

網膜色素上皮細胞シートの眼内移植

東京女子医科大学眼科

ヤジ ナオコ ホリ サダオ
谷 治 尚子・堀 貞夫

(受理 平成23年11月2日)

Transplantation of Tissue-engineered Retinal Pigment Epithelial Cell Sheets

Naoko YAJI and Sadao HORI

Department of Ophthalmology, Tokyo Women's Medical University

Research in retinal regenerative medicine has made a great advance in medical and engineering science. In particular, various transplantation methods have been developed for retinal pigment epithelial (RPE) cell transplantation in an attempt to compensate for the loss of RPE function, such as age-related macular degeneration and retinitis pigmentosa. In our previous study, we transplanted tissue-engineered RPE cell sheets in a rabbit model.

The RPE cells of pigmented rabbits were cultured in temperature-responsive dishes. The pigmented RPE cell sheets were non-invasively harvested without enzymatic treatment, simply by reducing the room temperature. Using 3-port vitrectomy, these sheets were transplanted into the subretinal space of albino rabbits. Our results showed that, after transplantation, RPE cell sheets attached to the host tissues in the subretinal space more effectively than with the injection of isolated cell suspension. However, in this experiment, RPE cell sheets were difficult to transplant in the form of flat monolayer sheets into the desired area; therefore, the transplantation method needed to be improved. In the current study, our engineering collaborators developed a novel surgical tool for RPE cell sheet transplantation that used the principle of the pneumatic balloon actuator. This tool could perform sequential motions driven by pneumatic pressure. The cell sheet was fixed on the actuator, rolled-up into a cylindrical shape, stored in the tube, and then inserted into the eye. Using this procedure, we could attach the cell sheet as flat sheets on the Bruch's membrane and on RPE of pig eyeball in which the cornea, lens, vitreous body, and neural retina were removed. Thus, this collaboration of medicine and engineering science enabled dramatic research progress in transplanting vulnerable RPE cell sheets into subretinal space.

Key Words: retina, transplantation, cell sheet, rabbit

はじめに

近年網膜再生治療研究が進展している。なかでも網膜色素上皮 (RPE) 細胞移植については小動物から人への移植までさまざまな移植方法が試みられている^{1)~5)}。

RPE は視細胞外節の貪食, 神経網膜との接着, 血液網膜柵の維持, サイトカインの分泌などを通じて神経網膜の機能を保っている⁶⁾。しかし加齢やほかの病的変化, 治療のための新生血管除去術による欠損があると再生せず, 増殖したとしても色素顆粒の少

ない RPE がごくわずかに広がるのみであったり, 薄い RPE であることが報告されている⁶⁾。本来の機能を失った RPE では神経網膜の機能の維持ができなくなり視力の低下をきたす。そのため RPE 移植が期待される。筆者らは培養 RPE を非侵襲的にシートとして回収しキャリアーを用いずに家兎に移植したことを報告した⁷⁾。今回はその後の移植デバイスの開発経過も含め研究の経緯を総括する。

1. RPE 細胞移植の目的

脈絡膜新生血管 (CNV) 除去術を滲出性加齢黄斑

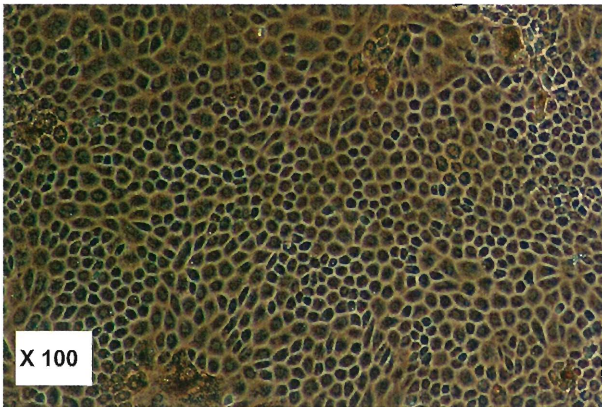


Fig. 1 Cultured RPE cells

Primary cultured RPE cells in temperature-responsive cell culture dishes.

The cells exhibited pigmentation and cobblestone morphology.

