

平成 25 年度 弁理士の日 記念講演会「iPS 細胞技術を取り巻く知的財産権の光と陰～発明の保護と利用の調和を考える～」

第 2 部【一般講演 1】

タカラバイオにおける iPS 細胞関連技術
への取り組み

タカラバイオ株式会社 常務執行役員 細胞・遺伝子治療センター長 峰野 純一

要 約

当社は遺伝子工学関連製品の開発で培った技術を用いて遺伝子治療及び細胞医療のプロジェクトを推し進めています。

iPS 細胞は遺伝子治療と細胞医療のノウハウをそのまま利用できるため、独自の遺伝子導入技術であるレトロネクチンを用いた iPS 細胞誘導技術を開発していち早く研究者に提供を開始し、iPS 誘導用ベクターを GMP 準拠した方法で製造する等、CDMO (Contract Development & Manufacturing Organization) としての事業を展開しています。

本講演では、これら当社の iPS 細胞関連技術への取り組みをご紹介します。

目次

はじめに

1. タカラバイオ株式会社の紹介
2. iPS 細胞研究におけるタカラバイオの技術
3. 遺伝子治療に関するタカラバイオのコア技術
4. タカラバイオの GMP 対応
5. タカラバイオのゲノム解析技術

おわりに

はじめに

峰野： 弊社におけます iPS 細胞関連技術への取り組みについてお話しさせていただきます。まず、弊社の紹介をさせていただきます。本日のスライドはお手持ちの資料にないものも結構含まれておりますので、申し訳ございませんが、画面のほうでご確認いただければと思います。

1. タカラバイオ株式会社の紹介

もともとは宝酒造という会社でしたが、2002 年に宝ホールディングスの下で独立いたしました。現在は、宝ホールディングス下の 1 つの会社です。宝酒造は皆様も御馴染みの「松竹梅」や「宝みりん」、「缶チューハイ」等を販売しております。2002 年からその兄弟会社になりましたが、もともとは宝酒造のバイオ事業部門でした。

弊社のビジネスは、30 年近くになりますが、遺伝子

工学研究用の試薬や機器の販売をしておりました。その遺伝子工学研究用試薬の開発で蓄えたノウハウをもって、1 つは食品バイオビジネスに向かっています。健康食品等に対して効果のある素材を研究し、それを提供しようというビジネスです。もう 1 つは、遺伝子医療のビジネスに進んでいます。遺伝子工学で培った技術を用いて、例えばリンパ球拡大培養や、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療といったところに向かおうとしております。その 1 つが iPS 細胞であり、再生医療であります。

iPS 産業創薬支援ビジネスというものがあります。真ん中にいますが、iPS を使ってこれから創薬をしていこうという企業の方々です。それを取り巻く支援ビジネスというものが大きく存在しております。例えば、培地、試薬、機械、受託や搬送サービスといったものになりますけれども、弊社が今トライしているビジネス領域は、この支援領域になります。

弊社は、ユニークなセンターを 2 つ抱えております。1 つは細胞・遺伝子医療センター、もう 1 つはドラゴンジェノミクスセンターです。細胞・遺伝子医療センターは遺伝子治療を 1 つのメインのビジネスにしております。ドラゴンジェノミクスセンターはゲノム解析を 1 つのメインのビジネスにしております。

2. iPS細胞研究におけるタカラバイオの技術

まず細胞・遺伝子治療センターについて紹介します。世界で初めて遺伝子治療がアメリカで行われたのが1990年、ほとんどそれと歴史を同じくしまして、私どもの遺伝子治療の歴史が始まっております。レトロネクチン[®]を90年の中頃に開発し、その後、GMP (Good Manufacturing Practice) の施設を作り、細胞調製する施設である細胞プロセッシングセンター (CPC) も各地に作りまして、実際にがん治療薬や体外遺伝子治療といった遺伝子治療のプロジェクトも自ら進めております。

