

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等研究事業

角膜全層の再生医療技術の開発および  
臨床応用に関する研究

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西 田 幸 二

平成 20 (2008) 年 3 月

## 角膜全層の再生医療技術の開発および臨床応用に関する研究

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	西田 幸二	東北大学大学院医学系研究科眼科学	教 授
分担研究者	明石 満	大阪大学大学院工学研究科応用化学	教 授
	仲野 徹	大阪大学大学院医学系研究科病理学幹細胞病理学	教 授
	田畑 泰彦	京都大学再生医科学研究所生体組織工学研究部門生体材料学	教 授
	竹花 一成	酪農学園大学獣医学部獣医解剖学	教 授
	宮野 悟	東京大学医科学研究所ヒゲム解析センターDNA 情報解析分野	教 授
	上 昌広	東京大学医科学研究所探索医療ヒューマンネットワーク部門	客員准教授
	山口 拓洋	東京大学大学院医学系研究科臨床試験データ管理学	准教授
	嶋澤 るみ子	同志社女子大学薬学部医療薬学科	専任講師

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 角膜全層の再生医療技術の開発および臨床応用に関する研究 . . . . . 1  
主任研究者 西田 幸二

## II. 分担研究報告

1. 角膜実質再生を目的とした配向積層型コラーゲンゲルの創製 . . . . . 9  
明石 満
2. 角膜全層の再生医療技術の開発および臨床応用に関する研究 . . . . . 13  
仲野 徹
3. 培養角膜内皮シートキャリアとしてのヒアルロン酸ゲルの開発 . . . . . 17  
田畑 泰彦
4. 電子顕微鏡を用いた人工角膜実質の構造解析 . . . . . 20  
竹花 一成
5. 再生医療技術の臨床応用を含めた橋渡し臨床試験のデザインに関する研究 . . . . . 22  
山口 拓洋
6. 角膜全層の再生医療技術の臨床プロトコール作成に関する研究 . . . . . 24  
嶋澤 るみ子、上 昌広、宮野 悟

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表一覧 . . . . . 27
2. 知的財産に関する一覧表 . . . . . 31

## IV. 研究班会議に関する報告書

1. 全体班会議  
第1回班会議プログラムおよび議事録 . . . . . 33
2. 分科会  
第1-5回角膜実質ミーティング議事録 . . . . . 36

# 総括研究報告

## 角膜全層の再生医療技術の開発および臨床応用に関する研究

主任研究者 西田 幸二 東北大学大学院医学系研究科 教授

### 研究要旨

重篤な角膜疾患に対して現在角膜移植が実施されているが、わが国では献眼数は絶対的に少なく、また他家組織による拒絶反応のため角膜移植が奏功しない。本研究では、自家細胞と人工材料を用いて全層性再生角膜を作製する技術を創出し、免疫抑制剤を必要としない安全性で有効な角膜再生治療法の開発を行い、臨床応用の実現化を目指している。3年計画の1年目にあたる本年は、自己細胞と動物由来成分を含まない GMP 準拠の製品のみを用いた培養上皮細胞シート作製法、架橋コラーゲンの線維配向を制御した人工角膜実質作製法、角膜内皮細胞シートのキャリアを提案し、角膜全層の再生医療の基盤となる技術を見出した。

### 分担研究者

仲野 徹 大阪大学大学院生命機能研究科 教授  
明石 満 大阪大学大学院工学研究科 教授  
田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所 教授  
竹花一成 酪農学園大学獣医学部 教授  
鈴木茂伸 国立がんセンター中央病院 眼科医長  
上 昌広 東京大学医科学研究所 准教授  
宮野 悟 東京大学医科学研究所 教授  
山口拓洋 東京大学医学部 助教  
嶋澤るみ子 同志社女子大学薬学部 講師  
田中裕次 東京大学医科学研究所 助教

### A. 研究目的

視覚は QOL の維持に極めて重要である。角膜疾患のため重篤な視覚障害にいたって失明した患者に対して、現在角膜移植が実施されている。しかし現在の角膜移植は献眼に依存しており、その献眼数は絶対的に少なく、多くの患者に対して直ちに移植手術を行うことは困難である。さらに、ステーブンスジョンソン症候群や角膜内皮疾患などの重篤

な疾患では、拒絶反応のため角膜移植が奏功しない。

そこで我々は拒絶反応の生じない角膜再生治療法の開発を進めてきた。角膜は角膜上皮、角膜実質、角膜内皮の三層に分かれるが、角膜上皮疾患に対してこれまで患者自身の角膜ないし口腔粘膜上皮の幹細胞を用いた培養上皮細胞シート移植の開発とその臨床応用に世界に先駆けて成功し、難治性角膜上皮疾患の根治的治療法の道を開いた (Nishida K et al, N Engl J Med 2004)。しかし、これまでの培養上皮細胞シート作製にマウス 3T3 細胞やウシ血清を用いることから、安全面の問題が懸念される。またコラーゲンを主成分とする角膜実質の疾患や角膜移植の対象疾患の第一位で予後の悪い角膜内皮疾患に対して、この培養上皮細胞シート移植は適応できない。そのため、角膜上皮、角膜実質、角膜内皮それぞれの再生医療技術の開発と臨床応用に関する更なる研究が望まれている。

3年計画の初年度に当たる本年は、角膜上皮、角膜実質、角膜内皮のパーツ毎に既往の技術の課題を

克服するための技術を提案し、角膜全層の再生医療技術の基盤を創出することを目的とした。角膜上皮については、プロセスの安全性を向上させるため、自己細胞をフィーダー細胞として用い、動物由来成分を含まないGMP準拠の製品のみを用いた培養上皮細胞シート作製法の開発を行うこととした。角膜実質に関しては、先行技術であるコラーゲンクロスリンクによる人工角膜実質作製法（Griffith M et al, Science 1999）を再現し、動物実験等により有効性を見極め、実用化に向けた独自技術による課題の克服を目指した。角膜内皮に関しては、これまで有力な候補がなかった他組織由来の細胞源を探索して角膜内皮に誘導する技術の開発と、移植時に用いるキャリアの検討を行うこととした。