Reprinted from *Atarashii Ganka (J Eye)* 26 (6), 2009

変性に対し治療として行っていた時期があるが、光線力学的療法 (PDT) や抗 VEGF 療法などの新しい治療に比べて侵襲が大きく成績も良くないことから⁸⁾⁹⁾現在では施行される機会はほとんどない。筆者らの施設で過去に施行した例では CNV 抜去時に多量の RPE が新生血管板に付着しており、固視点は RPE が脱落していない部位に移動していた。このような RPE 脱落部位に RPE 細胞がシートで移植できたら、RPE 欠損による神経網膜の機能低下を防げるのではないかというのが当初の目的であった。ほかの RPE 移植の方法としてこれまでに、フラップ状の自己 RPE 移植、周辺部の RPE の直接移植などが国内外で報告されている²⁾¹⁰⁾。ほかにも、Allo の成人 RPE や胎児 RPE のヒトへの移植の報告もある²⁾³⁾。また RPE の代替として採取の容易な虹彩色素上皮 (IPE) での臨床報告も出ている^{1)1)~1)3)}。これまで細胞ソースの問題が懸念されていたが、今後は iPS 細胞を利用できる可能性が広がっている。

2. RPE 細胞シートの作製

RPE 細胞シートは東京女子医科大学先端生命科学研究所 (ABMES) の岡野らが開発した温度応答性培養皿を利用して作製した¹⁾⁴⁾¹⁾⁵⁾。この細胞シート工学と呼ばれる方法は、細胞組織を培養皿から温度変化によってシートの形のまま取り出して回収するというものである。従来の蛋白分解酵素などを用いて RPE を回収する方法やほかの基質に頼る方法と異なり、より生体に近い形で細胞シートが回収される。眼科領域ではすでに温度応答性培養皿で作製した角

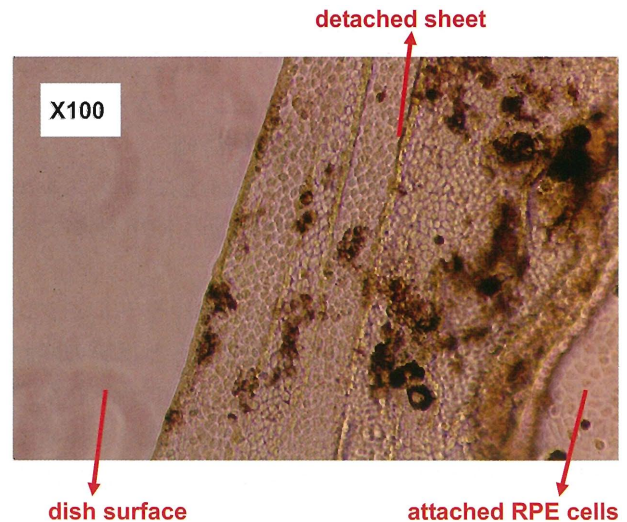


Fig. 2 Fabrication of carrier-free RPE cell sheets

The confluent RPE cells can be non-invasively harvested as a single contiguous cell sheet by reducing temperature.

Reprinted from *Atarashii Ganka (J Eye)* 26 (6), 2009

膜上皮の細胞シートを西田らが臨床応用している¹⁾⁶⁾¹⁾⁷⁾。

筆者らの実験のデザインは有色家兎の RPE 細胞シートを作製し、白色家兎に移植して経過をみるというものであった。本研究は東京女子医科大学動物実験倫理委員会基準を遵守した。

まず RPE 細胞は有色家兎の眼球からトリプシン・EDTA を用いて回収し、温度応答性培養皿に播種した。RPE 細胞は単層で皿面からの脱着時にはがれにくくなることが多いため、培養皿の表面ははがれやすい組成に加工した。培養時には皿面のはがれやすさのため厳密な温度管理を必要とした。RPE 細胞はコンフルエントになった後、光学顕微鏡 (Fig. 1) および電子顕微鏡で観察し、サイトケラチン染色を行ったものは蛍光顕微鏡で観察した。

コンフルエントになった RPE 細胞は、培養皿を 20 度で 30 分冷やしたのち鑷子を用いてシートとして回収した (Fig. 2)。細胞の種類によってはコンフルエントになっても培養を続けてからはがしたほうがはがしやすいいとされているが、RPE 細胞はコンフルエントになってから早めにはがしたほうが、シートに穴が開くことが少なかった。

