

機関番号：34310

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592083

研究課題名（和文）多糖類アルジネートを用いた角膜内皮再生医療の開発

研究課題名（英文）Corneal Tissue Engineering Using Alginate

研究代表者

小泉 範子 (KOIZUMI NORIKO)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：20373087

研究成果の概要（和文）：植物由来の多糖類であるアルジネートを用いた角膜凍結保存法の開発を試み、凍結保存角膜実質フィルムを用いたサル培養角膜内皮シートを作成した。培養角膜内皮シートの *in vitro* での機能解析を行った後に、角膜内皮機能不全の動物眼への移植実験を行い、*in vivo* での機能、生体適合性および安全性の検討を行った。本研究により、凍結保存角膜実質フィルムを用いた角膜内皮再生医療の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We tried to develop a new cryopreservation method for human corneal tissue using alginate encapsulation and we studied the feasibility of cultivated corneal endothelial cell transplantation using a corneal lamellar graft. We cultivated monkey corneal endothelial cells on a frozen preserved human corneal lamellar graft and successfully transplanted this construct into animal eyes. Our results suggest the possibility of cultivated corneal endothelial cell transplantation using a frozen preserved corneal lamellar graft.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：眼科学、医工学

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、アルジネート、細胞移植

1. 研究開始当初の背景

角膜内皮細胞は角膜の最も内側に存在する単層細胞層であり、角膜の透明性維持に重要な役割を果たしている。霊長類では角膜内皮細胞の生体内での増殖能が乏しく、角膜ジストロフィや内眼手術などによって角膜内皮細胞が障害されると水疱性角膜症を生じる。近年、ヒトの角膜内皮細胞を生体外で培養して増殖させることが可能になっており、培養角膜内皮細胞を用いた再生医療の開発が期待されている。

我々はこれまで、羊膜やコラーゲンを用い

た培養角膜内皮シート移植術の開発を行っており、動物への移植実験によりその有用性を確認してきた。凍結保存角膜は、抗原性が低く生体への適合性がよいことが知られており、薄切してフィルム状の基質を作成することによって角膜内皮再生医療に用いることができると考える。しかし臨床的には、角膜凍結保存角膜を用いた表層角膜移植では、新鮮角膜を用いた表層角膜移植術に比べて術後の角膜透明性の回復に時間がかかることが知られており、コラーゲン線維の配列を保ち角膜の透明性維持に重要な役割を果た

ナグリコサミノグリカンの変性を生じている可能性が指摘されている。

近年、植物由来の天然高分子であるアルジネートが幹細胞培養における細胞外基質を保持する作用を持っていることから、整形外科領域再生医療における軟骨三次元培養の基質として注目されている。我々は、アルジネートを用いた角膜凍結保存法を確立し、角膜内皮再生医療の基質としての有用性を検討する着想に至った。

2. 研究の目的

社会の高齢化に伴って患者数の増加が問題となっている角膜内皮機能不全(水疱性角膜症)に対する再生医学的治療法の確立を目的として、植物由来の多糖類アルジネートを用いた培養角膜内皮シート移植術の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) アルジネートを用いた角膜凍結保存法開発の試み

凍結保存角膜は、抗原性が低く生体への適合性がよいことが知られており、角膜再生医療に用いることができると考える。本研究では、アルジネートを用いて凍結保存したウサギおよびヒト角膜組織中のケラタン硫酸プロテオグリカン (KSPG) 量を ELISA で測定し、免疫染色を行った。コントロール角膜と比較することで、アルジネートが凍結保存角膜における正常 KSPG の保持に与える影響を検討した。また、アルジネートコーティングが角膜凍結保存時に、角膜上皮、実質、内皮細胞に与える影響を検討した。

(2) 角膜実質フィルムを用いた培養角膜内皮シートの作成

1ヶ月間凍結保存した研究用ヒト角膜組織を用いて角膜実質フィルムを作成し、カニクイザル培養角膜内皮シートを作成した。人工前房装置を用いて強角膜片を固定し、LASIK 手術用マイクロケラトームを用いて角膜実質を層状に切開し、厚さ約 150 μ m のフィルムを作成した。カニクイザルの角膜内皮細胞を継代培養し、角膜実質コラーゲンフィルム上に播種して1カ月間培養し、培養角膜内皮細胞シートを作成した。角膜内皮細胞の密度および形態、角膜内皮細胞の機能に関連するタンパクである ZO-1、Na⁺-K⁺-ATPase の発現を免疫染色により評価した。

(3) ウサギ水疱性角膜症モデルを用いた培養角膜内皮シート移植

カニクイザルへの培養角膜内皮シート移植

の予備的実験として、ウサギ眼を用いた培養角膜内皮シート移植を行って生体適合性の評価を行った。全身麻酔下にて、ウサギ角膜輪部に作成した約 1mm の切開創より角膜内皮を周辺部まで機械的に搔爬し、水疱性角膜症モデルを作製した。次に、角膜輪部に約 4.5mm の角膜切開創を作製し、直径約 8mm のヒト角膜実質コラーゲンフィルムをキャリアとする培養角膜内皮シートを挿入した。前房内を空気で置換することで角膜内皮シートをホスト角膜実質面に接着させ、角膜切開創を縫合した。手術1日後、2日後に前眼部所見および角膜内皮シートの接着状態を確認した。

