化ES/iPS細胞・造腫瘍性細胞の残存・混入を防止する工夫が必要



ヒトES/iPS細胞加工製品の品質・安全性

- 未分化なES/iPS細胞には**腫瘍形成能(造腫瘍性)**があることから、**残存ES/iPS細胞**による造腫瘍性のリスクが存在する
- 加工に伴う**造腫瘍性形質転換細胞**の出現の可能性もある

未分化ES/iPS細胞・造腫瘍性細胞の残存・混入を防止する工夫が必要

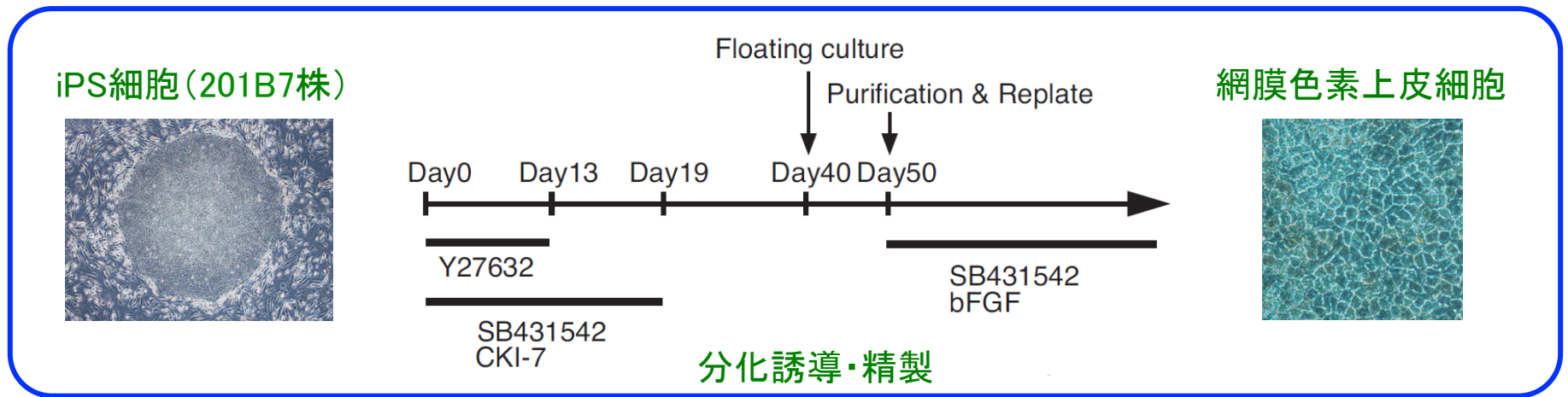


③製品の「実用化」には、未分化ES/iPS細胞・造腫瘍性細胞の
除去・残留を確認する試験法が不可欠

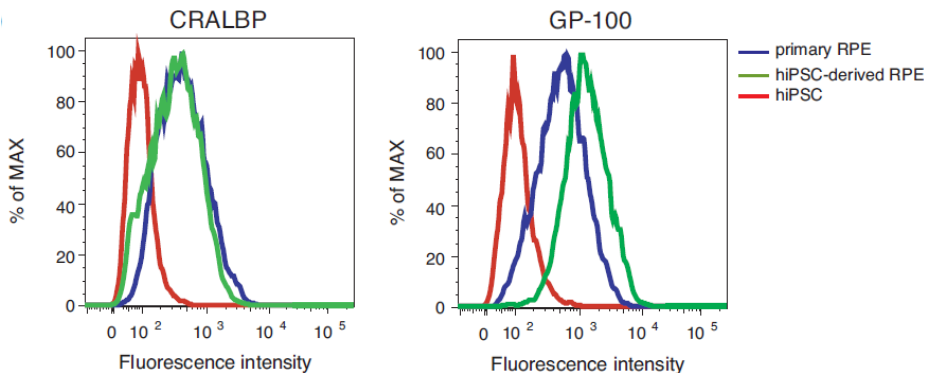
→ 未分化ES/iPS細胞・造腫瘍性細胞の高感度検出法の開発と評価

モデルケース

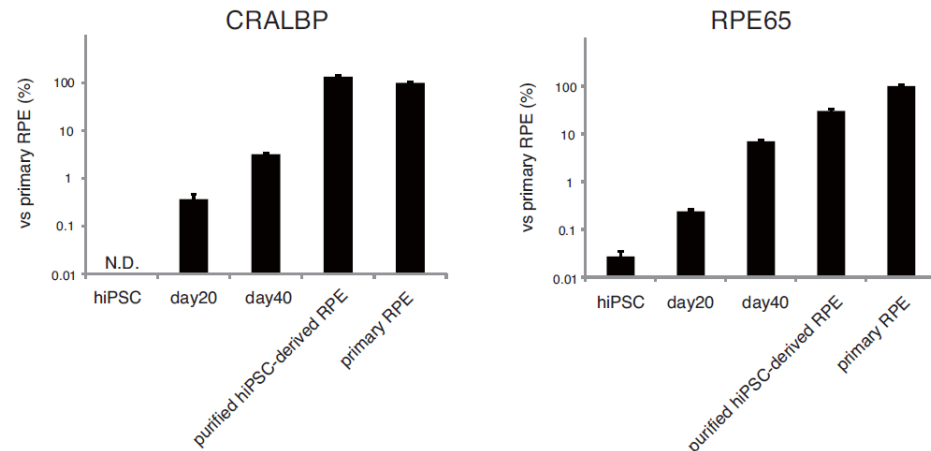
ヒトiPS細胞由来の網膜色素上皮細胞 (RPE)



RPE特異的タンパク質発現



RPE特異的遺伝子発現

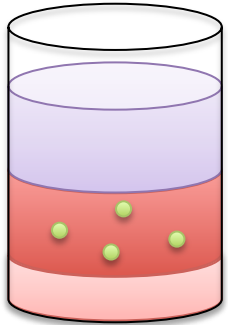


未分化iPS細胞の*in vitro*検出法

*in vitro*検出法

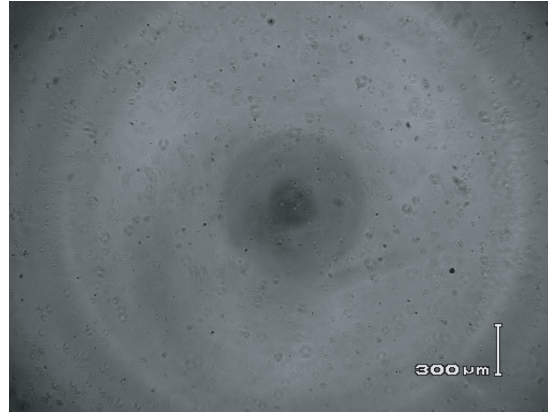
- 1) 軟寒天コロニー形成試験
- 2) フローサイトメトリー
- 3) qRT-PCR

