

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-511076

(P2021-511076A)

(43) 公表日 令和3年5月6日(2021.5.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6881 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6881 Z	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813 Z	4 C 0 8 7
C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6886 Z	
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6869 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-560565 (P2020-560565)
 (86) (22) 出願日 平成31年1月22日 (2019.1.22)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年9月18日 (2020.9.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2019/051530
 (87) 国際公開番号 W02019/141878
 (87) 国際公開日 令和1年7月25日 (2019.7.25)
 (31) 優先権主張番号 1801035.5
 (32) 優先日 平成30年1月22日 (2018.1.22)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 1809337.7
 (32) 優先日 平成30年6月6日 (2018.6.6)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)

(71) 出願人 511174719
 システミック・スコットランド・リミテッド
 SYSTEMIC SCOTLAND LIMITED
 イギリス、ジィ・20 O・エス・ビー
 グラスゴー、メアリーヒル・ロード、23
 17、ウェスト・オブ・スコットランド・
 サイエンス・パーク、ブロック・3、ユニ
 ット・3/4/5、ケルビン・キャンパス
 (74) 代理人 110001656
 特許業務法人谷川国際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞混入アッセイ

(57) 【要約】

多能性幹細胞の混入細胞において差次的に発現されていることが知られているmiRNAなどのノンコーディングRNAの集合体に対して、多能性幹細胞由来の細胞集団の試料を測定することで、細胞療法において使用するための多能性幹細胞由来の細胞集団における多能性幹細胞の混入細胞の有無及び細胞数を決定する方法であって、それによって、100万細胞数のバックグラウンドにおいて10細胞数以下及び5細胞数以下で残存・混入した多能性幹細胞数という、多能性幹細胞由来の細胞集団又は試料が、細胞療法において使用するために必要とされる安全性を満たすことが特定されうるような細胞数で、残存多能性幹細胞の混入を検出する方法。

【選択図】 図1

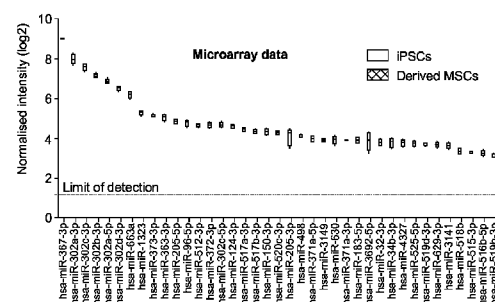


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

別用途のための多能性幹細胞由来の細胞集団における多能性幹細胞の混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数の決定のための方法であって、多能性幹細胞の混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAに対して、多能性幹細胞由来の前記細胞集団の試料を測定することを含む方法。

【請求項 2】

1つの又は集合体を形成する2つ以上の前記した所定のノンコーディングRNAが、多能性幹細胞由来の細胞試料における多能性幹細胞の混入細胞に対するバイオマーカーである、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記ノンコーディングRNAがマイクロRNA(miRNA)である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

混入の有無及び/又は細胞数の前記決定が所定の混入細胞数に対してなされた、請求項 1 から 3 のうちいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 5】

多能性幹細胞の混入細胞を既知の又は所定の細胞数に播種させた又は添加させた細胞の陽性コントロールに対して、多能性幹細胞由来の前記細胞集団の試料における多能性幹細胞の混入細胞数を決定することを含む方法であって、請求項 1 から 4 のうちいずれか 1 つに記載の方法。

20

【請求項 6】

前記陽性コントロールが 100 万細胞数あたり 10 細胞数の細胞数で多能性幹細胞の混入細胞を播種させた又は添加させた細胞試料を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記陽性コントロールが、多能性幹細胞の混入細胞に対して好ましくない条件下において増殖させ又は継代させ、その次に多能性幹細胞の混入細胞を所定の細胞数に播種させた又は添加させた、多能性幹細胞由来の細胞試料を含む、請求項 5 又は請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記陽性コントロールを備えた多能性幹細胞由来の前記細胞集団の試料を測定することを含む方法であって、請求項 5 から 7 のうちいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 9】

前記したノンコーディングRNAの集合体が 2 つから 6 つのノンコーディングRNAを含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

1つの又はそれ以上の前記ノンコーディングRNAが、多能性幹細胞の混入細胞に特異的なノンコーディングRNAとして特定された及び実証された、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 11】

1つの又はそれ以上の前記ノンコーディングRNAが、所定の混入細胞数における混入細胞の検出を可能にする検出感度を、使用された測定過程において有することが実証された、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

1つの又は集合体を形成する2つ以上の前記した所定のノンコーディングRNAが、下記するmiRNAから選択される1つの又はそれ以上のmiRNAを含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法：hsa-miR-367-3p, hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302a-5p, hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-1323, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-372-3p

50

, hsa-miR-302c-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-517a-3p, hsa-miR-517b-3p, hsa-miR-150-3p, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-205-3p, hsa-miR-498, hsa-miR-371a-5p, hsa-miR-3149, hsa-miR-630, hsa-miR-371a-3p, hsa-miR-183-5p, hsa-miR-3692-5p, hsa-miR-32-3p, hsa-miR-34b-3p, hsa-miR-4327, hsa-miR-525-5p, hsa-miR-519d-3p, hsa-miR-629-3p, hsa-miR-3141, hsa-miR-518b, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-516b-5p及びhsa-miR-519b-3p。

【請求項 1 3】

1つの又は集合体を形成する2つ以上の前記した所定のノンコーディングRNAが、下記するmiRNAから選択される1つの又はそれ以上のmiRNAを含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法：hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-371a-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-512-3p及びhsa-miR-520c-3p。 10

【請求項 1 4】

1つの又は集合体を形成する2つ以上の前記した所定のノンコーディングRNAが、下記するmiRNAから選択される1つの又はそれ以上のmiRNAを含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法：hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-302d-3p及びhsa-miR-367-3p。

【請求項 1 5】

1つの又は集合体を形成する2つ以上の前記した所定のノンコーディングRNAが、下記するmiRNAから選択される1つの又はそれ以上のmiRNAを含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法：hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302c-3p及びhsa-miR-302d-3p。 20

【請求項 1 6】

1つの又は集合体を形成する2つ以上の前記した所定のノンコーディングRNAがmiRNAのhsa-miR-302d-3pを含む、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 7】

多能性幹細胞由来の前記細胞集団と多能性幹細胞の前記混入細胞との間に非特異的に又は非差次的に発現されている、1つの又はそれ以上の内因性ノンコーディングRNAに対する、多能性幹細胞由来の前記細胞集団の試料を、標準的な若しくは対照的な方法によって測定することをさらに含む方法であって、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記内因性ノンコーディングRNAがmiRNAである、請求項16に記載の方法。 30

【請求項 1 9】

前記内因性ノンコーディングRNAがhsa-miR-107及びhsa-miR-130a-3pから選択されるmiRNAである、請求項16又は請求項17に記載の方法。

【請求項 2 0】

多能性幹細胞の混入細胞が混入していない細胞試料を含む陰性コントロールを備える多能性幹細胞由来の前記細胞集団の試料を測定することを含む方法であって、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 1】

多能性幹細胞の混入細胞が混入していない前記細胞試料が、多能性幹細胞由来の前記細胞集団と分化状態及び/又は表現型が同じである細胞試料を含む、請求項20に記載の方法。 40

【請求項 2 2】

多能性幹細胞の混入細胞が混入していない前記細胞試料が、多能性幹細胞由来の前記細胞集団の細胞源とは異なる細胞源の多能性細胞に由来する、請求項20又は請求項21に記載の方法。

【請求項 2 3】

1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAに対する陽性コントロールを任意に備える、多能性幹細胞由来の前記細胞集団の試料を測定する段階が、以下の内容を含む、並びに、内因性コントロールが以下の内容を任意に含む、請求項1～2 50

2のいずれか1項に記載の方法：

1つの又は集合体を形成する2つ以上の前記した所定のノンコーディングRNAの濃度を測定するための、前記試料及び任意の陽性コントロールの処理及び分析が、以下の内容を含む、並びに、内因性コントロールが以下の内容を任意に含む；

任意の陽性コントロール中に前記濃度を備える試料において、1つの又は集合体を形成する2つ以上の前記した所定のノンコーディングRNAの濃度を任意に比較することが、以下の内容を含む；及び

前記試料中の多能性幹細胞の混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数を、前記内容から決定すること。

【請求項24】

前記した処理及び分析が、前記ノンコーディングRNAの塩基配列の少なくとも一部に対して、実質的に相補的なヌクレオチド配列を有するプライマー及び/又はプローブを用いて、前記ノンコーディングRNAを検出することを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記した処理及び分析の段階が、定量RT-PCR、デジタルPCR、ドロップレットデジタルPCR、シーケンシング、Luminex法による核酸増幅法、又は他のハイブリダイゼーションに基づく技術を含む、請求項23又は請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記した処理及び分析の段階がドロップレットデジタルPCR(ddPCR)を含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

多能性幹細胞の混入細胞の混入細胞数が、前記試料において100万細胞数あたり10細胞数以下の多能性幹細胞の混入細胞という基準を満たすか否かを決定するために構成されている、請求項1～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

100万細胞数あたり10細胞数という細胞数に多能性幹細胞の混入細胞を播種させた又は添加させた細胞を含む陽性コントロールとの比較によって、多能性幹細胞の混入細胞数の決定に至る、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記試料中のノンコーディングRNAの濃度が、前記陽性コントロール中のノンコーディングRNAの濃度に満たない及びその測定誤差の許容限界の範囲外であると測定される場合、決定される多能性幹細胞の混入細胞の混入細胞数が、前記試料において100万細胞数あたり10細胞数以下の多能性幹細胞の混入細胞と判断される、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記別用途が細胞療法を目的とする、請求項1～29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】

多能性幹細胞由来の前記細胞が間葉系幹細胞(MSC)である、請求項1～30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

前記多能性幹細胞が人工多能性幹細胞(iPSC)である、請求項1～31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】

多能性幹細胞の前記混入細胞が1つの又はそれ以上の未分化な多能性幹細胞及び不完全に分化した多能性幹細胞を含む、請求項1～33のいずれか1項に記載の方法。

【請求項34】

前記陽性コントロールが、100万細胞数あたり1細胞数、100万細胞数あたり5細胞数、及び/又は100万細胞数あたり10細胞数の細胞数で多能性幹細胞の混入細胞を播種させた又は添加させた細胞試料を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項35】

多能性幹細胞の混入細胞の混入細胞数が、前記試料において100万細胞数あたり5細胞数以下の多能性幹細胞の混入細胞数という基準を満たすか否かを決定するために構成されている、請求項1～34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項36】

100万細胞数あたり1細胞数、100万細胞数あたり5細胞数、及び/又は100万細胞数あたり10細胞数という細胞数に多能性幹細胞の混入細胞を播種させた又は添加させた細胞を含む陽性コントロールとの比較によって、混入細胞数の決定に至る、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記試料中のノンコーディングRNAの濃度が、前記陽性コントロール中のノンコーディングRNAの濃度を満たさない及びその測定誤差の許容限界の範囲外であると測定される場合、決定される多能性幹細胞の混入細胞の混入細胞数が、前記試料において100万細胞数あたり5細胞数以下の多能性幹細胞の混入細胞と判断される、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

請求項1から37のうちいずれか1つにおいて定義された、多能性幹細胞由来の細胞集団の多能性幹細胞の混入細胞の混入を決定するための前記方法を実施すること、並びに、多能性幹細胞の混入が全くない又は許容可能な混入細胞数との決定に基づいて、別用途のための多能性幹細胞由来の前記細胞集団を公開すること、を含む方法であって、多能性幹細胞由来の細胞集団のロット公開の方法。

【請求項39】

許容可能な多能性幹細胞の混入細胞数が、多能性幹細胞由来の前記細胞集団の試料において100万細胞数あたり10細胞数以下の多能性幹細胞の混入細胞である、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

多能性幹細胞の混入細胞において差次的に発現されていることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAを対象とした、ノンコーディングRNAの発現データ又は発現プロファイルの、別用途のための多能性幹細胞由来の細胞集団における多能性幹細胞の混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数を決定することを目的とする使用。

【請求項41】

前記ノンコーディングRNAの集合体が2つから6つのノンコーディングRNAを含む、請求項40に記載の使用。

【請求項42】

前記した1つの又はそれ以上のノンコーディングRNAが、人工多能性幹細胞の混入細胞に特異的なノンコーディングRNAとして特定された及び実証された、請求項40又は請求項41に記載の使用。

【請求項43】

前記した1つの又はそれ以上のノンコーディングRNAが、所定の混入細胞数における混入の検出を可能にする検出感度を、使用された測定過程において有することが実証された、請求項42に記載の使用。

【請求項44】

前記した1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAが、下記するmiRNAから選択される1つの又はそれ以上のmiRNAを含む、請求項40から43のうちいずれか1つに記載の使用：hsa-miR-367-3p, hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302a-5p, hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-663a, hsa-miR-1323, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-302c-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-517a-3p, hsa-miR-517b-3p, hsa-miR-150-3p, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-205-3p, hsa-miR-498, hsa-miR-371a-5p, hsa-miR-3149, hsa-miR-630, hsa-miR-371a-3p, hsa-miR-183-5p, hsa-miR-3692-5p, hsa-miR-32-3p, hsa-miR-34b-3p, hsa-miR-4327, hsa-miR-525-5p, hsa-miR-519d-3p, hsa-miR-6

