特集 網膜変性疾患や視覚障害を標的とした新規治療戦略を目指して

iPS 細胞由来網膜シートを用いた 網膜変性に対する再生治療

秋葉 龍太郎, 松山 オジヨス 武, 高橋 政代, 万代 道子

網膜色素変性症 (RP) は、多様な遺伝子変異を原因として光受容体である視細胞が徐々に変性し視機能が低下していく遺伝性網膜変性疾患である。現時点で RP に対する確立された治療法はなく、日本においては RP が失明原因の 2 位である。過去には胎児網膜を RP 患者の網膜下に移植する臨床研究が海外で行われたが、その有効性について明確な結論は出しておらず、胎児からの組織を用いる治療は倫理的問題により普及には至らなかった。2006 年に iPS 細胞が登場し、そして iPS 細胞からの立体網膜組織の誘導が可能になったことで、倫理的問題を生じることなく網膜組織の移植治療も現実的なものとなった。我々はこれまで、マウス幹細胞 ES/iPS 細胞由来の網膜組織を末期網膜変性モデルマウスの網膜下に移植すると組織が視細胞層を形成して生着し、視細胞が経時的にホスト網膜とシナプスを形成することを明らかにした。また移植後にはホスト側の細胞で光応答性が回復すること、また行動解析によって光認識の回復が認められることを報告した。またサルに光凝固を行った網膜変性モデルにヒト iPS 細胞由来の網膜組織を移植すると最大で 2 年以上の長期生存が確認され、良好な視細胞の生着と共に、視野検査による機能回復も示唆されている。これらの Proof of Concept をもとに、現在 iPS 細胞由来網膜組織を用いた臨床研究の準備を進めている。

キーワード：網膜再生、神経科学、シナプス、網膜色素変性症、再生医療

1. はじめに

網膜色素変性症 (RP) は現在日本において失明原因の 2 位を占める遺伝性網膜変性疾患であり、これまでに 60 以上の原因遺伝子が同定されている (<https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm>)。正常網膜では一次ニューロンである視細胞

が光を受容し、二次ニューロンである双極細胞や水平細胞・アマクリン細胞へと視覚情報が伝達・情報処理され、三次ニューロンである神経節細胞へと伝達・さらに情報処理がなされることで脳の視覚野へと情報が出力される (図 1)。RP では原因遺伝子にかかわらず網膜において最も主要な光感受性ニューロンである視細胞がアポトーシス

図 1 網膜層構造の概略図

網膜外層に存在する一次ニューロンである視細胞で光を受容し、それが二次、三次ニューロンへ伝達され、情報処理を受けた上で中枢へと視覚情報が送られる。

を起こし視機能低下を起こす。視細胞には、網膜周辺部に広く分布し暗所での光受容を行う桿体視細胞 (rod) と、中心部に密に分布し明所での光受容を行う錐体視細胞 (cone) が存在する。RP では遺伝子変異を原因としてまず rod が変性していく疾患群であり、それに続いて二次的に cone の変性が起きる¹⁾ ため、夜盲・視野狭窄といった主訴が先行することが多い。Cone は中心部に高密度に分布し高精度の視力を司っているが、rod の細胞死に伴う cone の二次的な変性は視力低下をきたし、末期まで進行すると失明に至るが、病気の進行速度には個人差がある。また、視細胞が変性した後は、網膜の主要なグリア細胞である Muller 細胞によるグリオシスや残存している他の二次・三次ニューロンが異常なシナプス形成や広範なりモデリングを起こすことが知られている²⁾。RP に対する効果的な治療法は長らく確立されておらず、医療機関においてはもっぱら経過観察を続けるしかなく、残存視機能を有効に活用するためのロービジョンケアと視覚障害手帳や年金・難病指定などの手続きを通して患者の生活を医療以外の側面からの支援することなどしかできなかった。近年、変性を遅らせるための保護的な治療、遺伝子治療、視機能を代替するような人工網膜など様々な治療が開発されつつあり、本項ではこれまで行われてきた網膜変性疾患に対する細胞または組織を用いた治療研究について述べるとともに、我々の行ってきた embryonic stem (ES) /induced pluripotent stem (iPS) 細胞由来網膜シートを用いた細胞治療と今後の臨床応用について詳細に述べる。

2. 胎児網膜・網膜前駆細胞を用いたアプローチ

網膜変性疾患に対するアプローチとして、失われた視細胞または網膜組織を移植することで補うという方法が近年注目されつつあるが、この治療概念は決して新しいものではない。2002 年には米国から胎児網膜を RP 患者の網膜下に移植する臨床試験の結果が報告された³⁾。この臨床試験では、ドナーとホスト間でヒト組織適合性白血球抗原 (HLA) がマッチしていなかった状態にもかかわらず、移植後 6 ヶ月までの時点では網膜浮腫や瘢痕形成などのあきらかな拒絶反応が認められなかった。一方で視力や、電気

