

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462765

研究課題名(和文) iPS細胞由来網膜色素上皮細胞の移植用デバイスの開発

研究課題名(英文) Production of the surgical device for human iPS cell-derived retinal pigment epithelium transplantation

研究代表者

桐生 純一 (Kiryu, Junichi)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80281096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性に対してヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞シートの移植が臨床応用された。一方で病変部が約3.0mm径であることから、3.0×3.0mmの移植片を移植することが望ましいが、現在の手術器具では1.3×3.0mmの移植片の移植が限界である。そこで、現在の強膜創の長さ(1.5mm)から3.0×3.0mmの移植片を移植可能な手術器具の開発を行った。作製した移植器具は、カニューラの吸引口を眼球内への挿入方向から見て横側に設置し、また内部を渦巻き状に加工することで3.0×3.0mmの移植片を収納可能な設計にした。これにより、強膜創よりも大きな細胞シートを移植することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：We successfully conducted transplantation of a hiPSC-RPE cell sheet into a patient with AMD as the first-in-human trial using hiPSCs. AMD lesion, which is 3.0 mm in diameter, requires a 3.0 x 3.0 mm graft, however the surgical device in current use is possible to transplant less than 1.3 x 3.0 mm grafts. Therefore, we produced a surgical device which is possible to transplant a 3.0 x 3.0 mm graft via 1.5 mm scleral wound. The suction port of the device was designed on the lateral side in the insertion direction and the inside of device was processed to be able to store a 3.0 x 3.0 mm grafts. The device is possible to transplant grafts larger than scleral wound.

研究分野：眼科分野

キーワード：網膜色素上皮細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性症は、視力に最も重要な黄斑部に新生血管(病的血管)が生じ、これが出血や浮腫を引き起こすことによって視力が低下する疾患である。病因は、網膜細胞の一つである網膜色素上皮細胞(RPE)の加齢による機能低下で、欧米では50歳以上の年代における失明原因の第1位となっている。一方、日本においても高齢化や食生活様式の欧米化に伴い患者数が年々増加し、成人における失明原因の第4位にまでなっており、高齢者のQOL(Quality of Life)や医療経済を考える上で早急に解決すべき社会問題となっている。現在、臨床で行われている治療法は“レーザー治療”と“抗VEGF治療”が主流であるが、いずれも新生血管を退縮させ疾患の進行抑制を目標としたもので、病因であるRPEの機能低下に対する治療ではない。このため再発する症例も多く、新たな視点での根本的な治療が望まれており、その研究の一つに『RPE移植』がある。RPE移植はすでに、海外において加齢黄斑変性症を対象とした同種移植1)と自家移植2)の臨床応用が行われており、移植細胞源が“自己由来の細胞が望ましい”という事が分かっている。このため現在、この条件を満たす移植細胞源として人工多能性幹細胞(iPS細胞: induced Pluripotent Stem Cell)が注目されており、すでにiPS細胞からRPE(iPSC-RPE)への分化誘導に成功している3)。移植されるiPSC-RPEの形態は生体内のRPEと同じ単層上皮構造が望ましいため、これまでにRPEシートの作製に関する多くの研究が行われてきた。しかし、何れも人工基質を使用したRPEシートの作製が主流で、臨床応用可能な人工基質を伴わないRPEシートの報告はなかった。この人工基質は、多かれ少なかれ生体内で炎症等の様々な反応を引き起こすため、世界中で悪影響が出にくい人工基質を探す研究が行われる中、我々は人工基質を伴わないiPSC-RPEのシートの作製を試み、最近これに成功した。さらに移植片として『質』『量』『安定性』『安全性』において臨床応用可能なレベルであることも確認した4)。

作製したiPSC-RPEシートは人工基質が無いいため、これまでの手術器具では移植することができなかった。このため臨床応用を前提とした、新たなiPSC-RPEシート移植用の手術器具の開発を試み、これに成功した7)。しかし、作製した手術器具では1.3×3.0mmの細胞シートの移植が限界で、病変部である約3mmの黄斑部全体を覆うことができないため、今回3.0×3.0mmの細胞シートを移植可能な移植器具開発の着想に至った。この手術器具の完成により、これまで根治治療の無かった加齢黄斑変性症に対する、iPS細胞を用いた根治治療が完成すると自負している。

- 1) Algever P.V., et al.: Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1994;232:707-716.
- 2) van Meurs JC, et al.: Am. J. Ophthalmol.

2003;136:688-695.

3) Hirami Y, et al.: Neurosci. Lett. 2009;458:126-131.

4) Kamao H, et al. Stem Cell Reports 2014;2:205-218.

