特集：再生医療の臨床応用

総 説

iPS 細胞の網膜再生医療—網膜変性疾患への臨床応用

杉 田 直

Retinal regeneration with iPS cells – Clinical trials for retinal degenerative disorders

Sunao SUGITA

Laboratory for Retinal Regeneration, Center for Developmental Biology, RIKEN

(Accepted November 12, 2014)

summary

Potential for re-programming cells has become widely accepted as a tool for obtaining transplantation materials. There has been great interest in cell-based therapies, including retinal transplants, because there is a reduced risk of immune rejection. Stem cells have the capacity for self-renewal plus the capacity to generate several differentiated cells. They are derived from many sources including human adult-derived induced pluripotent stem (iPS) cells and have found early application in the context of ocular disease. In results, our established iPS-retinal pigment epithelial (RPE) cells are high-quality RPE cells. iPS cells-derived RPE cells clearly showed polygonal morphology (mostly hexagonal) and contained melanin. Moreover, RPE cells derived from iPS cells had many characteristics of mature RPE cells *in vivo*, but no characteristics of pluripotent stem cells. Recently, we transplanted RPE cell sheets to treat a patient with wet age-related macular degeneration (September, 2014). In addition, we are now conducting experiments to determine whether allogeneic T cells can recognize iPS-RPE cells from HLA-A, B, DRB1 locus homozygote donors. iPS bank might be useful as allografts in retinal disorders, if the recipient T cells cannot respond to allogeneic RPE cells because of match to some of main HLA antigens.

Key words——iPS cells; retinal regeneration; clinical trials; retinal pigment epithelial cells

抄 録

リプログラミングされた細胞は移植のツールとして広く受け入れられている。これらは移植後の拒絶反応が少ないことから、網膜移植を含めた細胞移植で利用されつつある。人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS cells) は自己の細胞を利用できる事に加えて多種類の細胞・組織に分化する事が可能な細胞として注目され、現在様々な基礎研究および臨床試験が取り組まれている。近年、著者らの研究所では、高純度のヒト iPS 細胞由来の網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cells: RPE) の分化・誘導に成功した。この iPS 細胞由来の RPE 細胞は多角形 (多くは六角形) で色素を豊富に含んだ細胞で、また、この細胞は生体内の RPE 細胞と同等の特徴を有していた (iPS 細胞の素因はなし)。著者らの研究所とその関連病院では、2014 年の 9 月に滲出性加齢性黄斑変性患者に iPS 細胞由来 RPE 細胞が世界で初めて移植された。また、他家移植に向けた検討の中で、HLA ホモドナー (HLA-A, B, DRB1 locus homozygote donors) から樹立した iPS-RPE 細胞が HLA 拘束下でアロ T 細胞に反応するかなどを行っているところである。近い将来には加齢性黄斑変性だけではなく他の網膜疾患にも移植の構想があり、その場合 iPS バンクを利用した他家移植で行われる予定である。もし HLA が適合する患者 T 細胞の iPS-RPE 細胞への反応が低下するならば、iPS バンク由来の細胞がこれらの網膜疾患に利用できる可能性があると思われる。

網膜色素上皮細胞と加齢黄斑変性症

眼色素上皮細胞 (ocular pigment epithelial cells) は虹彩、毛様体、網膜の一連の層で構成される。後眼部に位置する網膜色素上皮細胞 (retinal pigment epithelial cells: RPE) は網膜層の最外側にあり脈絡

膜に接し網膜血液関門、つまり全身血流とのバリアを形成する。また、RPE は網膜 (視細胞) の維持に不可欠な細胞で、いくつかの機能を有する。中でも視細胞外節の貪食能は最も重要な機能で、網膜の光障害を防ぐため脱落した視細胞や老廃物を貪食し、視細胞のメンテナンスを行っている。それ以外では、視物質の元になるビタミン A のリサイクルを担当し、また、数々の栄養因子を産生し、網膜、

