

200806004A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

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 20 年度 総括・分担研究報告書

代表研究者 西 田 幸 二

平成 21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

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 20 年度 総括・分担研究報告書

代表研究者 西 田 幸 二

平成 21 (2009) 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
代表研究者	西田 幸二	東北大学大学院医学系研究科眼科学	教 授
研究分担者	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
	大和 雅之	東京女子医科大学先端生命研究所	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
	上 昌広	東京大学医科学研究所 先端医療社会コミュニケーションシステム社会連携研究部門	特任准教授
	山口 拓洋	東京大学医学部附属病院	准教授
	嶋澤 るみ子	東北大学未来医工学治療開発センター	准教授

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
代表研究者 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・・・・・・・・・・ 13
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・・・・・・・・・・ 18
仲野 徹
3. 培養角膜内皮シートキャリアの開発・・・・・・・・・・ 22
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・・・・・・・・・・ 26
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ータマネジメントに関する研究・・・・・・・・・・ 29
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・・・・・・・・・・ 32
嶋澤 るみ子、上 昌広、大和 雅之

III. 知的財産に関する一覧表

1. 知的財産に関する一覧表・・・・・・・・・・ 34

IV. 研究会議に関する報告書

1. 全体班会議
平成 20 年度第 1 回班会議プログラムおよび議事録・・・・・・・・・・ 35
2. 分科会
第 1-9 回角膜再生ミーティング議事録・・・・・・・・・・ 42

V. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 雑誌および論文一覧・・・・・・・・・・ 62

總 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

代表研究者 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2年目にあたる本年は、上皮細胞シート移植を先進医療として実施するための臨床プロトコルの作成および申請、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、角膜内皮へ分化しうる細胞源の絞り込みおよび内皮細胞シートキャリアの選定を行い、角膜全層の再生医療の基盤となる技術を見出した。

研究分担者

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

大和雅之 東京女子医科大学先端生命研究所 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

上 昌広 東京大学医科学研究所 准教授

山口拓洋 東京大学医学部 准教授

嶋澤るみ子 東北大学未来医工学治療開発センター 准教授

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、ステイプンズ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

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

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。

昨年度は、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った。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と、移植時に用いるキャリアの検討を行った。

3年計画の2年目に当たる本年は、角膜上皮、角膜実質、角膜内皮のパーツ毎に昨年度に得られた知見および技術の課題をふまえて、角膜全層の再生医療技術を発展させることを目的とした。

角膜上皮については、培養上皮細胞シートに対して GLP 準拠の造腫瘍性試験を実施し安全性を確認した。さらに、多施設臨床研究の開始のための臨床研究プロトコルの作成を行い、患者データベースの作製を開始している。過去の自家培養上皮細胞シート移植の成果に対する客観的評価を受け、角膜上皮再生に関する臨床研究を先進医療として実施するために、先進医療の申請を行った。

角膜実質については、1年目に開発した積層ゲルに関する基盤技術の最適化や作製法の改良、添加物の導入等の要素技術の確立を目指した。特に動物移植実験を中心としたコラーゲングルセルの評価を行い、作製したゲルの移植片としての有効性を評価した。また、細胞導入の検討や強膜透明化技術の開発等、独創的なアプローチでの移植片作製要素技術の開発も進めた。

角膜内皮については、1年目に候補に挙げられた細胞について、未分化性および多分化能を検討した。これまでにマウス虹彩より神経堤由来未分化細胞を単離、様々な細胞へ分化誘導することに成功している (特許出願済、論文投稿中)。また、内皮移植用キャリアシート候補として、新規開発ゲルとアテロコラーゲンを選定することに成功している。

B. 研究方法

角膜上皮

培養上皮細胞シートの造腫瘍性試験: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。今後多施設臨床試験を実施するにあたって、培養上皮細胞シートの GLP 準拠造腫瘍試験を実施し、安全性を確認した。ヒト培養上皮細胞を温度応答性培養皿により、シート状に培養した後、専用輸送容器 (37°C ± 3°C) 内にて保存した。細胞を回収し、軟寒天コロニー形成試験および核型解析を実施した。

