

# 合成RNAによるPBMCからの 高効率iPS細胞作製法

京都大学 iPS細胞研究所 (CiRA)

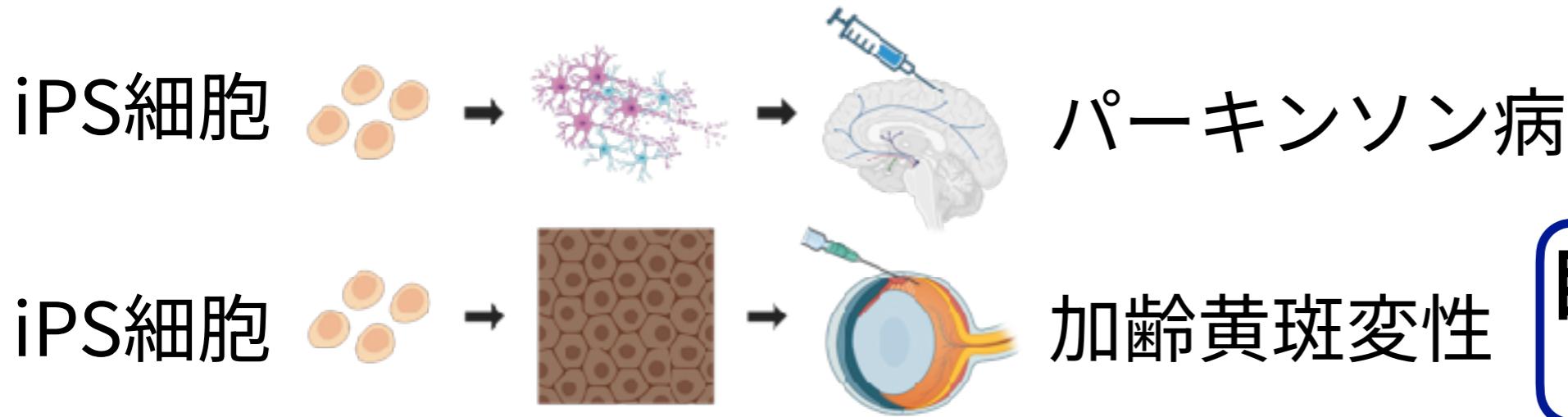
講師・中川 誠人

2026年2月5日



# 社会的背景：iPS細胞技術の応用

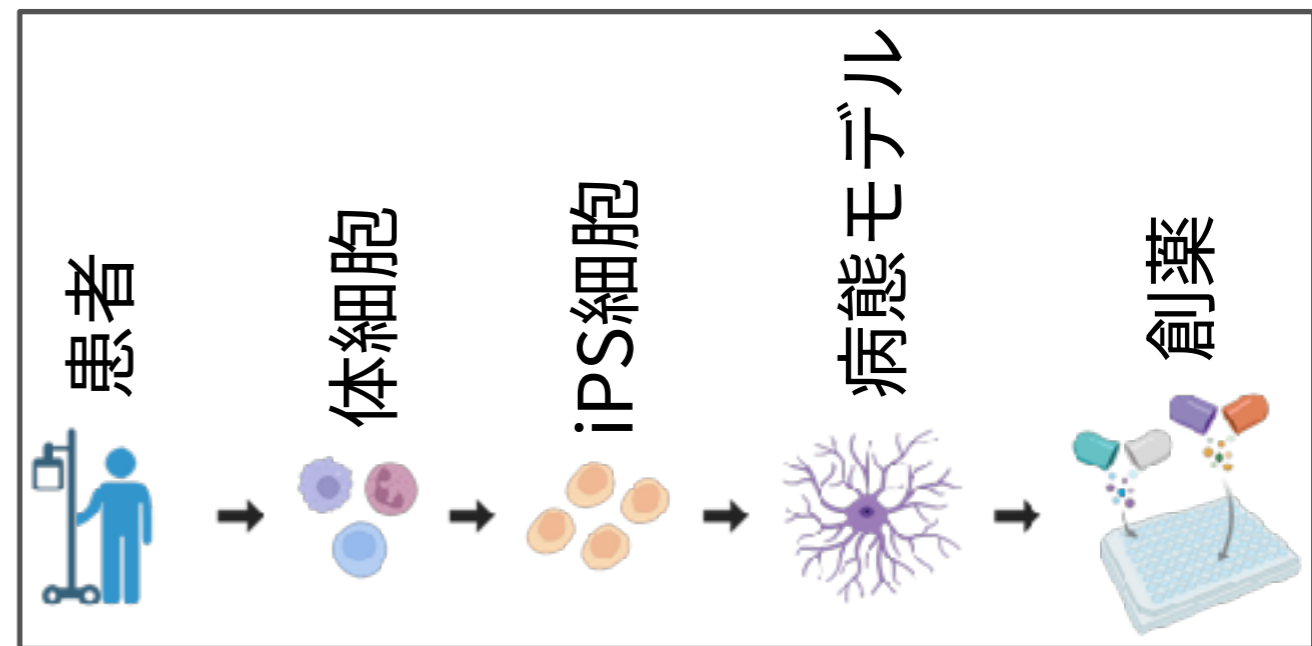
## iPS細胞を活用した再生医療の急速な発展



**臨床用iPS細胞**  
(iPS細胞研究財団)

## 新技術の活用の方は？

- 疾患iPS細胞パネルの構築
- 創薬スクリーニング用iPS細胞
- 社内研究用「共通iPSC基盤」

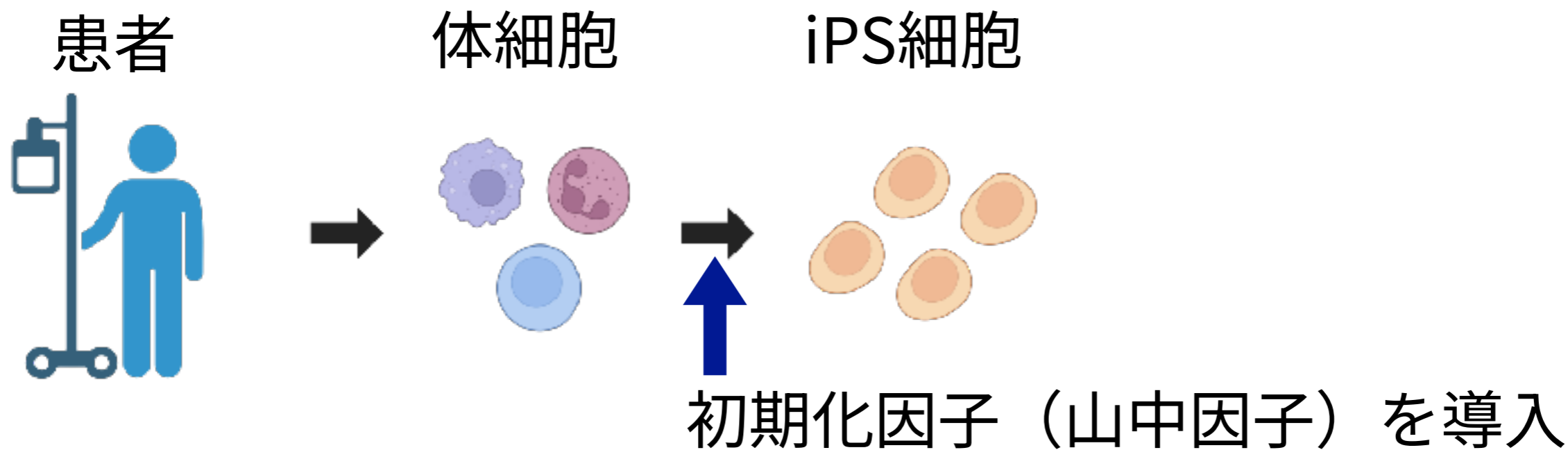


## ボトルネックは？

血液細胞からのiPS細胞樹立・非ウイルス・高効率

シン  
真に活用できるiPS細胞作製法が必要

# iPS細胞作製法について



## 何由来の体細胞？

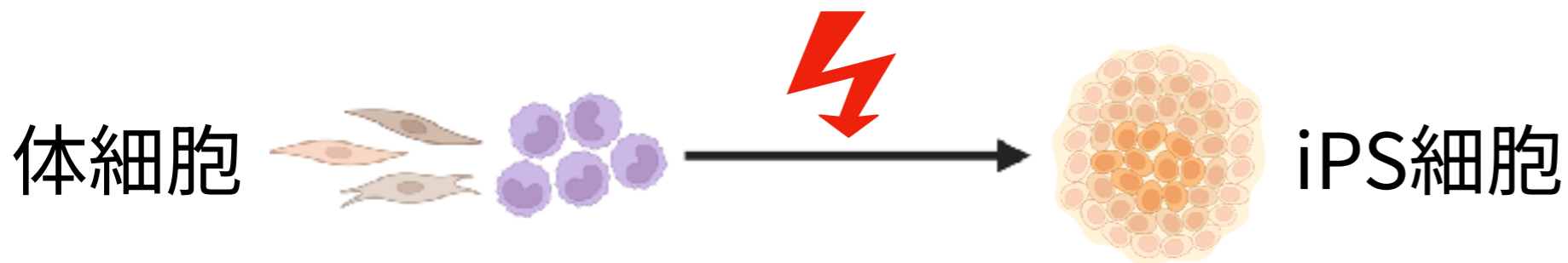
採取の容易さ・無菌性の担保・採取後すぐに使用可能

## 最適な導入法？

扱いやすさ・導入効率・細胞毒性・ゲノムへの挿入が起こらない

# iPS細胞作製法について：これまで

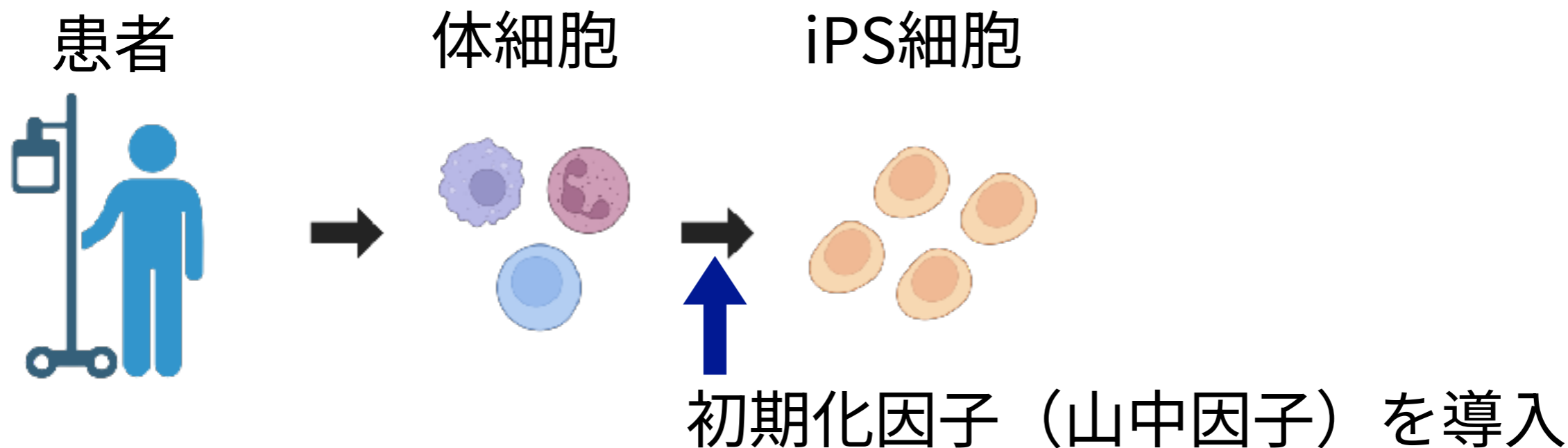
初期化因子（山中因子）を導入



備考	体細胞	導入法	BSL	ゲノムへの挿入 ↓	初期化効率 ↓	iPSC クローン
世界初のヒトiPS細胞	皮膚	レトロウイルス	P2	100%	低	201B7
世界初の臨床グレードiPS細胞	血液	プラスミド	P1	有り	低	1383D2
ベクター改変不可 臨床グレードiPS細胞アリ	血液	センダイウイルス	P2	無し	高	
簡単・安全・低コスト	皮膚	合成RNA	P1	無し	高	

