

第22回 日本再生医療学会総会
2023年3月24日(金)
O-29-2

マイiPS用細胞治療セット・ プロトタイプの開発



研究開発センター
中島 義基 塚原 正義

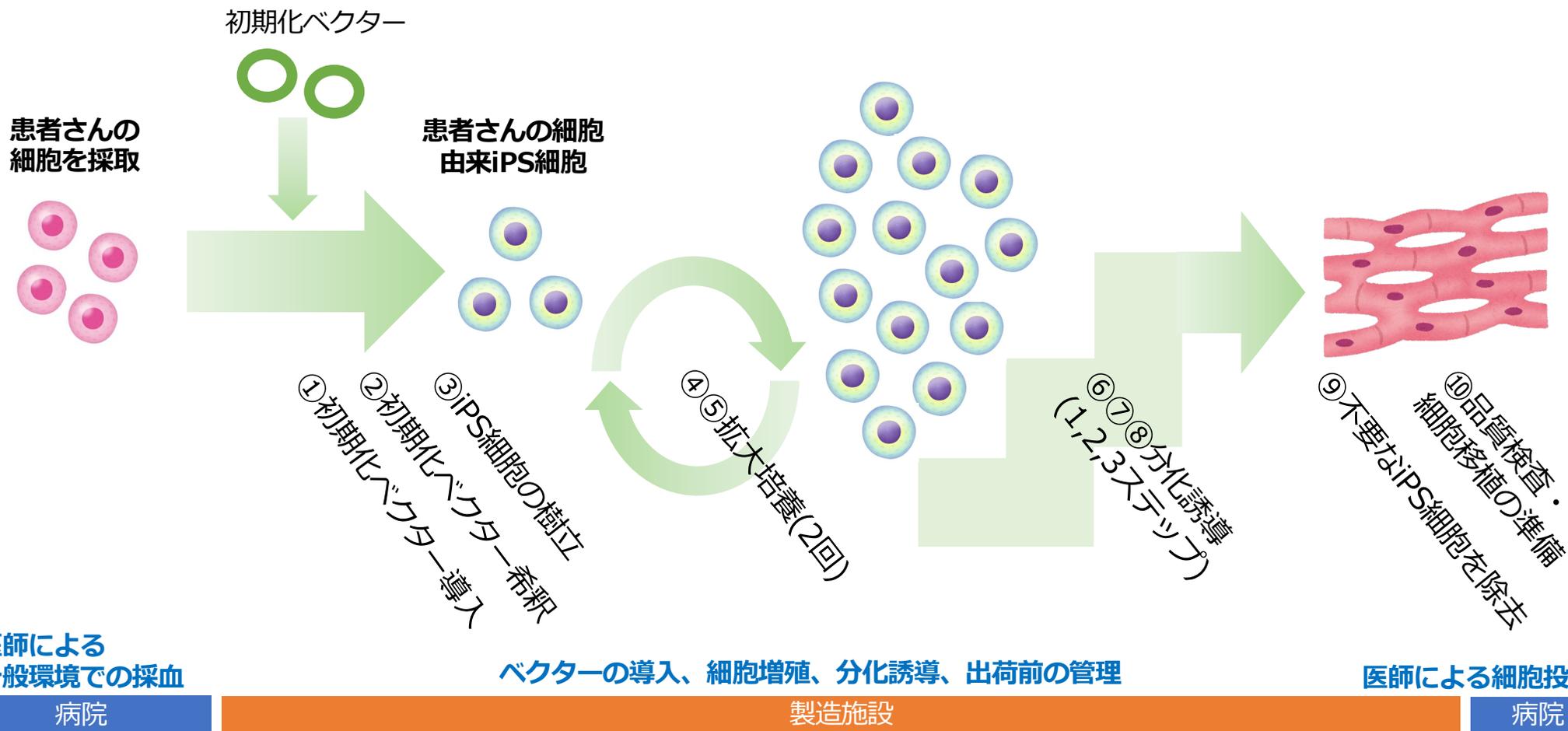
マイiPS用細胞治療セット・ プロトタイプの開発

iPS細胞研究財団
中島 義基

筆頭演者は、過去1年間(1月～12月)において、
本演題の発表に関して開示すべきCOIはありません。

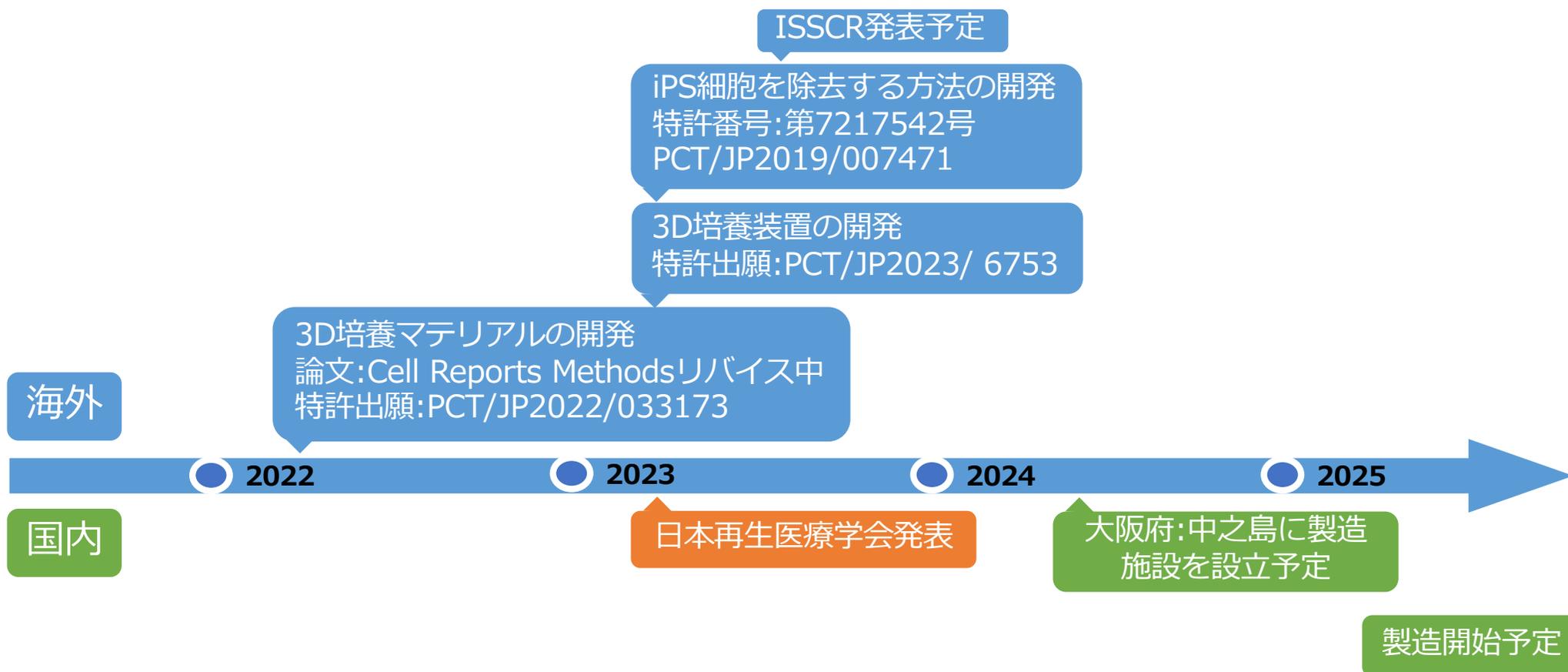


= 自家細胞で作るiPS細胞 = 拒絶反応が低い
(分化誘導して治療に使う)



