

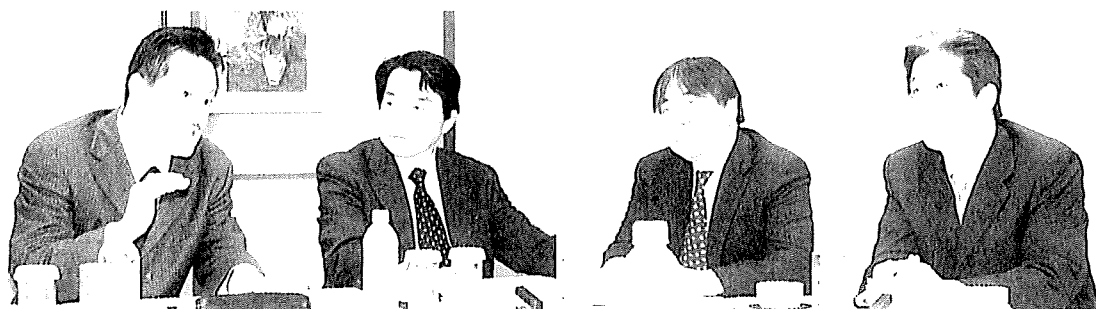
刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名 巻頁数 論文名)	刊行年	執筆者氏名
J Cataract Refract Surg. 2009 Jul;35(7):1251-9. Histological evaluation of mechanical epithelial separation in epithelial laser in situ keratomileusis.	2009	Soma T, Nishida K, Yamato M, Kosaka S, Yang J, Hayashi R, Sugiyama H, Maeda N, Okano T, Tano Y.
Br J Ophthalmol 2010 in press. A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction.	2010	Oie Y, Hayashi R, Takagi R, Yamato M, Takayanagi H, Tano Y, Nishida K.
Tissue Eng Part C Methods. 2010 Apr 13 Validation System of Tissue-Engineered Epithelial Cell Sheets for Corneal Regenerative Medicine.	2010	Hayashi R, Yamato M, Takayanagi H, Oie Y, Kubota A, Hori Y, Okano T, Nishida K.

スーパー特区への期待

期待される効果とその安全性／緊急課題となる基盤構築／期待されるグローバル戦略

出席者 (発言順)

- (司会) 岡野光夫 おかの てるお：東京女子医科大学 先端生命医科学研究所
澤 芳樹 さわ よしき：大阪大学大学院医学系研究科外科学講座 心臓血管外科学
西田幸二 にしだ こうじ：東北大学大学院医学系研究科 眼科・視覚科学分野
梅澤明弘 うめざわ あきひろ：国立成育医療センター研究所 生殖・細胞医療研究部



左から梅澤明弘・岡野光夫・澤 芳樹・西田幸二の各氏

2009年3月4日・東京

岡野 本日は、再生医療が今後どうあるべきかを総合的に議論していきたいと思えます。

20世紀後半には、遺伝子工学や細胞工学が進み、ペプチド、蛋白質が薬剤として開発され、それらによる治療が可能になりました。しかし、依然として対症療法の域を脱していません。そのため、細胞や組織での根本治療が実現できる再生医療への期待は、非常に大きくなっています。

2008年に先端医療開発特区（スーパー特区）の設置が閣議決定されました。スーパー特区とは、革新的技術の開発を阻害している要因を克服するために、研究資金の特例や規制を担当する部局と並行協議などを行えるという特区で、これまでの行政区域単位でなく、テーマを重視し、複数拠点の研究者をネットワークで結び、複合体を構築するものです。再生医療分野では、5課題が採択されました。

期待される効果とその安全性

人工心臓からの離脱

岡野 心臓外科分野で再生治療を臨床応用されている澤芳樹先生に、特に安全性と効果をどのように評価しながら行っていらっしゃるのか、お聞きしたいと思います。

澤 私たちが行っているのは、脚の筋肉の細胞をシート化して心臓の周囲に張りつけるという治療で、世界で初めて人工心臓からの離脱を実現させることができました。

これまで、骨髄細胞の移植による血管新生療法が中心で、脚の筋肉の細胞などを、注射器で注入することにより移植するといったイメージでした。十分な効果を得られず、むしろ不整脈を起こすなど、安全性を懸念するようなデータが出ていました。私たちは、その同じ細胞を



岡野光夫 氏

用いて、人工心臓を装着した重症患者の再生治療を成功させたのです。安全対策は当然のことながら万全に施し、動物実験による十分なデータを集計し、院内の倫理委員会で承認を得ました。不整脈などの合併症もなかったです。

しかし、現状では、このような臨床試験を円滑に実施することは非常に難しくなっています。「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(ヒト幹)」という規制により、試験が迅速に進まない場合があります。規制の主眼は、臨床試験の安全性を担保するためのハードルは決して下げてはいけないということですが、効果・有用性を証明し、いち早く臨床へ発展させるにはどうすべきか、という課題が浮上してきたのです。

西田 幸二先生へ

岡野 西田幸二先生は、国内に限らず世界でも相当数の患者を治療されておられます。安全と効果について、どうお考えでしょうか。

西田 われわれが対象としているのは角膜疾患です。角膜は眼の最も前方にある組織で、カメラでいうレンズにあたります。これが濁ると光が入らず、見えなくなります。これまでの主流は角膜移植でしたが、治療不可能な疾患がいくつかありました。たとえばアルカリ溶液の暴露などが原因となるアルカリ浮腫や、薬剤などの

副作用により全身の皮膚粘膜が傷害を受けるステーブンス・ジョンソン症候群などは、移植後に拒絶反応が必発して、1年ももちません。両眼とも悪くなる疾患ですから、自身の角膜細胞は使えません。

そこで私たちは、患者の口腔粘膜を細胞源として、体外で角膜上皮の組織を培養し移植するという治療を、2002年に初めて成功させました。その患者さんの角膜は現在も透明性を保っています。これまで約20例行ってきましたが、視力の改善率は80%以上で重篤な合併症もなく、非常に良好な成績を得ています。これらのデータから、安全性に問題はなく有効性が高い治療法だといえます。

角膜上皮の再生治療に関して、初めての報告は1990年代後半、イタリアのグループが行いました。片眼の疾患に対して、良いほうの眼の角膜上皮にある幹細胞を使用する方法です。しかし、片眼の疾患にしか対応できないことや、細胞を採取し移植する際の酵素処理により細胞が傷害を受けやすいことも問題でした。

しかし、岡野先生が開発された温度応答性培養皿を使うことにより、酵素処理などが不要になり、温度を下げるだけで細胞を培養皿から回収できるようになりました。これにより、非常に強い組織、しかも接着性の高い組織の移植が実現できました。成功への2つの大きな鍵は、口腔粘膜を使用する技術を開発できたことと、温度応答性培養皿の使用でした。

岡野 角膜移植で治療できなかった疾患を治せる可能性はどの程度になったのでしょうか。

西田 角膜上皮の疾患であれば、50~100%です。一般の角膜移植における拒絶反応は20~30%なので、移植後の拒絶反応は起きにくいといわれてきました。しかし、施設や術者、投薬内容なども異なるのでデータは一様ではありませんが、拒絶反応が原因で再び濁ってしまう患者が数十%と、少なからず存在しています。

岡野 自己細胞を用いる治療法には大きな期待がかかります。新時代の到来を感じますね。

西田 ええ、治癒を見込めます。ただ、注意すべき点として、自己細胞とはいえ、幹細胞の種類により安全性が変化する可能性があつて、ケースバイケースだということです。たとえば、間葉系幹細胞は万能細胞といわれるだけあつて、口腔粘膜に比べると未分化性が高く、安全面の見方も違う観点が必要です。



澤 芳樹氏

岡野 梅澤明弘先生、再生医療の安全性と効果について、コメントをお願いできますか。

梅澤 私どもの病院は、成育医療センターという小児の病院です。特に遺伝病の子どもたちがたくさん来院され、多くの疾患を診ています。安全性と有効性に関し興味深い例としてあげられるのは、骨髄移植と臍帯血移植です。わが国では、2008年までで骨髄移植は1万例以上、臍帯血移植は5千例以上実施されています。がんや白血病、リンパ腫の患者さんに多く行われ、治療法として受け入れられています。細胞を移植する医療において、利益が不利益を大幅に上回っている場合には許容されるわけです。リスクとベネフィットの評価を、もう少し検討していくことが大事だと思います。

岡野 重要なご指摘です。100人のうち何人かでも救えればよいのではないかと。しかし、一般的には、1人でも死んでしまうと“実施させない”という否定的なムードになりがちです。安全と効果という問題を科学的に議論していく環境作りが重要になっています。

