

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※甲	第	号
------	----	---	---

氏 名

伊藤 ありさ

論 文 題 目

再生医療等製品を目指した

ヒト iPS 細胞の網膜分化制御機構の解明と応用

論 文 審 査 担 当 者

主 査 名古屋大学准教授 小坂田 文隆

委 員 名古屋大学教授 人見 清隆

委 員 名古屋大学教授 大嶋 篤典

委 員 名古屋大学准教授 加藤 竜司

我々の生活は視覚情報によって大きく支えられており、失明などの視覚障害は我々の Quality of Life を著しく低下させる。加齢黄斑変性は主要な視覚障害の一つであり、日本では 50 歳以上の 80 人に 1 人が罹患している。加齢黄斑変性は、眼の黄斑部に老廃物や血液が溜まり、黄斑部の網膜色素上皮細胞 (RPE) が変性する疾患である。RPE は眼に入った光を吸収する機能、視細胞と脈絡膜を隔てるバリア機能、視細胞外節を取り込む貪食能、レチナールを再異化し再び視細胞へ送る機能などを有し、視細胞の生存維持や機能に必須な細胞である。そのため、加齢黄斑変性による RPE の変性は二次的に視細胞の変性を引き起こし、視野の欠損が生じる。既存の治療法として、薬剤治療やレーザー治療があるが、対症療法に留まる上に再発率の高さが問題とされている。そこで、新たな治療法としてヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) やヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から作製した RPE の移植治療が注目されており、現在、日本を含む複数の国で臨床研究や治験が行われている。iPS 細胞由来 RPE を細胞医薬品として患者に供給するためには、一定品質の RPE を iPS 細胞より安定して大量に作製する必要がある。しかし、iPS 細胞はドナー個人の遺伝的多様性、遺伝的安定性の低さ、由来組織の違い、実験による変動により、エピジェネティック修飾や遺伝子/タンパク質の発現が株間で異なり、株によって分化指向性能が異なる。この iPS 細胞株間の分化指向性の違いにより、同じ分化誘導法を用いても使用する iPS 細胞株によって分化効率が大きく変化する。すなわち、免疫拒絶の回避のために患者に適合した iPS 細胞株を用いても、RPE を安定して得られないという問題に直面する。RPE 作製における iPS 細胞株間での変動は、ヒト iPS 細胞由来 RPE を用いた細胞治療の臨床応用および産業化の大きな障壁となっている。

そこで著者は、ヒト iPS 細胞由来 RPE を「再生医療等製品」として安定供給するために、分化指向性の異なる iPS 細胞株間においても高い再現性と高い分化効率で RPE を得ることを目指して研究を実施し、以下の新知見を得た。

ヒト iPS 細胞から高い再現性と高い分化効率で RPE を得るために、3 つの戦略を用いた。1 つ目は、培養操作が簡便な手法であり、かつ薬物が全ての細胞へ均一に作用しやすい二次元分散培養を用いることである。2 つ目は、低分子化合物のみを使用することである。動物由来の原料の使用は、ウイルス感染や免疫原性などの問題を引き起こす。また、組み換えタンパク質による分化誘導は、ロット差による分化の再現性の変動に繋がるのに対して、低分子化合物では安価で大量に合成でき、ロット間でも安定している利点がある。3 つ目は、iPS 細胞から RPE への分化効率を高めるために、分化効率に最も影響を与える分化初期段階で網膜分化シグナルを調整することである。多能性幹細胞から神経外胚葉を誘導する手法である dual SMAD inhibition に加えて、Wnt シグナル阻害薬を組み合わせることで網膜分化シグナルを制御する。

まず始めに、阻害標的の異なる 3 つの Wnt シグナル阻害薬の網膜分化への影響を検討した。単一細胞に解離したヒト iPS 細胞 (1383D6 株) を iMatrix-511 上に播種し、tankyrase 阻害

薬の IWR-1-endo (10 μ M)、PORCN 阻害薬の IWP-2 (10 μ M)、あるいは β -catenin と TCF の結合阻害薬の iCRT3 (10 μ M) を ROCK 阻害薬の Y-27632 (10 μ M)、ALK2/3 阻害薬の LDN193189 (100 nM)、ALK4/5/7 阻害薬の A-83-01 (500 nM) の存在下で分化誘導した。分化誘導 5 日目に網膜前駆細胞マーカーである RX の mRNA 量を qPCR で定量した結果、IWR-1-endo の添加条件下においてのみ、control 条件下と比較し、RX の発現量が有意に増加した。免疫染色においても同様に、IWR-1-endo 処置したヒト iPS 細胞は RX 陽性細胞を効率良く誘導した。続いて、分化誘導 5 日目以降、RX 陽性細胞群を GSK3 β 阻害薬の CHIR99021 (3 μ M) と FGF 受容体 1 阻害薬の SU5402 (10 μ M) で処置したところ、分化誘導 17 日目に PAX6 と MITF の共陽性細胞が 82.8% の割合で得られた。さらに培養を続けたところ、分化誘導 40 日目に色素を有する多角形細胞が観察され、これらの細胞は RPE に特徴的な貪食能を有していた。tankyrase 阻害が効率的な RPE の誘導に重要なのかを明らかにするために、IWR-1-endo とは異なる化学構造を有す tankyrase 阻害である XAV939 の作用を検討した。その結果、XAV939 は、RX の発現量および、PAX6 と MITF の共陽性細胞数を有意に増加させ、IWR-1-endo と同様の作用を示した。以上より、dual SMAD inhibition と tankyrase 阻害による分化誘導方法は、ヒト iPS 細胞を RX 陽性網膜前駆細胞に効率的に誘導し、その結果、PAX6、MITF 共陽性の RPE 前駆細胞、続いて機能的な成熟 RPE を効率良く誘導することが明らかになった。

次に、上記で確立した手法が分化指向性の異なる iPS 細胞株間においても有用であるかを調べた。ヒト iPS 細胞株である 1383D6 株、1383D2 株、Aics0023 株、A18945 株を分化指向性のマーカーである SALL3 の発現量を調べたところ、1383D6 株 > A18945 株 > 1383D2 株 > AICS-0023 株の順番で発現量が低かった。すなわち、AICS-0023 株は RPE などを含む外胚葉への分化よりも、内胚葉や中胚葉に分化傾向を有することが明らかになった。そこで、これら分化指向性の異なる細胞株を IWR-1-endo 用いた分化誘導方法にて分化誘導した。その結果、全ての株において PAX6 と MITF の共陽性細胞および色素を有する多角形細胞への分化が認められた。AICS-0023 株においても、IWR-1-endo 用いた分化誘導方法は、80% 以上の高効率で RPE へ分化誘導した。以上より、本手法が iPS 細胞株の分化指向性に関係なく RPE を高効率で誘導するロバストな分化誘導法であることが示された。

本研究において著者は、二次元分散培養と低分子化合物を用いて、tankyrase を阻害することで、ヒト iPS 細胞から RPE を短期間かつ高効率に誘導する簡便な新規手法を確立した。さらにこの分化誘導法は、iPS 細胞株の分化指向性に関係なく RPE を高効率に誘導可能であり、高い頑健性と高い再現性を示した。

本研究成果は、幹細胞の網膜分化制御における重要な基礎的知見を提供すると同時に、新規治療モダリティとしての細胞医薬品の実現化、および疾患・創薬研究の創出に貢献するものである。よって、本論文は博士（創薬科学）の論文として価値あるものと認める。さらに、2021 年 3 月 5 日に本論文とそれに関する口頭試問を行った結果、合格とした。