

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：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）
2. 研究開発代表者：中辻 憲夫（国立大学法人京都大学）
3. 研究開発の成果

(I) 各プロセスにおける個別要素技術開発

培地開発：汎用性の有る接着培養用培地の開発完了。汎用性の有る浮遊培養用培地の開発を開始。bFGFの代替化合物開発ではリード化合物の合成展開とその評価により同等以上の効果があり毒性の少ない化合物の同定に成功。**最大 10¹⁰ 個/バッチの細胞培養が可能**な自動培養装置：中型自動培養装置開発では多能性幹細胞の増殖培養、継代、分化誘導培養の工程を連続的に自動運転することに成功。中大型自動培養装置（リアクター培養、浮遊培養系）：1Lスケールでのプロトタイプ自動培養装置の開発に成功しさらに 10Lスケールの半自動培養装置を開発。ヒト iPSC 未分化細胞維持培養で世界最高水準の拡大培養に成功。**分化誘導**：分化 3 次元スフェア多能性幹細胞からより効率的に心筋細胞を分化誘導するために、最適心筋分化誘導化合物及びジェランガム濃度を検討。大スケール神経細胞分化誘導法の開発では、大量培養と同条件となるジェランガム存在下で分化誘導された神経幹細胞の細胞生物学的評価を実施。京大で確立された多能性幹細胞からの神経前駆細胞への分化誘導法を閉鎖系自動培養装置による神経分化誘導の自動化を検討。1Lスケール拡大培養後の未分化維持ヒト iPS 細胞の心筋細胞へ分化誘導を検討。**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では、工業化しやすい新規化合物を発明し、ヒト多能性幹細胞と各種ヒト分化細胞を使った定量的な選択毒性試験を実施。未分化細胞を除去するネガティブソーティング法改良について実施。**細胞加工技術及び動物モデルでの評価**：蛍光 Ca センサー GCaMP 遺伝子を iPS 細胞に導入し、*in vivo* における移植心筋細胞の電氣的統合について評価するシステムを確立。配向性心筋組織片の正常ヌードラットの心臓への生着及びラット急性期心筋梗塞モデルに移植での心機能改善効果の確認。ニューロスフィアの三次元積層により、神経含有率の高い神経構造体の作製法を確立。**品質管理/評価**：1Lスケールの自動培養多能性幹細胞の分化心筋細胞について高トロポニン陽性心筋細胞が得られ、分化心筋細胞の機能評価として各遺伝子の発現量を定量 PCR 法で解析。1L-10L 自動培養サンプルおよび分化誘導サンプルの染色体解析、RNA 発現解析、CNV/LOH 解析、癌関連遺伝子エクソーム解析、WGS 解析等を行い、品質評価データ取得と解析およびフィードバックを実施。染色体解析中心に新規技術開発。集中研での製造システムを想定した製造工程、品質管理、データ管理の各 SOP 及びシステムのプロトタイプ作成を実施。テラトーマ形成可能な最小細胞数の検討。**保存及び輸送**：京都大学再生研の開発した凍害保護成分を含むヒト iPS 細胞用の凍結保存液を、2015 年 8 月にリプロセルが販売開始。神経幹細胞、心筋細胞及び心筋組織片の搬送容器開発、搬送システム開発を実施。**市場・競合の評価・予測**：心不全：慢性心不全患者及び脊髄損傷：脊髄完全損傷入院患者についての多項目調査を実施し、事業化戦略検討に反映。

(II) 個別要素技術と開発機器を組み合わせ、全体を連結して一貫管理する、細胞製品製造システムの構築、及び信頼性の確立とコスト評価

集中研に必要な機能に関する設計を実施。具体的な施設規模や製造環境を定義。集中研に合わせたシステムの具体的検討実施。集中研での製造システムを想定した製造工程、品質管理、データ管理の各 SOP 及びシステムのプロトタイプ作成を実施。事業性のパイロット検証（各種用件の定義付け）、事業シナリオ案の検討（検討条件・想定）、事業性のパイロット検証（コスト試算前提）について検討。