

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
疾患・組織別実用化研究拠点 (拠点A)
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
- 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
- 研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 網膜再生医療研究開発プロジェクト
プロジェクトリーダー 高橋政代
- 所属 役職 氏名： (英語) Masayo Takahashi, M.D., Ph.D. Project leader, Laboratory for Retinal Regeneration, RIKEN Center for Developmental Biology
- 実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日
- 分担研究 (日本語) 動物での POC 獲得に向けた視細胞移植技術の開発
開発課題名： (英語) Development of regenerative therapy by transplantation of retinal photoreceptors with POC for clinical application
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 網膜再生医療研究開発プロジェクト
副プロジェクトリーダー 万代道子
- 所属 役職 氏名： (英語) Michiko Mandai, M.D., Ph.D. Deputy project leader, Laboratory for Retinal Regeneration, RIKEN Center for Developmental Biology
- 分担研究 (日本語) 他家移植の免疫反応についての検討
開発課題名： (英語) Immunological studies on the use of allogenic iPSC derived retinal cells with or without HLA matching

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 網膜再生医療研究開発プロジェクト
副プロジェクトリーダー 杉田直

所属 役職 氏名 : (英 語) Sunao Sugita, M.D., Ph.D. Deputy project leader, Laboratory for Retinal
Regeneration, RIKEN Center for Developmental Biology

分担研究 (日本語) 移植に適した立体組織を形成する為の自己組織化技術の開発
開発課題名 : (英 語) Optimization of self-organizing retinal differentiation for clinical use

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 立体組織形成研究チーム
チームリーダー 永樂元次

所属 役職 氏名 : (英 語) Mototsugu Eiraku, Ph.D. Team Leader, Laboratory for in vitro Histogenesis,
RIKEN Center for Developmental Biology

分担研究 (日本語) 網膜自己組織化技術の前眼部組織への拡大応用と前臨床研究
開発課題名 : (英 語) Application and customization of self-organizing differentiation protocol for
anterior part of the eye as a preclinical study

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 立体組織形成研究チーム
客員主管研究員 上野盛夫

所属 役職 氏名 : (英 語) Morio Ueno, M.D., Ph.D. Senior Visiting Scientist, Laboratory for in vitro
Histogenesis, RIKEN Center for Developmental Biology

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

● 動物での POC 試験について

iPS 細胞由来網膜移植による視機能回復の POC を得ることを目的として、網膜変性モデル動物を用いた試験を行った。iPS 細胞由来網膜組織を網膜変性モデルマウスに移植し、その後網膜をとりだして、多電極アレイを用いて薬理学的実験を加えて詳細な解析を行い、移植片の光応答機能、およびそのシグナルの宿主網膜への伝達を確認し移植片の機能的生着を確認した。また、移植後に光に反応した行動パターンがみられるようになることを検証する行動解析系およびその解析プログラムを完成し、約 4 割のマウスで網膜機能の回復効果が見られることを確認した。さらに中型動物（サル）にトレーニングを行い視野検査の系を立ち上げ、サルの網膜変性モデルの変性部位にヒト ES 細胞由来網膜組織の移植を行った。現在、観察継続中である。

また、*In vivo* で脳の大脳皮質視覚野から視覚応答を計測する目的で、二光子顕微鏡のセットアップを行った。神経細胞の活動は細胞内カルシウム濃度変化と対応することから、カルシウム感受性蛍光タンパク質である GCaMP6 をマウス大脳皮質の神経細胞に導入し、カルシウムイメージングを試みたところ、マウスに視覚刺激を与えることにより GCaMP6 シグナルの上昇が観察された。

● 臨床用網膜組織の調製方法について

臨床試験に使用可能なグレードの移植用神経網膜シートをヒト iPS 細胞から調製するため、培養方法の検討と最適化を行い、移植治療に適した培養条件および成熟状態をある程度絞り込むことができた。網膜組織の純度を検討するために、各マーカー分子の発現を網羅的に検討し、品質管理のための適切なマーカー分子を同定した。さらに、**First-in-Human** の次の段階として、一般治療化や高い治療効果を目指すために必要な移植神経網膜調製技術を確立することを目的として研究を進めた。培養技術のハイスループット化のために、非染色で網膜組織の品質を可視化するための計測機器の開発を顕微鏡メーカーと共に行なうとともに、移植に適した網膜組織を選別するための画像処理アルゴリズムの開発を行なった。今後は、画像データを各マーカー分子の発現量など他のパラメータと相関させるとともに、人工知能アルゴリズムを取り入れる事で自動判別の精度を上げていく計画である。

