

- 28) 西田幸二：角膜の再生医療、バイオマテリアル学会東北地域講演会、東北大学金属材料研究所講堂、2007年12月21日。
- 29) 西田幸二：幹細胞研究と角膜再生医療、21世紀COE公開シンポジウム「再生医療を実現する細胞シート工学-基礎から臨床へー工学と医学の融合」、東京女子医大 弥生記念講堂、2008年1月31日
- 30) Hongo C, Matsusaki M, Tanaka Y, Nishida K, Akashi M, Development of Layered Collagen Gel with Orthogonal Molecular Orientation, The 8th World Biomaterials Congress, オランダ アムステルダム, 2008年5月28日～6月1日
- 31) 田中佑治, 久保田享, 本郷千鶴, 松崎典弥, 竹花一成, 明石満, 西田幸二, 角膜再生医療に向けた分子配向を制御した積層型コラーゲン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
- 32) 西田幸二：角膜手術の進歩、第91回阪大眼科同窓会学術講演会、大阪国際会議場、2008年6月8日
- 33) 西田幸二：角膜手術の進歩、第94回沖縄眼科集談会、琉球大学医学部、2008年6月21日
- 34) 西田幸二：Cell Sheet Transplantation for Ocular Surface Reconstruction、WOC 2008 Symposium: External Eye Disease, Cornea, and Eye Bank / Ocular Surface Reconstruction, Hong Kong Convention & Exhibition Centre、2008年6月29日
- 35) 西田幸二：DALK Combined with Cataract Surgery、WOC 2008 Symposium: External Eye Disease, Cornea, and Eye Bank / Anterior Lamellar Keratoplasty、Hong Kong Convention & Exhibition Centre、2008年6月30日
- 36) 西田幸二：DALK Combined with Ocular Surface Reconstruction、WOC 2008 Symposium: External Eye Disease, Cornea, and Eye Bank / Anterior Lamellar Keratoplasty、Hong Kong Convention & Exhibition Centre、2008年6月30日
- 37) 西田幸二：Corneal tissue engineering、9th International Symposium of Ophthalmology、中国 青島、2008年7月26日
- 38) 西田幸二：角膜治療のアップデート、函館眼科医会学術講演会、函館国際ホテル、2008年7月28日
- 39) 本郷千鶴, 松崎典弥, 田中佑治, 久保田享, 西田幸二, 明石満, 分子配向を制御した積層化コラーゲンゲルの創製, 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
- 40) Hongo C, Matsusaki M, Nishida K, Akashi M, Molecular Orientation of a Collagen Hydrogel with High Mechanical Strength by a Simple Method, XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, 大阪, 2008年8月23日～31日
- 41) 西田幸二：角膜上皮の再生医療、東京大学平成20年度基礎・臨床・社会学統合講義、東京大学医学部、2008年9月3日
- 42) 本郷千鶴, 田中佑治, 松崎典弥, 久保田享, 西田幸二, 明石満, 分子配向を制御したコラーゲン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

- 43) 田中佑治, 久保田享, 本郷千鶴, 松崎典弥, 竹花一成, 明石満, 西田幸二, 線維配向を制御した積層型コラーゲングルの開発と人工角膜実質としての応用, 再生医療・生体材料研究会 (眼科再生医療研究会) 東京国際フォーラム, 東京, 2008年10月23日
- 44) 西田幸二:角膜上皮ジストロフィーの治療戦略、第62回臨床眼科学会 モーニングクルズス、東京国際フォーラム、2008年10月24日
- 45) 西田幸二:徹底解剖!角膜内皮移植術(DSAEK)、第62回臨床眼科学会 モーニングクルズス、東京国際フォーラム、2008年10月24日
- 46) 本郷千鶴, 松崎典弥, 田中佑治, 久保田享, 西田幸二, 明石満, 分子配向を制御した積層化コラーゲング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
- 47) 西田幸二:東北大学のTR(トランスレーションリサーチ)への取り組み 未来医工学治療開発センターの紹介、東北大学未来医工学治療開発センターシンポジウム、東北大学良陵会館、2008年11月17日
- 48) 西田幸二:角膜再生医療の標準化に向けて、第2回再生医療テクノロジー・イノベーション研究会 シンポジウム、東京女子医科大学、2008年11月19日
- 49) 西田幸二:再生医療の話題、堺市眼科医会総会 学術講演会、大阪、2008年11月22日
- 50) 西田幸二: CORNEAL EPITHELIAL STEM CELL AND REGENERATIVE MEDICINE、Adult Stem Cells – Biology and Clinical Applications Meeting、Griffith University national Centre for Adult Stem Cell Research、2008年11月26日
- 51) 西田幸二: Tears and Ocular Surface、The 14th Annual Meeting of Kyoto Cornea Club Symposium I、ウエンスティン都ホテル京都、2008年12月5日
- 52) 西田幸二:オキュラーサーフェスとステムセル、第33回角膜カンファランス シンポジウム 1 眼表面サイエンス、ザ・リッツカールトン大阪、2009年2月20日
- 53) 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、人工角膜実質の構築を目指した線維配向型架橋コラーゲングルの開発、第8回再生医療学会、東京国際フォーラム、東京、2009年3月6日
- 54) 西田幸二:再生医療と Translational research、第9回角膜緑内障研究会<9th GlaNea in Sednai>、仙台エクセルホテル東急、2009年3月28日
- 55) 本郷千鶴, 松崎典弥, 田中佑治, 久保田享, 西田幸二, 明石満, 角膜実質再生医療へ向けたラメラ構造を有するコラーゲングルの創製, 第25回日本医工学治療学会, 大阪国際会議場, 大阪, 2009年4月10日~12日
- 56) 西田幸二:トランスレーションリサーチにおける産学連携の動き、第113回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム、2009年4月18日
- 57) 仲野 徹: PTEN/PI3K と幹細胞、第98回日本病理学会ワークショップ、京都、2009年5月
- 58) 西田幸二:眼科領域における再生医療の現状と将来、日本組織培養学会第82回大会、独協大学、2009年5月18日
- 59) 仲野 徹:再生医療の現実と課題、第46回日本小児外科学会学術集会、大阪、2009年6月

