

第 106 回 日本眼科学会総会 宿題報告Ⅲ

眼の再生医学

色素上皮細胞を利用した網膜再生医療の可能性

阿部 俊明

東北大学大学院医学系研究科感覚器病態学講座眼科学分野

共同研究者

玉井 信, 西郷 陽子, 北条 昌芳, 鹿野 哲也, 富田 浩史, 吉田まどか
吉岡 由紀, 鶴殿 徹男, 山下あさひ, 桜木 素子, 和田 裕子, 佐藤 肇
板橋 俊隆, 相良 淑子, 菅野江里子, 高橋 真弓

中村 幸江(東北大学大学院医学系研究科感覚器病態学講座眼科学分野)

大和 雅之, 岡野 光夫(東京女子医科大学医学部先端生命医科学研究所)

研究協力者

柴原 茂樹(東北大学大学院医学系研究科分子生物学分野)

菊池 孝信(信州大学機器分析センター)

要 約

再生医療は、組織そのものを最初から使用するのではなく、一部の細胞、細胞増殖因子、細胞外マトリックスなどを使用して、再生を人工的に手助けするものである。これには、人工材料なども積極的に利用されてきた。細胞増殖因子の一つとして線維芽細胞増殖因子(b-FGF)は虚血性心疾患などで臨床応用され、パーキンソン病患者には、胎児の脳神経細胞が直接投与された。難治性の網膜疾患にも再生医療が試みられてきた。我々が加齢黄斑変性(AMD)に行ってきた、脈絡膜新生血管(CNV)抜去後に自己の培養虹彩色素上皮細胞(IPE)を移植する方法は、CNV 抜去後に障害された網膜色素上皮(RPE)の代用細胞となることを目的としている。本稿では、これまでに行ってきた培養自己 IPE 移植症例の結果を報告する。また、AMD 以外の網膜疾患に細胞移植による治療を適応できる可能性があるかどうか、検討した結果を示す。

周辺虹彩切除術により得られた IPE を自己血清で培養し、CNV 抜去後の網膜下に移植した。術後 6 か月以上経過観察できた症例をまとめると、the logarithm of the minimal angle of resolution(log MAR) 視力で 0.2 以上改善できた症例は 35 眼中 18 眼(51.5%)、不変が 11 眼(31.5%)、悪化は 6 眼(17%)であった。これは、

単純に CNV を抜去しただけの 47 眼と統計的に有意差はなかった。しかし、培養 IPE が網膜下や硝子体内で増殖した症例は 1 例もなく、また拒絶反応もみられなかった。移植による合併症もなく、移植は安全に行われると考えられた。

次に、細胞移植に細胞増殖因子などを加えて、IPE 移植成績の改善と他の難治性網膜疾患への再生医療の適応拡大が可能かどうかを検討した。まず、サルに異種であるラット RPE を網膜下へ移植したところ、炎症細胞の出現とともにサルの RPE が移植細胞を取り囲むような所見がみられ、生体 RPE も炎症反応や網膜下の細胞に対して反応する可能性が示された。また、RPE に b-FGF をはじめとする細胞増殖因子を導入した場合、導入された細胞増殖因子が誘導する一連の遺伝子の動きがあることが判明した。bFGF の場合、最も変動した遺伝子は、細胞外マトリックスのコラーゲンなどの成熟や細胞の生着率に関与するものであった。しかし、*in vitro* の培養では 12 時間以上培養すると細胞の生着率に有意差がなくなり、この遺伝子を導入した細胞をラットに移植した 4 週後では、他の細胞と網膜下に存在する範囲に有意差はないと考えられた。一方、導入される細胞増殖因子が異なれば、細胞はそれぞれ違う反応をする可能性

別刷請求先：980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1 東北大学大学院医学系研究科感覚器病態学講座眼科学分野 阿部 俊明
(平成 14 年 8 月 15 日受付, 平成 14 年 10 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Toshiaki Abe, M. D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Tohoku University.
1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan

(Received August 15, 2002 and accepted in revised form October 11, 2002)

が示され、変動した 1 つ 1 つの遺伝子の詳細な影響については今後の検討が必要である。また、遺伝子導入細胞をラット網膜下に移植しても局所に炎症を誘発することもなく、細胞増殖因子とともに蛍光色素でもラベルした細胞の移植では、移植後 12 週でも網膜下に確認できた。さらに、細胞増殖因子を導入された細胞の移植を受けたラットの血清は RPE に対して明らかな抗体反応を示すことはないと考えられた。

一方、視細胞の変性動物モデルで知られている *rd* マウスに、bFGF や Axokine を異所性に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製したが、これらの因子は生体に対して過剰に反応し、致死的になったり、逆に生体から抑制を受けて視細胞の変性抑制に作用しないと

推測された。しかし、視細胞変性をコントロールできる光障害ラットモデルを作製し、移植を利用して細胞増殖因子の働く部位を制御すれば、光障害による視細胞の変性の進行を部分的に抑制できた。細胞増殖因子遺伝子を導入した細胞を移植に利用して、難治性網膜疾患に再生医療を適応できる可能性が考えられた。(日眼会誌 106: 778—804, 2002)

キーワード：加齢黄斑変性、虹彩色素上皮細胞、網膜色素上皮細胞、細胞移植、増殖因子、遺伝子、拒絶反応、トランスジェニックマウス、光障害、脳由来神経栄養因子

A Review

Regeneration of the Retina Using Pigment Epithelial Cell Transplantation

Toshiaki Abe

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Tohoku University

Abstract

At has been reported that transplantation of appropriate cells, growth factors, and/or extracellular matrix may help the regeneration of damaged tissues or organs. Some growth factors, such as basic fibroblast growth factor (bFGF), have been successfully transferred to patients with ischemic heart disease. Embryonic dopamine neurons were also transplanted into the brains of patients with Parkinson's disease successfully. We have also performed cultured auto iris pigment epithelial cell (IPE) transplantation into the subretinal space after removal of choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration (AMD). Here, we report the results of auto IPE transplantation in 35 patients, who could be followed for more than 6 months. We also tried to apply cell transplantation to other retinal diseases by managing the transplanted cells as introduced growth factor genes.

Auto IPE transplantation was performed after removal of choroidal neovascular membranes (CNV). Visual acuity was improved by more than 0.2 log MAR in 18 of 35 patients (51.5%), it was unchanged in 11 patients (31.5%), and it was worsened in 6 patients (17%). No significant difference was observed in comparison to patients who underwent CNV removal only. However, unlike the previous reports, we found no patients showing rejection. We also found that the cultured transplanted cells never showed proliferation under the retina or in the

vitreous cavity and concluded that cultured auto IPE transplantation can be performed safely without complications.

Next, we examined whether cell transplantation can be expanded to other degenerative retinal diseases. One of our results showed that host RPE may play an important role against the transplanted cells in the subretinal regions. When we introduced bFGF gene into the cells, we found synexpression cluster of the genes in the cells. One of the most prominent movements among the genes was lysyl oxidase like-1 gene, which plays an important role in the maturation of the extracellular collagen and in cell attachment. However, when we examined the cell attachment on the culture plates after 12 hours of culture, no significant difference was observed between the cells with or without bFGF. Further, when we examined the area of the cells transplanted into the subretinal space of rats during successive follow-up using fluorescein marker (EGFP), no statistical significance was observed. The gene expression pattern may be different when we introduce different growth factor gene. No antibody production was generated against the growth factor gene introduced cells after cell transplantation. Further, when we made transgenic mice expressing bFGF or Axokine cDNA in the RPE of *rd* mice, no photoreceptor degeneration was observed. One of the reasons was suspected to be that bFGF was expressed systemically by the promoter of tyrosinase

related-protein 1 gene and may lead to lethality. Another reason was suspected to be suppression of the function of Axokine by the down-regulation of the ciliary neurotrophic factor or its receptor gene. Conversely, when we produced photoreceptor degeneration by constant light damage in the rats, we found partial photoreceptor rescue by transplantation of the growth factor gene introduced RPE. We show here the possibility that growth factor gene introduced cell transplantation may be applied to

retinal diseases, if we select appropriate cells and genes. (J Jpn Ophthalmol Soc 106 : 778—804, 2002)

Key words : Age-related macular degeneration, Iris pigment epithelial cells, Retinal pigment epithelial cells, Cell transplantation, Growth factor, Gene, Rejection, Transgenic mice, Light damage, Brain derived neurotrophic factor

I 緒 言

再生医療は、再生医学が実際の臨床に応用されるものであるが、組織そのものを最初から提供するのではなく、幹細胞に代表される一部の細胞を細胞増殖因子や細胞外マトリックスなどと一緒に含めて、再生を人工的に手助けするものである。これには、いわゆる再生医工学と呼ばれる人工材料なども積極的に利用されている¹⁾。したがって、実際の臨床ではかなり広い意味をもって、さまざまな医療分野に応用され始めている。皮膚科領域では比較的早くから治療に利用されてきた²⁾。細胞増殖因子の一つとして線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)は、骨の再生を人為的に加速することが動物実験で報告³⁾されている。細胞増殖因子を利用して、自己再生を人工的にコントロールしようとするものである。さらに、虚血性心疾患などでは臨床応用も始められた⁴⁾。神経疾患でもパーキンソン病患者の被殻領域に、胎児の脳神経細胞(ドーパミン神経細胞)を直接投与する治療法が報告⁵⁾されている。神経組織に応用されたことは注目される。再生医工学の人工材料として代表的なものは、自己細胞による再生までの間、一時的にでも再生を補助する人工材料の利用などがあり、人工硬膜の開発などがある⁶⁾。

眼科学分野にも再生医療が取り入れられてきた。角膜上皮幹細胞や羊膜を利用した、角膜上皮疾患に対する治療は代表的なものである⁷⁾。再生医療により、これまで治療法がなかった疾患などにも積極的に治療が試みられてきている。一方、難治性の網膜疾患となると、まだ確立された再生医療がないばかりか、病態についても不明なものが多い。いったん発症すると重篤になる網膜疾患が多数存在する。まだ、臨床結果を評価できる段階ではないものの、難治性網膜疾患の代表である網膜色素変性や^{8)~11)}加齢黄斑変性(age-related macular degeneration, AMD)^{12)~17)}に対して、細胞移植を利用した再生医療の試みが行われてきた。我々がAMDに行ってきた、脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)抜去後に自己の培養虹彩色素上皮細胞(iris pigment epithelium, IPE)を移植する方法¹⁸⁾は、CNV抜去後に障害された網膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)

の代用細胞となることを目的とした。本稿では、これまで東北大学眼科学教室で行ってきた培養自己IPE移植症例の経過を報告し、その結果を考察する。また、AMD以外の網膜疾患に細胞移植による治療を適応できる可能性を、動物実験で検討した結果を述べる。

II 自己虹彩色素上皮細胞(IPE)移植

1. 目 的

AMD患者のCNV抜去後の網膜下へ、培養した自己IPEの移植を行い、その効果と合併症の有無を確認する。

2. 方法と対象

1) 患者

培養自己IPE移植は1998年8月から2002年3月まで、合計45眼に当教室で行われた。症例はすべて黄斑部を中心に出血や滲出物などの変化がみられ、fluorescein angiography (FAG)かindocyanine green angiography (ICG)、あるいは両者を行ってCNVの確認を行った。CNVは0~3乳頭径であった。今回解析の対象になったのは、そのうち6か月以上経過観察が可能であった35眼である。35眼の内訳は男性29例、女性6例、全例片眼で、右眼20眼、左眼15眼であった。年齢は平均 71.1 ± 8.6 (平均値±標準偏差)歳であった。術前の視力はthe logarithm of the minimal angle of resolution(log MAR)視力で3.0~0.40まで(指数弁は2.5, 手動弁; 3.0, 光覚; 3.5, 無光覚; 4.0として計算した)、平均log MAR視力は 1.46 ± 0.67 (平均値±標準偏差)であった。自覚症状の出現から手術までの時間は3~48か月まで平均 17.5 ± 11.1 (平均値±標準偏差)か月で、経過観察期間は6~43か月まで平均 26.5 ± 9.4 か月であった(表1)。すべての患者はFAGかICG、あるいは両者を行っている。眼科的検査はルーチンの眼科検査以外に可能であれば、Humphrey視野検査(30-2)、網膜電図、多局所網膜電図、視覚誘発電位、走査レーザー検眼鏡(scanning laser ophthalmoscopy, SLO)を利用したFAG、ICG検査、光干渉断層計(optical coherence tomography, OCT)検査を術前に行い、経過観察中も必要に応じて施行した。対照として、CNV抜去のみを施行したAMD47眼を表2に示す。

表 1 自己虹彩色素上皮細胞移植症例

症例	性	年齢	患眼	(log MAR)	術後視力 (log MAR)	移植した 細胞数	培養期間 (日)	自覚症状術現からの期間 (月)	経過観察期間 (月)
1	F	58	L	2.50	2.50	20000	32	6	43
2	M	85	L	2.00	2.00	210000	36	3	41
3	M	78	L	3.00	2.50	50000	64	11	39
4	M	73	L	1.00	0.82	10000	43	17	38
5	M	66	R	2.50	0.70	30000	39	9	41
6	M	77	L	1.22	1.22	50000	43	5	35
7	M	67	R	1.22	1.22	50000	81	11	34
8	M	61	R	2.30	2.50	100000	43	6	34
9	M	72	L	1.00	1.00	12000	57	24	34
10	M	70	R	1.20	1.22	20000	46	12	34
11	M	67	R	1.10	1.10	25000	39	7	31
12	M	65	R	2.00	1.00	20000	57	22	30
13	M	74	R	1.00	2.00	35000	44	16	30
14	F	73	L	1.00	1.00	20000	82	10	28
15	M	77	R	0.52	0.52	75000	36	3	27
16	M	71	L	1.10	1.10	120000	78	11	27
17	M	56	R	1.00	1.00	40000	113	43	27
18	M	79	L	1.22	1.22	20000	78	6	27
19	F	74	R	3.00	2.50	50000	102	9	27
20	M	53	R	0.40	0.40	18000	77	17	27
21	M	77	R	1.00	1.00	60000	63	29	26
22	M	61	L	1.52	1.10	35000	84	19	25
23	M	78	R	1.00	1.00	75000	54	21	29
24	M	71	L	0.82	1.22	25000	123	19	23
25	M	68	R	1.30	1.30	55000	81	7	23
26	M	77	L	1.10	1.10	45000	78	42	23
27	M	84	L	1.00	1.00	120000	64	9	22
28	F	74	L	2.50	2.00	35000	78	46	20
29	F	82	R	2.00	2.00	80000	57	13	20
30	F	82	R	2.00	1.40	80000	97	13	16
31	M	64	R	2.00	2.00	120000	63	41	12
32	M	70	R	1.40	1.40	20000	50	48	11
33	M	73	R	0.82	0.82	90000	82	36	10
34	M	75	R	1.40	1.40	20000	109	6	9
35	M	56	L	1.00	1.00	50000	60	16	6

M：男性，F：女性，L：左眼，R：右眼，log MAR：the logarithm of the minimal angle of resolution

2) 患者からの同意の取得

自己培養 IPE 移植については、1998 年 1 月 26 日、東北大学倫理委員会において「虹彩色素上皮細胞の自家移植による加齢黄斑変性症の治療の試み」で承認を得た。さらに、我々はヘルシンキ宣言に基づいた同意書を作成し、移植治療を受けるすべての患者から書面による同意を得た。

3) 自己 IPE の採取と培養

IPE は自己 IPE 移植に同意された患者から、局所麻酔下で周辺虹彩切除術を行って採取した。基本的に、周辺虹彩切除術は 11 時か 1 時方向、あるいはその両者に行った。また、同時に同意を得て患者静脈血から 15 ml 採取し、無菌状態で 3,500 回転、15 分遠心分離し、培養用の血清を確保した。切除された虹彩片は balanced salt solution(BSS)に保存し、以下に示すように、これまで報告してきた方法¹⁸⁾で速やかに IPE 分離の操作を

行った。すなわち、虹彩を 0.25% trypsin を含む Dulbecco 溶液中で 37°C、40 分反応させた。その後、IPE を顕微鏡下で機械的に剝離した。顕微鏡下で回収した IPE は事前に採取していた自己血清を利用し、至適血清濃度である 15% 自己血清¹⁹⁾と 1 ml 中に 100 units penicillin, 0.1 mg streptomycin, 0.25 μ g amphotericin B を含む Ham's F-12 Nutrient Mixture(F-12 medium)(Gibco BRL, Bethesda, MD, 米国)に保存し、無菌状態を維持して培養皿に分注した。これらの IPE は 3 日ごとに同じ培地に交換し、37°C、5% CO₂の条件で培養を継続した。培養細胞は 50~60% の confluent 状態で 0.125% トリプシンを含む、0.2 mM ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA)で回収し、BSS で 3 回洗浄後同一液に保存した。この細胞は移植 30 分以内に調整された。また、以上の培養は、東北大学眼科学教室の一室をヒト IPE 培養専用の“semi-sterile room”に改造し