自家培養上皮細胞シート製造方法と臨床研究のプロトコルの作成:臨床試験にて必要とされる GCP 準拠の標準操作手順書やプロトコルの作成を、分担研究者である大和、上、嶋澤、山口らと行った。研究を開始した本年度4月時点において、本臨床研究が従来からの先進医療 (第2項先進医療) と高度医療評価制度 (第3項先進医療) のどちらに該当するのか、不明であったため、当初は高度医療評価制度に沿った形で過去のデータ評価などを行った。

角膜実質

角膜移植におけるアテロコラーゲンの有効性評価: 8mm トレパンを用いてビーグル犬の角膜表層を除去し、3%アテロコラーゲン(高研・アテロコラーゲンインプラント)を角膜除去部位に移植した。移植後は動物用ソフトコンタクトレンズで保護し、抗生剤を点眼して感染を予防した。

クロスリンクコラーゲンゲルの再現とその有効性: M Griffith らのグループにより開発された架橋コラーゲンゲルを再現した。10%程度のブタアテロコラーゲンを EDC と NHS を架橋剤として用いて架橋した。溶液の混合にはシリンジと三方活栓を用いた。

線維配向・積層型クロスリンクコラーゲンゲルの開発: 架橋剤とコラーゲン溶液を混合後、ゲル化する際に方向性を持たせながらゲルを形成することによりコラーゲン分子配向を制御したコラーゲンゲルを作製した。また一旦ゲル化させたコラーゲンゲルの上に再度ゲルを作製することにより、積層コラーゲンゲルを作製した。

クロスリンクコラーゲンゲルへの添加物導入の検討: コラーゲンゲルに導入する添加物を選択するため、コンドロイチン硫酸等のグルコサミノグリカン、ポリエチレングリコール等の合成高分子をコラーゲン溶液に混合した。

細胞導入の検討: 角膜実質細胞培養条件を選定するため、培地や足場等の最適条件を検討した。角膜実質細胞はヒトおよび家兎の角膜の角膜実質から単離した。

また、他組織を細胞源とするため、細胞源の候補となる組織から得た細胞の誘導を試みた。

強膜(白目)透明化による角膜代価物作製法の検討: 強膜(白目)を単離し、透明化する方法の検討し、その透明性を評価するため、紫外可視光透過性を評価した。

移植片の物性評価: 透明性を評価するため、紫外可視光透過性を測定した。細胞との親和性を評価するため、角膜上皮、角膜内皮、角膜実質細胞を単離し、コラーゲンゲル上に播種して培養した。力学特性を評価するため、引張り強度測定機を用いてコラーゲンゲルの引張り強度を評価した。また物質透過性を評価するため、ウッシングチャンバーを用いてアルブミン透過率を評価した。

移植片の移植試験: 角膜実質層内移植試験ではブレードを用いて家兎角膜中央部を深さ 200 μ m 程度、長さ 5mm 程度切開し、角膜実質内に角膜面に対して水平にスパーテルを挿入して角膜周辺部に向かって 7mm \times 7mm 程度のポケットを作製した。直径 3mm 厚さ 100 μ m のゲルをポケットに挿入し、抗生剤を用いて感染を予防した。

表層角膜移植ではトレパン及びゴルフメスを用いて角膜表層中央部を深さ 100-200 μ m 程度、直径 7mm 程度切除し、トレパンで打ち抜いたコラーゲンゲルを 10/0 ナイロン縫合糸を用いて縫合した。移植後はコンタクトレンズにて眼表面を保護し、抗生剤を用いて感染を予防した。

角膜内皮

細胞源の探索 虹彩由来細胞の未分化性の検討: 虹彩実質細胞は角膜内皮細胞と同様に神経提由来であり、また、眼科の手術において容易かつ安全に採取可能な組織であるため、角膜内皮再生の細胞源候補として有望である。そこで今回マウス眼を用いて、虹彩実質由来細胞を単離、培養が可能か否かについて