- 60) Y. Tanaka, A. Kubota, A. J. Quantock, M. Yamato, K. Takehana, M. Akashi, K. Nishida, Light Transmissive Aligned Collagen Hydrogel for Tissue Rngineering of Corneal Stroma, The 9th Corneal Conference, Cardiff University, Wales, July 15th 2009.
- 61) S. Dong, Y. Tanaka, A. Kubota, K. Nishida, Differentiation of MSC into keratocyte, The 14th congress of Chinese ophthalmological society, September 4th 2009.
- 62) 西田幸二 : Ocular surface reconstruction with regenerative medicine 、 the 5th International Meeting for Advanced Cataract、 Seoul St. Mary's Hospital、 2009年9月24日
- 63) 稲垣絵里子、永易彩、美名口順、植田弘美、竹花一成、角膜実質細胞の培養条件の検討、第148回日本獣医学会学術集会、とりぎん文化会館、鳥取、2009年9月25日～27日
- 64) 永易彩、横井秀典、美名口順、植田弘美、竹花一成、自己集合性ペプチドゲルのブタ角膜実質細胞の培養基質としての応用、第148回日本獣医学会学術集会、とりぎん文化会館、鳥取、2009年9月25日～27日
- 65) 寺田希、永易彩、美名口順、植田弘美、竹花一成、角膜のグリコサミノグリカンの部位差、第148回日本獣医学会学術集会、とりぎん文化会館、鳥取、2009年9月25日～27日
- 66) 西田幸二 : 角膜再生医療の現状と将来、日本人類遺伝学会第54回大会、グランドプリンスホテル高輪(品川)、2009年9月26日
- 67) 西田幸二 : DSAEK、第63回日本臨床眼科学会 シンポジウム「角結膜手術の未来」、福岡国際会議場、2009年10月9-12日
- 68) 西田幸二 : 角膜移植手術の進歩、和歌山眼科集談会 特別講演、和歌山県立医科大学、2010年2月18日
- 69) 西田幸二 : 角膜の外科的治療の進歩、第6回大阪角膜フォーラム、ホテル日航大阪、2010年3月13日
- 70) 西田幸二 : 眼の再生、第9回日本再生医療学会、広島国際会議場、2010年3月19日
- 71) 田中佑治、久保田享、Thomas Duncan, 松崎典弥、Andrew J. Quantock, 八木直人、明石満、西田幸二、角膜実質代価物の作製を目指した光透過性架橋コラーゲンの線維構造と機能の制御、第9回再生医療学会、広島国際会議場、広島、2010年3月19日
- 72) 西田幸二 : 角膜の再生医療、第115回日本解剖学会総会・学術集会、岩手県水産会館、2010年3月30日

3. 新聞・テレビ等による報道

- 1) 元気！健康！フェア i n とうほく : 角膜再生治療、一定の効果 河北新報 2009年12月24日
- 2) 医療機器産業を東北に : TR 朝日新聞 2009年4月23日
- 3) 皮下に「第2の肝臓」作製で機能改善 角膜上皮の再生医療「標準的医療へ発展させる段階」 Japan Medicine 2009年3月30日
- 4) 本人の細胞から上皮と内皮 角膜再生研究を本格化 河北新報 2009年1月19日
- 5) 角膜移植 高まる技術 パーツで利用 治療法広がる 朝日新聞 2009年1月18日
- 6) 角膜再生研究 加速へ 工学分野からも研究者参加 読売新聞 2009年1月4日
- 7) 万能細胞で視力もどす 朝日新聞 2008年11月27日