## B. 研究方法

### 角膜上皮

新規フィーダー細胞の開発、新規プロセッシング方法の開発:我々は以前に培養口腔粘膜上皮細胞シート移植を臨床応用し、これまで難治とされていた角膜上皮幹細胞疲弊症に対して良好な治療成績を収めた。この方法は世界的に見ても画期的なものであり、再生医療の領域での重要な進歩であると考えられている。しかしながらマウス由来の細胞を使用しており、安全性の面から改善の余地のあるものであった。そこで皮膚由来の線維芽細胞を3T3細胞に変わるフィーダー細胞としての重要な候補と考え、皮膚線維芽細胞を用いて口腔粘膜上皮細胞シートを作成し、それを従来の3T3細胞をフィーダー細胞として作成した口腔粘膜上皮細胞シートと比較し検討した。また培地成分についてもその品質について安全性を保障するために医薬品を用いて作成し、これを培養に用いて検討した。さらには、臨床応用におけるプロトコルの作成を行った。

### 角膜実質

クロスリンクコラーゲンの再現とその有効性:角膜実質再生に関しては、基質と細胞の両面から国内外で競争的な研究が行われているが、臨床応用に達した例はない。M Griffithらのグループは架橋コラーゲンを基質として用い、唯一動物実験の結果を報告している。そこで、臨床応用の可能性と課題を検証するため、まずM. Griffithらの架橋コラーゲンを再現した。

### 角膜内皮

(1)線維柱帯細胞は角膜内皮細胞と同様に神経提由来であり、また、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る。そこで今回豚眼を用いて、線維柱帯細胞を単離、培養が可能か否かについて検討を実施した。

(2)単層である培養内皮シートは脆弱で移植時のハンドリングが困難であるため、安定した移植結果を得るには強度と透明性を有した基質が必要である。今年度は基質の開発として人工角膜実質再生の一貫として作製した架橋I型コラーゲンを培養内皮細胞シートの基質として用いることを検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験への配慮に関して:ヘルシンキ宣言、各施設動物実験指針、ARVO動物実験指針を遵守し、動物愛護の面を十分に配慮する。

臨床研究に関して:GCP基準、ヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針(平成16年厚生労働省告示59号)を遵守する。自家培養上皮細胞シート移植法の臨床応用に関しては、既に東北大学病院の倫理委員会の承認を得ている(添付)。当研究は「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に従って行われる。角膜内皮と実質の再生の臨床研究を始める場合は、ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針に準拠し、倫理委員会の承認を得た後、厚生労働省の承認を得る。不測の事態が生じた時には、実施

施設長、厚生労働省に報告する。

**被検者の同意の取得、プライバシーなど**：被験者は、本研究について文書により説明を受け、その内容と期待される効果および合併症、危険性についてインフォームドコンセントを得た上で、同意書に署名、捺印を得た者とする。患者の意思を最重要視して本研究への参加を決定する。また患者に対して、本研究を拒否した場合でも最善の方法を持って対処する。同意書に署名した後であっても拒否することが出来る。この手術を受けた被験者のプライバシーは保護する。手術に関する情報は被験者の同意なしには公表しない。その効果について客観的に被験者に告知する。被験者に不利益が生じた場合、被験者に状況を正確に知らせると共に、ただちにこの研究を中止する。そして、その状況に合わせて現在行われている最善の方法をもって対処する。

## C. 研究結果

### 角膜上皮

**皮膚線維芽細胞のフィーダー効果の検討 (コロニーアッセイ)**：直径 3mm のヒト皮膚組織を採取し、皮膚線維芽細胞を培養した。これに放射線照射を行い、増殖を停止させた後にフィーダー細胞として用いた。ヒト口腔粘膜および輪部上皮細胞を用いて、皮膚線維芽細胞と 3T3 細胞をフィーダー細胞とした系とコロニーアッセイでフィーダー効果を比較したところ、コロニー数は 3T3 細胞をフィーダー細胞として用いた系がやや多かったが、コロニーサイズは皮膚線維芽細胞をフィーダー細胞とした系のほうが多かった。このことから、ヒト皮膚線維芽細胞は 3T3 細胞と同等のフィーダー効果を有していることが示唆された。

**ヒト口腔粘膜上皮細胞シートの作成とバリデーション**：局所麻酔下にて口腔粘膜を 3mm 径で採

取し、デイスパーゼ処理とトリプシン処理を行って cell suspension とし、皮膚線維芽細胞をフィーダーとして温度応答性培養皿上で培養した。細胞の回収時には 20℃ で 30 分程度低温処理することで細胞をシート状のまま回収することができた。

皮膚線維芽細胞を用いて作成した口腔粘膜上皮シートは 3T3 細胞を用いて培養した口腔粘膜上皮シートと品質が同等であることが、ヘマトキシリンエオジン染色、シートの総細胞数、免疫染色 (K3、K10、ZO-1、p63、MUC-16)、FACS 解析による生細胞率、上皮細胞純度などから示された。

両シートともに重層化した細胞シートであり、基底部には未分化な小型の細胞と表層には分化したやや大きく扁平な細胞を認めた。

以下の点について線維芽細胞をフィーダーとしても 3T3 細胞をフィーダーとしても口腔粘膜上皮シートの質に違いがないことを免疫染色で確認した。

ケラチン 3 は角膜上皮に特異的に発現している。ケラチン 10 は角化上皮に発現しており、口腔粘膜上皮シートには発現していない。P63 は上皮の幹細胞マーカーであり、上皮基底部に発現している。ZO-1 はタイトジャンクションを構成する膜蛋白であり、最表層細胞間に発現している。MUC-16 は膜貫通型のムチンであり、最表層細胞に発現している。

両シートともに生細胞率は 80% 以上であり、高率であることが示された。

**臨床プロトコールの作成**：臨床試験にて必要とされる標準操作手順書やプロトコールの作成を、分担研究者である宮野、上、嶋澤、山口らと行った。

### 角膜実質

**クロスリンクコラーゲンの再現と透明性**：数々の動物実験結果が報告されている架橋コラーゲンは、シリンジを用いて角膜と同程度の

高濃度ブタ皮膚由来コラーゲン (10~20%) 水溶液を強制的に攪拌しながら化学架橋する手法で (May Griffith, IOVS, 2006,) に示す様な透明な架橋コラーゲンを作製することができた。その可視光透過率は摘出した兎角膜やブタ角膜を上回っており十分な透明性を有していた。

