

I. 総説

I. 1 網膜の再生医療

栗本 康夫

神戸市立神戸アイセンター病院

要旨

近年の幹細胞研究の進歩により従来は不可能と見なされていた網膜の再生医療が実現しつつある。網膜再生医療の最初のターゲットは網膜色素上皮 (RPE) であり、これに成功すればより内層の神経網膜再生へと治療開発が進む。加齢黄斑変性 (AMD) は RPE の加齢劣化に起因する疾患であり、RPE を治療できれば根治治療になり得る。我々は AMD の RPE 再生治療を目指して自家 iPS 細胞由来 RPE 移植治療を行った。世界初の iPS 細胞治療となった移植手術は成功、主要評価項目である安全性を達成し、形態と自覚症状において治療効果を認めた。自家 iPS 細胞治療は医学的に成功を収めたが、膨大な時間や費用の問題も露わとなった。我々は実臨床で普及可能な治療を目指し、HLA マッチした他家 iPS 細胞由来 RPE 移植の臨床研究を進行中である。また、RPE の次の網膜再生医療のターゲットである視細胞移植でも動物実験で一定の成果を収めつつある。

キーワード：網膜、再生医療、iPS 細胞、加齢黄斑変性

(神戸市立病院紀要 57 : 1 - 6, 2018)

Regenerative medicine for the retina

Yasuo Kurimoto, MD., PhD.

Kobe City Eye Hospital

Abstract

Recent advances in stem cell research are leading to realization of regenerative medicine for the retina, which was previously considered impossible. The retinal pigment epithelium (RPE) is the primary target of regenerative medicine for the retina, followed by neuronal cells in the inner retina. RPE senescence is a key contributor to age-related macular degeneration (AMD), and the replacement of impaired RPE can be a causal therapy for AMD. We successfully carried out a transplantation of a sheet of RPE differentiated from autologous induced pluripotent stem (iPS) cells in a patient with neovascular AMD. This was the first successful instance of in-human iPS cell-based therapy. The primary purpose of this pilot clinical trial, confirmation of the safety of iPS cell-based therapy, was achieved and morphological and subjective effects of the treatment were observed. Although the autologous iPS cell-based transplantation succeeded medically, it is likely that autologous iPS cell therapy is too costly and time-consuming for wide-spread clinical use. Currently, we are carrying out clinical research into HLA-matched allograft iPS cell-based transplantation, a method that considerably reduces the time and cost necessary for the procedure. In addition, we recently achieved progress in iPS cell-derived photoreceptor transplantation in an animal study.

Key words : retina, regenerative medicine, iPS cell, age-related macular degeneration

(Kobe City Hosp Bull 57 : 1 - 6, 2018)

はじめに

ヒトを含む大型霊長類は五感のうち視覚を高度に発達させており、外界より得る情報の多くを視覚に頼っている。視覚とは可視光の知覚であるが、ヒトが光情報を認識する視覚経路は光が外界から眼内に入射してから網膜に達するまでの光路と網膜から視覚中枢に至る視路に二別される。

眼科領域における再生医療の現状は光路と視路との間で大きな相違がある。光路を構成する角膜と水晶体では他の臓器と較べても再生医療の実用が早くから進んでいる。角膜については、献眼による角膜移植が20世紀前半に海外で開始され、我が国でも1958年に「角膜移植に関する法律」が公布し、その後の法律改定を経て、標準医療として定着して既に久しい。さらに、他家移植に伴う免疫拒絶などのリスクやドナー不足を克服するために自家組織幹細胞や代替細胞による細胞治療も開発され既に臨床実施されている¹⁾。近年ではiPS細胞等の多能性幹細胞を用いた再生医療の研究も進んでおり²⁾、慢性的な角膜ドナーの不足に悩む我が国においては、その実用化が特に期待される。水晶体に関しては、白内障で混濁した水晶体の摘出は紀元前にまで遡り、摘出された水晶体に代わって眼鏡やコンタクトレンズ等による屈折の補正が行われてきた。水晶体を代替する眼内レンズの移植は20世紀の半ばに初めて臨床で実施され³⁾、人工臓器による水晶体再生医療が確立した。その後、術式はめざましい進歩を遂げ、今日、眼内レンズを利用した水晶体再建術はあらゆる外科手術の中でも最も成功している治療と言って過言では無いほどの普及を見ている。

