

P17-2

iPS細胞自動培養装置実験機を用いて樹立したiPS細胞の分化能特性評価

梅景 雅史¹, 大脇 悠介², 米水 彩香¹, 塚原 正義¹

1. 京都大学iPS細胞研究財団
2. キヤノンメディカルシステムズ株式会社

背景・目的

■ 臨床用自家iPS細胞の製造には閉鎖系型装置の開発が重要

iPS細胞の特徴の1つは、自分自身の細胞から作製できることです。これは拒絶反応のリスクを最小化するためには、有効な手段である。しかし、自家iPS細胞由来の分化細胞を用いた移植治療を広く普及させるためには、コストダウンが非常に大きな課題である。我々はこの課題を解決・克服するために、閉鎖型自動培養装置の開発を行っている。閉鎖系装置の開発によりプラグイン可能な試薬、資材のキット化、品質試験の省略、人件費の削減と大幅なコストダウンが可能となる。

■ 閉鎖系型装置の開発（実験用試作機）で目処をつけた

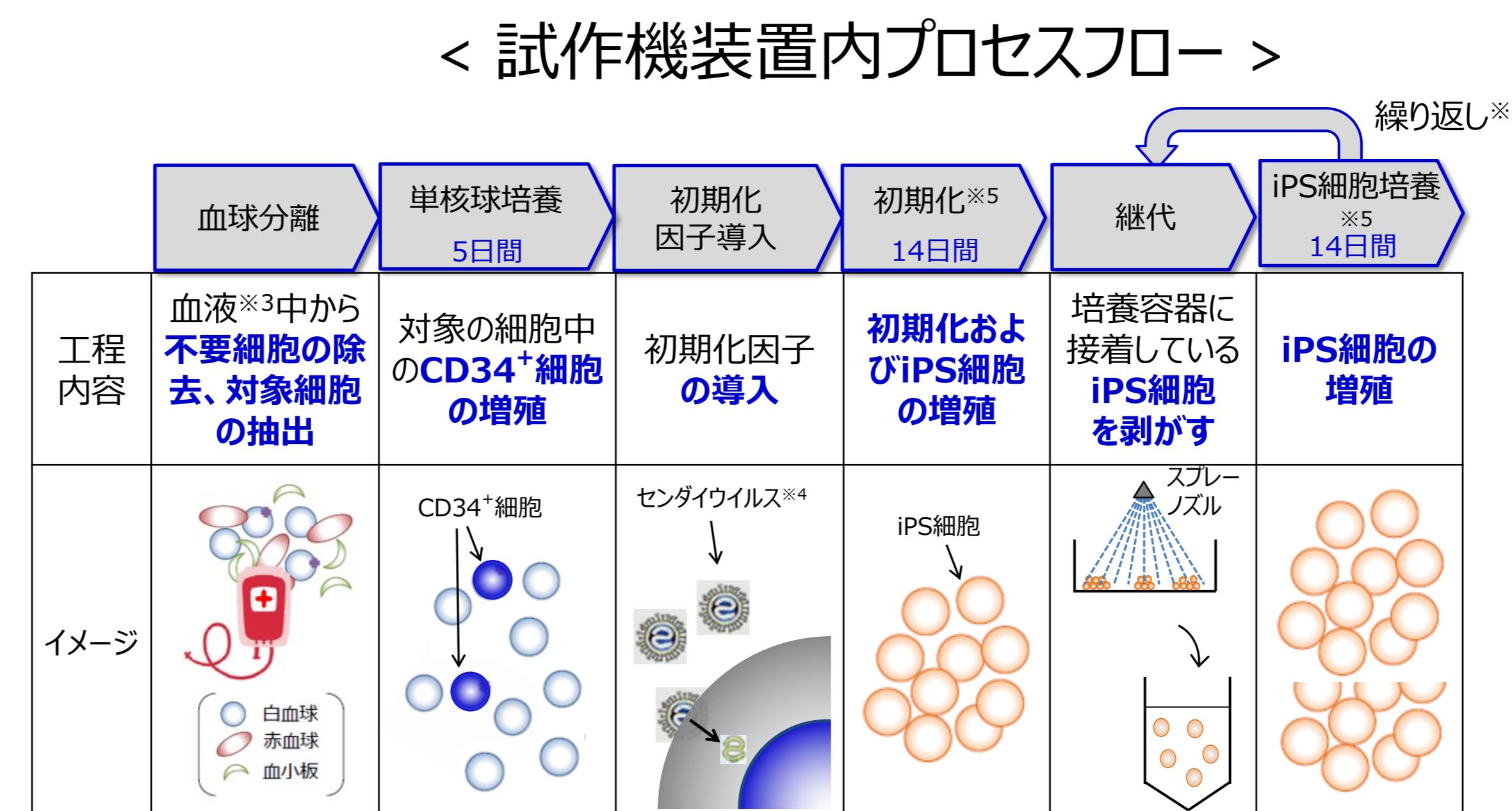
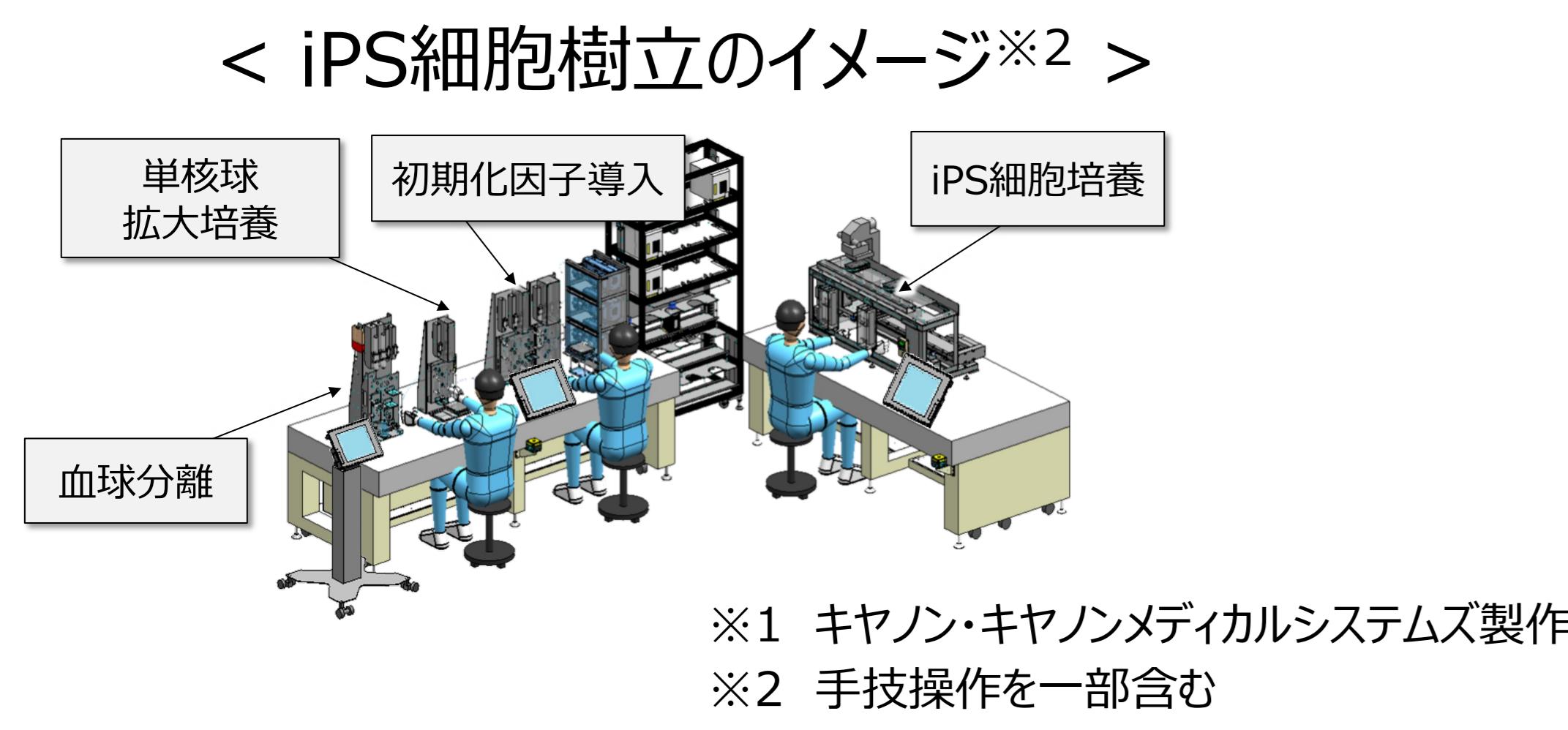
開発した装置（実験用試作機）では、閉鎖系でかつ自動でiPS細胞を樹立できることが可能となり、臨床用自家iPS細胞を閉鎖型装置で製造することに目途が付いた。装置を使って、健常者ドナー由来の血液約10mLからiPS細胞を樹立し、継代から細胞の回収までを行った。

■ 目的

実験用試作機で樹立したiPS細胞の特性を評価する

方法

■ 実験用試作機を使用したiPS細胞の樹立^{※1}



コストダウン技術

- ・自動化
- ・閉鎖型
- ・資材のキット化
- ・品質試験の省略
- ・人件費の削減

細胞株名

細胞株名	作製プロセス
F.O23	試作機を使用して樹立
F.O25	同上 (F.O23とはドナー違い)
手技	F.O.23と同じ血液を用いて、手技 ^{※7} により樹立