澤 たとえば心臓治療では、世界的には非常に進歩している一方で、重症心不全で亡くなる患者も増えています。心臓の弁や血管を治療することはできても、心筋自体は治せていません。そこで、私たちは細胞シートを使用する方法で、心筋を回復させるという本格的な“心臓治療”

を確立できればと思っています。

梅澤 透明性、公開性をもって社会に提示する、理解を求める、という姿勢をみせていく。そのためのツール、あるいは武器が“科学”なのだと思います。成功例を増やすことも重要です。

緊急課題となる基盤構築

岡野 国内の研究は非常に進んでおり、実際に大きな効果も得られています。しかし、必要となる製品の開発が遅れていて、今のところJ-TEC（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）の皮膚しかありません。これはやはり、再生治療のための規制のインフラストラクチャー（インフラ）が整備されていないことが原因だと考えられます。具体的にどのような対策が必要でしょうか。

梅澤 先日日本再生医療学会で、製造委託についての検討が行われました。委託という制度自体も、社会インフラのひとつだと思います。2008年に厚生労働省（厚労省）医政局の研究開発振興課が、北海道、東北、関東、関西など、各地区にセルプロセッシングセンター（CPC）



梅澤明弘 氏

の設置にかかる事業を行いました。近隣の施設へ細胞の委託が可能になることは大きな進展ですし、そこへ産業界に介入してもらえれば、さらに発展が期待できます。

西田 実際われわれは大学内の CPC で角膜上皮を作製していますが、高度な技術を要する製造を、医師たちが継続的に行うのはかなり難しい状況です。人事異動などもあり、その技術者となる医師たちの集団を維持させていくのは非常に困難です。その問題を打破するためには、産業界が人材として入ってくるような、新しい仕組みが不可欠だと思います。

澤 大阪大学医学部附属病院では、2002年に“未来医療センター”というトランスレーショナルリサーチ (TR) を行う施設を設立し、全国に先がけてインフラ整備を行ってきました。私たちが道を切り開いていくという姿勢で日夜頑張っており、CPC の運営も含めて人材育成などにも力を入れています。

国策的にも TR 拠点が全国 6 か所で認定されており整備が進みつつありますが、一方で、私たちが経験が十分ではなく、国のアイデアも具体的ではないので、実際にはなかなか進展しにくいというジレンマがあります。しかし、これを放っておくと、全国で 60 か所程度存在する CPC が倉庫化してしまう懸念があります。CPC

にこそ、細胞加工工場のような役割を期待したいと考えていて、そこには企業の力は不可欠です。実際に、未来医療センターで細胞を作製できるような、それに適した基準もつくっていません。アカデミックな施設を活用しながら、企業と一体となり“細胞加工工場”を機能させていく、これは非常に重要なことだと思います。

不可欠な規制緩和・薬事法改正

岡野 再生医療など、新しい治療法の開発が進むと、20 世紀にできた薬事法では限界があるのではないのでしょうか。

梅澤 それは非常に大事な点だと思います。私がスーパー特区に最も期待したい課題です。

委託については、薬事法違反ではないかと指摘される点が問題になっています。医療法を採用する場合には、人材を派遣してもらい、医師の監督下で行えます。しかし、人材派遣法では、派遣してもらった人材は派遣会社の監督下になるので、医師の監督下ではいけません。このように、これまでの法規制では、再生医療における細胞の製造委託は成り立たないのです。

医療法の「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会 (厚生労働省医政局研究開発振興課)」に申請するか、あるいは薬事法のもとに医薬品医療機器総合機構 (PMDA) で承認を得なければなりません。スーパー特区に選考された医療チームに関しては、行政の方々や委員と“一緒に相談できる”くらいの形式を期待したいです。

澤 「ヒト幹」自体のポリシーはよいと思いますが、治験申請の際、別の人の審査を受けることになるので、非常にハードルが高くなってしまいます。国策のひとつとしてスーパー特区を設置したのですから、「ヒト幹」と PMDA を連携させないとまったく意味がないと思います。1 日も早く一般医療へ普及させるためにはどうすべきか、そのためには臨床試験を「ヒト幹」でどう判断するかと、むしろゴールから設定して

いくべきではないでしょうか。各規制が独立しており、遅々として進まないということに、最大の問題があると思います。

西田 PMDA の理事長も全国の大学を訪問され、いろいろと相談しながら努力をなさっています。引き続き、情報や目的の交流なども深く進めていくべきだと思います。

岡野 スーパー特区においても、PMDA へ予算をきちんと出すべきではないでしょうか。また、PMDA と医師たちがお互いに認識し合い、安全性を担保しながら、正しくリスク・ベネフィットのバランスを考えていくスタイルを構築していきたいですね。

再検討すべき CPC の活用

西田 澤先生がお話しされた CPC の空洞化に対する懸念は私も同様です。維持費が莫大で、実際のプロジェクトは少ないという施設も多いようです。また、大学研究所に CPC を作り、そこである程度構想を練り、最終的には企業に渡して標準的治療へ発展させるという考え方がまだ不鮮明です。CPC から企業へ連携する過程を深く検討していくと、現在の CPC をどう整理し次に何をすべきかが明確になってくるのではないのでしょうか。

岡野 法律では、医師が自らの施設で培養した細胞を患者に使用する医療行為は医師法となりますが、他施設の患者に使うことは薬事法なのです。そこで CPC を多数設置することになりました。たとえば、西田先生の施設では角膜を、澤先生の所では心筋を、私たちは食道を作り、それを他施設に出して治療できるようなシステムになれば、効率も専門性も向上するはずです。そういう模範例をスーパー特区内で行っていければ、実際の効果も上がってくるのではないかと思います。

梅澤 モデル構築はぜひとも必要です。

澤 作る側、出荷する側にも、しっかりしたク



西田幸二氏

オリティコントロールが必要になりますが、医療上の責任はもちろん、手術を行う医師にあります。たとえば、提供された心臓を受け取ってみたら動かなかったという例など、われわれは何度も経験しています。しかし、インフォームドコンセントが十分であれば、患者の納得の下に行うという医療行為には、普遍性があると考えています。

西田 私も現状の法律下では、責任は医師にあると思います。スーパー特区を機に、製造の分野にも新しい仕組みを期待したいです。

期待されるグローバル戦略

円滑な臨床応用への移行

岡野 米国で先日、胚性幹 (ES) 細胞による脊髄損傷治療の臨床試験が承認されました。日本の研究も非常に高いレベルにあります。臨床や治験では世界に大きく遅れをとっています。今後、生き残るためにはどうすべきでしょうか。

澤 常にボトムアップ的な考え方が重要で、やはり最も大切なのは臨床で成功例を生み出すこと、これがすべてだと思います。そのために何が必要か、今何が問題かを、厚労省や PMDA と

ともに考えていくしかありません。

私たちは世界で初めて心機能を回復させる治療法を開発したわけですから、それを国際的な臨床研究へ発展させるべきではないでしょうか。日本で模範となるルールをつくり世界へ提案することができれば、それは大きな評価につながります。そういうグローバルな戦略を、スーパー特区で始めていきたいです。

梅澤 まったく同意見です。治療の成功例においては、患者さん自身もマスコミなどに出ただいて、それらを契機に、国際共同治験などへ結びつけられれば理想的です。

澤 日本の存在を示すということは、非常に重要だと思います。

西田 私が今注目しているのはアジアです。角膜再生医療の技術を学ぶために、私たちの大学へも中国から何人か来ています。技術をマスターした後は自国でそれぞれが治験を開始するのではなく、スーパー特区も国策のひとつですから、日本の国家プロジェクトとしてアジア全体で考えていけたらよいと思っています。

岡野 EU27 各国においては、EMA (European Medicines Agency) が承認すると、各国がそれぞれに治験を行う必要はなく、EU 全体で認可していくという仕組みを徹底させています。たとえば、EU 内の医師なら、自国に限らず EU 内のどこの国でも診療を行えるシステムができています。その根底には、治験を数多く行うことが本当に有益なのか、という疑問があります。治験自体は安全性を担保するので必要ですが、再度治験を行うことは、安全性の担保ばかりを重視することになり、時間がかかり、患者へ届ける時期が遅れてしまうことになりかねません。

