

明 細 書

発明の名称：

眼疾患治療剤、そのスクリーニング方法または網膜色素上皮細胞移植に伴う拒絶反応の予測方法

技術分野

[0001] 本発明は、眼疾患治療剤、そのスクリーニング方法および網膜色素上皮細胞移植に伴う拒絶反応の予測方法に関する。

背景技術

[0002] 主要組織適合抗原（MHC）はヒトではHLA（Human leukocyte antigen：ヒト白血球抗原）として知られほとんどの細胞や組織に発現している。HLAは主にA, B, C, DR, DQ, DPの6座抗原があり、さらにそれぞれが数十種類の異なるタイプ（アレル）の複雑な組み合わせで構成されており、その組み合わせは数万通り存在する。HLAはヒトの体内で重要な免疫機構を担っており、その主な役割は自他認識をするための抗原提示である。もし他人に自己以外の細胞・組織を移植した場合（他家移植）、このHLAが最も重要な抗原（異物）としてT細胞などの免疫担当細胞に認識され、拒絶が成立し移植片が生着されなくなる。

[0003] 通常の臓器移植、特に骨髄移植においては、原則的にHLAの各抗原であるA, B, C, DR, DQ, DPの6座抗原をすべて一致させる必要があると考えられており、一致できない場合は深刻な拒絶反応が生じるリスクがあり、また移植後の予後も悪くなると言われている。

[0004] 網膜色素上皮細胞は眼内に浸潤する炎症細胞（Th1細胞、CD8陽性細胞、マクロファージ、B細胞など）を抑制する分子を発現・産生しており、同種のオート炎症性細胞に対して抑制シグナルを与えることが知られている（例えば、非特許文献1、2）。一方で同様の条件下で制御性T細胞には促進的なシグナルを与えることが知られている（非特許文献3、4）。一方、網膜色素上皮細胞は異種T細胞（Th22細胞）を抑制することも知られており（非特許文

献5)、網膜色素上皮細胞自体には免疫抑制機能が存在し、これにより網膜色素上皮細胞周辺の環境は免疫反応が抑制される方向にあることが知られている。またIFN- γ 又はマクロファージで前処理したヒト網膜色素上皮細胞をアロT細胞と共培養すると、IL-2等の産生上昇によりT細胞の活性化が認められることが知られている(非特許文献6)。またIFN- γ はMHCクラスII分子の発現に重要な役割を果たすことが知られている(非特許文献7)。しかしながら、現在までに網膜色素上皮細胞(以下「RPE細胞」と記載する)を用いた網膜疾患患者への移植でHLA適合を考慮したアロ移植ストラテジーはなかった。

先行技術文献

非特許文献

- [0005] 非特許文献1: Sugita S et al, J Immunol. 2004, 172: 4184-4194.
非特許文献2: Sugita S et al, J Immunol. 2006, 176: 118-127.
非特許文献3: Sugita S et al, J Immunol, 2008, 181: 7525-7536.
非特許文献4: Sugita S et al, J Immunol, 2009, 183: 5013-5022.
非特許文献5: Sugita S et al, IOVS, 2013, vol. 54, No. 10: 6926-6933.
非特許文献6: Enzmann V et al. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2001 Jul;239(6):445-51
非特許文献7: Enzmann V. Transplant Immunology 7:9-14, 1999

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明の目的は、眼疾患治療剤および眼疾患治療剤のスクリーニング方法などを提供することである。さらに本発明の別の目的は、眼疾患患者への網膜色素上皮細胞移植に伴う免疫拒絶反応の予測方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは、複数の被験者から得たT細胞、iPS細胞由来網膜色素上皮(RPE)細胞を取得し、HLAタイピングを行ったうえで、前記T細胞とRPE細胞を接

触培養することで、T細胞から産生されるサイトカイン濃度を測定したところ、前記T細胞のHLA-A, HLA-B, HLA-DRの3遺伝子座のアレルが、HLA-A, HLA-B, HLA-DRの3遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞の各遺伝子座におけるアレルと一致する場合、サイトカイン濃度がT細胞単独の場合と同等か、それよりも低下するという知見を得た。

本発明者は、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本発明は以下に関する。

[1] HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞を含有してなる、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが当該網膜色素上皮細胞の当該遺伝子座におけるアレルと一致した組合せを有する眼疾患患者のための、眼疾患治療剤。

[2] 移植後の免疫拒絶反応を抑制する、[1]に記載の剤。

[3] 網膜色素上皮細胞が多能性幹細胞由来である、[1]または[2]に記載の剤。

[4] 多能性幹細胞がiPS細胞である、[3]に記載の剤。

[5] 眼疾患が、網膜変性または網膜変性に伴う疾患である、[1]～[4]のいずれか一つに記載の剤。

[6] 眼疾患患者に対する眼疾患治療剤を選択する方法であって、

(イ) 患者由来T細胞のHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型を調べる工程、

(ロ) 工程(イ)で判明した各遺伝子座におけるアレルと一致するアレルを有する網膜色素上皮細胞を選択する工程

を含む、方法。

[7] 工程(ロ)における網膜色素上皮細胞が有するHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である、[6]に記載の方法。

[8] 眼疾患患者に対する眼疾患治療剤を選択する方法であって、
(1) 患者由来T細胞を、網膜色素上皮細胞と接触培養する工程、
(2) 工程 (1) の培養上清中に分泌された炎症性サイトカイン濃度を測定する工程、および
(3) 工程 (2) における炎症性サイトカイン濃度が患者由来T細胞を単独で培養した培養上清中の炎症性サイトカイン濃度と同程度、あるいはそれ以下である場合に、当該網膜色素上皮細胞を当該患者に対する眼疾患治療剤の有効成分として用いることができると判定する工程、
を含む、方法。

[9] 当該網膜色素上皮細胞が有するHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である、[8] に記載の方法。

[1 0] 工程 (1) における患者由来T細胞が、抗CD3抗体を用いて活性化されている、[8] または [9] に記載の方法。

[1 1] 工程 (1) における患者由来T細胞がCD4陽性であり、工程 (2) において測定する炎症性サイトカインがIFN- γ である、[8] ~ [1 0] のいずれか一つに記載の方法。

[1 2] 工程 (1) における患者由来T細胞がCD8陽性であり、工程 (2) において測定する炎症性サイトカインがグランザイムBである、[8] ~ [1 0] のいずれか一つに記載の方法。

[1 3] 移植用網膜色素上皮細胞を移植する眼疾患患者における拒絶反応を予測するための試験方法であって、

- (A) 患者由来T細胞を、当該網膜色素上皮細胞と接触培養する工程、
- (B) 工程(A)の培養上清中に分泌された炎症性サイトカイン濃度を測定する工程、および
- (C) 工程(B)における炎症性サイトカイン濃度が、患者由来T細胞を単独で培養した培養上清中の炎症性サイトカイン濃度より有意に高い場合に、当該網膜色素上皮細胞に対する拒絶反応を生ずると判定する工程、

を含む、方法。

〔14〕当該移植用網膜色素上皮細胞が有するHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である、〔13〕に記載の方法。

〔15〕工程(A)における患者由来T細胞が、抗CD3抗体を用いて活性化されている、〔13〕または〔14〕に記載の方法。

〔16〕工程(A)における患者由来T細胞がCD4陽性であり、工程(B)において測定する炎症性サイトカインがIFN- γ である、〔13〕～〔15〕のいずれか一つに記載の方法。

〔17〕工程(A)における患者由来T細胞がCD8陽性であり、工程(B)において測定する炎症性サイトカインがグランザイムBである、〔13〕～〔15〕のいずれか一つに記載の方法。

〔18〕HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞をシートにして、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが当該網膜色素上皮細胞の当該遺伝子座におけるアレルと一致した組合せを有する眼疾患患者に移植する、眼疾患の治療方法。

〔19〕網膜色素上皮細胞が多能性幹細胞由来である、〔18〕に記載の方法。

〔20〕多能性幹細胞がiPS細胞である、〔19〕に記載の方法。

〔21〕眼疾患が、網膜変性または網膜変性に伴う疾患である、〔18〕～〔20〕のいずれか一つに記載の方法。

〔22〕HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞であって、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが当該網膜色素上皮細胞の当該遺伝子座におけるアレルと一致した組合せを有する眼疾患患者の眼疾患の治療に使用するための、網膜色素上皮細胞。

