

- (a) アイバンク角膜の周辺部より角膜内皮を採取し、培養により細胞数を増幅する。生体と同密度で温度応答性培養皿に播種し培養角膜内皮細胞シートを作製する。シートを回収し疾患眼へ移植する。
- (b) 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⁷⁾。(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(コントロール眼)に比較して移植眼では有意な角膜厚および角膜透明性の改善が認められた⁷⁾。(グラフ:角膜厚の経時変化、上:非移植眼、下:シート移植眼)

図 2 培養角膜内皮細胞シート移植

胞を増幅させ、1つのドナー角膜から多数の培養角膜内皮シートの作製が可能であれば、ドナー不足の解消という点で大きな意義があると考えられる。

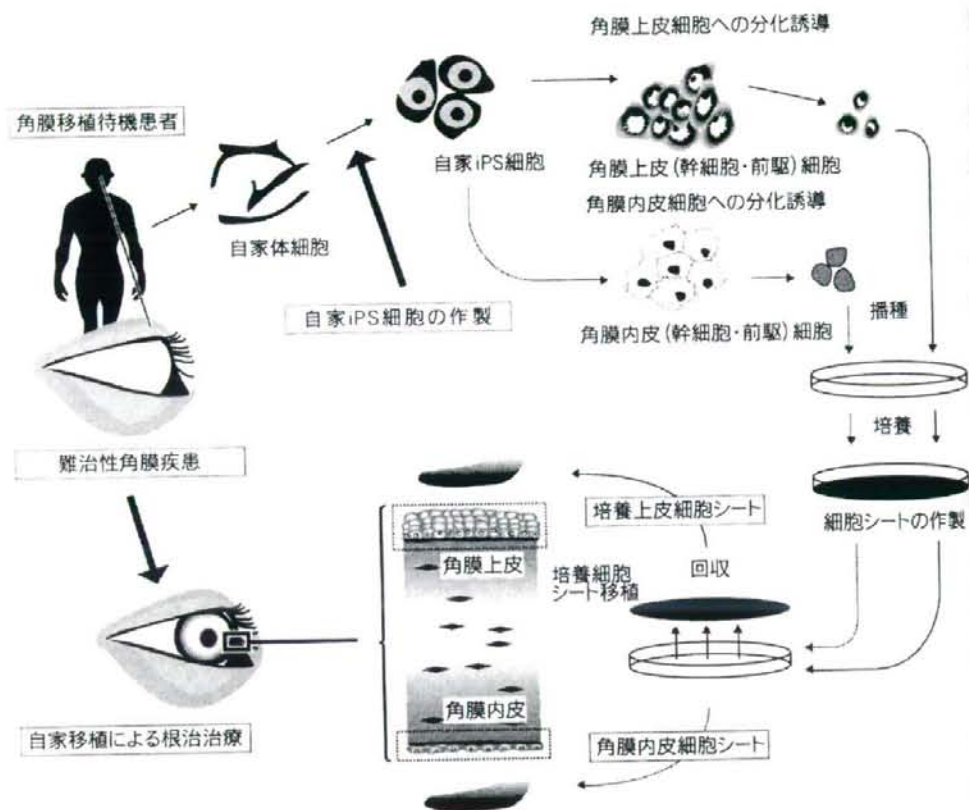
一方で、本移植法はドナー角膜(他家角膜)を細胞源として利用する他家移植であるため、拒絶反応の問題を解決しない。そこで、自家細胞から角膜内皮を再生することが理想的であるが、患者自身の角膜内皮を採取することは困難であり角膜内皮細胞以外の細胞より培養角膜内皮細胞シートを作製しなくてはならない。そのため、自家の角膜内皮再生医療の臨床応用には細胞源の探索が急務となっている。

4 iPS細胞を用いた角膜再生

冒頭で述べたように、京都大学山中伸弥教授らはヒトおよびマウスの体細胞に Oct3/4、Sox2、Klf4 などの遺伝子を導入することにより、iPS細胞を樹立することに成功した。iPS細胞はES細胞と比較しても遜色のない多分化能および自己複製能を有していることが明らかとなっている。これまでにES細胞は再生医療の細胞源として注目されてきたが、ES細胞の樹立には初期胚の破壊を伴うため倫理的問題があり、また、患者自身の細胞から樹立することはできないため、拒絶反応を根本的には解決しないといった問題を抱えている。一方、iPS細胞は患者自身より単離した体細胞を用いて作製することが可能であるため、倫理的問題および拒絶反応の問題を解決済みである。そのため、iPS細胞は再生医療のための細胞源として臨床応用が期待されている。

角膜領域においてもiPS細胞は有用な細胞源になり得ることが期待される。前述のように、筆者らはすでに患者自身の(幹)細胞を用いた培養上皮細胞シート移植法を開発し、良好な臨床成績を得ている。一方で、両眼性疾患で口腔粘膜上皮細胞シートを移植した場合においては、一部の例で新生血管の侵入や角膜バリア機能が不十分であるといった課題がある。また、角膜内皮再生には細胞源の問題が残されており、臨床応用に至っていない。iPS細胞はこれらの角膜再生領域における問題を解決する可能性を有している。つまり、患者自身から容易に採取可能な部位(皮膚など)より体細胞を単離し、iPS細胞を樹立した後、角膜上皮および角膜内皮を分化誘導する。さらに、得られた誘導角膜上皮細胞および角膜内皮細胞を、筆者らが開発している培養細胞シート移植法に基づき疾患眼へ移植することで、ドナーを必要とせず、また拒絶反応のない自家角膜再生治療法を確立することが可能である(図3)。現在、ES細胞等で報告されている手法に基づき、iPS細胞からの角膜上皮・内皮への分化誘導方法を検討中である。

実際のiPS細胞の臨床使用にあたっては、遺伝子導入に用いるウイルスベクターや移植後のガン化等安全性に関する課題が残されており、これらを解決すべくiPS細胞の樹立法の改良研究等が行われている。



角膜疾患患者自身の組織より体細胞を単離し、自家iPS細胞を作製する。iPS細胞を培養し、角膜上皮や角膜内皮への分化誘導を行う。得られた細胞を、筆者がこれまでに確立した培養細胞シート移植法を利用して疾患眼に移植する。

図 3 iPS細胞による角膜再生

5 おわりに

筆者らは、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を成功させ、拒絶反応とドナー不足の問題解決に大きく寄与した。一方で、現行の培養上皮細胞シート移植法にもなお課題があり、また角膜内皮や実質疾患に対する再生医療は臨床応用に至っていないのが現状である。iPS細胞の臨床使用にあたっては、安全性など検討すべき点は残されているものの、これらの問題を根本的に解決し得る可能性を有している。これまでの角膜再生研究では日本が世界をリードしており、iPS細胞を用いた角膜再生医療に関しても日本発の技術として一刻も早い実現化が望まれる。

- 1) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**(5), pp.861-872(2007).
- 2) K. Takahashi, S. Yamanaka : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**(4), pp.663-676(2006).
- 3) A. Schermer, S. Galvin, T.T. Sun : 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.*, **103**, pp.49-62(1986).
- 4) G. Pellegrini, C.E. Traverso, A.T. Franzini et al. : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium, *Lancet*, **349**, pp.990-993 (1997).
- 5) K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida et al. : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded *ex vivo* on a temperature-responsive cell culture surface, *Transplantation*, **77**, pp.379-385(2004).
- 6) K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida et al. : Corneal reconstruction using tissue-engineered cell sheets comprising autologous oral mucosal epithelium, *N. Engl. J. Med.*, **351**, pp.1187-1196(2004).
- 7) T. Sumide, K. Nishida, M. Yamato et al. : Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces, *FASEB J.*, **20**(2), pp.392-394(2006).

