

201306004B

厚生労働科学研究費補助金  
(再生医療実用化研究事業)

ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の  
汎用性向上のための基盤技術の創成

平成23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成26(2014)年4月

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の  
汎用性向上のための基盤技術の創成

平成23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成26（2014）年4月

# 目 次

I. 総合研究報告書	
ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の汎用性向上のための 基盤技術の創成 .....	3
梅澤 明弘	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	15
III. 研究成果の刊行物・別刷 .....	19

# I. 総合研究報告書

## ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の汎用性向上のための 基盤技術の創成（H23-再生-一般-004）

研究代表者：梅澤 明弘

独立行政法人国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部長

**研究要旨：**細胞・組織加工医薬品等による再生医療は、ヒトの臓器や組織の確保が難しいわが国の医療状況下において強く期待されており、研究の進歩に伴う技術的な実現可能性の高まりとともに、医療としての実用化を望む声ますます強くなっている。その中で、わが国をあげて再生医療の実用化に向けた動きが急速に進められており、特にヒト由来の多能性幹細胞、すなわち間葉系幹細胞、胚性幹細胞（ES 細胞）について、近い将来に予想される製品の評価を円滑に進めるための準備を早期に行う必要がある。各種幹細胞の実用化のために必要な要件を開発初期から示すことは、これらをより迅速に実用化するために必須である。本研究では原材料及び製造関連物質、製造工程、加工した細胞の特性解析、最終製品の形態・包装、製造方法の恒常性及び妥当性、製造方法の変更、製造施設・設備の概要、感染性物質の安全性評価、最終製品の品質管理法、試験方法のバリデーション、規格及び試験方法の妥当性、試験に用いた検体の分析結果、細胞・組織加工医薬品の非臨床安全性試験、細胞・組織加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験、細胞・組織加工医薬品等の体内動態、臨床試験に関して詳細に検討し、細胞医療の安全性及び有効性に関するデータの蓄積と周辺基盤技術を構築する。小児難治性疾患（特に先天性代謝異常症）に対する再生移植療法応用を視野に入れた早期実用化に資することを目的とし、研究を実施した。

### 研究分担者

佐藤陽治（国立医薬品食品衛生研究所 部長）

末盛博文（京都大学 准教授）

### A. 研究目的

細胞・組織加工医薬品等による再生医療は、ヒトの臓器や組織の確保が難しいわが国の医療状況下において強く期待されており、研究の進歩に伴う技術的な実現可能性の高まりとともに、医療としての実用化を望む声ますます強くなっている。その中で、わが国をあげて再生医療の実用化に向けた動きが急速に進められており、特にヒト由来の多能性幹細胞、すなわち間葉系幹細胞、胚性幹細胞（ES 細胞）について、近い将来に予想される製品の評価を円滑に進めるための準備を早期に行う必要がある。各種幹細胞の実用化のために必要な要件を開発初期から示すことは、これらをより迅速に

実用化するために必須である。「細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確認申請記載要領（薬食審査発 0420 第 1 号平成 22 年 4 月 20 日）」に従い、ES 細胞の安全性・有効性に関する検討を行う。具体的には原材料及び製造関連物質、製造工程、加工した細胞の特性解析、最終製品の形態・包装、製造方法の恒常性及び妥当性、製造方法の変更、製造施設・設備の概要、感染性物質の安全性評価、最終製品の品質管理法、試験方法のバリデーション、規格及び試験方法の妥当性、試験に用いた検体の分析結果、細胞・組織加工医薬品の非臨床安全性試験、細胞・組織加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験、細胞・組織加工医薬品等の体内動態、臨床試験に関して詳細に検討し、細胞医療の安全性及び有効性に関するデータの蓄積と周辺基盤技術を構築する。特に小児難治性疾患（特に先天性代謝異常症）に対する再生移植療法応用を視野に入れた早期実用化に資す

ることを目的とする。

## B. 研究方法

### B-1 原材料及び製造関連物質、製造工程、加工した細胞の特性解析

臨床試験研究に提供できる新たなES細胞の培養を行う。特に、幹細胞を未分化状態に保つための維持培養に必須の要素について検討を行う。

### B-2 細胞・組織加工医薬品の非臨床安全性試験

ヒトES細胞株に関して感染症について検査し、否定試験を行う。

### B-3 ヒトES製剤の製造方法

ヒトES製剤の製造方法について検討を行う。

#### (倫理面への配慮)

#### 1. ES細胞に関する倫理

国立成育医療研究センターでは「ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づき、ヒトES細胞に関する医学研究が適性に行われるよう、ヒトES細胞研究倫理審査委員会が組織されている。ヒトES細胞研究に関する各種規程(「ヒトES細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒトES細胞樹立に関する規程」、「ヒトES細胞分配に関する規程」、「ヒトES細胞使用に関する規程」)も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う(国立成育医療センターヒトES細胞研究倫理審査委員会：<http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm>)。申請者らは、当該センターが定期的(年2回以上)に開催している生命倫理に関する講演を受講し、適切な生命倫理観を身につけ常に配慮し研究を実施する。

国立成育医療研究センター(機関内番号ES倫2)  
文部科学大臣確認番号：18 諸文科振第 832 号

#### 2. ヒト細胞を用いることに対する倫理的配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認か

つ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(国立成育医療研究センター受付番号 49、平成15年10月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認、受付番号197、平成18年6月承認、受付番号201、237、238、平成19年6月承認)。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う予定である。

#### 3. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号 2003-002,2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