表 2 新生血管の抜去手術のみを施行した症例

症例	性	年齢	患眼	術前視力 (log MAR)	術後視力 (log MAR)	自覚症状出現からの時間 (月)	経過観察期間 (月)
1	M	77	L	1.22	1.52	4	3
2	M	64	L	1.70	1.40	18	34
3	F	75	L	3.00	3.00	18	29
4	M	66	L	1.70	0.82	9	22
5	M	56	L	1.52	0.52	5	26
6	F	66	R	1.30	1.22	4	3
7	M	76	R	1.70	2.00	60	20
8	M	69	L	1.70	1.00	24	2
9	M	65	R	1.10	0.82	30	15
10	F	66	L	3.00	1.30	2	6.5
11	M	68	L	3.00	1.00	5	9
12	M	78	L	2.50	1.15	4	3
13	M	83	L	2.50	1.00	2	3
14	M	78	L	1.40	2.00	14	3
15	M	65	R	3.00	0.70	2	9
16	M	60	L	3.00	2.50	2	4
17	F	77	R	1.30	1.70	10	9
18	M	68	R	1.22	1.00	7	3.5
19	M	78	R	3.00	1.40	9	73
20	M	66	R	1.52	0.82	24	60
21	F	62	R	3.50	3.00	84	60
22	M	59	L	3.50	3.00	1	24
23	M	77	R	2.50	0.40	24	43
24	M	66	R	3.00	3.00	1	41
25	M	70	L	3.00	1.40	2	5
26	M	68	R	2.50	0.70	2	47
27	F	78	L	3.00	1.70	1	2
28	M	69	L	3.00	1.52	0.5	20
29	F	80	L	1.40	1.52	24	2
30	M	55	R	2.50	1.22	13	33
31	M	68	L	1.70	1.00	10	30
32	M	75	R	3.50	3.50	2	6
33	M	75	L	3.50	1.70	4	24
34	M	67	L	3.00	2.50	5	27
35	M	58	R	1.40	1.22	1	50
36	F	60	R	1.30	2.00	1	41
37	M	69	R	1.70	1.70	1	48
38	F	52	L	1.00	1.15	1	19
39	M	65	L	1.30	2.00	24	39
40	M	74	R	3.00	2.50	36	22
41	F	81	L	1.70	1.70	60	9
42	M	77	R	0.70	1.70	7	31
43	M	72	L	1.70	0.40	13	25
44	M	65	L	2.50	2.50	60	12
45	M	69	R	1.52	2.00	44	51
46	M	71	R	0.40	4.00	5	23
47	M	55	L	3.00	3.50	1.5	22

て行われた。

4) AMD 患者への自己 IPE の移植

3 ポートを作製し硝子体カッターで硝子体を切除後、術前に SLO 検査で確認しておいた CNV の近くで、かつ固視点をさけた部位の網膜に弱いジアテルミー凝固後、小穴を作製し、CNV を鉗子で把持して摘出した²⁰⁾。CNV 摘出後、網膜下腔を特注の細胞移植針などで洗浄後、浅い網膜剝離を作り、自己の初代培養 IPE を細胞

浮遊液の状態、合計 15 μ l 移植した¹⁸⁾。この細胞移植針は細胞移植用口と網膜下腔維持用口の 2 種類の移植口でできている¹⁸⁾。移植後、硝子体腔は約 80% の液ガス交換をして、硝子体腔には 1~1.5 ml の 100% sulfur hexafluoride (SF₆) を注入した。術後、約 4~6 時間後に患者にはうつぶせ姿勢を指示した。自己免疫抑制剤は使用しなかった。

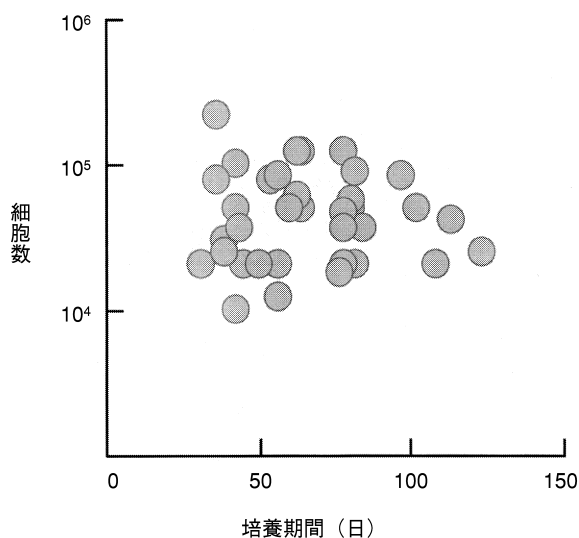


図 1 虹彩色素上皮細胞(IPE)培養期間と細胞数の関係。
横軸に IPE の培養期間(日), 縦軸に細胞数を示した。
両者に相関はない。

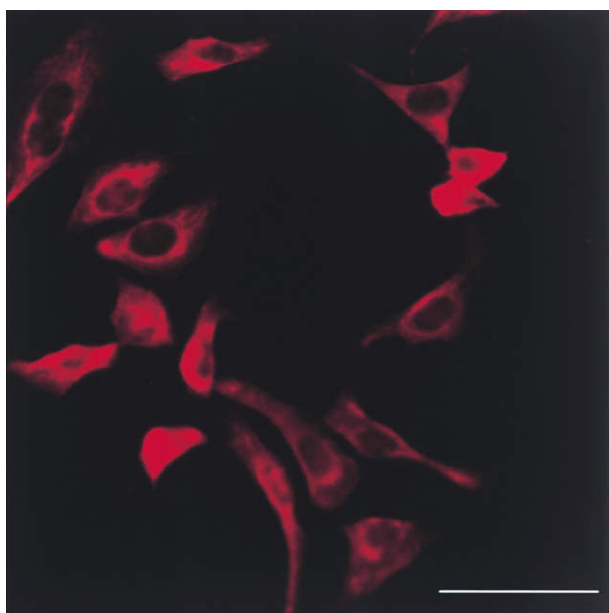


図 2 IPE のサイトケラチン染色。
培養細胞はサイトケラチン染色で上皮細胞由来であることが確認された。バーは 50 μm

3. 結 果

6 か月以上経過観察が可能であった 35 例と、対照として、CNV の抜去のみを行った 47 例の結果を示す。それぞれ平均年齢が 71.1 歳と 69.9 歳, 男女比が 29/6 と 37/10 で有意差なし。自己虹彩色素上皮採取後平均 5.4 週培養することで 1~12 万個の IPE が得られ, 移植細胞数は平均 54,000 個であった(表 1)。今回は培養期間と細胞数の間に相関はみられなかった(図 1)。この培養細胞はサイトケラチン染色で上皮細胞由来であることを確認した(図 2)。また, reverse transcription-poly-

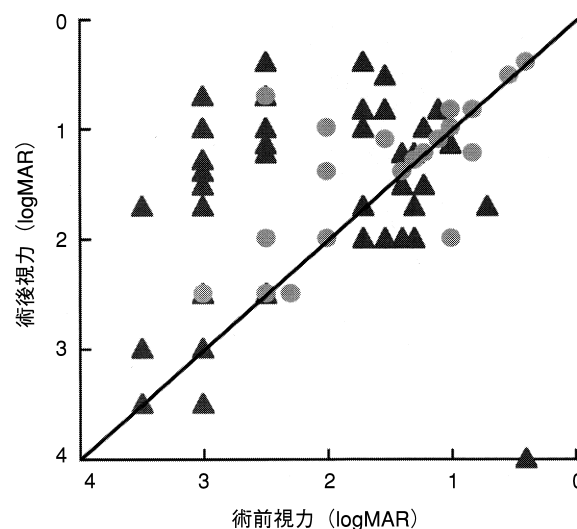


図 4 術前視力と最終視力。

IPE 移植患者(●)と対照として, IPE 移植を行わず, 単純に脈経膜新生血管(CNV)を抜去した症例(▲)を示した。横軸が移植前視力, 縦軸が最終視力で the logarithm of the angle of resolution(log MAR) 視力で示した。

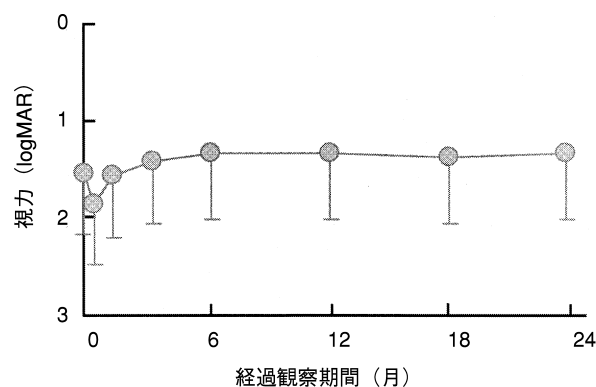


図 5 IPE 移植患者の視力経過。

横軸に期間(月), 縦軸に log MAR 視力を示した。バーは標準偏差を示す。

merase chain reaction(RT-PCR)で色素合成に関与する遺伝子の一つとして tyrosinase-related protein-1 の発現も確認した。経過観察期間は移植患者は, 6 か月から最長で約 4 年であった。図 3 に移植前後の眼底写真, ICG, OCT の所見を示した。図 4 に両者の術前, 術後の視力を示した。●が移植患者で, ▲が CNV 抜去のみを行った患者を示す。最終視力は移植群が log MAR 視力で 1.35 ± 0.58 (少数視力で 0.082 ± 0.083), 単純抜去群が log MAR 視力で 1.67 ± 0.89 (少数視力で, 0.081 ± 0.113) と最終視力は両者に有意差 ($p=0.263$) はなかった。また, 両者の視力経過をみると, 移植患者は術直後 2 週間で一過性に視力が術前より低下することが判明した(図 5)。移植患者の最終視力が log MAR 視力で 0.2 以上改善, 不変, 悪化をした症例がそれぞれ 35 例中 18 例(51.4%), 11 例(31.4%), 6 例(17%)で単純抜去群は

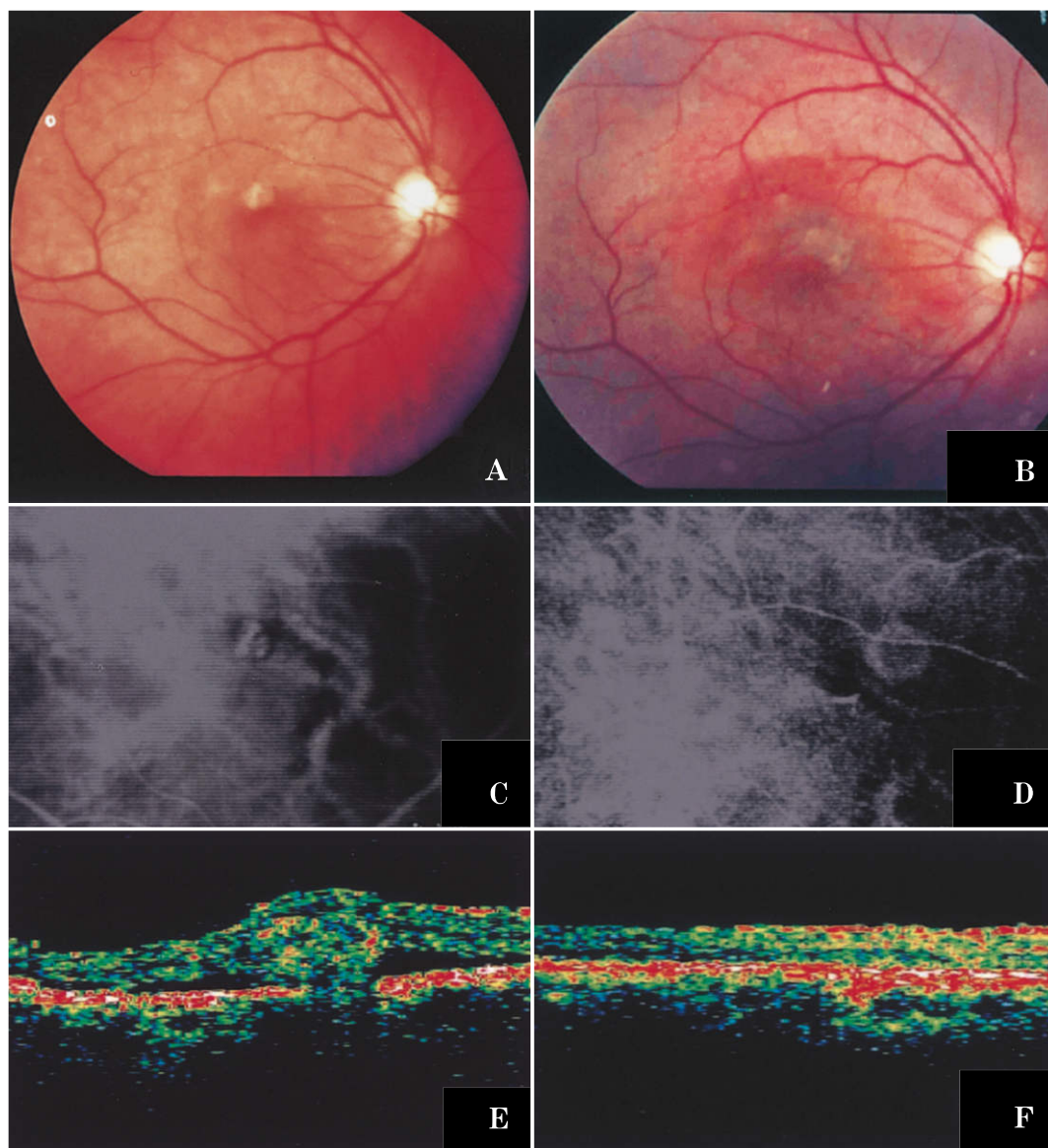


図 3 移植手術前後の眼底所見(代表例)。

A と B はそれぞれ移植手術前後のカラー眼底写真, C と D は移植前後のインドシアニングリーン蛍光眼底造影(ICG)所見, E と F は移植前後の光干渉断層計(OCT)所見を示す。移植術後に移植細胞は確認できない。

それぞれ 27 例(57.4%), 10 例(21.3%), 10 例(21.3%)で, 両者には χ^2 乗検定で有意差はなかった($p=0.476$) (図 6)。細胞移植した症例の合併症として, 網膜周辺部の裂孔形成を原因とする裂孔原性網膜剥離が 3 眼にみられた。単純抜去群では 1 眼に裂孔原性網膜剥離が, 4 眼に網膜下の著明な増殖組織の出現をみた。また, 臨床的に拒絶反応や CNV の再発は移植した患者にはみなかったが, 単純抜去群には 2 眼に再発をみた($p=0.210$)。

III 培養細胞や動物を用いた実験

実験 1. トランスジェニックマウス(Tg)の作製

1. 目的

RED に細胞増殖因子を発現させることで視細胞の変

性が保護できるかどうか, 遺伝的な背景がはっきりしている視細胞変性動物(マウス)のトランスジェニックマウスを作製し, 保護効果を検討する。

2. 方法

Phosphodiesterase (PDE) 遺伝子異常が視細胞変性を起こすことが知られている *rd* マウス²¹⁾に細胞増殖因子遺伝子を導入した。細胞増殖因子は bFGF と Axokine を用いた。それぞれのサイトカインは tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) と *Rpe65* のプロモータを用いて RPE に誘導されることを目的とした。TRP-1 は過去に報告された, *in vitro* で色素細胞特異的発現が確認された mRNA 転写開始部位から上流 1.4 kbp を利用し (東北大学応用生理学, 柴原教授から提供を受けた)²²⁾

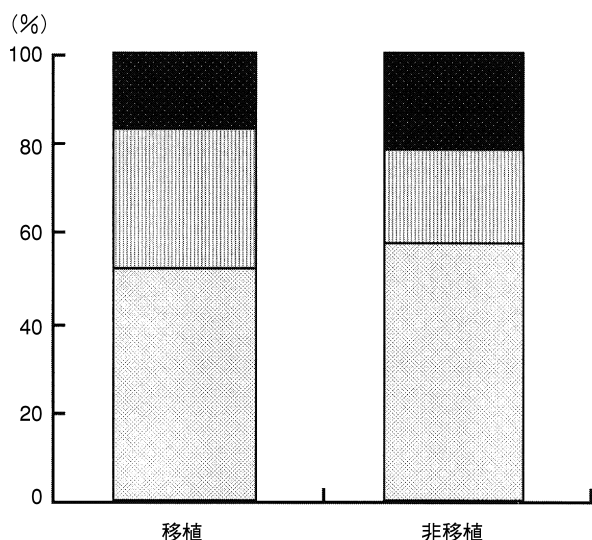


図 6 最終視力の改善率.

IPE 移植患者と CNV 単純除去術を行った症例の視力の改善率を比較した.

■: 悪化, □: 不変, ▨: 改善

²³⁾, *Rpe65* については以前報告²⁴⁾された RPE 特異的発現を持つことが Tg で確認された領域を polymerase chain reaction (PCR) で増幅して利用した. PCR 産物は T-Vetor に組み込んだ後に, 上記した方法で塩基配列が完全に過去の報告に一致することを確認した. internal ribosomal entry site 2 (IRES 2) ベクターを用いて IRES の上流に bFGF cDNA あるいは Axokine cDNA を挿入した. さらに, その直上に上記した *Rpe65* プロモータか TRP-1 プロモータを挿入, 作製した. 上記の構造が完成したベクターは, それぞれのプロモータの直上と SV 40 polyadenylation signal 直下で制限酵素で切り出し, *rd* マウスに導入した. マウスは生後 12 日と 36 日に眼球摘出のうえ, 組織学的に検討した. すなわち, パラフィン包埋後, 3 μ m の厚さに連続切片を作製後, hematoxylin-eosin (HE) で染色し, 外顆粒層の厚

さを測定して比較した.

