

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： 再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発  
The Development of Evaluation Methods for the Industrialization of Regenerative Medicine

研究開発課題名： 均質な培養ヒト角膜内皮細胞による安全な再生医療の確立のための革新的評価の開発  
The Development of Innovative Evaluation Methods to Confirm the Safety of Regenerative Medicine Using Homogeneous Cultivated Human Corneal Endothelial Cells

研究開発担当者： 木下 茂

所属 役職 氏名： Professor Shigeru Kinoshita, MD. PhD, Department of Frontier Medical Science and Technology for Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan.

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

## II. 成果の概要（総括研究報告）

我々は水疱性角膜症に対する培養ヒト角膜内皮細胞を用いた角膜内皮再生医療の研究開発に取り組んでいる。細胞表面形質を駆使して、細胞移植治療に用いる細胞は不均質細胞垂集団の混合物であり、細胞移植に有効性を示すと考えられる目的細胞はその一部に限定されることが判明した。すなわち培養ヒト角膜内皮細胞は高品質目的細胞、目的外細胞垂集団 X, Y, Z など構成されていることが分かってきた。細胞 (Seeds) の目的細胞の純度、非目的細胞の混在割合、移入細胞から分泌される、あるいは、細胞移入部位に内在する生理活性物質との類似性に基づき目的細胞の品質を評価するとともに、生体 (Soil) 側の因子を評価することが本事業の目的である。

本目的の達成に向けて、下記の6つの研究開発を中心に実施した。全ての研究項目について概ね予定通りの進捗がなされた。連携企業（千寿製薬株式会社）との業務分担も具体化し、近未来の治験申請に向けて、PMDA との対面相談も数回実施して進めてきた。

研究開発項目1は「外観試験を超える最終製造物たる培養細胞の品質評価法の実践検証」である。基盤研究で仮設定の品質規格項目並びに基準値を治験デザインに組み込めるよう新たな評価方法の策定を実施した。

相転移細胞を排除した相対的に均質な細胞集団でも、目的細胞以外に非目的細胞が混在すると予想されたため、その混在の評価法の設定に取り組んだ。

**研究開発項目 2・3は「非侵襲的品質評価法としての分泌型 miRNA、代謝産物の有用性検証」**である。培養細胞亜集団のうち、高品質目的細胞の構成割合・純度を非侵襲的に選別定量、評価できる分泌型 miRNA 分子種、培養細胞のエネルギー代謝産物について細胞プロセッシングセンター（CPC）生産品を用いて品質評価法としての有用性を検証した。miRNA に関しては候補 5 種からさらに絞り込み、2 種類の miRNA が目的細胞から特異的に分泌されていることを確認した。

また代謝産物に関しては Lactate / Pyruvate と Citrate / Lactate の 2 つの指標に絞り込んだものの、今後の個別試験法の実用性検証によっては Proline / Serine の指標の採用の可能性も残している。

**研究開発項目 4は「ハイブリッドセルカウント法による培養細胞の位相差像定量化技術による培養最終細胞産物の治験適用適合性評価」**である。高品質目的細胞は 1 細胞あたりの面積が小さく、培養における細胞密度が最も高くなることが判明している。最終製造法に近い方法で作製した培養ヒト角膜内皮細胞でも細胞面積・細胞密度は正常角膜内皮組織の角膜内皮細胞と同じ水準の細胞面積、細胞密度を示した。

**研究開発項目 5は「プロテインマイクロアレイによる培養液、臨床検体中のタンパクの網羅的評価」**である。独立行政法人 産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター（五島直樹チーム長）研究チームと共同で実施した。同研究チームが有する約 2 万種のヒトタンパク質およびそれに対する特異的抗体を基板上に高密度に転写したプロテインマイクロアレイを用いて、水疱性角膜症患者の血清中に含まれるサイトカイン・タンパク成分を網羅的解析した。

**研究開発項目 6は「培養細胞内の目的細胞、非目的細胞の選択的視覚化技術評価」**である。名古屋大学ナノバイオロジー研究センター馬場嘉信研究室と共同で研究を進めた。培養角膜内皮細胞内の目的細胞、非目的細胞の選択的視覚化技術評価法の確立である。培養ヒト角膜内皮細胞を光量子ドットで標識して、マウスモデルの前房内に移植して in vivo 組織イメージング手法を用い体内動態を検討した。