再生医療は薬剤ほど人種差がないので、アジアでも共同して行えればと考えています。日本がリーダーシップをとっていきたいですね。

シンガポール 機能の実現

岡野 先生方の研究を一般の治療に普及させ、より多くの患者さんを治すためにはどのようにしていったらよいでしょうか。

澤 世界が最も注目しているバイオサイエンス (バイオ) 系の国はシンガポールです。バイオを資源にしようとしています。国策として莫大な投資を行い、世界中から約 2000 人の技術者をヘッドハンティングしており、最終的には 4000 人になるといわれています。わが国の憂うべき現状では、かなりの人材がシンガポールへ流れてしまうという懸念が否めません。そこで、このスーパー特区にバイオハブ的な機能をもたせ、新しい基礎研究を固めていながら医療を産業として推し進めていかないと、将来的に日本は行きづまってしまいます。そこには当然国の力が必要です。トヨタのような世界的な自動車産業をつくってきた日本が現在転換期にあり、これから何をすべきかは、シンガポールをモデルケースにするというより、さらに上をいくことをめざすべきだと思います。人材は豊富で技術力もあるので、必ずや可能なはずですが。

また、国が臨床試験に積極的になってほしいと望みます。たとえば、眼は東北大学、肝臓は長崎大学、心臓は大阪大学というように、ある施設に集中させて徹底的に試験を行えるシステムが理想です。医療産業を開発しながら、かつ実践的に試していく。これには、ある程度国策で対応していくことが必要だと思います。今は、いわば竹槍部隊が 1 人ずつ立ち向かって戦っていくという時代ではありません。

西田 産業化においては、私自身も構想がまだ十分ではありません。ただ、治療を標準化するためには、必ず企業へ技術を渡さなければならぬといわれています。しかし、企業へ技術を渡すには、再生医療はビジネスモデルとして成り立ちにくい状況があります。というのは、先ほどから議論になっている規制などの壁がある

こと、それもノウハウという基礎的なところに非常に多いという点です。物をつくれたとしても、次に移植する技術が必要となります。企業と実施する機関が、共同で取り組んでいくことが不可欠です。

最後に私の夢を述べれば、このスーパー特区をきっかけに、海外へ技術を移転するのはもちろん、再生医療を希望する患者さんを海外から日本へ受け入れることができるような、再生医療病院というか、システムティックな施設の設けが実現できればよいと思っています。

発信源としてのスーパー特区

岡野 これまでの産学連携は、橋渡し研究などによれば、大学が技術を開発しそれを企業へ渡すと製品ができあがってくる、という流れでした。しかし、「学」が「産」へ技術を渡し、「産」がつくったものを、「学」が評価しフィードバックをしながら一般的な治療法へと発展させていくといった流れが理想です。スーパー特区で真の産学連携のスタイルをつくり、1人でも多くの患者さんを治すことが目標といえます。スーパー特区の期限である5年間で、ぜひ頑張りたいですね。

梅澤 補償問題も課題のひとつだと思い、健康被害救済制度の現状を確認しました。まだ、政府で勉強会を行っているという段階なのです。私も、責任の所在は医師自身にあると思いますが、たとえば患者からの訴えなどがあつたときに対応できる救済制度や、スーパー特区で相談を受けられるようなシステムを整えていければと考えています。

また、少し個人的なことになりますが、私は臨床の最先端の現場にはおらず、再生医療にどのように貢献できるかと、常に自問自答しなければならない立場にあります。細胞を培養したり、疾患モデルマウスに移植したりする日々で、医療の現場にはおりません。しかし、自身で開発した最先端の技術を臨床へ移行する、という岡野先生の講演を聞き、基礎研究者でも非常に高い評価を受けていらっしゃることに感銘を受け、自問の解決を見いだせたような気がしました。臨床へ移行する際のトランスレーショナルリサーチに貢献する、その役回りを担えればと思っています。

岡野 近年、飛躍的に医療が進みました。しかし、臨床技術が進歩したからといって、すべての疾患が治せるわけではありません。戦略的に治していく作業が必要です。

梅澤先生がおっしゃったような、地道にテクノロジーを蓄積していく作業も重要ですし、澤先生や西田先生のように、最先端の臨床を行いながら新技術を応用していく、基礎と臨床が一体になって取り組んでいくことも必要な時代になっています。日本はまだ“旧態依然”の延長線上にいることが多く、特に革命の必要な新しい治療“再生医療”という世界では、なかなかコマがそろってきません。

今回のスーパー特区の設置では、技術力の高い人材も集まりましたし、企業もずいぶんと参加しています。本日、お話しいただいたことが、5年後にはかなり達成できていることを願って、努力していきたいと思っています。本日は、ありがとうございました。

第Ⅱ部 実用段階に入る再生医療

角膜再生臨床試験の道筋

角膜疾患に対する再生治療

Regenerative medicine for cornea

西田 幸二*

Kohji Nishida

東北大学未来医工学治療開発センター

Innovation of new biomedical engineering center

はじめに

角膜の移植の現状についてお話ししたいと思います。角膜の病気では、日本がリードして角膜再生の開発をしていますので、紹介したいと思います。

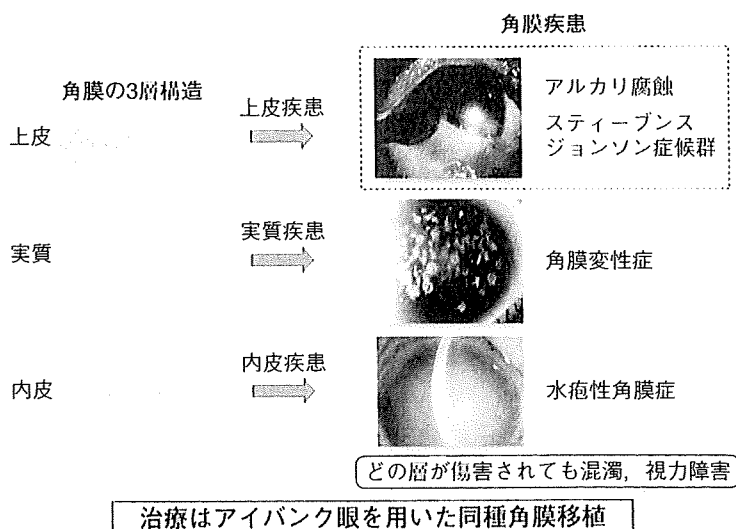
1. 角膜移植の問題点

少しバックグラウンドのお話をしますが、角膜は3層構造をしていて、上皮、実質、内皮に分か

れます。それぞれ発生的にオリジンも違いますし、再生医療も上皮の再生、実質の再生、内皮の再生というように研究が展開されています。そのうち、上皮の領域に対しての再生医療が、実際の患者への臨床研究ということで進められている段階です。角膜疾患の中で最も治りにくいのがこの上皮の病気ですので、上皮の病気で再生医療が最も進んでいるという状態です (Fig. 1).

角膜上皮の幹細胞は1980年代から研究がされていて、実は角膜の周辺部に存在するということがわかっています。輪部といいますが、角膜と結膜の間です (Fig. 2).

Fig. 1 角膜の3層構造と角膜疾患



* 東北大学大学院医学系研究科 神経感覚器病態学講座・眼科視覚科学分野 教授 (Department of Ophthalmology and Visual Science, Tohoku University Graduate School of Medicine)

角膜上皮の病気は、外傷とか、炎症とか、熱傷とか、Stevens-Johnson症候群とか、遺伝性の病気などの病気で、角膜の上皮の幹細胞が傷害されて、そのために角膜が結膜に覆われて濁ってしまうという病態になります。ですから、角膜上皮の幹細胞を移植する必要があるということになります。この病気については、ドナー角膜から角膜の周辺部を取ってきて、それを移植するという一種の角膜移植がこれまで進められてきました (Fig. 3).

しかし、角膜移植全体では拒絶反応が20～30%ですが、上皮の病気に対しては拒絶反応が非常に高頻度に起こります。Solomonらの報告 (*Ophthalmology* 2002) によると、例えばStevens-Johnson症候群では、生存曲線を見ると、長期予後が非常に悪い。生存率では40カ月でゼロになっ

ています。化学腐蝕はおよそ50%ということで、拒絶反応を抑えることはなかなか難しいということもありますし、わが国ではドナー角膜が非常に不足しているという問題点があります (Fig. 4).

こういったバックグラウンドがあって、組織工学・再生医療の開発が1990年代後半から進められてきました (Table 1).