## C. 研究結果

### C-1 原材料及び製造関連物質、製造工程、加工した細胞の特性解析

既に、樹立されたヒトES細胞を用いた。臨床試験研究に提供する新たなES細胞の培養工程に関する検討を行った。ES細胞、フィーダー細胞ならびに必須液性因子からなる閉鎖系培養ユニットの開発に着手し、特に培養に使用する試薬類、細胞剥離に使用する薬剤、細胞凍結に使用する薬剤についての洗い出しを行い、ゼノフリー環境を構築した。来年度以降に未分化度試験、細胞純度試験をパッケージとして行う予定である。

## C-2 細胞・組織加工医薬品の非臨床安全性試験

ヒト ES 細胞株に関して感染症について検査し、否定試験を行った。細菌・真菌否定試験(好気性)、細菌・真菌否定試験(嫌気性)、糸状性真菌否定試験、エンドトキシン、マイコプラズマ否定試験、培養細胞ウイルス否定試験(HCV-RNA、HBV-DNA、パルボウイルス DNA、HTLV-1 プロウイルス DNA、HIV-1 プロウイルス DNA)を行い、すべて陰性であった。

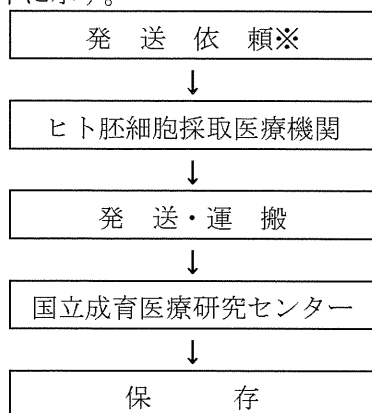
## C-3 ヒト ES 製剤の製造方法

### C-3-1 原材料および製造関連物質

原材料は独立行政法人国立成育医療研究センターにて、ヒト胚から樹立された ES 細胞 (SEiiiES3) である。使用した胚は、体外受精による不妊治療において、母体に戻されず凍結保存されている胚のうち破棄されることが決定した余剰胚である。正常なヒト胚由来細胞から作成される ES 細胞は無限に増加する特性を有しているうえに、正常な機能を有する多様な細胞への分化能をもつ細胞である。また、均質な細胞集団として大量培養が可能であり、これをバンキングすることにより長期安定して供給することが可能となる。従って、ヒト ES 細胞を原材料とすれば、対象疾患の治療に必要な細胞の製造を大量かつ安定的に行うことが可能である。

### C-3-2 胚細胞の保存方法

医療機関で採取されたヒト胚細胞を当研究センターが受領し、適切に保存するまでのフローを以下に示す。



※体外受精による不妊治療において、母体に戻されず凍結保存されている胚のうち破棄されることが決定した余剰胚がある旨の連絡が医療機関からくると、国立成育医療研究センターでは、倫理委員会の承認のもと、その入手を決定した場合には、当該細胞の発送依頼を文書にて行う。

### C-3-3 目的とする細胞以外の原材料及び製造関連物質

目的とする細胞以外のすべての原材料及び製造関連物質は、表 1. の通りである。

表 1. 目的とする細胞以外のすべての原材料および製造関連物質の一覧

	原材料名・製造関連物質名	医薬品、試薬の区別	供給元	用途
培養に使用	DMEM/F12	試薬	インビトロジェン	フィーダー
	ウシ胎児血清 (生物由来成分)	試薬	HyClone	フィーダー
	GlutaMAX™-1	試薬	インビトロジェン	フィーダー、SEiiiES、HAES
	MEM Non-Essential Amino Acids	試薬	インビトロジェン	フィーダー、SEiiiES、HAES
	Knockout DMEM	試薬	インビトロジェン	SEiiiES、HAES
	KNOCKOUT™ Serum Replacement (生物由来成分)	試薬	インビトロジェン	SEiiiES
	ペニシリン/ストレプトマイシン	試薬	インビトロジェン	SEiiiES、HAES
	Sodium Pyruvate Solution	試薬	インビトロジェン	SEiiiES、HAES
	Recombinant Human bFGF	試薬	インビトロジェン	SEiiiES、HAES
	KNOCKOUT™ Serum Replacement -XenoFree (生物由来成分)	試薬	インビトロジェン	HAES
	IGF1 (recombinant)	試薬	Sigma-Aldrich	HAES
	Heleglin beta1 (recombinant)	試薬	R&D Systems	HAES
	L-Ascorbic acid	試薬	シグマ	HAES
	PBS(Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> 不含有)	試薬	インビトロジェン	フィーダー
細胞処理用	TrypLE Select (Recombinant)	試薬	インビトロジェン	フィーダー細胞、HAES
	ディスパーゼ II	試薬	エーデアイ	SEiiiES
細胞凍結用	セルバパンカー	試薬		SEiiiES、HAES
基質	医療用コラーゲン	医薬品	ニッポンハム	SEiiiES

### C-3-4 ヒト胚細胞（及びES細胞）の培養に使用する培地の組成

表 2. にヒト胚細胞及びES細胞の培養に使用する培地の組成を示す。

表 2. ヒト胚細胞（及びES細胞）の培養に使用する培地の組成

成分名	分量	承認番号・規格等	供給元
KnockoutDMEM 培地		製品名 Knockout DMEM 規格は製造元規格による。	(株)インビトロジエン
KNOCKOUT™ Serum Replacement (血清代替物)	20%	製品名 Knockout Serum Replacement 規格は製造元規格による。	(株)インビトロジエン
ヒトbFGF (遺伝子組み換え)	10ng/ml	製品名 HU FGF BASIC FULL LENGTH 規格は製造元規格による。	(株)インビトロジエン
NEAA (非必須アミノ酸)	100µM	製品名 MEM 非必須アミノ酸溶液 規格は製造元規格による。	(株)インビトロジエン
ピルビン酸ナトリウム	1mM	製品名ピルビン酸ナトリウム溶液 100mM 液体 規格は製造元規格による。	(株)インビトロジエン
グルタミン	2mM	製品名 GULTAMAX I 200mM 規格は製造元規格による。	(株)インビトロジエン
ペニシリン/ストレプトマイシン		製品名ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 規格は製造元規格による。	(株)インビトロジエン

