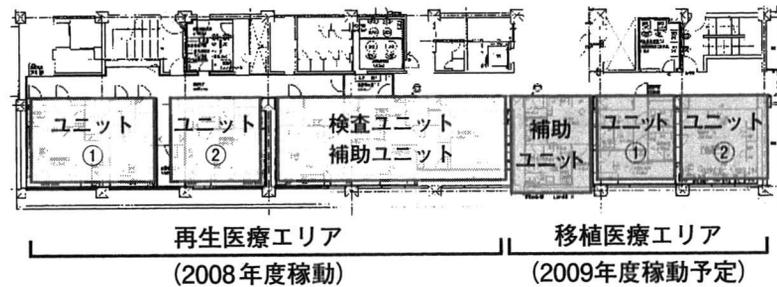


生医療エリア、移植医療エリアという二つのCPCを建造中です。まもなく再生医療エリアはできあがります。移植医療エリアは2009年度に稼働予定です。再生医療エリアは二つのユニットがあって、1番は角膜の再生医療のために使うという計画になっています。移植医療エリアは主として臍島移植のために使用する予定です (Fig. 6)。

このセンターの運営については、各部門を有機的に連携して基礎研究から、その実用化、つまり産業化までを支援する。他の大学のセンターもこのあたりをかなり工夫されていると思いますが、それを参考にしながら、われわれも独自の工夫を行っています (Fig. 7)。

Fig. 6 CPCの整備状況②新規CPC (未来医工学治療開発センター管理)

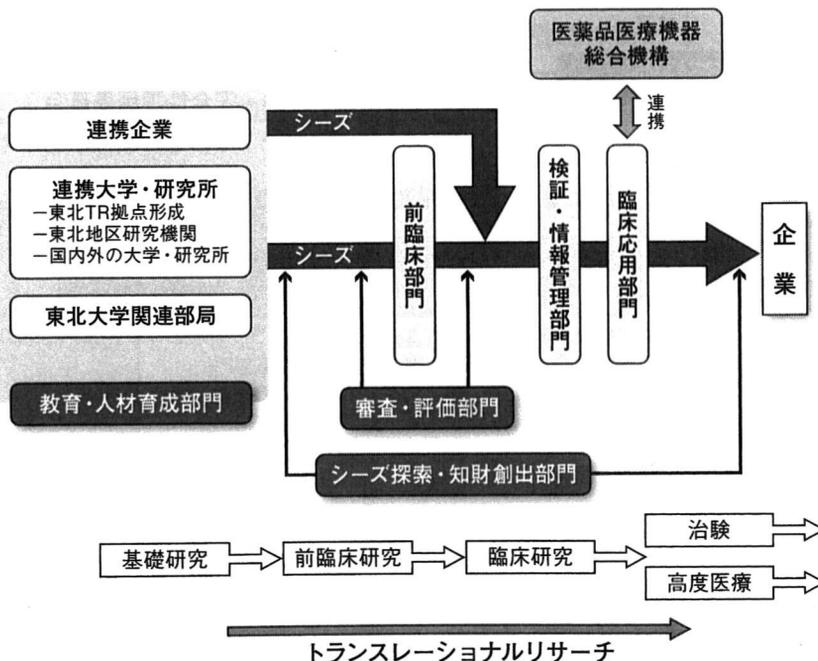


面積：約400m²
 ユニット数：(再生医療エリア) 2ユニット+補助・検査用ユニット
 (移植医療エリア) 2ユニット+補助ユニット
 製造物：①角膜上皮細胞シート, 口腔粘膜上皮細胞シート, ②臍島移植を計画中

- TRシリーズ試験物の製造管理を、GMP準拠で行う。

Fig. 7 TRセンターによる支援のながれ

各部門が連携し、臨床試験を経て、治験終了、企業へのライセンスアウトまでを総合的に支援することで基礎研究の成果を実用化に結びつける。



2. センターの特徴とシーズ開発状況

本日は時間の関係上、細かい内容についてお話しする時間がありませんが、特徴となるところのいくつか紹介したいと思います。まずシーズの公募を行います。こういったシーズを支援するかということで、希望があれば一応すべてまずは受け入れて、開発戦略と一緒に練っていきます。これはインターネットで、学内および学外にオープンにしてシーズを公募しております。そして、それを探索シーズとしてまずロードマップを作成します。マップを作成したあとに、TRで支援するか

どうかを委員会等で決めていくという体制になります (Fig. 8)。

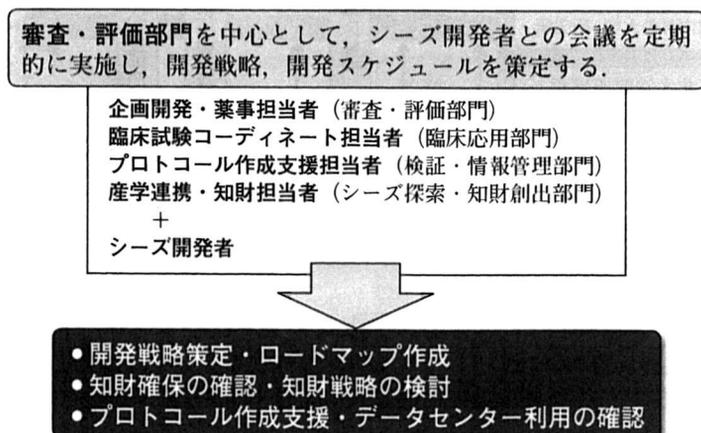
このTRの成功の一つとしては、出口を設定するということが非常に大切です。そして、開発のはじめから知財のこと、産学連携のことを考えるということが非常に重要です。まずはじめにシーズ開発戦略会議の中で、出口を設定して、知財、あるいは産学連携を含めて、ロードマップ、開発戦略の作成を行います。われわれはまずここにかなり重点を置いています (Fig. 9)。

具体的な開発ロードマップの例ですが、実施に必要な項目をできるだけ細かく並べて、それを時系列で整理して、いつそれを行っていくかという

Fig. 8 シーズの審査・評価の流れ



Fig. 9 シーズ開発戦略会議の実施



ことを話し合います。知財関係、あるいは産学連携が必要であれば、そのときに必要な支援を行う。産学連携では企業とのマッチング等も行っていきます。こういったロードマップを定期的に更新していく。まずこれがはじめの支援になります (Fig. 10)。

TRシーズを最終的な出口に持っていくためには、知財戦略が非常に重要であるということがよく強調されますが、われわれの大学では大学本部が知財を一括管理していますので、センターとしてはこの大学の知財本部の分室というかたちで運

営を行っています。知財部長が併任で週に2度ほど出向いてきて、知財の戦略について話をしているという段階です。具体的なシーズに関しては戦略会議を行って、知財の管理については知財部で行うということになっています (Fig. 11)。

このセンターは、先ほど申しましたように、大学の本部所属で大学全体のセンターですので、病院のセンターではありません。臨床試験の実施に関して治験センターとどのように区別しているかというと、現状では医師が主導する臨床試験に関してはこちらのセンターで支援して、企業へのラ

