

ハイドロゲル化の検討のためペプチド溶液を急速に中性化すると、KE(+), KE(-)は透明なゲルを形成したが、RADA(0)はゲルを形成しなかった。RADA(0)は NaOH と溶媒置換により徐々に中性化すると透明なゲルを形成した。細胞培養において、培養1日目のNIH3T3細胞数は培養プレート上に比べKE(+), KE(-)ゲル、アテロコラーゲンゲル上で有意に少なかったが、全ての足場上で日数依存的に増加した。RADA(0)ゲル、KE(+)

ゲル上のみ有意に少なく、細胞は接着しなかった(図3)。角膜実質細胞

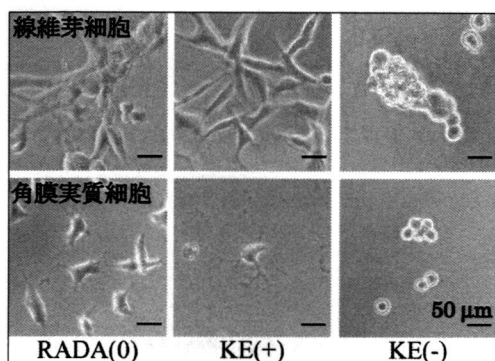


図3 培養5日目の細胞形態の比較

数はアテロコラーゲンゲル上および培養プレート上では顕著に増加し、RADA(0)ゲル上ではわずかに増加した。KE(+), KE(-)ゲル上では増加せず、KE(-)ゲル上で顕著に減少した。5日目の角膜実質細胞はRADA(0)およびアテロコラーゲンゲル上では樹枝状を示し、KE(+), KE(-)上では分岐の多い細胞質突起をもつ細胞が観察された。

D. 考察

角膜実質を構成するコラーゲン細線維の直径およびCFIの違いにより中央部の方がコラーゲン層の厚さが薄くなり、結果として、角膜全層の厚さも中央部の方が薄くなっていた。コラーゲン細線維の違いはルミカンやデコリンなどの小型ロイシンリッチプロテオグリカンの量の

違いによるものと考えた。すなわち、コラーゲン細線維の径による特性およびグリコサミノグリカンの種類や分布と組織の特性の関連性から、眼球最前面に位置する角膜中央部は眼内圧を直接受けるため、細いコラーゲン細線維を多く分布させることで、受ける圧力を緩衝し、さらに、コンドロイチン硫酸を多くすることで弾力性を高め、圧力に対して形態を維持していると推察した。一方、角膜より強靱な強膜に隣接する角膜辺縁部では太いコラーゲン細線維を多く分布させ、そして角膜全層の厚さも増加させることで剛性を高め、さらに、デルマタン硫酸を多くすることで、強膜からの張力に対する抵抗力を持たせると推察した。よって、角膜実質の部位ごとの構造特性を明らかになり、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。

角膜実質細胞の培養法の検討から、アスコルビン酸とインスリンを両方添加しても細胞増殖に対する相加・相乗作用は認められず、20 μg/mLアスコルビン酸の単独添加が最も優れた条件であった。さらに、この培養条件の角膜実質細胞の細胞形態観察やRT-PCRの結果、角膜実質細胞の表現型が維持されていた。また、リアルタイムRT-PCRの結果、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。以上のことから、20 μg/mLアスコルビン酸を添加した無血清培養が角膜実質細胞の表現型を維持し、細胞の増殖やコラーゲン合成を高める最適な培養条件であることが明らかになった。

自己集合性ペプチドの基質成分としての検討により、中性下で安定したゲルを形成するKE(+), KE(-)の方がRADA(0)よりも細胞の三次

元培養を行う際には有用であると考えた。次に、KE(-)ゲル上では培養細胞は伸展した状態で接着しなかったことから、細胞の足場材料を設計、選択する上で足場の電荷も考慮する必要性が示唆された。また、RADA(0)ゲルと KE(+)ゲル上ではアテロコラーゲンゲル上よりも線維芽細胞がより伸展、接着し、増殖していたことから、この2種のゲルは線維芽細胞の増殖に適した足場材料であることが明らかとなった。しかし、角膜実質細胞は RADA(0)ゲルおよび KE(+)ゲル上で活発な増殖を示さなかったが、培養プレート上よりも *in vivo* の角膜実質細胞に近い形態を示す表面構造および硬さの足場であることが示唆された。すなわち、KE(+)ゲルのような中性下でプラスの電荷を持つ自己集合性ペプチドのハイドロゲルは、角膜実質細胞を生体へと移植するキャリアとしても有用と考えられ、さらに改良することで、角膜実質の基質成分として応用が十分可能であることが示唆された。