RPE 細胞シート作製には純粋な RPE 細胞を回収することがポイントで、線維芽細胞との接着性の差を利用して培養と回収を繰り返したり、explant で培養したりしてみたが、半球にして神経網膜を除去した眼球のなかに、RPE のみに液が接触するように

トリプシン・EDTA を満たし眼球は半円状の金属メッシュで形を保護するという方法により、もっとも純粋な RPE 細胞が回収できるようになった。

3. RPE 細胞シートの組織学的評価

播種された RPE 細胞は約 9~14 日でコンフルエントになり、色素顆粒をもった単層の RPE 細胞であることが確認された。

透過型電子顕微鏡 (TEM) 用の切片をトルイジンブルー染色して光学顕微鏡で観察すると単層の細胞の上部に色素顆粒をもち、頂部には microvilli が認められ、さらに TEM では生体の RPE 細胞と極めて類似した形態であった。分裂を繰り返した RPE 細胞はもとの RPE 細胞に比べ色素の密度が低かった。有色家兎から得た RPE 細胞は、RPE 特有の単層の敷石状の形態を示し、RPE 細胞で陽性であるサイトケラチン 18 が陽性であった。温度応答性培養皿でコンフルエントになった RPE 細胞は温度を下げることでより茶色のシートとして回収できた。はがした RPE 細胞シートのヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) では色素顆粒をもった単層の細胞シートであったが、基底部分が接着していないため剝離後は収縮していた。培養皿からはがしたシートは microvilli を内側にして丸まってしまう性質があった。こうして得られた細胞シートは、酵素を用いてはがしておらず細胞外マトリックス (ECM) を豊富に保持しているためかほかの部位やシート同士で接着しやすかった。培養液や眼灌流液の水流で洗うと伸びて操作はしやすかったが、接着性は弱く伸展性も悪くなり生体内での状態とは異なる印象であった。

4. RPE 細胞シートの移植と生物学的評価

RPE 細胞シート移植は白色家兎に対して行った。有色家兎から得られた色素をもった RPE 細胞シートは、白色家兎網膜下での確認が容易であるというメリットがある。自家移植ではないため免疫抑制剤 (FK506) を使用した。移植一週間前から白色家兎には後部硝子体剝離を促進するために空気を硝子体注射した。3 ポートを作製し、家兎では水晶体の眼球内に占める容積が大きく手術の妨げとなるため水晶体を摘出し、トリアムシノロン併用の硝子体手術を行った。硝子体除去後、黄斑下に網膜剝離を作るためにレチナルニードルを用いて網膜下に眼灌流液を注入し、剝離した網膜に切開を加えた。直前に温度応答性培養皿から剝離した有色の RPE 細胞シートを 18G サーフローの外套に吸い込み、ポートの一つを拡大して網膜下に水流を利用して注入した。シー

トの直上よりパーフルオロカーボン (PFC) を網膜上に滴下してシートを広げ網膜下に固定した。十分に RPE 細胞シートが伸展した後、液-空気置換しシリコンオイルを注入してポートを縫合して終了した。また比較対象として RPE 細胞懸濁液を作り同様の手術手技で網膜下に注入した。さらに硝子体手術をせずに細胞懸濁液を注入したモデルも作成した。術後に FK506 の皮下注射を行い 1 週後に経過を観察した。

移植後は 1 週後に眼球摘出し、光学顕微鏡と TEM で組織学的検討を行った。移植したシートは目的の場所に移植できても折り重なっているところがあった。また目的の場所に移植できても後に下方に移動しているところがあった。細胞懸濁液の移植では硝子体手術の有無にかかわらず、網膜下での定着率は悪かった。注入部位からの流出があったと思われた。硝子体手術をしない対照群では RPE 細胞が硝子体線維に多数からまっているのが認められた。

TEM では移植したシートがブルッフ膜側と視細胞側の両方ともに接着しているのが確認された。しかしホストの RPE 細胞を除去していないため移植した RPE 細胞シートの極性は不明であった。移植されたほとんどの細胞は endoplasmic reticulum と cytoplasmic mitochondria を豊富に保持しており、隣接した細胞とは細胞接合を形成していた。