【年間1000症例を想定したオーダーメイド医療：製造ラインの短期化・最小化が必要】

【論文・特許：海外への展開を視野に研究・開発を進めている】



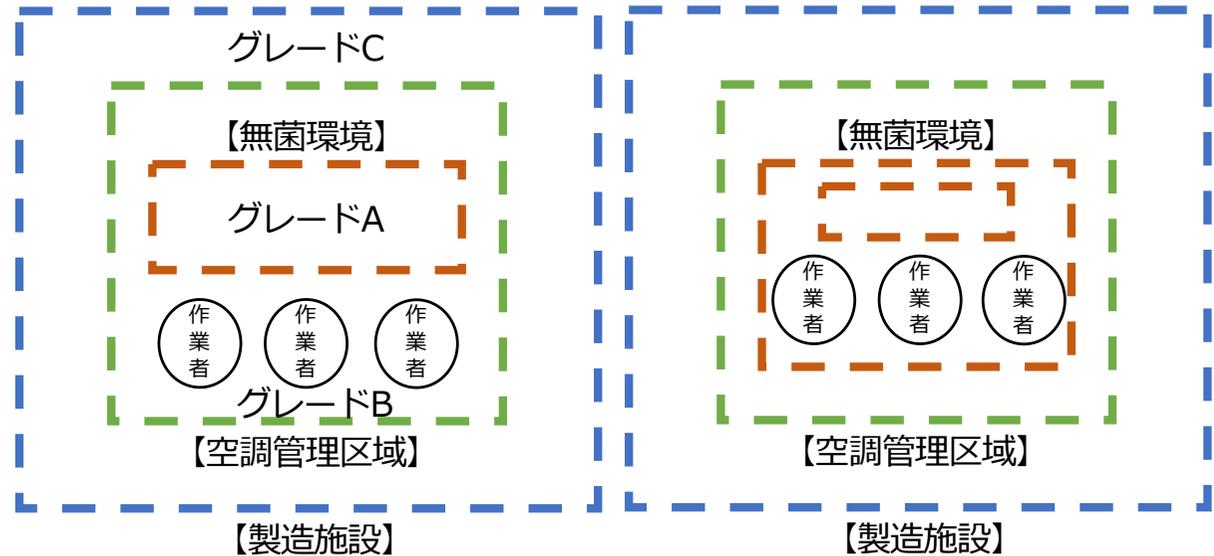
【事業：国内で2年後の稼働予定】

【現在、臨床用iPS細胞製造では無菌室への人の出入りが多い】

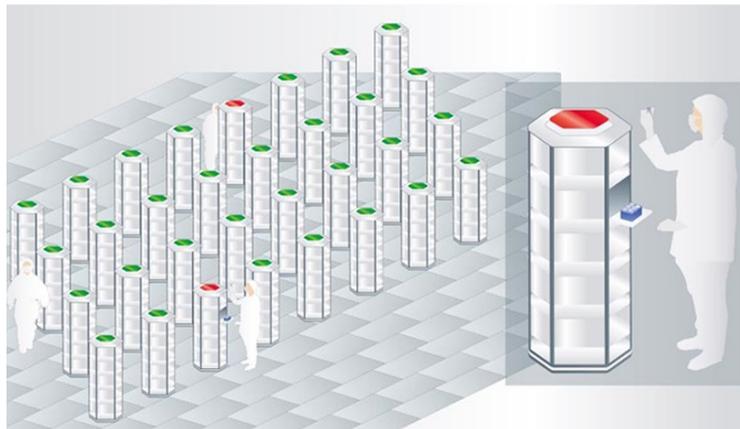
【既存のiPS細胞の製造施設】



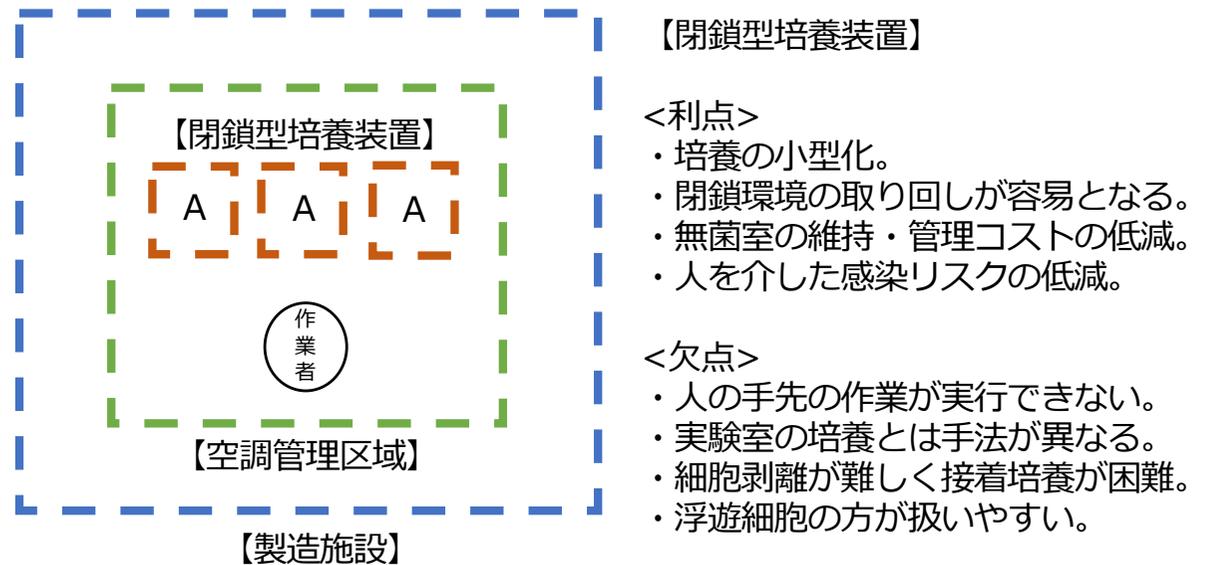
人が行うiPS細胞の培養



myiPS

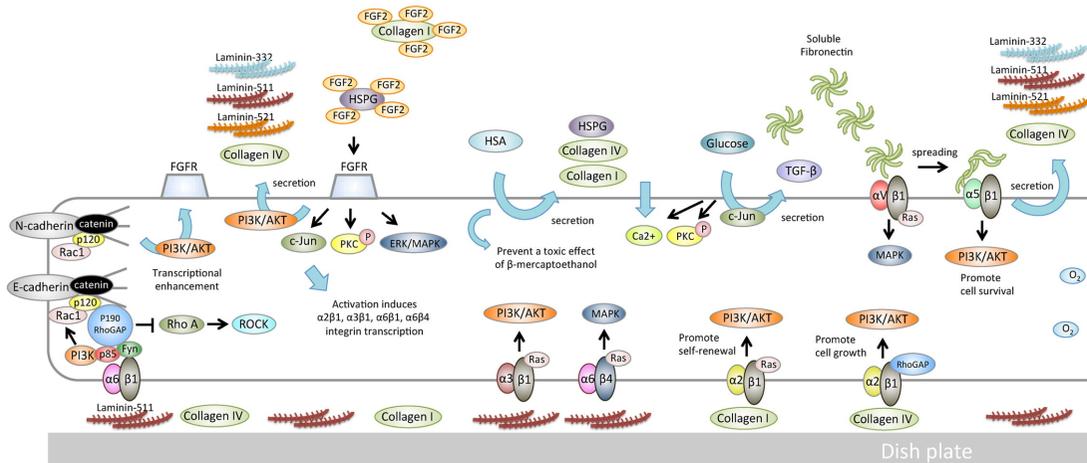


閉鎖型培養装置が行うiPS細胞の培養

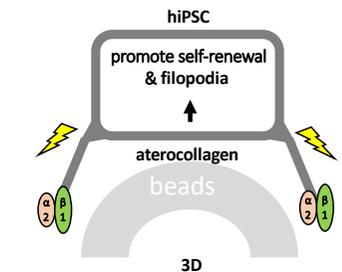
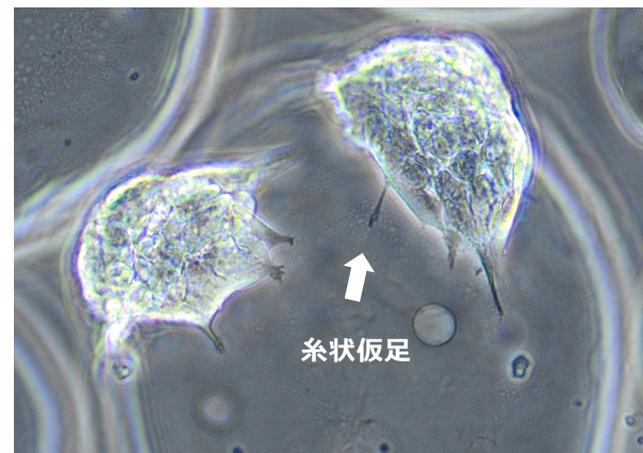
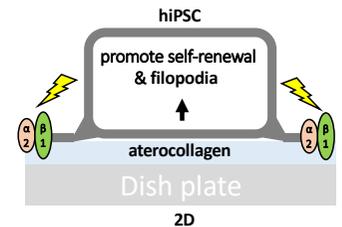
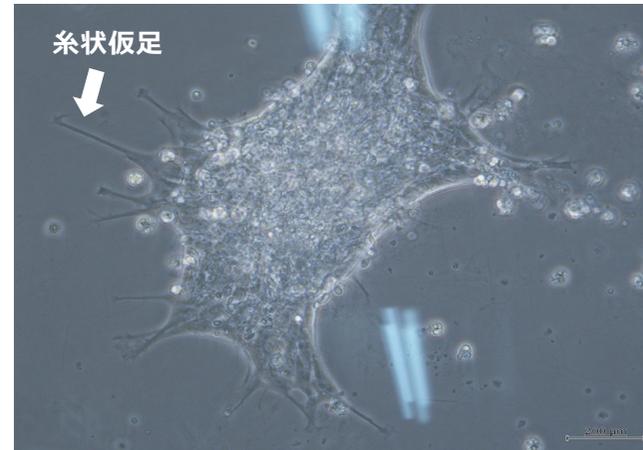


【閉鎖型培養装置を使い無菌室内での人の手作業を減らす】

【iMatrix-511上のiPS細胞に働くシグナル伝達経路： 1型コラーゲンの接着に厳選】



Nakashima et al. BioResearch Open Access. 2016.84-93.