マウスを用いる動物実験が本質的な部分で重要な役割を担ってきた。しかし、ヒトは決してマウスを大きくしただけではない。iPS細胞の応用に際しても、サルなどのヒトに近い大型動物を用いて、マウスからヒトへの「橋渡し」研究が非常に重要である。

(自治医科大学分子病態治療研究センター
教授 再生医学研究部)

文献

- 1) Takahashi, K., et al. : Cell, 131, 861-872(2007)
- 2) Hanna, J., et al. : Science, 318, 1920-1923(2007)
- 3) Wernig, M., et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 105, 5856-5861(2008)
- 4) Cavazzana-Calvo, M., et al. : Science, 288, 669-672(2000)
- 5) Orlic, D., et al. : Nature, 410, 701-705(2001)
- 6) Yoshioka, T., et al. : Stem Cells, 23, 355-364(2005)
- 7) Haccin-Bey-Abina, S., et al. : J. Clin. Invest., 118, 3132-3142(2008)
- 8) Zhang, X.B., et al. : J. Clin. Invest., 118, 1502-1510(2008)

9) Shibata, H., et al. : Stem Cells, 24, 1450-1457(2006)

10) Kishi, Y., et al. : Cell Transplant., in press.



再生医療を考える

iPS細胞による角膜再生への応用

西 林 幸 二
田 竜 平

はじめに

角膜は透明な無血管組織であるが、疾患や障害により透明性は低下し、視力低下をもたらす。角膜疾患により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、重篤な角膜上皮疾患などでは拒絶反応のため術後成績は良好ではない。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。本稿では、これまで筆者が開発してきた独自の角膜再生治療法および、近年、京都大学山中伸弥教授らにより作製された人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた新規角膜再生治療法の可能性について述べる。

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 μ mの非角化扁平重層上皮である(図①a)。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)。重度の外傷や疾患

①培養角膜上皮細胞シート移植

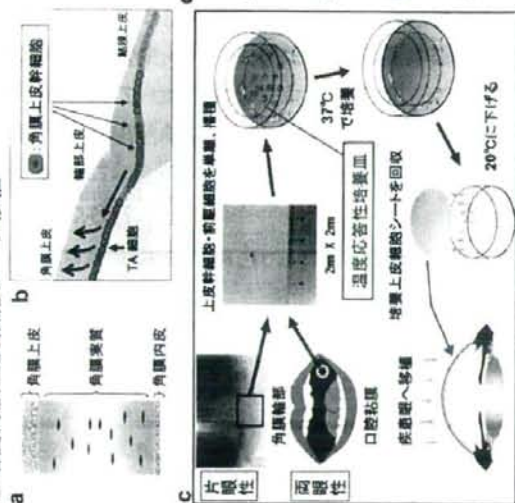


図1 培養角膜上皮細胞シート移植
Nishida K, Yamada M, et al. Transplantation 2004; 77: 319-385
Nishida K, Yamada M, et al. N Engl J Med 2004; 351: 1187-1196

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。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、アイスバーゼなど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(図①c)⁵⁾。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℃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

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。これら角膜上皮幹細胞疫癉症に対して、ドナー眼を用いた角膜移植法が実施されてきたが、拒絶反応など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³⁾。本手法は片眼性の角膜上皮幹細胞疫癉症に対して、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、培養により作製し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

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に局在している。
c: 角膜上皮幹細胞(片眼性)あるいは口腔粘膜細胞(両眼性)を角膜上皮細胞を含む角膜上皮細胞を単離し、温度応答性培養皿上で培養する。温度を下げると細胞が接着し、疾患眼へ移植する。
d: 移植前後の眼表面観察像(左:術前、右:術後)。

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、細胞接着装置が酵素処理で破壊されことなく保持されている。筆者らは Stevens-Johnson 症候群、眼瞼天疱瘡、化学腐食などの角膜上皮幹細胞疫癉症患者に対して、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おり、良好な術後成績を得ている(図①d)⁶⁾。

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。

角膜内皮の再生

角膜内皮は角膜の最内層に存在する単層の組織であり、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、実質内の含水率を一定に維持し、角膜の透明性を維持している（図①a）。ヒト角膜内皮細胞は一度障害を受けると、不可逆的に角膜内皮細胞数が減少し、角膜が混濁する水疱性角膜症と呼ばれる病態となる。水疱性角膜症は角膜移植対象疾患中で最も症例数の多い疾患であり、ドナー不足の問題が深刻である。

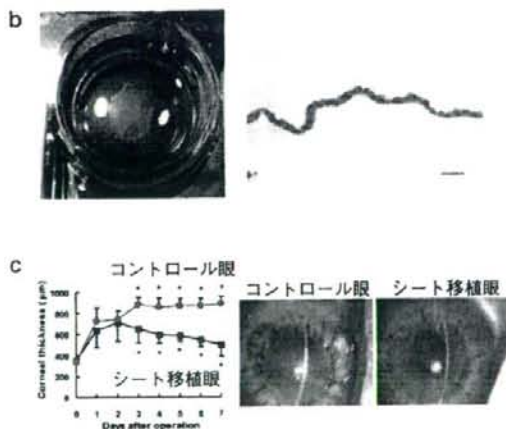
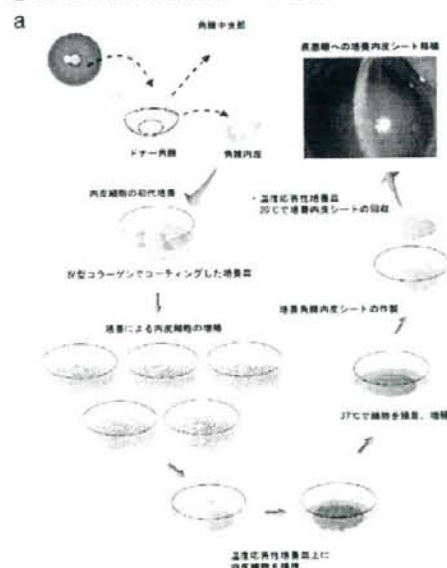
この問題に対処するため、筆者らは培養細胞シート移植技術を用いた角膜内皮再生治療法の開発を試みた。ヒト角膜内皮細胞は *in vivo* では増殖しないが、*in vitro* では増殖することが知られている。そこで筆者らは、研究用輸入アイバンク角膜より単離したヒト角膜内皮細胞を温度応答性培養皿上にて培養により増幅させて、培養角膜内皮細胞シートを作製した（図②a）。

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②b、c）。この方法を用いて角膜内皮細胞を増幅させ、1つのドナー角膜から多数の培養角膜内皮細胞シートを作製が可能であれば、ドナー不足の解消という点で大きな意義があると考えられる。