Fig. 10 開発ロードマップの例

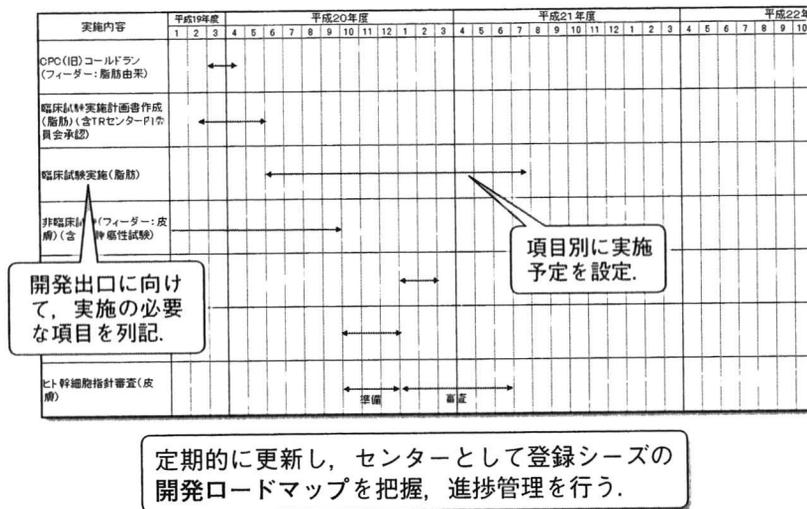
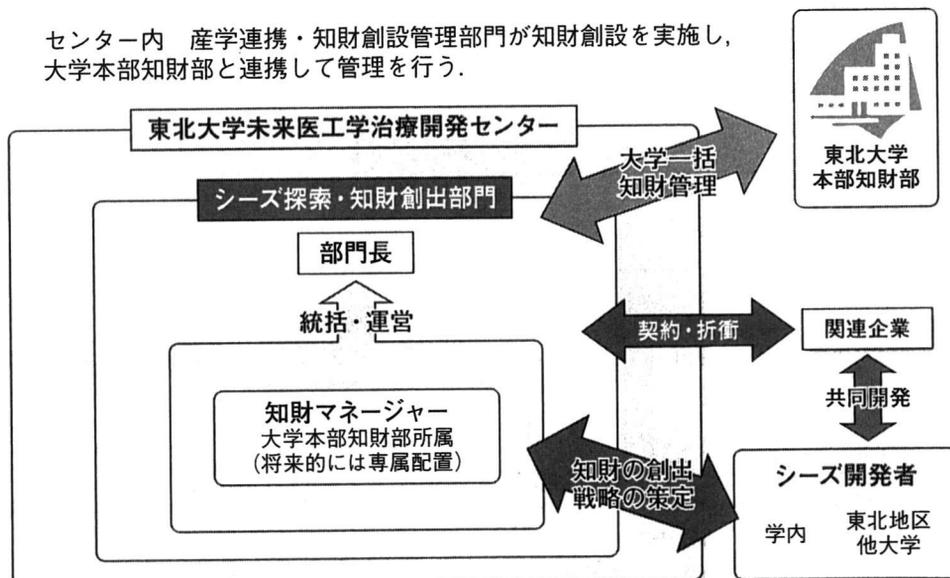


Fig. 11 シーズの知的財産の管理体制

センター内 産学連携・知財創設管理部門が知財創設を実施し、大学本部知財部と連携して管理を行う。



イセンスアウトができたあと、あるいは企業主導の治験の場合には、この治験センターが責任を持って推進するという体制になっています (Fig. 12).

医師主導の臨床試験を支援するために、いま臨床試験データセンターを構築中です。われわれのところではまだ人数が少ないのですが、データマネジメント、統計、システム運営という三つの部

門に分けて、データセンターの運営を行っています。まだ始めたばかりですが、まもなくこのデータセンターを動かして、実際に臨床試験を支援しながらデータセンターの実質的な構築を行っていくと考えています (Fig. 13).

目標は、このデータセンターが東北大学全体の臨床試験推進のためのデータセンターとなることです。つまり東北地方の病院の臨床試験のネット

Fig. 12 東北大学における未来医工学治療開発センターの役割

これまで研究者が個別に各所へ申請、報告していたTR開発を一括支援できる体制とした。

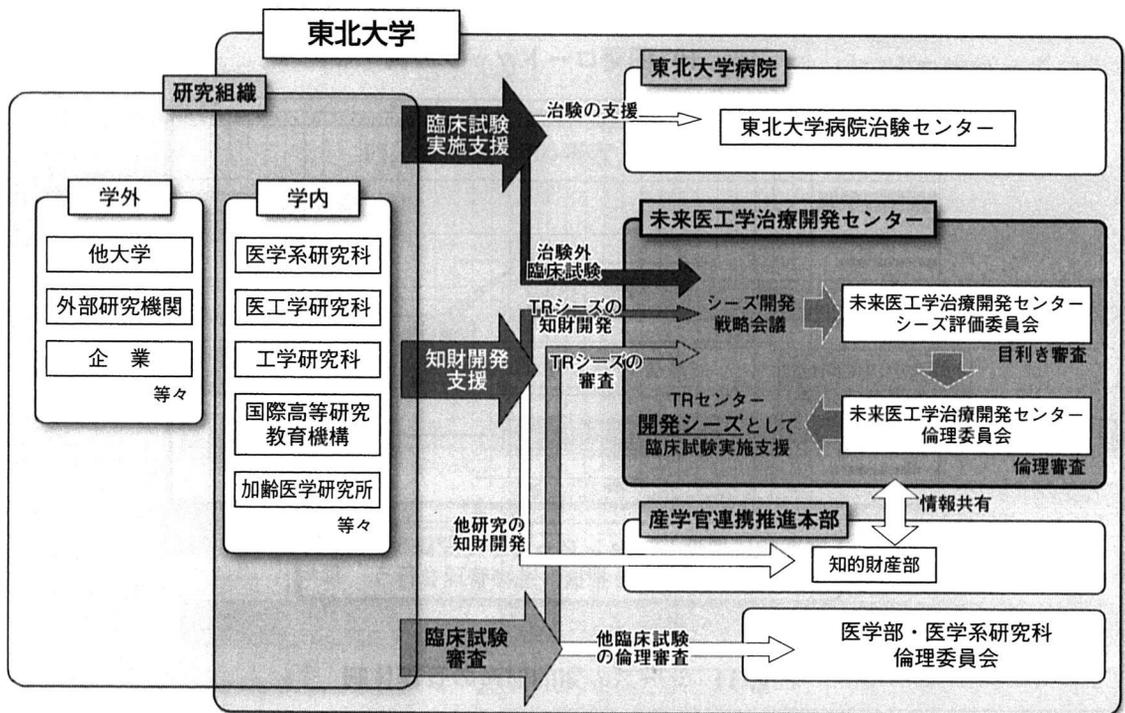
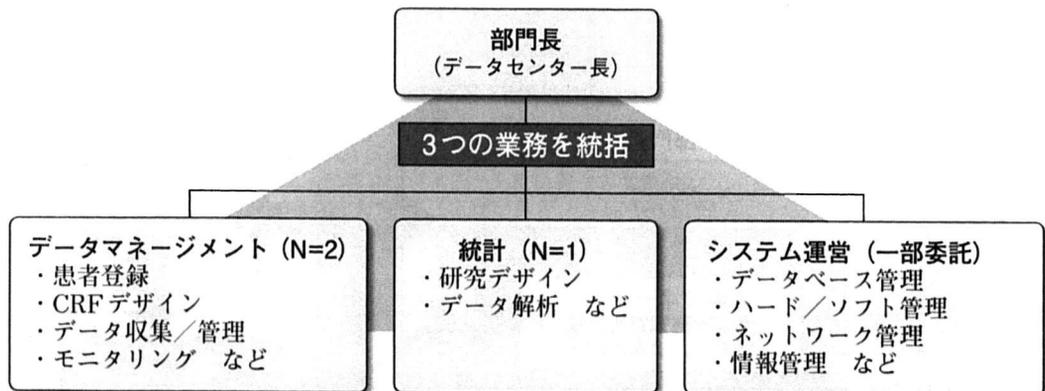


Fig. 13 臨床試験データセンターの運営体制



データマネジメント、統計解析、情報管理システム運営の3業務を部門長が統括、運営する。

医師主導の臨床試験 (医師主導治験を含む) を支援

ワークを作って、このデータセンターでそれを支援していきたい。そのために東北TR医工協議会を定期的に行っていくことを計画しています。まもなく第1回の東北TR医工連携協議会を行う予定です。

3. TRの人材育成の拠点

日本でこのTRを推進していくためには教育が非常に重要ですが、大学院の博士課程のコースとして、TR特論コースをすでに作っています。また、各部門が独自に院内で講義コースを開いています。最近、医学統計入門コースとう15回、1回だいた

い2時間というコースを始めています (Fig. 14).