10

20

30

40

50

29-3p, hsa-miR-3141, hsa-miR-518b, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-516b-5p及びhsa-miR-519b-3p。

【請求項 4 5】

前記した1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAが、下記するmiRNAから選択される1つの又はそれ以上のmiRNAを含む、請求項40から44のうちいずれか1つに記載の使用：hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-371a-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-512-3p及びhsa-miR-520c-3p。

【請求項 4 6】

前記した1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAが、下記するmiRNAから選択される1つの又はそれ以上のmiRNAを含む、請求項40から45のうちいずれか1つに記載の使用：hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-302d-3p及びhsa-miR-367-3p。

【請求項 4 7】

前記した1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAが、下記するmiRNAから選択される1つの又はそれ以上のmiRNAを含む、請求項40から46のうちいずれか1つに記載の使用：hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302c-3p 及び hsa-miR-302d-3p。

【請求項 4 8】

前記した1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAがmiRNAの hsa-miR-302b-3pを含む、請求項40から47のうちいずれか1つに記載の使用。

【請求項 4 9】

多能性幹細胞の混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAを対象とした、及び、多能性幹細胞の混入細胞において非特異的に又は非差次的に発現されている、1つの又はそれ以上の内因性ノンコーディングRNAを対象とした、ノンコーディングRNAの発現データ又は発現プロファイルの、別用途のための多能性幹細胞由来の細胞集団における多能性幹細胞の混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数を決定することを目的とする使用であって、請求項40から48のうちいずれか1つに記載の使用。

【請求項 5 0】

前記内因性ノンコーディングRNAがmiRNAである、請求項49に記載の使用。

【請求項 5 1】

前記内因性ノンコーディングRNAがhsa-miR-107及びhsa-miR-130a-3pから選択されるmiRNAである、請求項49又は請求項50に記載の使用。

【請求項 5 2】

別用途のための多能性幹細胞由来の細胞集団における多能性幹細胞の混入細胞の混入細胞数が、100万細胞数あたり10細胞数以下の多能性幹細胞の混入細胞であると、多能性幹細胞由来の前記細胞集団から決定することができる、請求項40から51のうちいずれか1つに記載の使用。

【請求項 5 3】

別用途のための多能性幹細胞由来の細胞集団における多能性幹細胞の混入細胞の混入細胞数が、100万細胞数あたり5細胞数以下の多能性幹細胞の混入細胞であると、多能性幹細胞由来の前記細胞集団から決定することができる、請求項40から51のうちいずれか1つに記載の使用。

【請求項 5 4】

前記したノンコーディングRNAの発現データ又は発現プロファイルが、ドロップレットデジタルPCRにより決定される、請求項40から53のうちいずれか1つに記載の使用。

【請求項 5 5】

請求項1から39のうちいずれか1つの前記方法における、請求項40から54のうちいずれか1つに記載の使用。

【請求項 56】

多能性幹細胞の混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、所定のノンコーディングRNAに特徴的であるヌクレオチド配列を各々含む、1つ又は2つ以上のPCRプライマーを含むキットであって、多能性幹細胞由来の細胞試料中の対応する1つの又は2つ以上のノンコーディングRNAの濃度又は発現量の定量的な決定に使用するためのキット。

【請求項 57】

前記ノンコーディングRNAが、請求項40から48のうちいずれか1つにおいて定義された、いずれか1つ又はそれ以上のノンコーディングRNAである、請求項56に記載のキット。

10

【請求項 58】

多能性幹細胞由来の細胞集団において多能性幹細胞の混入細胞の混入を検出するための方法であって、多能性幹細胞の混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、標的のノンコーディングRNAに対して相補的なヌクレオチドを含み、多能性幹細胞由来の前記細胞集団の試料から抽出されたノンコーディングRNA由来である、cDNA分子の濃度を増幅すること及び測定することを含む方法。

【請求項 59】

別用途のための多能性幹細胞由来の細胞集団における多能性幹細胞の混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数を決定するための、請求項1から39のうちいずれか1つに記載の方法であって、ノンコーディングRNAのバイオマーカーに、好ましくはmiRNAのバイオマーカーに、依存しない異なる測定方法によって、多能性幹細胞の混入細胞の混入に対する多能性幹細胞由来の前記細胞を測定することをさらに含む方法。

20

【請求項 60】

細胞療法において使用するための多能性幹細胞由来の細胞集団であって、請求項1から39のうちいずれか1つの前記方法によって決定された、100万細胞数あたり10細胞数以下の多能性幹細胞の混入細胞を含む、前記細胞集団。

【請求項 61】

細胞療法において使用するための多能性幹細胞由来の細胞集団であって、請求項1から39のうちいずれか1つの前記方法によって決定された、100万細胞数あたり5細胞数以下の多能性幹細胞の混入細胞を含む、前記細胞集団。

30

【請求項 62】

細胞療法において使用するための多能性幹細胞由来の細胞集団を製造する方法であって、以下の内容を含む方法：

多能性幹細胞由来の細胞集団を提供するために、多能性幹細胞(PSC)のPSC由来細胞への分化を誘発すること；

多能性幹細胞由来の前記細胞集団の試料を採取すること

前記細胞試料中の多能性幹細胞の混入細胞の有無及び細胞数を決定するために、前記試料を請求項1から39のうちいずれか1つの前記方法で測定すること

多能性幹細胞の混入細胞の有無及び細胞数が、所定の混入細胞数に等しい又はそれ未満であるとの決定に基づき、細胞療法に適した又は入手可能な多能性幹細胞由来の前記細胞集団を特徴づけること；及び

40

多能性幹細胞由来の前記細胞をそれを必要とする患者に対して任意に投与すること。

【請求項 63】

前記した所定の混入細胞数が前記試料において100万細胞数あたり10細胞数の多能性幹細胞の混入細胞である、請求項62に記載の方法。

【請求項 64】

前記した所定の混入細胞数が前記試料において100万細胞数あたり5細胞数の多能性幹細胞の混入細胞である、請求項62に記載の方法。

【請求項 65】

多能性幹細胞由来の細胞を用いる細胞療法によってそれを必要性とする患者を治療する

50

方法であって、請求項 6 2、請求項 6 3、又は請求項 6 4 の前記方法に従い、細胞療法において使用するための多能性幹細胞由来の細胞集団を製造することを含む方法であって、前記患者に対して多能性幹細胞由来の前記細胞集団の少なくとも一部を投与することをさらに含む方法。

【請求項 6 6】

多能性幹細胞を利用した細胞療法によって生じる奇形腫の危険性を低減させるための方法であって、請求項 6 5 の前記方法に従い、前記細胞療法において使用するための多能性幹細胞由来の幹細胞集団を製造すること、並びに、前記細胞集団の少なくとも一部をそれを必要とする患者に対して投与すること、を含む方法。

【請求項 6 7】

多能性幹細胞の混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1 つの又は集合体を形成する 2 つ以上の所定のノンコーディング RNA を対象とする、ノンコーディング RNA の発現データ又は発現プロファイルの、多能性幹細胞由来の細胞療法における奇形腫の危険性を低減させることを目的とする使用。

【請求項 6 8】

多能性幹細胞の混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、少なくとも 1 つ又は 2 つ以上の所定のノンコーディング RNA を検出するための 1 組のポリヌクレオチド、及び、多能性幹細胞由来の細胞集団から採取した試料から抽出された RNA、若しくは、多能性幹細胞由来の細胞集団から採取した試料から抽出された RNA から逆転写された cDNA、を含む方式。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般的に細胞混入及び細胞療法に関する。より詳細には、本発明は、細胞集団中の細胞混入の決定、このような決定において使用するための測定法、このような測定法において使用するためのキット、細胞集団、及び、このような細胞集団を使用する治療法、に関する。

【背景技術】

【0002】

幹細胞を利用した治療法は多くのヒト疾患の効果的な治療として多大な期待が寄せられている。幹細胞は、成体幹細胞、及び、多能性幹細胞(PSC)を利用した細胞療法製品に、主に分類することができる。PSCは、ヒトの生体内において全種類の細胞へと分化することができ、幹細胞を利用した細胞療法の基礎として再生可能な細胞源を提供する、幹細胞である。

【0003】

当該細胞療法の分野が発達するにつれて、PSCは、幹細胞を利用した細胞療法による治療を生み出す代表的な方法に益々なりつつあり、胚性幹細胞(ESC)又は人工多能性幹細胞(iPSC)でありうる。臨床試験においてPSCを利用した細胞療法製品の数はこちら数年にわたり急速に増え続けており、この状況は続くものと推測されている。

【0004】

PSCを利用した細胞療法製品に共通の課題として、幹細胞を利用した細胞製品内に残存した未分化なPSCが、奇形腫や他の腫瘍を生じさせうる点が挙げられ、このような治療法にとって重大な安全上の問題となっている。このように、これらの治療法を応用する上での重要な安全上の障害となっているのが、最終的な臨床製品内に残存・混入したPSCの細胞数を実証し、定量的に評価することができるための、必要な条件が制限されている点である。これはPSCを利用した細胞療法の進歩にとって重要な課題となっている。

【0005】

今のところ、未分化なPSCの混入細胞数を評価するための確立された簡易な手段は存在しない。この問題に対処するための現段階における選択肢やアプローチは、時間を消費し、必要とされる感度を欠き、コストのかかるin vitro又はin vivoによる測定法であるた

10

20

30

40

50

め、日常の品質管理(QC)試験には一般的には適していない。特に、日常のQC試験やロット公開に適した、簡易で迅速な測定法のプラットフォームが、現時点では構築されていない。

【0006】

日常のQC試験及びロット公開に適した、簡易で、高感度で、定量的な測定法が入手可能であることは、PSCを利用した治療法の臨床的な発展の継続的な成功にとって重要である。

【0007】

マイクロRNA(miRNA)とは長さが約21から23ヌクレオチドの1本鎖ノンコーディングRNA分子である。miRNAは、特定の「標的」遺伝子産物を対象とすることで、mRNA転写産物に対するハイブリダイゼーションを介して、細胞内の遺伝子発現を調節しており、結果として、翻訳の抑制や転写産物の分解を生じさせる。細胞内において、1本鎖miRNAは複数の遺伝子(最大1000まで)を調節することができ、各遺伝子は複数のmiRNAによって調節されうる。今のところ、2588のヒトmiRNAが知られており、これらは全ヒト遺伝子の最大60%までを制御する調節ネットワークを形成すると推定されている。これらの低分子の調節因子は、複数の本質的な生物学的過程において、重要な役割を担っている。

【0008】

本発明者は、マイクロRNA(miRNA)の発現又はプロファイルのデータを、簡易で高感度で定量的な測定法において、PSC由来細胞集団中のPSCの混入細胞数を決定するために使用することができるということを、特定した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

細胞療法において使用するためのPSC由来の細胞集団中のPSCの混入を、検出する又は決定する上での改善が求められている。

【0010】

本発明の目的は、細胞療法において使用するためのPSC由来の細胞集団中のPSCの混入を、検出する又は決定するための方法を、提供することにある。

【0011】

本発明のさらなる目的は、細胞療法において使用するためのPSC由来の細胞集団における品質管理又はロット公開のための方法を、提供することにある。

【0012】

さらなる目的は、細胞療法を受ける患者において奇形腫及び腫瘍が生じる危険性を低減する、細胞集団及び細胞療法を製造する方法を、提供することにある。

【0013】

本発明の第1の態様によれば、別用途のためのPSC由来の細胞集団中のPSCの混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数(level、レベル)を決定するための方法であって、PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAに対して、PSC由来の当該細胞集団の試料を測定することを含む方法、が提供されている。

【0014】

本発明の第2の態様において、PSC由来の細胞集団のロット公開の方法であって、PSC由来の細胞集団中のPSCの混入細胞の混入を上記で定義されたように決定するための該方法を実施すること、並びに、混入が全くない又は許容可能な混入細胞数であるとの決定に基づいて、別用途のためのPSC由来の当該細胞集団を公開すること、を含む方法が提供されている。

【0015】

本発明の第3の態様において、PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAに対する、ノンコーディングRNAの発現データ又は発現プロファイルの、別用途のための

PSC由来の細胞集団中のPSCの混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数を決定するための、使用が提供されている。

【0016】

本発明の第4の態様において、PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、所定のノンコーディングRNAに特徴的なヌクレオチド配列を各々含む、1つの又は2つ以上のPCRプライマーを含むキットであって、PSC由来の細胞試料中の対応する1つ又は2つ以上のノンコーディングRNAの濃度又は発現量を定量的に決定するのに使用するためのキット、が提供されている。

【0017】

本発明の第5の態様において、PSC由来の細胞集団における混入を検出するための方法であって、PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された標的のノンコーディングRNAに対して相補的なヌクレオチドを含み、PSC由来の当該細胞集団の試料から抽出されたノンコーディングRNA由来である、cDNA分子の濃度を増幅すること及び測定することを含む方法、が提供されている。