て検討を実施した。さらに、これらの細胞の未分化性および多分化能について検討を行った。

P0-Cre マウスと EGFP をマーカーとしたレポーターマウスを交配し作製した P0-Cre;EGFP マウスの虹彩実質を用いて、非接着性培養皿上にて 37°C で浮遊培養を行うことで、sphere 形成を試みた。さらに、虹彩実質由来 sphere について各幹細胞マーカー発現および多分化能に関して検討を行った。さらに虹彩実質 sphere の多分化能を検討するため、論文等で報告された方法を用いて神経や脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導を試みた。

線維柱帯細胞の単離・培養: 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。これまでに、豚眼線維柱帯組織より線維柱帯細胞を単離、培養することに成功していた。

今回さらに線維柱帯中の未分化細胞を単離する目的で、虹彩実質細胞と同様の戦略に基づき、線維柱帯細胞を非接着性培養皿上にて 37°C で浮遊培養を行うことで、sphere 形成を試みた。

培養内皮の基質の検討: 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。昨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 型コラーゲンゲル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。本年度は、アテロコラーゲン、共同研究者の田畑より供給した細胞接着が不良であったヒアルロン酸に対して種々の細胞接着因子を加えたもの、および新規開発シートのキャリアとしての機能を検討した。作製したシートに角膜内皮細胞を播種し、その接着性およびバリア機能を

tight junction protein ZO-1 の発現によって評価した。

(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。

被験者の同意の取得、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

培養上皮細胞シートの造腫瘍性試験:培養上皮細胞シートに対して GLP 準拠の造腫瘍性試験を実施し安全性を確認した。軟寒天コロニー形成試験の結果、培養上皮細胞において造腫瘍性は認められなかった。さらに核型解析の結果、培養上皮細胞の染色体異常は認められなかった。本試験によって、培養上皮シートが輸送後においても造腫瘍性がないことを確認できた。

自家培養上皮細胞シート製造方法と臨床研究のプロトコルの作成:細胞シートの製造方法は、これまでの実績があることから、3T3 細胞（マウスの線維芽細胞）をフィーダー細胞として、胎仔ウシ血清を用いる方法を用いることに決定した。過去の自家培養上皮細胞シート移植の成果に対する客観的評価を受け、角膜上皮再生に関する臨床研究を先進医療として実施するために、先進医療の申請を行った。

角膜実質

角膜への移植におけるアテロコラーゲンの有効性評価:アテロコラーゲンは低温ではゾル状の溶液であるが、体温付近になるとゲル化する特性を有するが透明性が著しく損なわれる。移植後動物の体温でゲル化するが、移植後 2 日目には移植したコラーゲンが白濁する。しかしながら、上皮層の再構築が進行するとともに一度白濁したコラーゲンが透明になる。宿主角膜実質から細胞がアテロコラーゲンマトリックス内に遊走することを確認した。遊走した細胞は移植初期には形状が肥大していたが 1 ヶ月以内に正常な角膜実質細胞と同等な形態を回復した。また血管浸潤等の激しい拒絶反応や炎症反応は起こらなかった（竹花らによる分担研究報告書を参照）。

クロスリンクコラーゲンゲルの再現と有効性評価

評価:数々の動物実験結果が報告されている架橋コラーゲンゲルは、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ゲル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。

架橋コラーゲンゲル作製法では 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。架橋コラーゲンゲル上で角膜上皮、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。

角膜実質層内への移植試験にてアテロコラーゲン移植と同様に、激しい拒絶反応や炎症反応が生じることは無く、透明性も損なわれることは無かった。また良好な生体親和性を有することが柔軟性とある程度の強度を有し、ピンセットで取り扱うことができる程度のハンドリングの良い素材であった。しかしながら縫合に対して非常に脆弱であり、また保湿度が不十分で乾燥しやすいことが分かった。

