

再生医療の産業化に向けた
細胞製造・加工システムの開発
ヒト多能性幹細胞由来の
再生医療製品製造システムの開発
(心筋・神経)

京都大学(再委託先:慶應義塾・信州大学・大阪大学)
日産化学工業(株)、(株)リプロセル、ニプロ(株)、富士フイルム(株)
(株)オンチップ・バイオテクノロジーズ、(株)サイフューズ、
玉井化成(株)、(株)ジェイ・エム・エス、タカラバイオ(株)、
パナソニックプロダクションエンジニアリング(株)

総括成果報告

サブプロジェクトリーダー
中辻 憲夫
(京都大学ウイルス・再生医科学研究所)

①京大(中辻)AMEDサブプロジェクトの基本構想: 産業化と経済戦略への貢献

世界市場とニーズに適合した、
国際競争力(品質、コスト、信頼性)を有する、「世界で売れる」
再生医療分野での装置、製造システムの開発と国内外での販売

- 前臨床研究 > 臨床応用の成功 > 医療として実用化 > 産業展開
- 安全性と有効性の確認
- 多能性幹細胞株の品質信頼性・安定性とリスク管理
- 分化後の移植用細胞ロットの品質信頼性・安定性とリスク管理
- 移植用細胞生産コストなど細胞治療コストの抑制
- 品質信頼性と安定性
- 安全性のリスク管理
- 細胞生産などコストの抑制
- グローバルスタンダードと合致

AMEDの設定目標: 百億個／ロットの大スケール細胞生産可能、
生産コストを10分の一に削減

Figure 5. Geographic location of 4749 stem cell clinical trials globally. Illustrates those (A) globally, and in (B) the USA by state, and (C) Europe and the Middle East by country. The total number of trials is indicated in each blue pie chart, with the proportion of novel trials, representative of the future of regenerative medicine, indicated in red. (A) Pie charts without numbers denote regions/countries with fewer than ten clinical trials.

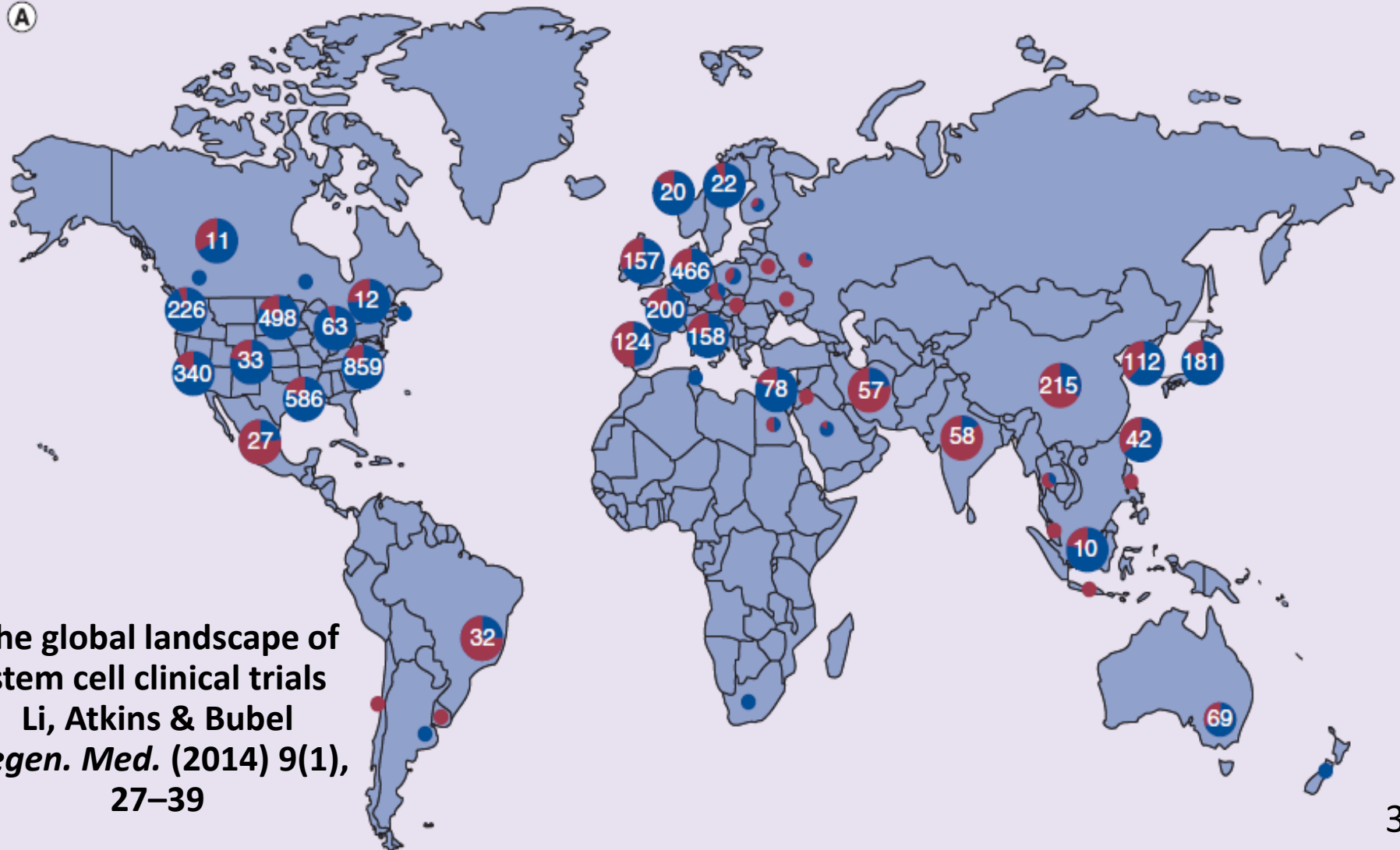


Table 4. Clinical Trials Based on Human Pluripotent Stem Cells

Sponsor	Disease(s) (as Indicated)	Study ID	Country
Clinical Trials Based on hESCs			
Assistance Publique – Hôpitaux de Paris	ischemic heart disease	NCT02057900	France
Astellas Pharma	Stargardt macular dystrophy	NCT01345006	United States
Astellas Pharma	advanced dry AMD	NCT02463344	United States
Astellas Pharma	AMD	NCT03178149	not specified
Astellas Pharma	AMD	NCT01344993	United States
Astellas Pharma	Stargardt macular dystrophy	NCT02941991	UK
Astellas Pharma	Stargardt macular dystrophy	NCT01469832	UK
Astellas Pharma	Stargardt macular dystrophy	NCT02445612	United States
Astellas Pharma	macular degenerative disease	NCT03167203	not specified
Asterias Biotherapeutics	spinal cord injury	NCT02302157	United States
Asterias Biotherapeutics	spinal cord injury	NCT01217008	United States
Cell Cure Neurosciences	AMD	NCT02286089	Israel, United States
CHA Biotech	dry AMD	NCT01674829	Korea
CHA Biotech	Stargardt macular dystrophy	NCT01625559	Korea
Chinese Academy of Sciences	dry AMD	NCT03046407	China
Chinese Academy of Sciences	nonexudative AMD	NCT02755428	China
Chinese Academy of Sciences	Parkinson's disease	NCT03119636	China
Chinese Academy of Sciences, Institute of Zoology	dry AMD	ChiCTR-OCB-15007054	China
Chinese Academy of Sciences, Institute of Zoology	retinitis pigmentosa	ChiCTR-OCB-15007055	China
Eye Institute of Xiamen University	severe ocular surface diseases	ChiCTR-OCB-15005968	China
Federal University of São Paulo	AMD, Stargardt disease, exudative AMD	NCT02903576	Brazil
Pfizer	AMD	NCT03102138	UK
Pfizer	AMD	NCT01691261	UK
Regenerative Patch Technologies	dry AMD	NCT02590692	United States
Southwest Hospital, China	macular degeneration diseases, not specified	NCT02749734	China
Viacyte	diabetes mellitus type 1	NCT03162926	Canada
Viacyte	diabetes mellitus type 1	NCT02239354	United States, Canada
Viacyte	diabetes mellitus type 1	NCT02939118	United States, Canada
Viacyte	diabetes mellitus type 1 with hypoglycemia	NCT03163511	United States

(Continued on next page)

Recent Trends in Research with Human Pluripotent Stem Cells: Impact of Research and Use of Cell Lines in Experimental Research and Clinical Trials

Guhr et al. Stem Cell Reports 11, 485-496 (August 2018)

**Clinical trials/studies using hES cells: 29
hiPS cells: 3**

Table 4. Continued

Sponsor	Disease(s) (as Indicated)	Study ID	Country
Clinical Trials Based on hiPSCs			
RIKEN	exudative AMD	UMIN000011929 (based on autologous iPSCs)	Japan
Cynata Therapeutics	graft-versus-host disease	NCT02923375 (based on allogenic iPSCs)	Australia, UK
Kobe City Medical Center General Hospital	neovascular AMD	UMIN000026003 (based on allogenic iPSCs)	Japan

Follow-up studies among hPSC-based trials are highlighted with a blue background. Withdrawn studies were not included. Studies that only aim at the derivation of patient-specific hiPSC lines and therapeutic cells thereof (but not at the treatment of patients with these hiPSC-derived therapeutic cells) were not included either. iPSCs, induced pluripotent stem cells.

The Key to Success

- **Multi-Disciplinary Collaboration/Technology R&D**

Genome Editing, Biomaterials, Micro-engineering, etc.

Gene Therapy, Immuno-therapy, etc.

- **Multi-Sector Collaboration**

Academia, Industry, Investor, Patients, etc.

Regulation, Government, etc.

How to deliver reliable and practical applications of human stem cells in cell therapy for many patients at affordable cost

- **Importance of Academia-Industry & Global Collaboration**
- **Key Targets for practical application, but
Under-emphasized in Academic Research**
- **Reliable QC and stability of cell production**
- **Scale-up of cell production**
- **Cost reduction in cell production**

①京大(中辻)AMEDサブプロジェクトの基本構想(詳細)

1. 研究の背景及び目的

- ・旧NEDOプロジェクトでは、多能性幹細胞(ES/iPS細胞)の培養バッグを使用する自動培養装置の開発(京大とニプロ株の共同開発成果)及び大規模生産を可能にする目的で**新規三次元浮遊培養技術開発**に成功
- ・本プロジェクトでは国際的優位性を持つ上記の画期的な技術開発成果を活用し、**大量生産用の新規三次元浮遊培養技術を用いた大型バイオリアクターの開発**さらに多能性幹細胞から臨床応用に使用する有用分化細胞への分化誘導による**治療用細胞製品の生産システムの構築**を行う
- ・本研究開発プロジェクトは国際的な優位性の観点を重視し、世界トップの性能と信頼性およびコスト競争力を備えた細胞製造システム構築を目的とする。

2. 研究計画及び方法

<研究計画>

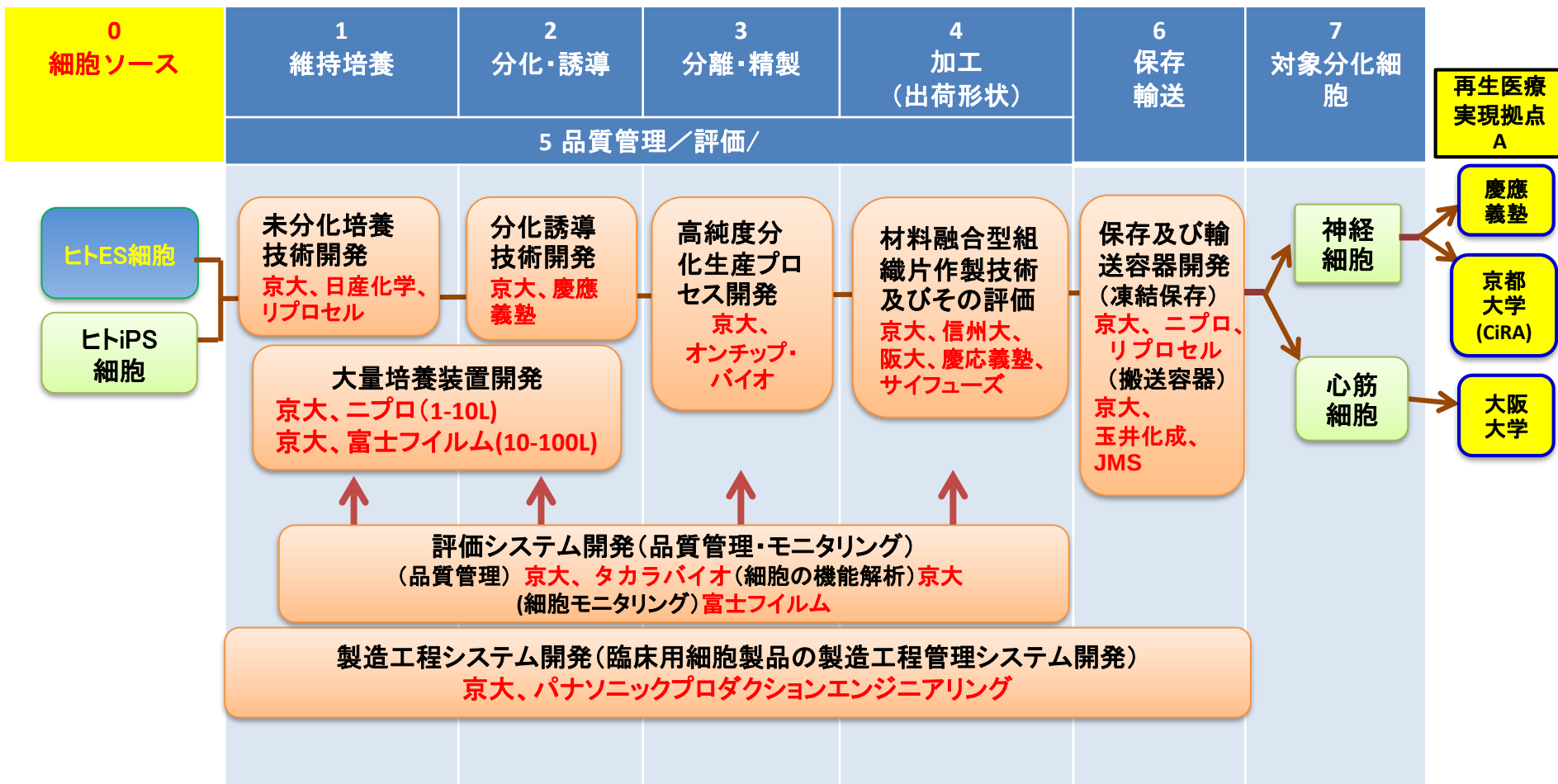
- ・大量培養した多能性幹細胞から再生医療に利用可能な細胞製品を生産するための一貫した細胞製造システム構築を行う(**大スケール無攪拌浮遊自動培養装置**を開発)。
- ・分化細胞生産の対象としては**心筋細胞**および**神経細胞**を選定した(再生医療実現化プロジェクト(拠点A)での再生医療実施を目指す分化細胞種)
- ・分化誘導方法としては、京都大学で開発された低分子化合物を使った世界的競争力のある心筋細胞分化誘導方法及び慶應義塾大学と京都大学で開発された優れた**神経細胞分化誘導方法**を活用