【0018】

本発明の第6の態様において、PSC由来の細胞集団のロット公開の方法であって、PSC由来の細胞集団のPSCの混入細胞の混入を上記で定義されたように決定するための該方法を実施すること、並びに、混入が全くない又は許容可能な混入細胞数であるとの決定に基づいて、別用途のためのPSC由来の当該細胞集団を公開すること、を含む方法が提供されている。

【0019】

本発明の第7の態様において、細胞療法において使用するためのPSC由来の細胞集団であって、上記の方法によって決定されるように、100万細胞数のPSC由来細胞あたり10細胞数以下のPSCの混入細胞を含む集団、が提供されている。

【0020】

本発明の第8の態様において、細胞療法において使用するためのPSC由来の細胞集団を製造する方法であって、以下の内容を含む方法、が提供されている：

PSC由来の細胞集団を提供するために、多能性幹細胞(PSC)のPSC由来細胞への分化を誘発すること；

PSC由来の当該細胞集団の試料を採取すること

当該細胞試料中のPSCの混入細胞の有無及び細胞数を決定するために、該試料を上記方法で測定すること、及び、PSCの混入細胞の有無及び細胞数が所定の混入細胞数と等しい又はそれ未満であるとの決定に基づいて、細胞療法に適する又は入手可能なようにPSC由来の当該細胞集団を特徴付けること；並びに、PSC由来の該細胞をそれを必要とする患者に任意に投与すること。

【0021】

本発明の第9の態様において、PSC由来の細胞を用いる細胞療法によりそれを必要とする患者を治療する方法であって、細胞療法において使用するためのPSC由来の細胞集団を上記の方法に従い製造することを含む方法であって、PSC由来の当該細胞集団の少なくとも一部を該患者に対して投与することをさらに含む方法、が提供されている。

【0022】

本発明の第10の態様において、PSCを利用した細胞療法で生じる奇形腫の危険性を低減するための方法であって、当該細胞療法において使用するためのPSC由来の幹細胞集団を上記の方法に従い製造すること、並びに、当該細胞集団の少なくとも一部をそれを必要とする患者に対して投与すること、を含む方法、が提供されている。

【0023】

本発明の第11の態様において、PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAに対する、ノンコーディングRNAの発現データ又は発現プロファイルの、PSCを利用した細胞療法における奇形腫の危険性を低減するための使用、が提供されている。

【0024】

本発明の第12の態様において、以下の内容を含む方式が提供されている：
PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、少なくとも1つの又は2つ以上の所定のノンコーディングRNAを検出するための、1組のポリヌクレオチド、及び、PSC由来の細胞集団から採取した試料から抽出されたRNA、若しくは、PSC由来の細胞集団から採取した試料から抽出されたRNAから逆転写されたcDNA。

【発明の効果】

【0025】

本発明の方法、使用、及び方式は、適切なロット公開、及び、詳細には、PSC由来の当該細胞集団におけるPSCの混入細胞の有無及び細胞数の測定法又は評価法、を提供することで、細胞療法におけるPSC由来の細胞集団の安全な使用を可能とし、これらに基づき、細胞療法における使用に対して決定が下されうる。詳細には、該方法は、幹細胞由来の細胞集団の残存PSC細胞の混入の検出を、100万細胞数のバックグラウンドにおいて10細胞数以下の残存・混入したPSC細胞という細胞数で、及び、100万細胞数のバックグラウンドにおいて5細胞数以下の残存・混入したPSC細胞という細胞数で、可能とする。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】 iPSC特異的miRNAの発現密度及びその特定のマイクロアレイ分析データ

【図2】 iPSC特異的miRNAの差次的発現を確認したQRT-PCR分析データ

【図3】 iPSC特異的miRNAの細胞特異性を確認したマイクロアレイ分析データ

【図4】 iPSC添加試料を用いたiPSC特異的miRNAのQRT-PCRによる感度分析データ

【図5】 10～100細胞数のiPSC添加試料を用いたiPSC特定のmiRNA集合体を備える高感度ドロップレットデジタルPCR法の検出感度評価

【図6】 10細胞数のiPSC添加試料を用いたiPSC特定のmiRNA集合体を備える高感度ドロップレットデジタルPCR法の検出限界評価

【図7】 1～10細胞数のiPSC添加試料を用いたiPSC特異的miRNAを備える高感度ドロップレットデジタルPCR法の検出感度評価

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明は、典型的には細胞療法などの別用途のためのPSC由来の細胞集団における多能性幹細胞(PSC)の混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数を決定するための、ノンコーディングRNAの発現データ、発現量、又は発現プロファイルの使用に関する。(以下において区別しないで用いられる)当該ノンコーディングRNAの発現データ、発現量、又は発現プロファイルは、(PSC由来の細胞と比べて)PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAに対するものである。

【0028】

このように、当該ノンコーディングRNAの発現データは、細胞療法などの別用途のためのPSC由来の細胞集団におけるPSCの混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数を決定するための方法において、使用することができる。PSC由来の当該細胞集団の試料は、PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAに対して、測定されうる。

【0029】

該当する1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAは、PSC由来の細胞試料におけるPSCの混入細胞に対するバイオマーカーと見なされうる。

【0030】

「ノンコーディングRNA」という用語は、miRNA(マイクロRNA)又は他のノンコーディングRNAを含みうる。「ノンコーディングRNA」という用語は、タンパク質をコードしておらず、低分子の調節RNAのクラスを一般的に包含する、RNAのことに典型的には言及している。上記で言及した他のノンコーディングRNAは、例えば、small interfering RNA (siRNA)

、piwi-interacting RNA (pi RNA)、small nuclear RNA (snRNA)、small nucleolar RNA (snoRNA)、extracellular RNA (exRNA)、Small Cajal body RNA (scaRNA)、及びshort hairpin RNA (shRNA)、でありうる。他のノンコーディングRNAは、ノンコーディングRNA発現のレポーター遺伝子として機能しうる遺伝子組み換えノンコーディングRNAを、さらに含む。他のノンコーディングRNAはエピソームRNAであることがあり、記載された方法及び/又は使用は、プロファイルされたノンコーディングRNAの全部又は一部を構成するノンコーディングRNAを製造するために、当該エピソームDNAが転写されうる、本明細書において記載された細胞に、エピソームDNAが導入される初期段階を、必要としうる。実施形態の1つにおいて、ノンコーディングRNAという用語は、teloRNAとして知られるノンコーディングRNAを含まない。

10

【0031】

miRNA(マイクロRNA)という用語は、文脈から明らかなように、miRNA分子、並びに、miRNA前駆体及び成熟RNAの一方又は両方、を含むうるが、好ましくは成熟RNAである。

【0032】

以下のように、本発明の実施形態(及びさらなる態様)は、miRNAに対する言及によって記載されている。以下に記載された本発明の実施形態のいずれか又は全てに対して代替的である任意の実施形態では、miRNAに対する言及は、(例えば、特定のmiRNAに対して言及した場合以外における)文脈によって許容される、(上記で定義されたノンコーディングRNAなどの)ノンコーディングRNA又は他のノンコーディングRNAに対する言及の代替的な表現でありうる。

20

【0033】

好ましくは、本発明は、PSC由来の細胞集団におけるPSCの混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数を、所定の混入細胞数に対して事前に定義された(及び好ましくは特徴付けられた)miRNA発現量を用いて、決定するように方向づけられる。所定の混入細胞数は、治療法などの別用途に従い、より好ましくは特定の細胞療法や必要とされる投与量に従い、選択されうる。

【0034】

多能性幹細胞(PSC)は胚性幹細胞(ESC)又は人工多能性幹細胞(iPSC)でありうる。

【0035】

本明細書で用いられるPSCの混入細胞とは、残存したPSCの細胞、未分化なPSC、及び不完全に分化したPSCであると判断される。不完全に分化したPSCとは、多能性幹細胞由来の当該細胞集団の特定の細胞に完全には分化していないが、多能性を有する分化段階のような、ある中間段階に位置しうる、PSCを意味する。このようなPSCの混入細胞は、未分化なPSC又はPSC由来の前駆細胞を含むうる。PSCの混入細胞は、未分化なPSCの細胞からなるものとして、任意に定義されうる。

30

【0036】

本発明の方法は、PSC由来の該細胞に分化する中間段階にあるPSCや多能性細胞のような、PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上のmiRNAに対して、PSC由来の当該細胞集団の試料を測定すること又は検査することを、好ましくは含む。これは、PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上のmiRNAの発現量(又は発現パターン)を、PSC由来の当該細胞集団の試料において、決定する(又は測定する)ために実施される、過程のことを意味する。

40

【0037】

当該測定法の実施対象である1つの又は集合体を形成する2つ以上のmiRNAは、「集合体」の又は「標的」のmiRNAとして、区別しないで、本明細書において言及されうる。

【0038】

好ましくは、PSC由来の当該細胞集団におけるPSCの混入細胞の混入の有無又は細胞数を決定するために、PSC由来の当該細胞集団の試料における標的miRNAのmiRNA発現は、所定の混入細胞数と比較して、並びに/又は、バックグラウンドの及び/若しくはコントロールの

50

試料と比較して、決定される。

【0039】

所定の混入細胞数は、細胞療法などの該細胞の別用途での必要性に従い、選択されうる。例えば、相対的に低用量で投与される細胞を必要とする細胞療法の適応に対しては、許容可能な所定の混入細胞数は相対的に高くなりうる。一方で、相対的に高用量の細胞を必要とする細胞療法では、特に、例えば、奇形腫又は腫瘍の形成に対して、より感受性の高い組織に投与する場合、許容可能な所定の混入細胞数は相対的に低くなりうる。所定の混入細胞数は、PSCの混入細胞が150細胞数未満である、任意には100細胞数未満である、細胞の注入量に従い、任意に決定されうる。

【0040】

好ましくは、該当する所定の混入細胞数が、PSC由来の当該細胞集団について100万細胞数あたり1000細胞数未満又はそれに等しい細胞数であり、PSC由来の当該細胞集団について、より好ましくは、100万細胞数あたり500細胞数未満又はそれに等しい細胞数であり、さらにより好ましくは、100万細胞数あたり100細胞数未満又はそれに等しい細胞数であり、さらにより好ましくは、100万細胞数あたり50細胞数未満又はそれに等しい細胞数であり、より好ましくは、100万細胞数あたり20細胞数であり、最も好ましくは、100万細胞数あたり10細胞数未満又はそれに等しい細胞数である。該当する所定の混入細胞数が、PSC由来の当該細胞集団について、100万細胞数あたり9細胞数、100万細胞数あたり8細胞数、100万細胞数あたり7細胞数、100万細胞数あたり6細胞数、100万細胞数あたり5細胞数、又は100万細胞数あたり4細胞数、であることが任意にありうる。好ましくは、該当する所定の混入細胞数が、100万細胞数あたり5細胞数であると選択される。この好ましい実施形態によれば、試料は、この所定の混入細胞数に対して測定され、PSCの混入細胞数が所定の混入細胞数以上である場合は、好ましくは5細胞数以上の場合などは、結果として不適切であると判断される。

【0041】

好ましくは、該方法は、PSC由来の当該細胞集団の試料中の標的miRNAの発現量を測定すること、並びに、陽性コントロールに対してなされた測定結果と比較すること、を含み、当該陽性コントロールは、既知の又は所定の細胞数にPSCの混入細胞を播種させた又は添加させた細胞を含むコントロール試料において、標的miRNA発現を測定したものでありうる。当該コントロール試料における、PSCの混入細胞のこのような所定の細胞数は、上記した所定の混入細胞数のような、PSC由来の細胞におけるPSCの混入細胞の(安全であると推定される又は判断される)所定の細胞数と、好ましくは一致する。好ましい実施形態においては、当該コントロール試料におけるPSCの混入細胞数は、100万細胞数あたり10細胞数である。より好ましい実施形態においては、PSCの混入細胞数は、100万細胞数あたり5細胞数である。好ましくは、当該コントロール試料中の標的miRNAの発現の測定は、PSC由来の細胞試料に対する測定と同時に実施される。

【0042】

陽性コントロールを表す当該コントロール試料は、細胞療法などの別用途のための細胞集団の推定された安全性に対する閾値として定義されることがあり、並びに、例えば、(すなわち、細胞療法等において使用するための次の処理段階のために公開される、細胞集団のバッチ又はロットの)ロット公開に対しても、同様に定義されうる。該閾値は、望ましい最大値を表す、又は、許容可能なあらゆる測定結果が必ず該閾値未満の値を表す、と見なされうる。当該コントロール試料では、PSCの混入細胞数は、好ましくは所定の閾値と一致する。実施形態の1つにおいて、(平均値が2回以上の測定によって、例えば、少なくとも3回以上の測定によって、算出されたと仮定すると、)標的miRNA濃度を測定した平均値が、当該コントロール試料の標的miRNAを測定した平均値未満である場合、又は、その平均値以下である場合、PSC由来の細胞試料では、混入細胞数が、所定の細胞数未満である、又は、(該閾値が許容可能な細胞数であるなら、)所定の閾値未満である、と判断される。他の実施形態において、PSC由来の細胞に対する標的miRNA発現の測定結果の平均