BSL: バイオセーフティレベル

# iPS細胞作製法について：これから



## 何由来の体細胞？

採取の容易さ・無菌性の担保・採取後すぐに使用可能

➡ 末梢血中の細胞（PBMC）

## 最適な導入法？

扱いやすさ・導入効率・細胞毒性・ゲノムへの挿入

➡ 合成RNA法

# 血液中の細胞から合成RNAで iPS細胞を樹立する方法の開発

# PBMCの初期化における課題

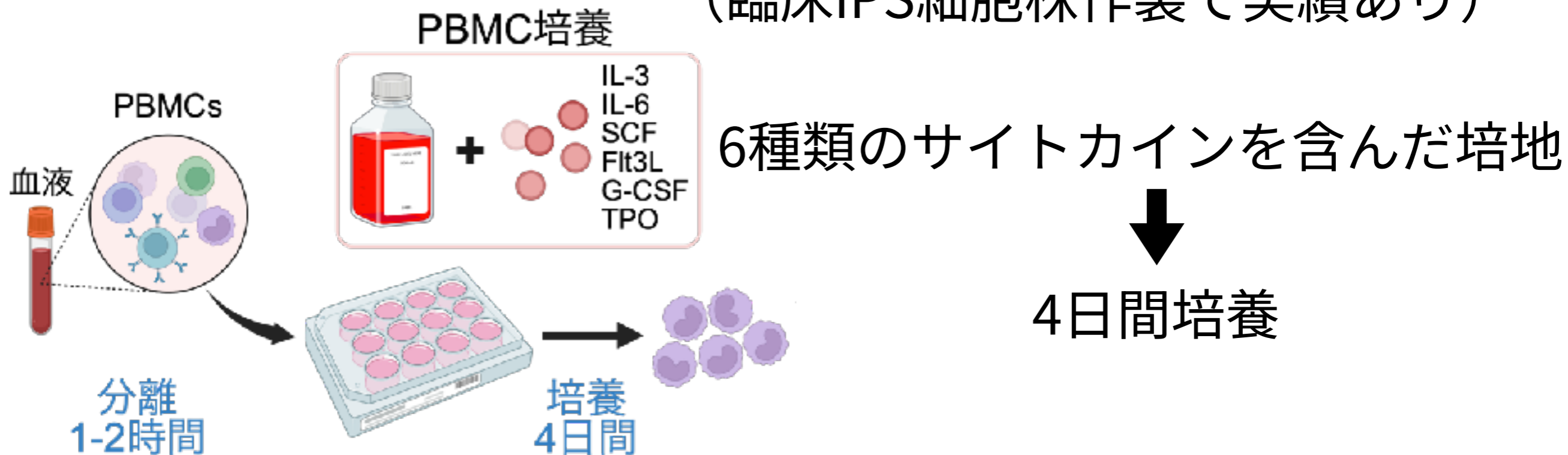


## RNAの導入が可能か？

導入試薬？エレクトロポレーション？

## PBMCの扱い（培養法）

プラスミド法 → PBMCからiPS細胞樹立可能  
(臨床iPS細胞株作製で実績あり)