そういった講義コースで臨床試験に携わる医師および関係者の知識を増やしていくとともに、このセンターや、関連するがんセンター、治験センター等と連携してOJTで教育を行っていくという体制になっています (Fig. 15).

もう一つは、TRでは基礎研究が非常に大事だと思います。TRの組織構築が非常にうまくいったとしても、いいシーズがなければうまくいかないので、基礎研究の部門を強化するために、トランスレーショナルリサーチセンターに所属するTRの寄付講座を設置することができるようになりました。今年度は二つの寄付講座を設置して、実

Fig. 14 TRに関する教育体制

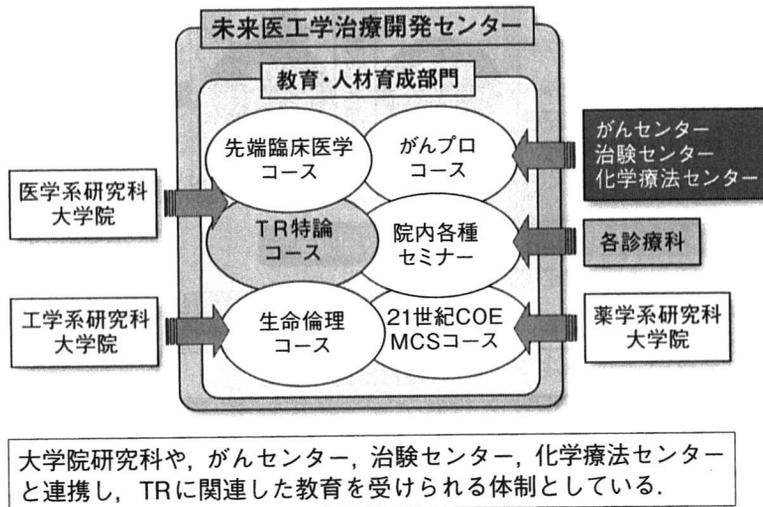
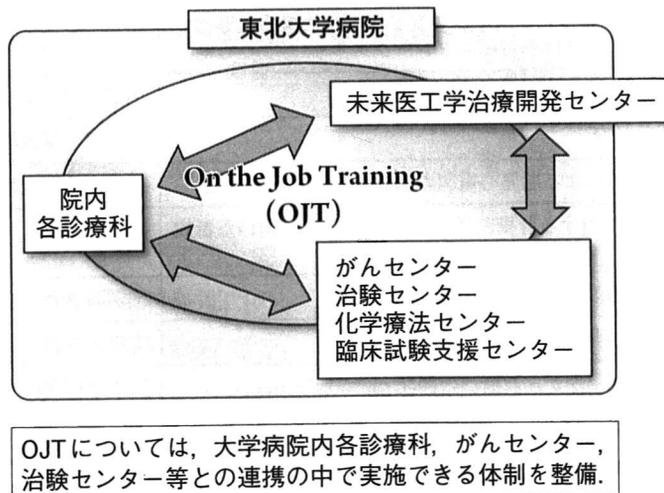


Fig. 15 TRのOJT実施体制



際の出口を見据えた基礎研究を行っていくという体制にしました (Fig. 16).

開発シーズ例については省略しますが、角膜については私があとのセッションでお話しさせていただきます。また、アルツハイマー病のプローブの開発や細胞の呼吸を非侵襲的に測定する機器の開発などがあり、後者は不妊治療や膵島移植に用いることができるというものです。膵島移植については、膵島移植研究会と足並みをそろえて高度医療に申請するという段階にきています。神経難

病であるALSに対しては、HGFを用いた新規治療法を開発を行っており、いまサルを用いた非臨床試験、毒性試験を行っている段階です (Table 1).

その他、この4月に京都大学から出澤真理先生が教授として東北大学に来られましたので、骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞治療の開発、あるいは東海大学から宮田敏男先生が教授として来られましたので、PAI-1阻害薬という新規血栓治療薬の開発といったシーズの支援を始めたところです。

Fig. 16 前臨床部門

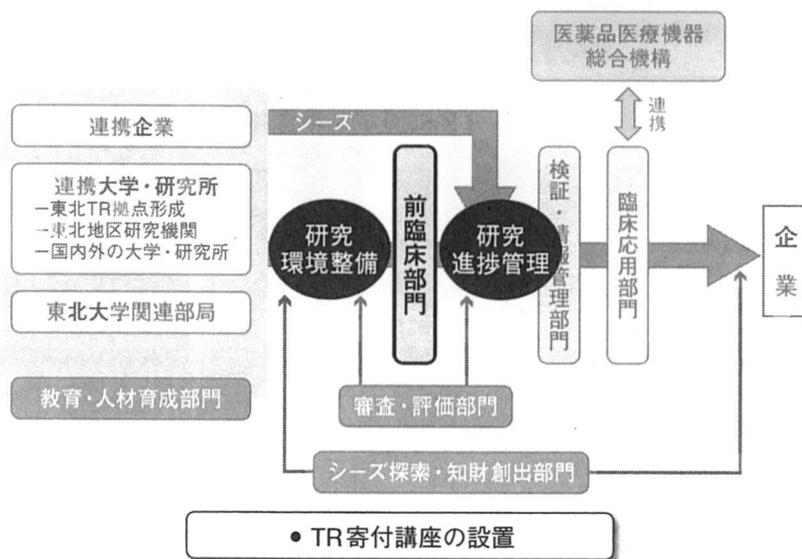


Table 1 未来工学治療開発センター 開発シーズ例

研究題目	所属部局	研究代表者
自家培養口腔粘膜上皮シート移植法の多施設共同臨床試験	医学系研究科	西田 幸二
重症糖尿病治療におけるメディカルイノベーション：医工学の融合に基づく独創的新プロトコルの確立による膵島移植のブレークスルー	国際高等研究教育機構	後藤 昌史
非侵襲的細胞呼吸活性診断システムの開発と臨床応用	山形大学大学院理工学研究科	阿部 宏之
新規アルツハイマー病診断のTR	未来医工学治療開発センター	工藤 幸司
非接触広域接地型高感度電極法による胎児心電図の治験・臨床応用の確立	国際高等研究教育機構	木村 芳隆
筋委縮性側索硬化症 (ALS) に対する肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた新規治療法の開発	医学系研究科	青木 正志
形状記憶合金を用いた人工括約筋システム	国際高等研究教育機構	羅 雲
剛性傾斜型ガイドワイヤーの開発	工学研究科	山内 清
ナノバブルと超音波を用いた超早期がん診断法の開発	医工学研究科	小玉 哲也
極細径光ファイバ圧力センサ	医工学研究科	芳賀 洋一
フルフィールド光干渉断層計 (OCT) の開発と医療への応用	医学系研究科	西田 幸二

マイクロケラトームを使った DSAEK

久保田 享* 西田幸二*

角膜内皮疾患に対する DSAEK は、乱視が少なく良好な術後視力を得られることから、急速に普及している。移植片の作製にあたっては、マイクロケラトームを使って自分で作製する方法と海外のアイバンクに依頼してすでにフリーフラップが作製されたプレカット角膜を使用して作製する方法とがある。自分で作製する方法では、慣れるまで移植片の厚みにばらつきが出やすいことが問題であり、プレカットを使用する方法では、値段が高いことが問題である。国内ドナー角膜を使用する場合には自分自身で移植片を作製しなくてはならないので、マイクロケラトームを用いて自分で移植片を作製する方法もぜひ習得しておきたいものである。