脈絡膜の栄養、血管形成などに関与している。

加齢黄斑変性症は、日本では50歳以上の約1%が罹患しており、欧米では失明原因第1位の疾患である。加齢黄斑変性の現在の治療は抗VEGF抗体の硝子体注射が中心で、主な原因となる脈絡膜新生血管を抑制する目的で行われている。しかし、再発を繰り返すなど症例によっては効果が得られていない。この疾患の多くは脈絡膜新生血管からの出血によりRPEが損傷しており（特に、滲出型加齢黄斑変性患者）、その修復は従来の既存治療では不可能であった。著者らは、体性幹細胞を含めた様々な幹細胞を用いた細胞治療研究の経験や過去の他のグループの報告から、網膜、特にRPEは再生医療を利用した移植治療が適していると、また、中でも、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells: iPS細胞）の使用が適していると判断した。以前著者らは、ヒトiPS細胞からRPEを分化・誘導できる事を報告している¹⁾。このRPE移植の網膜対象疾患は様々あるが、最初の臨床試験には上記の滲出型加齢黄斑変性症がベストと考え、移植手術の臨床試験の取り組みを行った。

iPS細胞由来RPEの移植に向けた取り組み

iPS細胞は、多種類の細胞・組織に分化する事が可能な細胞として注目され、現在様々な基礎研究およびヒト臨床研究が始まっている。著者らの研究所では、ヒトiPS細胞由来RPEの分化誘導に成功し¹⁾、加齢性黄斑変性患者にiPS細胞由来RPEシートを移植する計画が立てられた。

現在、そのRPE臨床研究用の設備が稼働している。平成23年に設立された網膜細胞移植用の細胞プロセッシングセンター（facility for Retinal Cell Therapy: fRECT）では、ヒトiPS細胞およびヒトiPS細胞由来RPE細胞を樹立、維持されている。培養法の標準手順書（Standard Operating Procedures: SOP）を作製し、対象患者からiPS細胞作製、維持、RPE分化誘導、RPEシート作製、移植準備などを常駐スタッフが行っている。また、臨床研究だけではなく、治験の準備のために設立した株式会社ヘリオスは理研ベンチャー企業に設定され、各国の規制状況など情報収集を開始し、また、独自の細胞培養方法も加えて新しいRPE分化誘導方法の開発を行っている。

著者らの研究室では以前、サル胚性幹細胞（embryonic stem cells: ES細胞）からRPEが分化誘

導できる事²⁾、ES細胞由来RPEがRCSラット（RPE障害動物モデル）に移植して網膜機能をレスキュー出来る事³⁾、ヒトES/iPS細胞由来RPEの分化誘導¹⁾、さらにヒトiPS細胞由来RPEのシート作製、シート移植方法、また、動物を用いた安全性試験などを報告した⁴⁾。現在、このRPE細胞シートの品質管理試験や安全性試験は多数の項目で行われ問題はないと考えられているが臨床応用に向けて課題がないわけではない。次稿では、その臨床試験に向けた細胞製造方法の確立、純度試験、品質管理試験、安全性試験、また将来的に他家移植を行った場合のその拒絶反応対策について述べる。

ヒトiPS細胞由来RPEの製造、 品質管理試験、安全性試験

まず最初に、滲出型加齢黄斑変性患者で同意の得られた患者から皮膚組織を採取した。皮膚線維芽細胞にエピソードベクター遺伝子を導入し（Electroporationによるプラスミド導入）、4週間前後培養した（図1）。同時にiPS細胞用のフィーダー細胞を用意して、また培地にはbasic FGF入りのES/iPS細胞専用培地（Primate ES培地）を用いた。iPS細胞を樹立した後、RPE分化因子をRPE専用培地下で培養した。褐色の色素を持った多角形の上皮細胞（図1）が確認されたら数回に分けて継代培養した。iPS細胞からRPEへと分化誘導すると色素を持つ黒い細胞がクラスターで分化してくるので、顕微鏡下でピックアップしてそれらを純化する事が可能である。

図1に製造過程と品質規格試験をまとめた。ヒトiPS細胞の品質の確認のために、免疫染色による未分化マーカー発現確認試験（OCT-3/4, Nanog, SSEA-4, Tra-1-60など）を行った（図2）。その他、ヒトiPS細胞の品質規格試験には、プラスミドベクター残存PCR試験、核型解析（Conventional Giemsa及びG-band法）を行った。プラスミド残存ライン、核型異常ラインはその行程毎に削除し問題のないラインのみ継代した。

