

201006010A

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22年度 総括研究報告書

研究代表者 高橋 政代

平成23(2011)年5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 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植の実用化研究

平成 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 高橋 政代

平成 23 (2011) 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	-----	2 4
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	2 5

# 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

先端医療振興財団 視覚再生研究グループ グループリーダー

### 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一部にとどまる。残りの多く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 $10^{4-5}$ 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。

本研究では臨床応用を開始する前に、CPC における 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し、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に適合するよう、コストと安全性の両面から検討し、適当と思われる培養法の確立を目指す。

また、CPC では臨床試験に適合する培養基準をクリアするための管理方法を策定し、本格的な運用を行うことで、臨床試験と同レベル、同条件の iPS 細胞の樹立、維持、網膜色素上皮細胞の分化誘導、純化、移植細胞の調製を可能にし、より完成度の高い培養プロトコル・SOP の完成を目指す。

## 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、臨床研究で使用する場合と同条件でヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞の培養を行うためにGMP準拠CPCの本格的な運用を開始した。

具体的には、施設におけるモニタリングシステムを稼働させ、施設内の温度、湿度、圧力、酸素濃度、清浄度、インキュベーター内CO<sub>2</sub>濃度などの環境測定を24時間行い、ヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞の培養に適した基準値を検討した。

また、平成21年度に作成した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)を元にさらに詳細な検討と確認を行うことで2次バージョンを作成し、最終年度における完遂を目指す。

## 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2次バージョン(改訂版)を作成するとともに、新たに必要となった文書の追加作成を行った。

### ●管理文書

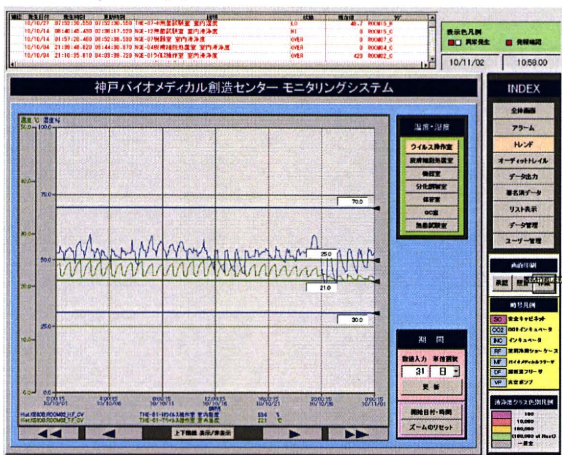
1. 製品標準書(改定)
2. 衛生管理基準書(改定)
3. 品質管理基準書(改定)
4. 製造管理基準書(改定)
5. 教育訓練手順書(改定)
6. バリデーション手順書(改定)

7. 自己点検手順書 (改定)
8. 苦情・回収処理手順書 (改定)
9. 文書管理手順書 (改定)
10. ベリフィケーション手順書 (新規)
11. 変更管理手順書 (新規)
12. 逸脱管理手順書 (新規)
13. バリデーションマスタープラン (新規)

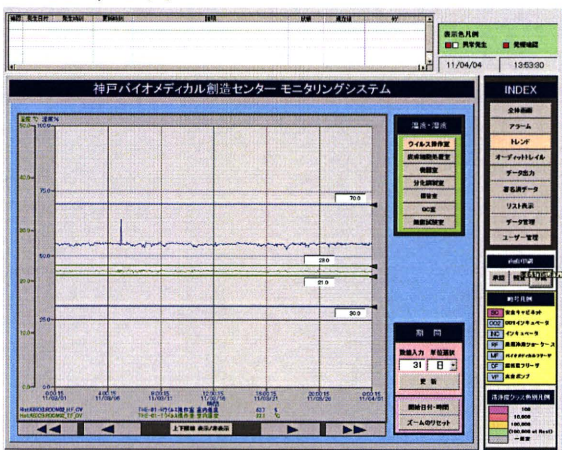
また、ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞の培養に適した GMP 準拠 CPC の本格的な運用開始により、下記のモニタリングデータを得られた。(一部データを抜粋)

