

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。

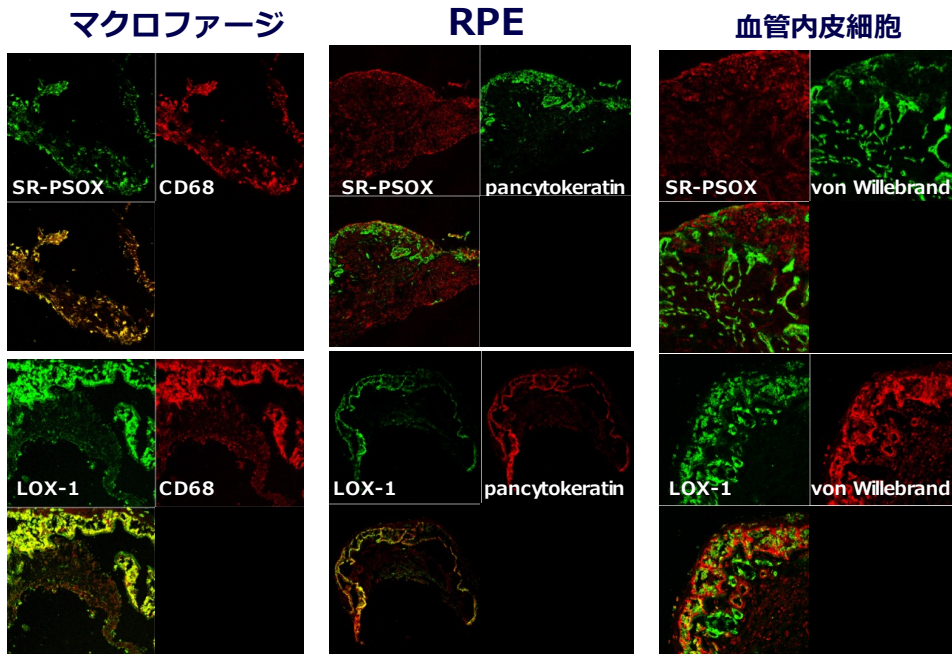


図 1. 加齢性黄斑変性病巣における、酸化リポ蛋白に対するスカベンジャーレセプターの発現

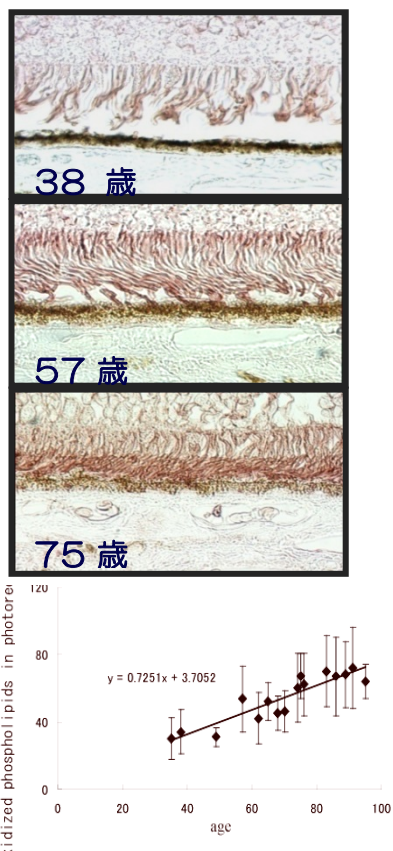


図 2. ヒト網膜内酸化リン脂質