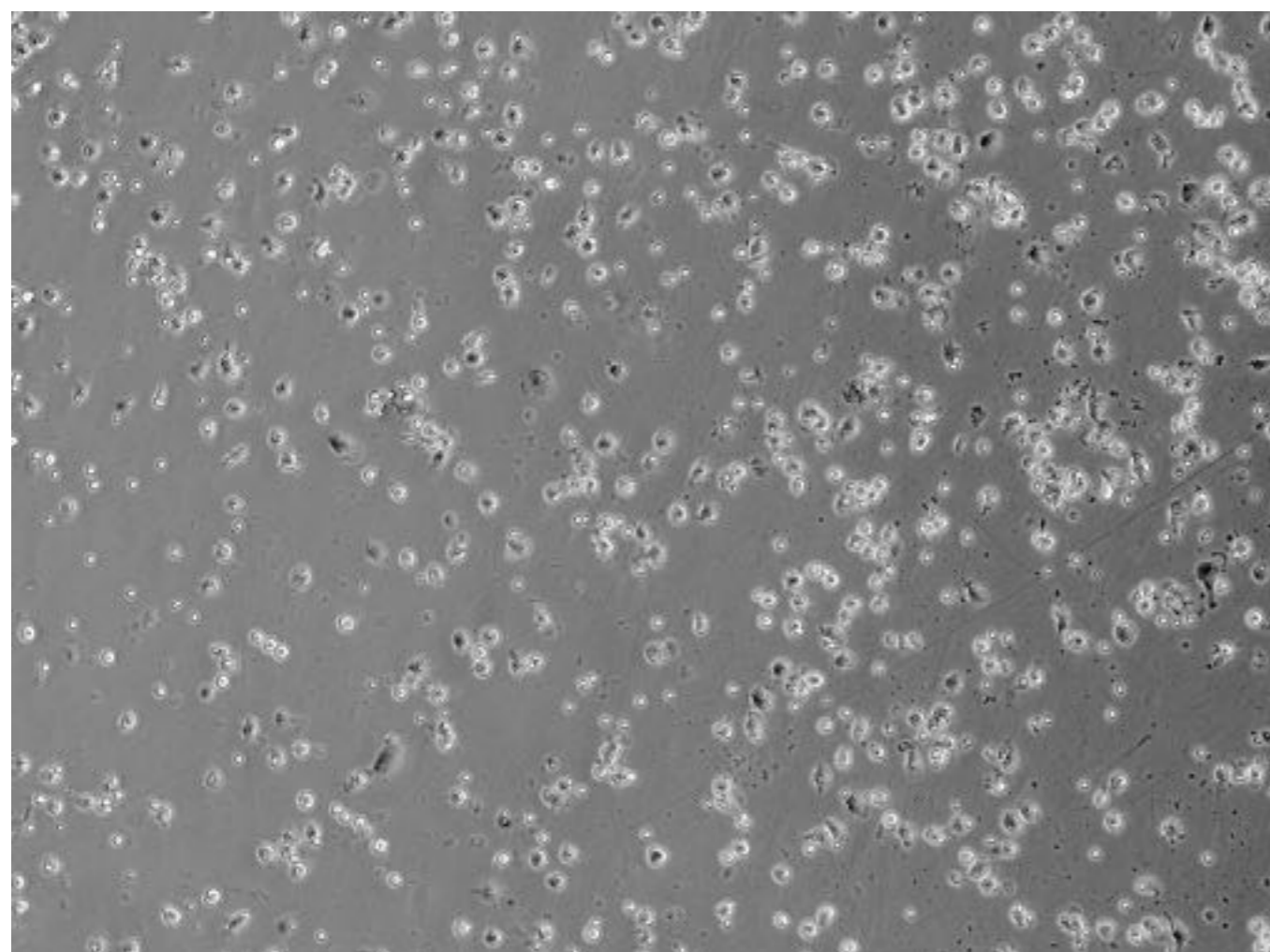
# PBMCへのRNAの導入

6種類のサイトカインを含んだ培地

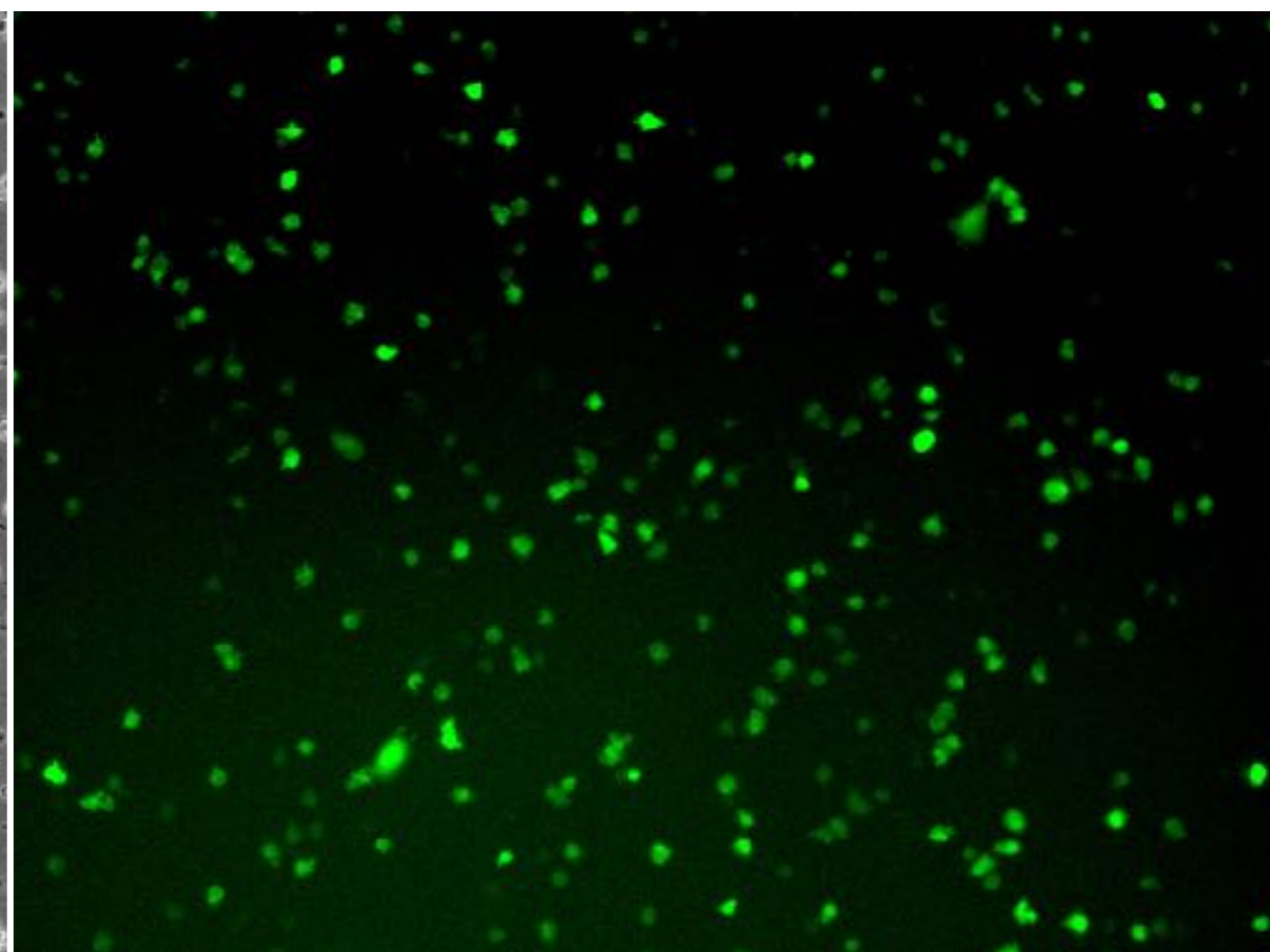


4日間培養 → EGFP mRNAを導入  
(市販品の導入試薬) → 翌日観察

位相差像



EGFP



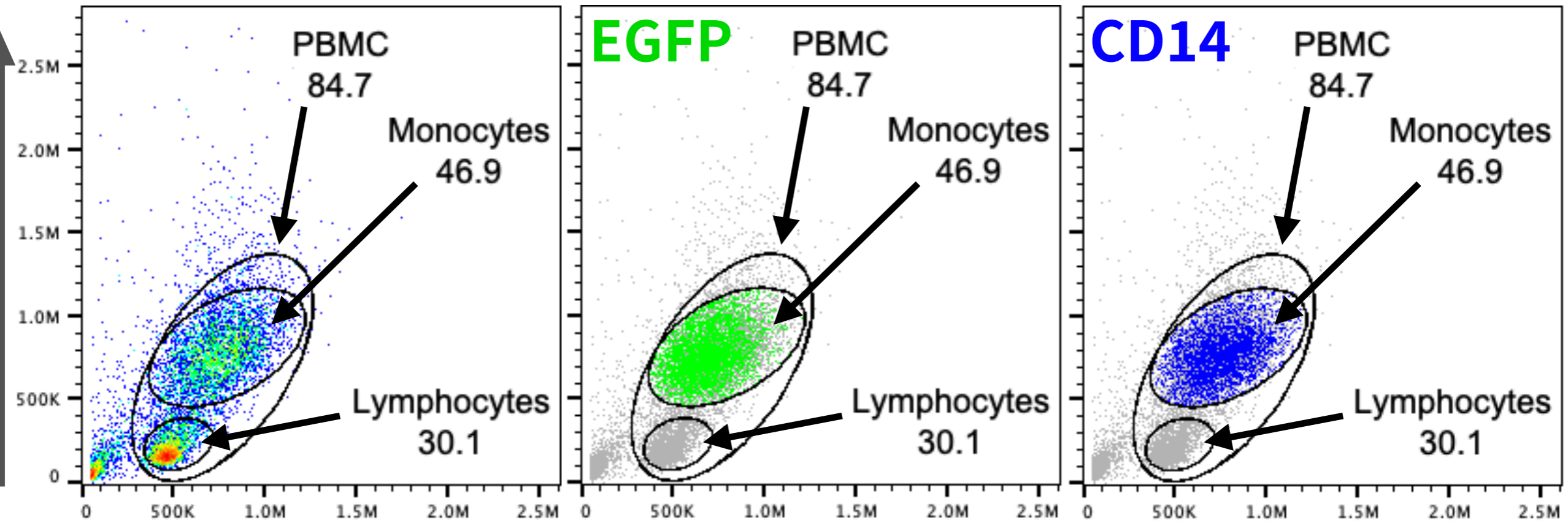
# PBMCへのRNAの導入

6種類のサイトカインを含んだ培地



4日間培養 → EGFP mRNAを導入 → 翌日観察  
→ FCM解析

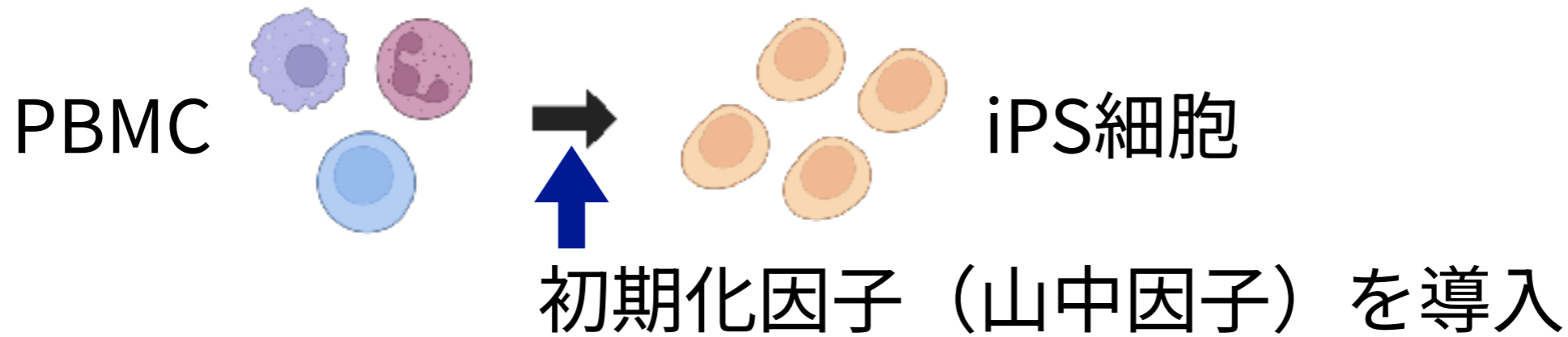
細胞の複雑さ(SSC-H)



細胞のサイズ(FSC-H)

Monocytes画分において90%程度の導入効率を確認

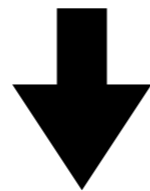
# PBMCの初期化における課題



## RNAの導入が可能か？

導入試薬？エレクトロポレーション？

➡市販の導入試薬で可能（MessengerMAX (Invitrogen)）



iPS細胞の樹立？

- **RNA導入試薬**：MessengerMAX (Invitrogen)
- **初期化RNA**：StemRNA-3<sup>rd</sup> Gen Reprogramming Kit (REPROCELL)
- **PBMC培養**：StemSpan SFEM II (STEMCELL Technologies) またはAscleStem 造血幹細胞用培地 (ナカライ) + サイトカイン
- **iPS細胞培養**：StemFit AK03N (味の素)  
iMatrix-511 (matrixome)

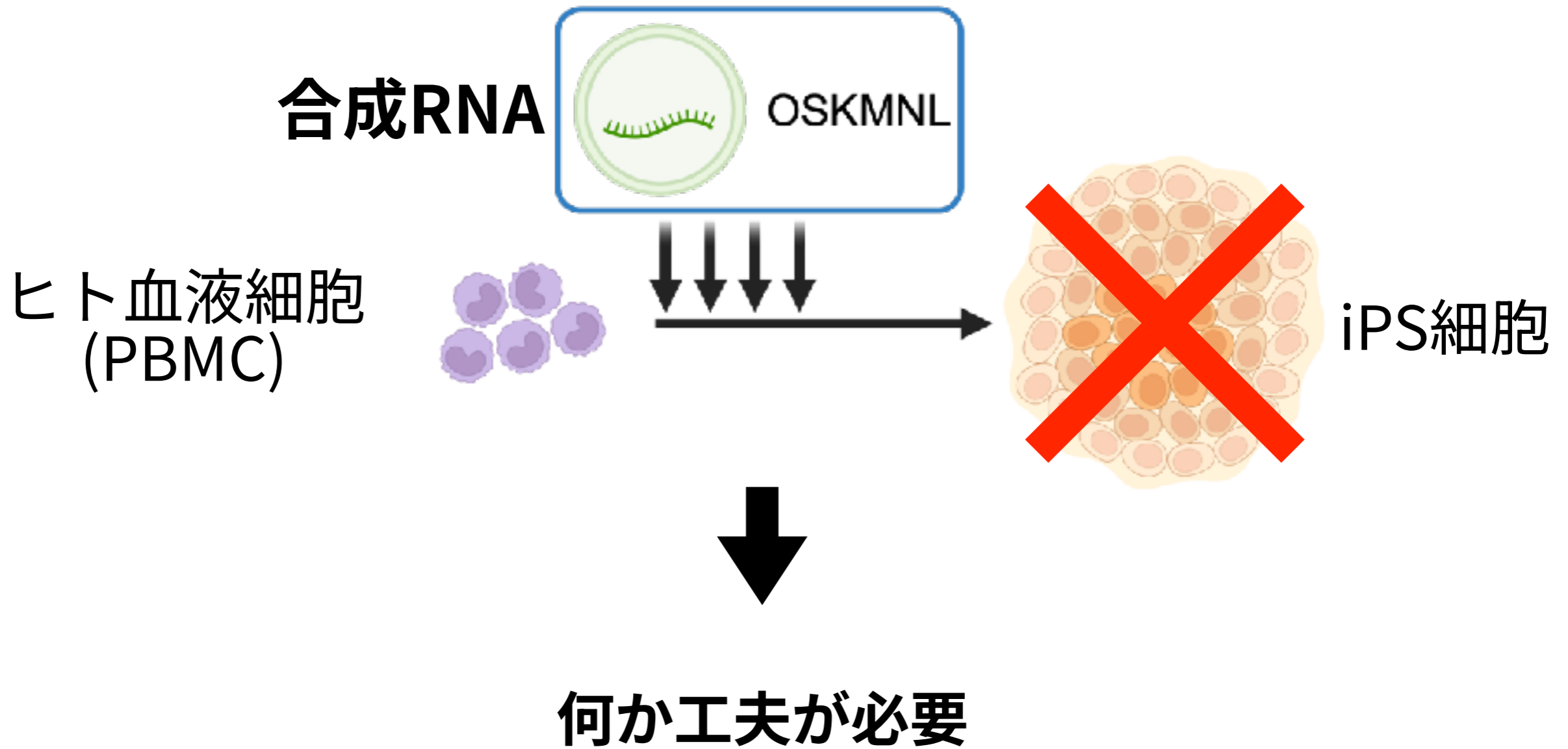
## 初期化RNA：

**OSKMNL** mRNA (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG, LIN28A)

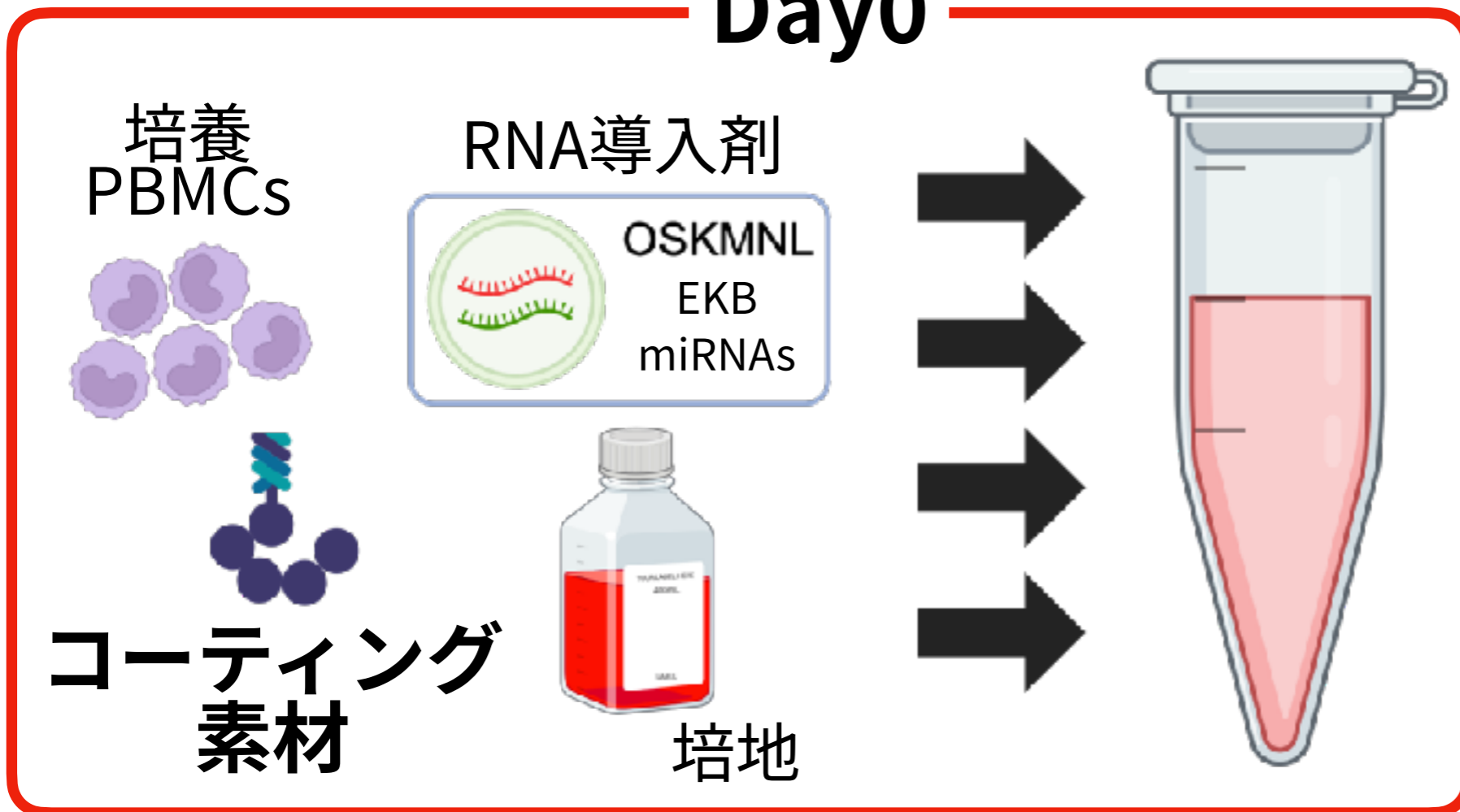
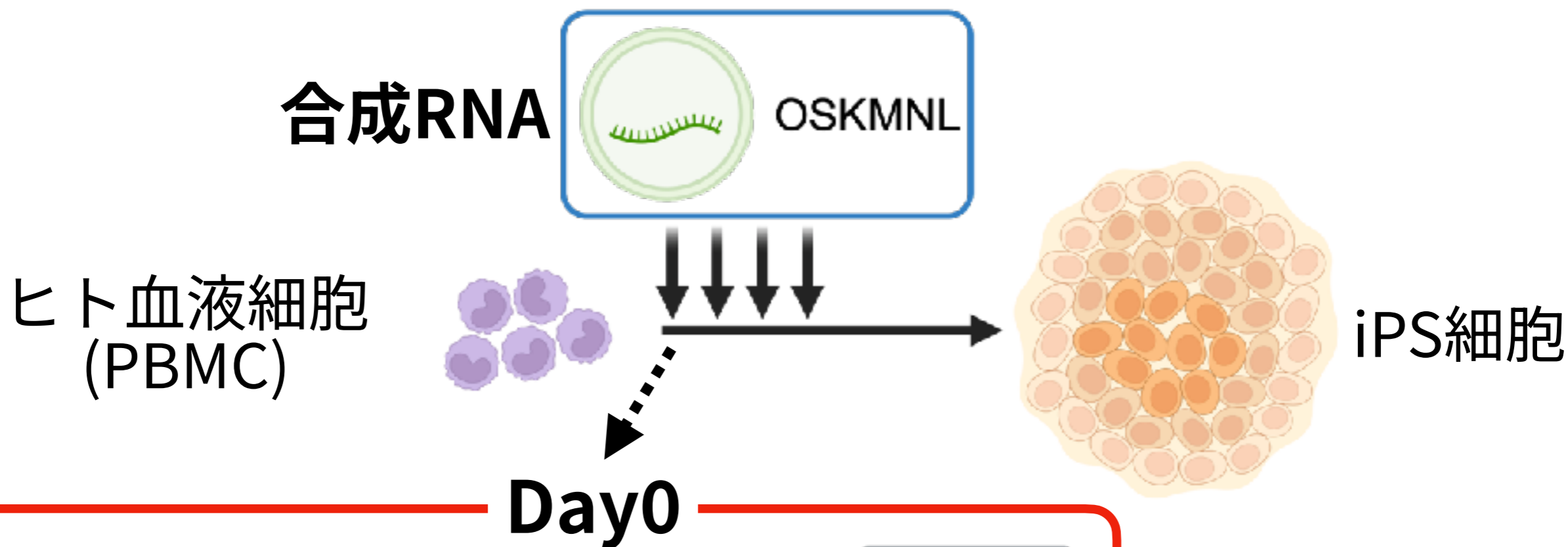
**EKB** mRNA (RNA初期化時(導入時)の自然免疫応答を抑制)