〔23〕網膜色素上皮細胞が多能性幹細胞由来である、〔22〕に記載の網

膜色素上皮細胞。

〔24〕多能性幹細胞がiPS細胞である、〔23〕に記載の網膜色素上皮細胞。

〔25〕眼疾患が、網膜変性または網膜変性に伴う疾患である、〔22〕～〔24〕のいずれか一つに記載の網膜色素上皮細胞。

〔26〕HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞であって、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが当該網膜色素上皮細胞の当該遺伝子座におけるアレルと一致した組合せを有する眼疾患患者の眼疾患の治療剤を製造するための、網膜色素上皮細胞。

〔27〕網膜色素上皮細胞が多能性幹細胞由来である、〔26〕に記載の網膜色素上皮細胞。

〔28〕多能性幹細胞がiPS細胞である、〔27〕に記載の網膜色素上皮細胞。

〔29〕眼疾患が、網膜変性または網膜変性に伴う疾患である、〔26〕～〔28〕のいずれか一つに記載の網膜色素上皮細胞。

発明の効果

[0009] 従来の他家移植においてはドナーとレシピエントのHLA型をできるだけ一致させることが求められていた。特に骨髄移植においては、HLA型として知られる6座抗原のアレル全てをマッチさせることが必要と考えられてきた。しかしながら、本発明によれば、RPE細胞移植においてドナー側のHLA-A、HLA-B及びHLA-DRの三遺伝子座における遺伝子型がホモ接合型の場合、レシピエントのHLA座の片方のマッチングだけで拒絶反応を抑制することが可能になる。したがって、患者から事前に採血することにより免疫学的に適合しない移植細胞を判別・選択できるため、不適合な細胞の移植を回避することにより患者の負担を軽減できる。この方法により選択されたRPE細胞は移植に用いることが可能である。

[0010] また本発明を免疫抑制剤の要否判定に用いることにより、治療方針の選択

に寄与する。よって本発明は他家移植による治療効率を著しく向上することに寄与し、しかも移植に適さない細胞の調製コスト削減などの効果も奏する。

あるいはHLA-A、HLA-B及びHLA-DRの三遺伝子座における遺伝子型がホモ接合型のRPE細胞は、当該三遺伝子座における少なくとも片方のアレルが当該網膜色素上皮細胞のアレルと一致した組合せを有する患者用の眼疾患治療剤として用いることができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]CD4陽性T細胞浮遊液(TLHD-1, TLHD-2)と454E2-iPS由来RPE細胞を共培養した場合における、培養上清中のIFN- γ の濃度を示す。

[図2]CD4陽性T細胞浮遊液(TLHD-2, TLHD-3, TLHD-4, TLHD-6, TLHD-7, TLHD-8, TLHD-9)と454E2-iPS由来RPE細胞を共培養した場合、ならびにTLHD-1由来T細胞浮遊液及びTLHD-1由来iPS細胞由来RPE細胞を共培養した場合における、培養上清中のIFN- γ の濃度を示す。

[図3]CD4陽性T細胞浮遊液(TLHD-1)と各種RPE細胞（表2におけるNo.1～3、6～10）またはマウス線維芽細胞を共培養した場合における、培養上清中のIFN- γ の濃度を示す。

[図4]CD4陽性T細胞浮遊液(TLHD-1, TLHD-8, TLHD-14, TLHD-21)と453F2-iPS由来RPE細胞を共培養した場合における、培養上清中のIFN- γ の濃度を示す。

[図5]CD8陽性T細胞浮遊液(TLHD-1, TLHD-8, TLHD-14, TLHD-22)と453F2-iPS由来RPE細胞を共培養した場合における、培養上清中のGranzyme Bの濃度を示す。

[図6]CD4陽性T細胞浮遊液(TLHD-1)と454E2-iPS由来RPE細胞を共培養した場合における、IL-2、IFN- γ 、IL-17、TNF- α 、IL-22を産生するCD4陽性T細胞の割合をFACSで示す。

[図7]CD4陽性T細胞浮遊液(TLHD-1, TLHD-10)と454E2-iPS由来RPE細胞を共培養した場合における、各種サイトカインの産生量を示す。

[図8]CD8陽性T細胞浮遊液(TLHD-1)と454E2-iPS由来RPE細胞を共培養した場合

における、Granzyme B、Perforin、TNF- α を産生するCD8陽性T細胞の割合をFACSで示す。

[図9]CD8陽性T細胞浮遊液(TLHD-1, TLHD-3)と454E2-iPS由来RPE細胞を共培養した場合における、培養上清中のGranzyme Bの濃度を示す。

[図10]CD8陽性T細胞浮遊液(TLHD-2, 4, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20)と454E2-iPS由来RPE細胞を共培養した場合における、培養上清中のGranzyme Bの濃度を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明は、HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞を含有してなる、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが当該網膜色素上皮細胞の当該遺伝子座におけるアレルと一致した組合せを有する眼疾患患者のための、眼疾患治療剤（以下、「本発明の治療剤」という）を提供する。

[0013] 本発明の治療剤は、網膜色素上皮細胞を含有する。本発明において「網膜色素上皮細胞」とは、網膜色素上皮を構成する上皮細胞、及びその前駆細胞をいう。網膜色素上皮細胞であるかは、例えば、細胞マーカー（RPE65、CRALBP、MERTK、BEST1等）の発現や、細胞の形態（細胞内のメラニン色素沈着、多角形で扁平状の細胞形態、多角形のアクチン束の形成等）等により確認できる。また、網膜色素上皮細胞の前駆細胞とは、網膜色素上皮細胞への分化誘導が方向づけられた細胞を意味し、当該前駆細胞であるかは、細胞マーカー（Mitf、Pax6、Rx、Crx等）の発現等により確認できる。また網膜色素上皮細胞の機能評価は、例えばサイトカイン（VEGFやPEDF等）の分泌能や貪食能等を指標により確認できる。これらの機能評価および確認操作は、当業者であれば適宜条件を設定して実施することが可能である。

[0014] また、本発明における網膜色素上皮細胞は、例えば哺乳動物に由来する網膜色素上皮細胞を使用できる。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトが挙げられる。ヒトへの移植等を目的として網膜色素

上皮細胞を製造する場合等には、ヒト網膜色素上皮細胞が好ましく用いられる。

[0015] 前記「網膜色素上皮細胞」は、直接採取した初代細胞でもよく、あるいは、それらを何代か継代させたものでもよい。初代網膜色素上皮細胞は公知の方法で単離することができ、例えば、網膜色素上皮細胞は死体眼球摘出後、速やかに赤道部で眼球を分割し、硝子体と網膜を除去した後、必要に応じてコラゲナーゼやヒアルロニダーゼ等で処理し、セルスクレーパーによる擦過またはトリプシンやEDTA溶液にて細胞をブルッフ膜より遊離させて回収した後、培養液の中で静置することにより培養皿への接着、増殖を誘導することにより必要量の細胞を増殖させ、トリプシン処理などで適宜継代し細胞数を確保することができる。

[0016] さらに前記「網膜色素上皮細胞」は、多能性幹細胞、神経幹細胞などの体性幹細胞を含む幹細胞、あるいは神経前駆細胞、網膜前駆細胞を含む前駆細胞を分化誘導することによって得られる細胞であっても良いが、多能性幹細胞を分化誘導して得られる細胞が好ましい。

[0017] 本発明における「多能性幹細胞」は、自己複製能と分化多能性を有する幹細胞を意味し、特に限定されることはなく、例えば、胚性幹細胞（ES細胞）、iPS細胞（人工多能性幹細胞）等が広く利用される。好ましくはヒトES細胞またはヒトiPS細胞が利用され、より好ましくはヒトiPS細胞が利用される。

