

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名

YE Ke (葉 珂)

論 文 題 目

Reproducible production and image-based quality evaluation  
of retinal pigment epithelium sheets  
from human induced pluripotent stem cells

(細胞医薬品としてのヒトiPS細胞由来  
網膜色素上皮シートの作製法と品質評価  
に関する研究)

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	廣 明	秀 一
委 員	名古屋大学准教授	加 藤	竜 司

## 論文審査の結果の要旨

加齢黄斑変性は、加齢により網膜の黄斑部が変性する疾患で、物がゆがんで見えたり、視野の中心が欠けて見えたりなどの症状を起こす。加齢黄斑変性には萎縮型と滲出型の2つの病型があり、いずれも書字・読字不能となるため社会的失明となる。萎縮型では、新生血管は関与せず、網膜色素上皮細胞（RPE）や脈絡膜毛細血管の地図状萎縮病巣が認められる。欧米人に多く、進行はゆっくりである。現在のところ萎縮型加齢黄斑変性に対する治療法はない。滲出型は、黄斑部の脈絡膜から新生血管が発生し網膜を障害する。日本人に多く、進行が早く、日本における高齢者の失明や視力低下の主要な原因疾患の一つとなっている。滲出型加齢黄斑変性には抗 vascular endothelial growth factor 抗体の硝子体内投与などの治療法が試みられているが、新生血管をターゲットにした対症療法であり、治療後に再発するリスクも高く、繰り返し治療を受ける患者や家族の身体的、経済的負担が問題になっている。

そこで近年、加齢黄斑変性に対する新たな治療戦略として、人工多能性幹細胞（iPS細胞）を用いた再生治療が注目を集めている。iPS細胞は、体細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4などを導入することにより作製された細胞で、未分化のまま半永久的に分裂を繰り返す高い増殖能と、三胚葉系のあらゆる細胞へと分化する多能性を有する。同じく多能性を有する胚性幹細胞とは異なり、細胞の樹立に受精卵の破壊を伴わないため倫理的問題がなく、患者本人から iPS細胞を作製すれば、移植の際の拒絶反応を回避することができる。このような性質から、ヒト iPS細胞を用いた RPEの再生医療が、加齢黄斑変性の根治を目指した新規治療法として、期待されるようになった。現在までの臨床研究において、iPS細胞から作製した RPEシートを加齢黄斑変性患者に移植することで、その安全性は確認されつつある。

しかし、ヒト iPS細胞由来 RPEシートを細胞医薬品（再生医療等製品）として治療に用いるために、2つの大きな問題が指摘されている。①一つ目の問題点は、ヒト iPS細胞から純度の高い RPEシートを作製する際に、顕微鏡下で人の手で細胞を選別・採取する必要があり、熟練の技と手間、時間がかかるため大量生産できないことである。②二つ目は、同じ細胞株から同じプロトコルを用いて RPEシートを作製しても、RPEシートの品質がシートごとにばらつき、その品質の違いを非破碎的に評価する簡便な方法がないことである。そこで葉珂氏は、上記の2点を解決する目的で、本研究を実施し、以下の新知見を得た。

- ① 単一細胞に解離したヒト iPS細胞を、RHOシグナル、BMPシグナル、TGFシグナル、Wntシグナル、FGFシグナル、GSK3 $\beta$ シグナルを阻害する6種類の低分子化合物およびニコチンアミドで段階的に処置し、接着培養系で分化誘導を行った所、RPEの特徴を有する細胞が90%以上の高効率で認められた。以上より、本分化法を用いることで、ヒト iPS細胞から再現良く高効率で RPEへ分化誘導できることが明らかになった。本分化誘導方法を RPE6iN法と命名した。続いて、RPE6iN法

により分化誘導した RPE 細胞からシートを形成させるために、transwell 上で RPE を長期間培養したところ、その RPE シートは 99%以上の純度で、RPE に特徴的な貪食能やバリア機能などを有していた。以上より、ヒト iPS 細胞から RPE6iN 法により高純度の RPE シートを大量に作製することに成功した。続いて、RPE シートのバリア機能を経上皮電気抵抗 (TER) により定量化したところ、これまでの RPE シートの一般的な問題に一致し、作製したヒト iPS 細胞由来 RPE シートの TER 値にバラつきが認められた。TER 値の高い RPE シートおよび TER 値の低いシートを解析したところ、TER 値の低い RPE シートでは、ZO-1 や E-cadherin、F-actin の分布に異常が認められた。以上より、低機能のヒト iPS 細胞由来 RPE シートでは、tight junction や adherens junction、細胞骨格に異常があることが明らかになった。

- ② RPE シートの品質を非破碎的に評価するために、TER 値の低いヒト iPS 細胞由来 RPE シートでは細胞の形態異常を伴うことに着目した。RPE6iN 法を用いて作製した RPE シートの顕微鏡画像から細胞の形態情報を抽出し、TER 値と対応付ける予測モデルを構築した。F-actin を蛍光標識した画像を教師データとして機械学習を行い、非染色の明視野位相差画像を評価した。明視野位相差画像を用いても、RPE シートの TER 値を予測でき、TER 値の低い RPE シートを除外することに成功した。さらに、この予測モデルは、異なる施設で異なる分化プロトコルで作製した異なるヒト iPS 細胞株の RPE シートの TER 値も予測することができた。以上より、RPE の形態情報を用いた機能予測モデルを用いることで、作製したヒト iPS 細胞由来 RPE シートの中から低品質の製品を除外できることが示された。

以上をまとめると、本論文において葉珂氏は、ヒト iPS 細胞から高効率で RPE に分化誘導可能な新規 RPE6iN 法を確立し、熟練者の手による顕微鏡下での選別・採取操作なしに、高純度の RPE シートの作製に成功した。低機能のヒト iPS 細胞由来 RPE シートでは、細胞接着や細胞骨格に異常があることを見出し、細胞形態により RPE シートの品質を評価できる可能性を考えた。そこで葉珂氏は、ヒト iPS 細胞由来 RPE シートの顕微鏡画像から細胞の形態情報を抽出し、機械学習による予測モデルを構築することで、RPE シートの非破碎的な品質評価法を確立した。新規 RPE6iN 法によるヒト iPS 細胞由来 RPE シートの作製と非破碎的な品質評価を組み合わせることで、RPE シートのロット間のバラつきを解決し、細胞医薬品 (再生医療等製品) として RPE シートを効率良く大量に作製できるようになると期待される。本研究成果は、ヒト iPS 細胞由来 RPE シートを細胞医薬品 (再生医療等製品) として実用化し、再生医療を産業化するための基盤となる極めて重要な知見を提供するものである。

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、2020 年 8 月 28 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。