

iPS細胞加工製品の実用化に向けた 原料としてのiPS細胞の品質評価法の開発

国立医薬品食品衛生研究所
再生・細胞医療製品部
黒田 拓也

本日の発表内容



1.iPS細胞加工製品の開発状況

2.iPS細胞の分化指向性をはかる（予測する）

3.iPS細胞のゲノム変異の影響をはかる

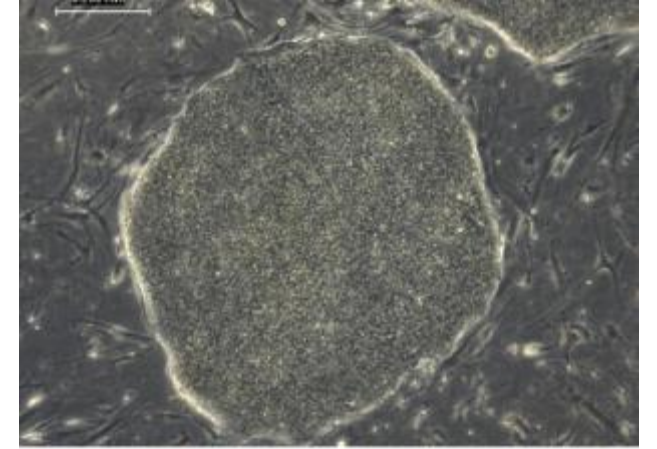
iPS細胞

特徴

- ・多分化能と無限増殖能を持つ
- ・皮膚や血液細胞にOCT4, SOX2, KLF4, c-MYCの4種類の遺伝子を導入することにより誘導可能

➤再生医療の原料として非常に有用

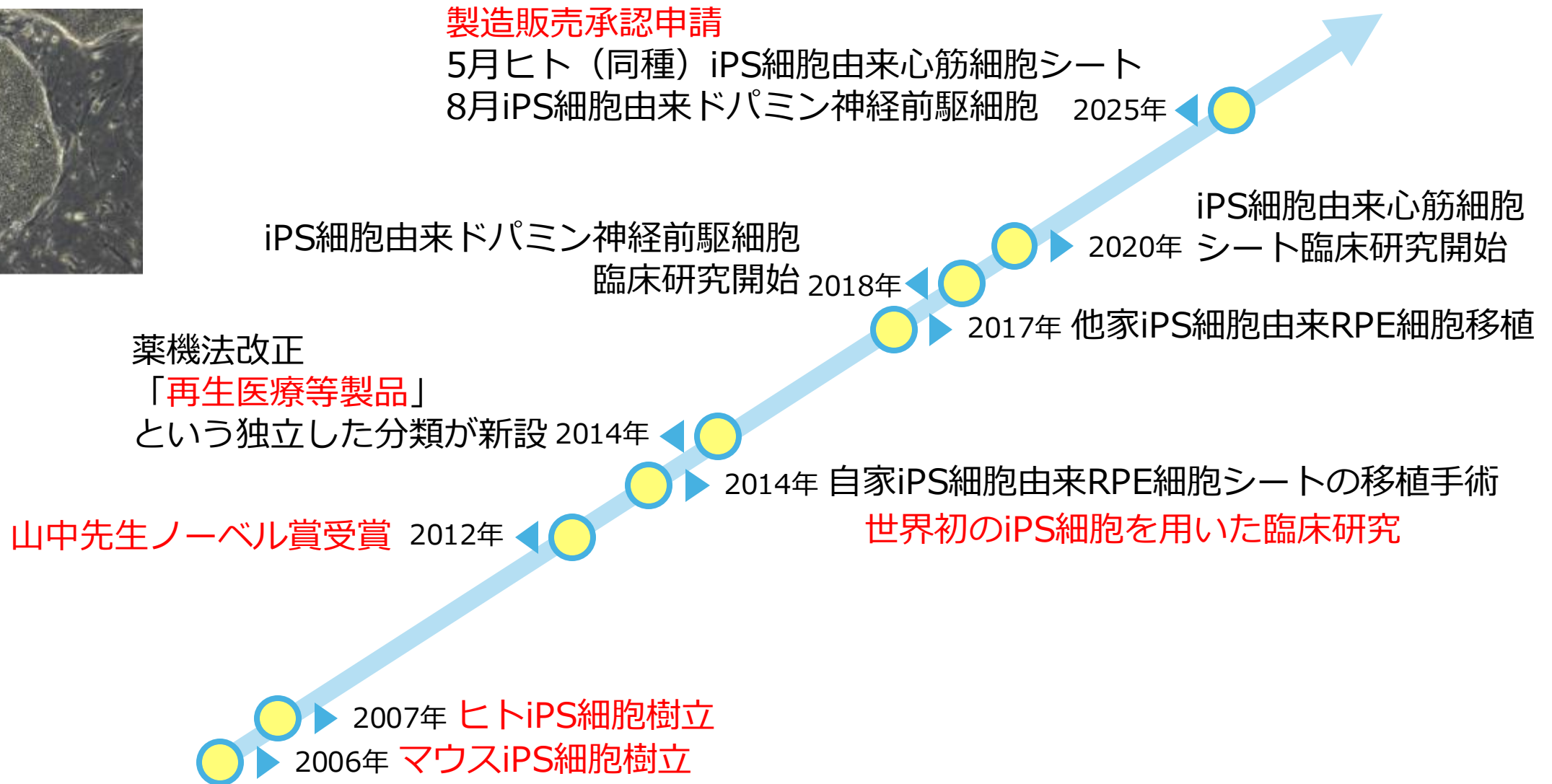
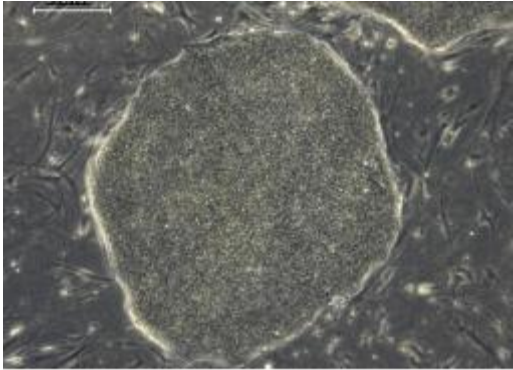
- ✓国内のドナー不足
- ✓倫理的問題の解消（ES細胞）



iPS細胞

iPS細胞加工製品：iPS細胞を原料として、培養や分化誘導などの加工を施し、医薬品として使えるようにした製品

iPS細胞20年の歩み



世界初のiPS細胞加工製品の承認（実用化）が目前

iPS/ES細胞を使った臨床試験

1. 臨床試験の現状と規模 (2024年12月現在)

試験数：116件

製品数：83種類

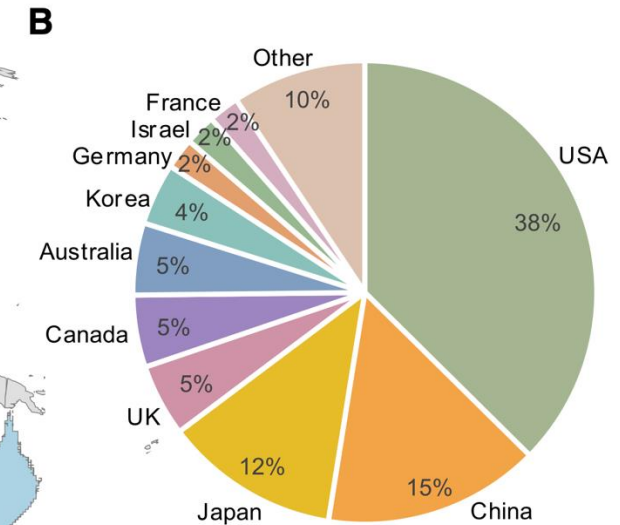
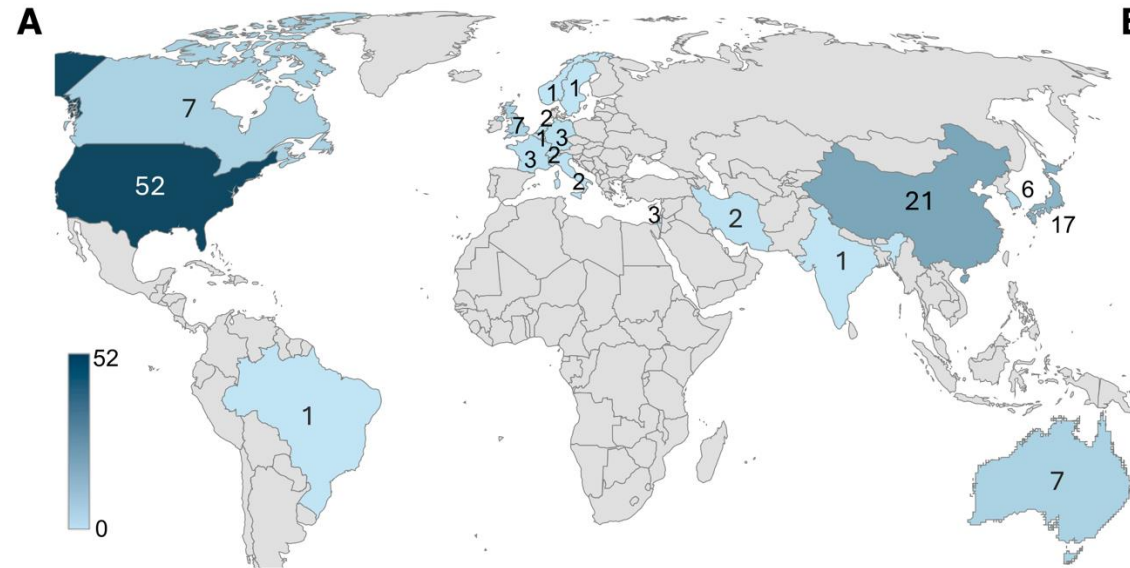
患者数：1200人以上