軟寒天コロニー形成試験

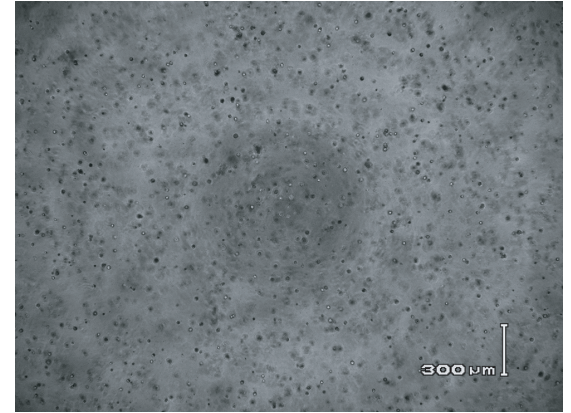


DMEM/10%FBS
Cell Agar Layer
Base Agar Layer

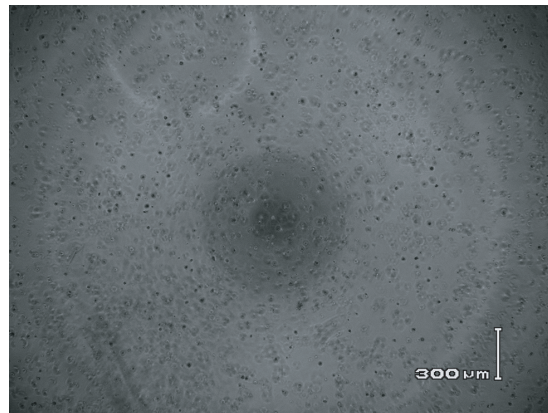
96-well plate



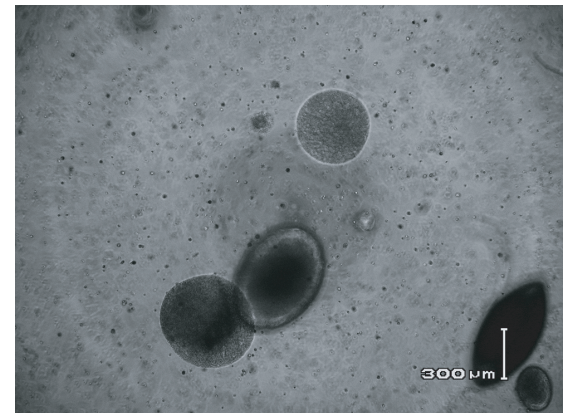
iPSCs



primary RPE



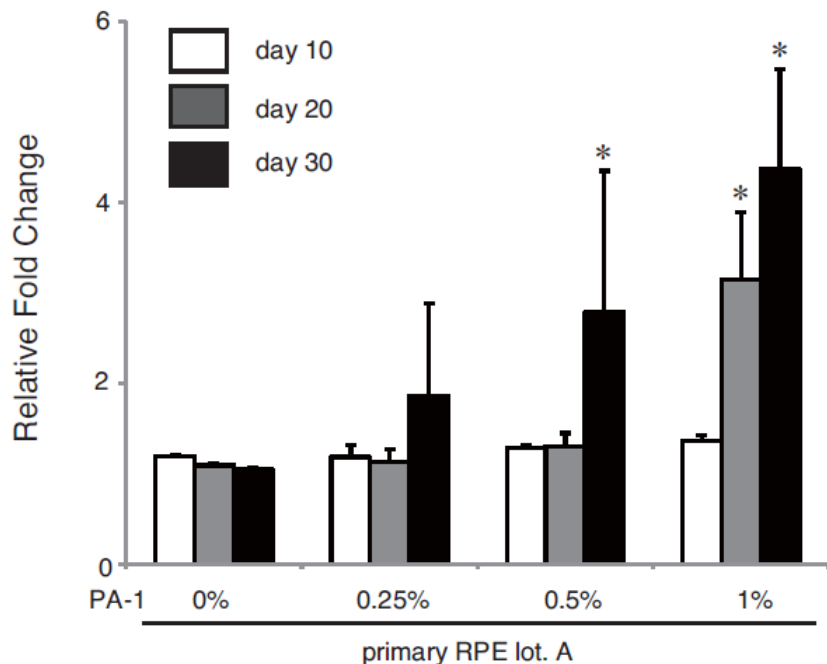
iPSC-derived RPE



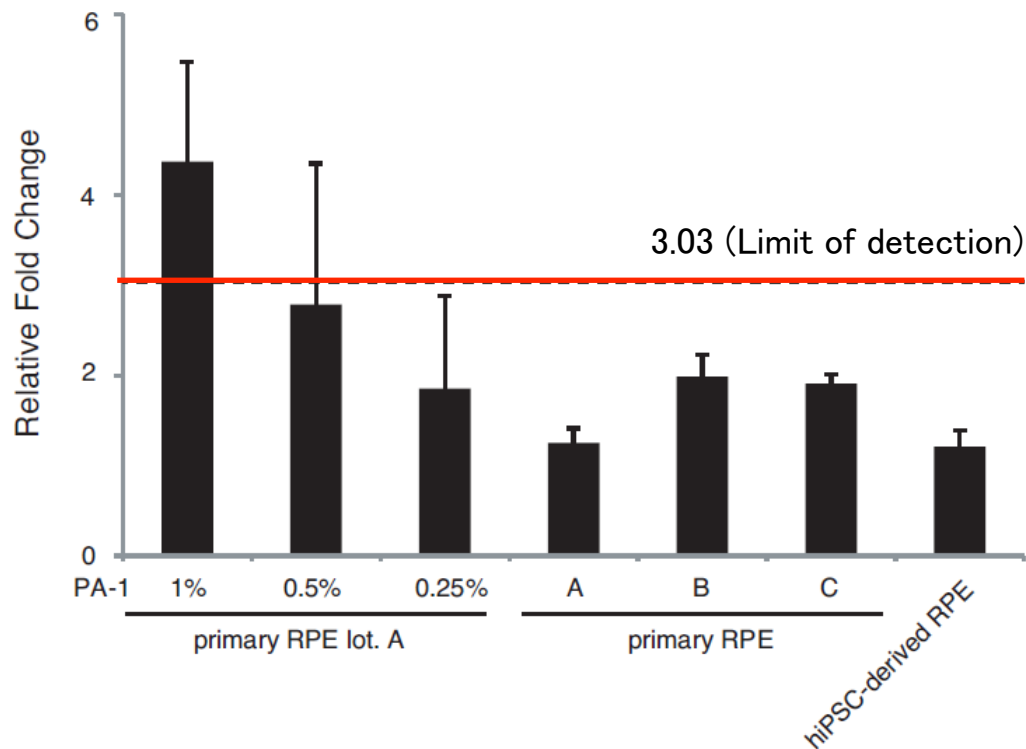
PA-1 (テラトカルシノーマ)

軟寒天コロニー形成試験

時間経過 (PA-1細胞)



検出限界 (PA-1細胞)

