

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 疾患・組織別実用化研究拠点(拠点A) 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 視機能再生のための複合組織形成技術開発および臨床応用推進拠点
(英語) Research and development center for clinical application of complex tissue formation technologies to restore visual function

研究開発実施期間: 平成25年4月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 高橋 政代
(英語) Masayo Takahashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 地方独立行政法人 神戸市民病院機構 神戸市立神戸アイセンター病院 研究センター 顧問
(英語) Senior Adviser, Research center, Kobe City Eye Hospital

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

本課題においては治療法のない網膜変性疾患に対する iPS 細胞由来の細胞治療開発に取り組み、臨床研究を行い、さらにそのフィードバックを得てより標準的な治療を確立する道筋をつけることにより、再生医療の進展に貢献した。多くの網膜変性疾患は遺伝的および環境因子による視細胞や網膜色素上皮細胞の変性を原因とするものである。そこで当初の理化学研究所研究室、後半では神戸アイセンター病院を中心として理化学研究所、またビジョンケアグループと共同して、原因遺伝子およびその疾患経過の調査、移植による治療方法の開発および POC の獲得と臨床研究の実施、そして移植後の評価法としての臨床的な視機能検査方法の評価を行うなど、実用的かつ標準的な治療開発を目標に、総合的な視点でプロジェクトを進めてきた。また分担機関である京大ではより標準的な治療につながるような新たな平面状網膜オルガノイド分化方法を確立、ステージゲート3ではこの技術を臨床応用できるよう最適化することにより、製造効率を飛躍的に高めることができた。さらに有効性の高いゲノム編集技術を組み入れた臨床研究をこの課題終了後に予定している。また神戸医療産業都市推進機構ではヒトで初めてとなるオルガノイド移植臨床研究の安全性試験を行った。

理研/アイセンター (のちにビジョンケアも連携) ではまずステージゲート I において日本人再頻度 HLA 免疫型のホモ iPS 細胞株を用いて加齢黄斑変性に対する臨床研究を行い、iPS 細胞由来 HLA 適合移植においては免疫抑制剤の全身投与なしでも移植細胞が生着することを示した。また、この臨床研究を通して iPS 細胞由来細胞の品質管理や安全性を担保する方法について知見を得るとともに、移植後の拒絶反応のモニタリ

ングや対応方法についても検討した。続くステージゲート2では、網膜オルガノイドシート（視細胞シート）移植の前臨床研究を行い、有効性を検証し、ヒトで世界初となる網膜オルガノイド移植臨床研究に着手した。また患者を選択する上で必要となる遺伝子診断も積極的に行い、その病態や予後についての理解を深めた。ステージゲート3では網膜オルガノイド移植臨床研究の安全性を確認し、拒絶モニタリング方法についても企業導出を前提に完成した。また、初期の再生医療での治療対象となるような、特に数値にならない視力での視機能検査について、コントロールデータを収集解析し、臨床研究の評価においても応用した。これまでの網膜色素上皮細胞、および視細胞の移植において、iPS細胞由来細胞/組織を用いた細胞治療が安全に行うことを示し、さらにステージゲート3では今後これらの治療をより汎用性の高い治療とするために、分化効率の改善に成功した。視細胞移植については平面状オルガノイド分化方法を最適化し、品質管理方法を設定したほか、網膜色素上皮細胞についても紐状凝集紐の移植が安全に効率よく投与できることを確認し、今後の複合移植を進める準備材料を得た。また、視細胞についてはより高い有効性が期待できるゲノム編集株の臨床株ストックを現在作成中であり、次のステップである投与量の増加による有効性評価の臨床研究の準備を進めている。

分担機関である京大では視細胞移植の標準治療化と高度化のための研究開発を行い、ヒトでのPOC獲得を目的とした初段階の臨床試験の次の段階での「標準治療化のための知見」につがなげることが目的として、新たなヒト網膜シート誘導技術および品質管理技術の開発を行った。これまでの自己組織化的に多能性幹細胞から立体組織を誘導する網膜オルガノイド技術の開発成果を踏まえて、より効果的、効率的な一般治療化を目指して、これまでと異なるアプローチで新たな移植網膜調整技術の確立を目指した。まず、組織の大型化を達成するために、平面網膜シートをヒト多能性幹細胞から誘導する新たな分化誘導法を確立し、5cmを超える直径を持つ均一な網膜シートを安定的に誘導することに成功した。本手法で誘導した網膜シートは移植による機能試験においても既存のオルガノイド法と同様の性能を示すことが確認できた。また、網膜の背腹軸制御シグナルを制御することで視細胞サブタイプの制御を行えることを示した。これらの研究により、より治療効果が高く、安全な移植用大型網膜シートをヒト多能性幹細胞から安定的に誘導し、品質管理を行うための基盤技術を確立することに成功した。本研究により開発した網膜シート誘導法は既存の自動培養装置による培地交換のみで多能性幹細胞から直接網膜シートを誘導可能であることから、これまでのオルガノイド法では難しかった安定的な自動製造の道を開いたことは産業化に向けても大きな意味を持つ。また、作成した網膜シートの誘導効率を定量的に推測できる画像判別アルゴリズムの開発に成功し、非染色で誘導した網膜シートの品質管理を可能にした。さらに、もう網膜シートを張り合わせるためのハイドロゲル材料の開発に成功し、網膜・色素上皮複合シートの作成が可能であることを示した。

