



平成25年6月23日

第23回日本サイトメトリー学会学術集会

ヒトiPS細胞由来移植細胞中に残存する未分化細胞の *in vitro*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

ヒトiPS細胞由来移植細胞の安全性

未分化なiPS細胞には**腫瘍形成能(造腫瘍性)**があることから、
残存iPS細胞による造腫瘍性のリスクが存在する

可能な限り未分化iPS細胞を除去する工夫が必要



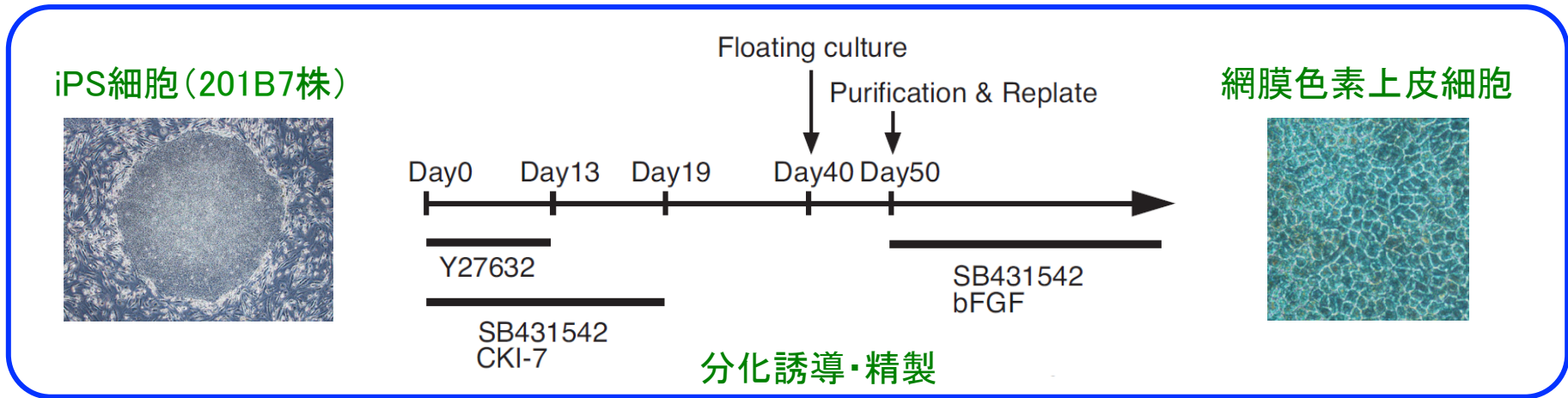
未分化iPS細胞を除去できたかどうかチェックする試験法も必要

未分化iPS細胞の高感度検出法の開発と評価

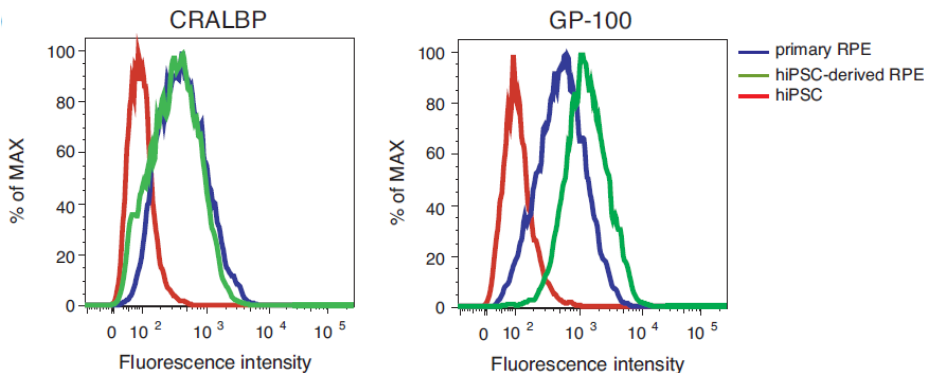
モデルケース



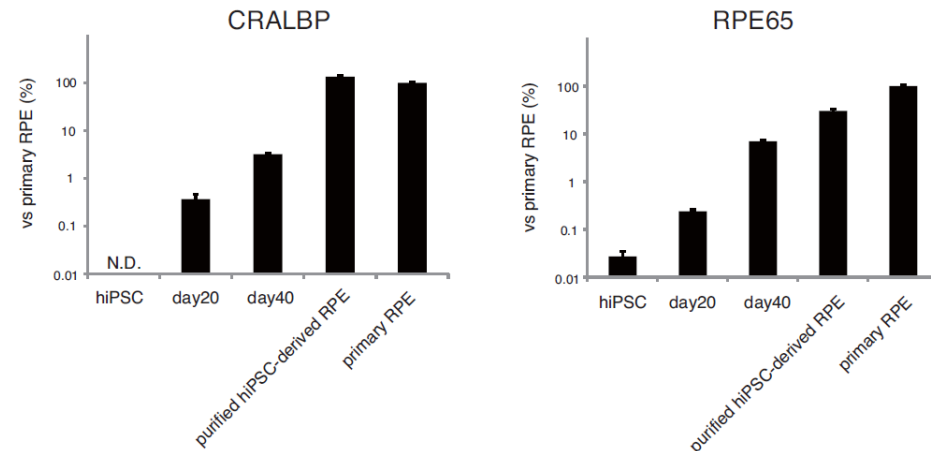
ヒトiPS細胞由来の網膜色素上皮細胞 (RPE)