生理学的に網膜の光に対する反応を検知する網膜電図では視機能のあきらかな改善は認められなかった。その後の続報⁴⁾ では視力の改善が報告されたが、この治療法は移植片が中絶胎児由来であることによる倫理的問題に加えて組織の安定供給が困難であり、標準治療として普及することにはなかった。一方、マウスでは生後早期の個体から取り出した視細胞前駆細胞を用いて細胞移植を行う検討もなされており、Maclaren らは視細胞のうち rod が GFP でラベルされている Nrl-GFP マウスの網膜から視細胞前駆細胞を取り出し、wildtype マウスと網膜変性モデルマウス (rds マウス、Rho ノックアウトマウス) の網膜下に移植したところ、GFP でラベルされた視細胞がホストの視細胞層に入り込み生着することを示した⁵⁾。さらに Pearson らは、Nrl-GFP マウスから取得した視細胞前駆細胞を、形態的に視細胞は残存しているが光応答性が失われている Gnat1 ノックアウトマウスに視細胞を移植したところ、移植後の行動試験にて視機能回復が認められることを報告した⁶⁾。

3. Material transfer による細胞治療の再考

網膜変性に対する視細胞前駆細胞移植による視機能改善のメカニズムは、約 10 年間、移植した細胞が視細胞に分化しホストの二次ニューロンである双極細胞とシナプスを形成することによって考えられてきた。しかし、近年複数の研究グループから GFP などを含むタンパク質などは視細胞同士の間で移行 (material transfer) することが明らかになった⁷⁻⁹⁾。視細胞が残存しているモデル動物に GFP 陽性の視細胞を移植すると、移植視細胞からホストの視細胞に GFP が移行するため、移植細胞が生着した場合と単に GFP が移行した場合の区別が困難となる。GFP 以外のタンパク質の同様の移行も示されており、このように視細胞が残存する網膜変性モデルを用いた網膜前駆細胞移植においては、機能回復のメカニズムは移植視細胞のシナプス形成を介した機能的生着によるものではなく、移植細胞からホスト視細胞へのタンパク質移行による機能回復効果が主であったと考えられるようになり、移植細胞とホスト網膜のシナプス形成の検証は振り出しに戻った形となった (図 2)。

図2 細胞移植による視機能回復の異なるメカニズム

変性網膜に対する細胞移植治療のメカニズムとしては、移植細胞がホストのニューロンとシナプスを形成して視機能回復を行う直接効果と、移植細胞からのタンパク質の移動などによる間接効果がある。

4. 幹細胞を用いた網膜再生医療のトランスレーショナルリサーチ

一方で、日本では 2006 年に iPS 細胞の誘導方法が樹立され¹⁰⁾、また ES 細胞で培われた網膜細胞の分化誘導法も iPS 細胞に応用された。すなわち、成人の体細胞を採取し、そこから幹細胞、そして網膜の神経細胞を分化誘導することが可能となり、再生医療分野での臨床応用の可能性が飛躍的に高まった。我々の研究室ではマウス・サル・ヒトの ES 細胞から桿体および錐体視細胞を誘導する方法を確立した¹¹⁾。さらに、2011 年には永楽らが ES 細胞から optic cup を誘導する方法を確立し、発達過程の網膜の三次元構造を維持した網膜組織を分化培養することが可能となった¹²⁾。これらの方法を用いて我々はマウス ES/iPS 細胞から誘導した網膜の三次元シート（網膜シート）を、生後 1 カ月で視細胞がほぼ死滅する末期網膜変性モデルマウスである rd1-2J マウスの網膜下に移植すると（図 3A）、移植片が網膜下に生着すること、そして視細胞層を形成し、視細胞の成熟マーカーである rhodopsin や recoverin などを発現する

図3 マウス幹細胞由来網膜シート移植の概略図とマウスへの移植後に摘出した網膜の免疫染色像および電子顕微鏡像

(A) 網膜シートの網膜下移植。ES/iPS 細胞から分化した網膜シートを、カニューレを用いて網膜下に移植する。(B・C) 移植後の網膜シートには rhodopsin や recoverin など視細胞成熟マーカーの発現を免疫染色で確認できた。(H: ホスト網膜, G: 移植した網膜シート, ONL: 外顆粒層, IS: 内節, OS: 外節) (Scale bar (B) 20 μ m, (C) 10 μ m) (D・E) 移植後の網膜シートは電子顕微鏡にて成熟した視細胞に特長的な内節 (inner segment: IS) と外節 (outer segment: OS) 構造を有していた。(scale bar 1 μ m) (文献 13 より改変)