これに対し、視路を構成する網膜および視神経については、成熟した哺乳類の中樞神経は再生することは無いと言う定説に基づき⁴⁾、長年にわたって再生医療は不可能とされてきた。しかしながら、近年、幹細胞研究が長足の進歩を遂げ、神経幹細胞あるいは多能性幹細胞を用いた再生医療が網膜において実現しようとしている。

I 網膜と再生医療

ヒトの体では、皮膚や粘膜、あるいは血球をはじめ多くの組織において、外傷や疾病によって脱落した細胞は再生によって補われる。細胞の再生能力は組織の種類によって大きく異なり、神経細胞であっても末梢神経は条件が良ければ再生することは知られている。しかし、ひとたび成熟した哺乳類の中樞神経系は神経細胞が傷害を受けて脱落・変性しても再生するこ

とはない⁴⁾と長きにわたって信じられており、医療の現場においても、中枢神経は再生しないというのが常識であった。眼科領域でも、中枢神経系に属する網膜疾患の治療は神経細胞の変性をどう防ぐかに尽きていたと言える。しかし、近年の幹細胞研究の進歩により哺乳類成体でも中枢神経組織幹細胞や神経新生があることが明らかとなり、この常識は覆されつつある。さらには多分化能と自己複製能を有する胚性幹(embryonic stem: ES)細胞や人工多能性幹(induced pluripotent stem: iPS)細胞などの多能性幹細胞が樹立され、未分化な幹細胞から網膜細胞を人工的に誘導することも可能となった。眼科領域においても、かつては夢の治療として現実味に乏しかった網膜の再生医療が現実のものになろうとしている。

II 幹細胞を用いた網膜再生医療のストラテジー

幹細胞による再生医療は、大きく分けて、内在性幹細胞の賦活、組織幹細胞もしくは前駆細胞の移植、幹細胞より最終分化させた体細胞の移植の3つのストラテジーが想定されている。ただし、前者二つについては生体内での神経系細胞の分化や脱分化、あるいは増殖制御への理解が不十分で技術も確立していないので現時点での臨床応用は難しい。臨床での実用に最も近いのは、幹細胞から治療に必要な体細胞を分化させて移植するストラテジーである。

幹細胞には、ほぼあらゆる細胞に分化できる多能性幹細胞と、分化する細胞の種類が限定されている組織幹細胞とがある。網膜の組織幹細胞である網膜幹細胞は成熟した哺乳類でも確認されているが、網膜幹細胞は採取も培養増殖も難しく、治療に必要な量の網膜細胞を確保するのは難しい。一方、近年、ES細胞などの多能性幹細胞は比較的簡単に大量培養できるようになり、かつ、網膜細胞に分化させる方法も確立された。臨床応用では、多能性幹細胞から必要な網膜細胞を培養して治療を行うことになる。

III 網膜再生医療のターゲット

網膜は眼球の内側に位置する神経網膜とその外側を裏打ちする網膜色素上皮(retinal pigment epithelium: RPE)に大別される。どちらも神経上皮に由来するがRPEは神経細胞では無く、隣接する視細胞の外節の貪食処理、視物質のリサイクルなどにより視細胞の生理的活動を支えると同時に血流の豊富な脈絡膜と神経網膜の間を隔て、血液・網膜柵を構成している。細胞移植による網膜の再生を考える場合、神経網膜においては移植細胞がホスト網膜の神経ネットワークと

有機的な結合をする事が機能再建には必須である。神経ネットワークがより複雑化する中枢側、すなわち網膜内層にいくほど宿主神経ネットワークとの有機的な結合を得る事が難しく、末梢側の網膜外層の方が容易と考えられる。従って、網膜再生治療は外層から着手されるのが自然な流れである。特に、網膜最外層に位置するRPEはホストの神経回路網に組み込まれる必要が無く、移植されたRPEが宿主組織と生理的に接着してRPE固有の機能を発揮すれば治療の効果が得られる。網膜再生医療のターゲットとしてRPEが最初に選ばれるのは必然であり、疾患の原因がRPEの加齢劣化に根ざす加齢黄斑変性(age-related macular degeneration : AMD)が最初の対象疾患になるのは合理的選択である。RPEの再生医療が成功すれば、同様の方法論をもってRPEよりも内層の神経網膜の再生へと治療開発が進んでいくであろう。

