

加齢黄斑変性の病因解明に関する研究の進歩

大阪大学大学院医学系研究科 脳神経感覚器外科学（眼科学）

瓶井資弘

加齢黄斑変性は先進国における 60 歳以上の失明原因の第一位であり、本邦でも人口の高齢化、生活習慣の欧米化に伴い、急速に発症頻度が増加している疾患である。統計では、現在本邦における視覚障害原因の第 4 位を占め、この 15 年間で最も顕著に増加した疾患（4.9%→9.3%、1.97 倍）として挙げられている（厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業、網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究 研究報告書、P99-103、平成 20 年 3 月）。病状が進行すれば中心視野が障害され、就労が困難になることも多く、社会的損失が非常に大きい疾患である。近年、光線力学的療法や抗血管内皮細胞増殖因子（VEGF）薬の開発により、病状の悪化をある程度抑制することが可能となった。しかし、これらの治療はあくまで対症療法であり、短期的には効果的であるものの数ヶ月で再発・増悪することが多い。そのため、2・3 ヶ月おきにレーザー照射や硝子体注射が必要であり、これは眼内感染症の危険性を伴うのみならず、医療費の増大という社会的問題にもつながっている。

そこでわれわれは、上記のような対処療法ではなく、加齢黄斑変性の発症・進展メカニズムに基づいた根治療法の開発、ひいては 1 次予防法を確立することを長期目標として研究を続けている。

加齢黄斑変性を広義の炎症性疾患ととらえる考え方は、研究の発展とともに世界的に受け入れられてきている。代表的なものとしては、補体因子 H や Toll-like receptor 4 などの一塩基多型が加齢黄斑変性の発症と有意に相関するというものが挙げられる（Science 2005, Proc Natl Acad Sci USA 2005）。われわれはこれまでに、加齢黄斑変性巣に集積しているマクロファージが酸化リン脂質を認識するスカベンジャーレセプターを発現していること（図 1）（Kamei et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 2007）、網膜内の酸化リン脂質量が年齢とともに増加しており（図 2）、加齢黄斑変性眼では年齢をマッチさせた正常眼に比べ有意な増加が見られること（図 3）（Suzuki et al, Molecular Vision, 2007）を報告した。

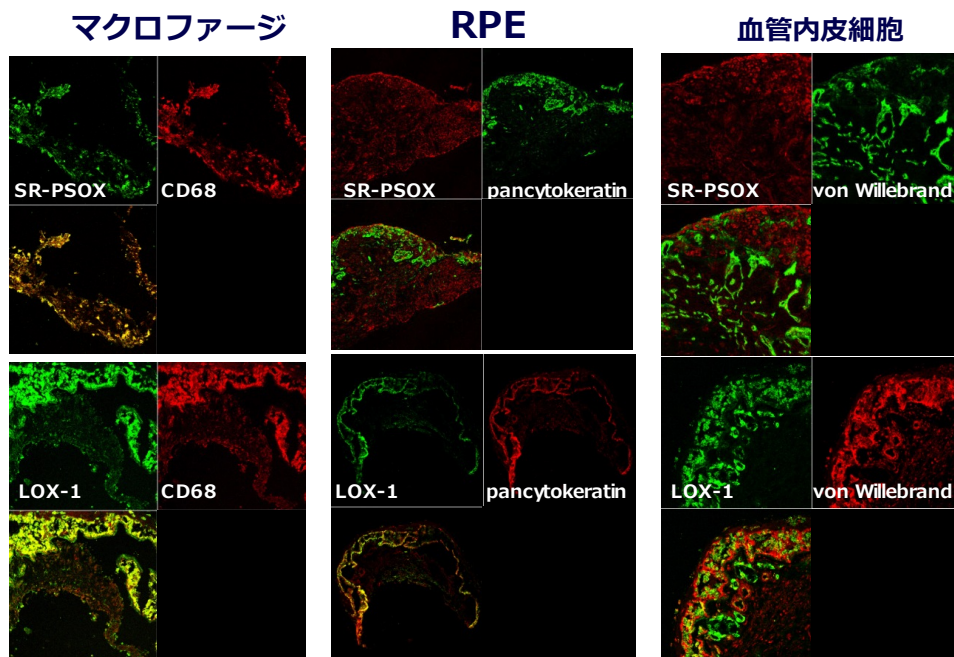


図 1. 加齢性黄斑変性疾患における、酸化リポ蛋白に対するスカベンジャーレセプターの発現

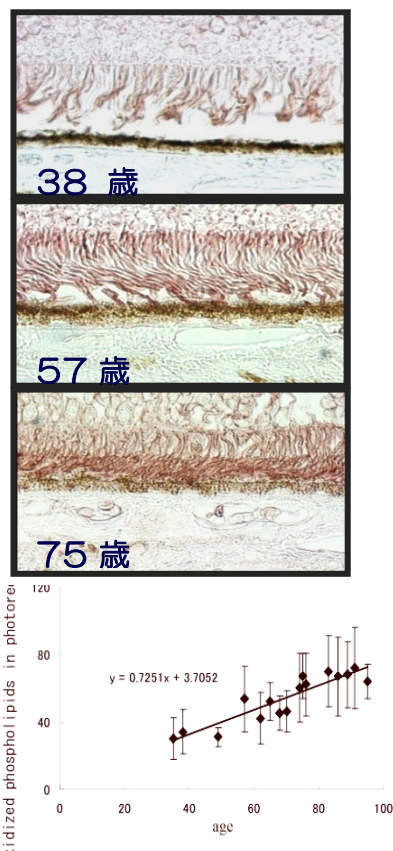


図 2. ヒト網膜内酸化リン脂質

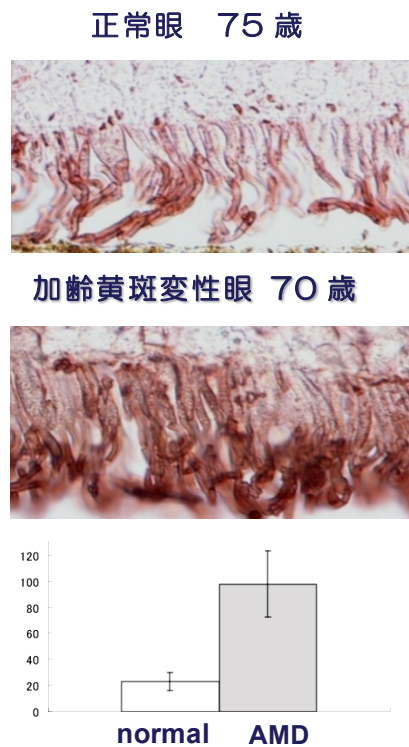


図 3 正常眼と加齢黄斑変性眼における網膜内酸化リン脂質の比較

さらに、光照射により網膜内の酸化リン脂質、MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) がともに有意に($p<0.001$)増加していることが免疫染色、ELISA で判明した。それらの増加は2ヶ月マウスと比べ、12ヶ月マウスで著明であった(図4)。そして、*in vitro*でもARPE-19(不死化網膜色素上皮細胞)におけるMCP-1の発現は、添加酸化リン脂質の容量に依存して上昇を認めた。最終的にMCP-1の発現誘導を介して、マクロファージの集積が見られることを見出し、網膜下酸化リン脂質投与による脈絡膜新生血管の誘導に成功した(図5)。