遺伝子治療というのは、in vivo 遺伝子治療と ex vivo 遺伝子治療の2つに分けられます。in vivo 遺伝子治療は、目的遺伝子を搭載したウイルスベクターをそのまま体に投与して、その患者様を治そうという治療です。ex vivo 遺伝子治療は、患者様もしくはドナー様から細胞を外に取り出して、その細胞を増殖させて、ウイルスベクター等で遺伝子をその細胞に導入して、それを体に戻す治療で、これが体外遺伝子治療になります。弊社が開発しましたレトロネクチン法はこの体外遺伝子治療に用いる方法になります。



ここに示しますように、細胞に遺伝子を入れて、GMC (Gene Modified Cells: 遺伝子導入細胞) を投与するのが遺伝子治療であり、細胞に山中4因子などを入れてiPSにして、分化させて、移植するのが再生医療ですから、元の細胞から遺伝子が入った細胞まで、ここが全くと言っていいぐらい遺伝子治療の技術がそのまま使えます。ですから、私どもが持っている技術をiPSに応用できます。それは遺伝子導入技術であり、細胞調製技術であるわけです。

それからもう1つ、出来上がったiPS細胞、これは

何らかの方法で因子が入ったものです。形態を変えているものですが、iPSではどこがどのように変わったのか、細胞の特性解析を行う必要があります。また、出来上がったiPSに対して、どういったところを見て、どうすれば、これが標準的なiPSと評価できるのかについては、解析の真っ最中で、結果が出ていない状態ですが、高速シーケンスや、エピジェネティクス解析を行いiPSを評価する技術があり、これも弊社が持っているもう1つの技術です。弊社はこの2つの技術を用いまして、iPS細胞における支援産業を展開しております。

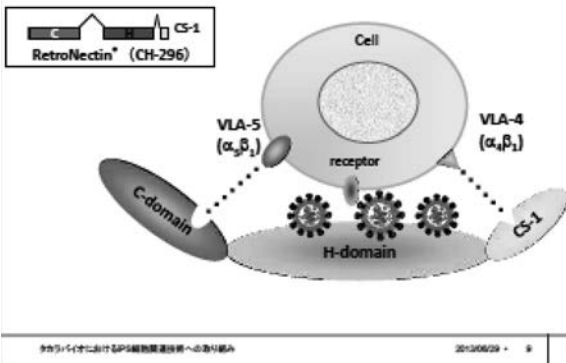
3. 遺伝子治療に関するタカラバイオのコア技術

遺伝子治療におけるレトロネクチン法は弊社のコア技術になります。これを用いることで細胞に遺伝子を入れる効率が飛躍的に上がります。レトロネクチン[®]は合成タンパク質であり、もともとフィブロネクチンというヒトの大きなタンパク質です。いくつかの機能領域、ファンクションドメインを有しており、その中のセルバインディング (細胞結合) 領域、ヘパリン領域およびCS-1領域だけを切り出して取ってきたのがレトロネクチン[®]という合成タンパク質です。

レトロネクチン[®]を用いるとどうなるかをヒトの造血幹細胞の写真で示します。レトロネクチン[®]を用いてレトロウイルスベクターで遺伝子を入れると光ります。このように約76%の細胞に遺伝子が入り、細胞に遺伝子を入れる効率を飛躍的に高めます。先ほど申しましたように、患者様から細胞を取り出しまして、こういうプレートの上で遺伝子を入れますけれども、ここにレトロネクチン[®]を用います。

現在、このレトロネクチン[®]を用いた遺伝子治療の臨床試験が世界中で行われておりまして、既に世界の標準プロトコールになっています。50以上の臨床プロトコールで使用されて、その中には既にいくつか成功例もあります。

Co-localization of retroviral particles and target cells on the molecules of RetroNectin®



なぜレトロネクチン®がウイルスベクターによる遺伝子導入の効率を上げるかを示す概念図を示します。これがレトロネクチン®であり、機能ドメインが3つあります。ヘパリドメインにウイルスベクターが吸着し、CS-1とC-ドメインが細胞の表面蛋白であるVLA-4とVLA-5に結合し、ウイルスベクターをここに押し付けることによって、遺伝子導入効率が上がるという仮説が考えられております。

