

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)

研究期間：2006 ~ 2008

課題番号： 18390464

研究課題名(和文) 培養ヒト角膜内皮および実質細胞を用いた角膜再生医療の実用化

研究課題名(英文) Realization of corneal regenerative medicine using cultured human corneal endothelial and stromal cells.

研究代表者

天野史郎(AMANO SHIRO)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 80193027

研究成果の概要：40歳以上のドナーから得た角膜内皮細胞においては、高率に染色体異常が発生することがわかった。従ってドナーとしては、40歳以下のできるだけ若いドナーが、望ましいことが示唆された。カルチャーインサートの底からトリプシン EDTA を作用させることで、培養角膜内皮細胞シートを作成した。この細胞シートでは、細胞間に Na-K ATPase の発現が見られ、その細胞密度は 2000/mm² を超えていた。この内皮細胞シートの兎への移植実験では、術後1週間にわたって、移植角膜の透明性が維持され、内皮をつけなかったコントロール群よりも有意に角膜厚が薄く保たれた。もう一つの内皮移植方法として、Descemet's stripping endothelial keratoplasty(DSEK)の術式において、培養角膜内皮細胞を応用する方法を検討した結果では、通常の DSEK の移植片と同等の移植片を培養角膜内皮細胞を用いて作成することが可能であり、in vivo にもいても短期的には、角膜の透明性を維持することができた。培養角膜実質細胞およびその前駆細胞を用いた実験では、ゼラチン上において前駆細胞のほうがより多くの細胞外基質の産生が観察され、兎角膜実質内への移植実験では、前駆細胞を播種したゼラチンでは術後1カ月においてより多くの細胞の残存と細胞外基質の産生が観察され、前駆細胞の角膜実質における再生医療への応用が期待される結果を得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：角膜、再生医療、角膜内皮細胞、角膜実質細胞

1. 研究開始当初の背景

培養細胞を用いた再生医療は、角膜の中でも、最表層にある上皮層をターゲットとした手術が、すでに臨床で行われている。これは、角膜化学外傷、スティーブンスジョンソン症候群、眼類天疱瘡などの、角膜上皮の幹細胞が消失した状態、すなわち角膜上皮幹細胞疲弊症に対して、培養した輪部上皮細胞や口腔粘膜上皮細胞のシートを移植する方法であり、我々の施設を含めて国内のいくつかの施設で長期の安全性、有効性が臨床において検討されつつある。これに対して、角膜の内皮細胞あるいは角膜実質の再生医療は、世界のいずれの国においても、まだ実現されていない。我々のこれまでの成果により、培養ヒト角膜内皮および実質細胞を用いた角膜再生医療は、臨床応用の一手手前まで来ている状態である。今回の研究では、これまでのわれわれの研究成果を踏まえ、培養ヒト角膜内皮および実質細胞を用いた、安全で有効な再生医療を実用化するための、最終的な詰めを行なうことを目的としている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大きく分けて四つあり、第一は、培養ヒト角膜内皮細胞の最適な使用方法、手術術式を検討することである。全層の角膜を採取する方法、マイクロケラトームで厚い角膜フラップを作成しその下の後方角膜実質を採取する方法、深層角膜内皮移植術のように層間剥離の後に後方角膜実質のみを採取する方法、の3つの

術式を検討する。第二は、組織前駆細胞と通常の培養細胞との角膜再生医療における有用性を比較することであり、第三は、培養ヒト角膜内皮および実質細胞の臨床での使用における安全性を確認することである。染色体異常の有無、癌遺伝子の発現の有無などを培養細胞において検討する。第四の目的は、より良好な機能を有する再生角膜を作製するための、ヒト角膜内皮細胞の培養法、播種法を、より洗練する事である。

3. 研究の方法

培養ヒト角膜内皮および実質細胞の臨床での使用における安全性を確認する。まず実験用に輸入したヒト角膜から実体顕微鏡下で上皮層、内皮層、実質の3つに分離し、内皮層と実質をコラゲナーゼ処理し、角膜内皮および実質細胞を取得する。それぞれ、初代培養から継代培養して行き、3代目および6代目のサブコンフルエントの状態にある段階で、分裂期にある細胞の染色体観察を行い、染色体異常の有無を検討した。角膜提供者の年齢をできるだけ若い年齢から80歳代までの幅広くとり、ドナー年齢の染色体異常への影響を検討した。

