

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム
iPS細胞研究中核拠点(01)
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 再生医療用 iPS 細胞ストック開発拠点
(英語) Core Center for iPS Cell Research

研究開発実施期間: 平成25年4月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 山中 伸弥
(英語) Yamanaka Shinya

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 京都大学 iPS 細胞研究所 名誉所長/教授
(英語) Director Emeritus and Professor, Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University

II 研究開発の概要

(和文)

本拠点は、高品質で安全性の高い再生医療用 iPS 細胞ストックを構築し、臨床応用の実現を目指す機関へのストック供給体制を整備することを通じて、再生医療の実現化に大きく貢献し、さらには我が国における関連産業の発展に寄与することを目的とした。具体的には、初期化メカニズムの解明等に基づく iPS 細胞の高効率樹立法および安全性確認試験法などの開発を通じて、10年間で日本人の約40%に適用でき、さらに欧米での使用可能性もある再生医療用 iPS 細胞ストックを構築し、臨床応用を目指す各機関に提供し、新規医療技術体系として確立することを目指して研究開発を実施した。

研究代表機関である京都大学 iPS 細胞研究所は、研究開発項目1 ①初期化メカニズム解明、②臨床応用可能な分化細胞作製のための分化抵抗性解除技術ならびに分化誘導技術開発、③安全性の高い iPS 細胞の作製に向けた基盤技術開発、研究開発項目2 ⑤高品質で均一な次世代 iPS 細胞の樹立・維持培養法の開発、研究開発項目3 ②HLA ゲノム編集による低抗原性 iPS 細胞作製を担当し、以下の成果を得た。

初期化メカニズム解明においては、マルチオミクス解析、空間トランスクリプトーム解析、CRISPRi 法などを用いて網羅的・多層的に多能性幹細胞の初期化・未分化維持状態の解析を行った。初期化因子の1つである MYCL において、N 末側の機能ドメインが初期化に重要であることを明らかにした。また、KLF4 が結合する因子を同定し、KLF4 がそれらの因子と協調的に働くことで初期化を制御していることを明らかにした (Akifuji

et. al., Scientific Reports, 2021)。多能性幹細胞で mRNA 量とたんぱく質量が相関していない遺伝子群が多能性幹細胞の生存に必須であること (Iwasaki et. al., iScience, 2022)、翻訳開始因子 NAT1 がヒト iPS 細胞の未分化能維持や神経分化能の制御に関与することを明らかにした (Takahashi et. al., Cell Reports, 2020)。また、ヒト iPS 細胞樹立過程における DNA メチル化異常を検出し、その DNA メチル化異常を回避する体細胞初期化方法 (Yagi et. al., Stem Cell Reports, 2019) や、DNA メチル化酵素の機能の違いを明らかにする手法を開発し (Yagi et. al., Nature Communications, 2020)、iPS 細胞の新たな評価手法の開発に繋がる可能性を示した。これらの取り組みにより、初期化効率や iPS 細胞品質の向上につながる成果を挙げた。

臨床応用可能な分化細胞作製のための分化抵抗性解除技術ならびに分化誘導技術開発については、iPS 細胞の持つ分化指向性や分化抵抗性のメカニズムを解明し、目的とする分化細胞を作製する技術開発を行った。これまでに、iPS 細胞から HLA クラス I の型を問わずに輸血可能な血小板の作製方法 (Suzuki et. al., Stem Cell Reports, 2020)、骨形成過程の可視化と骨形成不全症の病態再現を行い、体節を経て骨、軟骨、腱及び靭帯等の骨格関連分化細胞の前駆細胞である硬節細胞を誘導する方法 (Kawai et. al., Nature Biomedical Engineering, 2019)、培養法や遺伝子改変法の改良による iPS 細胞由来 CD8T 細胞の抗腫瘍効果向上の確認 (Ishikawa et. al., Cell to Cells, 2022) など、様々な分化細胞を対象に、分化指向性と関連したマーカー等の同定や、分化抵抗性の原因解明とその解除方法の開発を行い、将来の再生医療や創薬応用に資する、より有効性・安全性の高い分化細胞を選択する方法を開発した。