- 8) 再生医療で視力回復 朝日新聞 2008年5月22日
- 9) iPSの奇跡-相次ぐ成果 情報共有へ、読売新聞、2008年3月3日
- 10) 夢へ前進 iPS細胞研究、朝日新聞、2008年2月18日
- 11) マウス iPS細胞で角膜再生へ、朝日新聞、2008年1月26日
- 12) コラーゲンで人工角膜作製、日経産業新聞、1および11面、2008年1月17日
- 13) 口腔粘膜から角膜再生、東京新聞・中日新聞、2007年12月4日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特願 2008-330579・明石満、西田幸二、松崎典弥、大道正明・積層コラーゲンゲルの製造方法、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日出願
- 2) 特開 2009-28515・西田幸二、田中佑治、久保田享・強膜透明化による角膜移植材料調製方法 日本・国立大学法人東北大学・2008年5月29日出願・2009年12月10日公開
- 3) 特願 2008-123562・西田幸二、林竜平、菊地未来、大隅典子、組織幹細胞/組織前駆細胞からの角膜内皮細胞の生成 方法 日本・国立大学法人東北大学 2008年5月9日出願
- 4) 特願 2008-071677・西田幸二、大家義則・上皮系細胞シートの作製のための同種皮膚由来フィーダー細胞 日本・国立大学法人東北大学・2008年3月19日出願
- 5) 特願 2007-33963・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日出願

- 6) 特開 PCT/JP2008/073323・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・2009年7月9日公開

- 7) 特願 2009-190415・西田幸二、林竜平、渡邊亮、田畑泰彦、木村祐・ドナー角膜内皮をゼラチンハイドロゲルシート上で培養して得られる移植用角膜内皮細胞シート及び製造方法・国立大学法人東北大学・国立大学法人京都大学・2009年8月19日出願

- 8) 特願 2009-287890・西田幸二、田中佑治、久保田享・皮膚真皮透明化による角膜移植材料調整法・国立大学法人東北大学・2009年12月18日出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分 担 研 究 報 告

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 －実用化への道筋－

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

大和 雅之 東京女子医科大学先端生命研究所 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

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3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を利用しての角膜上皮再生実用化への道筋を検討した。

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3年目にあたる本年は、今後の自家培養上皮細胞シート移植の実用化への道筋について検討を行った。

B. 研究方法

平成20年度より高度医療評価制度が創設され、未承認の医薬品・医療機器を用いた医療技術も保険

との併用の可能性が出てきた。今回は先進医療（第2項先進医療）と高度医療評価制度（第3項先進医療）のそれぞれの活用した場合の実用化の道筋について検討した。（「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）、「高度医療に係る申請等の取扱い及び実施上の留意点について」（医政発第0331021号、平成21年3月31日）

C. 研究結果

1. 先進医療（第2項先進医療）活用の場合

先進医療制度を活用した実用化は、未承認医薬品・医療機器等を使用しない新規医療技術の場合に実際的な方法である。本研究で開発中の自家培養上皮細胞シートは、自家製造では未承

認の医療機器にはあたらないため、本制度の活用が可能である。但し、先進医療は医療機関ごとに認められるものであり、申請医療施設ごとの新たな移植実績が必要であり、他施設での成果だけでは申請出来ない。また本制度を活用し、医療技術として保険収載された場合は、医療機関での細胞シート培養を含めた医療技術として認められる形になるため、将来的に自家培養上皮細胞シートを医薬品・医療機器として承認申請・製造販売をすることが難しくなる可能性がある。

2. 高度医療評価制度（第3項先進医療）活用の場合

高度医療評価制度は、薬事法による申請等に繋がる科学的評価可能なデータ収集の迅速化を図ることを目的として創設されたものであり、将来的に自家培養上皮細胞シートを医薬品・医療機器として承認申請・製造販売することに結びつきやすい。但し、製造販売する企業が見つからないなど、細胞シートが医薬品・医療機器としての承認されない状況では、移植技術を含めて保険適応にはならず、実用化が困難になるおそれがある。

D. 考察

自家培養上皮細胞シートの臨床応用において、先進医療（第2項及び第3項）として認められることの意義は非常に大きい。つまり、

1. 臨床応用を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あたり、今後の実用化の方向について検討した。これまでに実施した臨床研究の結果を利用しての実用化の道筋は大きく2つ考えられる。どちらの方法も一長一短があり、今後の状況も勘案して決定していくことになる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者 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

研究要旨

難治性角結膜疾患に対する自己培養口腔粘膜上皮細胞シート移植法の臨床試験に関するプロトコールについて、主として統計学及びデータ管理学の側面から実際の作成及び作成支援を行った。

A. 研究目的

臨床試験のプロトコール作成には、様々な専門家が関与する必要がある。難治性角結膜疾患に対する自己培養口腔粘膜上皮細胞シート移植法の臨床試験に関するプロトコール作成について、統計学及びデータ管理学の側面から実際の作成を行うとともに、プロトコール全体の作成支援を行う。

B. 研究方法

主任研究者や他の臨床試験専門家、CRCなどと議論しながら、主として統計学的事項及びデータ管理の部分についてプロトコールの実際の作成及び作成支援を行った。

（倫理面への配慮）

研究プロトコール作成にあたっては、「臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日全部改正）」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。

C. 研究結果

以下に実際に作成したプロトコールの目次の

みを示す。

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

D. 考察

本領域において、有効性に関する確立した評価項目はなく、主任研究者との議論のうえ、独自に作成したが、本研究等において、その妥当性を検討する必要がある。また、安全性の評価に関しても他の研究での指標を適用するなど、評価項目の選定には苦労を要した。今後プロトコールに従って試験が実施されることで、プロトコールの妥当性が評価できると考える。

