

た RPE の補充として用いられた。過去に報告された RPE 移植は、アイバンクや胎児から得られた RPE が用いられていたが、これら非自己の RPE 移植では、移植 RPE 自体がさまざまな抗原性を持ち、炎症反応や免疫反応を惹起するなど臨床的に拒絶反応が大きいという課題があった。この改善例として、RPE の代用として自己の虹彩色素上皮細胞 (IPE) の移植が報告された¹⁾。この場合も含め、RPE が移植に利用される場合は培養細胞として利用されることがほとんどである。一般的には体外で培養する操作は、生体内における環境と異なるため、RPE がもともと持っている生理的機能 (分化機能) を完全に逸脱させた状態となる。培養細胞は微小環境内に移植してあげると、微小環境内で分化した落ち着いた状態になる可能性が指摘されているが、細胞を利用する細胞治療においてはこのような移植後の細胞の挙動が特に重要な問題である。しかし過去の報告を見ると、サル own 自己 IPE を培養後、懸濁液として網膜下に移植したとき、術後 6 か月の時点でも網膜下に移植細胞が確認でき、また、移植細胞の増殖反応や拒絶反応は通常の検査方法では見られない。また、培養細胞を用いる場合、遺伝子導入によって網膜保護作用のある神経保護因子や栄養因子の運搬細胞として利用できる可能性がある。すなわち、各個人にあった効果的な治療を引き出すオーダーメイドの細胞製剤を作ることが可能である。

1.2 遺伝子工学を駆使した細胞治療

培養細胞に遺伝子を組み込む場合、電気刺激を利用して強制的に導入する方法や、リポソームを使用したり、ウイルスベクターに目的遺伝子を組み込んで導入する方法などがある。ベクターに用いるウイルスとして、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus ; AAV)、レトロウイルス、ヘルペスウイルスなど多数のウイルスが知られている。これらの方法で、上述の網膜神経保護因子の遺伝子を移植細胞に導入し、網膜疾患治療に利用する方法が検討されている。

目的遺伝子を組み込んだプラスミドベクターをリポソームを用いた Lipofection 法で細胞内に導入し、プラスミドベクターが持つ抗生物質耐性遺伝子を利用して遺伝子導入された細胞を選択する方法がある。もし遺伝子が導入された細胞を特別に選択しない場合、目的遺伝子の発現は極端に低い。選択すると、目的遺伝子を発現する細胞を回収できるが、これには時間がかかり、回収できる細胞も少ないことが多い。そのため、臨床応用を目指した場合、限られた自己の細胞を利用することを考えると、もっと効率の良い方法で遺伝子を導入する必要がある。その点では、ウイルスベクターは導入効率の点で利点がある。

ウイルスベクターにはさまざまな種類があるが、X連鎖遺伝型重症複合免疫不全 (X-linked severe combined immunodeficiency : X-SCID) に対するレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、大半の患者が免疫能を獲得して通常の生活を送れるようになったが、治療を受けた 15 名のうち約 3 年後に 3 名が T リンパ性白血病を発症し、うち 1 名が死亡したことが報告された²⁾。アデノウイルスベクターでは ornithine transcarbamylase (OTC) 遺伝子を搭載させた phase I の毒性試験が 1997 年に開始されたが、18 番目の症例が血液凝固異常と多臓器不全を起こし、4 日後に死亡したことが報告された³⁾。一方、AAV は病気との関連が知られておらず、染色体に遺伝子を組み込む力はほとんどなく、これまでの臨床応用でも重篤な合併症は報告されていない。AAV にはいくつかの血清型が知られており、それぞれの組織によって感染のしやすさに違いがあることが知られている。網膜に関しては in vivo では 4 あるいは 5 型が RPE や視細胞に導入効率が高いことが判明しており、in vitro での遺伝子導入については 2 型が導入効率が高いことが判明した⁴⁾。2 型 AAV は米国食品医薬品庁 (FDA) が臨床応用を認可した AAV であり、米国において 12 種類の疾患に対して合計 30 のプロトコールが提唱されている。このうち、パーキンソン病に対しては、3 種類の臨床研究が進行している。実際に 2 型 AAV に神経栄養因子である脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子を組み込んだ IPE を網膜下に移植すると、光障害による視細胞死を部分的に抑制することが報告されている⁵⁾。AAV はアデノウイルスに比較して導入効率が悪く発現も遅いが、安全である以外にも長時間発現が持続するなどの利点がある。しかし AAV は細胞内に取り込まれてからは、まだ未知の部分もたくさんあり、今後の研究で導入効率の改善も含めて安全性の証明を検討していく必要がある。