安全性の高い iPS 細胞の作製に向けた基盤技術開発については、プライム型/ナイーブ型のヒト多能性幹細胞を用いたマルチオーム解析 (単一細胞レベルでの発現および ATAC-seq の同時解析) データおよび DNA メチル化データを統合した解析を実施し、それぞれの細胞に特徴的な染色体構造と DNA メチル化の関連性を明らかにした。また、マイクロ RNA 発現パターンに基づく細胞種を識別・選別する技術の開発を行い、複数のマイクロ RNA に基づくより精密な細胞の識別を実現した (Ohno et. al., Nucleic Acids Research, 2023)。加えて、合成 RNA を用いてゲノム編集を行う手法の確立や、CRISPR-Cas3 の化学修飾等により、遺伝子編集効率の向上や非特異的ゲノム編集を回避する技術を確立した。このように、最先端のゲノム編集技術や分子デザイン RNA 技術を用いて、より安全性の高い iPS 細胞作製に向け開発を実施し、着実に成果を挙げた。

高品質で均一な次世代 iPS 細胞の樹立・維持培養法の開発については、フィーダーフリーの環境下で体細胞からナイーブ型ヒト iPS 細胞を樹立・維持培養する方法を確立した (Kunitomi et. al., Cell Reports Methods, 2022、高島ら特許出願済み)。このように、臨床応用可能な次世代 iPS 細胞の作製に向け、様々な取り組みを行い、期待された効果が認められた。

分担機関の京都大学 iPS 細胞研究財団 (CiRA_F) では安全性の高い再生医療用 iPS 細胞の作製と供給に関する研究開発項目 2 : iPS 細胞の作製法および評価法、分化細胞のゲノム評価法の確立、3 : 免疫学的解析、4 : iPS 細胞ストックの構築と供給を担当し、以下の成果を得た。

細胞移植による免疫拒絶のリスクを最小限とすべく、①HLA ホモ iPS 細胞ストック、②HLA ゲノム編集 iPS 細胞ストックの作製を進めた。このうち①HLA ホモ iPS 細胞ストックに関しては、研究用細胞ストックを 68 機関・70 プロジェクトに、また臨床用細胞ストックを 30 機関・32 プロジェクトに提供しており、多くのアカデミアや企業において臨床開発が進められ、現在本ストックを用いて 10 以上の臨床研究が進行中であることから、iPS 細胞由来分化細胞移植に関する Proof of Concept (POC) の獲得や First in Human (FIH) の実施において重要な役割を果たしている。また、本事業による支援により、アカデミアには無償で、営利機関には 1 本 10 万円と低価格で提供を行うことが可能となった。その結果、再生医療への企業の参入障壁を下げることができ、多くの機関に本ストックを利用していただくことで、結果として iPS 細胞の再生医療で日本は世界を牽引する立場に

立つことが出来たと考える。②HLA ゲノム編集 iPS 細胞ストックは HLA ホモ iPS 細胞ストックの HLA-A, B, CIITA をゲノム編集したもので、約 10 種類で世界の大半の HLA 型をカバーするという大きなメリットを有している。HLA ゲノム編集による低抗原性 iPS 細胞作製については、CRISPR-Cas9 を用いた HLA 編集 iPS 細胞の製造テストの結果を論文報告した (Kitano et. al., Mol Ther Methods Clin Dev, 2022)。現在、研究用細胞ストックを提供中である (25 機関、32 プロジェクトに提供)。臨床用 HLA ゲノム編集 iPS 細胞 2 株についてもセルバンクを構築し、令和 5 年 6 月提供開始予定である。また、米国ドナー血液由来・センダイウイルスベクターで製造した臨床用 iPS 細胞 2 株のセルバンクを構築し、令和 5 年 4 月提供開始予定である。このように、本事業の成果は着実に臨床応用へと移行している。