RPE特異的タンパク質発現



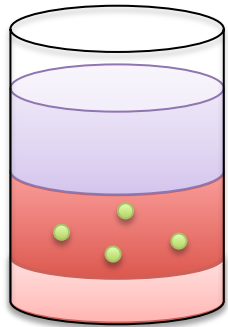
RPE特異的遺伝子発現



*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

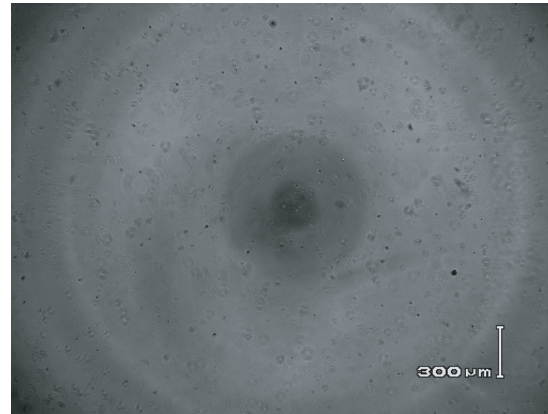


DMEM/10%FBS

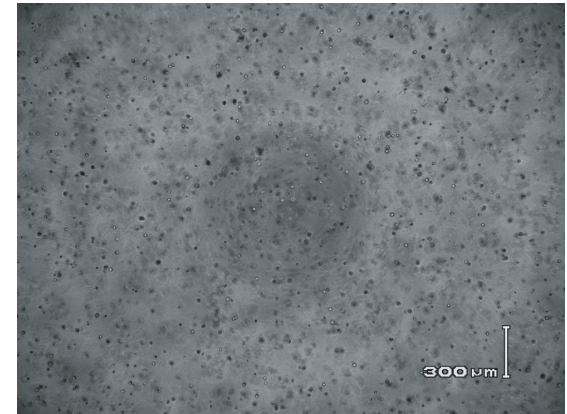