ヒトiPS細胞由来RPE細胞の品質規格試験に、RPEマーカーのRPE65, Bestrophin 1, MerTK, CRALBPなどの分子をRT-PCR法にて確認した（図3）。このiPS-RPE細胞の品質規格試験の代表的な項目とその方法、及び規格値を図4にまとめた。図4以外にも追加試験で、免疫染色によるRPE純度試験、成長因子産生の有無（PEDF/VEGF ELISA）、視細胞外節貪食試験（蛍光顕微鏡またはFlow cytometry）、

図1 ヒト iPS 細胞由来 RPE の製造および品質管理のフローチャート

加齢黄斑変性患者皮膚由来の線維芽細胞（上写真）にプラスミド（エピソードベクター）遺伝子を導入し、ヒト iPS 細胞を樹立した（中央写真）。その後、iPS 細胞から培養 RPE 細胞へと分化・誘導した（褐色の色素を持った多角形の上皮細胞：下写真）。枠内の試験・検査は各工程で行われる品質規格試験。

	光顕	DAPI	抗体
SSEA-4
Tra-1-60

図2 ヒト iPS 細胞の未分化マーカー免疫染色試験

ヒト iPS 細胞の品質確認のために、SSEA-4 及び Tra-1-60 の抗体を用いた未分化マーカー確認試験（免疫染色）を施行した。その形態（左写真）や核染色（中央写真）に問題なく、また、iPS マーカーの SSEA-4 及び Tra-1-60（赤色染色：右写真）の発現が確認された。

図3 ヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞の RPE 特異的遺伝子発現

RPE 品質規格試験の一つ、RPE マーカー分子の mRNA 発現を RT-PCR にて確認する試験。iPS-RPE ライン、836B1 細胞では、Bestrophin 1, RPE65, MerTK, CRALBP mRNA が陽性コントロール同様にその特異的バンドがゲル内で確認された。GAPDH - 内因性コントロール

品質規格試験項目	方法	規格値
1) シート外観	肉眼及び顕微鏡による観察	細胞欠損、異物の混入及び変色が認められないこと
2) シート構造	共焦点顕微鏡のZ-Stack機能による観察	
品質・有効性		
3) 生細胞率及び生細胞密度	シートをトリプシン消化しトリパンブルー染色	70% 以上 4,500 cells/mm ² 以上
4) RPE関連遺伝子	RT-PCR (RPE65, CRALBP, MERTK, BEST1)	バンドがみられること
5) 純度	①免疫染色および色素の確認 ②培養皿に接着しない細胞の確認	①95%以上 ②99.9%以上
安全性		
6) 幹細胞マーカー	qRT-PCR (Lin28)	検出されないこと
7) 細菌・真菌	薬局方(メンブランフィルター法)	検出されないこと
8) マイコプラズマ	薬局方(PCR法、染色法)	検出されないこと
9) エンドトキシン	薬局方(比色法)	3EU以下

図4 ヒト iPS-RPE 細胞の品質規格試験の代表的な項目、方法、及び設定した規格値
1)-4)まではその品質、有効性を、また、5)-9)は主に安全性を見ている。

シートの経上皮電気抵抗測定 (TER 測定) などとも同時期に施行した⁴⁾。

次に、安全性試験を行うために、ヒト iPS 細胞から分化・誘導した RPE 細胞を動物に移植して腫瘍形成の有無について検討した。RPE 細胞の移植部位は皮下または網膜下で、免疫不全マウス (SCID マウスやヌードマウスなど) を 100 匹以上使用して、また、12ヶ月以上で定期的な経過観察を行った。一次安全性試験では、レトロウイルスまたはセンダイ

ウイルスを使用して iPS 細胞を作製、二次安全性試験では旧プラスミドエピゾーマルベクターを用いて RPE を作製、また、三次安全性試験では現プラスミドエピゾーマルベクターを用いて fRECT で RPE を分化誘導してそれぞれ移植した。その結果、それぞれの試験で 1 年以上の経過観察で腫瘍形成は見られなかった。二次安全性試験では、RPE 純化前のプラスミド残存 iPS 細胞のみで腫瘍発生が数件見られていた。しかし、このようなプラスミド残存ライ

