

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390468

研究課題名（和文） 角膜内皮再生治療法の開発

研究課題名（英文） Development of regenerative therapy for corneal endothelial diseases

研究代表者

西田 幸二（NISHIDA KOJI）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40244610

研究成果の概要：

ヒト角膜内皮から作製したヒト培養角膜内皮細胞シートは、機能的に角膜内皮機能を補完できた。さらに、spheroid 培養することで自己複製可能な未分化細胞を得ることに成功した。また移植用キャリアシートとして、アテロコラーゲンおよび新規開発シートを選定した。さらにトランスジェニックマウスを用いた解析によって、眼組織中に内皮細胞源となる未分化かつ多分化能を有する細胞を単離することに成功した。マイクロアレイ解析によって、複数の角膜内皮細胞増殖因子候補を絞り込むことに成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
18年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
19年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
20年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：再生医学、角膜内皮

キーワード：移植・再生医療、再生医学、細胞・組織、トランスレーショナルリサーチ、臨床

1. 研究開始当初の背景

角膜疾患に対する治療法として、古くからアイバンク眼を用いた同種角膜移植術があるが、角膜移植の成績が不良な疾患として、角膜内皮細胞が障害されて生じる水疱性角膜症がある。水疱性角膜症は、角膜移植が必要となる疾患の内訳で最も多く、その治療方法としてはドナー角膜を用いた全層角膜移植が行われているが、他家移植であるため拒絶反応を生じ、長期成績は必ずしも良好ではない。さらに、国内においては深刻なドナー不足の問題を抱えており、国内における角膜移植は海外輸入ドナー角膜に頼っているの

が現状である。

2. 研究の目的

本研究では、本疾患に対する根治的治療法として、患者本人の自家細胞を用いた再生治療法の開発と、in vivo 角膜内皮細胞の増殖法の確立を目的とする。そのため、まず角膜内皮層から sphere を形成する未分化細胞を単離、この細胞を細胞源とする培養角膜内皮シート移植による角膜内皮再生医療の確立を行う。

また、免疫学的問題を考えると、患者本人の細胞を用いた角膜内皮再生医療が理想的

であるので、角膜内皮細胞を特異的に認識する抗体を作製した後、他組織からの角膜内皮の代用となる自家細胞源の探索を行う。

さらに、本研究では、*in vivo* 角膜内皮細胞の細胞周期等を解析することにより、内皮細胞が G1-arrest している原因を検索し、*in vivo* の内皮細胞を人為的に増殖させる技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) 培養角膜内皮シート移植法の確立

研究用輸入ヒト強角膜片からデスメ膜ごと角膜内皮組織を採取し、温度応答性培養皿上で培養した。さらに、作製したヒト角膜内皮細胞シートを、水疱性角膜症モデル家兎眼への移植を行った。

次に、ヒト角膜内皮細胞を単離し、非接着性培養皿上、無血清培地中で spheroid 培養を行った。さらに、得られた sphere を酵素処理で分散し、非接着性培養皿上で再び浮遊培養することで、二次 sphere の形成能を検討した。さらに、得られた sphere をコラーゲンコートした接着性培養皿上に播種し、角膜内皮細胞が増殖・進展するかどうか検討した。

また、培養角膜内皮シート移植法を確立するため、移植に用いるキャリアの開発について検討を行った。生体親和性、透明性の高いアテロコラーゲンやヒアルロン酸に接着因子を加えもの等について細胞培養および透明性を検討した。

(2) 内皮細胞源の同定

神経堤細胞の特異的マーカーである P0 タンパクを Cre-eGFP で標識したマウスを用いた、角膜内皮細胞源の探索を実施した。これらの組織の中で、容易に採取可能な虹彩実質を、角膜内皮の再生のための細胞源候補として解析を行った。虹彩実質由来細胞を単離し、spheroid 培養を行うことにより、sphere 形成能を評価した。

次に、虹彩実質を角膜内皮の再生のための細胞源候補として評価するため、虹彩実質細胞から得られた sphere の未分化性や多分化能について免疫染色、real-time PCR 法による検討した。

(3) *In vivo* 内皮細胞を増殖させる方法の確立

様々な培養条件において角膜内皮を培養した後で、mRNA の抽出・cDNA の合成を行った。次に、角膜内皮細胞との増殖に関わる遺伝子の発現を、*in vivo* の角膜内皮も含めてマイクロアレイ法による解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 培養角膜内皮シート移植法の確立

単離した角膜内皮細胞は、継代を繰り返すことで、複数の角膜内皮細胞シートを作製した。作製したヒト角膜内皮細胞シートを、水疱性角膜症モデル家兎眼への移植を行った結果、sham オペ群と比較して、培養上皮シート移植群では角膜の透明性が高く、角膜厚は有意に改善した。以上のことから、ヒト角膜内皮を細胞源として作製した、ヒト培養角膜内皮細胞シートは機能的に角膜内皮機能を補完できると考えられた。

