

— 教授就任記念講演 —

## 細胞移植を利用した網膜疾患治療の試み

## Cell Transplantation for Retinal Degeneration

阿 部 俊 明

東北大学大学院医学系研究科 附属創生応用医学研究センター 先進医療開発部門 細胞治療開発分野

## はじめに

眼球は、胎生4週を中心に optic vesicle より、optic cup として発達するが、この段階で神経外胚葉は網膜になる内層と脈絡膜になる外層の2つの層になる。そして、内層の最外側に色素を持った1層の網膜色素上皮細胞 (RPE) が出現する。RPE は、生理的に視細胞外節の貪食をはじめとする神経網膜の代謝、維持に重要な役割を担っており、ビタミンAの貯蔵や視物質であるロドプシン合成、光の吸収と散乱阻止、網膜下腔の水の吸収などのポンプ作用など神経網膜の機能維持に重要な役割をしている。さらに、RPE は、網膜の最外層に位置し、脈絡膜血流との間の眼血液関門機能を有する。このRPEは網膜を構成する細胞のなかでも、上皮細胞の性質を持つために、神経網膜よりも取り扱いが比較的容易で、これまでにたくさんの研究がおこなわれてきた。視細胞との重要な相互関係を持つものの、神経網膜のような複雑にからみあうニューロンネットワークがないことも、研究を比較的容易にした。

一方、増殖性硝子体網膜症などの、難治性疾患の中心的役割をなす細胞の1つであることも、よく知られている。生理的に分化した状態のRPEが、様々な刺激により脱分化して増殖すると考えられている。また、種々の外来刺激に反応して、さまざまなサイトカインの発現を up-regulate することが知られており、ぶどう膜炎などでも、その病態に重要な役割をする<sup>2)</sup>。

このRPEが障害することによりさまざまな病態が報告されている。脈絡膜からの血液成分の露出を中心に、種々の炎症反応でもこの細胞が形成している血液眼関門はさまざまな程度に破壊され、視機能低下の要因となる。同じ疾患でも破壊の程度は様々であり、RPEの血液眼関門を構成する分子群は複雑な機構が存在することが推測される。まずこの病態を解析する目的でRPEの血液眼関門に関すると思われる種々の分子群の解析をおこなった。つぎにRPEなどの障害のために脈絡膜より新生血管が出現し、網膜黄斑部に

さまざまな程度の出血や滲出性病変をきたした症例の新生血管を抜去し、脱落したあるいは病的なRPEの代用として細胞移植を実際に臨床応用した結果を示す。

## 方法、結果と結論

## 1. RPEのtight junction

RPE細胞は動物眼や眼球銀行から得られた眼であれば比較的容易に眼球から分離できるが、今回は、より生理的に近いと報告されているRPE細胞株である、ARPE-19を使用して検討した。さまざまな臓器の血管内皮細胞、上皮細胞は、それぞれに特異的なバリア機能を有しており、その特異性はoccludinやclaudinといった分子によって形成されていることが最近報告された。したがって、RPEにもRPE特異的なこれらの分子の発現が推測された。しかし、実際にこれらの分子の発現をreverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)で推測すると、occludin以外にすくなくとも数種類のclaudinが発現しており、また免疫組織科学的にもARPE細胞周囲に発現がみられ、RPEの血液眼関門構成はかなり複雑であることを疑わせた。実際にARPE-19を培養し、tight junctionを形成させてその抵抗値を測定したが、眼内の炎症起炎物質の1つであるインターロイキン1ベータ (IL-1beta) を使用するとARPE-19のtight junctionの機能を徐々に低下させた (図1)。しかも、fluorescein (SF; 376 Dalton (Da)), horseradish peroxidase (HRP; 40 kDa), HRP-labeled inulin (5 kDa, Sigma)の透過性を調べると、これらの分子すべてがIL-1beta投与で透過性亢進を示した (図2)。このときに発現する分子群を検討すると、必ずしもこれらの分子群のすべてが発現が低下するのではなく、逆に上昇するものも存在することが判明した (図3)。全体の値が総合的に抵抗値を上昇あるいは低下するのかもしれない。一方、RPEの血液眼関門構成に関与する分子

