

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立
2. 研究開発代表者： 氏名 江良 沢実（国立大学法人 熊本大学発生医学研究所幹細胞誘導分野）
3. 研究開発の成果

1) 臨床研究用 iPS 細胞の収集保存と安全性の高い iPS 細胞の開発

①臨床研究に用いる iPS 細胞の収集と保存 本邦初の iPS 細胞を使った臨床研究に使われた iPS 細胞の受け入れの書類整備と実際の細胞の受け入れ、さらに保存を開始した。

②細胞を安全に保存する技術の開発 I) 保存状態や培養維持条件が iPS 細胞の腫瘍形成能力に与える影響については、腫瘍化能力に関わる分子を2つまでに絞り込めた。また市販の Xeno-free 培養液を用いて、iPS 細胞の安定性ならびに安全性について未分化能・増殖能・均一性・解凍後生存率・染色体異常率について各々検討した。その結果、DEF-CS【タカラバイオ】が評価項目において最も高い評価を得た。II) 安全な保存法へ iPS 細胞の作成技術が与える影響の解析。より安全な iPS 細胞作製ベクターを開発して、それを使って健常者由来 iPS 細胞を樹立した。また市販の保存液を検討した。各保存液で大きな差は認めなかった。すべての市販保存液には、DMSO が含まれるので DMSO の有無で検討したところ、無しの方が細胞の生存率は高いという結果であった。

2) iPS 細胞の保存と分化誘導

① メチオニン除去培地を利用した効率的な内胚葉分化誘導系の構築

分化時に DMSO を利用する新規分化誘導方法を構築し、内胚葉分化因子である Activin の添加量を大幅に削減することに成功した。

② Cer1 ELISA を用いた分化モニタリングと分化効率評価方法（遺伝子発現・免疫染色）との比較

開発済みである Cer1 ELISA による分化モニタリングを組み込んだ再現性がよく、工程管理が容易な内胚葉分化誘導技術を開発した。

③ 新規分化誘導技術の多施設間での利用促進を目指した SOP の作成

構築した膵臓および肝臓への分化誘導技術について培養方法の詳細を論文化した。

④ メチオニン除去後の変化の網羅的遺伝子発現解析・メタボローム解析・プロテオーム解析技術を用いた評価

メタボローム解析からはメチオニン除去により、システイン代謝の下流であるグルタチオン合成の低下が確認され、メチル化反応を伴うオルニチン代謝の阻害も確認した。必須アミノ酸であるトリプトファン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、ヒスチジンをそれぞれ除去した培養液および完全培地を用いて培養した未分化ヒト iPS 細胞から RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を行い、発現プロファイルを得た。

3) 安全性の高い iPS 細胞のエピジェネティック解析

完全（安全）な iPS 細胞では、PML ボディやカハールボディ、核膜が特徴的なタンパク質構成となっていることを明らかにした。安全性の高い iPS 細胞に特徴的な高次エピジェネティックな制御機構が存在することを明らかにした。

4) 細胞の情報管理

我々は、患者の実名登録制度である JaSMIn and MC-Bank（厚労省難治性疾患克服事業）の協力を得て患者背景・血液検査データ・副反応を含む長期的フォローアップデータの収集が可能な体制を構築した。

5) 第3種細胞の寄託を見据えた細胞保管施設の拡充

追加研究費を使い超低温フリーザーや冷蔵庫を購入し施設の機器を拡充した。

6) 主に小児期を中心とした安定性・安全性を保持した保存体制の確立

小児を対象とした再生医療のための安全なサンプリングのマニュアルはなく、我々は採取から搬送までを安全に行うための基盤を確立した。具体的には、無菌採取可能な採血管（BD バキュティナ[®] ブラッドトランスファー）を用いて病院外来で採取を行い、これをそのまま無菌室に搬送することで均一の工程を実現し、12名の患者から採取を行った。

7) 国外開発幹細胞製剤の安定性・安全性の評価および保存体制の確立

海外からの幹細胞の受け入れ体制を樹立し、書類の整備を進めている。

4. その他 特になし。