

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：iPS 細胞を用いた角膜再生治療法の開発
2. 研究開発代表者：西田 幸二（大阪大学 大学院医学系研究科）
3. 研究開発の成果

角膜上皮再生については、昨年度までに臨床用 SOP を確立することに成功している。本年度においては非臨床試験用 iPS 細胞株を用いた培養角膜上皮細胞シートの作製を行い、臨床試験申請用データ取得を目的とした、品質評価試験および非臨床安全性・有効性試験（①未分化細胞の残留評価試験、②増殖特性解析、③核型解析、④造腫瘍試験（免疫不全マウス）、⑤眼局所安全性試験、⑥有効性試験）を実施した。①*LIN28A* の digital-PCR 法による残留評価試験の結果、最終製品であるヒト iPS 細胞由来角膜上皮細胞には未分化 iPS 細胞の残留は殆ど無いと考えられた。多能性幹細胞培養培地での長期間培養においても増幅するコロニーは認められなかった。②連続継代法による増殖特性解析の結果、最終製品由来細胞の増殖能は有限であり、継代中に無限増殖能を獲得する細胞は認められなかった。④免疫不全マウスへの皮下注入移植法を用いた造腫瘍性試験の結果、長期間観察においても腫瘍形成は見られなかった。⑤眼局所におけるシート移植の安全性については移植後 3 週間では異常等は認められず、⑥有効性については移植群においては、眼表面がヒト iPS 細胞由来角膜上皮細胞で被覆され、かつ、バリア機能の改善が認められた。さらに他家同種 iPS 細胞を用いた再生治療法の開発のために、CiRA より供給を受けた HLA-ホモ接合体 iPS 細胞株について角膜上皮細胞への分化のスクリーニングを開始した。また、臨床試験を開始するための準備として、臨床仕様セルソーターの試運転を行い、従来の機器と同様に角膜上皮細胞が単離可能であることを確認した。一方で、CPC 内への設置に伴い発生する発塵の問題を解決するための具体的な対策も検討した。また、CPC 内での培養士の育成、各種ドキュメント作成、患者レジストリ作成準備等を行った。

角膜内皮再生については、昨年度までの検討において、ヒト iPS 細胞から誘導した角膜内皮様細胞は、サルを用いた検討において十分な効果を示すものの、細胞の形態が不均一となり、EMT を起こし易いことが問題であった。したがって、今年度は引き続き、EMT 阻止、未分化細胞の除去や角膜内皮細胞の純化のために製造方法を改良し、非臨床試験を順次実施した。まず、従来の誘導の方法の延長として、①培養法の改良、②純化法の改良を行った。その結果、新規無血清培地を用いることで、シングルセルから角膜内皮前駆細胞形態を維持しながら、効率的に増殖させることが可能となり、さらに、新規表面マーカーを用いた細胞純化により、EMT マーカー発現を抑制し、未分化細胞の混入についても、*LIN28A* 発現値として 100 分の 1 以下に減少可能であった。しかしながら、角膜内皮においては依然決定的な選択的マーカーが存在しておらず、最終製品の角膜内皮の質について本質的な解決策が見出せていないのが現状である。そこで、従来法の改良と平行して、新たに我々が開発した SEAM 法に基づき、角膜内皮分化への誘導方法に最適化を行った。SEAM 法においては前眼部から後眼部までの細胞が、同心円状に規則正しく発生するが、角膜内皮の原基である、眼周囲神経堤細胞についても妥当な部位に誘導することが可能であった。本手法で誘導された角膜内皮細胞は生理的な発生を高度に模倣していると考えられ、このことにより EMT の抑制に繋がることが期待される。さらに、この方法を用いて、実際に臨床で使用する HLA ホモ接合体 iPS 細胞株を用いて角膜内皮細胞への分化誘導を開始した。