また、神戸医療産業都市推進機構では、理化学研究所及び地方独立行政法人神戸市民病院機構神戸市立神戸アイセンター病院で実施される細胞調製技術開発や前臨床研究と並行して、安全性検証や規制適応化、臨床試験実施体制などの整備を進め、視細胞移植の臨床応用への技術整備を行った。特に、臨床研究申請のための、信頼性の高い非臨床安全性試験（造腫瘍性試験等）を実施することを目的としており、下記についての試験を実施した。ステージゲート1においては網膜色素上皮細胞、ステージゲート2では網膜オルガノイドの造腫瘍性試験を実施した。

- ① 臨床試験での安全性・拒絶反応等の詳細解析
臨床用ヒト iPS 細胞由来視細胞の in vivo 造腫瘍性試験の実施及び報告書の作成
- ② 神経網膜組織調製方の高度化及び臨床グレード化
臨床用ヒト iPS 細胞由来視細胞の品質管理試験（無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験）の実施

①ヒト iPS 細胞 (QHJI01s01 株及び QHJI01s04 株) 由来網膜色素上皮細胞 (RPE) の造腫瘍性試験として RPE を網膜下移植したヌードラットを用いて試験を実施した。観察及び検査として、組織標本切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色と抗体染色による評価を行った。脳、下垂体、甲状腺、肝臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、皮膚・乳腺、脊髄においてはヒト細胞核特異的抗体で移植したヒト細胞の生着を検出する抗 Lamin A+C 抗体及び、細胞周期関連核タンパク質で細胞増殖マーカーとして用いられる抗 Ki67 抗体の 2 重蛍光免疫染色を行った。また、肺、心臓、顎下腺、大腿骨、胸骨、脊柱においては蛍光免疫染色で非特異的なバックグラウンドが高かったため、ヒト細胞核を検出する抗 Ku80 抗体、細胞増殖マーカー抗 Ki67 抗体を用いた DAB 発色による免疫染色を行った。その結果、全ての組織においてヒト細胞は認められなかった。これらの結果からヒト iPS 細胞 (QHJI01s01 株及び QHJI01s04 株) 由来 RPE の転移能及び、腫瘍形成能は極めて低いと考えられた。蛍光免疫染色の結果、被験細胞移植群において、Ku80 陽性細胞中の Ki-67 陽性の割合は、いずれの個体においても 1%未満であった。

上記のことから、網膜シートの評価として、OCT 検査、病理組織学的検査 (ヘマトキシリン・エオジン染色、蛍光免疫染色) は妥当な方法であり、評価方法の適格性についても問題ないと判断した。また、13 週観察時では被験細胞に関連する変化は眼球に認められず、増殖性のマーカーである Ki-67 の陽性率も低いことから被験細胞の増殖性は低いと考えられた。

上記の予備検討試験結果から評価方法の適格性が確認されたため、ヒト iPS 細胞由来網膜シートの造腫瘍性リスクを評価することを目的として、ヌードラットに単回網膜下移植し、26、52 及び 78 週間観察した。観察及び検査として、一般状態観察、体重測定、移植後及び剖検前の OCT 検査、剖検並びに病理組織学的検査 (ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫蛍光染色) 等を実施した。免疫蛍光染色では増殖性を評価するマーカーとして Ki-67 等の染色を行い、評価した。

OCT 検査結果より網膜下に被験細胞が移植され、観察期間を通して生着していることが確認された。病理組織学的検査 (ヘマトキシリン・エオジン染色) では、被験細胞群において、網膜の移植細胞が外顆粒層ないし、内顆粒層と色素上皮層の間に認められた。免疫蛍光染色の結果、被験細胞群において、Ku80 陽性細胞中の Ki-67 陽性の割合は、いずれの個体においても 1%未満 (平均 Ki-67 陽性率: 26 週間観察 0.36%、52 週間観察 0.10%、78 週間観察 0.66%) であった。また、その他のマーカーを用いた免疫染色結果から、被験細胞が生着し、ヒト視細胞やヒト双極細胞へと分化・成熟したと考えられた。

上記のことから、26、52 及び 78 週間の観察で、被験細胞に関連する変化は眼球やその他の器官・組織には認められず、増殖性のマーカーである Ki-67 の被験細胞の陽性率も低いことから、本試験条件下において被験細胞の造腫瘍性リスクはないと考えられた。