積層コラーゲンゲルの作製と機能評価

評価: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、架橋コラーゲンゲルの線維配向を制御する方法を開発した。作製した線維配向型コラーゲンゲル内ではコラーゲン線維が一定方向に配向していることを x 線測定や

電子顕微鏡観察にて確認した。また配向させても透明性が変化することは無かった。

この線維配向型コラーゲンゲルは線維方向への引張り強度が良好で、線維方向に対して垂直な方向の2倍以上の力学強度を示し、線維配向操作を加えていない物よりも良好な力学特性を有している。一方、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。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を試みた。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。しかしながら線維方向への力学特性は不十分でゲルが引き裂かれた。

この様な単層の力学特性を改善するため、線配向を制御しながら積層する技術を開発した。それぞれの線維層が独立したかたちで積層がなされ、透明性も維持されていた。表層角膜移植においても縫合が可能であることを確認している。また、当初開発した手法では各層の厚みを50 μ m以下に制御することは困難であったが、1 μ m程度まで薄化する技術も開発した。現段階までに1 μ mを数百層まで積層することが可能となっている(特願2007-339635、特願2008-330579、明石らによる分担研究報告書を参照)。

クロスリンクコラーゲンゲルへの添加物導入の検討:コンドロイチン硫酸等のグルコサミノグリカン、ポリエチレングリコール等の合成高分子をコラーゲン溶液に混合した。添加物を混和することによりコラーゲン溶液の光透過性は著しく損なわれる。しかしながら、添加物の種類や条件によっては透明性をある程度維持できることが分かった。透明性を維持できる添加物添加条件にてコラーゲンと混和し、

架橋剤を用いてゲル化を試みたところ、架橋も可能であり、添加物を導入した透明なコラーゲンゲルが作製できることが分かった。導入する添加物によってコラーゲンの機能を向上できることも確認している(特許出願準備中)。

細胞導入の検討:角膜実質細胞の形質を維持したまま培養できる条件を探索した。角膜実質細胞は血清存在下で良好な増殖性を得られるが、筋繊維芽細胞、繊維芽細胞に変化した。グロースファクターを添加した無血清培地を用いて培養したところ細胞は形質転換せず、角膜実質細胞のマーカーであるケラトカンを発現したまま増殖させることができることが分かった。また無血清培地でも角膜実質細胞と良好な接着性を有する足場を選定し、形質を維持したまま培養できることを確認した。

他組織由来の細胞を角膜実質細胞に誘導する手法についても開発を進め、角膜実質細胞のマーカーであるケラトカンおよびCD34陽性細胞が誘導できることを確認した(特許出願準備中)。

強膜(白目)透明化による角膜代価物作製法の検討:強膜(白目)を単離し、透明化する方法を検討した。強膜は特定条件で透明化し、550nmの波長の光透過率が1%未満から95%程度まで上昇することが分かった(特願2008-141043)。

角膜内皮

細胞源の探索 虹彩由来細胞の未分化性の検討:P0-Cre:EGFPマウスを用いて、虹彩実質からsphere培養法により未分化細胞を単離することに成功した。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)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。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、軟骨細胞への分化可能であった。

線維柱帯細胞の単離・培養：線維柱帯由来細胞の sphere 形成率は極めて低く、実験に使用する細胞数を確保するのが困難であると考えられたため、細胞源候補としては虹彩実質細胞に一本化する方針とした。

培養内皮の基質の検討：アテロコラーゲンおよび新規に作製したシートも、ヒアルロン酸と同様透明性に優れていた。アテロコラーゲン、ヒアルロン酸シートおよび新規開発シートは培養基材として十分な強度をもっていた。

アテロコラーゲンおよび新規開発シート上において正常角膜内皮細胞は接着・増殖することが確認された。一方でヒアルロン酸上では増殖せず、ゲルが溶解してキャリアとしての使用は困難であると考えられた。細胞間の密着結合を確認するため、tight junction protein ZO-1 による免疫染色の結果、新規開発シートでは不明瞭ではあるが発現が確認された。また、培養5日後も新規開発シートは透明性を維持していた。対照群として用いたアテロコラーゲンシートでは、明瞭な ZO-1 染色が確認されたものの培養後はシートがやや不透明化した。