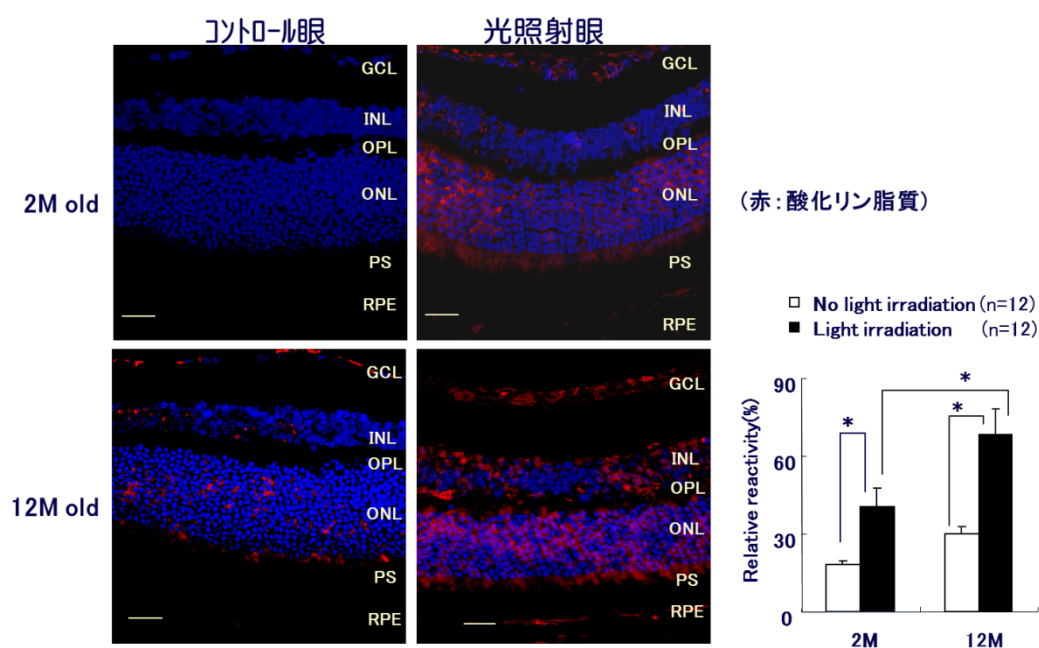


図4. 光照射によるマウス網膜内の酸化リン脂質

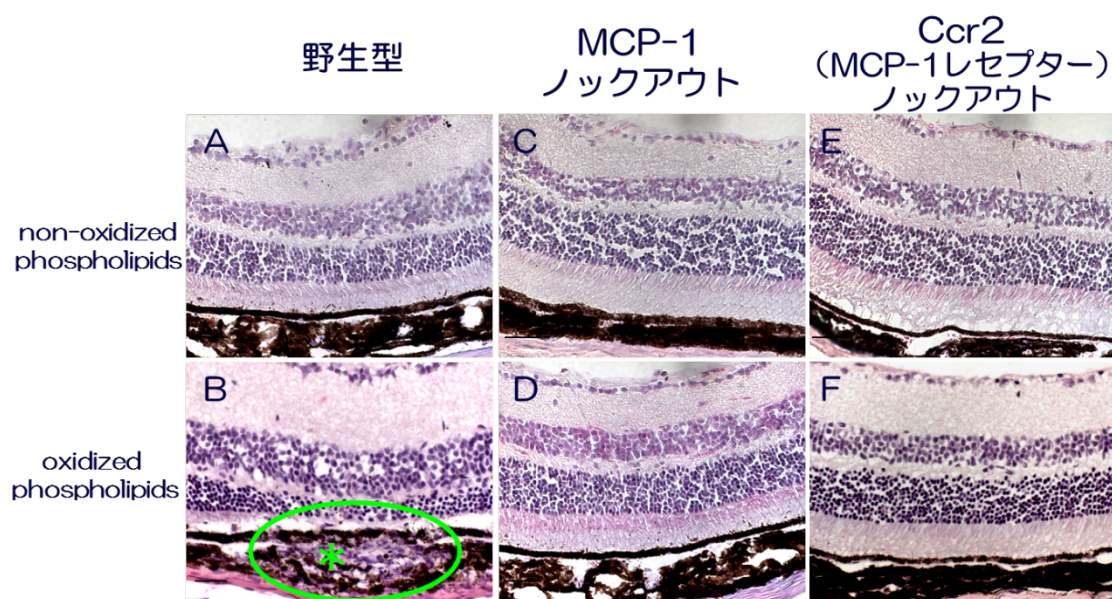


図5. 網膜下酸化リン脂質投与による脈絡膜新生血管の誘導

酸化されていないリン脂質の投与や、MCP-1 あるいはそのレセプターである *ccr-2* のノックアウトマウスへの投与では、脈絡膜新生血管は生じなかったことより、酸化リン脂質が MCP-1 の発現を介してマクロファージ集積、脈絡膜新生血管を誘導している可能性を示唆できた（図 5）。さらに、光ストレス動物モデルの作成・解析を行なったところ、光照射でマイクログリアが誘導され、慢性炎症を惹起することがわかった。照射条件としては、連続照射は低照度でも 1 ヶ月で組織損傷が見られ、3 ヶ月で高度となった。1～3 日の交互照射では、大差はなかったが、2 日毎のパターンが最も酸化ストレス誘導から慢性炎症を惹起していた。そして、低照度長期間（4-6 ヶ月）光照射により、実際のヒトの病態に類似した加齢黄斑変性動物モデルを確立した（図 6）。

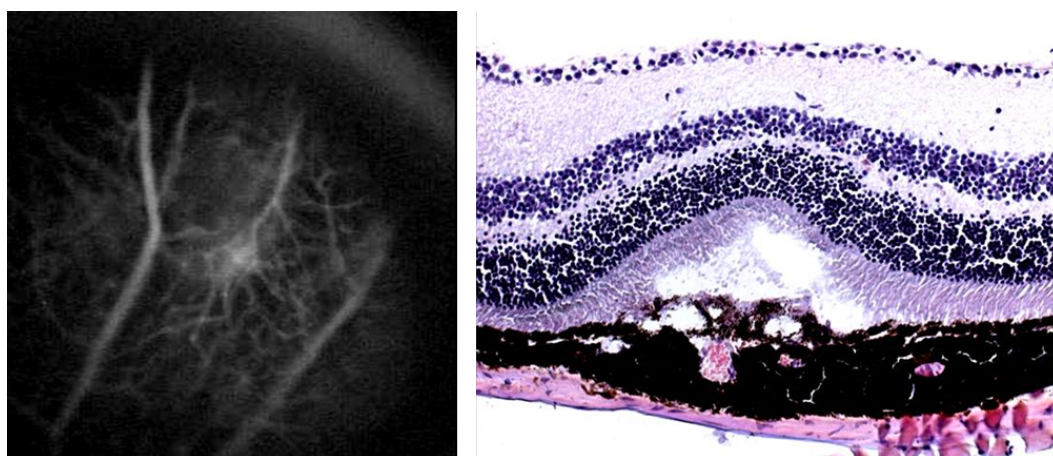
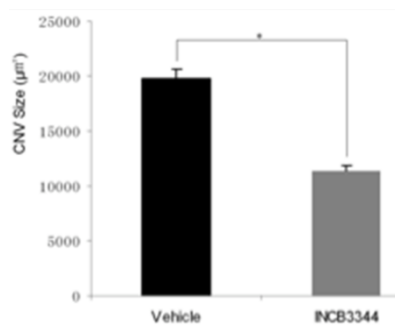
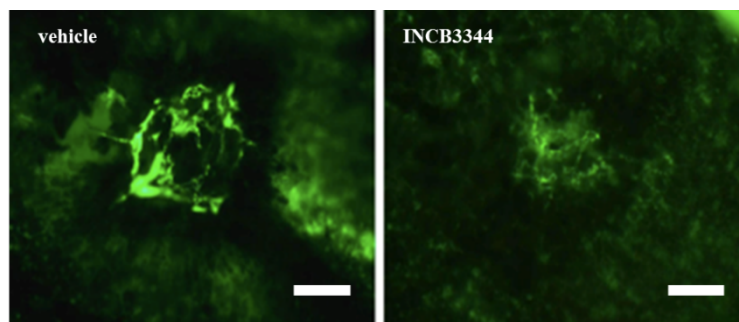


図 6. 照度長期間光照射による脈絡膜新生血管誘導

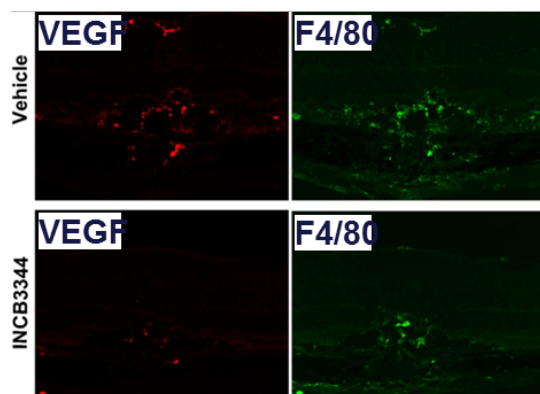
そして、MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1, 別名 CCL2)、および、そのレセプターである CCR2 のノックアウトマウスを用いると、低照度長期間光照射をおこなっても脈絡膜新生血管が生じなかったことより、MCP-1 が CNV の発生に重要な役割を担っていることを報告した (Suzuki M, Kamei M, et al. *J Cell Sci.*, 2012)。

そこで、CCR2 の阻害剤である INCB3344 による、CNV 抑制および退縮の効果を検討した。INCB3344 投与によりレーザー誘導 CNV の平均面積は INCB3344 投与眼で対象眼に比べ 42.4%抑制されていた（図 7）。そのメカニズムを明らかにするため、病巣へのマクロファージの集積を評価し、INCB3344 投与により、レーザー照射早期のマクロファージ集積が有意に抑制されることを見出した。そして、更にその下流のメカニズムを明らかにするため、VEGF の発現を評価したところ、マクロファージの集積抑制に伴い、VEGF の mRNA とタンパク量がともに低下していることが判明した（図 8）(Xie, Kamei, et al. *PLoS ONE*, 2011)。



scale bar; 100µm

図 7. CCR2 の阻害剤による脈絡膜新生血管抑制



Flow cytometry:

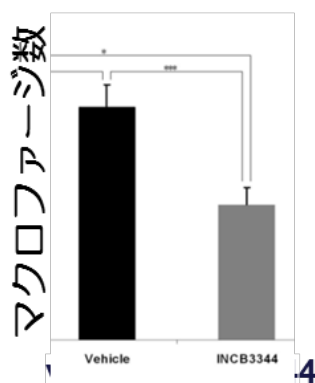
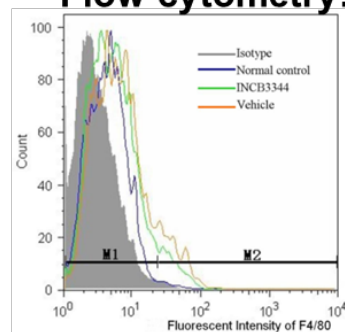


図 8. CCR2 の阻害剤によるマクロファージ集積抑制、VEGF 発現抑制

さらに、実際の臨床を想定すると、CNVは既に発達してから、患者は受診するので、完成後のCNVを抑えることができるかが重要になってくる。我々は蛍光眼底造影を用いた実際の臨床に類似した評価を行ない、長期光照射誘導CNVにおけるCNVサイズは、溶媒投与の対照群では変化なかった(102%)が、INCB3344投与群では有意な縮小(70.4%、 $p<0.001$)することが判った(図9)。これらの結果から、Ccr2アンタゴニストであるINCB3344は、脈絡膜新生血管の発生抑制と退縮効果があることが示され、滲出型加齢黄斑変性の新たな治療薬になる可能性が示唆された。

