

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861653

研究課題名(和文) DMEKインジェクターの開発

研究課題名(英文) Manufacture of DMEK injector

研究代表者

山口 昌大 (Yamaguchi, Masahiro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20574700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞密度3000/mm²を超える培養角膜内皮細胞シートを用いて、細胞障害が少ない角膜内皮移植術(DMEK)専用のインジェクターの検討、開発を行った。In vitroで10%、ex vivoで20%の内皮細胞減少率であったDMEKインジェクターを用いて水疱性角膜症ウサギモデルに移植し、術前より機能マーカーのタンパク発現が増強することがわかった。臨床手術に施行し、操作性に問題はなく、手術は合併症を起こすことなく終了した。今後ドナーグラフトのみならず、再生医療分野で培養内皮細胞シート、iPS細胞分化内皮シートを利用した角膜移植が行われる際のインジェクターとして用いることが可能であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Our purpose was to develop and assess DMEK specific injector to reduce corneal endothelial damage with cultured corneal endothelial cell. DMEK injector, with which corneal endothelial cell was reduced 10% in vitro and 20% ex vivo, was used in corneal transplantation in bullous rabbit model. Protein expression of functional marker in cultured corneal cell was reinforce after transplantation. DMEK surgery was performed with injector, in result of non complication. Our results of using DMEK injector with cultured corneal endothelial sheet may help not only for donor graft, but for cultured corneal endothelial cell or iPS cell in clinical application.

研究分野：角膜内皮

キーワード：角膜内皮移植 DMEK 培養角膜内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

日本の移植医療における問題点は、提供者数が少ないことであり、眼科領域においても慢性的なドナー不足に陥っている。また高い生着率を誇る角膜移植においても、移植後拒絶反応を含む移植片の機能不全が慢性的なドナー不足を助長している。

1980年代までは水疱性角膜症に対する治療法は全層角膜移植術(PKP)のみであった。しかし、PKP後の45%は拒絶反応、28%は角膜内皮数減少を生じ、再移植が必要となることが多かった。(Yamagami S, et al. Jpn J Ophthalmol 1994) また、PKP症例の約60%は角膜内皮細胞数減少眼(水疱性角膜症、移植片不全)であった。そこで角膜内皮のみを移植する角膜内皮移植術が1990年代後半より普及し、現在、角膜移植全体の約50%を占めるようになってきている。角膜内皮移植術の主流はDescemet's stripping automated endothelial keratoplasty(DSAEK)である。DSAEKグラフトは角膜実質一部+デスメ膜+角膜内皮で構成され、厚さ150 μ m~250 μ mである。PKPと比較したDSAEKの利点は、術後早期の視力回復、術後の屈折変化が少ない、拒絶反応が低く(8%)、再移植が容易などと報告されている。(Price M O, et al. Ophthalmology. 2009)(Lee W B, et al. Ophthalmology. 2009)一方で、早期の内皮細胞減少(29~61%:6カ月)、術中・術後のシート偏位(1.5~82%)が問題であった。(Price M O, et al. Ophthalmology. 2009)(Lee W B, et al. Ophthalmology. 2009)DSAEKの普及に伴い、移植時に使用するDSAEK専用インジェクターの開発は、術後の角膜内皮数減少抑制に大きく貢献した。(Khor WB, et al. Am J Ophthalmol. 2011)(Kobayashi A, et al. Ophthalmol. 2012)

近年、DSAEKを改良したDescemet's membrane endothelial keratoplasty(DMEK)が注目されている。デスメ膜と角膜内皮のみで構成されるため厚さが20 μ mと薄い。DSAEKと比較して正常構造に近く、術後最高視力の改善、早期の視力回復、拒絶反応が低い(1%)などが報告されている。(Price M O. et al. Ophthalmology. 2009)

DSAEKは術後6ヶ月で最高視力0.6以下の症例が多いのに対し、DMEKはより早期、術後3ヶ月の時点で最高視力0.8以上に改善する症例が多く、より高い視力改善が期待されている。しかし、術式難易度が高く、内皮細胞密度の減少率が高く、グラフト脱落・偏位による再移植率が高い、等の問題点がある。DMEKグラフトは20 μ mと薄く、術中操作性が難しく、手技が煩雑になり内皮減少率が高くなりやすい。手術の確実性を高めるためにDMEK専用のインジェクター作成は必要不可欠であるが、現在まで報告はなく、眼内レンズ(IOL)用のインジェクターを使用している施設が多い。IOLインジェクターは内径3mmの円形筒で、内筒を押すことでIOLが前方に押