Cell Agar Layer

Base Agar Layer

96-well plate



iPSCs



primary RPE



iPSC-derived RPE

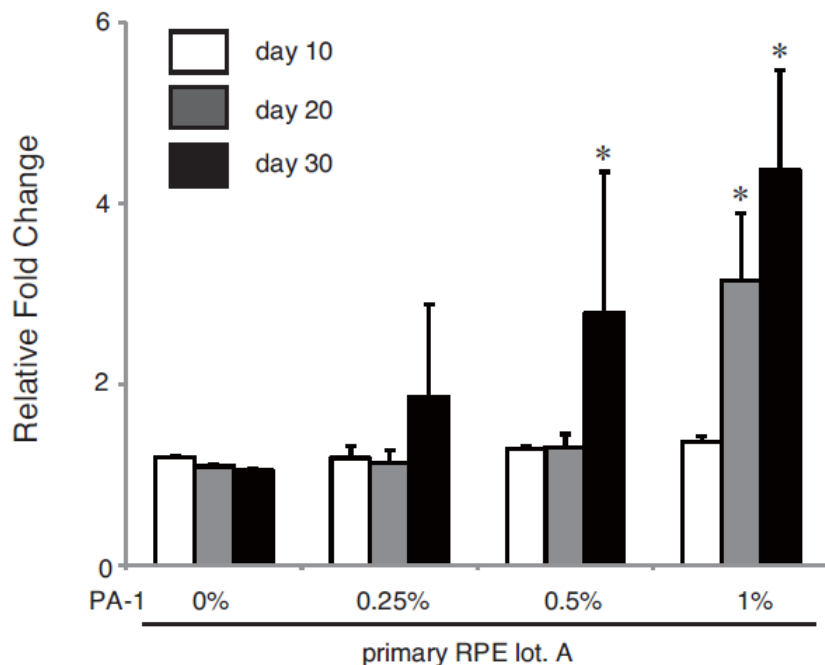


PA-1 (テラトカルシノーマ)

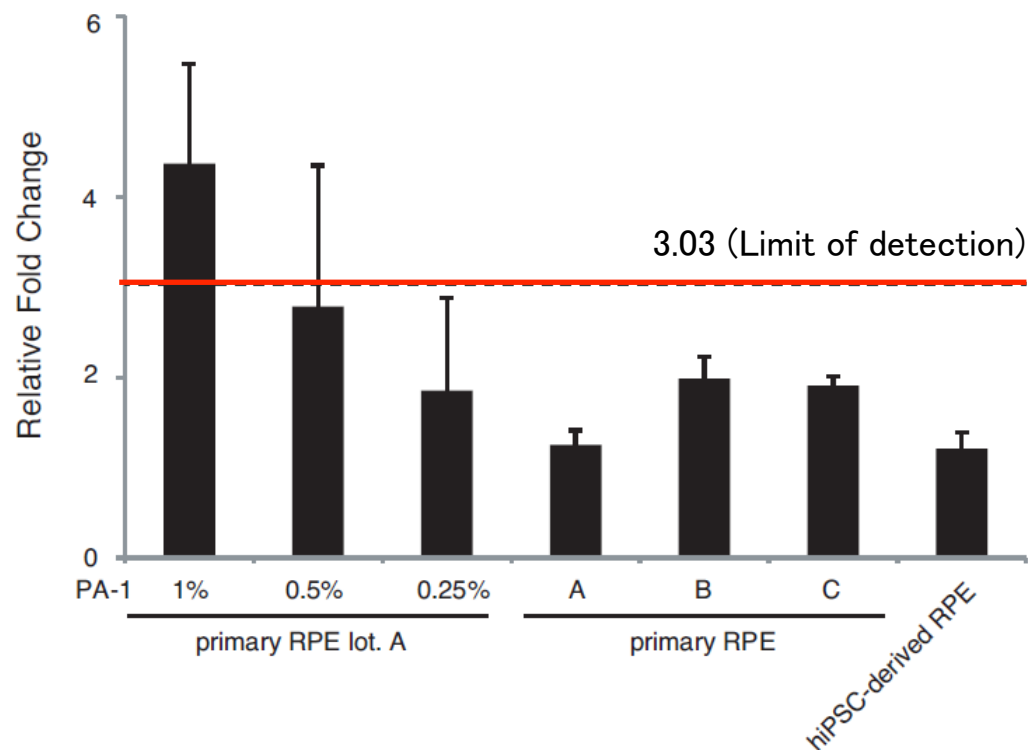
軟寒天コロニー形成試験



時間経過 (PA-1細胞)