3D培養マテリアルの
開発特許出願：
PCT/JP2022/033173

Nakashima et al. Cell Reports Methods リバイス中 ×200

【インテグリンα3とα6】:Laminin-511

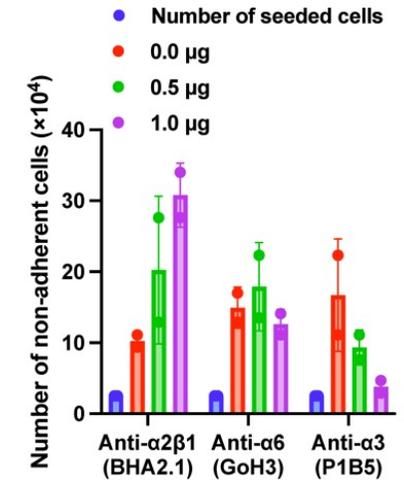
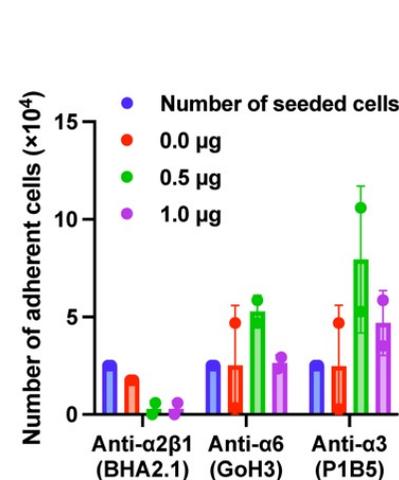
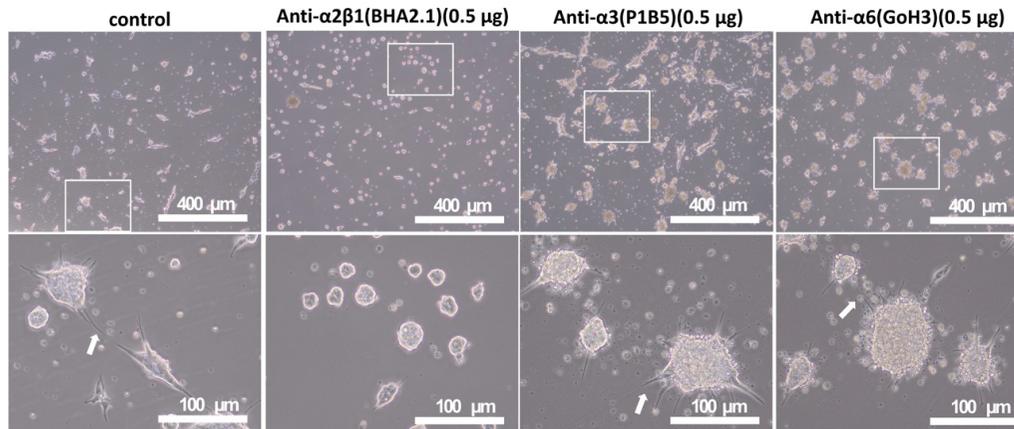
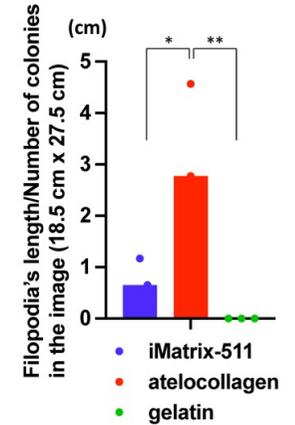
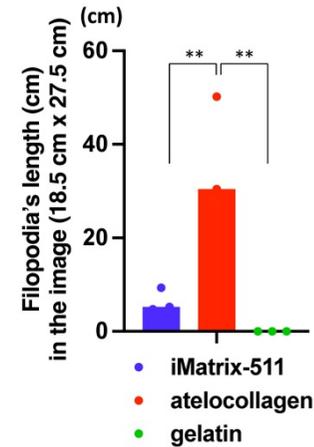
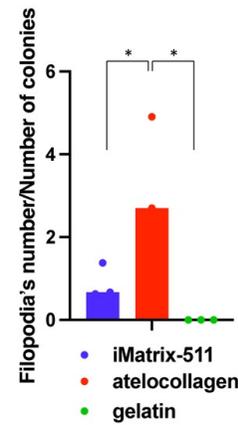
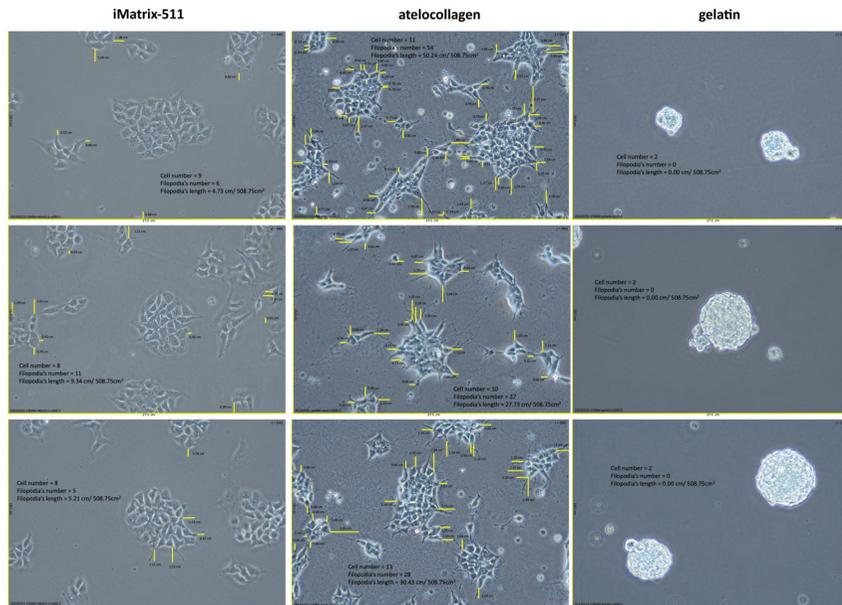
- ・iPS細胞が強く安定した接着培養ができる
 - 臨床用iPS細胞の接着培養に用いられる安定して優れた手法。
- Nakagawa et al. Scientific Reports volume 4, Article number: 3594 (2014)