2. 主要な治療対象分野

眼科疾患: 加齢黄斑変性など、目の疾患に対する治療

中枢神経系疾患: パーキンソン病や脊髄損傷など、神経系の病気が次に多い分野です。

がん: iPS細胞由来CAR-T細胞を用いたがん治療への応用



Kirkeby et al., *Cell Stem Cell*. 2025

難治性疾患に対する高い治療効果
現時点までに、安全性に関する一般的な懸念は確認されていない

本日の発表内容

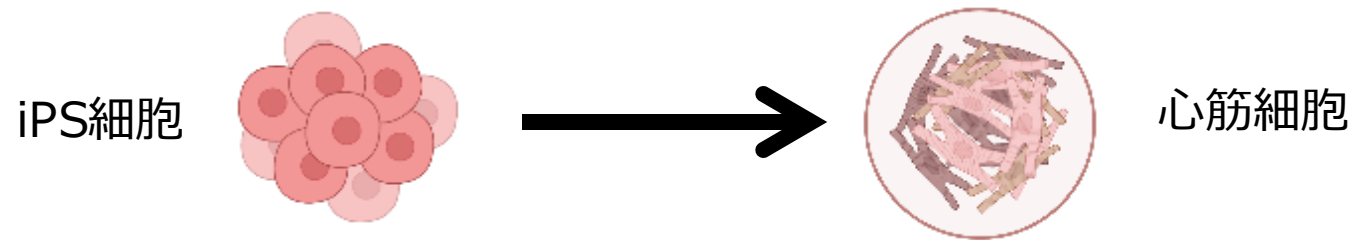


1.iPS細胞加工製品の開発状況

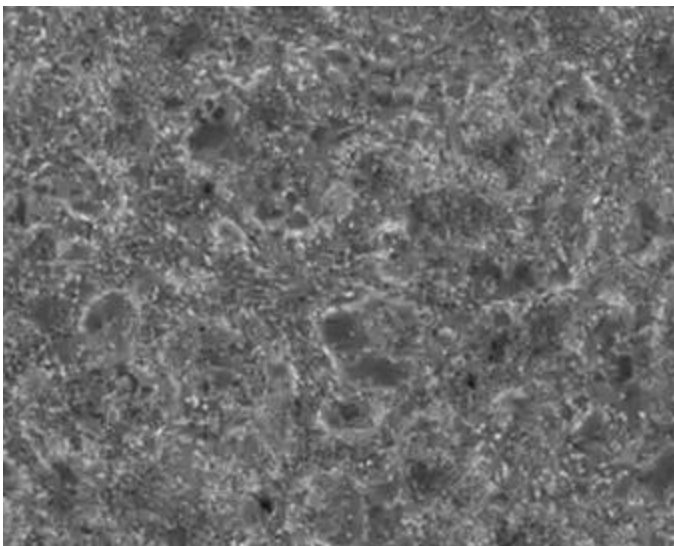
2.iPS細胞の分化指向性をはかる（予測する）

3.iPS細胞のゲノム変異の影響をはかる

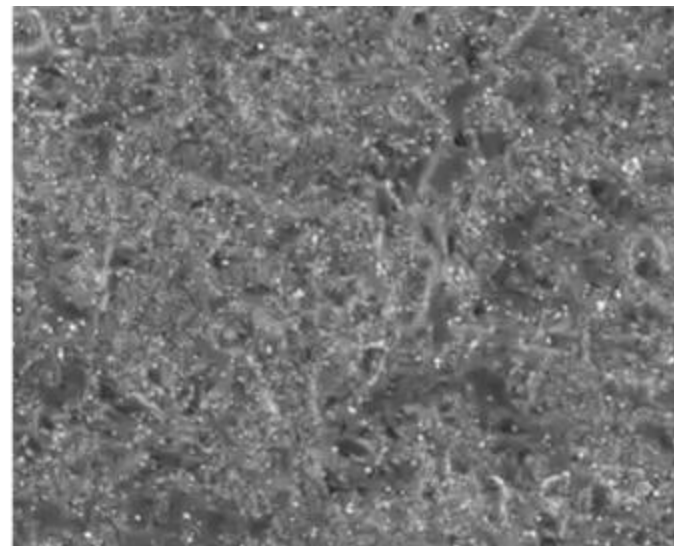
iPS細胞の分化指向性



1231A3株



1383D6株

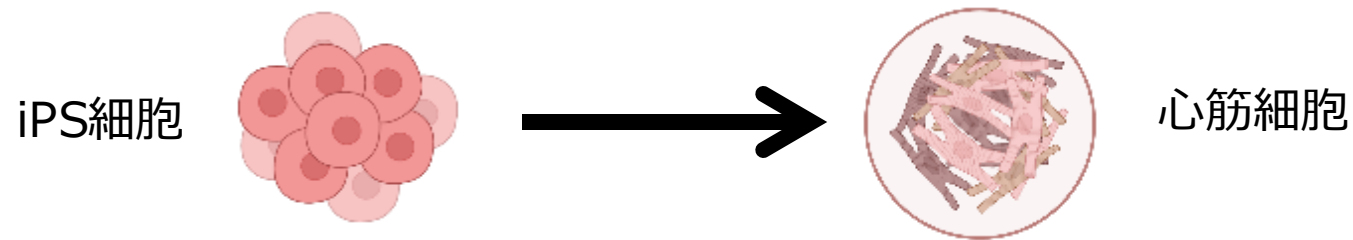


元細胞：末梢血
樹立方法：Episomal Vector

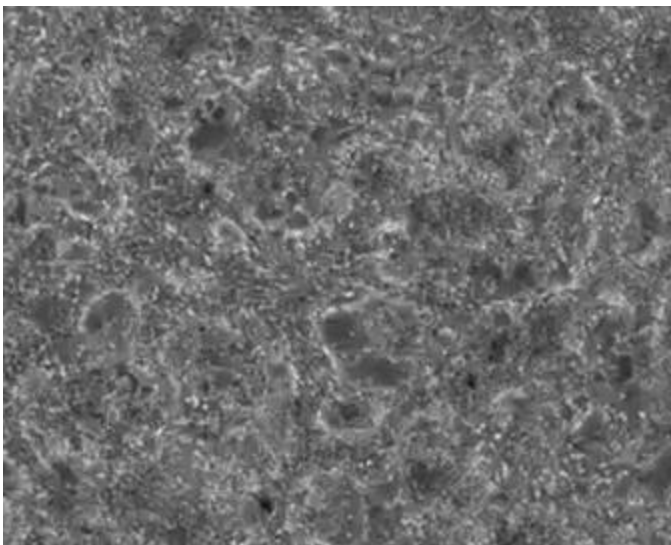
iPS細胞の細胞加工製品の原料としての問題点

iPS細胞は株間で分化のしやすさ（分化傾向）に
大きなバラツキがある

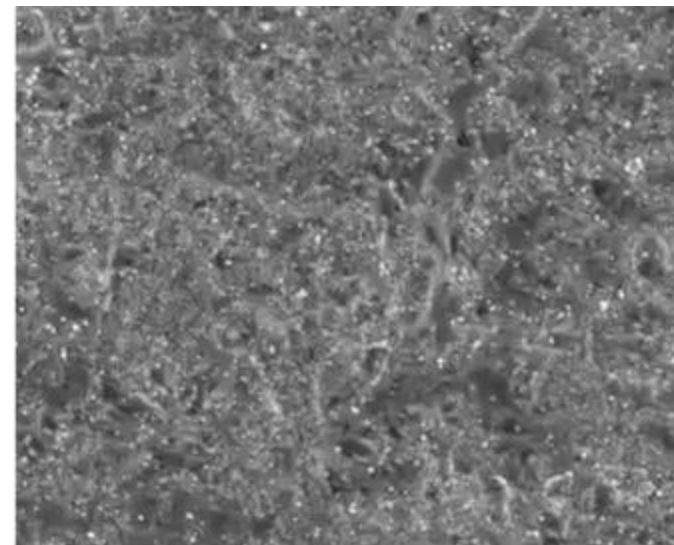
iPS細胞の分化指向性



1231A3株