こと（図 3B・C）に加え、電子顕微鏡を用いて内節・外節が形成されることを示した（図 3D・E）。また免疫染色により、移植された視細胞とホストの双極細胞がシナプスを形成することを示唆するデータも得られた¹³⁾。

さらに、光凝固または塩化コバルトの網膜下注射により局所的に視細胞を変性させたサルの網膜下にヒト ES 細胞から分化した網膜シートを移植すると、移植された網膜シートはマウス組織同様視細胞の層構造を形成し、cone および rod の視細胞マーカーやその他の網膜細胞のマーカータンパク質を発現、成熟した網膜組織が形成されることが明らかとなった¹⁴⁾。

さらに、これらの移植後の視機能再建を検証するために、我々は末期網膜変性モデル rd1-2J マウスの網膜下にマウス iPS 細胞由来の網膜シートを移植した後に、ホストの網膜を取り出し、ホスト神経節細胞からの光応答を多電極アレイで記録する実験を行った。多電極アレイで得られた神経節細胞の反応を spike sorting により個別化し解析したところ、移植をしていない rd1-2J マウスから得られた反応はほとんどが光と無関係な自発発火パターンであったのに対し、移植後には光に対応した transient-ON タイプの反応が有意に増加していた（図 4A・B）。また、移植後の視機能回復が動物の行動に影響を与えるかを検討するため、Shuttle Avoidance Test という方法を用いて解析を行った。これは、マウスがケージの中にある 2 つの部屋を自由に行き来できる環境で、光や音による警告があった後、5 秒以内に別の部屋に移動しないと電気ショックを受けるという学習装置で、音による学習で適性を見たのち、光による警告だけで電気ショックを回避する学習ができるかどうかを解析する方法である（図 5A）。この方法を用いると正常な視機能を示す C57BL/6J マウスは光による警告で電気ショックを回避することができるが、rd1-2J マウスでは回避することができない。一方網膜シートを移植した rd1-2J マウスの約 4 割は光による電気ショック回避学習ができた（図 5B）。このことから、網膜シート移植後には移植部位での光反応が電気生理学的に回復し、行動解析でも光を感知することができるようになったマウスがいることが示唆された¹⁵⁾。

続いてヒト ES 細胞由来の網膜シートによる視機能回復を検討するため、我々は免疫不全マウスである NOG マウスと、rd1-2J マウスを交配することで免疫不全の網膜変性モデルマウスを作成し、その網膜下にヒト ES 細胞由来網膜シートを移植して多電極アレイを用いた電気反応の記録を行った。移植後には移植片が存在する部位でホストの神経節細胞から光反応が認められ、ヒト ES 細胞由来の網膜シートも視機能回復に貢献することが示唆された¹⁶⁾。

ヒト ES 細胞に加えて、ヒト iPS 細胞由来の網膜シートの生着や機能を評価するため、ロドプシン遺伝子にナンセンス変異を持つ網膜変性・免疫不全ラットである S334ter ヌードラットおよび局所網膜変性を作成したサルの網膜下に移植を行い免疫染色評価を行った。免疫染色では双極細胞や視細胞マーカーの発現を認め、移植された網膜シート

図4 マウス幹細胞由来網膜シート移植後の電気生理学的検討

(A) 多電極アレイによる電気生理学的検査の概略図。(B) 神経節細胞からの反応を、光反応に対する反応のパターン別に spike-sorting を行った結果、正常発達網膜が B6、視細胞シナプスブロッカーである AP4 を追加した結果が B6+AP4、変性網膜が rd1、変性網膜に iPS 細胞由来網膜シートを移植したものが TP。光に対する反応のうち、光と関係のない反応が non-specific であり、それ以外は光刺激のタイミングで発火が増加する transient ON、発火が減少する transient OFF、光刺激の間だけ発火が増加する transient-ON-OFF に分類される。(文献 15 より改変)

図5 マウス幹細胞由来網膜シート移植後の行動解析

(A) 光刺激に対する行動検査である Shuttle Avoidance Test の検査装置と概略図。(B) 網膜変性マウスに iPS 細胞由来網膜シートを移植した群 (Graft+) と、移植していない群 (No graft) の合格 (Positive response) 割合を示した。移植を片眼と両眼に行ったサンプルを Bilateral, Monolateral と表記している。(文献 15 より改変)