【インテグリンα2β1】:アテロコラーゲン

- ・iPS細胞が糸上仮足を、多く長く伸ばすことを発見。
- マイクロキャリア上でiPS細胞がコロニーを形成できる手法。

【1型コラーゲンの抗原部位を除去したアテロコラーゲンをマテリアルに選定】

【アテロコラーゲンがiPS細胞の糸状仮足を多く、長く、伸ばす】

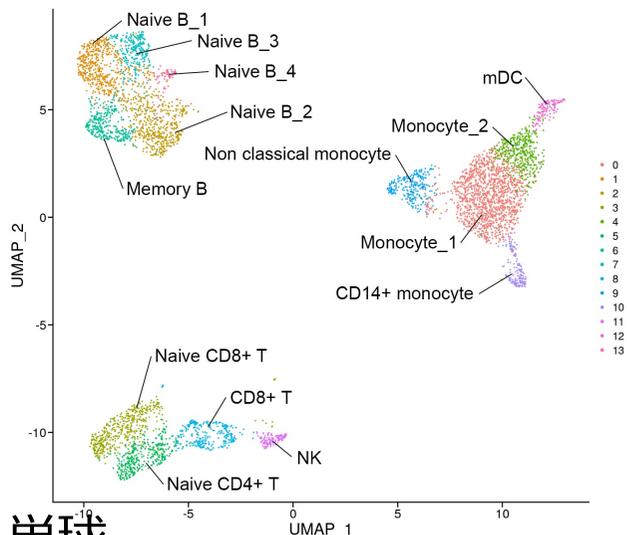


Nakashima et al. Cell Reports Methods リバイス中

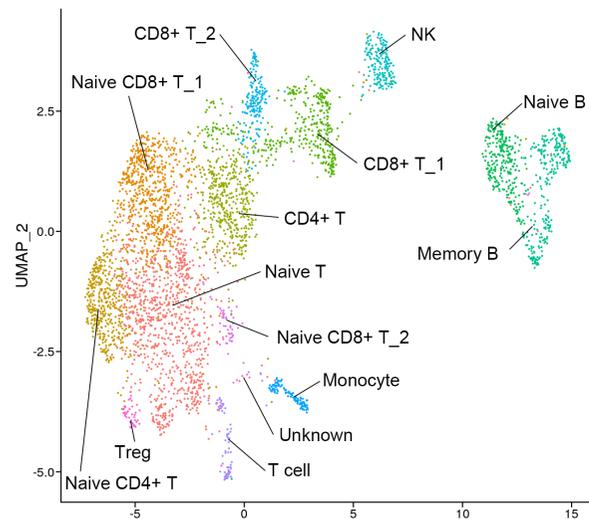
【インテグリンα2β1でiPS細胞はアテロコラーゲンへ細胞接着する】

【全血から採取したPBMCには多様な細胞が含まれる】

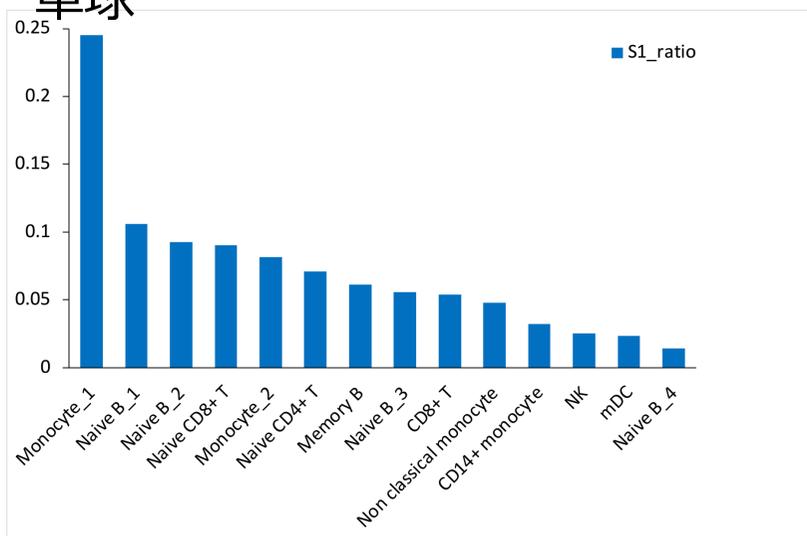
接着する細胞



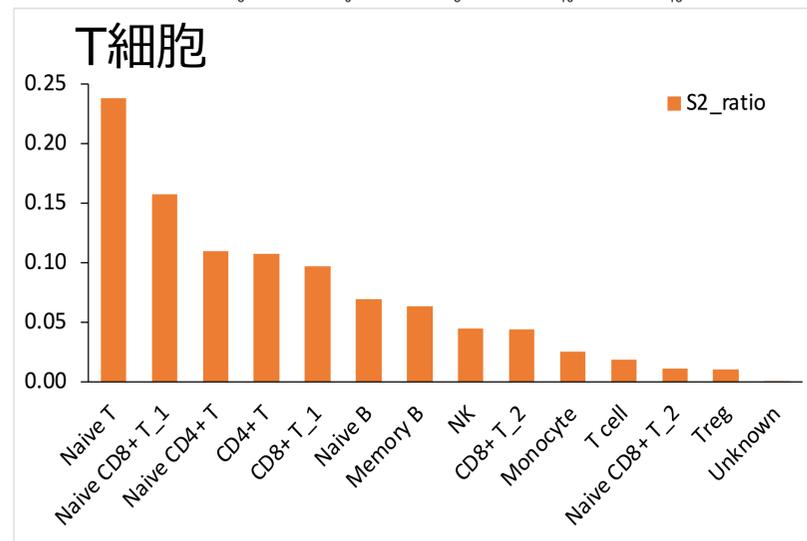
接着しない細胞



単球



T細胞

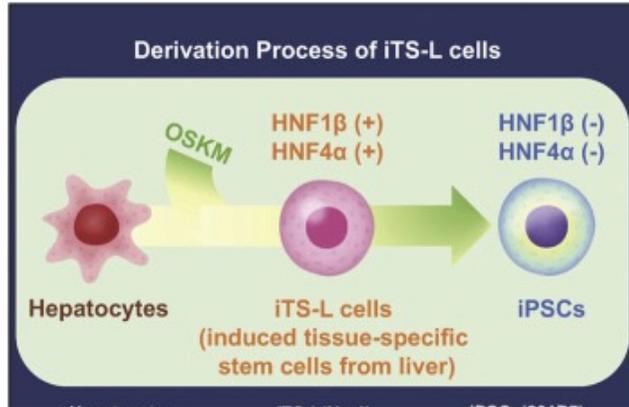


Nakashima et al. Cell Reports Methods リハイス甲

【アテロコラーゲンを使い多様な血液細胞の中から単球を優先的に初期化できる】

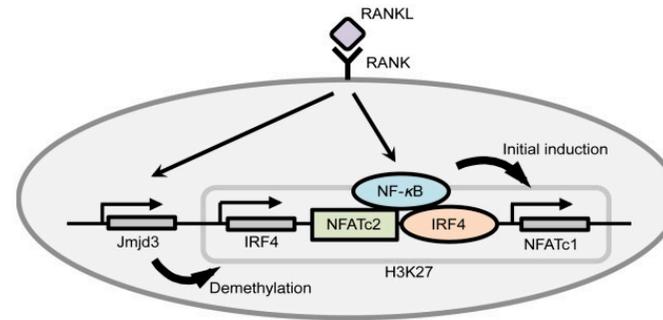
【各細胞種のエピゲノムは樹立iPS細胞の特性と分化能に影響を与える】

肝細胞からiPS細胞の樹立にエピゲノムが関与



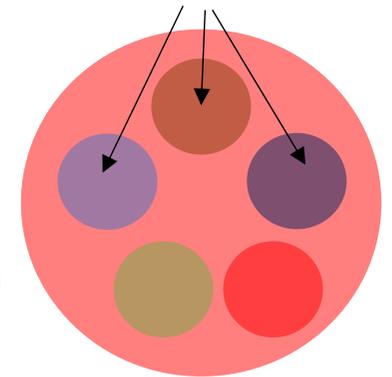
Nakashima et al. iScience. 2022. Volume 25, Issue 10, 21.

マクロファージから破骨細胞への分化誘導にエピゲノムが関与



Nakashima et al. PLoS One. 2013; 8(9)

エピゲノムの細胞種差



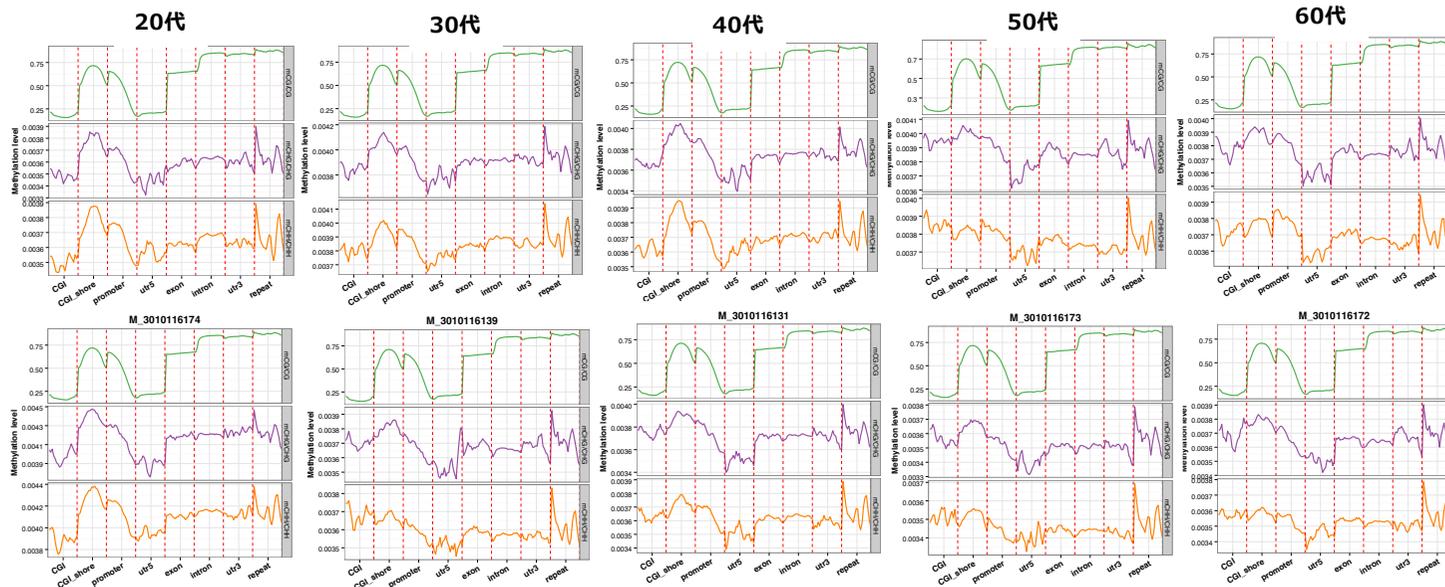
エピゲノムの個人差



iPS細胞のエピゲノムが不均一となる

細胞種

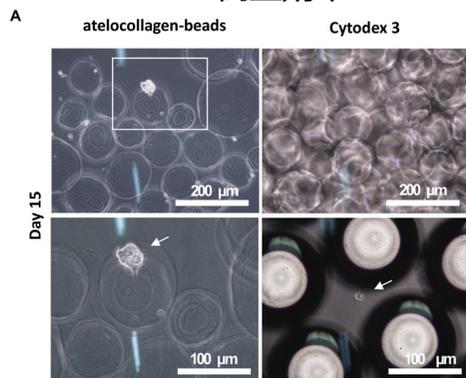
個人差



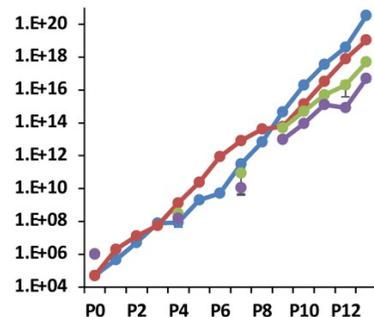
【PBMCにはエピゲノムの個人差があるため、樹立の元細胞種は1種類が望ましい】

【アテロコラーゲン上でPBMCからiPS細胞を樹立：品質試験】

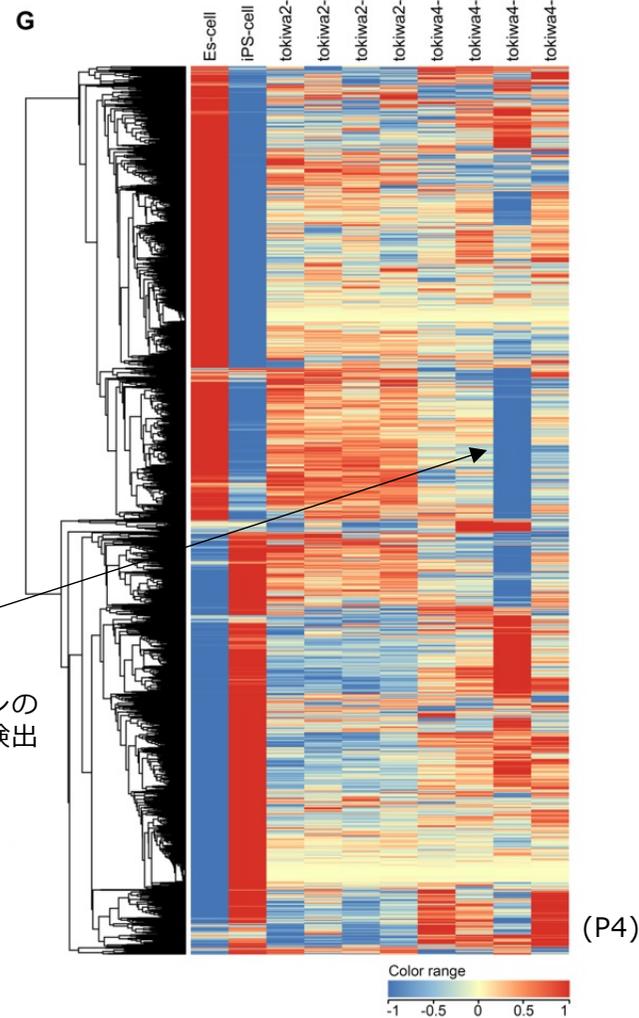
樹立効率



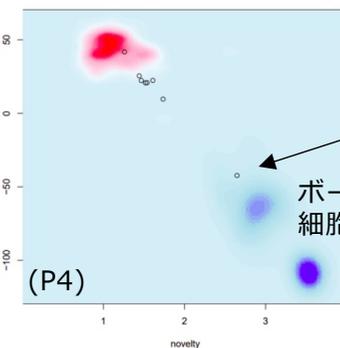
細胞増殖試験



マイクロアレイ解析



PluriTest(遺伝子発現)