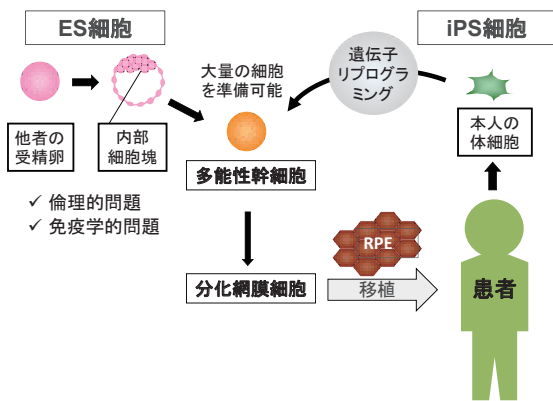
IV 加齢黄斑変性診療の現在

AMDは、生理的な再生能に乏しいRPEが加齢により疲弊・劣化することが発症の背景にあり、加齢に加えて喫煙などの環境因子や遺伝的背景も発症リスクであると知られている。AMDは脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization :CNV)が関与する滲出型とCNVの関与無くRPEが萎縮し引き続いて視細胞も変性していく萎縮型の二型に分けられ、我が国では滲出型の頻度が高く⁵⁾、視機能の障害は萎縮型よりも滲出型の方が急速かつ深刻である。萎縮型のAMDには今のところ有効な治療が無いが、滲出型AMDに対しては、近年、光線力学療法や抗vascular endothelial growth factor (VEGF)治療等のCNVを選択的に抑制する治療が導入され、現在では抗VEGF療法が滲出型AMDに対する第一選択治療となっている⁶⁾。抗VEGF治療の導入により、滲出型AMDの予後は大きく改善したが、AMD発症の背景にあるRPEの劣化を治療しているわけではなく、多くの症例ではCNVを持続的に抑制するために延々と抗VEGF薬の硝子体内注射を行い続けなければならない、人口の高齢化と患者数の増大に伴い、その医療費負担は膨大なものに膨れあがりつつある。さらに、抗VEGF薬への反応には個体差があり、治療への反応不良例も稀では無い。現行の標準治療は対症療法ゆえの限界を有しているが、一方で、AMD発症の背景にある加齢劣化したRPEを治療することができれば根治的治療となる可能性がある。

V 加齢黄斑変性に対する網膜色素上皮移植とiPS細胞

AMDにおいて加齢劣化したRPEを健常なRPEをもって換えるという治療法の着想は以前から存在した。実際に健常なRPEをAMD患者の黄斑下に移植する試みとして、胎児組織⁷⁾、自家RPE⁸⁾などを用いた移植治療が既に報告されている。しかし、胎児組織移植は倫理的な問題をはらんでいる上に他家移植であるがゆえの免疫学的拒絶の問題があり、自家RPE移植については有効性は認められるものの、ドナー組織として患者本人のRPEを周辺部網膜下から切り出す操作の手術侵襲が大きく、合併症リスクの問題等により、標準治療とはなり得なかった。

このようにAMDに対するRPE移植はドナーの供給が大きなネックとなっていたが、最近の幹細胞研究の飛躍的進歩により、ES細胞よりRPEを分化させることができるようになり⁹⁾、多能性幹細胞をドナー源とするRPE移植への見通しが開けたのである。しかし、ES細胞には、他家移植ゆえの拒絶のリスクとヒト胚を使用する倫理的な問題がつきまとう。そうした中に登場したのがiPS細胞である¹⁰⁾。iPS細胞の発見は、分化を完了した体細胞が比較的単純な遺伝子導入によって多分化能と自己複製能を有する多能性幹細胞に脱分化できるという生命科学におけるセンセーショナルな大発見であったが、同時に、臨床応用に大きな可能性を予見させるものでもあった。iPS細胞は分化を終えた成体の体細胞を起源としながらもES細胞と同等の能力と性質を有する多能性幹細胞である。iPS細胞を用いた移植治療では患者本人の体細胞をドナー源とするので、拒絶の問題と倫理的問題を一挙にクリアできる(図1)。また、ドナー源とする体組織は小さな皮膚片や血液細胞でよく、わずかな侵襲で容易に採取できるので、従来の自家RPE移植で最大の問題であったドナー採取時の過大な手術侵襲も無い。



