

- ・ P0-cre-EGFP-mouse 角膜凍結切片の観察
- ・ コラーゲンゲルポケットアッセイ 200 日後の結果
- ・ ポリエチレングリコール、グルコサミノグリカン、コアプロテインの混合実験
- ・ 透明化強膜、皮膚真皮の動物移植実験

ディスカッション

- ・ 混合物のイオン強度についての検討が必要

#### 5. 角膜内皮細胞シート移植用キャリアについて

発表者：東北大・渡邊

報告内容

- ・ キャリア上での角膜内皮培養

ディスカッション

- ・ ゲル上の細胞を観察するときのフォーカスの合わせ方

#### 6. Using chamber を用いた in vivo, in vitro での角膜内皮の電位差測定

発表者：東北大・景山

報告内容

- ・ Using chamber を用いた in vivo, in vitro での角膜内皮の電位差測定結果について
- ・ アリザリン染色、免疫染色の結果

ディスカッション

- ・ 完全には誘導できていない。

#### 7. 虹彩由来幹細胞について

発表者：東北大・菊池

報告内容

- ・ PCR について

ディスカッション

- ・ 良好な結果

#### 8. EMT について

発表者：女子医・梅本

報告内容

- ・ 上皮細胞シート培養時の Basal 側と apical 側の培地の違い等

ディスカッション

- ・ 培地成分の差は明らか

#### 9. 角膜上皮幹細胞と造血幹細胞の共通項に関するこれまでの研究について

発表者：女子医・梅本

報告内容

- ・ ノックアウトマウスに関するこれまでの研究のまとめ

ディスカッション

- ・ 明瞭な差があり、研究経過は順調。

\* 次回ミーティングは東北大学眼科にて 11 月 21 日に行う予定。

「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」  
角膜再生グループ 平成 20 年度 第 7 回 東京女子医大・東北大眼科ミーティング  
議事録

出席者：東北大学：西田幸二、林竜平、萩原邦恵、菊池未来、櫻井美晴、渡邊亮、田中佑治、  
劉孟林、大家義則、渡邊亮、高野、景山智文、上松聖典（長崎大）  
東京女子医科大学：大和雅之、梅本晃正、村上大輔  
大阪大学：相馬剛至

日時：平成 20 年 11 月 21 日（金） 17：00～21：00

場所：東北大学大学院医学系研究科 神経感覚器病態学講座・眼科視覚科学分野

書記：田中 佑治

【ミーティング内容】 研究進捗状況報告

1. 皮膚フィーダーを用いた口腔粘膜上皮シート作製

発表者：東北大・大家

報告内容

- ・ 今後の評価項目について

ディスカッション

- ・ 系の妥当性について
- ・ 今後の評価項目について

2. 電気抵抗測定法装置を用いた角膜バリア機能評価

発表者：東北大（長崎大）・上松

報告内容

- ・ これまでの研究について
- ・ 新型の角膜電気抵抗値測定装置開発
- ・ ヒト角膜上皮シートの電気抵抗測定

ディスカッション

- ・ 原理の確認
- ・ どのタイプが最適かについて

3. 虹彩由来幹細胞について

発表者：東北大・菊池

報告内容

- ・ FACS 解析、スフェア培養、PCR について

ディスカッション

- ・ 今後の方針について

4. 角膜内皮再生について

発表者：東北大・高野

報告内容

- ・ 内皮細胞培養について
- ・ 移植の準備について

ディスカッション

- ・ 今後の方針について

5. 角膜内皮細胞シート移植用キャリアについて

発表者：東北大・渡邊

報告内容

- ・ キャリア上での角膜内皮培養

ディスカッション

- ・ 細胞との相性、コーティング剤との相性

6. 自動培養装置について

発表者 女子医大・小林

報告内容

- ・ カートリッジ

イヌ口腔粘膜細胞を培養。カートリッジでもコンフルエントになったが、インサートと比較して増殖が少し遅い。→あまり問題ない

7. T-R culture insert の検討

発表者 女子医大・村上

報告内容

- ・ rat oral epithelial cell sheet の評価

rat では dish や insert に関係なく basal 側に tight-junction を形成する傾向にある。

- ・ EMT

H-E 染色では human basal cell は EMT をおこしているよう

8. イヌ口腔粘膜上皮シート

発表者 女子医大・高木

報告内容

- ・ イヌ口腔粘膜上皮 (COME) シートの検討

培地・フィーダー細胞との共培養など有無などで条件をふってみる。

→フィーダー共培養の

9. 造血幹細胞とインテグリン  $\beta 3$  について

発表者 女子医大・梅本

CD 6 1 のシグナルが分裂を抑制している可能性があるが、未分化性を保っている可能性もある。

CD 6 1 は TPO にきいている？

CD61 シグナルによって細胞分裂抑制とは別の機構でも HSC の能力を維持している

#### 10. 培養移植シート移植用装置の検討

発表者 女子医大・前田

- ・角膜内皮細胞シート内皮移植用 device の検討

もともと胸腔鏡下でおこなうシート移植用 device を開発していた。

同じ様な装置を角膜内皮細胞シート装置を開発している。

前房内でシートをリリースする。

外筒直径 3.5mm だが、改良次第では直径 3.0mm もいけそう。

#### 11. 生体組織／細胞培養系における比較検討

発表者 女子医大・近藤

- ・ ヒトとヒト以外の動物種の比較
- ・ CFA, HE, 免疫染色
- ・ 血清の添加と細胞シートの形成に関する研究

ディスカッション

- ・ 接着因子と細胞シート形成

\* 次回ミーティングは東北大学眼科にて 11 月 21 日に行う予定。

「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」  
角膜再生グループ 平成 20 年度 第 8 回 東京女子医大・東北大眼科ミーティング  
議事録