3. 結 果

生後早期に視細胞の変性をはじめる *rd/rd* マウス²¹⁾ にサイトカインを発現させる Tg を作製することを試みた. TRP-1 プロモータに誘導された bFGF と enhanced green fluorescein protein (EGFP) 遺伝子を組み込んだもの (図 7) を合計 4 回, 計 843 個の卵細胞に注入し, 合計 137 匹のこどもが生まれたが, Tg は生まれなかった. しかし, 遺伝子解析より子宮内で死亡していた個体の中に上記遺伝子を持ったマウスが存在した. これらの個体のほとんどは蛍光顕微鏡で EGFP の発現がみられ (図 8 A), また個体から mRNA を抽出して RT-PCR を施行すると EGFP の発現が確認できた (図 8 B).

Rpe65 プロモータに誘導される Axokine と EGFP は, 同様に 2 回の注入を行い, 2 匹の founder が得られた. 蛍光顕微鏡の観察では RPE を中心に蛍光がみられ (図 9 (A)), RT-PCR で網膜内に Axokine (図 9 B) が発現していることが判明した. もともと色素を持つマウスではあるが, 生後 0 日の Tg と非トランスジェニックマウス (non-Tg) を比較すると, Tg の RPE に強い蛍光が観察された. Axokine は ciliary neurotrophic factor (CNTF) を人工的に変異させたものであるが, CNTF の enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) でも測定可能であった. その結果, 発現量は 1 眼球当たり 9 pg/mg 蛋白であった. 生後 36 日に rod が完全に消失するという過去の報告に従い²⁵⁾, 36 日以外に, 生後 12 日において網膜の外顆粒層の厚さの比較を網膜の後極部 (視神経乳頭より 400 μ m) で測定して Tg と non-Tg を比較した (図 10). いずれの検査日においても外顆粒層の厚さに有意差はみられなかった (12 日は Tg と non-Tg がそれぞれ平均 27.5 μ m (A) と 30.8 μ m (B) で $p=0.796$, 生後 36 日がそれぞれ平均 5.5 μ m (C) と 7.6 μ m (D) で $p=0.354$). また, マウス CNTF や Axokine の

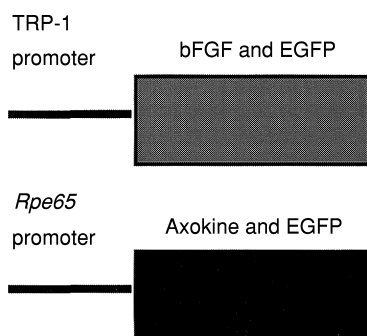


図 7 トランスジェニックマウス (Tg) の作製.

rd マウスに TRP-1 と Rpe 65 のプロモーターを利用して, それぞれ, 線維芽細胞増殖因子 (bFGF) と Axokine cDNA を導入した.

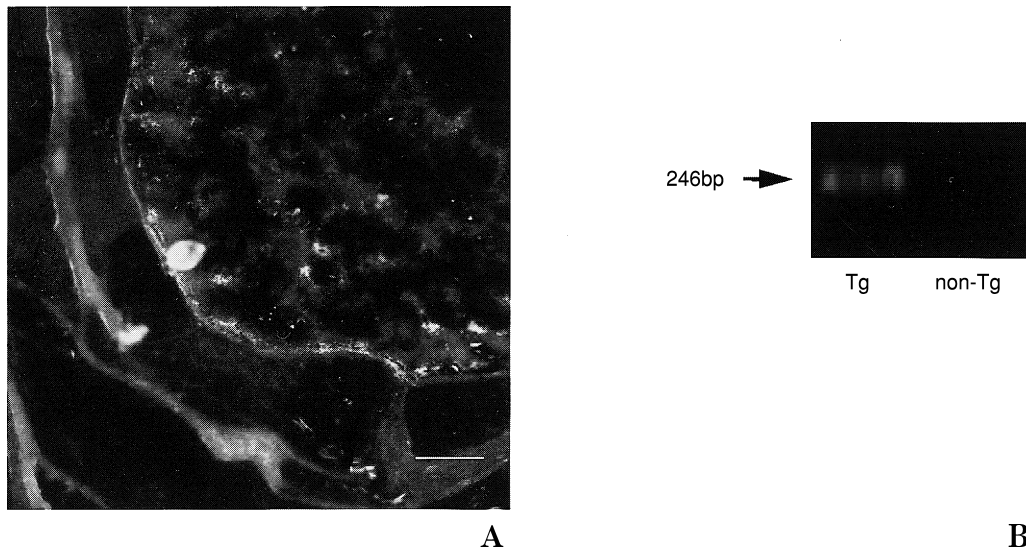


図 8 子宮内で死亡した個体の観察.

A: 蛍光顕微鏡観察所見. 個体は小さすぎて蛍光を発色している部位が同定できない. バーは 100 μ m (B)
B: Enhanced green fluorescein protein (EGFP) の reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

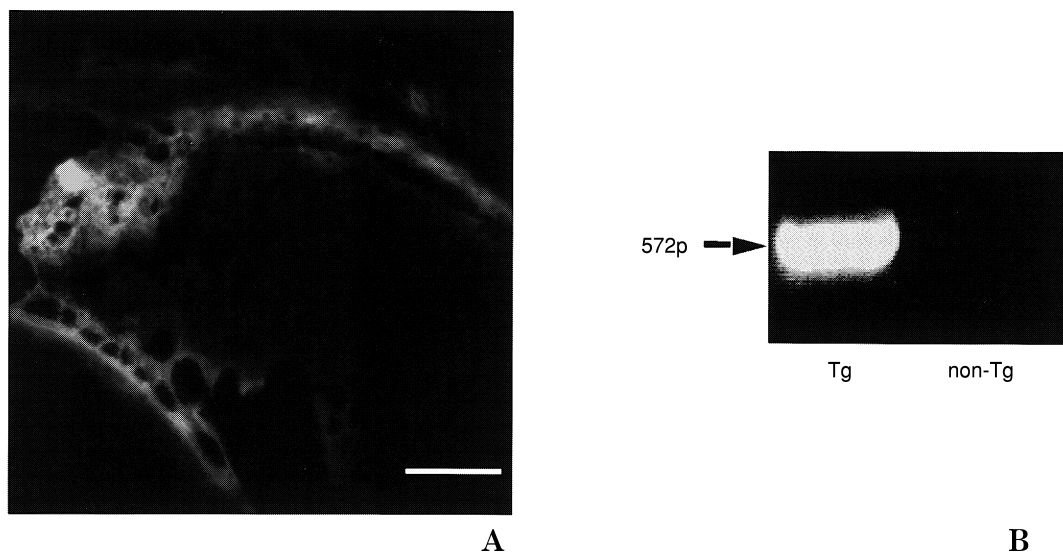


図 9 Tg マウスの網膜の検討.

A: 蛍光顕微鏡所見では網膜色素上皮 (RPE) を中心に蛍光がみられる. バーは 50 μ m B: RT-PCR では Tg に Axokine 遺伝子が発現しているのがわかる.

リセプターと考えられる CNTF receptor (CNTFR) の発現が RT-PCR で検討すると減少していることが疑われた (図 10 E に CNTFR の RT-PCR の代表例を示す).

実験 2. 網膜下に細胞を移植された生体の局所での反応 (サル)

1. 目的

移植細胞に対する局所の反応を検討する.

2. 方法と材料

1) サルへの移植

サルの IPE は過去に報告したのと同じ方法で²⁶⁾分離・培養した. また, 移植方法もヒトの移植方法に準じて行

った. すなわち, サルは pentobarbital sodium (60 mg/kg) と atropine (0.4 mg/kg) で麻酔後, 左眼に 3 port vitrectomy を行った. 硝子体手術後, 黄斑部上方に網膜に小孔を作製し, BSS を 30 ゲージ針で網膜下に注入し, 小さい網膜剥離を作製した. ここにラット RPE を下記した方法でシート状に回収したものを注入した. 移植後硝子体中は 20% SF₆ で置換し, 抗生物質を結膜下注射して終了した. 術後の経過観察中, サルに異常行動はみられなかった. サルはマカカ属日本ザル (Macaca Fuscata) を使用した.

使用した動物の管理は「動物の保護及び管理に関する

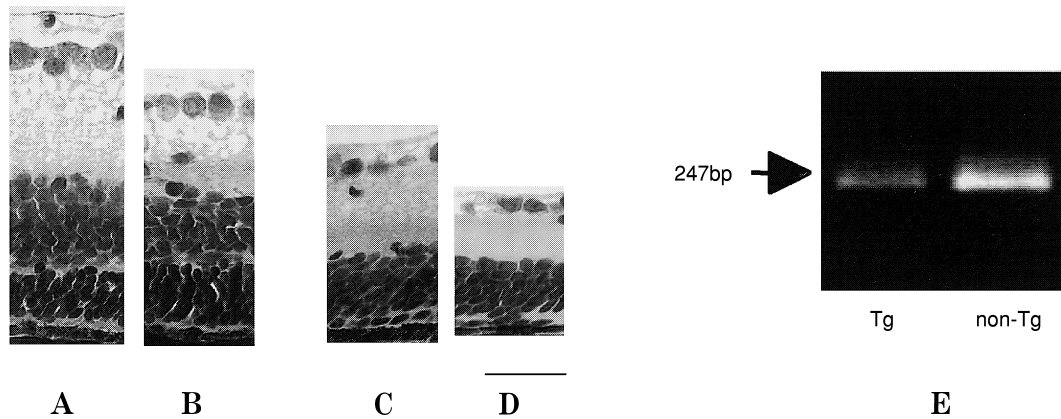


図 10 Tg の網膜光顕所見(HE 染色と RT-PCR).

生後 12 日の Tg(A)と non-Tg(B), 生後 36 日の Tg(C)と non-Tg(D)で, それぞれ外顆粒層の厚さに統計学的に有意差はない. バーは 30 μ m(E) Ciliary neurotrophic factor receptor(CNTFR)の RT-PCR. Tg で発現が減少している.

法律」と「実験動物の飼養及び保護等に関する基準」に従った.

2) 凍結切片作製と組織学的観察

サル眼球は 4% paraformaldehyde-0.1 M phosphate buffer(PB), pH 7.4 で 16 時間固定した. 次に 0.1 M PB 中で 10, 20, 30% sucrose にそれぞれ 24 時間浸した後, 5 μ m の cryostat section を作製し, gelatin をコートしたスライドガラス上で乾燥させ -80°C に保存した. サンプルは OLYMPUS IMT-2(Olympus)の位相差顕微鏡か Leica 蛍光顕微鏡で観察した.

3) 電子顕微鏡による観察

細胞を移植したサル眼球を摘出後, 毛様体扁平部に穿孔創を作製し, 2.5% glutaraldehyde と 2% paraformaldehyde(pH 7.4)を含んだ 0.1 M リン酸緩衝液に固定した. 固定後, サンプルは 1% osmium tetroxide(pH 7.4)に浸した後, アルコールで脱水した. サンプルは Epon 812 に包埋後, 3.3% 酢酸ウラニル-クエン酸鉛水溶液で染色し, 透過電子顕微鏡(JEM-1010; 日本電子株式会社)で観察した.

3. 結 果

温度感受性培養皿にラット RPE を培養し, RPE をシート状に回収した後にサル網膜下に移植した. シート状に回収された RPE には, 細胞外基質の一つであるコラーゲンタイプ IV が, シート状に回収した RPE(0.60 μ g/mg 蛋白質)に, トリプシン処理をして回収した RPE(0.11 μ g/mg 蛋白質)よりも有意に多く回収された($p=0.565$). 移植後 1 週間で硝子体はやや混濁し, 移植部位を中心に網膜は白濁し(図 11 A), FAG では(図 11 B)初期から蛍光色素の漏出が著明であった. 移植後 2 週間で眼球を摘出し, 組織学的に検討した. 色素に富む細胞が移植シート内, 神経網膜内に多数存在するのがわかる(図 12). 神経網膜内では血管の周囲や, 硝子体内にもたくさんの細胞が存在した(図 13 A). サルの RPE は移

植されたラット RPE を取り囲むように存在し, 移植片に向かって丈が高くなったり, また, 脱色素化しかけている RPE も存在した(図 13 B).

実験 3. 培養細胞を利用した遺伝子導入, 移植, 細胞と移植された生体の反応

1. 目 的

移植細胞に細胞増殖因子などを導入することが可能であるかどうかを検討し, 導入された細胞の反応や導入された細胞が実際に移植された場合の生体の反応を検討する.

2. 方法と材料

1) 細胞の採取

実験には ARPE-19 と D 407 RPE の 2 つのヒト RPE 細胞株とラット RPE を使用した. ARPE-19 と D 407 RPE はそれぞれ, Dr. Leonard M. Hjelmeland(Department of Ophthalmology, Section of Molecular and Cellular Biology, University of California)と Dr. Richard C. Hunt(Department of Microbiology, University of South Carolina Medical School)から好意的に提供された. これらの RPE は 10% fetal bovine serum(FBS)を含む Dulbecco's phosphate buffer saline(DPBS)/F-12(Gibco BRL)培地で継代した. IPE と同様に 3 日に一度ずつ培地を交換した. ラット RPE の獲得は我々が過去に報告した方法を用いた²⁷⁾. すなわち, Long Evans ラットの前眼部を取り去った後に, 眼球を 0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA が入った Hank's balanced salt solution(HBSS)(Gibco BRL)に 37°C で 30 分反応させ, 神経網膜を剥離後, 眼球を HBSS で洗浄した. 顕微鏡下で RPE を分離後, RPE を 10% FBS, DMEM/F-12 に回収した. 細胞数は Burke-Turk hemocytometer で決定し, 培地の交換は上記と同様に行った.

シート状に細胞を採取する場合は, 大和ら²⁸⁾が報告した温度感受性培養皿を利用した. すなわち, 培養条件は

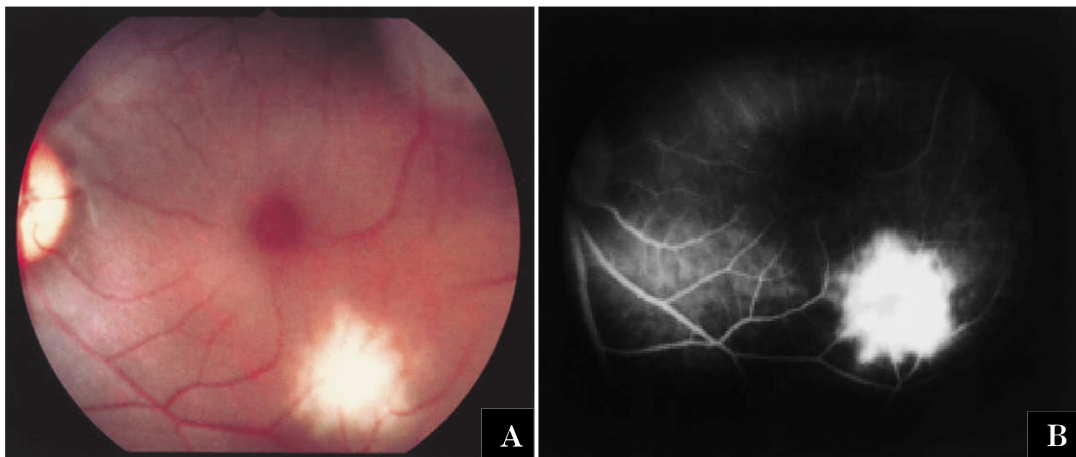


図 11 サルにラット RPE を移植(2 週後).

A: カラー写真. 移植部位の網膜は白濁している. B: 蛍光眼底造影(FAG)では初期から蛍光色素が過蛍光を示した.



図 12 細胞移植部位の凍結切片所見.

移植細胞内(矢印)にも色素をもった細胞が存在するのがわかる. バーは 100 μm

上記と同様であるが, シート状の細胞採取時には, 電子線重合を用いて直径 2 mm, あるいは 6 mm にポリ N-イソプロピルアクリルアミド [poly(N-isopropylacrylamide), PIPAAm] を培養皿表面にグラフト化した培養皿を用いて培養した²⁸⁾. 細胞の採取は 37°C で培養していた細胞を 20°C にして行った. トリプシンなどの酵素は使用しなかった.