一方で、本移植法はドナー角膜を細胞源として利用する他家移植であるため、拒絶反応の問題を根本的には解決しない。そこで、自家細胞から角膜内皮を再生することが理想的であるが、患者自身の角膜内皮を採取することは困難であり角膜内皮細胞以外の細胞より培養角膜内皮細胞シートを作製しなくてはならない。自家の角膜内皮再生医療の臨床応用には細胞源の探索が急務となっている。

(38)

② 培養角膜内皮細胞シート移植



(39)

- a: アイバンク角膜の周辺部より角膜内皮を採取し、培養により細胞数を増幅する。生体と同密度で温度応答性培養皿に播種し培養角膜内皮細胞シートを作製する。シートを回収し疾患眼へ移植する。
 b: 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: 20μm)
 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（コントロール眼）と比較して移植眼では有意な角膜厚および角膜透明性の改善が認められた。(グラフ: 角膜厚の経時変化、左: 非移植眼、右: シート移植眼)

Sumide T, Nishida K, et al. FASEB J. 20(2): 392~394(2006)



角膜疾患患者より体細胞を単離し、自家iPS細胞を作製する。iPS細胞を培養し、角膜上皮や角膜内皮への分化誘導を用いて得られた細胞を、筆者がこれまでにも確立したシート移植法を利用して疾患眼に移植する。

る。

おわりに

現時点ではiPS細胞の臨床使用には、ウイルスベクターや遺伝子導入の問題など検討すべき課題が残されている。現在これらの問題に対する改良研究が進められており、今後より安全なiPS細胞が作製可能になると期待される。iPS細胞は角膜再生医療が抱える問題を根本的に解決し得る可能性を有している。これまでの角膜再生領域では本邦が世界をリードしており、iPSを用いた角膜再生医療も本邦発の技術として実現できるよう筆者らも日々研究に精進している。

(東北大学大学院医学系研究科

眼科・視覚科学分野)

・(同 教授)

iPS細胞を用いた角膜再生

冒頭で述べたように、京都大学山中伸弥教授らはヒトおよびマウスの体細胞にOct3/4, Sox2, Klf4などの遺伝子を導入することにより、iPS細胞を樹立することに成功した。iPS細胞はES細胞と比較しても遜色のない多分化能および自己複製能を有していることが明らかとなっている。これまでもES細胞は再生医療の細胞源として注目されてきたが、ES細胞の樹立には初期胚の破壊を伴うため倫理的問題があり、また、患者自身の細胞から樹立することはできないため、拒絶反応の問題を抱えている。一方、iPS細胞は患者自身より単離した体細胞を用いて作製することが可能であるため、倫理的問題および拒絶反応の問題が解決可能である。そのため、iPS細胞は再生医療のための細胞源として臨床応用が期待されている。

前述のように、筆者らは角膜上皮疾患に対しては、患者自身の(幹)細胞を用いた培養上皮

細胞シート移植法を開発し、良好な臨床成績を得ている。一方で、両眼性疾患で培養口腔粘膜上皮細胞シートを移植した場合においては、一部の症例で新生血管の侵入や角膜バリア機能が不十分であるといった課題がある。また、角膜内皮再生には細胞源の問題が残されており、臨床応用に至っていない。iPS細胞はこれらの角膜再生領域における問題を解決する可能性を有している。つまり、患者自身から容易に採取可能な部位(皮膚など)より体細胞を単離し、iPS細胞を樹立した後、角膜上皮および角膜内皮を分化誘導する。さらに、得られた誘導角膜上皮細胞および角膜内皮細胞を、筆者らが開発している培養細胞シート移植法に基づき疾患眼へ移植することで、ドナーを必要とせず、また拒絶反応のない自家角膜再生治療法を確立することが可能である(図③)。現在、ES細胞などで報告されている手法に基づき、iPS細胞からの角膜上皮・内皮への分化誘導方法を検討中であ

文献

- 1) Takahashi, K., et al. : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 30, 131(5), 861-872(2007)
- 2) Takahashi, K., Yamanaka, S. : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 25, 126(4), 663-676 (2006)
- 3) Schermer, A., et al. : 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.*, 103, 49-62(1986)
- 4) Pellegrini, G., et al. : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*, 349, 990-993(1997)
- 5) Nishida, K., et al. : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded *ex vivo* on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation*, 77, 379-385(2004)
- 6) Nishida, K., et al. : Corneal reconstruction using tissue-engineered cell sheets comprising autologous oral mucosal epithelium. *N. Engl. J. Med.*, 351, 1187-1196 (2004)

- 7) Sumide, T., Nishida, K., et al. : Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J.*, 20 (2), 392-394(2006)



再生医療を考える

多能性細胞を用いた網膜の再生医療

万代道子
高橋政代

はじめに

網膜は3層の神経層構造を持つ器官で、一番外側に位置するのが視物質(オプシン)により光刺激を神経シグナルに変換する視細胞層である(図①)。視細胞には明るところで機能し、視力解像度や色覚に関係する錐体視細胞と、暗所での反応を司る桿体視細胞とがある。人の網膜では錐体視細胞は網膜の中心部に分布し、桿体視細胞は周辺部に分布する。網膜の変性疾患として代表的なものの一つである網膜色素変性は、とくに桿体視細胞が遺伝的背景によりアポトーシスを起こす疾患で、わが国で約30、0

00人の罹患者がいるとされている。この疾患の早期には桿体視細胞の機能不全による夜盲がしばしば見られ、進行に伴って視野が狭窄し、やがては二次的に錐体視細胞も変性し、進行例では著しい視力低下や失明に至る疾患である。現在までに視物質(ロドプシン)、視細胞のシグナル蛋白や構造蛋白、色素上皮細胞に存在する視物質の代謝酵素など40近い遺伝子が原因遺伝子として同定されており、いずれも桿体視細胞の機能不全から視細胞が変性に陥ると考えられている。

長く網膜色素変性に対する実質的治療は皆無

角膜再生

林 竜平 西田幸二*

東北大学大学院医学系研究科眼科・視覚科学分野 *教授

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。疾患や外傷により角膜に障害が生じ透明性が低下することで視力が低下し、失明に至る場合もある。角膜疾患のために失明などの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。1924年にソ連のフィラトウらによりドナー眼を用いた他人由来(他家)の全層角膜移植が初めて報告され、現在もなお最も普及した角膜移植の術式として実施されている。また、拒絶反応のリスクを軽減するため表層角膜移植や深層角膜移植などの術式が開発され、さらに近年では障害のある部位のみを移植するパーツ移植という考え方から、DSEK (Descemet's Stripping Endothelial Keratoplasty) などの角膜内皮移植術も実施され

ている。一方で、現在の角膜移植は献眼に依存しているが、その国内における提供数は絶対的に少なく、多くの患者に対したただちに移植手術を行うことは困難である。さらに、Stevens-Johnson症候群や水疱性角膜症などの重篤な疾患では、拒絶反応などのため術後成績は良好ではない。この原因として、角膜への血管侵入のため拒絶反応が高率に生じることや、幹細胞の概念に基づいた病態の理解や治療法がなかったことなどが考えられる。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、患者自身の細胞(自家細胞)を用いた再生治療法が開発が進められている。本稿では、筆者らが開発し、臨床応用を開始している自家細胞による角膜上皮の再生治療法を中心に、角膜内皮および角膜実質の再生医療についても述べる。