出席者：東北大学：西田幸二、林竜平、萩原邦恵、菊池未来、櫻井美晴、渡邊亮、田中佑治、  
劉孟林、大家義則、渡邊亮、高野良真、景山智文、上松聖典（長崎大）  
東京女子医大学：大和雅之、梅本晃正、村上大輔、近藤誠、前田真法  
大阪大学：相馬剛至、齋藤禎子  
大阪医療センター：林田康隆

日時：平成 20 年 12 月 19 日（金） 17：00～21：00

場所：東北大学大学院院医学系研究科 神経感覚器病態学講座・眼科視覚科学分野

書記：田中 佑治、渡邊 亮

[ミーティング内容] 研究進捗状況報告

1. 幹細胞疲弊症患者の角膜実質に関する研究

発表者：阪大・斉藤

報告内容

- ・ 幹細胞疲弊症の角膜実質の解析
- ・ プロテオグリカン mRNA、CD マーカー、ケモカインの解析

ディスカッション

- ・ 系の妥当性について
- ・ 今後の評価項目について

2. 角膜上皮幹細胞 Niche に関する研究

発表者：阪大・林田

報告内容

- ・ 細胞の単離方法と細胞培養、角膜上皮幹細胞 Niche

ディスカッション

- ・ Niche を維持した細胞の単離方法
- ・ マウスの角膜内皮は単離可能

3. GFP ラットに対する培養口腔上皮シート移植

発表者：阪大・相馬

報告内容

- ・ 角膜輪部、角膜中央部の未分化マーカーの探索(p63、K14、K5)

ディスカッション

- ・ 実験条件の検討

4. 角膜内皮再生について

発表者：東北大・萩原

報告内容

- ・ コンストラクトの設計

ディスカッション

- ・ 定量的評価も今後必要。
- ・ Electroporation 装置の検討。

#### 5. 生体組織／細胞培養系における比較検討

発表者 女子医大・近藤

- ・ ヒトとヒト以外の動物種の比較
- ・ CFA, HE, 免疫染色
- ・ 添加因子と細胞シートの形成

ディスカッション

- ・ 増殖因子を特異的に生産する動物についてさらに解析を進めるべき

#### 6. EMTに関する研究

発表者 女子医大・村上

報告内容

- ・ ヒトと他動物から作製した細胞シートの比較

ディスカッション

- ・ EMT, MET について

#### 7. 上皮細胞シート作製用培地の開発

発表者 女子医大・高木

報告内容

- ・ 添加因子効果の解析
- ・ コーティングの効果、

ディスカッション

- ・ 初期接着について検討すべき

培地・フィーダー細胞との共培養など有無などで条件をふってみる。

#### 8. 培養移植シート移植用装置の検討

発表者 女子医大・前田

- ・ 角膜内皮細胞シート内皮移植用 device の改良

#### 9. 造血幹細胞とインテグリン $\beta 3$ について

発表者 女子医大・梅本

- ・ 表面マーカーシグナルと細胞分化、未分化性維持の関係

「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」  
角膜再生グループ 平成 20 年度 第 9 回 東京女子医大・東北大眼科ミーティング  
議事録

出席者：東北大学：西田幸二、林竜平、萩原邦恵、菊池未来、櫻井美晴、渡邊亮、田中佑治、  
劉孟林、大家義則、渡邊亮、高野良真、景山智文、上松聖典（長崎大）  
東京女子医大学：大和雅之、高木亮、村上大輔、近藤誠、前田真法  
大阪大学：齋藤禎子  
大阪医療センター：林田康隆

日時：平成 21 年 2 月 2 日（月） 17：00～20：00

場所：東北大学大学院院医学系研究科 神経感覚器病態学講座・眼科視覚科学分野

書記：田中 佑治

【ミーティング内容】 研究進捗状況報告

1. 角膜内皮の遺伝子解析

発表者：東北大学・林

- ・ 培養法による遺伝子発現の違いを解析

ディスカッション

- ・ 手法の比較
- ・ 現在データを解析中

2. マウス角膜細胞の単離

発表者：東北大・萩原

報告内容

- ・ マウス角膜上皮の単離
- ・ マウス角膜内皮の単離

ディスカッション

- ・ マウス角膜内皮の単離法を検討する必要あり

3. 幹細胞疲弊症患者の角膜実質および角膜上皮細胞シート作製に関する研究

発表者：阪大・齋藤

報告内容

- ・ 幹細胞疲弊症の角膜実質の解析
- ・ プロテオグリカン mRNA、CD マーカー、ケモカインの解析
- ・ ナイバーム上および羊膜上で作製した角膜上皮シートのフローサイトメトリー解析

