

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15666

研究課題名(和文) 獣医臨床応用を目指した角膜移植の代替となりうる人工角膜の開発

研究課題名(英文) Fabrication of an artificial cornea as a potential alternative to corneal transplantation for veterinary clinical application

研究代表者

田島 一樹 (Tajima, Kazuki)

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：50770393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：北里大学付属動物病院では多くの動物の眼科症例を抱え、角膜疾患は非常に多いです。しかし、イヌやネコにおける角膜疾患は、ヒトでは角膜移植によって乗り切ることができる疾患でも、角膜移植ができずに最悪の場合眼球摘出術が適用される場合もあります。動物において角膜のドナーを確保することは難しく、アイバンク等のインフラ整備も難しい現状があります。そこでこの研究では、再生医療技術である、脱細胞化という手法を応用し、人工角膜を作成することを試みます。人工角膜の透明性維持が現状大きな課題であり、その原因や評価系を樹立することで、透明性を維持した動物用の人工角膜を作成することがこの研究の目的です。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって角膜脱細胞化の手法が確立され、動物にこの人工角膜を応用する第一歩を踏み出すことができました。これにより今まで眼球摘出となっていた難治性角膜疾患の犬や猫に対し、眼球を摘出せずにこの人工角膜を使用可能となる未来が一步現実のものとなった。

研究成果の概要(英文)：Kitasato University Veterinary Hospital has a large number of animal ophthalmology cases, and corneal diseases are very common. Although corneal diseases can be treated by corneal transplantation in humans, in the worst case scenario, a removal of eye ball may be required in dogs and cats because a corneal transplant cannot be performed in veterinary medicine. It is difficult to secure corneal donors in animals, and it is also difficult to establish infrastructure such as eye banks. In this study, we will attempt to create an artificial cornea by applying the technique of decellularization, a regenerative medicine technology. The transparency of the artificial cornea is currently a major issue, and the purpose of this research is to create an artificial cornea for animals that maintains transparency by establishing the causes and an evaluation system for the transparency.

研究分野：再生医療

キーワード：角膜移植 脱細胞化 獣医療 小動物 人工角膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小動物臨床の対象となる犬や猫といった獣医療の臨床現場において、眼球の最外層をなす角膜疾患は非常に多く遭遇する疾患であり、難治性の角膜疾患にも度々遭遇することがある。難治性角膜疾患に対して唯一有効である治療法は角膜移植であり、ヒト医療領域では、そうした疾患に対しては実際に角膜移植を治療として行っている。しかし、ヒト医療領域においてはアイバンク等のインフラが整備されており、移植のハードルが動物より低い。しかしながら、ヒトにおいても国内ではドナーが少なく、輸入角膜に頼った角膜移植術が実施されているという現状もある。そうした中、小動物獣医療領域においては角膜移植適応患者に対し、重度のドナー不足等が原因となり角膜移植がほとんど実施できていない現状がある。

2. 研究の目的

研究代表者は、小動物臨床領域に応用可能な人工角膜の作成を目指した。人工角膜の候補として、生体適合性の高い脱細胞化角膜を応用することをターゲットとした。研究期間を通しての目標は、まずは脱細胞化角膜作製方法を樹立し、その保存方法や細胞の生着を試みることにした。特に脱細胞化については今まで Badylack らが定義した脱細胞化の要件を満たした脱細胞化角膜の報告がなく、この要件を満たした脱細胞化角膜を樹立し、更にこの脱細胞化角膜を用いて、再細胞化の検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

脱細胞化方法の検討として、各種脱細胞化試薬に角膜を浸漬し、試薬の種類、濃度、組み合わせ、暴露時間を検討した。脱細胞化の評価としては、病理組織学的な評価として HE 染色、DAPI 染色を実施した。また、DNA の断片化を確認するため、DNA 抽出を行い、電気泳動法で確認した。さらに、脱細胞化角膜中の残存 DNA 量を測定し、脱細胞化を確認した。また、細胞生着の評価を行うため、犬の角膜細胞(角膜上皮細胞、角膜内皮細胞)の培養方法について検討を行った。培養した犬の角膜の細胞を脱細胞化角膜上で培養し、細胞の生着性について病理学的に評価した。

