

また、各層の厚みを薄化して積層数を増やす手法を提案し、積層ゲルを試作した(特願 2008-330579)。作製した積層コラーゲンゲルは従来のものと同様に良好な透明性を示した。さらに断面をSEM観察したところ各層が数 μm 程度に薄化しており、100層以上積層していることが分かった。

また、ヒト由来成分を導入するため、ヒト線維芽細胞由来コラーゲンでの架橋ゲル作製を検討した。ヒト線維芽細胞由来のコラーゲンはブタアテロコラーゲンと比較して酸性溶液に溶解しにくい性質を有しており、同様の作製法では透明なゲルを作製することはできなかった。

そこで透明性を得られる溶解条件を検討した。すると強酸、強アルカリ条件で高濃度のヒトコラーゲンも溶解することが分かった。これらのコラーゲン溶液のCDスペクトルをブタ皮膚由来コラーゲンのものと比較した結果、強酸水溶液で調製したものは3重らせんを示す225nmのピークが減少していた。しかしながら強アルカリ条件で調製したものはブタ皮膚由来コラーゲンと同程度のピークを示し、3重らせん構造を保っていることが分かった。得られた溶解条件にてEDCとNHSを2:1の割合で混合した架橋剤にて架橋を試みたところ、ブタコラーゲンと同様に透明性の高いゲルが調製できることが分かった。

D. 考察

配向性の低いコントロールゲルと比べると配向性を高めることで約2倍も強度が増加することが分かった(Fig. 1)。引張強度はコラーゲン分子のらせん軸方向に依存しており、らせん軸に平行な方向への引張強度は垂直な方向に比べて高い値を示すことが定量できた。このことから、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が考察できる。

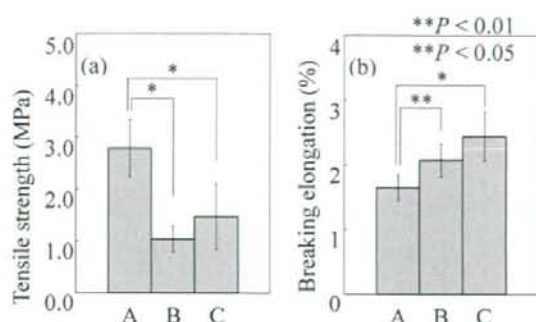


Fig. 1 Tensile strength (a) and breaking elongation (b) of the oriented and control gels. The oriented gels were pulled in parallel (A) or vertically (B) with the direction of the collagen triple-helix. C is control gel.

そこでコラーゲン/架橋剤混合液を方向を制御しながら積層したところ、透明性を確保したまま各層が混和することなく積層できることが分かった。しかしながら各層の厚みはスパーサーを用いて制御しており、市販されている薄膜の厚み(50 μm 以上)よりも薄くすることはできない。生体の角膜実質は、1 μm 程度の厚みを有するコラーゲン線維層が数百層程度積層した構造となっており、それを再現するには新たな手法を開発する必要がある。そこで各層の厚みを薄化する手法を考案してゲルを作製したところ、生体角膜実質により近い積層数と各層の厚みを得ることができた。

以上、配向と積層構造を有するコラーゲンゲルの開発にはこれまでブタ皮膚由来のアテロコラーゲンを用いてきた。しかし臨床応用には異種であるブタよりも同種であるヒト由来のコラーゲンの方が望ましい。そこで本研究ではヒトコラーゲンの利用を検討した。ブタアテロコラーゲンとヒトアテロコラーゲンは溶解特性が異なっており、同等に扱うことはできないことが明らかとなったが、溶解条件を検討することで透明性を有する架橋コラーゲンゲルが作製できることが明らかとなった。

E. 結論

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単にコラーゲン分子の配向を制御し、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。配向させることによって物理的強度を2倍も高めることに成功し、従来の手法では達成できていない高い透明性と機械強度が得られ、ハンドリングに優れた素材となった。さらにヒト細胞由来コラーゲンのゲル化に最適な条件を見出し、ゲルを作製することができた。また、ヒト由来成分でも透明性を有する架橋コラーゲンゲルが作製できる条件があることを確認した。