はじめに

角膜内皮移植は、1997年にオランダの Melles らによって初めて報告された術式である¹⁾。しかし、手作業でドナーや角膜実質を均一に剝離するという手技的なむずかしさから、普及はしなかった。その後、Price らはホストの実質を切除せずに、内皮と Descemet 膜のみを剝離して、移植する方法を開発し、DSEK (Descemet's stripping endothelial keratoplasty) と名付けた²⁾。移植片の脱落が問題となって、さらに、移植片の作製にマイクロケラトームを用いて行う方法が Gorovoy らや Price らにより報告され、これが DSAEK (Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty) と名付けられ^{3,4)}、より均一なドナーの作製が可能となり、多くの施設で行われるようになってきている。現在日本国内で DSAEK を行うには、国内ドナー角膜あるいは輸入角膜を自分でマイクロケラトームを用いて移植片を作製する方法と、海外のアイバンクに依頼してフリーフラップが作製された状態で送られてくるプレカット角膜を用いる方法とがある。本稿では、マイクロケラトームを用いて移植片を作製する方法について解説したい。

I マイクロケラトームを用いたドナーグラフトの作製

人工前房装置 (モリア社製) (図 1) に強角膜片を固定する (図 2-a)。ここで、注意が必要なのは、人工前房



図 1 人工前房装置

装置に強角膜片をセットするには、強角膜片の直径が 16 mm 以上必要となることである。DSAEK 用の強角膜片を準備する場合には、国内アイバンクや海外アイバンクに DSAEK 用に使う旨を伝えて、直径 16 mm 以上の強角膜片を作製してもらうようにする。強角膜片を作製する眼科医への教育も重要である。

その後、前房内圧を調整する。推奨されている値は、眼圧 65 mmHg 以上である。前房圧が十分に上がっていないと、均一な厚みで切除できないため注意が必要である。付属の専用眼圧計にて眼圧を確認する (図 2-b)。通常はボトル高を調整するだけで十分な眼圧を得られるが、不十分な場合もあり、その場合当科では、アキュラス® に付属の VGFI® という加圧装置を使用して、ガス圧にて加圧し、65 mmHg 以上の十分な眼圧を得よう

* Akira Kubota & Kohji Nishida : 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
〔別刷請求先〕 久保田 享 : 〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1 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 e-mail : akubota@oph.med.tohoku.ac.jp

■人工前房の前房圧は確実に65 mmHg以上に上がっていることを確認する。

■作製されるフラップの厚みはマイクロケラトームを動かすスピードによって制御する。

■フリーフラップはもとの位置に戻して、しっかりと水分を除去して再接着させる。

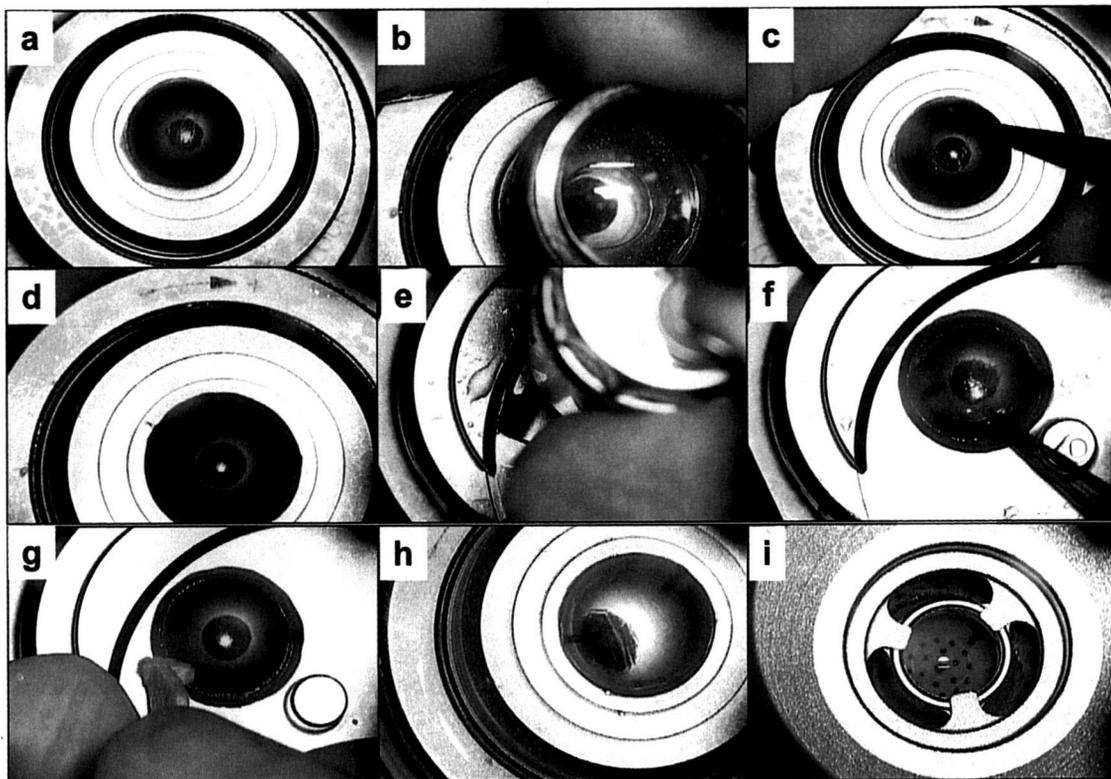


図2 マイクロケラトームを用いた DSAEK 用のドナー移植片の作製方法

にしている。

十分な眼圧が得られたら、MQA スポンジや綿棒を用いて角膜上皮を剝離する(図2-e)。その後、位置合わせのためにマーキングを行ってから(図2-d)、マイクロケラトーム(ATLK Cbm, モリア社製)にて、厚さ300 μ mのフリーフラップを作製し(図2-e)、残りの実質のついた内皮側を移植片として用いる。

マイクロケラトームは300 μ mで切除するが、マイクロケラトームは手動で動かすために、その動かすスピードによって作製されるフリーフラップの厚みが変わってくる。具体的には、速ければフリーフラップが薄くなるために移植片が厚くなり、遅ければ逆にフリーフラップが厚くなるために移植片が薄くなる。印象としては、角膜厚がドナーごとに異なることもあるが、マイクロケラ

トームの動かし方によって、作製される移植片の厚みにばらつきが大きい。輸入角膜のプレカットドナーの移植片の厚みが大体揃っていることから考えても、マイクロケラトームを用いて移植片を作製する場合には安定した手技の習得も必要であると思われる。

フリーフラップ作製後は、フリーフラップをマーキングに合わせてもとの位置に戻し、MQA スポンジにて層間の水分を除去して再接着させる(図2-f, g)。そして、前房を虚脱させないために前房圧をかけたままで、マイクロケラトーム用のリングをはずして、外筒をゆるめる。外筒をゆるめると、圧がかかっているために、自然に強角膜片のついた状態で外筒が浮きあがってくる(図2-h)。外筒を抑えながら急に上昇しないようにコントロールする。

■ 白内障を併発している症例ではできるだけ
2 期的に手術を行う。

■ 手術用顕微鏡にはスリット照明があるとホ
ストとドナーの接着が確認しやすい。

その後、移植片をトレパンに移し、全層角膜移植のときと同様に、必要に応じた大きさのトレパンで打ち抜く(図 2-i)。プレカットドナーでは、フリーフラップの作製までが行われているので、すぐにトレパンで打ち抜くことができるため、効率はよいが、その費用が高価なのが問題である。輸入角膜自体の値段も上がっており、日本国内のアイバンクの献眼数を増やす努力をすることも大事である。

移植片作製後は、挿入までの乾燥と内皮保護のためビスコート®を内皮面に塗布しておく。

II DSAEK の手術手順

当科で行っている DSAEK の手技について簡単に概説する。日本人の水疱性角膜症は LI 後などの狭隅角眼が多いため、白内障を併発している症例には白内障手術を先に行って、2 期的に DSAEK を行うようにしている。白内障手術は、上皮剝離をしてからトリパンプルーで前囊染色を行ってから、硝子体側からのシャンデリアイルミネーション⁵⁾ やスリット照明、硝子体手術用ライトガイドなどを使用している。