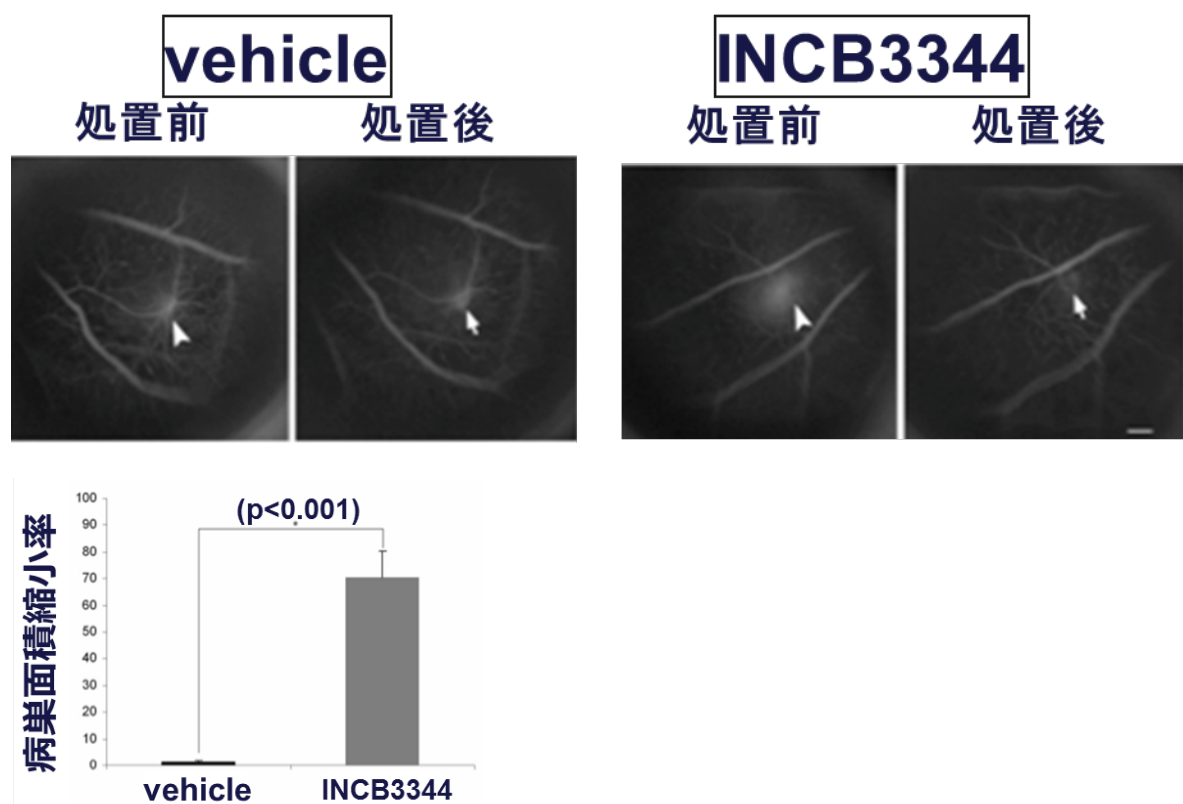


図 9.

このような成果から、光酸化ストレス→リン脂質酸化→MCP-1 上昇→マクロファージ誘導→VEGF 等分泌→加齢黄斑変性発症（滲出型）という機序が存在する可能性を示し、酸化ストレスや慢性的の炎症反応の抑制が、根治療法につながると考える（図 10）。

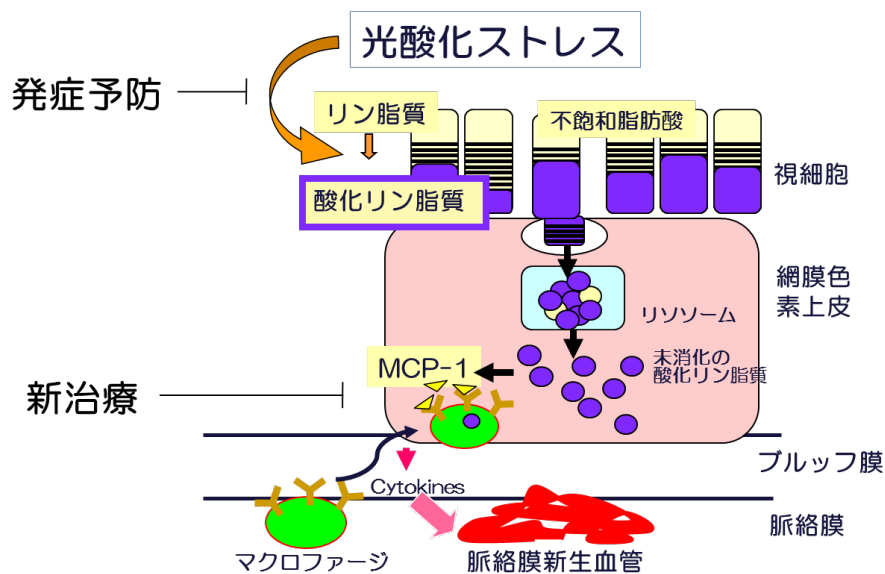


図 10. 発症メカニズムに基づく根治療法の開発

また、加齢黄斑変性の発症には、補体などの免疫系の異常や肺炎クラミジアなどの全身感染症の関与も報告されているので、我々は、微生物感染によって引き起こされる全身の免疫系の変化が、AMD 発症に関与しないかどうかを、実験的脈絡膜新生血管（CNV）モデルを用い、グラム陰性菌の細胞壁外膜の主要成分であるリポポリサッカライド（LPS）の事前腹腔内投与の影響を検討した。その結果、低用量の LPS 事前投与を行ったマウスの CNV サイズは、コントロールと比較して有意に減少することを見出した。加齢黄斑変性では肺炎クラミジアの血中抗体価が高いという報告が複数あることより、当初われわれは、LPS 腹腔内投与により CNV 形成が促進されるだろうと予測していた。しかし、実験結果は反対に、低容量の LPS 事前腹腔内投与により、実験的 CNV は有意に抑制された（図 11）。

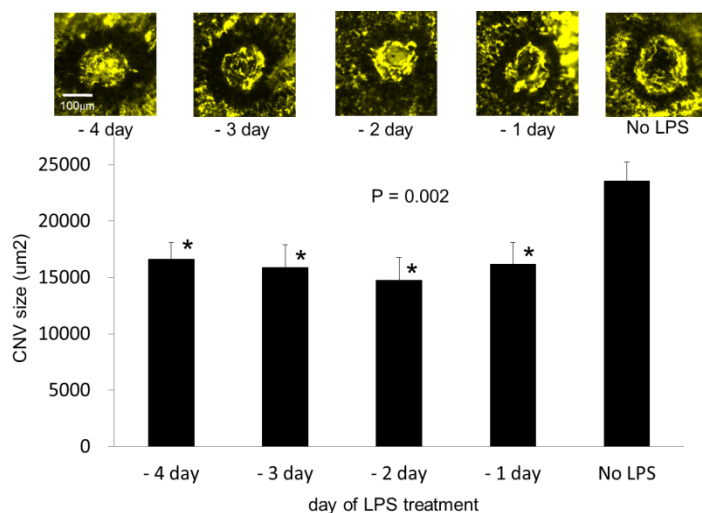


図 11. 低容量 LPS 事前腹腔内投与による脈絡膜新生血管抑制

われわれは、そのメカニズムとして、LPS トレランスが関与しているのではないかと考えた。そこで、LPS トレランスに関与する主要な分子として報告されている抑制性サイトカイン・IL-10 に注目した。その結果、LPS 投与後の血中 IL-10 濃度、腹腔マクロファージ・眼内マクロファージでの IL-10 発現は有意に上昇していることが判った。そして、IL-10 中和抗体の投与により LPS による CNV 縮小効果は抑制され、さらに、LPS 投与マウスからの腹腔マクロファージ移入により、無処置マウスにおいても CNV は抑制されることを見出した。結論として、低用量 LPS の事前投与は、マクロファージの IL-10 発現上昇を介して CNV 形成を抑制すると言える。

これらのことより、眼局所に限らず、全身における何らかの感染の既往は、CNV を生じにくくする可能性があると考えられる。明らかな自覚症状がなくても、subclinical な微生物感染が、全身の免疫系に様々な変化を起こしうることは様々な報告がある。実際に、多くの自己免疫疾患やアレルギー疾患、ある種の悪性腫瘍などは、何らかの微生物感染による免疫系の異常・攪乱が、疾患発症に関係する可能性があると報告されている。