5. 移植方法の検討

サーフローの外套を使って水流にのせて移植する方法では、目的の場所に確実に移植することや、細胞シートの極性のコントロールができず、移植方法の改良が必要であると思われた。しかし粘着性のある RPE 細胞シートを、家兎の眼内で操作できる器具がなく、移植実験では水流にのせる方法で実験を行い、平行して器具の開発を進めた。RPE 細胞をシートで移植するときの問題となるのは、眼内に入れるときの切開創の大きさ、網膜下に入れるときの網膜の切開の大きさ、シートを広げたままかつ目的の場所にいかに移植するかなどということである。ある程度視細胞が機能している間に移植しなければならないが、網膜下の操作自体が RPE や視細胞を傷害してしまう。また、複数回施行したときに再現性がなければならず、極端に難しい技術を必要とするわけにはいかない。

水流にのせることが RPE シートに物理的な影響を及ぼさないで眼内に入れられる方法であると思われたが、目的の位置に運ぶために運搬の支持体につ

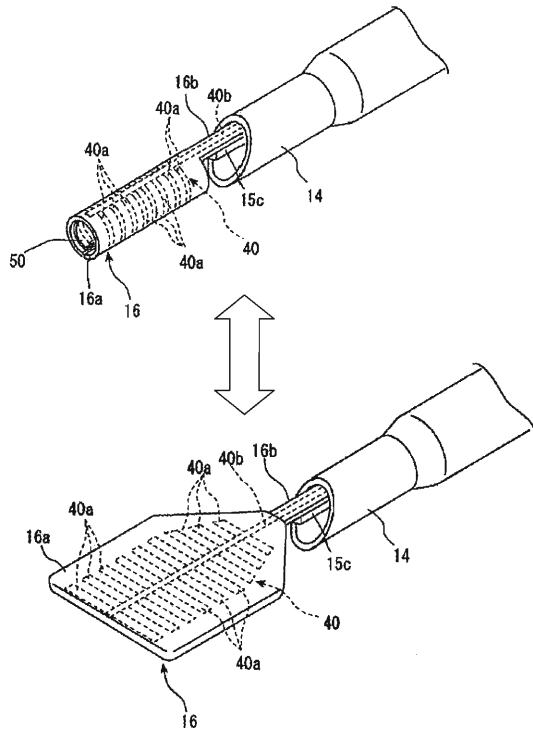


Fig. 3 Surgical tool for RPE cell sheet transplantation
Reprinted from JAPANESE PATENT GAZETTE
(Patent number 4569971) 2010

いて検討した。硝子体手術の器具と同じように径が小さく、先端はシートを単層のまま保持して眼内を移動し、網膜やBruch膜を傷つけないやわらかさで、神経網膜下にシートを貼り付けられることが要求された。

ABMESでは医学や生物系と工学系の研究者が同じ施設内で研究しており、また企業からの研究出向者も多く、支持体について相談するには良い環境であった。工学系の研究者と開発をすすめる、先端は流体圧の変化によってしなやかに曲げ運動を行う、バルーンアクチュエーターで構成された移植デバイスが試作された¹⁸⁾。このデバイスは、東京女子医科大学、立命館大学、名古屋大学、および(株)HOYAが共同で平成19年に特許出願し、平成22年に特許を取得している(Fig. 3)(特許第4569971号)。また、このデバイス関連で、平成19年に日刊工業新聞社モノづくり連携大賞特別賞を受賞している。

試作機は眼内の閉鎖空間で操作するにはまだ大きいと思われたが、操作が確実なものになればそれに添った形で小さくすることは可能である。シート支持体の上でシートを保持したまま支持体を筒状に収納し、移動後また支持体を広げ、角膜、水晶体、硝子体、神経網膜を除去した豚眼のブルッフ膜上およ

びRPE上に細胞シートを貼り付けることはできた。支持体の表面のコーティングによりシートの保持しやすさと貼り付けるときのはがれやすさを調整した。移植時にブルッフ膜面上が濡れているとシートが動いてしまい、いったん圧迫固定することが必要と思われた。また、RPE上への移植ではブルッフ膜面よりも接着力は強かった。

おわりに

今後、脆弱なRPE細胞シートをどのように移植するか、医学と工学の知恵が結集すればRPE細胞シート移植は飛躍的に進歩すると思われる。まず移植手技の成功率を100%近くに高めてから手術の評価が必要であろう。医学的には神経網膜が萎縮しない視力の良いうちに移植をしないと神経網膜をレスキューできないというジレンマがあるが、この移植の技術が他の疾患の治療にも応用できる可能性がある。網膜疾患の治療のオプションの一助になれば幸いである。

