

平成 29年 5月 30日

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 再生医療実現化ネットワークプログラム再生医療の実現化ハイウェイ事業
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
Highway Program for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名 : (日本語) iPS細胞を用いた角膜再生治療法の開発
(英語) Development of corneal regenerative treatment methods using iPS
cells

研究開発担当者 (日本語) 西田 幸二 大阪大学大学院医学系研究科 教授

所属役職氏名 : (英語) Kohji Nishida, Professor, Graduate School of Medicine, Osaka
University

実施期間 : 平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

「和文」

本事業では、ヒト iPS 細胞を用いた角膜上皮および角膜内皮再生治療法の開発を実施している。本年度は、①角膜上皮再生領域では、主に、最終製品であるヒト iPS 細胞由来角膜上皮細胞シートの品質・安全性評価試験の実施、他家 iPS 細胞の利用可能性に関する検討および臨床試験準備を、②角膜内皮再生領域では、角膜内皮誘導条件の最適化およびヒト iPS 細胞から誘導した細胞の安全性を中心とした非臨床試験を実施した。

①角膜上皮再生

1. ヒト iPS 細胞由来培養角膜上皮細胞シートの品質・安全性評価試験の実施

臨床用製造 SOP を用いて作製した前臨床試験用ヒト iPS 細胞由来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の取得を目的とした、品質評価試験および前臨床安全性・有効性試験（未分化 iPS 細胞の残留評価試験、増殖特性解析、核型解析、造腫瘍試験、有効性試験等）を実施し、申請用データを取得した。

2. 他家同種 HLA ホモ接合体 iPS 細胞の利用可能性に関する検討

昨年度より進めていた京都大学 CiRA より供給されている、臨床用 HLA ホモ iPS 細胞株のスクリーニングを実施した結果、角膜分化が良好な HLA ホモ iPS 細胞株を選定することに成功した。

同種他家 iPS 細胞の利用可能性の検討のために、サルを用いた動物実験系の構築を行っている（滋賀医大・小笠原、東海大学・椎名らと共同）。本年度は、これまでに報告例のなかったサル角膜上皮幹細胞疲弊症モデルを作製し、安定した培養角膜上皮細胞シート移植系を確立することに成功した。さらに、MHC 適合・非適合のサルへの他家培養角膜上皮細胞シート移植を実施し、拒絶反応の有無について詳細に解析中である。

3. ヒト iPS 細胞由来培養角膜上皮細胞シートの臨床試験準備

細胞培養加工施設（CPC）で臨床研究用試験物を製造する担当者のトレーニングを開始した。さらに製造手順すり合わせにあたって、施設管理者・製造担当者と共に協議することで CPC における業務の組立てを共有し、適宜製造手順の改善に対応できる体制を構築した。また、本試験物製造の細胞純化工程に用いる臨床用セルソーターの CPC 内での試運転を実施した。その結果、稼働に向けた問題を解決するために追加工事等を施工することで、運用可能な状態にすることが出来た。

②角膜内皮再生

4. ヒト iPS 細胞由来角膜内皮細胞の製造法の最適化と SOP 化

今回、角膜上皮分化に使用している SEAM 法に基づき、神経堤、眼周囲神経堤および角膜内皮発生を模倣した新たな分化誘導法を開発した。マーカーについては、従来進めていた角膜内皮特異的細胞表面マーカーに対する新規モノクローナル抗体を作製（ハイブリドーマとして入手）し、製造工程への導入を検討した。また、角膜上皮と同様に、京都大学 CiRA 提供の臨床用 HLA-ホモ iPS 細胞を用いて、角膜内皮分化誘導のスクリーニングを実施した。

5. ヒト iPS 細胞由来角膜内皮細胞の非臨床試験

SEAM 法を用いた新たな誘導法と新規マーカーの使用により、細胞形態の明らかな改善を得るとともに EMT マーカーの発現レベルの減少を認めた。また、分化誘導過程における未分化細胞混入の検討として、*LIN28A* のデジタル q-PCR を用いた検討を行ったところ、分化誘導の途中段階（純化前）においても *LIN28A* 発現はほぼ消失していた。このことから今後どの純化方法を採用したと

しても、未分化細胞の混入は問題にならない程度であることが確認できた。さらに、iPS細胞より誘導した眼周囲神経堤細胞をさらに分化誘導した細胞を用いて、増殖特性解析を実施した。増幅させた細胞の一部を、免疫不全マウスへの皮下に移植し、その造腫瘍性についても検討している。

「英文」

In this project, we aim to develop a therapy for corneal epithelium and corneal endothelium regeneration, using human iPS cells. In this fiscal year, 1) Corneal epithelial regeneration: we conducted quality and safety evaluation tests for the corneal epithelial cell sheet derived from iPS cells, and screened for allogeneic HLA-homozygous iPS cells and prepared a setup for clinical study; 2) Corneal endothelial regeneration: we conducted a pre-clinical study focusing on optimizing the cell culture conditions for corneal endothelial induction and examined the safety of iPS cell derived-corneal endothelium.