DSAEK の手術時は、まず 5mm の強膜トンネルを耳側に作製する。続いて、還流下に逆向き Sinskey フックを用いて、内皮と Descemet 膜を剝離する。このとき、トリパンプルーを用いると内皮が染色されてわかりやすい。ここまでの操作が終了した状態で、先に述べたマイクロケラトームを用いた移植片の作製に移る。

作製した移植片を Busin glide (モリア社) にのせ、内皮面をビスコート®にて保護する。前房への挿入は、鼻側から専用の鑷子を用いて引っ張り込み法にて行っている。挿入後は、前房を空気にて約 10 分間満たして、移植片を接着させ、角膜に 4~5 カ所程度垂直な穿孔創を作製して、層間の水分を排液する。

最後に、空気を少なくして、治療用コンタクトレンズを装用し、アトロピン点眼、抗生剤とステロイド眼軟膏を点入して手術を終了する。手術中に、移植片と宿主角膜の層間の間隙を確認したいときには、顕微鏡にスリッ

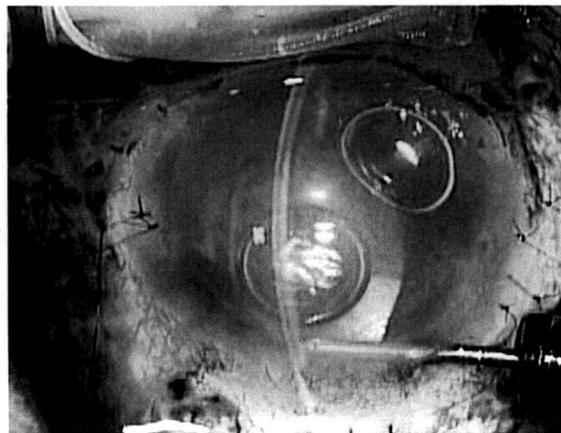


図 3 DSAEK の術中写真

スリット照明を用いると、グラフトが偏位しドナーとの間に隙間があることが確認できる。

ト照明があると非常にわかりやすい(図 3)。薄く剝離していると、通常の顕微鏡照明では認識が困難であるため、これから DSAEK を始めようと考えられている施設には、スリット照明を準備されることをお勧めしたい。

実際にマイクロケラトームを用いた DSAEK を行った症例をみると、術後乱視は非常に少なく、図 4 の症例では左眼に DSAEK を施行され、もう片眼には以前に全層角膜移植が行われているが、角膜形状を見るとその差は歴然としている。

おわりに

DSAEK は、無縫合で行える手術であり、術後の乱視も少なく、これまでの角膜移植では考えられなかったような良好な術後視力を得られる術式であることから、急速に普及している。その手技の習得には一定のラーニングカーブがあることが言われており、また長期的には内皮の減少などの問題が解決される必要があるが、少しずつではあるが器具などの改良も進んでいる。輸入角膜のプレカットの作製費用は高価であり、万が一不具合などがあつた場合には、どうしても自分で移植片を作製しなくてはならず、マイクロケラトームを用いた移植片の作

■ DSAEKの術後は乱視が少なく良好な術後視力が得られる。

■ マイクロケラトームを用いた移植片の作製法も習得しておくべきである。

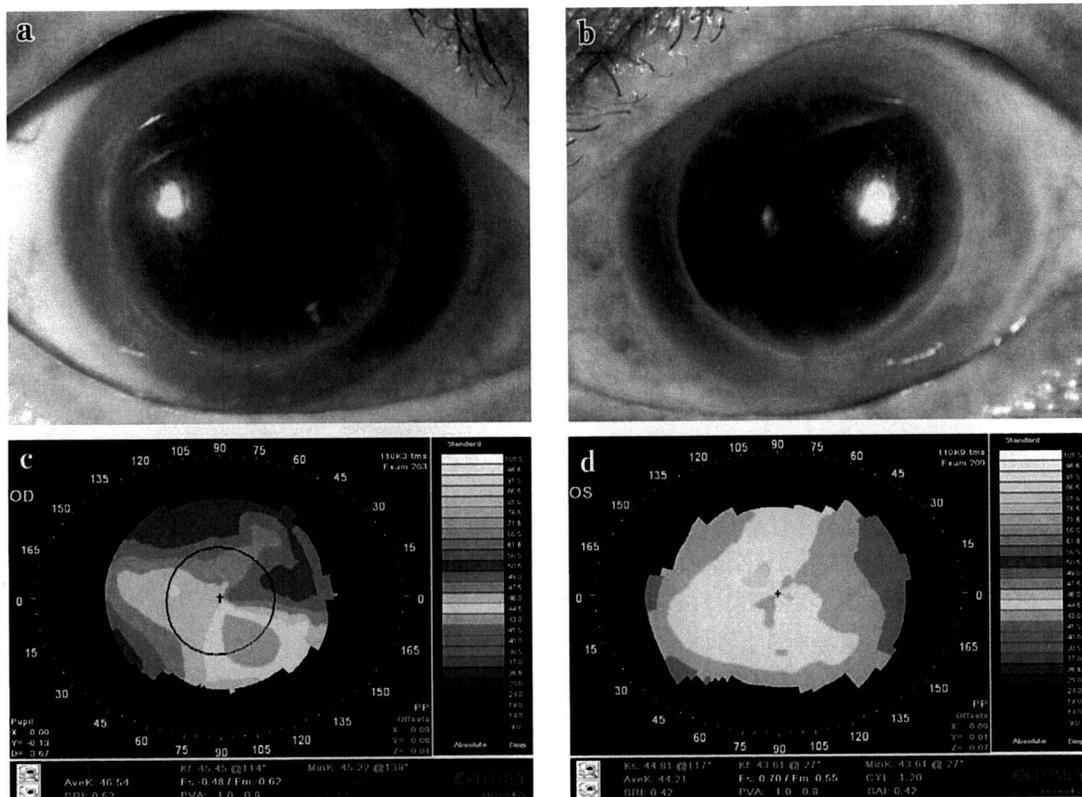


図4 右眼 (a, c) に全層角膜移植, 左眼 (b, d) に DSAEK を施行された症例
 DSAEK を施行された左眼のほうが角膜形状がよいことがわかる. 視力は $RV = (0.8 \times S - 3.0D) \div C - 0.75D$
 $Ax 120^\circ$, $LV = 1.2$ (n.c.) である.

製手技も習得しておくべきである。マイクロケラトーム自身のハード面での改良が進んで、より安定して一定の厚みの移植片が作製できるようになれば、この手技も、よりいっそう普及していくものと思われる。

【文 献】

- 1) Melles GR, Lander F, Beekhuis WH, et al : Posterior lamellar keratoplasty for a case of pseudophakic bullous keratopathy. *Am J Ophthalmol*, **127** : 340-341, 1999
- 2) Price FW, Price MO : Descemet's stripping with endothe-

- lial keratoplasty in 50 eyes : A refractive neutral corneal transplant. *J Refract Surg*, **21** : 339-345, 2005
- 3) Gorovoy MS : Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea*, **25** : 886-889, 2006
- 4) Price FW Jr, Price MO : Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 200 eyes : Early challenges and techniques to enhance donor adherence. *J Cataract Refract Surg*, **32** : 411-418, 2006
- 5) Oshima Y, Shima C, Maeda N, et al : Chandelier retroillumination-assisted torsional oscillation for cataract surgery in patients with severe corneal opacity. *J Cataract Refract Surg*, **33** : 2018-2022, 2007