ディスカッション

- ・ 系の妥当性について
- ・ 解析手法の確認
- ・ 今後の評価項目について



4. TERによる角膜上皮シートのバリア機能評価および生体角膜のバリア機能測定装置の開発

発表者：長崎大・上松

報告内容

- ・ 上皮細胞シートの形成とタイトジャンクション機能発現
- ・ 新規角膜電極の有効性評価

ディスカッション

- ・ 早期論文化
- ・ 絶縁パーツの改良

5. 角膜内皮細胞源の探索と角膜内皮への分化誘導

発表者：東北大・景山

報告内容

- ・ 神経堤細胞増殖法の検討
- ・ 角膜内皮への誘導法の検討

ディスカッション

- ・ 誘導の順番に関する検討

6. 上皮細胞シート作製用培地の開発

発表者 女子医大・高木

報告内容

- ・ 添加因子効果の解析
- ・ コーティングの効果、

ディスカッション

- ・ 初期接着の影響について考慮すべき

7. EMTに関する研究

発表者 女子医大・村上

報告内容

- ・ 細胞シート上のEカドヘリンの局在
- ・ タイトジャンクションの形成と物質輸送・代謝

ディスカッション

- ・ マイクロダイセクションのプロトコールについて

8. 生体組織／細胞培養系における比較検討

発表者 女子医大・近藤

- ・ ヒトとヒト以外の動物種の比較
- ・ CFA, HE, 免疫染色
- ・ 他種共培養系

ディスカッション

- ・ ムチン層の発現に関する考察

## 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名 巻頁数 論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
角膜の幹細胞移植 (病理と臨床 Vol.27 No.4)	2009年4月1日	文光堂	林竜平、西田幸二
幹細胞の分化誘導と応用 (p.293-299)	2009年2月20日	エヌ ティー エス	林竜平、西田幸二
iPS細胞による角膜再生への応用	2009年1月1日	エーザイ株式会社	林竜平、西田幸二
角膜再生	2008年	南山堂	林竜平、西田幸二
iPS細胞を用いた角膜再生	2008年	ブッカーズ	林竜平、西田幸二
角膜の再生医療 (医学のあゆみ・226・11)	2008年 9月13日	医歯薬出版株式会社	久保田享、西田幸二
成熟細胞・角膜上皮の再生医療 (進みつつける細胞移植治療の実態下巻)	2008年 5月31日	株式会社メディカルド	久保田享、西田幸二
前眼部OCT検査の機器：使用経験 (新しい眼科・25・5)	2008年 5月30日	メディカル葵出版	久保田享、西田幸二
培養上皮細胞シート移植 (NANO OPHTHALMOLOGY・2008・35)	2008年 5月30日	日本点眼薬研究所	久保田享
最新の角膜外科的治療 (NANO OPHTHALMOLOGY・2008・35)	2008年 5月30日	日本点眼薬研究所	西田幸二
変革期を迎えたクリニカルデータマネジメント (39(2):55-59)	2008年	日本臨床薬理学会雑誌	大津 洋、山下昌洋、増井俊成、中谷知弘、山口拓洋

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名 巻頁数 論文名)	刊行年	執筆者氏名
Chem. Lett. 37, 12, 1254-1255 Development of a Collagen Hydrogel with High Mechanical Strength by a Simple Molecular Orientation Method for Triple-Helix	2008	Hongo C, Matsusaki M, Nishida K, Akashi M
Journal of engineering and regenerative medicine. 2, 445-449 Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a novel feeder layer for epithelial cells.	2008	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
Experimental Eye Research. 1-6 Differential expression of MUC16 in human oral mucosal epithelium and cultivated epithelial sheets.	2008	Y. Hori Y, Nishida K, Yamato K, Sugiyama H, Soma T, Inoue T, Maeda N, Okano T, Tano Y
Genes Cells, 13, 839-850 PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation.	2008	Kita K, Kimura T, Nakamura N, Yoshikawa H, Nakano T
Development, 135, 869-79 Akt signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells.	2008	Kimura T, Tomooka M, Yamano N, Murayama K, Matoba S, Umehara H, Kanai Y, Nakano T
Blood, 111, 1924-32 Differential context-dependent effects of FOG-1 on mast cell development and differentiation.	2008	Sugiyama D, Tanaka M, Kitajima K, Zheng J, Yen H, Murotani T, Yamatodani A, Nakano T
Arch Histol Cytol 71, 37-44 The modulation of collagen fibril assembly and its structure by decorin: an electron microscopic study.	2008	Iwasaki S., Hosaka, Y., Iwasaki T., Yamamoto, K., Nagayasu, A., Ueda, H., Kokai, Y. and Takehana, K.
Curr Eye Res 33, 727-35 A preliminary study of direct application of atelocollagen into a wound lesion in the dog cornea.	2008	Nagayasu, A., Hosaka, Y., Yamasaki, A., Tsuzuki, K., Ueda, H., Honda, T. and Takehana, K.
Acta Biomater. 2009 Jan;5(1), 470-6 Temperature-responsive glass coverslips with an ultrathin poly(N-isopropylacrylamide) layer.	2008	Fukumori K, Akiyama Y, Yamato M, Kobayashi J, Sakai K, Okano T

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名 巻頁数 論文名)	刊行年	執筆者氏名
Biomaterials. Sep;29(27), 3650-5 The effect of extensible PEG tethers on shielding between grafted thermo-responsive polymer chains and integrin-RGD binding.	2008	Ebara M, Yamato M, Aoyagi T, Kikuchi A, Sakai K, Okano T
J Tissue Eng Regen Med. Jun;2(4), 190-5 Transportation of transplantable cell sheets fabricated with temperature-responsive culture surfaces for regenerative medicine.	2008	Nozaki T, Yamato M, Inuma T, Nishida K, Okano T
Biomaterials. Jun;29(17), 2565-72 A thermoresponsive, microtextured substrate for cell sheet engineering with defined structural organization.	2008	Isenberg BC, Tsuda Y, Williams C, Shimizu T, Yamato M, Okano T, Wong JY
Biomaterials. May;29(13), 2073-81 Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells.	2008	Mizutani A, Kikuchi A, Yamato M, Kanazawa H, Okano T
J Biomed Mater Res A. Sep 15;86(4), 1088-96 Subcutaneous transplantation of autologous oral mucosal epithelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes.	2008	Obokata H, Yamato M, Yang J, Nishida K, Tsuneda S, Okano T