角膜内皮細胞を spheroid 培養した結果、角膜内皮細胞から複数の sphere 形成が認められた。さらに、得られた sphere を酵素処理で分散し、非接着性培養皿上で再び浮遊培養することで、二次 sphere の形成が認められた。これらのことより、この sphere は自己複製可能な未分化細胞であることが示された。さらに、得られた sphere をコラーゲンコートした接着性培養皿上に播種した結果、角膜内皮細胞が増殖・進展することを確認した。これらの結果によって、今後極少量の角膜内皮細胞から移植に使用可能な培養内皮シートを複数作製することが期待できる。

また、移植用キャリアシートについて、細胞培養および透明性を検討した結果、アテロコラーゲンおよび新規開発シートを選定した。

(2) 内皮細胞源の同定

P0 Cre-eGFP マウスの眼組織の GFP 発現を組織学的に解析したところ、角膜内皮は神経堤由来であることが確認でき、角膜実質、虹彩実質も同様に、神経堤由来組織であることが明らかとなった。さらに、虹彩実質由来細胞を単離し、spheroid 培養を行うことにより、複数の sphere 形成が認められた。

幹細胞マーカーの免疫染色法による解析の結果から、虹彩実質 sphere は神経幹細胞マーカー (Sox2, Nestin 等) に加え、神経堤細胞マーカー (p75, AP2 等) を発現していることを確認した。RT-PCR の結果からも、虹彩実質 sphere は神経堤細胞および組織幹細胞マーカーを発現していることが示された。また、二次 sphere の形成も認められた。以上の結果から、虹彩実質細胞 sphere は未分化な細胞集団であることが示された。さらに分化誘導実験により多分化能を検討したところ、虹彩実質 sphere は神経や脂肪細胞、軟骨細胞への分化が可能であった。また、虹彩実質は手術により安全に採取可能な組織であることから、角膜内皮再生の細胞源候補として考えられた。

(3) In vivo 内皮細胞を増殖させる方法の確立

様々な培養条件における in vitro 角膜内皮細胞および in vivo 角膜内皮を マイクロアレイ法により解析した結果、複数の角膜内皮細胞増殖因子候補を絞り込むことに成功した。

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 21 件)

1. Kanayama S, Nishida K, Yamato M, Hayashi R, Maeda N, Okano T, Tano Y, Analysis of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 secreted from cultured corneal and oral mucosal epithelial cell sheets in vitro., Br J Ophthalmol., 93, 263-267, 2009, 有
2. Oie Y, Maeda N, Kosaki R, Suzaki A, Hirohara Y, Mihashi T, Hori Y, Inoue T, Nishida K, Fujikado T, Tano Y, Characteristics of ocular higher-order aberrations in patients with pellucid marginal corneal degeneration., J Cataract Refract Surg., 34, 928-934, 2008, 有
3. Nozaki T, Yamato M, Inuma T, Nishida K, Okano T, Transportation of transplantable cell sheets fabricated with temperature-responsive culture surfaces for regenerative medicine., J Tissue Eng Regen Med., 2, 190-195, 2008, 有
4. Obokata H, Yamato M, Yang J, Nishida K, Tsuneda S, Okano T, Subcutaneous transplantation of autologous oral mucosal epithelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes., J Biomed Mater Res A., 86, 1088-1096, 2008, 有
5. Hongo C, Matsusaki M, Nishida K, Akashi M, Development of a Collagen Hydrogel with High Mechanical Strength by a Simple Molecular Orientation Method for Triple-Helix, Chem. Lett., 37, 1254-1255, 2008, 有
6. Sugiyama H, Maeda K, Yamato M, Hayashi R, Soma T, Hayashida Y, Yang J, Shirakabe M, Matsuyama A, Kikuchi A, Sawa Y, Okano T, Tano Y, Nishida K, Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a novel feeder layer for epithelial cells. Journal of engineering and regenerative medicine, Journal of engineering and regenerative medicine, 2, 445-449, 2008, 有
7. Y. Hori Y, Nishida K, Yamato K, Sugiyama H, Soma T, Inoue T, Maeda N, Okano T, Tano Y, Differential expression of MUC16 in human oral mucosal epithelium and cultivated epithelial sheets., Experimental Eye Research, 87, 1-6, 2008, 有
8. Wakusawa R, Abe T, Sato H, Yoshida M, Kunikata H, Sato Y, Nishida K, Expression of Vasohibin, an Antiangiogenic Factor, in Human Choroidal Neovascular Membranes, Am J Ophthalmol., 146, 235-243, 2008, 有
9. Saito T, Nishida K, Sugiyama H, Yamato M, Maeda N, Okano T, Tano Y, Abnormal Keratocytes and Stromal Inflammation in Chronic Phase of Severe Ocular Surface Diseases with Corneal Stem Cell Deficiencies., Br J Ophthalmol., 92, 404-410, 2008, 有
10. Tanaka T, Sato H, Tada A, Moriya T, Wada Y, Nishida K, Case of orbital sebaceous carcinoma developing twenty-seven years after enucleation., Jpn J Ophthalmol., 52, 344-345, 2008, 有
11. Abe T, Wakusawa R, Seto H, Asai N, Saito T, Nishida K, Topical doxycycline can induce expression of BDNF in transduced retinal pigment epithelial cells transplanted into the subretinal space., Invest Ophthalmol Vis Sci., 49, 3631-3639, 2008, 有
12. Fuse N, Miyazawa A, Nakazawa T, Mengkegale M, Otomo T, Nishida K, Evaluation of LOXL1 polymorphisms in eyes with exfoliation glaucoma in Japanese., Mol Vis., 14, 1388-1343, 2008, 有
13. Shimura M, Nakazawa T, Yasuda K, Shiono T, Iida T, Sakamoto T, Nishida K, Comparative therapy evaluation of intravitreal