現在主任研究者らと協力して積層ゲルの作製条件の最適化と移植試験を中心としたその物性評価を進めている。作製条件の最適化では透明性を有しつつ、より優れた力学特性が得られる条件を網羅的に検討している。また、得られたコラーゲンゲルの物質透過性、細胞接着性、生体親和性についても同様に検討を開始している。

今後はこれらのブタコラーゲンを用いたゲルの作製実験で得られた知見をもとにヒトコラーゲンを原料として積層コラーゲンゲルを作製し、臨床応用可能な高機能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 a Collagen Hydrogel with High Mechanical Strength by a Simple Orientation Method for Triple-helix. *Chem. Lett.* **37**, 12, 1254-1255, 2008.

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.
- 2) 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.
- 3) 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ゲルの創製, 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.
- 4) 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ゲル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.
- 5) 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ゲルの開発と有効性評価, Fabrication of Multilayered Collagen Hydrogels with Orthogonally Oriented Fibers and its Effectiveness Assessment for Use as Artificial Corneas, 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.

3. その他

なし

6) 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ゲル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.

7) 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ゲ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.

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

2) 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・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

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

研究分担者 仲野 徹 大阪大学大学院生命機能研究科 教授

研究要旨

Wnt、 β -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、軟骨ならびに骨形成における 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、軟骨細胞の増殖を促進すること、また、分化を抑制することが明らかとなった。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分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。

哺乳類の骨形成には、軟骨内骨化と膜内骨化の二種類がある。軟骨内骨化では、中胚葉系の幹細胞から軟骨細胞へと分化し、骨の両端において軟骨細胞が増殖した後に、肥大軟骨へと分化し、最終的に骨を形成する。また、ヒト軟骨に由来する幹細胞は、間葉系幹細胞と同様の性質を有しており、軟骨や骨に分化することができる。本研究の目的は、骨・軟骨システムにおける 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。マウスの軟骨細胞およびヒト滑膜由来幹細胞において、Akt シグナルを活性化させ、それが軟骨細胞および骨形成過程に与える影響を

解析することで、骨・軟骨システムにおける PI3K/Akt シグナルの機能を明らかにした。

B. 研究方法

軟骨細胞において 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 (mutated estrogen receptor: 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 マウスをすでに作製している。この Akt-MER マウス胎仔から、胎仔骨を採取し、4OHT 存在下と非存在下において器官培養をおこない、Akt 活性化の影響をしらべた。また、Akt 活性化の機能を確認するため、阻害剤により、Akt の上流にある PI3K の機能を抑制することにより、Akt と逆の影響が認められるかどうかを確認した。

間葉系幹細胞と同様の性質を有するヒト滑膜由来幹細胞 (human synovium derived stem cell: hSSC) から軟骨細胞の終末分化における Akt の機能を解析した。この実験においては、レンチウイルスを用いて Akt-MER 遺伝子を hSSC に導入し、4OHT の存在下、非存在下において培養をおこない、Akt 活性化の影響を解析した。

(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

受精後 14.5 日目の Akt-MER トランスジェニックマウスとコントロールマウスから橈骨を採取し、それぞれを、4OHT 存在下と非存在下において培養した。コントロールでは、培養後 5 日目には、両端に、肥大軟骨が認められたが、Akt-MER トランスジェニックマウス由来の培養では認められなかった。

アルシアンブルー染色では、Akt の活性化により、軟骨細胞の増殖が亢進すること、また、分化した肥大軟骨細胞が減少していること、が明らかとなった。さらに、Akt の活性化が肥大軟骨細胞のマーカーである Runx2 や X 型コラーゲンの発現を抑制することも確認することができた。

さらに、Akt の活性化が正常な骨形成における機能を解析するために、Akt シグナルの上流にある PI3K の阻害剤である LY294002 を用いた解析をおこなった。正常マウス胎仔の骨を LY294002 存在下において培養したところ、阻害剤の濃度依存的に骨の伸長が抑制されることが明らかになった。また、阻害剤の添加により、肥大軟骨が増加すること、X 型コラーゲンの発現が促進されること、も明らかとなった。