2) 培養細胞への遺伝子導入

培養細胞に導入する遺伝子のうち, 脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)cDNA は東北大学神経内科武田篤先生から提供された²⁹⁾. bFGFcDNA はタケダ製薬株式会社から, Axokine cDNA は住友製薬株式会社から提供された. Interferon γ (IF- $\text{N}\gamma$) は桐沢型ぶどう膜炎患者の同意を得て硝子体から, 下記の方法で cDNA を作製し, PCR で増幅し, 310 ABI sequencer (Pharmacia LKB ALF DNA sequencer,

Pharmacia, Uppsala, スウェーデン) で塩基配列を確認後, 使用した. すなわち, dideoxy chain termination 法で, 過去に報告^{30)~33)}された塩基配列と一致するかどうか確認した. それぞれの cDNA は抗カナマイシン遺伝子を発現する pIRES 2-EGFP ベクター (IRES 2 ベクター) (Clontech; California, 米国) か抗 zeocin 耐性遺伝子を発現する pcDNA 4/HisMax TOPO[®] TE Expression ベクター (Topo ベクター) (Invitrogen; California, 米国) に組み込んだ. IRES 2 ベクターはさらに IRES を持ち, 目的遺伝子と同時に蛍光色素である EGFP を発現するように調整されている. Topo ベクターは目的遺伝子の N 末端に 6 個のヒスチジンと Xpress 抗原が追加される. それぞれのベクターは geneticin と zeocin で選択できる. どちらのベクターも lipofection 法 (Gibco BRL) を用いて, 培養細胞に導入した. すなわち, 37°C, 5% CO_2 インキュベーターで 60% confluent になった培

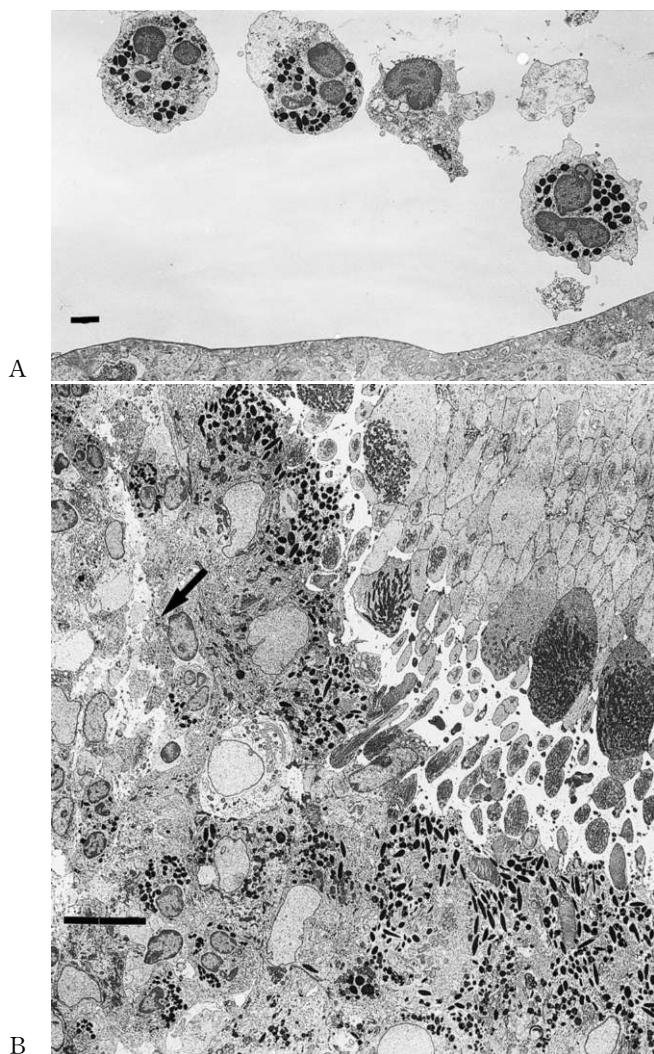


図 13 移植後の透過型電子顕微鏡所見.

A: 硝子体中に遊走している細胞がみられる。バーは 2 μm B: 移植された細胞周囲(矢印)に被移植眼の RPE が取り囲むようにみられる。バーは 10 μm

養細胞に 1-3 μg の DNA と 25 μl の LipofectoAMINE Regent を 100 μl DMEM/F-12 培地の中で混合した溶液を反応させた。37°C で 5 時間反応後、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の geneticin (Gibco BRL) か 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の zeocin (Invitrogen) が入った培地に交換し、培養を継続することでそれぞれの抗生物質耐性のベクターが導入された細胞のみを選択した。これらの細胞は培養と継代を繰り返しても導入遺伝子の発現があることを確認した。

3) 遺伝子導入細胞と非導入細胞の DNA microarray による遺伝子発現の比較

ARPE-19 細胞に上記の方法で bFGFcDNA を導入した。IRES 2 ベクターを用いたために Geneticin でベクターが導入された細胞のみを選択できた。さらにこの cDNA は、IRES を挟んで EGFP 遺伝子も同時に発現するために、蛍光顕微鏡 (Leica DMIRE 2, Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, 米国) を使用すると、Geneticin で選択されると同時に EGFP

と同じ mRNA 上にコードされる目的の bFGF 遺伝子の発現も同時に確認できた。Geneticin 中で選択された培養細胞が EGFP を発現していることを蛍光顕微鏡で確認後、ARPE-19 に bFGF を導入した細胞と EGFP のみ発現させた細胞から 2×10^7 細胞を回収し、下記する方法で mRNA を精製した。それぞれの RNA は 3,800 個の既知の遺伝子がある DNACHIP (Atlas Glass Array; clontech) 上に分注し、遺伝子の発現の差を調べた。まず、下記の方法に従い、cDNA を合成し、蛍光色素 Cy 3 (Amersham Pharmacia) をカップリング反応させて、ラベルした。この DNA はエタノール沈殿とカラム (NucleoSpin Extraction Spin Column, Clontech) を利用して精製した。DNA チップとのハイブリダイゼーションは 50°C で 16 時間行った。反応後、20 XSSC で 3 回洗浄した。続いて、蛍光シグナルを GenePix 蛍光スキャナーで測定後、解析ソフト ArrayGauge を用いて解析した。2.5 倍以上の発現の差を検討するとともに次の解析に用いた。

4) 遺伝子導入培養細胞の生着への影響

細胞の培養皿への生着は Penta らの方法³⁵⁾を改良して行った。まず、各種遺伝子が導入された細胞が目的遺伝子の発現をしていることを確認した後に、細胞を 16 時間の無血清培地で培養した。この細胞を 0.25% トリプシン処理をして回収した後に、96-well プレート上の各 well にそれぞれの細胞を 50,000 個分注した。プレートを 37°C で 4 時間か 12 時間以上反応させた後、培地を吸引、2 回の洗浄後、70% エタノールで室温で 30 分細胞を固定し、2 回洗浄後、0.5% トレパンブルーで染色した。さらに 2 回の洗浄後、1% sodium dodecyl sulfate (SDS) で可溶化した。可溶化された細胞は吸光度計 (OD 600) で吸光値を測定した。

5) RNA の抽出と RT-PCR

mRNA は oligo dT cellulose (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, スウェーデン) を用いて、過去に報告³⁶⁾した方法で抽出した。また、サーマルサイクラー (Perkin Elmer, Norwalk, CT, 米国) を利用して過去に報告³⁴⁾した方法と同じ方法で PCR を行った。Denaturation は 94°C で 1 分、polymeration は 72°C で 2 分を行った。Annealing の温度は表 3 に記載するごとくプライマーごとに変更した。それぞれの PCR 増幅物は 0.05 mg/ml エチジウムブロマイドを含む、1.5% アガロースゲル (Seakem, FMC BioProducts, Rockland, ME, 米国) 上で分離、確認した。

6) Real-time PCR

Real-time PCR はマニュアルに従って行った。すなわち、PCR 産物は Green I dye (BMA, Rockland, ME) で染色し、fluorescein-detectable specific thermal cycler (Smart Cycler: TaKaRa, 京都) で定量した³⁷⁾³⁸⁾。我々が検討した遺伝子は lysyl oxidase-like 1 で、至適

表 3 Polymerase chain reaction (PCR) に使用したプライマーの塩基配列

プライマーの種類	プライマーの塩基配列	増幅されるサイズ (bp)	annealing 温度 (°C)
IFN γ	5'-ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGC-3' 5'-AAAATTCAAATATTGTAGGCAGGAC-3'	531	62
EGFP	5'-ACGACTTCTTCAAGTCCGCC-3' 5'-CCTTGATGCCGTTCTTCTGC-3'	246	60
axokine	5'-ATGGCTTTCACAGAGCATTC-3' 5'-ATTCTATGGGATCCCAGTC-3'	572	58
BDNF	5'-ACAAGGCAACTTGGCCTACC-3' 5'-CTTGACTGCTGAGCATCACC-3'	221	60
bFGF	5'-GAGGAGTTGTGTCCATCAAGG-3' 5'-TAGTTATTTGGACTCCAGGCG-3'	130	55
lysyl oxidase-like 1	5'-ACAGCATGGACGAGTTTCAGC-3' 5'-GGTTATGTCGATCCACTGGC-3'	215	60
CNTFR	5'-CGTTATGAATAAGCACCCACCG-3' 5'-ATCCAACAGTCCAGCTGACC-3'	247	58
β -actin	5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3' 5'-CGGTGAGGATCTTCATGAGG-3'	313	57

IFN γ : インターフェロン γ , EGFP: enhanced green fluorescein protein, BDNF: 脳神経由来栄養因子, bFGF: 線維芽細胞増殖因子, CNTFR: ciliary neurotrophic factor receptor

条件は 3.5 mM MgCl₂, 94°C, 30 秒, 1 サイクル 94°C, 15 秒, 60°C, 30 秒, 72°C, 30 秒, 86°C, 10 秒, サイクル (β -actin), 3.5 mM MgCl₂, 94°C, 30 秒, 1 サイクル, 94°C, 15 秒, 57°C, 30 秒, 72°C, 30 秒, 85°C, 10 秒, 35 サイクル (lysyl oxidase-like 1). 遺伝子増幅後, PCR 産物は melting curve を利用して解析した. Melting curve は PCR 産物の GC % に依存し³⁹⁾, プライマー特異的に増幅される PCR 産物を確認できる. PCR 産物は 0.05 mg/ml エチジウムブロマイドを含む 2 % agarose gel (SeaKem, FMC BioProducts, Rockland, ME, 米国) に流して観察した. 上記した RT-PCR, real-time PCR に利用したプライマーは表 3 に示す.

7) ELISA

BDNF (Promega G 7610), bFGF (DFB 50 R&D system Inc. Minneapolis, 米国), Axokine (DNT 00 R&D system Inc. Minneapolis, 米国) の蛋白量の測定は ELISA でマニュアルに従って行った. まず BDNF の場合, 96 well プレートに抗 BDNF モノクローナル抗体 (1 mg/ml) を散布し, サンプルを添付後, chicken ポリクローナル抗 BDNF 抗体 (1 mg/ml) (pAb) で検出した. 検出には horseradish peroxidase (HRP) を利用した. 対照とともに反応させた溶液は吸光度型 (PIERCE, Rockford, IL) で測定した. bFGF も Axokine も同様に測定したが, ここでは詳細は省く. 最低でも 1 回の測定に 4 つのサンプルを使用した. Axokine は CNTF として, マニュアルに従って測定した. また, コラーゲンタイプ IV (Exocell Inc. Philadelphia, 米国) の測定も同様に行った.

8) 免疫染色

各種実験において, RPE, IPE の上皮細胞由来の証明にサイトケラチン染色を行った²⁶⁾. すなわち, 目的の細胞を 0.3% hydrogen peroxide を含む phosphate-

buffered saline (PBS) で, 室温で 20 分反応させた. 70 % エタノールで固定後, PBS で洗浄し, 培養細胞はマウス抗サイトケラチン抗体 (a monoclonal antibody mixture, Sigma, St Louis, MO) で 4°C で 12 時間反応させた. 洗浄後, Tween (Tw)-PBS-2 % FBS 中でローダミンでラベルした goat anti-mouse (DAKO A/S デンマーク) を室温で 30 分反応させた. 反応後, サンプルを蛍光顕微鏡で観察撮影した. 対照としてマウス IgG を Tw-PBS-2 % FBS 中に使用し, 一次抗体として使用した. Topo ベクター内にある Xpress 抗原 (アミノ酸配列が DLYDDDDK) は抗 Xpress 抗体で染色後, 上記と同様にローダミンでラベルした goat anti-mouse (DAKO A/S Denmark) で反応させ観察した.

9) ラットへの移植

ラットへの移植に用いた細胞は移植直前にトリプシン (0.05% トリプシン, 0.53 mM EDTA, InVitrogen Corporation NY, 米国) 処理により培養皿から回収し, HBSS で 2 回洗浄後に使用した. 移植方法は山口ら⁴⁰⁾の方法に従った. すなわち, 生後 6~8 週の雄 SD ラットを pentobarbital sodium (60 mg/kg) と atropine (0.4 mg/kg) で麻酔した後に, 上眼瞼を切開し上部角膜輪部が十分に露出するように 4-0 シルク糸で切開した眼瞼を固定した. 角膜輪部に制御糸をかけ, 眼球を下転後結膜を切開し, 強膜を露出して移植部位を確保した. 33 ゲージ針で強膜穿孔層を作製し, Hamilton syringe (HAMILTON COMPANY NEVADA, 米国) に装着した 32 ゲージ針で, 準備した移植細胞 20,000/ μ l, 2 μ l 合計 4 万個の細胞を含む HBSS 液を赤道部を中心に網膜下腔に注入した. 対照として同じ量の HBSS を同じ領域の網膜下腔に注入した. 眼瞼を縫合後, 抗生物質の軟膏を注入して手術を終了した. 動物に関する取り扱いにはサルと同じ基準で行った.

10) EGFP を利用した移植細胞の範囲の検討(ラットに移植した比較)

ARPE-19 とラット RPE に EGFP を安定して発現する細胞を上記した方法で作製した。安定して EGFP が発現することを確認した後で、ラット網膜下に移植した。正常の light cycle (light : dark = 14 : 10) に飼育したラットを移植後 3 日, 1, 4, 12 週で眼球を摘出し, 10% ホルマリンで眼球を固定した。前眼部を摘出して, 移植部位以外の強膜に切開を加えて, スライドガラス上でグリセリンとともにカバーガラスをして Leica 蛍光顕微鏡で撮影し, Leica Fluorescence Imaging (Leica Qfluoro V.1.0 a) で解析した。さらに, D 407 RPE にも EGFP を安定して発現させるとともに, Axokine, BDNF, bFGF と EGFP を IRES 2 ベクターを利用して同時に発現させるようにして, 同様に解析を施行した。

11) 細胞移植後の局所の炎症

次に, ラット RPE に IRES 2 ベクターを利用して EGFP か EGFP と BDNF の両者が安定して発現するものを作製した。さらに, Topo ベクターを利用して Axokine, BDNF, bFGF, IFN γ を安定して発現するラット RPE を作製した。前者は EGFP で遺伝子導入細胞を確認でき, 後者はそれぞれのサイトカインの上流にある抗原[Xpress 抗原に対する抗 Xpress 抗体(InVitrogen)]の免疫染色で確認できる。また, 後者は EGFP の効果を除外した結果が検討できる。それぞれ目的遺伝子が安定して発現することを確認した後で, ラット網膜下に移植した。移植後 7 日後に眼球を摘出し, 網膜を組織学的に観察, 検討した。まず, 炎症の程度を炎症が全然みられないものから (0), 網膜全層に渡る炎症を示すもの (3+) まで 4 段階に分類し, それを基に移植細胞の情報をわからないようにして, 我々の 3 人 (MH, YS, T-A) が移植部位で作製した切片の炎症の程度をスコア化し記録した。その後にそれぞれの切片についてスコアを平均し炎症の程度を比較した。

12) 移植細胞に対する抗体(血清中の抗 RPE 抗体の検出)

細胞を移植されたラットの血清中に存在する抗 RPE 抗体の出現をフローサイトメータ (FACS) を利用して検出を試みた。血清は上記したように静脈血を採取後, 3,000 回転 15 分の遠心器で血清に分離し, -80°C に保存した。反応させる細胞は ARPE-19, D 407 RPE, あるいはラット RPE で, それぞれの細胞は $2 \times 10^6/\text{ml}$ の cold PBS に回収し, 等量の 4% パラフォルムアルデヒドを加えて Vortex 後, 室温で 20 分静置した後に cold PBS で 2 回洗浄した。その後細胞は, 5% FBS を含む PBS (5% FBS-PBS) で 2 回洗浄し, $1 \times 10^5/\text{ml}$ cells, 1 ml を 5% FCS-PBS に保存した後に, 1/100 量のそれぞれの血清を加えた。氷上で 30 分反応させた後に, 5% FCS-PBS で 3 回洗浄し phycoerythrin (PE) でラベ

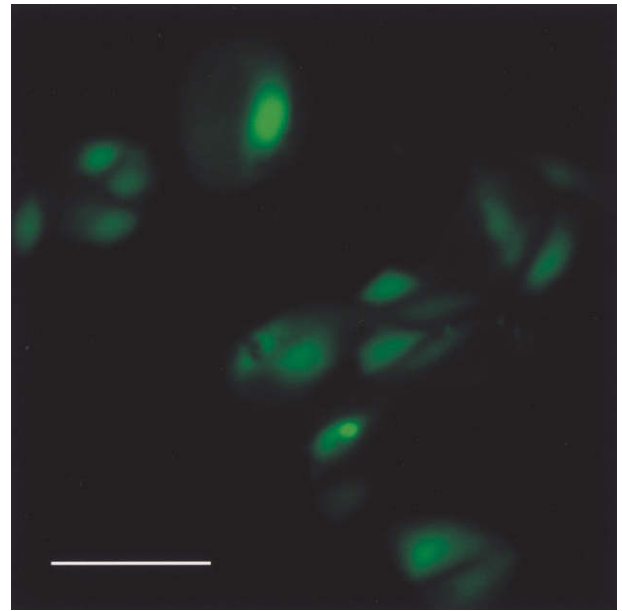


図 14 培養細胞の蛍光顕微鏡での観察。

細胞に蛍光色素を発現する遺伝子が導入されると蛍光顕微鏡の観察で, 遺伝子の導入が確認できる。バーは 50 μm

ルした抗ラット IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Lab. Anti-Rat IgG (H+L) PE conjugate (goat) 112-116-143) を 30 分氷上で反応させた ($10 \mu\text{l}/10^6 \text{cells}$)。5% FCS-PBS で 3 回洗浄した後に, 同一 buffer に保存した ($1 \times 10^5 \text{cells}/\text{ml}$)。