し出される。IOLのような弾性硬な物質は容易に操作されるが、内皮シートのように薄く、可塑性のない組織は丸まり、結果として角膜内皮障害を引き起こす。DMEK専用のインジェクターは、可塑性のない組織でも変形することなく挿入し、高い密閉性により前房深度を維持できる装置である必要がある。

我々はヒト培養角膜内皮細胞から内皮シートを作成している。この培養内皮シートを用いて低侵襲なDMEKインジェクター開発を行いたい。ヒト角膜内皮細胞はin vivoで増殖しないが、特殊な培養条件下ではin vitroで増殖することが知られている。(Miyata K, et al. Cornea. 2001)アスコルビン酸2リン酸(Asc-2P)がヒト角膜内皮細胞を顕著に増殖させることを見いだした。(Shima N, Yamaguchi M, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011)また、繊維芽細胞増殖因子(b-FGF)とAsc-2Pの組み合わせが、Asc-2P単独より有意に培養ヒト角膜内皮細胞の増殖を増強し、継代培養を繰り返しても細胞老化せずに角膜内皮細胞の形態を維持して増幅可能であることがわかった。さらにウシ真皮由来の型コラーゲンであるアテロコラーゲンをInsert culture dishに敷き3次元培養を行うと、シャーレ上に培養した内皮細胞に比べて、ポンプ機能のマーカであるNa⁺/K⁺ATPaseが細胞周辺部に強く発現した。以上の検討によって作製した培養ヒト角膜内皮細胞シートは、光学顕微鏡、免疫染色いずれも均一で3000/mm²を超える高密度な細胞シート作製が可能となった。(図1)

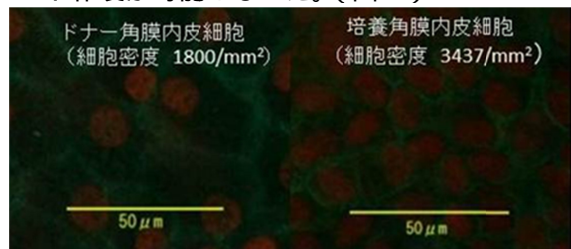


図1 培養内皮細胞シートの細胞密度

近年、奥村らはRhoキナーゼ(Rho-associated protein kinase: ROCK)阻害薬を用いた、点眼および角膜内皮細胞の前房内注入療法による水疱性角膜症患者の臨床治療に成功している。(Okumura N, et al. BJO. 2012) ROCKは低分子量GTP結合蛋白Rhoの標的蛋白質として同定されたセリン-スレオニン蛋白リン酸化酵素であり、平滑筋収縮や細胞の形態変化など様々な生理機能に参与する。ROCK阻害薬はこれらの細胞骨格収縮を抑制することで、細胞遊走などを亢進する。角膜内皮細胞では加えて細胞増殖効果もあると報告されている。ROCK阻害薬の点眼療法は-80℃の冷凍凝固を用いて角膜内皮細胞を剥離した水疱性角膜症患者に点眼することで、残存する健全角膜内皮細胞が増殖、遊走し、脱落部分が被覆、ポンプ機能が働くことによって角膜浮腫が改善する治療である。また培養内皮

細胞懸濁液に混和し、前房内投与する方法も報告されている。これらの治療法は簡便性、低侵襲の面からも画期的な治療法であり、水疱性角膜症の治療方針のパラダイムシフトと成り得る。限局性の角膜浮腫に対して効果がある一方で、びまん性の角膜浮腫に対する治療効果は低いとされている。びまん性水疱性角膜症に対する治療として従来型の角膜内皮移植術（PK、DSAEK、DMEK）が必要となる。セルソースとしてはドナー角膜、培養内皮細胞シート、今後 iPS 細胞などの多分化細胞から分化した角膜内皮細胞が考えられる。

以上の点からドナーグラフト、培養内皮細胞シート、更に iPS 細胞シートまで利用範囲が広がっても、移植する際のインジェクターによって内皮細胞は障害される。インジェクターを開発することは長期的な観点からも学術的利点は非常に高い。