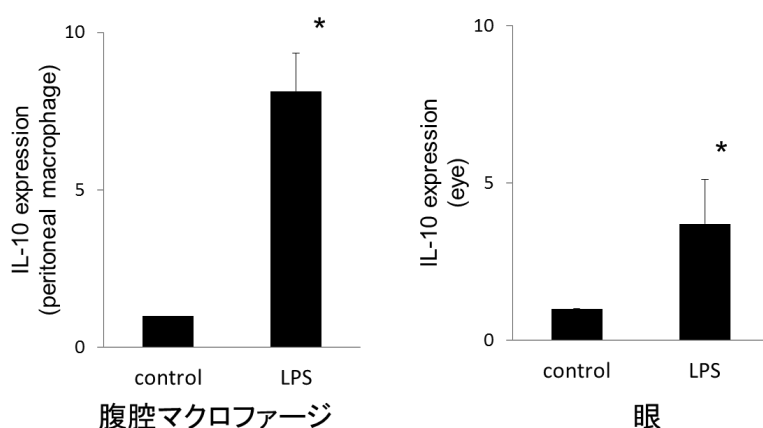


図 12. LPS 腹腔内投与後の腹腔マクロファージ・眼内マクロファージでの IL-10 発現

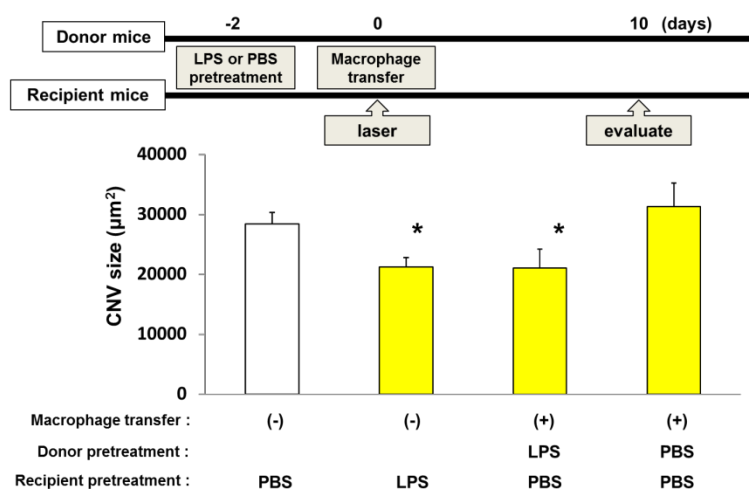


図 13. LPS 投与マウスからの腹腔マクロファージ移入による脈絡膜新生血管抑制

参考文献

1. Suzuki M, Kamei M, Itabe H, Yoneda K, Bando H, Kume N, and Tano Y: Oxidized Phospholipids in the Macula Increased with Age and in Eyes with Age-related Macular Degeneration. *Mol Vis*, 13:772-778, 2007.
2. Kamei M, Yoneda K, Kume N, Suzuki M, Itabe H, Matsuda K, Shimaoka T, Minami M, Yonehara S, Kita T and Kinoshita S: Scavenger Receptors for Oxidized Lipoprotein in Age-related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48:1801-1807, 2007.
3. Suzuki M, Tsujikawa M, Itabe H, Du ZJ, Xie P, Matsumura N, Fu X, Zhang R, Sonoda K, Egashira K, Hazen S, Kamei M. Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration. *J Cell Sci*. 125(10):2407-15, 2012.
4. Xie P, Kamei M, Suzuki M, Matsumura N, Nishida K, Sakimoto S, Sakaguchi H, Nishida K. Suppression and regression of choroidal neovascularization in mice by a novel CCR2 antagonist, INCB3344. *PLoS ONE*, 2011;6(12):e28933.
5. Matsumura N, Kamei M, Tsujikawa M, Suzuki M, Xie P, Nishida K. Low-dose lipopolysaccharide pretreatment suppresses choroidal neovascularization via il-10 induction. *PLoS ONE* 7(7):e39890, 2012.

 Since 1874

平成24年11月21日

平成24年度 次世代医療機器評価指標作成事業 再生医療審査WG

海外におけるヒトES細胞の臨床応用とその規制

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
佐藤 陽治

本発表で述べられている見解は発表者の私見であって、国立医薬品食品衛生研究所または厚生労働省の現在の公式な見解とは限りません

臨床におけるヒトES細胞加工製品の品質・安全性

<一般論>
ES細胞を用いた再生医療・細胞治療の問題

- ES細胞はヒトの胚を壊して取り出したものからつくる⇒「**倫理的問題**」
- ES細胞は他人由来の細胞 ⇒「**拒絶反応**」の問題
- ES細胞は移植後に「**がん化**」する可能性がある
- ES細胞は「**クローン技術**」が応用可能な点も注意
- 目的とする細胞種への「**効率的な分化誘導方法の開発**が必要」

ES細胞を実際に再生医療・細胞治療に使うには、これらの問題を克服する必要がある

2008年4月10日 第45回細胞治療・遺伝子治療諮問委員会 (CTGTAC Meeting #45)



ヒトES細胞による細胞治療
—非臨床安全性と患者のモニタリングに関する留意点—
http://www.fda.gov/ohrtm/dockets/oc/08/briefing/2008-0471B1_1.pdf

- BACKGROUND (背景)**
 - Properties of Human Embryonic Stem Cells (ヒトES細胞の特徴)
- PRODUCT CONSIDERATIONS (製品の留意点)**
- PRECLINICAL CONSIDERATIONS (非臨床における留意点)**
 - Animal Models for Preclinical Testing of hESC-derived Cellular Products (hES細胞製品の非臨床動物モデル)
 - Immunological Tolerance to Cells of Human Origin (ヒト由来細胞に対する免疫学的耐性)
 - Selecting Cell Dose Levels and Starting Cell Populations (投与量と初回投与細胞集団の選択)
 - Selecting Site of Cell Administration (投与部位の選択)
 - Impact of the Host Microenvironment (レシピエントの微小環境の影響)
 - Determining Study Duration (観察期間の設定)
 - Safety Assessment (安全性評価)
- CLINICAL CONSIDERATIONS (臨床における留意点)**
- DRAFT ADVISORY COMMITTEE DISCUSSION QUESTIONS (討議すべき課題)**
 - Inappropriate Differentiation/Tumorigenicity (不適切な分化／造腫瘍性)
 - Characterization of hESC-Derived Cellular Preparations (hES細胞製品の特性評価)
 - Patient Monitoring (患者のモニタリング)

2014年1月14日採択 CAT(先端医療委員会)



幹細胞利用医薬品に関する注意点
Reflection paper on stem cell-based medicinal products
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/02/WC500101692.pdf

- 1. Introduction (background) (背景)**
 - Definition and identification of stem cells (幹細胞の定義と実体)
 - Characteristics of different stem cell types (細胞種の性質の違い)
- 2. Quality considerations (品質に関する留意点)**
 - General (一般的留意点)
 - Starting materials (出発原料)
 - Manufacturing process (製造工程)
 - Process validation (工程評価)
 - Characterisation and quality control (特性評価と品質管理)
 - Identity (同一性)
 - Purity (純度)
 - Potency (力価)
 - Tumourigenicity and genomic stability (造腫瘍性・遺伝的安定性)

2014年1月14日採択 CAT(先端医療委員会)



幹細胞利用医薬品に関する注意点(続き)
Reflection paper on stem cell-based medicinal products
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/02/WC500101692.pdf

- 3. Non-clinical considerations (非臨床での留意点)**
 - Animal models (動物モデル)
 - Biodistribution and niche (体内分布と微小環境)
 - Tumourigenicity (造腫瘍性)
 - Differentiation in vivo (体内での分化)
 - Immune rejection and persistence (免疫学的な拒絶と耐性)
- 4. Clinical considerations (臨床での留意点)**
 - Pharmacodynamics (薬力学, 作用機序)
 - Pharmacokinetics (薬物動態学, 体内動態)
 - Dose finding studies (用量設定試験)
 - Clinical efficacy (臨床的有效性)
 - Clinical safety (臨床的安全性)
 - Pharmacovigilance (ファーマコビジランス)

ヒトES細胞の海外での臨床利用の現状

CNN.com
First U.S. stem cells transplanted into spinal cord
By Miriam Falco, CNN Medical News Managing Editor
January 23, 2010 11:30 a.m. EST

ATLANTA, Georgia (CNN) – For the first time in the United States, stem cells have been directly injected into the spinal cord of a patient, researchers announced Thursday.

Doctors injected stem cells from 8-week-old fetal tissue into the spine of a man in his early 60s who has advanced ALS, or amyotrophic lateral sclerosis. It was part of a clinical trial designed to determine whether it is safe to inject stem cells into the spinal cord and whether the cells themselves are safe.

ALS is a fatal neurodegenerative disease that causes the deterioration of specific nerve cells in the brain and spinal cord called motor neurons, which control muscle movement. About 30,000 Americans have ALS at any given time, according to the ALS Association.

There is no cure for ALS, which is better known as Lou Gehrig's disease, named after the New York Yankees' first baseman and Hall of Famer who retired from baseball in the 1930s after being diagnosed with the disease.

Stem cells like these were injected into the spine of an ALS patient.

2010年1月 ヒトES細胞由来のオリゴデンドロサイトによる筋萎縮性側索硬化症(ALS)治療の臨床試験開始(米国Geron社)

第1 相臨床試験計画

- オープンラベル
- 投与部位: T3-T10 領域
- 投与細胞数: 2×10^6 個
- 損傷後 7-14 日目の投与
- タクロリムスによる一時的な免疫抑制 (60日目には離脱)

- 一次エンドポイント: 安全性
- 二次エンドポイント: 有効性 (ASIA Sensory Score, Lower Extremity Motor Score)
- MRIスキャンも実施
- 5年間は定期的通院で、続く9年間は電話でのフォローアップの予定

臨床試験中間報告(2011年10月11日 Geron社発表)

- 投与された4名に関する安全性データ(投与後最短30日、最長1年間の時点)
- 術中・術後の合併症無し
- 投与又はGRNOPC1と関連する有害事象なし
- タクロリムスと関連するマイルドな有害事象は数件
- MRIによれば、脊髄中の損傷部位における豪細胞の兆候は無し
- 予期しない神経学的変化は無し
- GRNOPC1に対する免疫反応の兆候も無し

⇒ このあと、2011年11月に経済的理由で中止

The Washington Post NATIONAL
Corrections Energy & Environment Health & Science Higher Education National Security On Faith On Leadership Innovations Blogs & Columns

Printed at 08:30 AM ET, 10/14/2011
First patients treated in new human embryonic stem cell study
By Rick Orloff

Researchers at UCLA have treated the first two patients in the second government-authorized attempt to evaluate a therapy created using human embryonic stem cells in the United States.

A team led by **Steven Schwartz**, at UCLA administered about 50,000 cells Tuesday into one eye of a volunteer suffering from Stargardt Macular Dystrophy, a progressive form of blindness that usually begins in childhood, and another with Dry Age-Related Macular Degeneration, the leading cause of blindness in the developed world. **Advanced Cell Technology**, which is sponsoring the study, announced Thursday.

ヒトES細胞由来の網膜色素上皮細胞による網膜疾患治療の臨床試験開始(米国Advanced Cell Technology社)

www.thelancet.com Published online January 23, 2012 DOI:10.1016/S0140-6736(12)60028-2

Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report

Steven D Schwartz, Jean-Pierre Hubschman, Gad Hejblum, Valentina Franco-Cardenas, Carolyn K Pan, Rosaleen M Ostrick, Edmund Mickunas, Roger Gay, Irina Klimanskaya, Robert Lanza

Summary

Background It has been 13 years since the discovery of human embryonic stem cells (hESCs). Our report provides the first description of hESC-derived cells transplanted into human patients.

Methods We started two prospective clinical studies to establish the safety and tolerability of subretinal transplantation of hESC-derived retinal pigment epithelium (RPE) in patients with Stargardt's macular dystrophy and dry age-related macular degeneration—the leading cause of blindness in the developed world. Preoperative and postoperative ophthalmic examinations included visual acuity, fluorescein angiography, optical coherence tomography, and visual field testing. These studies are registered with ClinicalTrials.gov, numbers NCT01345006 and NCT01344993.