それぞれの反応液は $1 \times 10^5 \text{cells}/\text{ml}$ の濃度でフローサイトメータ (FACSCalibur HG フローサイトメータ, 日本ベクトン・デッキンソン株式会社) で解析した。

3. 結 果

1) 培養細胞への遺伝子導入

それぞれの RPE にベクターや各種細胞増殖因子が導入された細胞は, IRES 2 ベクターの場合は EGFP の蛍光で (図 14), Topo ベクターの場合は 5' 側にある Xpress 抗原の染色を利用して (図 15) 確認することができた。それぞれのサイトカインが導入された場合は ELISA か RT-PCR かあるいは両者を利用して, その発現量を確認した。ラット RPE に Axokine, BDNF, bFGF を導入した場合の濃度はそれぞれ 373, 90, 101 pg/mg 蛋白質であった。

2) DNA microarray による検討

細胞増殖因子遺伝子を導入した場合の遺伝子発現の変化をとらえるために DNA チップを利用した。まず, 我々は IRES 2 ベクターのみを導入した細胞と bFGF も同時に導入した細胞を蛍光顕微鏡で観察し, G-418 で選択してから bFGF の発現を ELISA で測定した。IRES 2 ベクターのみを導入した細胞と bFGF も同時に導入した細胞の培養上清 bFGF 濃度はそれぞれ 3.29 pg/mg 蛋白質と 28.86 pg/mg 蛋白質であった。上記した方法

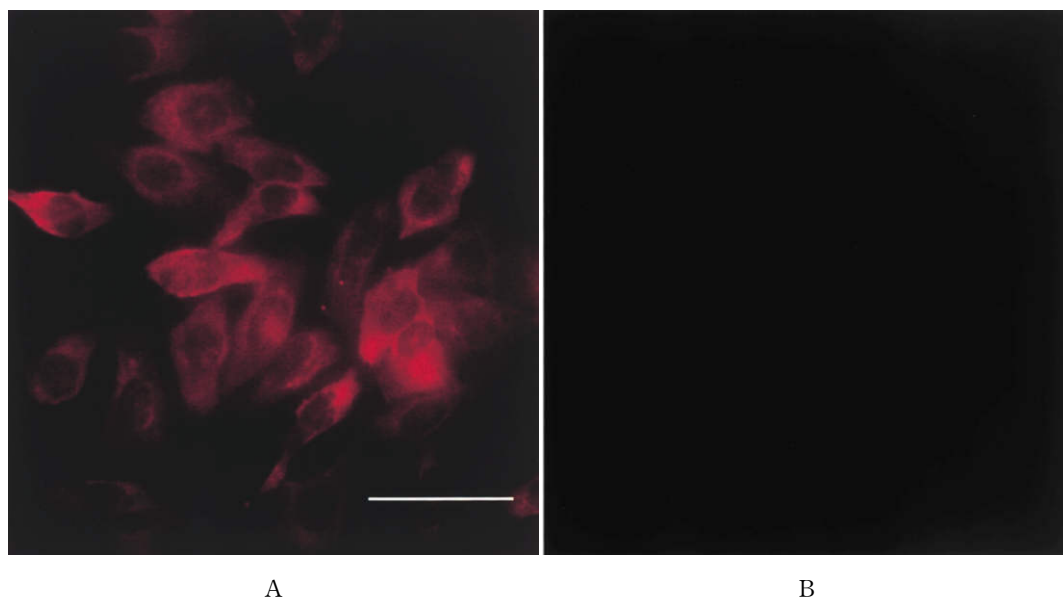


図 15 免疫染色.

A: Topo ベクター内に存在する Xpress 抗原を抗-Xpress 抗体で染色した. B: 1 次抗体にマウス IgG を使用した. 染色されたバーは 50 μm

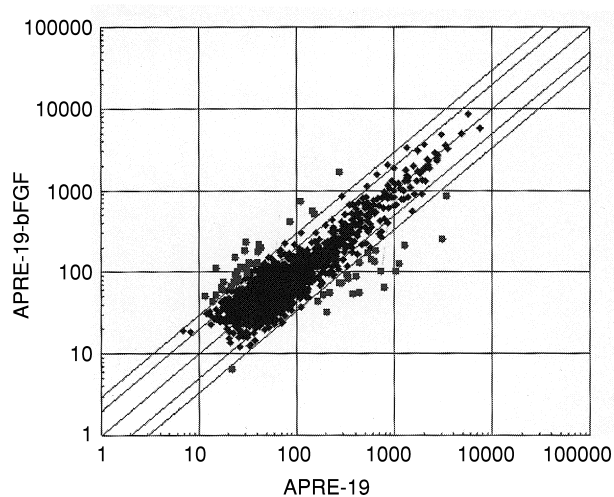


図 16 DNA microarray.

ARPE-19 に bFGF 遺伝子が導入された細胞と非導入細胞の間で遺伝子の発現の違いを調べた. 今回は 2.5 倍以上変動したものを解析の対象にした.

で比較した結果を示す(図 16). 増減はそれぞれ 2.5 倍以上動いたものを表記した. 増加した遺伝子は 17 個で, 神経の発生に関与したもの, 神経保護因子, 免疫機能に関与したもの, その他と大きく 4 つに分類された(図 17 A). 減少したものは 18 個で, 細胞外基質の合成, 分解に関与したもの, チャンネル分子, 神経伝達物質リセプター, サイトカイン関連因子, 核内転写因子, その他の 6 種類に大きく分類された(図 17 B). 最も大きく変動したものは遺伝子であり, bFGF 導入細胞で 12.4 倍発現が減少していた.

今回の比較は ARPE-19 細胞株に bFGF 遺伝子を導入して比較したものであるが, 我々はさらに別の RPE 細胞株である D 407 RPE に同じ方法で bFGF, BDNF, Axokine を導入し, real-time PCR を利用して lysyl oxidase-like 1 遺伝子の発現を検討した. β -actin に対する比で比較したが, bFGF 遺伝子導入 D 407 RPE では ARPE-19 と同様に lysyl oxidase-like 1 遺伝子の発

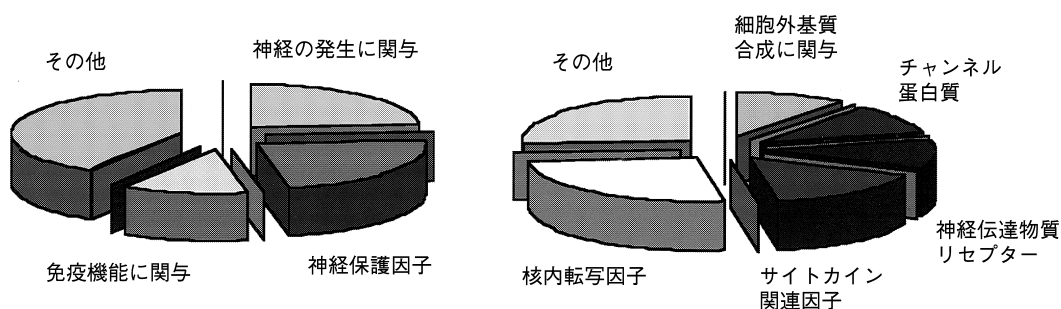


図 17 変動した遺伝子.

bFGF 遺伝子導入後に 2.5 倍以上発現が変動した遺伝子(A)を増加した群と減少した群(B)でそれぞれ分類した.

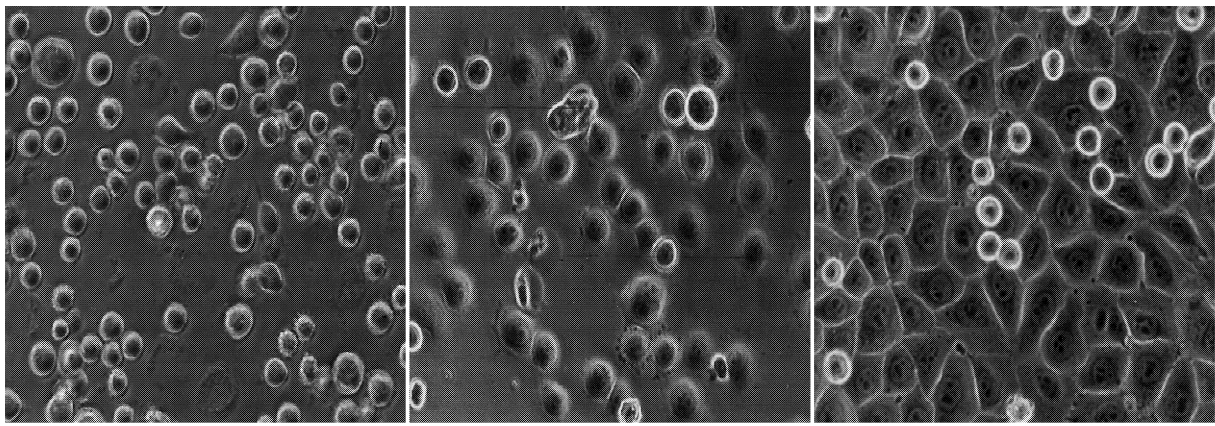


図 19 培養細胞(D 407 RPE)の生着。

A : 培養後 30 分, B : 培養後 3 時間, C : 培養後 6 時間。バーは 50 μ m

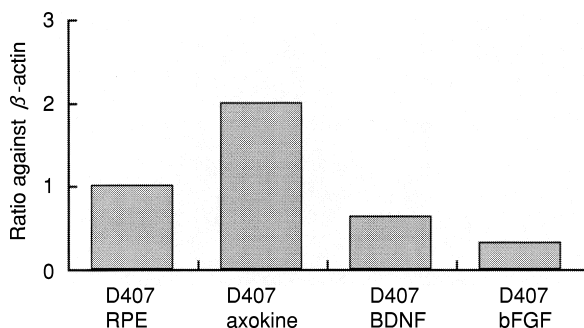


図 18 Real-time PCR.

D 407 RPE に bFGF 遺伝子以外に Axokine, 脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子を導入し, real-time PCR で lysyl oxidase-like 1 遺伝子の発現を調べた。

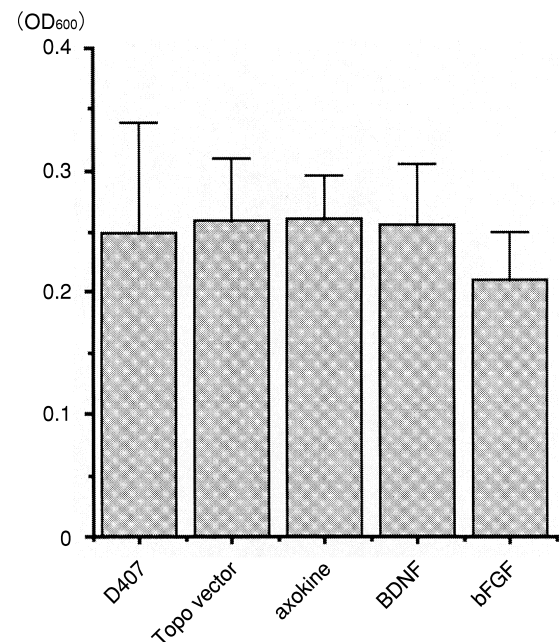


図 21 細胞増殖因子遺伝子導入細胞の生着率。

Axokine, BDNF, bFGF, cDNA を導入した細胞の培養開始 12 時間後の検討。

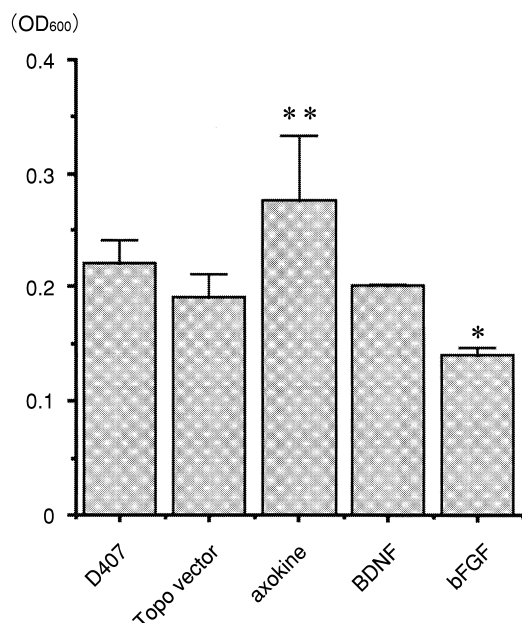


図 20 細胞増殖因子遺伝子導入細胞の生着率。

Axokine, BDNF, bFGF, cDNA を導入した細胞の培養開始 4 時間後の検討。*, **: 有意差。

現が減少していたが, BDNF 遺伝子導入細胞でも減少していた。一方, Axokine を導入した D 407 RPE ではむしろ増加していた(図 18)。

3) 培養細胞の生着率

Lysyl oxidase-like 1 遺伝子は細胞の生着などに関与するために⁴¹⁾, vector, axokine, BDNF, bFGF 遺伝子が導入された D 407 RPE を培養皿にプレーティング後, 約 4 時間で培養皿に正着した細胞を比較した(図 19)。細胞を分注後 4 時間後の細胞生着率を検討すると, bFGF で有意に低下しており(D 407, Topo-vector, Axokine, BDNF に対してそれぞれ $p=0.0030, 0.0245, <0.0001, 0.0146$), Axokine 遺伝子導入細胞は有意に生着率が増加していることが推測された(D 407, Topo-

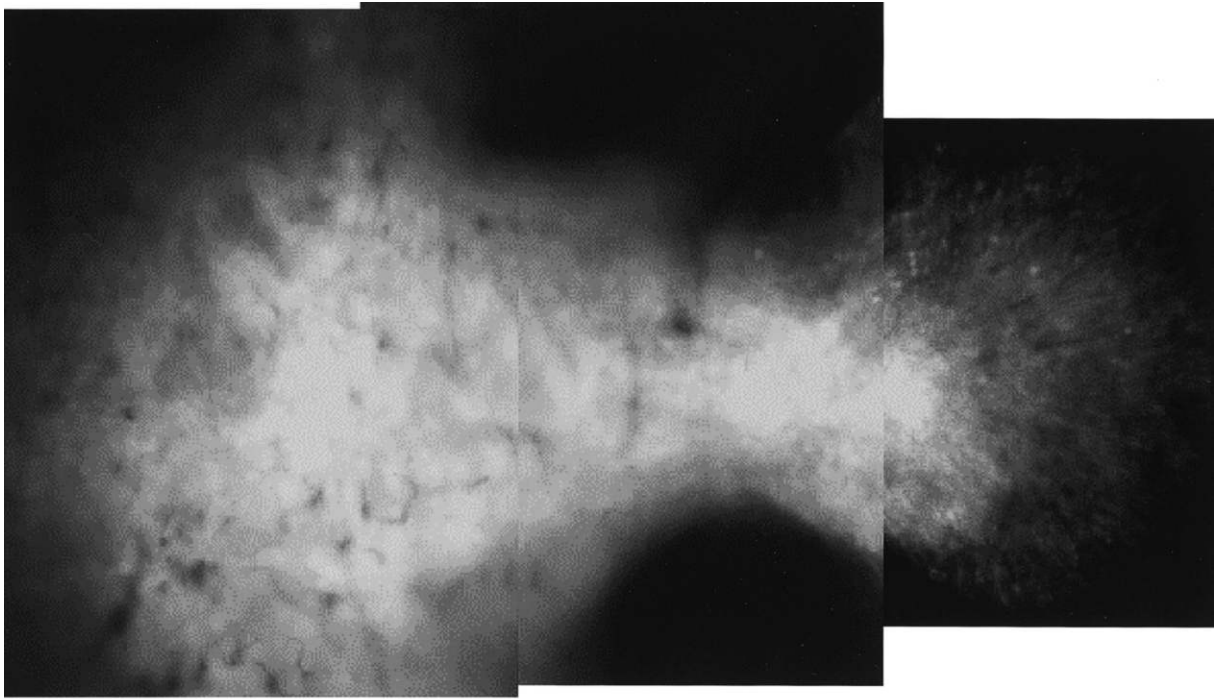


図 22 網膜下の移植細胞。

蛍光色素である EGFP 遺伝子を導入した細胞を移植して、蛍光顕微鏡で移植後の経過を観察した。バーは 500 μm

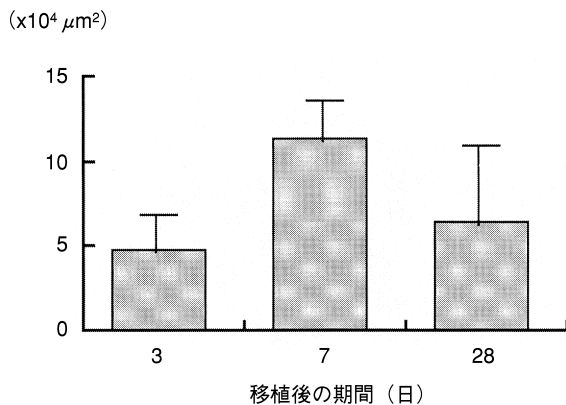


図 23 蛍光色素の面積の推移。

ARPE-19 に蛍光色素を発現させ、その面積を経時的に測定した。移植後 4 週までは測定できた。バーは標準偏差

vector, BDNF, bFGF に対してそれぞれ $p=0.0023$, <0.0001 , 0.0003 , <0.0001 (図 20)。しかし、培養時間を 12 時間以上になるとこれらの細胞間に有意差はなくなった (図 21)。