<方法>

- ・多能性幹細胞等の中大型(1-10L)培養法としてはニプロ株と京大が旧NEDOプロジェクトで開発に成功した接着培養用のバック型自動培養装置を用いて、パーキンソン病治療を目的としたドーパミン神経への分化誘導までを自動で行う装置を開発する。
- ・大型培養装置(10L-100L)としては、富士フイルム(株)により蓄積されてきた、医療用抗体生産等を目的とする哺乳類細胞の大量培養バイオリアクター技術を活用して、我々が開発してきた多能性幹細胞の新規無攪拌浮遊培養用のバイオリアクターの開発を行い、**心筋及び神経細胞の大規模な細胞製造システム**を構築する。
- ・これら国際優位性を持つ個別技術と機器を組み合わせ、全体を統合した細胞製品製造工程システムを構築するために集中研究所(以下集中研と略)を設置し、その**製造工程管理システム**に関しては世界的にもトップクラスの技術蓄積を誇るパナソニック・プロダクションエンジニアリング(株)が担当する。

以上の本プロジェクトにおける研究開発プロジェクトと開発要素及び関係研究機関について次頁に示した。

本プロジェクトにおける研究開発プロセスと開発要素及び関係研究機関



京大中辻SPLグループの研究開発内容について＜全体概要＞

1. 拡大培養関係

1-1. 培地と培養法の開発

複数化合物を用いた安定品質低コスト培地開発(京大)、bFGFの代替化合物の開発(京大・日産化学)及び新製品の培地開発(リプロセル) 心筋及び神経細胞の分化についても大量自動培養分化法の開発(阪大、慶應)。

1-2. 大量自動培養装置の開発

多能性幹細胞の中大スケール培養については、自動培養装置を用いた拡大培養及びパーキンソン病治療に用いられるドーパミン神経細胞の作製(京大、ニプロ)。また無攪拌浮遊培養を用いた大量自動培養装置開発(富士フィルム)。

1-3. 分離・精製

ヒト多能性幹細胞を選択的に死滅させる化合物を開発(京大)。また滅菌閉鎖系での使い捨てマイクロ流路チップ内において分化細胞を高純度で分取する技術開発(オンチップバイオテクノロジー)。

1-4. 加工及び評価

心筋については配向性ナノファイバーと組み合わせた心筋-材料融合型組織片を作製し、ラット心筋梗塞モデル動物での心機能の改善検討(阪大)。心筋細胞の心筋への注入による心筋梗塞モデルサルでの検討及び投与カクテルの改良(信州大)。細胞積層技術による脊髄領域特異的な神経三次元組織の構築及び脊髄損傷モデルラットへの移植(サイフューズ・慶應)。

1-5. 品質管理/評価

ヒト多能性幹細胞および分化細胞の各種品質管理に関わる検査項目の設定・無攪拌浮遊培養および自動培養装置により得られた細胞サンプルのデータ取得(機能評価、安全性リスク評価)と解析および装置開発へのフィードバック。また核型、ゲノム、エピゲノム解析等のための新規解析技術の開発、細胞製造システムにおける品質管理工程の文書体系およびその運用方法の設計と構築(京大、タカラバイオ、パナソニックプロダクションエンジニアリング)。

1-6. 保存及び輸送

ヒト多能性幹細胞の凍結保存液の製品化(リプロセル・京大)。また、液体窒素の混入を防ぐ細胞凍結容器の製品化(ニプロ・京大)。細胞製品の搬送システム開発では、長期搬送可能な搬送用細胞容器開発、市販化(玉井化成、JMS・京大)。

1-7. 市場・競合の評価・予測

本プロジェクトが対象とする疾患(心筋梗塞、神経疾患)について、事業計画立案に関する市場・競合情報の調査と評価。製造コストについての試算及び再生医療用細胞製品の事業化検討(京大)。

2. システム構築関係

2-1. 細胞製品製造システムの構築

集中研に設置される各種製造装置と製造工程管理システムのインターフェースの設計、製造工程管理システムの保守運用面のコストとセキュリティを考慮したITシステムの設計(富士フィルム、パナソニックプロダクションエンジニアリング)。

2-2. 製造工程における品質管理

細胞製造に関わる原材料、製造工程、品質検査などの各種の管理項目を抽出したソフトウェアシステムの作成(主に京都大学にて試行運用を実施)。並行して、細胞製品製造施設で稼働する統合システムの実証版について検討(京大、パナソニックプロダクションエンジニアリング)。

2-3. 再生医療用細胞製品の事業化検討

集中研の計画は研究開発項目2-1及び2-2を中心に実施。併せて経済性予測を進めるとともに事業化へ向けた連携計画の検討(京大、富士フィルム、リプロセル)。

①未分化培養技術開発

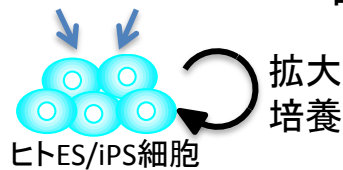
- 複数化合物を用いた安定品質低コスト培地開発
(京大) 培地製品化(2)
⇒午後口演予定
- 低コスト化を実現するためのサイトカイン等構成成分の代替品化合物開発bFGFの代替化合物
(化合物の合成と化合物のスクリーニング評価)
(京大・日産化学)
⇒午後ポスター発表
- 多能性幹細胞培地の開発
(リプロセル) 培地製品化(1)
⇒午後ポスター発表

複数化合物を用いた安定品質低コスト培地開発① 接着培養

京都大学・長谷川

これまでの市販培地
(E8やStemFitなど)

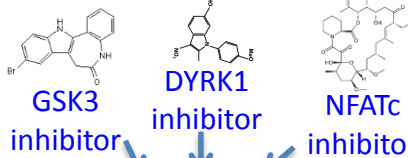
成長因子タンパク質



培地1Lの価格:
49000円~132000円
(市販価格)

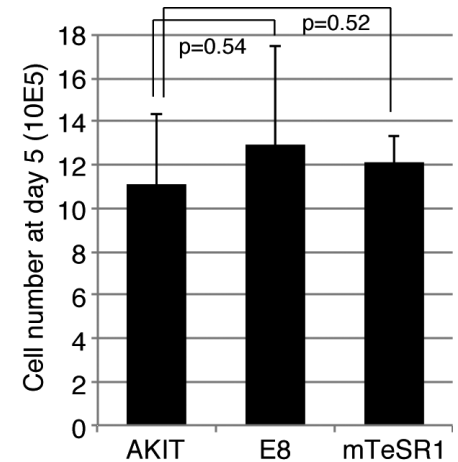
開発した接着培養用培地
(AKIT培地、AKIV培地)

低分子化合物

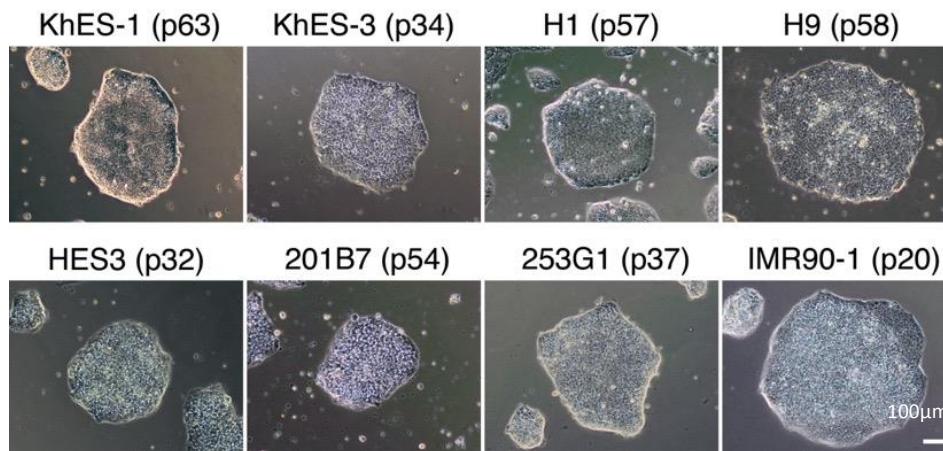


培地1Lの価格:
8000円~9000円
(各成分の購入価格の合計)

他の市販培地と同等の増殖



様々なiPS細胞、ES細胞を長期に拡大培養可能



論文: Yasuda S et al. (2018) *Nature Biomed Eng*、他3報



Chemically defined and growth-factor-free culture system for the expansion and derivation of human pluripotent stem cells

Shin-ya Yasuda^{1,5}, Tatsuhiko Ikeda^{1,5}, Hosein Shahsavaran^{1,4}, Noriko Yoshida¹, Bhavana Nayer², Motoki Hino¹, Neha Vartak-Sharma^{1,2}, Hirofumi Suemori³ and Kouichi Hasegawa^{1,2*}

特許: 014-064174 (国内)、WO2015147047A1 (国際)
事業化: ライセンス済2社 (国内)、交渉中3社 (海外)



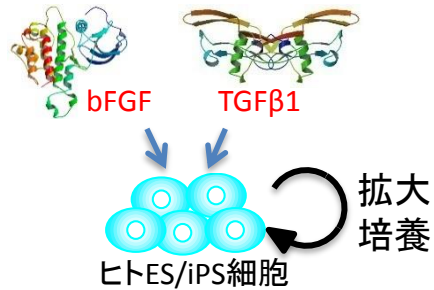
ニプロ社 バッグ自動培養装置

複数化合物を用いた安定品質低コスト培地開発② 浮遊培養

京都大学・長谷川

これまでの市販培地
(E8やStemFitなど)

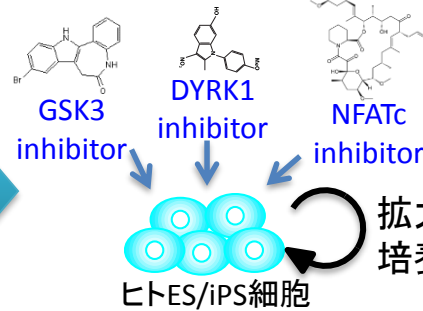
成長因子タンパク質



培地1Lの価格:
49000円~132000円
(市販価格)

開発した接着培養用培地
(AKIT培地、AKIV培地)

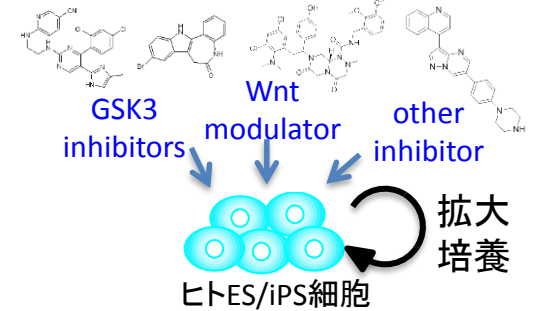
低分子化合物



培地1Lの価格:
8000円~9000円
(各成分の購入価格の合計)

開発した浮遊培養用培地
(AKCYL培地)

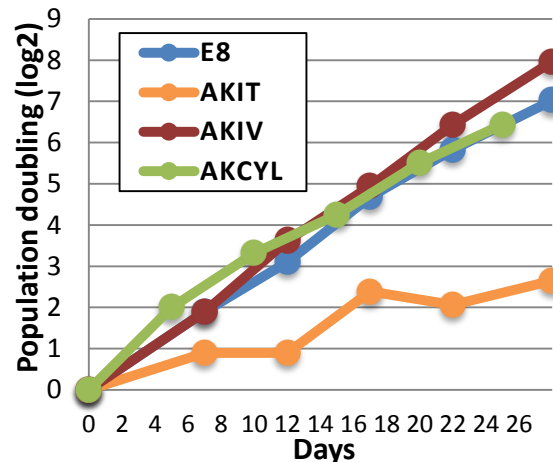
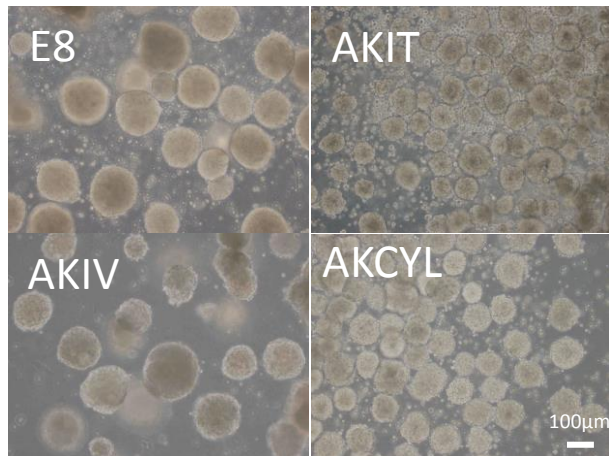
低分子化合物



培地1Lの価格:
8000円
(各成分の購入価格の合計)

京都大学と日産化学の浮遊培養技術
(Otsuji TG et al. (2014) *Stem Cell Rep*)を応用

他の市販培地と同等の拡大培養を可能



富士フイルム社
浮遊自動培養装置

低コスト化を実現するためのサイトカイン等構成成分の代替品化合物開発**bFGFの代替化合物の合成と評価**

日産化学工業(株) 京都大学ウイルス・再生医科学研究所

フィーダー非依存、動物由来成分を含まない培地 (2006年～アメリカ) (TeSR培地など)