● RPE 他家移植における免疫反応の検討と安全性試験について

他家移植の実施に向け、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）の解析に基づく iPS 細胞由来網膜色素上皮（RPE）細胞の免疫反応と RPE 他家移植における免疫抑制について検討を行った。MHC ホモのサルの iPS 細胞より RPE 細胞を作製し、同種移植（網膜下）を行った所、MHC が合うサルでは拒絶されずに生着したが、MHC が合わないサルでは拒絶が見られた。病理切片の免疫染色では、MHC が合う移植群では炎症の所見はなかったが、MHC が合わない移植群では、移植片の内部やその周辺に炎症細胞が浸潤し、激しい炎症がみられた。また、HLA ホモのヒト iPS-RPE 細胞と様々な HLA 型のボランティアの末梢血を用いてリンパ球混合試験を行ったところ、HLA 6 座が合致する場合は T 細胞の反応がなく、HLA が合致しない場合は増殖反応が見られた。これらの報告は、京都大学 iPS 細胞研究所が構築した HLA ホモの iPS ストックより作製した iPS-RPE 細胞が免疫原的に大きな問題がない事を実験的に証明するものである。

また、CiRA の臨床用 iPS ストックより RPE を作製して免疫不全動物への移植による造腫瘍性試験を先端医療振興財団にて実施した。観察期間において腫瘍形成等の異常は見られず、そのデータを以て「滲出型加齢黄斑変性に対する他家 iPS 細胞由来 RPE 懸濁液移植」の再生医療等提供計画を厚生労働省に提出し、臨床研究の実施が認められた。

さらに、次の段階として iPS 細胞由来 RPE 移植の一般治療化を目指すために必要な技術の確立をめざし、移植のためのデバイスや、自動培養装置の開発についての検討を進めている。

英文

POC studies in animals

We focused on obtaining POC for functional recovery using iPS cell derived retinal tissue (iPSC-retina) using animal models with retinal degeneration. We isolated mouse host retinas after iPSC-retina transplantation and conducted detailed electrophysiological analysis using multiple electrode array system. We could obtain light responses from the transplanted host retina and the retinal ganglion cells. We also made the protocol for behavioral analysis to evaluate visual function, and observed light responsive behavior in 40% of the mice after iPSC-retina transplantation. We also trained a monkey for visual test, in which we are currently monitoring visual function after human ES-retina transplantation.

In order to record visual response from the visual cortex, we set up calcium imaging using 2-photon microscope. We could record the calcium indicator (GCaMP6) signal responses from the visual cortex neurons upon visual stimuli.

Preparation of retinal organoids for the clinical use

We optimized and refined the differentiation protocol of iPSC derived retinal organoids (iPSC-retina). In order to set up the quality standard, we identified several markers adequate for the quality test. We are also developing the image analyzing computational program to select retinal organoids of clinical quality in cooperation with microscope makers. We further plan to refine the system using artificial intelligence.

Studies on immune-response using HLA matched RPE allografts

We produced iPSC-RPE from MHC homozygote monkey donor. After subretinal transplantation, we observed no rejection signs in iPSC-derived RPE allografts of MHC-matched animals without immunosuppression, whereas there were immune attacks around the graft and retinal tissue damage in MHC-mismatched animals. We also prepared RPE cells from induced human iPSCs in HLA homozygote donors. In vitro, human T cells directly recognized allogeneic iPSC-derived RPE cells that expressed HLA class I/II antigens. However, these T cells failed to respond to HLA-A, -B, and -DRB1-matched iPSC-derived RPE cells from HLA homozygous donors. These results suggest the advantage of using homologous iPSC stock lines with most frequent HLA combination among Japanese population for regenerative medicine.

We also produced iPSC-RPE from the clinical iPS cell line provided by CiRA and conducted a tumorigenicity test at Foundation for Biomedical Research and Innovation and was approved by the ministry to conduct a clinical study using allogenic iPSC-RPE cell transplantation for age-related macular degeneration.