- bevacizumab and triamcinolone acetonide on persistent diffuse diabetic macular edema., *Am J Ophthalmol.*, 145, 854-861, 2008, 有
14. Shimura M, Nakazawa T, Yasuda K, Kunikata H, Shiono T, Nishida K, Visual prognosis and vitreous cytokine levels after arteriovenous sheathotomy in branch retinal vein occlusion associated with macular oedema., *Acta Ophthalmol.*, 86, 377-384, 2008, 有
 15. Hayashi R, Yamato M, Sugiyama H, Sumide T, Yang J, Okano T, Tano Y, Nishida K, Enrichment of corneal epithelial stem/progenitor cells using cell surface markers, integrin $\alpha 6$ and CD71., *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 367, 256-263, 2008, 有
 16. Kanayama S, Nishida K, Yamato M, Hayashi R, Sugiyama H, Soma T, Maeda N, Okano T, Tano Y, Analysis of angiogenesis induced by cultured corneal and oral mucosal epithelial cell sheets in vitro., *Exp Eye Res.*, 85, 772-781, 2007, 有
 17. Hayashi R, Yamato M, Sugiyama H, Sumide T, Yang J, Okano T, Tano Y, Nishida K, N-cadherin is expressed by putative stem/progenitor cells and melanocytes in the human limbal epithelial stem cell niche., *Stem Cells.*, 25, 289-296, 2007, 有
 18. Hori Y, Sugiyama H, Soma T, Nishida K, Expression of membrane-associated mucins in cultivated human oral mucosal epithelial cells., *Cornea*, 9, 65-69, 2007, 有
 19. Kitayama K, Hayashida Y, Nishida K, Akama TO, Enzymes responsible for synthesis of corneal keratan sulfate glycosaminoglycans, *J Biol Chem.*, 282, 30085-30096, 2007, 有
 20. Koizumi N, Nishida K, Amano S, Kinoshita S, Progress in the development of tissue engineering of the cornea in Japan., *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.*, 111, 493-503, 2007, 有
 21. Watanabe K, Yamato M, Hayashida Y, Yang J, Kikuchi A, Okano T, Tano Y, Nishida K, Development of transplantable genetically modified corneal epithelial cell sheets for gene therapy. *Biomaterials.*, *Biomaterials*, 28, 745-749, 2007, 有
- [学会発表] (計 23 件)
1. 西田幸二, Tears and Ocular Surface, The 14th Annual Meeting of Kyoto Cornea Club Symposium I, 2008 年 12 月 5 日, ウェンステイン都ホテル京都
 2. 西田幸二, CORNEAL EPITHELIAL STEM CELL AND REGENERATIVE MEDICINE, Adult Stem Cells - Biology and Clinical Applications Meeting, 2008 年 11 月 25 日, Griffith University, Australia
 3. 西田幸二, 再生医療の話題, 堺市眼科医会総会 学術講演会, 2008 年 11 月 22 日, リーガロイヤルホテル堺
 4. 西田幸二, 角膜再生医療の標準化に向けて, 第 2 回再生医療テクノロジー・イノベーション研究会, 2008 年 11 月 19 日, 東京女子医科大学
 5. 西田幸二, 徹底解剖! 角膜内皮移植術 (DSAEK), 第 62 回臨床眼科学会 2008 年 10 月 24 日, 東京国際フォーラム
 6. 西田幸二, 角膜上皮ジストロフィーの治療戦略, 第 62 回臨床眼科学会, 2008 年 10 月 24 日, 東京国際フォーラム
 7. 西田幸二, 結膜炎と眼表面疾患, 第 9 回 眼炎症セミナー, 2008 年 10 月 18 日, 九州大学
 8. 西田幸二, Corneal epithelial stem cell, ICER2008, 2008 年 9 月 24 日, Crown Plaza Hotel Wuzhow, 北京
 9. 西田幸二, Translational Research, JST スイスワークショップ, 2008 年 9 月 15 日, スイス連邦工科大学チューリヒ校
 10. 西田幸二, 角膜上皮の再生医療, 東京大学平成 20 年度基礎・臨床・社会学統合講義, 2008 年 9 月 3 日, 東京大学医学部
 11. 西田幸二, 角膜治療のアップデート, 函館眼科医会学術講演会, 2008 年 7 月 28 日, 函館国際ホテル
 12. 西田幸二, Corneal tissue engineering, 9th International Symposium of Ophthalmology, 2008 年 7 月 26 日, 中国青島
 13. 西田幸二, DALK Combined with Ocular Surface Reconstruction, WOC 2008 Symposium, 2008 年 6 月 30 日, Hong Kong Convention & Exhibition Centre
 14. 西田幸二, DALK Combined with Cataract Surgery, WOC 2008 Symposium, 2008 年 6 月 30 日, Hong Kong Convention &