②臨床用ヒト iPS 細胞由来視細胞の品質管理試験 (無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験) の実施を行った。品質管理試験は第 17 改正 日本薬局方あるいは日本薬局方 参考情報に記載された試験方法に従って実施し、無菌試験は試験試料の形状 (培養上清、細胞等) に応じてメンブランフィルター法か直接法を選択して行った。エンドトキシン試験はカイネティック比色法を、マイコプラズマ否定試験は核酸増幅法 (NAT 法) を用いて試験を行った。

全ての試験において試験試料を用いた適合性試験を実施した。無菌試験においては微生物に対して抗菌活性を有していないかもしくは十分に抗菌活性が除去されていることを、エンドトキシン試験においてはライセート試薬の反応を干渉する因子を有しているかを、マイコプラズマ否定試験においては PCR 反応及びマイコプラズマ菌株に対して阻害因子を有しているかを適合性試験で確認し、試験試料に対する各試験の試験条件を決定した。

決定した試験条件のもと実施した全ての試験において、試験試料は規格に適合した。

その他、従来の試験方法に加えて Audit Trail 機能を有した機器での測定への切り替えに応じて適格性評価試験を実施した。無菌試験は微生物迅速試験を適応し、ガス測定法での試験条件の検討を行った。

エンドトキシン試験及びマイコプラズマ否定試験は試験キットの切り替えを行った。切り替えたキットは日本薬局方に適合したものであり、従来品と比較して測定範囲（感度）が同等以上であるものを採用したため、試験結果に対するリスク（感度の低下や擬陽性及び偽陽性）については問題ないと判断した。追加した試験方法及び試験キットの変更による試験結果への影響はなく、検体は規格に適合した。

In this project, we worked on the development of cell therapy using induced pluripotent stem cells (iPSCs) for retinal degenerative diseases, for which there is currently no treatment available. Through preparing and conducting clinical research and obtaining feedback, we have been able to establish a roadmap towards establishing more standardized treatments, thereby contributing to the progress of regenerative medicine. We obtained proof of concept (POC) data, confirmed safety, and conducted safety tests for organoid transplantation in humans for the first time. We also studied causal genes and disease progression and exploratorily adopted clinical visual function tests as evaluation methods before and after transplantation. We thereby advanced the overall project from a comprehensive perspective with the aim of practical and standardized treatment development. Additionally, during the collaborative period at Kyoto University, we established a new planar retinal organoid differentiation method that could lead to more standardized treatments. Preclinical safety tests were conducted by the Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe (FBRI) as described below.

At RIKEN/Kobe City Eye Hospital (Vision Care Co. joined later), by the exit of Stage Gate 1, we conducted clinical research on age-related macular degeneration using the RPE cells derived from homozygous iPSC cell lines with the most frequent HLA type in Japan. We demonstrated that transplanted RPE cells could engraft without systemic administration of immunosuppressive agents in iPSC-derived HLA-matched transplantation. We also established monitoring system for post-transplantation rejection. In Stage Gate 2, we conducted preclinical research on retinal organoid sheet transplantation to validate its effectiveness and started on the world's first clinical research on retinal organoid transplantation in humans. We conducted genetic diagnostics necessary for selecting patients and deepened our understanding of the disease state and prognosis. In Stage Gate 3, we confirmed the safety of retinal organoid transplantation in our clinical study and completed the rejection monitoring methods for technical transfer. We further improved the differentiation efficiency to make these treatments more versatile by optimized the planar organoid differentiation method, improved quality control methods, and we also developed an efficient way to deliver strip form RPE aggregates to the target area. Furthermore, we collected and analyzed control data for visual function tests for low-vision patients, which we applied in the evaluation of clinical research. We are currently creating genome-edited clinical cell line stocks for higher functional integration for clinical research to evaluate efficacy through increased dosage, which is the next step.

At Kyoto University, Dr. Eiraku succeeded in stably inducing uniform retinal sheets with a diameter exceeding 5 cm, which show the same performance as the existing organoid method in functional tests by transplantation. This method can utilize existing automated culture equipment and has opened the way for stable automated production, which has been difficult with the conventional organoid method, and is of great significance for industrialization. Also, an image discrimination algorithm can quantitatively estimate the induced retinal sheets' induction efficiency, enabling quality control of non-stained retinal sheets. He also showed that photoreceptor subtypes can be controlled by regulating dorsoventral axis control signals in the retina. Furthermore, he succeeded in developing a hydrogel material for laminating retinal sheets and demonstrated that preparing a retinal/pigment epithelium composite sheet is possible.

At FBRI, Dr. Kawamata established a protocol of safety and tumorigenicity test for clinical application, and conducted preclinical safety studies for RPE and retinal organoids to show that they have no tumorigenic risk under the conditions of this study. He also conducted Quality control tests (sterility test, endotoxin test, mycoplasma negativity test) on human iPS cell-derived retinal cells for clinical use.