### C-3-5 マウス胎児繊維芽細胞（MEF）及びフィーダー細胞の培養に使用する培地の組成

表 3. に MEF およびフィーダー細胞の培養に使用する培地の組成を示す。

表 3. MEF 及びフィーダー細胞の培養に使用する培地の組成

成分名	分量	承認番号・規格等	供給元
DMEM/F12 培地		製品名 DMEM/F12 規格は製造元規格による。	(株)インビトロジエン
ウシ胎児血清 (生物由来成分)	10%	製品名 規格は製造元規格による。	Hyclone
NEAA (非必須アミノ酸)	100µM	製品名 MEM 非必須アミノ酸溶液 規格は製造元規格による。	(株)インビトロジエン
グルタミン	2mM	製品名 GULTAMAX I 200mM 規格は製造元規格による。別紙規格 参照	(株)インビトロジエン

### C-3-6 原材料由来物質

残存する可能性がある原材料由来物質の種類は、以下のとおりである。

### 特定生物由来原料

- ・KNOCKOUT™ Serum Replacement (KSR)ーXeno Free

### 生物由来原料

- ・ウシ胎児血清
- ・ディスプレイゼ
- ・遺伝子組換えヒトbFGF
- ・遺伝子組み換えIGF1
- ・遺伝子組み換えHegelein beta1
- ・遺伝子組み換えTrypLE Select
- ・医療用コラーゲン

### 抗生物質

- ・ペニシリン（抗生物質）
- ・ストレプトマイシン（抗生物質）

### その他リスクレベルが高いと考えられる培地由来物質

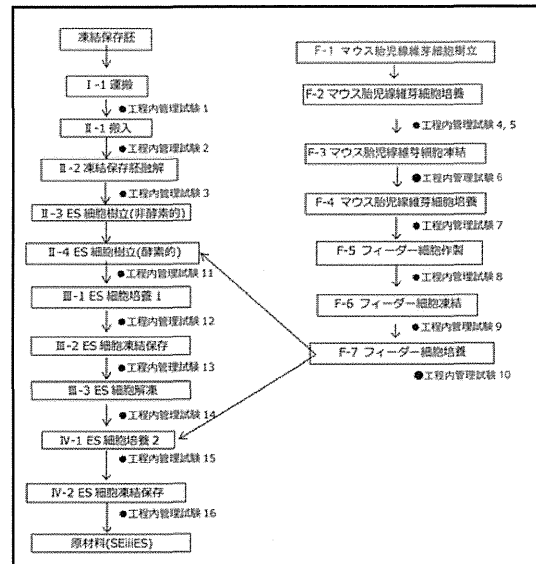
- ・KNOCKOUT™ Serum Replacement (KSR)
- ・セルバンカー（確認中）

### リスクレベルが低いと考えられる培地由来物質

- ・無機塩類、糖質、アミノ酸、ビタミン類

### C-3-7 原材料となる細胞の作製方法

以下に原材料となる細胞の作製のワークフローを示す。





### **I-1 凍結保存胚運搬工程**

担当医師より第三者立ち会いのもと、凍結保存胚の入った輸送用凍結保存容器を受け取った作業者は、受領証明書に記載漏れが無いことを確認し必要事項を記載する。輸送用凍結保存容器は専用輸送ケースに静置する。適切な交通手段によって、温度-100℃以下で 24 時間以内に製造場所へ運搬する。

### **II-1 凍結保存胚搬入工程**

(標準所要時間 10 分)

第三者立ち会いのもと、輸送用凍結保存容器から凍結保存胚を液体窒素保存用タンク内に保存する。輸送用凍結保存容器から取り出したチューブの肉眼検査（凍結チューブ数、破損の有無、凍結液の性状）を実施する。凍結保存胚移送記録書に項目を記載する。

### **II-2 凍結保存胚融解工程**

(標準所要時間 60 分)

融解後の胚培養用プレートを準備し、CO<sub>2</sub> インキュベータ (37℃) に入れる。専用の凍結胚融解プロトコールに従い無菌的に行う (Cryotop Safety Thawing Kit)。全ての操作は、安全キャビネット内で行う。融解後回収した胚は胚培養用培地で CO<sub>2</sub> インキュベータ (37℃) 内で適切な時期まで培養を行う。融解胚の性状を記載する。

### **II-3 ES 細胞樹立 (非酵素的) 工程**

(標準所要時間 20~40 日間)

胚盤胞期まで発生した胚の内部細胞塊 (ICM) を選択的に採取し、放射線処理したマウス胎児線維芽細胞を播種した培養プレート上で ES 細胞培地下に CO<sub>2</sub> インキュベータ (37℃) 内で培養する。増殖してきた細胞塊を分離し新たな培養プレートで培養し細胞を増やす。その際、ES 細胞は細胞が集団を形成 (コロニー) し増殖するため、培養プレート内では複数の特徴的なコロニー群が観察される。

