

201106004A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 高橋 政代

平成24(2012)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 23 年度 総括研究報告書

研究代表者 高橋 政代

平成 24 (2012) 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		
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	7
空調システム等定期的再バリデーション手順書及び結果報告書	10

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が登場し、一部の症例では視力の回復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の発生を抑制するものの、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なことである。

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、現在培養に使用している培地などから、動物由来成分を除いた Xeno-free 培地に代替可能かどうかを検証し、さらに、その製造工程すべてを 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 において現在の iPS 細胞作製法や維持法、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、GMP 基準に準拠したヒト iPS 細胞由来網膜細胞用 CPC が整備されており、平成 23 年度は実際の臨床研究と同様の製造工程を検証する。また、同時に臨床応用のためのプロトコル及び標準作業手順書 (SOP) の確認を行い、完成を目指すものである。

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の発生を抑制するものの、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、視細胞変性を根本的に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, Hiram i 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動物への移植後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および安全性検証を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を基に、皮膚細胞からのiPS細胞作製、網膜色素上皮細胞の分化誘導、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を目指してきた。

これまで、iPS細胞の樹立・維持法、網膜色素上皮細胞の分化誘導法、およびこれらの細胞の培養方法が、「生物由来原料基準」「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」などの規制・指針に適合するよう検討を行った。

具体的には、iPSの樹立・維持に関してはレトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、プラスミドベクターの比較およびマウス細胞フィーダー、ヒト(自己線維芽細胞)フィーダー、フィーダーレス培養などの条件を比較検討した。

網膜色素上皮細胞の分化誘導法に関しては動物細胞の培養上清を使用するSDIA

(stromal cell derived inducing activity)法と動物細胞を使わないSFEB(Serum-free floating culture of embryoid bodies-like aggregates)法との比較を行い、これらの結果をもとに標準作業手順書を作成した。

また、実際の治療用の細胞を製造するための、ヒトiPS細胞由来網膜細胞専用のGMP準拠CPC施設が建設されたことにより、製造・品質・衛生管理基準書、上位手順書等のGMP文書の作成と、実態に則した運用の見直しを行い、運営体制を整えた。

さらにCPCを使用して、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、移植細胞の調製を行った。実際にCPCを使用することによって、具体的な手順を確認し、問題点を洗い出すことにより、作業手順書の作成作業を進めた。

さらに、決定した製造方法により製造した細胞を用い、造腫瘍性試験を中心とする非臨床安全性試験を実施した。

C. 研究結果

実際に CPC を使用し、具体的な手順を確認して問題点を洗い出すことにより、標準作業手順書を作成した。

各工程を繰り返すことにより、問題点を抽出し、培養プロトコル、標準作業手順書の改訂を行うことができ、臨床研究開始に必要な改訂と最適化を行うことが可能となった。

また、実際の臨床研究における細胞製造の体制を整えるために、CPC 施設の管理・運用の為に必要となる文書の整備（改訂）、細胞製品の品質及び安全性を確保するための人員の配置、役割の決定などの検討を重ねた。

さらに、CPC 施設の 24 時間稼働を開始するとともに、運用コスト削減のため、夜間、無人の際に外気導入量を減らして省エネルギーを図るよう、空調設備の工事を行った。また、空調システムの定期的再バリデーションを実施し、施設・設備が適切に稼働していることを確認した。

●CPC 施設管理・運用に関する文書

fRect-B-001 製造管理基準書（改訂）
fRect-B-002 品質管理基準書（改訂）
fRect-B-003 衛生管理基準書（改訂）

fRect-C-001 文書管理手順書（改訂）
fRect-C-002 逸脱管理手順書（改訂）
fRect-C-003 変更管理手順書（改訂）
fRect-C-004 バリデーション手順書（改訂）
fRect-C-005 ベリフィケーション手順書（改訂）
fRect-C-006 自己点検手順書（改訂）
fRect-C-007 教育訓練手順書（改訂）

これらの施設管理・運用に関する文書に基づき、ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞を

製造するための GMP 準拠 CPC の本格的な運用を開始することが可能となった。



写真) CPC における資材、原材料の管理



写真) CPC における細胞培養作業

平成 23 年 1 月より施設の 24 時間稼働を開始するとともに、今後の運用における光熱水費にかかるコスト削減のため、夜間、無人の際に外気導入量を減らして省エネルギーを図るよう、空調設備の工事を行った後、定期的再バリデーションを実施した（別添資料「空調システム等定期的再バリデーション手順書及び結果報告書」参照）。