4) 蛍光色素を発現させたラット RPE, ヒト RPE 移植後の蛍光色素の面積

上記したラット培養 RPE とヒト RPE の培養細胞株 (ARPE-19) にまず IRES 2 ベクターのみ (EGFP が発現する) を導入した細胞を作製し、安定した EGFP の発現を確認してから、ラット網膜下に移植した。EGFP の発現を利用して蛍光顕微鏡で観察し、移植細胞を移植後

3 日, 1, 4, 12 週で状態を比較した。3 日目はラットもヒトも移植部位に蛍光を観察できた (図 22)。1 週目にもほぼ同様の状態が観察されたが、稀に EGFP の蛍光が網膜血管に沿ってみられたり、視神経乳頭上にみられるものも存在した。ARPE-19 の場合、蛍光色素が顆粒状に観察されることが多かった。ラット RPE に導入された EGFP の蛍光は最終的に 12 週まで観察したが、この期間で面積の変化に有意差はなく EGFP の蛍光がみられる面積はほぼ $50,000 \sim 100,000 \mu\text{m}^2$ と考えられた。また、EGFP が発現した ARPE-19 の網膜下の蛍光面積の推移は、移植後 28 日まではラット RPE とほぼ同様の傾向をとることが推測された。3 日, 1, 4 週までで EGFP の面積に有意差はない (図 23)。しかし、ARPE-19 を移植したラット網膜は移植後 12 週では網膜全体が顆粒状の著明な過蛍光を示し、面積の測定は不可能であった。一方、ラット RPE に BDNF, bFGF, Axokine といったサイトカインを同時に導入した細胞の移植後の面積の比較では、BDNF, FGF が面積はやや広い傾向があったものの、EGFP のみを発現させた細胞も含め、それぞれのサイトカイン導入細胞間で蛍光の面積に有意差はなかった。

5) 細胞移植後の局所の炎症

細胞移植後の移植部位を中心とした網膜の炎症所見を定量化することを試みた。上記したように炎症が全くみられないもの (0) から、網膜全層に渡る炎症を示すもの (3+) まで 4 段階に分類し、炎症の程度をスコア化し比

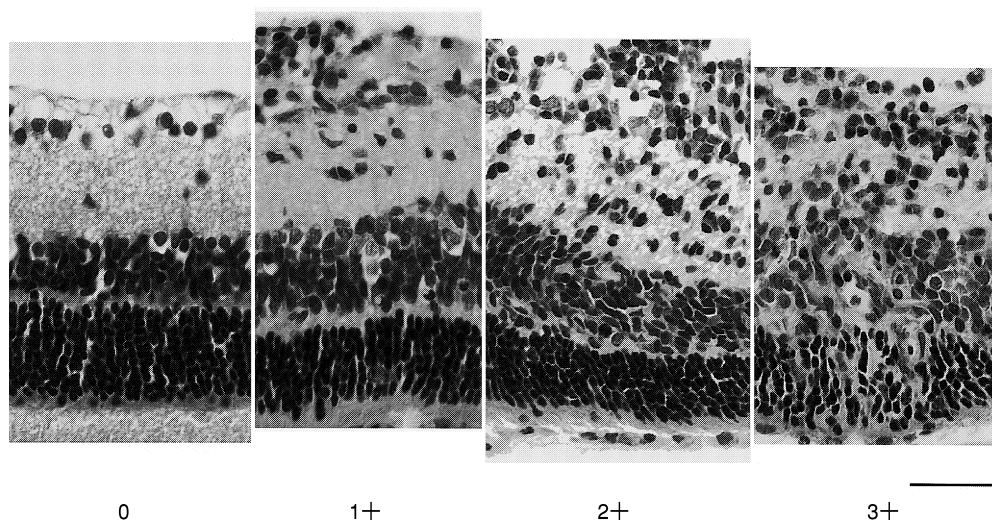


図 24 細胞移植後の網膜所見(ラット, HE 染色).

細胞移植後, 移植部位の炎症の程度を 0~3+ までスコア化した. バーは 50 μ m

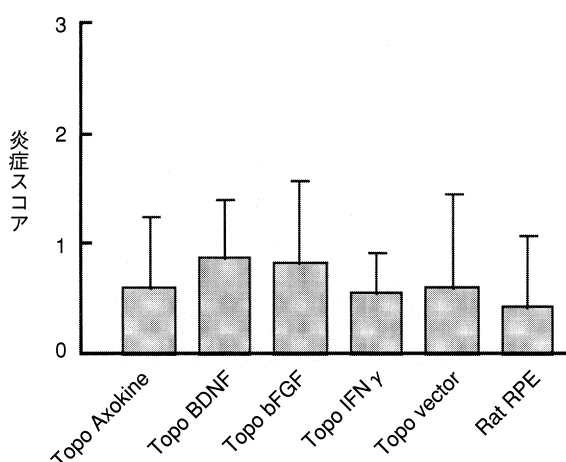


図 25 移植細胞の違いによる炎症の比較(ラット RPE).

ラット RPE に各種遺伝子を導入したものを移植し, 移植部位の炎症の程度を比較した. 有意差はない. バーは標準偏差

較した(図 24). 0 は炎症がみられないもの, 1+ は内顆粒層に炎症が存在するもの, 2+ は外顆粒層にも一部炎症が及んだもの, 3+ は網膜全層に炎症が及んだものとした. Topo ベクターのみを導入した細胞と, ベクターに Axokine, BDNF, bFGF 遺伝子を導入した細胞を移植した後, 1 週間後の網膜移植部位の所見を比較検討した. Axokine, BDNF, bFGF, ベクターを導入した細胞も, 移植した組織を炎症スコアで比較した場合, 有意差はなかった(図 25). 一方, ヒト D 407 RPE に IRE-S 2 ベクター(EGFP 発現)を利用して遺伝子を導入した細胞を移植した場合, EGFP と Axokine を導入した細胞の移植は他の遺伝子導入細胞よりも有意に炎症が強いことが推測された(図 26) (D 407 RPE, D 407 EGFP, EGFPBDNF, EGFPbFGF に対してそれぞれ $p < 0.0001$, 0.0014, 0.002, 0.0001, Fisher's PLSD). それ以外の

サイトカインの導入細胞の場合は, 移植しても網膜内炎症に差はないことが推測された.

6) 血清の抗体反応

RPE を移植されたラット血清を採取し, 使用まで -80°C に保存した. 上記した方法でそれぞれの血清を RPE に反応させ, PE でラベルした二次抗体で移植細胞に対する抗体の出現を FACS で検討した. 反応が大きくみられたものの, 代表例を図 27 に示す. 抗体が血清に存在する場合は, PE でラベルされた細胞集団が蛍光強度が強い右側へシフトするのがわかる. 今回は, 正常ラット血清を使用して反応を進めた蛍光強度の範囲(M 1)を設定し, この範囲から逸脱する割合を(M 2)を % で示し, M 2 の割合を比較した. まず, 正常ラット血清は同種移植 RPE と反応することはない, すなわち抗体はなく, またこの同種 RPE 細胞を移植した場合も移植ラット RPE に抗体反応は示さなかった. しかし, ヒト ARPE-19 や D 407 RPE を移植した場合にはそれぞれの移植細胞に対してほぼ 100% の抗体反応を示すことが判明した(図 28). 一方, ベクター, Axokine, BDNF, bFGF 遺伝子を組み込んだラット RPE を移植した後の血清は遺伝子非導入培養ラット RPE には反応しなかった.

実験 4. 光障害による網膜変性に対する細胞移植の効果

1. 目的

細胞増殖因子を導入した細胞実際に移植することで網膜変性を保護する効果があるかどうか検討する.

2. 方法と材料

光障害は我々が以前報告した方法に準じて行った³⁹⁾. すなわち, 上記の状態で細胞を網膜下へ注入後, 24 時間正常の light cycle(light-dark, 14:10)に飼育し, その後に 2,000-2,500 lux の光を 1 週間照射した. 照射後

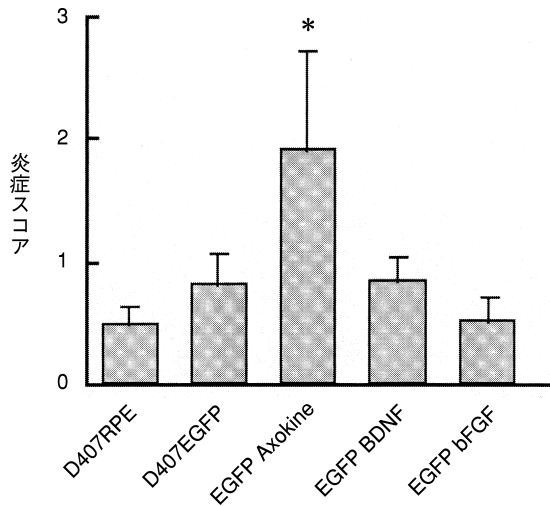


図 26 移植細胞の違いによる炎症の比較(D 407 RPE).
D 407 RPE に各種遺伝子を導入したものを移植した。
*: 有意差があることを示す。バーは標準偏差

carbon dioxide で処理した後眼球を摘出し、4 % paraformaldehyde で固定した後に、パラフィンに包埋した。パラフィン包埋後は視神経乳頭を中心に $3\mu\text{m}$ の厚さで連続切片を作製し、HE で染色し観察した。光照射しないラットや移植をせずに光障害したラットも同様に処理した。それぞれの実験にラットは 4~8 匹を使用した。移植の効果は視細胞外顆粒層の厚さ (ONL) を計測した。まず、HE 染色した組織の写真をコンピュータ上の Leica DC 100 (Leica AG, Heerbrugg, スイス) に取り込み、IPLab program (Scanalytics, Inc. Fairfax, VA) で解析した。測定した部位は視神経乳頭と細胞移植部位を含む平面を視神経乳頭から腹側、背側に $2100\mu\text{m}$ の点で測定した。それぞれのポイントは 5 枚の連続切片の平均を使用した。

3. 結 果

それぞれの細胞増殖因子を導入した RPE を上記と同様にラット網膜下に移植し、網膜光障害に対する視細胞の変性抑制効果を検討した。検討に用いた細胞は、ラッ

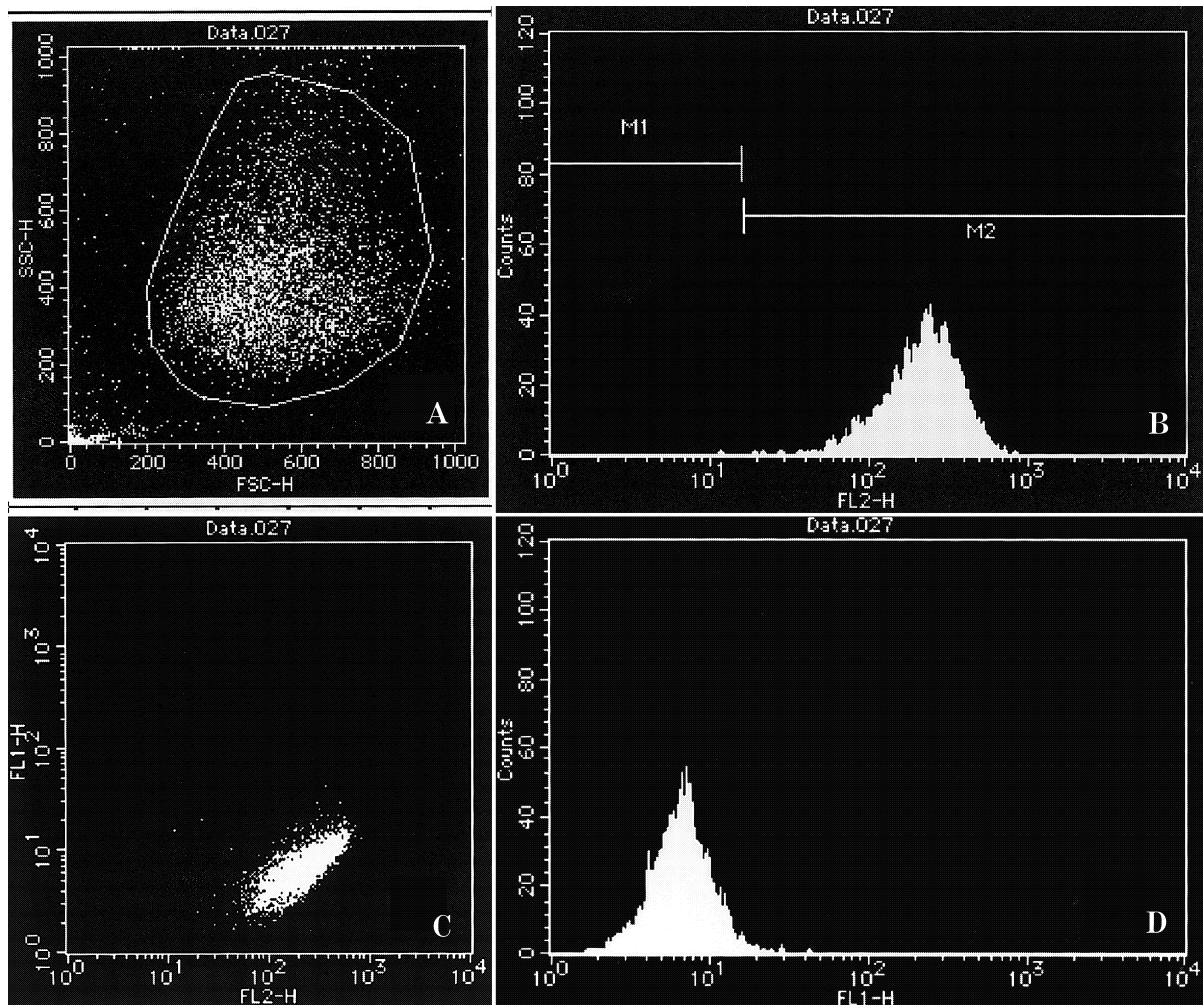


図 27 移植されたラットの血清を利用したフローサイトメータ。

A: 検討する細胞集団を決定する。B, C: 血清が細胞に対して抗体を持つと PE でラベルされた細胞集団は蛍光の強い右側にシフトする。D: FITC の蛍光で検査しても細胞集団の移動はない。

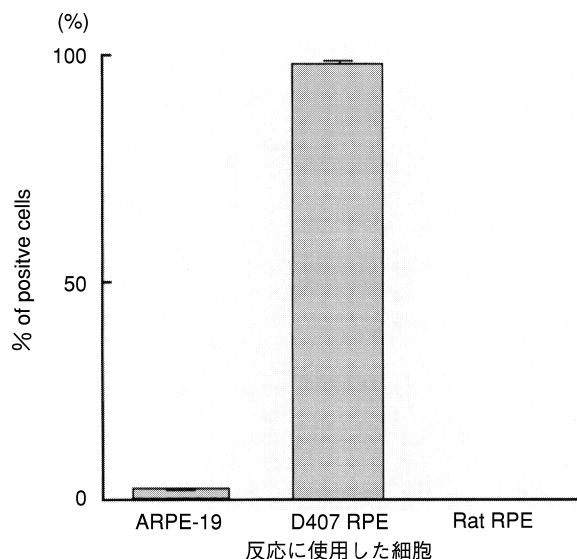


図 28 D 407 RPE を移植されたラットの血清を利用したフローサイトメータ。

異種である D 407 RPE を移植されたラットは D 407 RPE に対して 100% の抗体率を示すがラット RPE に対しては反応せず、ARPE-19 にもほとんど反応しない。

ト RPE と、ラット RPE に Topo ベクターを利用して Axokine, BDNF, bFGF を導入した細胞を移植して比較検討した。上記のように、視神経乳頭から背側(細胞を移植した側)、腹側(一で示した)2,100 の点で視細胞外顆粒層の厚さを測定した。図 29 に示すように、培養 RPE や遺伝子を導入した RPE を移植した場合、HBSS だけの移植や非移植眼に比較して移植した領域の視細胞層が厚く保たれていることがわかる。統計学的に検討すると BDNF を導入した細胞の移植では、非移植眼、HBSS 注入眼、培養 RPE のみの注入より統計学的に有意に視細胞の保護をする(実際の数値をグラフ内に示した)ことが判明した。細胞を移植した背側では BDNF, bFGF, Axokine の順で、培地だけの移植や非移植眼に対して有意に視細胞変性抑制効果があった。しかしながら、この視細胞変性抑制効果は移植部位以外の眼球腹側について検討してみると、BDNF のみが有意に保護効果を示した。FGF や Axokine は、この中で比較すると有意差がない。興味深いことに、Axokine は細胞を移植した背側で有意に保護した部分があるにもかかわらず、腹側では BDNF 導入 RPE 移植よりも有意に視細胞保護効果がないことが判明した。

IV 統計解析

多群間比較には一元配置分散分析を用いて、有意差がみられた場合は Fisher's protected least significant difference (PLSD) の多重比較を行った。また、Mann-Whitney の U 検定、 χ^2 検定も使用した。いずれも p 値が 0.05 以下を有意差ありとした。