### **ステップ 1 : 培養**

II-3 の ICM を ES 細胞用培地 500μl を加えた IVF 4-well 培養プレート (以下、4-W プレートとする) に播種する。2 日目以降、毎日、各 4-W プレートの培地を ES 細胞用培地①300 培地で培地交換して、適度な大きさに達するまで最長 14 日間培養する。

初代培養に必要な期間には個体差・サンプル差があるが、通常は初代培養開始後 7~10 日で 4-W プレート内で分離継代できる状態に達する。

4-W プレートを毎日観察することにより培養液に濁りが無いことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

### **ステップ 2 : 非酵素的継代**

4-W プレート内の増殖した ICM を無菌的にグラスピペットで小片毎に分離し新たな 4-W プレートで培養する。コロニー数が 7 個/ウェル以上で 4-W プレートから 35mm プレートへ播種する。更に、良好なコロニーが 10 個/35mm プレート以上増殖する場合は、60mm プレートで培養する。増殖細胞塊を分離する全ての操作は、安全キャビネット内で行う。

### **II-4 ES 細胞樹立 (酵素的) 工程**

(標準所要時間 30~60 日間)

35mm プレートまたは、60mm プレート内の培地を除去し、各プレート内を PBS 液 2-4mL にて 2 度洗浄する。2.0PU (Protease Unit) /mL ディスパーゼ II 処理液を加えて 37℃で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞が剥離し始めるのが観察された後に、ゆっくりピペット操作を行って ES 細胞様コロニー形成細胞を培養プレート底面から剥離し、細胞浮遊液を ES 細胞用培地 6-8mL の入った培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地 4mL を加えて細胞を浮遊し、新たなプレートで培養する。

#### F-1 マウス胎児線維芽細胞(MEF)樹立工程

妊娠マウス 2 匹より、13 日齢胎児を剖出する。実体顕微鏡下でハサミ、ピンセットを用いて胎児の頭部および内臓を切除する。残りの組織を新しい Dish に移し、Tryple Select 処理液を 5ml 加えて、37°C で酵素処理を行う。大部分が懸濁状態になった後に MEF 培地を 20ml 加えて培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地 30mL を加えて細胞を浮遊し、100mm プレートに播種する。CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養する。

#### F-2 マウス胎児線維芽細胞(MEF)培養工程

インキュベーターのプレートを取り出して、位相差顕微鏡下で観察する。プレート表面の少なくとも 90%が細胞の層で覆われている場合は、凍結作業に進む。90%未満の場合は、細胞が成長するまで数日待つ。1 日おきに培地を吸引し、新鮮な MEF 培地と交換する。

#### F-3 マウス胎児線維芽細胞凍結工程

MEF 培地を吸引後、PBS で一度洗浄する。Tryple Select 処理液を 2mL 加えて、37°C で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞の剥離が観察された後に、MEF 培地 10mL を加え、ゆっくりピペット操作を行って MEF を培養プレート底面から剥離し、培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地 10mL を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に凍結保存培地を  $4 \times 10^6$  cells/mL となるように加え、凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。

分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて-80°Cの超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80°Cに凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

#### F-4 マウス胎児線維芽細胞(MEF)培養工程

液体窒素保存用タンク内から III-4 で保存し

た凍結保存チューブを取り出し、37°Cの恒温水槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液と等量の MEF 培地を加える。この細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地 10mL を加えて細胞を浮遊し、100mm プレートに播種する。プレート表面の少なくとも 90%が細胞の層で覆われている場合は、放射線照射処理に進む。90%未満の場合は、細胞が成長するまで数日待つ。1 日おきに培地を吸引し、新鮮な MEF 培地と交換する。

#### F-5 フィーダー細胞作製工程

MEF 培地を吸引後、PBS で一度洗浄する。Tryple Select 処理液を 2mL 加えて、37°C で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞の剥離が観察された後に、MEF 培地 10mL を加え、ゆっくりピペット操作を行って MEF を培養プレート底面から剥離し、培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地 10mL を加えて細胞を浮遊し、HEPES を加える。丸底チューブに細胞を移し、ふたをする。丸底チューブをビーカーに移動し、30Gy の放射線処理を行う。

#### F-6 フィーダー細胞凍結工程

30Gy の放射線処理が終了したのち、細胞数及び生存率を決定する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に凍結保存培地を  $4 \times 10^6$  cells/mL となるように加え、凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。

分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて-80°Cの超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80°Cに凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

#### F-7 フィーダー細胞培養工程

液体窒素保存用タンク内から III-6 で保存した凍結保存チューブを取り出し、37°Cの恒温水槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液と等量の

MEF 培地を加える。この細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に MEF 培地 10mL を加えて細胞を浮遊し、100mm プレートに播種する。

### III-1 ES 細胞培養工程

60mm プレート内の培地を除去し、各プレート内を PBS 液 2-4mL にて 2 度洗浄する。2.0PU (Protease Unit) /mL ディスパーゼ II 処理液を加えて 37°C で酵素処理を行う。

上記酵素処理後、ゆっくりピペット操作し、ES 細胞コロニーを分散する。コロニーが分散されたディスパーゼ浮遊液に ES 細胞用培地 10mL を加えて酵素反応を停止する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地を加えて細胞を再浮遊し、新たなプレートへ播種する。

なお、細胞の遠心・洗浄操作は常温 (15~25°C) で行う (以下、同様)。培養フラスコを毎日観察することにより培養液に濁りがないことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

### III-2 ES 細胞凍結保存工程

#### 回収

60mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、II-4 と同様に細胞の酵素処理を行い、沈渣に ES 細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