2. 研究の目的

iPSC-RPE移植の際に行われる硝子体手術は、眼球内の硝子体腔に生じた病変を取り除く手術で、硝子体腔に手術器具を挿入するため強膜に創口を作製する。術中・術後合併症の頻度は、1970年代の開発された当初は非常に高く、一旦合併症を引き起こすと失明に至ることが多かったため、対象は一部の重症な疾患に限られていた。この合併症の頻度が高い理由の一つに手術器具の大きさがある。手術器具が大きくなることで創口が大きくなり、眼球を一定に保つことが困難となるため様々な合併症が引き起こされた。しかし手術器具の大きさ(口径)も年々小型化しており、開発当初は1.5mmあった口径は、80年代に入ると0.9mm、現在は0.5mmまでになっている。この手術器具の小型化に伴い手術の安全性が高まり、現在では個人医院で日帰り手術として行えるほど広く普及しており、創口の大きさの重要性を示している。一方、現在のiPSC-RPEシート用の移植器具を用いて3.0×3.0mmの細胞シートを移植するためには、強膜に3.0mm以上の創口を作製しなければならず、硝子体手術の合併症が非常に高かった開発当初の創口よりも大きくなるため臨床応用は不可能で、現在のところ1.3×3.0mmの細胞シートの移植が限界である。そこで本研究は、研究期間内に臨床応用可能なレベルの、3.0×3.0mmの細胞シートを移植可能で、少なくとも1.5mm以下の創口から眼内に挿入可能な移植器具を開発する。本研究の背景にあるiPS細胞を用いた再生医療は、本対象疾患である加齢黄斑変性症だけでなく、他の難治性疾患への応用も可能であるため、理想の大きさの移植片を移植可能な手術器具の完成は、社会的貢献度は極めて高く、また非常に先進的な研究である。

また、2007年度の調査で日本の視覚障害者数は約164万人、また視覚障害による総経費コストは8兆8000億円と算出されており、現在の厳しい医療経済を考える上で視覚障害への対応は避けて通ることはできない。日本における視覚障害の原因疾患は、緑内障、糖尿病網膜症、網膜色素変性、黄斑変性、高度近視と上位を全て網膜疾患が占めている。この理由として現在、一度障害された網膜を機能回復させる方法が無いことが挙げられる。この網膜機能を回復させる研究の一つが網膜細胞移植であり、現在注目されている研究がiPS細胞から作製した網膜細胞の移植を用いた網膜再生である。現在のところiPSC-RPE移植は加齢黄斑変性だけを治療対象としているが、視細胞保護因子を分泌するRPEを栄養因子分泌細胞として網膜色素変性等の他疾患への臨床応用も考えられ、また

iPS 細胞由来の視細胞移植も今後臨床応用される可能性がある。つまり本研究の移植器具が完成すれば、iPSC-RPE シート移植方法が確立し、これにより他疾患への臨床応用に繋がることとなり、今まで全く治療方法の無かった多くの視覚障害者の視機能を改善し本人の生活の質を上昇させるだけでなく、視覚障害から生じるコストを減らす事で日本経済の生産性に大きく貢献することができるため、非常に意義のある研究と考える。

### 3. 研究の方法

#### (1) 移植器具の開発

臨床応用可能な素材を用いて以下の移植器具を作製する。現在の移植用カニューラは“iPSC-RPE シートの吸引・排出口”と“眼球内(創口)への挿入方向”が同軸であるため、iPSC-RPE シートの横幅は創口の許容範囲である 1.5mm (実際はカニューラの厚みがあるため 1.3mm) に制限される。そこで本研究のカニューラは“iPSC-RPE シートの吸引・排出口”を“眼球内への挿入方向”と別軸に作製することで、iPSC-RPE シート幅と創口の大きさの関係が無くなるため、3.0×3.0mm の iPSC-RPE シートが移植可能となる。

#### (2) ヒト iPS 細胞の維持培養

細胞：ヒト iPS 細胞は RIKEN BioResource Center が提供している健康者由来ヒト iPS 細胞 (253G1) を使用する。

方法：ヒト iPS 細胞の維持培養は、Nakagawa らによって報告されている、Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008) に準じて行う。

評価：ヒト iPS 細胞の維持培養の評価は、分化誘導前に未分化性と多能性の確認で行う。  
・未分化性は、免疫細胞染色による未分化マーカー(OCT3/4、Nanog、SSEA-4、TRA-1-60)の発現を確認する。

・多能性は、免疫不全マウス (SCID mouse) の精巣にヒト iPS 細胞を移植し、2 か月後に精巣を組織学的に評価し奇形腫形成 (3 胚葉系の細胞) を確認する。