In our effort to create a novel treatment for patients suffering from bullous keratopathy, we have focused on the development of a corneal endothelial regenerative medicine technique involving the injection of cultivated human corneal endothelial cells (cHCECs). By using cell-surface 'cluster of differentiation' (CD) markers, cHCECs were found to be mixtures of non-homogeneous cell subpopulations, as well as 'target cells' which, although theoretically show the effectiveness, are only part of the subpopulations. In specific, cHCEC populations consist of high-quality target cells, as well as non-target subpopulation cells X, Y, Z, etc.

The purpose of this project was to evaluate the quality of cells (i.e., the 'seeds') in regard to the purity of the target cells, the ratio of target cells and non-target cells, biologically active substances secreted from infused cells or in the inherent infused site, and evaluate those obtained from the living human tissue (i.e., the 'soil').

In our efforts to successfully accomplish the above-described project, which is aimed for clinical trial in the near future, the following 6 research agendas were conducted as planned and with successful results. The role of the materialized findings has been shared in coordination with the corporate partner (Senju Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan), and several consultations with Pharmaceuticals and Medical Devices Agencies have been carried out.

**Research Agenda 1:** To development a novel practical method to assess and confirm the quality of cHCECs as a final medical product that exceeds the current testing methods which are tied merely to cell appearance. Incorporation with tentative specification values developed via the basic research, newly evaluable specification methods were planned for clinical trial. Even though phase-transition cells were precluded in the relatively homogeneous cell subpopulation, specific evaluation methods were established and addressed due to the expected mixed population of 'target cells' and 'non-target cells'.

**Research Agendas 2, 3:** To validate the efficacy of using secreted miRNA and metabolites as a non-invasive method to evaluate cell quality. Among the cHCEC subpopulation, the composition rate and purity of high-quality target cells via non-invasive selection quantification and the secreted miRNA molecular species and metabolism of cells cultured at a cell processing center were evaluated and confirmed. In regard to the miRNA, 2 miRNA were selected from 5 miRNA candidates that are specifically secreted from target cells. In regard to the metabolites, Lactate / Pyruvate and Citrate / Lactate were selected for additional analysis.

**Research Agenda 4:** To test the conformance of 'final product' cHCECs for application in clinical trial, phase-contrast microscopy was used to count the number of cells. In culture, high-quality target cells were found to exist in a small area per cell and to have the highest cell density. Interestingly, cHCECs produced by methods nearly identical to the 'final production' methods were found to have the same level of cell area and density as that in normal corneal endothelial tissue.

**Research Agenda 5:** To comprehensively evaluate the proteins in the culture supernatant and clinical specimens via protein microarray, research was conducted in collaboration with Dr. Goshima at the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. Using protein microarrays containing unique 200,000 human proteins and specific antibodies transcribed on the printed board in a highly dense manner, the cytokines and proteins in serum obtained from bullous keratopathy patients were comprehensively analyzed.

**Research Agenda 6:** To evaluate target cells and non-target cells in the cHCECs via a 'selective visualization' technique, research was conducted in collaboration with Dr. Baba at the Nano-Biology Research Center, Nagoya University. Quantum dot labeling conditions were determined, and then analyzed with in vivo by fluorescence microscopy imaging of mice infused with cHCECs in anterior chamber

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 9件）

#### References

1. Ueno M, Asada K, Toda M, Schlötzer-Schrehardt U, Nagata K, Montoya M, Sotozono C, [Kinoshita S](#), Hamuro J. Gene-signature-based development of Eliza assays for reproducible qualification of cultured human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57:429-305.

