

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20307

研究課題名(和文) 培養ヒト角膜内皮細胞を用いた角膜再生医療に関する研究

研究課題名(英文) Corneal regenerative treatment using cultured human corneal endothelial cells

研究代表者

吉田 絢子 (Junko, Yoshida)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20770465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：水疱性角膜症は角膜の混濁により失明する疾患で、有効治療は角膜移植しかない。その反面、国内ではドナー不足が深刻な問題となっている。そこで培養して増殖させたヒト角膜内皮細胞を用いて人工角膜内皮グラフトを作りドナー角膜の代替として用いる研究を行った。作成した人工角膜内皮グラフトをウサギの水疱性角膜症モデルに移植したところ、治療群では対照群に比して統計的に有意に角膜の厚みを改善させることが証明できた。改善すべき点はあるものの、角膜内皮細胞を用いた再生医療の成果と考える。

研究成果の概要(英文)：Bullous keratopathy is caused by corneal endothelial dysfunction, which is a major cause of corneal endothelial keratoplasty. Although keratoplasty is effective to treat bullous keratopathy, the shortness of donor cornea has been a problem in Japan. The purpose of this study was to seek a new treatment which can alter traditional keratoplasty. We developed artificial corneal endothelial graft, on which human cultured human corneal cells, and transplanted them into rabbit eyes. The transplanted artificial graft improved corneal edema compared to controls. Although some improvement is needed, the first step of regenerative medicine using corneal endothelial cells was successful.

研究分野：眼科

キーワード：再生医療 角膜内皮移植 水疱性角膜症

### 1. 研究開始当初の背景

角膜混濁による失明者は世界で 160 万人にのぼると推測されており、角膜疾患は白内障、緑内障、加齢黄斑変性に次ぐ世界の主要な失明原因となっている。角膜混濁の原因として感染などによる癩痕性混濁のほか、角膜内皮機能不全による水疱性角膜症などがあげられる。これらの角膜疾患の唯一の治療法は角膜移植である。角膜移植の方法として、角膜全層を取り換える全層角膜移植が古典的かつ一般的であるが、近年の技術の進歩により、DSAEK (Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty) と呼ばれる角膜内皮移植術が水疱性角膜症の治療として第一選択となった。角膜移植が角膜混濁の治療法として幅広く行われるようになった一方で、その問題点もある。拒絶反応、国内ドナー高年齢化による角膜の質の低下などもあげられるが、一番の問題点はドナー角膜不足である。世界的にドナー角膜は不足しており、特に日本国内においては毎年 2 千人以上が待機しているとされる。

ドナー角膜不足の解消、安定した質の移植用角膜確保の目的で角膜再生医療が注目されている。中でも本研究のグループは角膜内皮に注目して研究を進めてきていた。ヒト角膜内皮細胞は *in vivo* では増殖せず、*in vitro* でも培養・増殖させるのが非常に難しい。東大角膜グループではヒト角膜内皮細胞の増殖培養に成功し報告している。この方法で培養増殖されたヒト角膜内皮細胞を水疱性角膜症といった角膜内皮機能不全の治療に利用するため、本研究代表者は農業生物資源研究所の竹澤氏らとともに、培養ヒト角膜内皮細胞を移植するための専用キャリアを開発した。このキャリアを CV-CERT (collagen vitrigel for corneal endothelial regenerative treatment) と呼ぶ。CV-CERT の特徴として、ブタ由来のアテロコラーゲンを原料に無血清で作られたビトリゲル膜であり生体適合性に優れていること、透明であること、膜透過性が非常に良好であること、角膜形状に沿った半球面形状であること、手術操作のためある程度の強度が保たれていることなどがあげられる。本研究代表者のグループはこのキャリアに培養ヒト角膜内皮細胞を組み合わせ、人工角膜内皮グラフトを作成し、2014 年に報告している。

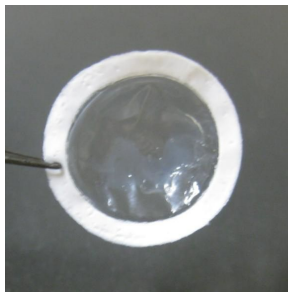


図 1 角膜内皮細胞移植用キャリア CV-CERT の外観。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が作成し 2014 年に報告した人工角膜内皮グラフトの機能評価を行うこと、実際に動物眼に移植することで水疱性角膜症に対する治療効果を判定すること、また培養方法の改善をし、ヒトでの臨床応用が可能となるまでをもっていくことであった。具体的には

- (1) 人工角膜内皮グラフトの機能評価
  - (2) 人工角膜内皮グラフトの動物眼への移植および水疱性角膜症の治療効果の判定
  - (3) 上記結果を踏まえたヒト角膜内皮細胞培養法および動物モデルの改良
  - (4) 臨床応用に向けた準備
- を順に達成することを目標とした。