2. 自家培養上皮細胞シート移植

最初の報告は、「Lancet」に載ったイタリアのグループの方法で、角膜上皮の周辺部を取ってきて、これは皮膚の表皮の培養系と同じなんです。幹細胞を3T3のフィーダー feeder 細胞とともに培養するという系です。そして細胞のシートを作って移植する。これは、細胞を回収するときに酵素処

Fig. 2 角膜上皮の幹細胞

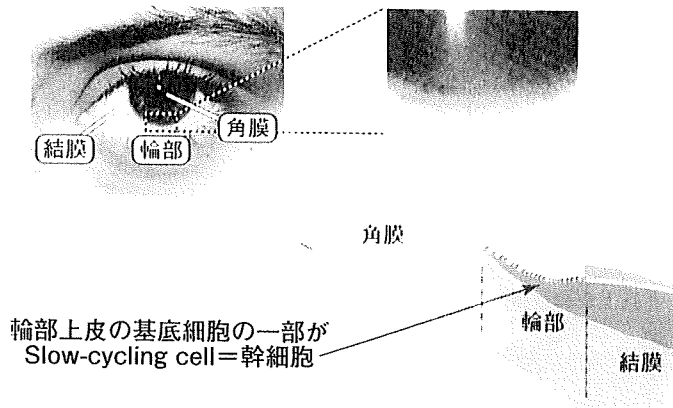
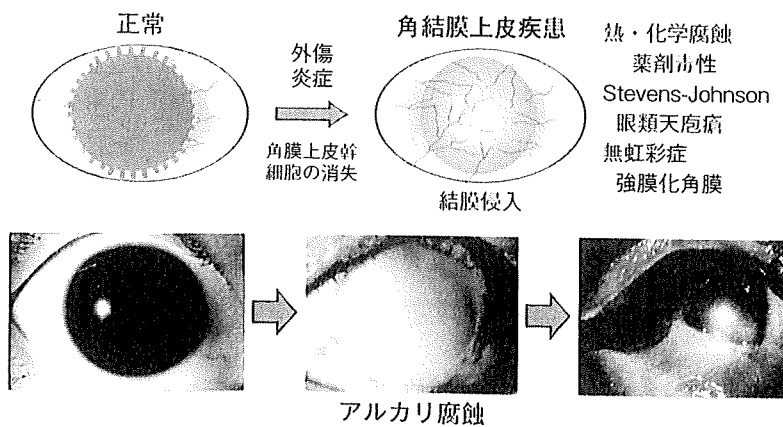


Fig. 3 角膜上皮幹細胞の消失する疾患



理を行うので、細胞シートが脆弱になってしまうという欠点がありました (Fig. 5).

それ以降、下に羊膜やフィブリンゲルという

キャリアを敷いておいて、その上に角膜上皮のシートを作ってキャリアごと移植するという方法が行われました。しかしながら、この方法であっても、フィブリンゲルであれば、溶解するときに炎症を起こしますし、羊膜であれば、生体材料ですので、組織への統合不良が起こるといったことが、欠点として考えています。

そこで、われわれは別の方法を考えました。一つは、口腔粘膜を使うという方法です。両眼性の病気に対しては、口腔粘膜を使って角膜上皮を再

Table 1 角膜移植の問題点

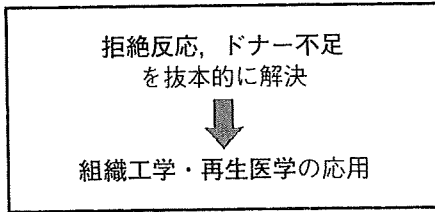


Fig. 4 角膜移植の問題点

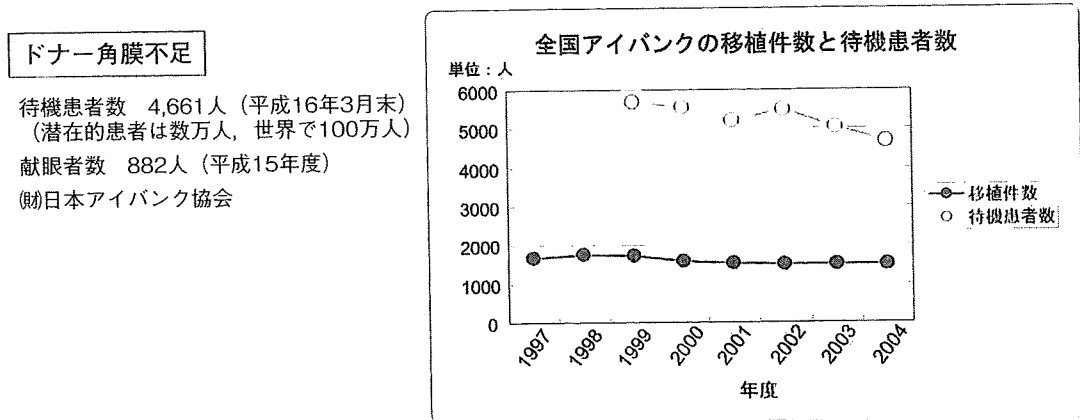
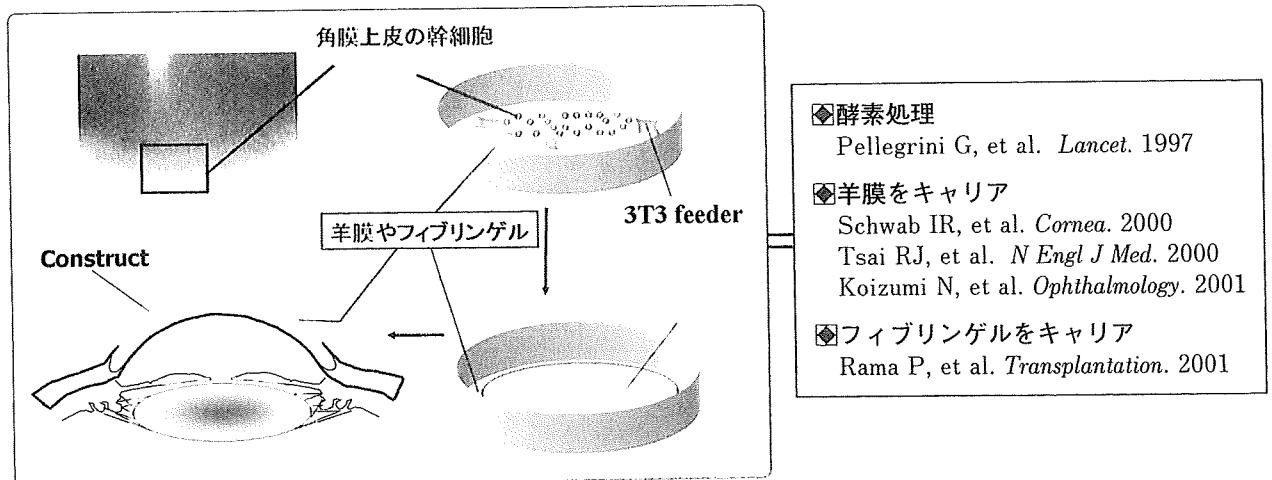


Fig. 5 自家培養角膜上皮細胞シート移植



温度応答性培養皿, キャリアなし (東北大学, 大阪大学, 東京女子医大)
Nishida K, et al. *Transplantation*. 2004. *N Engl J Med*. 2004.

酵素処理による培養細胞シートの消化の問題
羊膜やフィブリンゲルによる炎症, 組織への統合不良, 生体材料などの問題を払拭

建する。口の粘膜にも stem cell がありますので、その口の粘膜の stem cell を培養して、それで角膜上皮様の組織を作って、それを移植に供するという事です (Fig. 6).

もう一つの工夫としては、東京女子医大の岡野光夫先生と共同で温度応答性培養皿を使う細胞シートの構築の系を確立しました。口の粘膜か角膜の輪部の幹細胞を、温度応答性培養皿に播種して、細胞シートを作る。温度を下げるだけで、非

侵襲的に培養皿から細胞シートを回収することができますので、細胞シートだけを移植できる。これが非常に大きな利点になります (Fig. 7).