E. 結論

本研究班が主体となって実施予定の難治性角結膜疾患に対する自己培養口腔粘膜上皮細胞シート移植法の臨床試験のプロトコールについて、主として統計学及びデータ管理学の側面から実際の作成及び作成支援を行った。

F. 研究発表

- 1. 論文発表
 - 特になし
- 2. 学会発表

特になし

G. 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における幹細胞制御に関する研究

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 ES 細胞を利用し、発生過程における 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、分化を抑制し、細胞をある metastable な分化段階に停止させることが明かとなった。この方法は、角膜上皮および角膜内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因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。

始原生殖細胞は、発生過程において、マウスでは受精後 7 日目という発生の初期において胚体外中胚葉の一部から発生してくる。近年、試験管内において、ES 細胞から生殖細胞に類似した細胞を分化誘導することが可能であると報告されており、中胚葉系の細胞および始原生殖細胞の発生過程において、どのような分子メカニズムが機能するかを解析するには、ES 細胞からの分化誘導システムが利用可能となってきた。我々は、マウス ES 細胞を OP9 ストロマ細胞と共生培養することにより、中胚葉系細胞を経て血液細胞へと分化誘導する方法を確立し、種々の解析をおこなってきた。本年度

は、この方法を用いて、中胚葉系への分化における Akt シグナルの機能解析をおこなった。

B. 研究方法

ES 細胞からの分化誘導過程において 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 ES 細胞 (Akt-MERES 細胞) 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。

ES 細胞を OP9 ストロマ細胞の上で培養し、中胚葉への分化誘導をおこない、その過程において 4OHT を添加し、Akt を活性化させることにより、Akt の細胞分化における機能を解析した。分化にどのような影響を与えるかについては、未分化細胞、中胚葉系細胞、生殖細胞、それぞれのマーカー遺伝子の発現により解析した。また、細胞の分化能については、出現した細胞のマウス精巣への移植実験により解析した。

(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

共生培養を開始する 3 日前から Akt を活性化し、OP9 細胞による分化誘導を開始した。コントロールでは、中胚葉系の細胞を経て最終的に血液細胞へと分化したのに対して、Akt を活性化した場合、球状の構造をもった細胞塊が形成され増殖してくるこ

とが明らかとなり、この細胞塊を Akt-sphere と名付けた。

Akt-sphere における遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて解析したところ、Brachyury などといった中胚葉系細胞のマーカーは発現しておらず、そのかわり、ES 細胞など多能性未分化細胞において発現している、Nanog、Oct-3/4、Sox2 などの遺伝子が発現していた。また、始原生殖細胞において強発現する遺伝子である PGC7/Stella の発現は蛋白レベルでも確認した。

さらに、中胚葉系細胞を経て発生する始原生殖細胞において発現する遺伝子についても RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、Blimp1、Prdm1、PGC7、Dnd1、Nanos3、Fragilis といった、未分化な生殖細胞特異的な遺伝子の発現が認められた。一方、より分化した生殖細胞において発現する Mvh、Mili、Sycp3、Prm1、Prm2 といった遺伝子の発現は認められなかった。

生殖細胞の発生過程においては、ヒストン修飾がダイナミックに変化することが知られており、特に、Histone 3 の 9 番目のリジンのジメチル化 (H3K9me2) の低下と 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) の上昇が認められる。Akt-sphere 細胞の解析をおこなったところ、H3K27me3 の上昇は認められたが、H3K9me2 の低下は認められなかった。このことから、Akt-sphere では、遺伝子発現は始原生殖細胞に類似しているが、ヒストン修飾は ES 細胞と類似したままであることが明らかとなった。

次に、Akt 細胞の生殖細胞への分化能を、生殖細胞を欠損する変異マウスである W/W^v マウスの精巣に移植した。その結果、内胚葉、中胚葉、外胚葉を含む奇形腫が発症した。しかし、生殖細胞への分化は認めることができなかった。

Akt-sphere の細胞を、線維芽細胞の上で、2i とよ

ばれるキナーゼ阻害剤を含むES細胞の至適培養条件に戻したところ、ES細胞と類似した細胞が出現することが明らかとなった。

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、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。他にも、胎仔骨においても滑膜由来間葉系幹細胞においても、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、すなわち、発生過程においても成体においても、PI3K/Aktシグナルは軟骨細胞分化において同様の機能を有することを明らかにしてきた。

また、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や、Aktをコンディショナルに活性化できるAkt-MERマウスを用いた解析から、PI3/Aktシグナルが、始原生殖細胞の分化を抑制し、多能性幹細胞へと脱分化させることを明らかにしてきた。

今回、さらに、中胚葉への分化誘導において、Aktシグナルは、週末細胞への分化を抑制し、生殖細胞への中間段階で分化を停止した細胞を作出すること、また、その細胞が安定的に自己複製すること、を明らかにすることができた。さらに、この細胞は、ES細胞培養の至適条件に戻すと、ES細胞と

同じ性質を持つ細胞へと脱分化することが明らかとなった。言い換えると、Aktシグナルを活性化することによって、ある細胞をmetastableな分化段階に安定的に維持できることを明らかにすることができたのである。