血清置換物

高濃度のbFGF

高濃度のActivin/Nodal

他の成長因子

1Lの価格: 78000円 (GMP非対応) ~ 154000円 (GMP対応可) (販売価格)

Ludwig TE et al. Nature Biotech. (2006)

最もシンプルなフィーダー非依存、動物由来成分を含まない培地(2011年～アメリカ) (E8培地)

インスリン等

高濃度のbFGF

高濃度のNodal/TGF β

1Lの価格: 49000円 (GMP非対応) (販売価格) (GMP対応可の価格は倍程度?) Chen G et al. Nature Methods (2011)

高価な増殖因子を使わず**bFGFの代替低分子化合物**に置換した培地

インスリン等

低分子化合物

低分子化合物

培地1Lに含まれる臨床用bFGFの価格: 30000円

日産化学工業より選抜した化合物約3,000種より、ヒット化合物、リード化合物を選定し、さらには有機合成展開を行い、類似した化学構造体で効果があることを最も評価の高かった化合物を用い、培地中における**bFGF量を従来の1/5にしても長期間未分化維持培養できる**ことを検証した。
共通構造を踏まえ、同様な効果を示す**既存薬を見出し**、さらなる作用機序の解明、**特許出願の準備、開発化合物の安定性、安全性の検証、試薬販売に向けての準備を進めている。**

多能性幹細胞培地の開発(リプロセル)

<開発の目的>

再生医療分野で使用するための安価かつ医療応用可能な成分で構成された多能性幹細胞培養用培地を開発・上市し、その性能を評価する

製品外観

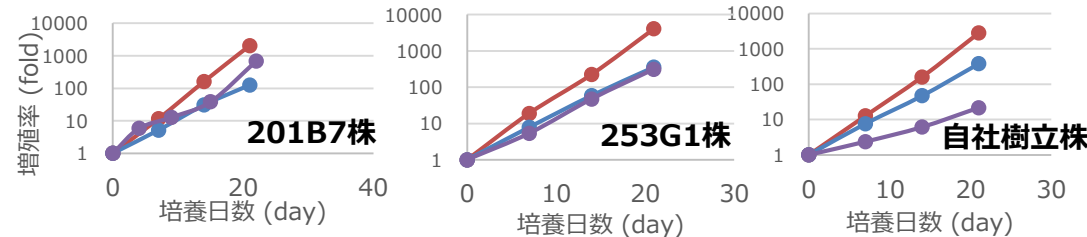


ReproMed iPSC Medium
定価：¥24,000

再生医療に対応した成分で構成され、PMDAで材料適格性相談を受け平成30年4月16日に**ReproMed iPSC Medium**としてiPS/ES細胞培養培地を上市。

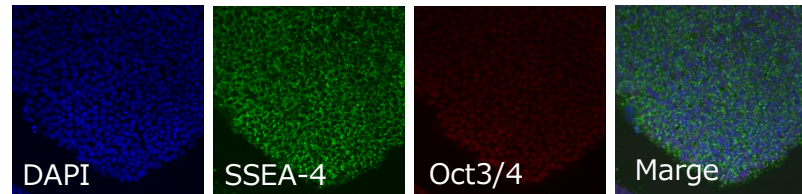
<成果について>

汎用性・増殖性



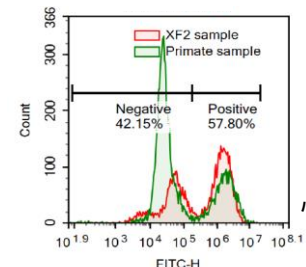
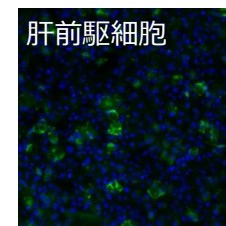
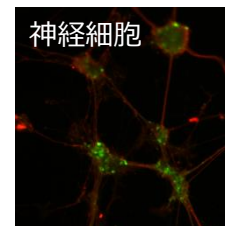
未分化能

免疫染色にてReproMedで培養されたiPS細胞の未分化性を確認した



分化能

ReproMed で培養されたiPS細胞を使用して神経・肝前駆・心筋細胞の分化誘導が確認された



心筋細胞

②分化誘導技術開発

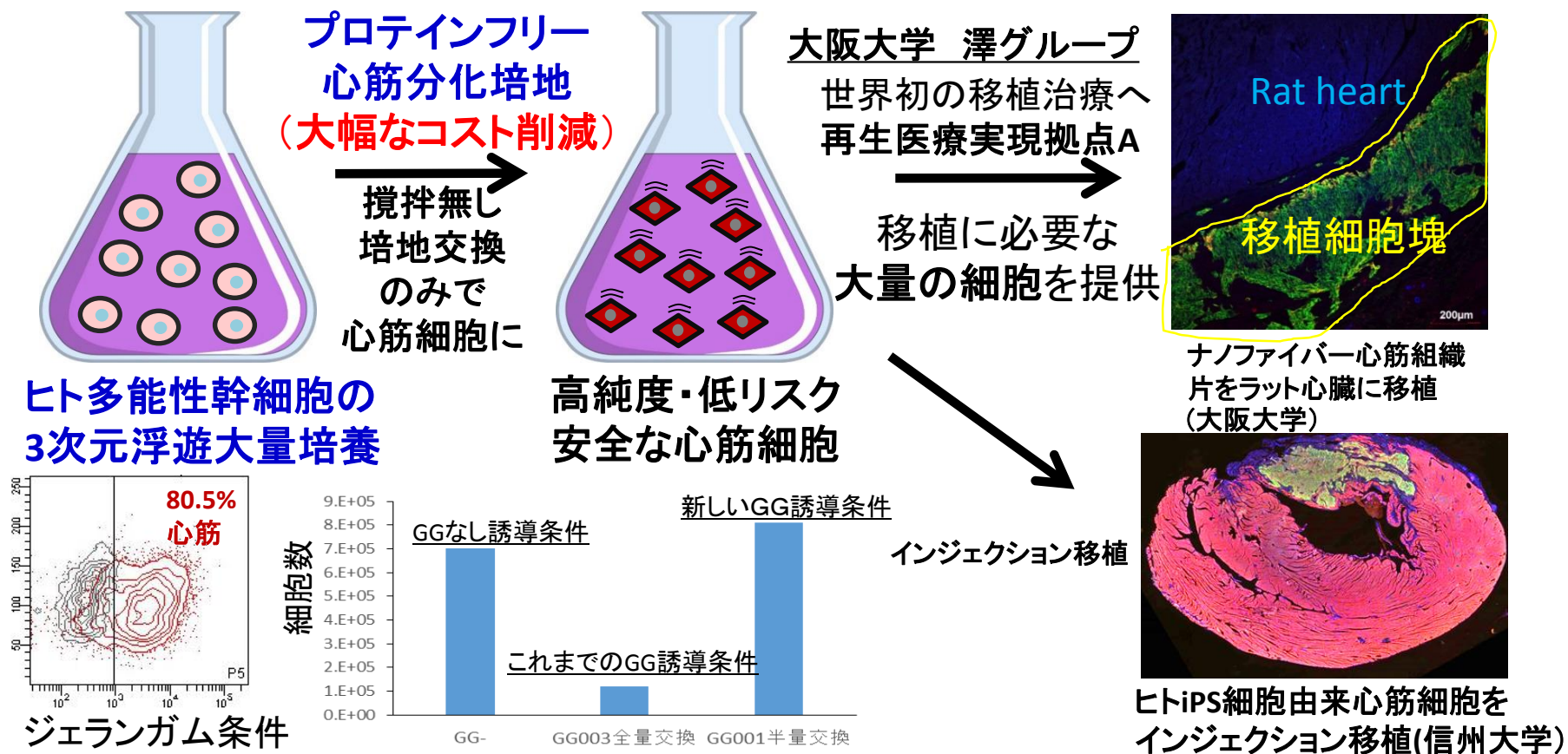
・安定高効率と低コスト化及び大スケール化を実現するための
分化誘導法の開発

➤ 大スケール**心筋細胞**分化誘導法の開発
(京大⇒阪大)**製品化(2)**

➤ 大スケール**神経細胞**分化誘導法の開発(慶應義塾)
⇒午後口演予定

安定高効率と低コスト化及び大スケール化を実現するための分化誘導法の開発(大スケール心筋細胞分化誘導法の開発)

京都大学⇒大阪大学・南



ジェランガム三次元培養において効率的に心筋細胞を分化誘導する条件を確立し、信州大学、大阪大学に心筋細胞を提供し移植心筋細胞の生着率が高いことを確認し、論文発表を行った。大量培養用の化合物と培養液について評価を行い、新規化合物KY03-Iとプロテインフリー心筋分化培地について和光純薬から販売を開始した。

安定高効率と低コスト化及び大スケール化を実現するための分化誘導法の開発(大スケール神経細胞分化誘導法の開発)

慶應義塾大学 岡野・赤松

再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発

京都大学
(中辻)

慶應義塾大学で開発された方法をベースに
多能性幹細胞から神経幹細胞を大量培養

大量培養された
神経幹細胞の調整と供与

神経分化誘導開発
方法のフィードバック

慶應義塾大学
(赤松・岡野)

神経分化誘導方法の確立
大量培養神経幹細胞の評価・解析

連携



AMED

再生医療実現拠点ネットワークプログラム
疾患・組織別実用化研究拠点(拠点A)
「iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた
脊髄損傷・脳梗塞の再生医療」

研究代表者: 岡野栄之

臨床研究グレードの
細胞に必要な基準の共有

本プロジェクトでの成果

浮遊培養ベースで大量培養されるヒトES/iPS細胞を効率よく神経分化誘導するシステムを構築し、従来の方法と比較して**短期間(従来法: 3か月⇒2週間)**での神経幹細胞分化および浮遊培養でのニューロンへの分化可能となり**コスト削減に成功**した。現在動物モデルでのPOC試験を実施中。

高効率な神経細胞分化誘導法(dNS法 CTRaS法)の確立

dNS法(2016)

Stem Cell Reports

Resource

ISSCR



OPEN ACCESS

Functional Neurons Generated from T Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells for Neurological Disease Modeling

Takuya Matsumoto,^{1,2,13} Koki Fujimori,^{1,13} Tomoko Andoh-Noda,^{1,3} Takayuki Ando,¹ Naoko Kuzumaki,^{1,4} Manabu Toyoshima,⁵ Hirobumi Tada,⁶ Kent Imaizumi,¹ Mitsuru Ishikawa,¹ Ryo Yamaguchi,^{1,7} Miho Isoda,^{1,7} Zhi Zhou,¹ Shigeto Sato,⁸ Tetsuro Kobayashi,⁹ Manami Ohtaka,¹⁰ Ken Nishimura,^{10,11} Hiroshi Kurosawa,³ Takeo Yoshikawa,⁵ Takuya Takahashi,⁶ Mahito Nakanishi,¹⁰ Manabu Ohya,^{9,14} Nobutaka Hattori,⁸ Wado Akamatsu,^{1,12,*} and Hideyuki Okano^{1,*}

CTRaS法(2017)

Stem Cell Reports

Article

ISSCR



OPEN ACCESS

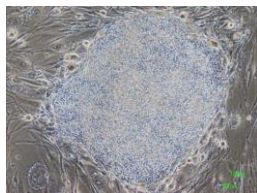
Escape from Pluripotency via Inhibition of TGF- β /BMP and Activation of Wnt Signaling Accelerates Differentiation and Aging in hPSC Progeny Cells

Koki Fujimori,^{1,2} Takuya Matsumoto,¹ Fumihiko Kisa,¹ Nobutaka Hattori,³ Hideyuki Okano,^{1,*} and Wado Akamatsu^{1,4,*}

dNS法を用いて高い効率で分化誘導し大量浮遊培養

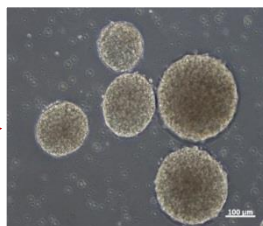
CTRaS法を用いて誘導した神経系細胞の分化を加速

iPS細胞



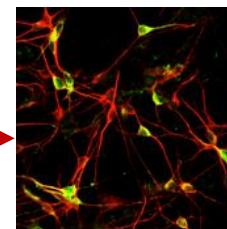
2週間

神経幹細胞



浮遊培養で
大量増幅可能

ニューロン



③大量培養装置開発

- 中型自動培養装置開発(バッグ培養、接着培養系)
(京大・ニプロ)
⇒午後ポスター発表
- 大量培養自動培養装置開発(拡大培養/分化誘導)
3次元無攪拌自動培養装置開発
(京大・富士フイルム)
⇒午後ポスター発表

最大 10^{10} 個/バッチの細胞培養が可能な自動培養装置 など 中型自動培養装置開発(バッグ培養、接着培養系) 京大・ニプロ

多能性幹細胞の増殖培養、分化誘導培養における自動培養プログラムと装置の最適化

成果

- ・自動培養装置とバッグ回路について、多能性幹細胞の増殖培養／分化誘導培養のプログラム変更・ バッグ回路改良による最適化を進めた。
- ・開発した自動培養装置について、2016年4月に受注生産による販売（製品名：CELLAFORTE®）を開始した。
- ・iPS細胞の増殖培養／神経分化誘導培養の自動培養が可能であることを確認した。



図1.自動培養装置CELLAFORTE®

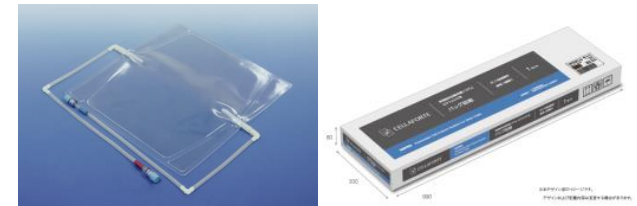


図2.CELLAFORTEのバッグ回路

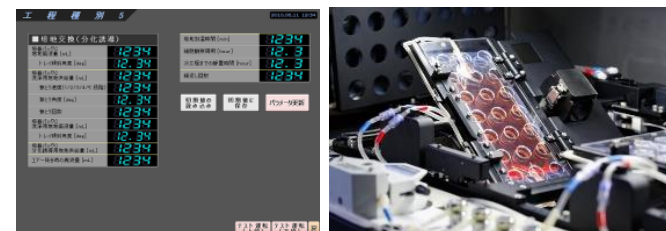


図3.運転プログラムと培養動作

再生医療に適用可能なグレードの培地及び培養基材 ①多能性幹細胞培地(複数化合物を用いた安定品質低コスト培地開発)
京都大学高等研究院 物質-細胞統合システム拠点・特定拠点
講師:長谷川光一