**microRNAs** (miR-302/367 クラスター miRNA、初期化促進)

# RNAによるPBMCの初期化：実験

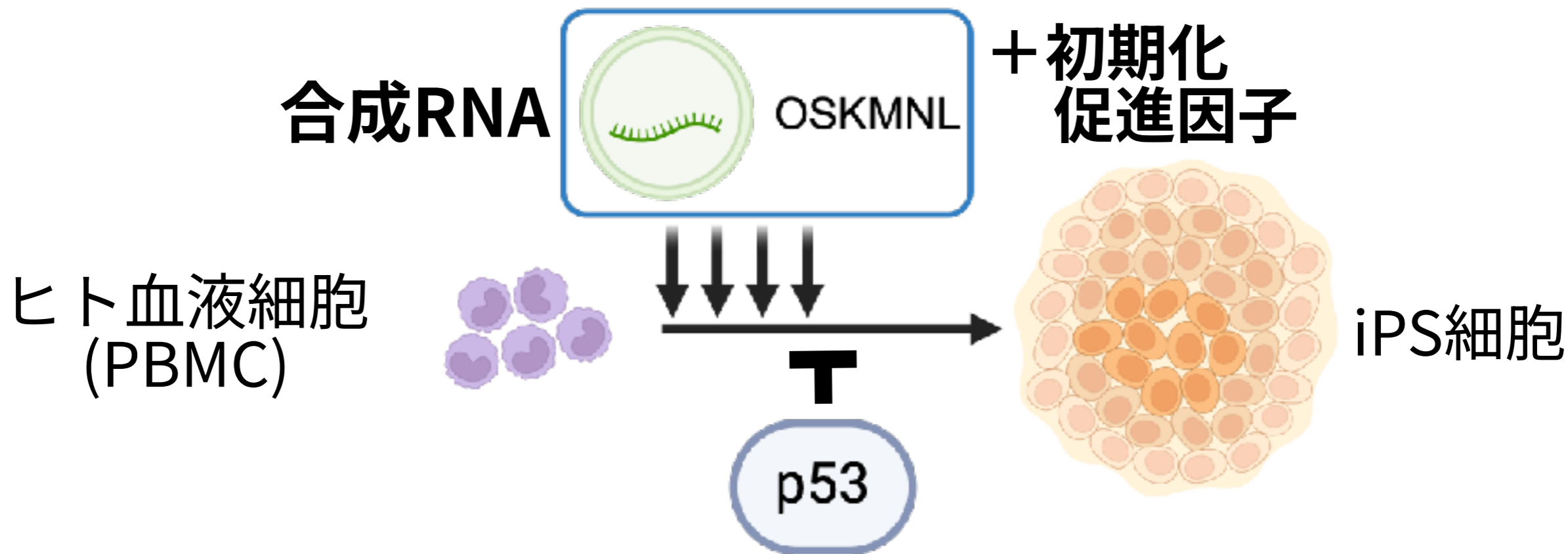


# RNAによるPBMCの初期化：外環境



RNA導入効率・  
生存率・再導入性  
を同時に改善

# RNAによるPBMCの初期化：促進因子



p53機能欠損体 (p53-DN)  
(ドミナントネガティブ変異体)

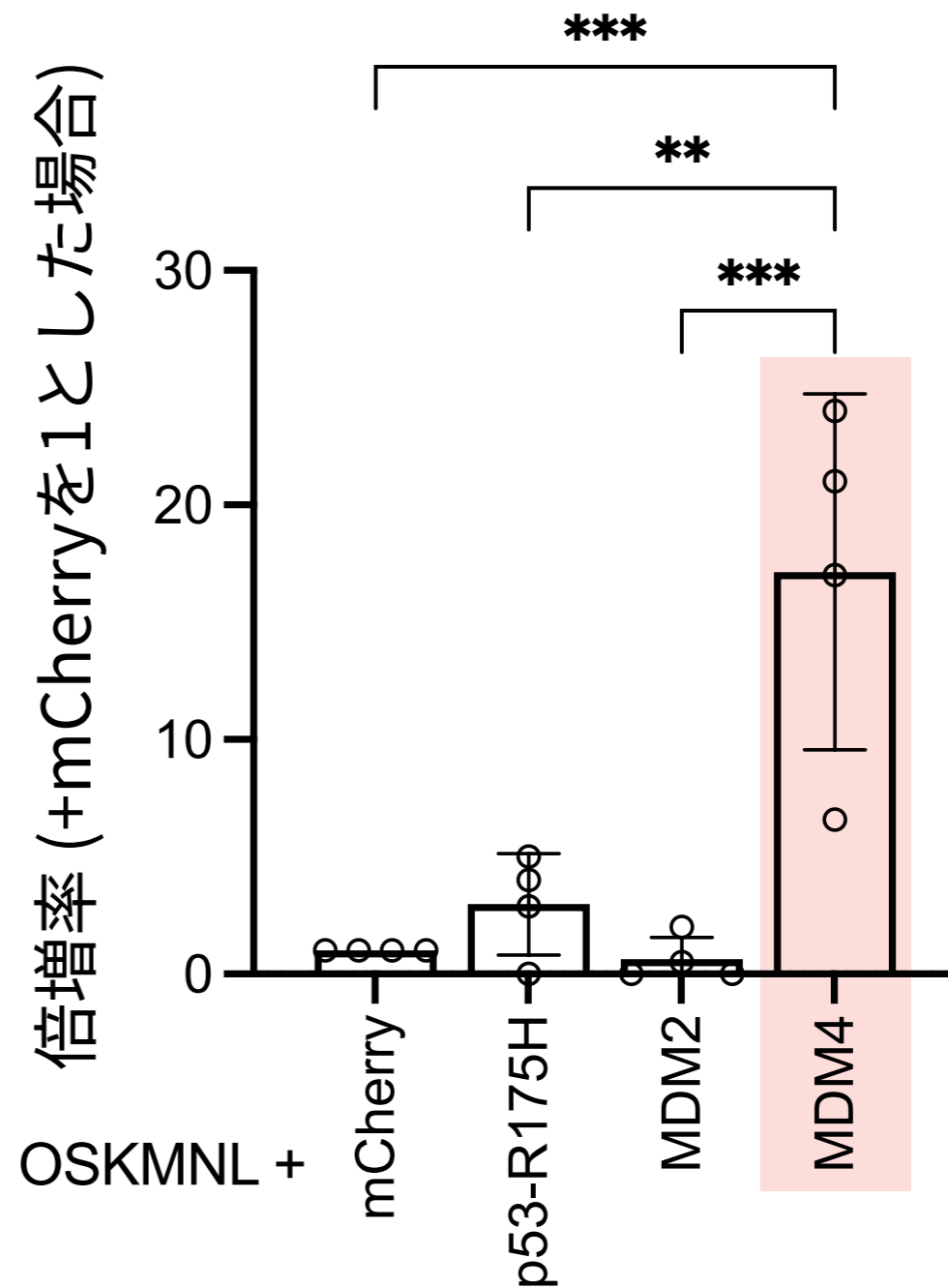
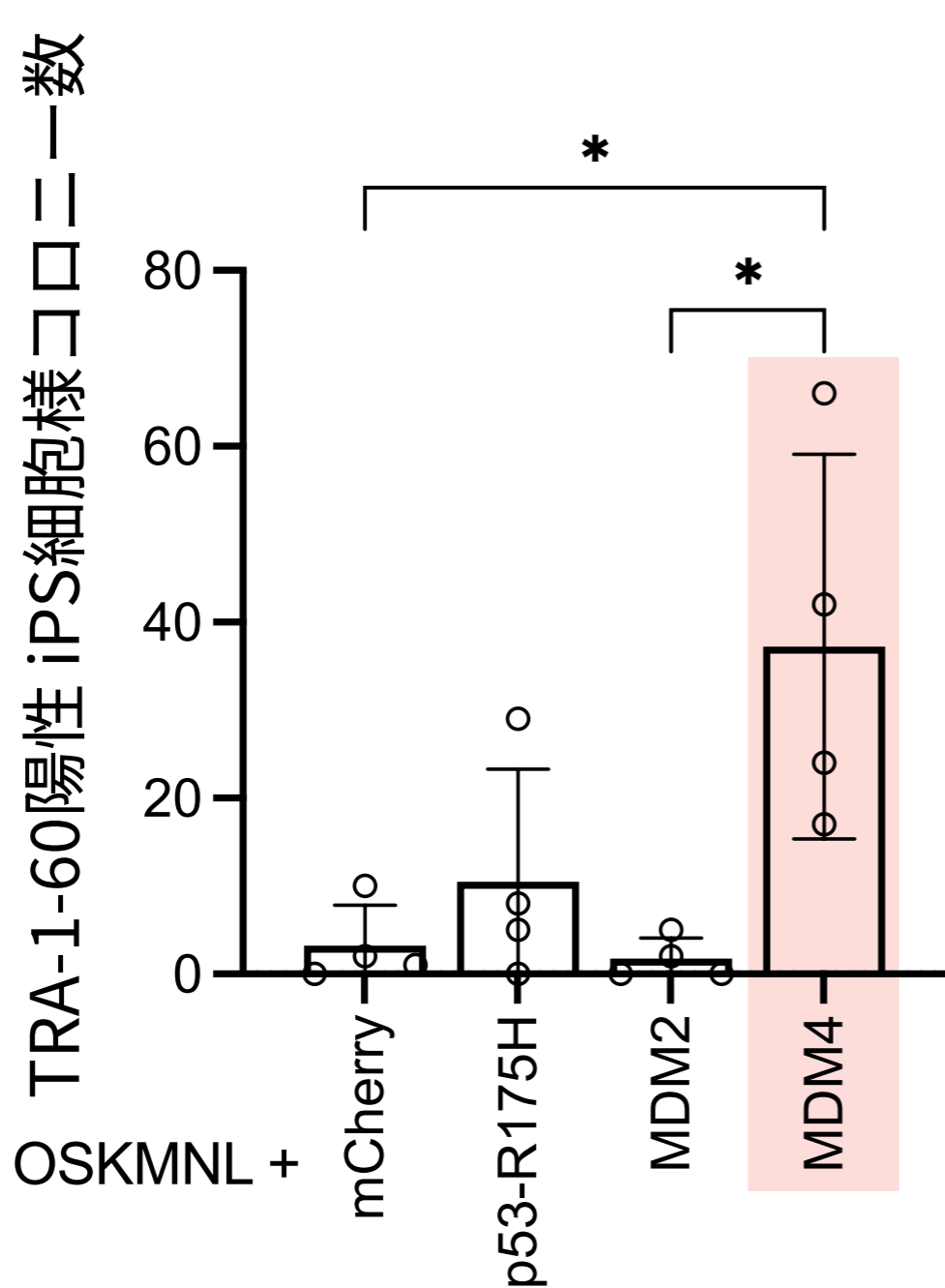
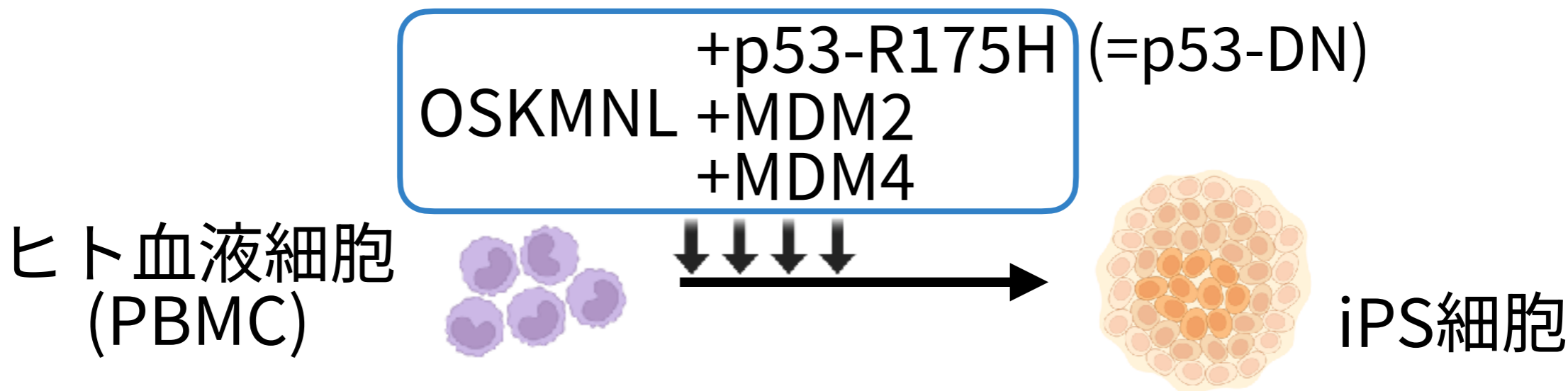
## 【p53の機能抑制機構】