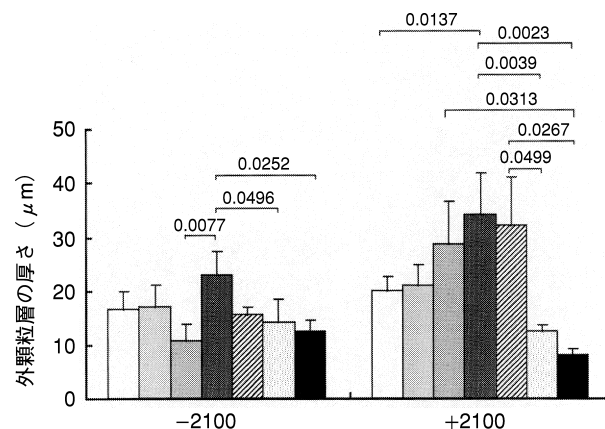


図 29 細胞増殖因子を導入した細胞移植後の網膜光障害。

各種細胞を移植した後で光障害を行い、網膜外顆粒層の厚さを比較した。横軸は視神経乳頭の位置を 0 にして、細胞を移植した背側+2100 μm と腹側-2100 μm で測定し、縦軸は外顆粒層の厚さ(μm)を示した。BDNF 導入細胞の移植が最も光障害を抑制することがわかる。有意差検定の結果は数値で示した。バーは標準偏差を示す。それぞれの細胞は以下に示す通り。
□: ラット RPE, ▨: Topo ベクター, ▩: Axokine, ■: BDNF, ▤: bFGF, ▦: HBSS, ■: 非移植

V 考察

網膜色素上皮(RPE)の変性、脱落は脈絡膜毛細血管の変性萎縮を招いたり、直接視細胞の変性に関与することが示されている⁴²⁾。したがって、加齢黄斑変性(AMD)で CNV 抜去後、RPE が脱落したり萎縮した領域に、RPE あるいは RPE の代用になるものを補い、視細胞の変性、消失を防ぐことが行われてきた。これにはアイバンクから提供された眼球の RPE¹²⁾⁴³⁾や、胎児の RPE¹³⁾¹⁴⁾、あるいは自己の IPE¹⁵⁾¹⁶⁾などを利用するものであった。虹彩自体は中胚葉と神経外胚葉からなるが、IPE は神経外胚葉由来で、発生学的には RPE と起源が同じである⁴⁴⁾。臨床的に採取が容易な IPE も、脱落した RPE の代用として RPE 欠損部へ移植された¹⁵⁾¹⁶⁾。当教室で行った培養自己 IPE 移植の結果は、過去に報告された胎児 RPE 移植の報告¹³⁾と異なり、CNV の抜去という外科的操作が加わったにもかかわらず、臨床的には拒絶反応と思われる所見がみられなかった。

さらに、我々は IPE を一度培養してから患者の網膜下に戻したが、拒絶反応がみられないだけでなく、網膜下や硝子体腔で移植細胞の増殖や増殖性硝子体網膜症などは 1 例もみられなかった。また、CNV の再発がみられた症例もなかった。したがって、培養自己 IPE 移植は安全に行われることが判明した。

IPE の培養期間であるが、我々が過去に報告¹⁹⁾した、動物を利用して検討した場合と異なり、培養期間と細胞

増殖率の間には必ずしも相関がみられなかった。今回の対象は平均 71 歳と比較的高齢であり、細胞の viability の問題もあったと思われる。培養方法の改善など今後の課題として考えられた。

術後の視力経過をみると、術後 2 週間で一過性に視力が低下して、次第に上昇し術後約 6 か月でほぼプラトーに達するらしいことも推測された。CNV 抜去だけを行った症例では術後早期の視力低下はみられなかったため²⁰⁾、細胞移植による何らかの影響が一過性に出現した可能性が考えられる。また、これまでのところ最終視力に 0.4 という上限があり、最終視力も術後最高視力も、単純に CNV を抜去した患者群との間に有意差はない。図 2 の移植後の眼底写真に示したように、培養した IPE は色素がほとんどなく、移植細胞を直接確認するのは難しい。Algvere ら¹³⁾も報告しているように、培養細胞を移植した場合、術後の視機能と移植細胞の関係を論ずるのは難しい。

一方、Thumann ら¹⁶⁾は術中に IPE を分離し、培養しないで直接網膜下に移植したために (iris translocation)、術後に色素のある IPE 塊を確認できた。Microperimetry を行ったところ、20 眼中 2 眼で、術後この色素上に反応があったと述べている。

サルに培養自己 IPE を移植した後に組織学的な検討をすると、培養自己 IPE が、視細胞の外節を貪食している所見も確認でき²⁶⁾、培養 IPE と RPE の機能の類似性も報告^{45)~47)}されていることから、移植した IPE が RPE 類似の機能を持つ可能性は十分にあると考えられる。

IPE 移植をしたにもかかわらず、術後の視力が CNV を抜去した症例と有意差がみられないのは、神経網膜の問題や移植細胞の網膜下の分布、生着率、あるいは培養期間と細胞数の関係でも示されたように、移植細胞の viability などの問題が考えられる。今後は、移植時期や移植方法など、検討の余地があると考えられる。

IPE 移植を改善させ、細胞移植を利用した網膜疾患の再生医療が可能であるか検討するために、まず、細胞の投与だけでなく、これまでも他疾患で重要な役割をしてきた細胞増殖因子の利用も試みた。

bFGF などは代表的な細胞増殖因子であり、長い間動物実験で検討が進められ³⁾、また、実際に臨床応用が行われた⁴⁾。さらに、視細胞変性動物モデルでも視細胞変性を抑制することが知られており、bFGF 以外にも、さまざまな細胞増殖因子が視細胞の変性を抑制することが報告^{48)~52)}されてきた。今回、我々はまず、bFGF と Axokine を視細胞変性動物モデルの代表である *rd* マウスに過剰発現させる Tg を作製することで、視細胞の変性が遅らせることができるのかどうか検討した。*rd* マウスは PDE 遺伝子異常で視細胞が変性することが知られているマウスで²¹⁾、視細胞の変性過程も組織学的によ

く調べられている⁴⁰⁾。杆体細胞がほとんど消失すると報告された生後 36 日と、変性がはじまり、まだ視細胞が残存する 12 日に組織学的な検討を行った。RPE に発現させたのは、上記したように、我々のこれまでの細胞移植の経験からいっても、RPE であれば取り扱える可能性があることを考慮したものである。さらに、*rd* マウスを利用したのは、AMD 以外の網膜疾患に再生医療を取り入れられる可能性を探る目的があった。RPE 自体は利用しやすい細胞であるために、これまでもたくさんの実験が報告されてきたが、RPE 特異的な遺伝子の解析となると限られてくる。我々は Boulanger ら²⁴⁾により RPE 特異的な発現を持つ領域が解析された *Rpe65* 遺伝子のプロモータと、Shibahara ら²²⁾²³⁾により報告された TRP-1 のプロモータを利用して、RPE に目的遺伝子を発現させることを試みた。結果的に、どちらの Tg も視細胞の変性を抑制することはできなかった。まず、TRP-1 に誘導された bFGF は発生の初期から全身に発現したためと思われるが、すべて致死性であった。子宮内で死亡した胎児をみても、体内のさまざまな部位に bFGF が誘導されていることが疑われた。やはり、細胞増殖因子と呼ばれる生理活性物質は、必要な部位で必要な量だけ分泌されるべきものであり、不必要に、どこにでも多量に発現させるべきものではないことが判明した。

さらに、*Rpe65* で誘導された Axokine は RPE にしか発現せず、この Tg は生存できたが、視細胞の変性を抑制する効果はみられなかった。上記したが、Axokine は CNTF を人工的に変異させたものであるが、構造的にも CNTF と非常に類似している。Real-time PCR で検討する限りマウス CNTF や Axokine のリセプターと考えられる CNTFR の発現がトランスジェニックマウスで減少している可能性があり、Axokine 過剰発現の影響も推測できる。したがって、どちらの Tg も導入した bFGF や Axokine が変性しなかった視細胞に作用しているとはいいいにくく、これらの因子の実際の効果についての判断は難しい。また、Axokine を過剰発現させた場合、bFGF ではみられなかったリセプターレベルでの生体内の作用調節などが、なぜ Axokine の発現で出現したのかなど不明の点は多いが、サイトカイン自身の問題、プロモータの強さの問題など解決されるべき問題は山積している。

Tg の解析をまとめると、細胞増殖因子を使用するためには、使用する因子を厳選し、局所誘導で、また投与の時期も慎重にする必要があると考えられる。

局所で細胞増殖因子を使用する目的のために、次に我々は培養細胞に各種細胞増殖因子を遺伝子の形で導入し、この細胞を移植することで網膜疾患に適応できる可能性があるかどうかを検討した。まず、網膜下に移植された細胞に対する局所での反応を確認した。反応をより

明確にする目的でサルへ異種のラット RPE を移植したが、組織学的な検査では著明な炎症細胞の集積以外に、サル RPE が移植された細胞を取り囲むような所見が明らかになった。炎症細胞の解析など、今後明らかにされるべき点は多いが、生体の RPE も局所の反応に関与している可能性が推測された。網膜下へ細胞移植を行ううえで、注意すべき点の一つである。

また、利用する細胞の採取法であるが、網膜疾患に再生医学を適応する場合、基本になる細胞の由来は網膜に由来する細胞が最善である。しかし、特に神経組織はいったん分化してしまうと、再生するのは不可能ではなくても、かなり制限されることが知られている⁵³⁾⁵⁴⁾。ここに、stem cell や ES cell の活躍の場が出現する可能性がある。しかし、これらの細胞も、自己の細胞を利用しようとする現状ではかなり困難である。

IPE 移植は、自己細胞を用いた一つの工夫であったが、異種あるいは同系異種の細胞は採取が容易であったり、いつも一定の条件を満たすことが可能で、機能的にも、人工的に調節が可能であり、利点は多い⁵⁵⁾。なんといっても、現時点では分化した細胞を十分量入手することはかなり困難であり、さまざまな疾患に異種の細胞を利用して移植する試みが報告⁵⁵⁾されている。

実際に血管を含まないブタの組織はヒトの心臓弁移植に利用されてきた⁵⁶⁾⁵⁷⁾。また、神経組織を利用した異種細胞移植は、既にパーキンソン病で報告⁵⁸⁾⁵⁹⁾された。しかも、ブタ神経細胞がヒトの神経組織内でニューロンを伸ばし、生着していることまで報告⁵⁸⁾されている。ラットを用いた実験でも、神経組織への異種神経細胞を移植した場合の生体の反応などが報告⁶⁰⁾された。眼内は免疫学的に特殊な部位であることも報告⁶¹⁾されており、また、胎児の RPE は immune privileged tissue と報告⁶²⁾されている。しかし、AMD の CNV 剥去後に胎児 RPE を移植した場合、視力が改善できた症例はなく、拒絶反応や移植細胞の生着の問題が原因と考えられている。血液-眼関門の破壊がなかったり、移植する部位によっては、異種の、あるいは同系異種の細胞でも、臨床的に拒絶反応はみられないことも報告⁶³⁾されているが、詳細については不明であり、機能や移植細胞の運命に至っては、全くといっていいほど知られていない。今回のようにサルにラット RPE を移植した場合、我々が以前報告した自己 IPE を移植した状態とは異なり²⁵⁾、移植部位の網膜は白濁し、硝子体も混濁し、蛍光造影では初期から著明な蛍光の漏出がみられ、臨床的には拒絶反応と考えられた。

一方、ラットに RPE を移植し、移植細胞の網膜下での存在を EGFP の蛍光顕微鏡で追跡したが、少なくとも同種の細胞を使用する限り、12 週後でもその面積が有意に増加したり、減少したりすることはないのに対して、ヒト RPE を移植した場合、12 週後では網膜全体が

顆粒状の過蛍光になった。FACS でも異種細胞を移植した場合は、必ず移植細胞に対する抗体反応が出現した。この場合、興味深いのは図 28 に示したように同じヒト RPE でも D 407 と ARPE を移植した場合、抗原として認識されるものが違う可能性があることである。細胞株の違いがあるが、培養される条件などでも抗原性が異なる可能性もある。ラットに移植する場合は蛍光眼底撮影は行っておらず、組織学的な判断では十分でない可能性や動物種の違いの問題もあるが、今回の検討では、少なくとも異種の細胞は網膜下でも拒絶反応や炎症を起こす対象になると考えられた。また、細胞に導入された細胞増殖因子が局所での炎症を抑える可能性も当初は考えたが、少なくとも D 407 RPE に Axokine と EGFP を同時に発現させたものを移植すると、炎症が助長される可能性が示された。しかし、同種細胞に各種細胞増殖因子を導入しても、異種細胞を移植したときのような局所での明瞭な炎症反応をみなかった。さらに、FACS を利用して、全身の反応を検討したが、同種の細胞は、細胞増殖因子遺伝子を導入した細胞を移植しても、移植細胞に対する抗体反応は少ないと考えられた。

また、遺伝子を導入された細胞は、その刺激に対して一連の反応をすることが推測されたが、bFGF 導入で最も変動したものは、コラーゲンやエラスチンなどの細胞外マトリックス成分の成熟に関与し⁶⁴⁾、細胞の生着にかかわる酵素であることが知られている⁴¹⁾、lysyl oxidase-like 1 遺伝子であった。この遺伝子の動きは、さらに D 407 RPE 細胞に bFGF 遺伝子を導入した後の real-time PCR でも確認され、また他の細胞 (MC 3T3-E 1 細胞) でも bFGF がこの遺伝子の発現を down-regulation することが報告⁶⁵⁾されている。今回の検討で RPE も同じ反応をすることが示された。

しかし、Axokine 導入ではむしろ up-regulation されており、細胞増殖因子とはいえ導入される遺伝子によってはそれぞれの遺伝子の発現が異なっていることが推測される。Lysyl oxidase-like 1 遺伝子の機能は培養細胞移植に重要と考えられたので、各種遺伝子を導入した細胞の生着率について検討したが、培養短期間では有意差があったものの、12 時間以上培養すれば細胞の生着率に有意差はなくなり、また、この細胞をラットに移植しても、4 週後ではベクター導入細胞と比較しても細胞分布の面積に差はなかった。今後は、変動を示したそれぞれ一つ一つの遺伝子について詳細な検討が必要になると考えられるが、今回の検討では移植には問題がないと推測された。

以上の結果をまとめると、網膜下に移植された細胞に対しては宿主の RPE も局所でさまざまな反応に関与する可能性がある。また、導入する細胞増殖因子を適切に選択すれば、細胞増殖因子を導入した細胞に対して、局所的にも全身的にも明らかな炎症の誘発や抗体反応はみ

られない。

実際に細胞増殖因子導入細胞移植が網膜変性保護効果を示すかどうかを検討した。動物モデルは光障害を利用した。Tg と違い視細胞の変性の時期を調節でき、細胞移植の効果を確認しやすいと考えた。結果に示したように、RPE 移植により、視細胞の変性は非治療群や HBSS のみを移植したラットに比較して、移植部位の視細胞変性を抑制する効果があると考えられた。手術や外傷によりインターロイキン(IL)-1 β , IL-6, TNF α といったサイトカインが発現誘導されることは報告⁶⁶⁾されている。我々も報告⁶⁷⁾したが、網膜下細胞移植の手術操作により、何らかの視細胞保護因子が移植部位に出現している可能性がある。これらの因子は移植細胞から分泌されるものなのか、移植という機械的な操作でも生じるのか明らかにされていないが、HBSS のみを注入しても非治療群よりも注入部位でわずかに視細胞保護効果が少しあることを考えると、移植操作だけでも発現する可能性がある。実際の臨床でも、移植操作による網膜保護因子の出現を推測している報告⁹⁾もある。

各種細胞増殖因子を導入した細胞は、移植部位では非導入細胞よりもさらに視細胞保護効果があることが判明した。Axokine, BDNF, bFGF は非細胞移植群に比較して有意に保護効果を示すが、興味深いのは移植した領域以外の部位の視細胞保護効果を検討した場合である。BDNF は移植部位以外でも有意に網膜保護効果を示したが、以前にも報告³⁴⁾したように、培養細胞上清中にもたくさん分泌され、BDNF の効果が広い範囲に及ぶことが考えられる。また、bFGF を導入した RPE の DNA microarray の結果からも推測されるように、BDNF 導入 RPE からは神経保護や成長に関する因子がでていた可能性もある。Axokine は移植部位以外には効果がないことが推測される。上記したが、Axokine は EGFP と同時に発現させると、移植部位には炎症が強く誘導される可能性もあり、遺伝子導入細胞移植には適さない因子であるかもしれない。

これに対して、BDNF は非細胞移植領域にまで光障害の視細胞保護効果があることがわかった。網膜全体に細胞を移植しなくても、比較的広い範囲にその効果が及ぶ可能性があり、炎症を誘発することもなく、遺伝子導入細胞移植には良好な因子と考えられた。我々のこれまでの検討によれば、BDNF 遺伝子を導入した細胞は *in vitro* でも N-methyl-D-aspartate (NMDA) により誘導される神経細胞死を抑制することも判明しており³⁴⁾、BDNF の広い神経細胞保護作用が考えられる。

また、上記したように少なくとも同系の細胞を使用する限り、ラットにおいては移植した細胞が網膜下で 12 週以上生存することが明らかであり、長期間 BDNF の効果を維持できるとなると、BDNF を導入した細胞は網膜疾患の治療法になり得る可能性もある。