成果

- ・「安定品質低コスト培地開発」を用いて、バッグ培養における条件(播種、継代)検討を進めた。小型培養バッグにて培養条件の検討が完了し、自動培養装置用の培養バッグにて培養評価を開始した。

大スケール化と自動化に適した分化誘導プロセスと装置の開発 中型自動培養装置開発(バッグ培養、接着培養系) 京大・ニプロ



[文部科学省] 再生医療実現拠点ネットワークプログラム疾患・組織別実用化研究拠点 (拠点A)
「パーキンソン病、脳血管障害に対するiPS細胞由来神経細胞移植による機能再生治療法の開発」
研究代表者: 京都大学CiRA 高橋淳教授

自動培養装置を用いたドーパミン神経前駆細胞への分化誘導と大量生産

成果

- ・自動培養装置/培養バッグの培養条件下におけるiPS細胞の接着に関する条件検討を行い、装置内での安定した拡大培養を可能にした。
- ・神経分化誘導の培養工程の自動化条件(誘導培地交換のプログラミング)を検討し、自動培養条件下におけるiPS細胞からのドーパミン神経前駆細胞の誘導に成功した。

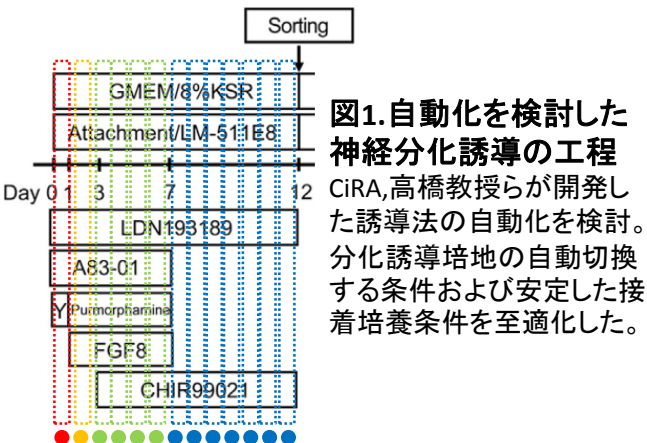


図2. 自動培養/バッグ培養による神経分化誘導
拡大培養(5日間)から分化誘導(12日間)の工程を自動化し
作製したドーパミン神経前駆細胞

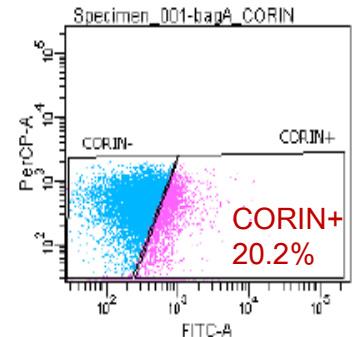


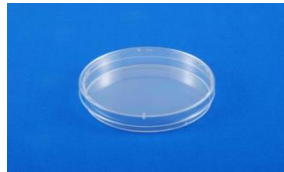
図3. フローサイトメリー解析
による誘導効率の評価
マニュアル培養と同等のドーパミン神経
前駆細胞(CORIN陽性細胞)の出現を確認

大量培養自動培養装置開発(拡大培養/分化誘導)

培養装置に組み込まれている技術(手動から自動へ) 富士フイルム

マニュアル培養

培養



シャーレ



インキュベータ



メッシュ破碎
(継代)



ピペット
+小型フィルタ

検査



顕微鏡
+目視評価

移液
混合



電動ピペッタ

分離
濃縮



遠沈管



遠心分離機

無菌保証

安全キャビネット内開放操作

自動大量培養装置

★大量浮遊培養技術

(ガス透過性バッグ培養)

★連続メッシュ破碎技術

★非破壊定量モニタリング

★低せん断移液混合技術

★連続ろ過濃縮技術

★完全閉鎖系操作

未分化拡大培養装置開発(富士フイルム)

☑培養可能容量

(0.2L)~18L：インキュベータ容量

インキュベータに0.5or1Lバッグを連通した大量培養用カスタムバッグを格納

☑使用方法, フロー

-培地交換・継代時

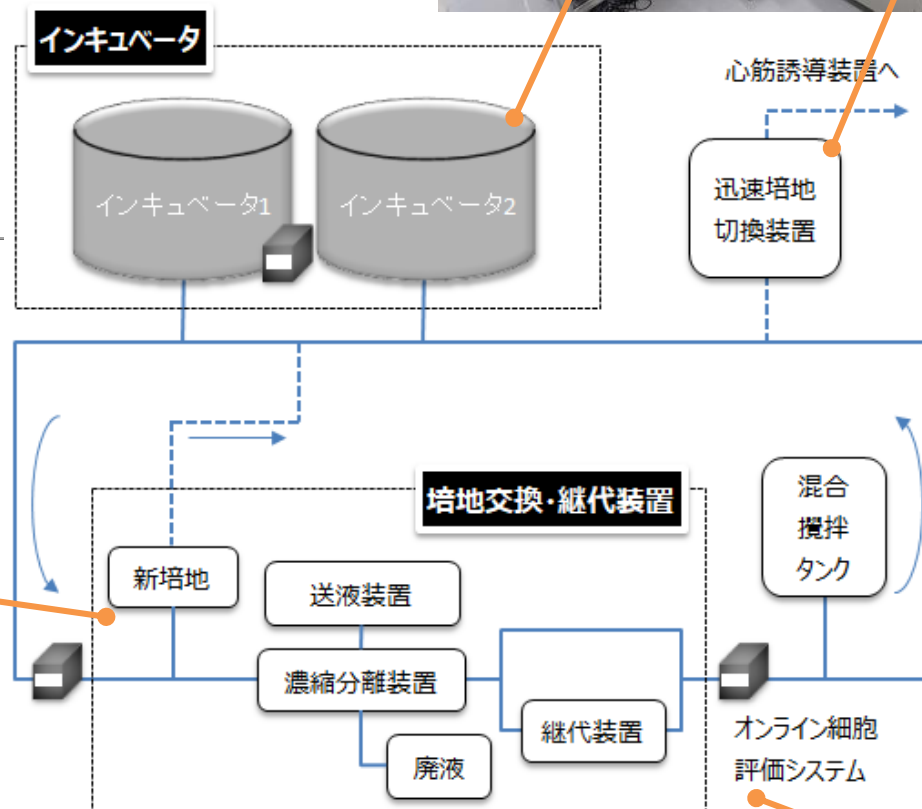
インキュベータ培養中の細胞を取出し, 培地交換・継代装置で処理後に混合・攪拌タンクに一時貯留して, 全量処理後にインキュベータに戻す.

-培地追添時

培地交換・継代装置の新培地供給システムを利用し, 直接インキュベータに送液・追添する.

☑オンライン細胞評価システム

培地交換・継代処理前後と, インキュベータ培養中の移送液時にスフェア総数, 大きさ, pHを測定可能.



世界初無攪拌三次元浮遊培養技術を用いた大型バイオリアクターの開発に成功

心筋細胞分化誘導培養装置開発(富士フイルム)

☑培養可能容量

処理容量：10L

大量分化誘導用カスタムバッグ(誘導容器)をインキュベータに格納する。

☑使用方法, フロー

-培地濃縮装置

- ①培養バックから細胞懸濁液を構成装置Cの貯蔵容器に送液する。
- ②濃縮分離装置で、古い培地を濾過し、所定の濃縮率まで細胞懸濁液を濃縮する。
- ③濃縮した細胞懸濁液を混合容器に送液する。

-混合装置

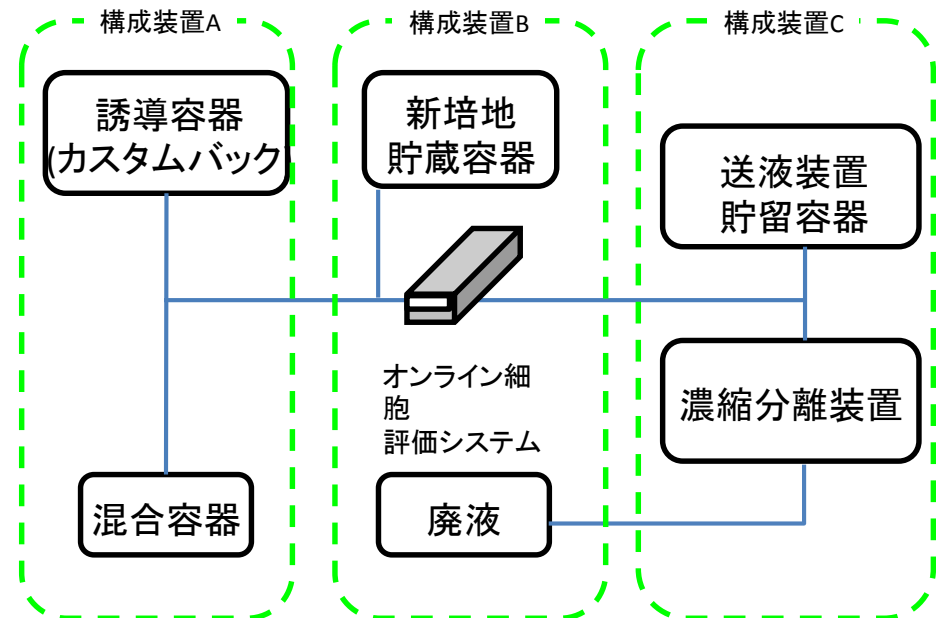
- ①濃縮した細胞懸濁液を回収する。
- ②新培地を混合溶液に送液する。
- ③細胞懸濁液と新培地を混合する。
- ④混合した細胞懸濁液をカスタムバックに戻す

☑オンライン細胞評価システム

培地交換・継代処理前後と、インキュベータ培養中の移送液時にスフェア総数、大きさを測定する。

現在、未分化拡大培養装置及び心筋誘導培養装置を京大中辻G集中研(神奈川県ライフイノベーションセンター: LIC)に設置来月より、本格的に稼働予定。

図. 心筋誘導装置外観



④高純度分化生産プロセス開発(分離・精製)

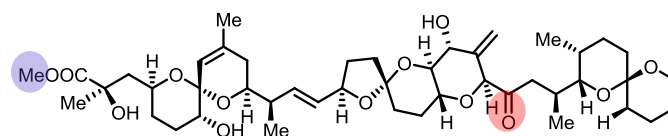
- 残存未分化多能性幹細胞を除去する化合物開発
京大:上杉
- 未分化細胞を除去し分化細胞を精製する新規システム開発
(株)オンチップ・バイオテクノロジーズ:武田
⇒午後ポスター発表

最終目標

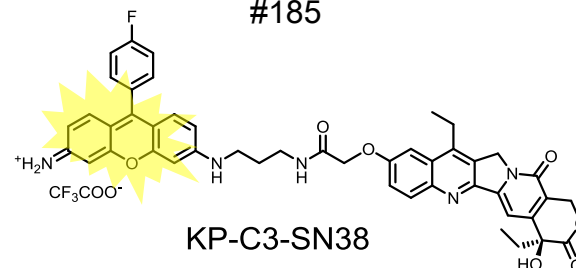
残存未分化多能性幹細胞を除去する化合物を開発し、腫瘍を形成しない細胞移植方法の実用的なプロトコルを確定する。

成果

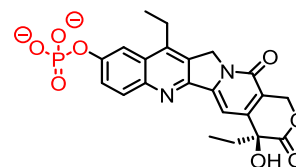
- 先行研究により、ヒト多能性幹細胞に選択的な蛍光分子 Kyoto Probe 1 (KP-1)を発見。(Cell Rep, 2014)
- KP-1のメカニズムから、ヒト多能性幹細胞を選択的に死滅する#185を発見。(JACS, 2014)
- #185より合成が容易で優れた選択性と実用性を示すKP-C3-SN38の開発に成功。(ACIE, 2017)
- 神経細胞の純化に有効なSN38-Pを赤松・岡野グループと開発(Chem. Comm., 2018)
- KP-C3-SN38は使用後の除去が簡便。合成法も確立。心筋細胞などの分化細胞から未分化のiPS細胞を除去するには実用的であり、特許を申請。