Findings Controlled hESC differentiation resulted in greater than 99% pure RPE. The cells displayed typical RPE behaviour and integrated into the host RPE layer forming mature quiescent monolayers after transplantation in animals. The stage of differentiation substantially affected attachment and survival of the cells in vitro after clinical formulation. Lightly pigmented cells attached and spread in a substantially greater proportion (>90%) than more darkly pigmented cells after culture. After surgery, structural evidence confirmed cells had attached and continued to persist during our study. We did not identify signs of hyperproliferation, abnormal growth, or immune mediated transplant rejection in either patient during the first 4 months. Although there is little agreement between investigators on visual endpoints in patients with low vision, it is encouraging that during the observation period neither patient lost vision. Best corrected visual acuity improved from hand motions to 20/500 (and improved from 0 to 5 letters on the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) visual acuity chart) in the study eye of the patient with Stargardt's macular dystrophy, and vision also seemed to improve in the patient with dry age-related macular degeneration (from 21 ETDRS letters to 28).

Interpretation The hESC-derived RPE cells showed no signs of hyperproliferation, tumorigenicity, ectopic tissue formation, or apparent rejection after 4 months. The future therapeutic goal will be to treat patients earlier in the disease processes, potentially increasing the likelihood of photoreceptor and central visual rescue.

Funding Advanced Cell Technology.

The New York Times

Stem Cell Treatment for Eye Diseases Shows Promise

By ANDREW POLLACK
Published: January 23, 2012

LOS ANGELES — A treatment for eye diseases that is derived from human embryonic stem cells might have improved the vision of two patients, bolstering the beleaguered field, researchers reported Monday.

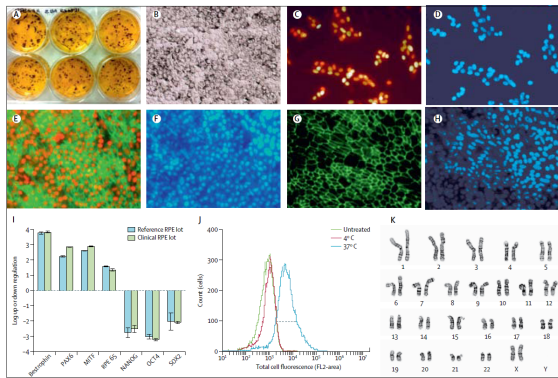
The report, published online in the medical journal The Lancet, is the first to describe the effect on patients of a therapy involving human embryonic stem cells.

The paper comes two months after the Geron Corporation cast a pall over the field by abruptly halting the world's first clinical trial based on embryonic stem cells aimed at treating spinal cord injury. Geron

Monica Aronow/The New York Times
Dr. Steven Schwartz, a retina specialist at the University of California, Los Angeles, conducted the trial with two patients.

http://ny.people.com/2012/01/23/embryonic-stem-cells-successfully-used-in-the-treatment-of-blindness/
#axzz10vU0295c

ヒトES細胞由来の網膜色素上皮細胞による網膜疾患治療臨床試験中間報告(米国Advanced Cell Technology社, 2012年1月)



SUPPLEMENTARY APPENDIX

Table 3 RPE Cell Characterization and Safety Testing

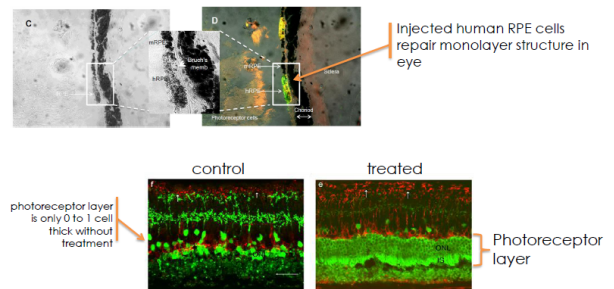
Test	Specification	Lot 0211-B1A
Sterility	Negative	Negative
Mycoplasma	Negative	Negative
Cell density	1-2 million viable cells/mL (post dilution)	2×10^6 viable cells/mL
Cell viability	Final harvest: > 85%	99%
	Post-thaw: >70%	95%
Morphology	Confluent, cobblestone epithelium, medium pigmentation	Pass
Karyotype	46, XX, normal	46, XX, normal
DNA fingerprinting	Conforms with hESC MCB	Conforms
hRPE mRNA for: <i>BEST-1</i> , <i>RPE-65</i> , <i>PAX6</i> , <i>MITF</i>	Up-regulated by a minimum of 1 log ₁₀ compared to hESC	RPE-65 1.32 PAX6 2.80 MITF 2.89 BEST-1 3.81
hESC mRNA for: <i>OCT-4</i> , <i>NANOG</i> , <i>SOX-2</i>	Down-regulated compared to hESC (log ₁₀): <i>OCT-4</i> ≤ -2.13 <i>NANOG</i> ≤ -1.95 <i>SOX-2</i> ≤ -0.63	OCT-4 -3.18 NANOG -2.49 SOX-2 -2.07

SUPPLEMENTARY APPENDIX

Table 3 RPE Cell Characterization and Safety Testing (続き)

Test	Specification	Lot 0211-B1A
Maturity by bestrophin staining	> 70% staining	71%
Purity by immunostaining	> 95% PAX6 and/or MITF	100%
	> 95% PAX6 and/or bestrophin	100%
	> 95% ZO-1	100%
hESC protein markers	< 2 cells staining with OCT-4 and AP in 9 million cells examined	0
Residual murine DNA	Negative	Negative
Murine viruses by MAP	Negative	Negative
Retroviruses by <i>Mus dunali</i> co-cultivation	Negative	Negative
Ecotropic murine viruses	Negative	Negative
Endotoxin	< 0.50 EU/mL	0.312 EU/mL
Potency by phagocytosis	Positive	Positive

Preclinical - Examples



<http://www.advancedcell.com/documents/0000/0423/act-corporate-presentation-mesa-meeting---october-2012.pdf>

Preclinical Survival in the Subretinal Space of NIH-III Mice

Survival Time (weeks)	Total Number of Animals	Number of Animals with Human Cells Found in the Eye	% of Animal with Human Cells Surviving in the Eye
4	26	26	100%
8	19	19	100%
12	28	28	100%
36-40	52	48	92%

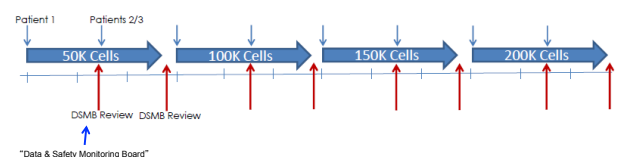
No tumours in animals injected with 5×10^4 RPE cells spiked with either 0.01%, 0.1%, or 1% undifferentiated hESCs

Phase I – Clinical Trial Design

SMD and dry AMD Trials approved in U.S., SMD Trial approved in U.K.

12 Patients / trial
ascending dosages of 50K, 100K, 150K and 200K cells.

Regular Monitoring - including high definition imaging of retina



<http://www.advancedcell.com/documents/0000/0423/act-corporate-presentation-mesa-meeting---october-2012.pdf>

Preliminary Results

No Adverse Events

No signs of hyperproliferation, abnormal growth, rejection or retinal detachment.

Persistence of cells

Anatomical evidence of hESC-RPE survival and engraftment.

Increased pigmentation within the bed of the transplant.

Impact on Acuity

Recorded functional visual improvements in both patients.

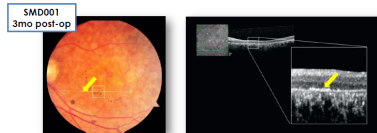
<http://www.advancedcell.com/documents/0000/0423/act-corporate-presentation-mesa-meeting--october-2012.pdf>

Absence of teratoma formation

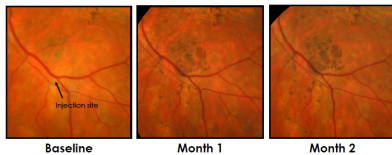
- Spectral domain optical coherence tomography
スペクトラルドメイン光干渉断層撮影
- High resolution digital fundus photography
高分析能デジタル眼底撮影
- Autofluorescence imaging
自家蛍光イメージング
- Fluorescein angiography
蛍光眼底血管造影

www.thelancet.com Published online January 23, 2012 DOI:10.1016/S0140-6736(12)60028-2

Preliminary Results - Structural



Engraftment and Survival: SD-OCT image collected at month 3 show survival and engraftment of RPE



SD-OCT confirms RPE engraftment adjacent Bruch's membrane.

<http://www.advancedcell.com/documents/0000/0423/act-corporate-presentation-mesa-meeting--october-2012.pdf>

Preliminary Results - Functional

Visual Acuity Measurements

- SMD Patient: BCVA improved from hand motions to 20/800 and improved from 0 to 5 letters on the ETDRS visual acuity chart
- Dry AMD Patient: Vision improved in the patient with dry age-related macular degeneration (21 ETDRS letters to 28)

14 month Follow-up:

- Visual acuity gains remain relatively stable for both patients
- SMD Patient continues to show improvement.