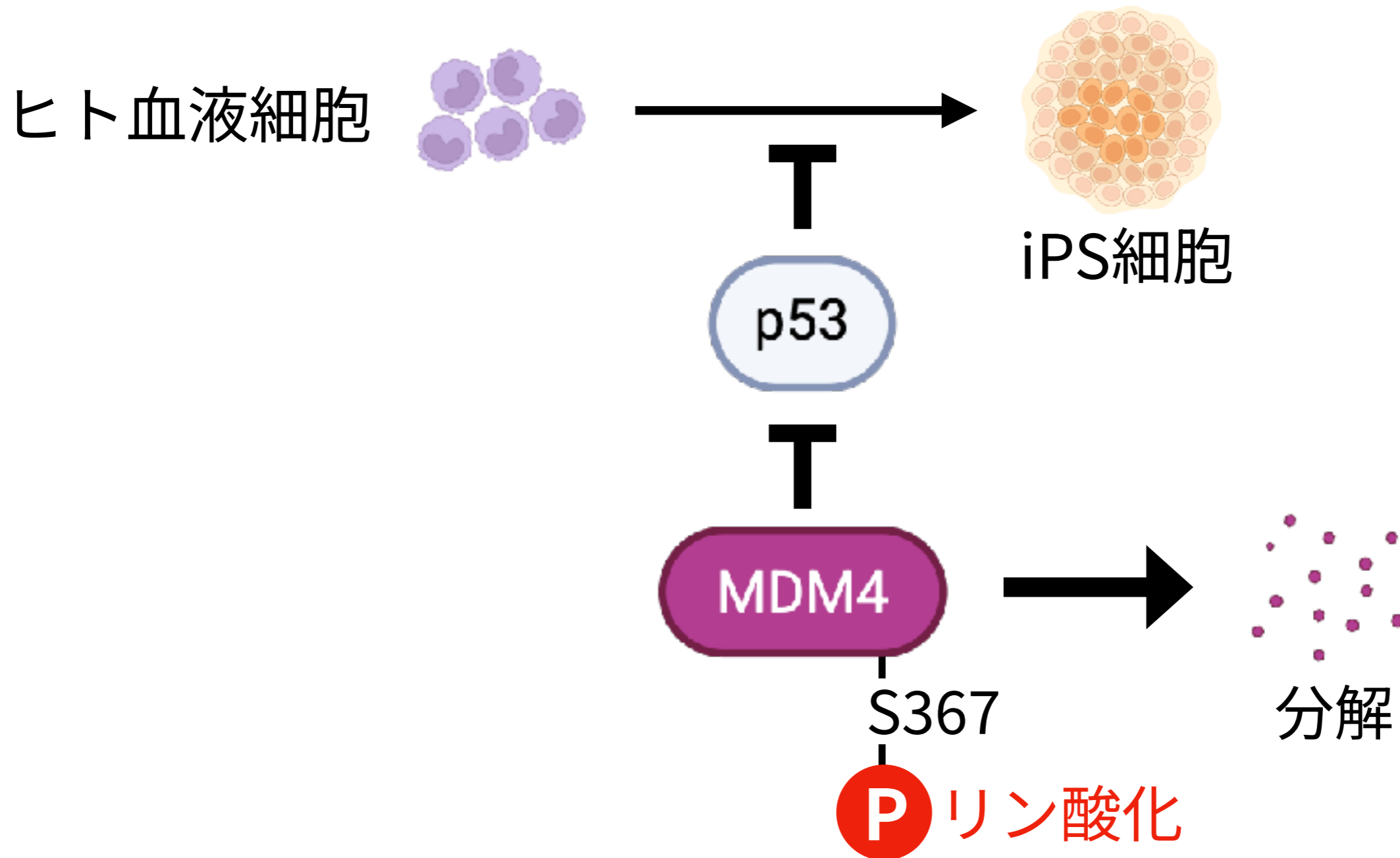
Journal of Molecular Cell Biology (2019), 11(3), 231-244 (改)

p53-DN、MDM2、MDM4のmRNAを合成→初期化

# RNAによるPBMCの初期化：結果



# RNAによるPBMCの初期化：MDM4



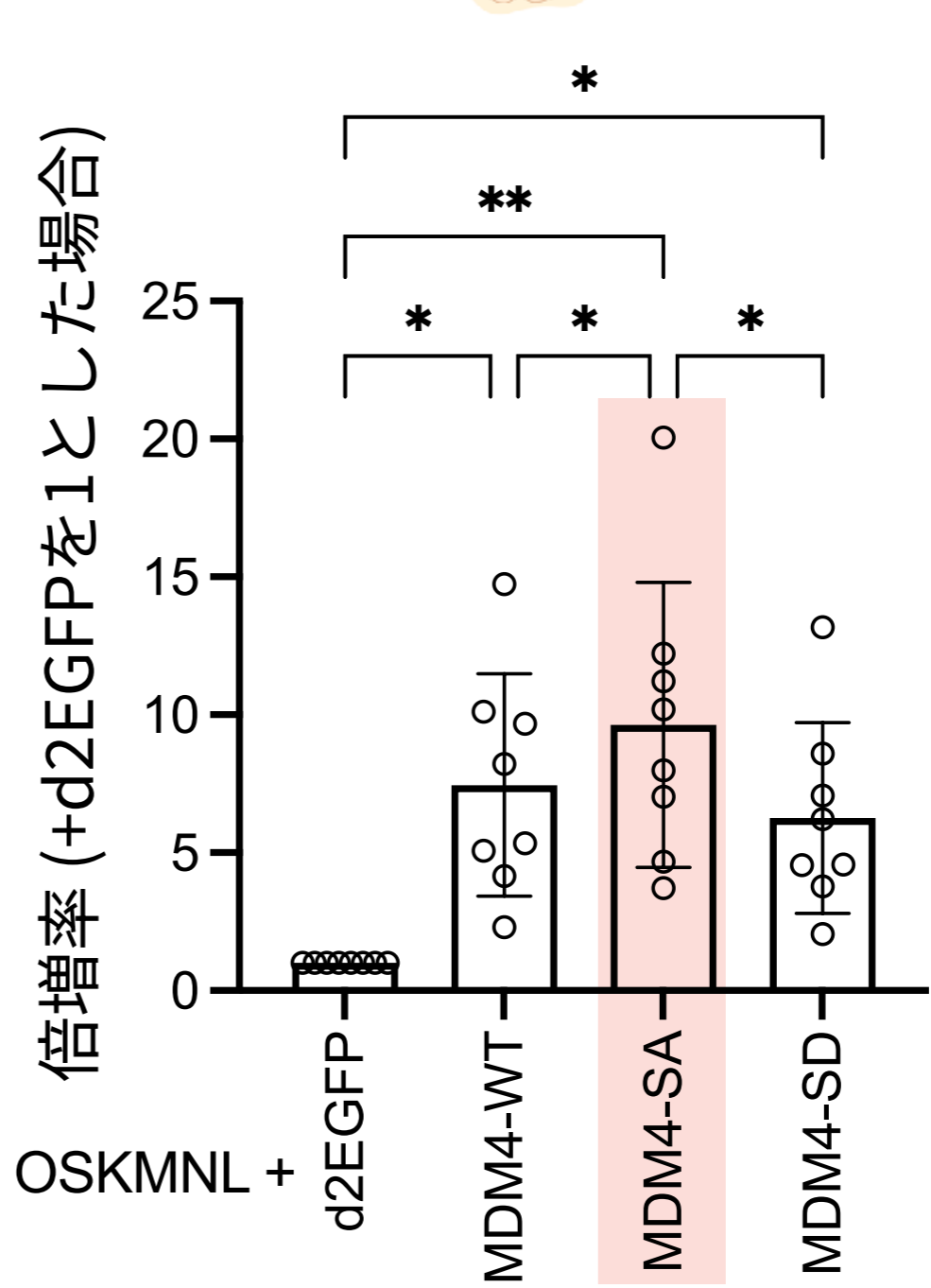
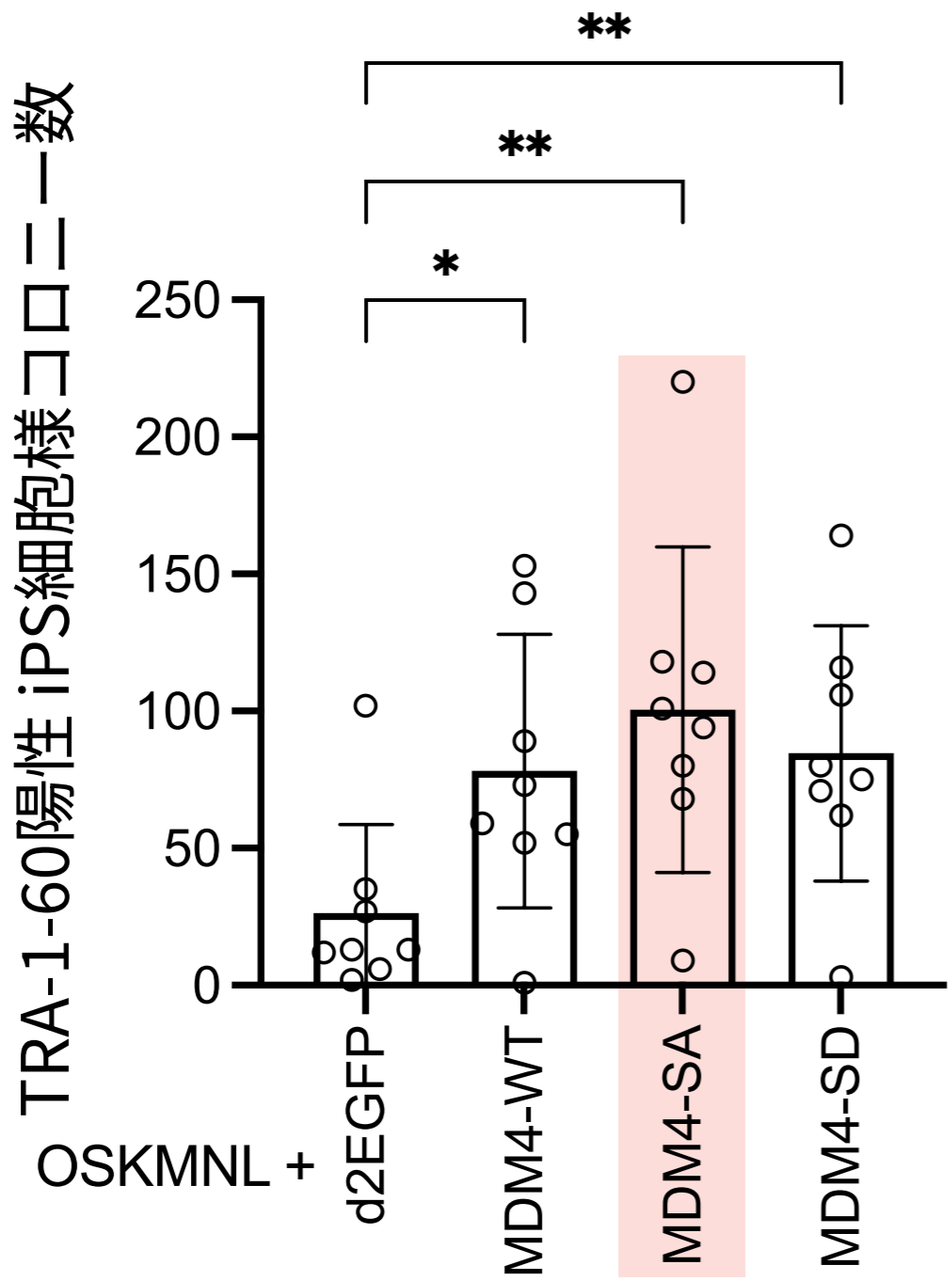
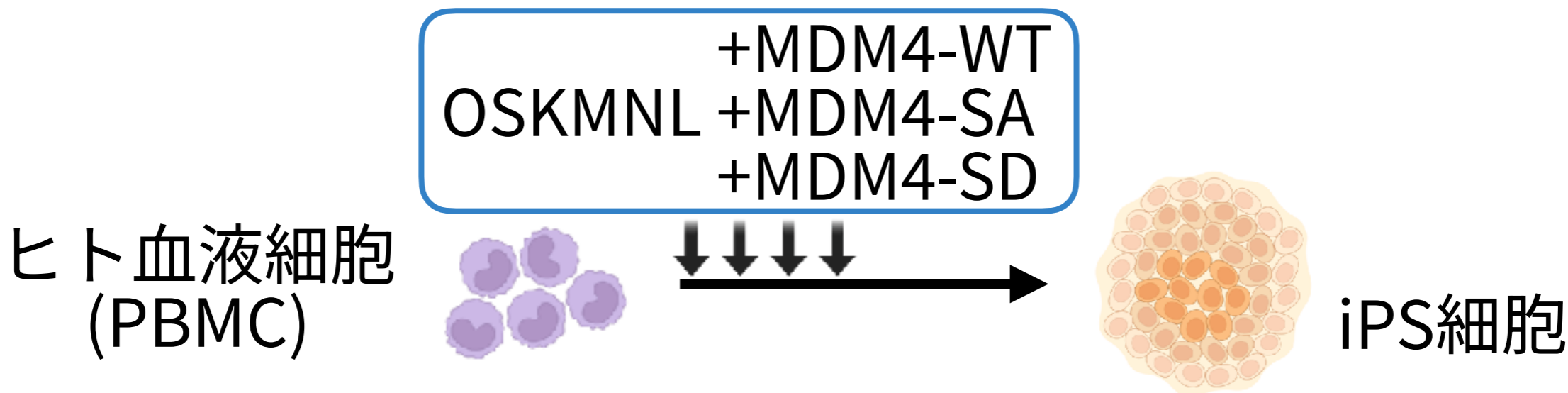
合成mRNA：