新しい角膜内皮シートの作成方法として、カルチャーインサートの底からトリプシン EDTA を作用させることで、培養角膜内皮細胞シートを作成した。このシートの *in vitro* , *in vivo* での特性を評価した。

もう一つの角膜内皮移植方法として、最近臨床で行われるようになってきた

Descemet's stripping endothelial keratoplasty(DSEK)の術式において、培養角膜内皮細胞を応用する方法を検討した

角膜実質細胞の組織前駆細胞と通常の培養細胞との角膜再生医療における有用性を比較した。ヒト角膜実質細胞の組織前駆細胞の単離にはニューロスフェア法を用いた。すなわち、実験用に輸入したヒト角膜から実体顕微鏡下で上皮層と内皮層を剥離し、実質のみとする。角膜実質をコラゲナーゼ処理し、角膜実質の単一細胞を取得した。これら単一細胞をDMEM/F12にB27添加物、EGFやbFGFなどの増殖因子、細胞の凝集を防ぐための0.8%メチルセルロースなどを添加した培地に播種し、1週間の浮遊培養を行った。この方法により未分化な組織前駆細胞を含んだ球状細胞塊であるスフェアが得られた。蛍光色素であるDiIで標識した角膜実質細胞のスフェアを多孔性のゼラチンに播種し、これを家兎の実質内に挿入した。術後に細隙灯顕微鏡による観察、組織学的検討を行った。多孔性ゼラチン内への実質細胞の侵入の程度や播種した実質細胞あるいはスフェアの残存の程度を蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

培養人角膜内皮細胞の安全性をチェックする一つの方法として、染色体異常の有無を検討した。その結果、40歳以上のドナーから得た角膜内皮細胞においては、高率に染色体異常が発生することがわかった。以上のパターンとしては、性染色体の異常が、最も多かった。従ってドナーとしては、40歳以下のできるだけ若いドナーが、望ましいことが示唆された。次に培養

角膜内皮細胞の移植方法として、細胞シートとして角膜実質に接着させる方法を検討した。カルチャーインサートの底からトリプシンEDTAを作用させることで、培養角膜内皮細胞シートを作成した。この細胞シートでは、細胞間にNa-K ATPaseの発現が見られ、その細胞密度は2000/mm²を超えていた。摘出した兎角膜から内皮細胞を除去したところにこの内皮細胞シートを接着させてから、もとの兎に移植しなおし術後経過を観察した。術後1週間にわたって、移植角膜の透明性が維持され、内皮をつけなかったコントロール群よりも有意に角膜厚が薄く保たれた。もう一つの内皮移植方法として、DSEKの術式において、培養角膜内皮細胞を応用する方法を検討した。まず家兎角膜から、マイクロケラトームを使用して、厚さ100-150ミクロンの角膜実質フラップを作成した。このフラップを培養皿におき、その上に人角膜内皮細胞を播種して、DSEK用の移植片を作成した。DSEKの術式に準じて、培養角膜内皮細胞をのせた移植片を、家兎角膜内皮面に移植した。その結果、短期的には、角膜の透明性を維持することができた。