1.3 細胞の機能制御

遺伝子導入された細胞は、目的の生理活性物質（薬）を移植された生体内で生合成し、かつ微小環境に応じて徐放するいわば全自動生合成型徐放製剤とみなせるが、さらにこの考えを一步進めた方法が報告されている。これは新たに導入した特定遺伝子の単純な発現を期待するのではなく、遺伝子の発現量と発現時間を人為的にコントロールして、病態に応じた薬（生理活性物質）の合成、分泌を制御することによって、さらなる治療の最適化を図るものである。その例として、テトラサイクリンにより導入遺伝子の発現を人為的にコントロールすることができる Tet-on および Tet-off システムの利用が挙げられる。詳細は省くが、テトラサイクリンやその誘導体であるドキシサイクリン（Dox）に対して用量依存的に目的遺伝子の発現を正確に制御できるシステムである。BDNF 遺伝子をこの Tet-on システムで導入した細胞を網膜下に移植し、Dox を含む点眼液で、点眼時にのみ遺伝子を発現させる方法が報告された⁶⁾。Dox は生体の機能に何ら影響しない濃度範囲で使用されており、外部から導入遺伝子の発現を完全な形でかつ簡便な方法（点眼）でコントロールするこの方法は、理想的な細胞製剤の1つである。

2. 細胞製剤の投与方法

遺伝子導入等によって機能化された細胞を作成した後、この細胞を目的部位に如何にして移植するかが次の課題となる。最近では、再生医療研究の発展によって、患者自身の体細胞（たとえば皮膚の線維芽細胞）の本来持っている分化機能をリセットして幹細胞に戻し、別の細胞に変換する iPS 細胞が作成できるようになったが、同様に細胞の移植方法が課題として残る。ここでは、細胞を分散した懸濁液を使う方法として高分子カプセルで細胞を免疫隔離する方法と、細胞を特殊な培養皿で培養することによって細胞シート化する方法を紹介する。

2.1 細胞免疫隔離カプセル

遺伝子導入した細胞や iPS 細胞などの多分化能を有する幹細胞など、人工的に機能を操作した細胞を生体内に移植する場合、これら細胞が生体内環境に適応して安定に機能し、目的の機能を発揮して治療に有効に働けば問題はない。しかし、上述したように遺伝子組換え体が異常を起こして癌化等の重大な副作用を引き起こす危険性は排除できないし、さらに使用する細胞は免疫拒絶反応の観点から自己もしくは組織適合性抗原が患者に適合している細胞に限られることになる。このような課題は今後の細胞製剤の産業化の支障となりうる。そこで、宿主の免疫系から移植細胞を完全に回避して拒絶反応を防ぎ、生体内で安定に機能させる方法を開発できれば、遺伝子導入細胞や幹細胞を自己の細胞から調製する必要がなくなり、広く非自己の細胞を利用することができるようになり、さらに遺伝子導入等の改変に伴う拒絶反応を回避できる可能性がある。

このような細胞の免疫隔離の方法として、細胞を高分子膜のようなカプセルで包み込み、免疫担当細胞をはじめとする生体防御因子の侵入を防ぐ方法がある。この場合、使用される高分子は細胞の生存に必要な栄養や酸素、細胞から分泌された生理活性物質が透過し、老廃物の排出も良好である膜でなければならない。さらに、生体内で長期的に安定で、生体適合性に優れている必要がある。このように生体に触れて使用される材料はバイオマテリアルと呼ばれ、高分子だけでなく金属やセラミックスなどこれまでに様々な材料が開発、臨床応用されている。

細胞免疫隔離カプセルの一例として、ニューロテック社の NT-501 を紹介する。2011 年に NT-501 は網膜色素変性症の患者に対する Phase II の臨床試験で、視細胞への保護効果があることが確認された。網膜色素変性症は網膜にある杆体、錐体と呼ばれる視細胞が原因不明に徐々に変性する遺伝性疾患であり、最終的には視力を失って失明に至る、今のところ確立された治療法がない希少疾患である。NT-501 は眼内に埋め込むインプラントで、毛様体神経栄養因子（CNTF）を分泌するように遺伝子改変したヒト由来細胞を封入した細胞カプセルである⁷⁾。カプセルは、長さ 9mm、内径 870 μm 、外径 1070 μm のポリエーテルスルホン（polyether sulfone ; PES）からなるホローファイバー膜からなり、内部には細胞の足場（scaffold）となるポリエチレンテレフタレート（polyethylene terephthalate）製のマイクロファイバーが充填されている。カプセルの一端にはチタニウム性のループがウレタンアクリレートを接着剤にして取り付けられており、反対側は perfluoroalkoxy 共重合体で蓋がされている。遺伝子組換えされた CNTF 発現細胞は、

39,000cells/ μ Lの懸濁液（1%グルタミン含有、血清不含培地）がおおよそ 10 μ L 充填されており、おおよそ 400,000 個の遺伝子組換え細胞が充填されている。このカプセルは硝子体手術によって眼内に埋め込まれ、細胞が分泌した CNTF は眼内の硝子体中におおよそ 1 年にわたって約 1-10ng/day の量で徐放される。Phase II の治験の結果では、移植から 12-24 ヶ月後に摘出された NT-501 には、すべて生き生きとした CNTF 産生細胞が残っていたと報告されている。眼内インプラントに伴う副作用もなかったため、細胞隔離がうまく機能していた可能性が高い。この成果は、細胞を葉の運び屋として利用する細胞製剤として臨床的に成功している例であり、どんな細胞でも充填できるカプセルという意味では、今後他の分野にも応用が期待できる汎用性を持っている。