#### 凍結 (標準所要時間 30-60 分)

60mm プレートから回収した ES 細胞に凍結保存培地を加え、細胞浮遊液を調製後、4°C の凍結保存培地で混合する。この際、 $1.0\sim 2.0\times 10^6$  個/mL の濃度になるように細胞浮遊液を調製する。

混合した細胞浮遊液を凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。

分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて -80°C の超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80°C に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク

内に保存する。

### III-3 ES 細胞解凍工程

#### 解凍 (標準所要時間 2 時間)

液体窒素保存用タンク内から IV-2 で保存した凍結保存チューブを取り出し、37°C の恒温水槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液と等量の ES 細胞用培地を加える。この細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地 5mL を加えて細胞を浮遊する。

### IV-1 培養

(標準所要時間 18~24 日間)

III-3 で調製した ES 細胞浮遊液を 60mm プレートに各 5mL 播種して 37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%air 下にて、60mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態 ( $2.0\sim 3.0\times 10^6$  個/60mm プレート) に達するまで培養する。

培養フラスコを毎日観察することにより培養液に濁りがないことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

培地交換は毎日行う。

#### 継代

継代は 7-10 日に一度実施する。

### IV-2 ES 細胞凍結保存工程

#### 回収

60mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、II-4 と同様に細胞の酵素処理を行い、沈渣に ES 細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

#### 凍結 (標準所要時間 30-60 分)

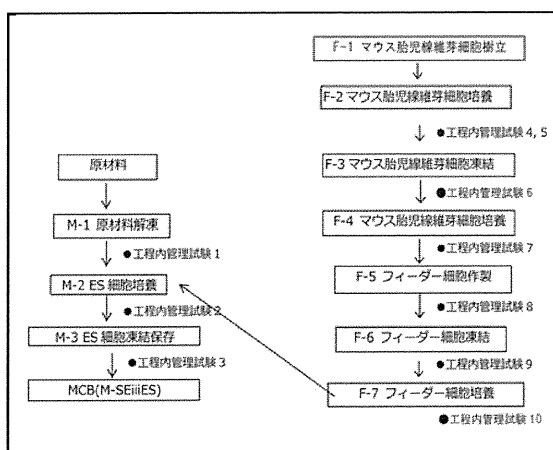
60mm プレートから回収した ES 細胞に凍結保存培地を加え、細胞浮遊液を調製後、4°C の凍結保存培地で混合する。この際、 $1.0\sim 2.0\times 10^6$  個/mL の濃度になるように細胞浮遊液を調製する。

混合した細胞浮遊液を凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。

分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて-80℃の超低温保冷库で凍結する。翌日、-80℃に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

### C-3-8 MCB の作製方法

MCBは原材料となる SEiiiES3 (ヒト ES 細胞) を培養後に得られる均一な細胞ストックである。



#### M-1 原材料細胞解凍工程

解凍 (標準所要時間 30分)

液体窒素保存用タンク内から原材料凍結保存チューブを取り出し、37℃の恒温水槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液と等量の ES 細胞用培地を加える。この細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地 5mL を加えて細胞を浮遊する。

#### M-1 培養工程

(標準所要時間 18~24 日間)

M-1 で調製した ES 細胞浮遊液を加え、60mm プレートに各 5mL 播種して 37℃、5% CO<sub>2</sub>、95% air 下にて、60mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態 (2.0~3.0x10<sup>6</sup> 個/60mm プレート) に達するまで培養する。培地交換は毎日行う。

培養フラスコを毎日観察することにより培養液に濁りが無いことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

#### 継代

継代は週 1 で実施する。MCB から起算して、40 倍以上に増殖するまで培養を継代培養を繰り返す。

#### M-3 MCB 細胞凍結保存工程

#### 回収

60mm プレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、プレート内の培地を除去し、各プレート内を PBS 液 2-4mL にて 2 度洗浄する。2.0PU (Protease Unit) /mL ディスパーゼ II 処理液を加えて 37℃で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞が剥離し始めるのが観察された後に、ゆっくりピペット操作を行って ES 細胞様コロニー形成細胞を培養プレート底面から剥離し、細胞浮遊液を ES 細胞用培地 6-8mL の入った培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を 800rpm、4 分間遠心後、沈渣に ES 細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

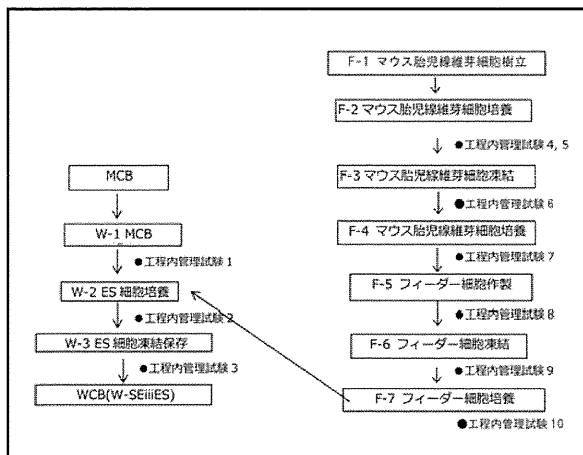
#### 凍結 (標準所要時間 30-60 分)

60mm プレートから回収した ES 細胞に凍結保存培地を加え、細胞浮遊液を調製後、4℃の凍結保存培地で混合する。この際、1.0~2.0x10<sup>6</sup> 個/mL の濃度になるように細胞浮遊液を調製する。混合した細胞浮遊液を凍結保存用チューブに 1.0mL ずつ分注する。分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ (バイセル) に入れて-80℃の超低温保冷库で凍結する。翌日、-80℃に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