値が、(又は、代替として、このような測定結果の最頻値が、若しくは、測定結果の全てが、)信頼区間又は標準偏差などのあらゆる適切な方法によって決定される、例えば平均値とその誤差として表されうる、閾値の範囲を逸脱している場合、統計的な誤差を調整するために、PSC由来の細胞試料は閾値未満の混入細胞数であると判断されうる。好ましくは、該閾値は、混入細胞数が検出不可能である及び/又は閾値未満である試料に対して測定可能なmiRNA発現量を、該閾値と区別することができるような、値である。好ましくは、該方法は、PSC由来の細胞集団におけるPSC混入細胞の混入細胞数が、検出不可能な混入細胞数である、(上記した範囲でありうる)該閾値以下の検出可能な混入細胞数である、該閾値と等しい(若しくは該閾値の誤差限界以内である)検出可能な混入細胞数である、若しくは、該閾値を超える検出可能な混入細胞数である、という決定を提供し、又は、該決定は、測定値の平均値についての統計的な誤差と一致する範囲を任意に有しうる、個別の混入細胞数を、提供しうる。

【0043】

好ましくは、該方法は、上記したコントロール試料を用いた陽性コントロールにより、標的miRNAに対して該試料を測定することを含む。

【0044】

当該陽性コントロールに対するコントロール試料は、PSCの混入細胞に対して好ましくない条件下で(好ましくは残存するPSCの存在を無視できる細胞数の条件下で)さらに培養させ続け、次にPSCの混入細胞を所定の細胞数に播種させた又は添加させた、PSC由来の細胞を含みうる。代替的には、当該陽性コントロールは、PSC由来の該細胞と同じ種類ではあるが、(例えば、骨髄細胞などの)体細胞のような代替的な細胞源に由来する、任意には、PSCの混入細胞を所定の細胞数に添加させた又は播種させた、当該細胞源に対して好ましくない条件下で増殖させた又は継代させた、細胞を含みうる。

【0045】

好ましくは、該方法は、バックグラウンドのコントロール試料を用いたバックグラウンドコントロールにより、標的miRNAに対して該試料を測定することを含む。当該バックグラウンドコントロール試料は、混入が無視できる細胞数(例えば、所定の閾値と比較した場合に、例えば、該閾値の10%未満、5%未満、又は1%未満)であると判断される、及び、好ましくは、未混入な試料であると判断されうる、細胞集団の試料を含みうる。好ましくは、当該バックグラウンドコントロール試料は、類似した分化状態及び/又は表現型を有する細胞のような、PSC由来の該細胞と類似した又は同種である細胞を含む。このようなバックグラウンドコントロール試料は、PSC由来の細胞集団の発生源である当該PSCに対して好ましくない条件下において増殖させた又は継代させた、PSC由来の細胞集団を含みうる。代替的には、当該バックグラウンドコントロール試料は、PSC由来の該細胞と同じ種類ではあるが、代替的な細胞源に対して好ましくない条件下において任意に増殖させた、(例えば、骨髄細胞などの)体細胞のような代替的な細胞源に由来する、細胞を含みうる。

【0046】

その結果、当該バックグラウンドコントロールは、標的miRNAの発現を、好ましくはPSC由来の当該細胞試料と同時に、好ましくは陽性コントロール試料も同時に、測定しうる。好ましくは、当該バックグラウンドのシグナル値は、検出不可能な混入細胞数に一致する値(又は、繰り返し測定して、若しくは、統計的な分析によって、決定された範囲)として判断されうる。

【0047】

好ましくは、該方法は、PSC由来の当該細胞集団、バックグラウンドコントロール試料、及び陽性コントロール試料、を測定することを含む

【0048】

好ましくは、該方法は、PSC由来の当該細胞集団とPSCの当該混入細胞との間に、非特異的に発現された、好ましくは非差次的に発現された、1つ又はそれ以上の内因性ノンコーディングRNAに対して、好ましくはmiRNAに対して、PSC由来の当該細胞集団の、並びに、

バックグラウンドの及び/又は陽性のあらゆるコントロールの、該試料を測定することをさらに含む。これは、例えば混入が全く検出されないという結果が有効であることを保証するために使用することができる、標準的な又は対照的な性質を当該測定法に対して提供する。

【0049】

該方法は、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のmiRNA(標的miRNA)に対して、任意には内因性ノンコーディングRNA(好ましくは内因性miRNA)に対して、陽性コントロール及び/又はバックグラウンドコントロールを用いて、PSC由来の当該細胞集団の該試料を測定することを、好ましくは含み、当該測定段階は、当該標的miRNAについて、任意には当該内因性miRNAについて、その濃度を測定するために、該試料や任意の陽性コントロールを処理すること及び分析すること、該試料中の並びに陽性の及び/又はバックグラウンドのコントロール中の、標的miRNA及び内因性miRNAの発現量を比較すること、並びに、該試料中のPSCの混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数を決定すること、を含む。

10

【0050】

本発明は、あらゆる適切な測定技術を用いて、好ましくは実施されうる。例えば、該方法は、逆転写、アミクロアレイ、PCR、定量PCR、次世代シーケンシング、ヌクレアーゼプロテクション法、プローブハイブリダイゼーション法、パイロシーケンシング、及びプライマー伸長法から選択される、少なくとも1つの技術を含みうる。

【0051】

好ましくは、該方法は、当該標的miRNAを、標的miRNAの塩基配列の少なくとも一部と実質的に相補的なヌクレオチド配列を有するプライマー及び/又はプローブを用いて、検出すること又は測定することを含む、該試料を処理する及び分析する段階を含む。

20

【0052】

任意には、当該miRNA発現の測定には、定量RT-PCR、デジタルPCR、ドロップレットデジタルPCR、シーケンシング、Luminex(商標)法による核酸増幅法、若しくは他のハイブリダイゼーションに基づく技術のうち、いずれか1つが又は幾つかを組み合わせ、用いられる。

【0053】

上記したように、標的miRNAの発現量の定量的測定が実施されることが、好ましい。当該測定法は、定量RT-PCR、デジタルPCR、又はドロップレットデジタルPCRを含むことが、好ましい。

30

【0054】

好ましくは、該方法はドロップレットデジタルPCR(ddPCR)を利用する。

【0055】

該方法は、1本鎖の標的miRNA又はその集合体を使用しうる。当該集合体は、miRNAを任意の個数で含みうるが、好ましくは最大で20、より好ましくは最大で10、さらにより好ましくは2から6で、例えば3、4、又は5、といった個数である。任意には、1本鎖のmiRNAは、PSCの混入細胞のマーカーとして用いられうる。

【0056】

好ましくは、当該標的miRNAは、PSCの混入細胞に特異的なmiRNAとして、特定及び実証されている。

40

【0057】

好ましくは、当該標的miRNAは、本明細書において記載された方法に従い、選択される。

【0058】

好ましくは、本発明の方法において使用するための標的miRNAの候補分子は、100以上のmiRNA、好ましくは少なくとも200のmiRNAを含みうる、1組のmiRNAによる包括的なmiRNAの測定法を用いることで、特定されうる。好ましくは、当該測定法は、PSC由来の細胞集団及びPSCの細胞集団の試料における包括的なmiRNA発現についての差次的発現の解析を備える、マイクロアレイである。PSC由来の当該細胞集団は、PSCの混入細胞を全く含

50

まない細胞集団、又は、無視できる細胞数の細胞集団で、好ましくはあるべきであり、任意には、PSC由来の当該細胞集団は、例えば、PSCに対して不適切な条件下で増殖させたPSC由来の細胞を含む、上記したバックグラウンドの細胞集団のような細胞集団を含みうる。好ましくは、当該マイクロアレイは、アジレント・テクノロジー株式会社から入手可能であるような市販のmiRNAプラットフォーム上(例えば、SurePrint Human miRNA microarrays)で実施される。PSC由来の当該細胞試料では特異的に発現されているが、当該PSC試料では特異的に発現されていない、これらのmiRNAは、1つの又は2つ以上のmiRNAが、本発明における混入細胞の決定方法のために選択されうる、標的miRNAの候補集団を形成しうる。

【0059】

10

好ましくは、PSCの混入の検出方法において使用するための標的miRNAを選択する方法であって、miRNAの大部分(例えば、少なくとも100)についての測定法、好ましくは上記したようなマイクロアレイ、を実施することを含む方法、が提供されている。好ましくは、標的miRNAの候補集団は、定量逆転写PCR(qRT-PCR)などの適切な定量的な測定方法を用いる方法によって、差次的な発現という観点から実証されうる。好ましくは、標的miRNAの候補集団は、最大100のmiRNA、好ましくは最大およそ50のmiRNA、を含む。

【0060】

好ましくは、以下のmiRNAから選択される、1つの又は集合体を形成する2つ以上のmiRNAを含む、標的miRNA: hsa-miR-367-3p、hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302c-3p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302a-5p、hsa-miR-302d-3p、hsa-miR-663a、hsa-miR-1323、hsa-miR-373-3p、hsa-miR-363-3p、hsa-miR-205-5p、hsa-miR-96-5p、hsa-miR-512-3p、hsa-miR-372-3p、hsa-miR-302c-5p、hsa-miR-124-3p、hsa-miR-517a-3p、hsa-miR-517b-3p、hsa-miR-150-3p、hsa-miR-520c-3p、hsa-miR-205-3p、hsa-miR-498、hsa-miR-371a-5p、hsa-miR-3149、hsa-miR-630、hsa-miR-371a-3p、hsa-miR-183-5p、hsa-miR-3692-5p、hsa-miR-32-3p、hsa-miR-34b-3p、hsa-miR-4327、hsa-miR-525-5p、hsa-miR-519d-3p、hsa-miR-629-3p、hsa-miR-3141、hsa-miR-518b、hsa-miR-515-3p、hsa-miR-516b-5p 及び hsa-miR-519b-3p。これは標的miRNAの好ましい候補集団である。

20

【0061】

任意には、本発明の方法において使用するための1つ又はそれ以上の標的miRNAは、上記で定義された候補集団から選択されうる。任意には、当該候補集団は、最大20のmiRNA、好ましくは最大10のmiRNAの精製された候補集団を提供するため、発現量などの1つの又はそれ以上の因子に基づいて、精製されうる。任意には、精製された当該候補集団は、当該候補集団において最も高発現されている、例えば、20倍高発現されている、10倍高発現されている、又は6倍高発現されている、当該候補集団のmiRNAを含む。

30

【0062】

好ましい実施形態の1つにおいて、当該候補集団から最も高発現量であるとして選ばれうる標的miRNAは、以下のmiRNAから選択される、1つの又はそれ以上のmiRNAを、好ましくは含む: hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302c-3p、hsa-miR-302d-3p、hsa-miR-367-3p、hsa-miR-371a-3p、hsa-miR-372-3p、hsa-miR-373-3p、hsa-miR-373-3p、hsa-miR-512-3p及びhsa-miR-520c-3p。これは標的miRNAの精製された候補集団の例を表している。

40

【0063】

好ましくは、当該候補集団又は精製された候補集団は、発現量の望ましい閾値におけるその感度という観点において実証されることがあり、好ましくは、これは実施される測定方法に対して実証される。100万細胞数あたり10細胞数のPSC由来の細胞という望ましい閾値が要求される、当該閾値における感度分析を、例えば、当該候補集団又は精製された候補集団は、好ましくは受ける。これは、1組の又はサブセットのmiRNA(例えば、精製された候補集団)に感度分析を受けさせることによって、好ましくは達成されうる。好ましくは、PCRに基づく測定法に対して、当該感度分析は、PCRを含み、好ましくは定量RT-PCR、ddPCR、又は他の定量法のうち1つを含み、好ましくはmiRNA測定に適したデジタル

50

PCRの手法を含む。この好ましい実施形態によれば、選択された測定方法は、既知の混入細胞数を添加させた細胞試料、PSC由来の該細胞に相当する細胞(例えば、上記したようなバックグラウンドの細胞)においてPSCを含む、添加させた細胞試料に対して、実施される。任意には、この定量的な測定法は、PSCの混入細胞を添加させた細胞試料の複数の異なる濃度において実施され、その1組(例えば、精製された候補集団)における各miRNAを用いる測定法の感度が評価されうる。発現量の望ましい閾値において区別可能であると示されている、これらのmiRNAは、測定法において使用される、又は、1つの若しくはそれ以上の標的miRNAが使用のために選択されうる、感度が評価された標的miRNAの集団として選択されうる。

【0064】

10

好ましい実施形態の1つにおいて、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAは、以下のmiRNAから選択される、1つの又はそれ以上のmiRNAを含む：hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302c-3p、hsa-miR-302d-3p及びhsa-miR-367-3p。これは、使用されうる、又は、1つ又はそれ以上のmiRNAが、本発明に従い混入細胞数を決定する方法において、使用するために選択されうる、感度が評価された標的miRNAの集合体の例である。