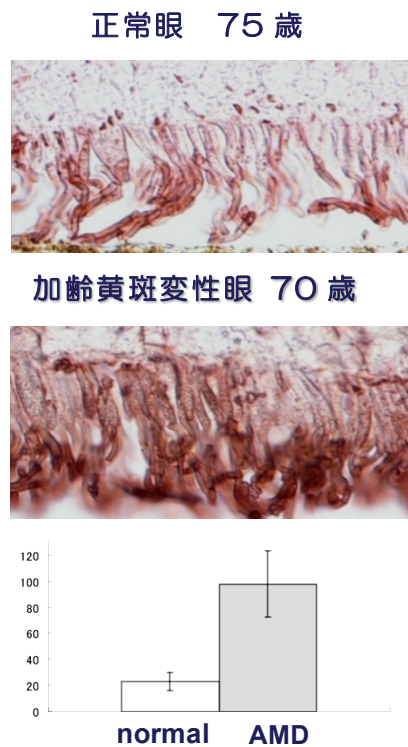


図 3 正常眼と加齢黄斑変性眼における網膜内酸化リン脂質の比較

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)。

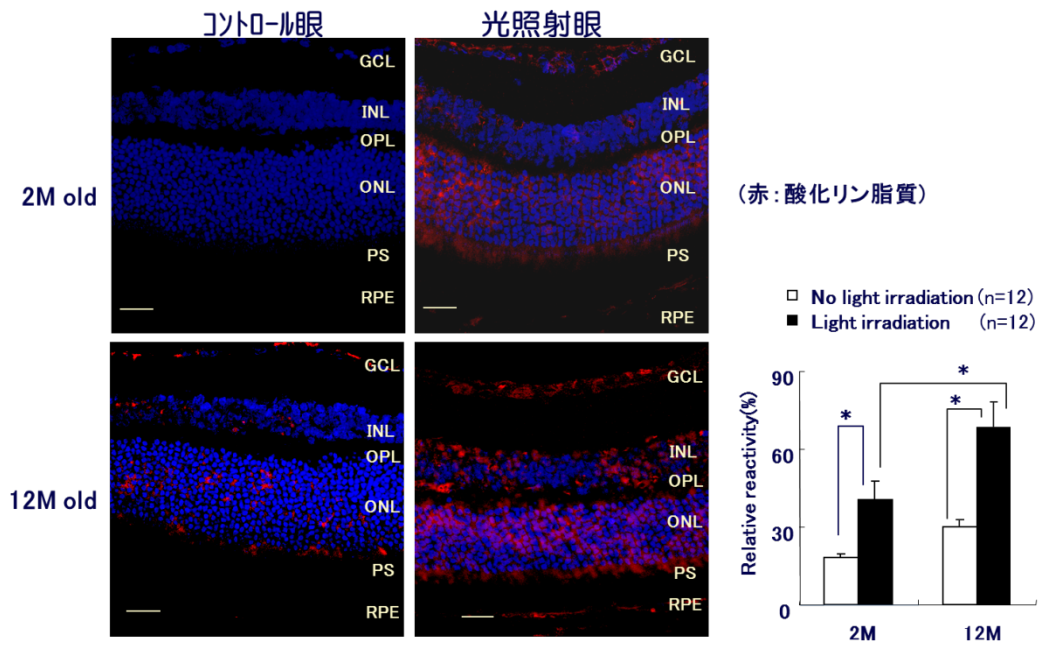


図4. 光照射によるマウス網膜内の酸化リン脂質