これを MCB とする。

### C-3-9 WCB の作製方法

WCBはMCBであるSEiiiES3(ヒトES細胞)を培養後に得られる均一な細胞ストックである。



#### W-1 MCB 細胞解凍工程

解凍 (標準所要時間 30 分)

液体窒素保存用タンク内から原材料凍結保存チューブを取り出し、37℃の恒温水槽内にて急速解凍する。解凍した細胞浮遊液を培養用チューブに集め、細胞浮遊液と等量のES細胞用培地を加える。この細胞浮遊液を800rpm、4分間遠心後、沈渣にES細胞用培地5mLを加えて細胞を浮遊する。

#### W-1 培養工程

(標準所要時間 18~24 日間)

M-1で調製したES細胞浮遊液を加え、60mmプレートに各5mL播種して37℃、5%CO<sub>2</sub>、95% air 下にて、60mmプレート内の細胞密度がほぼ飽和状態(2.0~3.0x10<sup>6</sup>個/60mmプレート)に達するまで培養する。培地交換は毎日行う。培養フラスコを毎日観察することにより培養液に濁りが無いことを確認し、濁りが疑われた場合は直ちに顕微鏡下で微生物の確認を行い、「陽性」の場合には製造を中止することとする。

#### 継代

継代は週1で実施する。MCBから起算して、40倍以上に増殖するまで培養を継代培養を繰

り返す。

#### W-3 WCB 細胞凍結保存工程

#### 回収

60mmプレート内の細胞密度がほぼ飽和状態に達したら、プレート内の培地を除去し、各プレート内をPBS液2-4mLにて2度洗浄する。2.0PU (Protease Unit) /mL ディスパーゼII処理液を加えて37℃で酵素処理を行う。位相差顕微鏡下で細胞が剥離し始めるのが観察された後に、ゆっくりピペット操作を行ってES細胞様コロニー形成細胞を培養プレート底面から剥離し、細胞浮遊液をES細胞用培地6-8mLの入った培養用チューブに回収する。細胞浮遊液を800rpm、4分間遠心後、沈渣にES細胞用培地を加えて細胞を浮遊し、細胞数及び生存率を決定する。

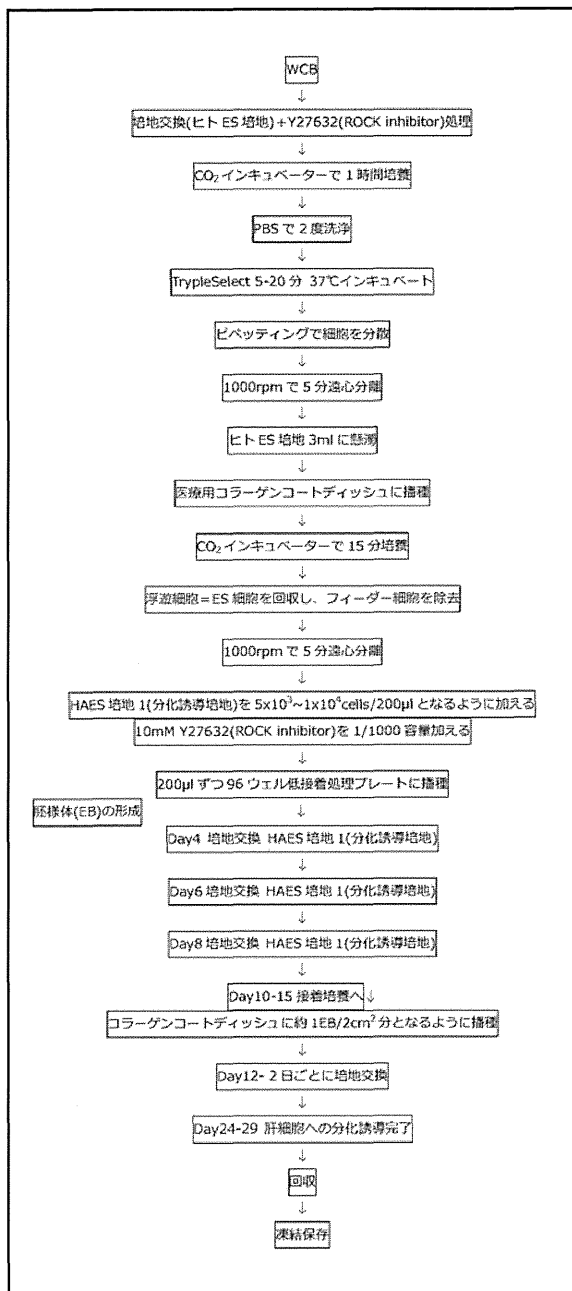
#### 凍結 (標準所要時間 30-60 分)

60mmプレートから回収したES細胞に凍結保存培地を加え、細胞浮遊液を調製後、4℃の凍結保存培地で混合する。この際、1.0~2.0x10<sup>6</sup>個/mLの濃度になるように細胞浮遊液を調製する。混合した細胞浮遊液を凍結保存用チューブに1.0mLずつ分注する。分注した凍結保存用チューブを細胞凍結用コンテナ(バイセル)に入れて-80℃の超低温保冷庫で凍結する。翌日、-80℃に凍結された上記凍結保存チューブを液体窒素保存用タンク内に保存する。