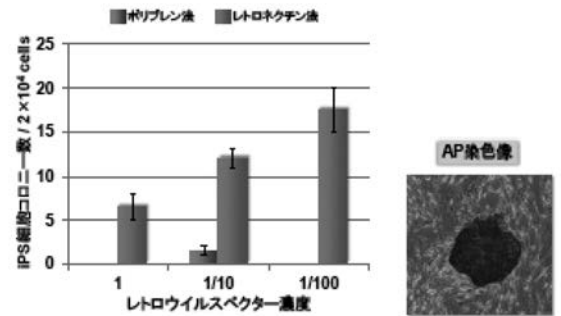
今回、弁理士の日ですから、知財の話が必要です。弊社のレトロネクチン関連知財を示します。1996年に論文で発表しておりますが、その2年前、1994年に「レトロネクチン®を用いた遺伝子導入方法」という形で米国に出願しまして、その後、これを広げ、また維持する目的で、「ウイルス仲介遺伝子導入の増強方法」、「レトロネクチン®のファンクシヨンドメインを分離して用いても遺伝子導入できますよという方法」、「遺伝子導入する方法そのもの」、「これを保存する方法」、「導入する基材」等、これの周辺に関する技術を多数開発してレトロネクチン法の知財を増強いたしました。

レトロネクチン®を用いるとiPS細胞がよく誘導されるだろうというのは、何となく予測がつくわけです。細胞にウイルスベクターで4因子をレトロネクチン®を使って入れるとiPS細胞ができるのではないかと。

iPS細胞を作るためには複数の遺伝子を入れる必要があります。2つの遺伝子、緑と赤の蛍光物質が発現する遺伝子を入れた結果をご覧ください。左がポリブレンという昔からの方法、右側がレトロネクチン®を使った方法です。まず緑の遺伝子を入れてみました。レトロネクチン®の方がたくさん入っています。当然、赤の遺伝子もたくさん入っていますので、

両方入った黄色とかオレンジ色の細胞も、レトロネクチン®のほうが多数見られます。

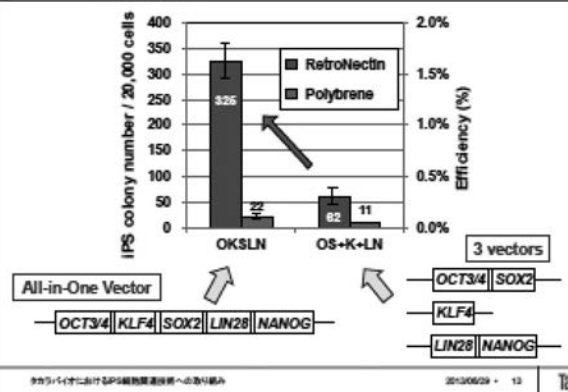
iPS細胞誘導：レトロネクチン法とポリブレン法の比較



タカラバイオにおけるiPS細胞関連技術への取り組み 2013/06/28 12 Takara

山中4因子ですと、4つを1つの細胞に入れなければいけませんけれども、レトロネクチン®を用いますと、グラフの右側の緑がレトロネクチン®, 青がポリブレンですけれども、明らかに従来のポリブレンの方法よりも多くのiPS細胞がレトロネクチン法で出来上がります。出来上がったiPS細胞をアルカリフォスファターゼで染色すると、このようにきれいに染まります。

iPSC 誘導効率



タカラバイオにおけるiPS細胞関連技術への取り組み 2013/06/28 13 Takara

山中4因子 (Oct3/4, Klf-4, Sox-2, c-Myc) から c-Myc (シーミック) 遺伝子を外しまして、LIN (リン) と Nanog (ナノグ) という遺伝子を入れるといいんじゃないかというデータが出ていますので、それを例えば3つのベクターに分けて入れるのと、1つのベクターに乗せて入れるのとでは効率はどう変わるかというのが、このデータになります。左側が1つのベクターに5つの遺伝子を乗せたもの、右側が3つに分けて遺伝子を投入したものの、それぞれiPS細胞の誘導