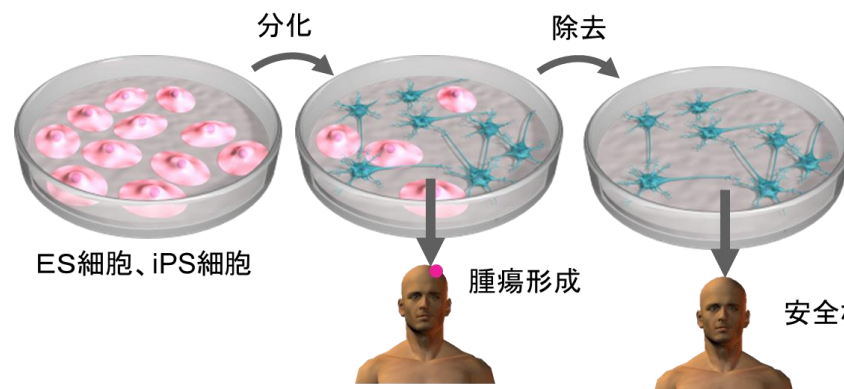
#185



KP-C3-SN38



SN38-P



分離・精製(高純度分化誘導生産プロセス開発)
未分化細胞を除去し分化細胞を精製する新規システム開発
(株)オンチップ・バイオテクノロジーズ

目的 : 未分化細胞の完全除去

方法 : 繰り返しネガティブソーティング法

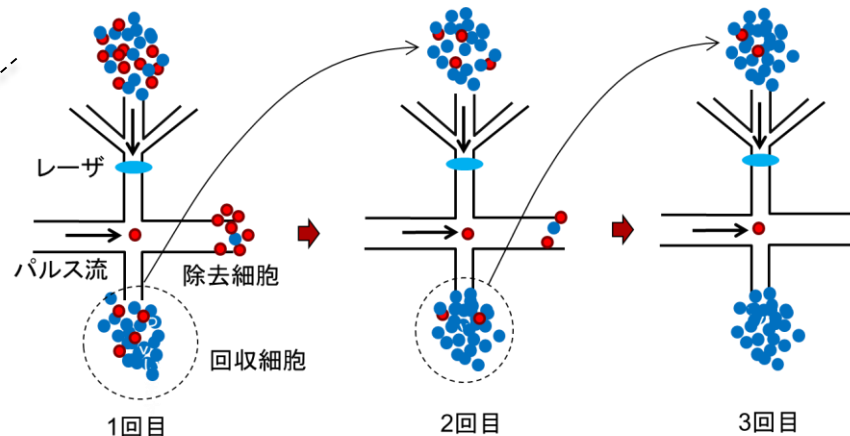
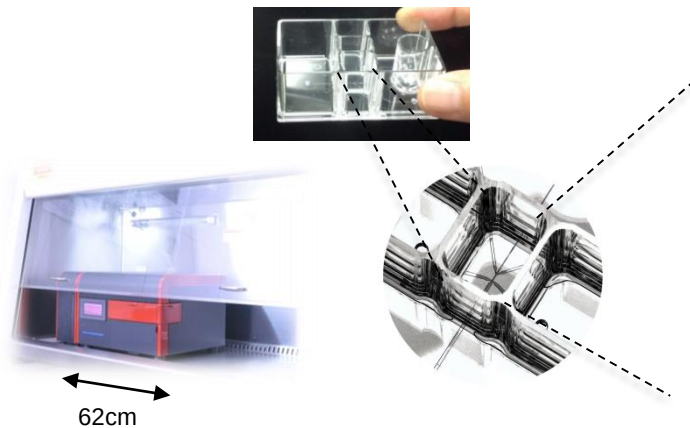
未分化細胞のみを検出して除去ソーティングし、分化細胞をスルーさせて回収する処理を繰り返すことで完全除去を実現する。

【研究成果】

1. 流路内の界面衝突が無くダメージフリーソーティング。
2. ダメージフリーであるために処理を繰り返すことが可能。
3. 高濃度細胞濃度(10^8 個/mL)で除去処理が可能。
4. 分化細胞 10^8 個中に残存する 10^4 個の未分化細胞(iPS細胞)の完全除去に要する時間は1時間。
5. iPS細胞除去試薬を利用する場合は、iPS細胞数が2桁低減し、除去効率が向上した。



処理用高濃度細胞懸濁液
 10^8 個/mL

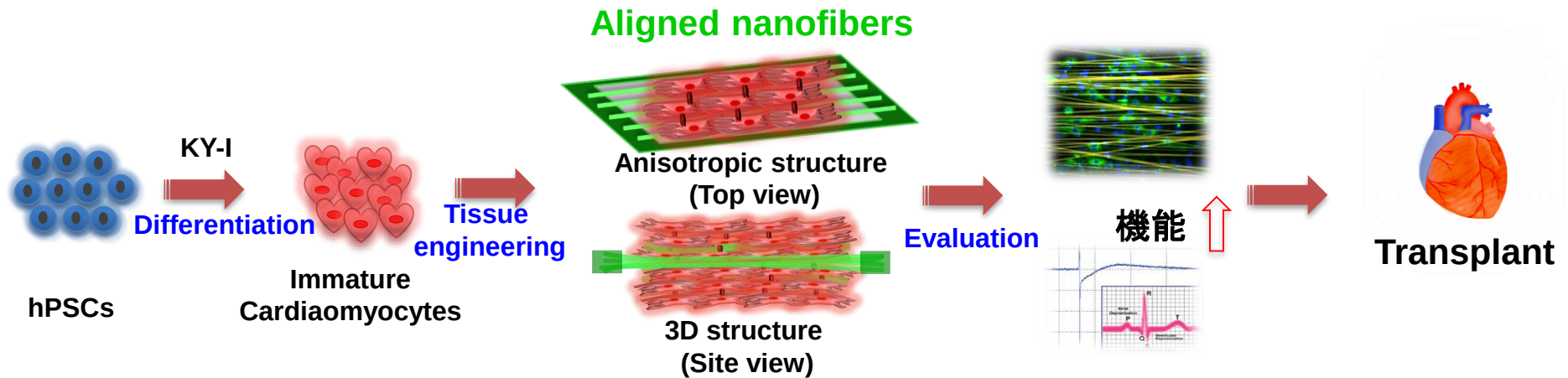


交換型マイクロ流路チップセルソーター
(On-chip Sort)

⑤材料融合型組織片作製技術及びその評価

- ナノファイバー心筋組織片の開発および心筋梗塞モデルにおける有効性の評価(京大⇒阪大)
- サル心筋梗塞モデルにおけるiPS細胞由来心筋細胞移植による心機能の改善
- 心筋細胞移植におけるマトリゲル以外の細胞接着因子の検討
(信州大学)
⇒午後口演予定
- 神経組織移植片の三次元構築技術の開発
(サイフューズ・慶應大学)
⇒午後ポスター発表

ナノファイバー心筋組織片の開発 および心筋梗塞モデルにおける有効性の評価 (京都大学⇒大阪大学)



多能性幹細胞 + 化合物(KY-I)
(化学制御)

心筋細胞 + 足場
(物理制御)

再生医療応用

安全なヒト多能性幹細胞由来の
心筋細胞の提供

配向性ナノファイバーを用い
て、組織化した心筋移植片の
開発及び心筋機能評価

心筋移植片の移植及び評価

南グループ
(医学系研究科・組織細胞設計学
共同研究講座@大阪大学)

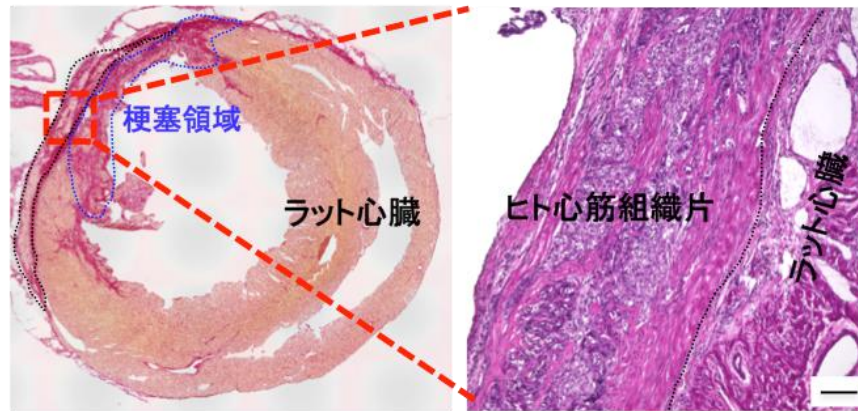
澤グループ
(医学系研究科・心臓血管外科@大阪大学)

ラット心筋梗塞モデルにおける心筋組織片の移植による心機能評価 (大阪大学)

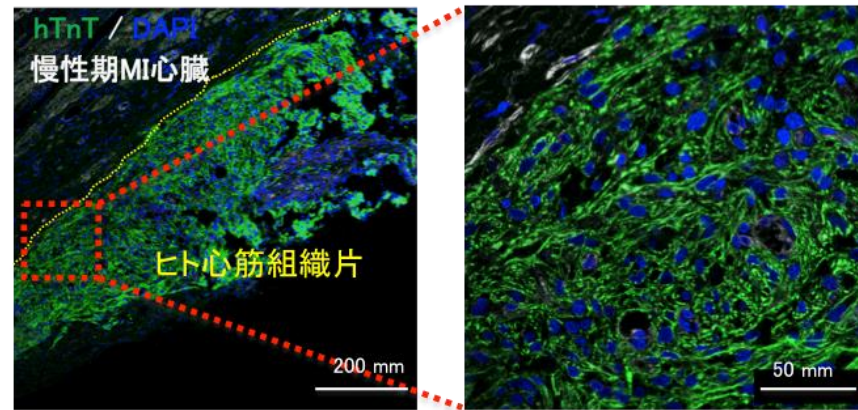
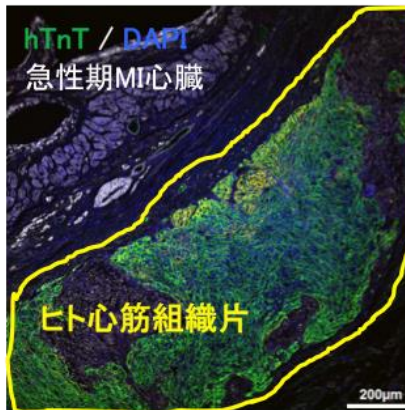
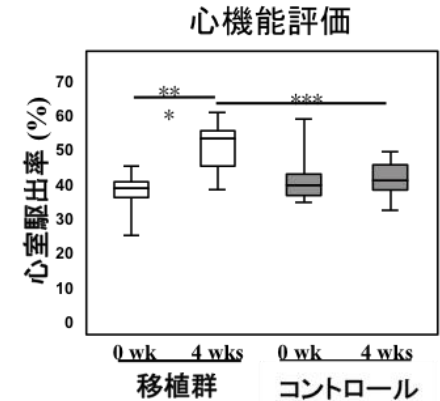
a 急性期MI移植



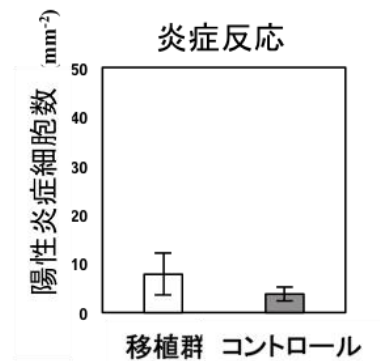
b 慢性期MI移植



c



d

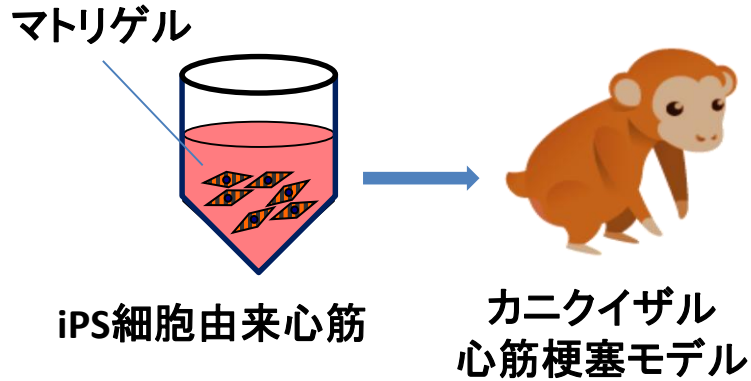


- ヒト由来心筋組織片は急性ラット心臓、慢性期ラット心筋梗塞モデル心臓に密着し、移植された心筋細胞は多く生存している。
- 慢性心筋梗塞モデルの心機能は回復している傾向がみられた。
- 炎症反応及び不整脈はみられなかった。

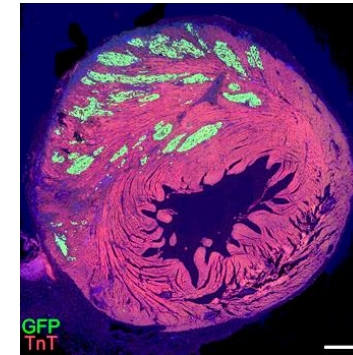
J. Li et. al., Stem Cell Reports 2017

カニクイザル心筋梗塞モデルにiPS細胞由来心筋細胞(GFP標識)移植試験

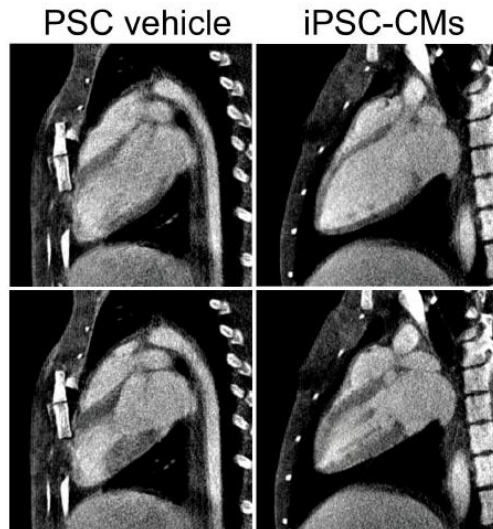
信州大学



Shiba Y. et.al., Nature **538**(7625)388-391(2016).