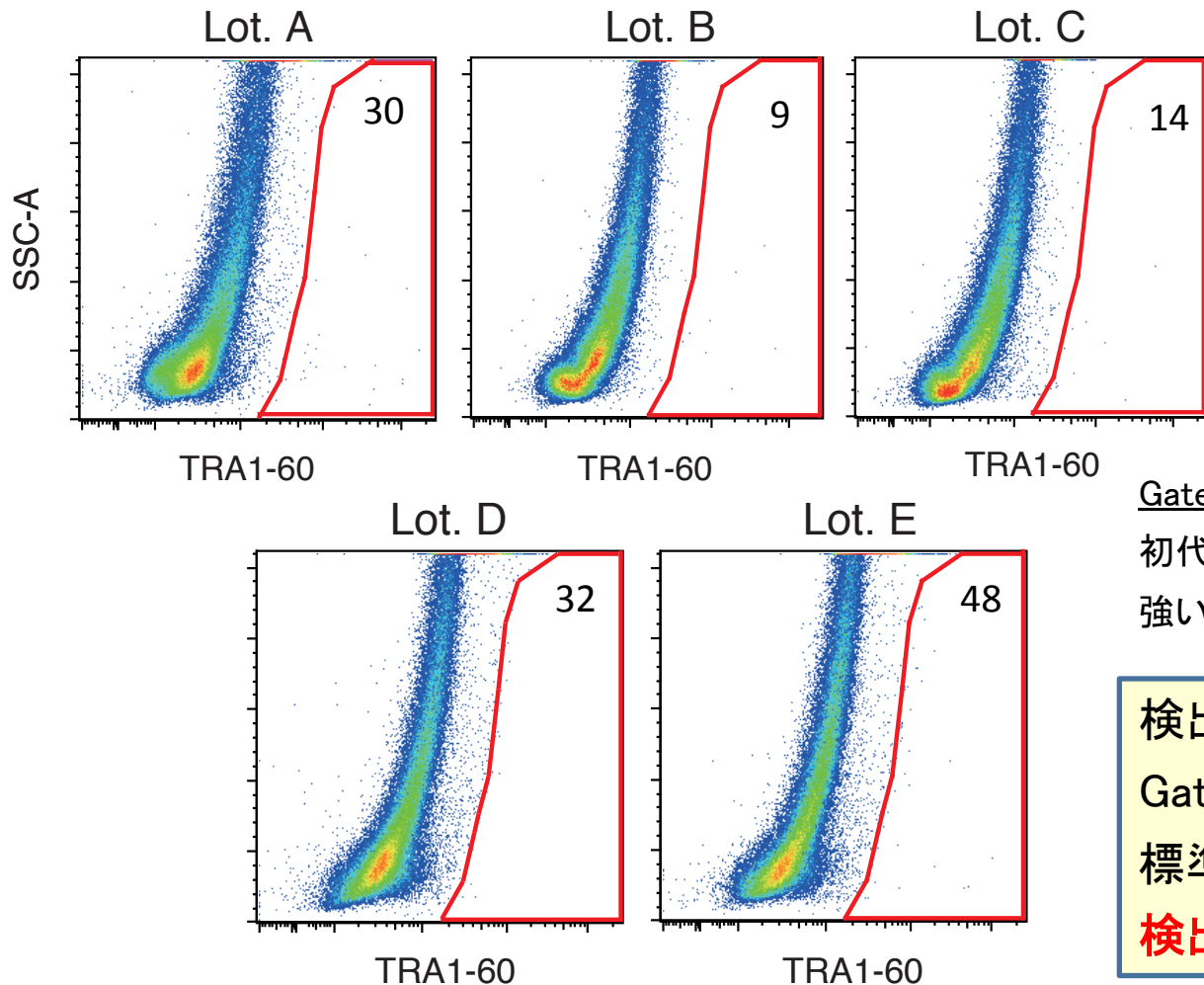


シグナルの検出までに3~4週間

がん細胞混入量の検出限界は約1%

フローサイトメトリー

フローサイトメトリー(TRA-1-60)の下方検出限界(LLOD)