MDM4-WT(野生型)

MDM4-S367A(SA)(リン酸化されない変異体)

MDM4-S367D(SD)(リン酸化を模倣した変異体)

# RNAによるPBMCの初期化：結果

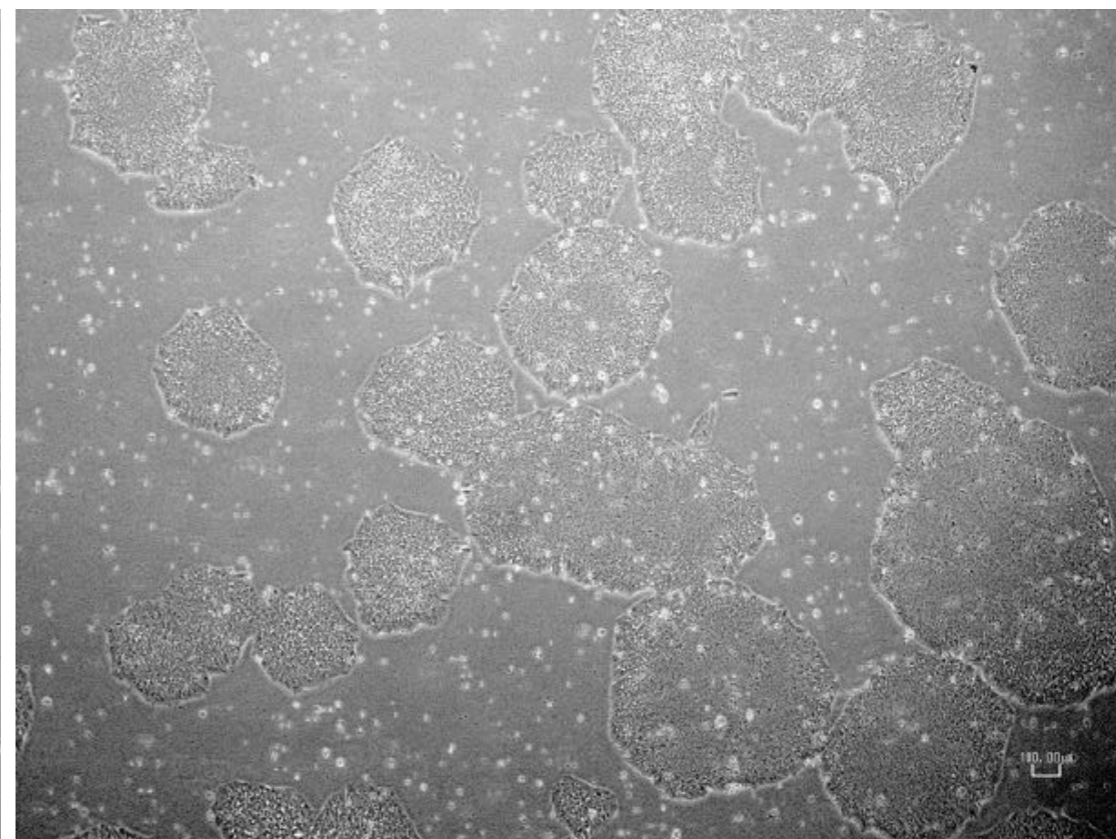
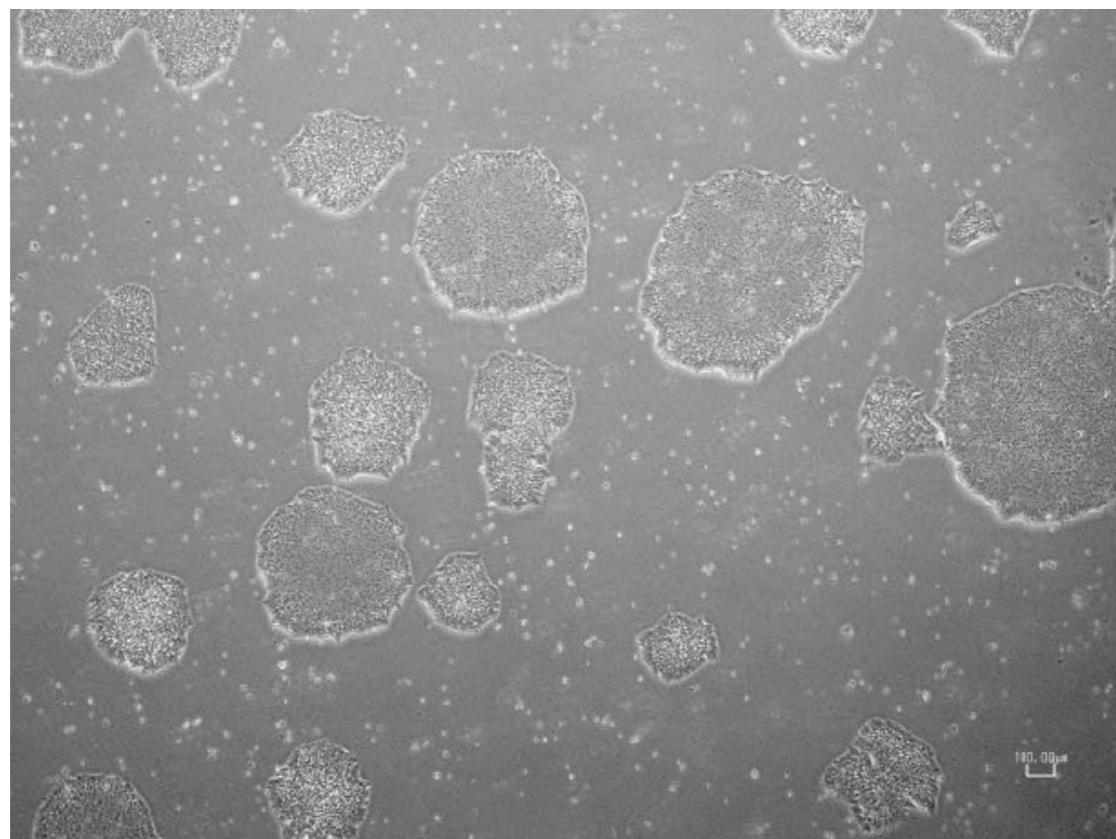


# RNA-iPS細胞：形態・核型

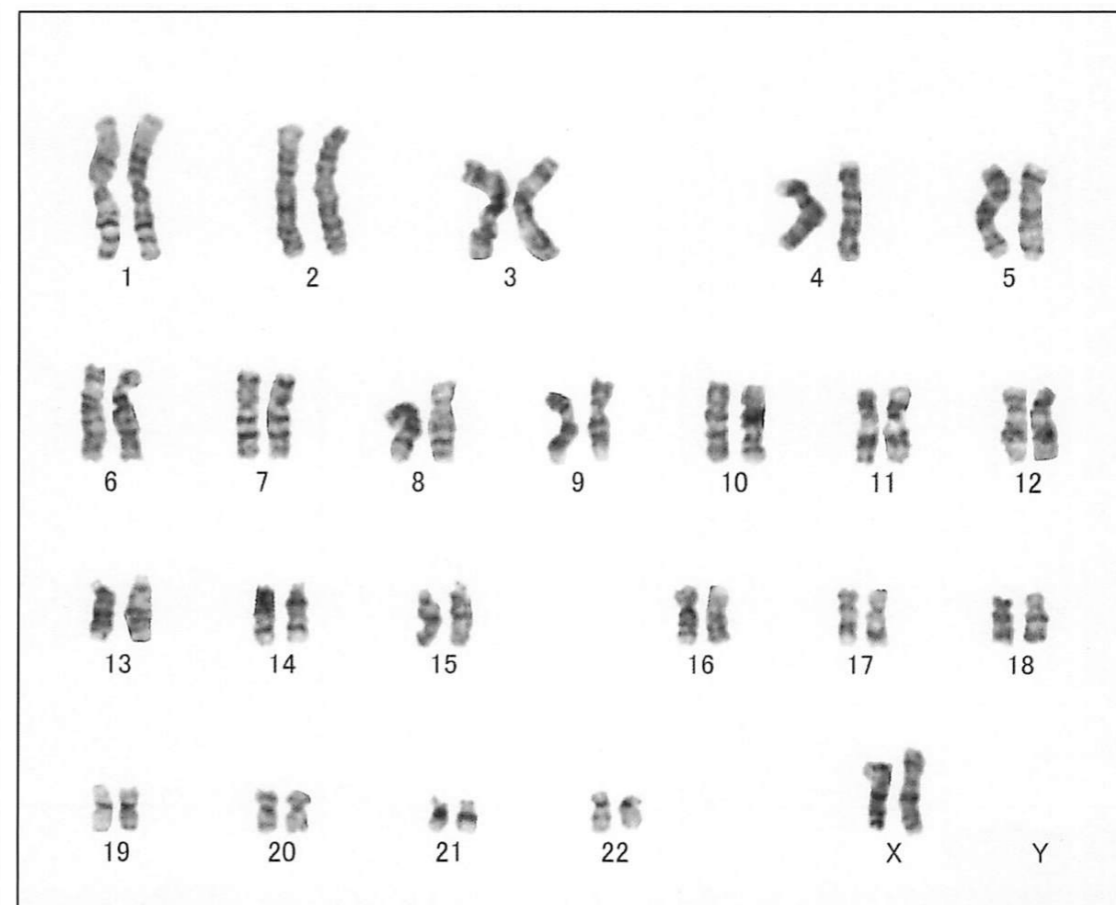
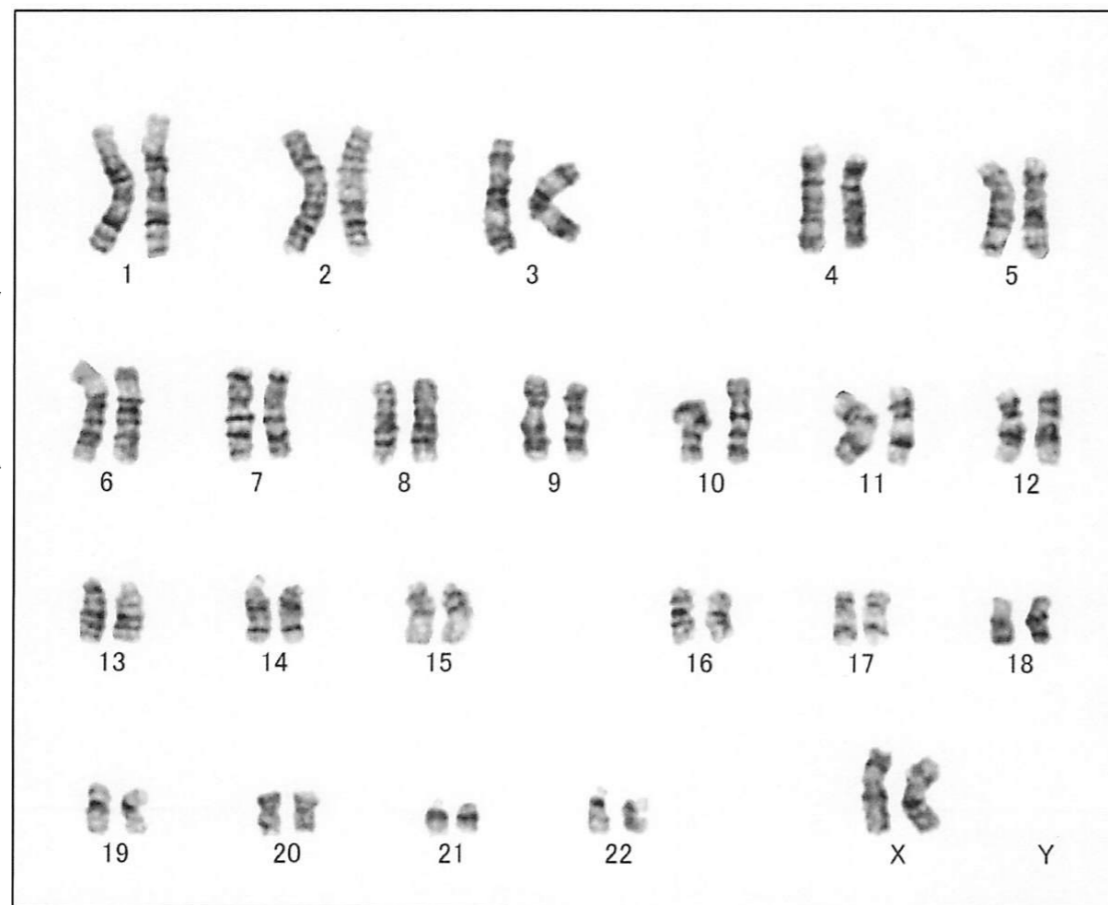
MN245C13 p11