We are also developing the transplantation device and automated culture system for more generalized use of these 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 0件、国際誌 6件）

1. Fujii M, Sunagawa GA, Kondo M, Takahashi M, Mandai M. Evaluation of micro Electroretinograms Recorded with Multiple Electrode Array to Assess Focal Retinal Function. Sci Rep. 2016, 6:30719.
2. Sunao Sugita, Yuko Iwasaki, Kenichi Makabe, Hiroyuki Kamao, Michiko Mandai, Takashi Shiina, Kazumasa Ogasawara, Yasuhiko Hiram, Yasuo Kurimoto & Masayo Takahashi. Successful transplantation of retinal pigment epithelial cells from MHC homozygote iPSC cells in MHC-matched models. Stem Cell Reports. 2016, 7(4):635-648.
3. Sunao Sugita, Yuko Iwasaki, Kenichi Makabe, Takafumi Kimura, Takaomi Futagami, Shinji Suegami & Masayo Takahashi. Lack of T-cell response to iPSC cell-derived retinal pigment epithelial cells from HLA homozygous donors. Stem Cell Reports. 2016, 7(4):619-634.
4. Michiko Mandai, Momo Fujii, Tomoyo Hashiguchi, Genshiro A. Sunagawa, Shinichiro Ito, Jianan Sun, Jun Kaneko, Junki Sho, Chikako Yamada, Masayo Takahashi. iPSC-derived retina transplants improve vision in rd1 end-stage retinal degeneration mice. Stem Cell Reports. 2017, 8(1):69-83.
5. Hiroyuki Kamao; Michiko Mandai; Wataru Ohashi; Yasuhiko Hiram; Yasuo Kurimoto; Junichi Kiryu; Masayo Takahashi. Evaluation of the Surgical Device and Procedure for Extracellular Matrix-Scaffold-Supported Human iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheet Transplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017, 58: 211-220.
6. Michiko Mandai, Akira Watanabe, Yasuo Kurimoto, Yasuhiko Hiram, Chikako Morinaga, Takashi Daimon, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. N. Engl. J. Med. 2017, 376(11):1038-1046.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. [Safety issue about cell therapy using iPSC cells]、口頭、高橋政代 ゲノムアーカイブ国際シンポジウム、2016/04/02、国内
2. [Application of iPSC cells to retinal diseases]、口頭、高橋政代 国際人類遺伝学会、2016/04/06、国内
3. 「ぶどう膜炎におけるトランスレーショナルリサーチ-網膜色素上皮 iPSC 細胞移植の現状」、口頭、杉田直、第 120 回日本眼科学会総会 2016/04/07、国内
4. 「実験的自己免疫ぶどう膜炎における網膜マイクログリアのシクロオキシゲナーゼ-1 発現の解析」、口頭、真壁健一、杉田直、高橋政代、第 120 回日本眼科学会総会 2016/04/10、国内
5. 「眼局所検体を用いた眼感染症網羅的 PCR strip 検査の検証」、口頭、杉田直、寶野阿佑美、井関恭子、高橋政代、外丸靖浩、清水則夫、高瀬 博、中野聡子、第 120 回日本眼科学会総会、2016/04/08 国内