E. 結論

本研究では、OP9細胞上で、ES細胞から中胚葉・血液細胞への分化誘導をおこなったところ、Akt-sphereと名付けた、生殖細胞と類似した遺伝子発現をおこなう細胞を安定的に作出し、維持できることを明らかにした。生理的な条件下においては、細胞分化は一旦開始されると、終末分化まで停止することなく進行してしまう。しかし、今回のように、コンディショナルにAktシグナルを制御することにより、ある特定の未分化状態に細胞分化状態をどめておくことも可能であることを明らかにすることができた。

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、限られた数の角膜上皮の幹細胞や前駆細胞、さらには、角膜内皮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) 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 *Biochem Biophys Res Commun*, in press
- 2) 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. *Exp Hematol*. 37:334-345, 2009.

2. 学会発表

- 1) 仲野 徹：PTEN/PI3K と幹細胞、第98回日本病理学会ワークショップ、京都、2009年5月
Toru NAKANO, Regulation of Stem Cell Systems by
- 2) 仲野 徹：再生医療の現実と課題、第46回日本小児外科学会学術集会、大阪、2009年6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

角膜実質再生を目的とした配向積層型コラーゲングルの創製

研究分担者 明石 満 大阪大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

角膜疾患に対する治療法として角膜移植が行われているが、献眼不足や拒絶反応が問題となっており角膜の再生医療が望まれている。近年、細胞シートを用いた角膜上皮の再生が成果をあげている。しかしながら、大部分がコラーゲンで構成される角膜実質層の再生は、透明性と力学強度、生体適合性を併せ持つことが求められるため、世界的に未だ達成されていない。本研究では、実質層の構造を限りなく再現し、透明性と強度を併せ持つコラーゲングルの開発と臨床応用を目的とした。最終年度である本年度は、これまでの知見を基に、角膜実質層と同様の積層構造を有するコラーゲングルを調製し、透明性試験や力学強度試験、さらに家兎への移植試験を検討した。角膜実質層の再生医療に重要な知見を得ることができた。

A. 研究目的

視覚障害を持つ患者の生活の質(QOL)の改善のため、拒絶反応のない人工角膜の創出が望まれている。近年、細胞シートを用いた角膜上皮や内皮の研究が行われ培養上皮細胞シート移植の臨床応用が成果を上げている。(Nishida K. et al, N. Engl. J. Med. 2004)。

しかしながら、上皮や内皮に比べて角膜実質再生に関する研究は非常に遅れており、臨床応用可能な人工角膜実質の創製は達成されていない。角膜実質は角膜全層の中で最も厚く、角膜の90%を占め、コラーゲンを主成分とする層である。コラーゲン線維がその線維径をそろえて、一軸方向に規則正しく並び、その層に対して直行した層が積層し、200層以上の積層構造(ラメラ構造)を構築することで高い透明性と、物理的強度を保持していると言われている。このため、上皮や内皮のように細胞シートを応用することは難しい。

コラーゲンや合成高分子のゲルを人工実質層として移植する試みが研究されているが、力学強度不足により安定に縫合できず、移植後に脱落してしまうということが問題となっている。有効な人工実質層は国際的にも未だ開発されていない。

人工角膜実質層としてもっとも研究が進んでいるのは、カナダの M. Griffith らの高濃度コラーゲングルを用いる手法 (*Science* 1999, *IOVS* 2006) であるが、角膜実質のラメラ構造を構築できておらず、物理的強度は低い。また、コラーゲン以外にも合成高分子であるポリ 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (PHEMA) やポリメチルメタクリレート (PMMA)、感熱応答性高分子であるポリ N-イソプロピルアクリルアミド (PNIPAAm) のゲルを人工実質層として用いる研究が報告されている。さらに、国内では、東京医科歯科大学の岸田教授らによるブタ角膜の脱細胞化組織を用いる手法や、北海道大学と物質・材料研究機構の共同研究による魚のウロコ

を人工実質として用いる方法が報告されている。しかし、透明性と移植時の縫合や眼圧に耐えうる物理的強度を有し、安全かつ高機能のコラーゲンマトリックスは未だ開発されておらず、実用化には至っていない。

そこで、本研究では、コラーゲンを架橋する際にゲル中のコラーゲンを配向させて積層することで、角膜実質類似の層状構造を再現し、生体角膜実質と同程度の透明性と強度、物質輸送能などを保持した高機能のコラーゲンマトリックスを創製することを目的とした。

これまでの研究成果より、コラーゲン分子が一軸方向に配向したコラーゲンゲルを調製できることを見出した。また、ランダム配向ゲルと比較して高い力学強度と透明性を有していることも確認している。本年度は、コラーゲン分子が直行方向に配向した積層コラーゲンゲルの調製を試みた。また、得られた積層ゲルの力学強度や透明性を評価し、家兔角膜への移植試験を行った。