初代培養RPE
解析細胞数 10^5
抗体: TRA-1-60

Gateの設定条件

初代培養RPEのmain populationより蛍光の強い細胞の $\leq 0.05\%$ を含む様に設定

検出限界

Gate内細胞数の平均値: 26.6

標準偏差: 15.6

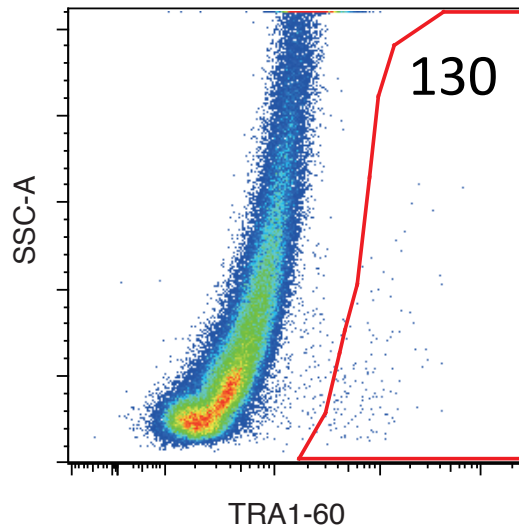
検出限界(平均値 + 3xSD): 73.2

フローサイトメトリー

RPE細胞＋iPS細胞スパイク

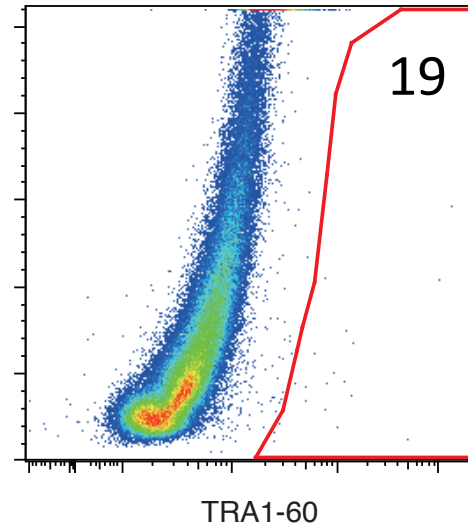
primary RPE 2.5×10^5 cells
+
iPS 2.5×10^2 cells

0.1% iPSC spike



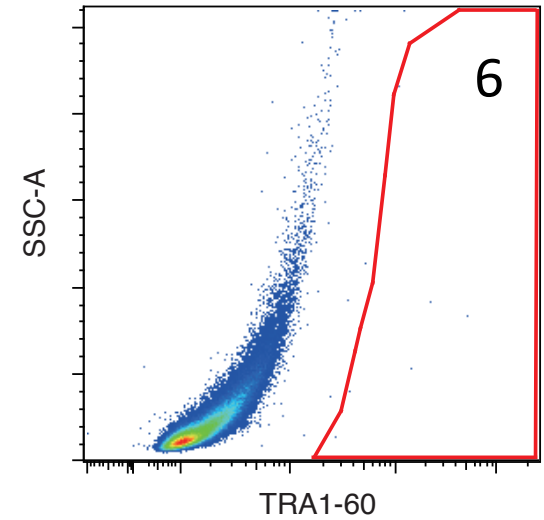
primary RPE 2.5×10^5 cells
+
iPS 2.5×10^1 cells