角膜実質の再生医療技術の開発に関する本研究は人工角膜の開発上の一助になるものと考え

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Nagayasu, A., Hirayanagi, T., Tanaka, Y., Tangkawattana, P., Ueda, H. and Takehana, K. 2009. Site-dependent differences in collagen lamellae in the corneal substantia propria of beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 1229-1231.

2. 学会発表

1) 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

2) 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

3) 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

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

培養角膜内皮シートキャリアの開発

研究分担者 田畑 泰彦 京都大学再生医科学研究所 教授

研究要旨

重篤な角膜疾患に対して、現在、角膜移植が実施されているが、わが国では献眼数は絶対的に少なく、また他家組織による拒絶反応のため角膜移植が奏功しない。本研究では、自家細胞と人工材料からなる、免疫抑制剤の必要としない安全で有効な全層性再生角膜を作製する技術を創出し、その臨床応用の実現化を目指す。本年度は、臨床使用されているゼラチンを熱脱水処理により化学架橋を行い、透明性の高いゼラチンハイドロゲルシートを作製した。このハイドロゲルシート上での家兎角膜内皮細胞の細胞接着および進展性を評価した。

A. 研究目的

視覚はQOLの維持に極めて重要である。角膜疾患のため重篤な視覚障害にいたって失明した患者に対して、現在角膜移植が実施されている。しかし、現在の角膜移植は献眼に依存しており、その献眼数は絶対的に少なく、多くの患者に対し直ちに移植手術を行うことは困難である。さらに、ステュ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。本申請では、自家細胞と人工材料を用いて全層性再生角膜を作製する技術を創出し、あらゆる角膜疾患に対して適応可能な、免疫抑制剤を必要としない安全性の高い、有効な角膜再生治療法を開発を行い、3年以内に臨床応用を実現化することを目的とする。高齢化が進んでいる中、失明予防と視機能回復によりQOLの維持と向上を達成できる本事業は、国民の福祉増進と感覚器障害者の社会復帰に大きく貢献できると考えられる。

申請者はこれまで患者自身の角膜ないし口腔粘膜上皮の幹細胞を用いた培養上皮細胞シート移植

の開発とその臨床応用に世界に先駆けて成功し、難治性角膜上皮疾患の根治的治療法の道を開いた（Nishida K et al, N Engl J Med 2004）。しかしながら早期の臨床応用には課題もあり、角膜上皮、角膜実質、角膜内皮それぞれの再生医療技術の開発と臨床応用に関する更なる研究が望まれている。

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

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

3年計画の2年目は、1年目で得られた知見をもとに、ヒト角膜内皮細胞の培養、移植基材としての生体内吸収性シートの作製条件の最適化を行った。1年目でよい透明性が確認されたものの、細胞接着が不良であったヒアルロン酸に対して種々の細胞接着因子を加えたものを作製した。作製したシートに細胞を播種して、接着性および進展性について評価を行ったが、期待通りの改善は得られなかった。そこで、最終年度においては、シート素材の選択を行い、臨床使用されているゼラチンからなる架橋ハイドロゲルシートを作製した。作製時の架橋条件を変えることによって、分解吸収性の異なるゼラチンハイドロゲルシートを作製、細胞の接着性と増殖性について検討した。

B. 研究方法

5%のゼラチン（ブタ皮膚のアルカリ処理により調製、新田ゼラチン株式会社製、重量平均分子量100,000）をポリプロピレンシャーレに流延、室温下で静置して乾燥させることで、シートを得た。これを160°Cで減圧下、6、12、24、48、および72時間、熱脱水処理を行うことで、ゼラチンの化学架橋を行った。この架橋ゼラチンハイドロゲルシートをエチレンオキサイドガスによる滅菌を行い、細胞のキャリアシートとしての特性を評価した。ゼラチンハイドロゲルシートをフィブロネクチン水溶液に37°Cで30分間、浸漬した後、リン酸緩衝生理食塩水溶液（PBS、pH 7.4）でリンスしたものあるいはフィブロネクチン水溶液をシート表面にぬりつけたものを作製、細胞培養実験に用いた。用いた細胞は、家兎角膜内皮細胞であり、その接着と増殖を検討した。比較対照として、アテロコラーゲンシートを用いて同様の実験を行った。

