

主論文の要旨

Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration

〔 ヒト胚性幹細胞由来網膜組織のサル視細胞変性モデルへの移植 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 眼科学分野

(指導：寺崎 浩子 教授)

白井 博志

【緒言】

網膜色素変性症は遺伝的背景をもとに視細胞が欠損していく疾患である。現時点で有効な治療法はないが、近年、視細胞移植により移植片が生着し、ホスト網膜とシナプス形成をして機能回復をするという報告がマウスの研究を中心になされ、新たな治療法として注目されている。さらにヒト胚性幹細胞（hESC）およびヒト人工多能性幹細胞から三次元的に神経網膜を培養する手法が確立され、移植片として臨床に用いることができるレベルの、任意の発生段階の網膜細胞・組織を準備することが可能になった。今回われわれはヒト多能性幹細胞由来視細胞移植の臨床応用に向けて、中型動物での中心窩外局所視細胞変性モデルを新たに作成するとともに、網膜変性ラットおよびサルを用いて hESC 由来分化網膜組織移植後の生着状態を観察した。

【対象および方法】

まず、hESC 由来網膜組織の移植を、移植時の分化日齢 50～150 日の範囲でヌードラットおよび網膜変性ヌードラットの網膜下に行い、視細胞の成熟および統合を観察した。ついで、中心窩外視細胞変性サルモデルを作成するため、カニクイザルおよびアカゲザル 8 頭 11 眼の中心窩外のおよそ直径 20 度前後の領域に塩化コバルトの網膜下注射もしくはパターンスキャンレーザー照射を行い、光干渉断層計・局所網膜電図を用いて同部位の観察を最長 7 か月間行った。中心視力が保たれていることを確認するため、コバルト・レーザーモデル各 1 頭 2 眼に対し、障害前後 1 週間毎に視力検査を行った。最後に、ヒトに使われる手術器具を用いて分化 60 日齢前後の hESC 由来網膜組織の移植を視細胞変性サル 3 頭 4 眼に行い、時期をずらして経過観察および組織評価を行った。

【結果】

分化 50～150 日齢の hESC 由来網膜組織は、どの時期のものであってもヌードラットの網膜下に移植後成熟し、ロゼット構造を呈する視細胞塊を形成し、分化 200 日齢相当以降に桿体視細胞マーカーを発現した。分化 293 日齢相当に電子顕微鏡にて視細胞外節構造の形成も確認した。移植時の分化日齢が若いほど厚い視細胞層が形成されることが示唆された。さらに、移植時の分化日齢が若いほど移植片の中に視細胞だけでなく二次ニューロンも多く形成され、ホスト二次ニューロン的一种である双極細胞との接触のバリアになってしまうが、移植片視細胞とホスト双極細胞の接触の割合に関して移植時の分化日齢の時期による差は認めなかった。立体網膜を網膜変性ヌードラットの網膜下に移植したところ、移植片のロゼット状の視細胞はホスト双極細胞と直接接合した（Fig.1）。続いてサルモデル作成のため、コバルトの網膜下注射およびレーザー照射を行い、視細胞選択的な障害が引き起こされていることを確認した。観察期間中、局所網膜電図にて障害部位の反応は検出されなくなる一方で内層の構造は保たれた（Fig.2）。視力検査にて中心視力は残存していた。最後にサルの変性網膜下に立体網膜の移植を行ったところ、移植片は明らかな拒絶反応を呈さなかった。移植

片は分化 120 日齢相当までは発育に伴って大きくなったが、それ以降は増殖が止まった。局所網膜電図にて移植部位の電気反応を検出することはできなかった。免疫組織学的検査にて移植片は成熟し、様々な種類の網膜細胞に分化したことが確認された。移植片は、分化 90 日齢相当ですべてのロゼットにおいて視細胞マーカーを発現し、分化 148 日齢相当にて桿体オプシン・錐体オプシンのマーカーを部分的に発現した。さらにすべてのロゼットにおいて分化 182 日および 210 日相当でそれぞれ錐体オプシン・桿体オプシンの完全な発現が確認された。148 日齢相当以降において、別種の晚期桿体オプシンマーカーのトランスデュシン・ペリフェリンの発現も認めた (Fig.3)。最後に、移植片視細胞が宿主網膜と接合し、接合部位にシナプス形成を示唆する所見も得られた (Fig.4)。

【考察】

視細胞変性サルモデルとして移植後の評価に適したものはなく、網膜移植の臨床応用の評価の妨げとなっていた。げっ歯類と霊長類の網膜は桿体・錐体の分布などを含め実質的に異なっており、霊長類での視細胞選択的障害は技術的に困難であった。本研究では塩化コバルトの網膜下注射もしくはレーザー照射により中心窩外に視細胞変性を引き起こすことでサルモデルを作成することができた。前者では有効濃度の幅が狭く、完全な視細胞障害を意図すると内層障害も起こってしまう可能性があること、後者では、内層はほぼ保全されるが、視細胞障害が不十分な領域があることという欠点があり、内層を適切に保全しつつも、視細胞層を完全に障害するためには遺伝子工学の技術を用いなければならないことが示唆された。

hESC 由来網膜組織の最大の利点は任意の発生段階の移植片を望む形態で得ることができる点にある。ヒト胎児網膜の移植はいくつかの国において実行され一定の効果が報告されている。しかしながら、倫理的問題に加え、その当時の技術の限界で、移植片がどのように効果をもたらしたかははっきりしておらず、霊長類網膜変性モデルを用いてヒト立体網膜組織移植後の成熟・統合のさらなる検討が必要とされていた。当研究ではまずヌードラットを用いて、分化 50～150 日齢の hESC 由来網膜組織の移植後の検討を行った。移植片は成熟して内節・外節様構造を形成し、移植時の分化日齢が若いほど厚い視細胞層ができる傾向があったが、宿主二次ニューロンとの接触に関しては分化日齢による差がなかった。これらの結果を踏まえて、分化 60 日齢の網膜組織を視細胞変性サルに移植した。分化 60 日齢の立体網膜は未熟であるため、移植後の増殖性の評価を行ったが、増殖は成長段階に伴う範囲内で腫瘍形成などは認めなかった。

移植片視細胞がサル変性網膜下で生着・宿主双極細胞と接合し、接合部位にシナプス形成を示唆する所見も得られたものの、サンプルの限界もあり、どのくらいの頻度でこの現象がみられるかは確認できなかった。しかしながら、移植片の機能的統合はさらに検討すべきであり、シナプス形成の頻度の組織学的検討、局所網膜電図を含めた電気生理学的検討、加えてマイクロペリメトリーなどの主観的検査が必要である。

局所網膜電図検査にて大きな反応を得るためには、移植片の大きさや数を増やし統合する割合を増やすことや、より感度のよい検査手法の開発が必要である。移植片内の内層細胞の存在はホスト・グラフトの統合を妨げるため、視細胞の割合が多くなるような立体網膜の分化条件の検討も必要である。

【結論】

ヒト多能性幹細胞由来視細胞移植の臨床的有用性を検討するため、まずヌードラットを用いて hESC 由来立体網膜組織の移植片としての有用性を確認した。次いで、視細胞変性サルモデルを作成し、その評価を行った。最後に hESC 由来網膜組織のサルモデルへの試験的移植を行い、移植片は成熟して視細胞層を形成し、ホスト双極細胞とシナプス形成することが示唆された。本研究により hESC 由来網膜組織移植の臨床的可能性が示されるとともに、将来の臨床応用において移植方法の最適化にふさわしい実用的なツールが提供された。