●温度・湿度

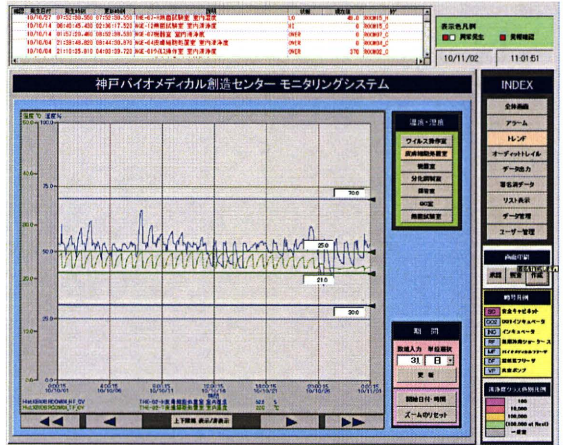
1. ウィルス操作室  
2010年10月



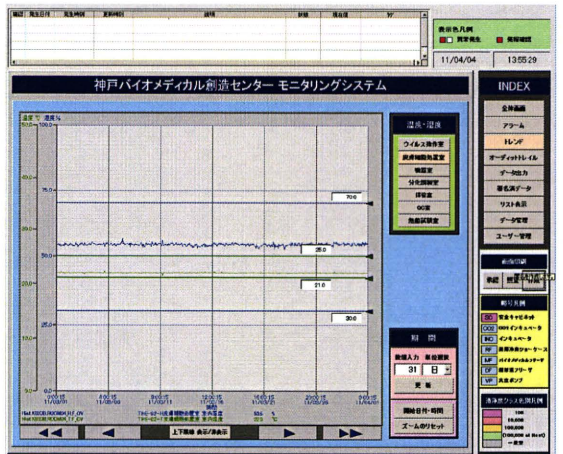
2011年3月



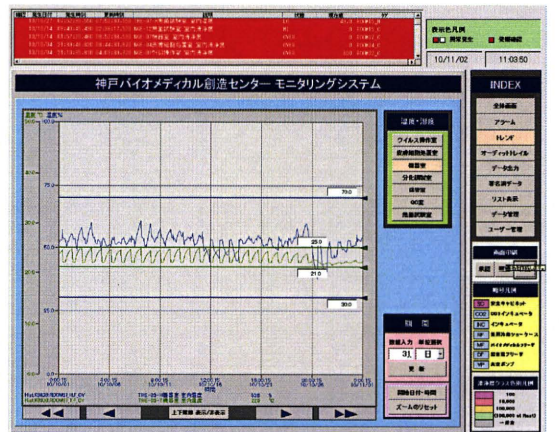
2. 皮膚細胞処置室  
2010年10月



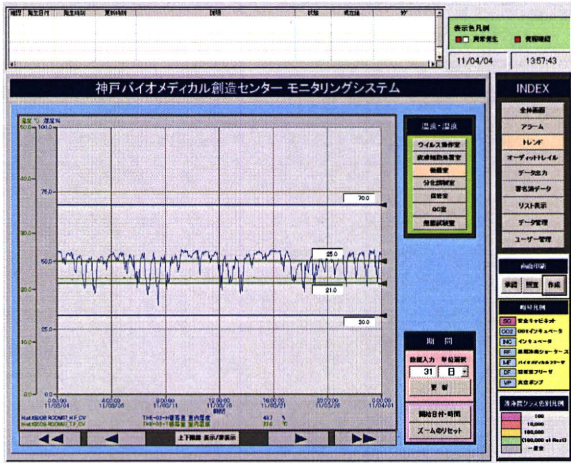
2011年3月



3. 機器室  
2010年10月

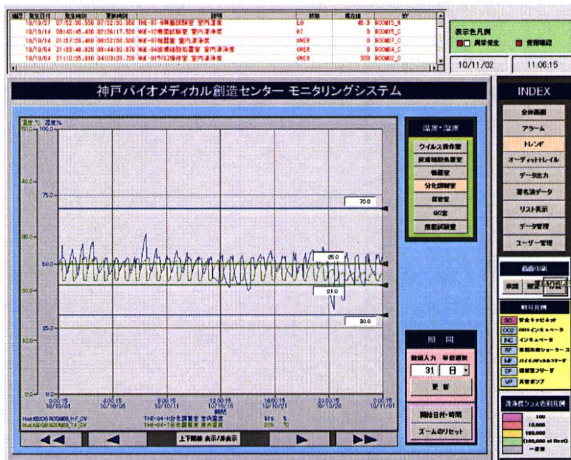


2011年3月

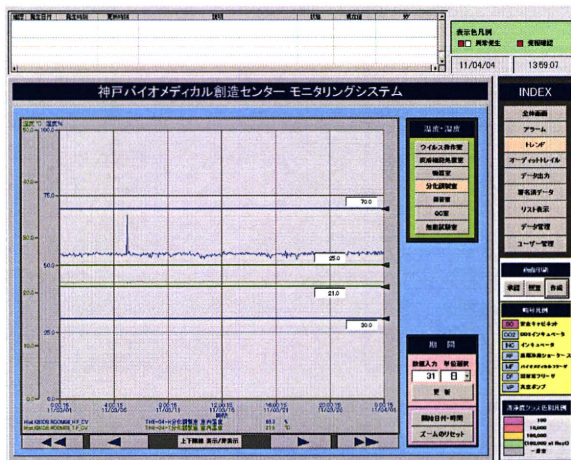


4. 分化調製室

2010年10月

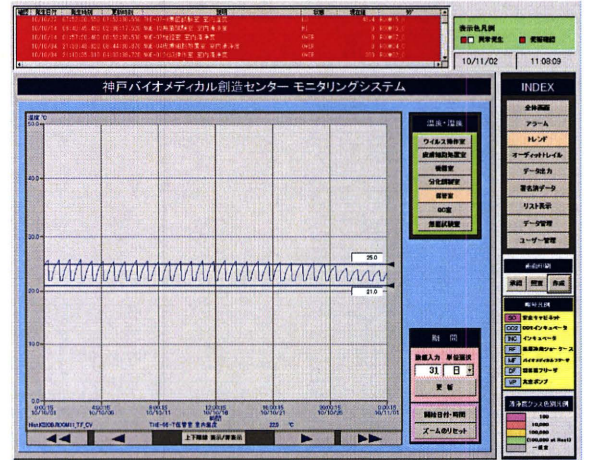


2011年3月

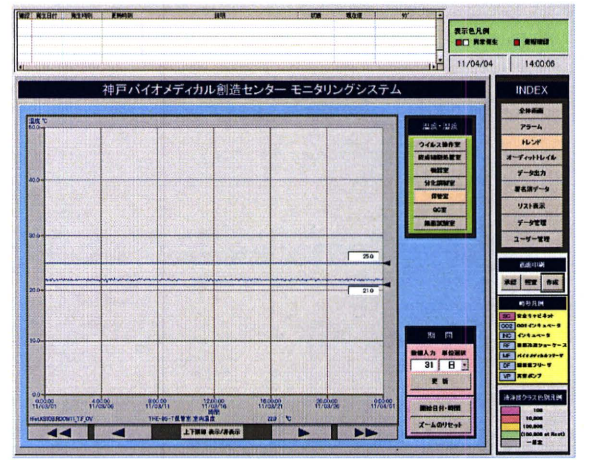


5. 保管室

2010年10月

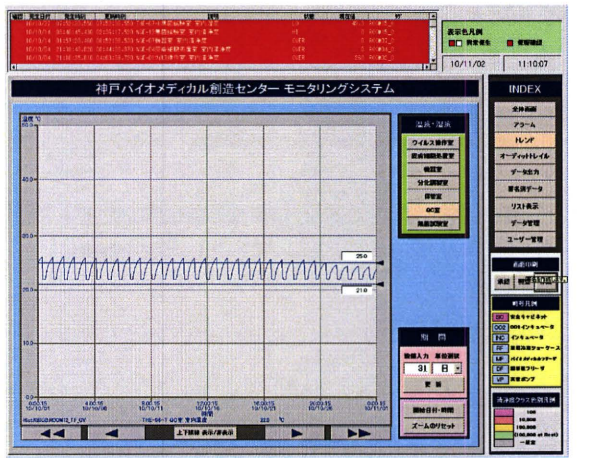


2011年3月



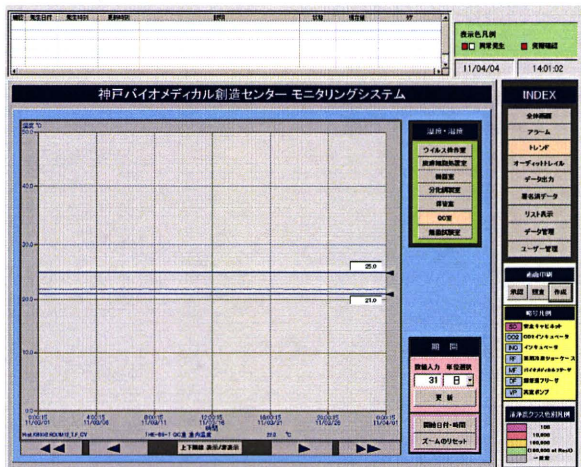
