

200906019A

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 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植の実用化研究

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 高橋 政代

平成 22 (2010) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植の実用化研究

高橋 政代 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 6

III. 研究成果の刊行物・別刷 7

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
総括研究報告書

ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植の実用化研究

研究代表者 高橋 政代

独立行政法人理化学研究所 網膜再生医療研究チーム チームリーダー

研究要旨

加齢黄斑変性は欧米では高齢者の視力低下の主原因であり、日本でも近年増加している疾患である。長く効果的な治療法が存在しない疾患であったが、近年光力学療法と抗新生血管薬 2 種が登場して一部の症例では視力の向上を得られるようになった。しかし、これらの治療法は原因となる脈絡膜新生血管を抑制するものの、視力低下の大きな要因である線維性瘢痕、網膜色素上皮細胞萎縮、視細胞変性をまったく解決することはできない。そのため現存する治療法で疾患の沈静化や視力の回復を得られる症例はわずかにとどまる。これら大多数の症例は線維性瘢痕の除去とともに網膜色素上皮の再生さらには視細胞の再生を必要とする。

我々は世界に先駆けて、ES細胞およびiPS細胞から加齢黄斑変性やその他の網膜色素上皮障害の治療に必要な機能を持つ網膜色素上皮細胞を分化誘導することに成功している。この細胞の利点は分化にともない色素が出現するために直視化に確認できること、また、分化した細胞は均一な細胞の塊として増殖するために、顕微鏡下にピックアップして純化することが可能であることである。また、網膜色素上皮障害の治療においては、細胞数が 10^4 個程度で治療効果を得られることから、細胞治療の実用化に最も近い細胞種のひとつと考えられる。

臨床応用のためには、現在使用している培地などから動物成分を除いたXeno-free 培地に代替可能かどうかを検証する必要がある。さらに、その過程すべてをGMP準拠のcell processing center (CPC)で管理する必要がある。

本研究では患者への臨床応用を開始する前に、CPCにおける現在のiPS細胞作成法や維持法、分化誘導法、網膜色素上皮細胞純化法が問題なく運ぶかどうかを厳重に検証する。

申請者の所属するスーパー特区の研究事業「ICRの推進による再生医療の実現」において、ヒトiPS細胞由来網膜細胞用CPCが建造され、そこで使用する物品はすべてGMP基準に準拠したものを新たに備える必要がある。

平成21年度は運用に関する準備を行い、平成22年度は完成したCPCを実際に使用して、実際の臨床応用の際と同様の工程を検証する。同時に臨床応用に向けたプロトコル及びSOPを作成し、研究計画の最終年度のなる平成23年度までに完成することを目標としている。

A. 研究目的

加齢黄斑変性は日本でも近年増加している疾患である。効果的な治療法が存在しない疾患であったが、近年光力学療法と抗新生血管薬2種が登場して一部の症例では視力の向上を得られるようになった。しかし、これらの治療法は原因となる脈絡膜新生血管を抑制するものの、視力低下の大きな要因である線維性瘢痕、網膜色素上皮細胞萎縮、視細胞変性をまったく解決することはできない。そのため現存する治療法で疾患の沈静化や視力の回復を得られる症例はわずかであり、これら大多数の症例は線維性瘢痕の除去とともに網膜色素上皮の再生さらには視細胞の再生を必要とする。

我々は世界に先駆けて、ヒトES細胞およびiPS細胞から加齢黄斑変性やその他の網膜色素上皮障害の治療に必要な機能を持つ網膜色素上皮細胞を分化誘導することに成功している。(Osakada et al. Nat Biotech 2008, Osakada et al. Nat Protocol 2009, Hirami et al. Neurosci Lett 2009) またそれより以前に、サルES細胞由来網膜色素上皮細胞の移植により網膜色素上皮障害モデルラット(RCSラット)の治療効果を示した。(Haruta et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004) これは、霊長類のES細胞を用いて疾患モデルの治療効果を示した世界初の成果であった。