U.K. SMD01 Patient (at 9 month follow-up)

- ETDRS: Improved from 5 letters to 10 letters, and stable
- Subjective: Reports significantly improved ability to read text on TV

<http://www.advancedcell.com/documents/0000/0423/act-corporate-presentation-mesa-meeting--october-2012.pdf>

追1)
その後の臨床成績

Current Safety Profile

9 SMD Patients Treated (as of 27 October 2012)

3 patients (50K cells cohort) treated at UCLA – US Trial
3 patients (50K cells cohort) treated at Moorfields Eye – UK Trial
2 patient (100K cells cohort) treated at Wills Eye – US Trial
1 patient (100K cells cohort) treated at Moorfields Eye – UK Trial

No reports of any adverse events or complications due to cells per se

- No evidence of inflammation or infiltration
- No evidence of ectopic tissue formation
- No evidence of retinal detachment

4 dry AMD Patients Treated (as of 27 October 2012)

3 patients (50K cells cohort) treated at UCLA – US Trial
1 patient (100K cells cohort) treated at Wills Eye – US Trial

No reports of any adverse events or complications due to cells per se

- No evidence of inflammation or infiltration
- No evidence of ectopic tissue formation
- No evidence of retinal detachment

<http://www.advancedcell.com/documents/0000/0423/act-corporate-presentation-mesa-meeting--october-2012.pdf>

CGH 法を用いた造腫瘍性試験について

国立成育医療研究センター

梅澤 明弘

はじめに

細胞・組織加工医薬品の形質転換を検証する手段として造腫瘍性試験がある。形質転換がどの程度であり、それが再生医療の受益者である患者の利益と不利益のバランスを考慮に入れた場合に、許容できるかどうかは個々の事象として判断することになる。もちろん、その際に、患者に承諾（インフォームド・コンセント）を得ることは不可欠であるが、医師が実際の判断をする際に大きな役割を果たすことには違いない。現時点までに、培養した細胞を移植することで、細胞を移植された患者に腫瘍が発生したという報告はない。これは、樹状細胞移植、皮膚線維芽細胞移植、間葉系細胞移植、骨髄間質細胞移植、軟骨細胞移植、角膜への上皮細胞移植を問わず、癌化の報告はない。移植する細胞を培養することのない骨髄移植および臍帯血移植において、ドナー細胞が白血病化したという報告はあるものの、その頻度が決して高くないことから造血幹細胞移植は、変わらぬ高い評価を受けている。前述した「細胞培養が、癌化への一歩を進むこと」と「現実に行われている細胞移植にて癌化が報告されていないこと」は矛盾する内容であるが、培養過程によるリスクを正確に捉え、再生医療・細胞移植を進めることが肝要となる。

移植されるべき間葉系細胞の検証は、後の医療評価の際に重要な意味をもつ。特に安全性に関して、かなりなレベルまで要求される。基本的にいずれの検証（バリデーション）も産業界、特に検査業務を担う企業、が受け持つことが効率を考えても有効である。「ヒト細胞は培養過程で癌化するか？生体内に戻した後に癌化するか？」という細胞移植にかかわる問題が間葉系幹細胞にも当てはまる。培養細胞における形質転換でみられる、具体的な変化は教科書レベルで記載されている。これは、個体における癌が、培養細胞で検討することが盛んであった 1980 年代前半における癌遺伝子研究による。また、形質転換という言葉は、培養細胞における癌化と理解してください。培養細胞の形質転換では、表にあげる変化がみられる。特に、免疫不全動物への培養細胞の移植は、形質転換の生体におけるアッセイでも最も大事である。免疫不全動物は、ヌードマウスを使用することになるものの、NOD/SCID または NOD/SCID/IL-2 受容体 γ 欠損マウス（NOG マウス）にする必要があるかどうかのコンセンサスは得られ

ていない。移植する場所は、皮下が一般的であるが、各臓器に移植することも可能である。また、腫瘍化過程にテロメラーゼ活性の出現、つまり hTERT 遺伝子発現は必要不可欠である。hTERT 遺伝子の発現が必要でない場合も確認されているが、hTERT 遺伝子が腫瘍化過程の第一歩であることは間違いないことより、将来的には細胞評価の必須な項目になることはあり得る。

近年、幹細胞を応用した再生医療は実現化に向け動き始めている。米国ではヒト ES 細胞製剤を用いた臨床試験が開始され、2010 年 10 月 11 日、Geron 社が ES 細胞由来のオリゴデンドロサイト前駆細胞製剤「GRNOPC-1」の臨床試験を脊髄損傷の患者を対象に開始した（翌年経営上の理由で撤退）。2012 年 1 月 23 日、Advanced Cell Technology 社は、2011 年に始めた ES 細胞により作製した網膜細胞を用いて加齢黄斑変性症およびスタグダード病の視力を回復させることに成功したという研究成果を、イギリスの医学誌 Lancet に発表した¹⁾。我が国でも現在臨床研究計画が進められている。ヒト幹細胞を臨床応用する上で安全性の確保は、重要な課題の一つである。特に長期間培養を継続する際、それに伴う細胞の形質変化、ゲノム構造変化などの有無を調べることは非常に重要である。我々は投与する細胞が形質転換を起こしていないか、腫瘍化していないかを調べるツールとして、従来の核型分析試験よりも少ない日数・低コストで実施可能なアレイ CGH 解析が有用であると考え検証試験を開始した。

1. アレイ CGH 法とは

CGH 法 (Comparative Genomic Hybridization : 比較ゲノムハイブリダイゼーション) は、1992 年に Kallioniemi らが、Science 誌で発表した方法であり²⁾、FISH 法(Flourescence In Situ Hybridization)³⁾を応用し、全染色体を対象として、ゲノム DNA が増幅 (gain)、欠失 (loss) した領域を調べる方法である。アレイ CGH 法は、マイクロアレイと CGH 法を組み合わせることで、ハイスループットに目的遺伝子、ゲノム DNA 領域のコピー数変化の検出を可能にした。特に、高密度マイクロアレイの登場により、染色体上の約 2kb ごとの位置にプローブが配置できるようになり、解像度が格段に向上した。

アレイ CGH 法は、微細ゲノム異常の探索を可能にする技術であり、ゲノムコピー数異常に起因する疾患の病態解明の糸口となる微細ゲノム異常の発見に威力を発揮している。また、既知の染色体異常症やがんの遺伝子・染色体診断にも応用されている。FISH 法や核型分析では発見できない微細な染色体異常を検出することができ、また定量 PCR では 1 回の実験でカバーしきれない網羅性で、全ゲノム領域を解析することができる点がアレイ CGH 最大のメリットである。

2. アレイ CGH 法手順

ここでは、Agilent Technologies 社 Human Genome CGH マイクロアレイを用いた標準的な手順について述べる⁴⁾。解析対象サンプル、比較したい正常コントロールサンプルをそれぞれ用意し、制限酵素 *AluI*、*RsaI* を用いて短いサイズに断片化する。その後ランダムプライマーと Exo-Klenow を用いた反応により、解析対象サンプルを Cyanine-5(Cy5)という赤い蛍光色素でラベル化し、比較したい正常コントロールサンプルを Cyanine-3(Cy3)という緑の蛍光色素でラベル化する。遺伝子領域を中心としたゲノム配列のプローブが網羅的に搭載されているスライドガラス上で、両サンプルの競合的なハイブリダイゼーションを行う。各プローブの蛍光強度を専用スキャナーを用いてスキャンし、Feature Extraction ソフトウェアを用いて蛍光強度を数値に変換し、正規化を行い、対数表示させ染色体の位置ごとに並べ直す。その後、Genomic Workbench ソフトウェアを用いてゲノムコピー数の異常の有無を検出する。実験概要とフローを(図 1)に示す。

3. ゲノムコピー数の異常の検出

Genomic Workbench ソフトウェアでは、ADM-2 (Aberration Detection Method-2)アルゴリズム⁵⁾を用いた解析が推奨されている。ADM-2 は Window 幅が可変で Log_2Ratio の変化が大きい領域を検出できるという特徴を持っている。これは、Homozygous Deletion のように大きな Log_2Ratio の変化が起きていれば 1 プローブでも検出できる高感度アルゴリズムである。Agilent 社は閾値 (Threshold) 6.0 以上の設定を推奨しているが、ADM-2 は変異の幅を大きく検出する傾向があり、使用するアレイフォーマットやサンプルによって最適値の検討が必要である。ゲノムコピー数の重複・欠失をわかりやすく表示させるために、移動平均の可視化が重要である。例えば移動平均 10 pt の場合は、染色体短腕側から 10 プローブの平均値を計算、表示し、次に一つずらした 10 プローブの平均値(2 プローブ目から 11 プローブ目の平均値)、その次に一つずらした 10 プローブの平均値(3 プローブ目から 12 プローブ目の平均値)というように 1 プローブずつ移動した平均値を直線で結ぶ(図 2)。このように可視化することによりゲノム全体のコピー数異常を一目で表現することができる。より客観的な数値データは Aberration Calling として一覧表としてアウトプットされ、遺伝子の情報、コピー数異常の度合、領域の長さなどの情報が付加される。尚、移動平均の値についても ADM-2(Aberration Detection Method-2)アルゴリズム⁵⁾ 同様に使用するアレイフォーマットやサンプルによって最適値の検討が必要である。

4. 正常 DNA(HAPMAP DNA 日本人男性)対骨肉腫 DNA の比較

まず最初に、解析対象サンプルとして骨肉腫のゲノム DNA と、比較したい正常コントロールサンプルとして HAPMAP DNA 日本人男性のゲノム DNA をそれぞれ 500 マイクログラム用い、Agilent 社 SurePrint G3 Human CGH マイクロアレイ 8 x 60K (6 万プローブ搭載) を使用し、既存プロトコルに従い実験を行った。ハイブリダイゼーション後のシグナル強度データの正規化を行った後、ADM-2 (Aberration Detection Method-2) アルゴリズム⁵⁾ Threshold = 10 を用いて、ゲノムコピー数の異常を検出したところ、ゲノム上の 19 領域でコピー数異常が見られた (図 3、移動平均 10 pt の図を示す)。また、それぞれのサンプルについて色素入れ替え検証実験を行った。これはラベル化に用いる蛍光色素を逆転させる実験で、逆転したデータが得られた場合再現性が得られたと判断する。その結果、前述した結果と再現性があるデータが得られた (図 3)。両者の図を重ね合わせると再現性について、よりわかりやすく確認ができる。以上のように、アレイ CGH 法を用いて網羅的にかつ微細なゲノムコピー数異常を検出できることが確認された。

おわりに

現在、培養軟骨細胞の継代数の差による異常の検出と同じ手法で、ES 細胞の継代数とゲノムレベルでの異常蓄積の関係データを取得する計画を進めている。最近の研究では、継代数が増えるにつれてゲノム上のある領域にコピー数異常が見られるという報告がある⁶⁾。培養軟骨細胞の実験・解析で得たノウハウから、幹細胞安全性評価に適したプローブを選別し幹細胞安全性評価用カスタムアレイ作成し、より効率よく高精度にコピー数異常を検出できるシステムを構築したい。特にゲノム上の癌関連遺伝子領域については、高精度のコピー数異常を検出できるシステムが必要である。また、現在の実験手法はマニュアル操作の部分も多く、検査として確立するためにはサンプル調製、ハイブリダイゼーションなどの工程について全自動システムを構築する必要がある。本技術は、幹細胞を応用した再生医療における細胞製剤のゲノム安定性を検証する上で事実上の標準となる。