I 角膜上皮の再生

1 角膜上皮幹細胞と角膜上皮幹細胞疲弊症

角膜上皮は角膜の最表層に存在する厚さ約50 μ 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。角膜上皮疾患の病態を考えるうえで重要なのは、角膜上皮幹細胞にかんする研究である。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

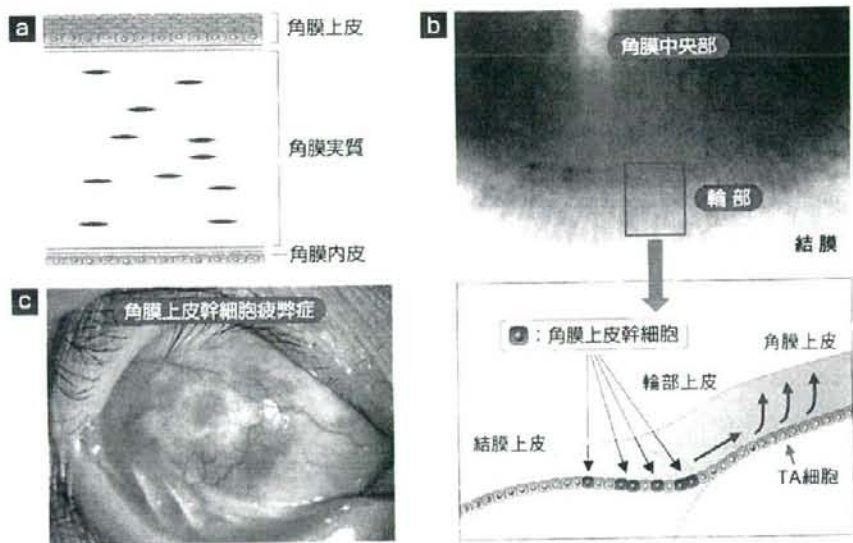


図1 角膜上皮幹細胞と角膜上皮幹細胞疲弊症

- a: 角膜上皮幹細胞は結膜と角膜の間に存在する輪部と呼ばれる組織に存在する。
 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疲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(角膜上皮幹細胞疲弊症)。

型分化マーカー(ケラチン3, 12)を発現していないことや、細胞分裂の緩やかなslow-cycling細胞であるなどの特徴を有している^{1,2)}。熱・化学外傷、Stevens-Johnson症候群や眼類天疱瘡などの重篤な角膜上皮疾患により、輪部の角膜上皮幹細胞が消失あるいは機能不全に陥ると、幹細胞からの角膜上皮細胞の供給ができなくなる。さらに隣接する結膜上皮が角膜側へ侵入し、角膜表面が血管を伴った結膜組織に被覆されることで、角膜混濁など重篤な視力障害が起きると考えられる(角膜上皮幹細胞疲弊症、図1c)。これらの疾患に対して角膜中央部のみを移植する従来の角膜移植法では、角膜上皮幹細胞を補充することができないため、結膜上皮の再侵入が起り得る。そこで幹細胞の補充という観点から、ドナー角膜(他家)の輪部上皮を採取し、患者の角膜輪部に移植する輪部移植法が開発されたが、他家移植であるために拒絶反応の問題を解決することができなかった。

2 培養角膜上皮移植

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)の細胞を用いた再生医療的治療法である培養角膜上皮移植法が初めて報告された³⁾。彼女らは、片眼性の幹細胞疲弊症に対して、患者の健常眼から輪部に存在する角膜上皮幹細胞を少量採取し、Greenらの培養表皮移植法に基づいて培養角膜上皮移植を実施した。すなわち、角膜上皮幹細胞をフィーダー細胞の3T3細胞と共培養することで、生体の角膜上皮に類似した重層化角膜上皮細胞シートを作製し、酵素処理により角膜上皮細胞シートを回収して疾患眼へ移植した。この発表の後、自家や他家の角膜上皮幹細胞を羊膜やフィブリンゲルなどの基質上で培養し、「角膜上皮+基質」シートを移植する方法も開発された^{4~6)}。しかし、デイスパーゼなどの酵素処理を用いて培養上皮細胞シートを

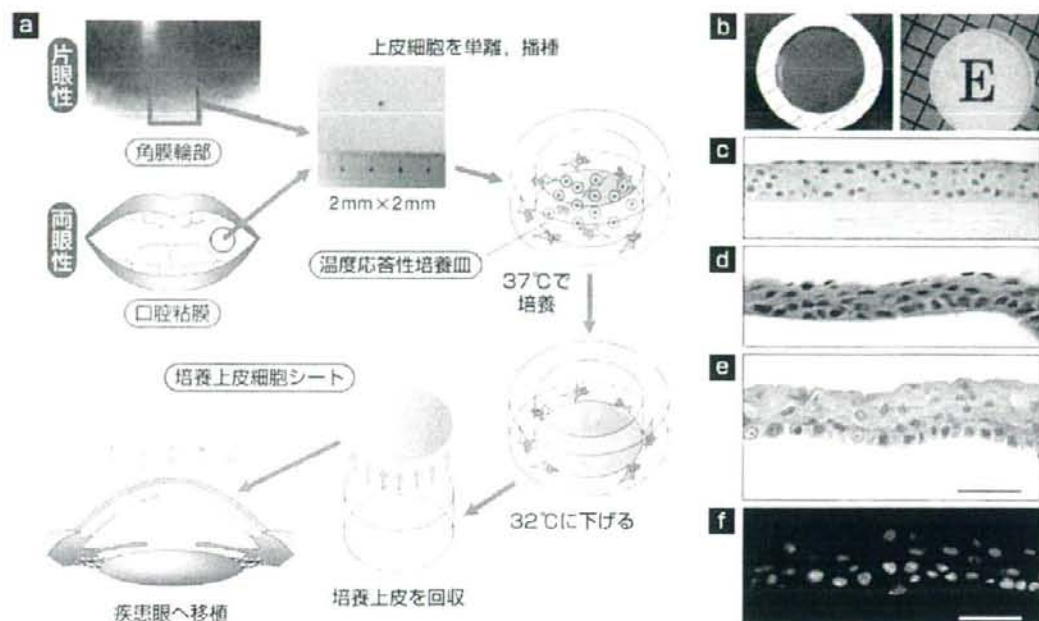


図2 温度応答性培養皿を用いた自家培養上皮細胞シート移植法

- a: 2×2mm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℃)→温度を下げて(32℃以下)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、透明なシートが作製できている。
 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、生体角膜と同様に重層化した培養上皮細胞シートが作製できている。
 e: 培養口腔粘膜上皮細胞シートHE染色像、角膜シート同様に重層化した上皮細胞シートが作製できている。
 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(文献7,8)より(Bar: 50μm)。

回収する方法では、シートが酵素処理により脆弱化することや、シート基底部の接着装置が破壊されるため、シート移植後のホスト角膜実質との接着が不良であるといった問題点がある。また、基質を用いて回収する方法は、基質とホスト角膜実質の接着が不良であることや、羊膜やフィブリンゲルなどは生体由来であるため、その安全性や生体適合性について課題が残されている。