1383D6株



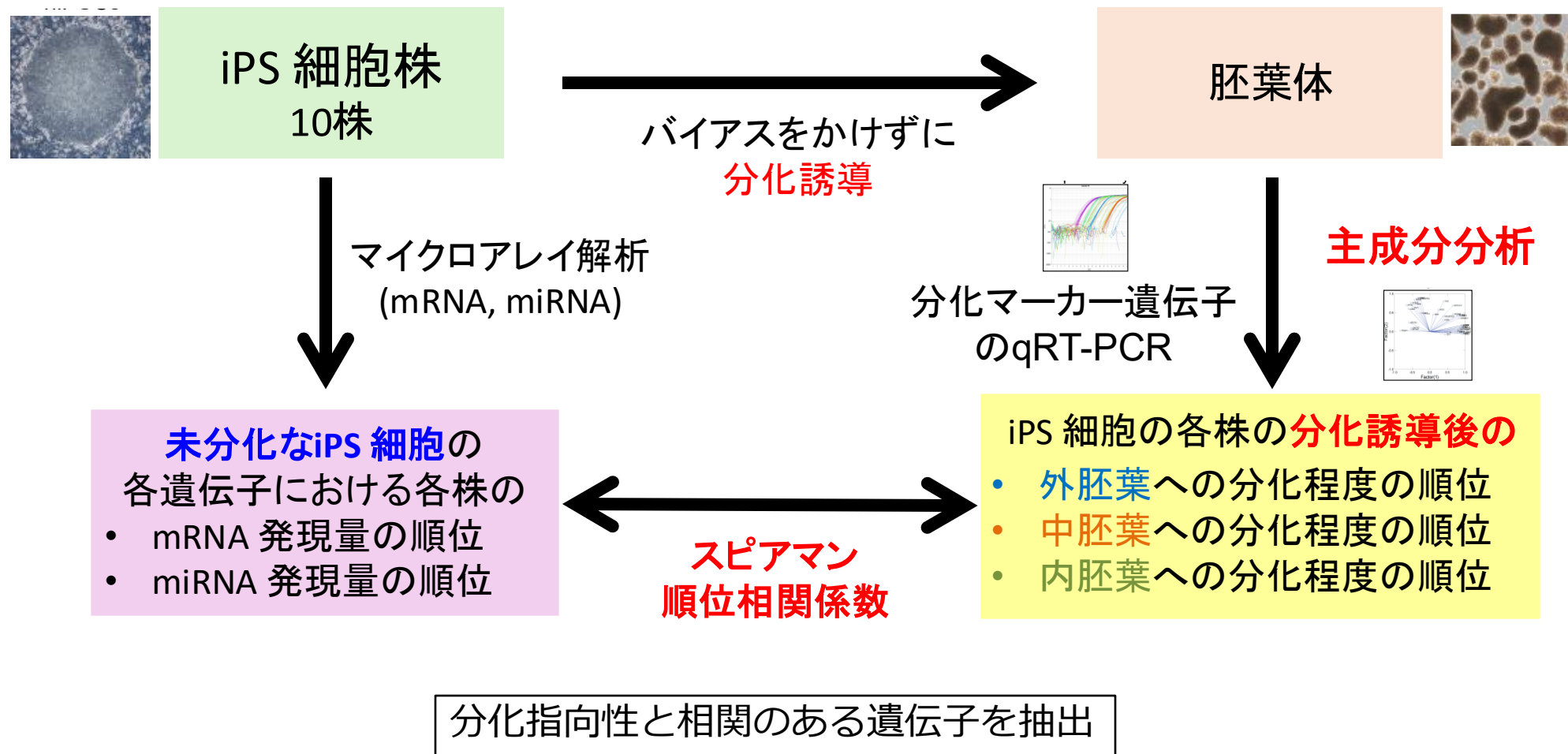
元細胞：末梢血
樹立方法：Episomal Vector

iPS細胞加工製品の品質に影響

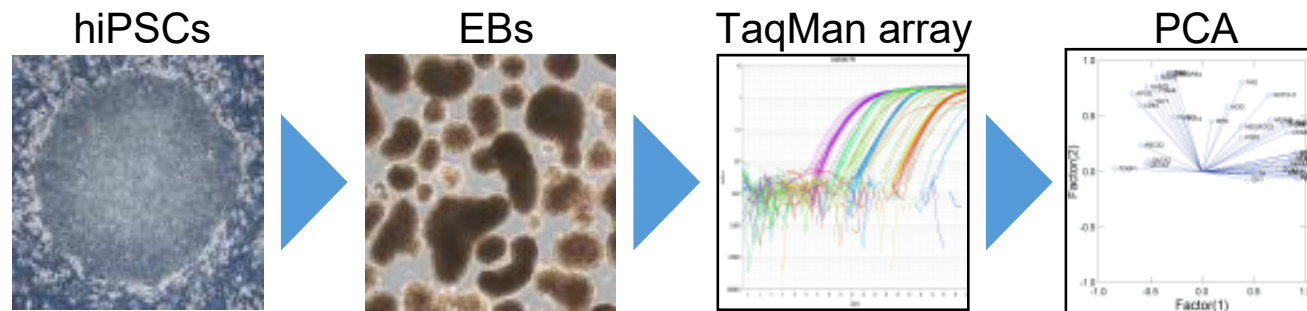
(収量の低下、未分化細胞、目的外細胞の残存など)

最終目的細胞に**再現性高く、高効率**に分化するヒトiPS細胞を選抜するための、
ヒトiPS細胞中の特性指標（バイオマーカー）の探索

iPS細胞の分化指向性



iPS細胞の分化指向性

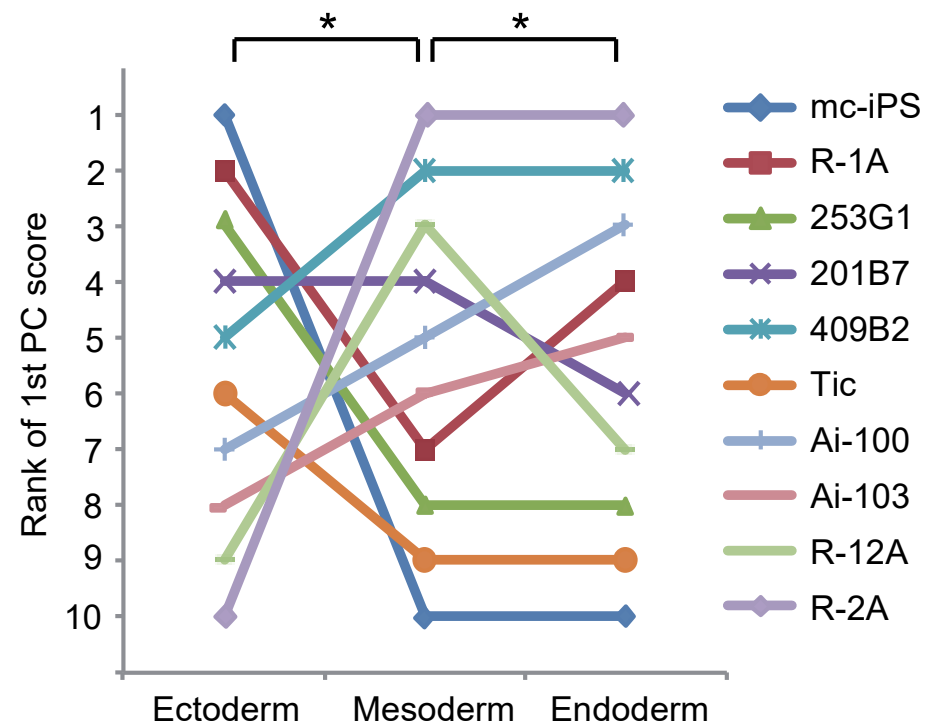


外胚葉マーカー:45遺伝子 中胚葉マーカー:56遺伝子 内胚葉マーカー:27遺伝子

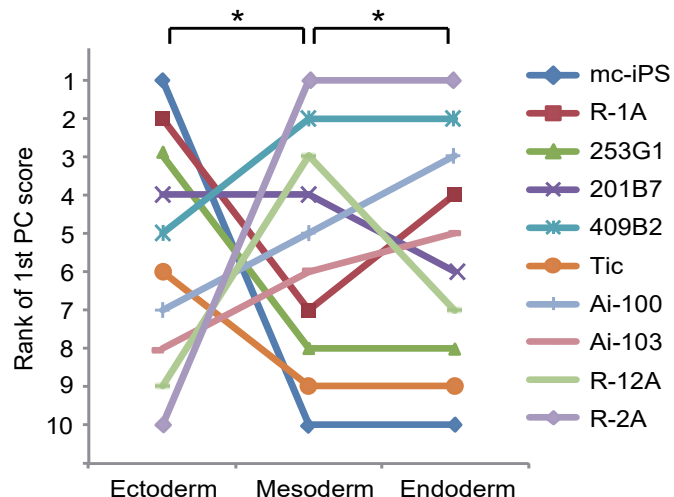
第一主成分得点

Cell line	Differentiation lineage		
	Ectoderm	Mesoderm	Endoderm
201B7	23.5	1.5	1.2
253G1	23.8	-12.6	-9.5
409B2	-11.8	18.5	9.3
Ai-100	-17.7	0.9	5.6
Ai-103	-18.0	0.2	3.0
mc-iPS	28.5	-32.2	-18.1
R-1A	25.4	-2.5	4.4
R-2A	-20.3	41.1	18.4
R-12A	-19.1	12.1	-0.4
Tic	-14.3	-27.0	-13.8