この細胞の利点は分化にともない色素が出現するために顕微鏡下にピックアップし

て純化することが可能であることである。また、細胞移植による効果は、過去から胎仔細胞を網膜色素上皮障害モデル動物に移植するなどして世界の多数の研究室が確認している(Lund et al. Prog Retin Eye Res. 2001)。最近では、ヒトES細胞由来網膜色素上皮細胞について移植後220日以上の安全性が確認されている(Lue et al. Stem Cells. 2009)。しかし、網膜色素上皮細胞については他家移植で拒絶反応が起こることが知られており、ES細胞よりも患者由来のiPS細胞を用いることが望ましいと思われる。

我々は、すでに患者皮膚細胞から多数のiPS細胞株の樹立にも成功しているが、本研究期間内に網膜色素上皮細胞の純化、安全性検証をGMP準拠のCPCにおいて行い、臨床試験のプロトコル、SOPの作成を行うものである。

B. 研究方法

本研究においては計画の最終年度となる平成23年度までに患者iPS細胞由来の網膜色素上皮細胞移植のプロトコル、SOPを基に皮膚細胞からのiPS細胞作成、分化誘導、網膜色素細胞純化の過程を繰り返し、さらにプロトコルとSOPの問題点を検討し完成する予定である。

本年度は、網膜変性患者の皮膚由来線維芽細胞から多数のiPS細胞株の作成に成功した。また、実際の治療用の細胞

を作成管理するためのヒト iPS 細胞由来網膜細胞専用の GMP 準拠 CPC がスーパー特区の研究事業「ICR の推進による再生医療の実現」において設計・建造されたため、その施設運営の準備を行った。準備には先端医療センターですでに他の 2 つの CPC を建造し稼動している川真田伸上席研究員と実際運営している方々の協力を得た。CPC の管理文書（品質管理基書、製造管理基準書等）の最初のバージョン（1 次バージョン）を作成し、平成 22 年度以降の CPC の本格運用及び網膜色素上皮細胞純化の準備を行った。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞由来網膜細胞用 CPC で必要となる管理文書の 1 次バージョンを作成し、平成 22 年度以降における CPC の本格運用及び網膜色素上皮細胞純化の準備を行った。

●管理文書

1. 製品標準書
2. 衛生管理基準書
3. 品質管理基準書
4. 製造管理基準書
5. 教育訓練手順書
6. バリデーション手順書
7. 自己点検手順書
8. 苦情・回収処理手順書
9. 文書管理手順書

D. 考察

1. 達成度について

今年度の研究においては、ヒト iPS 細胞由来網膜細胞用 CPC 稼動のために必要となる技術的、人的問題は解決したと判断しており、計画通りの達成度が得られたと考える。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

加齢黄斑変性は高齢者の視力低下の大きな原因であるが、60 歳以上の 1 % 近くという患者数に比べ治療薬が 3 剤しか存在しないという unmet needs の大きな疾患である。今年にはいって認可された薬剤についても視力低下の原因の一部（新生血管）を解決するにとどまり網膜色素上皮萎縮に関しては無効であるので、すべてを解決する治療法とはなり得ない。

本研究で GMP 準拠 CPC において、実際の臨床応用のためのプロトコルと SOP の作成をすることにより、スーパー特区の研究事業「ICR の推進による再生医療の実現」で計画されており、我々の基礎研究を実際の治療へと橋渡しする計画の加速が可能になると期待される。加齢黄斑変性やその他の網膜色素上皮障害に対するまったく新しい概念の治療が誕生するのみならず、世界に先駆けて iPS 細胞の臨床応用を目指すという点で意義が大きいと考える。

3. 今後の展望について

iPS 細胞の安全性が議論の的となっているが、本研究では実際に治療に使用する iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞およびその作成法を徹底的に検証し、厳重なプロトコルと SOP を作成することにより、臨床における安全性を確保することが目的である。