培養角膜実質細胞およびその前駆細胞を用いた実験では、ゼラチン上において前駆細胞のほうがより多くの細胞外基質の産生が観察され、兎角膜実質内への移植実験では、前駆細胞を播種したゼラチンでは術後1カ月においてより多くの細胞の残存と細胞外基質の産生が観察され、前駆細胞の角膜実質における再生医療への応用が期待される結果であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Hitani K, Yokoo S, Honda N, Usui T, Yamagami S, Amano S.
Transplantation of a sheet of human corneal endothelial cell in a rabbit model. *Mol Vis* 14:1-9, 2008 査読有
2. Mimura T, Amano S, Yokoo S, Uchida S, Usui T, Yamagami S.
Isolation and distribution of rabbit keratocyte precursors. *Mol Vis* 14:197-203, 2008 査読有
3. Amano S, Shimomura N, Yokoo S, Yamagami S, Araki-Sasaki K.
Decellularizing corneal stroma using N₂ gas. *Mol Vis* 14:878-882, 2008 査読有
4. Miyai T, Maruyama Y, Osakabe Y, Nejima R, Miyata K, Amano S.
Karyotype changes in cultured human corneal endothelial cells. *Mol Vis* 14:942-950, 2008 査読有
5. Yokoo S, Yamagami S, Usui T, Amano S, Araie M. Human corneal epithelial equivalents for ocular surface reconstruction in complete serum free culture system without unknown factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:2438-2443, 2008 査読有
6. Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, Yokoo S, Usui T, Amano S, Mizuki N.
A mouse model of allogeneic corneal endothelial cell transplantation. *Cornea* 27:699-705, 2008 査読有
7. Yokoo S, Yamagami S, Shimada T, Sato T, Usui T, Amano S, Araie M, Hamuro J. A novel isolation technique of progenitor cells in human corneal epithelium using uncoated dishes. *Stem Cells* 26:1743-1748, 2008 査読有
8. Mimura T, Amano S, Yokoo S, Uchida S, Yamagami S, Usui T, Kimura Y, Tabata Y. Tissue engineering of corneal stroma with rabbit fibroblast precursors and gelatin hydrogels. *Mol Vis* 4:1819-28, 2008 査読有
9. Yamagami S, Yokoo S, Mimura T, Araie M, Amano S. Distribution of precursors in human corneal stromal cells and endothelial cells. *Ophthalmology* 114:433-439, 2007 査読有
10. Ono K, Yokoo S, Mimura T, Usui T, Miyata K, Araie M, Yamagami S, Amano S. Autologous transplantation of conjunctival epithelial cells cultured on amniotic membrane in a rabbit model. *Mol Vis* 13:1138-1143, 2007 査読有
11. Mimura T, Yamagami S, Usui T, Yokoo S, Ono K, Honda N, Kaneda A, Sugisaki K, Sayegh RR, Amano S. Preoperative evaluation of cultured human corneal limbal epithelium on amniotic membrane by confocal microscopy. *Curr Eye Res* 32:407-411, 2007 査読有
12. Mimura T, Yamagami S, Honda N, Usui T, Yokoo S, Amano S. Necessary prone position time for human corneal endothelial precursor transplantation in a rabbit endothelial

deficiency model. Curr Eye Res
32:617-623, 2007 査読有

13. Yamagami S, Yokoo S, Amano S,
Ebihara N. Characterization of bone
marrow-derived cells in the substantia
propria of the human conjunctiva.
Invest Ophthalmol Vis Sci
48:4476-4481, 2007 査読有
14. Yamagami S, Ebihara N, Usui T,
Yokoo S, Amano S. Bone
marrow-derived cells in normal
human corneal stroma. Arch
Ophthalmol 124:62-69, 2006 査読有
15. Yokoo S, Yamagami S, Mimura T,
Ono K, Amano S, Saijo H, Mori Y,
Takato T. UV-absorption in human
oral mucosal epithelial sheets
for ocular surface reconstruction.
Ophthalmic Res 38:350-354, 2006 査
読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Amano S, Yamagami S, Usui T,
Yokoo S. Corneal endothelial cell
precursors. International Congress
of Eye Research, Beijing, China,
2008
2. Amano S, Miyai T, Maruyama Y,
Osakabe Y, Nejima R, Miyata K.
Karyotype changes in cultured
human corneal endothelial cells.
World Ophthalmology Congress,
Hong Kong, China, 2008

〔図書〕(計 2 件)

1. 天野史郎：培養角膜内皮細胞移植の現
状．IOL&RS 22:472-475, 2008
2. 天野史郎：角膜内皮における再生医療．

眼科 49:921-926, 2007

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

天野史郎(AMANO SHIRO)

東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：80193027

(2)研究分担者

なし。

(3)連携研究者

山上聡(YAMAGAMI SATORU)

東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10220245

臼井智彦(USUI TOMOHIKO)

東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80282557

杉崎顕史(SUGISAKI AKIFUMI)

東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40361480