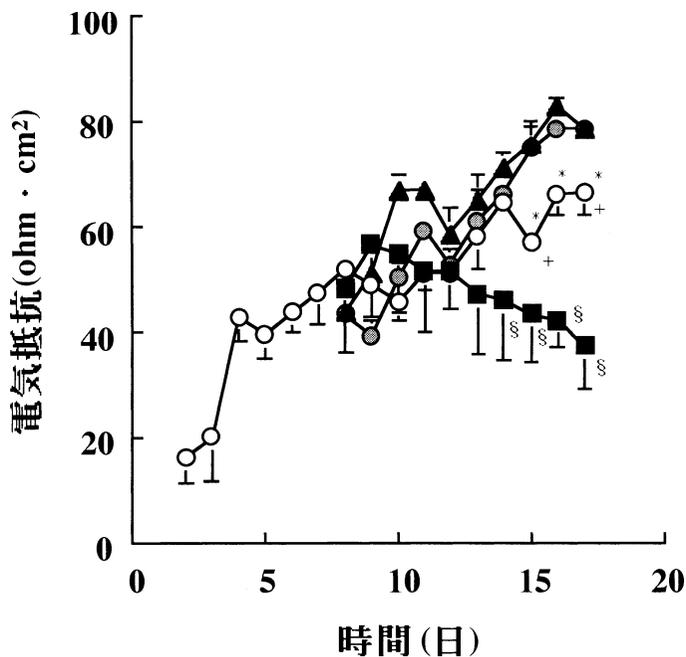


図1. ARPE-19細胞の電気抵抗  
DMEM/F12培地に1%血清を含む培地で培養後(○)に血清を除去し、IL-1 $\beta$ を添加するか(■)、そのままの培地で培養するか(●)、抗IL-1 $\beta$ 抗体で処理した後(▲)に抵抗を測定してARPE-19の抵抗値を検討した。IL-1 $\beta$ で処理すると抵抗値は有意(§)に低下することが判明した。

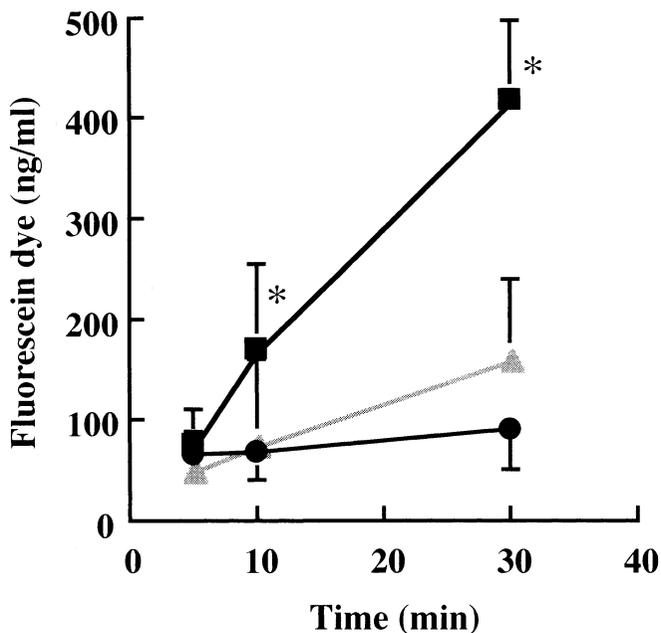


図2. 透過性の検討。  
ARPE-19細胞を培養した後にIL-1 $\beta$ 添加培地(■)とIL-1 $\beta$ 添加培地を抗IL-1 $\beta$ 抗体で処理した培地(▲)、ならびに通常の培地(DMEM/F12)(●)でフルオレセイン色素の透過性を検討したが、IL-1 $\beta$ 添加培地はその他の培地と比較して有意(\*)に透過性が亢進していることが判明した。

