

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：iPS細胞・体性幹細胞由来再生医療製剤の新規品質評価技術法の開発

2. 研究開発代表者：森尾 友宏(東京医科歯科大学大学院発生活達病態学分野)

3. 研究開発の成果

- (1) ウイルス・マイコプラズマ・細菌真菌検査のリアルタイム PCR 系プラットフォームでは通常の 96 well フォーマットに適合した 12 well 型 PCR ストリップを用い、ウイルス、マイコプラズマ、細菌、真菌の同時検出系のプロトタイプを作成した。また核酸抽出工程において微生物由来 RNA 抽出法の最適化を行い、細菌、真菌で従来法に比べて 50~700 倍高い抽出効率を達成した。
- (2) 本学が開発したマルチプレックス PCR 法を応用したマイコプラズマ検出法(TMDU 法)に関し、平成 28 年 4 月に公示される第十七改正日本薬局方に記載の A 法(培養法)B 法(DNA 染色法)の代替法の条件を満たすバリデーション項目のいずれも満たすデータを収集した。さらに日水製薬株式会社より「Myco finder」として 4 月 1 日より発売された。既製品市販キット(MycoTool、MycoSEQ)と比較して、特異性が高く、感度は同等以上、測定時間や総所要時間が短い、サンプル調製が簡単、測定可能なマイコプラズマ種は最も多いことが挙げられる。
- (3) 細菌・真菌検出系では生菌・死菌の区別が行える検査系評価を行った。短期培養法においては Digital PCR を用いて 2 時間以上培養することにより培養前後で菌の増幅を検出可能であることが示された。RNA 検出法では、代表的な細菌、真菌において検証し、RNA の検出法により生菌、死菌判定の可能性を確認した。
- (4) 本プロジェクトより構築されたウイルス、マイコプラズマ検査システムの検証及びデータ収集のため、再生医療実現化ハイウェイ、再生医療実現拠点ネットワークプログラム技術開発個別課題を対象として、山口大学、京都府立医科大学、東京医科歯科大学と連携し、各連携拠点から搬送されてきた 59 サンプルに対しウイルス、マイコプラズマ検査を実施した。
- (5) 低頻度変異検出系の検証においては、継続的な細胞増殖を誘導する遺伝子及びゲノム不安定性に関わる遺伝子として、PMDA 科学委員会が選定した 244 遺伝子(2013 年)を基盤とし、実際には Comprehensive Cancer Design(NimbleGen)に付加する形で 596 遺伝子を網羅した。本年度は、集合知的アプローチにて、次世代シーケンサー特有のエラーを排除する系を、モデル培養システム(滑膜由来間葉系幹細胞)を用いて全エクソン解析にても検証し、intron での変異など有意と言えない変異のみが検出されることを確認した。本 pipeline は東京医科歯科大学の遺伝子解析システムにも移植された。より正確に頻度解析を行える分子バーコーディング法についても、かずさ DNA 研究所から東京医科歯科大学に技術及びシステムが移植された。なお、低頻度変異遺伝子検出系については、今後の安全性評価の在り方に関する検討を踏まえて、対象遺伝子を適宜見直しつつ、追加等により再構築する予定とした。
- (6) 変異の蓄積系においては、KRAS 変異 iPS 細胞と isogenic な iPS 細胞を 15 代継代し、継代毎に 15 passages までサンプルを収集して、以降の本解析の試料を用意した。その他、iPS 細胞増幅時の変異があれば、同様に他の変異が蓄積していないか検証し、変異蓄積系の造腫瘍性獲得能評価における立ち位置を明らかにする予定とした。
- (7) 代表的遺伝子の簡易異常検出系としては、がん抑制因子として代表的な TP53 遺伝子の欠失の定量系を開発・作成した。またその他の代表的な染色体(1p, 2p, 11q, 17q)の欠失、増幅を解析できる系を確立した。
- (8) 付加的な解析として、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析(1000 万リード、0.2x coverage)にて、digital karyotyping を行えるシステムを開発し、その技術を染色体異常を呈する培養体性幹細胞及び元細胞、培養段階細胞にて検証を行った。その結果、短時間で 5%程度の copy number variation を検出できることが明らかになった(かずさ DNA による開発)。同システムは医科歯科大学にも移植予定となった。