

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390465

研究課題名 角膜内皮および実質における再生医療実現のための基盤技術の確立

研究課題名（英文） Establishment of fundamental technology for clinically applicable regenerative medicine in corneal endothelium and stroma.

研究代表者 天野 史郎（AMANO SHIRO）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80193027

研究成果の概要（和文）：

臨床における角膜内皮移植として広まりつつある DSAEK の手法を用いた培養ヒト角膜内皮細胞移植の長期的な有効性を検討した。培養 DSAEK グラフトは培養中に浮腫でやや厚みを増したものの実質の層構造は保たれ、培養 HCEC は単層の細胞層を形成するとともに細胞間接着装置の存在も見られた。術後 1 年の段階でコントロールと比較して、培養 HCEC 群では角膜厚が薄く、透明性が保たれた。これらの結果より、培養 DSAEK グラフトは有効な方法であり、臨床応用が可能であると考えられた。

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し培養ヒト角膜内皮を播種する方法においても同様に、有効性、安全性が確認された。

無血清・無フィーダー培養下において高付着能を有する角膜上皮細胞シートを剥離できる新規温度応答性培養皿を開発し評価した。その結果、新規温度応答性培養皿では角膜上皮シートに含まれる高付着能部位を含めて剥離することが可能であり、一枚の角膜上皮シートとして剥離することが可能であった。今後この新規温度応答性培養皿を角膜内皮シート作成に応用する予定である。

さらにアスコルビン酸-2 リン酸(Asc-2P)を用いた新たなヒト角膜内皮細胞培養法を検討した。その結果、アテロコラーゲンを基質とし、Asc-2P と bFGF 存在下で培養することにより、初代培養は全例で良好な増殖を示し、継代を重ねても高い増殖能と角膜内皮細胞独特の敷石状の形態を維持した。ZO-1、Na⁺/K⁺-ATPase は、組織角膜内皮と同等の発現レベルと類似の細胞内分布を示した。8-OHdG と MDA は、Asc-2P を添加しない培地では継代毎に生成が増加したが、Asc-2P 添加培地では生成が抑制された。Asc-2P を用いて培養した培養ヒト角膜内皮細胞は、高い細胞増殖能と継代安定性を有し、組織角膜内皮細胞と類似の形態を示した。Asc-2P は細胞内の酸化ストレスを減少させることにより細胞寿命の延長に寄与している事がわかった。

研究成果の概要（英文）：

Long-term efficacy of transplantation of cultured human corneal endothelial cells (HCEC) with Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK) was investigated. DSAEK grafts with cultured HCEC had normal stromal lamellar structure and endothelial cell layer with

intercellular adhesion structure. The corneas in which cultured HCEC were thinner than those in the control group and were transparent at 1 year after the surgery. These results indicated that DSAEK using cultured HCEC is effective and clinically feasible.

The other method of seeding cultured HCEC on the posterior corneal stroma which was obtained after a thick corneal flap was made using a microkeratome, was confirmed to be effective and safe.

A new temperature-responsive culture dish was developed and evaluated. The results indicated that the temperature-responsive culture dish can produce a sheet of corneal epithelium containing a lot of progenitor cells after culture with non-serum and non-feeder cells. We plan to use this new temperature-responsive culture dish to produce a cell sheet of corneal endothelial cells.

A new culture method of HCEC using bi-phosphate ascorbic acid (Asc-2P) was investigated. The results indicated that the primary culture of HCEC was successful in all cases under the culture condition with athello-collagen as a carrier and Asc-2P and bGFGF in the media. Even after several passage, HCEC showed a high proliferative capacity and a cobble-stone like appearance. The expression level and intracellular distribution pattern of ZO-1 and NA+/K+-ATPase in cultured HCEC were similar to those in in vivo HCEC. 8-OHdG and MDA increased in HCEC cultured without Asc-2P as passage increased whereas they were suppressed in HCEC cultured with Asc-2P. HCEC cultured with Asc-2P showed high proliferative capacity and appearance similar to in vivo HCEC. These results suggested that Asc-2P elongated the lifespan of HCEC by reducing intracellular oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