文献

- 1) Schwartz SD et al., Lancet, 379(9817), 713-20 (2012)
- 2) Kallioniemi A et al., Science, 258(5083), 818-21 (1992)
- 3) Trask BJ, Trends Genet, 7(5), 149-54 (1991)
- 4) 山本俊至, 臨床遺伝に関わる人のためのマイクロアレイ染色体検査, 第 5 章, 診断と治療社 (2012)
- 5) Lipson D et al., J Comput Biol, 13(2), 215-28 (2006)
- 6) Närvä E et al., Nat Biotechnol., 28(4), 371-7 (2010)

表.培養細胞の形質転換でみられる変化

1. 増殖因子依存性の低下
2. 増殖速度の増加
(コロニー状増殖を含む)
3. 形態変化
 - (ア) 小型化
 - (イ) 形が不揃い
 - (ウ) アポトーシス
4. 接触阻止の喪失とパイルアップ
5. 運動性
6. 足場依存性の喪失
 - (ア) 軟寒天コロニー形成
7. 分化能の変化

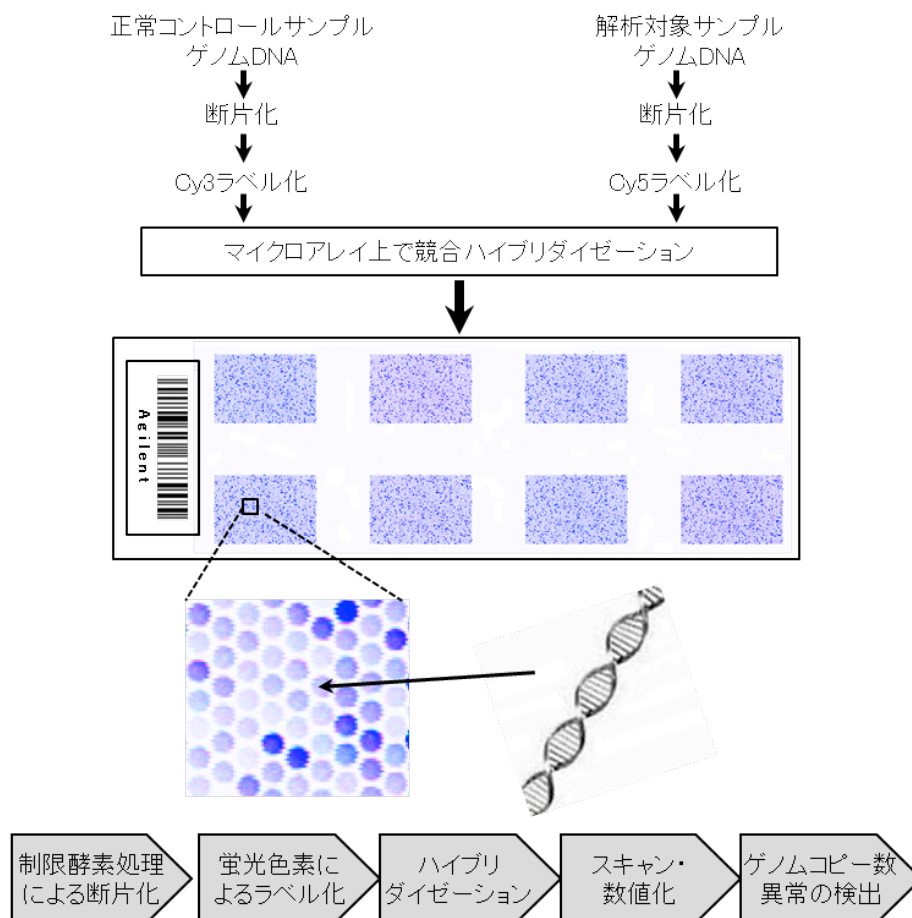


図 1 アレイ CGH 実験概要とフロー

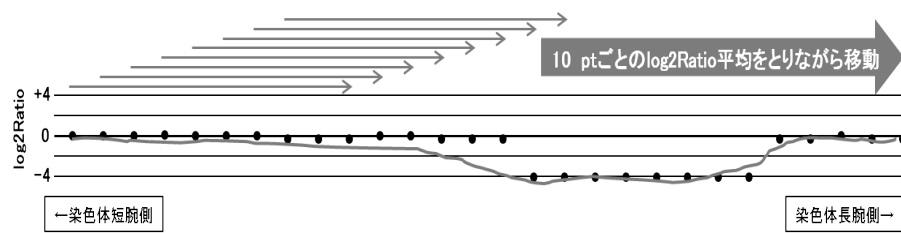


図 2 移動平均(Moving Average) 10pt

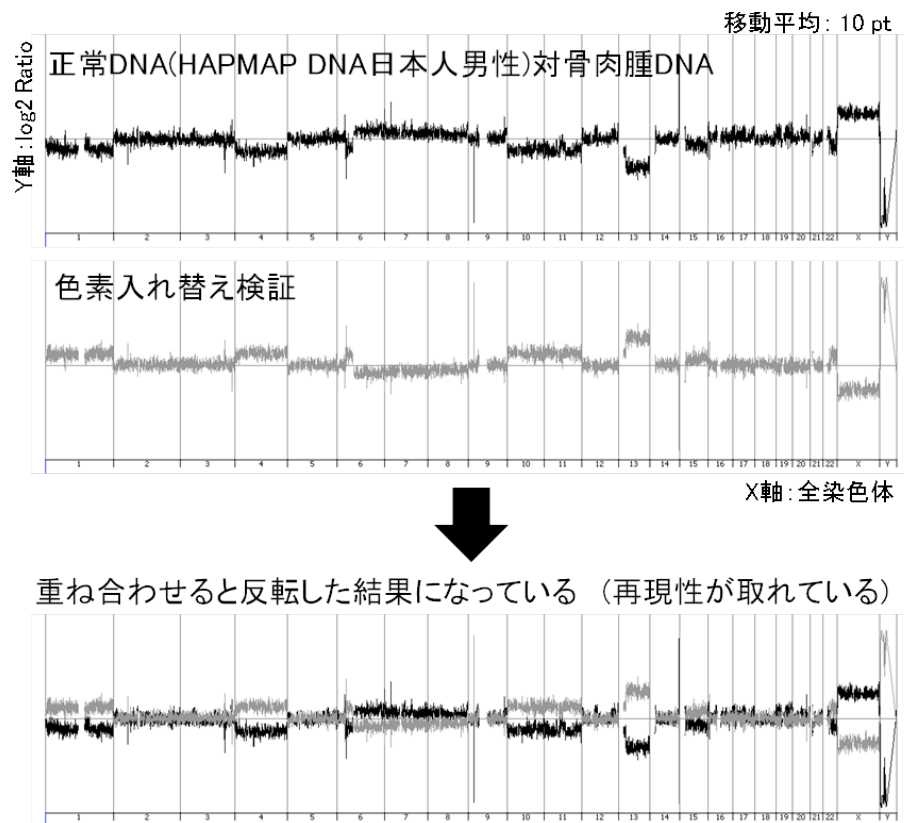


図3 正常DNA(HAPMAP DNA日本人男性)対骨肉腫DNAの比較

細胞シートの造腫瘍性

東京女子医科大学先端生命医科学研究所
大和 雅之

培養細胞の安全性

本稿では、ヒト細胞の安全性、特に造腫瘍性に関して概説する。体性幹細胞、体細胞を対象として、生殖細胞や ES 細胞、iPS 細胞などの多能性幹細胞は対象としない。

細胞自身の安全性については、様々な指針にあるように、感染に関しては必須項目、HTLV (アジア以外では不要である可能性はある)、HIV、HBV、HCV、梅毒は確認すべきだと思います。

議論が分かれる可能性を否定するものではないが、私自身の様々な細胞を扱ってきた経験からは、抗生剤はむしろ積極的に利用すべきではないかと考えている。インターフェロンやエリスロポエチンといったヒトタンパク質を薬剤として遺伝子組換えで生産する細胞、いわゆる細胞基質、たとえば CHO (チャイニーズ・ハムスター卵巣由来株化細胞) といった無限寿命を獲得した細胞株 (セルライン) であれば、相当な回数の継代をクリーンルーム内で行っており、完全に無菌になっているため抗生剤の添加は必要ないと期待できる。むしろ抗生剤存在下で培養した培地からターゲットとなるヒト組み換えタンパク質を精製する際に邪魔になるので入れるべきでないという考え方が一般的である。

もちろん、健常人由来の初代培養でも、体表以外から無菌的に採取した組織から単離した細胞の培養であれば抗生剤が不要である場合もあるものの、口腔粘膜、皮膚、食道、角膜などの体表由来の組織から単離した細胞の場合、必ず汚染していると考えるべきであり、抗生剤の積極的利用が必要である。

他の安全性リスクとして、培地にウシ胎児血清あるいは抗生物質等々が添加されている場合、これらに起因するアレルギーを完全に否定することは不可能である。事前にパッチテストで調べるとしても、パッチテストでは陰性でも移植した後にアレルギー反応が出ることも原理的にはありえるため、完全とはいえない。一方、ウシ胎児血清等を培地へ添加することを止めることができない場合も多々ある。現状では、すべての成分が明らかになっている完全合成培地は一般に高価であり、性能的にもウシ胎児血清添加培地に劣る場合も少なくない。臨床応用にあたっては、培地への添加物のトレーサビリティの確保、記録、必要に応じた公開は重要である。

細胞バンクを構築する場合、保存、輸送に関しては、これまでに様々な経験が世界中にある。細胞生物学者のコンセンサスは、保存そのものは液体窒素温度-196℃で十分だというものである。むしろ凍結、融解の手法、手技が、融解後の細胞の生存率、分化能等々に大きく影響を与える。最近では、電気で動く-150℃のディープフリーザーも市販されており、この温度でも問題がないと考えられる。ほとんどのセルバンクあるいは細胞の販売をしている企業では、ドラ