[0018] 本発明における「iPS細胞」は、体細胞（例えば線維芽細胞、皮膚細胞、リンパ球等）へ核初期化因子を接触させることにより、人為的に自己複製能及び分化多能性を獲得した細胞をいう。iPS細胞は、体細胞（例えば線維芽細胞、皮膚細胞等）にOct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycからなる核初期化因子を導入する方法で初めて見出された（Cell, 126: p. 663-676, 2006）。その後、多くの研究者により、リプログラム因子の組み合わせや因子の導入法について様々な改良が進められており、多様な誘導多能性幹細胞の製造法が報告されているが、本発明におけるiPS細胞の製造法は、特に限定されるものではない。

[0019] 本発明における「網膜色素上皮細胞」は、HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型であることが好ましい。遺伝子型がホモ接合型であるとは、2つのアレルが同一の塩基配列を有する遺伝子同士であることを指す。後述する実施例において、被験者から採取したT細胞およびiPS細胞を分化誘導して得られる網膜色素上皮細胞を共培養した結果、HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞に対して、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが該網膜色素上皮細胞の該遺伝子座におけるアレルと一致した組合せを有するT細胞は、サイトカイン産生がコントロール（T細胞単独の場合）と同程度か、あるいは驚くべきことに抑制されることを見出した。

[0020] 従来、網膜色素上皮細胞は、T細胞をはじめとする炎症性細胞を抑制する分子を発現し、かつ制御性T細胞には促進的なシグナルを与えることが知られていた。しかしながらこれらの多くは同種のオート細胞に対する結果であった（例えば、背景技術の非特許文献1～4）。一方で網膜色素上皮細胞が異種T細胞を抑制することも発明者らによって報告されているが（例えば、背景技術の非特許文献5）、これは単に網膜色素上皮細胞そのものの機能を示しているに過ぎない。実際に異種移植では急性拒絶反応が大きな問題となり、網膜色素上皮細胞が抗原提示するわけではないため、発明者らによるこれらの報告は本発明を何ら示唆するものではない。

[0021] 以上のことから、網膜色素上皮細胞移植においてドナー側のHLA-A、HLA-B及びHLA-DRの三遺伝子座における遺伝子型がホモ接合型の場合、レシピエントのHLA遺伝子座の片方のアレルのマッチングだけで拒絶反応を抑制することが可能になり、網膜色素上皮を移植する必要がある眼疾患患者に迅速に移植用細胞を供給することができる。本発明は、アロの網膜色素上皮細胞移植においてドナー側のHLA-A、HLA-B及びHLA-DRの三遺伝子座における遺伝子型がホモ接合型の場合、レシピエントのHLA座の片方のマッチングだけで拒絶反応を抑制できることを発見したことに起因して完成した発明であり、その発見

に大きな意義がある。また、本発明の最終目的は、網膜色素上皮細胞の他家移植において生じ得る免疫拒絶反応を出来る限り抑えることにある。その観点から本発明における眼疾患患者に投与する眼疾患治療剤の有効成分たるHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞は他家細胞であり、当該遺伝子座における遺伝子型がホモ接合型である様々な網膜色素上皮細胞から当該患者に適した網膜色素上皮細胞が選択される。

[0022] 眼疾患患者から取得したT細胞のHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型は、公知の方法で調べることができ、例えば、後述の実施例の通り、HLAタイピングを実施することで容易に決定することができる。また本発明の剤で用いられる網膜色素上皮細胞の各遺伝子座における遺伝子型も同様の方法で調べることができるが、予め各遺伝子座における遺伝子型がホモ接合型で具体的なアレルも判明している様々な網膜色素上皮細胞をストックしておいて、この中から眼疾患患者に適切な細胞を選択して用いるといった使用法が望まれる。

[0023] 本発明の治療剤を適用できる眼疾患としては、網膜変性または網膜変性に伴う疾患が挙げられる。網膜変性または網膜変性に伴う疾患としては、例えば、加齢黄斑変性疾患、網膜色素変性症、糖尿病性網膜症、及び網膜剥離等の網膜変性疾患が挙げられる。

[0024] 本発明の治療剤を適用できる眼疾患患者は、本発明の治療剤に含まれる網膜色素上皮細胞のHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座においてホモ接合型として保持されているアレルに対して、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが一致した組合せを有する眼疾患患者であることが好ましい。

[0025] 本発明の治療剤の適用できる眼疾患部位の範囲は、対象疾患、投与対象の動物種、年齢、性別、体重、症状などに依存して適宜選択される。

[0026] 本発明の治療剤の使用方法としては、例えば、シート状にして移植することができる。網膜色素上皮細胞をシート化する方法は公知であり、例えば、W

02012/115244に記載されている。網膜色素上皮細胞シートは、一度にもしくは数回に分けて移植してもよい。移植の適用回数は疾患に応じて医療従事者、ガイドラインに従って決定されるが、例えば疾患が加齢黄斑変性疾患であった場合には、移植用細胞シートを、その重篤度によって2回以上移植してもよい。また複数回移植を行う場合、インターバルは特に限定されないが、数日～数週間の期間を置いても良い。あるいは本発明の治療剤は、細胞を分散させた状態で直接対象の部位に移植してもよい。移植の適用回数はシートの場合と同様にガイドライン等に従って決定され、移植期間等もシートの場合と同様に適宜決定される。

[0027] 本発明はまた、眼疾患患者に対する眼疾患治療剤を選択する方法を提供する。

具体的には、本発明の眼疾患治療剤を選択する方法（以下、「本発明の方法（１）」という）は以下の工程を含む：

（イ）患者由来T細胞のHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型を調べる工程、

（ロ）工程（イ）で判明した各遺伝子座におけるアレルと一致するアレルを有する網膜色素上皮細胞を選択する工程。

[0028] 本発明の方法（１）の工程（イ）において、眼疾患患者から取得したT細胞のHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型は、公知の方法で調べることができ、例えば、後述の実施例の通り、HLAタイピングを実施することで容易に決定することができる。本発明の方法（１）におけるT細胞の由来となる患者の眼疾患は、本発明の治療剤の適用対象となる眼疾患と同一であってよい。

[0029] 本発明の方法（１）の工程（ロ）において選択される、前記の工程（イ）で判明した各遺伝子座におけるアレルと一致するアレルを有する網膜色素上皮細胞は、眼疾患患者に適用した際に拒絶反応が生じない眼疾患治療剤として有用である。また、本発明の方法（１）における、網膜色素上皮細胞が有するHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型は

それぞれホモ接合型であることが好ましい。本発明の方法（１）における網膜色素上皮細胞の調製は、本発明の治療剤に含まれる網膜色素上皮細胞の調製と同一であってよい。

[0030] 本発明はまた、別の眼疾患患者に対する眼疾患治療剤を選択する方法を提供する。

具体的には、本発明の眼疾患治療剤を選択する方法（以下、「本発明の方法（２）」という）は以下の工程を含む：

- （１）患者由来T細胞を、網膜色素上皮細胞と接触培養する工程、
- （２）工程（１）の培養上清中に分泌された炎症性サイトカイン濃度を測定する工程、および
- （３）工程（２）における炎症性サイトカイン濃度が患者由来T細胞を単独で培養した培養上清中の炎症性サイトカイン濃度と同程度、あるいはそれ以下である場合に、当該網膜色素上皮細胞を当該患者に対する眼疾患治療剤の有効成分として用いることができると判定する工程。

[0031] 本発明の方法（２）の工程（１）において、患者由来T細胞と網膜色素上皮細胞との接触培養は、後述の実施例の記載の方法に従って、実施することができる。具体的には、96穴プレートに、患者由来T細胞を播種し、網膜色素上皮細胞を加え、培養する。本工程において、患者由来T細胞は、予め活性化されていてもよい。T細胞の活性化方法としては特に限定されないが、例えば、抗CD3抗体を添加することによって実施することができる。また、T細胞はCD4陽性細胞とCD8陽性細胞に予め分離して調製されてもよい。

また、本工程において使用される網膜色素上皮細胞について、培養中に網膜色素上皮細胞が増殖することを避けるべく、予め放射線処理してもよい。さらに、培養に用いる網膜色素上皮細胞は、HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型はそれぞれホモ接合型であることが好ましい。

