



Title	ヒトES/iPS細胞由来網膜組織を用いた視機能再生医療の開発
Author(s)	山崎, 優
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88004
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (山 崎 優)	
論文題名	ヒトES/iPS細胞由来網膜組織を用いた 視機能再生医療の開発
論文内容の要旨	
<p>網膜色素変性 (Retinitis pigmentosa : RP) は網膜の周辺部の桿体視細胞から徐々に失われて視野狭窄が進み、最終的に中心視野を担う錐体視細胞も2次的に障害されることで視力低下や失明に至ることもある進行性の遺伝性疾患である。ヒトの網膜は一度障害を受けると再生能の低さのため、機能の修復は極めて限定的であることが知られており、RPに対して神経保護効果を狙ったアプローチや、原因遺伝子を取り換える遺伝子治療、人工網膜等、様々な研究が進められている。中でも視細胞移植治療は、残存している網膜内層の神経回路を利用して、光応答能を回復させるアプローチであることから、自然に近い再生であり、より高い視機能回復効果が期待されている。1990年代に米国やインドにおいて、中絶胎児の網膜組織を用いた移植研究が行われたが、適切な発生段階の網膜組織を安定的用意することは容易ではなく、倫理的な課題もあったことから、普及には至らなかった。</p> <p>理化学研究所のSasai・Eirakuらは、神経組織の発生の知見を用いて開発した、多能性幹細胞から中枢神経組織を分化誘導させる無血清凝集浮遊培養法「SFEBq法」を用いて、胎児網膜と同様の多層構造を有する立体網膜組織を作製できることを報告した。さらに、BMP4を添加する事によって、網膜組織への分化誘導効率を飛躍的に向上させることを見出したことから、ヒト多能性幹細胞由来網膜組織を用いた視細胞移植治療に期待が寄せられるようになった。理化学研究所のTakahashi・MandaiらはSFEBq法によって分化誘導されたES/iPS細胞由来網膜組織の一部を切り出した網膜シートを末期視細胞変性モデル動物に移植すると、視細胞が生着し、外節構造を形成して成熟することを確認した。さらに、レーザーで視細胞を変性させたサルにヒトiPS細胞由来網膜シートを移植し、異常増殖なく、2年以上視細胞が生着したことを報告した。これらのPOC研究より、ヒトiPS細胞由来網膜シートの安全性が示唆され、治療コンセプトが確認されたことから、現在、ヒトiPS細胞由来網膜シートを用いた視機能再生の臨床応用にむけた検討が本格的に進めている。</p> <p>このように理化学研究所を中心とした網膜組織の分化誘導法の改良や移植研究と並行して、私たちはこれらの先駆的な研究成果を臨床に応用するための研究に取り組んだ。まず、臨床用途の網膜組織の分化誘導法を検討したところ、フィーダーフリー培養したヒトES/iPS細胞からでは網膜組織を作製することができないという問題に直面し、改良検討を行った。その結果、フィーダーフリー培養したヒトES/iPS細胞の分化開始1日前にTGF-β/Noda1シグナル阻害剤SB431542、及びShhシグナル活性化剤SAGを添加してヒトES/iPS細胞の初期状態を調整し、さらに分化開始時にSAGを添加する事で、安定的に網膜組織へ分化誘導させることができる改良分化誘導法を見出した。さらに、網膜組織への分化誘導に必要なBMP4と併用でChk1阻害剤PD407824を添加すると、網膜以外の細胞の分化が抑制されることを示した。</p> <p>改良分化誘導法により、安定して網膜組織を作製できるようになったことから、移植免疫の基盤となる情報を取得することを目的として、ヒトES/iPS細胞由来網膜組織の免疫学的特性を解析した。ヒトES/iPS細胞由来網膜組織はヒトiPS細胞由来RPEと比較して、HLA分子の発現レベルが低く、PBMCsとの共培養では免疫細胞に対する免疫原性が低いことが明らかとなった。さらに、活性化した免疫細胞に対しても免疫抑制能を有することを見出し、免疫抑制メカニズムとして、ヒトES/iPS細胞由来網膜組織から分泌されるTGF-βが重要な役割を果たしている事を示した。</p> <p>また、移植研究から見てきたヒトES/iPS細胞由来網膜組織の課題を解決し、将来のさらなる有効性が期待される網膜組織として、<i>Islet-1</i>を欠損させる検討を行った。<i>Islet-1</i>を欠損させたヒトES細胞由来網膜組織では、視機能回復に必要な視細胞や水平細胞には分化するが、不用なON型双極細胞には分化しないことが確認された。さらに、<i>Islet-1</i>を欠損させることで移植した視細胞と宿主双極細胞とのコンタクト率が改善し、シナプス接続が示唆された。電気生理学的解析では、従来の網膜シートと比較して、<i>Islet-1</i>を欠損させた事により、光応答能がさらに向上することが</p>	

示され、*Islet-1*を欠損させた網膜組織の有用性を示すことができた。

本研究成果を含めたPOC研究において、ヒトES/iPS細胞由来網膜組織の細胞治療における安全性と有効性が示唆されたことから、2020年にヒトiPS細胞由来網膜シート移植による視機能の再生医療の臨床研究が開始され、患者への投与が行われた。現在、安全性や有効性を観察しているところであり、並行して治験開始に向けた準備が進められている。将来的にはより視機能回復効果が期待される次世代型網膜組織として*Islet-1*を欠損させたヒトiPS細胞由来網膜組織を患者に届けるべく、研究開発を進めている。将来、視細胞変性による失明する患者を無くすことを目標に今後も研究開発に取り組んでいきたい。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山崎 優)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 藤尾 慈
	副 査	教授 橋本 均
	副 査	教授 近藤 昌夫
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>ヒトの網膜は、再生能が低いために、一度障害を受けると機能回復はほとんど期待できない。そこで、これまで、視細胞移植治療を目指して、多能性幹細胞から網膜組織を分化誘導し移植するための基礎研究がなされてきた。</p> <p>本研究では、申請者は、基礎研究の成果を臨床に応用するための技術開発を行った。まず、フィーダーフリー培養したヒトES/iPS細胞を、網膜組織に特異的にかつ安定的に分化誘導する方法を確立した。次に、作製したヒトES/iPS細胞由来網膜組織の移植に向けて、免疫学的特性に関する研究を行い、組織の免疫原性が低いことに加え、免疫抑制能を有することを明らかにした。さらに、ゲノム編集技術を用いて幹細胞の遺伝子操作を行うことで、細胞分化を制御し、移植網膜の光応答性を向上させることに成功した。これらの研究成果は、既に査読を有する国際雑誌(Scientific Reports, Stem cell Reports, iScience, Regenerative Therapy)に4報の学術論文として発表あるいは受理されている。</p> <p>以上、本研究は、視細胞移植治療の実現に向けて、重要な技術基盤を構築したものと考えられることにより、博士(薬学)の学位論文に値するものと認める。</p>		