ンでも RPE に純化すると腫瘍発生は見られなかった。

以上の検査結果から、生体内と同等の高純度 RPE 細胞である事、導入遺伝子が残存していない事、未分化細胞が混入していない事、細菌、真菌、マイコプラズマの感染微生物のコンタミネーションがない事を確認作業した。このように長期間に渡り多項目で検査され、対象患者検体ラインだけではなく多数の iPS-RPE ラインで検討されたシュミレーション検査ではその品質性に問題は見られなかった⁴⁾。上記した行程を得て、2014 年の 9 月に滲出性加齢性黄斑変性患者に同患者から樹立した iPS 細胞由来 RPE 細胞シートが世界で始めて移植された。

他家移植に向けた取り組み

著者らの研究所では、近い将来に加齢性黄斑変性症だけではなく網膜色素変性症など他の網膜変性疾患にも移植の構想があり、その場合 iPS バンクを利用した他家移植で行われる予定である。

上記したように iPS 細胞由来 RPE 細胞の純度や安全性に関して大きな問題はないと考えられているが、その免疫原性、例えば、移植後の RPE 細胞の生着の有無とその拒絶反応に関してはほとんど研究が行われていない。最近、マウス iPS 細胞を同マウスの皮膚下に移植すると自家移植にも関わらず拒絶反応が起こる事が報告された⁵⁾。同様の方法でマウス ES 細胞では拒絶反応が起こらなかった事から iPS 細胞は ES 細胞に比べて免疫原性が高い細胞である可能性が示されている。しかし、その後の報告では⁶⁾、ヒト臨床で使用されるレベルの iPS 細胞由来の分化した細胞（最終産物）の移植では拒絶は起こらなかった。以上の報告からも、iPS 細胞から他の細胞・臓器に分化させた最終産物ならば特に問題はないと思われた。

眼は免疫抑制機構（ocular immune privilege）が存在して、その中心を担う RPE 細胞は強い免疫学的抑制能を有する事がわかっている⁷⁾。拒絶反応時に重要となる T 細胞を RPE は in vitro で抑制する。また、この RPE 細胞の移植場所は網膜下（sub-retinal space）で immune privilege site として知られていて、一般的には炎症や拒絶が起こりにくい場所と考えられている。しかしながら、過去の RPE 細胞の他家移植では拒絶炎症が起こっている事、また、免疫抑制剤使用でその拒絶反応がコントロールできる事から RPE を他家移植で行う場合はそれなりの対策が必要と考えられている。

著者らはまず、カニクイザルを用いた in vivo RPE 拒絶反応動物モデルの樹立を試みた。図 5 にカニクイザルの iPS 細胞樹立、RPE 細胞への分化誘導及び移植についてまとめた。分化誘導方法はヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞の方法に類似する方法で行った⁸⁾。その結果、カニクイザルの iPS 細胞由来 RPE 細胞を網膜下に移植したところ、自家移植では拒絶を示唆する所見はなく、また、他家移植では RPE 移植片付近の網膜に炎症を示唆する所見があり、著者らは RPE の他家移植では炎症拒絶反応が成立すると考えた⁴⁾。

現在、著者らの研究室では、in vitro で評価するヒト、サル拒絶反応試験の開発を行っている（図 6）。自家細胞、他家細胞、HLA-3 座ホモドナー由来の他家 iPS-RPE（HLA-A, B, DR がホモのライン）を用意して、ヒト CD4 または CD8 陽性 T 細胞、あるいは末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cells: PBMCs）を上記 RPE と共培養してその反応について検討した（結果未発表）。過去の RPE 移植の報告から RPE 移植で起こる拒絶反応メカニズムについて図 7 にまとめた。その拒絶反応には、移植患者 T 細胞がドナー RPE の HLA と抗原を直接認識するもの（direct recognition）と、移植患者 T 細胞が間接的に移植患者の抗原提示細胞（antigen presenting cells:

図 5 カニクイザルを用いた RPE 拒絶反応動物モデルの樹立
カニクイザル皮膚由来の線維芽細胞にエプソマルベクタープラスミド遺伝子を導入し、サル iPS 細胞を樹立した（上写真）。その後、サル iPS 細胞から RPE 細胞へと分化・誘導した（下写真）。これらの RPE 細胞を用いてサル網膜下に移植を試みた（自家移植または他家移植）。

移植予定の患者末梢血由来のT細胞
(MACSなどの細胞分離装置で分離):
CD4, CD8, 末梢血単核球 (PBMCs)

図6 ヒト *in vitro* RPE 拒絶反応試験の開発

自家細胞, 他家細胞, HLA-3 座ホモドナー他家 iPS-RPE (HLA-A, B, DR がホモのライン) を用意して, ヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMCs), CD4 陽性 T 細胞, CD8 陽性 T 細胞をそれぞれ分離して, iPS-RPE と共培養してその反応について評価.