温度応答性培養皿というのは、温度応答性ポリマーを通常の培養皿の底部に電子線重合でグラフト化しているものですので、このポリマーの性質が、37度と32度以下では疎水性から親水性に相転移しますので、温度を変化させると細胞シートが自然にはがれてくるということで、酵素も使わ

Fig. 6 細胞源：自家の幹細胞

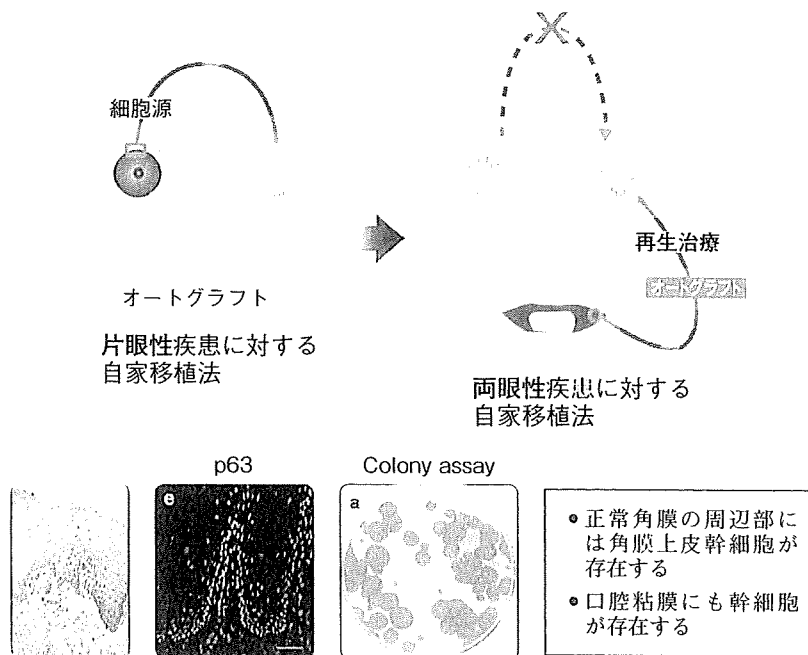
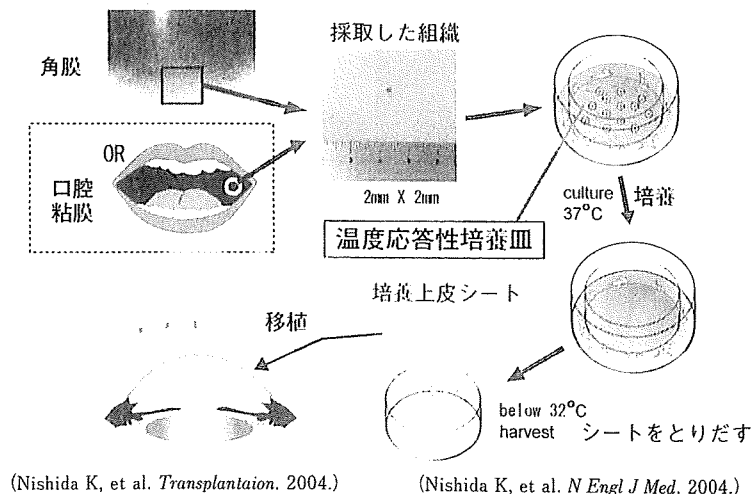


Fig. 7 自家培養上皮細胞シート移植



ずにすみますし、キャリアも使わずにすみます (Fig. 8).

これが細胞シートを回収している様子ですが、具体的には培養皿を20度のインキュベーターに30～40分入れておくだけで、細胞シートがはがれる状態になっていますので、このような紙を置いて引っ張りあげると、細胞シートが紙にくっついてはがれてきます。紙が丸くくりぬいてあって、この部分を角膜に移植する。このような工夫をしました (Fig. 9).

これは角膜の輪部の幹細胞から作った細胞シートで、こちらが口腔粘膜から作った細胞シートで

すが、いずれも角膜上皮と同様の構造を持っているような組織を、体の外で構築することができます。このシートの性質については、いろいろ研究をして、口腔粘膜から作っても角膜上皮と同じような機能を持っているということを確認して、動物実験等を行って、臨床に入ったという段階です。

表面を見ても、マイクロビライというような構造になっていますし、下のほうを見ても、基底膜様の構造もきちりとできて、それが細胞シートを回収するときにちゃんと残っています (Fig. 10).

また、細胞の幹細胞を移植しなければならないと申しましたが、細胞シートの中には幹細胞が

Fig. 8 温度応答性培養皿

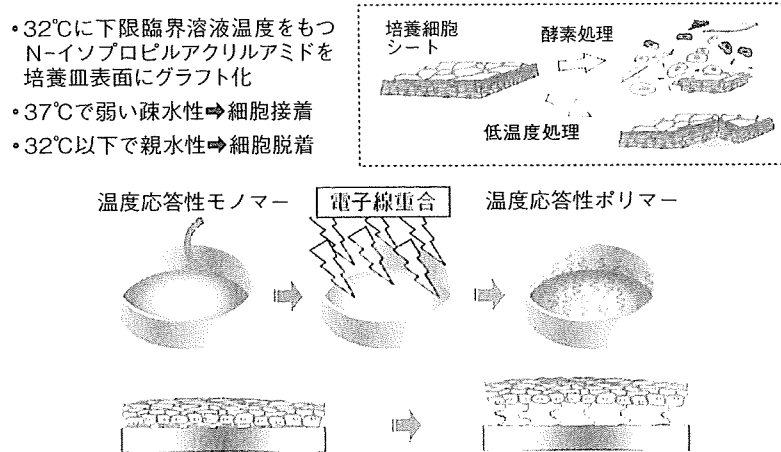
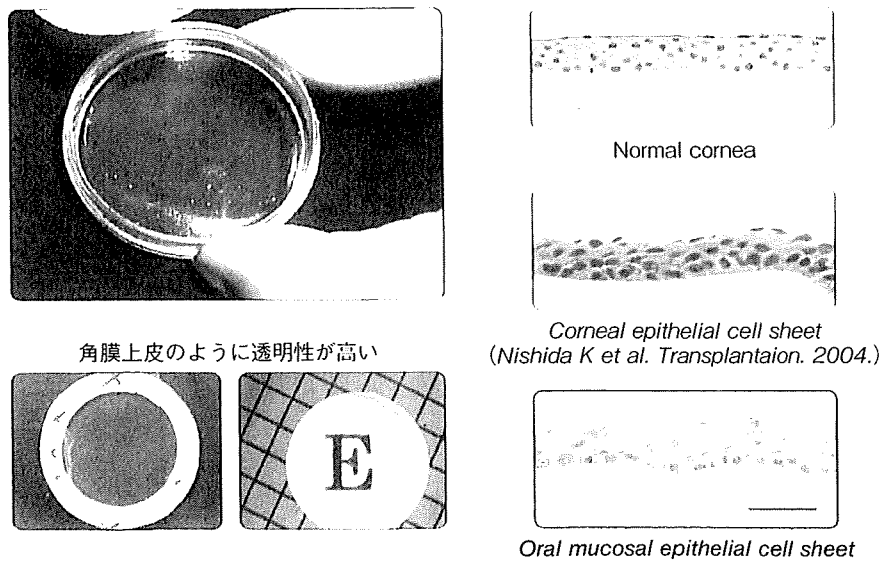


Fig. 9 細胞シートの回収と組織



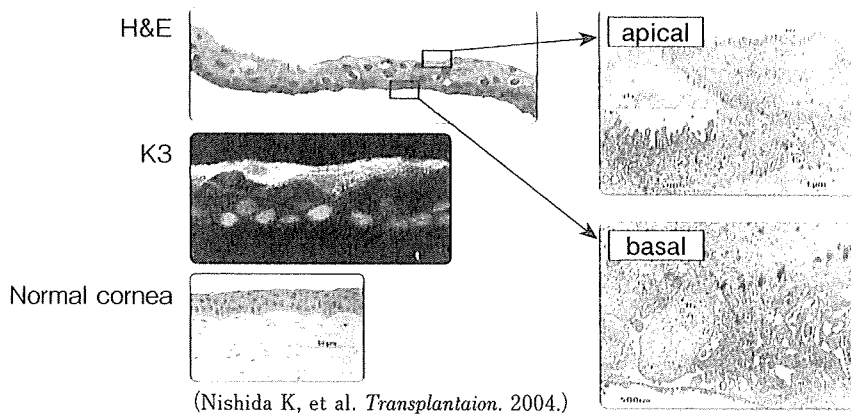
(Nishida K, et al. *N Engl J Med.* 2004.)

残っています。このp63というのは幹細胞マーカーですが、こういった未分化の幹細胞がこの細胞シートの基底部にちゃんと残っているということを確認しています。ですから、細胞シート移植ですが、幹細胞をきっちり移植できているということになります (Fig. 11).

このMUC16というのは角膜上皮で発現してい

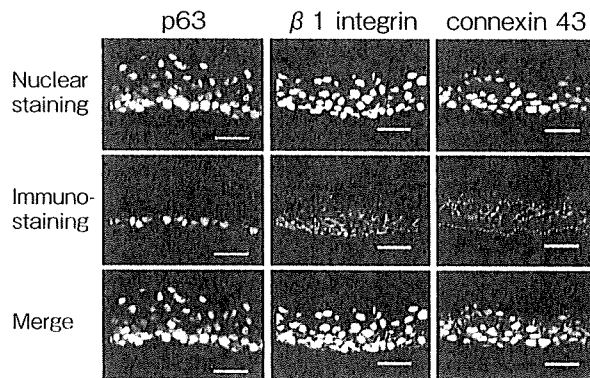
るムチンの一つですが、角膜上皮で特異的に発現します。これは *in vivo* で正常の角膜上皮で発現していますが、シートにも発現しています。口腔粘膜には発現していないのに対して、口腔粘膜をシートにすると発現しはじめているということで、口腔粘膜が角膜上皮様に分化して近くなっているということになります (Fig. 12).