6. QC室

2010年10月



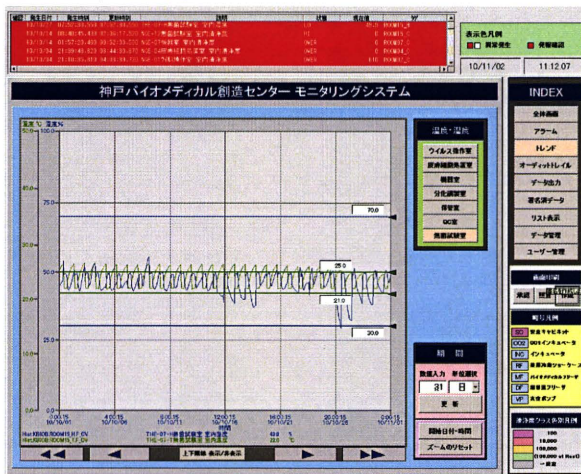


2011年3月

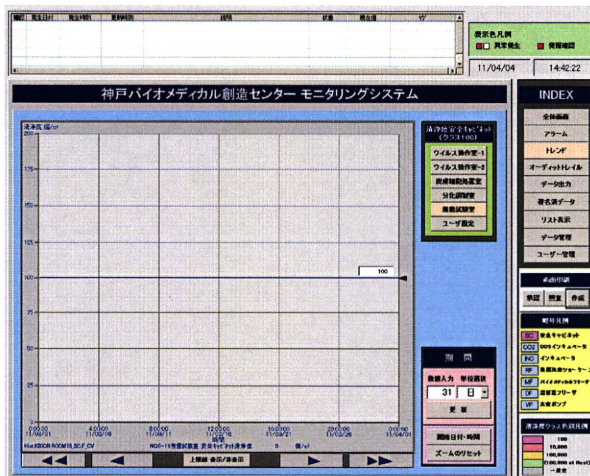


7. 無菌試験室

2010年10月



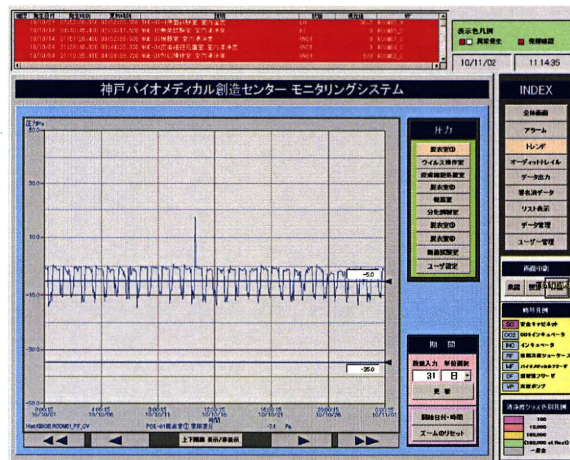
2011年3月



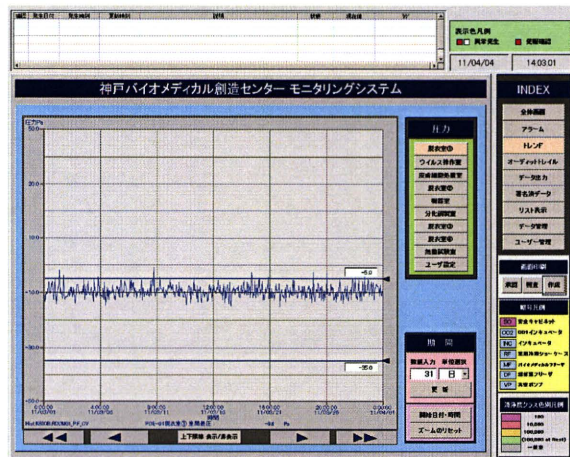
●圧力

1. 脱衣室①

2010年10月

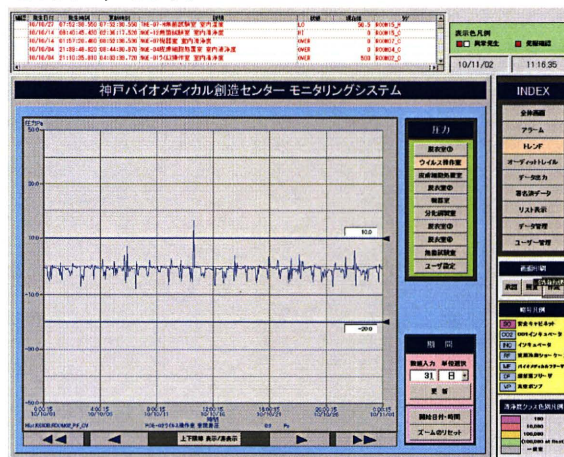


2011年3月

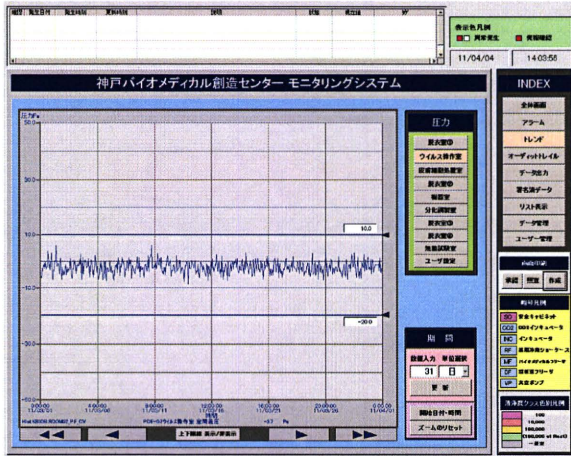


2. ウィルス操作室

2010年10月

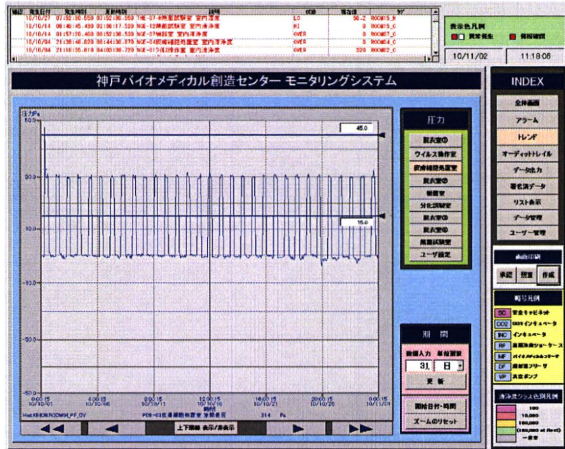


2011年3月



3. 皮膚細胞処置室

2010年10月

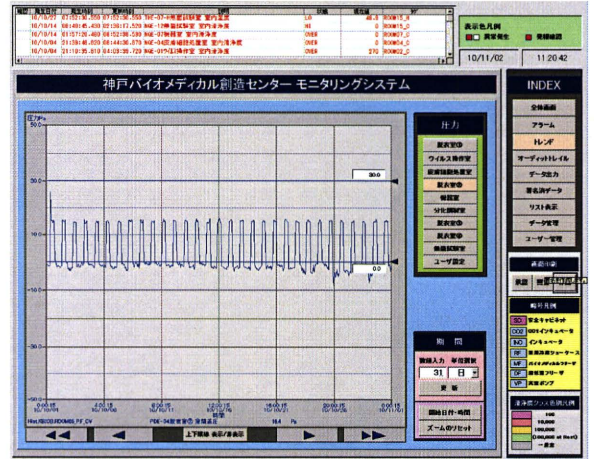


2011年3月



4. 脱衣室②

2010年10月

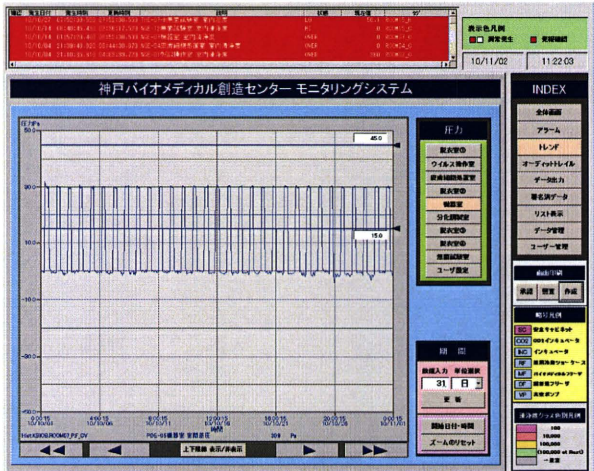


2011年3月