クロスリンクコラーゲンの角膜由来細胞親和性: 架橋コラーゲン作製法では EDC と NHS を用いてカルボキシル基とアミノ基をペプチド結合させるが、架橋処理後もコラーゲン分子が持つ細胞親和性が維持されるかを確かめるため、家兎角膜細胞の培養を行った。架橋コラーゲン上で角膜上皮、角膜実質、角膜内皮細胞をそれぞれ培養したところ、良好な接着性、伸展性を示し、化学架橋を施してもコラーゲンが本来有する細胞親和性に寄与する分子構造が失われていないことが明らかになった。

ヒト角膜実質への構造の近似による機能改善 (特許出願中): 靭帯など、強度画筆用とされる組織のコラーゲン線維の走行は一定方向に配向している。そこで、架橋コラーゲンの線維配向を制御する方法を開発した (特許出願中)。走査型電子顕微鏡でコラーゲン表面を観察したところコラーゲン線維が一定方向に配向していた。

また、乾燥時の収縮特性等から線維方向がゲル全体に渡って一定方向に配向していることが示唆されている。

この線維配向ゲルの縫合糸 (10/0 ナイロン) に対する引張り強度は、線維の配向方向に弱いという特性を持っている。配向ゲルの線維方向にそれぞれ縫合糸をかけ、未配向ゲルと強度を比較したところ、未配向ゲルよりも 15% 程度良好な強度特性を示した。

さらにこの線維配向ゲルを用いて、家兎角膜表層への移植に試みた。15 糸まで縫合を行い、4

糸の結び目の埋没まで行うことができた。

#### 角膜内皮

1) 線維柱帯細胞を細胞源とした角膜内皮再生に関する検討

線維柱帯細胞の単離・培養: 豚眼から鑷子を用いて線維柱帯を単離し、Explant 法にて培養を行った。培養 2 日目より細胞は outgrowth し、増殖していることを確認した。線維柱帯細胞であることを検証するために、線維柱帯に特異的な LDL 染色法を用いた。その結果、線維柱帯組織下の細胞が DiI 染色されており、培養細胞が線維柱帯細胞であることが確認できた。

2) 培養内皮の基質の検討

架橋コラーゲンは透明性で、摂氏でのハンドリングにも十分に耐えうる強度を備えている。ヒト角膜内皮細胞を架橋 I 型コラーゲン上に播種したところ、IV 型コラーゲンコートディッシュ上と同等の良好な接着性、伸展性、増殖性を示し、2 週間後には内皮様の形態を呈することを確認した。以上のより、架橋 I 型コラーゲン上でも培養内皮を作製可能であり、基質として利用できる可能性が示唆された。

さらに眼科領域にて既に医療応用されているヒアルロン酸を原料とした角膜内皮キャリア用の細胞シートも開発している。角膜内皮細胞の接着性に問題があり、現在改良中である。

#### D. 考察

角膜上皮については、ヒト皮膚線維芽細胞がマウス 3T3 細胞と同等のフィーダー効果を得ることが分かったが、このことにより、異種細胞を使わない自家培養上皮シート移植が可能となった。この発見はわれわれの開発した培養上皮シート移植法において全てを自家細胞で行うことが可能となったという点で非常に重要な知見である。今後は、作成した標準操作手順書および臨床プロトコールに基



づいて、幹細胞を用いる臨床研究に関する指針への申請を行う必要があると考えている。

角膜実質については、透明性については正常角膜を上回るほど良好な光透過性を得ることができたが、再現した架橋コラーゲンゲルは非常に強度が弱く、縫合糸で引っ張ると糸を引いた方向にゲルが切断されるという問題点が判明した。4/0 ナイロンで引っ張り強度の定量をしたところ、ヒト角膜の100分の1以下の強度しか有しておらず、現状のままでは移植に耐えられない。しかし、コラーゲン線維の配向性を一定にしたり、ゲルを積層化することによって強度が増強する知見をみいだすことはできた。しかしいくつかの課題があり、次年度以降で解決する必要がある。

角膜内皮については、生体から取り出した未分化細胞の検討を進めていく必要がある。角膜内皮は単層の細胞であるため、内皮のみを移植するにはキャリアが必要となることが予想されるため、I型コラーゲンゲルや新規のヒアルロン酸シートなどの検討および移植方法についても今後は研究をすすめていく必要がある。

## E. 結論

角膜上皮については、皮膚線維芽細胞は3T3細胞と同等のフィーダー効果があるということが示された。自己由来の皮膚線維芽細胞をフィーダー細胞として用いることで、異種由来の3T3細胞を用いることによる未知の病原体の感染などのリスクを回避することが出来る。よって、皮膚線維芽細胞はフィーダー細胞として有力であると考えられた。また医薬品を用いた培地を用いても培養移植に用いるのに十分なシートを作成できることが証明された。さらには、皮膚線維芽細胞を用いた培養上皮移植法についての標準操作手順書および臨床プロトコルの作成を行った。

角膜実質については、架橋I型コラーゲンゲルに

よって十分な透明性をもつシートが得られることが示された。しかしながら、強度不足の問題があり、本年度はコラーゲンの配向制御や積層化などによる改善を行い成果を得たが、いまだ角膜移植を問題なく行えるほどの強度はなく、次年度以降のさらなる改善が必要である。

角膜内皮については、候補となる細胞源とキャリアの研究を行った。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hayashi R, Yamato M, Saito T, Oshima T, Okano T, Tano Y, Nishida K: Enrichment of corneal epithelial stem/progenitor cells using cell surface markers, integrin alpha6 and CD71. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Mar 7;367(2):256-63.
- 2) 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. *2007 Stem Cells.* 25:289-296.
- 3) Hori Y, Sugiyama H, Soma T, Nishida K: Expression of membrane-associated mucins in cultivated human oral mucosal epithelial cells. *2007 Cornea.* 9:65-69.
- 4) 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. *2007 Exp Eye Res.* 85:772-781.
- 5) 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. *2007 Biomaterials.* 28:745-749.
- 6) Murayama K, Kimura T, Tarutani M, Tomooka M, Hayashi R, Okabe M, Nishida K, Itami S, Katayama I,

Nakano T: Akt activation induces epidermal hyperplasia and proliferation of epidermal progenitors. 2007 Oncogene. 26:4882-8.

7) Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Inoue E, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Kimura T, Nakano T, Ogura A, Shinohara T: Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. 2007 Development. 134:1853-1859.

## 2. 学会発表

1) 西田幸二：角膜疾患の治療の進歩、第 112 回 広島県眼科医会講習会、ホテルグランビア広島、2007 年 4 月 1 日.

2) 西田幸二：角膜混濁、日本眼科医会第 53 回 生涯教育講座、名古屋市中小企業振興会館、2007 年 4 月 14 日.

3) 西田幸二：角膜手術の進歩、栃木県眼科集談会、自治医科大学研修センター、2007 年 4 月 15 日.

4) 西田幸二：角膜ジストロフィ、第 111 回日本眼科学会総会 「シンポジウム 16:」、大阪国際会議場、2007 年 4 月 20 日.

5) 西田幸二：角膜内皮の診かた、第 111 回日本眼科学会総会 「教育セミナー9」、大阪国際会議場、2007 年 4 月 22 日.

6) Nishida K: Middle sized Animal Model of Retinal Degeneration, ARVO 2007 「Retinal Degeneration」, Fort Lauderdale Convention Center, 2007/5/9

7) 西田幸二：医工連携による角膜再生治療法の開発と臨床応用、大阪大学医学部、2007 年 5 月 25 日.

8) 西田幸二：角膜診療のステップアップ講座 II、東北 6 大学眼科 Step Up セミナー、盛岡グランドホテル、2007 年 5 月 26 日.

9) 西田幸二：角膜移植の進歩、第 38 回北陸東海ブロック講習会、福井商工会議所ビル、2007 年 6 月 3 日.

10) 西田幸二：角膜再生医療の現在と未来、チバビジョン 第 13 回ビジョンフォーラム、品川ストリングスホテル、2007 年 6 月 5 日.

11) 西田幸二：症例から学ぶ角膜疾患の診断、角膜診療座談会、ホテル仙台プラザ、2007 年 6 月 15 日.

12) 西田幸二：実用化されている角膜の再生医療、柴田郡医師会学術講演会、サンシャイン青葉(柴田町船岡)、2007 年 6 月 27 日.

13) Nishida K: Recent Advance of Corneal Surgery, The 8th Qingdao International Symposium of Ophthalmology, Qingdao, China, 2007/6/30.

14) 西田幸二：角膜疾患の治療の進歩、北海道眼科医会生涯教育講座プログラム、ホテルロイトン札幌、2007 年 7 月 14 日.

15) 西田幸二：スリット所見・見方、第 45 回北日本眼科学会 インストラクションコース、新潟コンベンションセンター、2007 年 7 月 28 日.

16) 西田幸二：加齢性の眼の病気と最新の治療について、第 413 回 市民医学講座、仙台市急患センター・仙台市医師会館、2007 年 8 月 23 日.

17) 西田幸二：角膜診療の最近の話題、東北ブロック特別講習会、宮城県眼科医会、2007 年 8 月 25 日.

18) 西田幸二：角膜上皮、角膜内皮の再生医療、バイオメディカル 講義、東京女子医大 先端生命医学研究所、2007 年 9 月 22 日.

19) 西田幸二：角膜手術の進歩—基礎診療から応用まで、第 77 回明交会総会、京都府立医科大学眼科学教室、2007 年 9 月 23 日.

20) 西田幸二：角膜の再生医療、オキュラーサーフィスシンポジウム 大阪、ホテル阪急インターナショナル、2007 年 9 月 27 日.

21) 西田幸二：角膜の再生医療、オキュラーサーフィスシンポジウム 東京、秋葉原コンベンションホール、2007 年 9 月 29 日.

22) 西田幸二：角膜治療のアップデート、第113回青森眼科集談会、弘前市医師会館、2007年9月30日。

23) 西田幸二：安全なフィーダー細胞の開発による角膜再生治療の最前線、第5回医療機器フォーラム、東京 コンファレンススクエア、2007年10月27日。

24) 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、東京 丸ノ内マイプラザホール、2007年11月17日。

25) 西田幸二：角膜手術の進歩、第13回愛媛県眼科学術講演会、愛媛県医師会館、2007年11月18日。

26) 西田幸二：再生医療で視力を甦らせる、再生医療が実現する高齢社会のQOL、日本プレスセンター10階ホール、2007年12月8日。

27) 西田幸二：角膜疾患の最近の話題、第7回東北大OB勉強会、郡山ビューホテル、2007年12月18日。

28) 西田幸二：角膜の再生医療、バイオマテリアル学会東北地域講演会、東北大学金属材料研究所講堂、2007年12月21日。

29) 西田幸二：幹細胞研究と角膜再生医療、21世紀COE公開シンポジウム「再生医療を実現する細胞シート工学-基礎から臨床へ-工学と医学の融合」、東京女子医大 弥生記念講堂、2008年1月31日。

### 3. 新聞・テレビ等による報道

1) コラーゲンで人工角膜作製、日経産業新聞、1および11面、2008年1月17日

2) 口腔粘膜から角膜再生、東京新聞・中日新聞、2007年12月4日

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1) 特願 2008-071677・西田幸二、大家義則・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 日本・国立大学法人東北大学・2008年3月19日、出願中

2) 特願 2007-339635・明石 満、西田幸二、松崎典弥、本郷千鶴、田中佑治、久保田享・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 日本・国立大学法人大阪大学、国立大学法人東北大学・2007年12月28日、出願中