C. 研究結果

ゼラチンハイドロゲルシートの厚みは35～50 μmであり、この範囲内のゼラチンハイドロゲルシートはアテロコラーゲンと同様に培養基材として十分な強度をもっていた。

次に、各シート上における角膜内皮細胞の接着および進展を調べた。その結果、160°Cで24時間、架橋処理を行ったゼラチンハイドロゲルシート上で角膜内皮細胞の接着は良好であり、フィブロネクチン水溶液を表面にぬりつけたシートに関しては、よりよい細胞の接着と進展が認められた。ハイドロゲルシートのフィブロネクチン水溶液への浸漬処理では、ぬりつけ処理に比べて、細胞進展増強は認められなかった。細胞播種後4日までに、細胞は進展し、また、フィブロネクチンぬりつけにおいて、よりよい細胞進展が見られた。培養5日以降において、ハイドロゲルシートは融解せず、存在していた。比較対照として用いたアテロコラーゲンシート上では、ゼラチンハイドロゲルシートと同様の細胞接着および進展性が認められ、少なくとも培養後14日間ではシートの融解は観察されなかった。次に、角膜内皮細胞の機能に必須である細胞間密着結合（tight-junction）を確認するため、tight junction protein ZO-1による免疫染色を実施した。その結果、ゼラチンハイドロゲルシートとアテロコラーゲンシートともに、角膜内皮細胞間に明瞭なZO-1発現が確認された。14日間の培養後には、ゼラチンハイドロゲルシートは透明性を維持していたが、アテロコラーゲンシートではシートの不透明化が観察された。なお、ゼラチン架橋のための熱脱水処理時間の短いゼラチンハイドロゲルシートでは、フィブロネクチン処理にもかかわらず、細胞の接着が悪く、また、処理時間の長い場合には、分解性が悪く、角膜内皮細胞シートキャリアとしての性質に問題となる場合があるように考えられた。

D. 考察

過去 2 年間に用いたヒアルロン酸シートは、厚み、架橋作製法、フィブロネクチン処理などによっても、よい細胞接着性は得られなかった。これに対して、ゼラチンハイドロゲルシートは、透明性と細胞接着、進展性の点からすぐれていることがわかった。これまで、この目的によいと考えられてきたコラーゲンシートに比べても、劣ることのない細胞接着性と進展性を示した。かつ、上皮細胞に重要である細胞間密着結合も確認され、コラーゲンシートで問題となっていた不透明性も解決することができた。

ゼラチンハイドロゲルシートの架橋熱脱水処理時間が細胞の接着、進展性に大きく影響することがわかった。最近、細胞の接着と増殖に基材の軟らかさが関係していることが報告されている。軟らかい基材上では、硬い基材に比べて、細胞の接着が悪いことが知られ、その傾向は上皮細胞では強調される。熱脱水処理時間が短い場合には、ゼラチンハイドロゲルの架橋度が低く、ハイドロゲルは軟らかい。今回の実験においても、この基材の軟らかさが、角膜上皮細胞の接着の悪さの原因であると考えられる。逆に、硬いハイドロゲルでは、細胞の接着と進展はよいものの、分解性の遅いことが気になる点である。角膜上皮細胞キャリアシートとしての性質の 1 つに、ある時間、すなわち上皮細胞シートが完成、細胞外マトリクス分泌も正常となった後には、キャリアは分解吸収されることが好ましいと考えられる。この観点から、ゼラチンハイドロゲルシートの分解性、つまり架橋度の最適化が今後は必要となるであろう。

臨床使用されているゼラチン素材を用いて新規キャリアシートの開発を行ったところ、透明性、強度、角膜内皮細胞の接着、進展も良好であった。アテロコラーゲンと比較した場合も、培養後にシートの不透明化が起きないために、内皮シートキャリア