我々は、内皮密度 3000/mm² の培養シートを用いて、内皮細胞密度減少が少ない、簡便な操作性、の条件を満たした DMEK 専用インジェクターの開発を行う。

2. 研究の目的

水疱性角膜症は角膜内皮細胞数減少に起因し、角膜移植の原因として最も多い。治療法はドナー角膜を利用した角膜移植であるが、近年角膜内皮移植術が普及している。術式は DSAEK、DMEK があるが、術後最高視力は DMEK が優れているとする報告が多い。しかし、術式が完成されておらず、術中の複雑性から日本では普及していないのが現状である。特に DMEK 専用インジェクターの開発が急務である。

3. 研究の方法

海外ドナー角膜より採取した角膜内皮細胞は既知の方法(Shima N, Yamaguchi M, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011)を利用して培養角膜内皮細胞を作成する。バリア機能のマーカである ZO-1、細胞接着のマーカである N-cadherin、細胞骨格のマーカである Phalloidin の発現を確認する。

PKH26 色素（蛍光色素の半減期は 100 日以上）で標識した内皮細胞から細胞密度 3000/mm² のシートを作成し、*in vitro* で DMEK インジェクター、IOL インジェクターに装填、リリースし、インジェクターの操作性、内皮細胞密度の減少率を測定する。*ex vivo* 豚眼モデルに移植した後に、内皮シートを取り出し、内皮細胞密度減少率(PKH 染色)、細胞機能マーカーの発現 (N-cadherin、ZO-1、Phalloidin)を比較する。

in vivo ウサギ水疱性角膜症モデルに細胞密度 3000/mm² の培養ヒト角膜内皮細胞シートを移植し、術直後および術翌日の内皮細胞密度減少率、バリア機能のマーカである ZO-1、細胞接着のマーカである N-cadherin、細胞骨格のマーカである Phalloidin の発現変化を免疫染色で測定する。

4. 研究成果

アスコルビン酸 2 リン酸 (Asc-2P) を含

む培地を用いて海外ドナー角膜から採取した角膜内皮細胞を継代培養し、第 4 継代 (P4) 細胞を細胞密度 3000/mm² となるようにアテロコラーゲンに播種し、細胞シートを作成した。バリア機能のマーカである ZO-1、細胞接着のマーカである N-cadherin、細胞骨格のマーカである Phalloidin の発現を確認した。(図 2A、B、C)

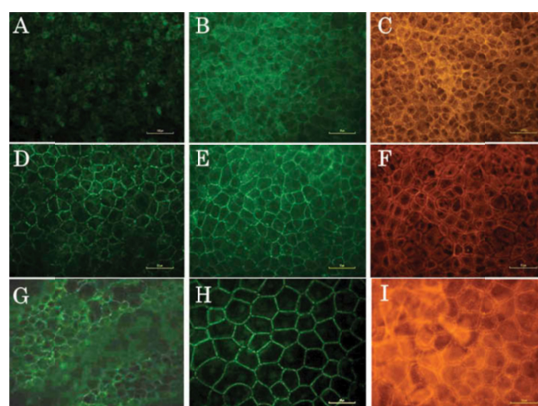


図 2 培養内皮細胞シートの機能マーカー発現

次に *in vitro* において 8mm 径の培養内皮細胞シートを、過去の論文で DMEK に使用したと報告のあった市販の IOL インジェクター 2 種類 (A、B) および DMEK インジェクター (C、D、E) に装填、リリースを行い、角膜内皮細胞の減少率を測定した。A、B は装填に時間を要し、リリースにおいてもシートがちぎれ、リリースされないなど、操作性に大きな障害があった。角膜内皮細胞の脱落が強く、測定できなかった。DMEK インジェクター三種類は装填、リリースともに行うことができたが、C (外径 4 mm)、D (外径 1.6mm) は時間を要した。一方 E (外径 3mm) は容易に装填することができ、リリースも簡単であった。(図 3、4) 3 社ともに内皮細胞減少率は 10% 程度と良好な結果を得た。しかし、免疫染色において製品 E のインジェクターが免疫染色で発現がよく、細胞形態が保たれており、最も良好な結果であった。