1). Quality and safety evaluation tests of the corneal epithelial cell sheet-derived from human iPS cells

Human iPS cell-derived corneal epithelial cell sheets for preclinical examination were manufactured based on the SOP for actual clinical use. We then performed quality assessment tests and preclinical safety and efficacy tests such as proliferation analysis, karyotype analysis, and tumor formation assay to obtain the application data for a clinical study.

2). Study on the availability of HLA-homozygous iPS cells

Upon screening the clinical HLA-homozygous iPS cell line supplied by CiRA of Kyoto University, we have succeeded in selecting a HLA-homozygous iPS cell line with good corneal differentiation ability. To investigate the availability of allogeneic iPS cells, we also performed animal experiments using monkeys (in collaboration with Dr. Ogasawara of Shiga Medical University and Dr. Shiina of Tokai University). In this fiscal year, we succeeded in establishing a monkey model of corneal epithelial stem cell deficiency and a stable system for corneal epithelial cell sheet transplantation. Furthermore, we transplanted MHC-compatible and incompatible monkey corneal epithelial cell sheets to the eyes of the diseased monkey model and a detailed analysis of the presence or absence of immune-rejection is ongoing.

3). Preparation for the clinical study of human iPS derived-corneal epithelial cell sheet transplantation

We have started training the technical staff that is responsible for cell sheet manufacturing for the actual clinical study at the Cell Processing Center (CPC). Moreover, by consulting the facility managers and manufacturing staff, we have shared the assembly of the work in CPC and established a system to respond to the improvement of manufacturing procedures. In addition, we have started a trial operation of the cell sorter used in the cell purification step in CPC, and solved the problems encountered. After the trial operation, the cell sorter has been successfully operable in CPC.

4). Optimization of manufacturing procedures for human iPS cell-derived corneal endothelial cells

To date, the corneal endothelium differentiation lineage and its specific markers are unclear. In addition, corneal endothelial-like cells induced by conventional differentiation methods showed effectiveness in animal experiments, but problems such as EMT and cell purity were encountered. In

this study, we developed a novel SEAM-based differentiation method that mimics the neural crest, periocular neural crest, and corneal endothelial development. Regarding the marker, we have developed a novel monoclonal antibody against the corneal endothelial specific cell surface marker and obtained its hybridoma. We are planning to introduce the antibody in the manufacturing process. Moreover, as is the case for corneal epithelial cell induction, we have screened for corneal endothelial cell induction using clinical HLA-homo iPS cell lines provided by CiRA of Kyoto University.

5). Pre-clinical study of corneal endothelial cells-derived from human iPS cells

Using the novel SEAM-based induction method and the novel marker, a remarkable improvement in cell morphology and decreased mRNA expression of EMT markers was achieved. In addition, we investigated the contamination of undifferentiated cells in the products by digital q-PCR analysis for LIN28A. The expression of LIN28A was found to have disappeared even in the intermediate products before purification. From this fact, it was confirmed that contamination of undifferentiated cells is not a problem; however, a purification method is still adopted in the current manufacturing process. Furthermore, we performed a proliferation assay and tumor formation assay using the cells induced from the iPS cells-derived periocular neural crest cells.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 4 件、国際誌 1 件）

1. Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, Sasamoto Y, Taniwaki Y, Takayanagi H, Tsujikawa M, Sekiguchi K, Quantock AJ, Nishida K. Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. Nat Protoc. 2017 Apr;12(4):683-696.
2. 林竜平, 「ヒト iPS 細胞からの協調的な眼組織発生と角膜機能の回復」, 日本眼科学会誌 2016 年, 120, p552.
3. 林竜平、西田幸二, 「眼オルガノイドー多能性幹細胞を用いた眼発生と再生医療への応用ー」, 実験医学増刊, 2016 年 10 月, vol.34, No.17, p2878-2883.
4. 林竜平、西田幸二, 「iPS 細胞による角膜上皮組織の再生」, 日本の眼科 2016 年, 87:7 号 p5-6.
5. 林竜平、西田幸二, 「iPS 細胞を用いた角膜上皮の再生」, 月刊糖尿病, 2016 年, vol.8 No.6 p68-74.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Development of stem cell-based therapy for corneal diseases-from tissue stem cell to iPS cell, 口演, 西田幸二, 人工角膜学会, 2016/4/22, 海外
2. Current and Future Corneal Stem Cell-Based Therapy, 口演, 西田幸二, Chinese Cornea Society Congress, 2016/5/13, 海外
3. 眼と iPS 細胞の未来, 口演, 西田幸二, 第 9 回 TORC の会, 2016/6/25, 国内
4. Current and Future Corneal Stem Cell-Based Therapy, 口演, 西田幸二, Congress of Chinese Ophthalmological Society 2016/9/8, 海外
5. Development of Stem Cell-based Therapy for Corneal Diseases-from Tissue Stem Cell to iPS Cell, 口演, 西田幸二, ISER2016, 2016/9/28, 海外
6. 眼と iPS 細胞の未来, 口演, 西田幸二, 第 37 回西中国眼疾患フォーラム, 2016/11/10, 国内
7. iPSC Cells for Corneal Epithelial Regeneration, 口演, 西田幸二, Asia-Pacific Academy of Ophthalmology, 2016/ 3/4, 海外
8. Induction of Corneal Epithelial Cells from Human Pluripotent Stem Cells by a Method Based on Spontaneous Ocular Cell Differentiation, ポスター, Ryuhei Hayashi, Yuki Ishikawa, Yuzuru Sasamoto, Ryosuke Katori, Tatsuya Ichikawa, Naoki Nomura, Takeshi Soma, Satoshi Kawasaki, Andrew J Quantock, Kiyotoshi Sekiguchi, Motokazu Tsujikawa, and Kohji Nishida, ISSCR, 2016/6/23, 海外
9. Tropic Effect of Mesenchymal Stem Cells Attenuates TGF-beta1-induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Corneal Limbal Epithelial Cells, ポスター, Shun Shibata, Toru Okubo, Ryuhei Hayashi, Yoichi Honma, Kohji Nishida, ISSCR, 2016/6/23, 海外