■ High □ Medium ■ Low



iPS細胞の分化傾向マーカー *SALL3*

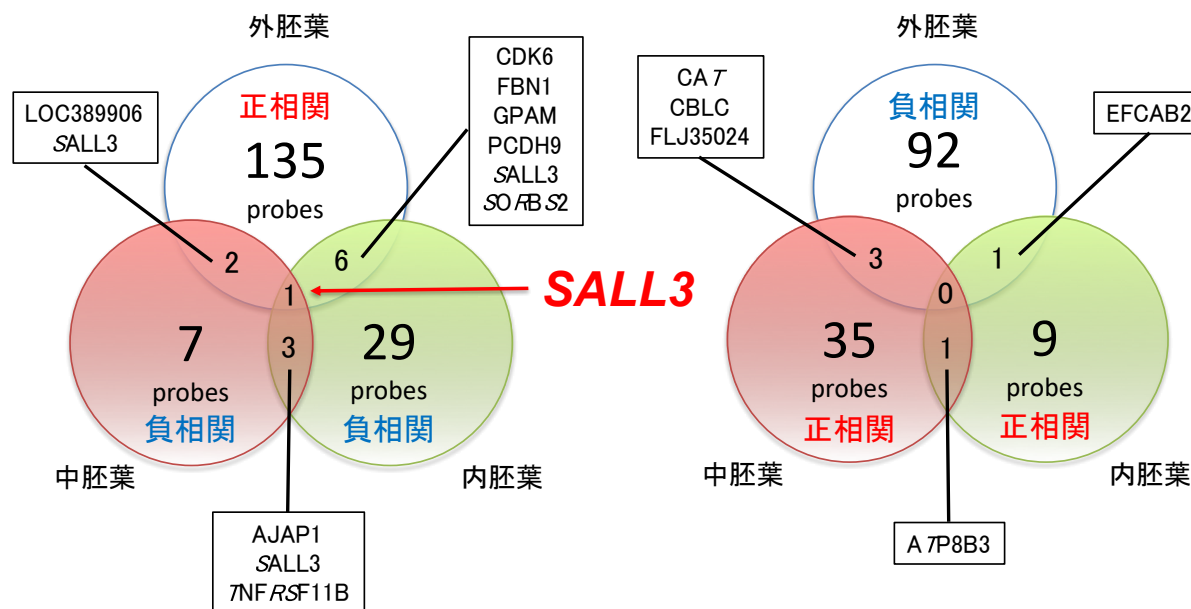


外胚葉になりやすい株は中・内胚葉になりにくい

中・内胚葉になりやすい株は外胚葉になりにくい

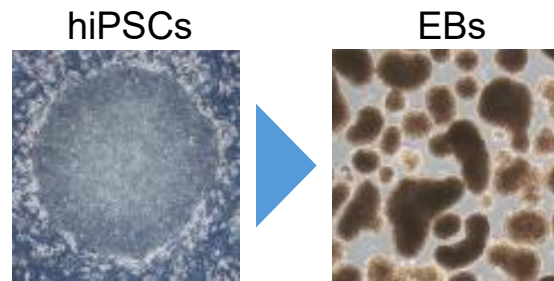
仮説

真のバイオマーカー = 外胚葉 ↔ 中・内胚葉で
逆相関を示す遺伝子



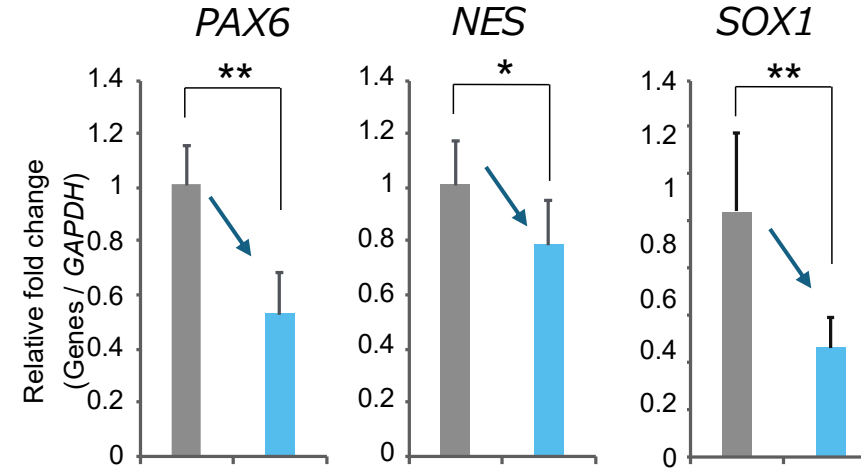
分化指向性（外胚葉vs中・内胚葉）バイオマーカー*SALL3*を同定

253G1 SALL3 KD株 EB分化

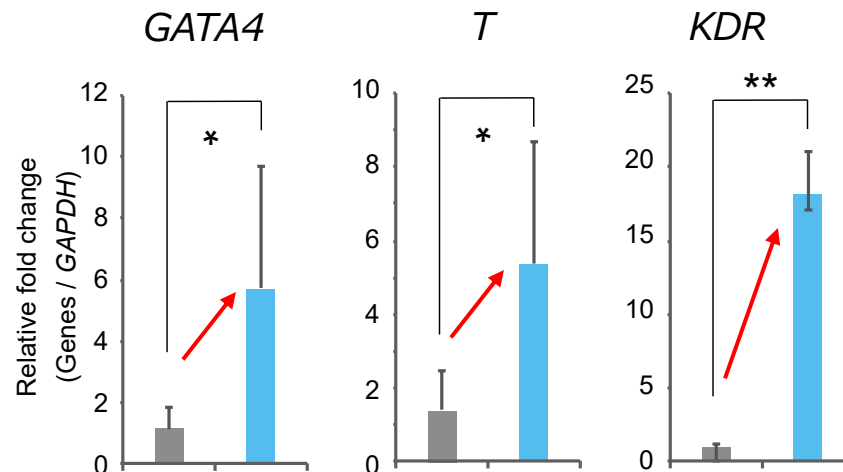


Control shRNA
SALL3 shRNA

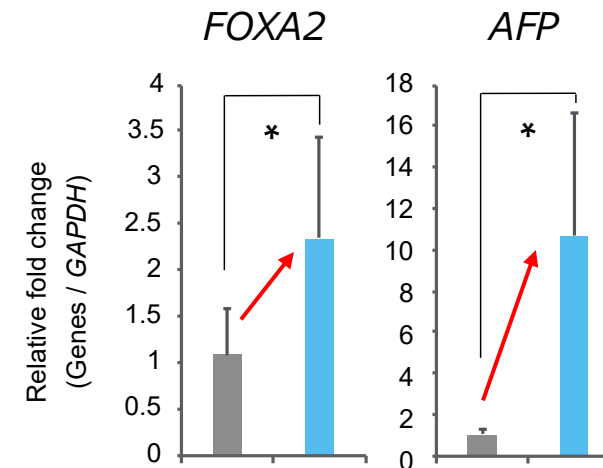
外胚葉マーカー



中胚葉マーカー

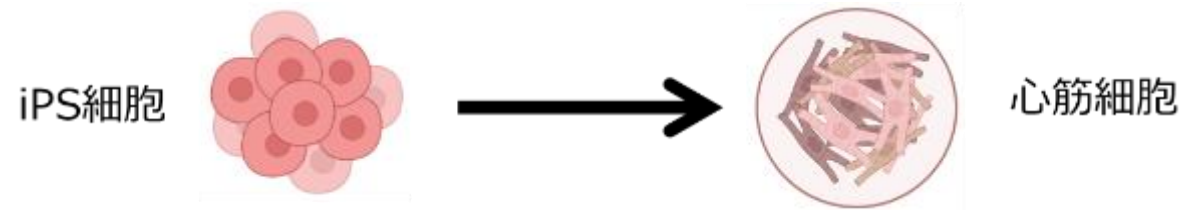


内胚葉マーカー

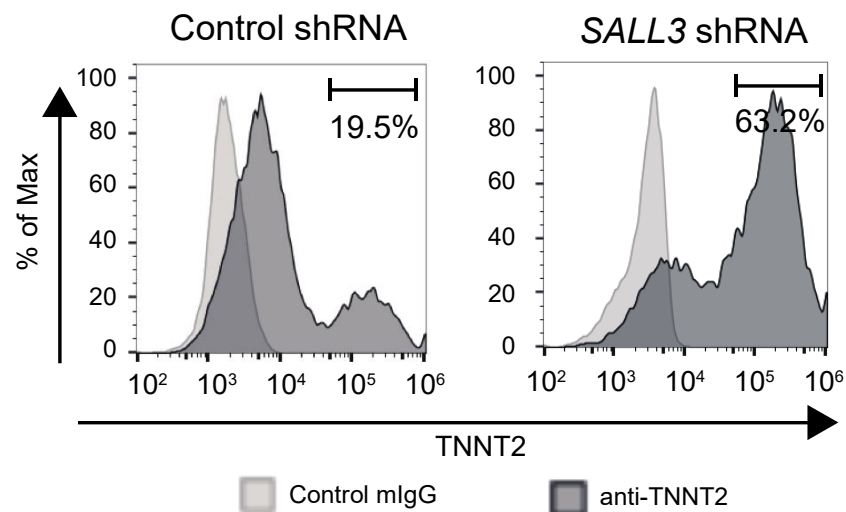