0.01% iPSC spike



iPS由来RPE

iPSC-derived RPE



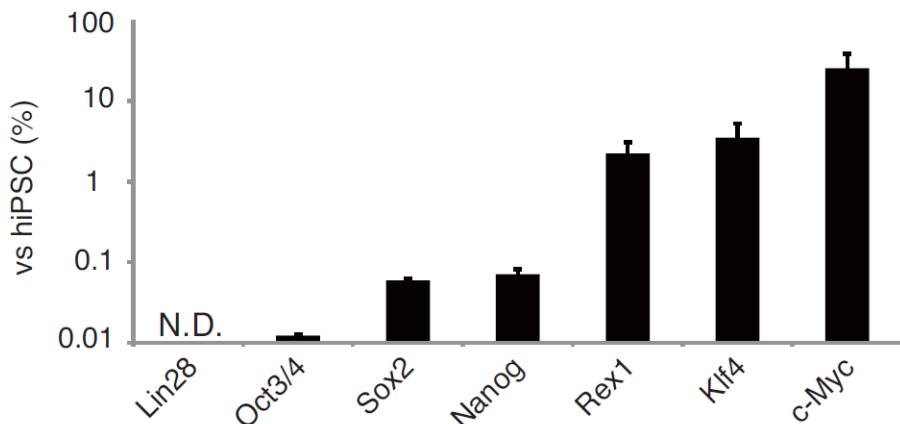
検出限界(平均値 + 3xSD) : 73.2



残留・混入iPS細胞の検出限界は約0.1%

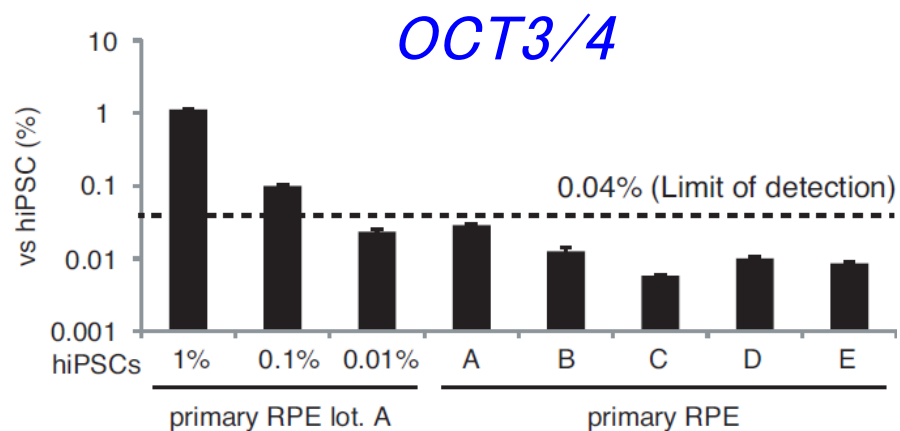