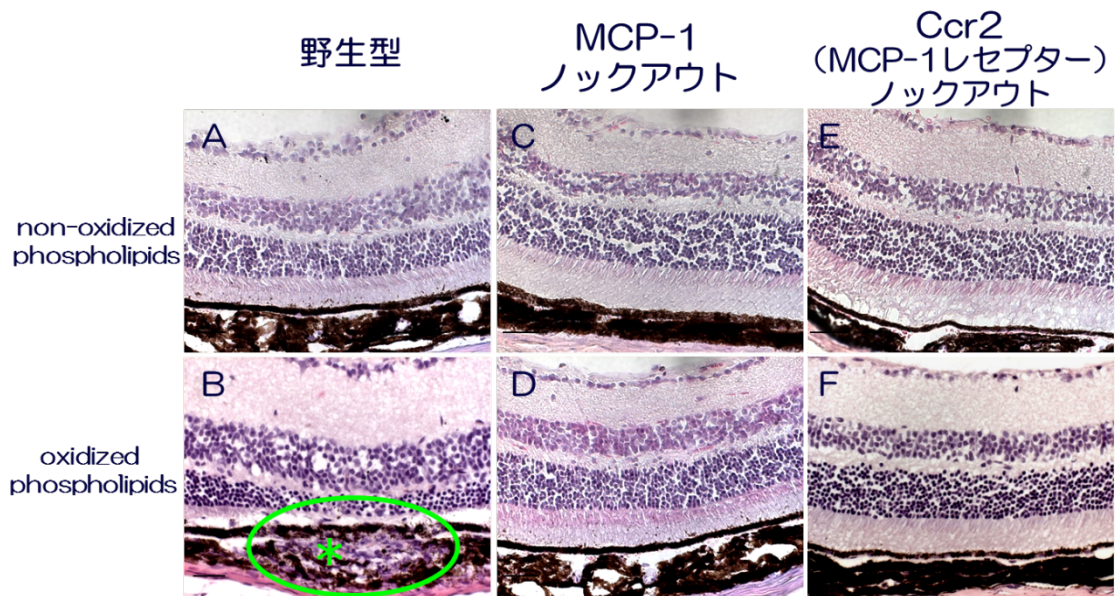


図5. 網膜下酸化リン脂質投与による脈絡膜新生血管の誘導

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)。

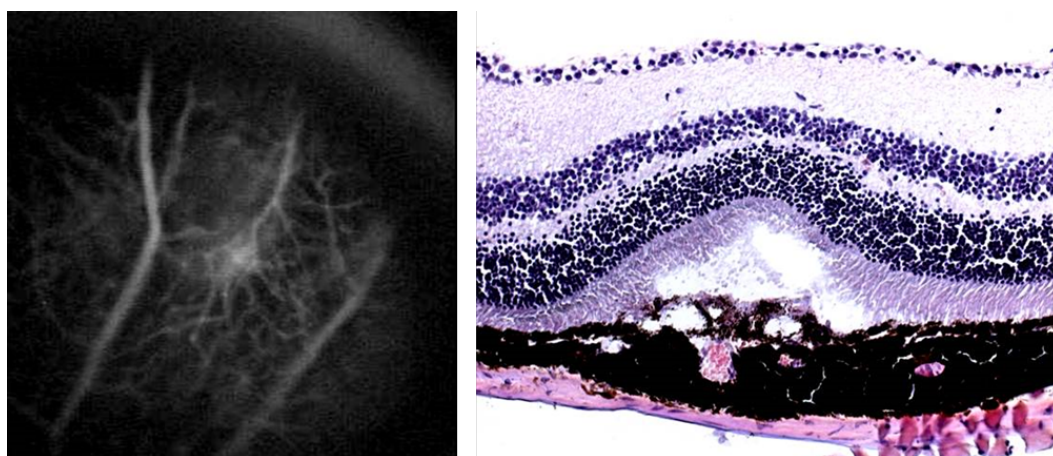
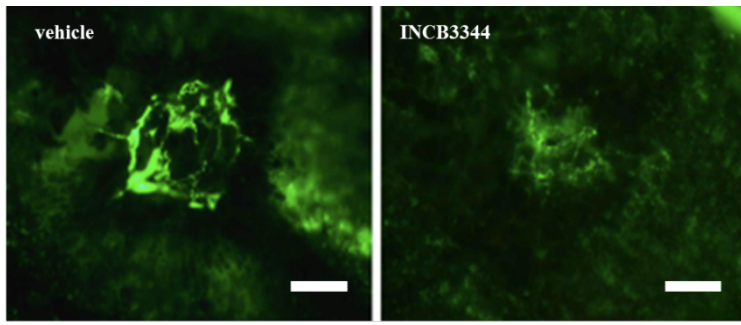