### 3. 研究の方法

(1) 人工角膜内皮グラフトの機能評価  
角膜内皮のポンプ機能の指標である  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase およびバリア機能の指標である ZO-1 の免疫染色を人工角膜内皮グラフト上の角膜内皮細胞に対して実施する。

- (2) 人工角膜内皮グラフトの動物眼への移植および水疱性角膜症の治療効果の判定

ウサギ眼のデスメ膜を剥離することで水疱性角膜症モデルを作成した。治療群、対照群、無治療群として、それぞれ、人工角膜内皮グラフト移植、CV-CERT 単独移植、および移植なしを実施し、術後 14 日目まで観察し角膜厚を測定した。

- (3) ヒト角膜内皮細胞ミトコンドリア機能の評価

小胞体ストレスである thapsigargin をヒト角膜内皮細胞セルラインに添加し、JC-10 アッセイによるミトコンドリア膜電位の低下を確認した。qRT-PCR を用いて小胞体ストレスマーカー (CHOP, GRP78) およびマイトファジー関連遺伝子 (PINK1, PARK2) の mRNA を測定した。

### 4. 研究成果

(1) 人工角膜内皮グラフトの機能評価  
免疫染色像を図 2 に示す。 $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase および ZO-1 とも染色されたものの細胞膜に沿ったはっきりとした発現は認められず、内皮細胞を継代するにつれ線維芽細胞化していることが考えられた。

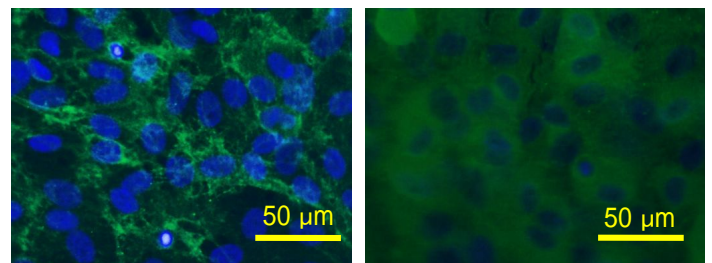


図 2 CV-CERT 上に播種した培養ヒト角膜内皮細胞の、ポンプ機能の指標であり

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (左) およびバリア機能の指標である ZO-1 (右) の染色像。

(2) 人工角膜内皮グラフトの動物眼への移植および水疱性角膜症の治療効果の判定

治療群では術後より 14 日目までかけて角膜浮腫が徐々に改善し透明性が改善したのに対し、対照群および無治療群ではいずれも経過観察中強い角膜浮腫による混濁を生じた。術後 14 日目の平均角膜厚は治療群が 997 μm であったのに対し対照群、無治療群は測定感度限界 (1200 μm) を超えていた。またグラフトに用いた内皮はあらかじめ蛍光染色を施してあり、観察期間終了後、グラフトを摘出してヒト角膜内皮細胞がグラフト全体に残存していることを確認した。このことから、作成した人工角膜内皮グラフトは角膜浮腫を改善させることができるといった。

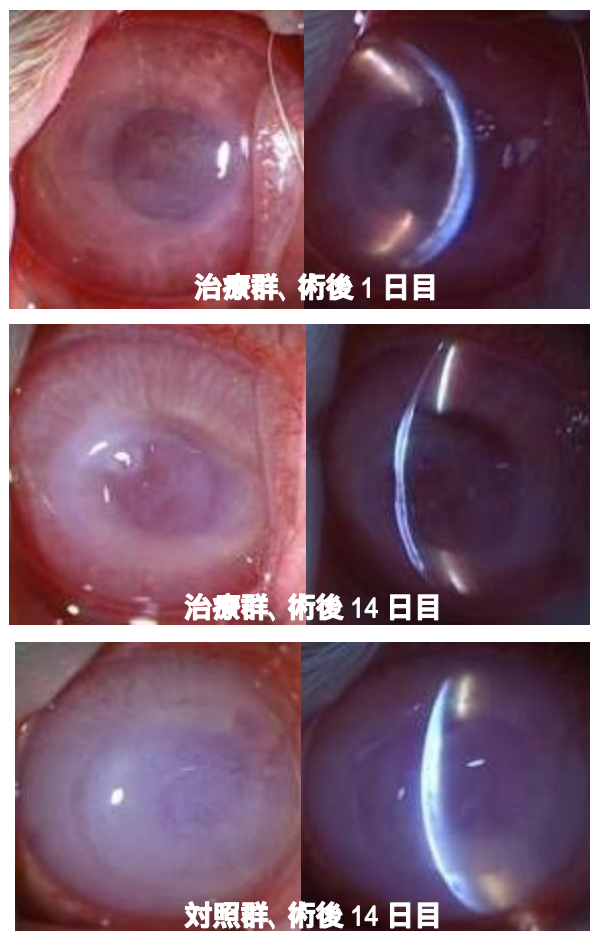


図 3 人工角膜内皮グラフト移植をしたウサギ眼の細隙灯顕微鏡写真。

上) 治療群術後 1 日目、まだ角膜浮腫が残る。  
中) 治療群術後 14 日目、浮腫の改善がみられる。  
下) 対照として内皮細胞の播種されていない CV-CERT 単独で移植したもの。強い角膜浮腫を認める。