※3 健常者由来の全血

※4 ときわバイオ社「SRV™ iPSC-2 Vector」

※5 フィーダーフリーでの培養

※6 7回継代。バルク状態で培養し、クローニングは不実施

※7 CiRA_Fプロトコールを参照

■ iPS細胞の評価方法

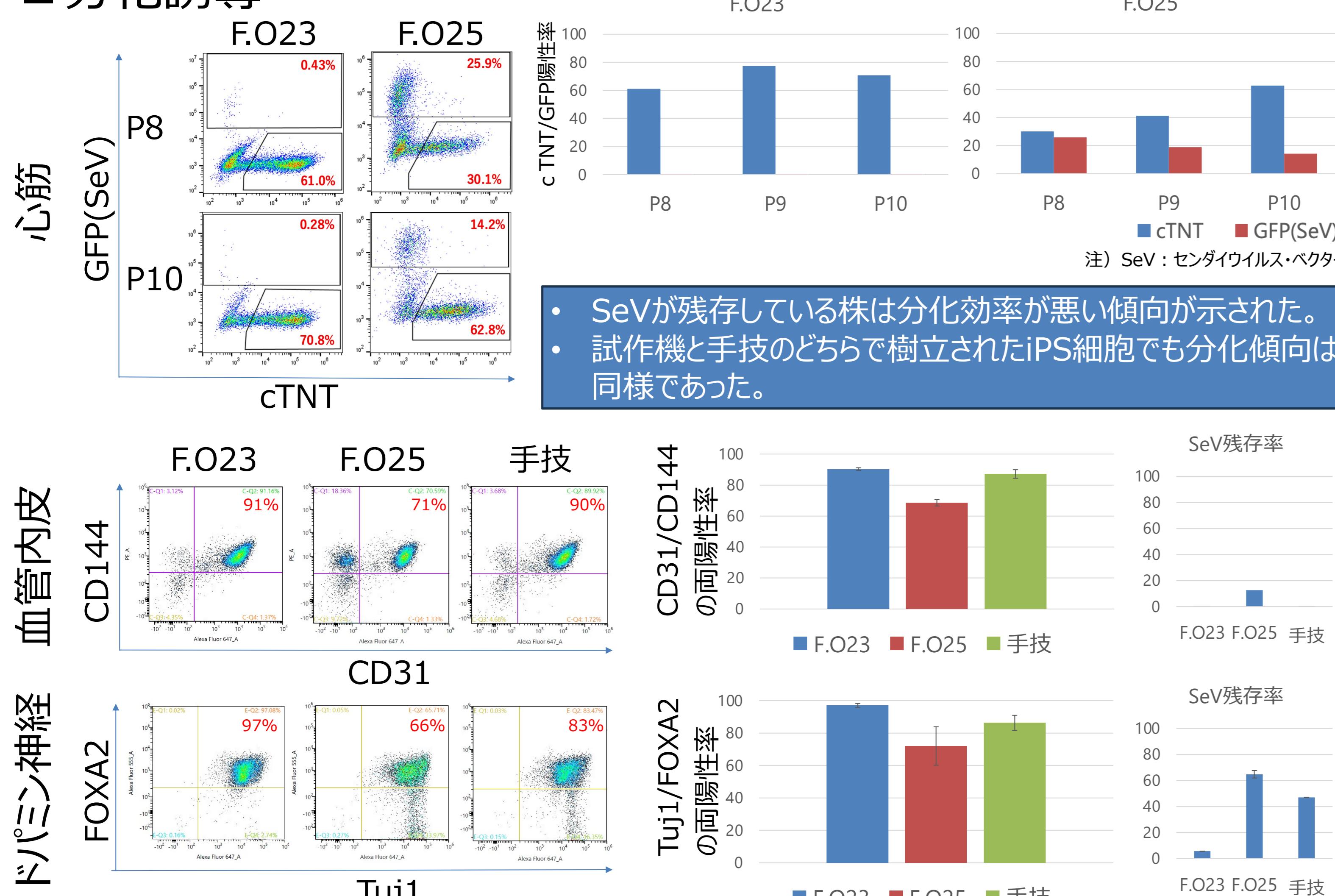
試験項目	試験方法
無菌試験	日本薬局方 直接法
核型解析	G-band
未分化マーカー	TRA-1-60, SSEA4, OCT4
三胚葉分化	STEMdiff™ Trilineage Differentiation Kit
特定細胞への分化	心筋細胞 血管内皮細胞 ドパミン神経細胞

各分化誘導プロトコルの詳細は「公益財団法人 京都大学iPS細胞研究財団 プロトコル」参照

- ・フローサイトメトリー検査により各分化細胞特有のマーカー陽性率を評価
- ・各細胞のマーカー
 - 心筋細胞 : Troponin-T
 - 血管内皮細胞 : CD31 & CD144
 - ドパミン神経細胞 : FOXA2 & Tuj1