これをWCBとする。

### C-3-10 最終製品の作製方法

WCBから肝細胞(HAES)を作製し、最終製品(凍結品)までの製造フローを示す。



今後、セルバンクの安全性、品質にかかわる試験についての項目設定に当たり、医薬審第 329 号 (ICH Q5A)・医薬審第 873 号 (ICH Q5D)・「生物由来原料基準」・「同種指針」を基に、核型分析、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、ウイルス試験 (感染性試験、電子顕微鏡観察、In vitro 試験、In vivo 試験、抗体産生試験、ウシ及びブタ迷入ウイルス試験)、特性解析試験 (未分化度試験、細胞純度試験) を適宜行う予定である。

#### D. 考察

再生医療における細胞の供給源として、胚性幹細胞 (ES 細胞)、組織幹細胞、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) があげられる。これらの原料細胞は、従来まで同じ指針のもとで運用されてきたが、細胞性状が多岐に渡るため、個別の指針として運用することが現実的であるという提言がなされ、現在、我が国の研究開発がその方向で進みつつある。本研究は ES 細胞に特化して研究を推進する。ES 細胞はその増殖能、多分化能より、将来的に期待されており、最適のドナー細胞の選択肢となりつつある。また、人工多能性幹細胞の臨床応用を先導することができる再生医療技術となりうる。ヒト ES 細胞をはじめとする未分化性の非常に高いヒト細胞は、再生医療での重要な細胞ソースとなるばかりでなくその培養システムでは発生分化研究等のヒト発生メカニズム探求や創薬開発研究の基盤となる。これを異種由来の影響を排除して完全ヒト型培養システムの下で行う意義は大きい。より安全性の高い再生医療基盤を社会へ提示することが可能となる。

#### E. 結論

現在までに国内で 2 施設がその樹立機関として認定されている (京都大学、国立成育医療研究センター)。しかしながら臨床応用を開始するまでは多くの基盤研究ならびに細胞の整備が必要となる。本申請に用いる ES 細胞は、主任研究者である梅澤 (樹立責任者 18 諸文科振第 832 号平成 19 年 3 月 5 日) らが、樹立初期から「ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針案」を意識した、樹立・培養を進行させており、その、初期培養された細胞が蓄積されている。さらにこれらの細胞を用いた神経、心筋、肝臓、骨を構築する研究が進行している。この ES 細胞を用いた再生医療が現実味を帯びてきており、再生医療・細胞移植の最適の対象になっている。ES 細胞自体を生体内マイクロデバイスとして利用する新たな治療戦略を現実するために必要なステップとして、1) 原材料及び製造関連物質の明確化 (体外受精胚の起源・選択理由の明示、ド

ナー選択の倫理的妥当性、培養方法、培養材料の明示等)、2) 製造工程の明確化、3) 最終製品の品質管理法の確立がある。このような世界的な状況の中で、ヒト ES 細胞の維持および可塑性の分子基盤を明確にすることを旨とし、その評価・検証システムの元に ES 細胞の提供までを視野に入れた「ヒト胚性幹細胞をドナー細胞とする再生医療の汎用性向上のための基盤技術開発」は再生医療促進にとって必要不可欠なものであり、速やかな確立が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kami D, Watakabe K, Yamazaki-Inoue M, Minami K, Kitani T, Itakura Y, Toyoda M, Sakurai T, Umezawa A, Gojo S. Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine. *BMC Biotechnol.* 13:102, 2013.

Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products. *Biol Pharm Bull.* 36(2):189-192, 2013.

Miyazaki T, Nakatsuji N, Suemori H. Optimization of slow cooling cryopreservation for human pluripotent stem cells. *Genesis.* 52(1):49-55, 2014.

Kumagai H, Suemori H, Uesugi M, Nakatsuji N, Kawase E. Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal. *Biochem Biophys Res Commun.* 434(4):710-716, 2013.

Miyazaki T, Futaki S, Suemori H, Taniguchi Y, Yamada M, Kawasaki M, Hayashi M, Kumagai H, Nakatsuji N, Sekiguchi K, Kawase E. Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 2012;3:1236.

Tsuneyoshi N, Tan EK, Sadasivam A, Poobalan Y, Sumi T, Nakatsuji N, Suemori H, Dunn NR. The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells. *Genes Dev.* 26(22):2471-2416, 2012.

Gojo S, Toyoda M, Umezawa A. Tissue engineering and cell-based therapy toward

integrated strategy with artificial organs. *J Artif Organs.* 14(3):171-177, 2011.

Numasawa Y, Kimura T, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A. Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis. *Stem Cells.* 29(9):1405-1414, 2011.

Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet.* 7(5):e1002085, 2011.

International Stem Cell Initiative. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol.* 29(12):1132-1144, 2011.

Higuchi A, Ling QD, Hsu ST, Umezawa A. Biomimetic cell culture proteins as extracellular matrices for stem cell differentiation. *Chem Rev.* 112(8):4507-4402, 2012.

Higuchi A, Ling QD, Ko YA, Chang Y, Umezawa A. Biomaterials for the feeder-free culture of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Chem Rev.* 111(5):3021-3035, 2011.

