

令和元年6月13日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21633

研究課題名(和文)再生医療用網膜組織の機能を担保した冷却保存方法の開発

研究課題名(英文) Development of a cooling preservation method that secures the function of retinal tissue for regenerative medicine

研究代表者

小出 直史 (Koide, Naoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：40714126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、蛍光異方性と不凍タンパク質を応用した保存技術の開発に取り組んだ。蛍光異方性については、立体構造特有の厚みの問題と浮遊状態のため水分による光散乱を極小化できず完成に至れなかった。不凍タンパク質は、冷蔵環境下においてIII型AFP添加により細胞生存率が向上確認した。他方、当研究室で実施している臨床研究の細胞輸送について、本課題で得たノウハウを生かし臨床研究における輸送条件確定に至った。科学的エビデンスとして、保存条件は冷却しすぎることによる細胞毒性が顕著に確認され、振動に関する検証は一定レベルの輸送資材を準備することで配慮は限定的で必要十分であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題において、蛍光異方性と不凍タンパク質の臨床応用には至らなかったものの、研究開発で得られたノウハウをベースに臨床研究での細胞輸送要件を策定することに成功した。iPS細胞を用いた再生医療臨床研究(RPE他家懸濁液移植)において国内初の細胞輸送工程を実現したことは今後の普及・拡大を考慮した際に重要な前進であったといえる。今回は振動への対応は輸送資材を考慮することで限定的な対応で十分であることが明確となり、温度については細胞ごとに最適化する必要がある知見が得られた。今後は、懸濁液以外のシートや立体成型された構造物などより複雑な特定細胞加工物の輸送にむけて研究開発を促進させる心算である。

研究成果の概要(英文)：In this research, we worked on development of preservation technology that applied fluorescence anisotropy and antifreeze protein. With regard to fluorescence anisotropy, it was not possible to minimize the light scattering by water due to the thickness problem unique to the three-dimensional structure and the floating state, and it could not be completed. Antifreeze protein was confirmed to improve cell viability by the addition of type III AFP in a refrigerated environment. On the other hand, with regard to cell transport in clinical research conducted in our laboratory, we have reached the determination of transport conditions in clinical research by making use of the know-how acquired in this task. As evidence from scientific evidence, cytotoxicity due to overcooling was also clearly confirmed, and vibration verification was found to be sufficient to provide limited consideration in preparing transport materials at a certain level.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 網膜 細胞移植 細胞保存 不凍タンパク質 蛍光異方性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) iPS 細胞の臨床応用の変遷

iPS 細胞の開発から 10 年余り、iPS 細胞から様々な種類の細胞へ分化誘導する方法が確立され、基礎研究から細胞移植をはじめとする臨床応用へ移行しつつある。私たちの研究室では 2014 年に世界に先駆けて網膜色素上皮 (RPE; retinal pigment epithelium) の自家移植 (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に関する臨床研究) を実施した。

(2) 自家移植を経て得た課題

自家移植では被験者より細胞組織を採取して iPS 細胞を樹立し、樹立した iPS 細胞株について品質等を基準に臨床使用株を選定した後、選ばれた iPS 細胞株を目的細胞 (RPE シート) へ分化誘導してから種々の品質管理を経て移植用の細胞製品の製造が完了する。これらの工程を経るために移植待機時間 (細胞移植を実施すると決めてから実際に移植されるまでにかかる時間) や費用の課題が浮き彫りとなった。自家移植は科学的に最善であると考えられる一方で、治療介入において被験者の移植待機時間については重大な課題であり、急性・亜急性疾患への適応や原疾患の増悪に対するリスクヘッジができないことから、時間と費用を解決するために備蓄可能なスキームを整備していく方向へ舵を切った。

(3) 現在の臨床応用における課題

現在は課題解決のために他家移植に挑戦しており、他家移植では製造サイトから医療機関へ細胞輸送する課題が重要であることが露呈した。そこで、移植による治療期待値を最大化するために細胞機能を担保する方法論の確立が必要となった。

2. 研究の目的

(1) 細胞移植医療と細胞保存・輸送の重要性

細胞移植医療は、「細胞製造」「移植」「被験者フォローアップ」の 3 段階に大別される。「細胞製造」と「移植」をつなぐ工程として「細胞輸送」が挙げられ、細胞移植医療を普及させるためには製造サイトは集約し、全国に散らばっている医療機関それぞれに安定的に移植用細胞を供給する方法論を確立することが必要である。

(2) 細胞移植における機能を担保した輸送の重要性

細胞移植においては「細胞の生き死に」が重要であることは無論であるとともに、細胞機能を損なわずに移植・生着させる技術の確立が細胞移植を実りあるものにするために必須である。本研究では、細胞移植による治療期待値を最大化するために細胞の生死のみでなく、細胞機能を担保する細胞保存あるいは輸送について方法論の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 蛍光異方性を応用した新規技術開発

既報の GFP の温度依存的蛍光異方性の再現を実施する。それぞれの温度(0-40 度)において、十分量の蛍光タンパク質である GFP を偏向解析し、蛍光異方性の検量線を作成する。次に、GFP 濃度を段階的に希釈することで蛍光異方性の濃度依存的な検出限界を導き出す(プレートリーダーの限界感度を把握することを含む)。そして、細胞内 GFP において同様の現象論を再現できるかについて、遺伝学的に蛍光標識を施した細胞を網膜組織に分化誘導した細胞組織をモデルに細胞内蛍光タンパク質の蛍光異方性を検証する。最後に、細胞が光刺激に应答することで局所的・微細な細胞内温度変化(温度上昇)を蛍光異方性で捉えられる新規解析系の構築を実施する。