この再バリデーションによるデータのみならず、細胞の製造管理・品質管理に関するデータ、施設運用に関するデータ等を今後も蓄積の上、総合的に解析し、平成 24 年度以降に実施予定である臨床研究へ向けた、GMP 準拠 CPC の本格運用及び網膜色素上皮細胞製造のための準備を万全にする。

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 の本格的な稼働を実施し、臨床試験に必要となる細胞培養の体制を整え、細胞製品の品質及び安全性を確保するための人員の配置、役割の決定、技術的、人的問題をほぼ解決し、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。

近年認可された薬剤についても新生血管の発生や伸展を抑制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。

本研究により、GMP 準拠の CPC において、実際の臨床応用のための製造工程を確立し SOP を作成することにより、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」による計画が可能となる。よって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するものである。

本研究により促進される、我々が計画している患者本人の iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植による臨床研究の実施は、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画期的な治療が誕生するだけでなく、世界に先駆けて行われる 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。

また、今後の再生医療研究開発における「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をはかる必要がある場合にも iPS 細胞の臨床応用を実際に検討している我々の研究成果が参考になると考える。

3. 今後の展望について

iPS 細胞の安全性が議論的となっているが、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についてその製造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、臨床における細胞の品質と安全性を確保することを目的とする。

また、その過程において再生医療における「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に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、現在は各研究機関に任されている CPC の運用基準について、その指針となる有益な情報の提供が可能になると考える。

E. 結論

今年度の研究は計画通りに遂行できたと考えるが、これまでの研究成果をもとに「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に適合する基準を満たした上で、コストと安全性の両面から適当と思われる方法を決定し、臨床試験プロトコルを作成する必要がある。

iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞移植による再生医療を一般的な治療として実用化するまでには数多くの解決すべき課題があり、さらなる試験研究が行われることになるが、日本発の iPS 細胞技術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。そのため、臨床試験に向けた関係機関間の連携体制の構築が急務となっている。

iPS 細胞を使った研究が基礎研究によるデータ集積で終わることなく、臨床試験及び治療を経て世界で通用する画期的な治療法となるためには、iPS 細胞に対する理解を深め、安全性と効果を知らしめる必要がある。

本研究により、これまで基礎研究として我々が行ってきた「細胞の培養」を、GMP 準拠の CPC において「細胞製剤の製造」として行う準備が整ったことは、臨床応用のための SOP 作成、手技・方法の確立だけでなく、細胞の品質と安全性の確保にもつながると考えられ、我々の基礎研究を実際の治療へと橋渡しする計画を加速するものとして多いに有益であった。

臨床研究を行う最初の対象疾患としては加齢黄斑変性を考えており、加齢黄斑変性は高齢者の視力低下の大きな原因の一つであるが、60 歳以上の 1% 近くという患者数に対し治療薬が 3 剤しか存在しないという unmet needs の大きな疾患である。認可された薬剤についても視力低下の原因の一部を解決するにとどまり、視力低下の主原因である網膜色素上皮萎縮に関しては無効であるので、根本的な治療法とはなり得ない。

iPS 細胞を使った研究や研究者を取り巻く環境に配慮するだけでなく、患者（国民）のニーズにあった治療法を確立することが我々研究者の第一の使命であると考えことから今後予定されている臨床試験の実施に向けて、関係機関との連携・協力は必至であり、臨床試験を推進し、支援する体制づくりが急務となっている。

先に述べたように、iPS 細胞を使った治療の研究開発においては iPS 細胞の安全性について議論されることが多く、常に ES 細胞と比較されているが、iPS 細胞は日本が生んだ技術であり、再生医療分野だけでなく iPS 細

胞に関する種々の産業化を視野に入れた場合には日本固有の財産となる試金石になり得る資源であり、資産でもある。

よって、この iPS 細胞に関するあらゆる技術開発を他国に追従するのではなく、日本がリーダーとなり、研究開発を牽引する必要がある。今後はその流れを堰き止めることのないよう、行政・研究機関・病院・患者（団体）とその支援者が一体となり、治療法確立の第一ステップとなる臨床試験の実施に向けた具体的な取り組みがなされることが、世界初・日本生まれの iPS 細胞を用いた治療法を成功させるカギとなることは間違いない。

改めて、ここで関係各者の協力と支援、理解を求め、成功への架け橋となっていたきたいと熱望する。

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（上位文書）
臨床研究対応

管理番号	文書名
fRect-B-001	製造管理基準書
fRect-B-002	品質管理基準書
fRect-B-003	衛生管理基準書
fRect-C-001	文書管理手順書
fRect-C-002	逸脱管理手順書
fRect-C-003	変更管理手順書
fRect-C-004	バリデーション手順書
fRect-C-005	ベリフィケーション手順書
fRect-C-006	自己点検手順書
fRect-C-007	教育訓練手順書