## 【幹細胞医学の臨床】

## 角膜への幹細胞移植

林 竜平<sup>\*</sup>  
西田幸二<sup>\*</sup>

## はじめに

角膜は角膜上皮、角膜実質、角膜内皮の3層からなる透明な無血管組織である。角膜疾患のために失明など重篤な視覚障害に至った患者に対して、現在、ドナー角膜を用いた角膜移植法が実施されている。現在の角膜移植は献眼に依存しているが、本邦における提供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、Stevens-Johnson症候群などの重篤な角結膜疾患では、拒絶反応等のため術後成績は良好ではない。これらのドナー不足および拒絶反応の問題を解決する手段として、患者自身の幹細胞・前駆細胞を用いた再生治療法の開発が進められている。

本稿では、筆者らが開発し、既に臨床応用を開始している自家細胞による角膜上皮再生治療法を中心に、現在、研究中である角膜内皮の再生医療についても述べる。

## I. 角膜上皮再生

角膜上皮は角膜の最表層に存在する厚さ約50 $\mu$ mの非角化扁平重層上皮である(図1a)。角膜上皮は、表層細胞のタイトジャンクション形成やムチン産生により外界とのバリア機能を担っている。角膜上皮幹細胞は、角膜と結膜の境界に位置する輪部と呼ばれる組織の上皮基底部に存在すると考えられている(図1b)。角膜上皮幹細胞は、角膜上皮型分化マーカー(ケラチン3, 12)を発現せず、p63等の上皮幹細胞マーカーを発現し、また細胞分裂が緩やかであるなどの特性を有している<sup>1-3)</sup>。外傷や角膜上皮疾患により、輪部の角膜上皮幹細胞が機能不全に陥ると、幹細胞からの角膜

上皮細胞の供給ができなくなり、角膜混濁などの重篤な視覚障害が起きると考えられる(角膜上皮幹細胞疲弊症, 図1c)。これら角膜上皮幹細胞疲弊症に対して、ドナー眼を用いた角膜移植法が実施されてきたが、拒絶反応等のため術後成績は良好ではない。

拒絶反応の問題を解決する方法として、1997年に患者自身(自家)の細胞を用いた培養角膜上皮移植法が初めて報告された<sup>4)</sup>。本手法は、片眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症に対して、患者の健常眼より採取した角膜上皮幹細胞の培養により、培養角膜上皮シートを製作し、疾患眼へ移植する方法である。この報告以降、角膜上皮疾患に対して再生医療的アプローチによる治療法の開発が進められ、拒絶反応の問題解決に寄与してきた<sup>5-7)</sup>。しかし一方で、両眼性疾患には適応できないこと、および培養上皮細胞シートの回収方法が課題となっている。つまり、ディスパーゼ等の酵素を用いて培養上皮細胞シートを回収する場合は、酵素処理によるシート自体の脆弱化、また、羊膜やフィブリンゲルなどの基質を用いる場合は安全性や生体適合性の問題が危惧されている。

これらの問題を解決すべく筆者らは基質や酵素処理を必要としない、独自の自家培養上皮細胞シート移植法を世界に先駆けて開発した<sup>8)</sup>(図2a)。片眼性疾患の場合には、健常眼の輪部上皮、両眼性疾患の場合では口腔粘膜上皮より上皮幹細胞・前駆細胞を単離し、温度応答性培養皿上で培養する。この温度応答性培養皿は、37 $^{\circ}$ Cでは培養皿表面が疎水性となるため細胞が接着するが、32 $^{\circ}$ C以下では、相転移により表面が親水性となり細胞が接着できない。このため、この培養皿上で培養した細胞は酵素処理を必要とせず、温度を下げるという極めて非侵襲的な方法により、細胞接着装置を保持したまま培養上皮細胞シートを回収することが可能である。回収した培養上皮細胞シートは、*in vivo*角膜上皮と同様に重層化しており、基底部には上皮幹細胞・前駆細胞が保持されている(図2c~f)。

\*1 東北大学大学院医学系研究科眼科・視覚科学分野

図1 角膜上皮幹細胞と角膜上皮幹細胞減少症  
 a: 角膜は上皮、実質、内皮の3層からなる。  
 b: 角膜上皮幹細胞は輪部組織の上皮基底部に局在している。  
 c: 輪部の角膜上皮幹細胞が衰弊あるいは消失すると、結膜上皮が侵入してきて瘢痕化する(角膜上皮幹細胞減少症)。