本拠点は、臨床用の iPS 細胞および分化細胞を製造・評価する中核組織として、品質システムの確立、各種文書体系の構築、製造や品質評価に関する技術・ノウハウの蓄積等を行ってきた。また施設面では再生医療等安全性確保法に基づく細胞培養加工施設の許可のみならず、薬機法に基づく再生医療等製品の製造業許可も取得し、非臨床から商用製造まで柔軟な対応が可能となった。iPS 細胞製造における記録、データ管理の効率化や作業の機械化・自動化について取り組んだ。iPS 細胞の培養・品質評価方法の構築・標準化については、日米欧の規制要件への適合や、ゲノム解析の自動化を進め、クラウド環境も整備し飛躍的に処理速度及び処理量を高め、蓄積してきたデータを駆使することで精度も高めた。更に RNA やエピゲノム解析法を開発し評価可能とした。また、品質評価の受託についても依頼受領から解析、解析結果提供までを遅滞なく行う手順を確立し、令和 4 年度実績として計 79 件の評価を行った。

iPS 細胞ストックおよび分化細胞に関する規制対応については、薬事規制に関して、iPS 細胞の米国マスターファイル登録の準備を進めた。知財関連では、閉鎖系培養装置に適した培養法に関する重要な出願を行った。また iPS 細胞ストックを用いた再生医療の実施において将来障壁となり得る他者特許について、権利者との交渉を進めた。アウトリーチ活動については、iPS 細胞からドーパミン神経・肝細胞・血管内皮への分化誘導プロトコールや FDA 情報、当財団の学会および論文情報などを公表した。特に今年度は中核拠点 10 年間のまとめとして、iPS 細胞ストックの総括論文を作成し査読付きジャーナルで公表した (Yoshida et al., Med (2022))。また細胞製造に関わる実務者間の交流を目的とした「情報交換会」を定期的で開催し、活発な意見交換を行った。

これら蓄積した多くの技術や情報をアカデミア・企業と共有することにより、再生医療の実用化に貢献できたと考えている。今後もこれまでの技術の蓄積を生かしつつ、iPS 細胞のさらなる品質向上や、より分化機関のニーズに合った iPS 細胞の製造に取り組むことが可能となり、一層の再生医療の推進に貢献できると考える。

(英文)

The Center for iPS Cell Research and Application (CiRA) at Kyoto University and the CiRA Foundation (CiRA_F) have established a high-quality, safe cell stock of iPSCs for cell therapy and a system to implement regenerative medicine and develop related industries.

CiRA research accomplishments:

Elucidating reprogramming mechanisms: CiRA has been characterizing the fine details of reprogramming: initialization of iPS cells, maintenance of the undifferentiated state, and functions of reprogramming and related factors to advance basic and applied biomedical science.

Developing technologies to generate differentiated cells for clinical applications: CiRA has been developing technologies to produce a wide range of differentiated cell types from iPSCs and establishing highly efficient and safe methods to manufacture specific differentiated cells for cell therapy.

Developing basic technology to generate safe iPS cells: CiRA has been developing new technologies, based on cell characteristics and genome analysis, to improve the safety of iPS cells.

Developing methods to establish and maintain next-generation iPS cells: CiRA has been working to establish next-generation iPS cells and develop novel culture methods to produce high-quality cell lines with low variability.

Meanwhile, CiRA_F focuses its research efforts on optimizing the generation and supply of iPSCs for regenerative medicine: CiRA_F engages in the establishment of methods for the generation and evaluation of iPSCs, genomic evaluation of differentiated cells, immunological analysis, and the establishment and supply of iPSC stocks.

CiRA_F has been producing HLA homologous iPS cell stocks and HLA genome-edited iPS cell stocks and providing them to multiple institutions. HLA homologous iPS cell stocks include research and clinical cell stocks used in many clinical studies. Furthermore, HLA genome-edited iPS cell stocks have low antigenicity through genome editing of HLA and can cover the majority of HLA types in the world.

CiRA_F serves as a core organization for iPS cell production and evaluation by establishing quality control and documentation systems and accumulating technology and know-how. CiRA_F is also involved in facility licensing, efficiency and automation initiatives, contracted quality evaluations, and regulatory compliance.

CiRA and CiRA_F have made great strides in many research areas and supported the entry of many clinical research trials and companies. Furthermore, we have contributed to the practical application of regenerative medicine through technology and information sharing and will continue our efforts on quality improvements and response to new needs.