APC) の HLA 上の RPE 由来抗原を認識するもの (indirect recognition) が考えられている. 前者の場合, 移植患者の T 細胞が直接 T 細胞レセプターおよび MHC 分子を介して RPE 細胞そのものを認識, 攻撃している. また, 後者の場合, 移植患者の APC は脈絡膜マクロファージ, 樹状細胞 (dendritic cells: DC), 網膜マイクログリアで, これらの APC が移植片に遊走して RPE 由来の抗原を T 細胞へと提示していると考えられている. 実際 RPE 細胞は primary culture でも iPS 細胞由来でも MHC (HLA) の発現が構成的にある事からこれらが主抗原と考えられている.

iPS バンクを利用した他家移植の可能性

著者らは iPS 細胞 RPE を用いた臨床試験に現在取り組んでいるが, 現時点で考えられる大きな問題点には以下の2つが挙げられる. 自家移植では移植するための用意する RPE 細胞の培養期間が 8-10 ヶ月程度と非常に長いため急性の患者は待てない. また, iPS 細胞作製及び網膜細胞への分化誘導には莫大なコストがかかるためコスト面からも現方法では標準治療になりえない. しかし, 他家細胞の移植の場合, これらの問題を解決できると思われる. その場合, 前述したように移植後の拒絶反応が問題とな

図7 RPE 移植後の推測される拒絶反応メカニズム

他家移植の場合, ドナーの RPE 細胞の HLA-class I の構成的な発現, また, IFN- γ などの炎症性サイトカインに暴露されると HLA-class II の発現が見られるようになる事から RPE 細胞の HLA 発現が問題となる. CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞は直接 RPE 上の HLA 抗原を認識する (左図). また, 別の機序に抗原提示細胞 (APC) を介して間接的に T 細胞が認識する場合もある (右図). これらの 2 つの機序により拒絶が成立すると考えられている.

図8 iPSバンクを利用した他家移植

主要 HLA の HLA-A, B, DR が homozygote の iPS ライン (あるいは RPE ライン) を使用すれば拒絶を回避, または減少できる可能性がある。

るが, その対策の一つとして京大 iPS 細胞研究所の iPS バンクの設立 (HLA ホモラインをバンク化) 及びその利用が将来の標準治療の道筋になりうると思われる。造血幹細胞移植や臓器移植の時に重要な HLA 抗原は HLA-A, B, DR (3 座 6 抗原) と考えられ, その主要 HLA の HLA-A, B, DR がホモ (homozygote) のラインを使用すれば拒絶を回避 (あるいは減少) できるという考えである。過去の報告によると, 日本国内で HLA-3 座ホモドナーを 75 名探して iPS 細胞を作製すれば日本人の約 80% をカバーできるという算出である⁹⁾。図 8 にその iPS バンクの原理と例をまとめた。将来的には, その iPS バンク構想に向けても HLA-3 座ホモドナー由来の iPS 細胞 RPE が免疫原的に問題ないのかなどを検討しておく必要がある。これらの研究成果は今後の iPS 細胞関連の再生医療の発展に大きく寄与するものと思われその意義は極めて高いものと思われる。

文 献

- 1) Hirami, Y., et al.: Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett.* **458**: 126–131, 2009.
- 2) Kawasaki, H., et al.: Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 1580–1585, 2002.
- 3) Haruta, M., et al.: In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **45**: 1020–1025, 2004.
- 4) Kamao, H., et al.: Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports.* **2**: 205–218, 2014.
- 5) Zhao, T., et al.: Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature.* **474**: 212–215, 2011.
- 6) Araki, R., et al.: Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature.* **494**: 100–104, 2013.
- 7) Streilein, J.W.: Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol.* **3**: 879–889, 2003.
- 8) Okamoto, S., Takahashi, M.: Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **52**: 8785–8790, 2011.
- 9) Okita, K., et al.: A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods.* **8**: 409–412, 2011.