また、その途上で再生医療における「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」および薬事法との整合性などを慎重にはかる必要があるが、その際にも iPS 細胞の臨床応用を実際に検討している我々の研究が参考情報となることと思われる。

また、この研究成果が再生医療のモデルケースとなり、全国の医療・研究機関や網膜変性患者だけでなく、広く一般に認知・理解される細胞移植治療となることを目標にするとともに、再生医療全般の発展に寄与するものとする。

さらに将来的には、先進医療の申請を行うなど、再生治療として確立する仕組みを構築することが望まれる。

E. 結論

今年度の研究は計画通りに遂行できたと思うが、次年度以降は引き続き、これらの結果をもとに「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に適合するかどうか、また、コストや安全性から考え

て適当と思われる方法を決定し、臨床試験のプロトコル作成を開始する必要がある。

また、その際には、指針を熟知している先端医療振興財団・松山晃文チームリーダーの協力が得られる予定である。

平成22年度からは、ヒト iPS 細胞由来網膜細胞用 CPC を本格運用して実際の臨床試験に使用するのと同じ条件で iPS 細胞の樹立、維持、網膜色素上皮細胞の分化誘導、純化、移植細胞の調整を行う予定であり、CPC を使用することによって、具体的な手順を確認し、問題点を洗い出し、より完成度の高いプロトコルと SOP の作成が可能となると考える。

さらに、計画の最終年度には22年度までに作成したプロトコル、SOP を基に皮膚細胞からの iPS 細胞作成、分化誘導、網膜色素細胞純化の過程を繰り返し、さらにプロトコルと SOP の問題点を検討し完成させ、工程を繰り返すことにより手技・手順を確実なものにすることを目標とする。

再生医療を一般的な治療として実用化するまでには解決すべき課題が山積しており、数々の試験研究が行われることになるが、日本の iPS 細胞を使った再生医療の実用化に向け、iPS 細胞に関わる他機関と情報の共有を図るなど連携を充実させることが望まれる。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

1. 特許取得

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

「ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植の実用化研究」におけるCPC管理文書
(臨床研究対応)

1. 製品標準書
2. 衛生管理基準書
衛生管理関係 標準作業手順書 記録書一式
3. 品質管理基準書
品質管理関係 標準作業手順書 記録書一式
4. 製造管理基準書
製造管理関係 標準作業手順書 記録書一式
5. 教育訓練手順書
6. バリデーション手順書
7. 自己点検手順書
8. 苦情・回収処理手順書
9. 文書管理手順書

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植の実用化研究における
C P C 管理文書

(内容非公開のため項目のみ記載)

●製品標準書

●衛生管理基準書

(1) 衛生管理関係 標準作業手順書

- ①清浄度管理手順書(環境測定の総括)
- ②浮遊菌測定手順書
- ③浮遊微粒子測定手順書
- ④落下菌測定手順書
- ⑤付着菌測定手順書
- ⑥清掃・消毒作業手順書
- ⑦入退室手順書
- ⑧更衣手順書
- ⑨手洗い手順書
- ⑩搬入搬出手順書
- ⑪衛生管理教育手順書
- ⑫防虫防鼠手順書
- ⑬バリデーションマスタープラン(バリデーション手順書とは別)
- ⑭空調機器操作手順書
- ⑮健康管理手順書
- ⑯各種機器操作手順書(バリデーション・キャリブレーションが必要な機器)
- ⑰他

(2) 記録書

- ①施設全体の清浄度区分図
- ②施設の気流方向図
- ③製造機器の配置図
- ④設の動線図
- ⑤防虫防鼠関係のトラップ配置図及び、ライトトラップ配置図、捕捉記録書
- ⑥防虫防鼠関係のトラップ以外の昆虫捕捉報告書、殺虫施工報告書
- ⑦バリデーション関係の対象機器一覧及び、バリデーション項目リスト
- ⑧空調関係の室圧、温度、湿度、HEPAフィルターの測定記録書及び、グラフ、各種製造機器の測定チャート(温度・ガス濃度他)
- ⑨落下菌、付着菌、浮遊菌、浮遊微粒子の測定ポイント図、測定頻度一覧、測定記録書