Fig. 10 ヒト培養角膜上皮シートの組織



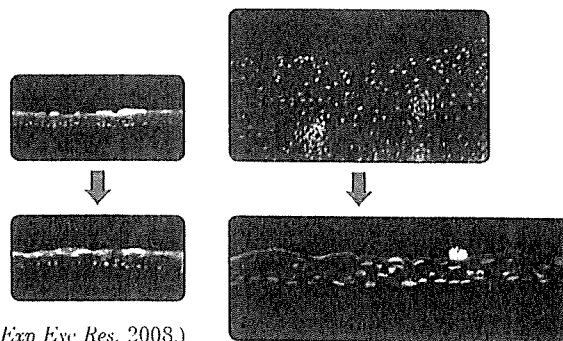
(Nishida K, et al. *Transplantation*. 2004.)

Fig. 11 口腔粘膜上皮細胞シートの幹・前駆細胞マーカー抗体染色



(Hayashida Y, Nishida K, et al. *IOVS*. 2005.)

Fig. 12 Immunostaining for MUC 16



(Hori Y, et al. *Exp Eye Res*. 2008.)

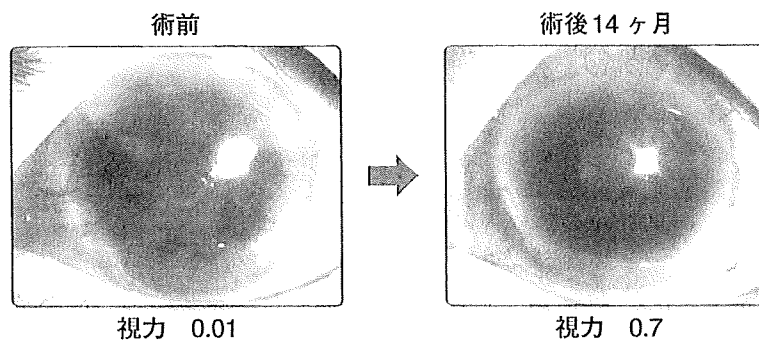
プロトコル等は省きますが、一つ症例のビデオをお示しします。これは、上皮の表面に癩痕性の結膜疾患が張っている病気ですが、これをきれいに取って、患者自身の口腔粘膜から作製した細胞シートをこの上に貼り付けるという治療です。これは自家移植ですので、自家の口腔粘膜から作っています。ですから、拒絶反応が起きない。ドナーの角膜もいらぬということになります。

これは眼類天疱瘡という非常に難治性の疾患ですが、術前が0.01であったのが、14カ月で0.07と非常にきれいに再建できています。いまはもう

1年以上を経過していますが、長期間にわたって角膜の透明性を維持できています。それは拒絶反応が起きないからだろうと思います (Fig. 13)。

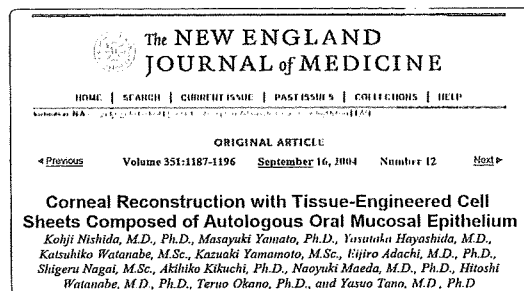
はじめの4例はすべて重症例ばかりです。Stevens-Johnson症候群か、あるいは眼類天疱瘡といった、これまで角膜移植で非常に予後の悪い病気を選んで、この治療を行った結果、1年以上にわたって角膜の透明性が維持されて、視力も有意に上昇しました。こういう結果を得ましたので、2004年にこの結果を「*New England Journal of Medicine*」に報告しました (Fig. 14)。

Fig. 13 培養口腔粘膜上皮シート移植の結果

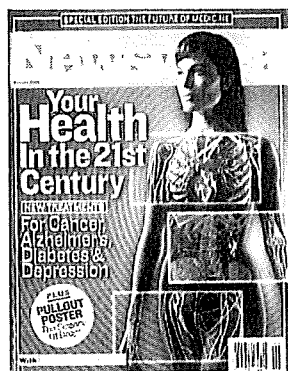
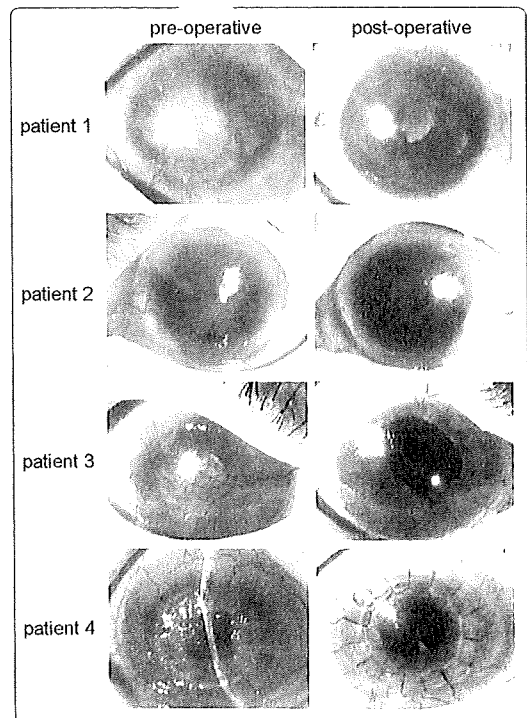


(Nishida K, et al. *N Engl J Med.* 2004.)

Fig. 14 培養口腔粘膜上皮シート移植の結果



(Nishida K, et al. *N Engl J Med.* 2004.)



はじめの4例を報告
世界初の技術
を日本から発信

3. 標準治療へ向けた改良点

さらに、これを標準治療にするためには、やはり改良していかなければいけない。いくつかの改良点がありましたので、まず研究を行いました。標準治療に向けた開発研究を行いました (Fig. 15).

一つは安全性に向けた改良で、3T3という異種の細胞とFBSを用いた系ですので、これを何とかヒトの細胞、あるいはヒトの血清に置き換えると

いうことを試みました (Fig. 16).

患者自身の細胞からフィーダー細胞を作る。血清は自己血清を用いる。こういう系にできないかを研究してきました (Table 2).

Table 2 安全性に関する改良

<ul style="list-style-type: none"> ● フィーダー細胞 3T3細胞 → 自己フィーダー細胞 ● 血清 牛胎児血清 → 自己血清
--

Fig. 15 標準治療へ向けた改良点

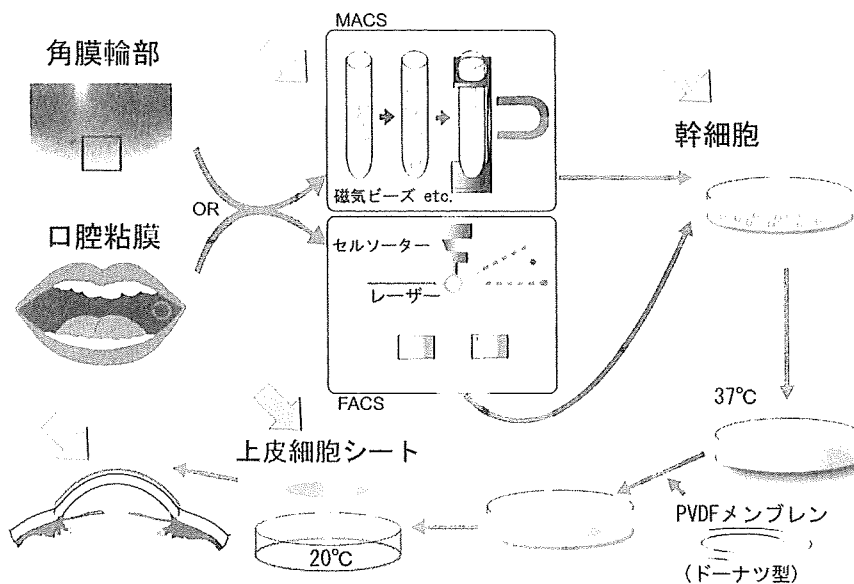
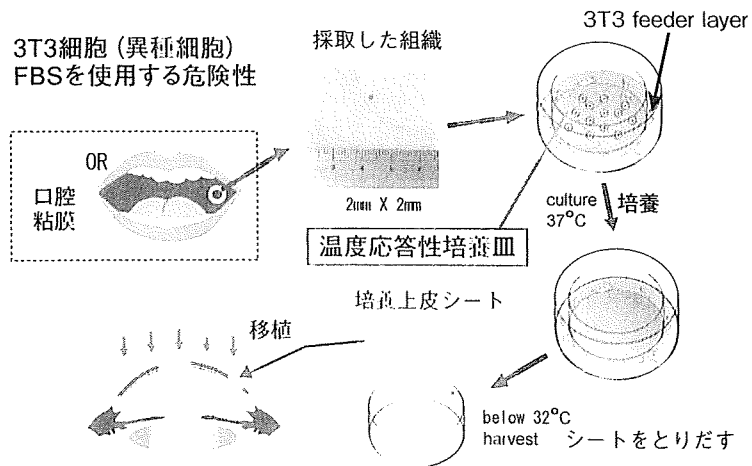


Fig. 16 自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植



(Nishida K, et al. *N Engl J Med.* 2004.)