SALL3 KDにより、外胚葉分化は阻害され、中・内胚葉分化は促進される

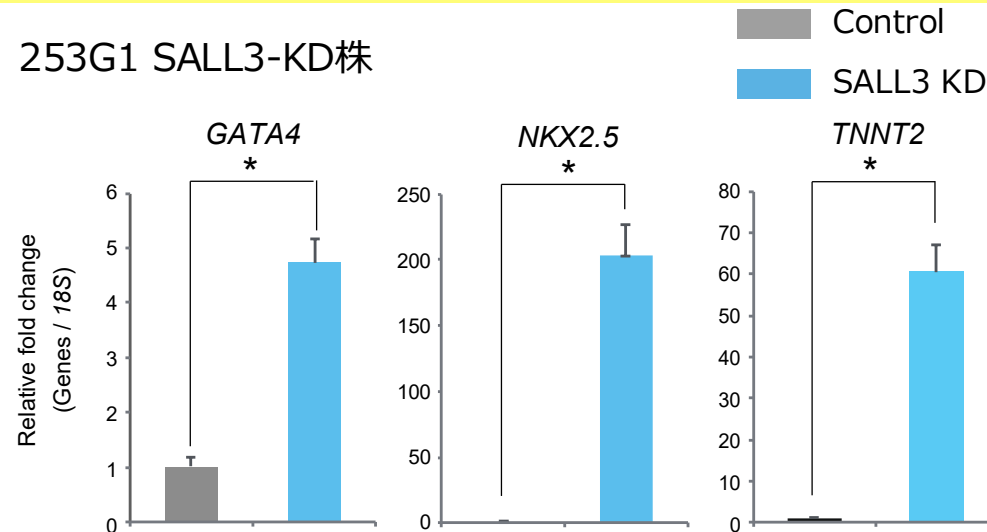
253G1 SALL3 KD/OE株 心筋分化誘導



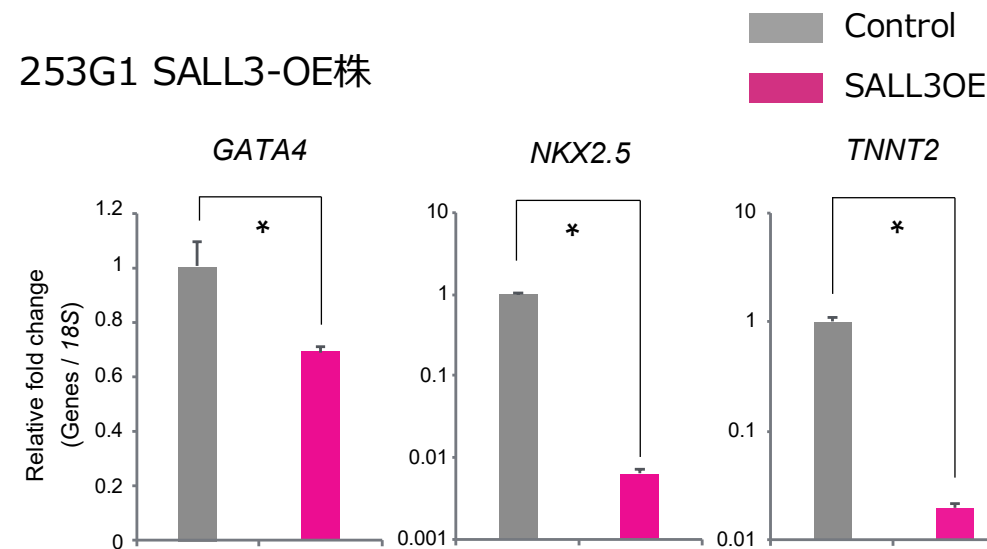
253G1_SALL3-KD株



253G1 SALL3-KD株



253G1 SALL3-OE株

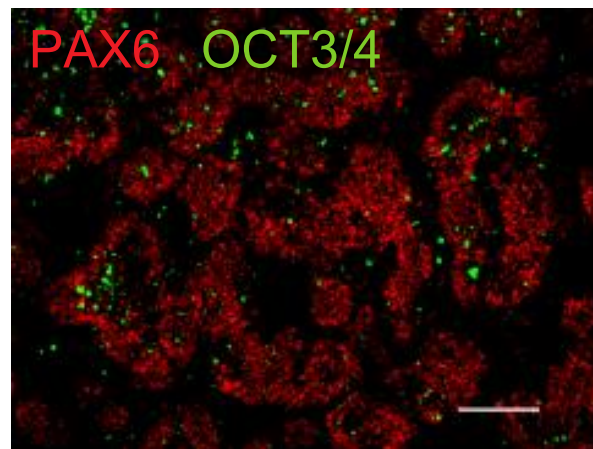
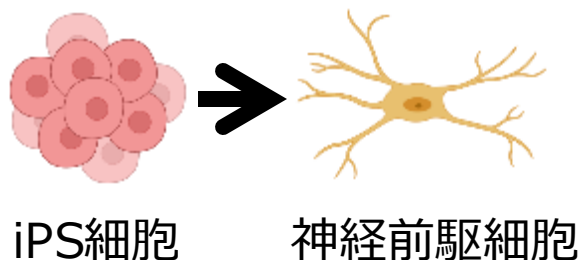


心筋分化誘導効率はSALL3 KDにより促進され、SALL3 OEにより阻害される

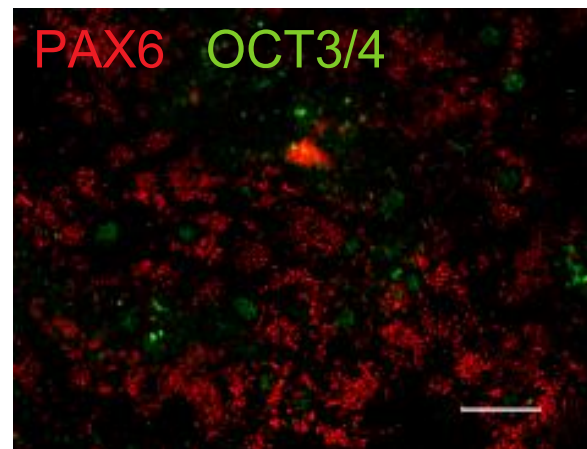
253G1 SALL3 KD/OE株 神経分化誘導

神経分化誘導 (Day10)

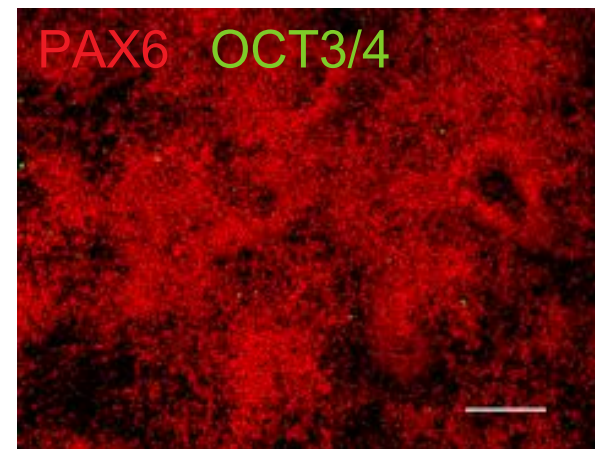
PAX6: 外胚葉マーカー



253G1

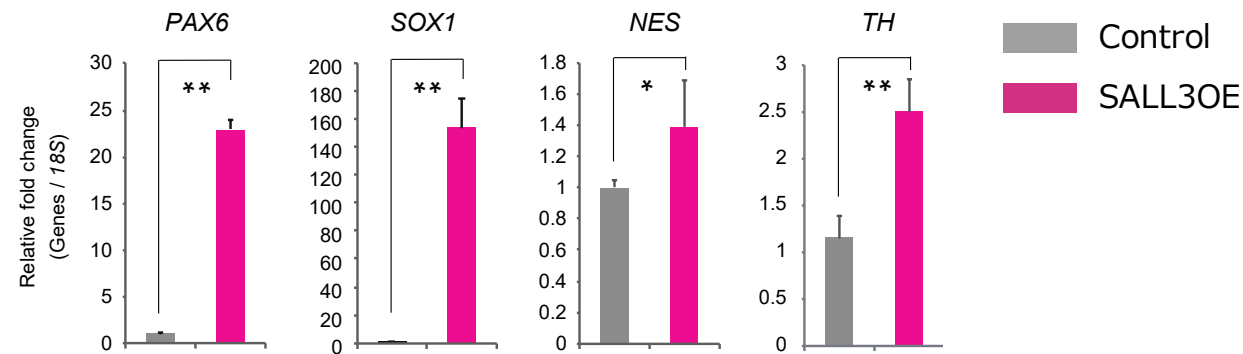
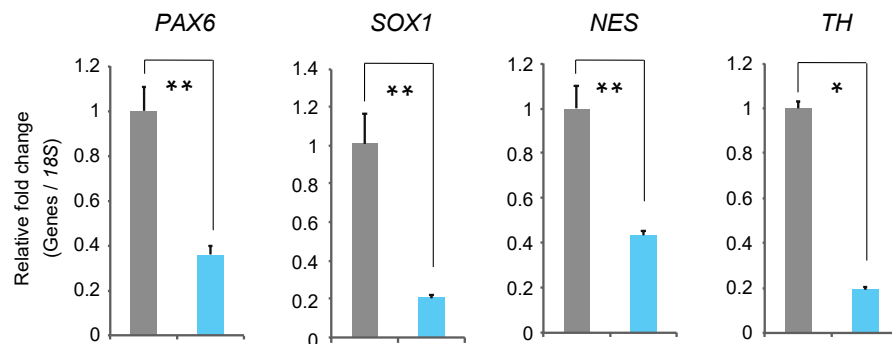