次に、発生過程における軟骨内骨化ではなく、成体における骨形成における PI3/Akt シグナルの機能を解析するため、Akt-MER を発現させた hSSC による解析をおこなった。hSSC を遠沈してペレットとし、TGF- β を添加した培養をおこない、軟骨細胞へと分化誘導した。その結果、Akt の活性化がある場合には、分化誘導をおこなった細胞ペレットの大きさが増大することが明らかとなった。

アルシアンブルー染色をおこなったところ、Akt を活性化した場合には、軟骨の増生が認められた。さらに、半定量 RT-PCR により、遺伝子発現を解析したところ、軟骨細胞の最終分化を示すマーカーである Runx2 や Coll10a1 の発現が Akt の活性化により低下していた。

また、正常 hSSC の培養を用いて LY294002 の添加実験したところ、ペレットのサイズ減少ならびに軟骨細胞への分化の抑制が認められた。Akt の阻害剤である NL-71-101 でも、同様の結果を得ることができた。さらに、LY294002 の添加により、未分化な軟骨細胞のマーカーである Sox9、Col2a1、Aggrecan の発現が低下し、終末分化のマーカーである Runx2、Col10a1 の発現が上昇した。

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こり、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、軟骨細胞における PI3K/Akt シグナルの機能解析をおこなった。そのために、① Akt のリン酸化酵素活性を自在に制御できる Akt-MER マウス胎仔骨を用いた、Akt シグナルの活性化が軟骨細胞の増殖・分化に与える影響、② Akt-MER 遺伝子を導入した hSSC から軟骨細胞への分化誘導における Akt シグナルの影響、③ PI3K 阻害剤および Akt 阻害剤を用いた、それぞれのシグナルの胎仔骨および hSSC から軟骨への分化における機能解析をおこなった。

いずれの実験においても、PI3/Akt シグナルは軟骨細胞の増殖を促進し、その終末分化を抑制することが明らかとなった。すなわち、発生過程においても成体においても、PI3K/Akt シグナルは同様の機能を有することが明らかとなった。

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。

本研究を含めて、我々は、PI3K/Akt シグナルを

2008年11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

人為的に活性化させると、いろいろな細胞において増殖を促進させうることを示してきた。これらの成果から、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のではないかと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kita K, Kimura T, Nakamura N, Yoshikawa H, Nakano T. PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation. *Genes Cells*, 13:839-850, 2008
- 2) Kimura T, Tomooka M, Yamano N, Murayama K, Matoba S, Umehara H, Kanai Y, Nakano T. Akt signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells. *Development*, 135:869-79, 2008
- 3) Sugiyama D, Tanaka M, Kitajima K, Zheng J, Yen H, Murotani T, Yamatodani A, Nakano T. Differential context-dependent effects of FOG-1 on mast cell development and differentiation. *Blood*, 111:1924-32, 2008

2. 学会発表

- 1) 仲野 徹：PTEN/PI3K と幹細胞、第5回日本病理学会カンファレンス、湘南、2008年8月
Toru NAKANO, Regulation of Stem Cell Systems by
- 2) PI3/Akt Signaling, Royan Twin Congress, Tehran, Iran, 2008年8月
- 3) Toru NAKANO, Regulation of Stem Cell Systems by PI3/Akt Signaling, The 5th Nikko International Symposium, Tochigi, Japan, 2008年8月
- 4) Toru NAKANO, PI3/Akt Signal in Stem Cell Systems, Suez Canal University-Kumamoto University COE Joint Symposium, Ismalia, Egypt,

培養角膜内皮シートキャリアの開発

研究分担者 田畑 泰彦 京都大学再生医科学研究所 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からなる、免疫抑制剤の必要としない安全で有効な全層性再生角膜を作製する技術を創出し、その臨床応用の実現化を目指す。本年度は、眼科領域において既に用いられているヒアルロン酸に種々の細胞接着因子を加えたものを作製し、この膜上で家兎角膜内皮細胞の細胞接着および進展性を評価した。