われわれが注目したのは、脂肪の中にある mesenchymal stem cell, 間葉系の幹細胞です (Fig. 17). これは、最近、再生医療の細胞ソースとして非常に注目されていますが、様々な研究から細胞の恒常性を維持する様々な因子を分泌しているということがわかっています. アディポサイトカインとか、いろいろ呼ばれていますが、そういった機能がありますので、これは使えるのでは

ないかと考えて、いろいろな研究を行いました.

一つは、コロニーアッセイという方法でフィーダー効果を観察することができますが、これは 3T3のフィーダー細胞を用いて、これが脂肪の細胞を用いて、ヒトの血清で角膜上皮の幹細胞に対するフィーダー効果を見たものです. 3T3と遜色ない. フィーダー効果としては、この脂肪由来の MSC も使えるという結果を得ました (Fig. 18).

Fig. 17 再生医療の細胞源として期待される脂肪由来MSCと多様な機能をもつ脂肪細胞

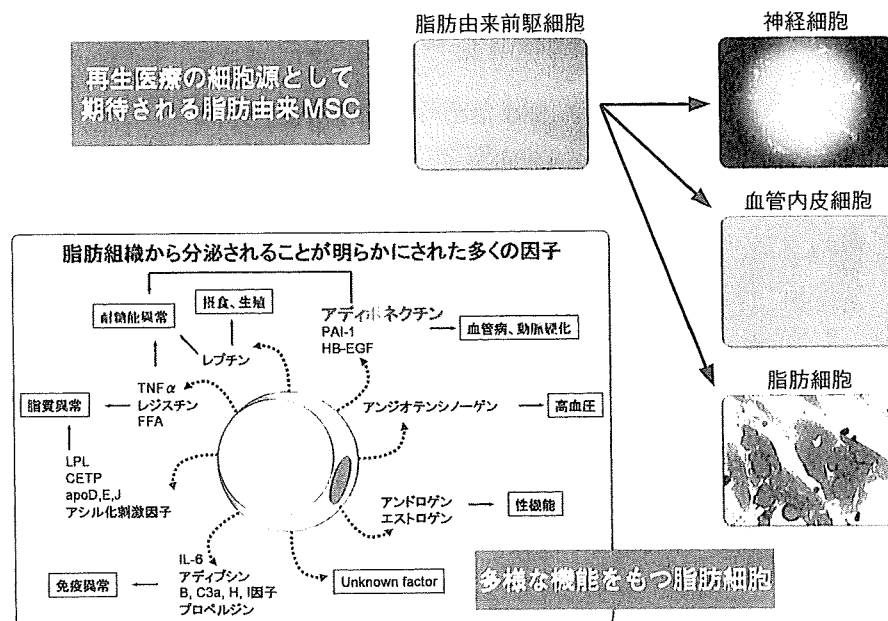
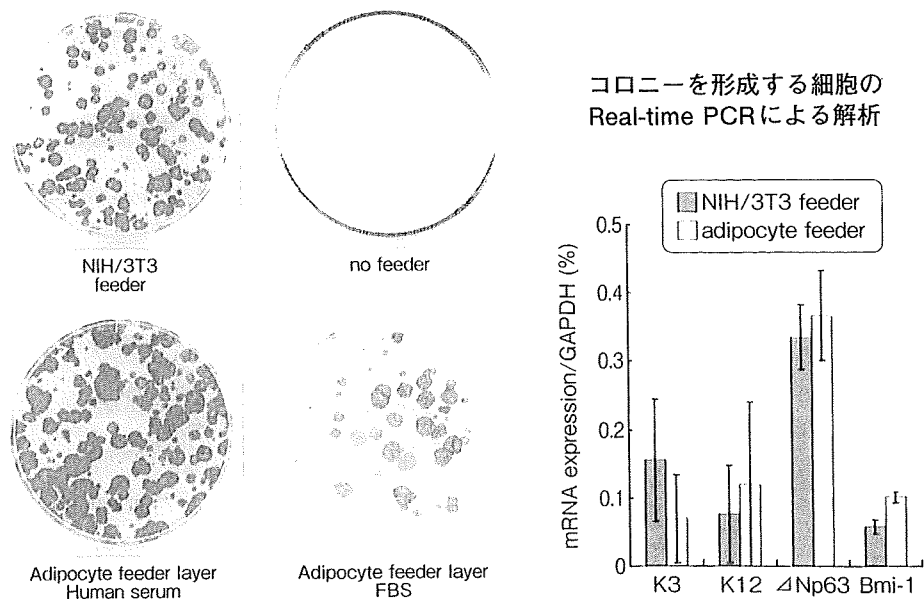


Fig. 18 ヒト角膜上皮幹細胞に対する脂肪 MSC のフィーダー効果



これは、このなかにある細胞を取って分化マーカーの発現を調べたものですが、コロニーを形成する細胞というのは幹細胞を自己複製させていく必要があります。ですから、このΔNp63とか、Bmi-1といったものが、両方で差があれば少し問題ですが、差がないという結論を得ましたので、こういった研究を行って、この脂肪由来の細胞もフィーダー細胞として使えるのではないかという結果を得ています。

実際にシートを作っても、上が3T3 feeder, 下が脂肪由来MSC feederですが、遜色ない細胞シートを作ることができました。幹細胞もこの中にしっかり残っています。様々な実験を行って、脂

肪由来の幹細胞が応答のフィーダー細胞として使えるということで、プロトコルに入れるということを考えてみました (Fig. 19)。

改良点のもう一つはバリデーション法です (Fig. 20)。最終製品の評価というのは再生医療では非常に大切です。ですから、最終製品が実際に移植に適しているものかどうかということで、様々な評価基準を設けてきました。実際には、同じロットとして移植用は一つ、バリデーション用として一つ、そして予備・保存用として一つということで、最低三つのシートを作って、一つをつぶしてバリデーションに用いる。

これはバリデーションフローチャートですが

Fig. 19 作製した培養角膜上皮細胞シートの組織

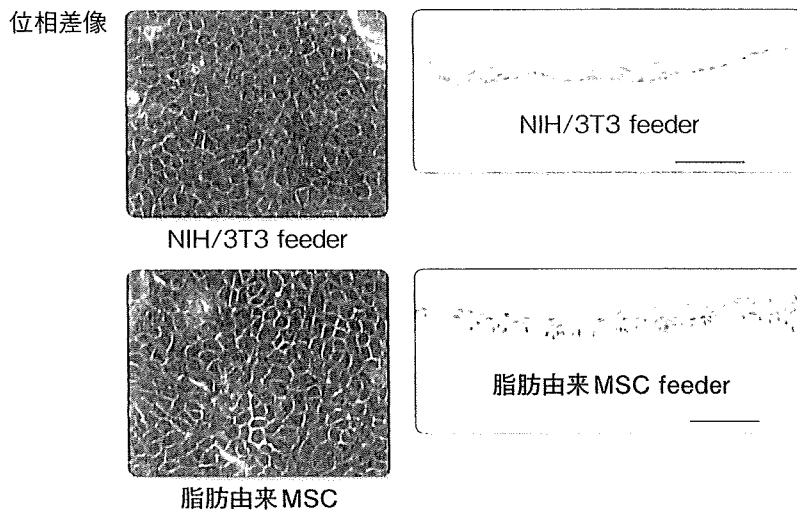
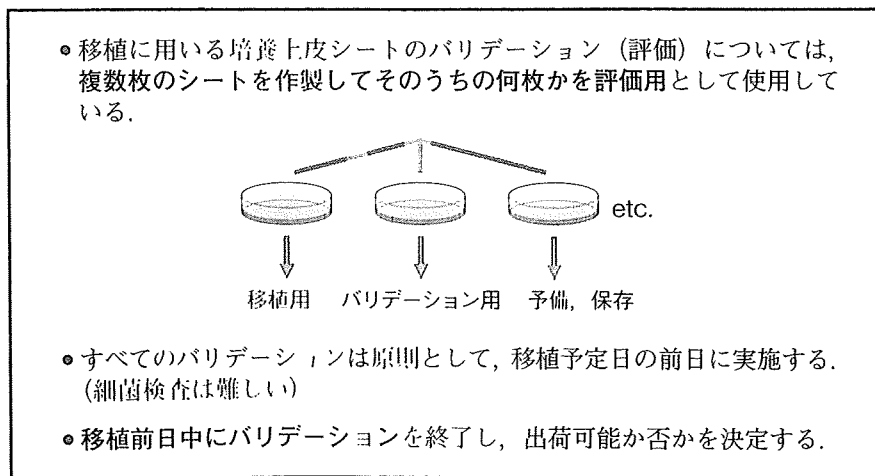