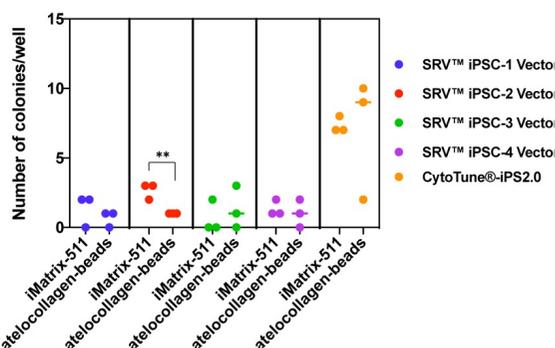


Sample	Sample ID	PluriTest Result	PluriCor	NovelCor
PT-3923	tokiwa2-atelo-2	pass	22.37404	1.46665
PT-3924	tokiwa2-atelo-3	pass	25.53781	1.441704
PT-3925	tokiwa4-atelo-1	pass	20.90222	1.538544
PT-3926	tokiwa4-atelo-2	pass	22.43482	1.609426
PT-3989	tokiwa2-atelo-1	pass	20.80057	1.517598
PT-3990	tokiwa4-atelo-3	borderline	9.744087	1.735047
PT-3943	iPSC	pass	41.8694	1.258766
PT-3944	Non_iPSC	fail	-42.24044	2.648107

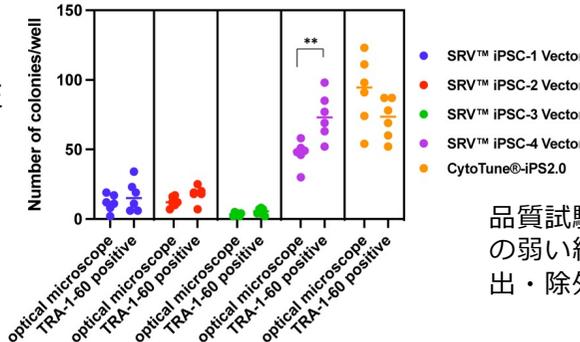
品質試験で多能性の弱い細胞は検出・除外可能

Nakashima et al. Cell Reports Methods リバイス中

コロニー数



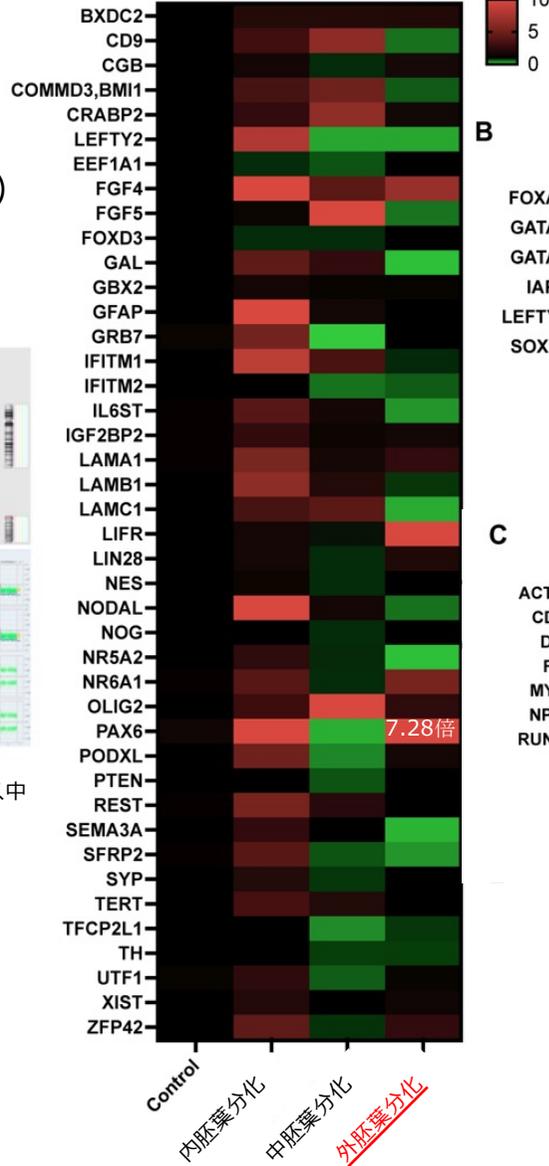
Tra-1-60陽性コロニー数



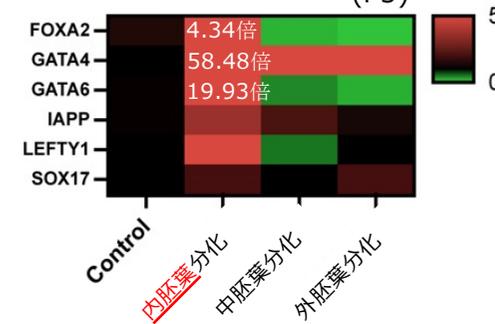
【品質試験で多能性の弱い細胞は検出・除外できる】

【アテロコラーゲン上でPBMCからiPS細胞を樹立：品質試験】

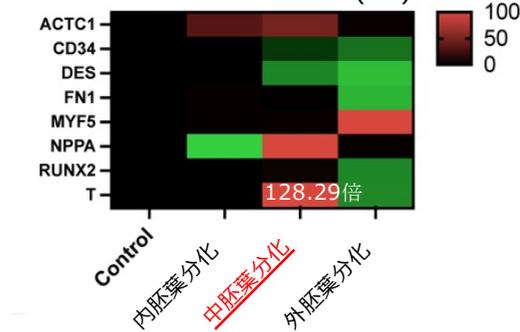
D 外胚葉 (P5)



B 内胚葉 (P5)



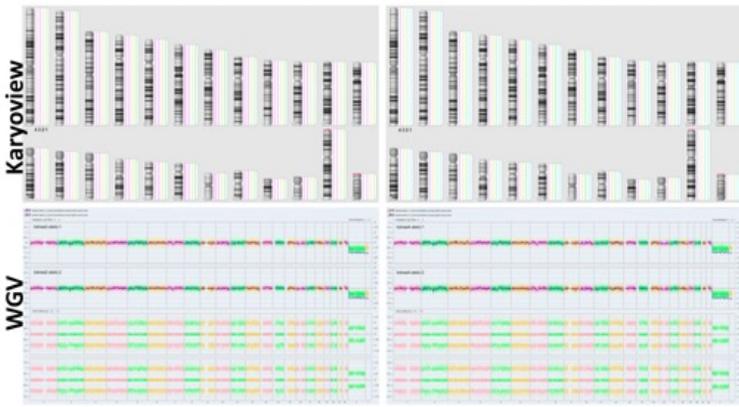
C 中胚葉 (P5)



KaryoStat
(全ゲノムシーケンスから核型解析する手法)

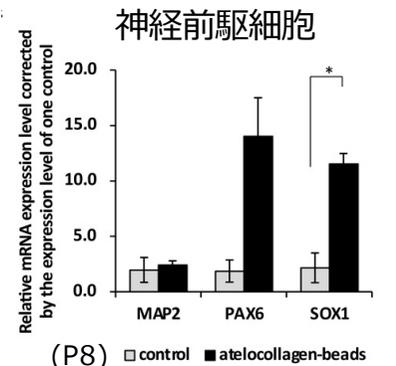
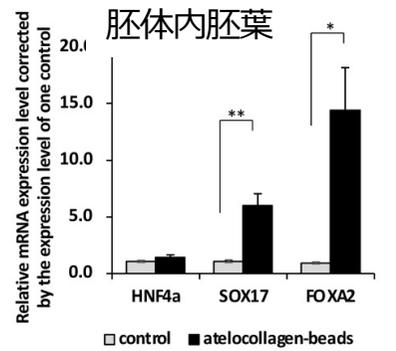
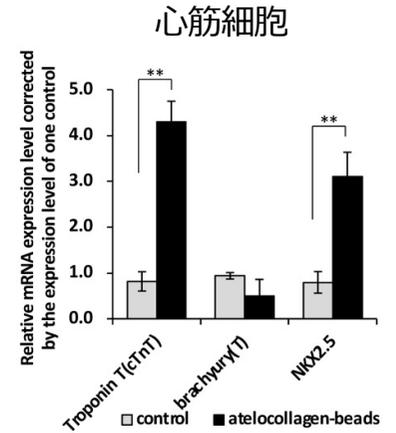
iPSC (P5) on atelocollagen-beads (SRVTM iPSC-2 Vector)

iPSC (P5) on atelocollagen-beads (SRVTM iPSC-4 Vector)