図 6. 照度長期間光照射による脈絡膜新生血管誘導

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; 100 μ m

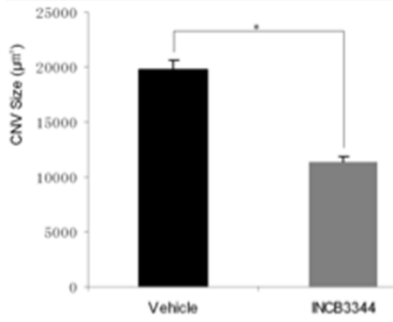


図 7. CCR2 の阻害剤による脈絡膜新生血管抑制

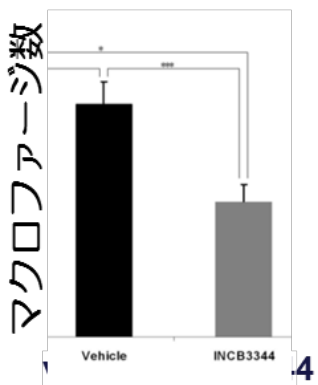
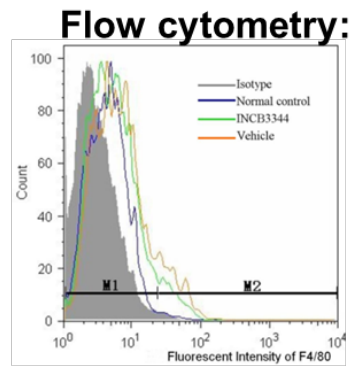
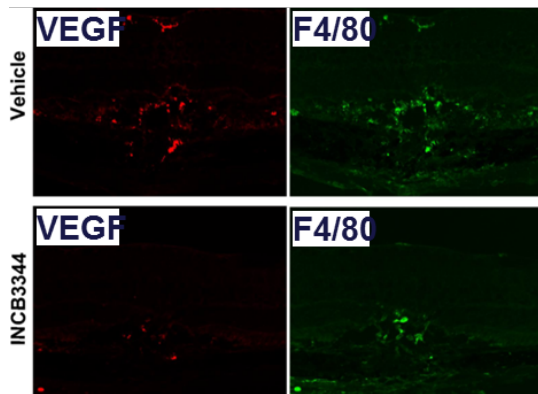