(4) 霊長類を用いた培養角膜内皮シート移植

ヒトと同様に生体内における角膜内皮細胞の増殖能が乏しい動物であるカニクイザルを用いて同様の移植実験を行い、ヒト角膜実質コラーゲンフィルムをキャリアとする培養角膜内皮シートの長期的な効果を検討した。全身麻酔下で、前述の方法で水疱性角膜症モデルを作成し、デスメ剥離用フックを用いて角膜中央部に直径約 6mm のデスメ膜剥離を行い、角膜実質を露出した。続いて、角膜輪部に約 4.5mm の角膜切開創を作製し、直径約 8mm のヒト角膜実質コラーゲンフィルムをキャリアとするカニクイザル培養角膜内皮シートを挿入した。前房内を空気で置換することで角膜内皮シートをホスト角膜実質面に接着させ、角膜切開創を縫合した。手術1、2、3、7日後に前眼部所見および角膜内皮シートの接着状態を確認した。また、長期にわたり前眼部所見の観察を行い、角膜内皮スペキュラを用いて生体内における角膜内皮の観察を行った。

4. 研究成果

(1) 凍結保存角膜を用いた検討

ケラタン硫酸の定量実験により、アルジネートを用いて保存した群では、アルジネートを用いない群に比べて、保存角膜組織におけるケラタン硫酸濃度が有意に高い結果が示された。またウサギおよびヒト角膜のケラタン硫酸の蛍光免疫染色では、アルジネートを用いて保存した群の角膜実質で強い染色が観察され、また角膜実質細胞の細胞密度も高く保持されていた(図1)。アルジネートは角膜実質内のケラタン硫酸および角膜実質細胞を保持し、角膜実質変性を防ぐ可能性が示唆された。一方、アルジネートは角膜上皮細胞および角膜内皮細胞の生存状態には影響を与えなかった。

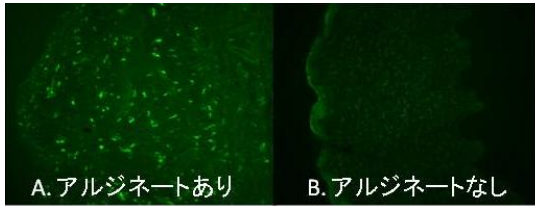


図 1 凍結保存角膜実質組織（ウサギ）におけるケラタン硫酸プロテオグリカンの発現

(2) 角膜実質フィルムを用いた培養角膜内皮シートの作成

凍結保存した角膜実質コラーゲンフィルムを用いて作成した培養角膜内皮シートの細胞密度は約 2000 個/mm² であり、正常角膜内皮細胞に類似した大小不同の少ない均質な多角形細胞から構成されていた。角膜内皮細胞の機能に関するタンパクとして、ポンプ機能に関わる Na⁺-K⁺-ATPase、タイトジャンクションに関わる ZO-1 の免疫組織学的検討を行い、培養角膜内皮シートにおいてもこれらのタンパクを発現していることを確認した（図 2）。以上のことより、角膜実質コラーゲンフィルムを用いた培養角膜内皮シートは、正常の角膜内皮細胞と類似した細胞生物学的特性を有しており、生体内へ移植した後も角膜内皮細胞としての機能を有することが推測された。

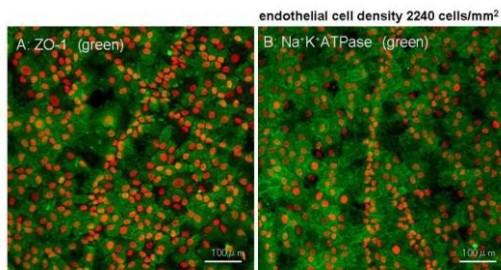


図 2 角膜実質フィルムを用いた培養角膜内皮シートにおける機能関連タンパクの発現

(3) 水疱性角膜症動物モデルを用いた培養角膜内皮シート移植

ウサギ眼への移植において、手術後早期に角膜内皮シートは宿主角膜実質面中央に接着しており、宿主-グラフト間の離開、グラフトの移動を認めなかった（図 3A）。移植 24 時間後の角膜の透明性は良好で、移植した培養角膜内皮細胞が生体内で機能していることを示唆する所見であった。移植した角膜内皮シートの生体内での状態を検討するために、移植 48 時間後にウサギを安楽死させ、眼球を摘出して角膜内皮細胞のアリザリン