(P4)

Nakashima et al. Cell Reports Methods リバイス中



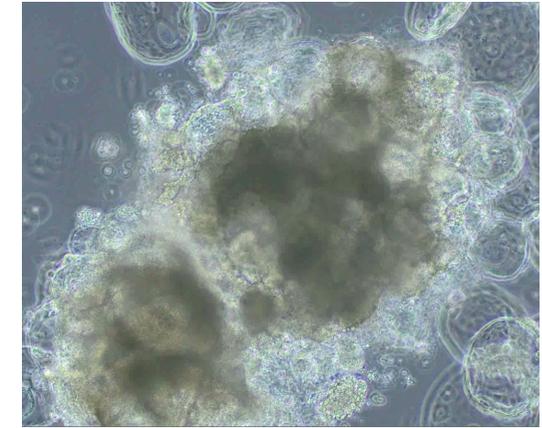
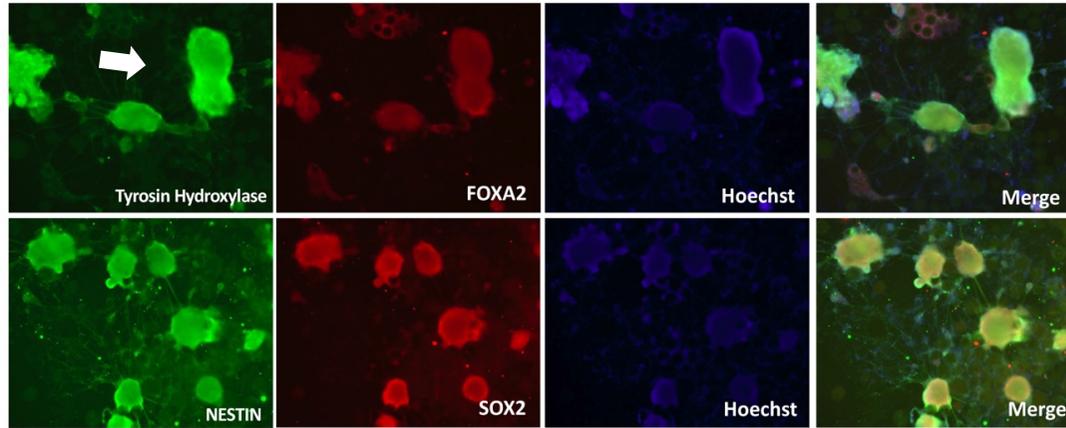
【KaryoStatに異常は無く、分化誘導能も確認できた】

【アテロコラーゲンを用いてPBMCから樹立したiPS細胞の品質試験】

201B7細胞 (ドパミン神経細胞の分化誘導30日目)

201B7細胞(心筋細胞の分化誘導8日目)

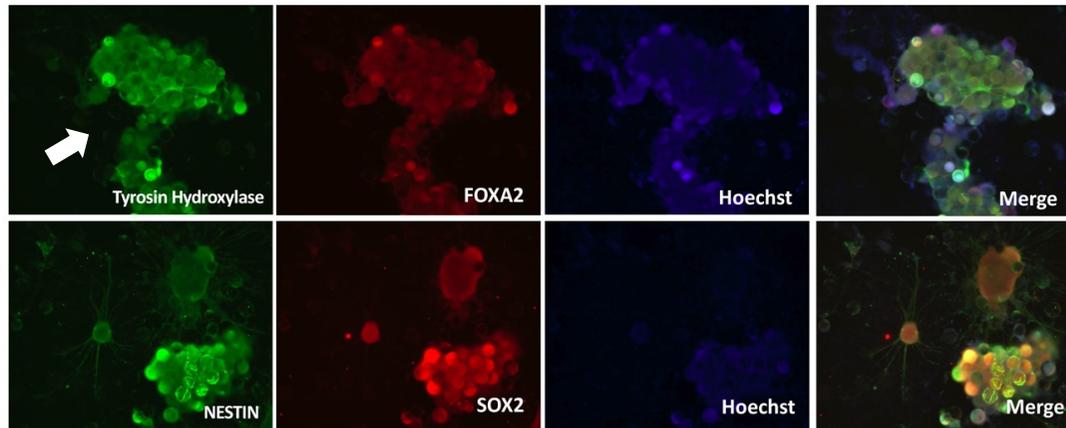
アテロコラーゲン
ビーズ



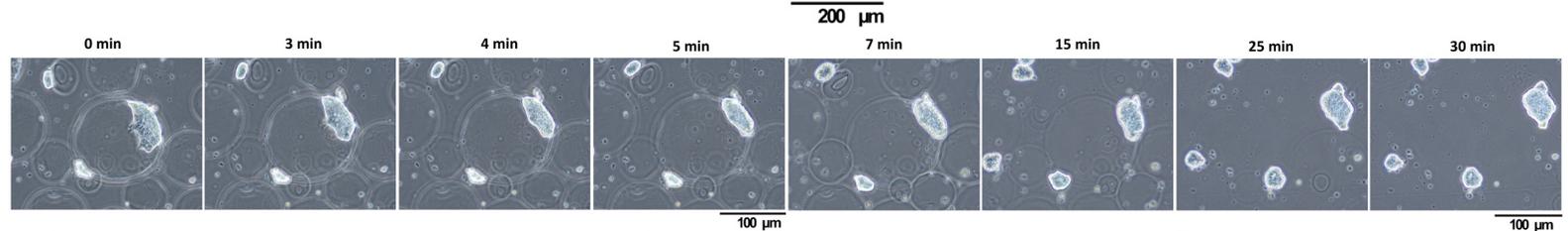
X4倍速

Nakashima et al. Cell Reports Methods リバイス中

Synthemax II



アテロコラーゲンビーズは、
コラゲナーゼで30分で消失。



【移植に用いる分化成熟度の高い細胞を作製できた】

【製造装置のデザイン】

(1) The nurse draws 4 mL of blood from the patient's upper arm.



(2) The tube can yield up to 15 million (1.5×10^7) PBMCs with centrifugation times of 15 or 20 minutes.

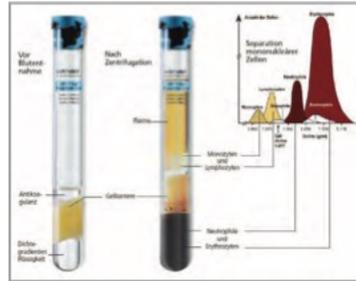


(3) The nurse injects the PBMC (1.5×10^7 cells) in the collection tube into the culture bag using the BD Vacutainer® Luer-Lok™ Access Device.