253G1_SALL3-KD



253G1_SALL3-OE

Control
SALL3 KD



神経分化誘導効率はSALL3 KDにより阻害され、SALL3 OEにより促進される

「目的細胞へのなりやすさ」を予測するためのiPS細胞バイオマーカー

3胚葉分化予測マーカー

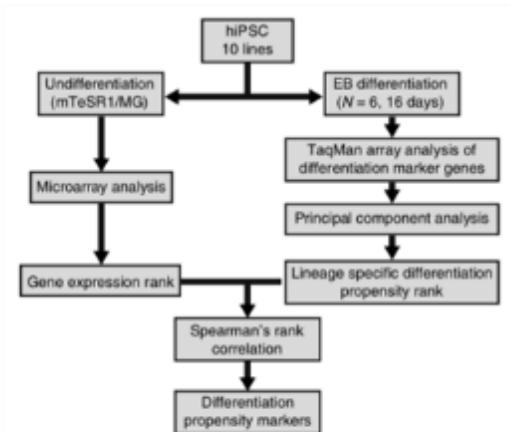


ARTICLE

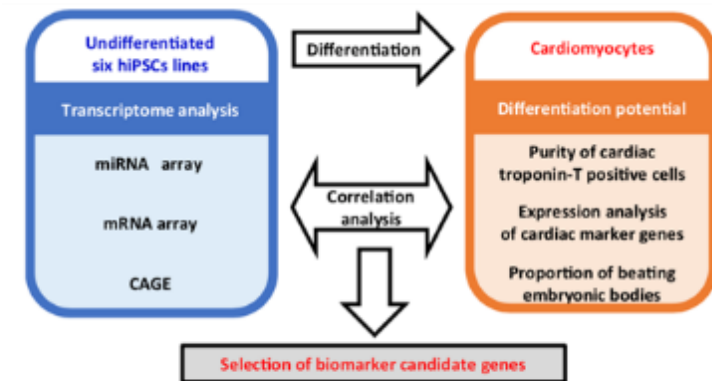
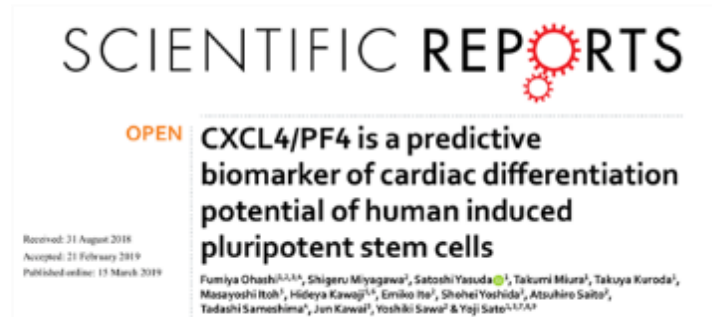
<https://doi.org/10.1038/ncomms10600> OPEN

SALL3 expression balance underlies lineage biases in human induced pluripotent stem cell differentiation

Takuya Kuroda¹, Satoshi Yasuda^{1,2}, Shiori Tachibana^{1,2}, Satoko Matsuyama^{1,3}, Shinji Kurokawa¹, Keiko Tano¹, Takumi Mura¹, Akifumi Matsuyama² & Yoji Sato^{1,2,4,5}

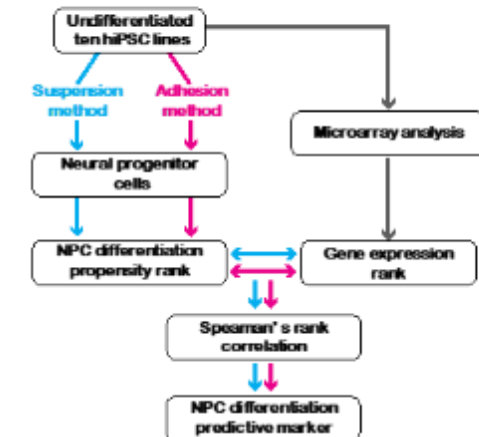


心筋分化予測マーカー



神経前駆細胞分化予測マーカー

ROR2 gene expression predicts human induced pluripotent stem cell differentiation into neural progenitor cells



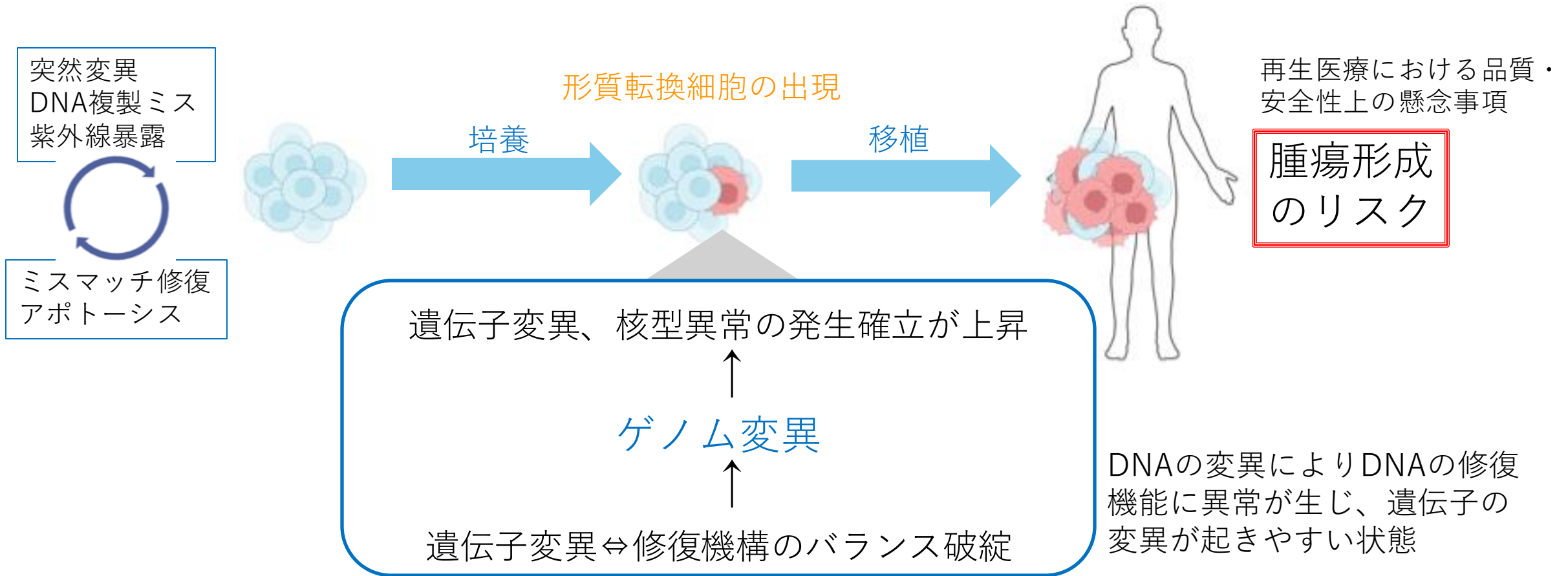
バイオマーカーの効率的な探索・検証手法の開発により
「目的細胞へのなりやすさ」を「はかる」

本日の発表内容



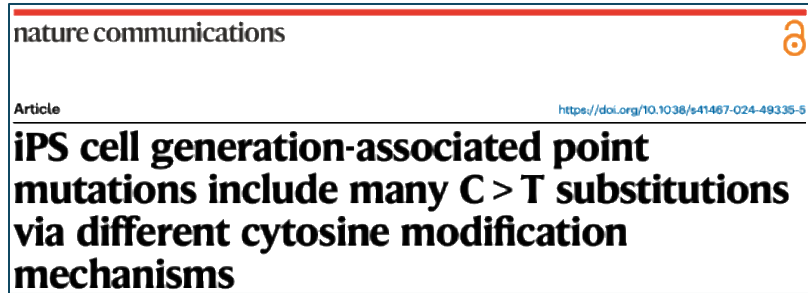
- 1.iPS細胞加工製品の開発状況
- 2.iPS細胞の分化指向性をはかる（予測する）
- 3.iPS細胞のゲノム変異の影響をはかる

iPS細胞加工製品のゲノム変異



研究背景

■ iPS細胞は初期化時に変異を生じる



(Araki et al., *Nature commun.*, 2024)