率ですけれども、明らかに5倍以上、1つのベクターに5つの遺伝子を乗せた方がiPS細胞がよく出来るということがわかりました。

これがその結果ですが、こういったiPS細胞ができて、SSEA-4とかSox-2といったマーカーでもよく染まることわかりましたので、これがiPS細胞であることがわかりました。

弊社としましては、この5つの遺伝子が乗ったレトロウイルスベクターを作って、これを販売しようということで、2009年4月8日のニュースリリースにありますように、iPSアカデミアジャパン株式会社さんから、試薬の製造販売、それからこれを使ったiPS細胞の受託サービスに関しましてライセンスを受けて、弊社のiPS細胞のビジネスが正式に始まりました。

もう1つ、先ほどのレトロネクチン[®]関連特許の中には記載しませんでしたけれども、1995年にレトロネクチン[®]を使って、「形質転換細胞の製造方法」という名称の特許を世界に出しております。これは例えばエレクトロポレーションなどで遺伝子を入れる場合、細胞が傷つくわけですけれども、その傷ついた細胞をレトロネクチン[®]の上で培養すると成育がいいですよという特許です。1995年ですから、当然iPSはありませんでしたけれども、iPSの4因子等を入れた後の細胞を培養するのにこの特許が使えます。

この特許をiPS細胞の製造に使うことでさらにもう1つよいのが、フィーダーフリーという、フィーダー細胞なしで、遺伝子導入した細胞をレトロネクチン[®]を敷いた上にプレートして、そして培養するとiPS細胞ができることです。レトロネクチン[®]によりフィーダーフリーによるiPS細胞の誘導も可能になりました。これがそのタイムラインとそれぞれの写真ですけれども、20日でこのようにアルカリフォスファターゼで染まるiPS細胞が出来ます。

アメリカのCDI社(セルラーダイナミックス・インターナショナル社)は、先ほどの白橋先生のご発表でもお話がありましたトムソン先生が作った会社ですが、そのCDI社と先ほどのレトロネクチン[®]を敷いて細胞を培養するという特許のライセンス契約を締結しましたので、つい先日、ニュースリリースいたしました。

4. タカラバイオのGMP対応

iPS細胞を含めて、再生医療とか細胞を臨床にもっていくための指針がいくつかあります。その中で細胞

をGMPで作りたいと言われております。弊社は自社プロジェクトも進めており、GMPの製造施設を持っております。滋賀県の草津市にありますCenter for Cell and Gene Therapyという名前のGMP施設です。



これがGMPの製造風景になります。白い宇宙服みたいな格好をして作業をするわけです。GMPの1つには、1人で作業をしてはいけない、1人は必ずその作業を記録しなさいというルールがあります。その作業もなるべく複数の人数で行ったほうが良いということで、このように1人がメモを取りながら作業をします。ここではマスターセルバンクという一番元になる細胞を作ったり、ベクターを作ったり、プラスミドを作ったりしています。先ほどのレトロウイルスベクターで当初はiPS細胞が作られていましたが、臨床に持っていくためにはレトロウイルスベクターはやはり少し問題があったりして良くないということで、プラスミドベクターにしようという流れがあります。そのプラスミドベクターをGMPで作るということも可能な施設になっています。これは大腸菌を使ってGMPで作る方法です。プラスミドベクターを大腸菌で増やしますので、こういったタンクを使って組換え大腸菌を増やして、その後、カラムクロマトグラフィーで精製を行います。

タカラバイオ、品質試験

- ✓ Endotoxin
- ✓ Vector integrity testing
- ✓ DNA sequencing
- ✓ Viability
- ✓ Potency testing of the viral vector
- ✓ Functional assay of the viral vector
- ✓ LAM-PCR
- ✓ RCR(RT-PCR)
- ✓ Plasmid identity
- ✓ Restriction Map Analysis
- ✓ Plasmid DNA Size.
- ✓ Spectrophotometric Purity
- ✓ Analysis of DNA Conformation
- ✓ Host peptides
- ✓ Host genome DNA
- ✓ Host RNA
- ：