が成熟することが確認された。移植後のラットを用いた多電極アレイ検査では、移植片のある部位で神経節細胞からの光反応を検出することができた。更に、ヒト iPS 細胞由来の網膜シート移植後に、霊長類モデルで自覚的な視機能の回復が見られるかを検討するために、我々は視野検査トレーニングを行ったサルに光凝固による局所的な視細胞変

性を作成後、網膜下にヒト iPS 細胞由来網膜シートを移植し、1 年および 1 年半後の視野検査を行った。具体的にはサルの頭を固定し、LCD モニター上に表示された指標に対し眼球サッケード運動が起こるかどうかをアイトラッカーを用いて解析する visually-guided saccades (VGS) テストを行った。網膜光凝固により視細胞変性を作成した部位は暗点となったが、網膜シートが移植された範囲に一致して、移植後 1.5 年に暗点の中に島状に視野の改善が認められた (図 6A・B)。この移植眼では移植後 2 年以上経った組織標本で、非常に多くの移植視細胞が良好な状態で生着し、宿主双極細胞と接触している像も観察され、移植組織により視野が改善した可能性も示唆された¹⁷⁾。これらの検討はいずれも異種間での移植であり、シナプス形成などには種の違いが影響を及ぼすことも考えられる。そのためヒト由来細胞のヒトへの移植によってどの程度の視機能改善が認められるかは、実際の臨床研究によって明らかになるものと考えられる。

一方、これまで免疫染色を用いて視細胞がホストの網膜とシナプスを形成することを示唆する所見は得られていたが、移植後にどの程度・どのようなシナプスが形成されているのかが不明であった。そこで我々は、視細胞リボンシナプスを構成するシナプス前マーカー Ribeye とシナプス後マーカー mGluR6 の免疫染色像を用いて、まず正常発達 B6J マウスからの教師データを取得し、ImageJ と R のスクリプトを組み合わせることにより、シナプスの定量化とシナプス毎にシナプスらしさや成熟度を評価するプログラム QUANTOS を確立した。QUANTOS を用いて分化 12 日目 (胎生 12 日にほぼ相当) のマウス iPS 細胞由来の培養網膜シートのリボンシナプスを解析すると、シナプス数はほぼ 0 であった。しかし網膜変性モデルマウスである rd1-2J の網膜下にこの iPS 細胞由来網膜シートを移植し、14 日、30 日、60 日後にそれぞれ QUANTOS を用いてシナプス解析を行ったところ (図 7A)、視細胞のシナプスが経時的に増

図6 ヒト幹細胞由来網膜シートのサルへの移植後の視機能検討

(A) サルに網膜光凝固を用いて2箇所の局所的な網膜変性病巣を作成し (ROI1, ROI2), ROI1の網膜下にヒト iPS 細胞由来の網膜シートを移植した。Visually-guided saccades (VGS) テストの網膜光凝固前, 移植前, 移植1年後, 移植1.5年後の網膜感度を赤から緑の色階調で示した。マゼンタの矢印は網膜シート挿入部位である。(B) VGS テストで測定した網膜感度を移植前と移植1.5年後で比較した結果を移植後の眼底写真上に提示した。赤い破線が網膜光凝固部であり, 黄色い上矢印は感度上昇, 青い下矢印は感度低下, 緑の点は変化なしを示す。(A) VGS テストの結果を上下反転したものが, (B) 眼底写真と対応することとなる。(文献17より改変)

図7 マウス幹細胞由来網膜シート移植後の視細胞シナプス形成の検討と光によるシナプス形成促進

(A~C) マウス iPS 細胞を網膜変性モデルマウスに移植後 14, 30, 60 日後にシナプスマーカー RIBEYE と mGluR6 にて免疫染色を行なった。それぞれの免疫染色画像でシナプスが見られた部位を拡大画像として下のパネルに表示している。(Scale bar=10 μ m, 拡大画像の Scale bar=1 μ m) (D) QUANTOS を用いて各タイムポイントの視細胞あたりのシナプス数を計測し, サイクル照明群と暗所飼育群を比較した結果。(E) 移植後に検出されたシナプスマーカーのシナプス確率を横軸に, シナプスでない確率を縦軸にとり, それぞれの点の表すシナプスマーカーの数を色階調表示した。それぞれのグラフを横切る黒の境界線より右下にあるものはシナプス, 左上にあるものはノイズとして判定されている。(文献18より改変)