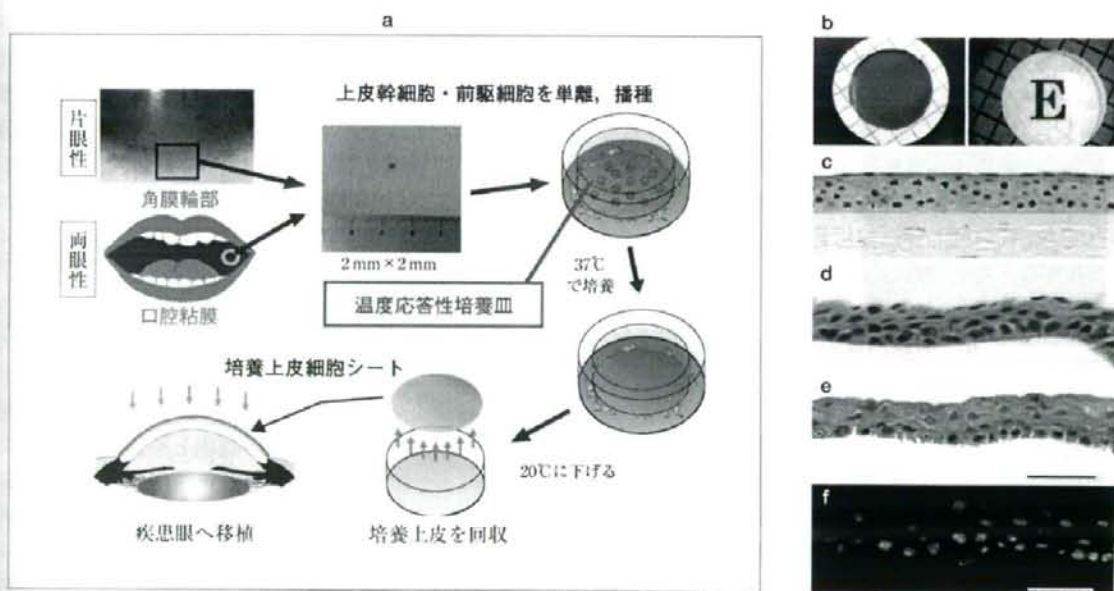
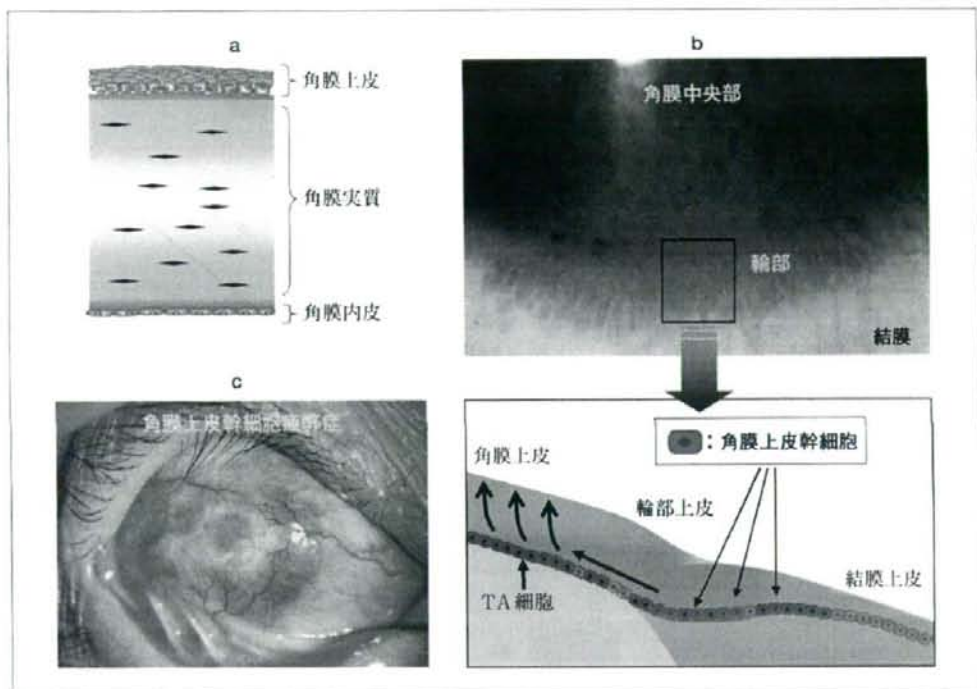


図2 温度応答性培養皿を用いた自家培養上皮細胞シート移植法 a: 2×2 mmの輪部組織(片眼性)あるいは口腔粘膜組織(両眼性)を患者自身から採取→酵素処理で幹細胞・前駆細胞を含む上皮細胞を単離→上皮細胞を温度応答性培養皿上で培養(37°C)→温度を下げて(20°C)培養上皮細胞シートを剥離→疾患眼へ移植, b: 回収した培養上皮細胞シート, 透明な一枚のシートとして回収可能である, c: 生体角膜上皮のHE染色像, d: 培養角膜上皮細胞シートHE染色像, 培養角膜上皮細胞シートは生体角膜と同様に重層化している, e: 培養口腔粘膜上皮細胞シートHE染色像, 培養角膜上皮細胞シート同様に重層化している, f: 培養角膜上皮細胞シートのp63免疫染色像, 培養上皮細胞シートの基底部にp63陽性の角膜上皮幹細胞・前駆細胞が存在している, bar=50µm。(文献8,9より)

筆者らは再生医学に基づいて、基質を用いない角膜上皮再生治療法の開発に取り組んできた。角膜上皮については、世界に先駆けて温度応答性培養皿を用いた自家の培養上皮細胞シート移植法の臨床応用に成功し、拒絶反応とドナー不足という2つの問題を同時にクリアすることができたことに大きな意義がある。一方で、角膜内皮の再生医療はまだ研究段階であり、臨床応用されるに至っていない。これらの再生医療の実現化には、幹細胞・前駆細胞に対する理解をさらに深める必要がある。今後、角膜全層の再生医療を実現化し、献眼に頼らない、拒絶反応のないより安全でかつ有効な治療法を提供できるよう、筆者らも日々研究に精進している。