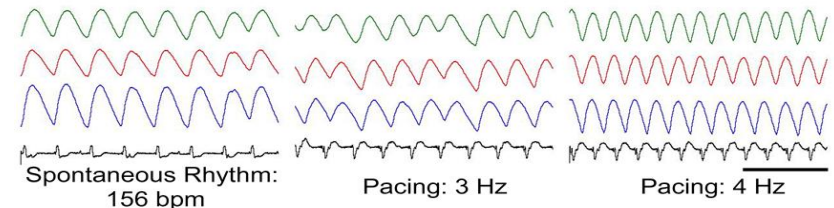
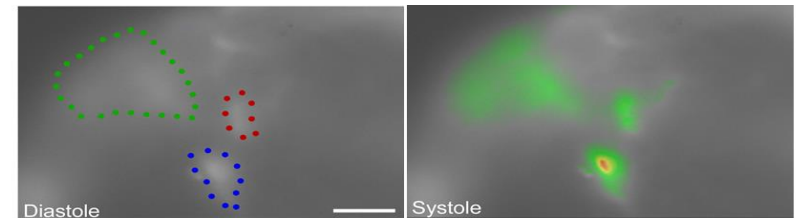


12週間後の組織評価
GFP(緑)陽性のグラフト
心筋の生着を確認



12 w post-Tx

マイクロCTを用いた心機能評価
心機能の改善を確認

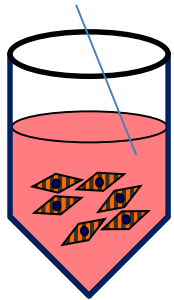


蛍光CaセンサーGCaMPを用いた電気生理
検査ではグラフト心筋収縮と心電図が同期し
ており、ホストグラフトの電氣的結合確認

心筋細胞移植: マトリゲル以外の細胞生着因子の検討

信州大学

断片化ラミニン



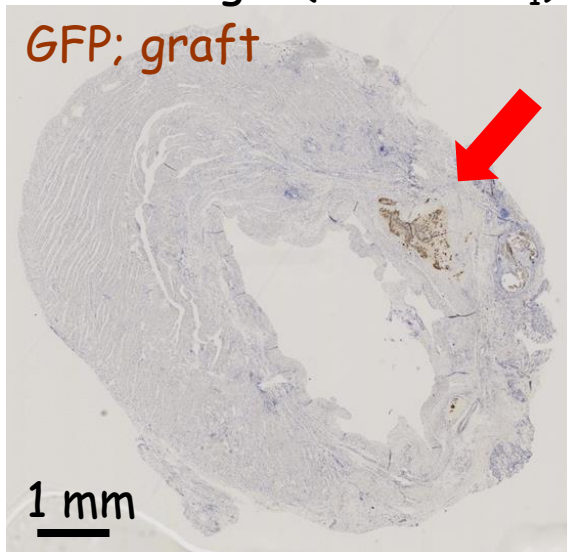
iPS細胞由来心筋

ラット心筋梗塞モデル

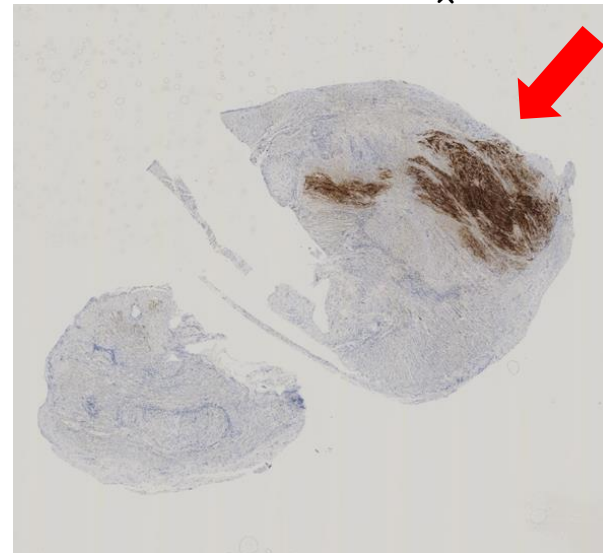
- ・マトリゲル: マウス肉腫由来蛋白で臨床応用は難しい
- ・マトリゲルの主要構成成分であるラミニンに着目し、**合成可能な複数の断片化ラミニン**について検討

Matrigel (Laminin α_1)

GFP; graft



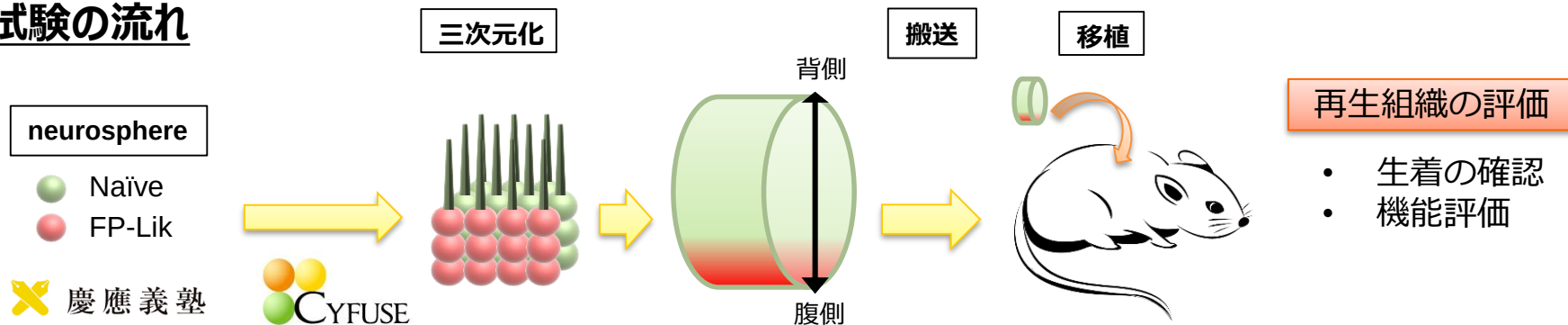
Laminin α_x



iPS細胞由来心筋細胞の遺伝子発現パターン解析から最適なラミニンを選択し、心筋細胞とともにラット心筋梗塞モデルに移植したところ、

マトリゲルと同等以上の生着効果を確認

試験の流れ



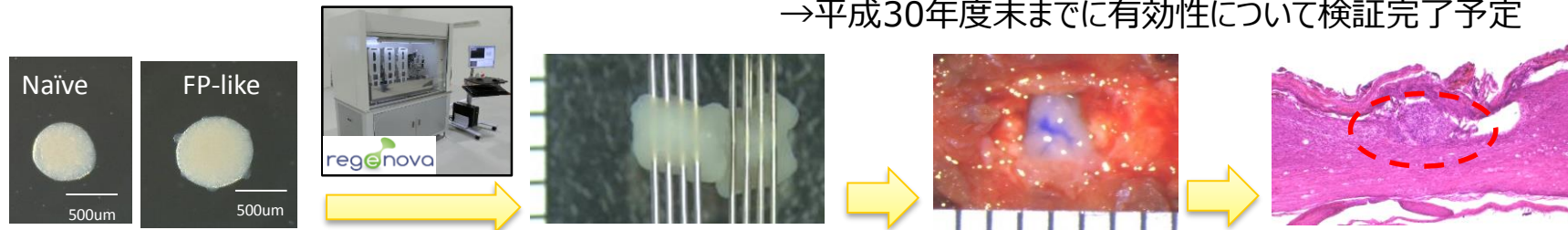
目標

1. 慶應大学にて作製されたiPS由来神経幹細胞から、移植可能な三次元組織を作製する
2. 脊髓損傷モデル動物への三次元組織の移植方法を確立する
3. 慢性期脊髓損傷モデル動物へ移植後の生着および有効性について検討する

研究成果

1. 脊髓腹側・背側領域に分化誘導された領域特異的神経幹細胞を用いて背腹軸を持つ三次元神経組織を作製
2. 脊髓損傷モデルラットに対して三次元神経組織の背腹軸を正しい向きで移植する方法を確立
3. 慢性期脊髓損傷モデル動物に対して三次元神経組織を移植し、1ヵ月以上の生着を確認

→平成30年度末までに有効性について検証完了予定

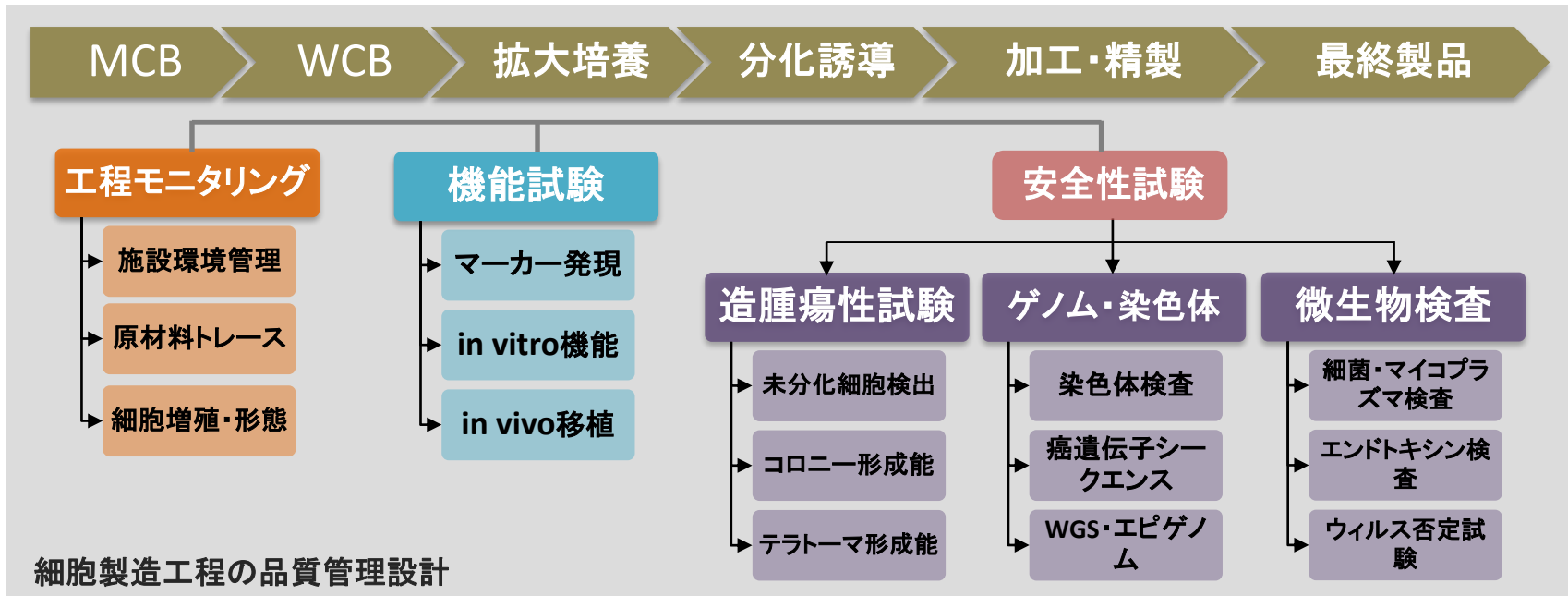


⑥評価システム開発(品質管理・モニタリング)

- 多能性幹細胞、分化細胞及び細胞加工品の製造工程における品質管理(京大、タカラバイオ)
- ゲノム・エピゲノム品質評価用試薬キットの開発
(タカラバイオ、京大) 製品化(1) 事業化(5)
⇒午後ポスター発表
- 培養・細胞モニタリング⇒オンライン細胞評価システム
(富士フイルム)
- 分化細胞の造腫瘍性の生体試験の為のテラトーマ
アッセイのシステム開発(京大)

多能性幹細胞、分化細胞及び細胞加工品の 製造工程における品質管理

(京大、タカラバイオ)

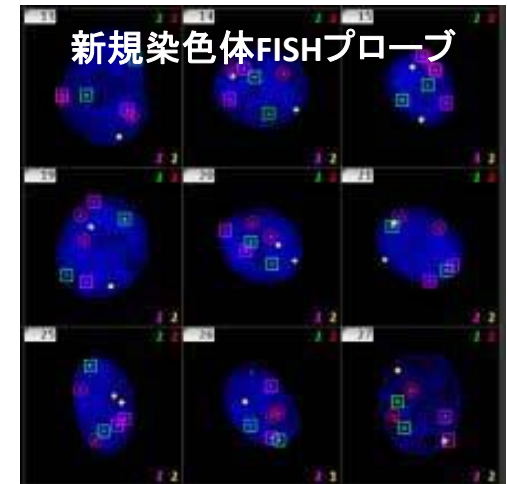


研究開発項目

- ① ヒト多能性幹細胞及び細胞加工品の品質管理設計
- ② 培養装置サンプルの品質評価データ取得と解析
- ③ ゲノム・染色体品質評価試薬や解析システム開発

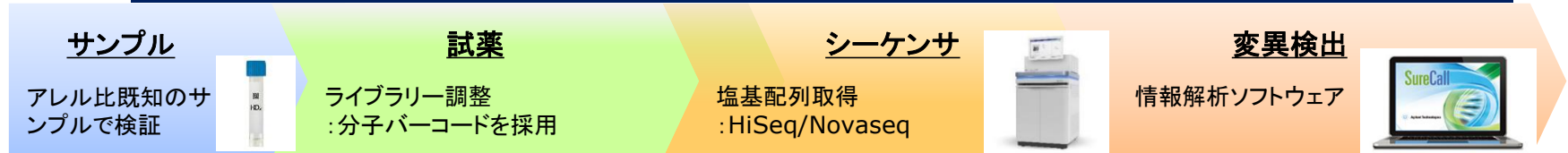
ゲノム・染色体検査

- ・ 染色体解析
- ・ FISH解析
- ・ 癌遺伝子エクソーム解析
- ・ WGS解析
- ・ CNV/SNP解析
- ・ DNAメチル化解析
- ・ RNAseq解析



評価G 多能性幹細胞、分化細胞及び細胞加工品の製造工程における品質管理
ゲノム・エピゲノム品質評価用試薬キットの開発 タカラバイオ、京大
 遺伝子発現及びゲノム、エピゲノム品質管理のシステム開発と測定試薬キット化・装置開発

「Flexible Oncopanel」の受託試験サービスを開始した（2018年10月）

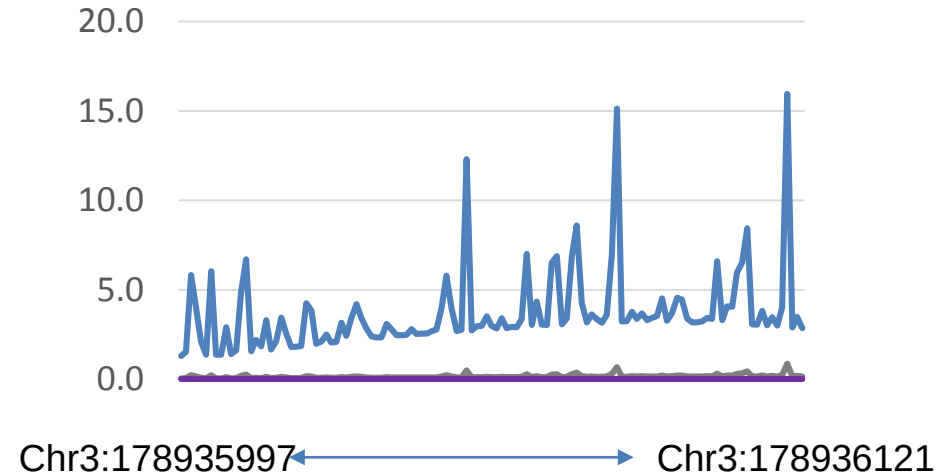
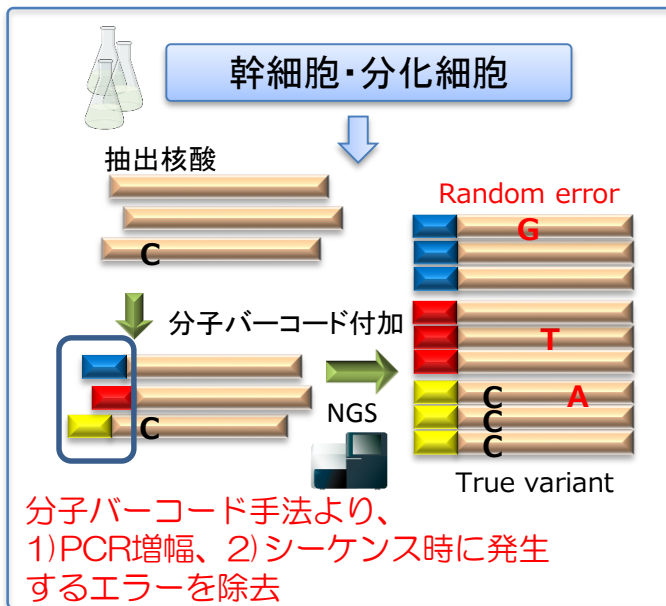