謝 辞

研究のご指導をいただきました東京女子医科大学先端生命医科学研究所 岡野光夫教授、大和雅之教授、伊関洋教授、清水達也教授、立命館大学理工学部 小西聡教授、早稲田大学大学院理工学研究科生命理工学専攻 並木秀男教授、名古屋大学大学院工学研究科 生田幸士教授に深く感謝いたします。

実験と一緒に進めていただいた早稲田大学大学院理工学研究科生命理工学専攻 尾関泰之さん、平元正直さん、東京女子医科大学先端生命医科学研究所 前田真法さん、立命館大学理工学部 渡邊優作さん、手術のお手伝いをしてくださった東京女子医科大学眼科 山本香織先生、鹿内真美子先生、秋山友紀子先生に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Gouras P, Flood MT, Kjedbye H et al: Transplantation of cultured human retinal epithelium to Bruch's membrane of the owl monkey's eye. *Curr Eye Res* 4: 253-265, 1985
- 2) Peyman GA, Blinder KJ, Paris CL et al: A technique for retinal pigment epithelium transplantation for age-related macular degeneration secondary to extensive subfoveal scarring. *Ophthalmic Surg* 22: 102-108, 1991
- 3) Algere PV, Berglin L, Gouras P et al: 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
- 4) Weisz JM, Humayun MS, De Juan E et al: Allo-

- genic fetal retinal pigment epithelial cell transplant in a patient with geographic atrophy. *Retina* **19**: 540–545, 1999
- 5) **Del Priore LV, Kaplan HJ, Tezel TH et al**: Retinal pigment epithelial cell transplantation after subfoveal membranectomy in age-related macular degeneration: clinicopathologic correlation. *Am J Ophthalmol* **131**: 472–480, 2001
 - 6) **Thumann G, Hoffmann S, Hinton DR**: Cell biology of the retinal pigment epithelium. *In* *Retina*. 4th ed. (Ryan SJ ed), pp137–152, Elsevier MOSBY (2006)
 - 7) **Yaji N, Yamato M, Yang J et al**: Transplantation of tissue-engineered retinal pigment epithelial cell sheets in a rabbit model. *Biomaterials* **30**: 797–803, 2009
 - 8) **Hawkins BS, Bressler NM, Miskala PH et al**: Surgery for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: ophthalmic findings: SST report no. 11. *Ophthalmology* **111**: 1967–1980, 2004
 - 9) **Miskala PH, Bass EB, Bressler NM et al**: Surgery for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: quality-of-life findings: SST report no. 12. *Ophthalmology* **111**: 1981–1992, 2004
 - 10) **van Meurs JC, ter Averst E, Hofland LJ et al**: Autologous peripheral retinal pigment epithelium translocation in patients with subfoveal neovascular membranes. *Br J Ophthalmol* **88**: 110–113, 2004
 - 11) **Abe T, Tomita H, Ohashi T et al**: Characterization of iris pigment epithelial cell for auto cell transplantation. *Cell Transplant* **8**: 501–510, 1999
 - 12) **Thumann G, Aisenbrey S, Schraermeyer U et al**: Transplantation of autologous iris pigment epithelium after removal of choroidal neovascular membranes. *Arch Ophthalmol* **118**: 1350–1355, 2000
 - 13) **Lappas A, Weinberger AW, Foerster AM et al**: 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
 - 14) **Yang J, Yamato M, Okano T**: Cell-sheet engineering using intelligent surfaces. *MRS Bull* **30**: 189–193, 2005
 - 15) **Kikuchi A, Okano T**: Intelligent thermoresponsive polymeric stationary phases for aqueous chromatography of biological compounds. *Prog Polym Sci* **27**: 1165–1193, 2002
 - 16) **Nishida K, Yamato M, Hayashida Y et al**: Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* **77**: 379–385, 2004
 - 17) **Nishida K, Yamato M, Hayashida Y et al**: Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* **351**: 1187–1196, 2004
 - 18) **Watanabe Y, Maeda M, Yaji N et al**: Small, soft and safe microactuator for retinal pigment epithelium transplantation. *Proceedings of 20th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical System*: 659–662, 2007