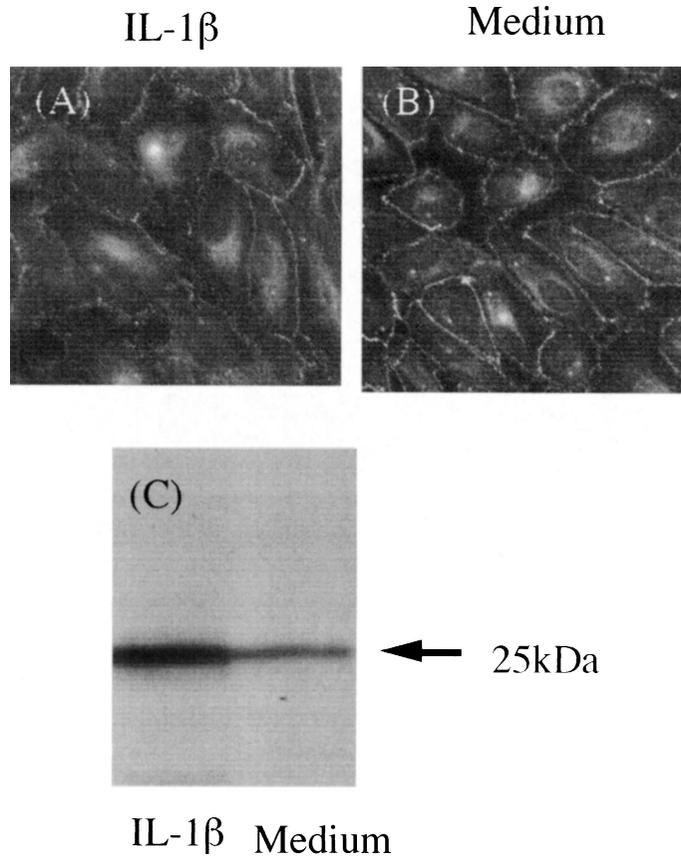


図3. Occludin の免疫染色と Claudin の western blotting. ARPE-19 細胞の周囲には Occludin の発現が見られたが IL- $\beta$  の存在 (A) では通常の培養条件 (B) よりも発現が低下していることが疑われる。一方, Claudin-1 の western blotting (C) は IL- $\beta$  の存在下のほうが発現が強いと考えられる。

群は複数存在し、これらの分子が複雑にからみあうことにより形成されていた RPE 特異的 junction がある分子の発現増加、あるいは低下により、全体としてのバランスが崩れることも推測された。

## 2. 自己虹彩色素上皮細胞移植

病的な状態が進行すれば、これらの分子発現の変化は不可逆的になり、さまざまな病態が出現すると推測される。RPE そのものの異常、あるいは変性・脱落することで神経網膜と脈絡膜の血液眼関門機能の異常を生じる。脈絡膜新生血管はまさにこの RPE の異常が大きく関与するとされている。しかもこの脈絡膜新生血管は外科的に抜去すると RPE は広い範囲で脱落したりする。したがって、我々はこの脱落する、あるいは病的な RPE を補う意味で、RPE と起源が同じ神経外胚葉由来である虹彩色素上皮細胞 (IPE) の移植を行うことを施行してきた。IPE は RPE と異なり、自己の

細胞でも、臨床的には容易に獲得が可能である。まず我々は周辺虹彩切除術を行い、摘出された虹彩より IPE を分離した。我々はこの IPE を自己の血清を利用して培養し、それを移植してきた。移植方法は、まず移植細胞が十分な数に成長した後に、硝子体切除術を施行し網膜に小孔を作成後、脈絡膜新生血管を抜去しそのあとに培養した自己 IPE を移植した。移植患者は平均すると術直後 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。しかし、移植患者の最終視力が logMAR 視力で 0.2 以上改善、不変、悪化をした症例はそれぞれ 35 名中 18 名 (51.4%)、11 名 (31.4%)、6 名 (17%) であった。さらに自己の細胞を利用することで、培養した細胞であっても特別な治療を追加することなく移植医療最大の懸案であった拒絶反応をおさえることができた。しかも、上記したような増殖性硝子体網膜症や移植細胞の網膜下での増殖などはみられなかった。これまでに施行してきた症例は約 50 症例

になるが移植によると思われる合併症は経験していない。しかし、合併症は見られなくても視力の改善には上限があることも判明し、今後の問題点としては、移

植をする時期の検討や、移植方法の検討が必要であると考えられた。