②ゲノム・エピゲノム品質評価用試薬キットの開発

自社試薬キットThruPLEXと独自ソフト（特許出願中）を土台にして、コピー数変異（CNV）の検出系を開発。作業工程の見直しやカスタムパネルの設計ツールの開発。プライマーベースでのPCR濃縮のプロトコルを開発し、高い濃縮効率、および低コストを実現。

- PIK3CAのエキソン10の各塩基箇所におけるエラー数をエラー補正の前後で評価

- エラー補正前のエラー推定値
- エラー補正後のエラー推定値



エラー補正（特許出願中）によって、
 推定エラー数をほぼ0に抑えることができ、
 AF 0.01% の変異も検出可能なレベルに到達

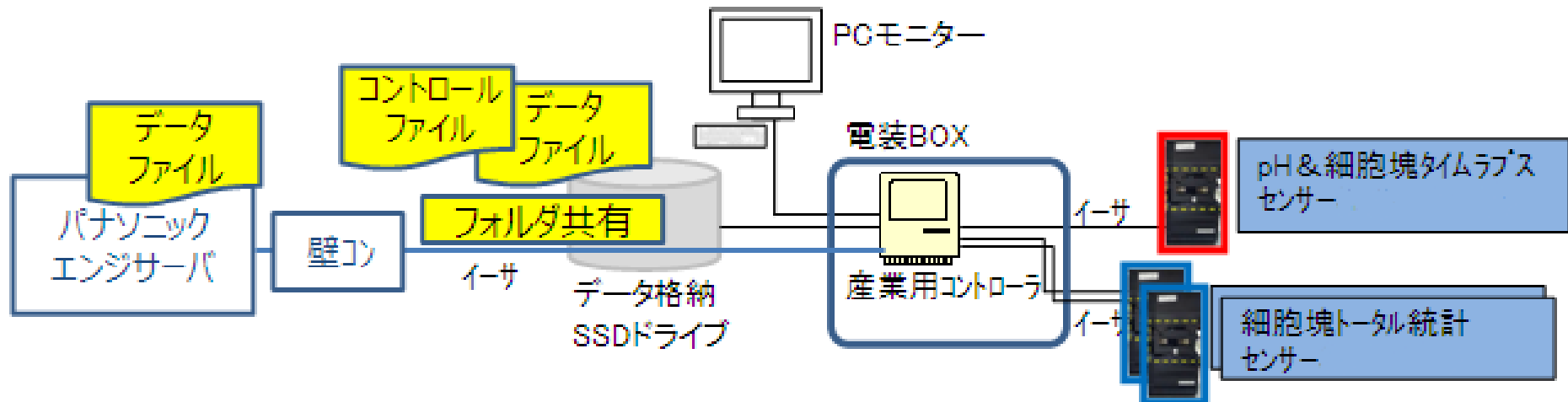
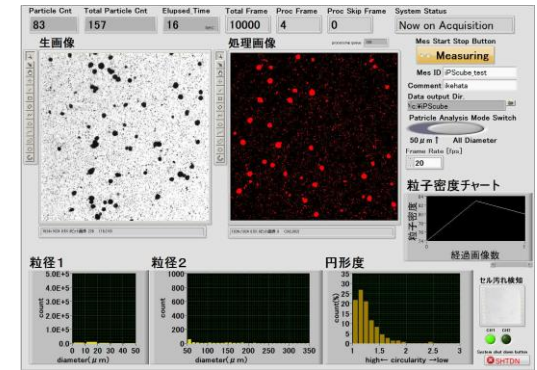
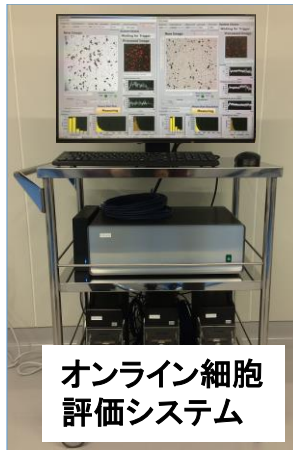
評価G 多能性幹細胞、分化細胞及び細胞加工品の製造工程における品質管理
ゲノム・エピゲノム品質評価用試薬キットの開発 タカラバイオ、京大
 遺伝子発現及びゲノム、エピゲノム品質管理のシステム開発と測定試薬キット化・装置開発

平成30年度予定と目標

項目			平成30年度計画と最終目標
1-5-1-2.遺伝子発現及びゲノム、エピゲノム品質管理のシステム開発と測定試薬キット化・装置開発	①品質を管理するための基礎データの取得		継続して基礎データとしてWES、RNA-Seq、SNP Arrayデータの取得。 =>プロジェクト使用細胞の基礎データ解析と蓄積
	②ゲノム・エピゲノム品質評価用試薬キットの開発	高感度変異検出方法の検証	コピー数変異（CNV）の検出系の開発に加えて、分析バリデーションを実施し、試験方法（検出力）の適格性評価。 =>高感度変異解析サービスの提供
	③未分化細胞の高感度否定試験法の確立	未分化細胞で特異的遺伝子のRNA定量PCR系	qPCR試験の実施（実検体を用いた検証）。 =>未分化細胞検出（否定）試験サービスの提供
1-5-1-3.製造工程における品質管理	④細胞製品の品質管理システム開発	核型解析試験・ウイルス試験・マイコ試験	染色体像取得の実験技術、及び染色体識別、異常判定基準設定などの解析技術の向上（実検体を用いた検証）。 =>各種試験サービスの提供

オンライン細胞評価システム(拡大培養装置、心筋分化誘導装置と連動)

培地交換・継代処理前後と、インキュベータ培養中の移送液時にスフェア総数、大きさ、pHを測定する。



多能性幹細胞、分化細胞及び細胞加工品の製造工程における品質管理: 分化細胞の造腫瘍性の生体試験の為のテラトーマアッセイのシステム開発 (京大)

目的: 細胞製品に混入する未分化細胞によるテラトーマ形成の検出

- ・細胞調製方法、移植部位の最適化
- ・再現性の検証

皮下の異なる部位および精巣皮膜下に移植

移植部位によりテラトーマ形成に差



移植細胞数と移植部位の検討

細胞数	精巣/皮下	観察期間	精巣/皮下
1×10^3	9/9	3 mo + α	+/-
1×10^4	6/6	3 mo + α	+/+

- ・移植部位による検出感度の差 → 移植部位の最適化(精巣皮膜下)
→ テラトーマ形成の検出感度を10倍程度向上 (10^3 個程度)
- ・テラトーマ非形成ドースでの長期観察では検出感度は向上しないと考えられる

10^8 個の細胞を移植する場合、 $1/10^5$ 異常の検出感度が必要と考えられるためPCR等での評価だけでは不十分で、未分化細胞除去技術との組み合わせが必要

⑦保存(凍結保存) 及び輸送容器開発

- ヒト多能性幹細胞および分化細胞の(凍結)保存液の開発
(リプロセル・京大) 製品化(1)
⇒午後ポスター発表
- 凍結容器の作成 (京大、ニプロ)
⇒午後ポスター発表
- 保存及び輸送(京大・玉井化成・JMS) 製品化(2)
⇒午後ポスター発表

保存Gヒト多能性幹細胞および分化細胞の（凍結）保存液の開発 (リプロセル・京大)

<開発の目的>

再生医療分野で使用するためのDMSO不含かつ医療応用可能な成分で構成された多能性幹細胞培養用凍結保存液を開発・上市し、その性能を評価する

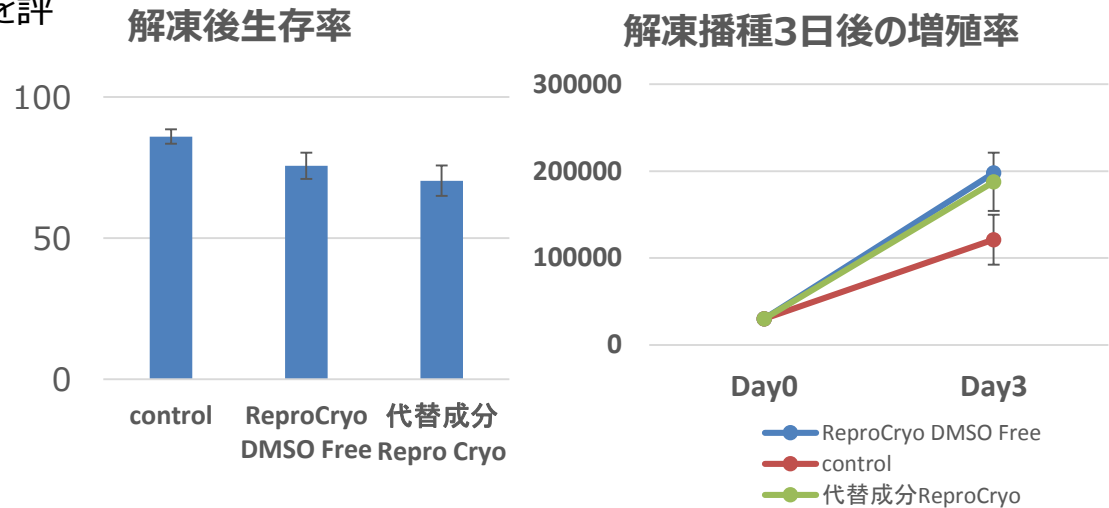
製品外観



ReproCryo DMSO Free
定価：¥15,000

<成果について>

生存率と増殖率



動物を使用した安全性試験・マスターファイルへの登録

ラットを使用した安全性評価を実施し、**安全性を確認した**。
また、含まれる成分に関してPMDAとの面談を重ね**マスターファイル登録を完了した**。

生物由来原料基準に対応した組成で構成されたDMSO不含のiPS細胞凍結保存液である、ReproCryo DMSO Freeを平成27年8月24日に販売を開始した。

液体窒素(菌・ウイルス)の混入の無い完全閉鎖系凍結保存容器の開発

成果

- ・京都大学とニプロで安全性が高く、ガラス化凍結や緩速凍結に適した閉鎖系凍結保存容器の開発を進め、試作品の作製を実施した。
- ・医療機器グレードの樹脂原料を用いて試作品の開発を進め、試作品の操作性・耐凍性・細胞品質の評価をニプロと京都大学の相互で実施し、閉鎖系凍結保存容器の製品化を目指した開発を進めた。
- ・改良を進めた閉鎖系凍結保存容器について、操作性評価、残液性評価、耐凍結性評価により、製品化に向けた最終仕様を決定した。
- ・ニプロと京都大学の相互で細胞凍結保存を実施し、細胞生存率について既存品との同等性を確認した。



図1. 開発品の形状仕様



図2.凍結保存試験



図3.凍結保存試験(結果)

目標

AMEDプロジェクト内で行われる多能性幹細胞及びその由来製品の搬送形態、条件の調査研究を行い、搬送システムを構築する。
そのために必要となる蓄熱材/断熱容器の生産技術を確立し、該容器を用いた実輸送を目標として実施した。

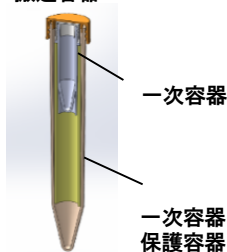
開発成果

細胞搬送一次容器の研究開発; JMS

細胞搬送と作業性、コンタミリスクに適した一次容器を高精度なプラスチック成形技術を用いて細胞搬送の要件に対応した搬送容器の研究を実施。

◆ 神経細胞 (京都大学iPS細胞研究所 高橋研)

iPS細胞研究所向け
搬送容器



一次容器
一次容器
保護容器

一次容器



キャップ
本体

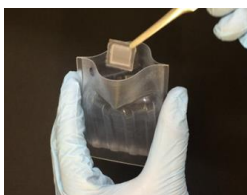
一次容器保護容器



上記の一次容器および二次容器はパーキンソン病に対するiPS細胞由来神経細胞移植試験において使用された。

◆ 心筋組織片

(信州大学、大阪大学)

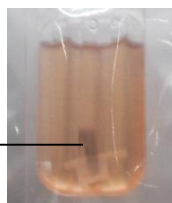


心筋組織片

◆ 神経組織

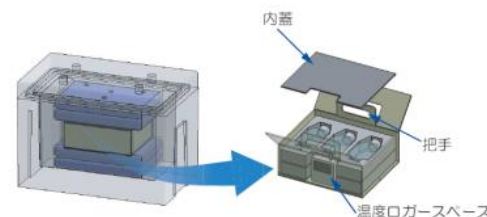
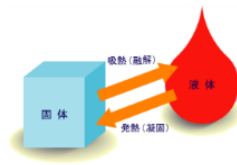
(慶応大学、サイフューズ)

神経組織
と支持材
(KENZAN)



細胞搬送二次容器の研究開発; 玉井化成

細胞搬送に適した融点のPCM(Phase Change Material)の組成と断熱容器の最適な組合せに関する研究を実施し、細胞搬送の要件に対応した搬送容器の研究を実施。