角膜再生医療

Regenerative medicine of cornea



林 竜平(写真) 西田幸二

Ryuhei HAYASHI and Kohji NISHIDA

東北大学大学院医学系研究科眼科・視覚科学分野

◎角膜は透明な無血管組織であるが、疾患や外傷により透明性は低下する。透明性低下により視覚障害に至った患者に対してはドナー眼を用いた角膜移植が実施されているが、国内においてはドナー不足、またとくに角膜上皮疾患においては拒絶反応が問題となっている。著者らはこれらの問題を解決すべく、難治性上皮疾患に対して患者自身の上皮幹細胞・前駆細胞の培養により作製した培養上皮細胞シートによる治療法の臨床応用を開始し、角膜上皮の再生に成功した。本手法はドナーを必要とせず、また拒絶反応も起こらないため、有効な治療法がなかった難治性上皮疾患に対する有効な治療法になりうる。また、角膜内皮疾患に対しても培養角膜内皮細胞シート移植法を開発し、動物モデルにおいてその有効性を確認している。著者らは臨床応用を開始している角膜上皮再生医療のみではなく、角膜全層の再生医療技術の開発をめざし研究に取り組んでいる。



Key word : 角膜上皮, 角膜内皮, 再生医療, 培養上皮細胞シート, 温度応答性培養皿, 角膜移植

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年に旧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)の全層角膜移植がはじめて報告され、現在もなおもっとも普及した角膜移植の術式として実施されている。一方で、現在の角膜移植は献眼に依存しているが、国内におけるその提供数は絶対的に少なく、多くの患者に対してただちに移植手術を行うことは困難である。また、とくに重篤な上皮疾患の場合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の開発が進められている。本稿

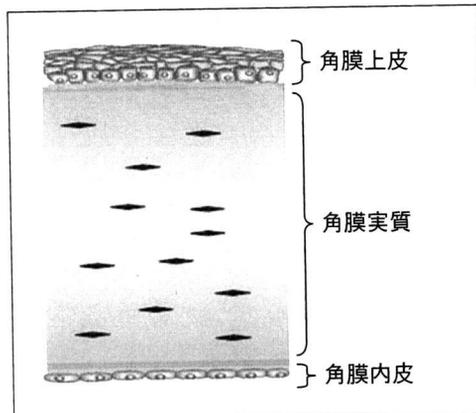


図1 角膜上皮

では著者らが開発し、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、角膜内皮再生医療への取組みについて述べる。

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 μmの非角化扁平重層上皮である(図1)。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

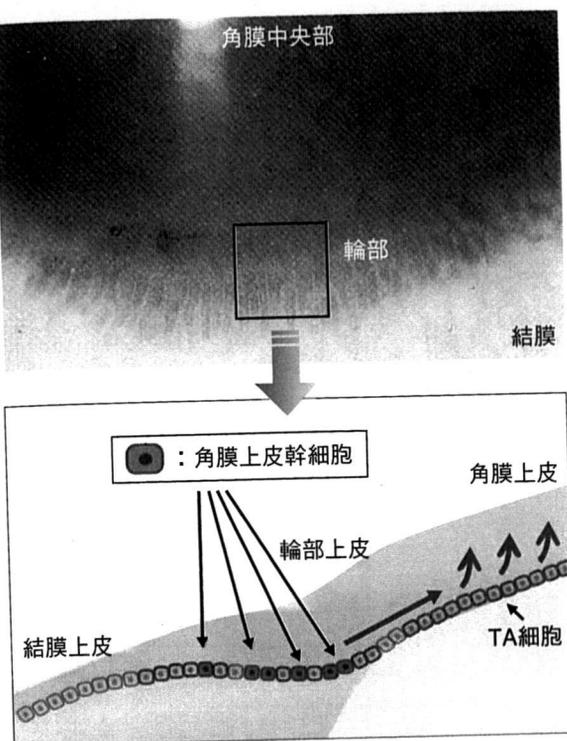


図 2 角膜上皮幹細胞

角膜上皮幹細胞は、結膜と角膜の間に存在する輪部とよばれる組織の上皮基底部に局在している。

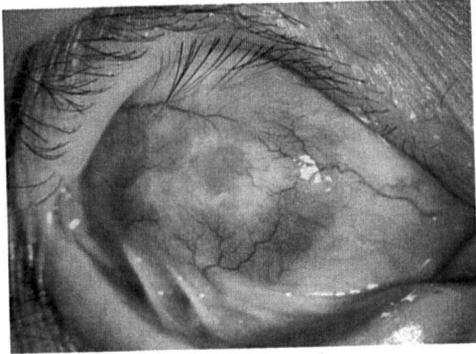


図 3 角膜上皮幹細胞疲弊症

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。

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はじめて報告された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、ディスペルゼなどの酵素処理を用いて培養上皮細胞シートを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、シート移植後の宿主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、基質と宿主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、著者らは基質を用い

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、角膜上皮幹細胞に関する研究である。角膜上皮幹細胞は角膜と結膜の境界に位置する輪部とよ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 2)。角膜上皮幹細胞は角膜上皮型分化マーカー(ケラチン 3, 12)を発現していないことや、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こると考えられる(角膜上皮幹細胞疲弊症、図 3)。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こりうる。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

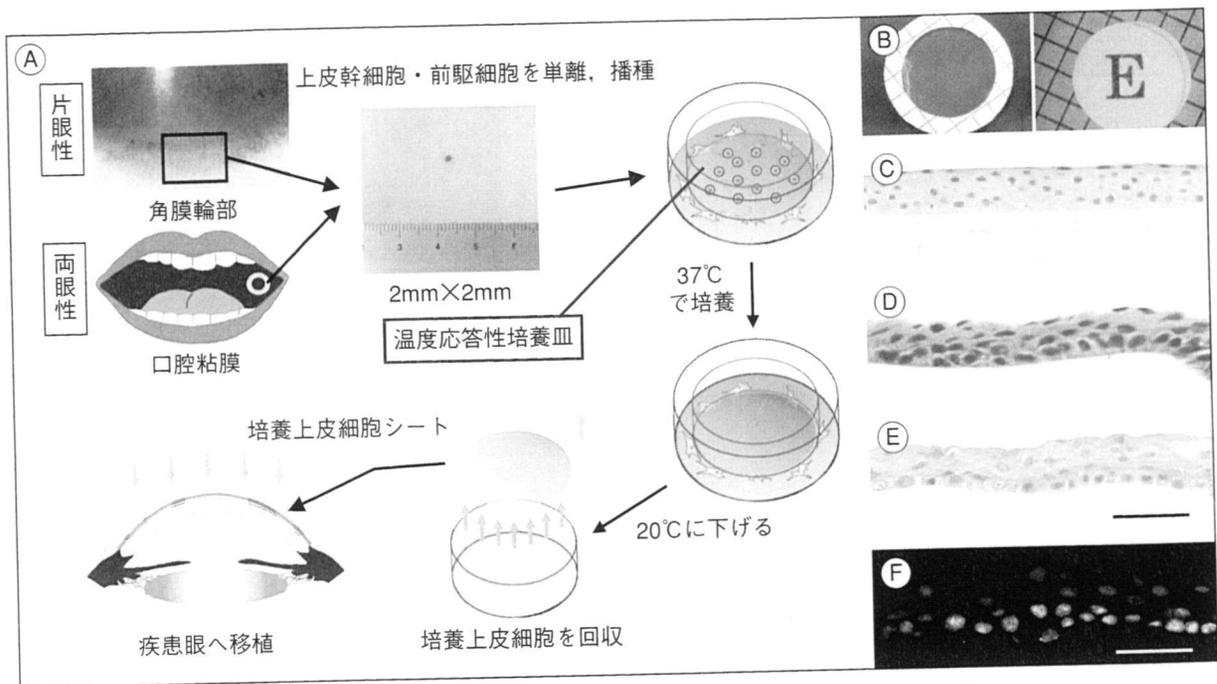


図 4 温度応答性培養皿を用いた自家培養上皮細胞シート移植法^{7,8)}

A: 2×2 mm の輪部組織(片眼性)あるいは口腔粘膜組織(両眼性)を患者自身から採取→酵素処理で幹細胞・前駆細胞を含む上皮細胞を単離→上皮細胞を温度応答性培養皿上で培養(37°C)→温度を下げて(20°C)培養上皮細胞シートを剥離→疾患眼へ移植。

B: 回収した培養上皮細胞シート。透明な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。(Bar: 50 μm)