[0032] 培養培地は、当技術分野で通常用いられる細胞培養用培地であれば特に制限なく用いることができる。例えば、F-10培地、F12培地、MEM、BME培地、DM

EM、 α MEM、IMD培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、WE培地およびRPMI1640培地等の基礎培地を用いることができる。さらに、基礎培地に必要に応じて血清（ウシ胎児血清等）、各種増殖因子（EGF、FGF、HGF、PDGFなど）、抗生物質、アミノ酸などを加えてもよい。培地のpHは、好ましくは約6～約8である。培養は、例えば、通常約30～約40℃で、約15～約60時間、好ましくは48時間で行うことができる。また、培養に際して、患者由来T細胞と網膜色素上皮細胞の細胞数の比率は、通常、500:1～10:1、好ましくは、400:1～25:1、より好ましくは、200:1～50:1である。患者由来T細胞と網膜色素上皮細胞の細胞数の比率をこの範囲に設定することによって、T細胞が適切な量の炎症性サイトカインあるいは細胞傷害物質を分泌するため、対象となる網膜色素上皮細胞が当該患者に適用できるかをより明確に判定することが可能となる。

本発明の方法（2）におけるT細胞の由来となる患者の眼疾患は、本発明の治療剤の適用対象となる眼疾患と同一であってよく、網膜色素上皮細胞の調製は、本発明の治療剤に含まれる網膜色素上皮細胞の調製と同一であってよい。

[0033] 本発明の方法（2）の工程（2）において、培養上清中に分泌された炎症性サイトカイン濃度の測定は、後述の実施例の記載の方法に従って、実施することができる。具体的には、ELISA、ウェスタンブロット、FACS等によって測定することができる。また、本工程において測定する炎症性サイトカインは、拒絶反応に関与するサイトカインであれば特に制限されないが、例えば、工程（1）において、患者由来T細胞としてCD4陽性細胞を使用した場合は、IFN- γ 、IL-17およびTNF- α が挙げられ、その中でもIFN- γ がより好ましい。また、工程（1）において、患者由来T細胞としてCD8陽性細胞を使用した場合は、Granzyme B、Perforin、TNF- α が挙げられ、その中でもGranzyme Bがより好ましい。

[0034] 後述の実施例の通り、被験者から採取したT細胞およびiPS細胞を分化誘導して得られる網膜色素上皮細胞を共培養した結果、HLA-A遺伝子座、HLA-B遺

伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞に対して、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが該網膜色素上皮細胞の該遺伝子座におけるアレルと一致した組合せを有するT細胞は、サイトカイン産生がコントロールと同程度か抑制されることを見出した。従って、本発明の方法（2）の工程（3）において、工程（2）で測定された炎症性サイトカイン濃度が患者由来T細胞を単独で培養した培養上清中の炎症性サイトカイン濃度と同程度、あるいはそれ以下である場合に、当該網膜色素上皮細胞を当該患者に対する眼疾患治療剤の有効成分として用いることができると判定できる。

[0035] 本発明はまた、移植用網膜色素上皮細胞を移植する眼疾患患者における拒絶反応を予測するための試験方法を提供する。具体的には、本発明の拒絶反応を予測する方法（以下、「本発明の方法（3）」という）は以下の工程を含む：

- (A) 患者由来T細胞を、当該網膜色素上皮細胞と接触培養する工程、
- (B) 工程(A)の培養上清中に分泌された炎症性サイトカイン濃度を測定する工程、および
- (C) 工程(B)における炎症性サイトカイン濃度が、患者由来T細胞を単独で培養した培養上清中の炎症性サイトカイン濃度より有意に高い場合に、当該網膜色素上皮細胞に対する拒絶反応を生ずると判定する工程。

[0036] 本発明の方法（3）の工程（A）および(B)は、本発明の方法（2）の工程（1）および（2）と同様に実施することができる。また、後述の実施例の通り、被験者から採取したT細胞およびiPS細胞を分化誘導して得られる網膜色素上皮細胞を共培養した結果、HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞に対して、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが該網膜色素上皮細胞の該遺伝子座におけるアレルと不一致である組合せを有するT細胞は、サイトカイン産生がコントロールよりも上昇することを見出した。従って、本発明の方法（3）の工程（C）において、工程（B）で測定された炎症性サ

イトカイン濃度が患者由来T細胞を単独で培養した培養上清中の炎症性サイトカイン濃度より有意に高い場合に、当該網膜色素上皮細胞に対する拒絶反応を生ずると判定できる。

実施例

[0037] 以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは単なる例示であって、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

[0038] (調製例1) ヒトiPS細胞由来RPE細胞の調製

iPS細胞として、Nature Methods 8, 409-412 2011に開示されたiPS細胞株454E2あるいは453F2(京都大学より提供)を用い、J Cell Sci (2009)122: 3169-3179に記載の分化誘導方法に準じて、454E2-iPS細胞由来RPE細胞および453F2-iPS細胞由来RPE細胞(両細胞はHLA-A, -B, -DR3遺伝子座における遺伝子型がホモ接合型である)を調製した。

またiPS細胞株として、454E2あるいは453F2に代えて、被験者名TLHD-1のヒト皮膚由来線維芽細胞よりNature (2011) 474: 225-229に記載の方法に準じて樹立されたiPS細胞を用い、同様の方法でTLHD-1-iPS細胞由来RPE細胞を調製した。

[0039] (調製例2) ヒトT細胞浮遊液の調製

ヒト末梢血(被験者名; TLHD-1~TLHD-22)からMACS磁気分離装置を用いてCD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞を分離し、100U/ml rhIL-2 含有RPMI培養液(RPMI 1640 445ml、FBS 50ml、ペニシリンーストレプトマイシン5ml)に懸濁して各細胞浮遊液を調製した。

[0040] (参考1) HLAタイピング

実施例1~8に用いた細胞のHLAタイピングを慣用の方法で行った結果を以下の表に示す。調製例2で得られた被験者における各T細胞のHLAタイピング結果を表1-1、1-2に、そして調製例1や他のiPS細胞から誘導したヒトiPS由来RPE細胞のHLAタイピング結果を表2に示した。

[0041] 454E2-iPS細胞由来RPE細胞(HLA-A, HLA-B, HLA-DRの3座ホモ)に対して、被験者名TLHD-10およびTLHD-21はHLA-A, HLA-B, HLA-DRの3遺伝子座における

遺伝子型の全てでアレルが一致しており、被験者名TLHD-6, 18はHLA-B, HLA-DRの2遺伝子座における遺伝子型でアレルが一致、被験者名TLHD-2, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 22はHLA-Aの1遺伝子座の遺伝子型のみにおいてアレルが一致、被験者名TLHD-19はHLA-DRの1遺伝子座の遺伝子型のみにおいてアレルが一致していた。

また、453F2-iPS細胞由来RPE細胞（HLA-A, HLA-B, HLA-DRの3座ホモ）に対して、被験者名TLHD-1, 4, 18は2遺伝子座における遺伝子型でアレルが一致しており、被験者名TLHD-6はHLA-Aの1遺伝子座の遺伝子型のみにおいてアレルが一致していた。

[0042]

[表1-1]