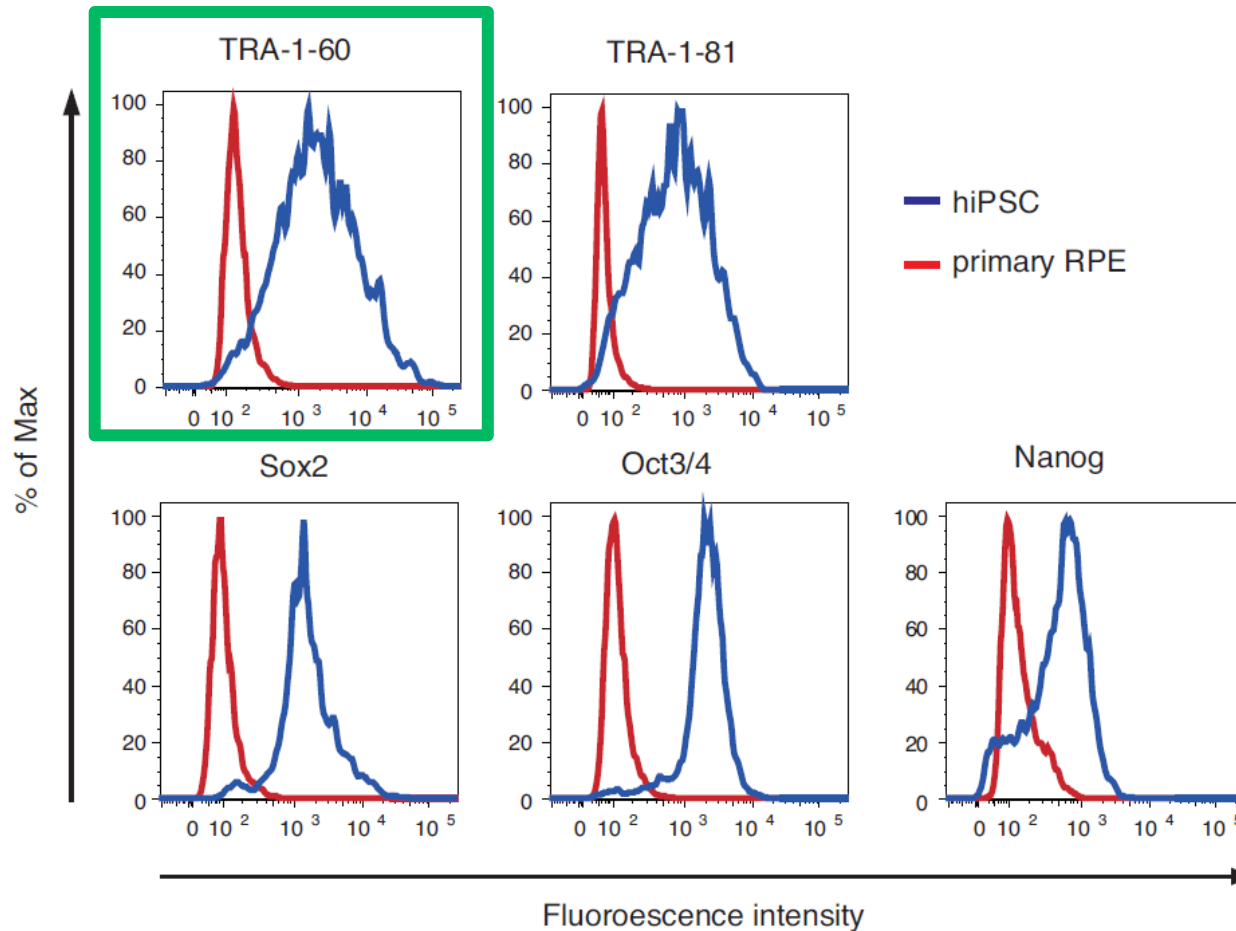
検出限界 (PA-1細胞)