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

# 分 担 研 究 報 告

## 角膜実質再生を目的とした配向積層型コラーゲングルの創製

分担研究者 明石 満 大阪大学大学院工学研究科 教授

### 研究要旨

献眼数の不足や拒絶反応のため角膜移植ができない重篤な疾患に対して自家細胞と人工材料を用いた角膜全層を作製する再生医療技術の創出が望まれている。角膜全層の中で最も厚くその大半を占める実質層は、コラーゲンが複雑な階層構造をとりながら整然と並び、透明性と強度を維持している重要な層である。複雑な高次構造の再現が困難なため、これまで人工実質層の構築と臨床応用に成功した例は皆無である。本研究では、実質層の構造を限りなく再現し、透明かつ高強度なコラーゲングルの開発と臨床応用を目的とした。3年計画の1年目にあたる本年度は、コラーゲン線維を簡便な手法で一軸方向に並べ、透明なゲルを作成する手法を考案した。また、このゲルを積層させることで、実質層類似の積層構造を構築した。移植時の縫合にも耐えうる強度と高い透明性を兼ね備えた配向積層型のコラーゲングルの作成に成功した。

### A. 研究目的

拒絶反応のない人工角膜の創出は視覚障害を持つ患者のQOLの改善に極めて重要である。

これまで、細胞シート作成技術を応用し、角膜上皮や内皮の研究が行われ培養上皮細胞シート移植の臨床応用が成功している。(Nishida K, et al. N. Engl. J. Med. 2004)。

しかしながら、上皮や内皮に比べて角膜実質再生に関する研究は非常に遅れている。角膜実質は角膜全層のうち最も厚く、角膜の90%を占め、細胞は少なく、コラーゲンを主成分とする層である。コラーゲン線維がその線維径をそろえて、一軸方向に規則正しく並び、配向した薄い層を形成する。その層に対し直行した層が積層し、200層以上の積層構造(ラメラ構造)を構築することで高い透明性と、物理的強度を保持していると言われている。このため、上皮や内皮に適応された細胞シートを応用すること

は難しい。

これまでに開発されている人工角膜実質はその強度や透明度を実現することが困難であり、移植後に脱落してしまうということが問題となっている。最も研究が進んでいるのはGriffithらが考案しているコラーゲングルを用いる方法(Liu Y, et al. IOVS. 2006)であるが、角膜実質のラメラ構造を構築できず、物理的強度は低い。透明性と移植時の縫合や眼圧に耐えうる物理的強度を有し、安全かつ高機能のコラーゲンマテリアルの開発が必要不可欠である。

そこで、コラーゲンを線維化し、架橋する際にゲル中のコラーゲン線維の線維構造や配向性を制御して角膜実質類似の層状構造を再現することを目指し、生体角膜実質と同程度の透明性と強度、物質輸送能などを保持した高機能のコラーゲンマテリアルを創製することを目的とした。

3年計画の初年度に当たる本年は、人工角膜実質の開発に関する既往の技術では克服できていないコラーゲン線維の構造や緻密な層構造の構築を目指し、透明かつ高強度のコラーゲンゲルの開発を目的とした。

具体的にはアレルギー反応を起こしやすい抗原基を取り除いたアテロコラーゲンを用いて、安全性の高い架橋剤を用いてコラーゲン線維間を架橋することによりゲル化を行う。線維構造や高濃度のコラーゲン溶液の粘性に着目し、一定方向にコラーゲン線維を並べ、配向させる。さらに90度向きを変えて積層することを繰り返すことによってコラーゲン実質層類似のラメラ構造を持つ配向積層型のコラーゲンゲルを作成する。

得られたコラーゲンゲルの透明性や強度、ゲル中でのコラーゲン線維の配向や線維径、積層構造を解析し、改良を繰り返して、高強度、高機能のコラーゲンゲル作製技術を確立する。

## B. 研究方法

酸抽出してアテロ化され凍結乾燥された日本ハム製 Type I コラーゲン(Type III コラーゲンを約5%含む)をシリンジ内で酢酸バッファーに溶解し、遠心分離機を用いて溶液中の気泡を取り除いた。三方活栓につないだ2本のシリンジ内で気泡の混入を防ぎながら NaOH を加えて攪拌し、コラーゲン濃度 14 wt % に調整した。縮合剤の 1-ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl)carbodiimide (EDC) とカルボキシシルキ活性剤の N-hydroxysuccinimide (NHS) を混合した水溶液を架橋剤としてコラーゲン溶液に添加して、溶液をガラス基板上に押し出し、もう一枚のガラス基板で挟んで流延した。

24時間の架橋後、上部のガラス基板を剥がし、上記の方法で新たに調整したコラーゲン溶液を1層目のゲルの上に流延した。

層内のゲルの配向をイメージングプレートを備えた回折装置(Rigaku 製 Rapid LS (X線 CuK $\alpha$ ))を用いてX線回折法により確認した。UV測定により可視光(波長 400~700 nm)の透過率を測定し、ゲルの透明性を定量した。力学強度を測定するため引張試験を行った(SIMAZU 製 EZ-test)。

## (倫理面への配慮)

動物実験への配慮に関して：該当なし。

臨床研究に関して：該当なし。

被検者の同意の取得、プライバシーなど：該当なし

## C. 研究結果

本手法により作成したゲル(厚さ 500  $\mu$ m)を直径 8 mm の正円の抜き型で打ち抜いたものを図1に示した。一定方向に流延してゲル化したものは長軸が 9 mm、短軸が 6 mm の楕円形に変形した(a)。一方で方向を定めずにガラス基板に押し出してゲル化したものは変形することなく、直径 8 mm の円型であり(b)、ゲルは半年以上、生理食塩水中で保存してもその形を保っていた。これらのゲルの X 線回

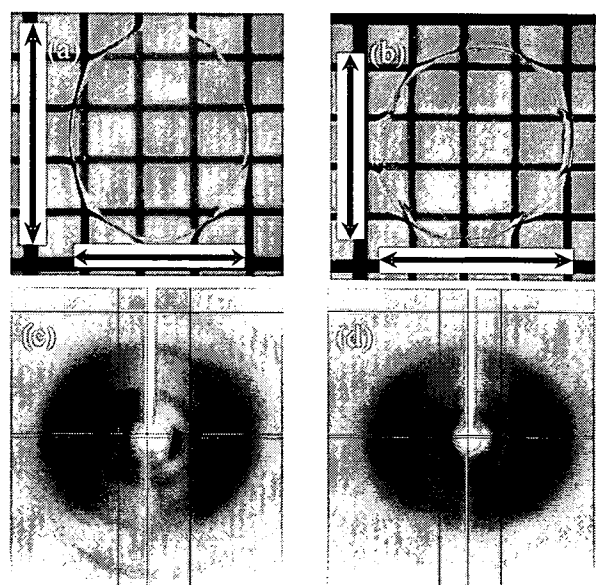


図1 配向性および無配向性コラーゲンゲルの光学顕微鏡像 (a, b)と X 線回折像(c, d)