No.	T cells	Origin	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	T cell response to	
						454E2*	HLA-matched to 454E2
1	TLHD1	PBMCs	A11/- (11:01/-)	B62/B67 (15:01/67:01)	DR9/DR16 (09:01/16:02)	CD4 (+) / CD8 (+)	
2	TLHD2	PBMCs	A24/33 (24:02/33:03)	B44/B55 (44:03/55:02)	DR4/DR13 (04:05/13:02)	CD4 (+) / CD8 (-)	A24:02
3	TLHD3	PBMCs	A2/A26 (02:01/26:03)	B44/B61 (40:06/44:03)	DR4/DR8 (04:05/08:03)	CD4 (+) / CD8 (+)	DQB1 06:01
4	TLHD4	PBMCs	A2/A3 (02:01/03:01)	B62/B51 (15:01/51:01)	DR4/DR4 (04:02/04:06)	CD4 (+) / CD8 (+)	
5	TLHD5	PBMCs	A24/A33 (24:02/33:03)	B7/B44 (07:02/44:03)	DR1/DR13 (01:01/13:02)	CD4 (+) / CD8 (+)	A24:02
6	TLHD6	PBMCs	A11/A26 (11:01/26:02)	B39/B52 (39:01/52:01)	DR8/DR15 (08:03/15:02)	CD4 (-) / CD8, nt	B52:01 DRB1 15:02
7	TLHD7	PBMCs	A24/A26 (24:02/26:01)	B35/B54 (35:01/54:01)	DR14/DR15 (14:05/15:01)	CD4 (+) / CD8, nt	A24:02
8	TLHD8	PBMCs	A26/A26 (26:01/26:03)	B13/B35 (13:01/35:01)	DR12/DR15 (12:02/15:01)	CD4 (+) / CD8 (+)	
9	TLHD9	PBMCs	A24/A26 (24:02/26:03)	B51/B54 (51:01/54:01)	DR4/DR12 (04:05/12:01)	CD4 (+) / CD8, nt	A24:02
10	TLHD10	PBMCs	A24/A31 (24:02/31:01)	B61/B52 (40:02/52:01)	DR15/DR15 (15:01/15:02)	CD4 (-) / CD8 (-)	A24:02/B52:01 DRB1 15:02
11	TLHD11	PBMCs	A24/- (24:02/-)	B7/B59 (07:02/59:01)	DR4/DR9 (04:05/09:01)	CD4, nt / CD8 (-)	A24:02
12	TLHD12	PBMCs	A24/A26 (24:02/26:01)	B51/B54 (51:01/54:01)	DR14/DR14 (14:03/14:05)	CD4, nt / CD8 (-)	A24:02
13	TLHD13	PBMCs	A24/A26 (24:02/26:01)	B61/B56 (40:02/56:01)	DR4/DR14 (04:05/14:54)	CD4 (+) / CD8 (-)	A24:02
14	TLHD14	PBMCs	A1/A24 (01:01/24:02)	B37/B51 (37:01/51:01)	DR9/DR10 (09:01/10:01)	CD4 (+) / CD8 (-)	A24:02
15	TLHD15	PBMCs	A2/A24 (02:01/24:02)	B48/B54 (48:01/54:01)	DR4/- (04:05/-)	CD4, nt / CD8, nt	A24:02
16	TLHD16	PBMCs	A2/A31 (02:01/31:01)	B62/B61 (15:01/40:02)	DR9/- (09:01/-)	CD4 (+) / CD8 (+)	

[0043]

[表1-2]

17	TLHD17	PBMCs	A24/A31 (24:02/31:01)	B54/B55 (54:01/55:02)	DR4/DR9 (04:05/09:01)	CD4 (+) / CD8 (-)	A24:02
18	TLHD18	PBMCs	A2/A11 (02:01/11:01)	B62/B52 (15:01/52:01)	DR14/DR15 (14:54/15:02)	CD4 (-) / CD8 (-)	B52:01 DRB1 15:02
19	TLHD19	PBMCs	A2/A33 (02:01/33:03)	B35/B44 (35:01/44:03)	DR13/DR15 (13:02/15:02)	CD4 (-) / CD8 (+)	DRB1 15:02
20	TLHD20	PBMCs	A2/A24 (02:01/24:02)	B44/B51 (44:03/51:01)	DR9/DR13 (09:01/13:02)	CD4 (+) / CD8 (+)	A24:02
21	TLHD21	PBMCs	A24/A24 (24:02/24:20)	B39/B52 (39:01/52:01)	DR9/DR15 (09:01/15:02)	CD4 (-) / CD8 (-)	A24:02/B52:01 DRB1 15:02
22	TLHD22	PBMCs	A24/A26 (24:02/26:02)	B39/B61 (39:01/40:06)	DR8/DR14 (08:03/14:06)	CD4 (-) / CD8 (+)	A24:02

* T cell response to 454E2 : 網膜色素上皮細胞なしで各T細胞 (CD4 陽性またはCD8 陽性) を培養した場合のサイトカイン濃度をコントロールとして採用し、該濃度より高い場合を (+)、同濃度かそれより低い場合を (-) とした。nt は測定していないことを示す。

[0044]

[表2]

No.	RPE and control cells	Origin	HLA-A	HLA-B	HLA-DR	Reference
1	836B1 iPS-RPE cells	iPS cells (skin fibroblasts from HD)	A2/- (02:01/-)	B27/B50 (27:03/50:01)	DR1/13 (01:01/13:03)	
2	101G26 iPS-RPE cells	iPS cells (skin fibroblasts from RP)	A11/A24 (11:01/24:02)	B60/B54 (40:01/54:01)	DR4/DR8 (04:05/08:03)	
3	454E2 iPS-RPE cells	iPS cells (dental pulp cells from HD)	A24/- (24:02/-)	B52/- (52:01/-)	DR15/- (15:02/-)	HLA homozygous donor
4	453F2 iPS-RPE cells	iPS cells (dental pulp cells from HD)	A11/- (11:01/-)	B62/- (15:01/-)	DR4/- (04:06/-)	HLA homozygous donor
5	TLHD1 iPS-RPE cells	iPS cells (skin fibroblasts from HD)	A11/- (11:01/-)	B62/B67 (15:01/67:01)	DR9/DR16 (09:01/16:02)	Autologous TLHD1
6	ES-RPE cells	ES cells	A2/A24 (02:06/24:02)	B35/B39 (35:01/39:01)	DR9/DR14 (09:01/14:05)	
7	Primary RPE cells	Fetal ocular cells	A3/A24 (03:01/24:02)	B35/B60 (35:01/40:01)	DR1/- (01:01/-)	
8	RPE cell lines (ARPE19)	Adult ocular cells	A2/A3 (02:01/03:01)	B7/B65 (07:02/14:02)	DR13/DR15 (13:02/15:01)	
9	Cornea endothelial cells	Primary human CE cells	A24/A68 (24:02/68:01)	B27/B51 (27:03/51:01)	DR7/DR11 (07:01/11:01)	
10	Fibroblast cells	Skin tissues (HD)	A24/A26 (24:02/26:02)	B61/B52 (40:02/52:01)	DR9/DR15 (09:01/15:02)	

[0045] (調製例3) サルiPS細胞由来RPE細胞の調製

カニクイザルの皮膚由来線維芽細胞よりNature (2011) 474: 225-229 (GLI S1使用) に記載の方法に準じてiPS細胞を樹立し、J Cell Sci (2009)122: 3169-3179に記載の分化誘導方法に準じて、健常サル(A, B)及び、片眼に網膜光凝固術を施して網膜光凝固斑を形成させることにより作成した疾患モデルサル(C)についてそれぞれサルiPS細胞由来RPE細胞を調製した。

[0046] (調製例4) サルT細胞浮遊液の調製

疾患モデルサル(C)末梢血、からMACS磁気分離装置を用いてCD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞を分離し、100U/ml rhIL-2 含有RPMI培養液(RPMI 1640 445ml、FBS 50ml、ペニシリンーストレプトマイシン5ml)に懸濁して各T

細胞浮遊液を調製した。

[0047] (参考2) MHCタイピング

実施例9、10に用いる細胞のMHCタイピングを慣用の方法で行った。健常サルAはiPS細胞由来RPE細胞 (Mafa-A、-B、-DRA、-DRB、-DQA、-DQB、-DPA、-DPB座のうちの3座がホモ) に対して、疾患モデルサル (C) は3座でアレルが一致する。健常サルBのiPS細胞由来RPE細胞は、疾患モデルサル (C) とはMHCすべての遺伝子型が不一致であった。

[0048] (実施例1)

96穴プレートに、調製例2で得たCD4陽性T細胞浮遊液 (TLHD-1およびTLHD-2) に抗CD3抗体を1 μ g/ml 添加して、5 x 10⁵細胞/wellの濃度でウェルに分注した。各ウェルに、調製例1で得た454E2-iPS由来RPE細胞を3通りの濃度、1 x 10³/well、5 x 10³/well、1 x 10⁴/wellで加え、無添加の場合をコントロールとして培養した。48時間培養後、培養上清を回収し、培養上清中のIFN- γ の濃度をELISAを用いて測定した。結果を図1に示す。