アテロコラーゲンシートおよび新規開発シートにおいて細胞接着が良好であり、また培養後もシートは透明性を維持していたことから、角膜内皮の移植用キャリアとして適していると考えられた。

D. 考察

角膜上皮については、培養上皮細胞シートに対し

て GLP 準拠の造腫瘍性試験を実施し安全性を確認した。すなわち、作製した培養上皮シートを多施設に輸送した場合においても、安全に使用可能であることが保障された。さらに、多施設臨床研究の開始のための臨床研究プロトコールの作成を行い、患者データベースの作製を開始している。過去の自家培養上皮細胞シート移植の成果に対する客観的評価を受け、角膜上皮再生に関する臨床研究を先進医療として実施するために、先進医療の申請を行った。これまでに、高度医療評価制度への申請準備も行ったが、最終的に自家培養上皮細胞シート移植法に未承認・適応外の医薬品・医療機器が含まれないとの判断を受けて、先進医療の申請をする運びとなった。フィーダー細胞に関しては、これまでに 3T3 細胞およびヒト皮膚線維芽細胞を用いて検討していた。どちらも同様のフィーダー効果を有しているが、過去の実績から 3T3 細胞を用いることとなった。

角膜実質については、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。その中で M Griffith らのグループは架橋アテロコラーゲンを基質として用い、いち早く動物実験の結果を報告している。アテロコラーゲンは角膜に移植しても激しい拒絶反応や炎症反応は起こさないことから（竹花ら）、角膜実質材料として有望である。我々はまず M.Griffith らの手法を再現し、力学特性や保湿性等の課題を確認した。これらの課題の解決の為に初年度に開発した線維配向・積層型コラーゲンゲルは特徴的な力学特性を有しており、表層角膜移植等によりその有効性を確認した。また、保湿性等の物性向上のため添加物導入条件等の新たな要素技術開発に取り組んだ。これまでに 10 種以上の添加物を試したが、透明性を維持したまま添加物を導入するのは非常に困難であった。しかしながら特殊な条件で透明性を確保でき、機能改質が可能であることを確認した。また、生体

において角膜実質基質を産生する役割を担っている角膜実質細胞を導入することにより移植片として必要とされる機能を満たすことができるのではないかと仮説に基づき、細胞導入の検討も開始した。新規性のある技術が開発できているが、現段階では細胞自身にマトリックスを産生させるのは困難で、移植片として利用するにはコラーゲンマトリックスを導入する方法の開発が今後必要と考えている。今後は細胞の必要性の検討も含めて検討する必要がある。また強膜（白目）が透明化するという特異な現象を発見し、角膜代価物とする手法を考案することができた。

角膜内皮については、虹彩実質由来未分化細胞は、様々な細胞へ分化可能な、多分化能を有する神経堤幹細胞であることが示された。また同時に、神経堤由来組織である角膜内皮再生のための細胞源として、虹彩実質細胞が有望であることを、科学的に裏付けることが出来た。

また、移植に用いるキャリアについて、アテロコラーゲン等は臨床使用実績があることから、今後の臨床応用が容易である。今後は、誘導性角膜内皮細胞を各キャリア上に培養し、疾患モデルに移植することで、その生体分解性や炎症について検討を行う予定である。

E. 結論

角膜上皮については、培養上皮細胞シートに対してGLP準拠の造腫瘍性試験を実施し安全性を確認した。さらに、過去の自家培養上皮細胞シート移植の成果に対する客観的評価を受け、角膜上皮再生に関する臨床研究を先進医療として実施するために、先進医療の申請を行った。フィーダー細胞に関しては、過去の実績から3T3細胞を用いる。