VI ま と め

東北大学眼科で AMD に対して以前行われた、単純に CNV を抜去だけを行う手術とその成績の検討から、CNV の抜去とともに脱落する RPE 対策に、自己の IPE を移植するという再生医療を試みてきた。開始してから今年でちょうど 4 年である。これまでの成績を確実に解析すると、まず、自己の IPE を培養して網膜下に移植しても安全であることが判明した。しかし、視力予後の点からは、さらに新しい工夫が必要であると考えられた。

新しい工夫の一つとして、細胞を安全に移植できることが判明したことにより、これまで臨床応用されなかった、遺伝子を利用した難治性網膜疾患の治療にも利用できる可能性が考えられた。bFGF や BDNF は同種の細胞に導入されれば、局所の炎症の誘発はないと考えられ、また、全身的にも移植細胞に対する抗体反応はみられない。

さらに、光障害の実験では統計学的に有意に視細胞を保護することも判明した。今後は、多方面からの詳細な検討が必要であるが、これまでに報告のなかった、自己の培養細胞を網膜下に安全に移植できるという事実をもとに、遺伝子操作を追加すること以外にも新しい治療法の展開に期待したい。

文 献

- 1) 田畑泰彦：再生医療のための生体組織工学。蛋白質核酸 酵素 47：770—778, 2002.
- 2) Suzuki S, Kawai K, Ashoori F, Morimoto N, Nishimura Y, Ikada Y：Long-term follow-up study of artificial dermis composed of outer silicone layer and inner collagen sponge. Br J Plast Surg 53：659—666, 2000.
- 3) Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, Tamura M, Yuge T, Fukuda H, et al：Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. J Bone Miner Res 13：942—949, 1998.
- 4) Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, et al：Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. Circulation 105：1291—1297, 2002.
- 5) Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, et al：Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. N Engl J Med 344：710—719, 2001.
- 6) Yamada K, Miyamoto S, Takayama M, Nagata I, Hashimoto N, Ikada Y, et al：Clinical application of a new bioabsorbable artificial dura mater. J Neurosurg 96：731—735, 2002.
- 7) 中村隆宏, 木下 茂：眼の再生医学における羊膜

- の位置付け. 眼科手術 15 : 5—9, 2002.
- 8) **Kaplan HJ, Tezel TH, Berger AS, Wolf ML, Del Priore LV** : Human photoreceptor transplantation in retinitis pigmentosa. A safety study. Arch Ophthalmol 115 : 1168—1172, 1997.
 - 9) **Das T, del Cerro M, Jalali S, Rao VS, Gullapalli VK, Little C**, et al : The transplantation of human fetal neuroretinal cells in advanced retinitis pigmentosa patients : results of a long-term safety study. Exp Neurol 157 : 58—68, 1999.
 - 10) **Radtke ND, Aramant RB, Seiler M, Petry HM** : Preliminary report : indications of improved visual function after retinal sheet transplantation in retinitis pigmentosa patients. Am J Ophthalmol 128 : 384—387, 1999.
 - 11) **Humayun MS, de Juan E, Jr., del Cerro M, Dagnelie G, Radner W, Sadda SR**, et al : Human neural retinal transplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci 41 : 3100—3106, 2000.
 - 12) **Peyman GA, Blinder KJ, Paris CL, Alturki W, Nelson NC, Jr. Desai U** : A technique for retinal pigment epithelium transplantation for age-related macular degeneration secondary to extensive subfoveal scarring. Ophthalmic Surg 22 : 102—108, 1991.
 - 13) **Algvere PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y, Kopp ED** : Transplantation of RPE in age-related macular degeneration : observations in disciform lesions and dry RPE atrophy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 235 : 149—158, 1997.
 - 14) **Weisz JM, Humayun MS, De Juan E Jr. Del Cerro M, Sunness JS, Dagnelie G**, et al : Allogenic fetal retinal pigment epithelial cell transplant in a patient with geographic atrophy. Retina 19 : 540—545, 1999.
 - 15) **Abe T, Yoshida M, Tomita H, Kano T, Nakagawa Y, Sato M**, et al : Functional analysis after auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration. Tohoku J Exp Med 189 : 295—305, 1999.
 - 16) **Thumann G, Aisenbrey S, Schraermeyer U, Lafaut B, Esser P, Walter P**, et al : Transplantation of autologous iris pigment epithelium after removal of choroidal neovascular membranes. Arch Ophthalmol 118 : 1350—1355, 2000.
 - 17) **Lappas A, Weinberger AW, Foerster AM, Kube T, Rezai KA, Kirchhof B** : Iris pigment epithelial cell translocation in exudative age-related macular degeneration. A pilot study in patients. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 238 : 631—641, 2000.
 - 18) **Abe T, Yoshida M, Tomita H, Kano T, Sato M, Wada Y**, et al : Auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration : short-term results. Tohoku J Exp Med 191 : 7—20, 2000.
 - 19) **Abe T, Tomita H, Ohashi T, Yamada K, Takeda Y, Akaishi K**, et al : Characterization of iris pigment epithelial cell for auto cell transplantation. Cell Transplantation 8 : 501—510, 1999.
 - 20) **Abe T, Yoshida M, Kano T, Tamai M** : Visual function after removal of subretinal neovascular membranes in patients with age-related macular degeneration. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 239 : 927—936, 2001.
 - 21) **Pittler SJ, Baehr W** : Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene of the rd mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 88 : 8322—8326, 1991.
 - 22) **Shibahara S, Taguchi H, Muller RM, Shibata K, Cohen T, Tomita Y**, et al : Structural organization of the pigment cell-specific gene located at the brown locus in mouse. Its promoter activity and alternatively spliced transcript. J Biol Chem 266 : 15895—15901, 1991.
 - 23) **Yasumoto K, Yokoyama K, Shibata K, Tomita Y, Shibahara S** : Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. Mol Cell Biol 15 : 1833, 1995.
 - 24) **Boulanger A, Liu S, Henningsgaard AA, Yu S, Redmond TM** : The upstream region of the RPE 65 gene confers retinal pigment epithelium-specific expression *in vivo* and *in vitro* and contains critical octamer and E-box binding sites. J Biol Chem 275 : 31274—31282, 2000.
 - 25) **Carter-Dawson LD, LaVail MM, Sidman RL** : Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 17 : 489—498, 1978.
 - 26) **Abe T, Tomita H, Kano T, Yoshida M, Ohashi T, Nakamura Y**, et al : Autologous iris pigment epithelial cell transplantation in monkey subretinal region. Curr Eye Res 20 : 268—275, 2000.
 - 27) **Abe T, Sato M, Tamai M** : Dedifferentiation of the retinal pigment epithelium compared to the proliferative membranes of proliferative vitreoretinopathy. Curr Eye Res 17 : 1103—1109, 1998.
 - 28) **大和雅之, 廣瀬志弘, 播元政美, 岡野光夫** : 人工材料を用いた細胞のマニピュレーション細胞シート工学の創成. 蛋白質 核酸 酵素 45 : 2156—2161, 2000.
 - 29) **Takeda A, Onodera H, Sugimoto A, Kogure K, Obinata M, Shibahara S** : Coordinated expression of messenger RNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. Neuroscience 55 : 23—31, 1993.
 - 30) **Nishida T, Nishino N, Takano M, Kawai K, Bando K, Masui Y**, et al : cDNA cloning of IL-1 alpha and IL-1 beta from mRNA of U 937 cell line. Biochem Biophys Res Commun 143 : 345—352, 1987.

- 31) **Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al** : Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324 : 73—76, 1986.
- 32) **Nedospasov SA, Shakhov AN, Turetskaya RL, Mett VA, Azizov MM, Georgiev GP, et al** : Tandem arrangement of genes coding for tumor necrosis factor (TNF- α) and lymphotoxin (TNF- β) in the human genome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 : 611—624, 1986.
- 33) **Gray PW, Goeddel DV** : Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 298 : 859—863, 1982.
- 34) **Kano T, Abe T, Tomita H, Sakata T, Ishiguro S, Tamai M** : Protective effect of iris pigment epithelial cells transfected BDNF gene from ischemia and light damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
- 35) **Penta K, Varner JA, Liaw L, Hidai C, Schatzman R, Quertermous T** : Del 1 induces integrin signaling and angiogenesis by ligation of α -V- β 3. *J Biol Chem* 274 : 11101—11109, 1999.
- 36) **Abe T, Durlu YK, Tamai M** : The properties of retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy compared with cultured retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 63 : 201—210, 1996.
- 37) **Kim DW** : Real time quantitative PCR. *Exp Mol Med* 33 : 101—109, 2001.
- 38) **Schnerr H, Niessen L, Vogel RF** : Real time detection of the tri 5 gene in *Fusarium* species by lightcycler-PCR using SYBR Green I for continuous fluorescence monitoring. *Int J Food Microbiol* 71 : 53—61, 2001.
- 39) **Hiratsuka M, Kishikawa Y, Narahara K, Inoue T, Hamdy SI, Agatsuma Y, et al** : Detection of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphisms using real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis with SYBR Green I on a GeneAmp 5700. *Anal Biochem* 289 : 300—303, 2001.
- 40) **山口慶子, 山口克宏, Gaur VP, Turner JE** : 老化網膜に対する幼若網膜色素上皮移植の効果 97 : 36—42, 1993.
- 41) **Saito H, Papaconstantinou J, Sato H, Goldstein S** : Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence. *J Biol Chem* 272 : 8157—8160, 1997.
- 42) **Dorey CK, Wu G, Ebenstein D, Garsd A, Weiter JJ** : Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 : 1691—1699, 1989.
- 43) **Del Priore LV, Kaplan HJ, Tezel TH, Hayashi N, Berger AS, Green WR** : Retinal pigment epithelial cell transplantation after subfoveal membranectomy in age-related macular degeneration : Clinicopathologic correlation. *Am J Ophthalmol* 131 : 472—480, 2001.
- 44) **Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE** : *Histology of the Human Eye*. WB Saunders Company Philadelphia, 204—205, 1971.
- 45) **Rezai KA, Lappas A, Kohen L, Wiedemann P, Heimann K** : Comparison of tight junction permeability for albumin in iris pigment epithelium and retinal pigment epithelium in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 : 48—55, 1997.
- 46) **Rezai KA, Kohen L, Wiedemann P, Heimann K** : Iris pigment epithelium transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 : 558—562, 1997.
- 47) **Rezai KA, Lappas A, Farrokh-siar L, Kohen L, Wiedemann P, Heimann K** : Iris pigment epithelial cells of long evans rats demonstrate phagocytic activity. *Exp Eye Res* 65 : 23—29, 1997.
- 48) **Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM** : Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 347 : 83—86, 1990.
- 49) **Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM** : Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J Neurosci* 12 : 3554—3567, 1992.
- 50) **LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH** : Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 11249—11253, 1992.
- 51) **Masuda K, Watanabe I, Unoki K, Ohba N, Muramatsu T** : Functional Rescue of photoreceptors from the damaging effects of constant light by survival-promoting factors in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 2142—2146, 1995.
- 52) **LaVail MW, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH, et al** : Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 592—602, 1998.
- 53) **Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, Nakano I, Takahashi JB, Mizoguchi A, et al** : Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 4268—4274, 2000.
- 54) **Haruta M, Kosaka M, Kanegae Y, Saito I, Inoue T, Kageyama R, et al** : Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci* 4 : 1163—1164, 2001.
- 55) **Edge AS, Gosse ME, Dinsmore J** : Xenogeneic cell therapy : current progress and future devel-

- opments in porcine cell transplantation. *Cell Transplant* 7 : 525—539, 1998.
- 56) **Wada J, Yokoyama M, Hashimoto A, Imai Y, Kitamura N, Takao A**, et al : Long-term follow-up of artificial valves in patients under 15 years old. *Ann Thorac Surg* 29 : 519—521, 1980.
- 57) **Hatcher CR, Jr., Craver JM, Jones EL, Bone DK, Guyton RA** : The porcine bioprosthesis. A review of 1,000 consecutive patients undergoing cardiac valve replacement. *Am Surg* 49 : 6—10, 1983.
- 58) **Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, Thomas C, Palmer P, Kott S**, et al : Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med* 3 : 350—353, 1997.
- 59) **Edge AS** : Current applications of cellular xenografts. *Transplant Proc* 32 : 1169—1171, 2000.
- 60) **Okura Y, Tanaka R, Ono K, Yoshida S, Tanuma N, Matsumoto Y** : Treatment of rat hemiparkinson model with xenogeneic neural transplantation : Tolerance induction by anti-T-cell antibodies. *J Neurosci Res* 48 : 385—396, 1997.
- 61) **Jiang LQ, Jorquera M, Streilein JW** : Subretinal space and vitreous cavity as immunologically privileged sites for retinal allografts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 3347—3354, 1993.
- 62) **Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Ng TF, Zamiri P** : Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res* 42 : 487—495, 2002.
- 63) **Berglin L, Gouras P, Sheng Y, Lavid J, Lin PK, Cao H**, et al : Tolerance of human fetal retinal pigment epithelium xenografts in monkey retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 : 103—110, 1997.
- 64) **Kenyon K, Modi WS, Contente S, Friedman RM** : A novel human cDNA with a predicted protein similar to lysyl oxidase maps to chromosome 15 q 24-q 25. *J Biol Chem* 268 : 18435—18437, 1993.
- 65) **Feres-Filho EJ, Menassa GB, Trackman PC** : Regulation of lysyl oxidase by basic fibroblast growth factor in osteoblastic MC 3 T 3-E 1 cells. *J Biol Chem* 271 : 6411—6416, 1996.
- 66) **Soulillou JP** : Biological reagents for immunosuppressants. *Transplant Proc* 27 : 106—108, 1995.
- 67) **Abe T, Takeda Y, Yamada K, Akaishi K, Tomita H, Sato M**, et al : Cytokine gene expression after subretinal transplantation. *Tohoku J Exp Med* 189 : 179—189, 1999.
-

Comment : 宇山 昌延

この論文は難治の網膜変性症の治療として、変性・萎縮・消失する視細胞の再生をめざして、網膜下腔への色素上皮(虹彩色素上皮または、網膜色素上皮)の移植を行った研究について述べられている。疾患として、脈絡膜新生血管によって発生する加齢黄斑変性と、視野狭窄、夜盲を来す網膜色素変性症を対象としている。

1. 加齢黄斑変性の治療の試み

近年高齢者に著しく増加し、中途失明を来す加齢黄斑変性は脈絡膜新生血管の発生によって発病する。薬物療法と外科的治療があるが、その一つとして脈絡膜新生血管の抜去術がある。硝子体手術によって、黄斑部の耳側に小さい穿孔を作り、そこから網膜下摂子を網膜下へ挿入して、新生血管膜をつかんで引き出す。このとき同時に網膜色素上皮細胞がひっついて取れ、あとに色素上皮の欠損部を生じる。網膜色素上皮細胞の欠損領域では視細胞が変性、萎縮、消失し、術後に視機能を失い、中心暗点を残す。それで色素上皮をその部へ移植して視細胞の変性消失をくい止め、さらに障害された視細胞を再生させようとする試みが行われている。色素上皮移植が行われる理由である。しかし、生体から移植のために網膜色素上皮を得ることは難しい。代わりに虹彩の色素上皮を用いたのが本研究の大きい特徴である。この2つの色素上皮はともに眼杯外板から発生した神経外胚葉由来であり、相互に分化し得る能力を持っている。自己の細胞であるから免疫反応は起こらない。移植する虹彩の色素上皮細胞は予め周辺虹彩切除を行って本人の細胞を得、培養して保存しておくので、移植手術を何時でも好む時に行うことが出来るなどの利点がある。

著者は最近4年間に加齢黄斑変性の35眼に本移植を行い、術後6か月以上経過観察した成績を報告した。術後合併症の発生はなく安全に経過していた。しかし、細胞移植を行わないで新生血管単純抜去術のみを行った症例40眼と術後視力を比べて両者に差はなかった。なぜ視力経過が良くなかったのか、その理由は不明であり、著者は感覚網膜の関与、移植細胞の生着率、細胞の網膜下での分布などがかかわっているのではないかと考案している。また移植された色素上皮細胞は網膜下腔で生存はしているが、増殖しないといわれている。このように本治療は今後なお検討を要する事柄を含んでいるが、治療法として残り得る可能性が高く、基礎実験から臨床実験にまで研究を推進された意義は高い。

2. 網膜変性症の治療

先天性遺伝性素因によって視細胞が変性、消失する疾患は網膜変性症で、その代表は網膜色素変性症である。視細胞の変性の進行を阻止し、再生させようとするのが本研究の目的である。

最近、細胞増殖因子、神経栄養因子など種々のサイトカインに神経細胞を再生させる効果がみられ、その物質が同定されている。basic fibroblast growth factor, brain derived neurotrophic factor など、これらサイトカインやその遺伝子、レセプター遺伝子などを移植細胞に導入し、その細胞を網膜下へ移植し、その効果を期待して、多項目にわたって詳細な実験研究が行われた。分子遺伝学、分子生物学などの知見を応用して行われたもので、本格的な移植を行うために必要な基礎実験である。今後、網膜色素変性症の治療を進めるのに有益な種々の成果が示されている。

このように、本研究は色素上皮の網膜下腔への移植のテーマのもとに精力的に行われた実験であり、それが確実なものになって臨床応用される日が期待される。