図 3 豚眼モデルへの培養内皮シート移植

上記の結果から E を *in vivo* ウサギ水疱性角膜症モデルに細胞密度 3000/mm² の培養ヒト角膜内皮細胞シートを移植し、術直後および術翌日の内皮細胞密度減少率、バリア機能

のマーカである Z0-1、細胞接着のマーカである N-cadherin、細胞骨格のマーカである Phalloidin の発現変化を免疫染色で測定した。(図 2D、E、F) 移植前、細胞密度は 3500/mm² あったが、接着マーカである N-cadherin、バリアマーカの Z0-1 は発現しているが弱く、細胞骨格マーカである F-アクチンは一重構造であった。移植後に取り出してきた内皮細胞は、細胞密度が 2800/mm² と 20%低下したが、依然高密度を保っており、更に、N-cadherin、Z0-1 は発現が強く増強し、F-アクチンは 2 重構造を呈した。これらのことから培養ヒト角膜内皮細胞は、移植後のうさぎの前房内環境下で機能タンパクのトランスロケーションが顕著になり、生体のヒト角膜内皮細胞に近づくことがわかった。



図 4 培養内皮シート移植後

上記の結果から製品 E を用いて臨床に使用した。学内倫理委員会の承認を得て、インフォームドコンセントの承諾を得られた Fuchs 角膜内皮変性症例に対する角膜内皮移植術 (DMEK) を施行し、挿入器具として上記を使用した。術前の角膜内皮細胞密度は 2600/mm²、術中操作に問題なく、合併症もなかった。術後 10 日目で角膜内皮細胞密度は 1500/mm² であったが、角膜浮腫は消失し、良好な術後経過であった。in vivo ウサギモデルでは角膜内皮減少率は 20%であったが、臨床では 43%減少した。この乖離が生じる原因が、ドナー角膜内皮と培養角膜内皮のバイアビリティーの差、前房深度の差、前房内のサイトカイン等の炎症動態の違いなどが考えられるが、今回の期間では検証することができなかった。

内皮細胞密度 3000/mm² を超える培養角膜内皮細胞シートを用いて、細胞障害が少ない DMEK インジェクターの検討、開発を行った。結果的に内皮減少率が in vitro で 10%、in vivo で 20%の、DMEK インジェクターが有効であると考えた。術後生着良好であり、移植前の in vitro より機能マーカの発現が増強することがわかった。臨床手術に施行し、操作性に問題はなく、手術は合併症を起こすことなく終了した。しかし内皮細胞障害が in vitro とは乖離する結果となった。今後ドナーグラフトのみならず、再生医療分野で培養内皮細胞シート、iPS 細胞分化内皮シートを利用した角膜移植が行われる際のインジェ

クターとしても用いることが可能であることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Optimization of Cultured Human Corneal Endothelial Cell Sheet Transplantation and Post-Operative Sheet Evaluation in a Rabbit Model. Yamaguchi M, Shima N, Kimoto M, Ebihara N, Murakami A, Yamagami S. *Curr Eye Res.* 査読有、2016 Feb 1:1-7. PMID: 26828450

Markers for distinguishing cultured human corneal endothelial cells from corneal stromal myofibroblasts, Yamaguchi M, Shima N, Kimoto M, Ebihara N, Murakami A, Yamagami S. *Curr Eye Res.* 2015;40(12):1211-7. 査読有

doi: 10.3109/02713683.2014.993087.

〔学会発表〕(計 3 件)

Roles of TWEAK in Human Corneal Endothelial Cells. Masahiro Yamaguchi, Nobuyuki Ebihara, Toshinari Funaki, Nobuyuki Shima, Satoru Yamagami, and Akira Murakami. WOC2014. 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

ヒト角膜内皮と TWEAK. 山口昌大、海老原伸行、島伸行、山上聡、舟木俊成、村上晶. 角膜カンファランス 2014. 沖縄コンベンションセンター (沖縄県沖縄市)

緑内障術後の DSAEK 治療成績. 山口昌大、舟木俊成、中谷 智、村上晶. 角膜カンファランス 2013. 白浜町立総合体育館 (和歌山県白浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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

山口 昌大 (YAMAGUCHI, Masahiro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20574700

(2) 研究協力者

中谷 智 (NAKATANI, Satoru)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80343490

(3) 連携研究者

()

研究者番号：