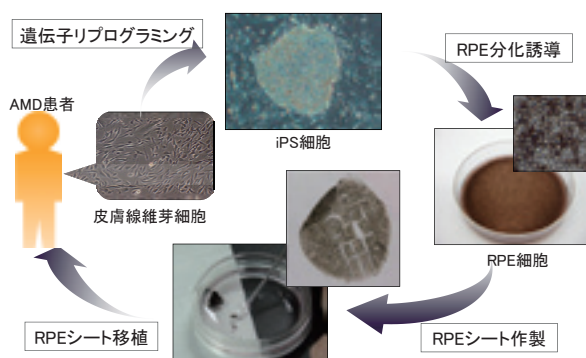
多分化能と自己複製能を有する ES 細胞を用いると細胞治療に必要な大量のドナー細胞を比較的容易に得る事ができる。ただし、ES 細胞には受精卵を破壊するという倫理的問題と他家移植ゆえの免疫学的問題を有する (図左側)。これに対し、iPS 細胞 (図右側) は ES 細胞と同等の能力を有しながら、患者の体細胞から得られるので、倫理的問題と免疫学的問題をクリアできる。

図1: 多能性幹細胞による細胞治療

VI 加齢黄斑変性に対する iPS 細胞治療

1. 加齢黄斑変性に対する自家 iPS 細胞由来 RPE 移植

我々は、世界初の iPS 細胞治療となる「滲出型 AMD に対する自家 iPS 細胞由来 RPE 移植の臨床研究」を 2013 年に開始した。本臨床研究のプロトコルの概略を図 2 に示す。現行の標準治療が無効な滲出型 AMD の患者本人の皮膚を採取し iPS 細胞を樹立、RPE に分化誘導し RPE 細胞シートを作製。対象患者に硝子体手術を行い、黄斑部網膜下の CNV を抜去した上で CNV と同時に除去された病的 RPE の跡に生じた宿主 RPE の欠損部に iPS 細胞由来 RPE シートを移植した。



患者より直径 4 mm の皮膚を採取し皮膚線維芽細胞を培養。線維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、RPE への分化を誘導。RPE を細胞シート状に培養し、患者の黄斑部網膜下に移植する。

図2: 自家iPS細胞由来RPEシート移植の流れ

本臨床研究は iPS 細胞を用いた世界初の細胞治療であり、安全性の確認が今回の臨床研究の主たる目的であった。したがって、プライマリー エンドポイントは本プロトコル治療の安全性の検討とし、セカンダリーエンドポイントとして、その他のあらゆる有害事象を検証し、治療による効果についても検討を行った。今回の対象は現行の標準治療を行っても病状が進行して既に黄斑部の視細胞が変性してしまった症例に限定しているため、視機能の大幅な回復は望めない。それでも、本治療によりエンドレスに続く抗 VEGF 治療から離脱して視機能の低下が食い止められれば、患者にとってのメリットは大きい。

移植症例は既に術後 3 年以上を経過しているが重篤な合併症を認めず、本臨床研究のプライマリーエンドポイントである安全性の確認は達成された。また、CNV の再発は認めず、黄斑部網膜の浮腫は減少、矯正視力は術前の値から悪化することなく維持され、視機能に関する健康関連 QOL を評価する VFQ-25 (National Eye Institute Visual Function Questionnaire -25 日本語版) のスコアは改善した。さらに、網膜断層撮影所見にて、移植された iPS 細胞由来 RPE に接する視細胞の保全が認められ、宿主環境において RPE の生理的機能を果たしていることが推定される。滲出型 AMD に対する自家 iPS 細胞由来 RPE シート移植臨床研究第一例目は安全性に関するエンドポイントを達成し、形態学的評価と自覚症状において有効性を認め、治療は成功したと言える¹¹⁾。

今後、iPS 細胞由来 RPE 移植治療の安全性が十分に確認されれば、より良好な治療効果が期待できる早期の症例へと対象を拡大していくことになろう。視機能の維持あるいは改善効果が十分に確認出来れば、当面は抗 VEGF 治療への反応が不良な症例のセカンドライン治療となると思われる。さらに、視細胞がほとんど障害を受ける前の病初期の段階で劣化した RPE の細胞治療を行えるようになれば、AMD の根治的治療となり得るかもしれない。

2. 加齢黄斑変性に対する他家 iPS 細胞由来 RPE 移植

今回の自家 iPS 細胞由来 RPE 移植の臨床研究を通じて本治療が標準治療となる上での問題も浮かび上がってきた。自家移植では患者本人の細胞から iPS 細胞を樹立し RPE を得るまでに約 10 ヶ月の月日と作製した iPS 細胞由来 RPE の安全性確認を含め多額の費用を要する。今後、より高い治療効果を目指す上で、長い準備期間のために最適な治療タイミングを逸しか