- ⑩施設の清掃場所一覧表(グレード別)及び、清掃記録書
- ⑪教育関係の教育年間基本計画書、教育訓練実施記録、教育訓練実施状況及び、実効性評価結果報告書、実施教育資料
- ⑫健康管理・入退室関係の入室者健康状態チェック表、海外渡航者健康記録健康チェック表
- ⑬他

●品質管理基準書

(1) 品質管理関係 標準作業手順書

- ①試験検査実施計画作成手順書
- ②原材料規格試験手順書
- ③試験番号付与手順書
- ④試験検査実施手順書(原料・資材・中間品・製品)
- ⑤試験検査報告手順書(原料・資材・中間品・製品)
- ⑥製品出荷判定手順書
- ⑦標準品・試薬の管理及び、発注・在庫手順書
- ⑧検体保管手順書
- ⑨参考品保管手順書
- ⑩測定機器校正実施手順書
- ⑪品質工程教育訓練手順書
- ⑫他

(2) 記録書

- ①試験項目実施計画書
- ②規格書(全ての原材料・中間体・製品)
- ③原材料試験判定報告書
- ④中間体試験判定報告書
- ⑤製品試験判定報告書
- ⑥製品出荷判定報告書
- ⑦不適合判定報告書
- ⑧検体保管・使用記録書
- ⑨他

●製造管理基準書

(1) 製造管理関係 標準作業手順書

- ①製造計画日程作成手順書
- ②原材料発注・受入・出庫管理手順書
- ③製造指図書・記録書発行手順書
- ④工程ラベル発行手順書
- ⑤検体受入・保管手順書
- ⑥解凍手順書(解凍工程があれば)
- ⑦検体採取手順書
- ⑧中間体に関する規格・手順書
- ⑨製品ラベル発行手順書
- ⑩製品出荷手順書
- ⑪感染性廃棄物処理手順書
- ⑫委託試験手順書
- ⑬試験不適合時手順書
- ⑭製造時環境測定手順書
- ⑮製造工程バリデーション実施手順書
- ⑯製造工程教育訓練手順書
- ⑰他

(2) 記録書

- ①製造依頼書
- ②製造計画書
- ③原材料発注書
- ④製造指図書
- ⑤製造記録書
- ⑥受入・規格試験依頼書
- ⑦原材料保管・出庫記録書
- ⑧製造工程ラベル作成報告書
- ⑨検体送付書
- ⑩製品ラベル作成報告書
- ⑪製品出荷報告書
- ⑫製品出荷受領書
- ⑬外注検査依頼書
- ⑭異常発生報告書