- iPS細胞に見られる点突然変異は、iPS細胞樹立に伴って生じる新規の変異である。(100個～1万個)

■ iPS細胞は培養中に変異を蓄積する



(Lezmi et al., *Nature biotech.*, 2023)

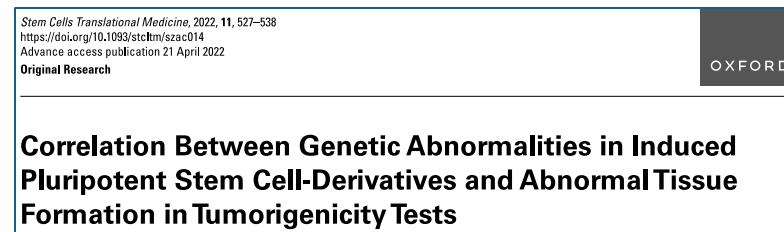
- 146種類のhiPS細胞株、2200超のシーケンス結果
22%の検体でガン関連遺伝子に変異
うち、65%はTP53に変異が見つかった

■ ゲノム不安定性の評価方法（臨床研究, 日本）

「特定認定再生医療等委員会におけるヒト多能性幹細胞を用いる再生医療等提供計画の造腫瘍性評価の審査のポイント」(令和3年3月9日医政研発0309第1号別添)

原材料となる多能性幹細胞および多能性幹細胞由来特定細胞加工物において、腫瘍関連遺伝子（COSMIC Cancer Gene Census Tier1 + Shibata list）における変異を確認することが推奨されている。

■ 腫瘍関連遺伝子変異と腫瘍化の関係



(Yamamoto et al., *Stem Cells Transl Med.*, 2022)

- 腫瘍関連遺伝子に変異を認めるiPS細胞およびiP細胞由来分化細胞を免疫不全マウスに移植しても、必ずしも腫瘍化しない

腫瘍関連遺伝子の変異が、実際に腫瘍・異常組織形成を引き起こすのか不明である

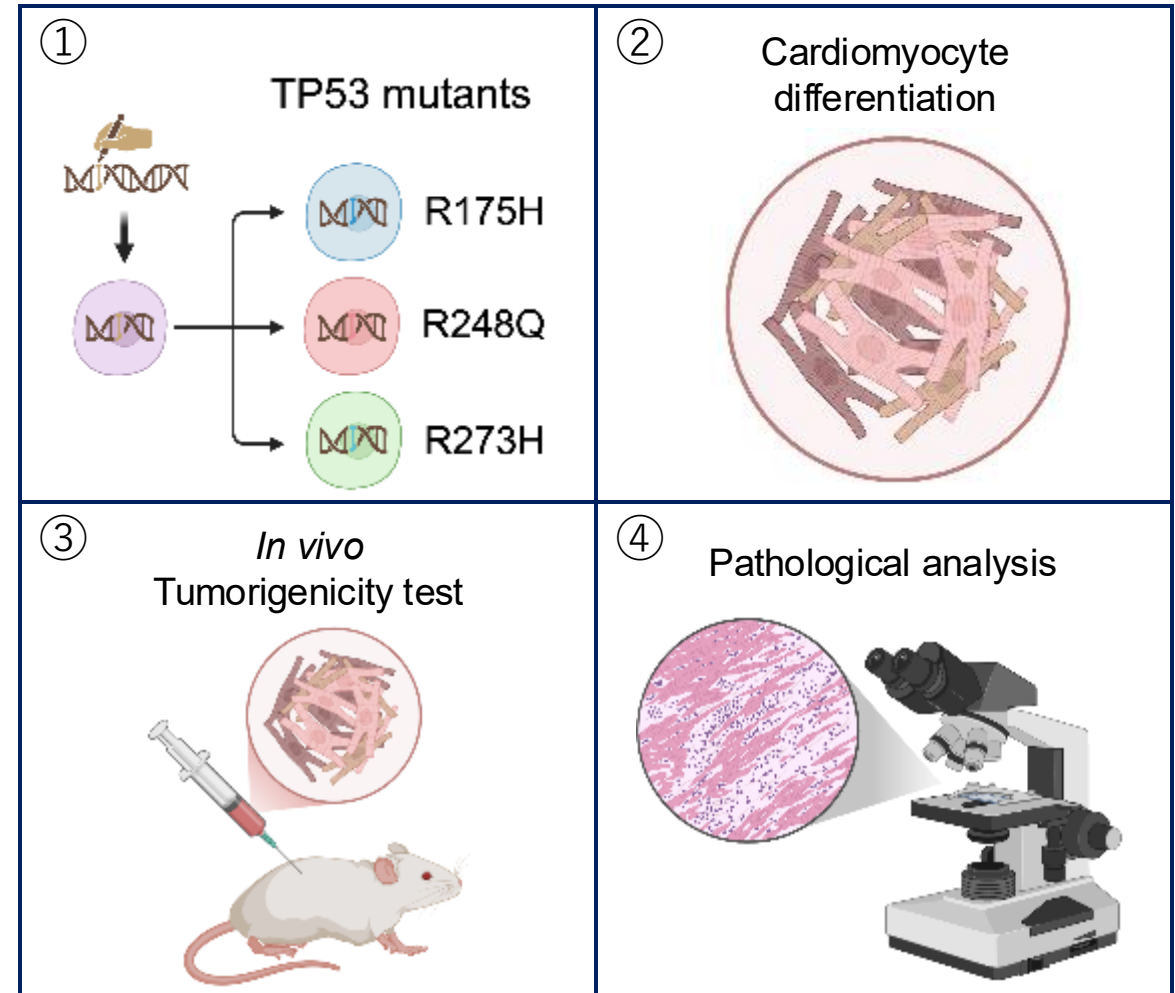
本研究の目的・方法

● 本研究の目的

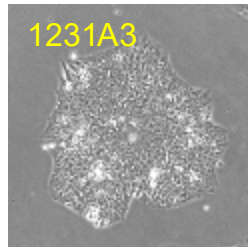
腫瘍関連遺伝子の変異が **iPS** 細胞由来移植細胞において腫瘍や異常組織形成を引き起こすのかを検討する

● 本研究の方法

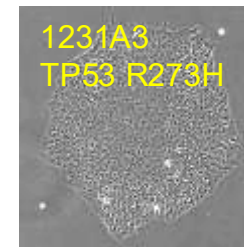
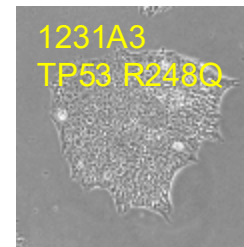
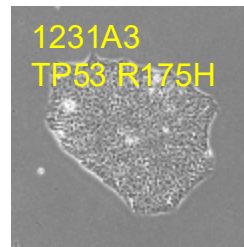
ヒトのがんにおいて最も高頻度に見られる遺伝子異常である **TP53がん抑制遺伝子** に変異を持つhiPS細胞をゲノム編集により作製し、心筋細胞に分化後、in vivo造腫瘍性試験を行い、異常組織形成との相関を調べる。



TP53変異株の作製



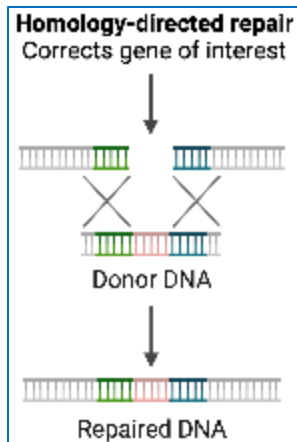
ゲノム編集



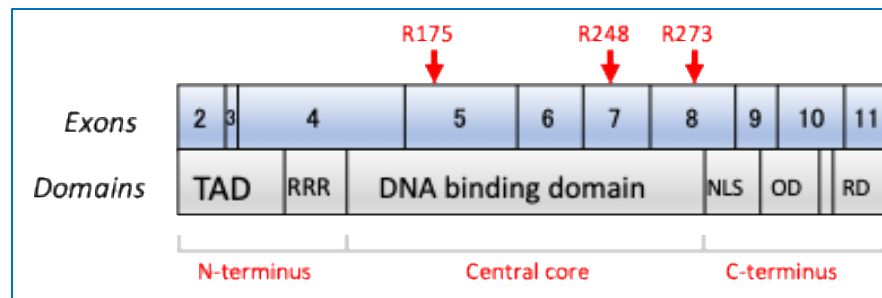
変異アレル頻度Top3
R175H, R248Q, R273H
の各変異株

親株

- 1231A3
- RIKEN BRCで入手可能な研究用細胞株
- ヒト末梢血単核細胞から**エピソーマルベクター** (pCE-hOCT3/4, pCE-hSK, pCE-hUL, pCE-mp53DD, pCXB-EBNA1)を用いてCiRAで樹立
→ 臨床株と同様な作製法