2. Hamuro J, Ueno M, Toda M, Sotozono C, Montoya M, Kinoshita S. Cultured human corneal endothelial cell aneuploidy dependence on the presence of heterogeneous subpopulation with distinct differentiation phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:4385-4292.
3. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. Concomitant evaluation of a panel of exosome proteins and MiRs for qualification of cultured human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:4393-4402.
4. Toda M, Ueno M, Yamada J, Hiraga A, Tanaka H, Schlötzer-Schrehardt U, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J. The different binding properties of cultured human corneal endothelial cell subpopulations to Descemet' membrane components. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:4599-4605.
5. Yamada J, Ueno M, Toda M, Shinomiya K, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J. Allogeneic sensitization and tolerance induction after corneal endothelial cell transplantation in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:4572-4580.
6. Hamuro J, Toda M, Asada K, Hiraga A, S Schlötzer-Schrehardt U, Montoya M, Sotozono C, Ueno M, Kinoshita S. Cell homogeneity indispensable for regenerative medicine by cultured human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:4749-4761.
7. Hamuro J, Ueno M, Asada K, Toda M, Montoya M, Sotozono C, Kinoshita S. Metabolic plasticity in cell state homeostasis and differentiation of cultured human corneal endothelial cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:4452-4463.
8. Ueno M, Asada K, Toda M, Hiraga A, Montoya M, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J. MicroRNA profiles qualify phenotypic features of cultured human corneal endothelial cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:5509-5517.
9. Toda M, Ueno M, Hiraga A, Asada K, Montoya M, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J. Production of homogeneous cultured human corneal endothelial cells indispensable for innovative cell therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;5:2011-2020.
10. 羽室淳爾 培養細胞の均質性検査 再生医療細胞治療のための細胞加工物評価技術 (佐藤陽治監修) . 63-73. シーエムシー出版, 東京, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Friedenwald Lecture: Medical science and future realities in corneal regenerative medicine. Kinoshita S. ARVO 2016 Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 2016-05-04. 口頭. 国外
2. Corneal endothelium in health and disease. Kinoshita S. ACS Foundation Visiting Professorship, VNIO, Hanoi, Vietnam, 2016-06-15. 口頭. 国外
3. Paradigm shift of surgical treatment of devastating corneal diseases. Ultramodern concepts in ophthalmology. Kinoshita S. 2nd Chulalongkorn Eye Center - KPUM Joint Meeting, Bangkok, Thailand, 2016-08-23. 口頭. 国外
4. Keynote Lecture: Medical science and clinical research in corneal regenerative medicine. Kinoshita S. EVER2016, Nice, France, 2016-10-06. 口頭. 国外
5. Plenary session: The future of endothelial keratoplasty. Kinoshita S. 2016 APAO Congress, Manila, Philippines, 2016-11-25. 口頭. 国外
6. Corneal endothelium in health and disease, Cornea day. Kinoshita S. Israel Ophthalmological Society Conference 2016, Tel Aviv, Israel, 2016-05-31. 口頭. 国外
7. Divergence between medical breakthroughs in corneal endothelial treatment and applied clinical practice. Kinoshita S. ARVO Mini-Symposium; Corneal Regeneration, ARVO 2016 Annual Meeting, Seattle, 2016-05-02. 口頭. 国外
8. The clinical research on corneal endothelial cell injection therapy. Kinoshita S. Focus Session 2; Clinical Translational Research, 7th EuCornea Congress, Copenhagen, Denmark, 2016-09-09. 口頭. 国外