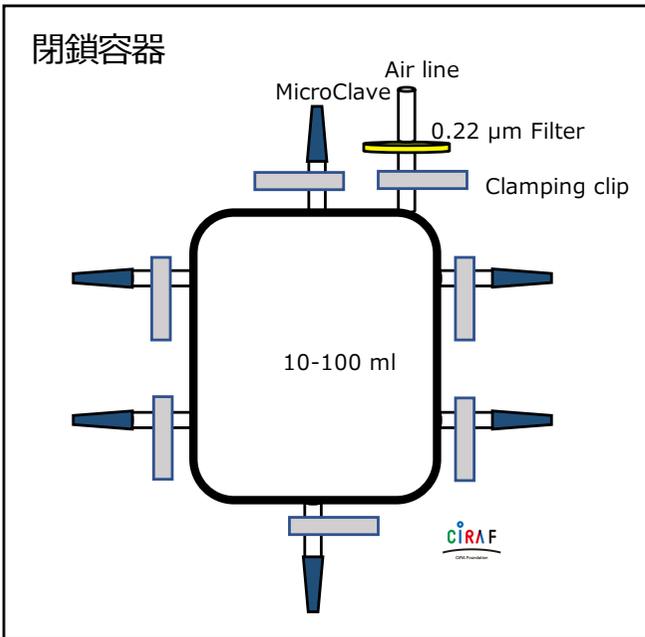


<https://ameblo.jp/kagayake-shinjin/entry-12678689999.html>

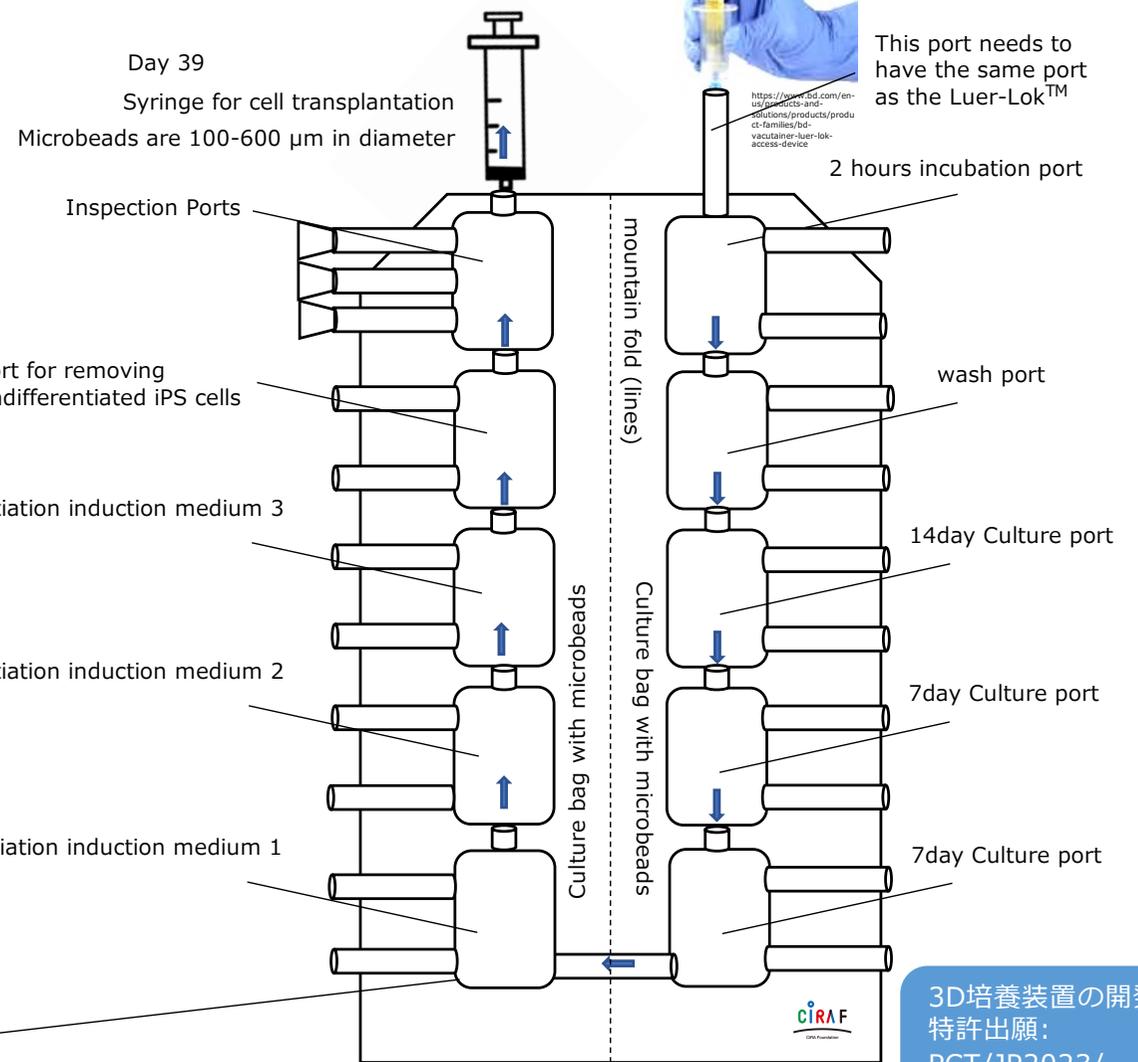
BD Vacutainer® (362781)