角膜実質については、線維配向・積層型コラーゲンゲルを作製する技術を開発し、移植試験等にて一

定の有効性が確認できた。しかしながら、臨床応用を考えた際にはさらに機能向上を図る必要がある。本年度機能向上のための要素技術として、新規積層技術、添加物導入技術、細胞培養技術、強膜透明化法等を開発した。来年度はこれらの要素技術の改良や融合により機能向上してゆく必要がある。また、透明化強膜の角膜移植片としての有効性の評価も行う必要がある。

角膜内皮については、虹彩実質由来未分化細胞は、様々な細胞へ分化可能な、多分化能を有する神経堤幹細胞であることが示された。また、移植に用いるキャリアについて、細胞培養および透明性の検討の結果、アテロコラーゲンおよび新規開発シートを選定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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, 12, 1254-1255, 2008.
- 2) 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, 2008 2 445-449
- 3) 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*. 2008; 1-6
- 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) Watanabe K, Yamato M, Hayashida Y, Yang J, Kikuchi A, Okano T, Tana Y, Nishida K: Development of transplantable genetically modified corneal epithelial cell sheets for gene therapy. 2007 *Biomaterials*. 28:745-749.
 - 9) 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.
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、ホテルグランピア広島、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、名古屋市中心企業振興会館、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 先端生命科学研究所、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 丸の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.
- 30) 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.
- 31) 田中佑治, 久保田享, 本郷千鶴, 松崎典弥, 竹花一成, 明石満, 西田幸二, 角膜再生医療に向けた分子配向を制御した積層型コラーゲングルの開発と有効性評価、日本再生医療学会 東京国際フォーラム、東京、2008年3月6日.

- 32) 西田幸二：角膜手術の進歩、第 91 回阪大眼科同窓会学術講演会、大阪国際会議場、2008 年 6 月 8 日
- 33) 西田幸二：角膜手術の進歩、第 94 回沖縄眼科集談会、琉球大学医学部、2008 年 6 月 21 日
- 34) 西田幸二：Cell Sheet Transplantation for Ocular Surface Reconstruction、WOC 2008 Symposium: External Eye Disease, Cornea, and Eye Bank / Ocular Surface Reconstruction, Hong Kong Convention & Exhibition Centre、2008 年 6 月 29 日
- 35) 西田幸二：DALK Combined with Cataract Surgery、WOC 2008 Symposium: External Eye Disease, Cornea, and Eye Bank / Anterior Lamellar Keratoplasty、Hong Kong Convention & Exhibition Centre、2008 年 6 月 30 日
- 36) 西田幸二：DALK Combined with Ocular Surface Reconstruction、WOC 2008 Symposium: External Eye Disease, Cornea, and Eye Bank / Anterior Lamellar Keratoplasty、Hong Kong Convention & Exhibition Centre、2008 年 6 月 30 日
- 37) 西田幸二：Corneal tissue engineering、9th International Symposium of Ophthalmology、中国 青島、2008 年 7 月 26 日
- 38) 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、函館国際ホテル、2008 年 7 月 28 日
- 39) 本郷千鶴、松崎典弥、田中佑治、久保田享、西田幸二、明石満、分子配向を制御した積層化コラーゲンの創製、第 37 回医用高分子シンポジウム、東京医科歯科大学、東京、2008 年 7 月 28 日～29 日
- 40) Hongo C, Matsusaki M, Nishida K, Akashi M, Molecular Orientation of a Collagen Hydrogel with High Mechanical Strength by a Simple Method, XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography、大阪、2008 年 8 月 23 日～31 日
- 41) 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、東京大学医学部、2008 年 9 月 3 日
- 42) 本郷千鶴、田中佑治、松崎典弥、久保田享、西田幸二、明石満、分子配向を制御したコラーゲンの創製と角膜実質材料への応用、Development of Layered Collagen Gel with Molecular Orientation for Regenerative Medicine of Corneal Stroma、第 57 回高分子討論会、大阪市立大学 杉本キャンパス、大阪、2008 年 9 月 24 日～26 日
- 43) 田中佑治、久保田享、本郷千鶴、松崎典弥、竹花一成、明石満、西田幸二、線維配向を制御した積層型コラーゲンの開発と人工角膜実質としての応用、再生医療・生体材料研究会（眼科再生医療研究会）東京国際フォーラム、東京、2008 年 10 月 23 日
- 44) 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 モーニングクルズス、東京国際フォーラム、2008 年 10 月 24 日
- 45) 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 モーニングクルズス、東京国際フォーラム、2008 年 10 月 24 日
- 46) 本郷千鶴、松崎典弥、田中佑治、久保田享、西田幸二、明石満、分子配向を制御した積層化コラーゲンの創製と角膜実質再生医療への応用、Fabrication of Layered collagen gel with Molecular Orientation for Corneal Stroma、日本バ