9. Clinical Research Symposia; Stem Cells and the Eye, Endothelial Stem Cells. Kinoshita S. ESCRS 2016 (34th Congress of ESCRS) Copenhagen, Denmark, 2016-09-10. 口頭. 国外
10. Scientific evidence on cultured human corneal endothelial cell-injection therapy. Kinoshita S. 22nd Biennial Meeting of ISER, Tokyo, Japan, 2016-09-28. 口頭. 国内
11. Instruction course, Diagnosis and management of corneal endothelial diseases. Kinoshita S, Kruse FE, Mehta JS, Jurkunas U, Inatomi T. AAO 2016, Chicago, USA, 2016-10-16. 口頭. 国外
12. Restoring and renewing the endothelium, AAO-APAO Symposium; Corneal endothelial disease; Current surgical treatment and the future of endothelial cell Stimulation and cultured substitute. Kinoshita S. AAO 2016, Chicago, USA, 2016-10-18. 口頭. 国外
13. Cornea and external disease symposium, Corneal regenerative medicine. Kinoshita S. 2016 PAO Congress, Manila, Philippines, 2016-11-24. 口頭. 国外
14. Symposium 13. The corneal endothelial cell puzzle. Kinoshita S. JCS Symposium- Regenerative Medicine of the Cornea. 5th Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting, Seoul, Korea, 2016-12-10. 口頭. 国外
15. Regulation of mitochondrial respiration under cell culture stress in human corneal endothelial cells. Kinoshita S, Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Hamuro J. ARVO 2016 Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 2016-05-03 口頭. 国外
16. Metabolic plasticity in the cell-state homeostasis and differentiation of cultured human corneal endothelial cells. Hamuro J, Ueno M, Asada K, Toda M, Montoya M, Sotozono C, Kinoshita S. ARVO 2016 Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 2016-05-03. ポスター. 国外
17. Allogeneic sensitization and tolerance induction post corneal endothelial cell injection into the anterior chamber. Yamada J, Ueno M, Toda M, Shinomiya K, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J. ARVO 2016 Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 2016-05-04. 口頭. 国外
18. The role of dysregulated expression of miRs in the pathogenesis of bullous keratopathy and Fuchs' endothelial corneal dystrophy. Asada K, Ueno M, Toda M, Hiraga A, Montoya M, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J. ARVO 2016 Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 2016-05-04. ポスター. 国外
19. Quantifying the adhesion strength of human corneal endothelial cells in an in vitro model. Tanaka H, Yamamoto A, Hamuro J, Sotozono C, Kinoshita S, Ueno M, Tanaka M. ARVO 2016 Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 2016-05-04. ポスター. 国外
20. Profiles of cytokines in the aqueous humor and serum of bullous keratopathy patients. Ueno M, Toda M, Hiraga A, Wakimasu K, Koizumi N, Okumura N, Asada K, Sotozono C, Hamuro J, Kinoshita S. ARVO 2016 Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 2016-05-04. ポスター. 国外
21. The cell homogeneity is indispensable for regenerative medicine by cultivated human corneal endothelial cells. Toda M, Ueno M, Hiraga A, Asada K, Montoya M, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J. ARVO 2016 Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 2016-05-04. ポスター. 国外
22. Concomitant evaluation of a panel of exosome proteins and miRs for qualification of cultured human corneal endothelial cells. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. ISEV2016 Annual Meeting, Rotterdam, Netherlands, 2016-05-05. ポスター. 国外

23. 再生医療等安全性確保法により必要であった体制整備. 今井浩二郎, 上野盛夫, 萩屋道雄, 外園千恵, 羽室淳爾, 木下茂. 第 120 回日本眼科学会総会, 仙台, 2016-04-08. 口頭. 国内
24. 水疱性角膜症患者の血清中および前房水中サイトカインプロファイルの検討. 上野盛夫, 戸田宗豊, 平賀朝子, 小泉範子, 奥村直毅, 浅田和子, 外園千恵, 羽室淳爾, 木下茂. 第 120 回日本眼科学会総会, 仙台, 2016-04-10. 口頭. 国内
25. 培養ヒト角膜内皮細胞亜集団の特性解析. 戸田宗豊, 上野盛夫, 平賀朝子, 浅田和子, 外園千恵, 木下茂, 羽室淳爾. 第 120 回日本眼科学会総会, 仙台, 2016-04-10. 口頭. 国内
26. 角膜内皮細胞機能不全における epigenetic な細胞機能制御. 浅田和子, 上野盛夫, 戸田宗豊, 平賀朝子, 落合孝広, 外園千恵, 木下茂, 羽室淳爾. 第 120 回日本眼科学会総会, 仙台, 2016-04-10. 口頭. 国内
27. 角膜内皮細胞機能不全における epigenetic な細胞機能制御. 羽室淳爾, 上野盛夫, 浅田和子, 戸田宗豊, 外園千恵, 木下茂. 第 120 回日本眼科学会総会, 仙台, 2016-04-10. 口頭. 国内
28. 培養ヒト角膜内皮細胞移植による角膜内皮再生医療の実現化. 上野盛夫. 平成 28 年度京都府立医科大学再生医療シンポジウム, 京都, 2016-09-23. 口頭. 国内

### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 培養ヒト角膜内皮細胞移植による角膜内皮再生医療の実現化. 木下茂. 平成 28 年度 AMED 再生医療公開シンポジウム, 東京, 2017-02-02. 国内.

### (4) 特許出願

国内出願 4 件 公開

PCT出願 1 件 未公開