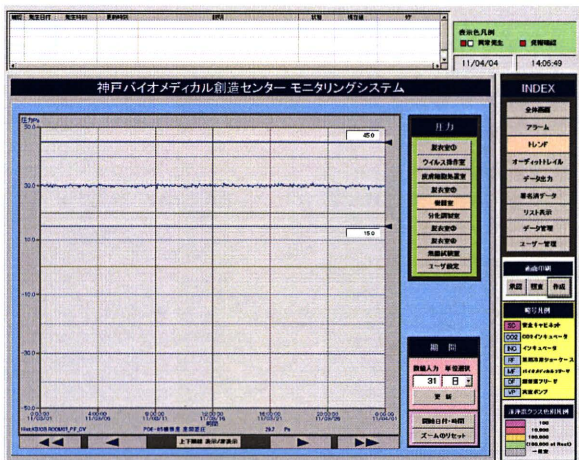


5. 機器室

2010年10月



2011年3月



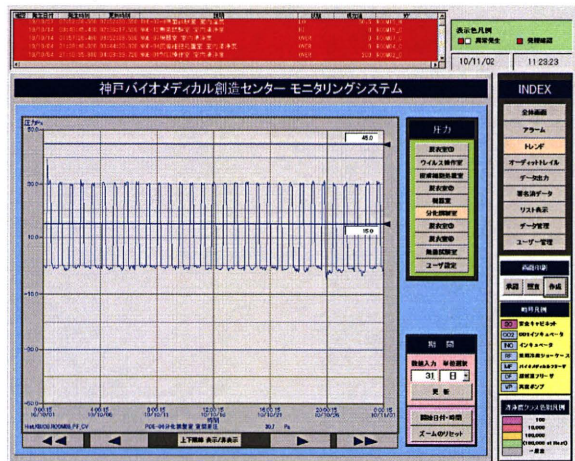
7. 脱衣室③

2010年10月

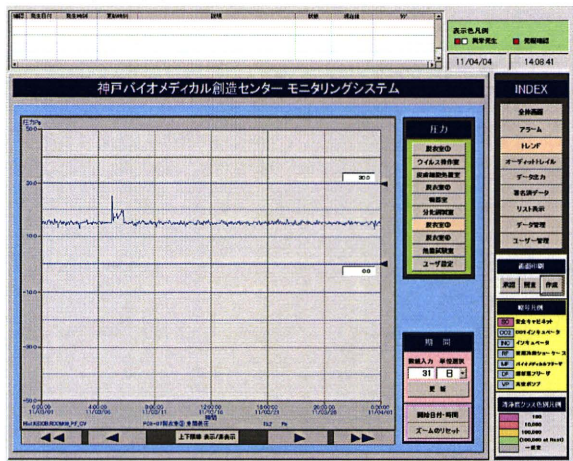


6. 分化調製室

2010年10月



2011年3月

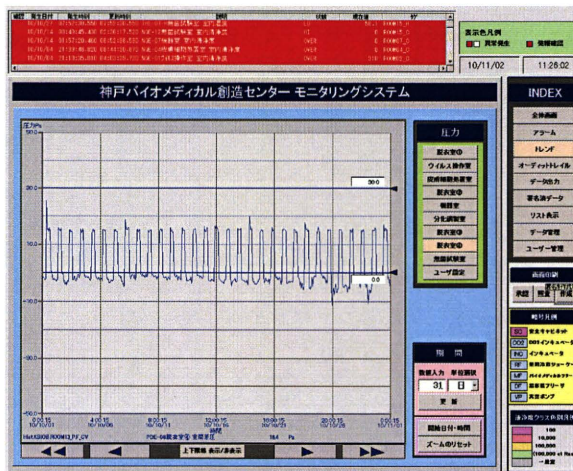


2011年3月

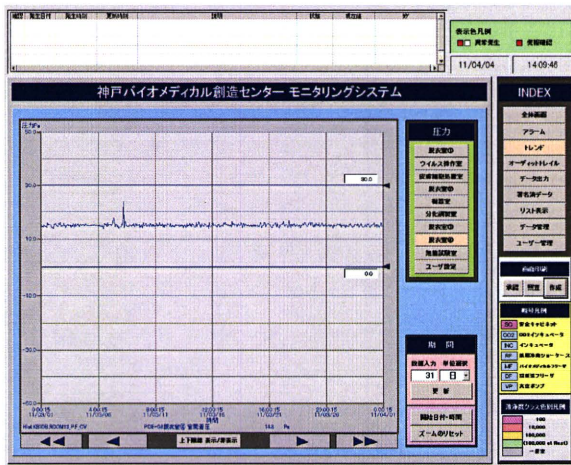


8. 脱衣室④

2010年10月

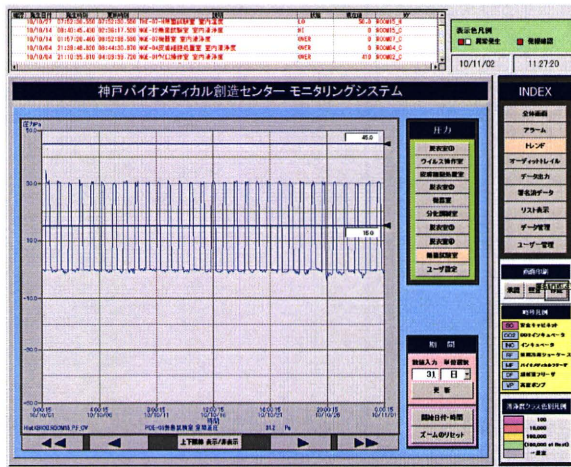


2011年3月



9. 無菌試験室

2010年10月



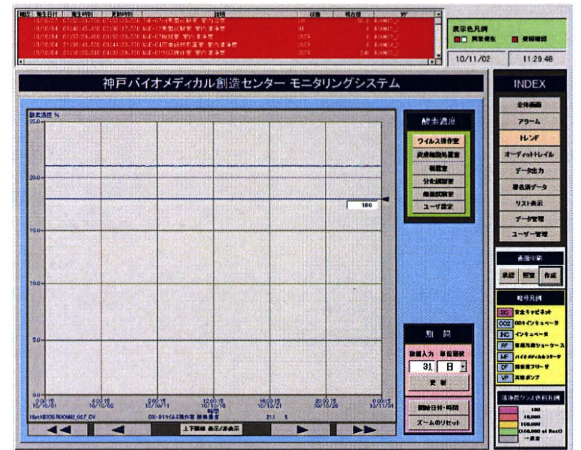
2011年3月



●酸素濃度

1. ウィルス操作室

2010年10月

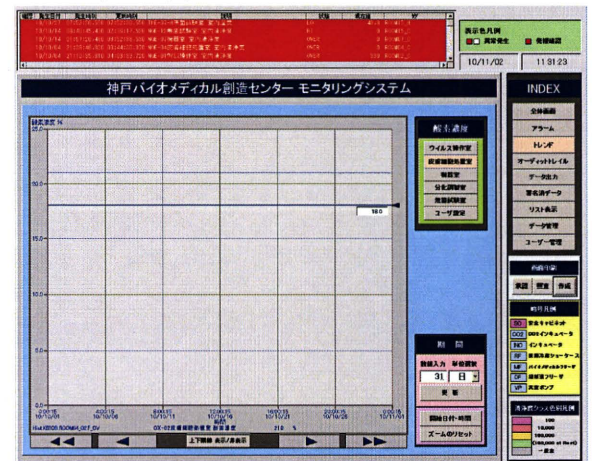


2011年3月

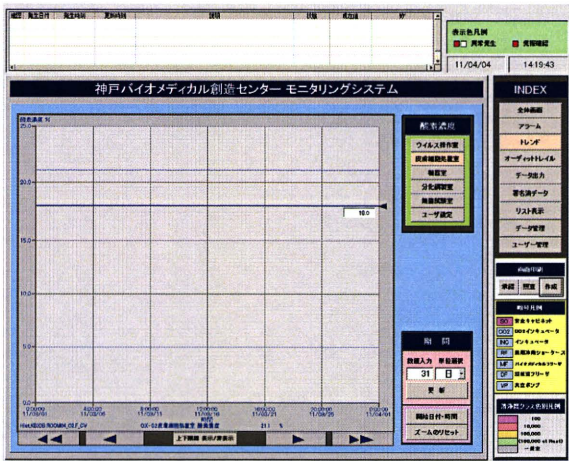


2. 皮膚細胞処置室

2010年10月