B. 研究方法

10wt%のブタ皮膚由来 Type I アテロコラーゲン(日本ハム株式会社)を50mM, pH4.0の酢酸バッファーに溶解し、1NのNaOHで(pH 3.5~4.0)に縮合剤の1-ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl)carbodiimide (EDC)とカルボキシルキ活性剤のN-hydroxysuccinimide (NHS)を混合した水溶液(EDC/NHS濃度比 2/1)を架橋剤として添加し、反応液を調製した。コラーゲン分子を配向させるため、シリンジを用いて反応液を一定方向にガラス基板上に押し出し、もう一枚のガラス板で挟み、25°Cで24時間ゲル化した。このようにして分子配向を制御したゲルの上に、新たなゲルを直交するように配向させて積層した。この操作を複数回繰り返すことによって、分子配向を制御した積層化ゲルを作製し

た。

作製したゲルの力学特性を解析するため、引張試験(SIMAZU 製 EZ-test)を用いて引張り強度測定を行った。また、紫外-可視分光スペクトル測定より得られたゲルの透明性を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験への配慮に関して:本研究における動物実験は、各大学に附属する動物実験施設、またはその管理下にある別施設にて行い、すべて「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」を遵守しておこなった。すべての動物実験は、各施設の動物実験の倫理性、妥当性に関する審査委員会の承認を得た実験計画書にもとづき、これを遵守しておこなった。

臨床研究に関して: 該当なし。

被検者の同意の取得、プライバシーなど:

該当なし

C. 研究結果と考察

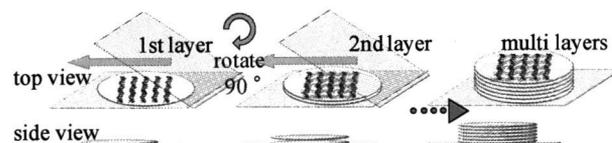


Fig. 1. Schematic illustration of layered collagen gels with oriented collagen molecules.

積層コラーゲンゲルの作製方法をFig. 1に示した。本手法により、一軸方向にコラーゲン分子が配向したゲルを積層することが可能であり、得られたゲルのコラーゲン分子の配向は、交互に直交することになる。ゲルの全体の厚さを600µmで一定にし、スペーサーのシリコンラバーの厚さを変えることで、1-4層のコラーゲンゲルが得られた。得られたゲルの写真をFig. 2に示した。作製したゲルは全て透明性に優れており、層数や1層の厚さには依存していないことが確認された。透明性をより定量的に評

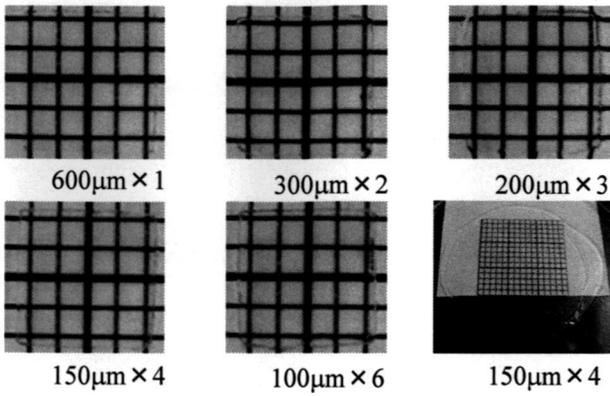


Fig. 2. Photographs of the obtained layered collagen gels with various collagen gel layers. Total thickness was fixed as a 600 μm , and thickness of each layer was adjusted to obtain the 600 μm of total thickness.

価するため、紫外-可視分光スペクトル測定にて 450-700 nm の透過度を測定した (Fig. 3)。層数の増加に応じて透過性が若干低下する傾向であったが、どのゲルも 60%以上の高い透過度を有しており (500-700 nm にて)、特に 3 層以下のゲルにおいては 75%以上の高い透過度を示した (700 nm にて)。

ゲルの層数が力学強度へ与える影響を調べる目的で引っ張り試験を行った (Fig. 4)。600 μm の 1 層のゲルは 25g-force であったが、層数の増加に伴い強度が増加する傾向となり、150 μm のゲルを 4 層積層したゲルでは 48.4g-force という最も高い値を示した。これは、従来報告されているコラーゲンゲル (28g-force, M. Griffith et al., *Biomacromolecules* 2006) と比較して 1.7 倍以上の高い強度であった。

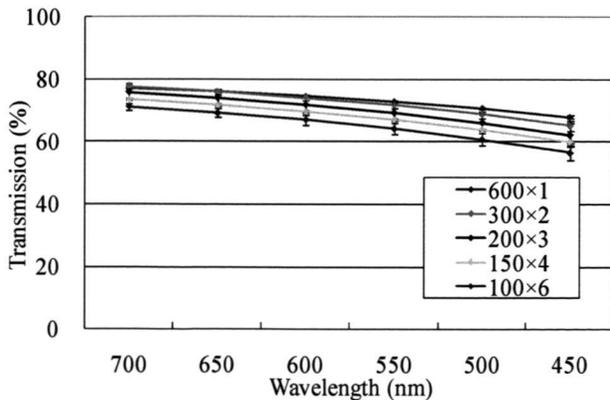
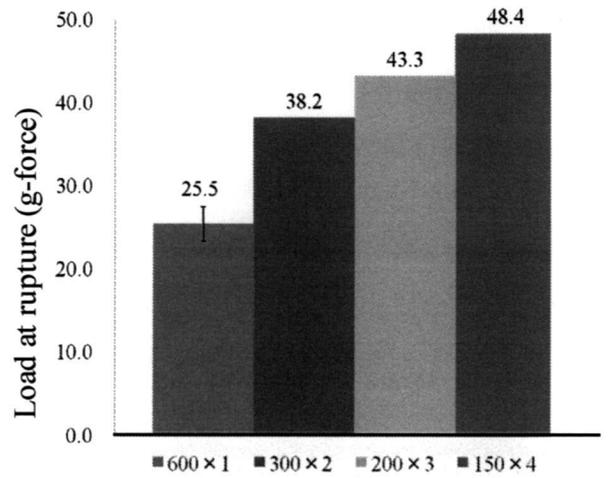