T25フラスコ



96ウェルプレート



ウェルプレート&チューブ
混載

-50℃タイプ定温搬送容器

細胞に対応した定温・防震・緩衝搬送容器の研究

Target	Temperature
◆ 神経細胞 (京都大学 iPS細胞研究所)	+5℃
◆ 神経組織 (慶応大学 サイフューズ)	+20℃ 防震緩衝機能容
◆ 神経細胞 (京都大学 iPS細胞研究所)	+37℃/-50℃
◆ 心筋組織片 (京都大学、信州大学、大阪大学)	+37℃

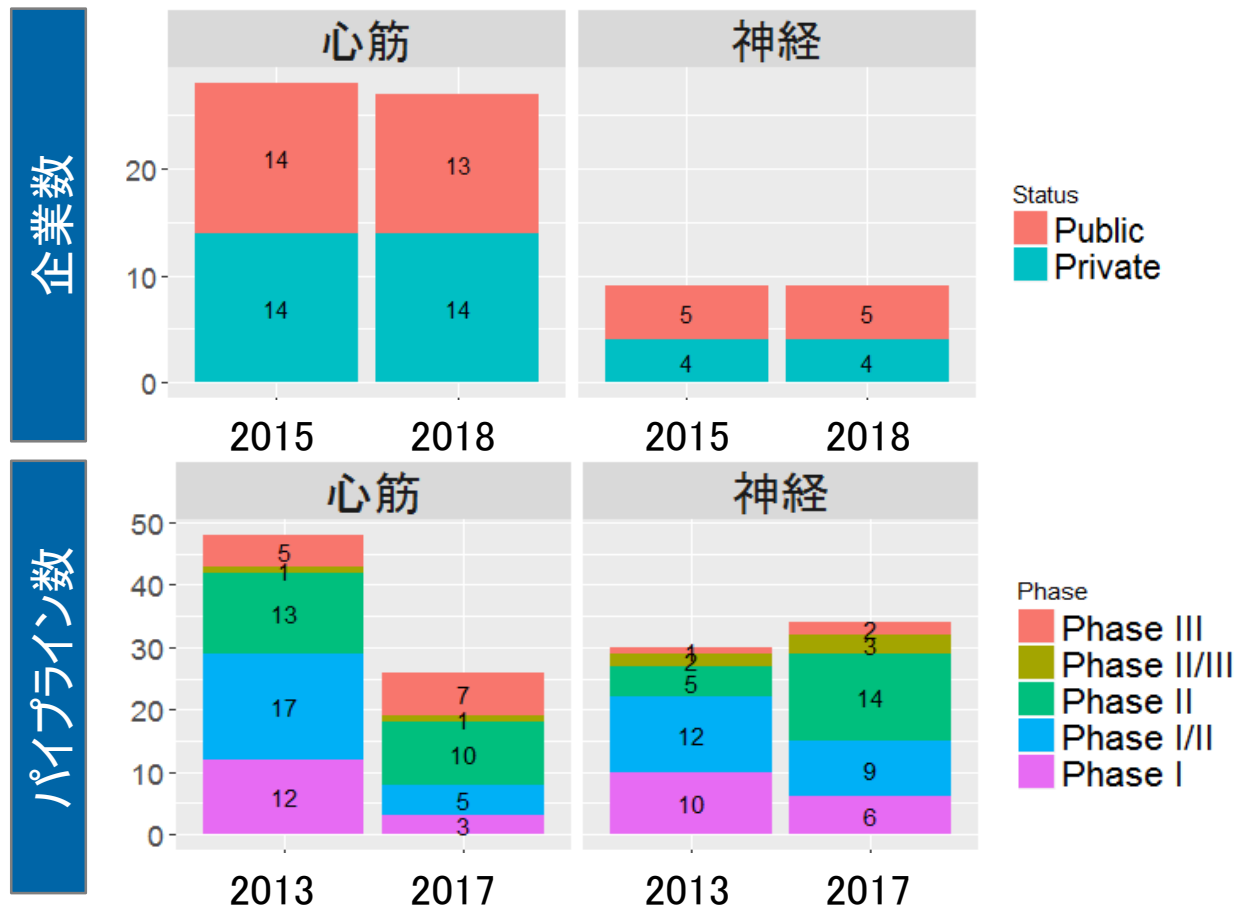
製品化

- ◆ PATTHERMO F3/F37(構成能蓄熱材)
- ◆ TACPack37FS (定温輸送容器)

平成27年3月15日
平成28年4月1日

⑧市場・競合の評価・予測 (京大)

再生医療等製品の実施企業数・臨床開発数の変化



心筋領域のパイプライン数が減少: 事業の継続性に課題

⑩再生医療用細胞製品の事業化検討

(京大・富士フイルム・リプロセル)

再生医療用細胞製品の事業化検討 (京大・富士フイルム・リプロセル) 製造コストの低減アプローチ

	共通領域	心筋領域	神経領域
低コスト 培養手法 の開発	低コスト培地・試薬等(リプロセル・日産化学他)	分化誘導法の小分子代替(和光純薬)	- DiSC法 - 三次元細胞構築(サイフューズ)
培養 プロセス 最適化	- 接着培養システム(ニプロ) - 分離精製システム(OCBT) - 凍結保存システム(太陽日酸等) - 搬送システム(JMS・玉井化成)	10Lバイオリアクター(富士フイルム)	1Lバイオリアクター(富士フイルム)
品質評価 の効率化	- 検査ロットの大規模化 - ゲノム・エピゲノム品質評価キット(タカラバイオ) - 品質管理システム(タカラバイオ) - 製造工程管理システム(PPE)		

3つのコスト低減アプローチを組み合わせ、事業性を向上

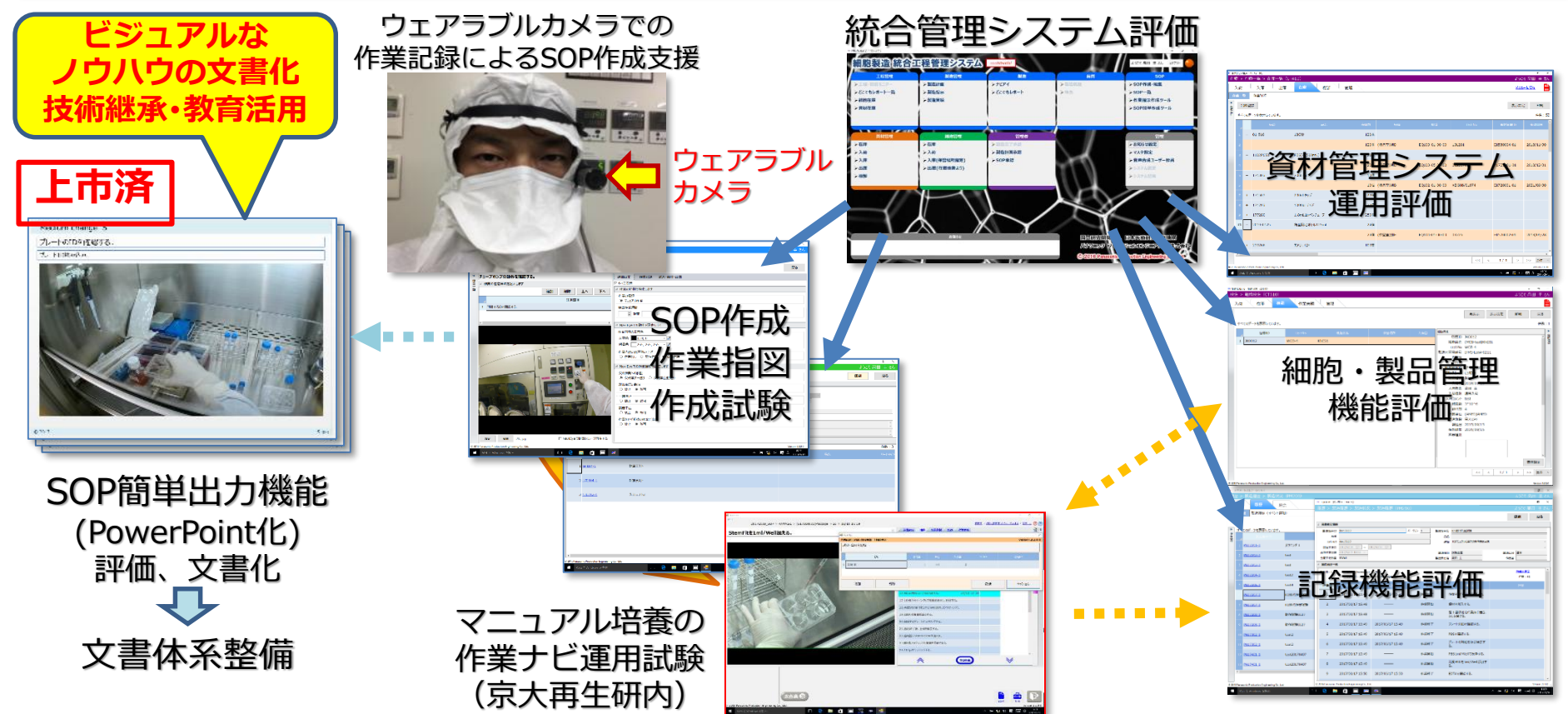
⑨製造工程システム開発 (臨床用細胞製品の製造工程管理システム開発)

- 臨床グレード細胞製品生産プロセスのSOP等の作成管理
(京大・パナソニックプロダクションエンジニアリング) 実用化(1)
- 細胞製造工程管理システムの開発
(パナソニックプロダクションエンジニアリング・京大)
⇒午後ポスター発表

製造工程における品質管理
臨床グレード細胞製品生産プロセスのSOP等の作成管理

目標：
京大ウイルス・再生研で構築してきた臨床グレードヒトES細胞製品の生産プロセスシステムを
ベースに、細胞製品の大量培養のプロセス、品質管理システムを整備する。
集中研での実際の製品製造を想定し、プロトタイプを構築する。

成果：
製造管理システムの集中研での実装を完成させ、運用を試行、検証及び改善を実施



細胞製造工程管理システムの開発 パナソニックプロダクションエンジニアリング

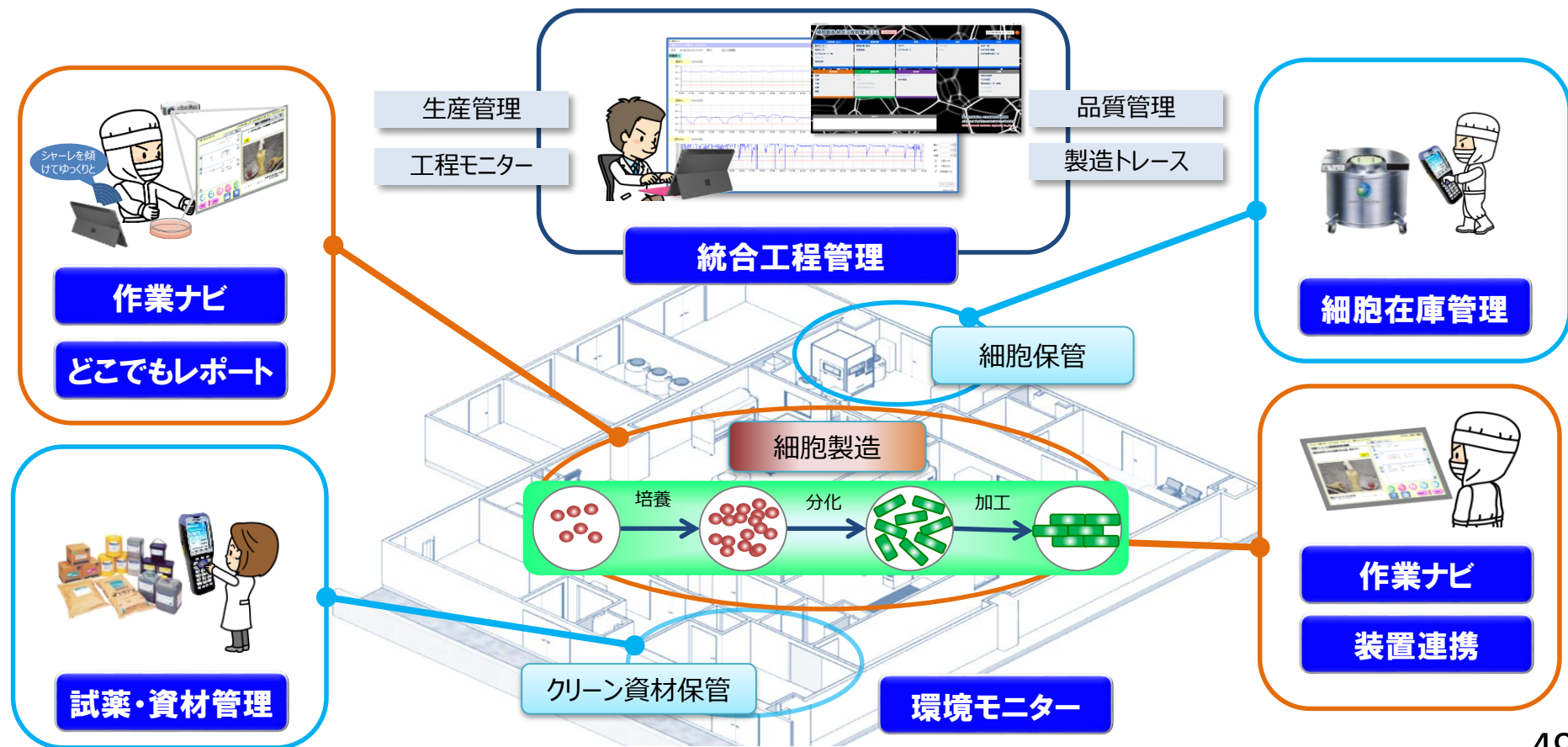
再生医療製品の**製造プロセス全体**について、原材料・製造履歴・品質評価等を**一貫して記録し、統合的なトレーサビリティ**を提供できるシステムを開発

【特長】①作業の高位平準化・人為的ミス防止をサポート

②製造工程で発生する多様なデータを収集・記録し、見える化

③多様な製造形態、多様な製造施設の適応が可能

システムの全体構成



京大中辻AMEDプロジェクト
成果のまとめ
⇒午後ポスター発表

実用化・製品化：15件