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がけて開発した(図 4-A)。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東京女子医科大学・岡野光夫教授らが開発したもので、培養皿表面に温度応答性インテリジェントポリマーが共有結合で固定化されており、37°Cでは培養皿表面が疎水性となり細胞が接着するが、32°C以下では相転移により表面が親水性となるため細胞が接着できないという性質を有している。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(図 4-B)。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 4-C~F)。

著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。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 5)。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になりうると考えら

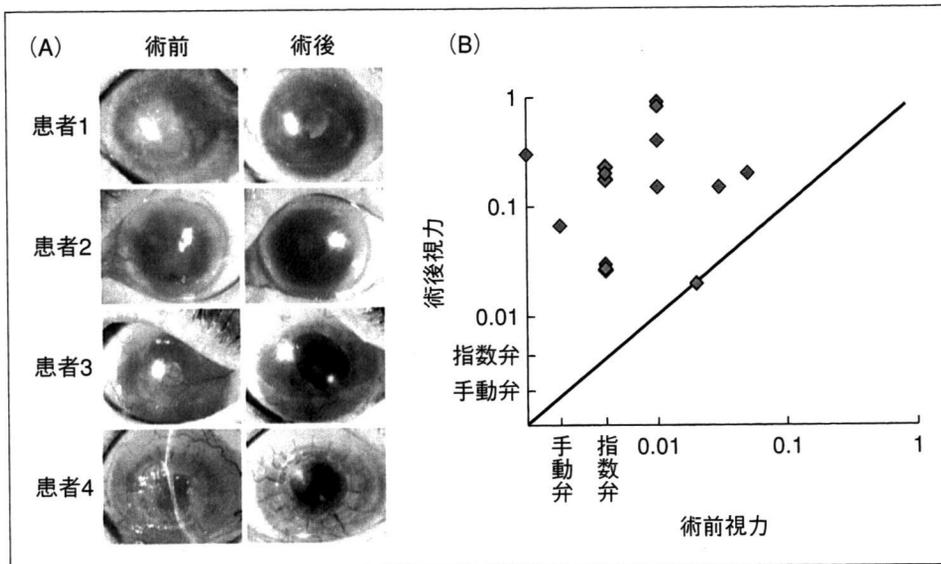


図5 自家培養上皮細胞シート移植による臨床成績⁸⁾

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。

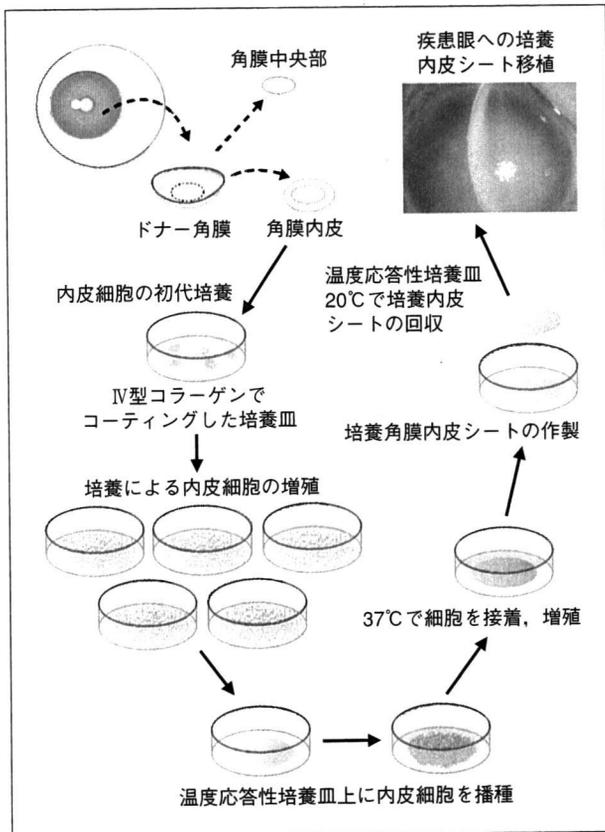


図6 培養角膜内皮シート移植法の概要

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

れる。

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1)。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に角膜内皮細胞数が減少し, 最終的に実質に水が貯留する水疱性角膜症とよばれる病態となる。水疱性角膜症は角膜移植対象疾患のなかでもっと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。

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。そこで著者らは, 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おり(図6), 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

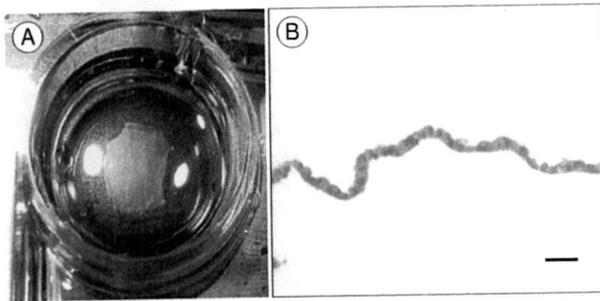


図 7 温度応答性培養皿より回収した培養角膜内皮細胞シート(A)およびHE染色像(B)
透明な単層シートとして回収可能であった(Scale bar: 20 μ m).

胞シートを作製・回収することに成功している(図 7). 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(おもに六角形)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(図 8)⁹⁾. さらに, 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(図 9, 10)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(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, 生体内で増殖しない角膜内皮細胞を採取することはリスクが高

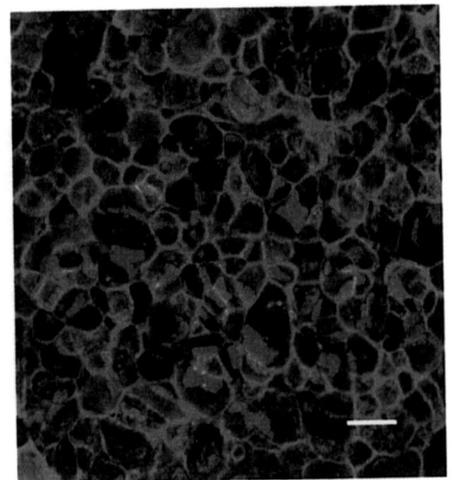


図 8 培養角膜内皮細胞シートにおけるNa⁺/K⁺ ATPaseの免疫染色
培養角膜内皮細胞シートにはポンプ機能を担っているNa⁺/K⁺ ATPase発現が認められた(Scale bar: 20 μ m).

いため, 角膜内皮以外の細胞源を用いることが理想的である. 角膜内皮は第4の胚葉ともよばれ神経堤由来の組織であると考えられていること: ら, 細胞源候補としては同様に成体組織中の神経堤由来細胞が有望と考えられる. 現在, 角膜内の再生医療の実現化に向けて, 自家細胞源だけではなく他家細胞源も視野に入れて研究に取り組んでいる.

おわりに

著者らは組織工学的な手法を取り入れて, 基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がけて度応答性培養皿を用いた自家の培養上皮細胞シ

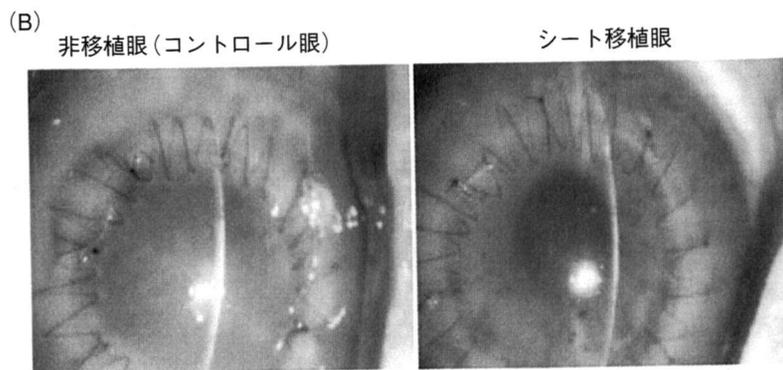
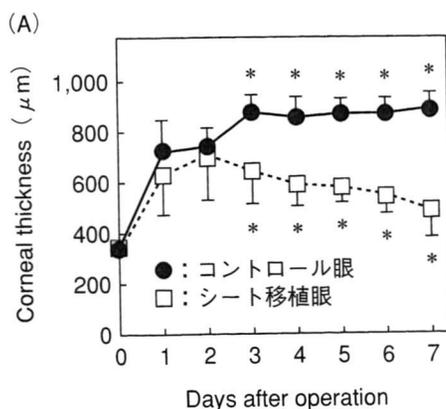


図 9 家兎水疱性角膜症モデルへの培養角膜内皮細胞シート移植後の角膜厚の変化(A), および眼表面像(B)¹⁰⁾
非移植眼に比較して移植眼では有意な角膜厚および透明性の改善が認められた. *: $p < 0.05$.