イオマテリアル学会シンポジウム 2008 東京大学
本郷キャンパス, 東京, 2008 年 11 月 17 日～18 日
47)

3. 新聞・テレビ等による報道

- 1) 万能細胞で視力もどす 朝日新聞 2008 年
11 月 27 日
- 2) 再生医療で視力回復 朝日新聞 2008 年 5
月 22 日
- 3) iPS の奇跡-相次ぐ成果 情報共有へ、読売新
聞、2008 年 3 月 3 日
- 4) 夢へ前進 iPS 細胞研究、朝日新聞、2008 年 2
月 18 日
- 5) マウス iPS 細胞で角膜再生へ、朝日新聞、
2008 年 1 月 26 日
- 6) 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
- 7) 口腔粘膜から角膜再生、東京新聞・中日新聞、
2007 年 12 月 4 日

- 4) 特願 2008-121073・明石 満、西田幸二、松崎
典弥、久保田享・非共有結合型コラーゲン架
橋剤 日本・国立大学法人大阪大学、国立大学法
人東北大学・2008 年出願
- 5) 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
- 6) 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
ラーゲングルの作製方法及び積層コラーゲング
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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特願 2008-330579・明石満、西田幸二、松崎典
弥、大道正明・積層コラーゲングルの製造方法、
配向方法およびそれらの方法により製造された
積層コラーゲングル・日本・国立大学法人大阪
大学、国立大学法人東北大学・2008 年 12 月 25
日出願
- 2) 特願 2008-141043・西田幸二、田中佑治、久保
田享・強膜透明化による角膜移植材料調製方法
日本・国立大学法人東北大学・2008 年 5 月 29
日出願
- 3) 特願 2008-123562・西田幸二、林竜平、菊地未
来、大隅典子、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 日本・国立大学法人
東北大学 2008 年出願

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

研究分担者 明石 満 大阪大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

角膜疾患に対する治療法として角膜移植が行われているが、献眼不足や拒絶反応が問題となっており角膜の再生医療が望まれている。近年、細胞シートを用いた角膜上皮再生が成果をあげている。しかしながら、角膜全層の中で最も厚い角膜実質層は複雑なコラーゲンマトリックスであり、コラーゲンや合成高分子のゲルを人工実質層として移植する試みが研究されているが力学強度不足により安定に縫合できず、有効な人工実質層は国際的にも開発されていない。本研究では、実質層の構造を限りなく再現し、透明性と強度を併せ持つ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年目にはコラーゲン線維を簡便な方法で一軸方向に並べ、透明なゲルを作製する方法を考案した。2年目にあたる本年度は、生体における角膜実質の構造を模倣し、積層構造を有するゲルの作製、また、ヒト細胞由来アテロコラーゲンを用いてのゲル調製条件の検討を行った。

A. 研究目的

視覚障害を持つ患者の生活の質(QOL)の改善のため、拒絶反応のない人工角膜の創出が望まれている。近年、細胞シートを用いた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果を上げている。(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おり、臨床応用可能な人工角膜実質の創製は達成されていない。角膜実質は角膜全層の中で最も厚く、角膜の90%を占め、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、その層に対して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、上皮や内皮のように細胞シートを応用することは難しい。