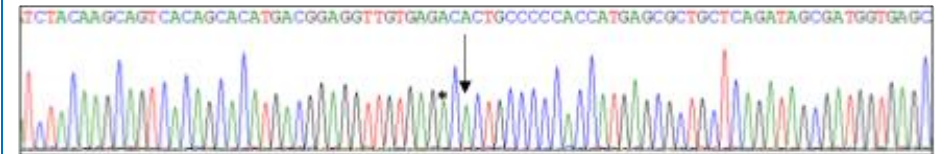
ゲノム編集



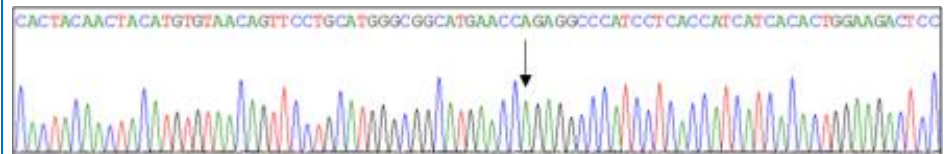
変異アレル頻度Top3 R175H, R248Q, R273H

1231A3株

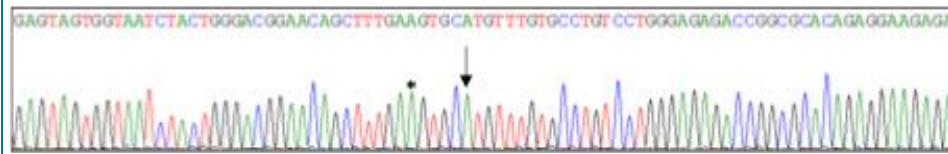
(1) R175H (CGC→CAC), *サイレント変異 R174 (AGG→AGA)



(2) R248Q (CGG→CAG)



(3) R273H (CGT→CAT), *サイレント変異 E271 (GAG→GAA)



TP53変異(ホモ接合体)

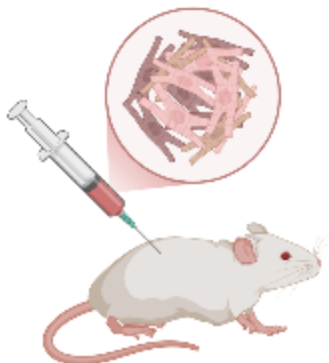
TP53変異iPS細胞の心筋分化誘導



分化誘導条件：STEMdiff Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Kit
 Day14-16 乳酸培地（未分化細胞除去）

移植群

In vivo
Tumorigenicity test



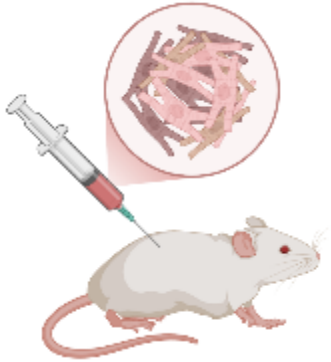
群	群略号	移植細胞
1	undiff.もしくは未分化	1231A3
2	Parentもしくは親株	1231A3_CM
3	175H_c1	1231A3_TP53-R175H_c1_CM
4	175H_c2	1231A3_TP53-R175H_c2_CM
5	248Q_c1	1231A3_TP53-R248Q_c1_CM
6	248Q_c2	1231A3_TP53-R248Q_c2_CM
7	273H_c1	1231A3_TP53-R273H_c1_CM
8	273H_c2	1231A3_TP53-R273H_c2_CM

心筋分化誘導

c1, c2: 変異株樹立時のclone

TP53変異iPS株由来心筋細胞の造腫瘍性試験

In vivo
Tumorigenicity test



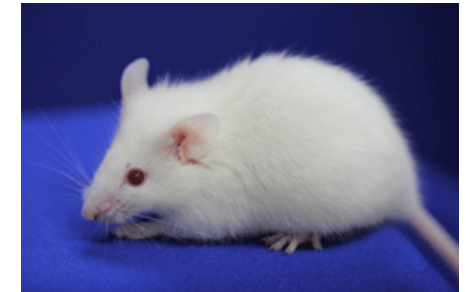
- 移植群

群	群略号	移植細胞
1	undiff.もしくは未分化	1231A3
2	Parentもしくは親株	1231A3_CM
3	175H_c1	1231A3_TP53-R175H_c1_CM
4	175H_c2	1231A3_TP53-R175H_c2_CM
5	248Q_c1	1231A3_TP53-R248Q_c1_CM
6	248Q_c2	1231A3_TP53-R248Q_c2_CM
7	273H_c1	1231A3_TP53-R273H_c1_CM
8	273H_c2	1231A3_TP53-R273H_c2_CM

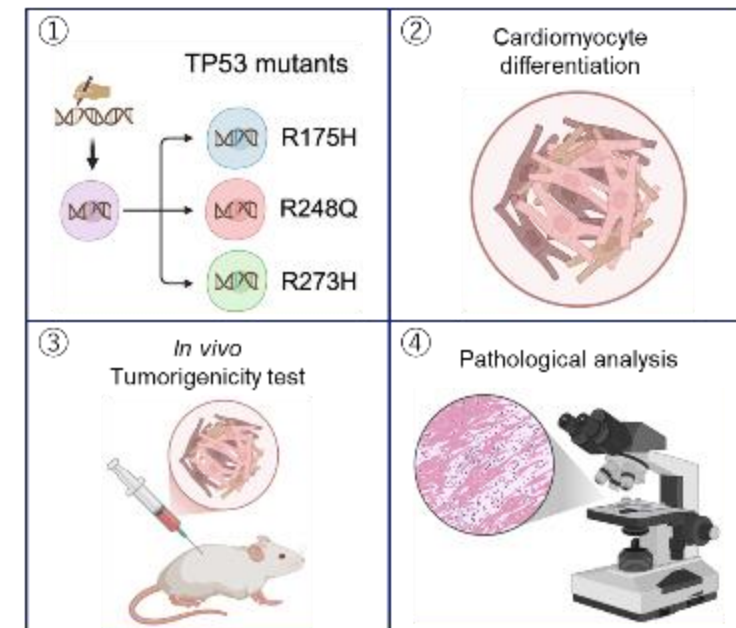
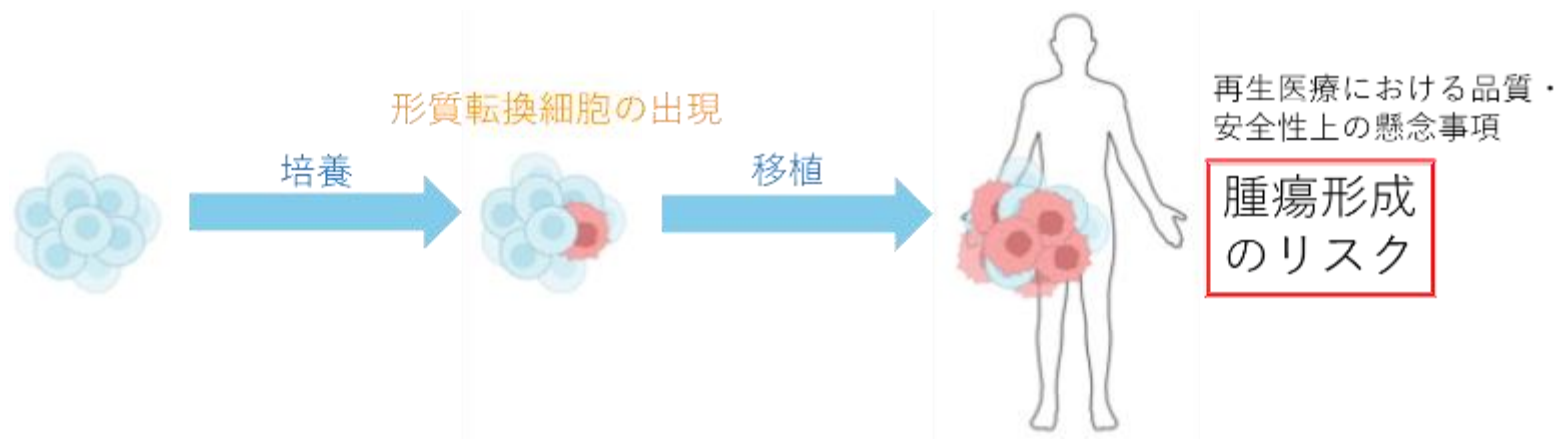
c1, c2: 変異株樹立時のclone

- 匹数：6匹／群（NOGマウス）
- 移植部位：マウス右側腹部
- 移植細胞数： 1×10^6 cells
- 移植条件：Y27632添加, Matrigel
- 観察期間：20週間

CIEA
Central Institute for Experimental
Medicine and Life Science



iPS細胞のゲノム変異の影響をはかる



原料となるiPS細胞にTP53変異（R175H, R243Q, R273H）が存在するとimmature teraromaが形成されることが示唆された。

➡ 今後、他の腫瘍関連遺伝子についてもデータを蓄積することにより、科学的エビデンスに基づいたゲノム変異の評価基準を確立することを目指す。

謝辞

国立医薬品食品衛生研究所

再生・細胞医療製品部の皆様

(公財) 実中研

浦野浩司先生

札幌総合病理研究所

澤田 典均先生

神戸大学

川真田伸先生

ご清聴ありがとうございました