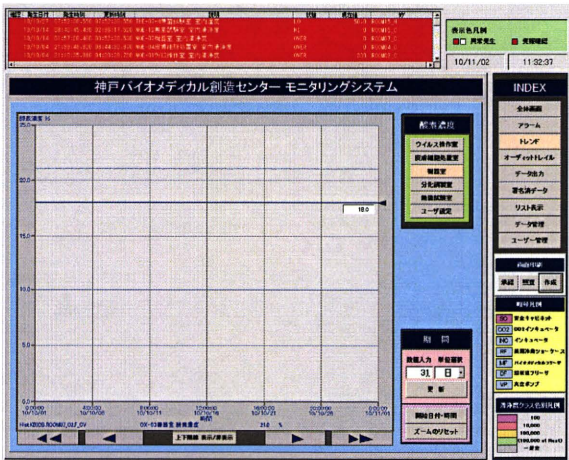


2011年3月

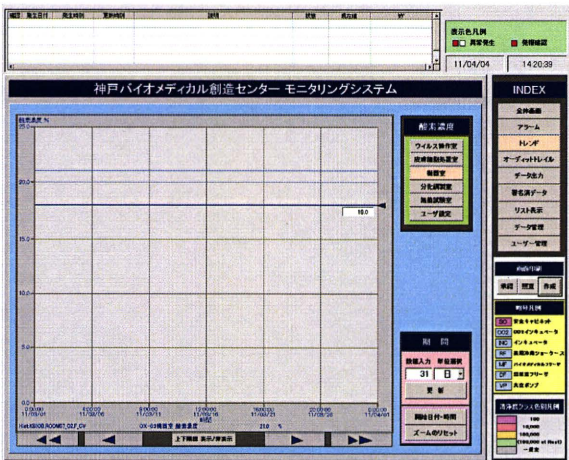


3. 機器室

2010年10月

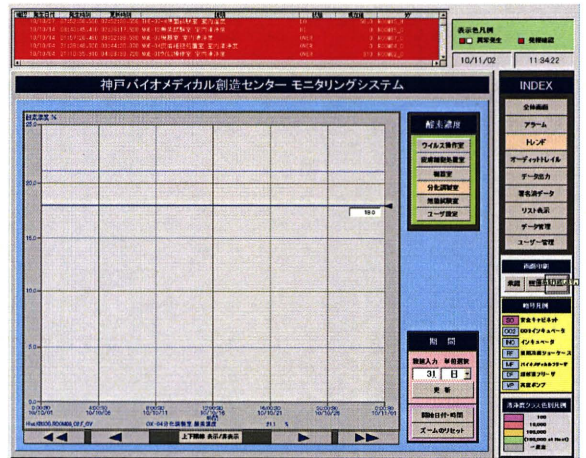


2011年3月

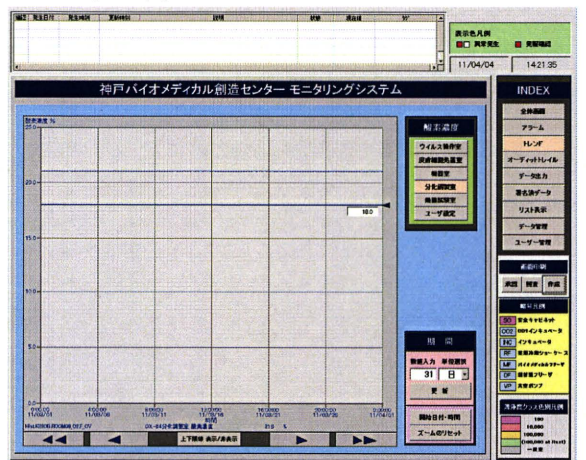


4. 分化調製室

2010年10月

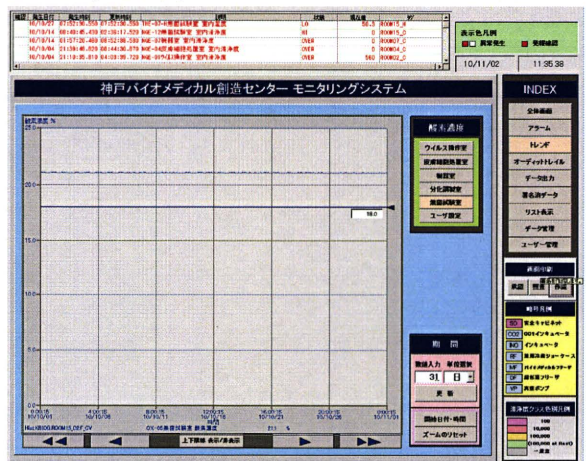


2011年3月



5. 無菌試験室

2010年10月



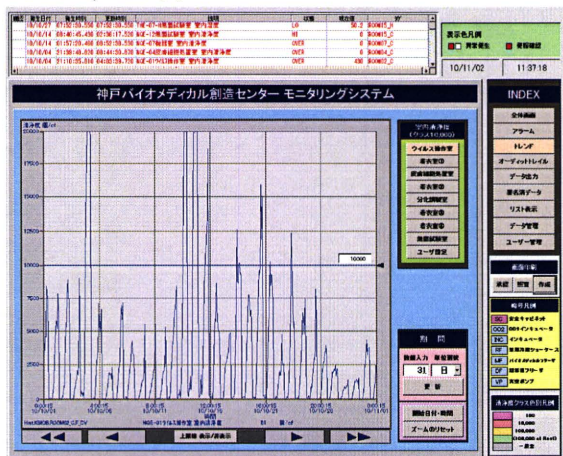
2011年3月



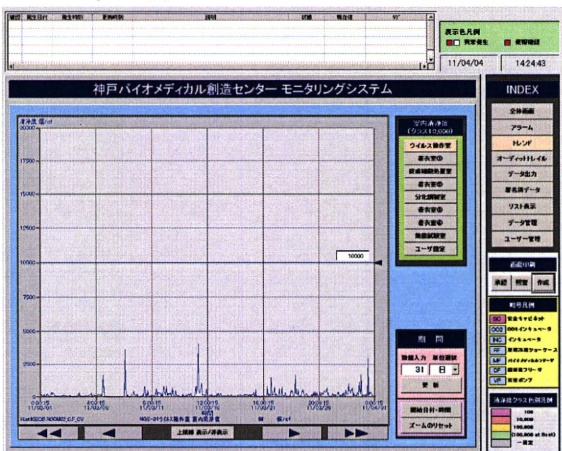
● 清浄度

1. ウィルス操作室

2010年10月

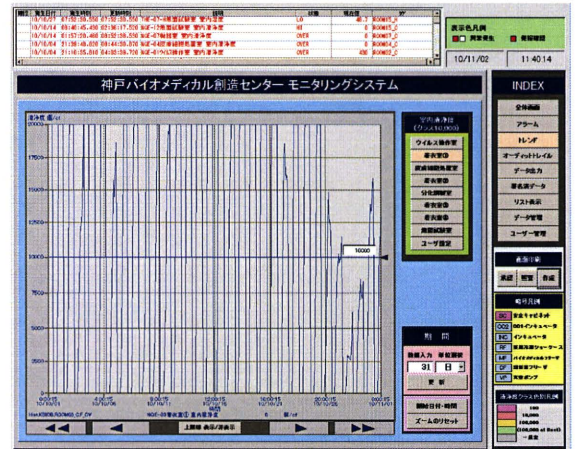


2011年3月

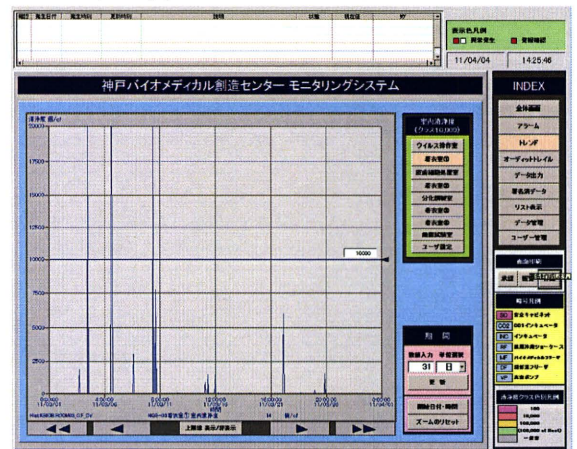


2. 着衣室①

2010年10月

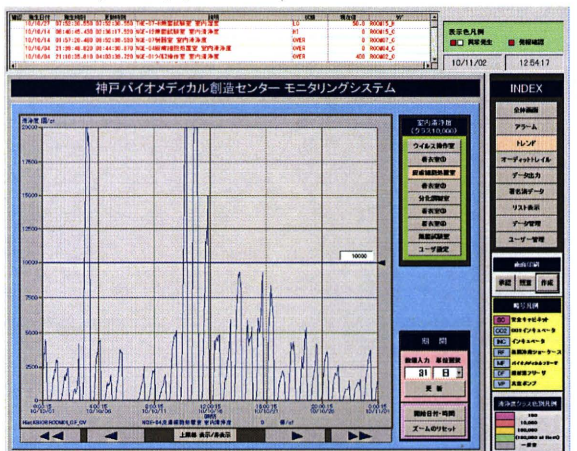


2011年3月