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、多くの患者に対し直ちに移植手術を行うことは困難である。さらに、ステー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。本申請では、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、あらゆる角膜疾患に対して適応可能な、免疫抑制剤を必要としない安全性の高い、有効な角膜再生治療法の開発を行い、3年以内に臨床応用を実現化することを目的とする。高齢化が進んでいる中、失明予防と視機能回復によりQOLの維持と向上を達成できる本事業は、国民の福祉増進と感覚器障害者の社会復帰に大きく貢献できると考えられる。

申請者は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）。しかしながら早期の臨床応用には課題もあり、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。

われわれはこれまでに、種々の材料を用いて生体内吸収性材料を作製し、生理活性物質の徐放体や細胞培養基材（スキャホールド）としての有用性を明らかにしてきた。これらの知見をもとに、本研究では、角膜実質再生にかかわる幹細胞培養基材の作製を検討した。

昨年度は、ヒアルロン酸からなる生体吸収性シートを作製し、その培養基材としての機能評価を行った。作製されたシートは十分な透明性と薄さをもち、良好な操作性を保っていた。しかしながら、ヒト角膜内皮細胞の接着と増殖を調べたところ、ヒア

ルロン酸シート上への細胞接着に問題があることがわかった。

3年計画の2年目に当たる本年は、1年目で得られた知見をもとに、ヒト角膜内皮細胞の培養、移植基材としての生体内吸収性シートの作製条件の最適化を行った。1年目でよい透明性が確認されたものの、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を作製した。作製したシートに細胞を播種して、接着性および進展性について評価を行った。

B. 研究方法

1 wt% のヒアルロン酸（電気化学工業株式会社製、重量平均分子量 2,000,000）および 3mM の L-リジンメチルエステル（和光純薬工業株式会社製）を含む水溶液をポリスチレン皿に流延し、室温下で静置して乾燥させることで、シートを得た。これを 500 mM の 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, hydrochloride (WSC, 水溶性カルボジイミド) およびフィブロネクチン（伊藤ハム株式会社製）、プロネクチン F plus（三洋化成工業株式会社製）を含む水溶液中へ浸漬して、室温下 24 時間静置し、エステル化およびアミド化による架橋反応を行った。架橋後のシートは蒸留水で洗浄し、乾燥させることで架橋ヒアルロン酸シートを得た。得られたシートの厚みを測定した。

エチレンオキシドガスによる滅菌を行い、細胞を播種して培養基材としての特性を評価した。初代培養によって得られた家兎角膜内皮細胞を用いて、その接着と増殖を検討した。比較対照として、アテロコラーゲンを用いて同様の実験を行った。

C. 研究結果

ヒアルロン酸シートの厚みは 35~50 μm であり、この範囲内のヒアルロン酸シートはアテロコラー

ゲンと同様に培養基材として十分な強度をもっていた。

次に、各シート上における角膜内皮細胞の接着および進展を調べた。その結果、ヒアルロン酸シート上での角膜内皮細胞の接着は不良であり、フィブロネクチンおよびプロネクチン F plus を添加した場合も結果は同様であった。細胞進展についても、細胞播種後 4 日までに、進展はほとんど認められず、フィブロネクチンおよびプロネクチン F plus を添加した場合も結果は同様であった。また、培養 5 日以降において、ヒアルロン酸シートは融解した。一方で、比較対照として用いたアテロコラーゲンシート上では、良好な細胞接着および進展性が認められ、少なくとも培養後 14 日間ではシートの融解などは観察されなかった。さらに、角膜内皮細胞の機能に必須である細胞間密着結合 (tight-junction) を確認するため、tight junction protein ZO-1 による免疫染色を実施した結果、アテロコラーゲンシート上の角膜内皮細胞間に明瞭な ZO-1 発現が確認された。しかしながら、14 日間の培養後にはアテロコラーゲンシートの不透明化が観察された。

これらの問題点を踏まえて、独自に開発した素材に架橋等を施した新規キャリアシートを開発を行った。新規開発素材の厚さは少なくとも 30 μm 程度のシート状に加工することが可能であり、アテロコラーゲンおよびヒアルロン酸シート同様に高い透明性、適切な強度を有していた。角膜内皮細胞の接着性および進展についても良好であり、アテロコラーゲンと同等であった。さらに新規開発シートは培養後に不透明化しないといった特性を備えていた。