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、角膜実質

1. 研究開始当初の背景

角膜移植の対象となる患者の多くは、角膜内皮障害あるいは角膜実質混濁などによる失明患者であるが、角膜内皮あるいは角膜実質の再生医療は、いまだ実現されていない。従って角膜内皮や角膜実質をターゲットとする角膜再生医療を実用化する事は、臨床的に大変意義が大きい。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、臨床応用の一歩手前まで来ている。

2. 研究の目的

今回の研究では、これまでの我々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、基盤技術を確立する事を目的としている。すなわち、本研究の第一の目的は、角膜内皮移植として有用な術式として臨床で確立されつつあるDescemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK)に則った術式を含めた複数の候補術式を検討する事により、培養ヒト角膜内皮細胞を用いた角膜内皮再生医療手術法を確立する事である。第二の目的は、ヒト角膜内皮および実質前駆細胞を用いた角膜内皮および実質再生法を検討する事である。前駆細胞の使用法としては、無細胞化した実質上で前駆細胞を培養して使用方法や実質内へ直接注入する方法などが考えられる。第三の目的は、より安全性の高い細胞培養方法として我々が輪部上皮培養において実現した無血清、無フィーダー細胞による培養を角膜実質細胞及び内皮細胞の培養においても可能にする事である

3. 研究の方法

培養ヒト角膜内皮細胞および実質細胞、そしてそれらの前駆細胞の最適な使用方法、手術術式を検討した。ヒト角膜内皮細胞は実験用に海外より輸入した角膜から入手した。角膜内皮細胞をデスメ膜に接着させた状態で角膜より剥離し、眼科で所有する培養システムにおいて初期培養、継代培養を行い冷凍保存した。培養ヒト角膜内皮細胞の移植方法にはいくつかの候補がある。昨今、角膜内皮移植として臨床で注目されつつあるDSAEKに則った術式が角膜内皮再生医療手術法の最有力候補の一つと考えた。そこで今回の研究では、まずDSAEKに則った手術術式に培養ヒト角膜内皮細胞を応用した手術を家兎において行い、その長期的な有効性と安全性を検討した。培養ヒト角膜内皮細胞を用いたDSAEKを行なうためには、まず培養細胞のキャリアーとなる厚さ

約150ミクロンの角膜実質片を作成する必要がある。輸入ヒト角膜から培養用にまず内皮細胞を剥ぎ取り、残りの角膜実質を人工前房装置にセットする。前房圧を上げた状態にして輪部に深さ0.15mm、長さ7mmの切開を行う。その深さから角膜のlamellar構造に沿って層間剥離刀で層間剥離を行なっていく。その後、人工前房装置から角膜実質をはずし、直径8mmのトレパンで角膜を打ち抜くことで、厚さ150ミクロン、直径8mmの角膜実質片を得ることができた。作成した角膜実質片をクリーンベンチに移送し、6穴培養皿に置き、その上に培養ヒト角膜内皮細胞を高密度に含む培養液を滴下した後、直ちに培養皿ごと1000rpmで10分間遠心する事で細胞接着を促進させた。播種する培養ヒト角膜内皮細胞は蛍光色素であるDiIで標識した。このようにヒト培養角膜内皮細胞を播種した後に、4週間培養し、細胞間接着、細胞実質間接着が強固になった状態の移植片を動物実験で使用した。この方法により作成したDSAEK移植片上にはヒト角膜内皮が2500cell/mm²以上の密度で播種され、細胞境界領域にはタイトジャンクション関連蛋白ZO-1が発現していた。このようにして作成したDSAEK移植片のin vivoにおける有効性と安全性を検討した。筋肉注射による全身麻酔下にある白色家兎に対して、まず硝子体カッターを用いてcore vitrectomyを行なった。家兎の輪部に前房メインテナーを取り付けた後、逆シンスキーフックで直径8mmの範囲内のデスメ膜と内皮細胞を除去する。輪部に4.5mm幅の切開を行い、この切開よりBusin glideと島崎氏鑷子を用いて引っ張り込み法により移植片を前房内に挿入した。前房内に挿入したヒト培養角膜内皮細胞