として用いた場合に、術直後から良好な角膜透明性が得られることが期待される。一方で、角膜内皮細胞を培養後において、ZO-1 発現がアテロコラーゲンシート上と同様であった。今後、シートの分解性に関する条件を動物実験により最適化していくことが重要である。

E. 結論

熱脱水処理により作製したゼラチンからなる生体吸収性シートを作製し、その培養基材としての機能評価を行った。ゼラチンハイドロゲルシートについては、十分な透明性と薄さを持ち、良好な操作性を保っていることを確認した。さらに、角膜内皮細胞の接着、進展も良好であった。また、内皮細胞で重要となる細胞間密着結合も観察された。さらに、これまでのゴールドスタンダードであったコラーゲンシートで問題となっていた培養時でのシートの不透明化も見られず、ゼラチンハイドロゲルシートは、角膜内皮細胞キャリアシートとして優れていることがわかった。今後は、動物実験を通して、ゼラチンハイドロゲルシートの分解性についての最適化が必要となると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

3. 新聞・テレビ等による報道

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

知的財産に関する一覧表

発明の名称	出願場号	出願日	発明者	出願人
皮膚真皮透明化による角膜移植材料調整法	特願2009-287890	2009年12月18日	西田幸二 田中佑治 久保田享	国立大学法人東北大学
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	特願2009-190415	2009年8月19日	西田幸二 林竜平 渡邊亮 田畑泰彦 木村祐	国立大学法人東北大学 国立大学法人京都大学
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	特願2008-330579	2008年12月25日	明石 満 西田幸二 松崎典弥 大道正明	国立大学法人大阪大学 国立大学法人東北大学
強膜透明化による角膜移植材料調製方法	特願2008-141043	2008年5月29日	西田幸二 田中佑治 久保田享	国立大学法人東北大学
組織幹細胞/組織前駆細胞からの角膜内皮細胞の生成	特願2008-123562	2008年5月9日	西田幸二 林竜平 菊地未来 大隅典子	国立大学法人東北大学
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	特願2008-071677	2008年3月19日	西田幸二 大家義則	国立大学法人東北大学
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	特願2007-339635	2007年12月28日	明石満 西田幸二 松崎典弥 田中佑治 久保田享	国立大学法人大阪大学 国立大学法人東北大学

発明の名称	出願場号	公開日	発明者	出願人
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	特開PCT/JP2008/073323	2009年7月9日	明石 満 西田幸二 松崎典弥 大道正明	国立大学法人大阪大学 国立大学法人東北大学
強膜透明化による角膜移植材料調製方法	特開2009-28515	2009年12月10日	西田幸二 田中佑治 久保田享	国立大学法人東北大学

研究班会議に関する報告書

厚生労働省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」班

(H19-再生-一般-001)

平成 21 年度第 1 回班会議

プログラム

日時：平成 21 年 6 月 23 日（火）14：00 － 17：00

場所：ホテルメトロポリタン仙台

研究代表者

西田 幸二

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

事務局（景山智文、田中知佳）

〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1

TEL：022-717-7294（医局）

FAX：022-717-7298

プログラム

- 14:00-14:10 開会挨拶
座長:西田 幸二 (東北大)
司会:横倉 俊二 (東北大)
- 14:10-15:30 研究経過報告および今後の研究計画
(14:10-14:30) 研究全体の総括
西田 幸二 (東北大)
- (14:30-14:50) 角膜上皮再生プロジェクト
大家 義則 (東北大)
- (14:50-15:10) 角膜実質再生プロジェクト
久保田 享 (東北大)
- (15:10-15:30) 角膜内皮再生プロジェクト
林 竜平 (東北大)
- 15:30-15:45 休憩
- 15:45-16:30 グループミーティング
「角膜上皮再生グループ」
西田 幸二 (東北大)、仲野 徹 (大阪大)、大和 雅之 (東京女子医科大)、山口 拓洋 (東京大)、嶋澤 るみ子 (東北大)、田中 祐次 (東京大)、井上 恵美 (東北大)、横倉 俊二 (東北大)、高柳 泰 (東北大)、櫻井 美晴 (東北大)、上松 聖典 (東北大)、大家 義則 (東北大)、檜森 紀子 (東北大)、萩原 邦恵 (東北大)、牟 式魯 (東北大)、周 慶軍 (東北大)
- 「角膜実質再生グループ」
明石 満 (大阪大)、竹花 一成 (酪農学園大)、久保田 享 (東北大)、松崎 典弥 (大阪大学)、永易 彩 (酪農学園大)、田中 佑治 (東北大)、石 棟 (東北大)、トーマス・ダンカン (東北大)、佐々木 優香 (東北大)
- 「角膜内皮再生グループ」
田畑 泰彦 (京都大)、林 竜平 (東北大)、菊地 未来 (東北大)、渡邊 亮 (東北大)、高野 良真 (東北大)、景山 智文 (東北大)
- (*二重線-司会、単線-書記)
- 16:30-17:00 全層再生に関するフリーディスカッション
- 17:00 閉会挨拶