⑮製造工程逸脱管理手順書

⑯他

●教育訓練手順書

●バリデーション手順書

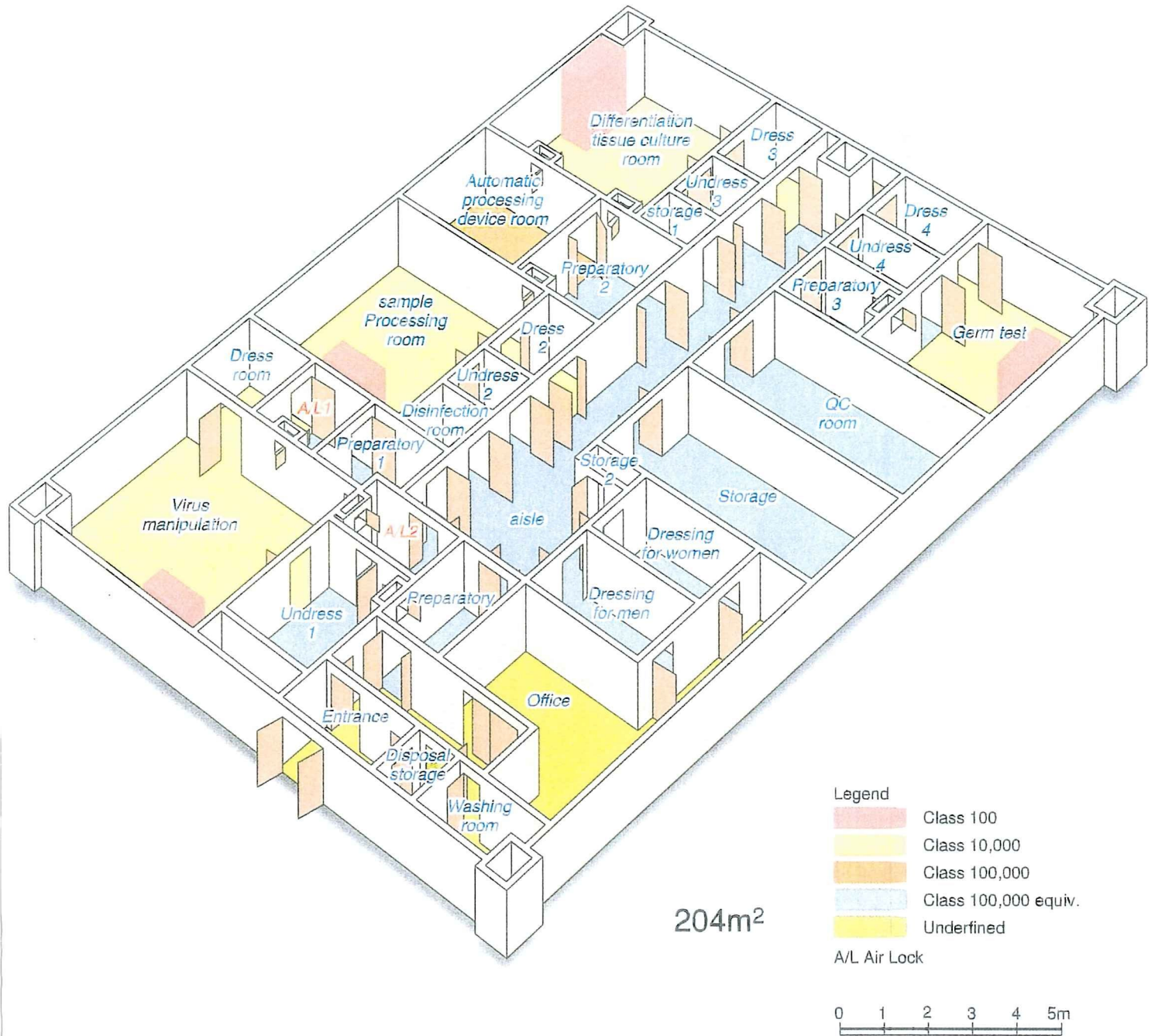
●自己点検手順書

●苦情・回収処理手順書

●文書管理手順書

CPC for processing iPS cell 概要

神戸バイオメディカル創造センター2階



建築概要

延べ面積	204.0m ²
床面積	18.9m ² ウイルス操作室
	14.9m ² 分化調整室
	15.0m ² 皮膚細胞処理室
	11.0m ² 無菌試験室
	12.0m ² QC室
	12.0m ² 保管室
	8.0m ² 機械室

設備概要

安全キャビネット	×4台	冷蔵庫 (4°C)	×2台
炭酸ガスインキュベータ	×8台	冷凍庫 (-85°C)	×1台
レーザーマイクロダイセクション	×1台	(-150°C)	×1台
バイオメディカルフリーザー	×2台	滅菌機	×3台
用益ガス供給設備	×1台	遠心機	×4台