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%

各種マーカーの検討

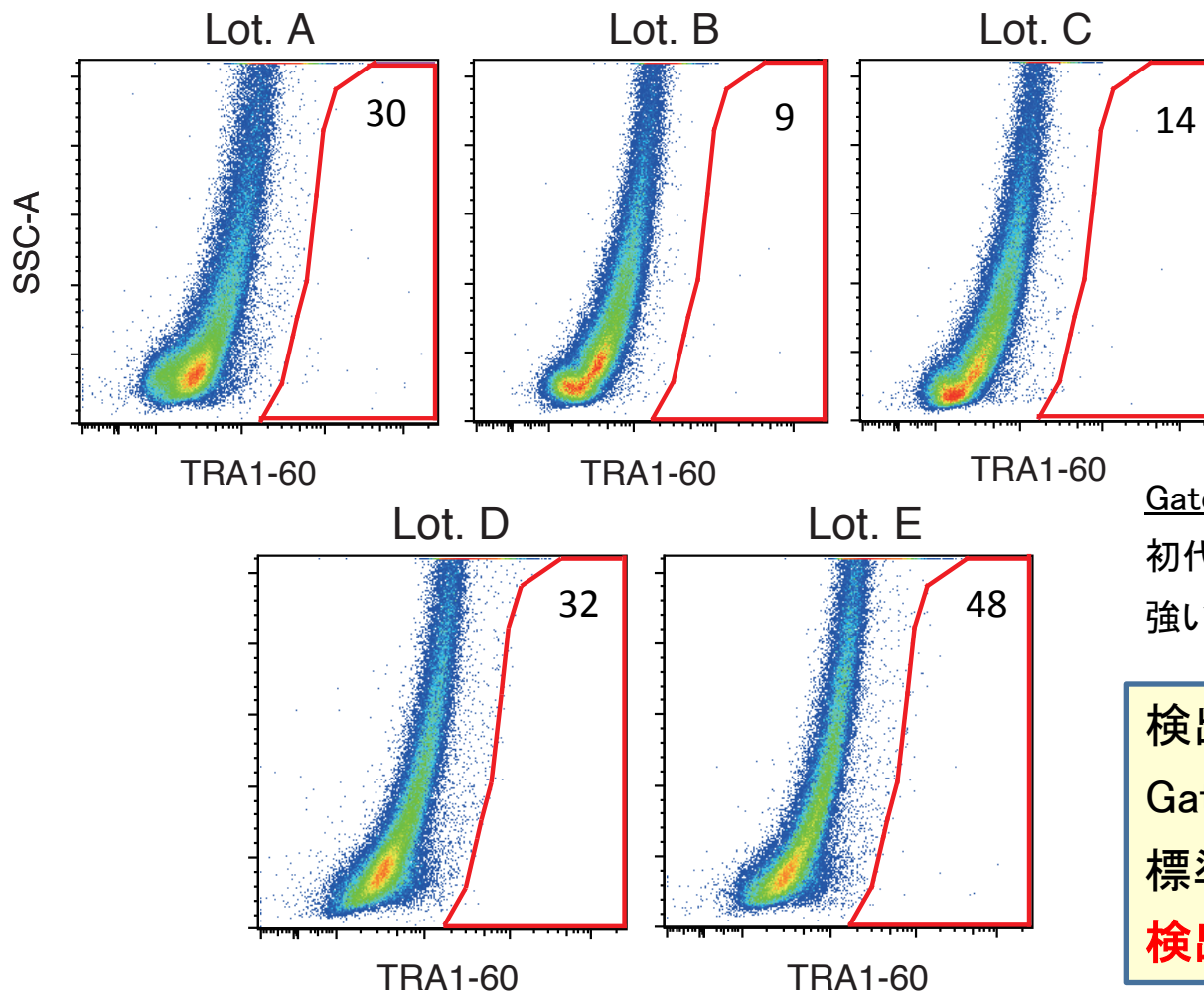


hiPSCへの選択性が高く、胚性がん(ES)細胞のマーカーでもあるTRA-1-60を採用

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

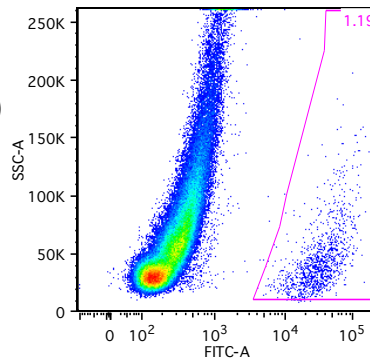
検出限界(平均値 + 3xSD): 73.2

Gateの妥当性の検討

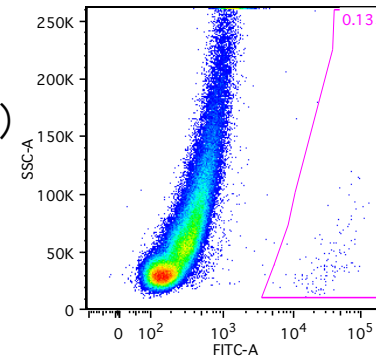
予めCFDAで蛍光ラベルしたiPS細胞を初代培養RPEにスパイクし、
フローサイトメーターで検出される細胞数がスパイクした細胞数と一致しているか検証