出席者名簿

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

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)

明石 満 (大阪大学大学院工学系研究科応用化学・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・教授)

大和 雅之 (東京女子医科大学先端生命研究所・教授)

竹花 一成 (酪農学園大学獣医学部獣医解剖学・教授)

田中 祐次 (東京大学医科学研究所探索医療ヒューマンネットワーク部門・特任助教・上先生代理)

山口 拓洋 (東京大学大学院医学系研究科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・審査・評価部門・准教授)

研究協力者 (研究代表者/研究分担者随伴)

松崎 典弥 (大阪大学大学院工学系研究科応用化学・助教・明石先生随伴)

永易 彩 (酪農学園大学獣医学部獣医解剖学・大学院生・竹花先生随伴)

高柳 泰 (東北大学未来医工学治療開発センター・助手・嶋澤先生随伴)

井上 恵美 (東北大学未来医工学治療開発センター・助手・山口先生随伴)

横倉 俊二 (東北大学眼科・助教)

久保田 享 (東北大学眼科・助教)

上松 聖典 (東北大学眼科・助教)

林 竜平 (東北大学眼科・助教)

菊地 未来 (東北大学眼科・大学院生)

田中 佑治 (東北大学眼科・大学院生)

大家 義則 (東北大学眼科・大学院生)

渡邊 亮 (東北大学眼科・大学院生)

櫻井 美晴 (東北大学眼科・大学院生)

高野 良真 (東北大学眼科・大学院生)

石 棟 (東北大学眼科・大学院生)

檜森 紀子 (東北大学眼科・大学院生)

景山 智文 (東北大学眼科・研究生)

トーマス・ダンカン (東北大学眼科・研究生)

萩原 邦恵 (東北大学眼科・研究員)

牟 式魯 (東北大学眼科・研究員)

周 慶軍 (東北大学眼科・研究員)

佐々木 優香 (東北大学眼科・技能補佐員)

以上 31 名

「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」班

(H19-再生-一般-001)

平成 21 年度第 1 回班会議

議事録

出席者：東北大学：西田幸二、嶋澤 るみ子、横倉 俊二、久保田 享、林 竜平、菊地 未来、櫻井 美晴、渡邊 亮、田中 佑治、劉 孟林、大家 義則、高野 良真、石 棟、景山 智文、牟 式魯、佐々木 優香、高柳 泰、井上 恵美、上松 聖典、檜森 紀子、萩原 邦恵、牟 式魯、周 慶軍、石 棟、トーマス・ダンカン

東京女子医大学：大和雅之

東京大学：山口 拓洋、田中 祐次

大阪大学：明石 満、仲野 徹、松崎 典弥

京都大学：田畑 泰彦

酪農学園大学：竹花 一成、永易 彩

日時：平成 21 年 6 月 23 日（火） 14：00～17：00

場所：ホテルメトロポリタン仙台

書記：大家義則、田中佑治、景山智文

角膜上皮再生グループ

● 角膜上皮再生プロジェクトに関する発表

平成 20 年度までの成果として、新規プロセッシング方法の開発、上皮細胞シートの造腫瘍性試験、多施設臨床研究の準備として東北大学未来医工学治療開発センターでの CPC の準備、GCP 準拠の臨床プロトコルの作成、上皮細胞シートの手術前評価法の確立、フィーダー細胞(3T3J2 細胞)の準備を行った。