【0065】

miRNA又はその集合体を選択する方法は、好ましくはddPCRである測定方法の選択において最適化手段を実行すること、感度が評価された(又は他の1組である)標的miRNAの候補集団の感度分析を実施すること、をさらに含む。実施されうる最適化の例は以下に記載されている。

20

【0066】

好ましい実施形態の1つにおいて、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAは、miRNAの集合体を最適化させるddPCRであると好ましくは判断されうる、以下のmiRNAから選択される、1つの又はそれ以上のmiRNAを含む：hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302c-3p及びhsa-miR-302d-3p。好ましくは、PSC由来の細胞集団におけるPSCの混入細胞の混入を、100万細胞数あたり10細胞数以下という感度を求めて、ddPCRを用いて検出するための方法における使用に対して、単独で、又は、標的miRNAの集合体において、使用するためのmiRNAは、hsa-miR-302b-3pである。

【0067】

30

実施形態の1つにおいて、内部コントロールとして使用するための内因性miRNAは、hsa-miR-107及びhsa-miR-130a-3pのうち、1つ又は両方から選択される。

【0068】

本発明の好ましい実施形態の1つにおいて、該方法及び方式は、定量RT-PCRのような、最も好ましくは、ddPCRのような、定量PCRを利用する測定法を含む。このように、上記したようなバックグラウンドコントロール及び陽性コントロールを任意に用いる、1つの又はそれ以上の差次的に発現されている標的miRNA(及び、任意には内部コントロール)に対する測定によって、PSCの混入細胞のPSC由来の細胞集団における混入を検出するためのddPCRの使用は、さらなる態様や好ましい実施形態において、提供されている。好ましくは、当該測定法は、100万細胞数あたり10細胞数以下の、より好ましくは100万細胞数あたり5細胞数の、PSCの混入細胞を検出することができる。好ましくは、当該標的miRNAは、望ましい閾値において高感度なものとして、選択される。好ましくは、当該ddPCRは、選択された1つ又はそれ以上の標的miRNAの望ましい閾値において、高感度な検出及び識別のために最適化される。

40

【0069】

好ましくは、当該PCRの方式及び方法(好ましくは、当該ddPCRの方式及び方法)は、1つ又はそれ以上の以下の内容に従い最適化される：

- ・逆転写酵素による相補的DNA(RT cDNA)の合成段階は、RNAインプット及び/又はRT cDNAプライマーの濃度に対して、最適化される。

- ・PCR段階は、1つの又はそれ以上のcDNA濃度、PCRプライマーの濃度、及びアニーリング

50

温度に対して、最適化される。

【0070】

より好ましくは、該方法はddPCRであり、該方法はRNAインプット及びRT cDNAのプライマーの濃度に対して、最適化される。好ましくは、当該PCR段階も最適化され、好ましくはcDNA濃度及びPCRプライマーの濃度に対して、好ましくはアニーリング温度に対しても、最適化される。

【0071】

特に好ましい実施形態において、該方法は、PSC由来の細胞試料(及び、任意には、バックグラウンドコントロール試料及び陽性コントロール試料)において、ddPCRを実施することを含み、好ましくは、該方法は、総RNAを抽出すること、標的miRNAに相当するcDNAを製作するために当該標的miRNAにおいて逆転写段階を(例えば標的miRNAに対するプローブやプライマーを用いて)実施すること、ddPCRによって当該cDNAを増幅すること、及び増幅させたシグナル値から個々の試料における標的miRNAの発現量を決定すること、を含む。

10

【0072】

好ましくは、該方法は、miRNA RT assay(好ましくは、TaqMan miRNA assay又はその類似物、並びに、以下に提供されている一般的なプロトコル)内のmiRNA逆転写酵素成分、及び(好ましくは、市場で入手可能なドロップレットデジタルPCR方式、並びに、以下に提供されている一般的なプロトコルを用いる)ddPCR成分、を備えるddPCR法を含む。

【0073】

特に好ましい実施形態において、本発明の方法及び方式は、好ましくは上記したようにより好ましく最適化されたddPCRによって、PSC由来細胞におけるPSC混入細胞の混入を検出する測定法において、前記した好ましい標的miRNA(例えば、好ましい候補集団、より好ましくは発現が評価された候補集団、さらにより好ましくは感度が評価された標的miRNA、及び、より好ましくは5、4、又は1の好ましい標的miRNAに対して言及されたもの、から選択されたmiRNA)の使用を含む。さらにより好ましくは、混入の閾値が、100万細胞あたり最大20細胞数、さらにより好ましくは100万細胞あたり最大15細胞数、及び最も好ましくは100万細胞あたり10細胞数、に選ばれる、並びに、より好ましくは100万細胞あたり5細胞数から10細胞数、好ましくは100万細胞あたり5細胞数、から選択される。

20

【0074】

本発明の方法は、100万細胞あたり10細胞数という閾値において、より好ましくは100万細胞あたり5細胞数という閾値において、及び、より好ましくは偽陽性や偽陰性という結果が全く生じない、該方法の好ましい実施形態における場合において、低い偽陽性率及び偽陰性率を好ましくは有する。このように該方法は高感度で高特異度な方法である。

30

【0075】

本発明の他の態様は、PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、所定のノンコーディングRNAに特徴的なヌクレオチド配列を各々が含む、1つの又は2つ以上のPCRプライマーを好ましくは含む、PSC由来の細胞試料中の対応する1つの又は2つ以上のmiRNAの濃度又は発現量を定量的に決定するのに使用するための、キットに方向付けられる。好ましくは、当該キットはddPCRにおいて使用するためのものである。好ましくは、当該miRNAは上記で好ましいことが示されたmiRNAである。

40

【0076】

本発明の他の態様において、方式は以下の内容を含む：PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、少なくとも1つの又は2つ以上の所定の標的miRNAを検出するための、1組のポリヌクレオチド、及び、PSC由来の細胞集団から採取した試料から抽出されたRNA、若しくは、PSC由来の細胞集団から採取した試料から抽出されたRNAから逆転写されたcDNA。該方式はddPCRのための装置又は方式を好ましくは含む。

【0077】

PSC由来の当該細胞集団は、典型的には細胞療法のために使用することが意図される細

50

胞集団(幹細胞由来の細胞製品)であり、PSCに由来するあらゆる細胞の種類でありうる。このようなPSC由来の細胞は例えば間葉系幹細胞(MSC)でありうる。好ましくは、PSC由来の該細胞はPSCの重要な特徴を欠いたものである。好ましくは、PSC由来の該細胞は多能性ではない。任意には、PSC由来の該細胞は多能性を有する特定の系統の細胞でありうる。任意には、PSC由来の該細胞は、PSC由来である、心臓細胞、網膜細胞、神経細胞、肝細胞等でありうる。任意には、PSC由来の該細胞は神経幹細胞、心臓幹細胞等でありうる。任意には、PSC由来の該細胞はT細胞又はCD4陽性細胞でありうる。好ましくは、(MSC以外の)PSC由来の該細胞は最終分化した細胞である。

【0078】

実施形態の1つにおいて、PSC由来の該細胞はMSCである。実施形態の1つにおいて、PSC由来の該細胞は心筋細胞である。実施形態の1つにおいて、PSC由来の該細胞はドーパミン作動性神経細胞である。 10

【0079】

実施形態の1つにおいて、当該PSC細胞はiPSCである。

【0080】

好ましくは、PSC由来の当該細胞集団は細胞療法において使用するためのものである。

【0081】

実施形態の1つにおいて、PSC由来の当該細胞集団は、移植片対宿主病、心臓療法、組織再灌流療法、脳卒中からの回復、1型糖尿病及び2型糖尿病、腎疾患及び腎移植からの回復、並びにアルツハイマー病などの、細胞療法において使用するためのMSCを含む。 20

【0082】

他の実施形態において、PSC由来の該細胞は心血管症状のための心筋細胞である。

【0083】

他の実施形態において、PSC由来の該細胞はパーキンソン病の治療のためのドーパミン作動性神経細胞である。

【0084】

任意には、PSC由来の該細胞は細胞療法において使用するためのCD34陽性細胞又はT細胞である。

【0085】

本発明のさらなる態様において、細胞療法において使用するためのPSC由来の細胞集団であって、100万細胞数あたり10細胞数以下、より好ましくは100万細胞数あたり5細胞数から10細胞数の範囲内である、100万細胞数あたり5細胞数などの所定の閾値以下といった、上記方法によって決定される所定の閾値以下のPSCの混入細胞を含む集団、が提供されている。 30

【0086】

さらに、細胞療法において使用するためのPSC由来の細胞集団を製造する方法であって、以下の内容を含む方法が提供されている：PSC由来の細胞集団を提供するために、多能性幹細胞(PSC)のPSC由来細胞への分化を誘発すること；PSC由来の当該細胞集団の試料を採取すること；当該細胞試料中のPSCの混入細胞の有無及び細胞数を決定するために、該試料を上記した該方法で測定すること、及び、PSCの混入細胞の有無及び細胞数が所定の混入細胞数と等しい又はそれ未満であるとの決定に基づいて、細胞療法に適する又は入手可能なようにPSC由来の当該細胞集団を特徴付けること；並びに、PSC由来の該細胞をそれを必要とする患者に任意に投与すること。好ましくは、所定の混入細胞数は、該試料について100万細胞数あたり10細胞数のPSC混入細胞、より好ましくは、該試料について100万細胞数あたり5細胞数のPSC混入細胞である。 40

【0087】

他の態様において、PSC由来の細胞を用いる細胞療法によって、それを必要とする患者を治療する方法であって、細胞療法において使用するためのPSC由来の細胞集団を上記方法に従い製造することを含む方法であって、該患者に対してPSC由来の当該細胞集団の少なくとも一部を投与することをさらに含む方法、が提供されている。 50

【0088】

他の態様において、PSCを利用した細胞療法によって生じる奇形腫の危険性を低減するための方法であって、当該細胞療法において使用するためのPSC由来の幹細胞集団を上記方法に従い製造すること、並びに、当該細胞集団の少なくとも一部をそれを必要とする患者に対して投与すること、を含む方法、が提供されている。

【0089】

本発明のさらなる態様において、それを必要とする人間の又は動物の患者を治療する方法であって、該患者に対して1回分の又は複数回分の細胞療法の投与量を投与することを含み、当該細胞療法の投与量が、100万細胞数あたり10細胞数又は100万細胞数あたり5細胞数といった、所定の閾値以下のPSCの混入細胞数を含むように特徴付けられたPSC由来の細胞集団を含む、当該細胞療法の投与量によって、奇形腫及び/又は腫瘍を形成する危険性を低減させるのに該患者を治療する上で効果的である、方法が提供されている。

【0090】

PSCの混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のmiRNAに対する、miRNAの発現データ又は発現プロファイルの、PSCを利用した細胞療法における奇形腫の危険性を低減させるための使用が、結果としてさらに提供されている。

【0091】

以下の態様は別用途のための細胞源由来の細胞集団中の細胞源の混入細胞の混入の決定に関する。

【0092】

さらなる態様の1つにおいて、別用途のための細胞源由来の細胞集団中の細胞源の混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数を決定するための方法であって、細胞源の混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAに対して、細胞源由来の当該細胞集団の試料を測定することを含む方法、が提供されている。

【0093】

他のさらなる態様において、細胞源由来の細胞集団のロット公開の方法であって、細胞源由来の細胞集団の細胞源の混入細胞の混入を上記したように決定するための方法を実施すること、並びに、混入が全くない又は許容可能な混入細胞数であるとの決定に基づいて、別用途のための細胞源由来の当該細胞集団を公開すること、を含む方法が、提供されている。

【0094】

本発明のさらなる態様において、細胞源の混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、1つの又は集合体を形成する2つ以上の所定のノンコーディングRNAに対する、ノンコーディングRNAの発現データ又は発現プロファイルの、別用途のための細胞源由来の細胞集団中の細胞源の混入細胞の混入の有無及び/又は細胞数を決定するための使用、が提供されている。

【0095】

本発明のさらなる態様において、細胞源の混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、所定のノンコーディングRNAに特徴的なヌクレオチド配列を各々含む、1つの又は2つ以上のPCRプライマーを含み、細胞源由来の細胞試料中の対応する1つの又は2つ以上のノンコーディングRNAの濃度又は発現量を定量的に決定するのに使用するためのキット、が提供されている。

【0096】

本発明のさらなる態様において、細胞源由来の細胞集団中の混入を検出するための方法であって、細胞源の混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、標的ノンコーディングRNAと相補的なヌクレオチドを含み、細胞源由来の細胞団の試料から抽出された当該標的miRNAであるノンコーディングRNA由来である、cDNA分子の濃度を

増幅すること及び測定することを含む方法、が提供されている。

【0097】

本発明のさらなる態様において、細胞源由来の細胞集団のロット公開の方法であって、細胞源由来の細胞集団の細胞源の混入細胞の混入を上記したように決定するための方法を実施すること、並びに、混入が全くない又は許容可能な混入細胞数であるとの決定に基づき、別用途のための細胞源由来の当該細胞集団を公開すること、を含む方法、が提供されている。