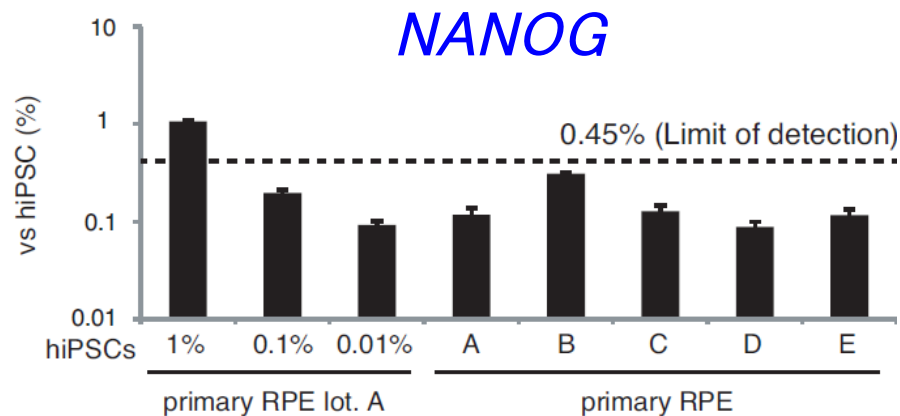
qRT-PCR

多能性幹細胞関連遺伝子 (初代培養RPE)



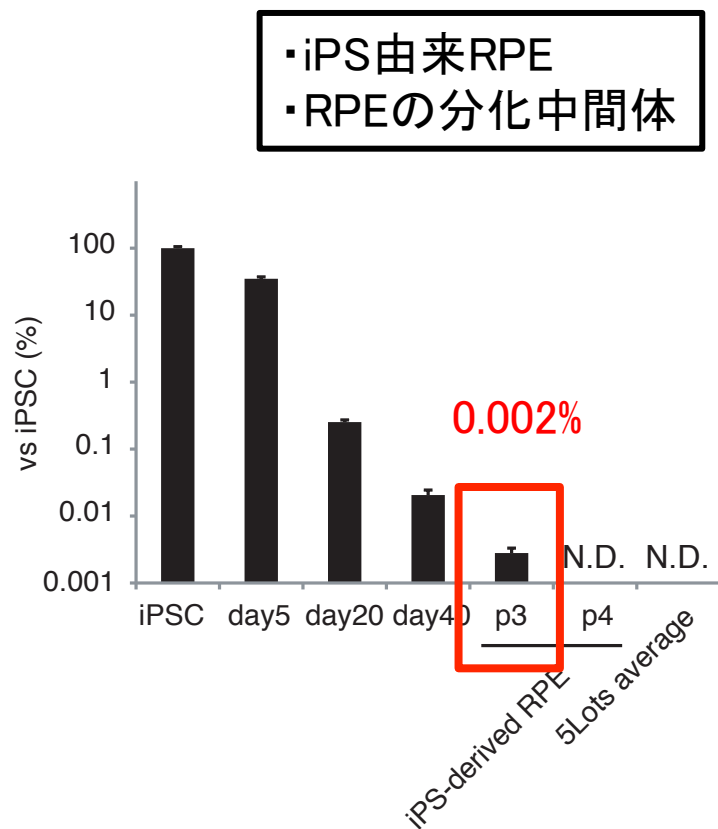
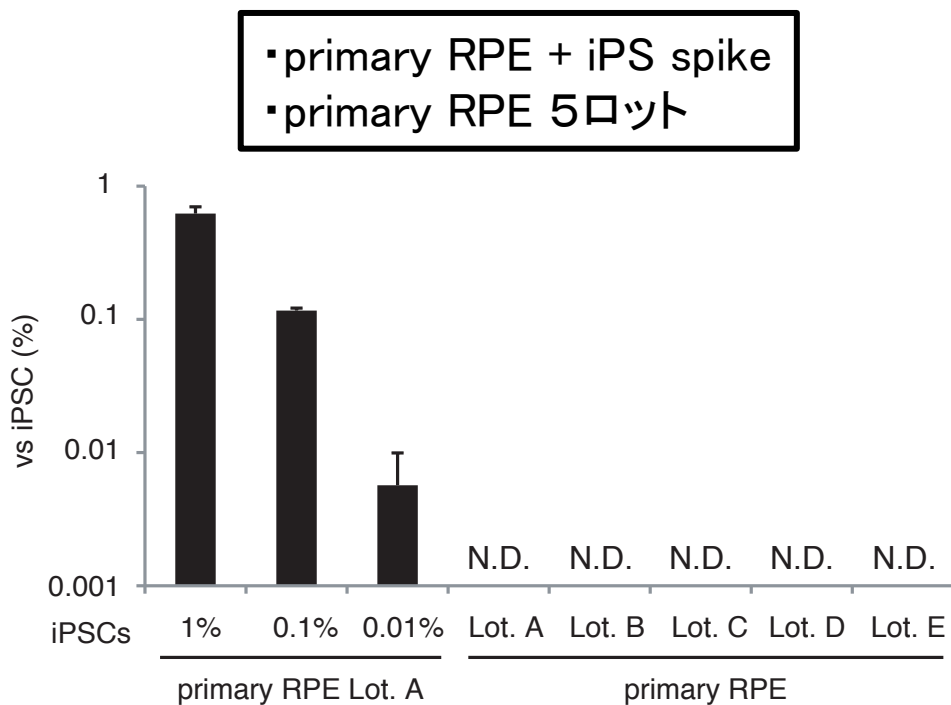
- ・初代培養RPE + iPS spike
- ・初代培養RPE 5ロット