折像をそれぞれ(c)、(d)に示した。どちらも、青い線のクロスポイントが 0.29 nm であり、赤い線のクロスポイントが 1.5 nm の回折周期を示している。厚さ 100  $\mu\text{m}$  に調製したコラーゲンゲルの UV 測定を行った結果、可視光の透過率は 70%以上であった。一定方向に押し延ばした配向性ゲルを線維の配向に対して平行な方向と垂直な方向に引張試験を行った。また、方向を定めずに押し延ばした無配向性のゲルの引張試験を行った。それぞれの応力-ひずみ曲線を図 2 に示した。

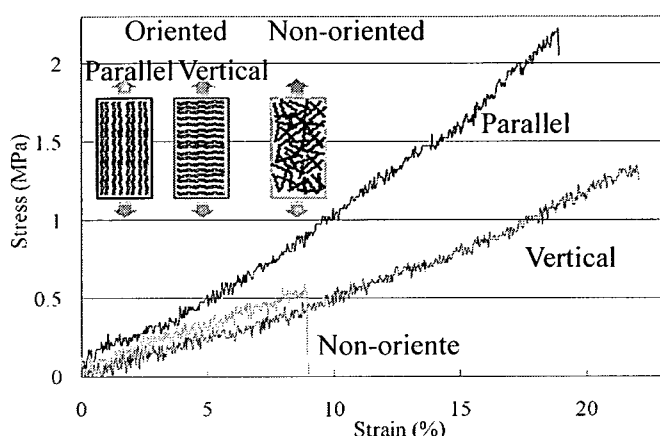


図 2 配向性および無配向性ゲルの引張試験による応力ひずみ曲線

#### D. 考察

一定方向に押し延ばしてゲル化したコラーゲンゲルは正円の抜き型で打ち抜いたにもかかわらず、楕円形に変形した。このことから、ゲル中のコラーゲン線維が一定の方向に向きを揃えていると推測した。

調製したゲルの X 線回折測定の結果、方向を定めずに押し延ばした(d)に比べて一定方向に押し延ばしたゲル(c)の回折パターンは円弧が狭く、より配向していることが考察できた。一般に、通常のコラーゲンゲルでは線維が無配向ため回折パターンは円形(デバイシェラー環)として得られるが、線維が配向すると回折パターンも配向する。(d)は環状

のパターンを示しており配向性が低い(c)は円弧の幅が狭く、高い配向性を示している。驚くべきことに(c)の回折パターンはラットやカンガルーなどの尻尾やアキレス腱などから切り出した天然コラーゲンに特徴的なパターンとも非常に類似しており、天然コラーゲンの線維構造に近い高次構造を形成していると考えられる。(Hongo C. et al, Chem. Lett. Submitted.)

UV 測定の結果、70%以上の可視光透過率を有しており、これまでに報告されているゲルと同程度の透過率を達成できていることが確かめられた。

配向性ゲルの線維方向に平行の引張強度は無配向性ゲルの 4 倍の引張強度を示した。配向させることで機械強度を向上させることが明らかとなった。また、引張強度は繊維方向に依存しており、線維に平行な引張強度は垂直方向に比べて高い値を示した。つまり、配向方向を変えながら積層するラメラ構造が物理的強度に重要であることを示唆している。

#### E. 結論

コラーゲン線維の配向を制御し、積層することで、高強度と高い透明性を併せ持つ配向積層型のコラーゲンヒドロゲルを作成することに初めて成功した。

本手法は高濃度のコラーゲン溶液を一定方向に押し延ばすだけで簡便にコラーゲン分子を配向し、向きを変えて積層することで、生体内の角膜実質のラメラ構造に類似した構造を再現できる新規の手法である。従来手法では達成できていない高い透明性と機械強度を併せ持つコラーゲンゲルの作成手法を確立できた。

X 線回折による線維構造の解析により、天然コラーゲンの線維構造に近い高次構造と高い配向性をもつコラーゲンゲルであることが確認できた。

配向させることによって物理的強度を 4 倍も高

めることに成功し、薄くても非常にハンドリングしやすいゲルを作成できた。

今後は配向積層ゲルの構造解析を行い、構造と物性の相関を調べ、更なる改良を加えて臨床応用可能なコラーゲンバイオマテリアルを創出することを目指す。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hongo C, Matsusaki M, Nishida K, Akashi M: Development of Collagen Hydrogel with High Mechanical Strength by a Simple Molecular Orientation Method. Chem. Lett. Submitted.

### 2. 学会発表

- 1) Hongo C, Matsusaki M, Tanaka Y, Nishida K, Akashi M: Development of Layered Collagen Gel with Orthogonal Molecular Orientation, The 8th World Biomaterials Congress, オランダ アムステルダム, 2008年5月28日～6月1日.