【0098】

本発明のさらなる態様において、細胞療法において使用するための細胞源由来の細胞集団であって、上記した方法によって決定されるように、100万細胞数の細胞源由来細胞あたり10細胞数以下、より好ましくは100万細胞数あたり5細胞数以下、である細胞源の混入細胞を含む集団、が提供されている。

10

【0099】

本発明のさらなる態様において、細胞療法において使用するための細胞源由来の細胞集団を製造する方法であって、以下の内容を含む方法、が提供されている：

細胞源由来の細胞集団を提供するために、多能性又は複能性を有する細胞源のこれらに由来する細胞への分化を誘発すること；

細胞源由来の細胞集団の試料を採取すること

当該細胞試料中の細胞源の混入細胞の有無及び細胞数を決定するために、該試料を上記した方法で測定すること、及び、細胞源の混入細胞の有無及び細胞数が所定の混入細胞数と等しい又はそれ未満であるとの決定に基づき、細胞療法に適する又は入手可能なように細胞源由来の当該細胞集団を特徴付けること；並びに、細胞源由来の該細胞をそれを必要とする患者に対して任意に投与すること。

20

【0100】

本発明のさらなる態様において、細胞源由来の細胞を用いる細胞療法によってそれを必要とする患者を治療する方法であって、細胞療法において使用するための細胞源由来の細胞集団を上記した方法に従い製造することを含む方法であって、細胞源由来の当該細胞集団の少なくとも一部を該患者に対して投与することをさらに含む方法、が提供されている。

【0101】

本発明のさらなる態様において、以下の内容を含む方式が提供されている：細胞源の混入細胞において差次的に発現されることが知られた又は決定された、少なくとも1つの又は2つ以上の所定のノンコーディングRNAを検出するための1組のポリヌクレオチド、及び、細胞源由来の細胞集団から採取した試料から抽出されたRNA、若しくは、細胞源由来の細胞集団から採取した試料から抽出されたRNAから逆転写されたcDNA。

30

【0102】

これらのさらなる態様において、細胞源は、細胞療法などの別用途のための細胞集団の細胞源を形成することがあり、別用途のための細胞集団が当該細胞源に由来する、細胞である。該誘導は、細胞源から分化すること、又は、分化によらなければ、遺伝情報の取り込みを介する形質転換若しくは他の変化によって、導き出されること、を含みうる。好ましくは、当該細胞源及び細胞源由来の当該細胞の両方は、安定であり、複製可能であり、特定できる表現型を有する、ということがある。好ましくは、当該細胞源は、成体由来の体性幹細胞(例えば、骨髄、脂肪組織、末梢血、骨格筋、子宮内膜、胎盤、ワルトンジェリー、若しくは歯髄)のような幹細胞である、又は、臍帯血若しくは臍帯に由来するようなヒト胚性幹細胞である、又は、人工多能性幹細胞か多能性細胞に由来する細胞である。任意には、該細胞は組織特異的な前駆細胞である。

40

【0103】

好ましくは、該細胞はヒト細胞である。好ましくは、該細胞は幹細胞又はT細胞である。

【0104】

50

該細胞は、特に幹細胞は、例えば、骨髄、脂肪組織、末梢血、骨格筋、子宮内膜、胎盤、臍帯血、臍帯、ワルトンジェリー、歯髄、及び多能性細胞由来の細胞でありうる、1つの又は複数の細胞源から供給されうる。

【0105】

PSC由来の細胞に関する方式、使用、及び方法に関連して上記され、標的miRNAの集合体又はバイオマーカーを決定する方法を含む、これらのさらなる態様のさらなる特徴は、当該文脈が許容するこれらのさらなる態様にも適用する。

【0106】

miRNAに対する及び特定のmiRNAに対する本明細書における言及は、Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC)から資金提供を受け、マンチェスター大学のグリフィス-ジョーンズ研究室によって運営されている、miRNAのレジストリデータベースである、www.mirbase.orgというURLのウェブサイト上に記載された命名規則に従い、miRNAの識別コード(miRNA識別子)を使用している。当該miRNA識別子は2018年1月18日時点で有効な識別コードである。

【実施例】

【0107】

実施例は、幹細胞由来の細胞試料においてPSCの混入を検出するための特異的であり高感度な候補分子として使用するためのmiRNAを特定して特徴付けるための該過程を示すこと、並びに、好ましい測定過程に達する感度を示すこと、に対して提示されている。データを生成するために用いた全ての細胞はヒト細胞であった。

【0108】

方法と材料

iPSC由来のMSC試料の製造

iPSC由来のMSC試料中にiPSCが残存する可能性を最小化するため、本明細書において用いられる当該iPSCに由来する全てのMSCは、あらゆる残存するiPSCが増殖しないMSC培養地におけるこれら細胞の培養時間を延長することによって、iPSCの混入するあらゆる可能性を最小化する方法において、製造された。このアプローチは、治療において使用するための幹細胞由来のMSCを日常的に製造する間は、不可能であったろうが、iPSCが混入するあらゆる可能性を最小化するために、本明細書において使用された。治療目的で用いられるiPSC由来のMSCと区別するために、iPSC由来のMSCはderived propagated MSC(dp MSC)として言及するものとする。

【0109】

細胞添加試料の製造

iPSCに由来するMSCと比べてiPSCにおいて差次的に発現されているmiRNAを決定するための分析を実施するために、iPSC由来のdp MSCの細胞集団はiPSC混入が少ないように準備され、並びに、iPSC由来のdp MSCのiPSC添加試料を選択することで準備された。

【0110】

既知濃度に添加させたiPSCを含むdp MSCを備えた、独立した3組の細胞添加試料(A、B、C)は、連続希釈によって製造した。当該細胞添加試料は、10000iPSC、1000iPSC、100iPSC、及び10iPSCを各々含んでおり、各細胞数のiPSCを100万細胞数のdp MSCに播種させた。これらの試料は、以下に記載された、定量逆転写PCR(QRT-PCR)による分析及びドロップレットデジタルPCR(ddPCR)による分析の両方における検出感度の評価に対して、用いられた。

【0111】

細胞ペレットの製造

分析された全ての細胞はヒト細胞であった。細胞ペレットは以下の様式における細胞から製造された。

【0112】

1×10^6 細胞数の細胞アリコットを遠心分離後、当該上澄みをピペットを用いて取り除き、該細胞を氷冷させたpH7.0であるリン酸緩衝生理食塩水(PBS)5mLで再懸濁させ、

4℃で300×gで5分の条件下において遠心分離させた。この段階を繰り返し実施し、該細胞を氷冷させたPBS 1 mLで再懸濁させ、1.5 mL用のマイクロチューブに移し替えた。このマイクロチューブを4℃で300×gで5分の条件下において遠心分離させ、当該上澄みをピペットを用いて取り除いた。結果として生じる細胞ペレットは、残存するPBSを全て回収するために、4℃で300×gで1分の条件下においてさらに遠心分離させた。回収されたPBSをピペットを用いて取り除き、該細胞ペレットを液体窒素中に急速冷凍させ、2週間という区切り以内にRNAの単離のために使用するまで、-80℃で保存した。

【0113】

RNAの抽出

(miRNAのような小分子のノンコーディングRNAを含む、全てのRNA分子種を含む)総RNAは、Exiqon miRCURY™ RNA Isolation Kit-Cell & Plant (cat. no. 300110)を用いて、製造メーカーの2.2版の取扱説明書に従い、冷凍保存された細胞から取得した当該細胞ペレットから単離された。総RNA濃度はNanodrop™ 1000 spectrophotometerを用いて測定された。RNAの純度及び品質は、260nm/280nm及び260nm/230nmの比に基づいて「純度が高い」として、及び、Agilent TapeStation 2200を用いて算出したRNA Integrity Numbers (RINs)が「大きい」ことで、評価された。

【0114】

マイクロRNAの発現分析—マイクロアレイ

ヒトのマイクロアレイを用いてmiRNA発現を分析するため、各細胞試料のRNAのアリコットをヌクレアーゼ非含有水を用いて50 ng/μLまで希釈し、分析まで-80℃で保存した。試料は、アジレント・テクノロジー株式会社のmiRNAマイクロアレイのプラットフォーム(SurePrint G3 Human v16 microRNA 8x60K microarray slides; miRBase v16.0, cat no. G4870A)上で、製造メーカーの1.7版の取扱説明書に従い、分析した。簡潔に説明すると、ヌクレアーゼ非含有水中で50 ng/μLである使用溶液から取得した、100 ngの総RNAを、マイクロアレイによる各実験に対するインプットとして使用した。各スライドは8つの個別のアレイを含み、各アレイは1349のマイクロRNAに相当し、このうち、1205がヒトのマイクロRNA(このうち1194のmiRNAがバージョン20のmiRbaseにマップされている)、144がウィルスのマイクロRNAに相当する。

【0115】

当該マイクロアレイ処理の4つの重要な手順は以下の通りである：

1. 単一色のCy3に基づく試薬によりRNAを標識する
2. 標識RNA試料を当該マイクロアレイにハイブリダイゼーションさせる
3. 洗浄段階
4. スライドの読み取り、データの取得、特徴の抽出(miRNA識別コードに対して、アレイスポットを適合させる)、結果画像とデータファイル上における品質管理の確認

【0116】

マイクロアレイデータの品質管理、前処理、正規化

全てのマイクロアレイデータは、アジレント社の(「good」から「excellent」までの)品質管理基準を満たしていた。次に、マイクロアレイデータの前処理及び正規化を、BioconductorのAgiMicroRNA packageを用いて実施した。

【0117】

アレイの品質管理は、以下の基準に基づき、棄却検定を用いて実施された：

- ・ 1アレイあたりの平均シグナル値
- ・ 1アレイあたりの平均バックグラウンド値
- ・ %表示された存在比率(各アレイ上において検出されたmiRNA発現の存在比率)
- ・ 1試料あたり及び1対あたりのデータ分布

【0118】

定量逆転写PCRによる差次的発現の確認

当該マイクロアレイ分析において特定されたmiRNAの差次的発現パターンを確認するた

10

20

30

40

50

め、QRT-PCR分析は、以下に記載したマイクロアレイ分析で使用したのと同じRNA試料を用いて、実施された：

QRT-PCRを用いてmiRNA発現を分析するため、iPSC試料中のRNAやdp MSC試料中のRNAといった各試料のアリコットを、使用濃度が5 ng/ μ Lとなるよう、ヌクレアーゼ非含有水を用いて希釈した。試料をExiqon LNATM primer assays及びRoche's Lightcycler(登録商標) 480 PCR systemを用いて分析した。当該QRT-PCRは製造メーカーの取扱説明書に従い実施した。簡潔に説明すると、10 ngのRNAを、1 $\times$ 反応緩衝液、1 $\times$ 逆転写酵素、10⁴個のUniSp 6スパイクインコピー(0.5 μ L)を含む使用溶液中において、Exiqon's LNA primer assay componentsを用いて逆転写した。当該逆転写サイクルの条件は、以下のように、42℃で60分及び95℃で5分であった。当該cDNAは、最終的に100倍希釈し、Exiqon's ExiLENT SYBR R(登録商標) Green mastermix及びRoche's Lightcycler(登録商標) 480 PCR systemを用い、製造メーカーの取扱説明書に従い、分析した。簡潔に説明すると、100倍希釈したcDNAを、1 $\times$ 使用溶液中でExiLENT SYBR(登録商標) Green mastermixに添加し、これをExiqon's Pick&Mix PCR panel arraysに添加した。

【0119】

発現量はsmall nucleolar RNAs C/D box (SNORDs)を用いて正規化した。5つのSNORDを候補正規因子として含んでいた。SNORDの48と38Bは変数が最も少ないGeNormアルゴリズムを用いて選択した。miRNAデータは発現量を(log2変換して)正規化して表し、各miRNAのCq値から算出した正規化因子のCq値の幾何平均を各試料に対して減算することで、デルタCqとして計算された。

【0120】

測定法の開発に適すると選択されたmiRNA候補分子の定量逆転写PCRを用いた感度評価

残存する未分化なiPSCの混入を検出するための測定法の開発に適したmiRNA候補分子を選択するため、QRT-PCR分析を、上記のように製造された既知濃度のiPSCスパイクインを含むdp MSCを備えた、細胞添加試料から抽出したRNAを用いて、実施した。上記したものと同様のQRT-PCR処理をこの分析において使用した。

【0121】

当該ddPCR法は、当業者によって理解され、並びに、当業者の能力の範囲内にある様式において、以下の内容を評価することで、開発され、最適化された：

- ・RNAインプット及びRT cDNAプライマー濃度に対して最適化された、逆転写酵素による相補的DNA(RT cDNA)の合成段階
- ・cDNA濃度、ddPCRプライマー濃度、及びアニーリング温度に対して最適化されたddPCR段階
- ・異なるオペレーター、装置試薬、及び試料を備える、2つの独立した実験施設において確認された上記内容物

最適化されたドロップレットデジタルPCR法の使用に適した選択方法の開発用のmiRNAの感度評価

【0122】

残存・混入した未分化なiPSCを検出するために最適化されたddPCR法を用いる、選択方法の開発用のmiRNAの感度評価が、QRT-PCRの感度評価の分析で用いたのと同じ試料を用いて、実施された。