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 取得特許

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kami D, Watakabe K, Yamazaki-Inoue M, Minami K, Kitani T, Itakura Y, Toyoda M, Sakurai T, Umezawa A, Gojo S.	Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine.	BMC Biotechnol.	13	102	2013
Kuroda T, Yasuda S, Sato Y.	Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products.	Biol Pharm Bull	36	189-92	2013
Miyazaki T, Nakatsuji N, Suemori H.	Optimization of slow cooling cryopreservation for human pluripotent stem cells.	Genesis.	52(1)	49-55	2014
Kumagai H, Suemori H, Uesugi M, Nakatsuji N, Kawase E.	Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal.	Biochem Biophys Res Commun	434(4)	710-716	2013
Miyazaki T, Futaki S, Suemori H, Taniguchi Y, Yamada M, Kawasaki M, Hayashi M, Kumagai H, Nakatsuji N, Sekiguchi K, Kawase E.	Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells.	Nat Commun	3	Article number: 1236	2012
Tsuneyoshi N, Tan EK, Sadasivam A, Poobalan Y, Sumi T, Nakatsuji N, Suemori H, Dunn NR.	The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells.	Genes Dev	26(22)	2471-2476	2012
Gojo S, Toyoda M, Umezawa A.	Tissue engineering and cell-based therapy toward integrated strategy with artificial organs.	J Artif Organs	14(3)	171-177	2011
Numasawa Y, Kimura T, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, Tsuruta H, Segawa K, Ogawa S, Umezawa A.	Treatment of human mesenchymal stem cells with angiotensin receptor blocker improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and improved cardiac function via angiogenesis.	Stem Cells	29(9)	1405-1414	2011
Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A.	DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time.	PLoS Genet	7(5)	e1002085	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
International Stem Cell Initiative	Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage.	Nat Biotechnol	29(12)	1132-1144	2011
Higuchi A, Ling QD, Hsu ST, Umezawa A.	Biomimetic cell culture proteins as extracellular matrices for stem cell differentiation.	Chem Rev	112(8)	4507-4540	2012
Higuchi A, Ling QD, Ko YA, Chang Y, Umezawa A.	Biomaterials for the feeder-free culture of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells.	Chem Rev	111(5)	3021-3035	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)―総則, 原材料及び製造関連物質, 製造工程に関する留意事項について―	再生医療	10	249-260	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)―ヒト体性幹細胞, iPS(様)細胞又はES細胞を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の最終製品の品質管理―	再生医療	10	261-266	2011
早川堯夫, 青井貴之, 梅澤明弘, 小澤敬也, 佐藤陽治, 澤芳樹, 松山晃文, 大和雅之, 山中伸弥	ヒト幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(案)―ヒト体性幹細胞, iPS(様)細胞又はES細胞を加工して製造される医薬品等(ヒト幹細胞加工医薬品等)の非臨床試験及び臨床試験について―	再生医療	10	267-272	2011

### III. 研究成果の刊行物・別刷

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine

Daisuke Kami<sup>1</sup>, Keizo Watakabe<sup>2</sup>, Mayu Yamazaki-Inoue<sup>3</sup>, Kahori Minami<sup>3</sup>, Tomoya Kitani<sup>4</sup>, Yoko Itakura<sup>5</sup>, Masashi Toyoda<sup>5</sup>, Takashi Sakurai<sup>2</sup>, Akihiro Umezawa<sup>3</sup> and Satoshi Gojo<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Cell-based regeneration therapies have great potential for application in new areas in clinical medicine, although some obstacles still remain to be overcome for a wide range of clinical applications. One major impediment is the difficulty in large-scale production of cells of interest with reproducibility. Current protocols of cell therapy require a time-consuming and laborious manual process. To solve this problem, we focused on the robotics of an automated and high-throughput cell culture system. Automated robotic cultivation of stem or progenitor cells in clinical trials has not been reported till date. The system AutoCulture<sup>®</sup> used in this study can automatically replace the culture medium, centrifuge cells, split cells, and take photographs for morphological assessment. We examined the feasibility of this system in a clinical setting.

**Results:** We observed similar characteristics by both the culture methods in terms of the growth rate, gene expression profile, cell surface profile by fluorescence-activated cell sorting, surface glycan profile, and genomic DNA stability. These results indicate that AutoCulture<sup>®</sup> is a feasible method for the cultivation of human cells for regenerative medicine.

**Conclusions:** An automated cell-processing machine will play important roles in cell therapy and have widespread use from application in multicenter trials to provision of off-the-shelf cell products.

**Keywords:** Automated cell culture system, Cell transplantation, Stem cells, Clinical trial, Cell processing facility

## Background

Degenerative diseases affect increasing numbers of people, particularly in developed countries with aging populations. Despite advancements in medicine, modalities to cure advanced diseases are often not available. Therefore, regenerative therapy may become the standard treatment option in cardiovascular medicine. Recent developments in stem cell biology, including those related to induced pluripotent stem cells (iPSCs) and tissue-derived stem/progenitor cells, are a giant leap toward the goal. Recently, myocardium-derived stem/progenitor cells were isolated by several institutes [1-3]. These cell populations have the potential to repair the diseased heart, and clinical trials are currently ongoing.

In tandem with these developments in stem cell biology and the large number of completed and ongoing clinical trials, attempts have been made to commercialize these therapies [4]. The most prominent therapeutic strategy is cell transplantation. However, harvested cells or tissues are usually limited in quantity and stem cells properties may vary from batch to batch, hindering the reliability for clinical applications. Moreover, current cell therapy protocols are laboratory centered and labor intensive, requiring highly skilled personnel and weeks to months to harvest sufficient quantities of stem/progenitor cells from the isolated tissues. These manual procedures are expensive and can result in high phenotypic and yield variability between different trials and institutions [5].

Strategies to validate advanced medicinal products have been established; however, these “best practices” still depend on the ability of personnel to perform them, such as the cultivation of stem/progenitor cells under strictly

\* Correspondence: gojos@koto.kpu-m.ac.jp

<sup>1</sup>Department of Regenerative Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan

Full list of author information is available at the end of the article