タカラバイオにおけるiPS細胞関連技術への取り組み

2013/06/28 21

TAKARA

出来上がったものに関しては品質試験を行う必要があります。こういう品質試験があって初めてGMPと言えるわけですが、これはPCRという試験の試薬を混ぜているところです。これは細胞の表面の形を探るためにFACSという装置を使うところですが、品質試験もこのようなきれいな服に着替えてやっております。

ここにズラッとできる試験項目を並べていますけれども、できないものに関してはスコットランドの会社と提携して、ほとんどの試験ができるような体制にしております。

日本で承認された遺伝子治療(2007 -)

http://www.mha.go.jp/safety/gene_therapy/gene_therapy.html

実施承認年	対象疾患
2013	進行性骨芽腫
2013	常染色体劣性先天性失明症
2013	食道がん
2013	非肥厚性慢性骨髄性白血病骨髄異形成症候群
2012	腺癌性リンパ腫
2012	サイトメガロウイルス(予防ワクチン)
2012	頰頭部・胸部悪性腫瘍
2012	X連鎖男性性白内障(X-CGD)
2012	精立腺がん
2012	網膜色素変性
2011	精立腺がん
2009	腎臓がん
2009	食道がん
2009	造血幹細胞腫瘍(移植片対宿主病(GVHD)の重症化防止)
2009	進行性骨芽腫
2008	精立腺がん
2007	末梢動脈閉塞性疾患
2007	先天性白血病(移植片対宿主病(GVHD)の重症化防止)
2007	精立腺がん

タカラバイオにおけるiPS細胞関連技術への取り組み

2013/06/28 22

TAKARA

遺伝子治療の話に少し戻りますけれども、2007年以降に日本で行うことが承認されている遺伝子治療を示します。これは厚生労働省のホームページから拾いました。このように2007年から毎年数例ずつ、遺伝子治療の臨床研究が承認されていますけれども、この赤い字で書いているところは、何らかの形で弊社が絡んでいます。一緒に実施したり、自分のところで実施したりというものですけれども、このように遺伝子治療

という領域では弊社はかなりノウハウを蓄積していますし、知財もいくつか持っております、それを用いてiPS細胞へのビジネスを展開しております。

遺伝子治療におきまして、GMPの製造に関する知識とノウハウが結構ありますので、一昨年、京大のiPS細胞研究所と臨床研究の使用を目指したiPS細胞を作るためのプラスミドベクターの品質に関して、共同研究を実施しました。こういった品質のプラスミドベクターを使えば臨床に使用できるiPS細胞を作ることができるのかという共同研究です。医薬品医療機器総合機構(PMDA)というところは最終的に治験とか臨床研究を申請するところで、ここからいろいろ指摘され、また、相談をするわけですが、弊社が保有するベクター製造技術のノウハウや経験を活用して、京都大学iPS細胞研究所と共同でプラスミドベクターを製造するための品質規格を、PMDAと相談したうえで検証を行いました。2011年8月に、品質に関する検証も終えましたので、臨床試験における使用を目指したiPS細胞作成用プラスミドベクターの製造供給をしますという契約を結びました。

このようにGMPで作るプラスミドベクターや、研究用にiPS細胞を作るための試薬等の製造受託を行っています。

先ほどお話にありました再生医療推進法の中に、再生医療安全性確保法の成立と薬事法の改正の2つの話があって、結局今回は成立しませんでしたけれども、この安全性確保法の中でこのように言われています。もともとiPS細胞を作るのは医療機関に限られています。iPSに限らず細胞調製をするのは医療機関に限られているのを外部に委託することができる。薬事法の改正におきましても、もともと治験薬というのは外部に委託できたわけですが、再生医療に関しても外部に委託することができる。当然外部に委託する企業は、認可された企業でないと駄目ですけども、そのように認可された施設で、安全性が確保された再生医療を速やかに患者さんに届けるというポリシーがこの法律にあるわけです。