検出限界



qRT-PCR

LIN28



LIN28の発現を指標とすれば5万個(臨床使用量に匹敵)に1個の割合の混入を検出可能

in vitro造腫瘍性試験

in vivo造腫瘍性試験との比較

試験法	軟寒天コロニー形成試験	フローサイトメトリー	qRT-PCR	in vivo造腫瘍性試験※
目的	足場非依存的増殖 (悪性形質転換細胞)の検出	未分化な多能性細胞の検出	未分化の多能性細胞の検出	悪性形質転換細胞および未分化な多能性細胞の検出
期間	30日	1日	6時間	12-16週間
利点	●安価	●短時間・簡便 ●個々の細胞を解析	●迅速 ●簡便 ●定量的 ●高感度	●直接的 ●微小環境での造腫瘍性を評価できる
欠点	●間接的 ●浮遊系細胞には使えない ●ヒトiPS細胞検出には使用できない (分散誘導性細胞死)	●間接的 ●既知のマーカー分子を発現する細胞以外は検出不能 ●ゲーティングが結果に影響	●間接的 ●既知のマーカー分子を発現する細胞以外は検出不能	●費用と時間がかかる
LLOD または混入率	RPE中の 1%のPA-1細胞 (ヒトテラトカルシノーマ由来細胞)	RPE中の 0.1%のiPS細胞 マーカー:TRA-1-60	RPE中の 0.002%以下のiPS細胞 マーカー: LIN28	10 ⁶ 個のフィーダー細胞中に含まれる245個(0.02%)の未分化ES細胞

※Hentze et al., Stem Cell Res. 2009;2:198-210

ヒトiPS細胞由来移植細胞の臨床研究開始



トピックス

ビットコイン

出直し大阪市長選

J1開幕

ビキニ水爆実験60年

ニュース > 社会 > その他・話題 > 記事

2013年7月31日 9時30分

ツイート 82

おすすめ 176

g+ 2

B! 1

メール 印刷

iPS細胞の臨床研究、8月から患者募集 目の難病治療



iPS細胞の臨床研究について説明する(左から)理化学研究所の高橋政代プロジェクトリーダー、先端医療センター病院の栗本康夫眼科統括部長、理化学研究所の斎藤茂和神戸事業所長=30日午後、神戸市中央区、諫山卓弥撮影

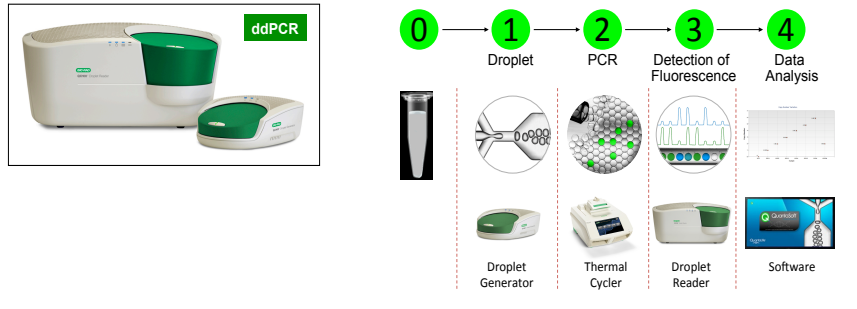
【小宮山亮磨】iPS細胞（人工多能性幹細胞）を人に応用する世界初の臨床研究について、理化学研究所と先端医療センター病院（神戸市）が30日、会見を開き、研究計画を正式に発表した。理研の高橋政代プロジェクトリーダーは「治療法を作るための第一歩。これから長い道のりがある。責任をひしひしと感じている」と述べた。