今後の展望としては、①臨床研究の開始、②培養細胞シート輸送法の最適化、③臨床プロトコルの最適化、④患者データベースの作成とデータ管理が挙げられる。

● 分担研究員の課題

新規フィーダー細胞の探索（脂肪由来細胞、皮膚線維芽細胞）：西田

新規プロセッシング方法の開発：西田・大和

非臨床安全性試験：西田・嶋澤

臨床プロトコルの作成：西田・上（代：田中）・山口・嶋澤

臨床研究：西田

- 実現化に向けての課題

- ▶ 多施設臨床研究へ向けての準備

東北大、阪大、東大、長崎大、愛媛大での多施設臨床研究を考えている。各施設で倫理委員会での審査を受けた後、総合してヒト幹細胞指針へ提出する必要がある。

- ▶ 培養法の検討

ウイルスバリデーションが取れた 3T3J2 細胞を使用するので、フィーダー細胞との接触による共培養系が可能である。カルチャーインサートでの共培養系と合わせて検討する予定。

- ▶ 3T3 細胞の残存に関する問題

3T3J2 細胞を用いて dish 上で培養した場合は、培養細胞シートにおける 3T3 細胞の残存量を決定する必要があると考えられる。

- ▶ 培養上皮細胞シートの製造について

最終的には企業に上皮細胞シートの作製を依頼することを検討する。

角膜実質再生グループ

- 角膜実質再生プロジェクトに関する発表

主にこれまでに研究を進めてきた架橋コラーゲンゲルを中心とした角膜実質代価物作製方法とその移植に関する研究の進行状況を報告した。H19年度までに開発した積層ゲルの課題を克服するため、架橋条件や混合物の選択や混合条件を検討した。しかしながら架橋剤濃度の削減や物質透過性、細胞増殖性等の改善を示唆するデータは得られたが、課題とされる力学特性の大幅な改善は現段階まででは得られていない。そこで無縫合移植法を新規に考案して家兎表層角膜移植に1例成功した。安定性等に課題があり、臨床応用には改良の余地がある。また、他組織の利用に関する研究の進行状況や細胞を中心とした角膜再生治療法に関する研究の進行状況についても紹介した。

今後の展望としては、①最適な作製条件の探索および添加物の検討、②新規作製法の開発、③物性評価（線維構造、物質透過性、可視光透過性、力学特性）、④移植方法の開発および家兎移植による有効性評価、⑤ヒトコラーゲンを用いての作製条件の検討、⑥他組織を用いた角膜実質再生技術の開発、⑦細胞を用いた再生治療法の開発が挙げられる。

- 分担研究員の課題

最適な作製条件の探索および添加物の検討：西田・明石・竹花

新規作製法の開発：西田・明石

物性評価（線維構造、物質透過性、可視光透過性、力学特性）：西田・竹花・明石

移植方法の開発よび家兎移植による有効性評価：西田・竹花

ヒトコラーゲンを用いての作製条件の検討：西田・明石

他組織を用いた角膜実質再生技術の開発：西田

細胞を用いた再生治療法の開発：西田・竹花

- 実現化に向けての課題

- ▶ 架橋ゲルの力学特性。

架橋条件と添加物導入を検討したが、現段階まででは透明性を維持したまま力学特性を大きく向上させる条件は見出せていない。

- ▶ 無縫合ゲル移植の脱落や上皮の生着性の悪さ。

物質透過性と表面接着性の改善が必要。また、移植部分の保護に関する処置法の検討も必要。

- ▶ 細胞のマイグレーション

細胞が移植片に入っていないことに関して具体的な問題点は生じていないが、将来的に課題となる可能性がある。

角膜内皮再生グループ

- 東北大学・角膜内皮再生プロジェクトに関する発表

角膜移植対象疾患の約 80%が角膜内皮疾患であるが、現在、角膜内皮の再生医療は実用化されていない。そこで本プロジェクトでは、患者自身からも安全に採取可能な組織を細胞源に用いた角膜内皮再生医療技術を 3 年以内に開発し、臨床応用準備を開始することを目的とする。