【0123】

実施例1－iPSC特異的なmiRNAを特定するためのマイクロアレイ分析

(上記の方法と材料において記載したように製造された)純度の高いiPSC試料及び純度の高いdp MSC試料は、測定法開発用の候補分子の特定を目的とした研究において、マイクロアレイによって、全miRNA発現に対してプロファイルされた。全部で233のmiRNAがマイクロアレイデータセットに存在していた。iPSCにおいて特異的に発現されるが、dp MSCにおいては特異的に発現されない、miRNAを特定することを目的として、差次的発現分析を、iPSCにおいてのみ発現されたこれらのmiRNAを特定するために、実施した。この分析により、当該iPSCにおいてのみ発現され、当該iPSC由来MSCにおいては発現されていない(未

検出)、39のmiRNAからなる集合体が特定された。これらmiRNAの発現の密度やその特定は図1に示されている。図1は特にマイクロアレイのデータを示している：iPSCにおいて発現されるが、dp MSCにおいては発現されない、miRNAの発現密度は、箱ひげ図の形式で表されており、各箱内にある黒色の水平線は中央値を示しており、該箱は25パーセントイル値から75パーセントイル値までの範囲をとり、該ひげは当該データの最小値と最大値である。(iPSCはn=4、dp MSCはn=4)

【0124】

実施例2－選択されたiPSC特異的なmiRNAの差次的発現を確認するためのQRT-PCR分析

これらのmiRNAの差次的発現パターンを確認するため、マイクロアレイ分析に用いられたのと同じ試料を、39のmiRNAからなる集合体から取得した10のmiRNAの(発現量に基づき)選択されたサブセットを用いるQRT-PCRによって、分析した。このより高感度で定量的な技術基盤を用いて、この分析により、当該iPSCにおいて発現されているが、当該dp MSCにおいては発現されていない(未検出)、差次的発現のパターンが確認され、miRNA集合体の選択されたサブセットの発現順位も確認された。このデータは図2において示されている。

10

【0125】

図2は特にQRT-PCRのデータを示している：iPSCにおいてのみ発現されているが、MSCにおいては発現されていない、選択された1組のmiRNAのQRT-PCRによる確認。箱ひげ図において、各箱内にある黒色の水平線は中央値を示しており、該箱は25パーセントイル値から75パーセントイル値までの範囲をとり、該ひげは当該データの最小値と最大値である。(iPSCはn=4、MSCはn=4)

20

【0126】

実施例3－選択されたiPSCに特異的なmiRNAの細胞特異性を確認するためのマイクロアレイ分析

PSC由来細胞製品において残存・混入した未分化なPSCに対する測定法開発用の候補分子としての、10のmiRNA集合体選択されたサブセットの有用性を調べるため、他のPSCや他の非多能性由来の細胞の種類におけるこれらの発現は、マイクロアレイのデータから決定される。用いられた該試料は、iPSC特異的なmiRNAの特定に用いられるiPSC、及び、5つのリプログラミング技術や3つの異なる培養条件により、7種類の体細胞から取得されるiPSCであり、当該体細胞には、MSC(臍帯血由来、骨髄由来、脂肪組織由来)、脂肪細胞、MSC由来の軟骨細胞と骨細胞、初代脂肪細胞と初代軟骨細胞、CD34陽性細胞、初代内皮細胞、及び、CD4陽性Pan T細胞を含む、(しかし、これらだけに限定されるわけでない、)ESCと非多能性細胞がある。これにより、miRNA集合体の選択されたサブセットの5つが、すなわち、hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302c-3p、hsa-miR-302d-3p、及びhsa-miR-367-3pが、測定した全てのPSCにおいて発現されているが、非多能性由来の細胞の種類には全く発現されていなかったこと、並びに、その結果として、PSC由来細胞製品中に残存・混入した未分化なPSCを検出するための、測定法開発の適切な候補分子であることが、確認された。この分析によって、選択されたサブ集合体中の残存miRNAが、すなわち、hsa-miR-371a-3p、hsa-miR-372-3p、hsa-miR-373-3p、hsa-miR-521-3p、及びhsa-miR-520c-3pが、測定された全ての非多能性細胞において発現されていないが、全てのPSCにおいて必ずしも発現されているとは限らない、ということも示された。これによって、PSC由来細胞製品中に残存・混入した未分化なPSCに対する測定法開発の候補分子として、これらmiRNAが除外されとは限らないが、これらmiRNAは、測定法開発の候補分子としての可能性を、PSC由来細胞製品の製造に用いられた特定のPSC株に基づいて、個別にさらに調べなければならないだろう。

30

40

【0127】

図3は当該マイクロアレイのデータを示している。特に、図3は、iPSC、ESC、及び非多能性細胞において発現されたmiRNAの選択されたサブセットの、(QRT-PCRにより確認された、)正規化された発現密度を示している。箱ひげ図において、各箱内にある黒色の水平線は中央値を表し、当該箱は25パーセントイル値から75パーセントイル値の範囲をとり

50

、該ひげは該データの最小値と最大値である。図3において、iPSC(測定法開発用の試料)はn=4、iPSC(追加試料)はn=40、ESCはn=8、非多能性細胞は細胞の各種類でn=3~8である。

【0128】

実施例4ー選択されたiPSCに特異的なmiRNAに対するQRT-PCRによる細胞添加試料を用いた感度分析

10のmiRNA集合体の選択されたサブセット(QRT-PCRによって確認されたmiRNA)の感度を、PSC由来細胞製品中に残存・混入した未分化なPSCに対する測定法開発の候補分子に対して評価するため、これらの検出感度を、10000細胞数のiPSC、1000細胞数のiPSC、100細胞数のiPSC、及び10細胞数のiPSCを含み、各々を100万細胞数のdp MSCへ播種させた、3つの独立した細胞添加試料において、各々評価した。図4は、3つの独立した細胞添加試料中の、10のmiRNA集合体の選択されたサブセットの相対的な発現量を示している。この分析により、10のmiRNA集合体の選択されたサブセットのうち、4のmiRNAが、すなわち、hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302c-3p、及びhsa-miR-302d-3pが、PSC由来細胞製品中に残存・混入した未分化な非常に少数のPSCを検出するための測定法開発の候補分子として、100万細胞数のiPSC由来MSCあたり10細胞数から100細胞数のiPSCを検出できる、最も高い検出感度を有している、ということが示された。

【0129】

図4において、測定法開発用の候補分子である、10のmiRNA集合体の選択されたサブセットについての、A、B、Cの細胞添加試料を用いたQRT-PCR分析が、Log2変換により正規化させた相対的な発現量として表されている

菱形は10000細胞数のiPSCを100万細胞数のdp MSCへ播種させた群である；三角形は1000細胞数のiPSCを100万細胞数のdp MSCへ播種させた群である；四角形は100細胞数のiPSCを100万細胞数のdp MSCへ播種させた群である；円形は10細胞数のiPSCを100万細胞数のdp MSCへ播種させた群である

【0130】

実施例5ー選択されたiPSC特定のmiRNA集合体を用いた高感度ドロップレットデジタルPCR法の開発

マイクロアレイによる細胞特異的なデータ(図3)、及び、細胞添加試料におけるQRT-PCRの検出感度のデータ(図4)に基づき、以下のmiRNAが、すなわち、hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302c-3p、及びhsa-miR-302d-3pが、さらに選択され、PSC由来細胞製品中に残存・混入した未分化な非常に少数のPSCを検出するための測定法開発用の候補遺伝子として優先された。細胞添加試料を用いた、これらmiRNAに対するQRT-PCRによって達成された、検出感度の限界値(図4)に基づき、絶対的な定量性能による、すなわち、ドロップレットデジタルPCRによる、より高感度な技術基盤への移行が決定付けられた。これら4つのiPSC特異的な測定法開発用の候補分子の使用を併用して、ddPCR法は開発され、最適化され、及び、方法と材料に記載したように評価された。最終的な検出感度、特異性、正確性、及び再現性の評価は、100細胞数のiPSC、10細胞数のiPSC、及び、iPSCを含まない細胞添加試料を用いて、実施された。この分析は、最適化された該方法は100万細胞数のMSCのバックグラウンド中で10細胞数以下のiPSCを一貫して検出可能であることを、図5及び図6において示したように、示していた。さらに、iPSCの混入細胞数が10細胞数である場合の、hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302c-3p、及びhsa-miR-302d-3pに対する、ddPCRあたりの絶対複製数は、図6において示したように、推定された検出限界(LOD)を優に上回っていた。

【0131】

図5は以下の内容を示している：100細胞数のiPSC、10細胞数のiPSC、及び全くiPSCを含まない細胞添加試料における、選択され、優先された4つのmiRNAを備える適正化された測定法を用いた、実施例におけるddPCRデータは、dp MSC中に残存・混入したiPSCを検出できることを示している。統合されたデータは、3つの独立した細胞添加試料(A、B、C)に対して示され、並びに、ddPCRあたりのmiRNAの複製数の棒グラフが、log10変換したス

ケールにおいて平均値±標準偏差として表されている。100細胞数のiPSCは、100細胞数のiPSCを100万細胞数のdp MSCへ播種させたもの；10細胞数のiPSCは、10細胞数のiPSCを、100万細胞数のdp MSCへ播種させたもの；DP MSCは、iPSCを100万細胞数のdp MSCへ播種させなかったもの、である。

【0132】

図6は以下の内容を示している：10細胞数のiPSC及び全くiPSCを含まない細胞添加試料における、選択され、優先された4つのmiRNAを備える適正化された方法を用いた、実施例におけるddPCRデータは、dp MSC中に残存・混入したiPSCを検出できることを示している。統合されたデータは、3つの独立した細胞添加試料(A、B、C)に対して示され、並びに、ddPCRあたりのmiRNAの複製数の棒グラフが、均等なスケールにおいて平均値±標準偏差として表されている。95%信頼区間における推定LODは、点線で示され、 $LOD = MSC \text{ miRNA 複製数} / ddPCR \text{ の平均値} + (3.3 \times SD)$ として計算される。10細胞数のiPSCは、10細胞数のiPSCを100万細胞数のdp MSCへ播種させたもの；DP MSCは、iPSCを100万細胞数のdp MSCへ播種させなかったもの、である。

10

【0133】

実施例6－選択されたiPSC特異的なmiRNAに対するddPCRによる細胞添加試料を用いた感度分析

最も高感度な可能性がある上記で特定された4つのmiRNAの感度を、すなわち、hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302c-3p、及びhsa-miR-302d-3pの感度を、PSC由来細胞製品中に残存・混入した未分化なPSCに対してさらに評価するため、これらの検出感度は、10細胞数のiPSC、5細胞数のiPSC、及び1細胞数のiPSCを含み、各々を100万細胞数のBM-MSC(骨髄MSC)(レーザーキャプチャーにより製造された細胞添加試料)へ播種させた、3つの独立した細胞添加試料において、並びに、iPSCを含まない100万細胞数のBM-MSCにおいても、さらに各々評価された。

20

【0134】

図7は以下の内容を示している：100万細胞数のMSCあたり10細胞数、5細胞数、又は1細胞数のiPSCを含む試料中のddPCR法の検出感度。バックグラウンドのシグナル値はBM-MSCに対して示されている。データは標的miRNA複製数/ng RNAとして表されている。箱ひげ図は最小値と最大値を示すひげを備えている。グラフは、10細胞数のiPSC(n=2)、5細胞数のiPSC(n=2)、1細胞数のiPSC(n=2)、及びBM-MSC(n=2)を含む、各試料に対して実施された2つの独立したcDNA合成反応の結果である。推定LODは、点線で示され、以下の式 $LOD = LOB + (1.645 \times 1 \text{ 細胞数の iPSC 試料の標準偏差})$ として計算され、LOBは $LOB = BM-MSC \text{ 試料の平均値} + (1.645 \times BM-MSC \text{ 試料の標準偏差})$ として計算される。

30

【0135】

この分析は、4つ全ての標的miRNAに対する、すなわち、hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302b-3p、hsa-miR-302c-3p、及びhsa-miR-302d-3pに対する、ddPCR法は、高感度であり、並びに、100万細胞数のBM-MSC中の5細胞数のiPSCを(100万細胞数のBM-MSCのバックグラウンドを超えて)明確に検出することができる、ということを示している。

【0136】

計算されたLODは、(hsa-miR-302a-3p、hsa-miR-302c-3p、及びhsa-miR-302d-3pにおいて、)100万細胞数のBM-MSC中に約1細胞数のiPSCに等しい、又は、(hsa-miR-302b-3pにおいて、)100万細胞数のBM-MSC中に1細胞数のiPSCを僅かに超える、細胞数に推定された。

40

【0137】

当該測定法の診断制度(感度と特異度)を評価するために、100万細胞数のBM-MSCのバックグラウンド中に10細胞数のiPSC及び5細胞数のiPSCを含む試料、及び、iPSCを全く含まない試料(100万細胞数のBM-MSCのみ)、において、実施された実験の全データが集められ、真陽性数、真陰性数、偽陰性数、及び偽陽性数が決定された。