3 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

前述の問題を解決すべく筆者らは、基質を用いず、また酵素処理も必要としない、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2a)。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、温度応答性イソテリジェントポリマー(32℃以上では疎水性、32℃以下では親水性となる)を電子線照射により培養皿に共有結合で固定化した培養皿であり、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、相転移が起きるため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きわめて非侵襲的な方法

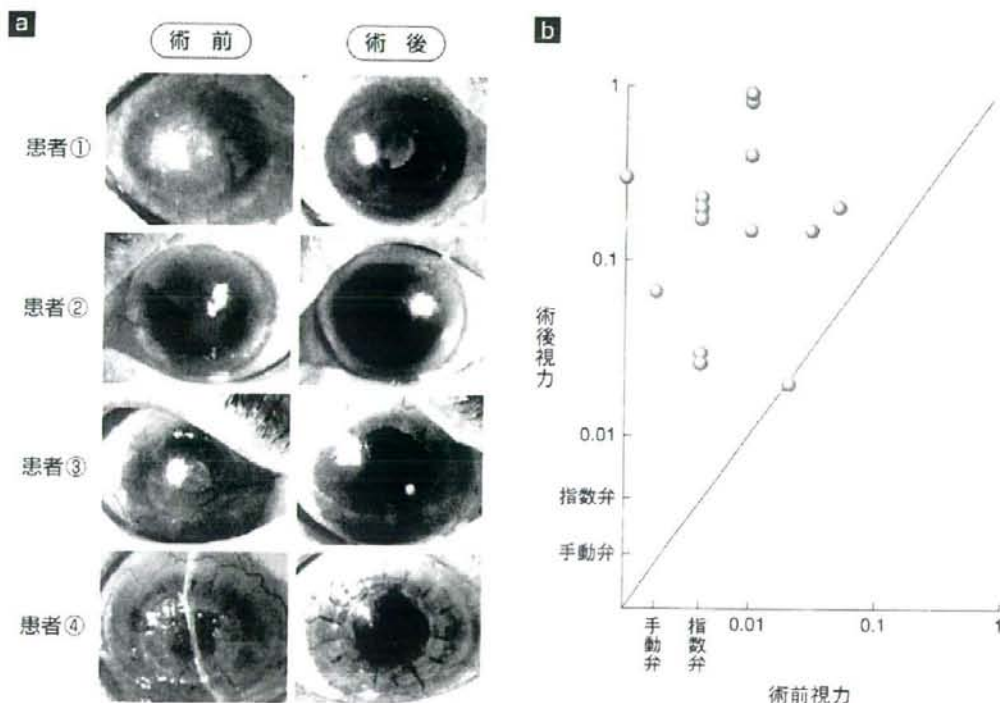


図3 自家培養上皮細胞シート移植による臨床成績

a: 培養上皮細胞シート移植術後の眼表面像(左:術前, 右:術後).

b: 術前視力および術後視力. 培養上皮細胞シート移植により視力改善が認められる.

(文献8)より)

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。さらに、回収した培養上皮細胞シートは生体の角膜上皮と同様に重層化しており、上皮幹細胞・前駆細胞(p63陽性細胞)がシート基底部に存在することを確認している(図2c~f)。筆者らは角膜上皮幹細胞疲弊症患者に対して、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。手術時には、まず角膜表面を覆っている結膜組織を除去し、透明な角膜実質を露出させる。作製した培養上皮細胞シートは、手術室にて低温

処理を施した後に、ドーナツ状のPVDF膜を用いて回収し、露出した角膜実質上に移植する。シートの接着能は保持されているため移植後の縫合は必要としない。これまでに、Stevens-Johnson症候群、眼類天疱瘡、熱傷、化学腐食の患者に対して、培養角膜上皮シート移植あるいは培養口腔粘膜シート移植^{7,8)}を実施してきたが、移植後の成績はきわめて良好であり、有意な視力改善が得られている(図3)。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、患者自身の細胞を用いた角膜上皮再生治療法は、これまで角膜移植ではきわめて予後が不良であった疾患に対しても、有効な治療法となり得ると考えられる。

II 角膜内皮の再生

1 角膜内皮と水疱性角膜症

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1a)。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、角膜の透明性の維持に寄与している。ヒト角膜内皮細胞は生体内では増殖せず、細胞周期がG1期で停止している細胞であると考えられている。そのため、白内障手術や遺伝性疾患により角膜内皮が障害を受けると、不可逆的な角膜内皮細胞数の減少が引き起こされ、最終的に実質に水が貯留する水疱性角膜症と呼ばれる病態となる。水疱性角膜症は角膜移植対象疾患のなかで最も症

例数の多い疾患であるが、同時に角膜内皮型の拒絶反応が頻発することから角膜移植の成績も不良な疾患である。

2 培養角膜内皮細胞シート移植

ヒト角膜内皮細胞は*in vivo*では増殖しないが、*in vitro*ではbFGF、血清存在下において増殖することが知られている。そこで筆者らは培養により角膜内皮細胞を増殖させ作製した、培養角膜内皮細胞シートによる角膜内皮再生治療法の開発を行っている(図4)。これまでに、研究用輸入アイバンク角膜より採取したヒト角膜内皮を温度応答性培養皿上で培養することで、ヒト培養角膜内皮細胞シートを作製、回収することに成功している

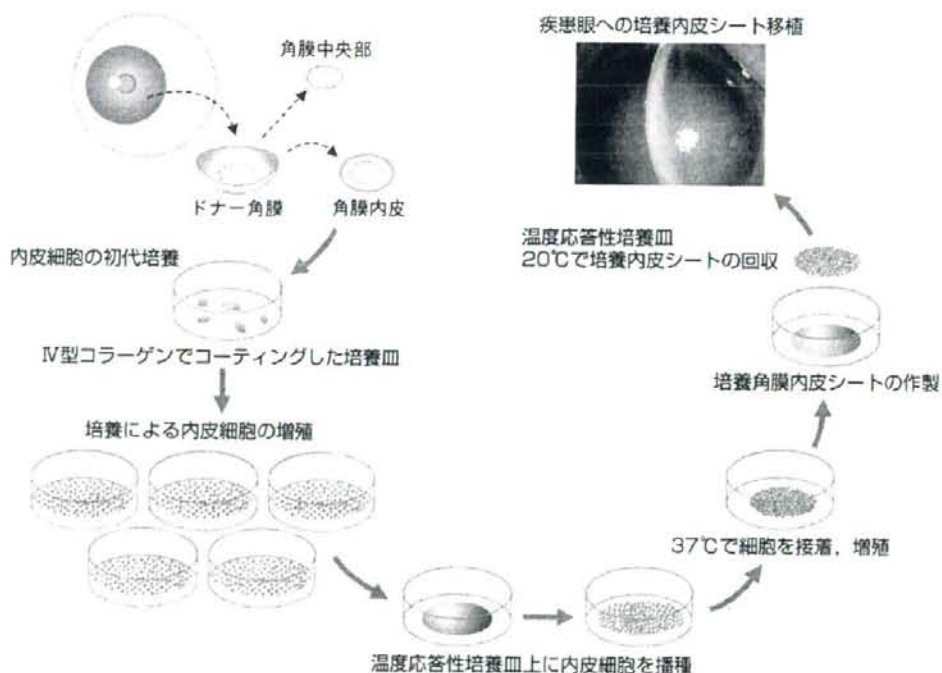


図4 培養角膜内皮シート移植法の概要

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℃で培養→32℃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。