結果

■ 分化誘導



実験用試作機 VS 手技の樹立方法の違いにより細胞特性に大きな違いはなかった

課題と将来

■ センダイウイルス・ベクターの使用について

メリット	デメリット
高い樹立効率	カルタヘナ対応が必要
非遺伝子挿入	ウイルス残存
GMP対応	コスト高

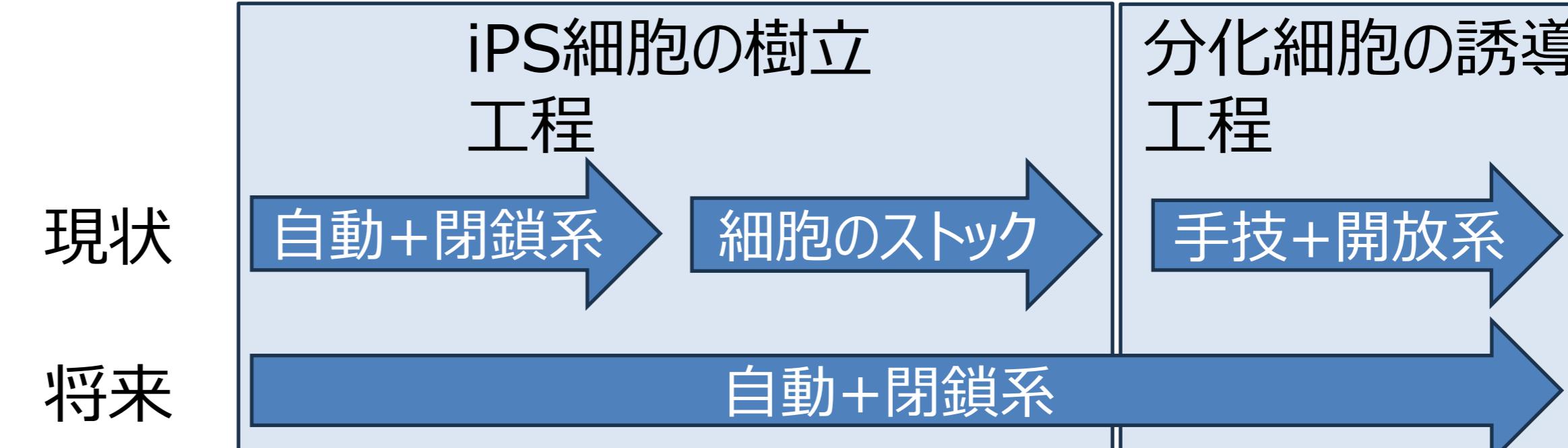
求められる対応策

- ・簡便なウイルス除去の工程の開発
- ・ウイルス残存否定の品質試験の省略
- ・mRNA、低分子などを使用した樹立方法の導入

■ 疾患を有するドナーからの樹立

- CD34⁺細胞の培養が不可能である場合の対応
- 感染症を併発している患者がドナーである場合の対応
- 健常者とは異なる性質のiPS細胞である可能性
- 疾患ゆえの個人差が大きく安定した製造に影響する可能性

■ 閉鎖系の分化誘導装置の開発



考察

- 今回の装置で樹立したiPS細胞の特性は手技と同等であったが、すべて自動化した場合、予期せぬセレクションや細胞へのストレスがかかつてしまう可能性がある。よって、それらの異常が検出可能な評価方法が求められる。しかし、現状のiPS細胞に対する評価方法では、異常を捉えることは困難であると予想される。そのため、なるべく最終製品に近い分化細胞での評価が望ましいと考えられ、幅広い分化細胞に誘導する評価系を確立していく必要がある。
- 自動装置で製造されるiPS細胞は、複数のPBMCから初期化した集団（バルク）である。クローニング工程がなく少ない継代数でストックできるため、コストと時間を抑えることができる。今後、バルクのiPS細胞の品質について、分化誘導試験などのデータの蓄積が必要と考えられる。
- コスト面では、将来的には「患者の細胞から分化細胞まで」を装置により一気通貫で製造することで、コストを大幅に削減することができる。実現には、上記の評価方法の確立により得られる結果と、装置パラメーター（数値化）を関連させたデータの蓄積が非常に重要である。また、mRNAや低分子のみで樹立することで品質試験や工程を省略することで可能と考えられる。
- 疾患を有するドナーからiPS細胞を樹立できない可能性は、投薬や疾患の状態によって状況が大きく異なるため注意が必要である。まずは、臨床応用が想定される疾患の患者のiPS細胞の樹立および分化誘導を行いデータの蓄積をして対応する方法について協議していく必要がある。

まとめ

装置を使って樹立したiPS細胞であっても、従来の手作業により樹立した細胞と同等の細胞特性を有していることが確認された。