MN333#4 p10

位相差像



核型(正常)



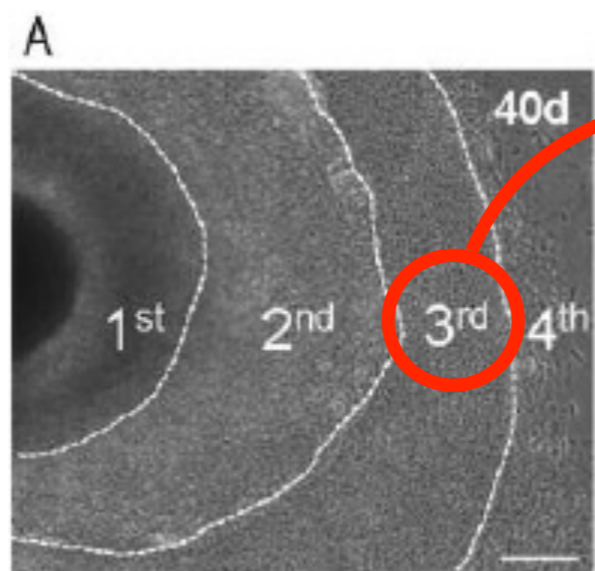
# RNA-iPS細胞：角膜分化能

確立済み

角膜上皮分化法

SEAM

(self-formed ectodermal autonomous multi-zone)



JSTプレスリリースより

角膜上皮前駆細胞



角膜上皮組織

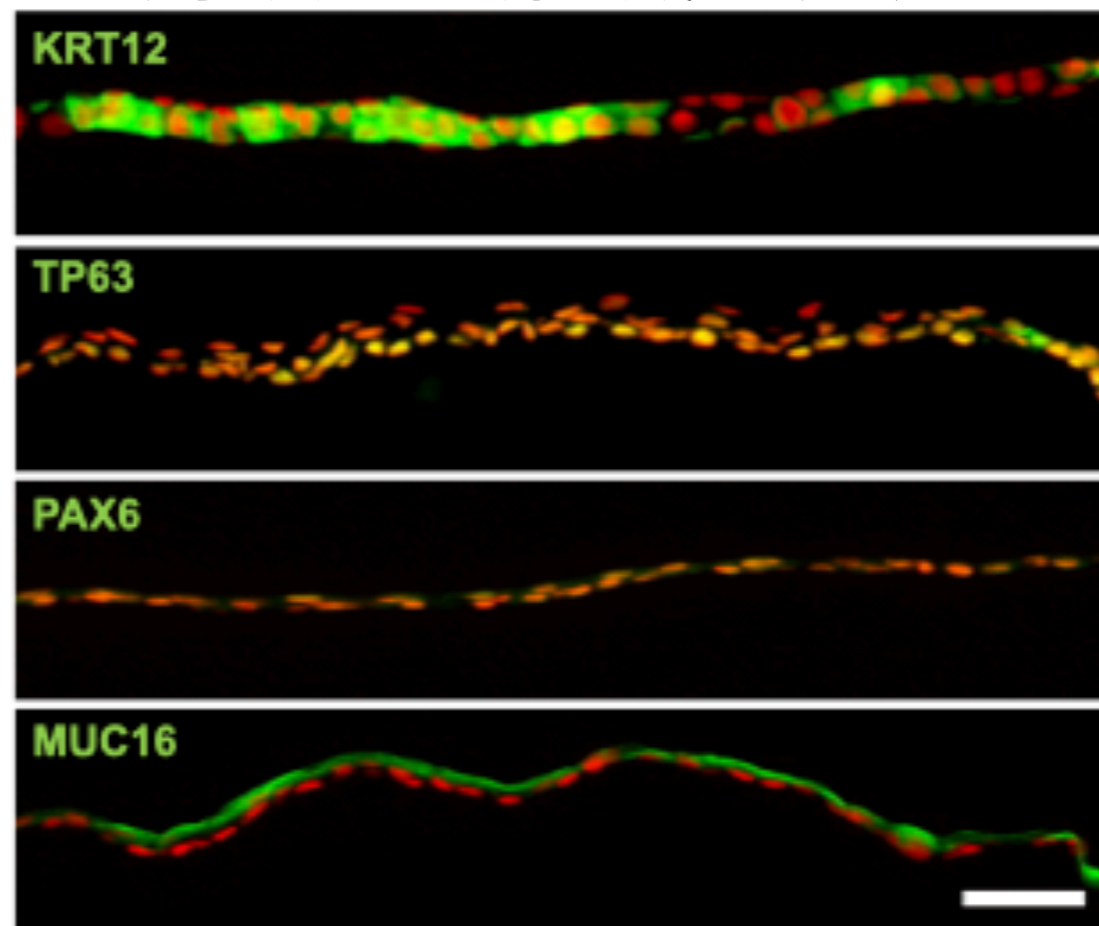
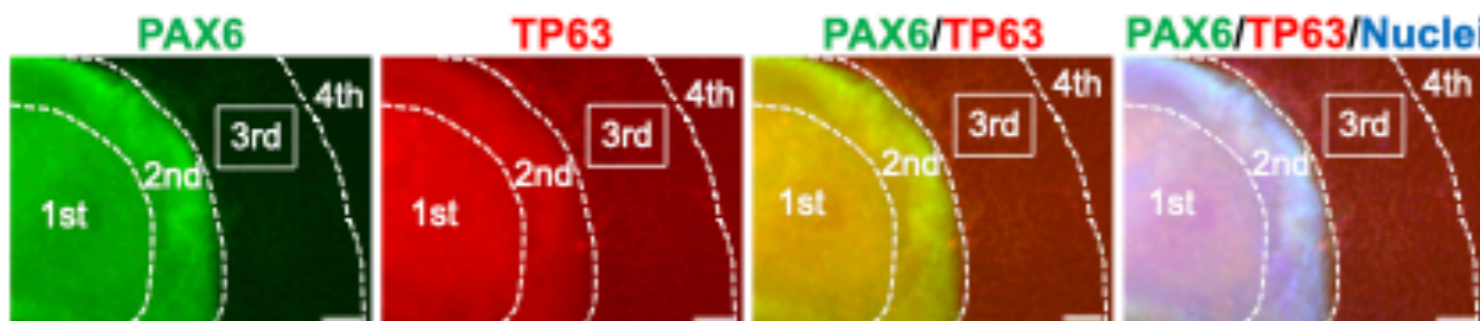
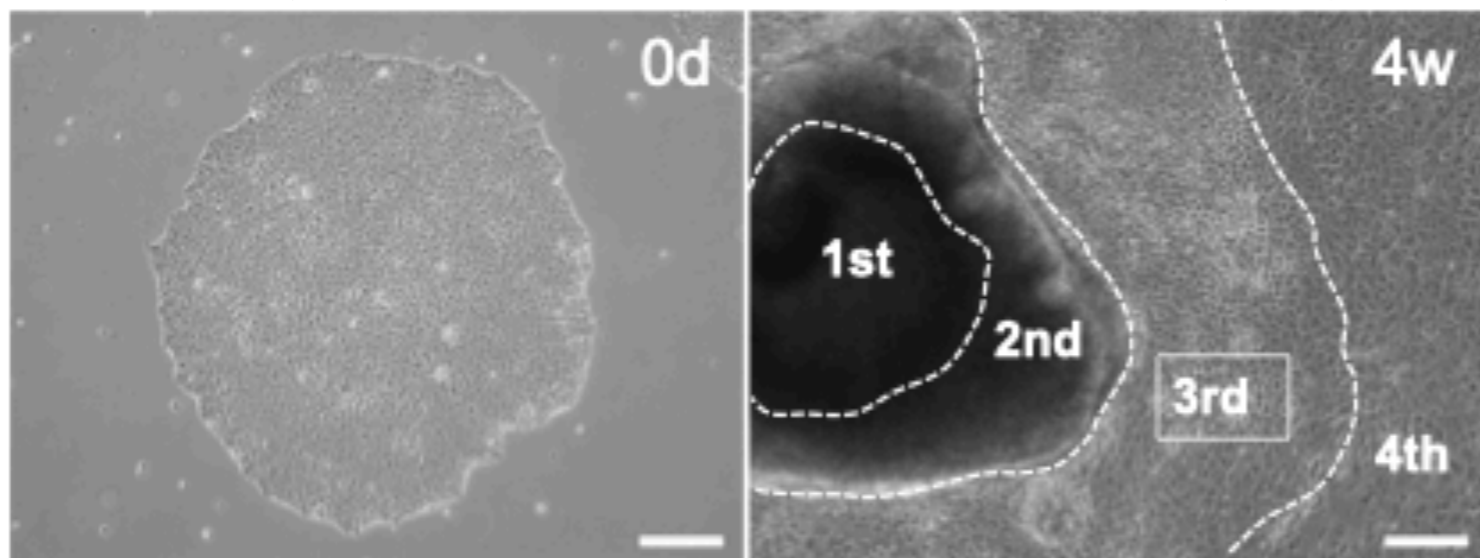