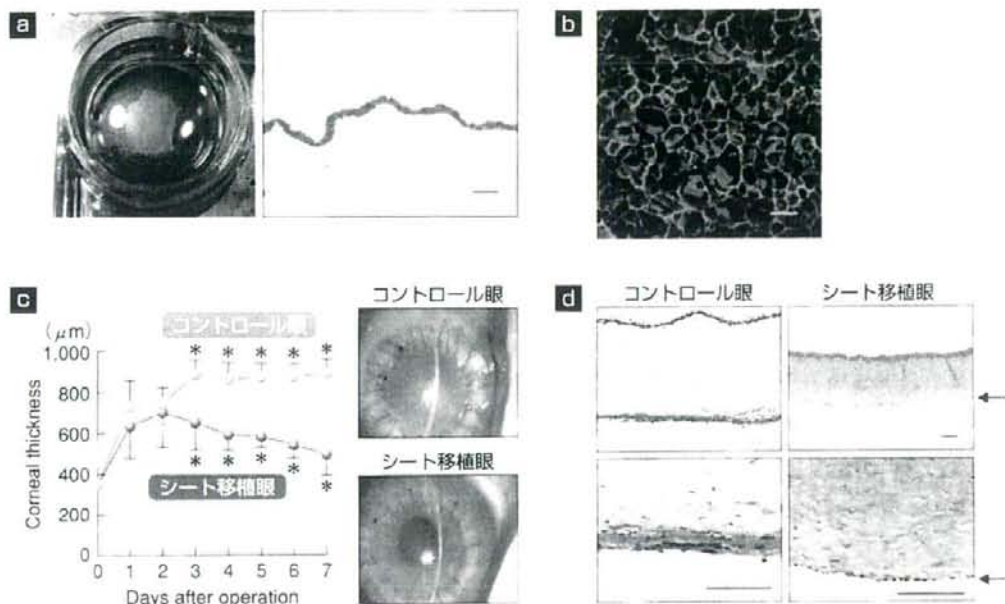


図5 ヒト培養角膜内皮細胞シートの作製および家兔疾患モデルへの移植

- 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⁺/K⁺ 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⁺/K⁺ ATPase発現が認められた (Bar: 20 μm)。
 c: 家兔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 (グラフ: 角膜厚。上: 非移植眼。下: シート移植眼)。
 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) の着が認められ、角膜厚が正常化していた (左: 非移植眼。右: シート移植眼。Bar: 100 μm)。(文献10より)

(図5)。回収した培養角膜内皮細胞シートは、*in vivo*角膜内皮同様に多角形(主に6角形)構造を呈しており、ポンプ機能も備わっていることを確認している⁹。さらに、培養角膜内皮細胞シートの家兔水疱性角膜症モデルへの移植技術を確認し、角膜厚および角膜透明性の有意な改善を認めている¹⁰。この方法を用いて角膜内皮細胞を増幅し、1つのドナー角膜から多数の培養角膜内皮シートの作製が可能であれば、ドナー不足の解消という点で大きな意義があると考えられる。一方で、本移植法はドナー角膜を細胞源として利用する他家移植であるため、拒絶反応の問題を解決しない。そのため現在、自家細胞源を用いた角膜内皮再生治療法に関する研究にも取り組んでいる。自家細

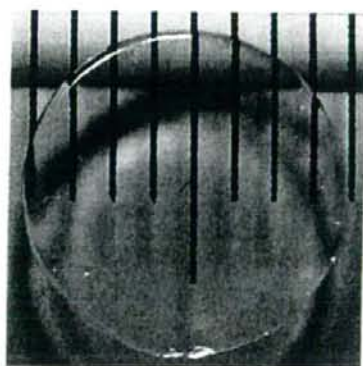
胞源として患者自身の角膜内皮細胞の利用が考えられるが、角膜内皮患者の角膜内皮細胞を採取することは倫理的に不可能であるため、角膜内皮以外の細胞源を探索することが必要である。角膜内皮は第4の胚葉と呼ばれる神経堤由来の組織であると考えられていることから、細胞源候補としては同様に成体組織中の神経堤由来組織や細胞が有望と考えられる。現在のところ他家および自家の培養角膜内皮移植の臨床応用は世界的にもまだ開発されていない。角膜内皮の再生治療法が確立すれば、多くの患者の視力回復が長期的に得られる可能性があり、一刻も早い臨床応用の開始が望まれる。

III 角膜実質の再生

角膜実質は角膜の容積の約90%を占め、主にコラーゲン繊維と角膜実質細胞(ケラトサイト)で構成される透明な組織である(図1a)。コラーゲン繊維は規則正しい密な充填構造を取ることで角膜特有の透明性と強度を呈しており、ケラトサイトは主にそのメンテナンスの役割を果たしていると考えられている。細胞成分が主である角膜上皮や内皮とは異なり、角膜実質の再生には細胞の再生に加えむしろ基質の開発が重要である。角膜実質の代価物は200年以上も前から探索されてきたが、無機・合成高分子材料にはホスト角膜の融解、移植片の脱落、緑内障等の合併症を誘発するといった課題があった。Griffithらは角膜の主成分であるコラーゲンを架橋して人工角膜実質を構築することを発案している¹¹⁾。この人工角膜実質は、透明性は高いものの、縫合糸の引っぱりに対する強度はヒト角膜と比較して非常に脆い。そこで筆者

らは、Griffithらの方法を改良し、コラーゲン繊維構造の制御に着目した新しいタイプのゲルの開発に取り組んでいる(図6)。筆者らが作製したクロスリンクコラーゲンゲル(600 μm)は75%以上の可視光透過率を有しており、生体角膜実質以上の強度を保持している。また、家兎角膜実質層内移植試験では、少なくとも移植1ヵ月後の現時点においては良好な生体適合性を示している。強度(脆さ)の問題など改善点も残されているが、角膜実質の代替基質として有望であると考えられる。一方で細胞成分については、ケラトサイトも角膜内皮同様に患者自身から採取することが困難であるため、ケラトサイト以外の細胞源を探索する必要があると考えられる。角膜実質再生には、細胞のみでなく材料分野などの工学的知識も重要であり、医工連携に基づいた研究推進が必要である。

a



b

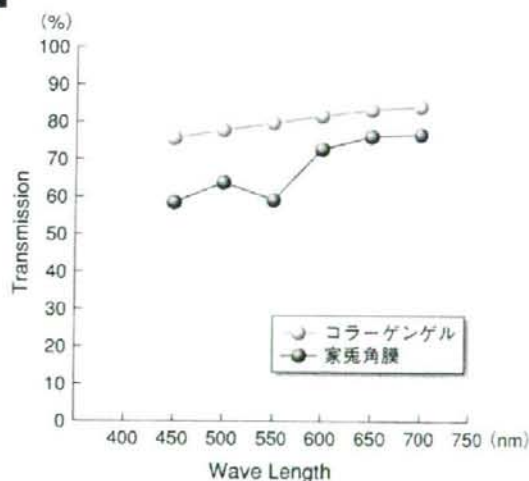


図6 筆者らが開発したクロスリンクコラーゲンゲル

a: 作製したクロスリンクコラーゲンゲル。高い透明性を保持している。

b: クロスリンクコラーゲンゲルの光透過性。家兎角膜と比較して全波長で高い光透過性を示している。

おわりに

筆者らは組織工学的な手法を取り入れて、基質を用いない角膜上皮の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の問題をクリアできたことに大きな意義があると考えている。一方で、現在の自家培養上皮細胞シート移植には、培養の際に牛胎児血清(FBS)やマウス由来の3T3フィーダー細胞を用いており、未知ウイルスの感染症の問題など課題も残されている。また、角膜内皮や角膜実質の再生治療方法はいずれもまだ研究段階であり、臨床応