コラーゲンや合成高分子のゲルを人工実質層として移植する試みが研究されているが、力学強度不足により安定に縫合できず、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。有効な人工実質層は国際的にも未だ開発されていない。

人工角膜実質層としてもっとも研究が進んでいるのは、カナダの M. Griffith らの高濃度コラーゲングルを用いる手法 (Science 1999, IOVS 2006) であるが、角膜実質のラメラ構造を構築できておらず、物理的強度は低い。また、コラーゲン以外にも合成高分子であるポリ 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) やポリメチルメタクリレート (PMMA)、感熱応答性高分子であるポリ N-イソプロピルアクリルアミド (PNIPAAm) のゲルを人工

実質層として用いる研究が報告されている。さらに、国内では、東京医科歯科大学の岸田教授らによるブタ角膜の脱細胞化組織を用いる手法や、北海道大学と物質・材料研究機構の共同研究による魚のウロコを人工実質として用いる方法が報告されている。しかし、透明性と移植時の縫合や眼圧に耐える物理的強度を有し、安全かつ高機能のコラーゲンマトリックスは未だ開発されておらず、実用化には至っていない。

そこで、本研究ではコラーゲンを架橋する際にゲル中のコラーゲンを配向させて積層することで、角膜実質類似の層状構造を再現し、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トリックスを創製することを目的とした。

3年計画のコラーゲン線維を簡便な方法で一軸方向に並べ、透明なゲルを作製する方法を考案した。2年目に当たる本年度は透明な架橋コラーゲンゲルを積層させる手法を開発した。また、ヒト細胞由来アテロコラーゲンをを用いてゲル調製条件の検討を試みた。

B. 研究方法

10wt%のブタ皮膚由来 Type I アテロコラーゲン(日本ハム株式会社)を 50mM, pH4.0 の酢酸バッファに溶解し、1N の NaOH で(pH 3.5~4.0)に縮合剤の 1-ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl)carbodiimide (EDC) とカルボキシル基活性剤の N-hydroxysuccinimide (NHS) を混合した水溶液(EDC/NHS 濃度比 2/1)を架橋剤として添加し、反応液を調製した。コラーゲンの配向性を高めるため、シリンジを用いて反応液を一定方向にガラス基板上に押し出し、もう一枚のガラス板で挟み、25°C で 24 時間ゲル化した。このようにして分子配向を制御したゲルの上に、新たなゲルを直行するように配

向させて積層した。この操作を複数回繰り返すことによって、分子配向を制御した積層化ゲルを作製した。また、各層の厚みを 1 μ m 程度まで薄化させる手法の開発も行った。

作製したゲルの力学特性を解析するため、引張試験(SIMAZU 製 EZ-test)を用いて引張り強度測定を行った。また積層構造を観察するために、走査型電子顕微鏡を用いて積層ゲルの断面を観察した。

ヒト由来成分の導入を検討するため、ヒト細胞由来 Type I アテロコラーゲン(株式会社エーシーバイオテクノロジーズ)の溶解試験を行った。溶解した条件において CD スペクトルを測定し、コラーゲン 3 重らせん構造の有無を調べた。3 重らせんを形成していると考えられる条件で EDC と NES を用いてゲル化実験を試みた。

(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

張試験の結果を Fig. 1 に示した。ゲル化の際に一定方向に流延して配向させたゲル(厚み：100 μ m)ではコラーゲン 3 重らせんのらせん軸に平行な方向への引張強度、引張伸度はそれぞれ 2.8 ± 0.6 MPa、 $17 \pm 2\%$ であり、垂直方向と比較して 2 倍以上の強度を示した。

この線維方向が配向した単層のコラーゲンゲル上に、線維方向が直交する様に 2 層目のコラーゲンゲルを積層させた。作製した積層コラーゲンゲルは単層のコラーゲンゲルと同等の透明性を有し、各層が独立していることを蛍光ラベリングにより確認した(特願 2007-339635)。