Fig. 20 バリデーション法



(Fig. 21), 位相差顕微鏡での観察から始まって, シートの剥離試験, 組織学的観察, あるいは免疫学的な観察などを, 移植前日に行うという系を構築しました. FACSを用いて細胞生存率を簡単に換算することができますので, これで例えば90%以上生存しているとか, 未分化細胞というか, 幹細胞が含まれているかどうか, 各症例ごとにそういうことを確かめるというプロトコルです.

そして, 実際に細胞シートの機能はどうか. バリア機能とって, 実際に微生物や異物など外来性の物質に対するバリアになるためには, 特定の moleculeが必要です. タイドジャンクションの形成が必要で, ZO-1やクローディン, オクルーディンなども分子がタイドジャンクションを構成しています. あとはムチンの発現が必要ですから, こういったものを観察してしっかり発現していることを確かめる必要があります. バリデーション法をきっちり確立することは治療の標準化に非常に重要です.

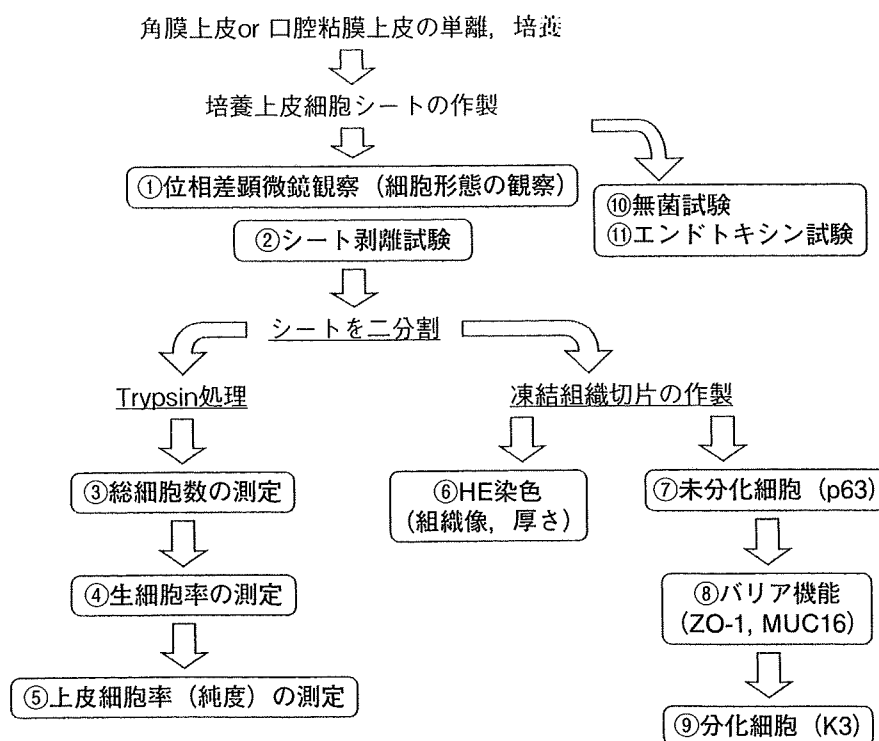
これらをプロトコルに組み込んで, はじめは脂肪を採取して, その脂肪由来のフィーダー細胞を

作製しておいて, 移植2週間前に口の粘膜を取って, そのフィーダー細胞を用いて細胞シートを作って移植をするというようなプロトコルを構築しました. これは, 私が阪大にいるときに未来医療センターでこういったプロセスを行わせていただいて, 未来医療センターのCPCを用いて, その支援でプロトコル, SOP等を作って, 少数の臨床試験を行いました (Fig. 22).

まだ詳細な結果をお示しすることはできません. 例えばこの患者は一番うまくいった症例です. 術前は手動弁とって, 0.01もない患者でした. ほとんど失明した患者でしたが, 術後3年0.9という正常に近いような視力を得ることができました. これはStevens-Johnson症候群の患者で, 通常の角膜移植では治すことができませんでしたが, 長期にわたってこのように視力を回復することができるといって結果を得ています (Fig. 23). 下は重症の熱傷の患者で良好な結果を得ております.

方法は少し違うもの, オリジナルな方法も含めてまとめてみますと, 視力の改善率については少しばらつきがありますが, 1年以上経過観察でき

Fig. 21 バリデーションのフローチャート



た14症例では、生着率100%、視力改善率92.9%
 となっています。

脂肪を取るといのは少し侵襲があるので、皮
 膚の線維芽細胞でも代用できないか等々、現在研

究を進めており、代用ができそうであるという結
 果を得ております (Fig. 24).

最終的にはこういったプロトコルで行うかとい
 うことを検討しなければなりません、今後、多

Fig. 22 自己脂肪前駆細胞をフィーダー細胞とした培養移植の方法

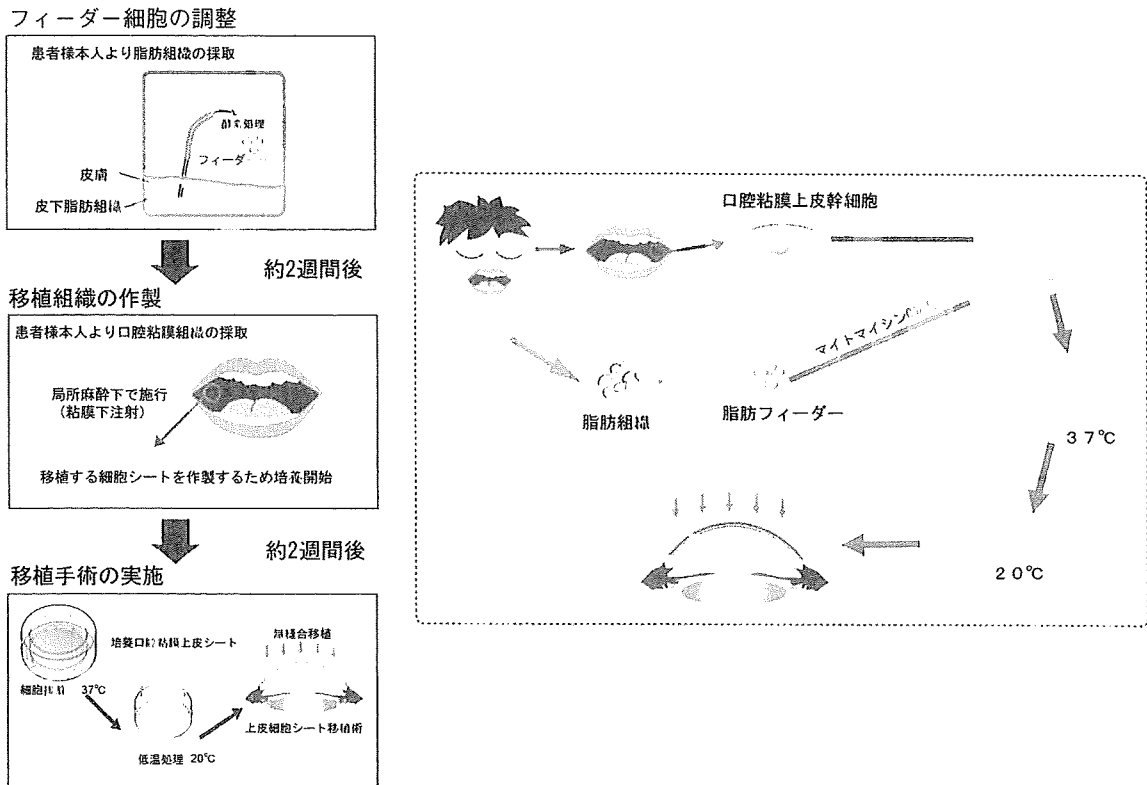


Fig. 23 手術成績