文 献

- 1) Schermer, A., Galvin, S., Sun, T.T. : Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986, 103 : 49-62
- 2) Cotsarelis, G., Cheng, S.Z., Dong, G. et al. : Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : Implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989, 57 : 201-209
- 3) Hayashi, R., Yamato, M., Sugiyama, H. et al. : N-cadherin is expressed by putative stem/progenitor cells and melanocytes in the human limbal ep-

ithelial stem cell niche. *Stem Cells* 2007, 25 : 289-296

- 4) Pellegrini, G., Traverso, C.E., Franzini, A.T. et al. : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997, 349 : 990-993
- 5) Tsai, R.J., Li, L.M., Chen, J.K. : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal cells. *N Engl J Med* 2000, 13 : 86-93
- 6) Koizumi, N., Inatomi, T., Suzuki, T. et al. : Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001, 108 : 1569-1574
- 7) Rama, P., Bonini, S., Lambiase, A. et al. : Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 2001, 72 : 1478-1485
- 8) Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y. et al. : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 2004, 77 : 379-385
- 9) Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y. et al. : Corneal reconstruction using tissue-engineered cell sheets comprising autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 2004, 351 : 1187-1196
- 10) Ide, T., Nishida, K., Yamato, M. et al. : Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials* 2006, 27 : 607-614
- 11) Sumide, T., Nishida, K., Yamato, M. et al. : Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J* 2006, 20 : 392-394

血液細胞ノート  
形態速習アトラス



好評  
発売中!

血液細胞ノート —形態速習アトラス—

編集 ● 巽 典之 (大阪市立大学名誉教授)

◆血液細胞観察のエキスパートで、学生教育にも長年の経験がある執筆陣による血液形態観察の演習教書。血液細胞の正常像・異常像の典型例を写真で掲げ、観察すべきポイントがシエーマとともに簡潔にわかりやすく解説されたフルカラーアトラス。臨床検査技師および医師国家試験血液細胞問題を解ける力が身につく細胞学演習に最適の1冊。

●B5判・90頁・4色刷／定価2,625円(本体2,500円+税5%) ISBN978-4-8306-1418-7

◎ 文光堂

<http://www.bunkodo.co.jp> 〒113-0033 東京都文京区本郷7-2-7 tel.03-3813-5478/fax.03-3813-7241



図4 培養角膜内皮シート移植法の概要

輸入アイバンク角膜の周辺部より角膜内皮を採取→IV型コラーゲンコーティング培養皿上で初代培養→細胞継代により細胞数を増幅→生体と同密度で温度応答性培養皿に播種、37°Cで培養→20°Cに温度を下げて培養角膜内皮細胞シートを回収→疾患眼へ移植。