<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=25128>



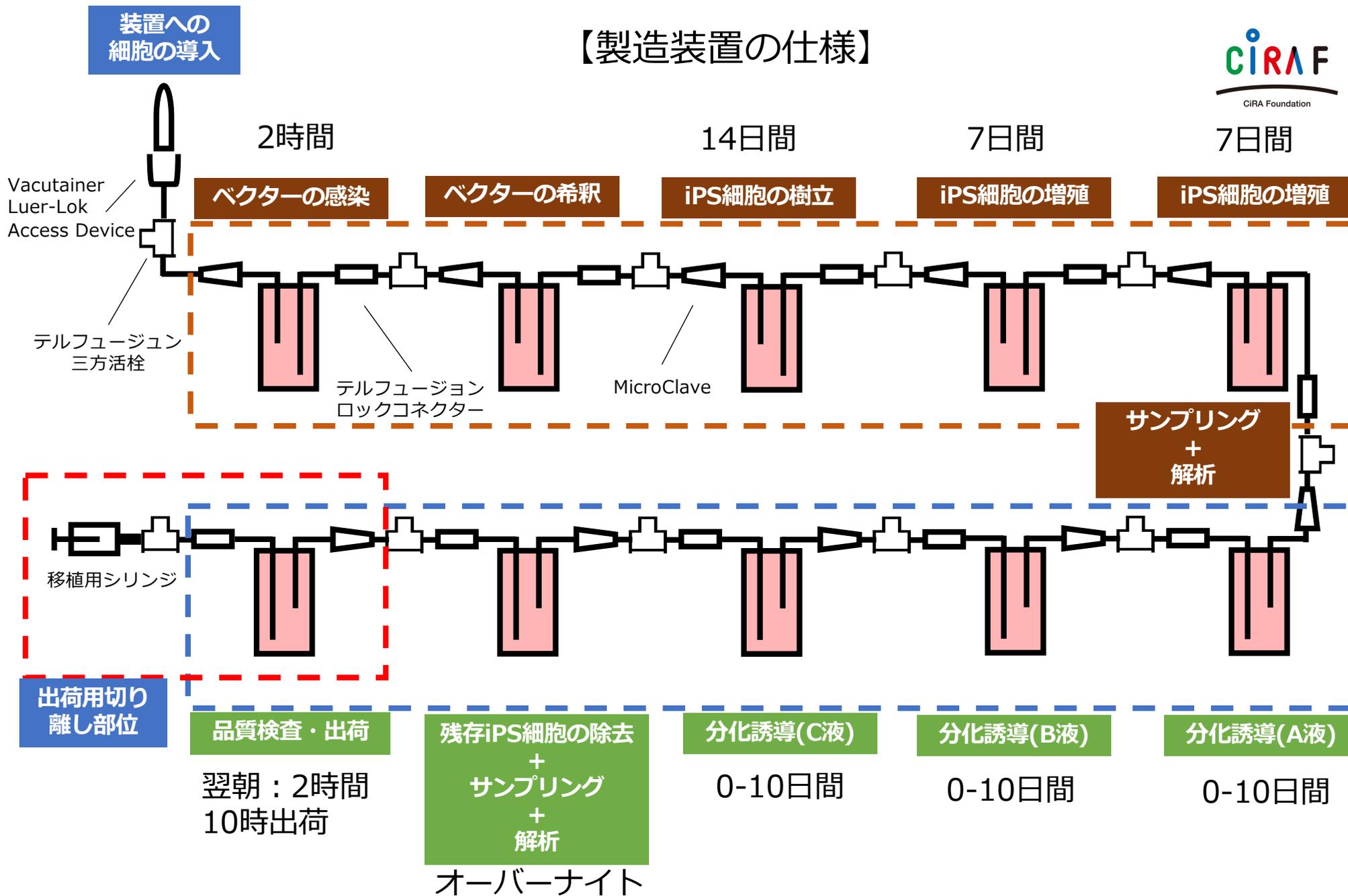
Each small bag has a 15mL capacity



【複数の閉鎖容器を持つ、無菌バック】

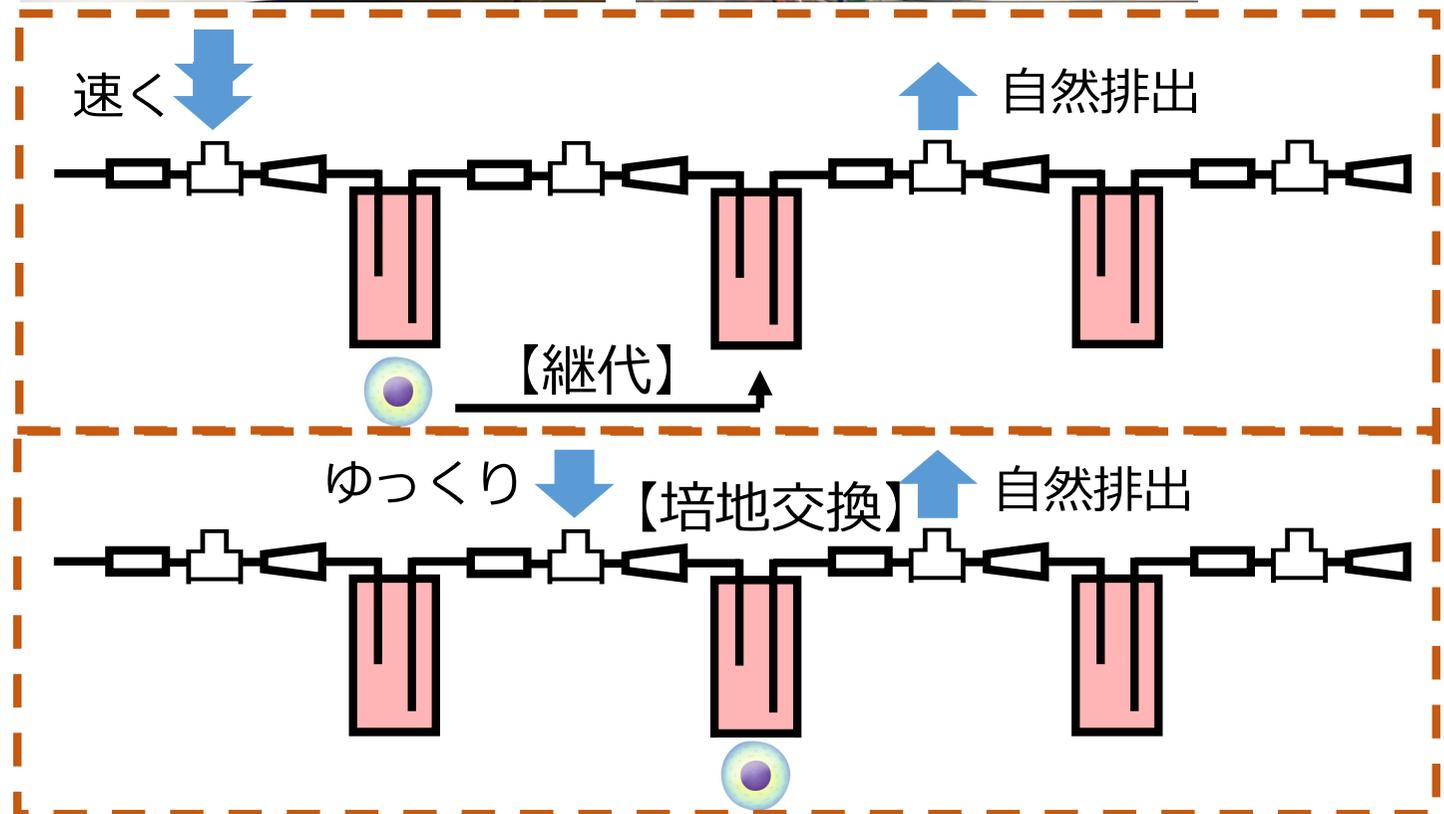
3D培養装置の開発
特許出願:
PCT/JP2023/
6753

【製造装置の仕様】



【製造作業と品質試験を並行して進める】

【プロトタイプを作製しiPS細胞の樹立・分化誘導を行った】

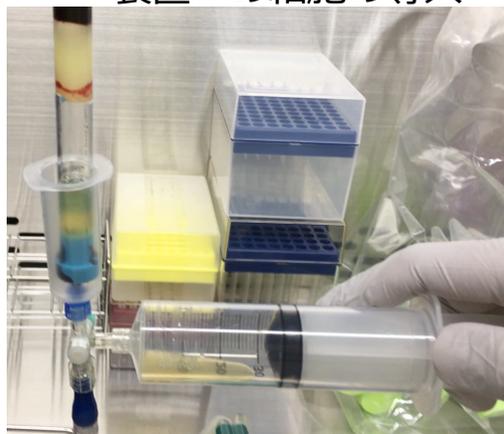


【閉鎖状態で細胞を流体として取り扱う】

【閉鎖型培養装置へ細胞を無菌的に導入】 【iPS細胞を除去する培地】

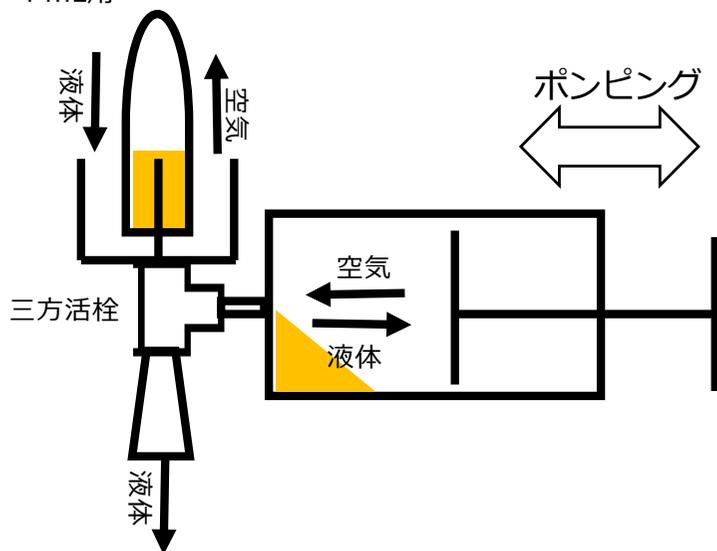


装置への細胞の導入



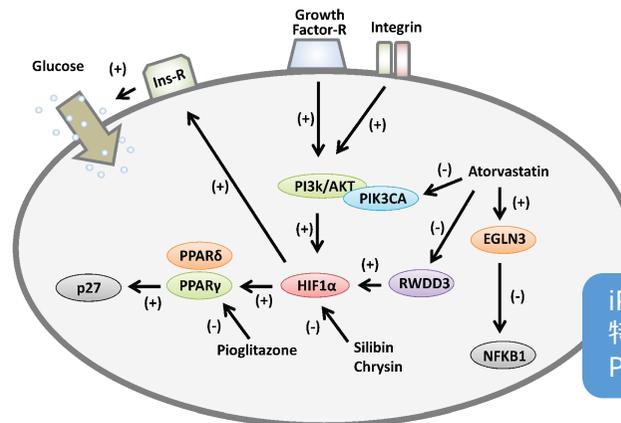
BD Vacutainer® (362781) CPT™
単核球分離用採血管
4 mL用

BD Vacutainer® Luer-Lok™ Access Device.



【閉鎖型培養を用いてiPS細胞の樹立と分化誘導ができた】

iPS細胞の生存に必須のHIF1α-PPAR axis



Liarozole、
Pioglitazone、Silibinin、
Chrysinのいずれか又は
複数を含む、幹細胞由
来の培地を用いるとiPS
細胞だけを除去できる。

iPS細胞を除去する方法の開発
特許番号:第7217542号
PCT/JP2019/007471

Nakashima et al. Molecular Therapy. 2018 Jul 5;26(7):1715-1734

【6時間でiPS細胞を除去できる】

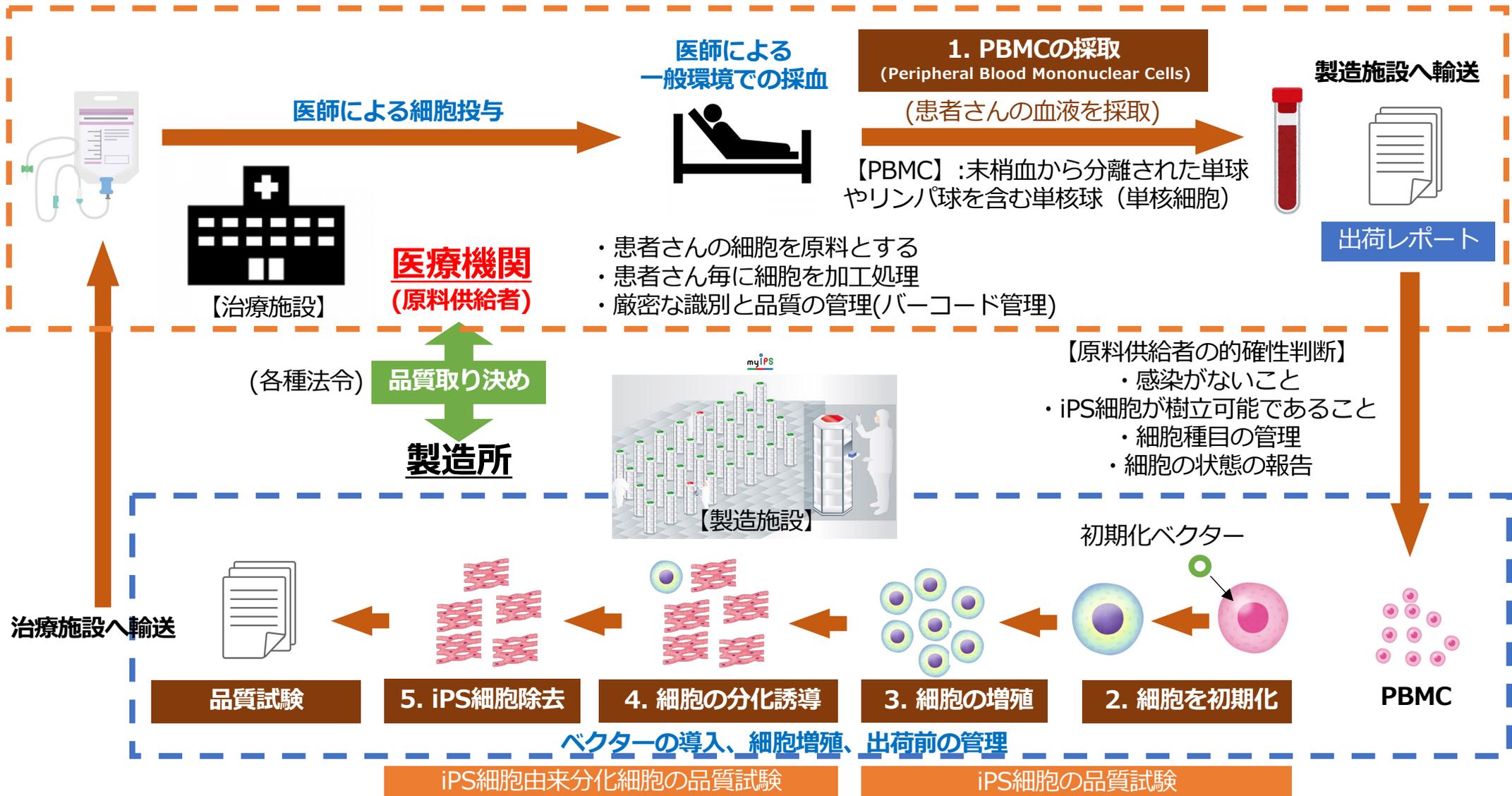
【閉鎖系培養装置を用いた成果】

全血から分離したPBMC
を用いたiPS細胞の樹立

iPS細胞の分化誘導
(心筋細胞)

3D培養装置の開発
特許出願:
PCT/JP2023/
6753

【まとめ：治療プロセス】



【細胞凍結の工程を持たない：細胞は患者さんの分身として温かく取り扱います】