図 8. CCR2 の阻害剤によるマクロファージ集積抑制、VEGF 発現抑制

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。

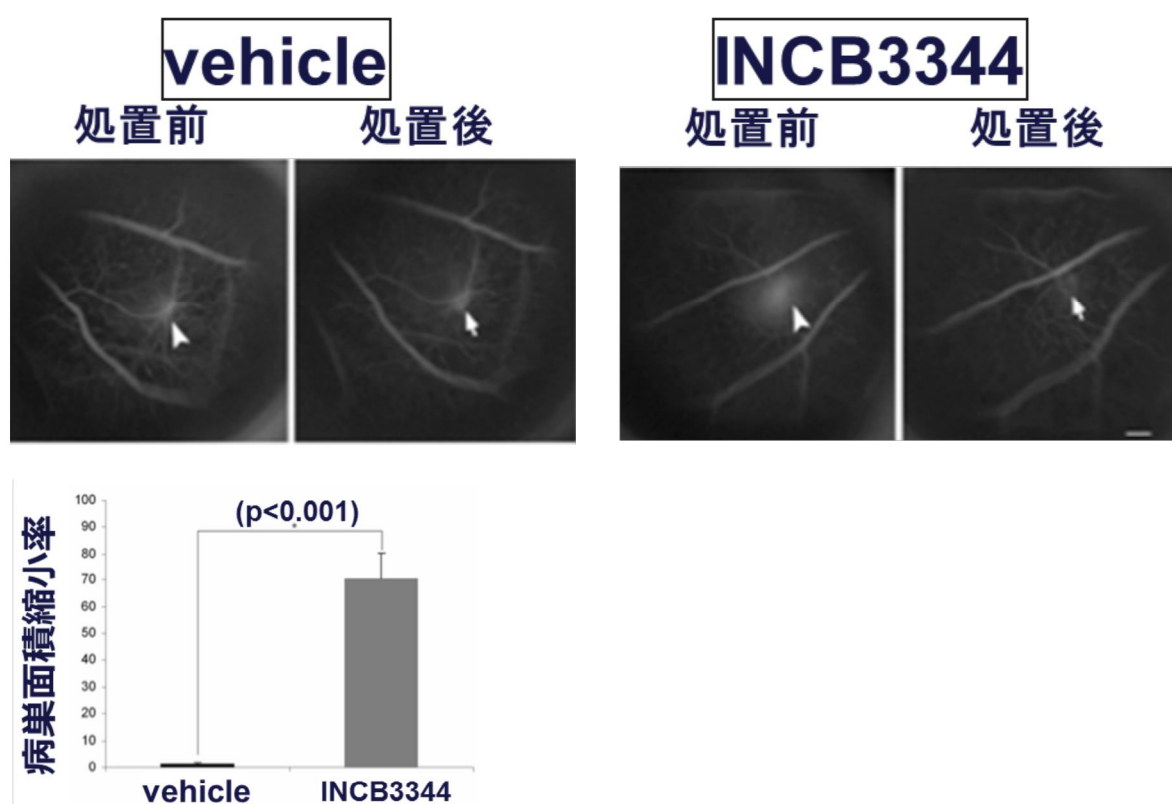


図9.