加することが明らかになった (図 7B)。また数だけでなく検出したシナプスのシナプスらしさを解析すると、移植前はシナプスでない確率の高いものがほとんどであるのに対し、移植後は経時的にシナプス確率が上昇することがわかった (図 7C)。視細胞のシナプス形成をコントロールする因子はまだ明らかになっていないが、その一つとして、我々は光による視細胞の活動性がシナプスの数に与える影響を検討した。網膜シート移植後の rd1-2J マウスを全く光のない環境 (暗所飼育群)、12 時間ごとに光が点灯する環境 (サイクル照明群) でそれぞれ飼育し比較したところ、サイクル照明群では暗所飼育群に比有意にシナプス数が増加することが明らかとなった (図 7B)。また光がある方がよりシナプス確率の高いシナプスが多いことが示唆された (図 7C)。このことは、光が視細胞のシナプス形成に促進的に働くことを示しており、移植後のシナプス形成を促進するためのリハビリテーションとして光刺激を用いることができる可能性が示唆された¹⁸⁾。

5. 細胞治療の今後の展望

現在、動物モデルを用いた前臨床研究での網膜シート移植の有効性エビデンスが出揃ってきたことを踏まえて、ヒト iPS 細胞由来の網膜シートを網膜色素変性患者に対して移植する臨床試験を行うべく、安全性試験や細胞製造のプロトコル整備を行っている。順調にいけば、1~2 年以内に first in human の網膜シート移植が行えるように準備を進めている。はじめての臨床研究においての主要項目は安

全性と生着確認であり、移植する範囲もまずは限定的であることから、視機能回復は副次項目として評価する。実際に人の病態でどの程度の視細胞が機能的に生着し、どの程度の効果が得られるかは実際にヒトで応用してみないとわからないが、一日も早い臨床応用、そしてより良い視機能再建を目指して引き続き前臨床研究および臨床研究の準備を続けていく予定である。

著者の利益相反：高橋 政代, 万代 道子 (大日本住友製薬株式会社)。

文 献

- 1) Mohand-Said S, et al. Prog Retin Eye Res. 2001;20:451-467.
- 2) Kolb H, et al. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]. 1995.
- 3) Radtke ND, et al. Am J Ophthalmol. 2002;133:544-550.
- 4) Radtke ND, et al. Arch Ophthalmol. 2004;122:1159-1165.
- 5) MacLaren RE, et al. Nature. 2006;444:203-207.
- 6) Pearson RA, et al. Nature. 2012;485:99-103.
- 7) Pearson RA, et al. Nat Commun. 2016;7:13029.
- 8) Santos-Ferreira T, et al. Nat Commun. 2016;7:13028.
- 9) Singh MS, et al. Nat Commun. 2016;7:13537.
- 10) Takahashi K, et al. Cell. 2006;126:663-676.
- 11) Osakada F, et al. Nat Biotechnol. 2008;26:215-224.
- 12) Eiraku M, et al. Nature. 2011;472:51-56.
- 13) Assawachananont J, et al. Stem Cell Reports. 2014;2:662-674.
- 14) Shirai H, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:E81-E90.
- 15) Mandai M, et al. Stem Cell Reports. 2017;8:69-83.
- 16) Iraha S, et al. Stem Cell Reports. 2018;10:1059-1074.
- 17) Tu H-Y, et al. EBioMedicine. 2019;39:562-574.
- 18) Akiba R, et al. Front Cell Neurosci. 2019;13:16.

Toward establishment of regenerative cell therapy for retinitis pigmentosa using iPS cell derived retinal sheet

Ryutaro Akiba, Take Matsuyama, Masayo Takahashi, Michiko Mandai

Laboratory for Retinal Regeneration, Center for Biosystems Dynamics Research, Riken

Abstract. Retinitis pigmentosa (RP) is a group of hereditary diseases that involve loss of photoreceptors. There has been no established treatment for RP, and it is now the 2nd leading cause of blindness in Japan. Previous clinical researches using human fetal retina transplantation suggested some functional recovery in vision, but it did not become a standard therapy because of ethical concerns for using fetus tissues. Invention of induced pluripotent stem cells (iPSC) in 2006 and the establishment of retinal organoids induction protocol from ES/iPS cells have paved a way of cell therapy for RP without ethical concerns. Our team has shown that mouse iPSC derived retinas can survive and mature after subretinal transplantation to the end-stage retinal degeneration model mice. Further, human ESC derived retinas survived and matured in retinal degeneration monkey models. Recently, we have established a qualitative and quantitative evaluation tool for photoreceptor synapses, QUANTOS, and showed that photoreceptors in mouse iPSC derived retina can form photoreceptor synapses in a time dependent manner after transplantation. We are now moving toward 1st in human clinical trial using iPSC derived retina for RP.