[0049] この結果、TLHD-1およびTLHD-2いずれも、3種類の濃度全てにおいてコントロールに対してIFN- γ の産生が上昇した。従って、454E2-iPS由来RPE細胞を、被験者TLHD-1およびTLHD-2に移植した場合には拒絶反応が生ずる可能性が高いと判定できる。

TLHD-1およびTLHD-2のHLA抗原は、454E2-iPS由来RPE細胞のHLA-DR抗原 (Class-II) とはハプロタイプが不一致であった。またHLA-A抗原およびHLA-B抗原 (Class-I) についてはTLHD-2のHLA-Aのアレルが一致するものの、それ以外のハプロタイプは全て不一致であり、TLHD-1では全て不一致であった (表3)。

[0050] [表3]

CD4+ cell	iPS-RPE	Class II match	Class I match	IFN- γ
TLHD-1	454E2	mismatch	mismatch	up
TLHD-2	454E2	mismatch	A allele match	up

[0051] (実施例2)

T細胞浮遊液として、調製例2で得たCD4陽性T細胞浮遊液(被験者名: TLHD-2, TLHD-3, TLHD-4, TLHD-6, TLHD-7, TLHD-8, TLHD-9)を用い、調製例1で得た454E2-iPS由来RPE細胞を $1 \times 10^4/\text{well}$ の濃度で用いた点以外は実施例1と同様の方法を行い、IFN- γ の産生量を測定した。また、T細胞浮遊液及びiPS細胞由来RPE細胞を、共にTLHD-1由来の細胞を用いて、実施例1と同様の方法を行い、IFN- γ の産生量を測定した。結果を図2に示す。

[0052] この結果、TLHD-1のT細胞浮遊液とTLHD-1のiPS細胞由来RPE細胞の組み合わせ、及びTLHD-6のT細胞浮遊液と454E2-iPS由来RPE細胞の組み合わせにおいて、コントロールに対してIFN- γ の産生が抑制されていた。

従って、自家移植、または454E2-iPS由来RPE細胞を被験者TLHD-6に移植した場合には拒絶反応が生ずる可能性が低いと判定できる。つまりこの454E2-iPS由来RPE細胞は、被験者TLHD-6または被験者TLHD-6と同じHLAハプロタイプを有し、かつアレルも一致する患者用の眼疾患治療剤として用いることができる。

[0053] 一方、上記以外の組み合わせにおいては、コントロールに対してIFN- γ の産生量が上昇した。従って、TLHD-6と同じHLAハプロタイプを有し、かつアレルも一致する眼疾患患者以外の患者に454E2-iPS細胞由来RPE細胞を移植した場合には拒絶反応が生ずる可能性が高いと判定できる。この場合、454E2-iPS細胞由来RPE細胞を移植に利用しないか、免疫抑制剤を併用した移植を検討する必要がある。

サイトカインの産生が抑制されていたTLHD-6は、454E2-iPS細胞由来RPE細胞のHLA-DRおよびHLA-Bにおいてアレルが一致していた。一方、サイトカイン産生が高かったTLHD-7はHLA-Aにおいてアレルが一致していたが、HLA-DRにおいてアレルは不一致であった。また、TLHD-8は、454E2-iPS細胞由来RPE細胞とアレルは不一致であった。サイトカイン産生が高かったその他の細胞は、454E2-iPS細胞由来RPE細胞とハプロタイプが不一致であった(表4)。

[0054]

[表4]

CD4+ cell	iPS-RPE	Class II match	Class I match	IFN- γ
TLHD-1	TLHD-1	All match	All match	down
TLHD-6	454E2	DR allele match	B allele match	down
TLHD-7	454E2	DR haplotype match	A allele match	up
TLHD-8	454E2	DR haplotype match	mismatch	up
TLHD-2	454E2	mismatch	A allele match	up
TLHD-3	454E2	mismatch	mismatch	up
TLHD-4	454E2	mismatch	mismatch	up
TLHD-9	454E2	mismatch	A allele match	up

[0055] (実施例3)

T細胞浮遊液として、調製例2で得たCD4陽性T細胞浮遊液(TLHD-1)を用い、調製例1で得た454E2-iPS由来RPE細胞に代えて、表2に示すNo.1~3、6~10及びマウス線維芽細胞を $1 \times 10^4/\text{well}$ の濃度で用いた点以外は実施例1と同様の方法を行い、IFN- γ の産生量を測定した。結果を図3に示す。

[0056] この結果、ヒト線維芽細胞以外の全ての細胞についてIFN- γ の産生量が上昇していた。従って、454E2-iPS細胞由来RPE細胞を上記ヒト線維芽細胞と同じHLAハプロタイプを有し、かつアレルも一致する眼疾患患者以外の患者に移植した場合には拒絶反応が生ずる可能性が高いと判定できる。この場合、454E2-iPS細胞由来RPE細胞を移植に利用しないか、免疫抑制剤を併用した移植を検討することができる。

ES由来RPE細胞およびヒト線維芽細胞のHLA-DR抗原に対して、TLHD-1はアレルが一致し、その他はハプロタイプが不一致であった(表5)。

[0057]

[表5]

Lane	CD4+ cell	Cell	Class II match	IFN- γ
2	TLHD-1	836B1 iPS-RPE	mismatch	up
3	TLHD-1	101G26 iPS-RPE	mismatch	up
4	TLHD-1	454E2 iPS-RPE	mismatch	up
5	TLHD-1	ES-RPE	DR allele match	up
6	TLHD-1	fetal RPE	mismatch	up
7	TLHD-1	ARPE-19	mismatch	up
8	TLHD-1	HCE	mismatch	up
9	TLHD-1	human fibroblast	DR allele match	same
10	TLHD-1	mouse fibroblast	mismatch	up

[0058] (実施例4)

T細胞浮遊液として、調製例2で得たCD4陽性T細胞浮遊液(被験者名: TLHD-1, TLHD-8, TLHD-14, TLHD-21)を用い、調製例1で得た454E2-iPS由来RPE細胞に代えて、表2に表される453F2-iPS由来RPE細胞を用いた以外は同様の実験を行った。結果を図4に示す。

あるいは、実施例1におけるT細胞浮遊液として、調製例2で得たCD8陽性T細胞浮遊液(被験者名: TLHD-1, TLHD-8, TLHD-14, TLHD-22)を用い、調製例1で得た454E2-iPS由来RPE細胞に代えて、表2に表される453F2-iPS由来RPE細胞を用いた以外は同様の実験を行った。結果を図5に示す。

[0059] この結果、TLHD-1のCD8陽性T細胞浮遊液と453F2-iPS由来RPE細胞の組み合わせにおいて、コントロールに対してGranzyme Bの産生が抑制されていた。従って、453F2-iPS由来RPE細胞を被験者TLHD-1に移植した場合には拒絶反応が生ずる可能性が低いと判定できる。つまりこの453F2-iPS由来RPE細胞は、被験者TLHD-1または被験者TLHD-1と同じHLAハプロタイプを有し、かつアレルも一致する患者用の眼疾患治療剤として用いられる可能性がある。

[0060] (実施例5)

96穴プレートに、調製例2で得たCD4陽性T細胞浮遊液(TLHD-1)に抗CD3抗体を1 μ g/ml 添加して、5 x 10⁵細胞/wellの濃度でウェルに分注した。各ウェル

に、調製例 1 で得たHLAの3座ホモの454E2-iPS由来RPE細胞を $1 \times 10^4/\text{well}$ の濃度で加え、無添加の場合をコントロールとして培養した。48時間培養後、細胞を回収し、CD4陽性T細胞におけるIL-2、IFN- γ 、IL-17、TNF- α 、IL-22の産生をFACSを用いてそれぞれ測定した。結果を図6に示す。