- Exhibition Centre
15. 西田幸二, Cell Sheet Transplantation for Ocular Surface Reconstruction, WOC 2008 Symposium, 2008年6月29日, Hong Kong Convention & Exhibition Centre
 16. 西田幸二, 角膜手術の進歩, 第94回沖繩眼科集談会, 2008年6月21日, 琉球大学医学部
 17. 林竜平, Method for the Validation of Tissue-Engineered Epithelial Cell Sheet., ARVO, 2008年5月1日, GREATER FORT LAUDERDALE/BROWARD COUNTY CONCENTION CENTER
 18. 久保田享, Validation of Human and Rabbit Cultured Corneal Epithelial Cell Sheets by Full-Field Optical Coherence Tomography., ARVO, 2008年4月19日, GREATER FORT LAUDERDALE/BROWARD COUNTY CONCENTION CENTER
 19. 西田幸二, 角膜疾患の外科的治療の進歩, 東京都眼科医会学術講演会, 2007.11.17, 丸の内マイプラザホール
 20. 西田幸二, 再生角膜移植の現状と課題, 国際人工臓器学会, 2007.10.30, 仙台国際交流センター
 21. 西田幸二, 角膜の再生医療, オキュラーサーフェスシンポジウム 東京, 2007.9.29, 秋葉原コンベンションホール
 22. 西田幸二, 角膜内皮の診かた, 第111回日本眼科学会総会, 2007.4.22, 大阪国際会議場
 23. 西田幸二, 上皮再生・内皮, 第111回日本眼科学会総会, 2007.4.19, 大阪国際会議場

[産業財産権]

○出願状況 (計 6 件)

1. 積層コラーゲンゲルの製造方法、配向方法およびそれらの方法により製造された積層コラーゲンゲル, 明石満、西田幸二、松崎典弥、大道正明, 大阪大学、東北大学, 特願 2008-330579, 2008.12.25, 国内
2. 強膜透明化による角膜移植材料調製方法, 西田幸二、田中佑治、久保田享, 東北大学, 特願 2008-141043, 2008.5.29, 国内
3. 組織幹細胞/組織前駆細胞からの角膜内皮細胞の生成方法, 西田幸二、林竜平、菊地未来、大隅典子, 東北大学, 特願 2008-123562, 2008.5.9, 国内
4. 非共有結合型コラーゲン架橋剤, 明石満、西田幸二、松崎典弥、久保田享, 大阪大学、東北大学, 特願 2008-121073,

- 2008.5.7, 国内
5. 上皮系細胞シートの作製のための同種皮膚由来フィーダー細胞, 西田幸二、大家義則, 東北大学, 特願 2008-071677, 2008.3.19, 国内
6. 積層コラーゲンゲルの作製方法及び積層コラーゲンゲル, 明石満、西田幸二、松崎典弥、本郷千鶴、田中佑治、久保田享, 大阪大学、東北大学, 特願 2007-339635, 2007.12.28, 国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 幸二 (NISHIDA KOJI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40244610

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

前田 直之 (MAEDA NAOYUKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号: 00273623

田野 保雄 (TANO YASUO)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 80093433

大和 雅之 (YAMATO MASAYUKI)
東京女子医科大学・先端生命研究所・教授
研究者番号: 40267117

中澤 徹 (NAKAZAWA TORU)
東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 30361075

横倉 俊二 (YOKOKURA SYUNJI)
東北大学・病院・助教
研究者番号: 30400378

久保田 享 (KUBOTA AKIRA)
東北大学・病院・助教
研究者番号: 50451589