使用 D S A E K 移植片の下に 30 ゲージ針を用いて空気を注入することにより、移植片を家兎角膜後面に接着させた。術直後、および術後1ヶ月の間に1週間に1回、拒絶反応抑制を目的として、ステロイドのデポ剤を結膜下注射した。培養ヒト角膜内皮細胞使用 D S A E K の後、前眼部顕微鏡による移植角膜の状態の観察・撮影、超音波パキメーターによる角膜厚の測定、移植片が透明度を回復してからは、スペキュラーマイクロスコープを用いた角膜内皮細胞の形態の観察、などの項目を経時的に検査した。術後3か月以降において、強角膜片を取り出し、角膜内皮面の組織学的な観察、蛍光顕微鏡による D i I 標識内皮細胞の残存の程度の観察などを行った。

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し培養ヒト角膜内皮を播種する方法の1年以上にわたる術後の観察を行い、各手術法の有効性と安全性の検討を行なった。前眼部顕微鏡による移植角膜の状態の観察・撮影、超音波パキメーターによる角膜厚の測定、スペキュラーマイクロスコープを用いた角膜内皮細胞の形態の観察、などの項目を経時的に検査した。また、術後1年おきに、強角膜片を取り出し、角膜内皮面の組織学的な観察、蛍光顕微鏡による D i I 標識内皮および実質細胞の残存の程度の観察などを行った。

無血清・無フィーダー培養下において高付着能を有する角膜上皮細胞シートを剥離できる新規温度応答性培養皿を開発し評価した。ヒト研究輸入角膜により角膜輪部細胞を採取しコラゲナーゼ添加無血清培地で組織融解後、酵素処理にて角膜輪部上皮細胞を分散した。セルシード社製温度応答性培養皿 UpCell および新開発の新規温度応

答性培養皿に角膜輪部上皮細胞を播種し無血清培地(DMEM/F12, B27, EGF 20ng/ml, KGF 20ng/ml)で三週間培養した後、氷上で低温処理を5分行い、細胞シートの剥離を試み評価した。

アスコルビン酸-2リン酸(Asc-2P)を用いた新たなヒト角膜内皮細胞培養法を検討し、Asc-2Pで培養した角膜内皮細胞の特性解析及び細胞寿命延長の機序を解析した。Asc-2Pを用いてヒト角膜内皮細胞の至適培養条件を検討し、継代培養を繰り返すことにより細胞の増殖安定性を評価した。本法で増幅した細胞をアテロコラーゲンシート上で培養後、ZO-1、Na⁺/K⁺-ATPaseの発現を評価した。Asc-2P(+)(-)で培養した細胞を用いて、DNA酸化損傷指標の8-OHdG、脂質過酸化指標のマロンジアルデヒド(MDA)の発現を評価した。

4. 研究成果

臨床における角膜内皮移植として広まりつつある D S A E K の手法を用いた培養ヒト角膜内皮細胞移植の長期的な有効性を検討した。結果としては、培養 D S A E K グラフトは培養中に浮腫でやや厚みを増したものの実質の層構造は保たれ、培養 HCEC は単層の細胞層を形成するとともに細胞間接着装置の存在も見られた。術後1年の段階でコントロールと比較して、培養 HCEC 群では角膜厚が薄く、透明性が保たれた。これらの結果より、培養 D S A E K グラフトは有効な方法であり、臨床応用が可能であると考えられた。培養角膜内皮細胞移植の免疫学的な検討を行った。C3H マウスの培養角膜内皮細胞を BALB/c マウスの角膜実質上に培養して作製したキメラ角膜を BALB/c マウスに移植したのちに、免疫学的な検討を行ったところ、移植された C3H マウス由来の培養角膜内皮細胞は、ホストに認

識されておらず、そのために拒絶反応がも全く起きなかった。このことから、アロの培養角膜内皮細胞の移植が、拒絶反応を起こす可能性が少ないことが分かった。

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し培養ヒト角膜内皮を播種する方法においても同様に、有効性、安全性が確認された。