[0061] その結果、IFN- γ 、IL-17およびTNF- α が抗CD4陽性T細胞のサイトカイン産生の指標として利用できることが分かった。

[0062] また、さらに調製例 2 で得たCD4陽性T細胞浮遊液(TLHD-1およびTLHD-10)を用いて同様の試験を行い、様々なサイトカイン産生量の比較を行った(図7aおよびb)。

その結果、数多くのサイトカインの中でIFN- γ だけが、454E2-iPS細胞由来RPE細胞(HLA-A, HLA-B, HLA-DRの3座ホモ)に対して、被験者名TLHD-10のT細胞(HLA-A, HLA-B, HLA-DRの3遺伝子座における遺伝子型の全てでアレルが一致)を用いた場合に発現量が減少した。よって拒絶反応が起こるか否かの指標としては、IFN- γ が適切であることがわかった。

[0063] (実施例 6)

調製例 2 で得たCD8陽性T細胞浮遊液(TLHD-1)に抗CD3抗体を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加して、 1×10^5 細胞/ well の濃度でウェルに分注した。各ウェルに、調製例 1 で得たHLAの3座ホモの454E2-iPS由来RPE細胞を $1 \times 10^4/\text{well}$ で加え、無添加の場合をコントロールとして培養した。48時間培養後、細胞を回収し、CD8陽性T細胞におけるGranzyme B、Perforin、TNF- α の産生をFACSを用いてそれぞれ測定した。ダブルポジティブの細胞の比率を図8に示す。

この結果、CD8陽性T細胞が産生する細胞傷害性物質は拒絶反応のスクリーニングに用いられることが示唆された。

[0064] (実施例 7)

CD4陽性T細胞に代えてCD8陽性T細胞の浮遊液(被験者名: TLHD-1, TLHD-3)を用い、IFN- γ に代えてグランザイムBの産生を測定した点以外は実施例 1 と同様の方法を行った。結果を図9に示す。

[0065] この結果、TLHD-1およびTLHD-3いずれも、2種類の濃度全てにおいてコン

コントロールに対してグランザイムBの産生が上昇した。従って、454E2-iPS由来RPE細胞を、被験者TLHD-1およびTLHD-3に移植した場合には拒絶反応が生ずる可能性が高いと判定できる。

TLHD-1およびTLHD-3のHLA抗原は、454E2-iPS由来RPE細胞のHLA-A抗原、HLA-B抗原ともにハプロタイプ不一致であった（表6）。

[0066] [表6]

CD8+Tcell	iPS-RPE	Class I match	Class II match	Granzyme B
TLHD-1	454E2	mismatch	mismatch	up
TLHD-3	454E2	mismatch	mismatch	up

[0067] （実施例8）

CD4陽性T細胞に代えてCD8陽性T細胞の浮遊液（被験者名；TLHD-2, 4, 5, 8, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20）を用い、IFN- γ に代えてグランザイムBの産生を測定した点以外は実施例1と同様の方法を行った。結果を図10に示す。

[0068] この結果、TLHD-10, TLHD-18, TLHD-2, TLHD-14, TLHD-12, TLHD-13, TLHD-17のT細胞浮遊液と454E2-iPS由来RPE細胞の組み合わせにおいて、コントロールに対してグランザイムBの産生が抑制されていた。従って、454E2-iPS由来RPE細胞を被験者TLHD-10, TLHD-18に移植した場合には拒絶反応が生ずる可能性が低いと判定できる。またTLHD-2, TLHD-14, TLHD-12, TLHD-13, TLHD-17についてはHLA-Aのアレルしかマッチしないものの、拒絶反応が生じない可能性について検討する余地がある。

[0069] 一方、上記以外の組み合わせにおいては、コントロールに対してグランザイムBの産生量が上昇した。従って、該当する被験者に454E2-iPS細胞由来RPE細胞を移植した場合には拒絶反応が生ずる可能性が高いと判定できる。この場合、454E2-iPS細胞由来RPE細胞を移植に利用しないか、免疫抑制剤を併用した移植を検討することができる。

[0070] グランザイムBの産生が抑制されていたTLHD-10およびTLHD-18では、HLA-AまたはHLA-Bと、HLA-DRにおいて、ハプロタイプとアレルが共に一致していた。一方TLHD-2, TLHD-14, TLHD-12, TLHD-13は、454E2-iPS細胞由来RPE細胞の

HLA-AまたはHLA-Bにおいてハプロタイプとアレルが一致していた。一方、グランザイムB産生が上昇したTLHD-5, TLHD-20においても、454E2-iPS細胞由来RPE細胞とHLA-AまたはHLA-Bにおけるハプロタイプとアレルが一致しており、TLHD-8はHLA-DRハプロタイプのみが一致していた（表7）。

[0071] このようにアレルやハプロタイプが部分的に一致しても、グランザイムB産生が上昇する場合があるが、少なくともHLA-A, HLA-B またはHLA-DRのアレルのうちいずれか1つのアレルが一致すれば、拒絶反応を起こす可能性が低いと判断し得る。さらに、HLA-A, HLA-B またはHLA-DRのアレルのうちいずれか2つのアレルが一致すれば、より拒絶反応を起こす可能性が低く、HLA-A, HLA-BおよびHLA-DRの全てのアレルが一致すれば、移植に適していると判断することができる。一方でそうでなければ、移植に利用しないか、免疫抑制剤を併用した移植を検討する指標とすることができる。グランザイムB産生が高かったその他の細胞は、454E2-iPS細胞由来RPE細胞とハプロタイプ自体が不一致であった。

[0072] [表7]

CD8+Tcell	iPS-RPE	Class I match	Class II match	Granzyme B
TLHD-10	454E2	A allele match, B allele match	DR allele match	down
TLHD-18	454E2	B allele match	DR allele match	down
TLHD-2	454E2	A allele match	mismatch	down
TLHD-14	454E2	A allele match	mismatch	down
TLHD-12	454E2	A allele match	mismatch	down
TLHD-13	454E2	A allele match	mismatch	down
TLHD-17	454E2	A allele match	mismatch	down
TLHD-5	454E2	A allele match	mismatch	up
TLHD-20	454E2	A allele match	mismatch	up
TLHD-8	454E2	mismatch	DR haplotype match	up
TLHD-4	454E2	mismatch	mismatch	up
TLHD-19	454E2	mismatch	DR allele match	up
TLHD-16	454E2	mismatch	mismatch	up

[0073] （実施例9）

（予測試験）

96穴プレートに、調製例4で得たCD4陽性T細胞浮遊液(サル疾患モデルC)に抗CD3抗体を $1\mu\text{g/ml}$ 添加して、 5×10^5 細胞/wellの濃度でウェルに分注する。各ウェルに、調製例3で得た健常サルB-iPS由来RPE細胞または疾患モデルサルC-iPS由来RPE細胞を 1×10^4 /wellで加え、無添加の場合をコントロールとして培養する。48時間培養後、培養上清を回収し、培養上清中のIFN- γ の濃度をELISAを用いて測定する。

前述の方法において、CD4陽性T細胞に代えてCD8陽性T細胞の浮遊液(サル疾患モデルC)を用い、IFN- γ に代えてグランザイムBの産生を測定した点以外は前述と同様の方法を行う。

健常サルB-iPS由来RPE細胞の場合は、コントロールに対してIFN- γ 及びグランザイムBの産生量がともに上昇するのに対し、疾患モデルサルC-iPS由来RPE細胞は、コントロールに対してIFN- γ 及びグランザイムBの産生量がともに抑制される。

[0074] (移植試験)

健常サルB-iPS由来RPE細胞または疾患モデルサルC-iPS由来RPE細胞を、Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995 Feb; 36(2):381-90.に記載の方法に準じて疾患モデルサルCの片眼に移植する。移植後28日目に、眼底写真、及びOCT (Optical coherence tomograph) 光干渉断層計を用いて眼底の断面を組織切片のように画像し、網膜の状態を確認する。

健常サルB-iPS由来RPE細胞を用いた他家移植を施した場合には、移植片周囲の線維性変化や蛍光眼底造影検査による蛍光の漏出、OCTでは網膜下の高輝度病変といった明らかな拒絶反応がみられる。疾患モデルサルC-iPS由来RPE細胞を用いた自家移植を施した場合には、このような明らかな拒絶反応は認められず、蛍光眼底造影検査による蛍光の漏出はなく、移植片は生着しており、感覚網膜の菲薄化などの障害は起きない。