Fig. 3. Transmission of the layered collagen gels

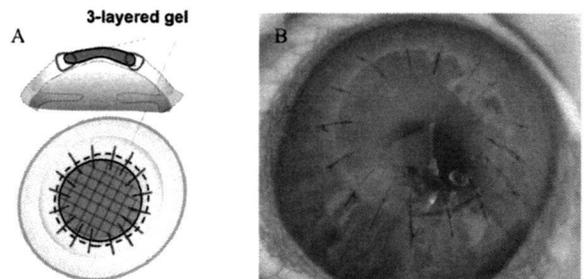


measured by UV-vis spectroscopy.

Fig. 4. Tensile mechanical properties of the layered collagen gels.

以上より、配向積層ゲルを直交配向して積層することで、透明性を維持したまま力学強度を上げることが可能であった。そこで、本積層コラーゲンゲルが移植可能であるか検討するため、家兎角膜への表層角膜移植を試みた (Fig. 5)。

家兎表層を剥離し、円形に打ち抜いた 3 層ゲルを移植し、縫合した。移植後において炎症や脱離などは確認されず良好であった。今後、再現性や長期的



な安定性、上皮層の形成など評価する予定である。
Fig. 5. Schematic image and photograph of transplantation of the 3-layered collagen gel onto rabbit cornea.

D. 結論

コラーゲン分子の一軸配向制御と積層法を組み合わせることで、透明かつ高強度のコラーゲンゲル

を作製することに成功した。このゲルは従来報告されている人工実質用のコラーゲンゲルと比較して高い力学強度を有しており、家兎への移植試験に耐えうることが確認された。長期的な安定性や再現性を今後十分に評価する必要があるが、生体適合性に優れたコラーゲンゲルで縫合と移植に耐えうる人工実質は、世界に初めての成果であると考えられる。

本研究により、角膜実質の再生医療のための重要な知見と成果を得ることができた。得られた研究成果を基に、角膜実質層の再生医療研究を推進していく次第である。

3. その他

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 本郷千鶴, 松崎典弥, 田中佑治, 久保田享, 西田幸二, 明石満, 角膜実質再生医療へ向けたラメラ構造を有するコラーゲンゲルの創製, 第25回日本医工学治療学会, 大阪国際会議場, 大阪, 2009年4月10日~12日.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) PCT/JP2008/073323, Mitsuru Akashi, Kohji Nishida, Michiya Matsusaki, Chizuru Hongo, Yuji Tanaka, Akira Kubota, Method of preparing layered collagen gel and layered collagen gel, PCT 出願・国立大学法人大阪大学、国立大学法人東北大学・2008年12月22日.

2. 実用新案登録

なし

角膜実質の再生医療技術の開発に関する研究

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

角膜の再生医療技術の中でも特に開発の遅れている角膜実質に焦点を当て、その技術確立を目的とした。その結果、角膜実質の部位ごとの構造特性を明らかにし、人工角膜実質の作製には、生体の角膜の部位ごとの構造特性を十分に考慮する必要性が確認された。また、細胞移植のための角膜実質細胞の最適な培養法も提示した。さらに、動物由来の基質成分に代わる安全な材料としての自己集合性ペプチドゲルの検討を行い、角膜実質の基質成分として代わりうる可能性を持つことを明らかにした。これらの結果は、角膜実質の再生医療技術の確立につながるものであり、さらには、人工角膜の開発上の一助になるものと考えられる。

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。角膜の再生医療のうち、角膜実質はその強度や透明性が重要であり、培養法の検討、基質の素材自体の検討、細胞の供給源、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。そのため実質の再生医療技術は、上皮や内皮の再生医療技術の開発より遅れている。

そこで、実質の再生医療技術の確立のために、まず組織の構造特性をイヌとブタの角膜を用いて明らかにした。さらに、角膜実質細胞の培養法の検討として、表現型を維持し、増殖性を高める培養条件を検討した。また、基質成分の検討として動物由来の基質成分に代わる安全な材料として自己集合性ペプチドの有用性を評価した。