染色を行った。移植した角膜内皮グラフト上の培養角膜内皮細胞には移植時の手術操作による傷害を認めず、生体内でも生存可能であることが明らかになった（図 3B）。宿主実質とグラフト面の接着は良好で、ヒト角膜実質コラーゲンフィルムをキャリアとする培養角膜内皮シートは生体適合性が良好であった。

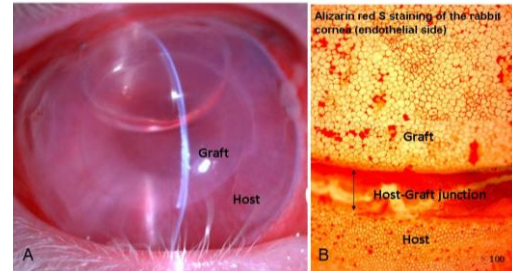


図 3 凍結保存角膜実質フィルムを基質とした培養角膜内皮シート移植（ウサギ眼）

(4) 霊長類を用いた培養角膜内皮シート移植

手術直後より角膜内皮シートは宿主角膜実質面中央に接着しており移植 24 時間後の角膜の透明性は良好で、移植した培養角膜内皮細胞が生体内で機能していることを示唆する所見であった。移植後 8 ヶ月後においても角膜内皮シートの宿主角膜への接着が認められ、宿主角膜および角膜内皮シートは透明性を維持した。また、角膜内皮スペキュラにより約 1800 個/mm² の細胞密度を保った角膜内皮細胞を観察することができた。以上の実験から、ヒト角膜実質コラーゲンフィルムは生体適合性が高く、長期にわたり透明性を維持することが可能なキャリアとして使用することが可能であることが明らかになった。また、ヒトに近い霊長類をモデルとしてヒト角膜実質コラーゲンフィルムを基質とする培養角膜内皮シートの移植により透明治癒が得られたことは、臨床応用の可能性を強く示すものであった。

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 10 件）

1. 小泉 範子: 臨床応用を目指した角膜内皮再生医療の開発. 同志社大学生命医科学会報 第 2 号. 2-7, 2010. 査読なし
2. Okumura N, Koizumi N, Kinoshita S, et al: Enhancement on primate corneal endothelial cell survival in vitro by a ROCK inhibitor. Invest Ophthalmol

Vis Sci. 50(8):3680-3687, 2009. 査読あり

3. Koizumi N, Kinoshita S, et al.: Cultivated Corneal Endothelial Transplantation in a Primate: Possible Future Clinical Application in Corneal Endothelial Regenerative Medicine. *Cornea*. 27(8):S48-S55, 2008. 査読あり

〔学会発表〕 (計 54 件)

1. Koizumi N: New strategy for corneal endothelial tissue engineering. Asia-ARVO 2011, Singapore, 2011.1.20.
2. 小泉範子: カニクイザルを用いた角膜内皮再生医療の開発. 第14回予防衛生協会セミナー. つくば, 2010.11.19 (平成21年度予防衛生協会研究奨励賞受賞講演)
3. Koizumi N: Cultivated corneal endothelial transplantation in a primate for the future clinical application of corneal endothelial regenerative medicine. Gordon Research Conference Biology & Pathobiology of the Cornea, Ventura, USA, 2010.3.11.
4. N. Koizumi, et al.: Cultivated monkey corneal endothelial cell transplantation using corneal lamellar graft. 2009 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, USA, 2009.5.4.
5. 小泉範子: 霊長類を用いた培養角膜内皮移植術の開発. 第113回日本眼科学会総会, 東京, 2009.4.18. (日本眼科学会学術奨励賞記念講演)
6. 小泉範子, 他: 霊長類を用いた培養角膜内皮移植術の開発. 第8回日本再生医療学会総会, 東京, 2009.3.5.
7. 小泉範子, 他: ヒト角膜実質を用いた培養角膜内皮移植術の試み. 第33回角膜カンファランス・第25回角膜移植学会, 大阪, 2009.2.21.
8. Koizumi N, et al: Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate mode. XVIII International Congress of Eye Research (ICER), Beijing, China, 2008.9.25.
9. Cannon CJ, Koizumi N, et al.: Cryopreservation of corneal tissue combined with alginate encapsulation. 2008 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale,

Florida, U.S.A., 2008.4.28.

〔図書〕 (計 1 件)

1. Koizumi N, Kinoshita S: The Ocular Surface: The surgical treatment for corneal epithelial stem cell deficiency, corneal epithelial defect, and peripheral corneal ulcer. encyclopedia of the eye. Elsevier Ltd., Oxfordshire, 2011, in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 範子 (KOIZUMI NORIKO)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号: 20373087

(2) 研究分担者

木下 茂 (KINOSHITA SHIGERU)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号: 30116024

(3) 研究協力者

鳥居 隆三 (TORII RYUZOU)
滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授
研究者番号: 50106647

奥村 直毅 (OKUMURA NAOKI)
京都府立医科大学・眼科・病院助教
研究者番号: 10581499