6. 「マウス iPS 細胞より分化した 3 次元網膜におけるサプリメントの視細胞保護効果の検討」、口頭、伊藤晋一郎、大西暁士、高橋政代、児玉徹也、角谷俊文、第 120 回日本眼科学会総会 2016/04/10、国内
7. 「神経網膜由来のレチノイン酸による脈絡膜発達制御機構」、口頭、後藤聡、大西暁士、伊藤裕美、坂口裕和、西田幸二、高橋政代、第 120 回日本眼科学会総会 2016/04/10、国内
8. [Transplantation of Autologous induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheets for Exudative Age Related Macular Degeneration: A Pilot Clinical Study.], 口頭、Kurimoto Y, Mandai M, Sugita S, et al. ARVO2016. 2016/05/01、国外.
9. [Increasing the population of retinal ganglion-like cells among retinal cells differentiated from mouse ES cells using 3D culture method], ポスター、伊良波諭、万代道子、谷原秀信、高橋政代、ARVO2016. 2016/05/05、国外
10. [Neural Retina-derived Retinoic Acids Control Choroidal Vascular Development.]、口頭、後藤聡、大西暁士、伊藤裕美、坂口裕和、西田幸二、高橋政代、ARVO2016. 2016/05/01、国外
11. [Culture of retinal ganglion cells (RGCs) purified from 3D retinal organoids differentiated from human induced pluripotent stem (iPS) cells]、ポスター、Wataru Kobayashi, Akishi Onishi, Yuji Takihara, Masaru Inatani, Toru Nakazawa, Masayo Takahashi、ARVO2016. 2016/05/05、国外
12. 「iPS 細胞を用いた再生医療」、口頭、高橋政代 第 33 回日本呼吸器外科学会総会 2016/05/12、国内
13. 「網膜内視覚情報処理の再生と視野」、口頭、高橋政代 第 5 回日本視野学会学術集会 2016/05/15、国内
14. [Retinal cell therapy using iPS cells]、口頭、高橋政代 ISSCR/ASGCT Workshop on Clinical Translation、2016/06/21、国外
15. 「シンポジウム iPS 細胞で眼炎症性疾患が治せるか? ●●賛成」、口頭、杉田直 フォーラム 2016 2016/07/02、国内
16. [Retinal Cell Therapy Using iPS Cells]、口頭、高橋政代 2016 Annual Meeting of Korean Society for Stem Cell Research (KSSCR2016)、2016/08/18、国外
17. iPS 細胞を用いて網膜を再生する」、口頭、高橋政代 第 20 回視覚科学フォーラム第 20 回研究会、2016/08/26、国内
18. 「ES/iPS 細胞由来立体網膜の応用」、口頭、高橋政代 Japan Macula Club 第 18 回総会、2016/08/28、国内
19. 「iPS 細胞を用いた網膜再生医療と安全性」、口頭、高橋政代 第一回バイオシグナルシグナル研究会、2016/08/30、国内
20. 「iPS 由来 3D 網膜の活用」、口頭、高橋政代 第 4 回細胞凝集研究会 2016/09/09 国内
21. [RPE regulation of innate immune activity and functionality in macrophages - RPE cells differentiated from iPS cells possess immune functions similar to primary RPE cells.], 口頭、Sunao Sugita, ISER2016、2016/09/25、国内
22. 「網膜移植の研究に用いる microERG の開発」、口頭、万代道子、日本臨床視覚電気生理学会 (JSCEV)、2016/10/01、国内
23. [Retinal cell using iPS cells]、口頭、高橋政代 ESGCT-ISSCR-ABCD Stem Cells and Gene Therapy Meeting、2016/10/18、国内

24. [Application of iPS cells to retinal diseases]、口頭、高橋政代 Biennial International Symposium on AMD 2016、2016/10/20、国外
25. [Retinal cell therapy using iPS cells]、口頭、高橋政代 Till & McCulloch Meetings(TMM2016)、2016/10/25、国外
26. [Retinal cell therapy using iPS cells]、口頭、高橋政代 New York Stem Cell Foundation (NYSCF) Annual Stem cell Conference、2016/10/27、国外
27. 「網膜変性に対する ES/iPS 由来網膜組織の移植後機能評価」、口頭、万代道子、第 70 回臨床眼科学会、2016/11/03、国内
28. [Retinal cell therapy using iPS cells]、口頭、高橋政代 第 16 回アジアカトリック医師会総会、2016/11/11、国内
29. 「iPS 細胞 網膜再生医療」、口頭、高橋政代 第 19 回近畿薬剤師学術大、2016/11/13、国内
30. 「iPS 細胞を用いた視細胞移植の可能性」、口頭、高橋政代 第 39 回日本分子生物学会年会、2016/11/30、国内
31. 「滲出型加齢黄斑変性に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植：2 年の臨床経過」、口頭、栗本康夫、平見恭彦、藤原雅史、森永千佳子、山本翠、藤田佳奈子、杉田直、万代道子、高橋政代、第 55 回日本網膜硝子体学会総会、2016/12/02、国内
32. [iPSC and Retinal Regeneration]、口頭、高橋政代 10th APVRS Congress 2016/12/09、国外
33. 「末期変性網膜(rd1)への iPSC-retina 移植後の機能検証」、口頭、万代道子、第 9 回 Retina Research Meeting、2016/12/10、国内
34. 「iPS 細胞を用いた網膜再生」、口頭、高橋政代 日本皮膚科学会第 79 回沖縄地方会、2017/01/29、国内
35. 「他家 iPS 由来網膜組織を用いた網膜変性疾患に対する治療開発」、口頭、万代道子、平成 28 年度 AMED 再生医療公開シンポジウム、2017/02/02、国内
36. [iPS cell derived retinal tissue improved vision in end stage retinal degeneration] 、口頭、万代道子、2017/03/01、国内
37. [Retinal Cell Therapy Using iPS Cells]、口頭、高橋政代 APAO2017、2017/03/03、国外
38. 「iPS 細胞由来立体網膜組織を用いた視機能再生」、口頭、万代道子、第 16 回再生医療学会総会、2017/03/07、国内
39. 「超免疫不全網膜変性疾患モデルマウスの開発」、口頭、伊良波諭、万代道子、渡邊健人、香川貴洋、後藤元人、高橋利一、山崎優、藤井桃、杉田直、桑原篤、松下恵三、小出直史、谷原秀信、高橋政代、第 16 回再生医療学会総会、2017/03/07、国内
40. 「iPS 細胞による網膜細胞治療」、口頭、高橋政代 第 90 回日本薬理学会年会、2017/03/15、国内
41. [A new model for Melanopsin based photoresponses]、口頭、Take Matsuyama、Masayo Takahashi、Yoshinori Shichida、第 94 回日本生理学会大会、2017/03/29、国内
42. Self-organization of patterned tissues from pluripotent stem cells, 口頭、永樂元次、SDB 75th Annual Meeting/ISD 19th International Conference、2016/08/06、国外
43. Self-organization of patterned tissues from pluripotent stem cells, 口頭、永樂元次、Engineering the embryo beyond systems biology、2016/11/14、国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 市民公開講座「いつまでもよく見える喜びのために」、高橋政代、第 70 回日本臨床眼科学会、2016/11/06、国内
2. 市民公開講座「網膜の再生医療」、高橋政代、近畿眼科医会連合健康講座、2017/02/12、国内
3. 市民公開講座「網膜再生医療とアイセンター」、高橋政代、済生会新潟第二病院眼科 市民公開講座、2017/02/25、国内