ねないし、高額な費用は広く行われる治療となるためには障害となる。こうした問題を解決するために、健常ボランティアより様々なタイプのHLA (Human Leukocyte Antigen) のiPS細胞株を樹立しバンク化する構想が京大iPS研究所で進んでいる。iPS細胞バンクが整備され、患者と適合するHLAタイプのiPS細胞由来のRPEが即座に手に入るようになれば、拒絶の問題を回避しつつ、治療までの期間を短縮し費用も低く抑えることが可能となる。今後、我が国の保険診療による標準治療に向けてはこの他家移植の方向で進んでいくと予想され、自家移植は一部の患者を対象に限定的に施行される医療となるかもしれない。我々は、HLA-A、C、B、DP、DQ、DRの6座が日本人で最も頻度が高い型のホモ接合体の細胞から樹立したiPS細胞由来のRPEをHLA6座すべてが適合している滲出型加齢黄斑変性の患者に移植する臨床研究を昨年より開始した。本臨床研究によりHLA6座適合の他家移植によるiPS細胞由来RPE移植の安全性が確認されれば、この方法による標準治療の開発が進むと考えている。

VII RPE移植の次に来る網膜の再生医療

RPEの次に来る網膜再生医療のターゲットは前述の様に神経網膜の最外層に位置し、視路の末梢端に当たる視細胞であろう。視細胞の移植も古くより動物実験が試みられてきたが、必要量のドナー細胞の確保や移植細胞の生着効率等の問題により臨床応用への道は遠いと思われていた。しかし、最近、ES細胞から立体的な層構造をもった網膜を作製する方法が報告され¹²⁾、この方法を用いれば網膜本来の立体的構造を有する大量の視細胞を細胞シートの状態で作製することができるため、移植における生着率が大幅に改善することが期待される。この方法を用いて、我々の研究グループは動物実験でiPS細胞から作成した視細胞3次元シート移植を行い、宿主網膜下に生着して形態学的に宿主網膜双極細胞とシナプスを形成し失われた視機能が回復することを報告した^{13,14)}。我々の研究グループはRPE移植の次に来る網膜再生医療として視細胞移植の臨床実施を視野に入れている。今後、視細胞移植が実用化されれば、網膜色素変性など全く治療法が存在しなかった多くの視細胞変性疾患が治療対象となることが期待される。

文 献

- 1) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al: Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351: 1187-1196, 2004
- 2) Hayashi R, Ishikawa Y, Sasamoto Y, et al: Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature* 531: 376-380, 2016
- 3) Ridley H: Intra-ocular acrylic lenses after cataract extraction. *Lancet* 1: 118-121, 1952
- 4) Ramón y Cajal, SR (1913-14) : Estudios sobre la degeneración del sistema nervioso. Moya. [translated by May RM, Cajal's Degeneration and Regeneration of the Nervous System. DeFelipe J, Jones EG (eds) , Oxford University Press, New York, 1991]
- 5) Yasuda M, Kiyohara Y, Hata Y, et al: Nine-year incidence and risk factors for age-related macular degeneration in a defined Japanese population the Hisayama study. *Ophthalmology* 116: 2135-2140, 2009
- 6) 高橋寛二, 小椋祐一郎, 石橋達朗, 他 : 加齢黄斑変性の治療指針. *日眼会誌* 116: 1150-1156, 2012
- 7) Algvare PV, Gouras P, Dafgård Kopp E: Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patients with AMD. *Eur J Ophthalmol* 9 : 217-230, 1999
- 8) van Zeeburg EJ, Maaijwee KJ, Missotten TO, et al: A free retinal pigment epithelium-choroid graft in patients with exudative age-related macular degeneration: results up to 7 years. *Am J Ophthalmol* 153: 120-127, 2012
- 9) Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, et al: Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelial from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1580-1585, 2002
- 10) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676, 2006
- 11) Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al: Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Eng J Med* 376:1038-1046, 2017
- 12) Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al: Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472: 51-56, 2011
- 13) Shirai H, Mandai M, Matsushita K, et al: Transplantation of human embryonic stem cell-

derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. Proc Natl Acad Sci USA 113: E81-90, 2016

- 14) Mandai M, Fujii M, Hashiguchi T, et al: iPSC-Derived Retina Transplants Improve Vision in rd 1 End-Stage Retinal-Degeneration Mice. Stem Cell Reports 8 : 69-83, 2017