### 3. 新聞・テレビ等による報道

- 1) コラーゲンで人工角膜作製、日経産業新聞、1および11面、2008年1月17日

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

- 1) 特願 2007-339635・明石 満、西田幸二、松崎典弥、本郷千鶴、田中佑治、久保田享・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  
日本・国立大学法人大阪大学、国立大学法人東北大学・2007年12月28日、出願中

### 2. 実用新案登録

なし



## 角膜全層の再生医療技術の開発および臨床応用に関する研究

分担研究者 仲野 徹 大阪大学大学院生命機能研究科 教授

### 研究要旨

Wnt、 $\beta$ -catenin、Notch、など、いろいろな種類の幹細胞に共通するシグナルが報告されている。我々は、PI3K (phosphoinositide 3 kinase) および、その下流にあるセリン・スレオニンキナーゼである Akt がその一つであることを示し、機能解析を精力的におこなってきた。今回、その機能を詳細に解析するため、Akt の活性をコンディショナルに制御できる Akt-MER 融合蛋白を発現するトランスジェニックマウスを利用し、皮膚上皮の幹細胞システムにおける Akt シグナルについての解析をおこなった。その結果、Akt シグナルは、幹細胞の自己複製と分化のいずれをも促進することが明かとなった。この方法は、角膜上皮の幹細胞制御にも応用できる可能性がある。

### A. 研究目的

PI3K/Akt シグナルは、様々な増殖因子や接着因子により活性化され、細胞の増殖や生存、移動を促進するシグナルである。我々は、これまでに、PI3K/Akt シグナルの活性化が、マウスおよび霊長類において、胚性幹細胞 (ES 細胞) の分化多能性を支持すること、始原生殖細胞が多能性幹細胞である胚性生殖細胞 (EG 細胞) へ脱分化するのを促進すること、を示してきた。これらの結果は、PI3K/Akt シグナルが、多能性幹細胞システムにおいて、分化多能性を支持するシグナルであることを示している。一方、より制限された分化能をもつ組織の幹細胞においては、PI3K/Akt シグナルのもつ機能について不明な点が多く、これが明らかになれば、PI3K/Akt シグナル伝達を操作することにより、組織幹細胞を人為的に制御できる可能性がある。

生体の各組織には、それぞれの組織に特有の分化多能性をもつ幹細胞が存在する。組織の幹細胞システムは、幹細胞を頂点とするヒエラルキー構造を

もつ。組織幹細胞は、普段は休止期にあるが、適度な刺激や組織の損傷などにより活性化し、高い増殖能をもつ前駆細胞を産生する。この前駆細胞は、徐々に分化多能性を失いながら増殖し、最終分化した細胞をつくる。

皮膚上皮には、少なくとも2種類の幹細胞システムが存在する。1つは、毛包間上皮の基底層に存在し、活発に増殖する前駆細胞を産生することで、上皮の階層構造を保持する。もう1つは、毛包のバルジに存在する幹細胞で、毛包を形作るすべての細胞に分化する能力をもつ。毛周期は、休止期、成長期、縮退期のサイクルから構成され、毛周期が、休止期から成長期へ移行することで、発毛が誘導される。この移行の際、休止期にある毛包幹細胞は活性化され、高い増殖能をもつ前駆細胞を産生する。

角膜組織は、発生学的に顔面の上皮に由来するため、皮膚上皮と似た性質をもつ。本研究の目的は、皮膚上皮幹細胞システムにおける PI3K/Akt シグナルの機能を理解し、その成果を角膜上皮幹細胞の人

為的制御へ応用することにある。本年度は、皮膚上皮細胞において、Akt シグナルを活性化させ、それが毛包間上皮および毛包の幹細胞システムに及ぼす影響を解析することで、皮膚上皮細胞における PI3K/Akt シグナルの機能を明らかにした。

## B. 研究方法

皮膚上皮細胞において Akt シグナルをコンディショナルに制御するために、Akt-MER 融合タンパクを発現するトランスジェニックマウス (Akt-MER マウス) を作製した。Akt-Mer は、活性化型 Akt と変異型エストロゲン受容体 (MER) との融合タンパクである。MER のリガンドである 4-hydroxytamoxifen (4OHT) の非存在下では、Akt-MER はリン酸化酵素活性を示さないが、4OHT の添加により、速やかにリン酸化酵素活性が誘導できる。全身で発現する CAG プロモーターをもちいて、Akt-MER を発現する Akt-MER マウスを作製した。この Akt-MER マウスの皮膚に、4OHT を塗布することにより、Akt の活性化が、毛包間上皮および毛包の幹細胞システムに与える影響を解析した。コントロール群として、4OHT を塗布した野生型マウス、および、4OHT の溶剤であるエタノールを塗布した Akt-MER マウスを用いた。

マウスの毛周期は、生後しばらく同調しており、6 週齢に休止期に入り、その後 3 週間は休止期の状態を維持することが知られている。したがって、6 週齢で、野生型マウスの背部を剃毛すると、その後 3 週間発毛が誘導されることはない。6 週齢で剃毛した Akt-MER のマウスに、4OHT を塗布し、Akt の活性化が皮膚上皮組織に与える影響を組織学的に解析した。また、そのとき発毛が誘導されるかどうかをみることで、Akt シグナルの活性化が、毛包幹細胞システムに与える影響を調べることができる。

幹細胞システムの動態に与える影響は、組織学

的解析に加えて、フローサイトメーターを用いた解析、および、コロニーアッセイにより調べた。皮膚上皮細胞は、CD34 と  $\alpha_6$ -integrin の発現により、幹細胞画分 (CD34<sup>+</sup>:  $\alpha_6$ -integrin<sup>high</sup>) と前駆細胞画分 (CD34<sup>+</sup>:  $\alpha_6$ -integrin<sup>low</sup>) に分けることができる。4OHT 処理後の皮膚上皮細胞を採取し、それを CD34 と  $\alpha_6$ -integrin の抗体で染色することで、幹細胞と前駆細胞画分の動態を解析した。また、それぞれの細胞画分をソーティングして回収し、フィーダー細胞上で培養すると、幹細胞や未分化な前駆細胞は holoclone という未分化細胞からなる大きなコロニーを形成する。この holoclone 形成効率を調べることで、実際の幹細胞および前駆細胞の数を定量した。

### (倫理面への配慮)

動物実験への配慮に関して: ヘルシンキ宣言、各施設動物実験指針、ARVO 動物実験指針を遵守し、動物愛護の面を十分に配慮した。

## C. 研究結果

6 週齢で剃毛した Akt-MER のマウスに、4OHT を塗布すると、3 週間以内に、全例で発毛が観察された。組織学的解析をおこなったところ、毛包間上皮および毛包の過形成、毛幹部の真皮側への伸長が認められた。このような変化は、4OHT を塗布した野生型マウス、エタノールを塗布した Akt-MER マウスでは認められなかった。この結果は、Akt の活性化が、休止期の毛包幹細胞を活性化し、成長期へと移行させたことを示している。