無血清・無フィーダー培養下において高付着能を有する角膜上皮細胞シートを剥離できる新規温度応答性培養皿を開発し評価した。その結果、新規温度応答性培養皿では角膜上皮シートに含まれる高付着能部位を含めて剥離することが可能であり、一枚の角膜上皮シートとして剥離することが可能であった。

さらにアスコルビン酸-2リン酸(Asc-2P)を用いた新たなヒト角膜内皮細胞培養法を検討した。その結果、アテロコラーゲンを基質とし、Asc-2PとbFGF存在下で培養することにより、初代培養は全例で良好な増殖を示し、継代を重ねても高い増殖能と角膜内皮細胞独特の敷石状の形態を維持した。ZO-1、Na⁺/K⁺-ATPaseは、組織角膜内皮と同等の発現レベルと類似の細胞内分布を示した。8-OHdGとMDAは、Asc-2Pを添加しない培地では継代毎に生成が増加したが、Asc-2P添加培地では生成が抑制された。Asc-2Pを用いて培養した培養ヒト角膜内皮細胞は、高い細胞増殖能と継代安定性を有し、組織角膜内皮細胞と類似の形態を示した。Asc-2Pは細胞内の酸化ストレスを減少させることにより細胞寿命の延長に寄与している事がわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5件)

1. Honda N, Mimura T, Usui T, Amano S. Descemet's stripping automated

endothelial keratoplasty using cultured corneal endothelial cells in a rabbit model. Arch Ophthalmol 127:1321-1326, 2009 査読有

2. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Amano S. Selective isolation of young cells from human corneal endothelium by the sphere-forming assay. Tissue Eng Part C Methods 16:803-812, 2010 査読有
3. Mimura T, Yamagami S, Uchida S, Yokoo S, Ono K, Usui T, Amano S. Isolation of adult progenitor cells with neuronal potential from rabbit corneal epithelial cells in serum- and feeder layer-free culture conditions. Mol Vis 16:1712-1719, 2010 査読有
4. Amano S, Kaji Y, Mimura T. Biology of corneal endothelial cells in vivo and in vitro. Jpn J Ophthalmol 54:211-214, 2010 査読無
5. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Amano S. Prospects for Descemet stripping automated endothelial keratoplasty using cultured human corneal endothelial cells. J Transplant Technol Res S2-001, 2011 査読有

[学会発表] (計 3件)

1. Amano S, Honda N, Usui T, Mimura T. An Animal Model of Descemet'S Stripping Automated Endothelial Keratoplasty Using Cultured Corneal Endothelial Cells. ARVO Meeting April 11, 2009 Fort Lauderdale.
2. 島伸行、木本美和、山口昌大、天野史郎、山上聡. アスコルビン酸-2リン酸を用いたヒト角膜内皮細胞の培養. 角

膜カンファランス2012 2012
年2月25日 東京

3. 横尾誠一、高田哲夫、山上聡、原口和敏、天野史郎。無血清・無フィーダー培養に対応した新規温度応答性培養皿による角膜上皮シート。角膜カンファランス2012 2012年2月25日 東京

〔図書〕(計5件)

1. Mimura T, Tabata Y, Amano S.
Transplantation of corneal stroma reconstructed with gelatin and multipotent precursor cells from corneal stroma. In: Daniel Eberli, editor. Regenerative Medicine and Tissue Engineering; From Cells to Organs / Book 2, 2011
2. 天野史郎：正常者の角膜内皮細胞。あたらしい眼科 26:147-152, 2009
3. 天野史郎：DSAEKの合併症と対策。眼科手術 22:463-467, 2009
4. 天野史郎：全層角膜移植術の長期予後。前田直行編集，眼科診療のスキルアップ，前眼部編，メディカルビュー，東京，50-55，2009
5. 天野史郎：角膜内皮細胞はなぜ増えないのか？ 眼のサイエンス、眼疾患の謎。文光堂，東京，71-73, 2010

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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・教授
研究者番号：80193027

(2) 研究分担者

臼井 智彦 (USUI TOMOHIKO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80282557

杉崎 顕史 (SUGISAKI KENJI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40361480

(3) 連携研究者

なし。