D. 考察

ヒアルロン酸は滑液などに含まれる高分子量の多糖であり、胚発生時において細胞遊走経路にしたがって分布するなど、細胞接着と遊走に深く関与し

ていることがわかっている。また、透明性が高く、高い強度のシート作製が可能であることから細胞培養、移植用の基材としても応用が可能と考えられている。今回作製したシートはヒアルロン酸のみを風乾したものおよび L-リジンメチルエステル、フィブロネクチン、プロネクチン F plus を含むものである。ヒアルロン酸は生体内吸収性であり、体内に存在するヒアルロン酸分解酵素（ヒアルロニダーゼ）によって分解される。L-リジンメチルエステルを混合して架橋反応を行うことで、架橋密度を高める（含水率は低下）ことが可能であった。これは、培養、移植後の分解挙動に応じてその架橋密度を変化させることで、種々の分解吸収期間をもつシートの作製が可能であることを示している。ヒアルロン酸のみのシートは、細胞接着があまり良好でなかったことから、細胞接着因子として、フィブロネクチンおよびプロネクチン F plus を含むヒアルロン酸シートを作製した。フィブロネクチンは体内で細胞外マトリクスに含まれる接着因子であり、プロネクチン F plus はフィブロネクチンの細胞接着部位 RGDS 配列を多くもち、それに加えて、物質的な安定性を向上させた細胞接着人工タンパクである。これらの細胞接着因子は、これまでも、細胞培養時にコーティング剤として用いられ、その細胞接着と増殖性の増強効果が確認されている。そのため、これらの因子の導入により細胞接着の向上が期待された。しかしながら、細胞培養によって細胞の接着性と増殖性を調べた結果、どちらも不良であった。このことは細胞接着因子のコーティングが不十分であった可能性が考えられる。また、昨年度に検討したシートは厚みとしては十分な薄さをもつものの硬く、移植時の端部剥離などの問題が考えられた。本年度は、種々の厚みをもつシートを作製することに成功し、臨床応用に適した硬さのヒアルロン酸シートを作製することができたと考えられる。

今後、今回用いた細胞接着因子に加え、その他の接着因子のコーティング条件を最適化していく予定である。

また、独自に開発した素材を用いて新規キャリアシートの開発を行ったが、透明性、強度、角膜内皮細胞の接着、進展も良好であった。アテロコラーゲンと比較した場合も、培養後にシートの不透明化が起きないために、内皮シートキャリアとして用いた場合に、術直後から良好な角膜透明性が得られることが期待される。一方で、角膜内皮細胞を培養後において、ZO-1 発現がアテロコラーゲン上に比較して、不明瞭であることが観察された。この原因は明確ではないが、シートの細胞接着性に起因している可能性が考えられた。今後、架橋やコーティング条件等を最適化することにより、この点を改善していく予定である。

E. 結論

ヒアルロン酸および新規開発素材からなる生体吸収性シートを作製し、その培養基材としての機能評価を行った。ヒアルロン酸シートについては、十分な透明性と薄さをもち、良好な操作性を保っていることを確認し、さらに L-リジンメチルエステルを架橋剤として加えることで含水率および架橋密度を変化させることが可能であった。一方で、ヒアルロン酸シートは、角膜内皮細胞の接着、進展に関しては改良が必要であった。新規開発素材から作製したシートにおいては、高い透明性および適切な強度を有しており、角膜内皮細胞の良好な接着、進展が認められた。さらに、培養後も新規開発シートは透明性を維持しており、また良好な操作性を確保していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

3. 新聞・テレビ等による報道

なし

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

3. その他

なし

電子顕微鏡を用いた人工角膜実質の構造解析

研究分担者 竹花 一成 酪農学園大学獣医学科 教授

研究要旨

角膜全層の再生医療技術開発のうち、角膜実質の開発には基質の素材自体の検討、細胞の供給源、培養法の検討、さらに基質と細胞の組み合わせの検討を行う必要がある。本研究では、実験的に作出した角膜実質損傷部にアテロコラーゲンゲルを充填し、修復過程を評価した。その結果、早期に角膜の透明性が回復し、形態学的にも損傷部の再生がみられた。実質細胞がアテロコラーゲンゲルを足場として増殖し、さらに新たなコラーゲン細線維を産生することで修復が早期に行われたと考えられた。したがって、このアテロコラーゲンゲルは角膜実質基質として応用可能であると推察される。