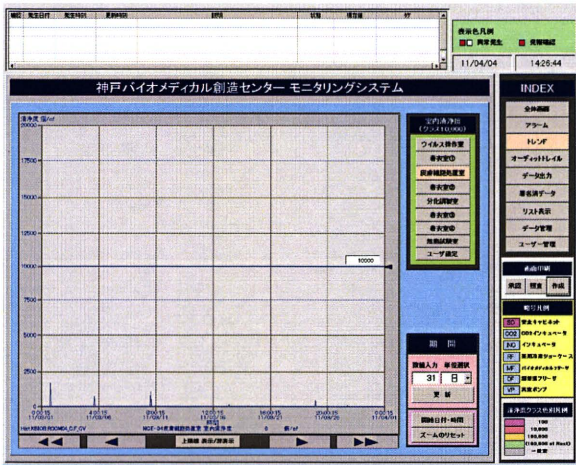


3. 皮膚細胞処置室

2010年10月

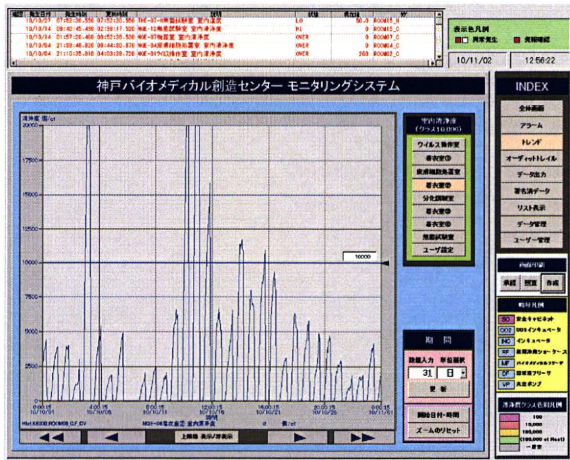


2011年3月

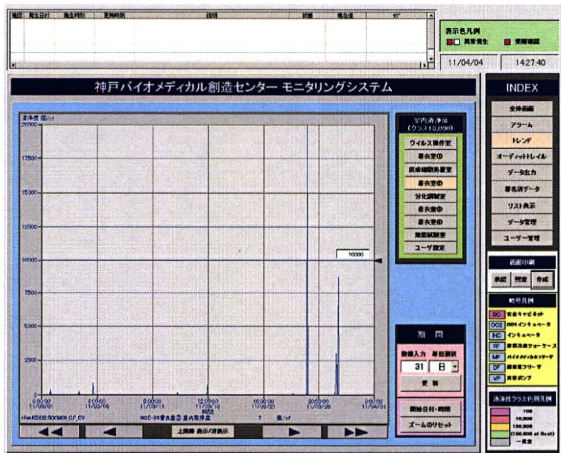


4. 着衣室②

2010年10月

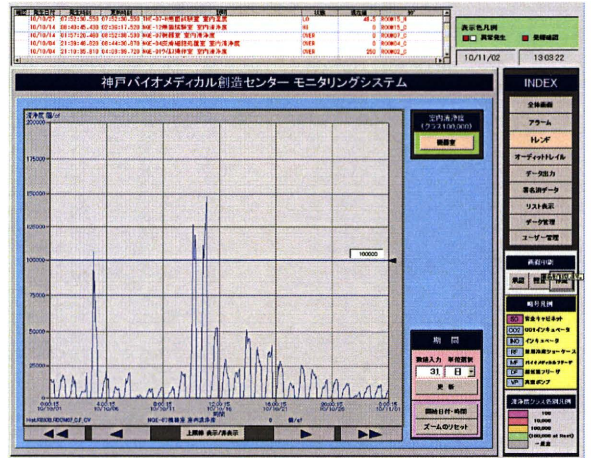


2011年3月



5. 機器室

2010年10月

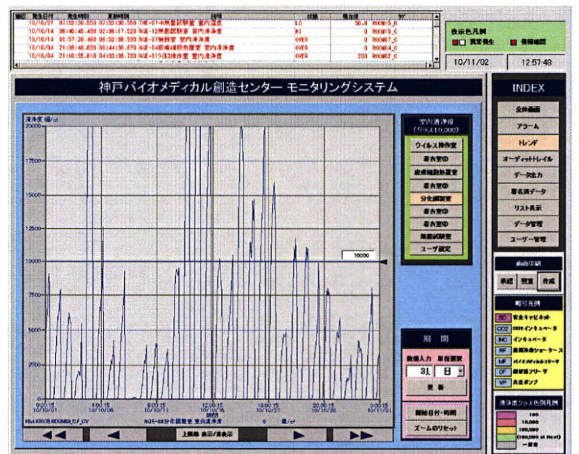


2011年3月



6. 分化調製室

2010年10月

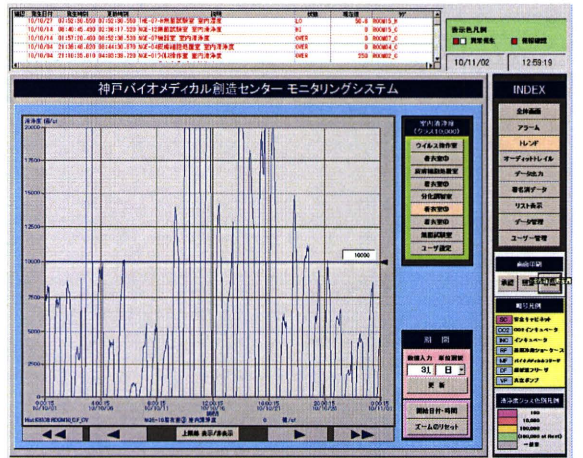


2011年3月



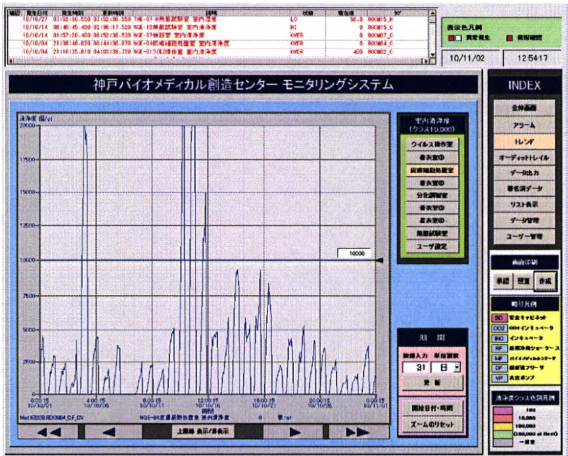
8. 着衣室③

2010年10月

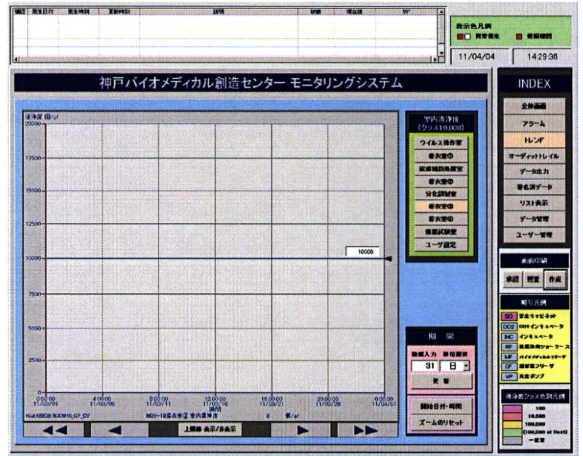


7. 皮膚細胞処置室

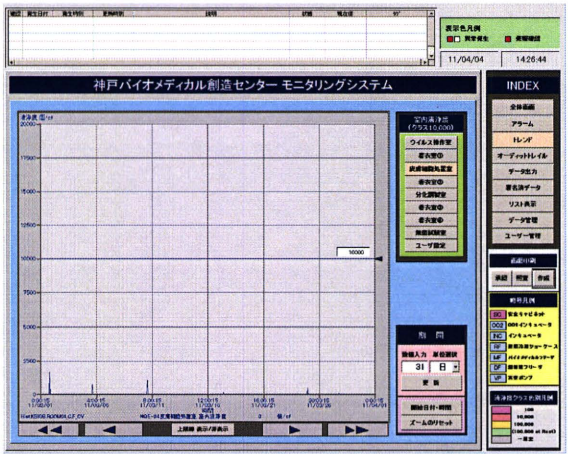
2010年10月



2011年3月

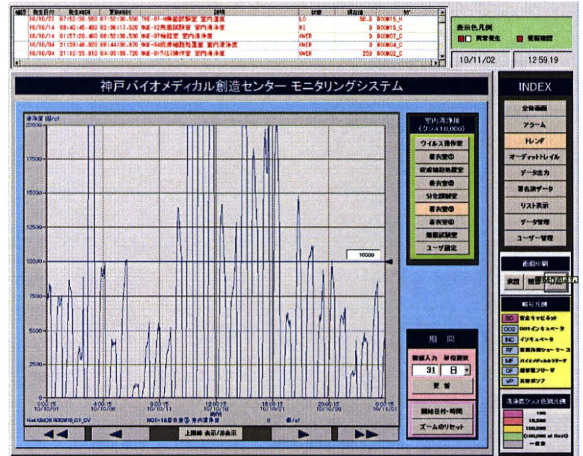