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)。

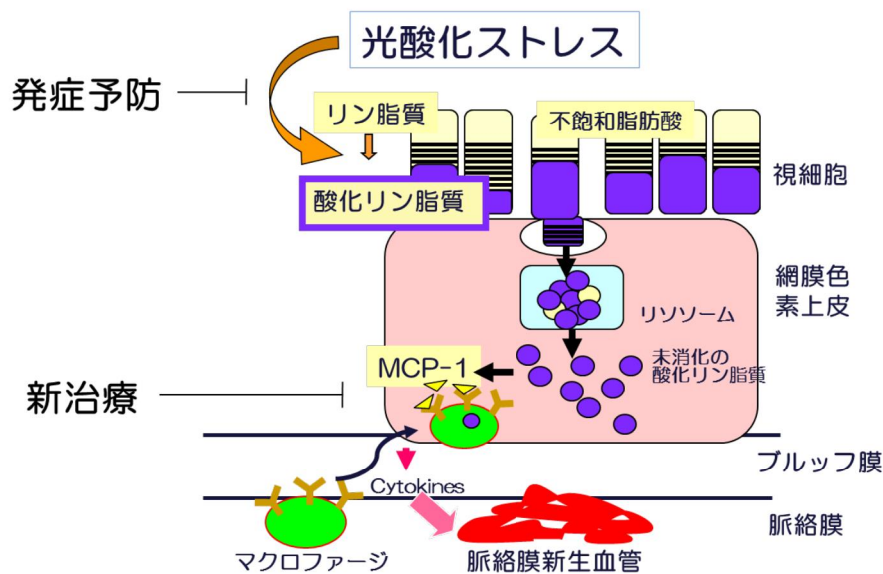


図 10. 発症メカニズムに基づく根治療法の開発

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)。

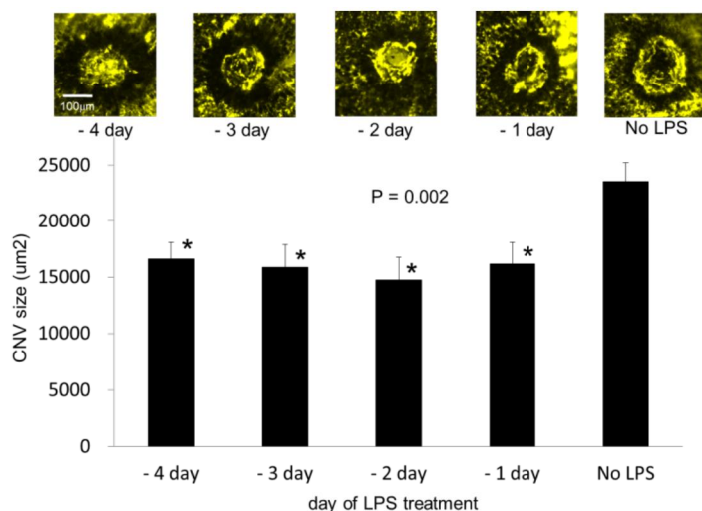


図 11. 低容量 LPS 事前腹腔内投与による脈絡膜新生血管抑制

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して報告されている。

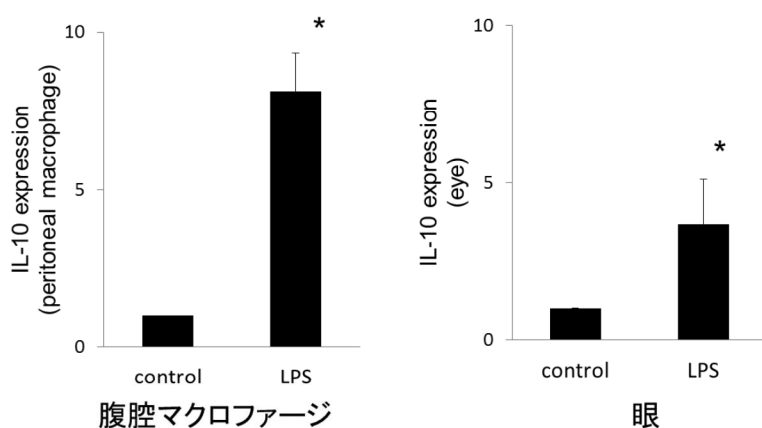


図 12. LPS 腹腔内投与後の腹腔マクロファージ・眼内マクロファージでの IL-10 発現

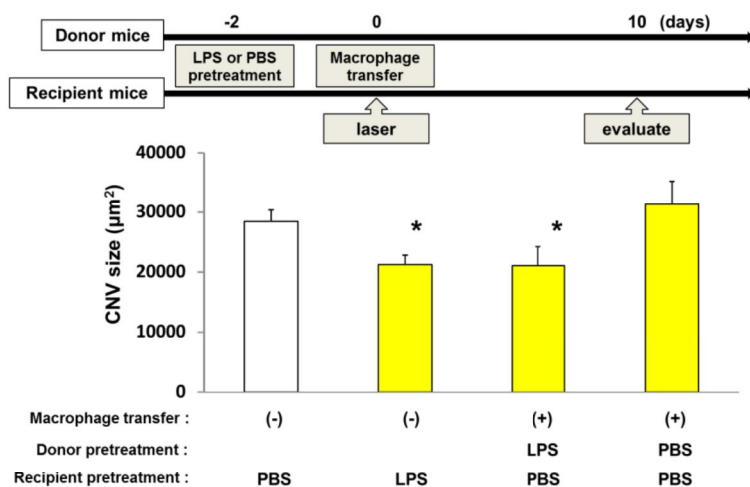



図 13. LPS 投与マウスからの腹腔マクロファージ移入による脈絡膜新生血管抑制

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.