A. 研究目的

水泡性角膜症などの非可逆的な混濁に対し、角膜移植が適応されるが、ドナー不足が問題となっており、角膜の再生医療が求められている。角膜の再生医療には上皮再生、内皮再生、実質再生、角膜全層の開発の4つの段階がある。上皮と内皮においては細胞シートの開発に成功しており、移植実験も既に行われている(Nishida, 2004; Sumide, 2006)。しかし、実質はその強度や透明性が重要であり、基質の素材自体の検討、細胞の供給源、培養法の検討、さらに基質と細胞の組み合わせの検討を行う必要がある。

そこで抗原性が著しく低く、陥没性瘢痕などの治療に用いられているアテロコラーゲンゲルを、実験的に作出した角膜実質損傷部の治療に用いた。そして、その修復過程を評価することで、アテロコラーゲンゲルの角膜実質基質としての有効性を検討した。

B. 研究方法

健康なビーグル犬3頭3眼の角膜中央部に真空トレビンを用いて直径8mm深さ0.375mmの損傷モデルを作製し、アテロコラーゲンゲルを充填した。その治癒過程を臨床的観察し、術後7、14、35日に角膜を採取し、形態学的に評価した。

臨床的観察

細隙顕微鏡を用いて角膜の透明性や血管新生の程度の観察および、フルオレセイン染色法により角膜損傷部における角膜前上皮の再生の程度を観察した。

形態学的評価

光学顕微鏡観察

角膜サンプルを10%ホルマリンで浸漬固定した。以下定法に従いアルコール脱水、キシロールによる透徹を行い、パラフィン包埋した。ミクロトーム(YAMATOKOHKI、日本)を用い、7 μ mないし6 μ m厚の切片を作製し、脱パラフィン後、

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、光学顕微鏡で観察した。角膜上皮細胞の観察および単位面積あたりの実質細胞数の計測を行った。

透過型電子顕微鏡観察

角膜サンプルを 3.0% グルタルアルデヒド・0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) にて浸漬固定 (前固定) した。その後 1.0% 四酸化オスミウム溶液で 1 時間、後固定を行った。エタノール系列で脱水し、QY-1 にて置換後、Quetol 812 (日新、EM、東京) にて包埋した。また、超薄切片を作製し、銅グリッドに搭載し、0.2% タンニン酸 10% エタノール水溶液で 15 分媒染後、1% 酢酸ウランで 8 分、2% クエン酸鉛 10 分の二重染色を施し、透過型電子顕微鏡 (JEM-1220 ; 日本電子、東京) を用いて加速電圧 80 kV にて観察した。角膜上皮細胞の基底膜および実質細胞の観察を行った。さらに、実質層のコラーゲン細線維の配列を観察し、占有率を計測した。

C. 研究結果

臨床的観察

角膜の透明性は術後 4 日には虹彩細部透見可能な程までに回復し、その後も透明性は維持された。術後 7 日前後までは角膜輪部に血管新生がみられたが、角膜損傷部まで血管が新生することはなかった。フルオレセイン染色は陰性となり、角膜実質損傷部が角膜前上皮で覆われていた。

形態学的評価

術後 7 日では、損傷部は角膜上皮で覆われていたが、上皮細胞数は正常角膜に比べ多く、基底膜も断片的で不完全であった。日数依存性に上皮細胞数は減少し、正常と同様な数と形態を示した。基底膜も術後 35 日にはほぼ正常に再生していた。