用されるに至っていない。筆者らはこれらの問題についても克服すべく、角膜上皮再生については、異種材料を用いない自家血清、自家フィーダー細胞による自家培養上皮細胞シート移植法も開発中であり、角膜内皮、実質再生についても一刻も早い臨床応用の開始に向けて研究に取り組んでいる。現在国内における献眼数は依然不足している。今後、再生医療的手法により角膜全層(上皮、実質、内皮)を再生することで、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可能になると期待される。



参考文献

- 1) Schermer A, Galvin S, Sun TT: 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*, 103: 49-62, 1986.
- 2) Cotsarelis G, Cheng SZ, 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*, 57: 201-209, 1989.
- 3) Pellegrini G, Traverso CE, Franzini A, et al: Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*, 349: 990-993, 1997.
- 4) Tsai RJ, Li LM, Chen JK: Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal cells. *N Engl J Med*, 13: 86-93, 2000.
- 5) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al: Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology*, 108: 1569-1574, 2001.
- 6) 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*, 72: 1478-1485, 2001.
- 7) 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*, 77: 379-385, 2004.
- 8) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al: Corneal reconstruction using tissue-engineered cell sheets comprising autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*, 351: 1187-1196, 2004.
- 9) Ide T, Nishida K, Yamato M, et al: Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials* Feb, 27 (4): 607-614, 2006.
- 10) Sumide T, Nishida K, Yamato M, et al: Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J*, 20 (2): 392-394, 2006.
- 11) Liu Y, Gan L, Carlsson DJ, Fagerholm P, et al: A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47 (5): 1869-1875, 2006.

Development of a Collagen Hydrogel with High Mechanical Strength by a Simple Orientation Method for Triple-helix

Chizuru Hongo,^{1,2} Michiya Matsusaki,^{1,2} Kohji Nishida,^{2,3} and Mitsuru Akashi^{*1,2}

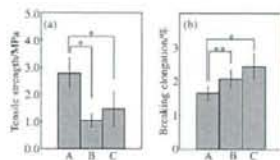
¹Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita 565-0871

²21st Century COE Program "Center for Integrated Cell and Tissue Regulation," Osaka University

³Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-8574

(Received September 2, 2008; CL-080829; E-mail: akashi@chem.eng.osaka-u.ac.jp)

Tensile strength (a) and breaking elongation (b) of 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. These are average values at more than three times. Statistically significant difference using two-sample *t* test (**P* < 0.01, ***P* < 0.05).



REPRINTED FROM

**Chemistry
Letters**

Vol.37 No.12 2008 p.1254–1255

CMLTAG
December 5, 2008

The Chemical Society of Japan

Development of a Collagen Hydrogel with High Mechanical Strength by a Simple Orientation Method for Triple-helix

Chizuru Hongo,^{1,2} Michiya Matsusaki,^{1,2} Kohji Nishida,^{2,3} and Mitsuru Akashi^{1,2}

¹Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita 565-0871

²21st Century COE Program "Center for Integrated Cell and Tissue Regulation," Osaka University

³Department of Ophthalmology, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8574

(Received September 2, 2008; CL-080829; E-mail: akashi@chem.eng.osaka-u.ac.jp)

Collagen hydrogels with oriented triple-helix were fabricated simply via the axial orientation of a dense collagen solution onto a glass plate and cross-linking. The orientation of the collagen triple-helix in the gels was clearly confirmed by X-ray diffraction measurements. The tensile strength of the oriented collagen gels in parallel was twofold higher than that of non-oriented gels as a control. Our collagen gels with oriented triple-helix can be useful as novel scaffolds in the tissue engineering field.

Collagen is the major fibrous protein responsible for the structural integrity of extracellular matrices (ECM) such as skin, bone, tendon, and other connective tissues. Its amino acid sequence is very characteristic: the presence of glycine as every third residue, and a high imino acid content, typically proline and hydroxyproline. The collagen molecule is known to have a rod-like triple-helical structure (diameter/length, 1.5 nm/300 nm) consisting of three polypeptide chains. Five triple-helical molecules further assemble to form a microfibril.¹ Furthermore, the micro-fibrils assemble to form collagen fibrils with 10–300 nm diameters.² In vivo, collagen fibrils organize into one direction to form collagen fibers of 0.5–3 μm in tendons or ligaments, and the orientation of these collagen molecules is known to be a significant factor in the mechanical strength of natural tissues such as bone, tendon, ligament, and the cornea. In other words, the molecular orientation in collagen matrices is important for strong mechanical properties. Accordingly, the construction of collagen hydrogels with oriented fibrils attracts much attention for tissue engineering. Recently, the preparation of collagen hydrogels with oriented fibrils using a magnetic field³ or N₂ stream⁴ was reported, but these methods required specific instruments or complicated manipulation. An effective and simple methodology to fabricate a collagen matrix with highly oriented collagen fibrils at the molecular level is strongly desired.

In this study, for the first time, we report a novel and simple method to prepare collagen gels with oriented triple-helix by the axial orientation of a dense collagen solution onto a glass plate and crosslinking processes. The mechanical strength of the collagen gel is significantly dependent on the orientation of triple-helix in the gel. Surprisingly, oriented gels in parallel show a twofold higher mechanical strength as compared to non-oriented gels as a control. This simple method to construct transparent collagen gels with oriented triple-helical molecules will have applications in the tissue engineering or biomedical fields.

Acid freeze-dried type I porcine atelocollagen powder containing 5% type III collagen was purchased from Nippon Meat Packers, Inc. A total of 168 mg of collagen was dissolved in

1 mL of 1 M acetate buffer at pH 3.6–4.0 (14 wt %) in a syringe for 24 h at 4 °C. Any air bubbles in the collagen solution were removed by centrifugation at 4 °C. The pH of the collagen solution was adjusted to 3.6–4.0 using 1.0 M NaOH under ice water using the syringe mixing system.⁵ Two 180 μL aliquots of 5 wt % 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) solutions (EDC/NHS is 2:1) were added and mixed with the collagen solution. The final concentration of collagen was adjusted to 10 wt %, a high collagen concentration similar to native tissues. For the preparation of collagen gels with orientation of collagen solution (oriented gels), the reaction solution was poured onto a glass plate unidirectionally and subsequently covered with another glass plate for spreading the solution in the same direction (Figure 1). For the preparation of control gels without orientation of collagen solution (non-oriented gels), the reaction solution was poured onto a glass plate randomly. Silicone rubbers of 500 μm thickness were sandwiched between the glass plates to fix the thickness of the obtained gels. The glass plates containing the reaction solution were maintained for 24 h at 25 °C. The obtained gels were washed with phosphate buffered saline (PBS) at 4 °C for 24 h. Both hydrogels were punched out to obtain 8 mm diameter disks.

Optical photomicrographs and X-ray diffraction (XRD) patterns of the oriented and control collagen gels are shown in Figure 2. Both gels were extremely transparent. Interestingly, the shape of the oriented gel immediately changed to ellipsoid (major and minor lengths of 9 and 6 mm) after punching out using a round 8 mm diameter punch (Figure 2a), whereas the shape of the control gel did not change (Figure 2b). These shapes were maintained even after a half year of incubation in PBS at 4 °C. The typical shape change seemed to be due to the orientation of the collagen triple-helix in the gels. In order to clarify the orientation of triple-helix, the XRD patterns were recorded on an imaging plate (rapid-LS, Rigaku) at vertical direction on to the surface of the gels (Cu Kα radiation). The outermost diffraction (crossed position of blue lines) of both gels was estimated at 0.29 nm of the periodicity of the axial rise per residue. In contrast, the innermost strong diffraction (crossed position of red lines) was estimated at approximately 1.5 nm, the spacing of the intermolecular lateral packing of the collagen triple-helices (Figures 2c and 2d). In the case of Bovine skin treated with salt or alkaline solutions, a diffraction pattern was observed as a Debye-Scherrer ring.⁶ In contrast, the XRD pattern of native tendon collagen shows a very narrow arc pattern.⁷ Amazingly, the pattern of our oriented gel was similar to that of native tendon collagen compared with control gel which had less orientation of triple-helix. The results of the XRD patterns clearly suggested a highly ordered orientation of the collagen triple-helix in the

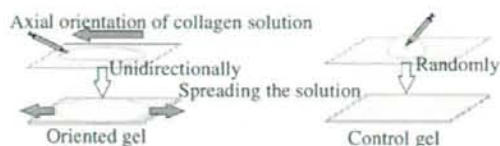


Figure 1. Schematic illustration of the fabrication process for oriented and control collagen gels.

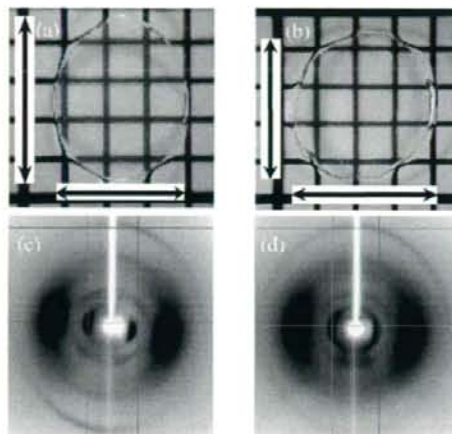


Figure 2. Optical photomicrographs and X-ray diffraction patterns of oriented (a and c) and control (b and d) collagen gels, respectively. Vertical and parallel scale bars are 9 and 6 mm (a) and 8 and 8 mm (b), respectively.

oriented gels as compared to the control gels. The direction of the collagen triple-helix in the gels was the same as the direction of orientation of the collagen solution spread onto a glass plate. We speculated that the axial orientation process of the reaction solution of high concentration (10 wt %) on the glass plate is important which caused this orientation of the collagen triple-helix because the other processes were exactly the same as the preparation of the control gel.

We evaluated the mechanical strength of both collagen gels because it is well known that the mechanical properties of a collagen matrix are strongly influenced by the orientation of the collagen triple-helix. The tensile strength of the oriented and control collagen gels was measured using a Shimadzu EZ-test. Both types of collagen gels of 100- μm thickness were prepared, and the specimens (width/length/thickness, 10 mm/30 mm/100 μm) were used for the measurement of tensile strength. The oriented gels were pulled in the parallel and vertical directions with the direction of the collagen triple-helix. Figure 3 shows the tensile strength and breaking elongation of each sample and the typical stress/strain curves of each sample shown in Supporting Information.⁸ No statistically significant differences were observed between the oriented gel pulled in vertical direction and the control gel in the tensile strength and breaking elongation. However, the tensile strength of the parallel direction was approximately twofold higher than that of the control gel, although the elongation properties of the oriented gel in parallel slightly decreased. To the best of our knowledge, it is the first report of controlling

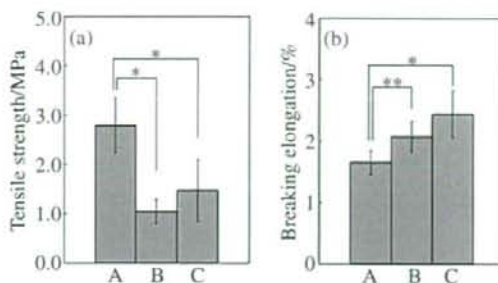


Figure 3. Tensile strength (a) and breaking elongation (b) of the oriented and control gels. The oriented gels were pulled in parallel (A) or vertically (B) with the direction of the collagen triple-helix. C is control gel. These are average values at more than three times. Statistically significant difference using two-sample *t* test (**P* < 0.01, ***P* < 0.05).

the orientation of collagen triple-helix via a simple method and the resulting significant difference in mechanical strength due to the orientation of the collagen triple-helix.

In summary, collagen hydrogels with oriented triple-helix were successfully prepared by the axial orientation of a dense collagen solution onto a glass plate and crosslinking. The oriented gels underwent an interesting shape change due to the orientation of the collagen triple-helix. Furthermore, the mechanical properties of the oriented gels depended strongly on the orientation of triple-helix, and the tensile strength was twofold higher than that of the control gel. Transparent collagen hydrogels with oriented triple-helix will be useful as novel collagen materials for various tissue engineering fields such as bone, tendon, ligament, and cornea.

This work was financially supported by the Center of Excellence (COE) Program for 21st Century, Osaka University, and the Health and Labor Sciences Research Grants of Japan. The authors are grateful to Mr. Y. Tanaka of Tohoku University for his helpful support.

References and Notes

- J. P. R. O. Orgel, T. C. Irving, A. Miller, T. J. Wess, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 9001.
- D. J. S. Hulmes, *J. Struct. Biol.* **2002**, *137*, 2.
- a) J. Torbet, M. Malbouyres, N. Buellesb, V. Justinb, M. Rouleta, O. Damoura, A. Oldberge, F. Ruggiero, D. J. S. Hulmes, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4268. b) C. Guo, L. J. Kaufman, *Biomaterials* **2007**, *28*, 1105.
- F. Amyot, A. Small, H. Boukari, D. Sackett, J. Elliott, D. McDaniel, A. Plant, A. Gandjbakhche, *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2008**, *86B*, 438.
- Y. Liu, L. Gan, D. J. Carlsson, P. Fagerholm, N. Lagali, M. A. Watsky, R. Munger, W. G. Hodge, D. Priest, M. Griffith, *IOVS* **2006**, *47*, 1869.
- C. A. Maxwell, T. J. Wess, C. J. Kennedy, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 2321.
- K. Okuyama, X. Xu, M. Iguchi, K. Noguchi, *Biopolymers* **2006**, *84*, 181.
- Supporting Information is also available electronically on the CSJ-Journal Web site, <http://www.csj.jp/journals/chem-lett/index.html>.