臨床研究は、目の「色素上皮」という組織によ（けいな血管が生えて視力が落ちる難病「加齢黄斑変性症」の患者6人が対象。血管や古い

LIN28/RT-PCR:他の細胞(心筋)に応用可能か？

(本総会演題#O-30-4)

Droplet Digital PCR (ddPCR)



Unpublished Research Data

LIN28/RT-PCR: もっと他の細胞・組織に応用可能か？

LIN28/ddPCR

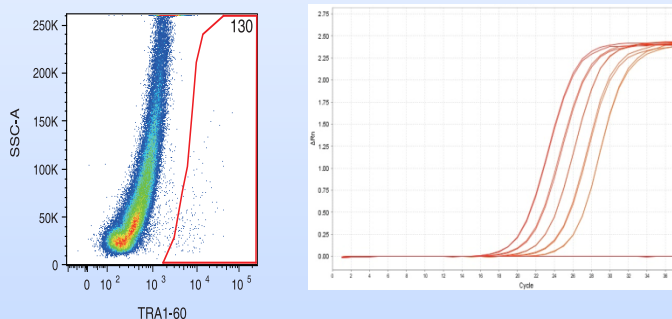
Unpublished Research Data

新しい検出法の開発

(本総会演題#O-15-4)

これまでの検出方法

Flow cytometry, qRT-PCRによる
未分化マーカーの検出

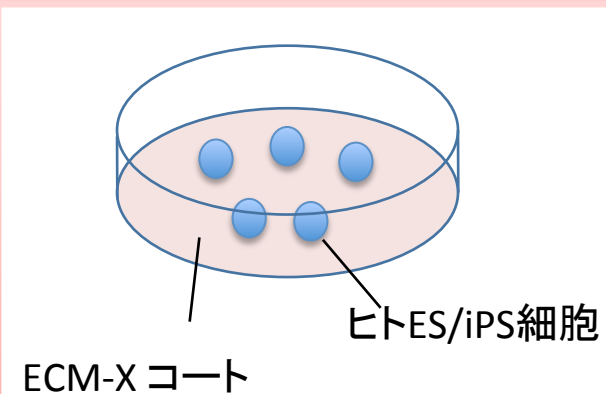


長所: 簡便、高感度
短所: 間接的
(細胞の存在を直接証明していない)

新しい検出方法

培養によって増幅させることで
直接検出できないか？

課題: ヒト多能性幹細胞特異的な
分散誘導性細胞死



ECM-Xを用いた高効率培養法の開発

ECM-Xを用いた培養系による 正常細胞(hMSC)に混入するiPS細胞の増幅・検出

Unpublished Research Data

まとめ

➤ LIN28を標的にしたqRT-PCRで、RPEへの0.002% (5万個*に1個) のヒトiPS細胞の混入・残留が検出可能
[*加齢横班変性治療時の使用量に相当]

➤ LIN28/ddPCR法は汎用性が高い可能性が高い

➤ 造腫瘍性試験系は、**試験系の能力と限界を踏まえ、**
個別の製品で示すべき目的に合うかどうかで取捨選択

➤ 懸念の強い製品についてはタイプの異なる試験をいくつか実施して総合的に

➤ 未分化iPS細胞をさらに高感度で検出するためには、分化細胞中に残存する未分化細胞を高効率で培養・増殖させて検出するなどの工夫が必要

➤ 適切な試験(を組み合わせた)結果・評価についても、
ヒトでの結果を完全に保証するものではないことに注意

➤ 各試験法の能力と限界を理解した上で、リスク判断・リスクマネジメント立案&IC受領

「イノベーション」

「イノベーションとは、必ずしも画期的な発明を指すわけではない。
既にある技術やアイデアでも、その組み合わせ方次第で、世界を
変えるようなイノベーションを起こせる」



カーマイン・ガロ

『スティーブ・ジョブズ 驚異のプレゼン』日経BP社

謝辞(敬称略)

国立医薬品食品衛生研究所

- 安田 智
- 黒田拓也
- 草川森士
- 田埜慶子
- 中島啓行
- 平田尚也
- 諫田泰成
- 鈴木和博
- 高田のぞみ
- 松山さと子
- 村岡ひとみ
- 城 しおり

慶應義塾大学

- 福田恵一

国立成育医療研究センター研究所

- 梅澤明弘
- 斎藤博久

近畿大学

- 掛樋一晃
- 早川堯夫

先端医療振興財団

- 川真田伸
- 松山晃文
- 郷正博
- 西下直希
- 金村星余
- 西川伸一

理化学研究所

- 高橋政代

大阪大学

- 西田幸二
- 澤 芳樹