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だとは限りません




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/ohrtms/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 (レシビ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)



2011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)**
 - 1.1. Definition and identification of stem cells (幹細胞の定義と実体)
 - 1.2. 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)**
 - 2.1. General (一般的留意点)
 - 2.2. Starting materials (出発原料)
 - 2.3. Manufacturing process (製造工程)
 - 2.4. Process validation (工程評価)
 - 2.5. Characterisation and quality control (特性評価と品質管理)
 - 2.5.1. Identity (同一性)
 - 2.5.2. Purity (純度)
 - 2.5.3. Potency (力価)
 - 2.5.4. Tumourigenicity and genomic stability (造腫瘍性・遺伝的安定性)




2011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)**
 - 3.1. Animal models (動物モデル)
 - 3.2. Biodistribution and niche (体内分布と微小環境)
 - 3.3. Tumourigenicity (造腫瘍性)
 - 3.4. Differentiation in vivo (体内での分化)
 - 3.5. Immune rejection and persistence (免疫学的な拒絶と耐性)
- 4. Clinical considerations (臨床での留意点)**
 - 4.1. Pharmacodynamics (薬力学, 作用機序)
 - 4.2. Pharmacokinetics (薬物動態学, 体内動態)
 - 4.3. Dose finding studies (用量設定試験)
 - 4.4. Clinical efficacy (臨床的有効性)
 - 4.5. Clinical safety (臨床的安全性)
 - 4.6. Pharmacovigilance (ファーマコビジランス)



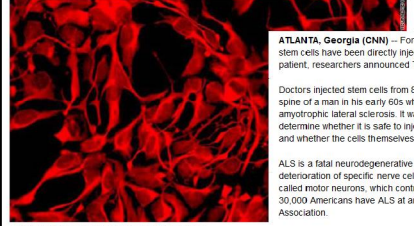
ヒトES細胞の海外での臨床利用の現状



CNN.com

First U.S. stem cells transplanted into spinal cord

By Miriam Falco, CNN Medical News Managing Editor
January 23, 2011 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.

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: 2×10⁶ 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

Correctives Energy & Environment Health & Science Higher Education National Security On Faith On Leadership/Innovations Single Columns

Posted at 08:28 AM ET, 07/14/2011

First patients treated in new human embryonic stem cell study

By Steve Delaney



Researchers 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)



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. <http://saypeople.com/2012/01/23/embryonic-stem-cells-successfully-used-in-the-treatment-of-blindness/>



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)

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, God Hoffwall, Valentina Franco-Carmona, Carolyn Pfen, Rosalynn M Ostroick, Edmund Mickelson, Roger Goy, Inna Kimonovskaya, 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 NCT01345906 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 20/300 (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 process, potentially increasing the likelihood of photoreceptor and central vision rescue.

Funding Advanced Cell Technology.

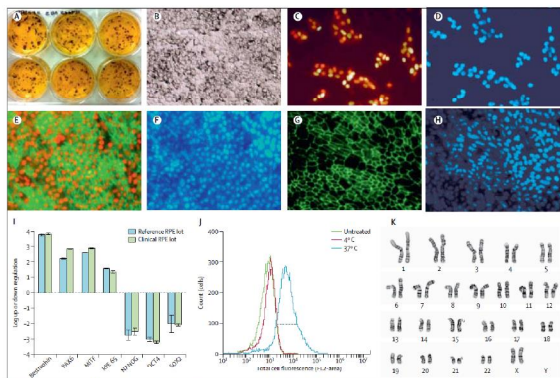


Figure 2 Characterization of RPE generated from hESC/iPSC cells
 A six-well plate with pigmented patches of RPE formed in differentiating culture of embryoid bodies (A) and assessment of molecular markers in thawed and formed RPE (B-H). (B) Hoffman modulation contrast microphotography of 3-week-old RPE after formation showing that the confluent cobblestone monolayer with medium pigmentation has been established. (C) RT-PCR (negative) for *MITF* and *PAX6* (green). (D) DAPI corresponding to *MITF*/*PAX6*. (E) Bar graph showing up-regulation of RPE markers and down-regulation of hESC markers in the formed RPE compared with a reference hESC. (F) Flow cytometry histogram showing phagocytosis of PK6 bio-particles by hESC-RPE at 37°C and at 4°C (control). (G) Normal female (46,XX) karyotype of the clinical RPE. *MITF* and *PAX6* (C, D) were assessed in overnight cultures of freshly formed cells, and biotinylation and ZO-1 immunostaining was done on 3-week-old cultures. Quantitative approach to chemical testing is done with standard methods with the percentage of positive stained cells normalized to the number of DAPI stained nuclei inspected. Assessment of RPE purity and the extent of differentiation were based on the percentage of biotinylation, *PAX6*, *ZO-1*, and *MITF* stained cells. RPE=retinal pigment epithelium; hESC=human embryonic stem cells.