B. 研究方法

角膜実質の構造特性の解析

ビーグル犬の角膜の中央部と辺縁部を透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、観察した。そして、角膜実質のコラーゲン層数ならびに層の厚さ、コラーゲン細線維の直径ならびにコラーゲン細線維占有率 (CFI) を求め、比較した。また、ブタ角膜を用いて、角膜中央部と辺縁部のコラーゲン分子種の比率、プロテオグリカンの相対比、グリコサミノグリカンの構成比を解析し、比較した。

角膜実質細胞の培養法の検討

ブタ角膜から角膜実質細胞を分離した。そして、無血清培養液 (Keratinocyte serum-free medium (Invitrogen, U. S. A.)) に添加剤として FBS、アスコルビン酸、インスリンを単独あるいはアスコルビン酸とインスリンを複数添加した。生細胞数をテトラゾリウム塩溶液 (Cell Counting Kit-8 ; 同仁化学研究所、熊本) で評価し、培養 1 日目の値を 100% として増殖率を求

めた。さらに、培養細胞の形態を位相差顕微鏡ならびに SEM で観察し、RT-PCR にて角膜実質細胞のマーカーである ALDH とケラトカン、筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA の発現を評価し、リアルタイム RT-PCR にてコラーゲン分子の産生能を評価した。

自己集合性ペプチドの基質成分としての検討

中性の pH でネット電荷 0 となる RADA(0) と本実験で新たに設計した中性の pH でネット電荷がプラスになる KE(+) およびマイナスになる KE(-) を合成した。まず、ペプチドのハイドロゲル化の検討を行い、さらに形成されたゲルを走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。次に、0.5% の各電荷の自己集合性ペプチドゲル上で、マウスの線維芽細胞である NIH3T3 細胞を培養し、培養の足場材料としての有用性の検討を行い、さらに分離したブタ角膜実質細胞を培養し、角膜実質の基質成分としての有用性も検討した。対照としてアテロコラーゲンゲル上と培養プレート上でも同様に培養を行った。

C. 研究結果

角膜実質の構造特性の解析

角膜全層の厚さは角膜中央部の方が辺縁部に比べ有意に薄く、実質の厚さは角膜中央部、辺縁部ともに角膜全層の厚さの高い割合を占めていた。実質を構成するコラーゲン細線維の直径および CFI は中央部の方が有意に小さな値をとり、コラーゲン層数およびに厚さに有意差は認め

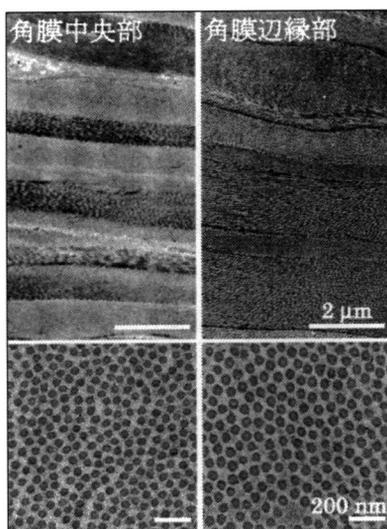


図1 コラーゲン層およびコラーゲン細線維の部位差

られなかった。しかし、コラーゲン層の厚さは中央部のほうが薄い傾向がみられた (図 1)。I 型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖と V 型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖の比率は角膜中央部で 75 : 25、角膜辺縁部で 76 : 24 であった。プロテオグリカンの相対比は、デコリンは角膜中央部 : 角膜辺縁部が 1 : 0.64、ルミカンは角膜中央部 : 角膜辺縁部が 1 : 0.74 と、いずれも角膜中央部の方が多かった。グリコサミノグリカンの構成比はケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸の順に、角膜中央部で 48.9、39.7、11.4%、角膜辺縁部で 58.8、17.8、23.4% であった。

角膜実質細胞の培養法の検討

添加剤の単独添加実験において、細胞の増殖率は FBS の単独添加が最も高く、次いで 20 μ g/mL アスコルビン酸添加であった。複数添加実験において、細胞の増殖率はいずれの培養条件においても 20 μ g/mL アスコルビン酸の単独添加と比べ低かった (図 2)。20 μ g/mL アスコルビン酸のみ添

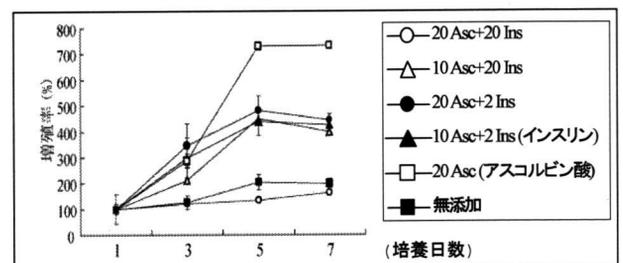


図2 添加剤の複数添加とアスコルビン酸単独による細胞増殖率の比較

加し、5 日間培養した角膜実質細胞は樹枝状で、細胞質突起同士で結合し網目状の構造を形成した。また、角膜実質細胞のマーカーである ALDH とケラトカンの発現が認められ、筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA は発現しなかった。さらに、アスコルビン酸添加により I 型コラーゲン分子および V 型コラーゲン分子の mRNA の発現量は無添加に比べそれぞれ約 2.9 倍、約 2.1 倍と、増加傾向を示した。

自己集合性ペプチドの基質成分としての検討