2.2 細胞シート化

近年の目覚ましい再生医療研究の発展は、従来臓器移植に頼ってきた移植医療を革新する新しい医療として現実味をおびてきた。特にノーベル医学・生理学賞を受賞した山中伸弥教授の iPS 細胞技術は、上述してきた自己細胞を使うことによる免疫拒絶反応の回避や、必要な細胞を人工的にいくらでも増やせるという点で、現状の臓器移植医療にある拒絶反応やドナー不足を解消できる可能性がある。さらに岡野光夫教授が開発した細胞シート化技術は、iPS 細胞等から作成した分化した細胞を 3 次元的な組織・臓器に組み立てることを可能にする技術である。従来の細胞懸濁液を注入していた方法では、細胞が移植部位で分散し、さらに細胞同士のインタラクションが希薄で分化機能の維持が難しいという課題が指摘されたが、細胞シート化によって目的の機能を維持した組織・臓器として移植し、定着させることが可能になると期待できる。これら日本発の 2 大技術は、今後の日本の最先端医療を牽引し、世界をリードする基幹技術である。最近、この 2 大技術を利用した革新的再生医療法が報告された。それは患者自身の iPS 細胞から RPE を作成し、さらにこれを細胞シート化して加齢黄斑変性症治療に臨床応用するという試みである。

加齢黄斑変性症は、加齢によって網膜の中でも視力の中心部分となる黄斑に障害が生じ、視力が低下する病気である。欧米では失明原因の 1 位の疾患であり、日本でも高齢化と食生活の欧米化が進み、患者数は近年著しく増加している。加齢黄斑変性症には大きく分けて萎縮型と滲出型の 2 種類があるが、上述の RPE 細胞シートの臨床応用は滲出型患者を対象にしているため滲出型を中心に述べる。滲出型は、一部上記したが、異常な血管（脈絡膜新生血管：CNV）が脈絡膜から網膜色素上皮の下あるいは網膜と網膜色素上皮の間に侵入して網膜が障害される病気である。外科的に CNV を抜去する手術が行われるが、CNV と一緒に RPE も失われる場合があり、網膜を栄養している RPE が失われた部分は、最終的に網膜が細胞死を起こし視力は回復しない。CNV が抜去された空間に新たな RPE を移植する方法は前項で述べたが、細胞懸濁液を注入していたため、細胞が分散し、目的部位に定着しないという課題が残っていた。さらに RPE は生体中で 1 層の上皮バリア構造を形成しているが、細胞は溶液に分散した状態で注入されるため、本来の RPE の機能を維持していたかどうかは不明である。この点において、RPE を細胞シート化して移植する方法は、本来の RPE の機能を維持したまま、本来の構造のまま移植することが可能であるため、移植後は定着し網膜を栄養して保護することが期待できる。

3. 実用化の課題

細胞を DDS として用いる場合、移植した細胞が目的の仕事だけを適切に行っているか、間違った仕事をしていないか監視できれば良いが、一度移植してしまうと細胞の様子をうかがい知ることは難しいため、移植後の治療は細胞任せになってしまう。これは再生医療研究にも言えることだが、移植した細胞が間違った方向に分化、すなわち癌化したり、思わぬ副作用を惹起することのないように、常に注視することが重要になってくる。この意味では、細胞免疫隔離カプセルは周囲の細胞との接触がなく、さらに不要になれば取外しも可能であるため、現状のベストな移植方法だろう。また、移植した細胞の監視と言う意味では、細胞のラベリング、モニタリング技術も必要になるかもしれない。一方、薬剤徐放の持続性も重要な課題である。ポリマーを用いた従来の DDS 製剤は薬剤充填量に限界があるため、いずれは空となり持続性はない。細胞を用いれば、細胞が生きている間は薬剤を自動で合成するため、長期間の徐放が期待できるが、どれほどの持続性があるかは今後の報告に期待するところである。いくつかの課題はあるものの、細胞を用いた細

胞治療は 21 世紀の医療に向けて無限の可能性を秘めており、寄せられる期待は大きい。

文 献

- 1) Abe T, Yoshida M, Yoshioka Y, Wakusawa R, Tokita-Ishikawa Y, Seto H, Tamai M, Nishida K. *Prog Retin Eye Res.* 2007 May;26(3):302-21
- 2) Kaiser J: Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science*, 2003, 299: 495
- 3) Marshall E: Gene therapy on trial. *Science*, 2000, 288:951-957
- 4) Sugano E, Tomita H, Ishiguro S, Abe T, Tamai M. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Sep;46(9):3341-8
- 5) Hojo M, Abe T, Sugano E, Yoshioka Y, Saigo Y, Tomita H, Wakusawa R, Tamai M. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Oct;45(10):3721-6
- 6) Abe T, Wakusawa R, Seto H, Asai N, Saito T, Nishida K. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Aug;49(8):3631-9
- 7) Thanos CG, Bell WJ, O'Rourke P, Kauper K, Sherman S, Stabila P, Tao W. *Tissue Eng.* 2004 Nov-Dec;10(11-12):1617-22