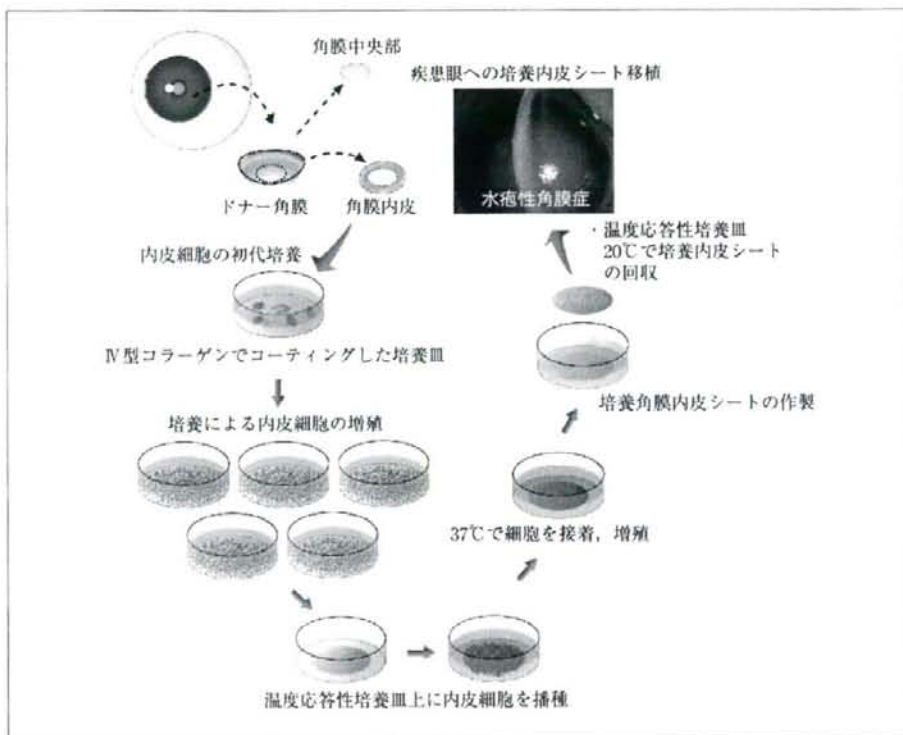


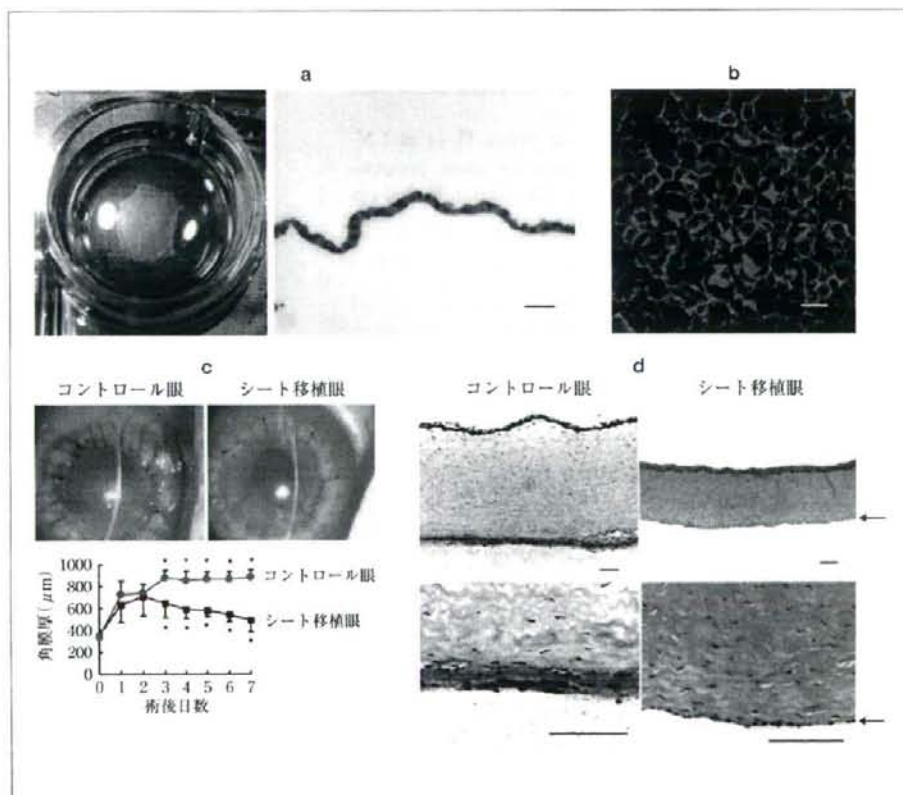
図5 ヒト培養角膜内皮細胞シートの作製および家兎疾患モデルへの移植

a: 温度応答性培養皿より回収した培養角膜内皮細胞シートおよびHE染色像。透明な単層シートとして回収可能であった (bar=20 μm)。

b: 培養角膜内皮細胞シートにおけるNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaseの免疫染色。培養角膜内皮細胞シートにはポンプ機能を担っているNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase発現が認められた (bar=20 μm)。

c: 家兎水疱性角膜症モデルへの培養角膜内皮細胞シート移植後の眼表面像。非移植眼に比較して移植眼では有意な角膜厚および透明性の改善が認められた。

d: 移植後1週間における角膜組織のHE染色像。移植眼では単層の角膜内皮(矢印)の生着が認められ、角膜厚が正常化した (bar=100 μm)。(文献11より)



## 9 iPS細胞による角膜再生への応用

東北大学大学院 林 竜平  
東北大学大学院 西田 幸二

### 1 はじめに

角膜は透明な無血管組織であるが、疾患や外傷などにより角膜の透明性が低下すると、視力が低下し、場合によっては失明に至ることもある。角膜疾患のために重篤な視覚障害に至った患者に対して、現在ドナー眼を用いた角膜移植が実施されているが、その国内における提供数は不足しており、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。また、重篤な疾患では拒絶反応のため術後成績は良好ではない。これらのドナー不足および拒絶反応の問題を解決する手段として、筆者らは患者自身の細胞(自家細胞)を用いた角膜再生治療法の開発に取り組んでいる。

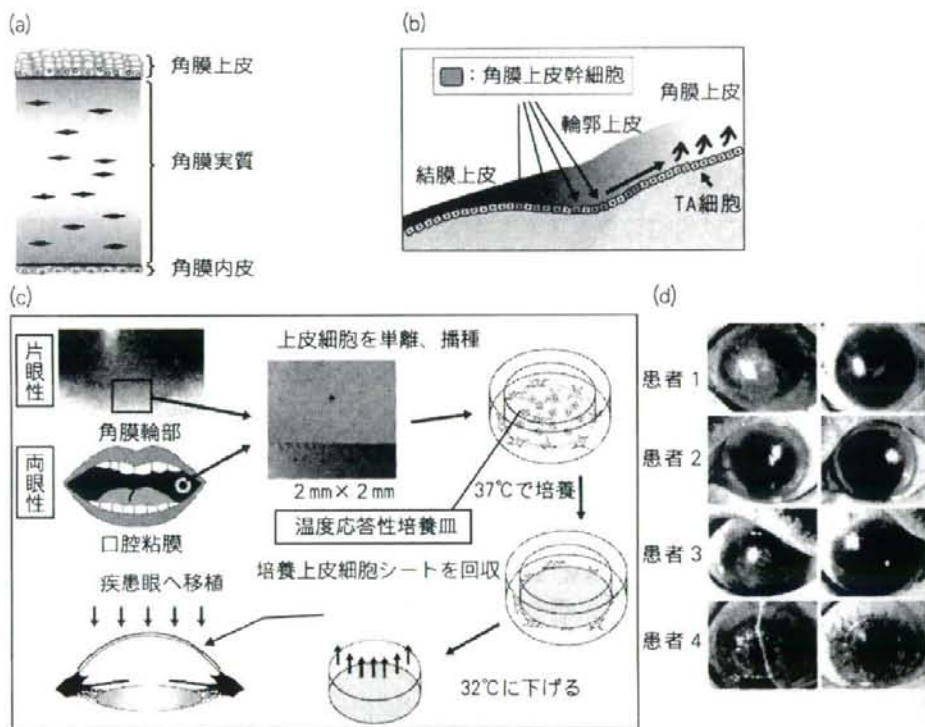
近年、京都大学山中伸弥教授らのグループが成体マウスおよびヒト体細胞に複数の遺伝子を導入することにより誘導多能性幹細胞(iPS細胞)を樹立することに成功した<sup>1),2)</sup>。iPS細胞は胚性幹細胞(ES細胞)と同等の多分化能を有すると考えられており、再生医療のための細胞源として注目されている。本稿では、筆者らがこれまでに取り組んできた自家細胞による角膜再生治療法およびiPS細胞を利用した新規角膜再生治療法について述べる。