(3) ヒト角膜内皮細胞培養法の検討およ

びヒト角膜内皮細胞でのミトコンドリア機能の評価

上記(1)および(2)よりヒト角膜内皮細胞を培養する上での問題点も生じた。まずヒト角膜内皮細胞培養を継続していくことで本来の角膜内皮細胞の形態、機能を保てなくなっていることが考えられた。そのため既報をもとに Rho キナーゼ阻害剤や TGF 阻害剤などを培養液に添加して継代培養を試みたが著明な改善は見られなかった。そのため方針を転換しヒト角膜内皮細胞でのミトコンドリア機能に着目し実験を遂行することとした。ミトコンドリアは骨格筋、脳などに分布することが知られているが、角膜内皮細胞内にも豊富に存在することが知られている。角膜内皮細胞における小胞体ストレスとマイトファジーの詳細について研究した報告はないことからヒト角膜内皮細胞のセルラインを用いた実験を行った。その結果、小胞体ストレスマーカーである CHOP および GRP78、マイトファジー関連遺伝子である PARK2 の増加が確認できた。今後この研究の進展により角膜内皮細胞培養法改良のほか各種疾患の機序解明、治療にも役立つことが期待できる。

#### 引用文献

- Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *British Journal of Ophthalmology*. 2012;96:614-618
- Shima N, Kimoto M, Yamaguchi M, Yamagami S. Increased proliferation and replicative lifespan of isolated human corneal endothelial cells with L-ascorbic acid 2-phosphate. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:8711-8717.
- Yoshida J, Oshikata-Miyazaki A, Yokoo S, et al. Development and evaluation of porcine atelocollagen vitrigel membrane with a spherical curve and transplantable artificial corneal endothelial grafts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Jul 15;55:4975-81.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Yoshida Junko、Yokoo Seiichi、Oshikata-Miyazaki Ayumi、Amano Shiro、Takezawa Toshiaki、Yamagami Satoru. Transplantation of Human Corneal Endothelial Cells Cultured on Bio-Engineered Collagen Vitrigel in a Rabbit Model of Corneal Endothelial Dysfunction. *Current Eye Research*. 査読あり、42 巻、2017、1420-1425、DOI: 10.1080/02713683.2017.1351568

吉田 絢子、臼井 智彦、角膜ジストロフィの新分類、日本医事新報、査読無、4873 巻、2017、55  
吉田 絢子、臼井 智彦、DSAEK 術後管理のコツ、眼科手術、査読無、30 巻、2017、310-313

〔学会発表〕(計 7 件)

Takashi Miyai, T. Toyono, K. Kitamoto, M. Fukushima, J. Yoshida, et.al. Endoplasmic reticulum stress decreases mitochondrial membrane potential and upregulate PARK2 expression in corneal endothelium, ARVO, 2018

吉田 絢子、教育セミナー 角膜移植のコツ、日本眼科手術学会、2018 年

吉田 絢子、藤田 あさひ、豊野 哲也、白川 理香、宮井 尊史、臼井 智彦、全層角膜移植後円錐角膜再発例と非再発例の前眼部 OCT による比較分析、日本臨床眼科学会、2017 年

藤田 あさひ、吉田 絢子、豊野 哲也、白川 理香、宮井 尊史、臼井 智彦、全層角膜移植後円錐角膜再発により急性水腫を起こした症例の前眼部 OCT による検討、日本臨床眼科学会、2017 年

Junko Yoshida, Hiroshi Murata, Rika Shirakawa, Toshihiro Sakisaka, Tetsuya Toyono, Takashi Miyai, Satoru Yagami, Tomohiko Usui, Recurrent keratoconus in eyes after penetrating keratoplasty, ARVO, 2017

Yoshida J, et.al., Postoperative results and analysis of therapeutic penetrating keratoplasty for refractory infectious keratitis, ARVO, 2016

〔図書〕(計 1 件)

本庄 恵、丸林 彩子、メディカ出版、目の病気ビジュアル BOOK、2017、58-69 頁

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 絢子 (YOSHIDA, Junko)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20770465

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

山上 聡 (YAMAGAMI, Satoru)

宮井 尊史 (MIYAI, Takashi)

横尾 誠一 (YOKOO, Seiichi)

竹澤 俊明 (TAKEZAWA, Toshiaki)

押方 歩 (OSHIKATA, Ayumi)