移植済み

iPS細胞 MN328

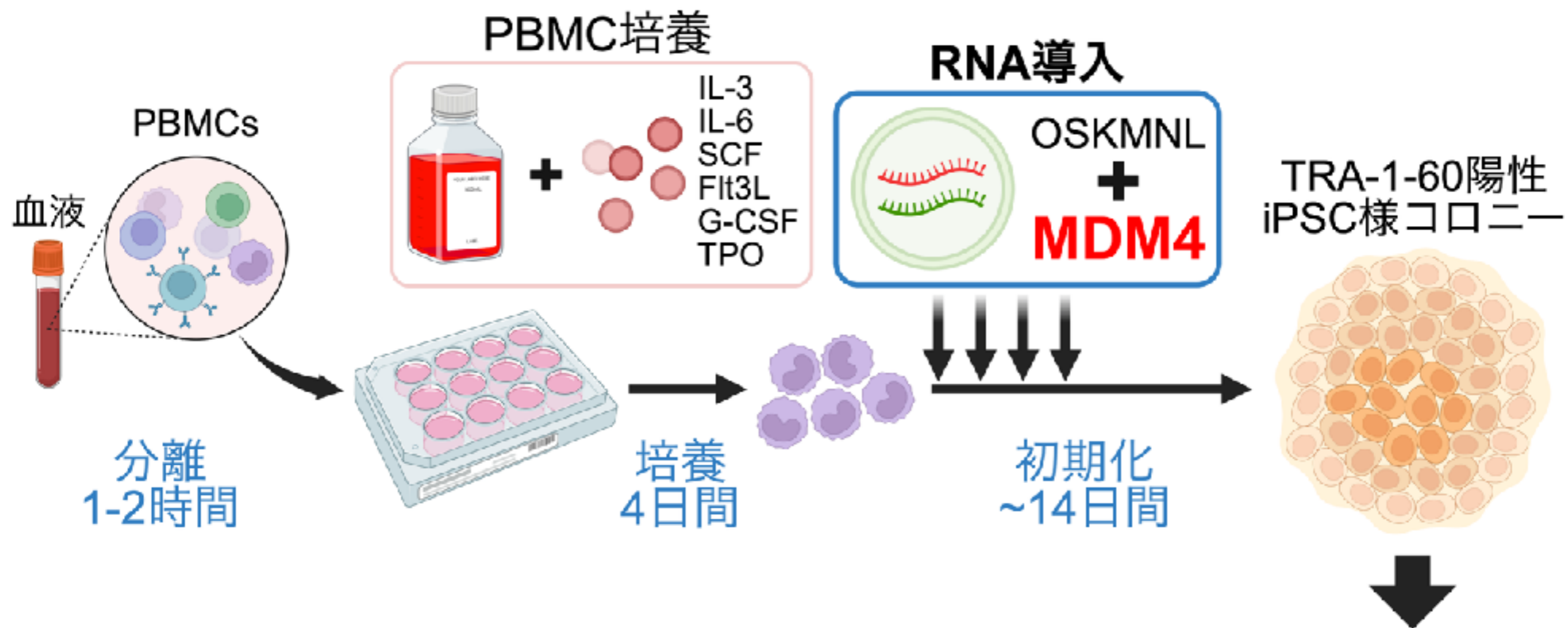
SEAMの誘導

角膜上皮組織の形成



角膜上皮前駆細胞マーカーの発現

## 合成RNAによるPBMCからの高効率iPS細胞 作製技術を開発した



- 再現性あり
- 安全（挿入無し、ウイルス不使用）
- 簡単な手順
- 改変可能（他の因子）

- 多能性マーカーの発現
- 正常な核型
- 三胚葉系列の細胞への分化
- 角膜上皮細胞への分化

# RNA法について：比較・従来技術

- 非ウイルスの**合成RNA** → 先行企業のキット
  - 血液細胞由来の**PBMC** → **PBMC**では難しかった
  - 促進因子の**MDM4** → **MDM4**追加で達成
- ↑ 上記の組合せ技術 → **×**競合・**○**拡張

項目	従来技術①ウイルスベクター法 (Sendai等)	従来技術②プラスミド/エピソード法	本技術合成RNA + MDM4法
初期化因子導入法	ウイルス	DNA (非ウイルス)	合成RNA (非ウイルス)
ゲノム改変/挿入リスク	低いが完全には否定不可	あり (低い)	なし (非DNA)
初期化効率 (PBMC)	中～高	低	高 (MDM4併用で大幅改善)
再現性 (ドナー間)	中	低	高 (複数ドナーで確認)
自動化との親和性	低	中	高

発明の名称：多能性幹細胞の製造方法

出願番号：特願2023-522621

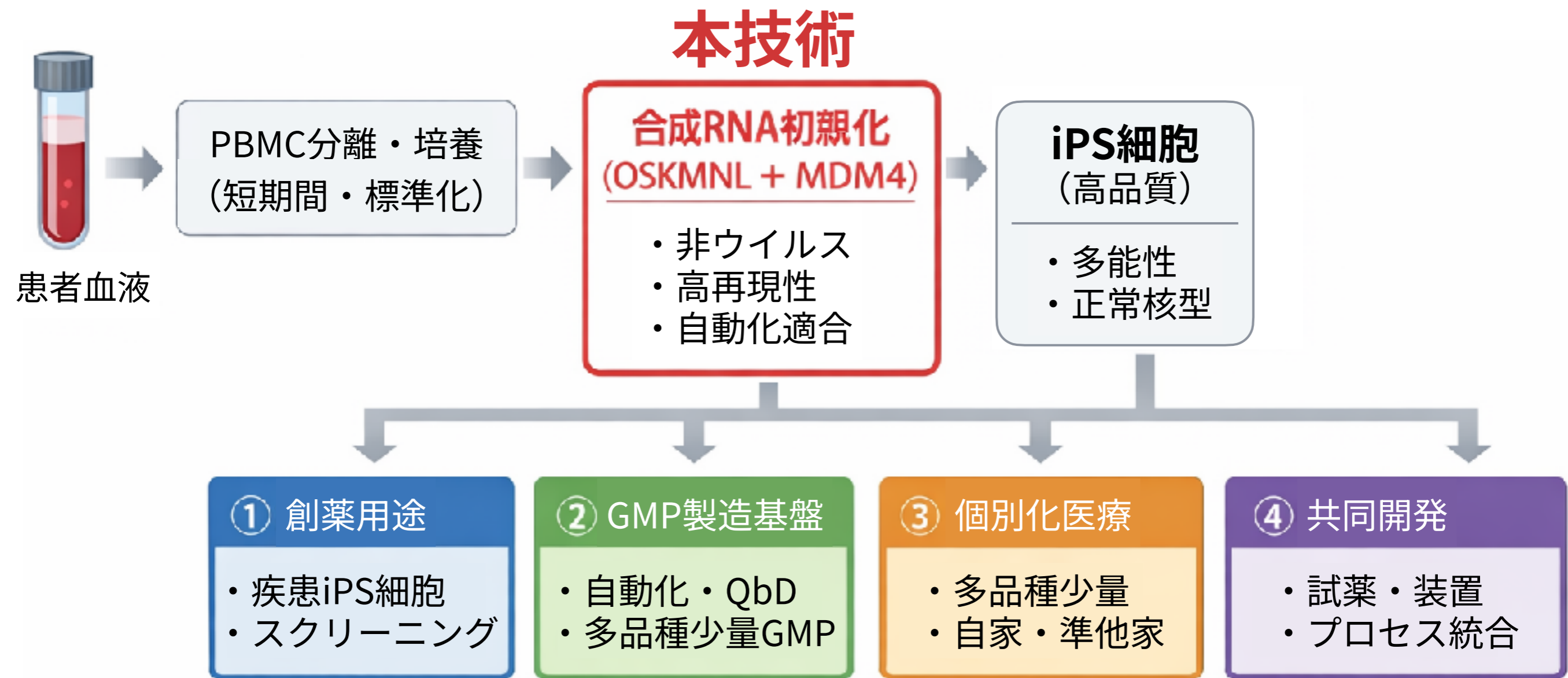
(日本で特許査定)

## 本特許のコア

- 血液細胞 (PBMC) × 合成RNA初期化
- ラミニン $\alpha$ 5系基質を用いた工程設計
- MDM4 mRNAによるp53経路制御

➡ 既存RNAリプログラミング技術を基盤として、  
血液細胞という難関材料への適用を成立させた  
製造方法特許 (既存技術の拡張特許)

# 本技術の企業活用イメージ



➡ 本技術は、PBMCからのiPS細胞作製を起点として、創薬・GMP製造・個別化医療へと展開可能なプラットフォーム技術である。

## 【実用化に向けた課題】

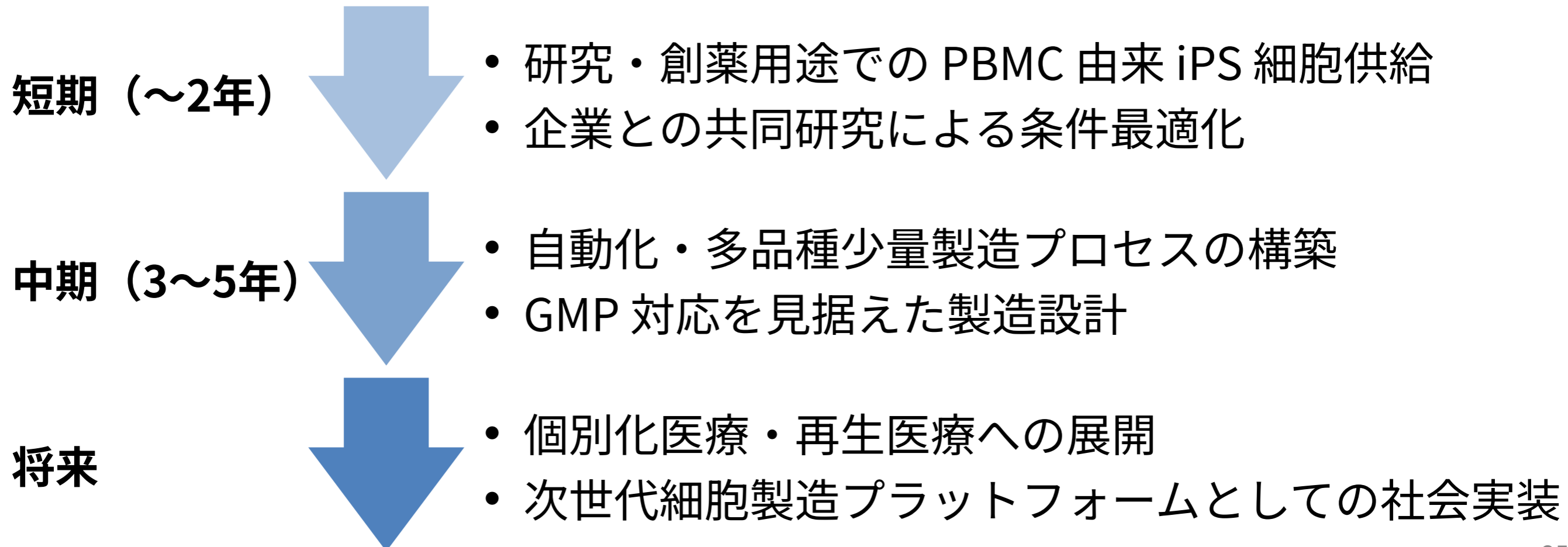
### 現在の到達点

- 合成RNA法を用いた PBMC 由来 iPS 細胞樹立を実現
- 再現性・安全性を確認済み（非ウイルス・非DNA）

### 今後の技術課題

- 自動化・GMP 製造を見据えた工程整理
- 品質評価項目（QC）の標準化

## 【社会実装への道筋（見通し）】



# Collaboration Opportunities

本技術は、血液細胞（PBMC）由来iPS細胞製造を起点とした、**次世代細胞製造プラットフォームの実装・事業化**に向けて、以下の企業との連携を想定しています。

## ① iPS細胞製造・創薬関連企業



- 疾患iPS細胞の作製・評価
- 創薬スクリーニングへの応用

## ② GMP製造・CDMO・自動化技術企業



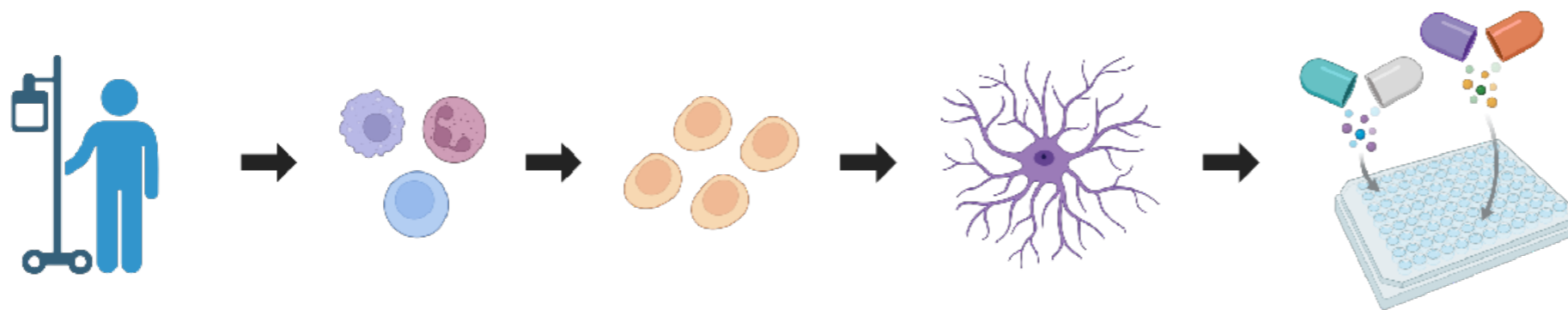
- 多品種少量GMP製造プロセスの構築
- RNA初期化工程の自動化・QbD設計

## ③ 試薬・基材・装置開発企業



- RNA、培地、ラミネン基材の最適化
- 製造プラットフォーム化・キット化

**本特許（特願2023-522621）を基盤として、共同研究、技術移転、プロセス共同開発に関心のある企業との対話を歓迎します。**



# 合成RNAを使いPBMCからiPS細胞樹立

- ◆ 次世代再生医療の基盤技術
- ◆ iPS細胞研究の裾の拡大

問い合わせ先

国立大学法人京都大学 iPS細胞研究所 医療応用推進室

[cira-chizai@cira.kyoto-u.ac.jp](mailto:cira-chizai@cira.kyoto-u.ac.jp)