#### (3) ヒト iPS 細胞由来 RPE への分化誘導

細胞：未分化性と多能性を確認したヒト iPS 細胞 (253G1) を使用する。

方法：ヒト iPS 細胞由来 RPE への分化誘導は、Osakada らによって報告されている、Nat. Biotechnol. 26: 215-224 (2008) に準じて行う。

評価：ヒト iPS 細胞由来 RPE への分化誘導の評価は、RPE 特有遺伝子の確認で行う。

・RT-PCR による RPE 特有遺伝子 (BEST1、RPE65、MERTK、CRALBP) の発現を確認する。

・免疫細胞染色による RPE 特有遺伝子 (PAX6、MiTF、BEST1、RPE65) の発現を確認する。

#### (4) ヒト iPS 細胞由来 RPE の機能評価 in vitro

細胞：RPE 特有遺伝子の発現を確認したヒト iPS 細胞由来 RPE (253G1) を使用する。

評価：ヒト iPS 細胞由来 RPE の機能評価は、サイトカイン分泌、バリア機能を評価する。

・サイトカイン分泌は、ELISA 法を用いて血

管内皮増殖因子 (VEGF) と色素上皮由来因子 (PEDF) の分泌量を評価する。

・バリア機能は、免疫細胞染色による密着結合蛋白 (ZO-1、Occludin、Claudin) の発現と Transwell ITM 上に培養し経上皮電気抵抗 (TER) により評価する。

#### (5) ヒト iPS 細胞由来 RPE の機能評価 in vivo

細胞：RPE 特有遺伝子の発現を確認したヒト iPS 細胞由来 RPE (454E2) を使用する。

評価：ヒト iPS 細胞由来 RPE の機能評価は、網膜変性モデル動物 (RCS rat) に対して、ヒト iPS 細胞由来 RPE を網膜下移植し、免疫組織染色と電気生理学的に移植効果を評価する。

・移植後、経時的に網膜電図の最大振幅を測定し非移植眼 (反対眼) と比較する。

・移植 9 週後に、視細胞層の厚さを組織学的に測定し非移植眼 (反対眼) と比較する。

### 4. 研究成果

#### (1) 移植器具の開発

作製した移植器具は、カニューラの吸引口を眼球内への挿入方向から見て横側に設置し、また内部を渦巻き状に加工することで 3.0×3.0mm の細胞シートを収納可能な設計にした。カニューラの作製方法は、1.5mm の円形金属を 2 つ作製し、1 つの円形金属の中央部分に 0.5mm の孔を作製後、孔に 22G の注射針を取り付けた。次に渦巻き状の円柱の金属を作製し、その両側面に先ほどの円形金属を取り付けた。最後に、注射針に 1mm の医療用シリンジを装着させることで、1mm シリンジを用いてカニューラの側面に作製した吸引・排出口から液体や細胞シートを吸引・排出することができた。この作製した移植器具により、強膜創よりも大きな細胞シートを移植することが可能となった。

#### (2) ヒト iPS 細胞の維持培養

・未分化性を免疫細胞染色による未分化マーカー (OCT3/4、Nanog、SSEA-4、TRA-1-60) の発現で確認した。

・多能性を免疫不全マウス (SCID mouse) の精巣にヒト iPS 細胞を移植し、2 か月後に精巣を組織学的に評価し奇形腫形成 (3 胚葉系の細胞) を確認した。

#### (3) ヒト iPS 細胞由来 RPE への分化誘導

・RT-PCR による RPE 特有遺伝子 (BEST1、RPE65、MERTK、CRALBP) の発現を確認した。

・免疫細胞染色による RPE 特有遺伝子 (PAX6、MiTF、BEST1、RPE65) の発現を確認した。

#### (4) ヒト iPS 細胞由来 RPE の機能評価 in vitro

・サイトカイン分泌は、ELISA 法を用いて VEGF と PEDF の分泌を確認した。

・バリア機能は、免疫細胞染色にて密着結合蛋白 (ZO-1、Occludin、Claudin) の発現を確認した。

#### (5) ヒト iPS 細胞由来 RPE の機能評価 in vivo

iPS 細胞由来 RPE を網膜下移植し、免疫組織

染色にて移植部位に一致する視細胞保護を確認した。また、移植眼と非移植眼の間に網膜電図の最大振幅の差を認めた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

桐生 純一 (Kiryu Junichi)・川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：80281096

##### (2) 研究分担者

鎌尾 浩行 (Kamao Hiroyuki)・川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：30388946

##### (3) 連携研究者 なし

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者 なし

( )