角膜実質細胞数は術後 7 日では正常に比べ多かったが、徐々に減少し、術後 35 日には正常と

同様であった。術後 7 日では大型で丸い核を持つ細胞が多く見られた。術後 14、35 日では、核小体が明瞭で、粗面小胞体が発達した細胞が多く観察された。

実質層のコラーゲン細線維は日数依存性に徐々に規則的な配列となり、占有率も増加し、正常角膜に近い状態へと再生した。

D. 考察

角膜実質損傷部は炎症反応をほとんど示さず、早期に透明性を回復した。角膜上皮再生は実質損傷部に充填したアテロコラーゲンゲル上でも遅延なく行われた。角膜実質層の修復過程での実質細胞の重要性は報告されており (Ohno et al., 2002)、本実験でも実質細胞がアテロコラーゲンゲルを足場として増殖し、さらに新たなコラーゲン細線維を産生することで修復が早期に行われたと考えられた。したがって、このアテロコラーゲンゲルは角膜実質基質として応用可能であると推察される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Iwasaki, S., Hosaka, Y., Iwasaki, T., Yamamoto, K., Nagayasu, A., Ueda, H., Kokai, Y. and Takehana, K. 2008. The modulation of collagen fibril assembly and its structure by decorin: an electron microscopic study. Arch Histol Cytol 71: 37-44.

2) Nagayasu, A., Hosaka, Y., Yamasaki, A., Tsuzuki, K., Ueda, H., Honda, T. and Takehana, K. 2008. A preliminary study of direct application of atelocollagen into a wound lesion in the dog cornea. Curr Eye Res 33: 727-35.

2. 学会発表

F. 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

3. その他

なし

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

研究分担者 山口 拓洋 東京大学医学部附属病院

研究要旨

臨床試験におけるデータマネジメントについては、データ取得時における入力・修正などの作業に注目した技術面ばかり強調され、その重要性は未だ認識されていない。これらのデータ操作に関する以外にも、試験計画書作成への参画、調査票の作成、データのコード化や入力方法の検討、データベースの設計と管理、試験実施中のデータのモニタリング、解析のためのデータセットの作成など、データマネジャーの関わりは多岐に渡らなければならない。特に、再生医療技術の臨床応用を含めた橋渡し臨床試験については、安全性情報の管理も含めた柔軟な試験デザインとなるため、データマネジャーを有効的に活用する必要がある。

A. 研究目的

再生医療技術の臨床応用も含めた橋渡し臨床試験におけるデータマネジメントのあるべき姿について検討した。

B. 研究方法

主として文献や実際の臨床試験計画への参画にもとづき、特に近年変革の大きい臨床試験の電子化などについて考慮したうえで、データマネジメントが目指すべき方向性について整理しまとめた。

（倫理面への配慮）

該当しない。

C. 研究結果

これまでの本邦における臨床試験のデータマネジメントは、「なぜ、データマネジメントが必要なのか？」や「どういう人材が必要なのか？」

といった本質が論じられることはなく、臨床試験において臨床データが集まった後のテクニカルな入力ミスや変換ミスをなくすことに主眼が置かれ続けてきた感は否めない。しかしながら、これらは臨床試験のデータマネジメントの役割のあくまで一部分にしか過ぎない。臨床試験実施中の進捗状況やデータを直接眺められるのはまぎれもなくデータマネジャーであり、その判断により試験をコントロール可能な重要な役割を担っている。特に、橋渡し臨床試験については、初めてヒトに対して実施される実験であることから、安全性に関して十分な配慮が必要なデザインを考慮する必要がある。すなわち、臨床試験の複雑化と電子化による迅速化に伴い、進行中の試験の進捗状況を分析し、プロトコルの変更やCRFの変更、新規クエリの発行などを適切に実施し、被験者の安全性に対するリスクを低くしながら、試験をコントロールしていくという高度な判断能力

が必要になる。

従って、データマネジャーは、自分の専門領域を軸としながらも、試験に関係する他の研究者ともコミュニケーションを取りながら臨床試験実施中のデータのマネジメントができなければならない。一方で、臨床試験に関わる研究者は、データマネジメントの役割と重要性をこれまで以上に認識しなければならない。

本邦の研修者主導臨床研究におけるデータマネジメントの重要性はなかなか理解されてこなかった。平成19年3月に出された「新たな治験活性化5ヵ年計画」では、データマネジメントの重要性が触れられているが、特に本邦においてデータマネジメントに対する認識の差は非常に大きく、企業や実施機関ごとにデータマネジメントのやり方やアプローチが異なり、必要な人材が育成されていないのが現状である。この状況を打開するためにも、最低限の標準的な教育（臨床、統計学、品質管理、医療情報学、法規制、倫理など）と On the Job Training (OJT) を同時に行えるような体制の確保が望まれる。