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

(内容非公開のため一部を除き項目のみ記載)

●衛生管理基準書（改定）

（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空調システム等定期的再バリデーション手順書（添付資料参照）
- ⑱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

- 製造管理基準書（改定）
- 品質管理基準書（改定）
- 文書管理手順書（改定）
- 逸脱管理手順書（改定）
- 変更管理手順書（改定）
- バリデーション手順書（改定）
- ベリフィケーション手順書（改定）
- 自己点検手順書（改定）
- 教育訓練手順書（改定）

空調システム等定期的再バリデーション 手順書及び結果報告書

1. 概要

2. 定期的再バリデーション要領

2-1. 実施項目

2-2. 標準手順書

3. 結果報告書（一部抜粋）

3-1. 自動制御機器キャリブレーション

3-2. 換気回数（風量）測定

3-3. 空間気流方向測定

3-4. 清浄度測定

3-5. 温湿度測定

1. 概要

1. 概要

1-1 適用

本実施作業標準手順書(バリデーション手順書)は、神戸バイオメディカル創造センター2階CPCエリアの「空調設備」に関する定期的バリデーションに適用する。

1-2 目的

当該設備が設定された仕様に適合して稼動する事を確認し、実施結果をまとめる。

1-3 対象項目

- 1) 自動制御機器キャリブレーション
- 2) 換気回数(風量)測定
- 3) 空間気流測定
- 4) 清浄度測定
- 5) 温湿度測定

1-4 バリデーションの実施期間

平成 24年 1月 16日 ~ 平成 23年 1月 27日までとする。

但し、(日)(祭日)は休み。

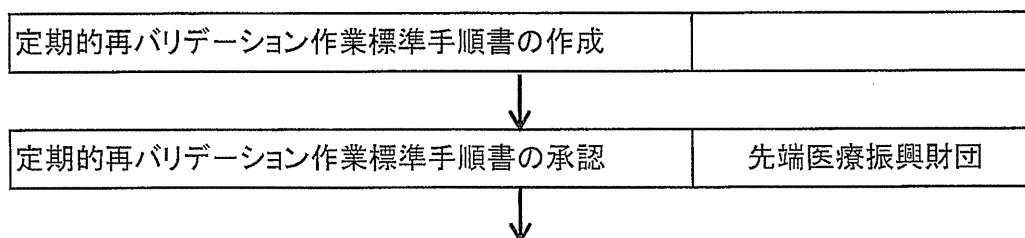
1-5 不具合時の対応

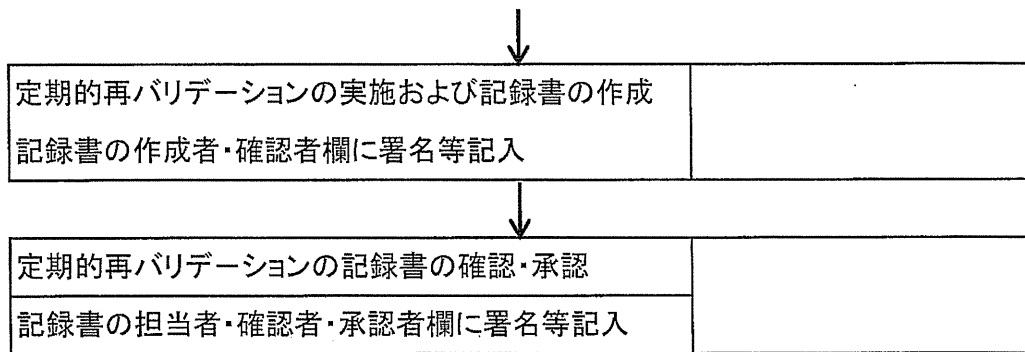
バリデーションの判定で「不適合」と判定された場合は、速やかに原因を調査し改善を図る。

また、改善によって設備およびシステムに変更が生じた場合は、先端医療振興財団バリデーション担当者との協議の上その内容を記録し承認を得、IQより再度バリデーションを行う。

1-6 バリデーション実施組織

本バリデーションの役務分担を以下に示す。





1-7 その他 注意事項

- ① CPC内はクリーンルームで、GMP規制を受けている環境である為、成り行きエリア入室時は無塵服
ヘアーキャップ、マスク、グローブを着用する。

- ② ウィルス操作室、皮膚細胞処理室、機器室、分化調製室、無菌試験室、着衣室は無菌衣及び
ヘアーキャップ、マスク、グローブ、無菌シューズカバーを着用する。