マイナス温度-79℃で搬送しており、日本国内もしくは日本からアメリカ、日本からヨーロッパ程度の時間であれば、これでまったく問題ないことを確認している。

むしろここで強調したいのは、クロスコンタミネーション（交差汚染）の回避は普通に研究者が考えているよりもはるかに深刻である。クロスコンタミネーションを絶対に回避できる SOP の作成、運用は必須である。この他、大腸菌や真菌などよりもはるかに小さいマイコプラズマの感染が大きな問題となっている。実際、マイコプラズマによる培養施設の汚染が内外の多くの研究機関で観察された。現状では、この 2 つはかなり深刻で、もっと真剣に検討されるべきである。

造腫瘍性試験

造腫瘍性試験に関しては複数の方法論が提案されている。軟寒天培養試験は、正常細胞は接着基質としての足場がなければ増殖できない一方、がん細胞は足場がなくても増殖できることを利用した試験である。細胞接着性を示さず足場として機能しない軟寒天の中で細胞を培養し、増殖した細胞をコロニーとして検出する。たとえば、0.5%の軟寒天に 9,000 個の細胞を非常にスパースに（薄く）播種し、7 日間培養してコロニーができるかを見る。ネガティブコントロールとしては、ヒトの正常二倍体の線維芽細胞などを用いる。ポジティブコントロールには、HeLa などのがん由来ヒト株化細胞を用いる。

培養系を用いない造腫瘍性試験として免疫不全動物への移植も一般におこなわれている。たとえば、 10^7 個の細胞を $200\mu\text{L}$ に懸濁し、ヌードマウスの皮下に移植する。ポジティブコントロールとしてがん由来ヒト株化細胞を用いるが、現実にはすべてのがん由来ヒト株化細胞で腫瘍ができるわけではない。実際、HeLa では腫瘍は形成されず、HeLa S3 という亜株（サブタイプ）が用いられている。WHO は細胞基質に用いる細胞の造腫瘍性試験に関するガイドラインを出しているが、このガイドラインは細胞組織加工製品を対象外としている。

この他、核型解析なども用いられることがあるが、がんの場合と異なりクローナルでない培養細胞集団に対して、ごく少数の細胞のみを検討する方法では検出感度が低すぎてまったく現実的でない。

ヒト細胞での知見

これまでのヒト細胞培養の経験から、ヒト正常二倍体細胞が培養の間に無限分裂寿命を獲得することはほとんど生じないという認識が、ヒト正常二倍体細胞をあつかっている細胞生物学者の間でコンセンサスとして共有されている。逆に、ヒト正常二倍体細胞が培養の間に無限分裂寿命を獲得すると、インパクトファクターの高いいわゆる一流誌に論文が掲載されている。たとえば、ヒト正常二倍体表皮細胞が培養の間にスポンティニアス（自発的）に不死化すなわち無限分裂寿命を獲得したという論文が 1988 年に *Journal of Cell Biology* (JCB) 誌に掲載されている。JCB は分子細胞生物学分野では *Cell* 誌に次いでイ

ンパクトファクターの高い雑誌である。つまり、ヒト正常二倍体細胞がスポンティニクスに無限分裂寿命を獲得することは大変頻度が低いことなので、インパクトファクターの高い雑誌に論文が掲載されるということになっている。

トランスフォームして無限寿命を獲得した後に継代を重ねるうちに、細胞分裂に要する時間（細胞倍加時間）が 50 時間から 21 時間に短縮していると報告されている。この間に、軟寒天の中でコロニーを形成する性質を獲得している。しかし大変興味深いことに、免疫不全動物への皮下移植の結果はネガティブで腫瘍は一切できていません。分子細胞生物学的には、無限分裂寿命を獲得して無限回継代ができる（不死化）ようになるということと、造腫瘍性の獲得は同義でないことがすでに明らかになっている。造腫瘍性の獲得は、不死化の後にさらに複数の遺伝子変異の蓄積が必要である。さらに腫瘍が悪性化するためには、さらに多くの変異が必要で、1 個や 2 個の遺伝子が壊れたからといって、悪性のがんができるわけではない。

この細胞株の核型解析の結果は、正常ヒト二倍体（46 本）が最初は 10%、少し欠けている細胞が 90%であったものの、継代を重ねていくと 72 本から 88 本になるものが 100%となっており、転座などの染色体の異常も観察されているにもかかわらず造腫瘍性は獲得されていない。

世界で最初に培養細胞を用いた再生医療のヒト臨床応用をおこなったのは、ハワード・グリーンである。グリーンらは 1975 年に、彼自身が樹立したマウスの胎仔由来線維芽細胞株である 3T3 細胞とヒト正常二倍体表皮細胞を共培養すると、ヒト表皮細胞が増殖し、移植に供することができる重層扁平上皮様の組織が培養系で作れることを報告した。グリーンらは 1980 年に熱傷の患者に対して患者自身の細胞を用いて作製した培養表皮の移植による治療をおこなった。その治療成績は *New England Journal of Medicine*（以下 NEJM）誌に 1984 年に掲載されている。この論文の共著者であるキャロリン・コンプトンという皮膚科の医師が、約 20 年後、2003 年に *Lancet* 誌にフォローアップの論文を出している。コンプトンはこの治療を受けた数 10 症例の患者の熱傷部位および正常部位から皮膚生検をおこない、表皮細胞、真皮線維芽細胞それぞれのテロメア長を検討した。正常部位では、いずれもテロメア長が約 8,000bp で、ほぼ均一だったが、熱傷部位の表皮に限って 5,000bp 以下と短くなっていた。すべての症例において、このようなテロメア長の短縮が観察された。健常人細胞のテロメア長は、年齢にしたがって右肩下がりになることはすでによく知られている。

これが何を意味するかというと、おそらく 20 年間、移植した細胞が移植部位で生存していたということ、もう 1 つは、がん化していないということである。がん化していれば、テロメラーゼの活性が出てくるので、テロメアが延びる。すなわちテロメア長が元に戻るか、もしくはもっと長くなるが、そのような延長は 1 症例も観察されていない。

マウスとヒトは違う

80 歳ぐらい、長い人で 120 歳ぐらい生きるヒトと、2 年ぐらいしか生きない

マウスの細胞、特に体細胞は非常に異なっている。DNA 複製時のエラーを修正する酵素が複数あるが、マウスでは一般に生殖細胞のみで発現していて、体細胞での発現は観察されない。一方、ヒトではほとんどすべての体細胞でこの酵素が発現しており、これがヒトでは寿命が長いことと関係があるのではないかという指摘がされている。マウスは、2 年近く飼育しているとほぼ全個体にがんを認めます。一方、ヒトの子どもで、先天性に遺伝子異常がある場合は別だが、そうでない場合は小児のうちに自然にがんを発症する例は非常に少ない。

多くの分子生物学者、細胞生物学者は、遺伝子導入がしやすいとか、トランスジェニック動物が簡単につくれるということで、マウスの細胞を一般に利用しており、継代の間にきわめて高頻度に無限分裂寿命化、不死化を獲得することを経験している。

老化学では、ヘイフリックの限界という概念が広く知られている。いわゆる細胞老化である。ヘイフリック自身は 1961 年頃から、このような観察を論文に書いている。ヘイフリックは、ヒト正常二倍体細胞の膨大な培養実験から、胎児由来であれば 60 回から 70 回くらい、小児由来では 50 回くらい、青年由来では 40 回くらい、中年由来では 30 回くらいで、老人由来では 10 回か 20 回くらいで細胞分裂が止まってしまって、それ以上増えないことを見出した。

ドナーの年齢を変える以外に、個体寿命が異なるカエルやトリ、ネズミなど様々な種の細胞を比較をすると、一般に寿命が長い種由来の細胞は分裂できる回数が多いことがわかる。細胞が分裂できる回数と個体の寿命は、何か関係があるのではないかという指摘をした。当時の学問では、細胞がどうやって分裂した回数を数えているのかが不明であり、否定的な意見もたくさんあったが、1980 年代に入って、染色体の末端構造であるテロメアが分裂する度に短くなることが明らかになる。その分子的理由は、DNA ポリメラーゼが、特定の塩基配列の反復構造であるテロメア領域に結合して、DNA の複製が始まるが、結合部位から下流から DNA の複製が始まるので、結合部位より上流は複製されない。よって、分裂の度にテロメアが短くなる。

これを伸長するために、生殖細胞もしくはがん細胞では、テロメラーゼという酵素が発現しており、テロメアの短縮が生じない。テロメラーゼは RNA とタンパクの複合体だが、タンパク部分の DNA を入れ、人工的に外来性の遺伝子でテロメラーゼ活性を出させると、正常細胞でもテロメアが伸長して、ヘイフリックの限界が延びることまでわかっている。現在ではヘイフリックの限界は、このように分子的に説明されている。

ヒト細胞の無限寿命化には、SV40 やラージ T 抗原、EB ウイルスなどの外来遺伝子を入れることが必要である。あるいは、ホルボールエステル等の化学的刺激が必要であり、上記のとおり、スポンティーニウスな無限寿命化はほとんど見られない。

さらに重要なことは、無限寿命化、つまり何回でも継代できるような状態になるということは、がん化の第一歩でしかない。「がん化」という表現を使うためには、無限分裂寿命を獲得した後に、さらに多数の変異が必要であり、さらにがんが悪性化するためには、もっと多くの変異が必要で、1 個や 2 個の遺伝子が壊れたり変わったりしたからといって、悪性のがんができるわけではない。

これまでに薬事承認を受けた細胞・組織加工製品は、免疫不全動物への移植、軟寒天コロニー試験、核型分析などの造腫瘍性試験はほとんどされていない。ヌードマウスや **SCID** マウスに移植した場合も、短期間フォローアップしているだけで、製品の機能が出るかどうかを調べる試験であり、造腫瘍性試験ではない。