解析細胞数: RPE 10^5

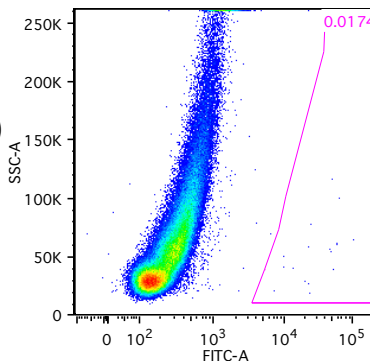
spike 1% (1000個)
検出細胞数
1146個



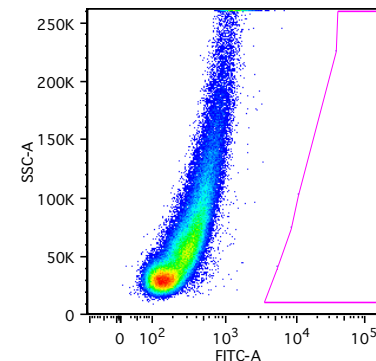
spike 0.1% (100個)
検出細胞数
132個



spike 0.01% (10個)
検出細胞数
17個



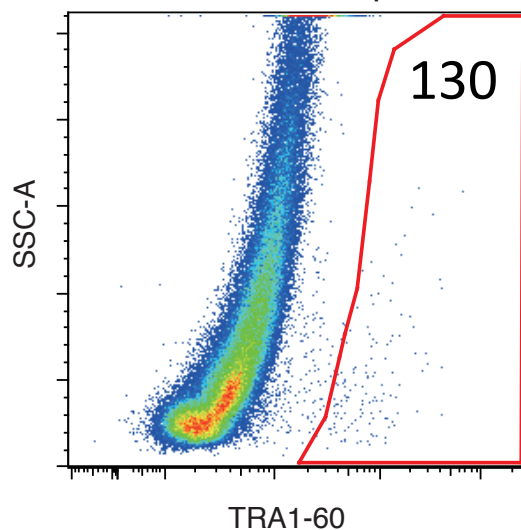
spike 0% (0個)
検出細胞数
0個
(gateの基準)



RPE細胞 + iPS細胞スパイク

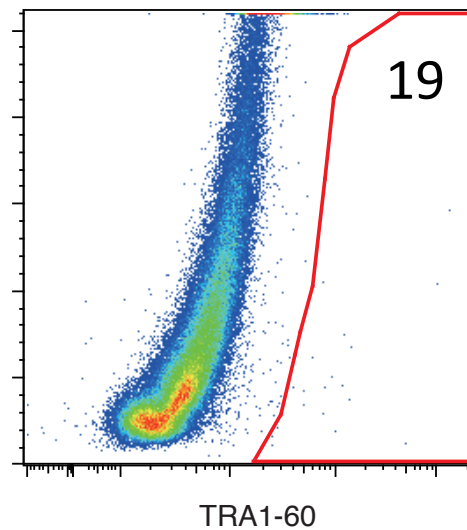
primary RPE 2.5×10^5 cells
+
iPS 2.5×10^2 cells

0.1% iPSC spike



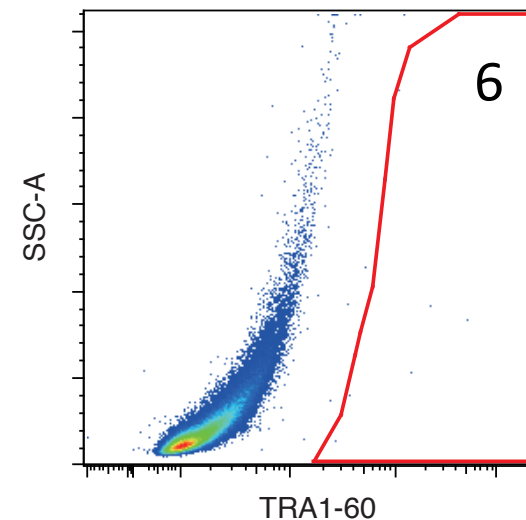
primary RPE 2.5×10^5 cells
+
iPS 2.5×10^1 cells