【0138】

表－異なる細胞数の人工多能性幹細胞を添加した場合の診断用ドロップレットデジタルPCR法の感度と特異度の評価

50

【 0 1 3 9 】

【表 1】

検査成績	検査の結果と件数	
	多能性幹細胞を 10細胞数添加した場合	多能性幹細胞を 全く添加しなかった場合
陽性	真陽性(a) 183	偽陽性(b) 0
陰性	偽陰性(c) 0	真陰性(d) 139
正確度	感度(%)=a/(a+c)x100=100%	特異度(%)=d/(b+d)x100=100%

検査成績	検査の結果と件数	
	多能性幹細胞を 10細胞数添加した場合	多能性幹細胞を 全く添加しなかった場合
陽性	真陽性(a) 64	偽陽性(b) 0
陰性	偽陰性(c) 0	真陰性(d) 64
正確度	感度(%)=a/(a+c)x100=100%	特異度(%)=d/(b+d)x100=100%

10

【 0 1 4 0 】

この分析は、当該ddPCR法が、100万細胞数のBM-MSC中に10細胞数及び5細胞数のiPSCの両方を検出できる細胞数において、100%の感度(偽陰性がない)と100%の特異度(偽陽性がない)を有することを、明確に示している。

20

【 0 1 4 1 】

本発明は好ましい実施形態に言及して記載されている。しかしながら、当該記載は、変動と変更が当業者によって本発明の要旨を逸脱しない範囲で達成されうることを、認めている。

【図 1】

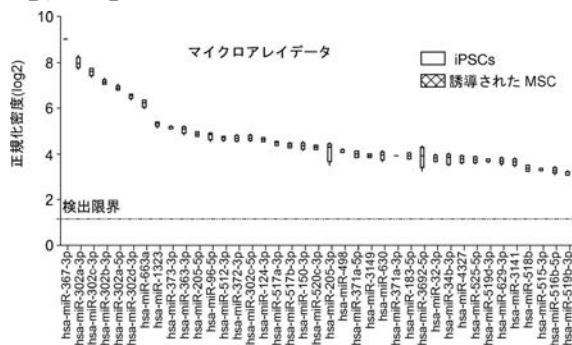


図 1

【図 2】

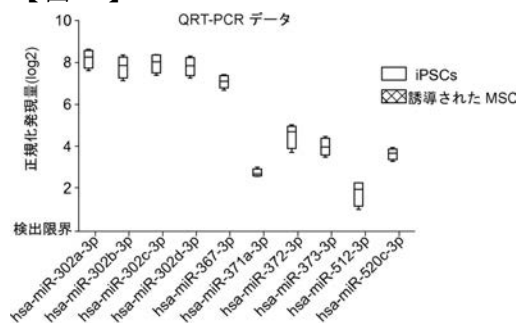


図 2

【図 3】

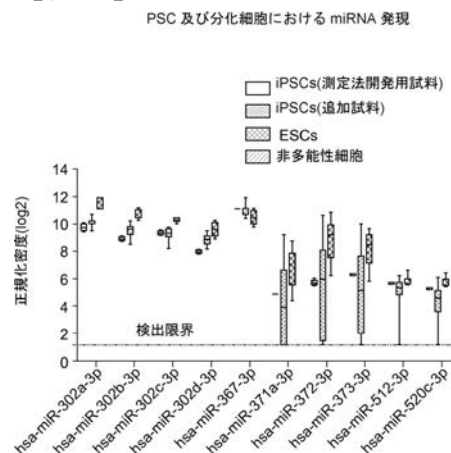


図 3

【図 4】

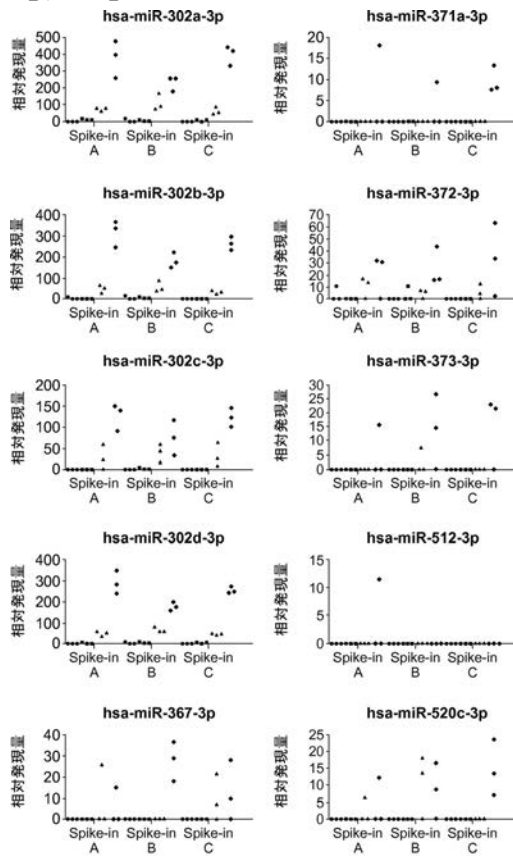


図 4 Spike-in: スパイクイン

【図 5】

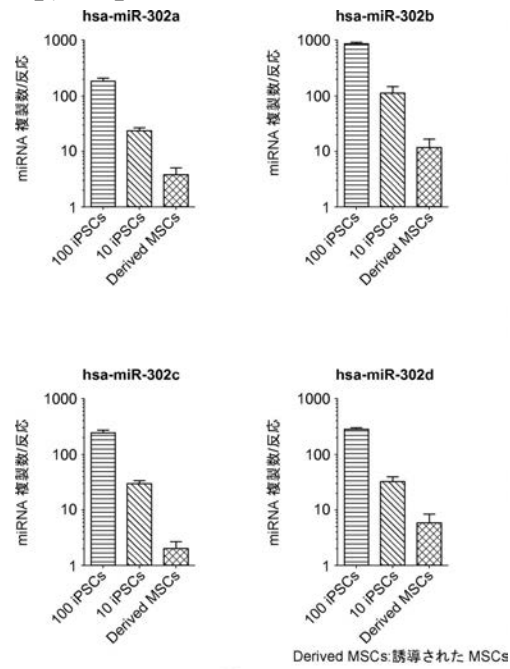


図 5

Derived MSCs: 誘導された MSCs

【図 6】

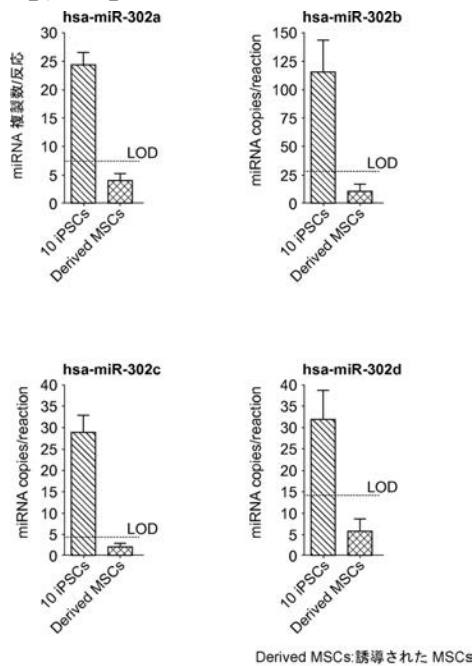


図 6

Derived MSCs: 誘導された MSCs

【図 7】

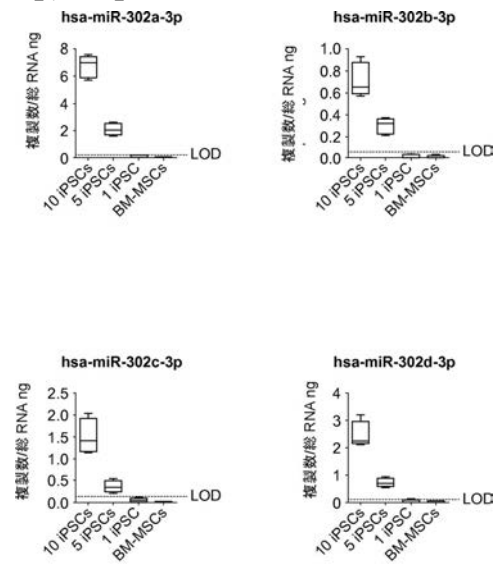


図 7

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/051530

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/6881 C12N5/0775
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARR CALLUM J C ET AL: "MicroRNA-302 switch to identify and eliminate undifferentiated human pluripotent stem cells", SCIENTIFIC REPORTS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 6, 9 September 2016 (2016-09-09), page 32532, XP002772612, ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/SREP32532	1-5,10, 11,20, 21,30, 32,36, 40,55-57
Y	abstract page 2, last paragraph page 5, paragraph full 2	1-18, 20-68
X	EP 3 181 698 A1 (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY [DE]) 21 June 2017 (2017-06-21)	56,57
Y	abstract; claims 1,2,5	1-18, 20-68
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 2019

Date of mailing of the international search report

24/05/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Celler, Jakub

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/051530

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HEUY-CHING WANG ET AL: "Profiling the microRNA Expression in Human iPS and iPS-derived Retinal Pigment Epithelium", CANCER INFORMATICS, vol. 13s5, 16 January 2014 (2014-01-16), XP055572679, ISSN: 1176-9351, DOI: 10.4137/CIN.S14074	56,57,68
Y	abstract page 27, column 1, paragraph first full page 28, column 2 -----	1-18, 20-68
X	EP 3 170 893 A1 (UNIV KYOTO [JP]) 24 May 2017 (2017-05-24)	56,57
Y	abstract; claims 1-3	1-18, 20-66,68
A	paragraph [0007]	67
A	----- KEIKO TANO ET AL: "A Novel In Vitro Method for Detecting Undifferentiated Human Pluripotent Stem Cells as Impurities in Cell Therapy Products Using a Highly Efficient Culture System", PLOS ONE, vol. 9, no. 10, 27 October 2014 (2014-10-27), page e110496, XP055485499, DOI: 10.1371/journal.pone.0110496 abstract page 1, column 1 page 2, column 1, paragraph top -----	1-18, 20-68
Y	TAKUYA KURODA ET AL: "Highly Sensitive In Vitro Methods for Detection of Residual Undifferentiated Cells in Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from Human iPS Cells", PLOS ONE, vol. 7, no. 5, 17 May 2012 (2012-05-17), page e37342, XP055382467, DOI: 10.1371/journal.pone.0037342	59
A	abstract page 4, column 1 - column 2 -----	1-18, 20-58, 60-68

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/EP2019/051530

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-18, 20-68(all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2019/ 051530

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-18, 20-68(all partially)

Subject matter of the above claims as characterised by
has-miR-367-3p.

2-39. claims: 1-68(partially)

Subject matter of the above claims as characterised by
specific miRNAs identified in claims 12 and 44, starting
with the second miRNA: has-miR302a-3p through to the 39th
miRNA: has-miR-519b-3p, respectively.

40-64. claims: 1-39, 56, 57, 59-66(all partially)

Subject matter of the above claims as characterised by the
constellation of feature of each of present claim 2-5, 9,
10, 12-17,20, 23, 27, 30-33, 35, 56, 57 and 59,
respectively.

65-72. claims: 40-57(partially)

Subject matter of the above claims as characterised by the
constellation of feature of each of present claim
41,42,49,52,53,54 and 55, respectively.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/051530

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
EP 3181698	A1	21-06-2017	EP 3181698 A1	21-06-2017	
		WO 2017102316	A1	22-06-2017	

EP 3170893	A1	24-05-2017	CN 107002031	A	01-08-2017
			EP 3170893	A1	24-05-2017
			JP W02016010119	A1	27-04-2017
			US 2017342439	A1	30-11-2017
			WO 2016010119	A1	21-01-2016

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071	
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 マリンソン, デビッド
イギリス国 ジー20 0 エスピー グラスゴー, ケルビン キャンパス, ユニット 3, 4 & 5, ブロック 3, ウェスト オブ スコットランド サイエンス パーク, システミック・スコットランド・リミテッド内

(72)発明者 グーレイ, イレーヌ
イギリス国 ジー20 0 エスピー グラスゴー, ケルビン キャンパス, ユニット 3, 4 & 5, ブロック 3, ウェスト オブ スコットランド サイエンス パーク, システミック・スコットランド・リミテッド内

(72)発明者 レイド, ジェイムズ
イギリス国 ジー20 0 エスピー グラスゴー, ケルビン キャンパス, ユニット 3, 4 & 5, ブロック 3, ウェスト オブ スコットランド サイエンス パーク, システミック・スコットランド・リミテッド内

(72)発明者 アンダーセン, ディッテ
イギリス国 ジー20 0 エスピー グラスゴー, ケルビン キャンパス, ユニット 3, 4 & 5, ブロック 3, ウェスト オブ スコットランド サイエンス パーク, システミック・スコットランド・リミテッド内

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ52 QR08 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34
QX02
4B065 AA90X BD50 CA44 CA46
4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 CA04 NA05 NA06 NA07 ZA02 ZA16
ZA36 ZB08 ZB21