(4) 特許出願

なし

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
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine

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) Development of composite tissue formation technology for visual function regeneration and clinical application promotion base

研究開発担当者 (日本語) 先端医療センター病院 眼科部長 (網膜再生担当) 高橋 政代
所属 役職 氏名：(英語) Institute of Biomedical Research and Innovation Hospital, Director of Ophthalmology (Responsible for Retinal Regeneration), Masayo Takahashi

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) CiRA の iPS 細胞ストックを用いた他家移植の準備
開発課題名：(英語) Tumorigenicity test using allogenic cell lines from CiRA iPS cell stock

研究開発分担者 (日本語) 細胞療法研究開発センター センター長 川真田 伸
所属 役職 氏名：(英語) R & D Center for Cell Therapy, Director, Shin Kawamata

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：先端医療センター病院 眼科部長（網膜再生担当）高橋 政代
総括研究報告を参照。

他家臨床用ヒト iPS 細胞ストック（QHJI01s04）由来 RPE 細胞についての *in vivo* 造腫瘍性試験を実施してその安全性を検証した。その結果、QHJI01s04 由来 RPE 細胞は移植後 3 ヶ月の時点において腫瘍形成は検出されなかった。また移植片の組織学的検討でも最終分化した RPE のみが確認され、未分化細胞や RPE 中間体組織は確認されなかった。抗 Ki67 抗体による免疫組織染色で移植細胞の増殖能を評価したが、移植時後 3 ヶ月時点で Ki67 陽性率が 1%程度以下であった。また QHJI01s04 由来 RPE の Lin28 の発現を qRT-PCR 手法を用いて検討したが、Lin28 の発現は検出感度以下であった。このことから QHJI01s04 由来 RPE 細胞は最終分化しており、細胞移植後の腫瘍形成事象発生は極めて低い、無視できるものと判断した。

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 1 件）

Michiko Mandai, Akira Watanabe, Yasuo Kurimoto, Yasuhiko Hiram, Chikako Morinaga, Takashi Daimon, Masashi Fujihara, Hiroshi Akimaru, Noriko Sakai, Yumiko Shibata, Motoki Terada, Yui Nomiya, Shigeki Tanishima, Masahiro Nakamura, Hiroyuki Kamao, Sunao Sugita, Akishi Onishi, Tomoko Ito, Kanako Fujita, Shin Kawamata, Masahiro J. Go, Chikara Shinohara, Ken-ichiro Hata, Masanori Sawada, Midori Yamamoto, Sachiko Ohta, Yasuo Ohara, Kenichi Yoshida, Junko Kuwahara, Yuko Kitano, Naoki Amano, Masafumi Umekage, Fumiyo Kitaoka, Azusa Tanaka, Chihiro Okada, Naoko Takasu, Seishi Ogawa, Shinya Yamanaka, and Masayo Takahashi.

Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. N Engl J Med. 2017, 376(11), 1038-46.

- （2）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当なし

- （3）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

- （4）特許出願

該当なし