SUPPLEMENTARY APPENDIX

Table 3 RPE Cell Characterization and Safety Testing

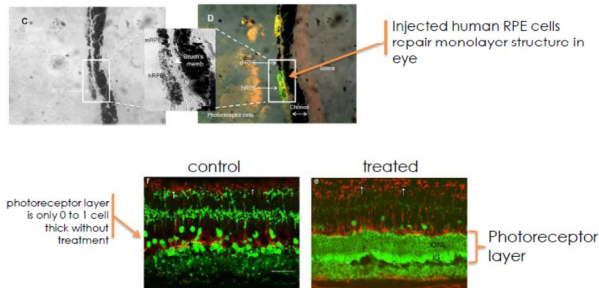
Test	Specification	Lot 0211-B1A
Stability	Negative	Negative
Mycoplasma	Negative	Negative
Cell density	1-2 million viable cells/mL (post dilution)	2 x 10 ⁶ viable cells/mL
Cell viability	Final harvest: > 85%	99%
	Post-flaw: >70%	95%
Morphology	Confluent, cobblestone epithelium, medium pigmentation	Pass
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 ₂ compared to hESC	<i>RPE-65</i> 1.32 <i>PAX6</i> 2.80 <i>MITF</i> 2.89 <i>BEST 1</i> 3.81
hESC mRNA for: <i>OCT4</i> , <i>NANOG</i> , <i>SOX-2</i>	Down-regulated compared to hESC (log ₂): <i>OCT4</i> ≤ -2.13 <i>NANOG</i> ≤ -1.95 <i>SOX-2</i> ≤ -0.63	<i>OCT-4</i> -3.18 <i>NANOG</i> -2.49 <i>SOX-2</i> -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>

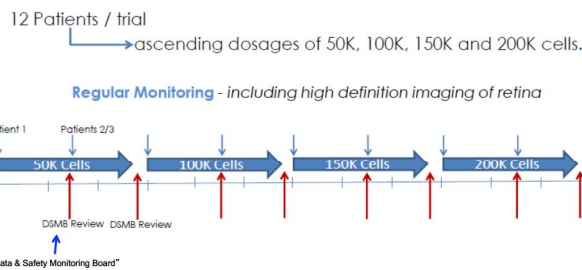
Preclinical Survival in the Subretinal Space of NIH-III Mice

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 5-10x10⁴ 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.



<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.

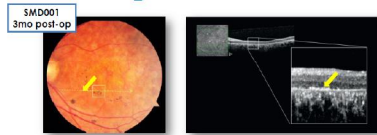
<http://www.advancedcell.com/documents/0000/0423/act-corporate-presentation-mesa-meeting-october-2012.pdf>

Absence of teratoma formation

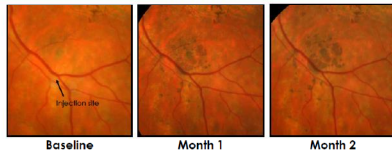
- Spectral domain optical coherence tomography
スペクトラルドメイン光干渉断層撮影
- High resolution digital fundus photography
高分析能デジタル眼底撮影
- Autofluorescence imaging
自家蛍光イメージング
- Fluorescein angiography
蛍光眼底血管造影

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

AGI
Cell Technology

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「現実に施行さ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