D. 考察

本研究班で試験計画が進められている「難治性角結膜疾患に対する自己培養口腔粘膜上皮シート移植の臨床試験」については、実施計画書の作成段階から、統計家とデータマネジャーが議論に加わっている。データマネジャーが参加することで、試験計画の妥当性や実施可能性などについて生産的な議論ができています。例えば、データ取得のタイミング、安全性情報取得方法、試験計画書とCRFとの対応などである。これまでの臨床研究では、データのマネジメントという観点からの議論がおきざりのまま研究計画書が作成されることがほとんどであった。データマネジャーは、計

画書が作成されてから、CRFの作成などに関わることが多かった。本来であれば、データプロジェクトのマネジメントも含めての試験計画であり、今後はこのような形式で臨床試験の研究計画が作成されることが強く望まれる。

また、今後の臨床試験においては複数の関連機関がそれぞれの役割分担をもって試験で連携し、ヴァーチャルな研究組織を形成し、ネットワーク化が進むと考えられることから、データマネジャーの他の専門家とのコミュニケーション能力がより重きをなすと思われる。

E. 結論

橋渡し臨床試験などを通じて取得するデータについては、公正な評価を行うための適切なデータマネジメントの実施が必須である。これまでの狭義の意味でのデータマネジメントでなく、臨床試験の計画段階から最終的に結果を評価・報告する段階までデータのマネジメントに関与する真のデータマネジメントが必須であり、そのための様々な周辺環境の整備が重要である。特に、試験計画に関して自由度が大きい再生医療技術の臨床応用も含めた橋渡し臨床試験については、その重要性をより認識して対応しなければならない。

F. 研究発表

1. 論文発表

天津 洋、山下昌洋、増井俊成、中谷知弘、山口拓洋. 変革期を迎えたクリニカルデータマネジメント. 日本臨床薬理学会雑誌 2008; 39(2):55-59.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

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

研究分担者

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

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

大和 雅之 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授

研究要旨

基礎研究によって生み出された新規医療技術のヒトへの適応は、事前に第三者の客観的評価を受けたプロトコールの下でのみ可能となる。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、免疫抑制剤の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、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。

A. 研究目的

基礎研究によって生み出された新規医療技術をヒトに対して適応する場合、事前に適切なプロトコールを作成し、第三者からの科学的、倫理的に客観的評価を受けた上で、実施する必要がある。

本研究班で実施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、東北大学医学部・医学系倫理委員会の承認を平成18年4月17日に得ている。

3年計画の2年目に当たる本年は、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。

B. 研究方法

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。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（第2項先進医療）としての申請を行った。（「厚生労働大臣の定める先進医療及び施設基準の制定等に伴う実施上の留意事項及び先進医療に係る届出等の取扱いについて」（保医発第0331003号、平成20年3月31日）

C. 研究結果

1 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ール

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

る方法を使う。細胞シートの製造方法も含めて用いるプロトコールは、倫理委員会で承認済のものである。

2 過去の移植実績

発表済の症例（N Engl J Med 351: 1187-1196, 2004）だけでなく、発表準備中の症例も含めて申請書に示した。

3 先進医療に要する費用

先進医療にかかる費用は、自家培養上皮細胞シート製造・検査費用と手術時費用（人件費、消耗品費など）を算出した。

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

D. 考察

自家培養上皮細胞シート製造方法については、これまでの実績などから、従来法の 3T3 細胞と胎仔ウシ血清を用いる方法とした。しかしながら、先進医療として認められることの意義は非常に大きく、

1. 今後臨床研究が保険診療を併用して実施することができる

2. 将来、保険収載される可能性が高くなる

ことから、角膜上皮再生を一般医療へ近づけることができると考える。

E. 結論

角膜上皮再生の臨床研究を実施するに当たり、先進医療への申請を行うこととした。厚生労働省との相談の結果、未承認・適応外使用の医薬品・医療機器は使用していないとのことで、第2項先進医療での申請をおこなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

知的財産に関する一覧表