10. ヒト iPS 細胞からの協調的な眼組織発生と角膜再生医療への応用, 口演, 林竜平, 産学連携蛋白質研究所セミナー, 2016/6/2, 国内
11. ヒト iPS 細胞からの協調的な眼組織発生と角膜再生医療への応用, 口頭, 林竜平, 第 23 回眼科若手研究者の会 2016/11/4, 国内
12. ヒト iPS 細胞由来角膜上皮細胞の長期間培養, ポスター, 石川幸, 林竜平, 香取良祐, 佐々本弦, 辻川元一, 西田幸二 角膜カンファレンス, 2017/2/16, 国内
13. 多能性幹細胞を用いた眼組織分化誘導技術の開発と角膜再生医療への実用化, 口頭, 林竜平, 2017 再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内
14. ヒト iPS 細胞由来角膜上皮細胞シート臨床応用のための試験物製造体制の整備, ポスター, 高柳泰, 香取良祐, 山手百合香, 安川裕子, 石川幸, 小林由紀, 森田未央, 片山朋彦, 林竜平, 西田幸二, 2017 再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内
15. ヒト iPS 細胞を用いた角膜上皮の分化誘導と再生医療への応用, 口頭, 林竜平 角膜カンファレンス 2017, 2017/2/16, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 角膜再生～体性幹細胞から iPS 細胞へ～, 口演, 西田幸二, 健康セミナー in 大阪, 2017/2/18, 国内
2. iPS 細胞を用いた角膜上皮再生医治療法の開発, 林竜平, 辻川元一, 西田幸二, H28 年度 AMED 再生医療公開シンポジウム, TKP ガーデンシティ品川 ボールルーム, 2017/2/2, 国内
3. iPS 細胞由来角膜上皮細胞の臨床応用に向けた研究開発, 口演, 西田幸二, 第 13 回 DIA 日本年会, 2017/11/14, 国内
4. 眼と iPS 細胞の未来, 西田幸二, 眼科再生医療特別講演, 2016/8/17, 国内
5. 角膜再生～体性幹細胞から iPS 細胞へ, 西田幸二, ～次世代医療システム産業化フォーラム, 2016/6/29, 国内

(4) 特許出願

(非公開)

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 再生医療の実現化ハイウェイ
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine,
Highway Program for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) iPS 細胞を用いた角膜再生治療法の開発
(英語) Corneal Regeneration using iPS Cells

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部 准教授 榛村 重人

所属 役職 氏名： (英語) Keio University School of Medicine, Associate Professor, Shigeto
Shimmura

実施期間： 平成 29 年 4 月 01 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

確定した製法による角膜内皮代替細胞を用いて特性解析を実施した。その一環として、造腫瘍試験を実施した。前臨床試験として、カニクイザル角膜内皮機能不全モデルにおける有効性と安全性の確認を行った。そこで得られた知見をもとに、家兎移植モデルについても検証を行った。また、臨床研究準備として、特定細胞加工物製造許可の申請準備等を行った。

We developed and characterized corneal endothelial equivalents from iPS cells. Tumorigenesis studies was also developed. Pre-clinical studies were performed in corneal endothelial deficient Macaca monkeys to assess safety and efficacy. Animal studies were also done in a rabbit model of bullous keratopathy. Preparations to apply for accreditation of foreign cell processor were done in order to prepare for clinical trials.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ポスター発表、Human iPSC-derived neural crest cells promote scarless wound healing on mouse cornea. Yoshida S, Yasuda M, International Society for Stem Cell Research, 2016/6/22, 海外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
(非公開)