### 2 角膜上皮再生

角膜上皮は角膜の最表層に存在する厚さ約50 $\mu$ mの非角化扁平重層上皮である(図1(a))。角膜上皮幹細胞は、角膜と結膜の境界に位置する輪部と呼ばれる組織の上皮基底部に存在すると考えられている(図1(b))。重度の外傷や疾患により、輪部の角膜上皮幹細胞が機能不全に

陥ると、角膜混濁など重篤な視力障害が起きると考えられる。これらの角膜上皮疾患に対して、ドナー眼を用いた角膜移植法が実施されてきたが、拒絶反応等のため術後成績は良好ではない。

拒絶反応の問題を解決する方法として、1997年に Pellegrini らにより患者自身(自家)の細胞を用いた培養角膜上皮移植法がはじめて報告された<sup>3)</sup>。彼女らは、片眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症に対して、患者の健常眼の少量の輪部組織より角膜上皮幹細胞を採取し、培養により得た培養角膜上皮シートを疾患眼へ移植した。この報告以降、再生医学に基づいた角膜上皮疾患治療法の開発が進められ、拒絶反応の問題解決に寄与してきた<sup>4)</sup>。しかし一方で、両眼性疾患には適応できないこと、および培養上皮細胞シートの回収方法に課題がある。つまり、ディスペラーゼ等の酵素を用いて培養上皮細胞シートを回収する場合は、酵素処理によるシート自体の脆弱化や基底部の接着装置が破壊されるといった問題、また、羊膜やフィブリンゲルなどの基質を用いる場合は安全性や生体適合性の問題が危惧されている。



- (a) 角膜は角膜上皮、実質、内皮の三層からなる。
- (b) 角膜上皮幹細胞は輪部上皮基底部に局在している。
- (c) 輪部組織(片眼性)あるいは口腔粘膜組織(両眼性)を患者自身から少量採取する。角膜上皮幹細胞・前駆細胞を含む上皮細胞を単離し、温度応答性培養皿上で培養する。温度を下げることで(32°C)培養上皮細胞シートを回収し、疾患眼へ移植する<sup>5)</sup>。
- (d) 移植前後の眼表面観察像(左:術前、右:術後)<sup>6)</sup>。

図1 培養上皮細胞シート移植

これらの問題を解決すべく筆者らは基質や酵素処理を必要としない、独自の自家培養上皮細胞シート移植法を世界に先駆けて開発した(図1(c))<sup>9)</sup>。片眼性疾患の場合には、健常眼の輪部、両眼性疾患の場合には口腔粘膜より少量の組織を採取し、上皮細胞を温度応答性培養皿上で培養する。この温度応答性培養皿は、37℃では培養皿表面が疎水性となるため細胞が接着するが、32℃以下では、相転移により表面が親水性となり細胞が接着できない。このため、この培養皿上で培養した細胞は酵素処理を必要とせず、温度を下げるという極めて非侵襲的な方法により、培養皿から培養上皮細胞シートのみを回収することが可能である。回収した培養上皮細胞シートは、細胞間接着分子や基底部の細胞外マトリックスなどの細胞接着装置が酵素処理で破壊されることなく保持されている。筆者らは Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡、熱傷、化学腐食などの角膜上皮幹細胞疫症患者に対して、温度応答性培養皿を用いた自家培養上皮細胞シート移植の臨床応用をすでに開始している。これまでの実施症例におけるシート生着率は100%であり、また、90%以上の症例で角膜透明性が改善し、良好な臨床成績が得られている(図1(d))<sup>9)</sup>。

今後、移植した角膜上皮幹細胞が長期間保持されるかなどについて、さらに観察を続けていく必要があるが、この温度応答性培養皿を用いた自家細胞による角膜上皮再生治療法は、これまで有効な治療法が存在しなかった難治性角膜上皮疾患に対して、根治的な治療法になり得ると考えられる。

### 3 角膜内皮の再生

角膜内皮は角膜の最内側に存在する単層の組織である(図1(a))。角膜内皮は角膜実質側から前房内に水を能動輸送する機能(ポンプ機能)およびバリア機能により、角膜内の含水率を一定に維持することで、角膜の透明性維持に寄与している。ヒト角膜内皮細胞は *in vivo* では増殖せず、一度角膜内皮が障害を受けると、不可逆的に角膜内皮細胞数が減少し、最終的に実質浮腫により角膜が混濁する水疱性角膜症と呼ばれる病態となる。水疱性角膜症は失明に至る場合もある重篤な疾患であると同時に、角膜移植対象疾患の中で最も症例数の多い疾患でもあり、ドナー不足の問題が深刻である。

この問題に対処するため、筆者らは培養細胞シート移植技術による角膜内皮再生治療法の開発を試みた。ヒト角膜内皮細胞は *in vivo* では増殖しないが、*in vitro* では増殖することが知られている。そこで筆者らは、研究用輸入アイバンク角膜より単離したヒト角膜内皮細胞を温度応答性培養皿上にて培養により増幅させて、培養角膜内皮細胞シートを作製した(図2(a))。さらに、作製した培養角膜内皮細胞シートの家兎水疱性角膜症モデルへの移植技術を確立し、角膜厚や角膜透明性を改善することに成功した(図2(b)、(c))<sup>7)</sup>。この方法を用いて角膜内皮細