0.01% iPSC spike



iPS由来RPE

iPSC-derived RPE



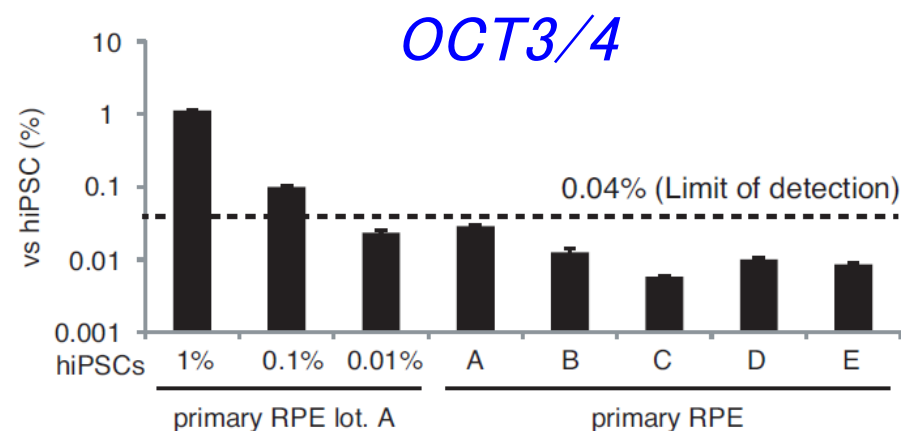
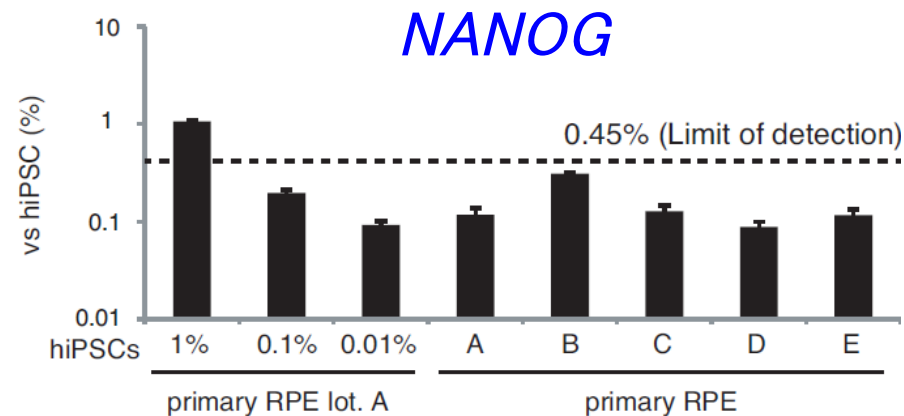
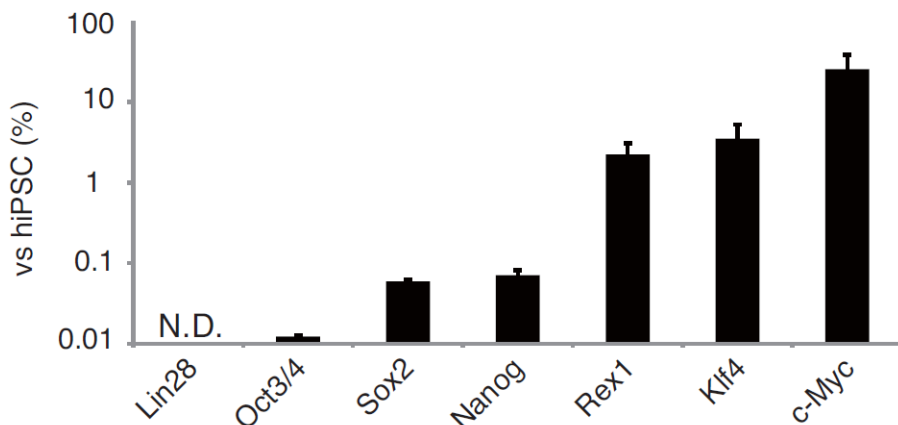
検出限界(平均値 + 3xSD) : 73.2