2011年3月



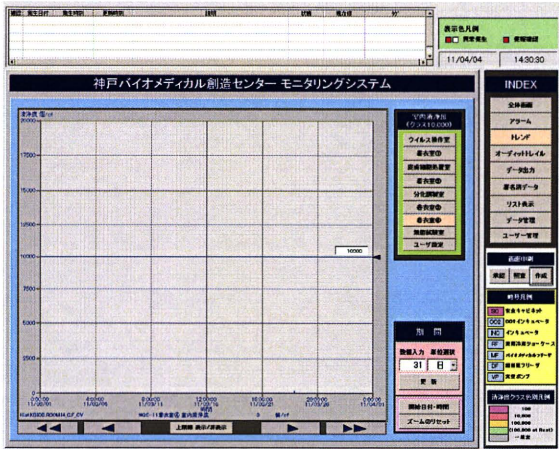
9. 着衣室④

2010年10月



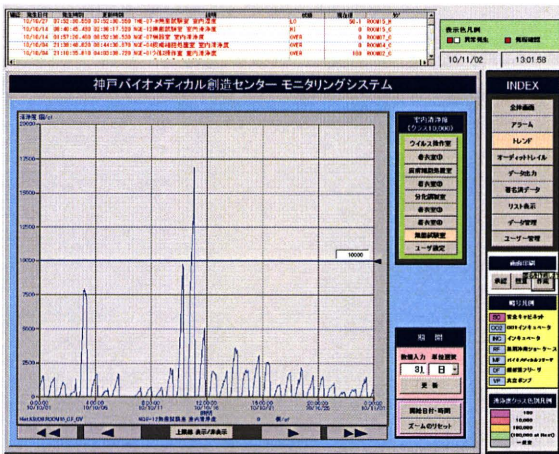


2011年3月

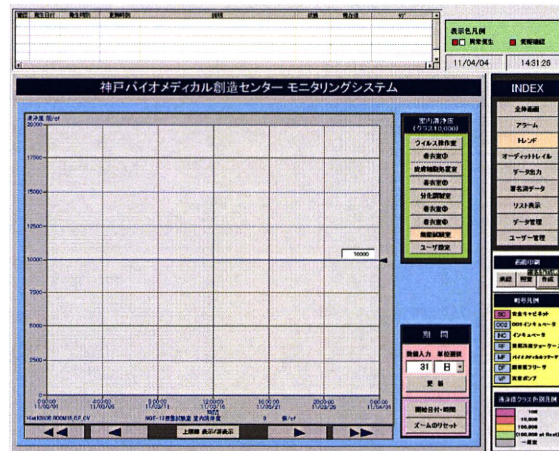


10. 無菌試験室

2010年10月



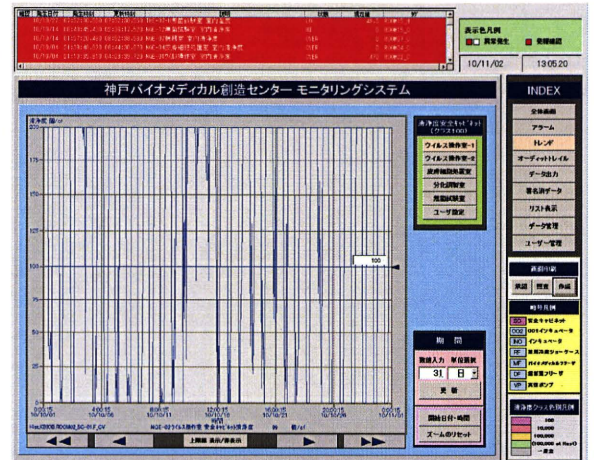
2011年3月



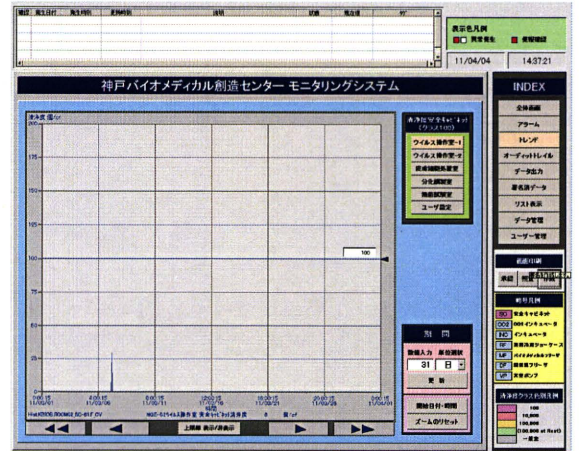
●安キャビ清浄度

1. ウィルス操作室①

2010年10月

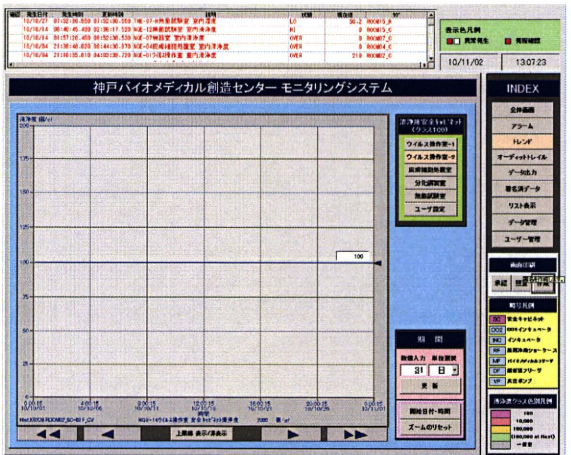


2011年3月



2. ウィルス操作室②

2010年10月



2011年3月

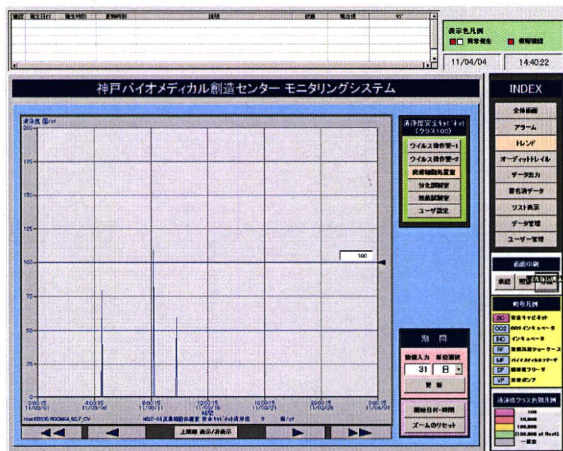


3. 皮膚細胞処置室

2010年10月

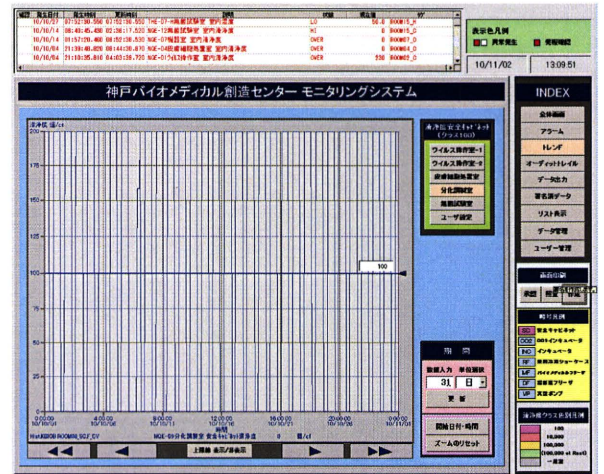


2011年3月



4. 分化調製室

2010年10月

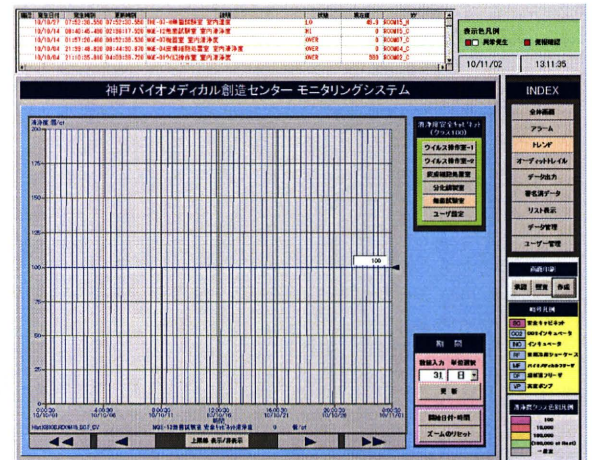