これまでに、虹彩実質、線維柱帯、血管内皮などを細胞源候補として研究を進めてきた。この中でも、虹彩実質は安全に採取可能な組織であり、また虹彩実質中に未分化細胞が存在することを見出した。また、Ussing chamber system を用いて、角膜内皮細胞のポンプ機能およびバリア機能を測定した。さらに、角膜内皮細胞移植用シートのキャリア開発において、ヒアルロン酸などを検討した。内皮移植用キャリア開発と並行して、移植用デバイスの開発にも着手した。In vivo における有効性および安全性を評価するため、家兎水疱性角膜症モデルへの移植実験の予備検討を行った。ヒト虹彩実質採取に関して倫理委員会より承認を受け、ヒト虹彩を用いた実験を開始している。

今後の展望としては、①家兎水疱性角膜症モデルへの移植による有効性、安全性の向上、②ヒト虹彩 sphere の培養、再生角膜内皮の構築、③キャリアシートの生体適合性評価（家兎への移植）および移植用デバイスの改良が挙げられる。

- 分担研究員の課題

細胞源の探索、内皮誘導、キャリアシート評価、培養内皮シート作製、動物モデルへの移植：西田

キャリアシート作製、改良、培養内皮シート作製：田畑

内皮誘導、培養内皮シート作製：大和

細胞源の探索、内皮誘導、培養内皮シート作製：仲野

- 実現化に向けての課題

- 角膜内皮細胞シートの移植方法

キャリアの強度等があれば問題ないと考えられる。移植用デバイスの開発も行っている。

- キャリアの生体内における分解性・強度について

1か月程度が望ましい。50 μm なら強度もあり、1~2か月で分解されると考えられるため、今後50 μm にて架橋度合または分子量を検討していく。なお生体での評価をふまえて、随時改良していく予定。

- 分解物の安全性について

分解物はおもにコラーゲン、ゼラチン、アミノ酸であるため、生体内における毒性は極めて低いと考えられる。

- 動物モデルを使用した有効性評価について

長期的に経過観察できる実験系が必要。また、なるべく早く大動物での有効性、安全性評価を行う方が好ましい。

以上

厚生労働省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」班

(H19-再生-一般-001)

平成 21 年度第 2 回班会議
プログラム

日時：平成 22 年 2 月 15 日（月）15：00 － 17：00

場所：ホテルメトロポリタン仙台 3F 藤

研究代表者

西田 幸二

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

事務局（景山智文、田中知佳）

〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1

TEL：022-717-7294（医局）

FAX：022-717-7298

プログラム

- 15:00-15:10 開会挨拶
座長:西田 幸二 (東北大)
司会:横倉 俊二 (東北大)
- 15:10-16:40 研究経過報告および今後の研究計画
(15:10 -15:40) 角膜上皮再生プロジェクト
大家 義則 (東北大)
- (15:40-16:10) 角膜実質再生プロジェクト
久保田 享 (東北大)
- (16:10-16:40) 角膜内皮再生プロジェクト
林 竜平 (東北大)
- 16:40-17:00 全層再生に関する総括&フリーディスカッション
西田 幸二 (東北大)
- 17:00 閉会挨拶

出席者名簿

西田 幸二（東北大学大学院医学系研究科眼科学）
明石 満（大阪大学大学院工学系研究科応用化学）
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）
山口 拓洋（東京大学大学院医学系研究科生物統計学）
嶋澤 るみ子（東北大学未来医工学治療開発センター・審査・評価部門）

松崎 典弥（大阪大学大学院工学系研究科応用化学）

高柳 泰（東北大学未来医工学治療開発センター）

横倉 俊二（東北大学眼科・助教）
久保田 享（東北大学眼科・助教）
上松 聖典（東北大学眼科・助教）
林 竜平（東北大学眼科・助教）
菊地 未来（東北大学眼科・大学院）
大家 義則（東北大学眼科・大学院）
渡邊 亮（東北大学眼科・大学院）
櫻井 美晴（東北大学眼科・大学院）
高野 良真（東北大学眼科・大学院）
石 棟（東北大学眼科・大学院）
檜森 紀子（東北大学眼科・大学院）
景山 智文（東北大学眼科・研究生）
トーマス・ダンカン（東北大学眼科・研究生）
萩原 邦恵（東北大学眼科・研究員）
金野 なつみ（東北大学眼科・研究補助員）
木村 雅恵（東北大学眼科・研究補助員）
原 進（東北大学眼科・研究補助員）
伊藤 美由紀（東北大学眼科・研究補助員）
西嶋 恵子（東北大学眼科・研究補助員）