[0075] (実施例10)

(予測試験)

実施例8におけるiPS由来RPE細胞として、調製例3で得た健常サルA-iPS

由来RPE細胞（MHCの3座ホモ）または疾患モデルサルC-iPS由来RPE細胞を $1 \times 10^4/\text{well}$ の濃度で用いた点以外は実施例8と同様の方法を行い、IFN- γ の産生量を測定する。

前述の方法において、CD4陽性T細胞に代えてCD8陽性T細胞の浮遊液（サル疾患モデルC）を用い、IFN- γ に代えてグランザイムBの産生を測定した点以外は前述と同様の方法を行う。

健常サルA-iPS由来RPE細胞及び疾患モデルサルC-iPS由来RPE細胞ともに、コントロールに対してIFN- γ 及びグランザイムBの産生量がともに抑制される。

[0076] （移植試験）

実施例8の移植試験において、iPS由来RPE細胞として、健常サルA-iPS由来RPE細胞（3座ホモ）または疾患モデルサルC-iPS由来RPE細胞を用いた点以外は、実施例8に記載の方法に従い疾患モデルサルCの片眼にiPS由来RPE細胞を移植する。移植後28日目に、眼底写真、及びOCT（Optical coherence tomograph）光干渉断層計を用いて眼底の断面を組織切片のように画像し、網膜の状態を確認する。

健常サルA-iPS由来RPE細胞（3座ホモ）を用いた他家移植を施した場合、疾患モデルサルC-iPS由来RPE細胞を用いた自家移植を施した場合と同様、明らかな拒絶反応は認められず、蛍光眼底造影検査による蛍光の漏出はなく、移植片は生着しており、感覚網膜の菲薄化などの障害は起きない。

産業上の利用可能性

[0077] 本発明によれば、RPE細胞移植においてドナー側のHLA-A、HLA-B及びHLA-DRの三遺伝子座における遺伝子型がホモ接合型の場合、レシピエントのHLA座の片方のマッチングだけで拒絶反応を抑制することが可能になる。したがって、事前の採血により免疫学的に適合しない細胞を判別・選択できるため、不適合な細胞の移植を回避することにより患者の負担を軽減できる。この方法により選択された細胞はRPE細胞移植に用いることが可能である。また本発明を免疫抑制剤の要否判定に用いることにより、治療方針の選択に寄与する。

よって本発明は他家移植による治療効率を著しく向上することに寄与し、しかも移植に適さない細胞の調製コスト削減などの効果も奏する。

本出願は、日本で出願された特願２０１４－０３２３２５（出願日：平成２６年２月２１日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞を含有してなる、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが当該網膜色素上皮細胞の当該遺伝子座におけるアレルと一致した組合せを有する眼疾患患者のための、眼疾患治療剤。
- [請求項2] 移植後の免疫拒絶反応を抑制する、請求項1に記載の剤。
- [請求項3] 網膜色素上皮細胞が多能性幹細胞由来である、請求項1または2に記載の剤。
- [請求項4] 多能性幹細胞がiPS細胞である、請求項3に記載の剤。
- [請求項5] 眼疾患が、網膜変性または網膜変性に伴う疾患である、請求項1～4のいずれか一項に記載の剤。
- [請求項6] 眼疾患患者に対する眼疾患治療剤を選択する方法であって、
 (イ) 患者由来T細胞のHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型を調べる工程、
 (ロ) 工程(イ)で判明した各遺伝子座におけるアレルと一致するアレルを有する網膜色素上皮細胞を選択する工程、
 を含む、方法。
- [請求項7] 工程(ロ)における網膜色素上皮細胞が有するHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である、請求項6に記載の方法。
- [請求項8] 眼疾患患者に対する眼疾患治療剤を選択する方法であって、
 (1) 患者由来T細胞を、網膜色素上皮細胞と接触培養する工程、
 (2) 工程(1)の培養上清中に分泌された炎症性サイトカイン濃度を測定する工程、および
 (3) 工程(2)における炎症性サイトカイン濃度が患者由来T細胞を単独で培養した培養上清中の炎症性サイトカイン濃度と同程度、あるいはそれ以下である場合に、当該網膜色素上皮細胞を当該患者に対

する眼疾患治療剤の有効成分として用いることができると判定する工程、

を含む、方法。

[請求項9] 当該網膜色素上皮細胞が有するHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である、請求項8に記載の方法。

[請求項10] 工程(1)における患者由来T細胞が、抗CD3抗体を用いて活性化されている、請求項8または9に記載の方法。

[請求項11] 工程(1)における患者由来T細胞がCD4陽性であり、工程(2)において測定する炎症性サイトカインがIFN- γ である、請求項8～10のいずれか一項に記載の方法。

[請求項12] 工程(1)における患者由来T細胞がCD8陽性であり、工程(2)において測定する炎症性サイトカインがグランザイムBである、請求項8～10のいずれか一項に記載の方法。

[請求項13] 移植用網膜色素上皮細胞を移植する眼疾患患者における拒絶反応を予測するための試験方法であって、

(A) 患者由来T細胞を、当該網膜色素上皮細胞と接触培養する工程、

(B) 工程(A)の培養上清中に分泌された炎症性サイトカイン濃度を測定する工程、および

(C) 工程(B)における炎症性サイトカイン濃度が、患者由来T細胞を単独で培養した培養上清中の炎症性サイトカイン濃度より有意に高い場合に、当該網膜色素上皮細胞に対する拒絶反応を生ずると判定する工程、

を含む、方法。

[請求項14] 当該移植用網膜色素上皮細胞が有するHLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である、請求項13に記載の方法。

[請求項15] 工程(A)における患者由来T細胞が、抗CD3抗体を用いて活性化され

ている、請求項 13 または 14 に記載の方法。

[請求項16] 工程(A)における患者由来T細胞がCD4陽性であり、工程(B)において測定する炎症性サイトカインがIFN- γ である、請求項 13 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項17] 工程(A)における患者由来T細胞がCD8陽性であり、工程(B)において測定する炎症性サイトカインがグランザイムBである、請求項 13 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項18] HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞をシートにして、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが当該網膜色素上皮細胞の当該遺伝子座におけるアレルと一致した組合せを有する眼疾患患者に移植する、眼疾患の治療方法。

[請求項19] 網膜色素上皮細胞が多能性幹細胞由来である、請求項 18 に記載の方法。

[請求項20] 多能性幹細胞がiPS細胞である、請求項 19 に記載の方法。

[請求項21] 眼疾患が、網膜変性または網膜変性に伴う疾患である、請求項 18 ～ 20 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項22] HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞であって、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが当該網膜色素上皮細胞の当該遺伝子座におけるアレルと一致した組合せを有する眼疾患患者の眼疾患の治療に使用するための、網膜色素上皮細胞。

[請求項23] 網膜色素上皮細胞が多能性幹細胞由来である、請求項 22 に記載の網膜色素上皮細胞。

[請求項24] 多能性幹細胞がiPS細胞である、請求項 23 に記載の網膜色素上皮細胞。

[請求項25] 眼疾患が、網膜変性または網膜変性に伴う疾患である、請求項 22 ～ 24 のいずれか一項に記載の網膜色素上皮細胞。

- [請求項26] HLA-A遺伝子座、HLA-B遺伝子座及びHLA-DR遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である網膜色素上皮細胞であって、対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルが当該網膜色素上皮細胞の当該遺伝子座におけるアレルと一致した組合せを有する眼疾患患者の眼疾患の治療剤を製造するための、網膜色素上皮細胞。
- [請求項27] 網膜色素上皮細胞が多能性幹細胞由来である、請求項26に記載の網膜色素上皮細胞。
- [請求項28] 多能性幹細胞がiPS細胞である、請求項27に記載の網膜色素上皮細胞。
- [請求項29] 眼疾患が、網膜変性または網膜変性に伴う疾患である、請求項26～28のいずれか一項に記載の網膜色素上皮細胞。