増殖マーカーである Ki67 抗体を用いた免疫組織染色をおこなったところ、4OHT を塗布した Akt-MER マウスの毛包間上皮においては、基底層で、Ki67 陽性細胞の数が有意に上昇していた。また、毛包においては、毛周期の成長期に前駆細胞が盛んに増殖をおこなう外毛根鞘 (ORS: outer root

sheath) において、多くの Ki67 陽性細胞が認められた。一方、コントロール群の毛周期は休止期にあるので、ORS に Ki67 陽性細胞は認められなかった。

次に、皮膚上皮細胞を採取し、CD34 と  $\alpha_6$ -integrin 抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した。4OHT を塗布した Akt-MER マウスでは、コントロール群と比較して、幹細胞画分 (CD34<sup>+</sup>:  $\alpha_6$ -integrin<sup>high</sup>) の割合に変化は認められなかったが、前駆細胞画分 (CD34<sup>+</sup>:  $\alpha_6$ -integrin<sup>low</sup>) の割合は有意に上昇していた。さらに、これらの画分をソーティングしコロニーアッセイをおこなったところ、前駆細胞画分の hololone 形成効率が有意に上昇していた。一方、幹細胞画分の hololone 形成効率には、変化は認められなかった。以上の結果から、Akt シグナルの活性化は、毛包間上皮の基底層、毛包の ORS において、前駆細胞の増殖を促進することが示された。

#### D. 考察

幹細胞システムは、幹細胞自身を増幅する「自己複製能」と、前駆細胞を産生することで多種類の分化細胞を生み出す「分化能」により成立している。我々は、これまでに、ES 細胞や始原生殖細胞といった多能性幹細胞システムにおいて、PI3K/Akt シグナルは、幹細胞の自己複製を促進し、分化を抑制するシグナルであることを示してきた。一方、本研究において、皮膚上皮幹細胞システムでは、Akt シグナルは、休止状態にある毛包幹細胞を活性化することで前駆細胞を産生すること、毛包間上皮と毛包において前駆細胞の増幅を促進することを明らかにした。

最近、皮膚上皮以外の組織幹細胞システムにおける PI3K/Akt シグナルの機能が、PI3K に拮抗する脱リン酸化酵素 PTEN (phosphatase and tension homolog deleted on chromosome 10) の欠損マウスを用いた解析から報告されている。例えば、造血幹細胞

において、PTEN を欠損させることで PI3K/Akt シグナルを亢進させると、造血幹細胞の異常増殖がおり、その結果、幹細胞が枯渇する。また、腸管上皮細胞において、PTEN を欠損させると、腸管上皮の幹細胞と前駆細胞の増殖が活発になり、陰窩が新生する。

以上のように、PI3K/Akt シグナルの作用には、多能性幹細胞システムと組織幹細胞システムにおいて、共通の作用と異なる作用があることが明らかとなりつつある。すなわち、両幹細胞システムにおいて、PI3K/Akt シグナルは、幹細胞の自己複製を促進する。一方、細胞分化については、PI3K/Akt シグナルは、多能性幹細胞システムにおいては、分化を抑制するのに対して、組織幹細胞システムにおいては、前駆細胞の産生・増幅を誘導し、分化を促すシグナルとしても機能する。

#### E. 結論

本研究では、皮膚上皮幹細胞システムにおける PI3K/Akt シグナルの機能解析をおこなった。そのために、Akt のリン酸化酵素活性を自在に制御できる Akt-MER マウスを用いて、Akt シグナルの活性化が皮膚上皮幹細胞システムに与える影響を調べた。まず、Akt シグナルは、休止期の毛包を成長期へと移行させることを見出した。この結果は、Akt シグナルにより休止状態にある毛包幹細胞が活性化し、高い増殖能と分化能をもつ前駆細胞を産生したことを示している。次に、Akt シグナルは、基底層と ORS において前駆細胞の増殖を促進し、毛包間上皮と毛包の過形成を引き起こすことを示した。これらの結果より、PI3K/Akt シグナルは、幹細胞の増幅と分化のいずれをも促進することが明らかとなった。さらに、この結果は、PI3K/Akt シグナルが、組織幹細胞と多能性幹細胞において異なる機能をもつことも明らかにしたものである。

熱や化学腐食、眼表面の疾患により角膜幹細胞

が障害を受けた患者には、アイバンク眼を用いた角膜移植が有効であるが、拒絶反応は生じるため、治療成績は不良である。それに替わる技術として、患者自身の角膜幹細胞を少量採取し、培養条件下で上皮シートを作製し、患者に戻すという方法が開発されている。したがって、培養条件下で、少数の角膜幹細胞を効率よく増幅する方法の開発が重要な課題の1つとなる。

皮膚組織と角膜組織は、ともに上皮細胞に由来する組織であり、その幹細胞システムの制御機構についても共通の部分が多いと考えられる。本研究で、我々は、PI3K/Akt シグナルを人為的に活性化させると、皮膚上皮の幹細胞と前駆細胞を増幅させることができることを示した。したがって、人為的にPI3K/Akt シグナルを操作することにより、限られた数の角膜の幹細胞や前駆細胞を、培養条件下で増幅できる可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Murayama K, Kimura T, Tarutani M, Tomooka M, Hayashi R, Okabe M, Nishida K, Itami S, Katayama I, Nakano T Akt activation induces epidermal hyperplasia and proliferation of epidermal progenitors. *Oncogene*, 26:4882-8, 2007
- 2) Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Inoue E, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Kimura T, Nakano T, Ogura A, Shinohara T Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development*, 134: 1853-1859, 2007
- 3) Kishimoto H, Ohteki T, Yajima N, Kawahara K, Natsui M, Kawarasaki S, Hamada K, Horie Y, Kubo Y, Arase S, Taniguchi M, Vanhaesebroeck B, Mak TW, Nakano T, Koyasu S, Sasaki T, Suzuki Pten/PI3K pathway governs the homeostasis of Valpha14iNKT cells. *Blood*, 109: 3316-24, 2007

## 2. 学会発表

仲野 徹 : PTEN/PI3K と幹細胞、第96回日本病理学会、大阪、2007年4月

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし