

200906001A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西 田 幸 二

平成 22 (2010) 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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 西 田 幸 二

平成 22 (2010) 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
研究代表者	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分野	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臨床試験データ管理学	特任准教授
	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
研究代表者 西田 幸二

II. 分担研究報告

1. 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・・・20
嶋澤 るみ子、大和 雅之、上 昌広
2. 統計学及びデータ管理学の観点からの統計学及びデータ管理学の観点からの臨床試験に関するプロトコール作成及び作成支援・・・22
山口 拓洋
3. 角膜全層の再生医療技術における幹細胞制御に関する研究・・・25
仲野 徹
4. 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・・・29
明石 満
5. 角膜実質の再生医療技術の開発に関する研究・・・33
竹花 一成
6. 培養角膜内皮シートキャリアの開発・・・37
田畑 泰彦

III. 知的財産に関する一覧表

1. 知的財産に関する一覧表・・・41

IV. 研究班会議に関する報告書

1. 全体班会議
平成 21 年度第 1-2 回班会議プログラムおよび議事録・・・43
2. 分科会
第 1-5 回角膜再生ミーティング議事録・・・57

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・・・66

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

研究代表者 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3年目にあたる本年は、上皮細胞シート移植を進めるための臨床プロトコールの作成、細胞プロセッシングセンターの準備および多施設共同臨床研究の準備、人工実質としてのゲル作製条件の最適化と動物実験による有効性評価、角膜内皮分化誘導法の開発と有効性評価および内皮細胞シートキャリアの改良を行い、角膜全層の再生医療技術を創出した。

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

A. 研究目的

視覚はQOLの維持に極めて重要である。角膜疾患のため重篤な視覚障害にいたって失明した患者に対して、現在角膜移植が実施されている。しかし現在の角膜移植は献眼に依存しており、その献眼数

は絶対的に少なく、多くの患者に対して直ちに移植手術を行うことは困難である。さらに、ステーブンスジョンソン症候群や角膜内皮疾患などの重篤な疾患では、拒絶反応のため角膜移植が奏功しない。

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

内皮それぞれの再生医療技術の開発と臨床応用に
関する更なる研究が望まれている。

19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キング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。

20年度は、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ゲルの評価を行い、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た。

最終年度である本年度は、角膜上皮、角膜実質、角膜内皮のパーツ毎に昨年度まで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。角膜上皮は、臨床研究の準備として、臨床プロトコルの作成、東北大学未来医工学治療開発センターのセルプロセッシングセンター (CPC) の準備、多施設共同臨床研究の準備をおこなった。角膜実質は、ゲル作製条件の最適化と透明化皮膚移植術の開発を進め、動物実験を中心とした評価を行った。角膜内皮は、虹彩を用いて角膜内皮様細胞への分化誘導条件を検討し、さらに動物移植実験による誘導性角膜内皮様細胞の有効性評価を行った。また、キャリアシートの細胞接着性、物性評価、生体適合性の評価を行った。

B. 研究方法

角膜上皮

臨床研究のプロトコルの作成: 臨床試験を行うにあたって、必要となる臨床プロトコルの作成を行った。臨床プロトコル作成に当たっては、実際に臨床研究を担当する医師のみならず、生物統計家や、薬事法の専門家、CRC など多くの専門家が関与する必要がある。そこで、分担研究者である大和、上、嶋澤、山口らと共同で臨床プロトコルの作成を行った。また、平成 20 年度より高度医療評価制度が新たに創設されたが、本研究の実用化において、同制度および先進医療との比較を行いながらその可能性について検討を行った。

東北大学未来医工学治療開発センターのセルプロセッシングセンターの準備: 東北大学未来医工学治療開発センターには CPC が併設されており、GMP

準拠での細胞調整が可能となっている。われわれは培養上皮細胞シート移植を行うにあたり、培養細胞シート作製を GMP 準拠の管理下で行う予定としており、そのために必要な標準手順書 (SOP) の準備、工程管理システムの準備などをおこなった。さらに実際に細胞培養を行う CPC 作業者の教育訓練や工程管理システムの準備をおこなった。

多施設臨床研究の準備: 自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植は大阪大学において西田らによって有効性及び安全性が少数例に対して確認されているものである。これをさらに検証するためには多施設で複数の研究者によって本治療法の有効性及び安全性について検証を行う必要がある。本年度はこれについても準備を行った。

(倫理面への配慮)

「臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年 7 月 31 日全部改正)」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、「ヒト (自己) 由来細胞・組織加工医薬品等の製造管理・品質管理の考え方について」などの関連指針や関連法規を遵守する内容となるように留意した。

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。

皮膚透明化による角膜代価物作製法の検討: 皮膚を単離し、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 μm 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 μm 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 μm 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

角膜内皮への分化誘導実験:虹彩実質由来細胞を用いて、角膜内皮細胞への分化誘導実験を行った。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。

これまでに、マウス虹彩から浮遊培養によって単離した虹彩実質 sphere は幹細胞マーカー (Sox2, Nestin 等) に加え、神経堤細胞マーカー (p75, AP2 等) 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、軟骨細胞などへの多分化能を有する神経堤幹細胞であることが示された。

同様に家兎眼を用いて、虹彩実質由来スフェアを作製し、幹細胞マーカー (Sox2, Nestin 等) および神経堤細胞マーカー (p75, AP2 等) の免疫染色を行った。次いで、多分化能を検討するため、神経や平滑筋、軟骨細胞などへの分化誘導実験を行った。それぞれ Tuj-1 (ニューロン)、GFAP (グリア)、 α SMA (平滑筋)、collagen type II および aggrecan (軟骨) の免疫染色により評価した。

さらに、家兎またはヒト虹彩実質由来細胞を用いて角膜内皮細胞への分化誘導実験を行った。虹彩から虹彩実質スフェアを作製した後、細胞外基質をコーティングした培養皿上に播種し、角膜内皮細胞誘導因子を添加して接着培養を行った。数日間誘導した細胞に対して、角膜内皮マーカーである ZO-1 および Na^+/K^+ ATPase の免疫染色を行った。また、角膜内皮特異的なマーカーである Collagen type VIII および Na^+/K^+ ATPase、N-cadherin の発現を RT-PCR にて検討した。

誘導角膜内皮細胞シートの機能解析:虹彩実質由来細胞から誘導した細胞を用いて、角膜内皮細胞シートの作製を行った。誘導細胞を酵素処理にて回収した後、移植用キャリア上に播種し、誘導角膜内皮細胞シートを作製した。また、培養角膜内皮からも角膜内皮細胞シートを作製した。

次いで、この細胞シートのポンプ機能およびバリア機能の評価を行った。誘導角膜内皮細胞シートおよび角膜内皮細胞シートを ussing chamber の間に挟み、ショートサーキットアンプリファーを用いて、細胞シートの作り出す電位差とそれを打ち消すために必要な短絡電流を測定した。

培養内皮移植用キャリアの検討: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適切な強度と透明性を有した基質が必要である。昨年度までに基質の開発として人工角膜実質再生の一貫として作製した架橋 I 型コラーゲンを培養内皮細胞シートの基質として用いることを検討した。さらに、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シート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。

本年度は新規に開発したゼラチンハイドロゲルシートの機能解析および有効性の検討を行った。水分を含んだ状態にて厚さ 50 μ m のゼラチンハイドロゲルシートならびにアテロコラーゲンシートの透明性を測定した。ゼラチンハイドロゲルシートは熱脱水架橋を 6, 12, 24, 48 時間施行した合計 4 種類を測定した。測定条件は 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700nm の波長にて測定した。さらに、同シートについて力学特性（抗張力、破断点、ヤング率）を測定した。

物質透過性について、厚さ 50 μ m のゼラチンハイドロゲルシート（熱脱水架橋 48 時間）ならびにアテロコラーゲンシートの物質透過性（アルブミン、グルコース）を測定した。donor chamber に 50 μ M FITC-labeled human albumin solution ならびに 0.05 g/ml glucose solution にいれ一定時間後 receptor chamber より溶液を回収した。回収後 FITC-labeled human albumin solution は fluorophotometric analysis を用いて、また glucose solution は spectrophotometric analysis を用いて拡散係数を算出した。

次いで、ゼラチンハイドロゲルシート上における角膜内皮細胞の状態について検討を行った。ゼラチ

ンハイドロゲルシート（熱脱水架橋 48 時間施行）上に培養ヒト角膜内皮細胞を播種（播種密度は 3000-5000 個/mm²）し、Na⁺/ K⁺-ATPase、ZO-1 の免疫染色を行った。また、同様のサンプルから凍結標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色（H.E.染色）を行った。さらに、2% glutaraldehyde 37^o C にて 1 時間固定し、エタノールにて脱水後、osmium coater にてコーティングを行い、走査型電子顕微鏡にて観察を行った。

さらに、ゼラチンハイドロゲルシートの生体適合性を動物への移植実験により評価した。同シートを家兎の前房内へ移植し、継時的にスリットランプによる前眼部観察を行った。また、移植動物を安楽殺した後、角膜を摘出し、H.E.染色により組織学的解析を行った。

動物への移植実験:虹彩実質由来細胞から誘導した細胞の有効性を確認するため、疾患動物モデルへの移植実験を行った。

まず家兎の角膜から角膜内皮の除去を行い、水疱性角膜症モデルを作製した。この疾患家兎モデルに対し、虹彩実質由来細胞から誘導した誘導角膜内皮細胞の移植手術を行い、経時的にスリットランプによる前眼部観察、超音波パキメーターによる角膜厚測定、眼圧計による眼圧測定を行った。また、移植動物を安楽殺した後、角膜を摘出し、H.E.染色により組織学的解析を行った。対照群として、角膜内皮細胞移植を行わない疾患家兎モデルを用いた。

（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の場合は、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

臨床研究のプロトコールの作成:臨床家、生物統計家、薬事法専門家、CRCなどと共同で下記の項目を含む臨床プロトコールを作成した。

0. 概要

1. 目的

2. 背景

3. 薬剤や器具等の情報

3.1. 使用する薬剤や器具

3.2. 使用する生体材料、移植細胞等

4. 本試験で用いる規準・定義

5. 選択規準

5.1. 適格規準

5.2. 除外規準

6. 登録

6.1. 施設登録

6.2. 患者登録

7. 治療計画

7.1. 移植細胞ソースの採取

7.2. 培養口腔粘膜上皮細胞シートの作製

7.3. 手術方法

8. 観察・検査項目とスケジュール

8.1. 観察・検査項目スケジュール

8.2. 検査・観察項目

9. 有害事象の評価と報告

9.1. 有害事象の定義

9.2. 有害事象の評価

9.3. 予期される有害事象

9.4. 有害事象の報告と対応

10. データ収集

10.1. 記録用紙(CRF)の種類と提出期限

10.2. 記入方法

10.3. 送付方法

11. エンドポイント(評価項目)

11.1. 有効性エンドポイント

11.2. 安全性エンドポイント

12. 統計学的事項

12.1. 解析対象集団

12.2. 有効性の主要評価項目の解析

12.3. 有効性の副次的評価項目の解析

12.4. 安全性評価項目の解析

12.6. サンプルサイズ、予定登録期間、追跡期間

13. 倫理的事項

- 13.1. 被験者の保護
- 13.2. 患者への説明と同意（インフォームド・コンセント）
- 13.3. プライバシーの保護
- 13.4. 実施計画書の遵守
- 13.5. 倫理審査委員会による承認
- 13.6. 新たな情報の報告
- 13.7. プロトコールの内容変更について
- 14. 費用負担と補償
 - 14.1. 資金源及び財政上の関係
 - 14.2. 試験にかかる費用負担
 - 14.3. 健康被害の補償及び保険への加入
- 15. モニタリングと監査
 - 15.1. モニタリング
 - 15.2. プロトコール違反・逸脱
- 16. プロトコールの内容変更
- 17. 試験の終了と早期中止
 - 17.1. 試験の終了
 - 17.2. 試験の早期中止
- 18. 記録の保存
- 19. 研究結果の帰属と発表
- 20. 研究組織
 - 20.1. 主任研究者
 - 20.2. 研究事務局
 - 20.3. 効果・安全性評価委員会
 - 20.4. 統計解析責任者
 - 20.5. データセンター
- 21. 文献
- 22. 付録

さらに、先進医療および高度医療評価制度の比較検討をおこなった。自家製造した自家培養上皮細胞シートを用いれば、先進医療制度の活用が可能と考えられるが、本制度は医療機関ごとに認められるものであることから、申請施設ごとの実績が求められる。また、本制度によって培養移植術が保険収載さ

れた場合には、培養上皮細胞シートを薬事法における医療機器として承認されることが難しくなることが考えられた。高度医療評価制度については、将来的な薬事法による申請につながるデータ収集を容易にする一方で、細胞シートを製造販売する企業が必要であり、今後の解決すべき課題である。

東北大学未来医工学治療開発センターのセルプロセッシングセンターの準備: 東北大学未来医工学治療開発センターのセルプロセッシングセンターの準備を行った。セルプロセッシングセンターにおいて使用する標準手順書（SOP）を作成し、これをもとに電子管理となっている工程管理システムの整備を完了した。さらにCPC内で実際に作業する作業者の教育および訓練を完了した。これらの成果によってGMP準拠による培養上皮細胞シート作製が可能になると考えられた。

多施設共同臨床研究の準備: 多施設共同臨床研究は東北大、大阪大、愛媛大、東京大の4施設において行うことが決定された。本年度は多施設研究を行うに当たっての各施設における倫理委員会への提出書類の準備を行った。さらに各施設での倫理委員会への書類提出の後におこなう「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従った書類準備について行った。

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。また血管浸入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の再現と有効性評価

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

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

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。

積層コラーゲンの作製と機能評価: 靱帯など、強度が必要とされる組織のコラーゲン線維の走行は一定方向に配向している。そこで、架橋コラーゲンの線維配向を制御する方法を開発した。作製した線維配向型コラーゲン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。

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方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 CD 3 4 陽性細胞が誘導できることを確認した。

生体組織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)。また皮膚真皮組織も透明化出来ることが分かった(特願2009-287890)。透明化した強膜組織および皮膚組

織は共に縫合に絶え得る十分な力学強度を有していた。

角膜内皮

角膜内皮への分化誘導実験:幹細胞マーカーの免疫染色法による解析の結果から、マウス虹彩を用いた実験と同様に、浮遊培養によって単離した家兎虹彩実質 sphere は幹細胞マーカー (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。

さらに虹彩実質 sphere の多分化能を検討するため、神経や平滑筋、軟骨細胞などへの分化誘導実験を行った。平滑筋への分化誘導を行った結果、平滑筋マーカーである α -SMA 陽性細胞が認められ、陽性細胞率は約85%であった。神経への誘導を行った結果、ニューロンのマーカーである Tuj-1 およびグリア細胞マーカーである GFAP 陽性細胞を確認した。陽性細胞率について解析した結果、Tuj-1 約21%、GFAP 約13%であった。さらに、軟骨細胞への分化誘導を行い、type II collagen および aggrecan 陽性であることを確認した。

さらに、虹彩実質由来細胞を用いて角膜内皮細胞への分化誘導実験を行った。誘導5日目以降、角膜内皮と同様の敷石状細胞が認められるようになった。誘導した細胞に対して、角膜内皮マーカーである ZO-1 および Na^+/K^+ ATPase の免疫染色を行った結果、角膜内皮細胞と同様に誘導細胞にも発現が認められた。また、RT-PCR の結果、誘導細胞は角膜内皮マーカーである Collagen type VIII および Na^+/K^+ ATPase、N-cadherin を発現していた(特願2008-123562)。

誘導角膜内皮細胞シートの機能解析:虹彩実質由来細胞から誘導した細胞を用いて、角膜内皮細胞シートを作製を行った。位相差顕微鏡による細胞観察の

結果、誘導細胞シートと角膜内皮細胞シートの細胞密度は約 3000cells/mm² であった。次いで、この細胞シートのポンプ機能およびバリア機能の評価を行った。ussing chamber を用いた実験結果より、誘導細胞シートは角膜内皮細胞シートと同程度の短絡電流値であった。さらに得られた短絡電流値と電位差から電気抵抗値を算出した結果、誘導細胞シートの電気抵抗値は角膜内皮細胞シートと同程度であった。

培養内皮移植用キャリアの検討: 透明性試験の結果、アテロコラーゲンシートの透明性は $72.1 \pm 2.1\%$ であった。ゼラチンハイドロゲルシート (熱脱水架橋を 6, 12, 24, 48 時間施行) の透明性はそれぞれ、 $99.1 \pm 0.1\%$, $99.0 \pm 0.2\%$, $98.8 \pm 0.5\%$, $99.0 \pm 0.6\%$ であった。力学特性試験の結果、抗張力(MPa)について、アテロコラーゲンシートは 1.95 ± 0.74 、ゼラチンハイドロゲルシート (熱脱水架橋を 6, 12, 24, 48 時間施行) は順に 1.74 ± 0.43 , 2.01 ± 0.20 , 2.76 ± 0.19 , 3.43 ± 0.53 であった。破断点(%)について、アテロコラーゲンシートは 67.9 ± 2.0 、ゼラチンハイドロゲルシート (熱脱水架橋を 6, 12, 24, 48 時間施行) は順に 60.5 ± 3.5 , 45.3 ± 10.9 , 33.2 ± 5.8 , 21.8 ± 5.2 であった。ヤング率(MPa)について、アテロコラーゲンシートは 3.50 ± 0.76 、ゼラチンハイドロゲルシート (熱脱水架橋を 6, 12, 24, 48 時間施行) は順に 3.01 ± 0.68 , 4.89 ± 1.43 , 8.94 ± 1.77 , 18.31 ± 6.46 であった。

物質透過性について、アルブミンの拡散係数 (cm²/s) はアテロコラーゲンシート : $5.13 \pm 1.82 \times 10^{-8}$ 、ゼラチンハイドロゲルシート : $9.67 \pm 1.46 \times 10^{-8}$ であった。グルコース拡散係数 (cm²/s) はアテロコラーゲンシート : $2.55 \pm 0.02 \times 10^{-7}$ 、ゼラチンハイドロゲルシート : $2.25 \pm 0.11 \times 10^{-7}$ であった。

また、ゼラチンハイドロゲルシート上で培養した

角膜内皮細胞の免疫染色の結果、細胞間に Na⁺/K⁺-ATPase、ZO-1 の発現が認められた。細胞の形態も敷石状であった。細胞シートの H.E.染色の結果、ゼラチンハイドロゲルシート上の培養角膜内皮細胞は単層を呈していた。電子顕微鏡観察の結果、培養角膜内皮細胞の細胞間は密接に接着しており、細胞表面上には microvilli が観察された。

さらに、動物への移植実験の結果、移植したゼラチンハイドロゲルシートは角膜実質へ生着していた。移植後 4 週まで継時的にスリットランプによって前眼部観察を行ったが、炎症も認められず、角膜は透明性を維持していた (特願 2009-190415)。

動物への移植実験: 虹彩実質由来細胞から誘導した細胞の有効性を確認するため、疾患動物モデルへの移植実験を行った。

継時的にスリットランプによる前眼部観察の結果、移植を行わなかった群は角膜混濁および浮腫が認められたが、誘導細胞移植群では角膜の透明性が回復していた。また、超音波パキメーターによって角膜厚を測定した結果、非移植群は 1000-1200 μm であったのに対して、誘導細胞を移植した場合に角膜厚が 400-700 μm まで回復する傾向が認められた。眼圧計による眼圧測定を行った結果、非移植群および移植群において眼圧の上昇は認められなかった。

また、H.E.染色による組織学的解析の結果、移植群では前房側の角膜実質上に細胞の生着が認められ、角膜厚も減少していた。一方、非移植群では、角膜実質上の角膜内皮細胞は消失した状態であった。

D. 考察

角膜上皮

臨床プロトコールの作成をおこない、臨床試験の

準備をさらに進めることができた。また、先進医療及び高度医療の検討から、培養口腔粘膜上皮細胞シート移植の臨床試験に関しては、高度医療制度を用いることをまず検討することとした。本制度が培養上皮細胞シート移植に適応されれば、本治療法のさらなる普及に極めて有用であると考えられた。また、CPCの準備も完了したことから、施設面においてもGMP準拠の細胞調整の準備が完了したと考えられた。さらに、多施設共同臨床研究を今後行うことで、さらに高いエビデンスレベルで本治療法の有効性及び安全性が証明されるものと期待された。

角膜実質

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）、角膜実質代価物の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。

さらに、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に導入する方法の開発が今後必要と考えている。

また、強膜（白目）が透明化するという特異な現象を発見し、これを自家透明化皮膚組織移植術に発展させることができた。力学強度はコラーゲンゲルよりも優れており、臨床応用が期待される。

角膜内皮

角膜内皮について、これまでに虹彩実質は角膜内皮同様に神経堤細胞から発生した組織であることを報告した。さらに浮遊培養によって、マウス虹彩から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を単離することに成功した。今回、家兎を用いた場合も同様の方法によって、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）を発現する虹彩実質由来sphereを単離することが可能であった。この虹彩実質由来sphereも、神経や平滑筋、軟骨細胞などへの分化誘導が可能であり、多分化能を有する神経堤幹細胞であった。マウスおよび家兎によって同様の実験結果が得られており、この方法はヒトを含む哺乳類に共通する方法であると考えられる。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。

角膜内皮への誘導実験において、虹彩実質より誘導した敷石状細胞は角膜内皮マーカーであるZO-1およびNa⁺/K⁺ ATPase、Collagen type VIII、N-cadherinを発現していた。角膜内皮細胞へ分化した報告はこれまでに報告がなく、本事業において我々のグループが、虹彩実質組織から角膜内皮様細

胞を誘導する条件を世界で初めて見出した。さらに、誘導角膜内皮細胞シートの作製し、この細胞シートのポンプ機能およびバリア機能の評価を行った。誘導細胞シートは角膜内皮細胞シートと比較して、約6割のポンプ機能およびバリア機能を持っていた。今後、角膜内皮への分化誘導条件を最適化することによって、これらの機能を向上することが可能であると考えられる。

また、移植に用いるキャリアについて、アテロコラーゲンおよびゼラチンは細胞接着、細胞形態、物質透過性ともに良好であった。これらの基質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。また、我々が見出したゼラチンハイドロゲルシートはアテロコラーゲンと比較して透明であった。さらに物質特性の解析結果から、ゼラチンハイドロゲルシートはより手術時のハンドリングが容易であることが示唆された。動物移植実験において生体適合性も良好であることが実証され、内皮移植用キャリアとして有用であると考えられた。今後は、動物実験を通して、生体分解性について最適化を行うことが期待される。

最後に、誘導角膜内皮細胞の疾患動物モデルへの移植実験により、有効性を確認できた。誘導細胞移植群では角膜の透明性の向上が認められ、また超音波パキメーターによって角膜厚を測定した結果、バラツキが大きいものの角膜厚が減少する傾向が認められた。これは、病態モデルが未だ不十分であることや、現在確立されている角膜内移植方法が手技的に困難であるためである。今後は、より安定した病態モデルの作製や、角膜内皮移植における術式の改良が必要である。

E. 結論

角膜上皮については、臨床プロトコールの完成、CPCの整備、多施設臨床研究の準備を行うことが

できた。これらの成果によって培養口腔粘膜上皮細胞シート移植を今までよりも高いレベルで行う準備が完了したと考えられ、さらに今後の多施設研究が本治療法標準化の足掛かりになると考えられた。

角膜実質については、線維配向・積層型コラーゲン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。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、細胞培養技術等を開発した。また透明化強膜および皮膚移植術といった独創的な技術を提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。さらに、虹彩実質が角膜内皮細胞を分化誘導し、誘導性角膜内皮細胞シートを作製することに成功した。誘導性角膜内皮細胞は角膜内皮と同等のポンプ機能およびバリア機能を有しており、動物移植実験においてその有効性も確認できた。また、移植に用いるキャリアについて、細胞培養および物質特性、生体適合性の検討の結果、ゼラチンハイドロゲルシートを開発することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yuji Tanaka, Akira Kubota, Michiya Matsusaki, Thomas Duncan, Yoshikiyo Hatakeyama, Katsuya Fukuyama, Andrew J. Quantock, Masayuki Yamato, Mitsuru Akashi, and Kohji Nishida. Anisotropic mechanical properties in collagen hydrogels induced by uniaxial-flow for ocular applications. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*. in press.

- 2) Oie Y, Hayashi R, Takagi R, Yamato M, Takayanagi H, Tano Y, Nishida K. A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 2010 in press.
- 3) Yamano N, Kimura T, Watanabe-Kushima S, Shinohara T, Nakano T. Metastable primordial germ cell-like state induced from mouse embryonic stem cells by Akt activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 392 (2010) 311–316
- 4) Hayashi R, Yamato M, Takayanagi H, Oie Y, Kubota A, Hori Y, Okano T, Nishida K. Validation System of Tissue-Engineered Epithelial Cell Sheets for Corneal Regenerative Medicine. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Apr 13
- 5) Kumashiro Y, Yamato M, Okano T. Cell Attachment-Detachment Control on Temperature-Responsive Thin Surfaces for Novel Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng*. 2010 Apr 13.
- 6) Sakai E, Kitajima K, Sato A, Nakano T. Increase of hematopoietic progenitor and suppression of endothelial gene expression by Runx1 expression during in vitro ES differentiation. *Experimental Hematology* 2009;37:334–345
- 7) Nagayasu A, Hirayanagi T, Tanaka Y, Tangkawattana P, Ueda H, Takehana K. Site-dependent differences in collagen lamellae in the corneal substantia propria of beagle dogs. *J Vet Med Sci*. 2009 Sep;71(9):1229-31.
- 8) Haraguchi Y, Sekine W, Shimizu T, Yamato M, Miyoshi S, Umezawa A, Okano T. Development of a new assay system for evaluating the permeability of various substances through 3-dimensional tissue. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009 Sep 29.
- 9) Kusanagi R, Umemoto T, Yamato M, Matsuzaki Y, Nishida K, Kobayashi Y, Fukai F, Okano T. Nectin-3 expression is elevated in limbal epithelial side population cells with strongly expressed stem cell markers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Nov 13;389(2):274-8. Epub 2009 Aug 28.
- 10) Soma T, Nishida K, Yamato M, Kosaka S, Yang J, Hayashi R, Sugiyama H, Maeda N, Okano T, Tano Y. Histological evaluation of mechanical epithelial separation in epithelial laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg*. 2009 Jul;35(7):1251-9.
- 11) Maeda M, Yamato M, Kanzaki M, Iseki H, Okano T. Thoracoscopic cell sheet transplantation with a novel device. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009 Jun;3(4):255-9.
- 12) Kanayama S, Nishida K, Yamato M, Hayashi R, Maeda N, Okano T, Tano Y. Analysis of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Secreted from Cultured Corneal and Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets in Vitro, *Br J Ophthalmol*. 2009 Feb;93(2):263-7.
- 13) 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.
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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、ホテルグランビア広島、2007年4月1日。
- 2) 西田幸二：角膜混濁、日本眼科医会第53回生涯教育講座、名古屋市中小企業振興会館、2007年4月14日。
- 3) 西田幸二：角膜手術の進歩、栃木県眼科集談会、自治医科大学研修センター、2007年4月15日。
- 4) 西田幸二：角膜ジストロフィ、第111回日本眼科学会総会「シンポジウム16:」、大阪国際会議場、2007年4月20日。
- 5) 西田幸二：角膜内皮の診かた、第111回日本眼科学会総会「教育セミナー9」、大阪国際会議場、2007年4月22日。
- 6) Nishida K: Middle sized Animal Model of Retinal Degeneration, ARVO 2007「Retinal

- Degeneration」, Fort Lauderdale Convention Center, 2007/5/9
- 7) 西田幸二：医工連携による角膜再生治療法の開発と臨床応用、大阪大学医学部、2007年5月25日。
 - 8) 西田幸二：角膜診療のステップアップ講座Ⅱ、東北6大学眼科 Step Up セミナー、盛岡グランドホテル、2007年5月26日。
 - 9) 西田幸二：角膜移植の進歩、第38回北陸東海ブロック講習会、福井商工会議所ビル、2007年6月3日。
 - 10) 西田幸二：角膜再生医療の現在と未来、チバビジョン 第13回ビジョンフォーラム、品川ストリングスホテル、2007年6月5日。
 - 11) 西田幸二：症例から学ぶ角膜疾患の診断、角膜診療座談会、ホテル仙台プラザ、2007年6月15日。
 - 12) 西田幸二：実用化されている角膜の再生医療、柴田郡医師会学術講演会、サンシャイン青葉(柴田町船岡)、2007年6月27日。
 - 13) Nishida K: Recent Advance of Corneal Surgery, The 8th Qingdao International Symposium of Ophthalmology, Qingdao, China, 2007/6/30.
 - 14) 西田幸二：角膜疾患の治療の進歩、北海道眼科医学会生涯教育講座プログラム、ホテルロイトン札幌、2007年7月14日。
 - 15) 西田幸二：スリット所見・見方、第45回北日本眼科学会 インストラクションコース、新潟コンベンションセンター、2007年7月28日。
 - 16) 西田幸二：加齢性の眼の病気と最新の治療について、第413回 市民医学講座、仙台市急患センター・仙台市医師会館、2007年8月23日。
 - 17) 西田幸二：角膜診療の最近の話題、東北ブロック特別講習会、宮城県眼科医会、2007年8月25日。
 - 18) 西田幸二：角膜上皮、角膜内皮の再生医療、バイオメディカル 講義、東京女子医大 先端生命医科学研究所、2007年9月22日。
 - 19) 西田幸二：角膜手術の進歩ー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、東京都眼科医学会学術講演会、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。