残留・混入iPS細胞の検出限界は約0.1%

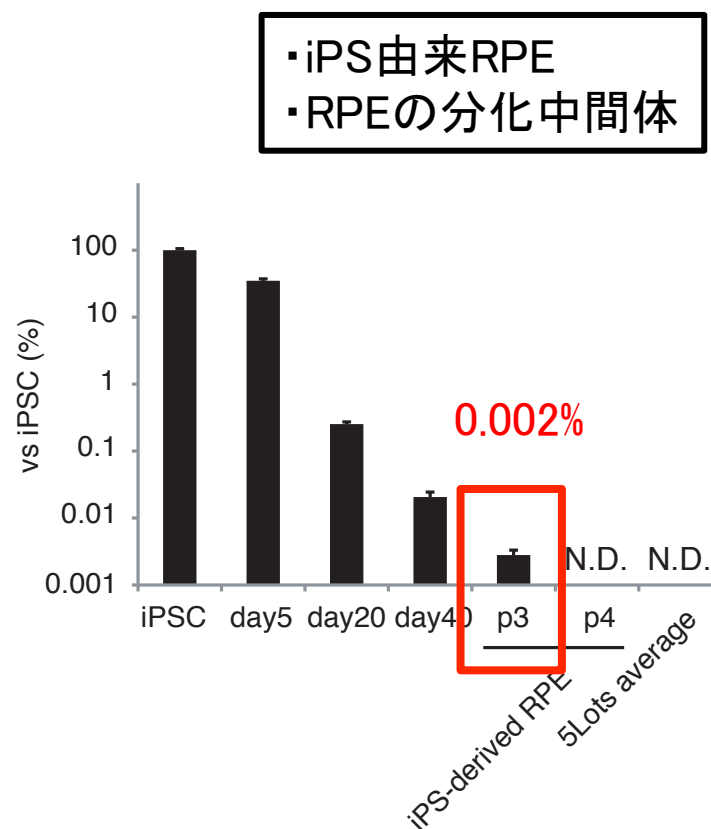
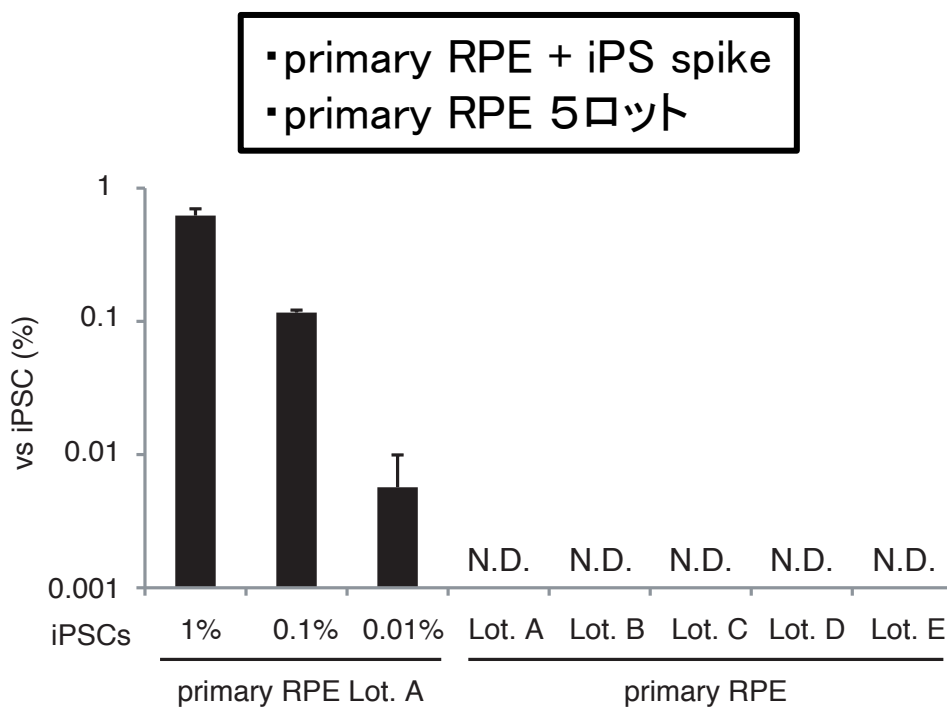
多能性幹細胞関連遺伝子 (初代培養RPE)

検出限界



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

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

*in vivo*造腫瘍性試験との比較



ヒトiPS細胞由来移植細胞の造腫瘍性試験

〈目的別に3種類ありうる。ただし、すべてが必須ということではない〉

- ①原材料の品質管理のための試験・・・「均一なセル・バンク」の造腫瘍性
 - ②製造工程評価のための試験(中間製品)
 - ③最終製品の安全性評価のための試験
- } 有害細胞の僅かな混入による造腫瘍性

中間製品、最終製品における懸念

最終製品

中間製品

Q1「どのくらいのiPS細胞が残存しているのか？」

qRT-PCR、フローサイトメリー

Q2「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれる？」

細胞増殖特性評価、軟寒天コロニー形成試験、高感度*in vivo*試験

Q3「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか？」

高感度*in vivo*試験

- *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]

- 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
- 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うえで、
リスク判断・リスクマネジメント立案 & IC受領

謝辞(敬称略)



国立医薬品食品衛生研究所

黒田拓也

安田智

草川森士

諫田泰成

平田尚也

鈴木和博



(公財)先端医療振興財団

川真田伸

郷正博

金村星余

松山晃文

西川伸一



理科学研究所網膜再生医療研究チーム

高橋政代