弊社としましても、蓄積したGMP細胞調整のノウハウをこちらに活かしたいと考えておまして、細胞調製そのものの施設に関して、世界のあちこちを飛び回って調査をしました。この矢印が私ですけども、例えばインディアナ大学はアメリカのウイルスベクターを作るところでは老舗です。それからペンシルバ

ニア大や、テキサスにあるベイラーカレッジというアメリカで一番大きい細胞調製施設になります。これはスコットランドの品質試験の会社です。フランスで非常に大きなベクター製造施設でありますジェネソンとか、イタリアで最も進んだ遺伝子治療をやっているモルメド、同じくスコットランドで世界的な品質試験の会社であるバイオリアンスとか。昨年、世界で初めて遺伝子治療の製剤が認証されたオランダのユニキュアとか、そういったところを飛び回って、ベクターセンター、細胞調製室、品質試験といった施設で世界的に必要とされているのはどういったものかを調査いたしました。満を持しまして、去年8月に発表いたしましたけれども、タカラバイオにおきましても、細胞遺伝子治療用の研究製造施設を新設することいたしました。現在工事に入ったところでございます。

延べ床面積が6,500平米で、この中で先ほどのプラスミドベクターを作ったり、レトロウイルスベクターを作ったり、細胞調製を行ったり、品質試験を行ったり、そういった一連のことができるような施設を建築中であります。これが現在、草津にあります細胞・遺伝子医療センターですけれども、これを2倍、3倍といった大きさにしようと考えております。見た目はこんな形になるかなと考えております。

このように、細胞・遺伝子医療センターでは、遺伝子治療で培った技術やノウハウをベースに、iPS細胞支援産業に取り組んでおります。

5. タカラバイオのゲノム解析技術

もう1つのドラゴンジェノミクスセンターは、ゲノム解析に関する技術、ノウハウを持っているセンターです。その歴史を書いてみました。この大きい施設ができたのは2000年ですけれども、蛍光イメージアナライザーといったシーケンスに関する機器の開発は90年初頭からやっております。大腸菌ゲノムのプロジェクトが89年で、確か世界的なヒトゲノムプロジェクトもこのあたりで始まっていますので、ヒトゲノムプロジェクトの歴史とほぼ並行して、弊社のドラ

ゴンジェノミクスセンターの歴史もあります。現在におきましては、ほとんどの次世代シーケンサーを抱えている数少ないセンターの1つになっています。

これが外観です。パソコンを並べて、こういう装置を使って解析を行っています。世の中にあるほとんどの次世代シーケンサーをこのセンターでは抱えております。これらの特徴をうまくつかまえて、解析を行っています。

ついにヒト全ゲノムシーケンス解析サービスもできるようになりました。先ほど90年の少し前にヒトゲノムシーケンスのプロジェクトが世界中で始まったと申しました。そこから10年と少しをかけて、やっと1人のワンセットのヒトゲノムがわかったわけですが、最近では、カスタムで個人個人のゲノムのシーケンスも短期間で行うことができるような世の中になりました。こういったサービスも行っている解析センターです。

先ほど数々のシーケンサーがあると申しましたが、いくつかの解析ターゲットとその動物種によってそれぞれに解析法が決まって、シーケンサーが決まることになります。ここに示しますプライマーアレイという簡単な試薬も開発して、解析を行っています。iPS細胞の個性を解析する標準的手法の開発を、このセンターでは行っています。

おわりに

再生医療の実用化、産業化に関する研究会（平成25年2月）の発表で、現在、170億円のゲノム支援サービスの市場が、2050年には1.3兆円、100倍になるというような報告がありました。私どももこの市場が大きくなることを信じて、iPS細胞の支援サービス、支援産業の中で頑張っていくと考えている次第でございます。

以上が私の本日のご紹介になります。ご清聴どうもありがとうございました。

(原稿受領 2013. 9. 9)