(2) 不凍タンパク質による冷却保存時における細胞保護効果の検証

網膜組織を用いて低温暴露速度(緩徐に、または急速)など含めた低温暴露時の細胞障害について解析する。次に、不凍タンパク質による低温誘導時の細胞保護効果を解析する。そして低温暴露による細胞障害責任遺伝子を同定し保存状態のスクリーニングなどを実施する際の評価手法の一つとして構築する。

(3) 細胞輸送方法などの確立に向けた方法論開発

細胞機能(光応答)を表現する機能解析系と低温暴露による細胞障害リスクを評価するモニタリング系を合わせて、移植細胞の輸送保存方法の開発を網膜組織を例に実施する。

4. 研究成果

(1) 蛍光異方性を応用した新規技術開発

温度と蛍光異方性の関係性については既存報告を再現でき検量線の作成は完了した。しかしながら網膜組織とりわけ立体構造を有する神経網膜を用いて検量線の作成を試みたが、細胞内蛍

光タンパク質の発現量が測定感度に対して不十分である可能性、培養条件（浮遊）による培地（水分）の干渉、機能を表現するマーカータンパク質の発現量の課題等により、細胞機能発現による細胞内温度変化と蛍光異方性に関する確度高い関係性を再現するに至っていない。

(2) 不凍タンパク質による冷却保存時における細胞保護効果の検証

細胞・組織を冷蔵環境に暴露した際に III 型不凍タンパク質が細胞死を抑制する細胞保護効果を示すことを見出した。III 型不凍タンパク質が細胞膜に吸着することによって細胞膜を保護する現象を確認している。これらの現象は BSA (Bovine Serum Albumin) と比較して優位に細胞膜を保護することを確認しており、既存物質よりも優位性があることが明らかとなった。

一方、再生医療等製品に応用するためには生物由来原料基準をクリアする必要があるため、不凍タンパク質の応用ならびに供給について、製法をリコンビナント化することについて連携先と準備を進めたが研究機関中には完了することはできなかった。一方で、不凍タンパク質による冷蔵環境下における細胞保護効果に関する有効性については一定の POC を得たものとする。

(3) 細胞輸送方法などの確立に向けた方法論開発

技術開発については十分ではなかったものの、保存技術開発のノウハウを活用することで、臨床研究（滲出型加齢黄斑変性に対する他家 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞懸濁液移植に関する臨床研究）において、細胞製造サイトである神戸から再生医療提供機関である大阪へ細胞輸送する工程で採用する条件について、検討段階における条件の絞り込みに寄与した。その結果臨床研究の実施に対して予定通りの実施に大きく貢献する結果となった。具体的には、温度に関する条件探索と振動に関する対処に関して、網膜組織を用いて検証を重ね、振動については剤型に応じて個別対応が必要であることが明確になり、それらについても一定の搬送資材を準備することで過剰な除振機構などは不要であることを見出した (Hori et al., JTERM, 2019)。さらに保存温度については特殊な条件を施さない場合には冷却することで細胞障害が大きいこと、37 度よりも室温(25 度)やその周辺温度で保存することで細胞生存率が優位に維持されることを見出した (Kitahata et al., Sci Rep., 2019)。今後、再生医療を含む細胞移植医療の普及において保存や輸送に関する技術開発は更なる発展が不可欠であり、本研究ではその一翼を担うきっかけと結果について臨床研究の実施支援等の実績を持って寄与できたものとする。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. A simple and static preservation system for shipping retinal pigment epithelium cell sheets.

Hori K, Kuwabara J, Tanaka Y, Nishida M, **Koide N**, Takahashi M.

J Tissue Eng Regen Med. 2019 Mar;13(3):459-468. doi: 10.1002/term.2805. Epub 2019 Feb 20.

査読有.

2. Fabricating retinal pigment epithelial cell sheets derived from human induced pluripotent stem cells in an automated closed culture system for regenerative medicine.

Matsumoto E, **Koide N**, Hanzawa H, Kiyama M, Ohta M, Kuwabara J, Takeda S, Takahashi M.

PLoS One. 2019 Mar 13;14(3):e0212369. doi: 10.1371/journal.pone.0212369. eCollection 2019.

査読有.

3. Establishment of Immunodeficient Retinal Degeneration Model Mice and Functional Maturation of Human ESC-Derived Retinal Sheets after Transplantation.

Iraha S, Tu HY, Yamasaki S, Kagawa T, Goto M, Takahashi R, Watanabe T, Sugita S, Yonemura S, Sunagawa GA, Matsuyama T, Fujii M, Kuwahara A, Kishino A, **Koide N**, Eiraku M, Tanihara H, Takahashi M, Mandai M. 査読有.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計1件)

1. 2018.7.20 メディカル・サイエンス・ダイジェスト 2018年8月号

「iPS細胞を用いた加齢黄斑変性治療」

小出直史、高橋政代

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：細胞・生体組織輸送容器

発明者：桑原順一、**小出直史**、加藤孝司、高橋政代

番号：特願 2016-122315、PCT/JP 2017/020473

国内外の別：国内、国外

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：砂川玄志郎

ローマ字氏名：SUNAGAWA Genshiro

研究協力者氏名：津田栄

ローマ字氏名：TSUDA Sakae

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。