4. 研究成果

脱細胞化の手法の検討として、いくつかの臓器で報告されている方法の検討が必要であった。肝臓や腎臓といった有血管臓器であれば、門脈や腎動脈等の血管を通して薬剤を注入する手法がよく用いられ、毛細血管を通して薬剤が浸透するため、臓器全体に薬剤がいきわたるため非常に有効な手法である。一方、角膜は無血管組織であるため、臓器で用いられているこの経血管の方法を用いることはできず、浸漬等の技術を応用して脱細胞化を実施する必要があった。しかし、研究代表者は豊富な脱細胞化の経験があり、肝臓、腎臓、心臓、脂肪組織、筋肉、膵臓といった臓器や組織の脱細胞化を実施していた。このノウハウを応用し、角膜の脱細胞化を試みることにした。

角膜において特に経血管法ではなく、浸漬を用いた脱細胞化の方法においては、厚みのある角膜全体において脱細胞化を完全に達成するために時間がかかってしまうことや、角膜実質細胞の脱細胞化が課題であった。角膜実質細胞は角膜実質を構成する非常にタイトなコラーゲン等の細胞外マトリックス内部に存在しており、細胞の破壊はできても、実質からの排泄が課題であった。しかし今回、最適な試薬、時間で脱細胞化することで角膜実質細胞においても脱細胞化を達成することができた。脱細胞化の達成には病理組織学的な検討としての HE 染色はもちろん、核染色である DAPI 染色にて細胞成分の除去を確認したことに加え、DNA 含量や、DNA の断片化を確認することで定義した。このことにより、Badylack らの定義している異物反応や拒絶反応の少ない脱細胞化角膜が作成されたといえる。この樹立した脱細胞化角膜を用いて、以降の実験を実施した。

樹立した脱細胞化角膜を消毒し、再細胞化を試みた。まずは角膜上皮細胞、角膜内皮細胞の再細胞化を試みた。特に角膜内皮細胞は生体内で再生しないことから、再細胞化できれば非常に有用な人工角膜となることから、犬の角膜内皮細胞の再細胞化を試みた。しかし、犬角膜内皮細胞の培養を行っている報告がほとんどなく、まずは犬角膜内皮細胞の培養方法について検討した。犬角膜より角膜内皮細胞を分離し、培養することに成功したが、この細胞の増殖には制限があり、数回継代すると増殖能力が低下してしまうことがわかり、そのことを論文化した(Tajima K et al, Primary cell culture of canine corneal endothelial cells, 2021, Veterinary Ophthalmology)。人で報告のある通り、犬においても角膜内皮細胞の増殖能力には非常に制限があるため、再細胞化についても細胞数の確保が難しかったが、実際に犬角膜内皮細胞の再細胞化を試みた。すると、脱細胞化した角膜に犬角膜内皮細胞生着が確認され、作成した脱細胞化角膜に細胞毒性はなく、細胞生着に有用な足場構造であることが確認された。今後さらにこの脱細胞

化角膜に角膜内皮細胞のみならず、角膜上皮細胞や角膜実質細胞を生着させるモデルを樹立し、詳細な検討を実施していく予定である。それにより当初の目的である移植角膜片に代替可能な人工角膜の作成を目指していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tajima Kazuki, Kuroda Kohei, Otaka Yuya, Kinoshita Rie, Kita Mizuki, Oyamada Toshifumi, Kanai Kazutaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Decellularization of canine kidney for three-dimensional organ regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary World	6. 最初と最後の頁 452～457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14202/vetworld.2020.452-457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tajima Kazuki, Okada Misaki, Kudo Rina, Otaka Yuya, Kita Mizuki, Yamashita Yohei, Kanai Kazutaka	4. 巻 24
2. 論文標題 Primary cell culture of canine corneal endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 447～454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/vop.12924	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田島一樹、工藤莉奈、岡田岬、喜多瑞樹、大高裕也、岡田大輝、山下洋平、金井一享
2. 発表標題 イヌ角膜内皮再生に向けた脱細胞化角膜の再細胞化
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田島一樹、岡田岬、工藤莉奈、喜多瑞樹、大高裕也、岡田大輝、山下洋平、金井一享
2. 発表標題 犬角膜内皮細胞に対するROCK阻害剤の細胞増殖効果
3. 学会等名 日本角膜学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小田愛、田島一樹、工藤莉奈、岡田大輝、大高裕也、喜多瑞樹、山下洋平、金井一享
2. 発表標題 ex vivoにおけるブタ脱細胞化角膜(DC)の再細胞化モデルの開発
3. 学会等名 日本小動物獣医学会(東北地区獣医師大会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 不死化された伴侶動物由来角膜細胞株及びその使用	発明者 田島一樹、松村海波	権利者 学校法人北里研究所
産業財産権の種類、番号 特許、T21008	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関