2011年3月

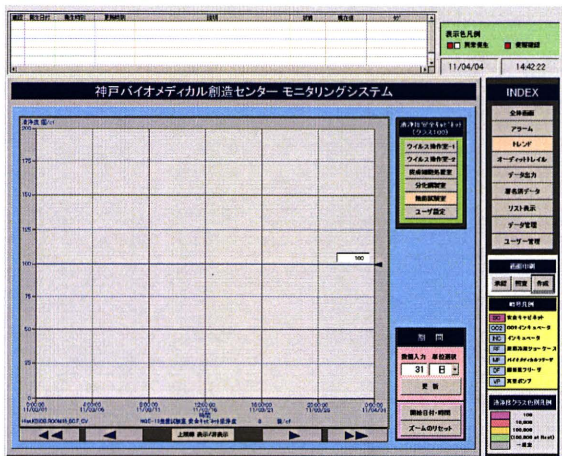


5. 無菌試験室

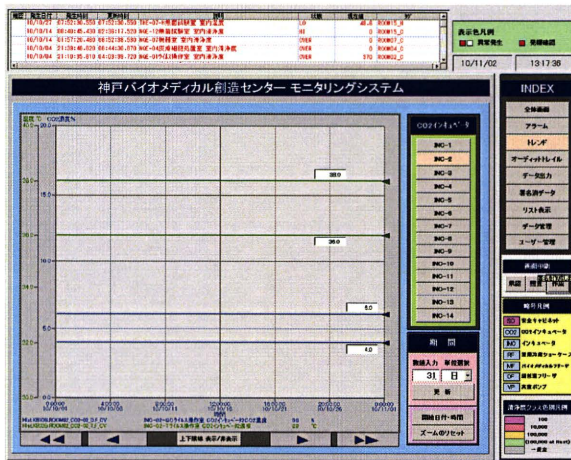
2010年10月



2011年3月

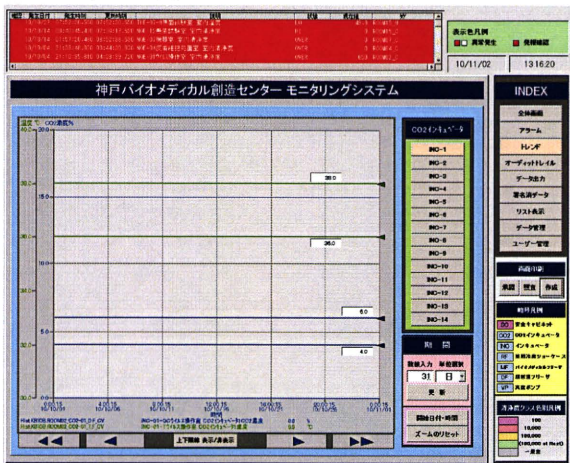


2. ウィルス操作室 INC②  
2010年10月



●CO2 インキュベーター (温度、CO2 濃度)

1. ウィルス操作室 INC①  
2010年10月

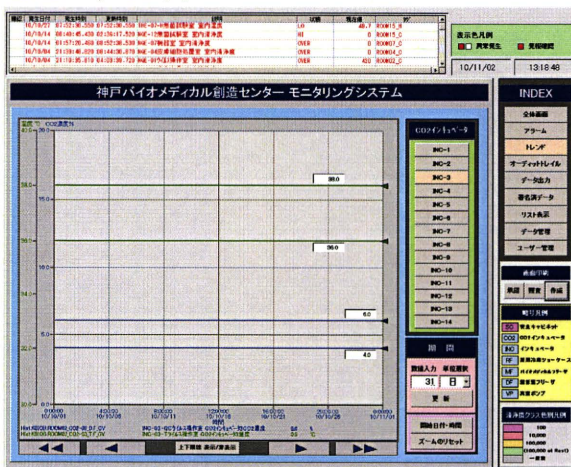
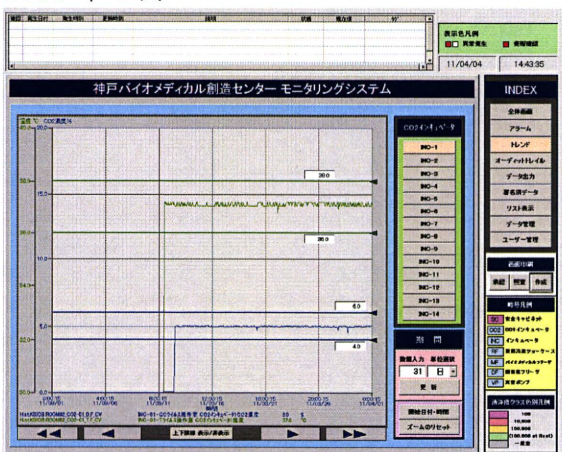


2011年3月



3. ウィルス操作室 INC③  
2010年10月

2011年3月

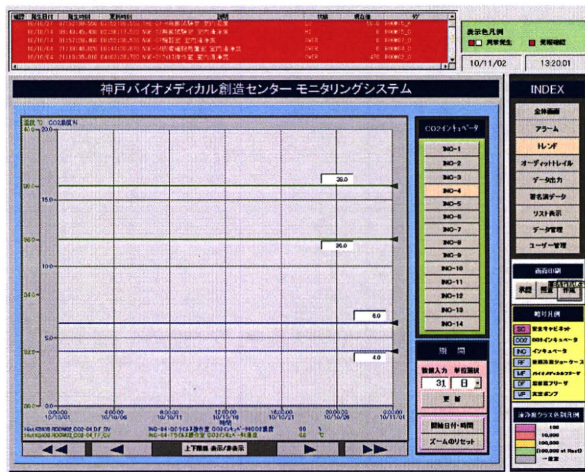


2011年3月



4. ウィルス操作室 INC④

2010年10月

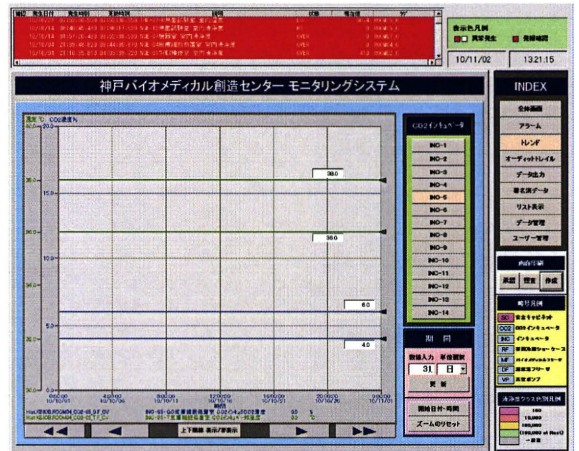


2011年3月



5. 皮膚細胞処置室 INC⑤

2010年10月



2011年3月



6. 皮膚細胞処置室 INC⑥

2010年10月