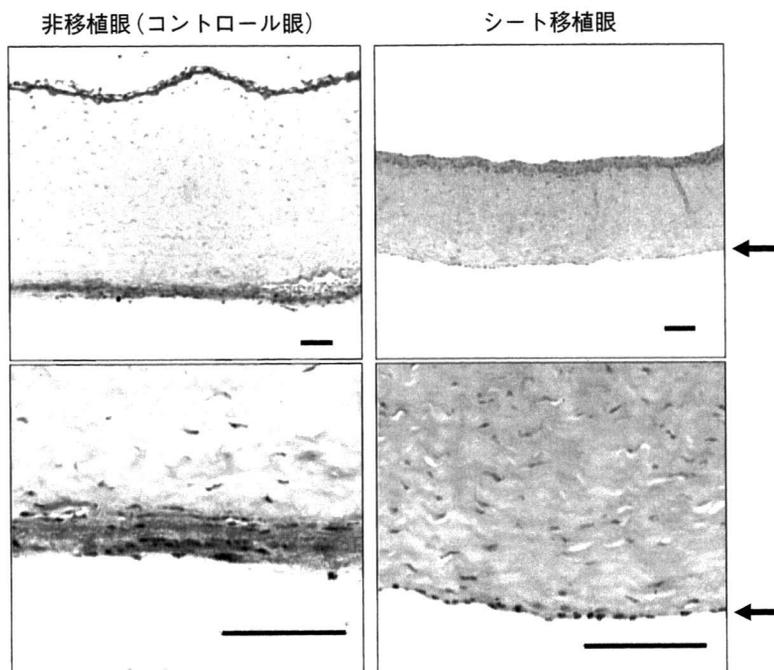


図 10 移植後1週間における角膜組織のHE染色像¹⁰⁾
 移植眼では単層の角膜内皮(矢印)の生着が認められ、角膜厚が正常化していた。 Scale bar : 100 μ m.

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。今後は多施設における臨床試験を実施し、著者らの開発した培養上皮細胞シート移植法を標準医療として確立することで、より多くの患者を治療できるよう研究開発を進めている。一方で、角膜内皮疾患の再生治療法はまだ研究段階であり、臨床応用されるに至っていない。角膜内皮の再生治療法が確立されれば、さらに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。今後、再生医療的アプローチにより角膜全層(上皮、実質、内皮)を再生することで、献眼に頼らず拒絶反応のない、より安全かつ有効な治療法を提供可能になると期待される。

文献

- 1) 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.
- 2) Cotsarelis, 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. et al. : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*, **349** : 990-993, 1997.
- 4) Tsai, R. J. et al. : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal cells. *N. Engl. J. Med.*, **13** : 86-93, 2000.
- 5) Koizumi, N. et al. : Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology*, **108** : 1569-1574, 2001.
- 6) Rama, P. 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. 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. 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. et al. : Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials*, **27**(4) : 607-614, 2006.
- 10) Sumide, T. et al. : Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J.*, **20**(2) : 392-394, 2006.

論説

再生医療の現状と展望

大家 義則^{*}, 西田 幸二^{**}

再生医療はregenerative medicineやtissue engineeringといった英語で表現されることが多い。この中でもtissue engineeringの概念を打ち立てたのはRobert LangerとJoseph P. Vacantiである¹⁾。LangerらによるとTissue Engineeringとは、「生物学や工学の原理を用いて損傷を受けた組織を再建するための機能的な代用物を作製する、多分野にまたがる新しい学問」である。その実現のためには、細胞、増殖因子、細胞外マトリックスの3因子が非常に重要であると考えられ、これらを組み合わせて目的とする組織の人工的な再建を行う。すなわち培養細胞を直接患者に投与して機能を再建するような方法も含まれるし、コラーゲンや人工のポリマーを用いて増殖因子などを投与することで機能を再建する方法も含まれる。また、その対象となると考えられる組織や臓器は非常に多岐にわたっており、皮膚、骨、軟骨、血管、肝臓、腎臓、角膜、膀胱、肺、歯などがその対象となると考えられる。この技術が発展すれば、対症療法的な現在までの治療方法から人工物を用いた組織再生という根治療法へのパラダイムシフトとなる大きな可能性を持っており、社会的にも大きな注目を浴びているものである。

また近年「幹細胞」という細胞が注目を浴びているが、ここで簡単に解説しておく。幹細胞とは「多分化能」(複数種類の細胞へ分化する能力)および「自己複製能」(自分自身と同じ性質を持った細胞を産生する能力)を有した未分化な細胞と定義される。すなわち、多分化能を利用して治療

に用いることができる多くの種類の細胞を供給できる可能性があるし、自己複製能を利用して多くの数の細胞を得ることができる可能性があり、再生医療に用いる細胞源として期待がかかっている。幹細胞には体性幹細胞と胚性幹細胞の二種類がある。体性幹細胞は骨髄、皮膚、肝臓、角膜などの各臓器や組織に存在する幹細胞で、それぞれの組織に少量存在して、ゆっくりとしか分裂しない(quiescent)が、何らかの刺激があると活発に分裂する。一般に小型で細胞質に対する核の比率(N/C比)が高いという形態的な特徴をもつものが多い。そして周囲の微小環境(niche)が、幹細胞の維持に極めて重要であると考えられている。さらに幹細胞から少し分化した、TA(transient amplifying)細胞が速い速度で分化増殖することで、大量の分化細胞を作り出す仕組みになっている。一方、胚性幹(ES)細胞は、受精卵から樹立される細胞で、胎盤以外のすべての細胞へ分化する多分化能(pluripotency)を有しており、試験管内(in vitro)で非常に活発に増殖する。この細胞から目的とする細胞への分化誘導が自由自在に行えれば、再生医療に用いる細胞源として有用であると考えられている。しかしながら樹立の際には生命の萌芽である受精卵を破壊しており、その研究および臨床での使用には倫理的な問題が付いて回る。

さて、もっとも早期に培養細胞を用いたヒトの治療が始まった例が培養表皮である。表皮の培養はアメリカのHoward Greenらのグループによっ

^{*}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

^{**}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・視覚科学分野教授

論説

て報告され、臨床応用されてきた。ヒトの表皮細胞 (keratinocyte) は生体外での培養が極めて困難であったが、Greenらは3T3細胞といわれる、マウス胎児由来の線維芽細胞を用いて keratinocyte を培養することでこの問題を解決した²⁾。さらに培養液の成分についても改良を行い、現在までGreenらによって開発された3T3細胞とウシ胎児血清を用いた培養方法は keratinocyte 培養のゴールドスタンダードとなっている。さらにGreenらのグループは、1980年からこの培養表皮をヒトの治療にも使用し始めた。具体的には熱傷の患者の治療であり、当初は腕などの部分的な熱傷の患者に用いられていたが、その後3度熱傷で体表の80パーセント以上の皮膚を損傷した極めて重症の従来の治療法によっては救命不可能である熱傷患者の治療にも成功している³⁾。これらの一連の成功は培養細胞をヒトの疾患の治療に用いて成功した世界初の例であり、極めて画期的なものであった。この培養表皮は現在までに多くの国で重傷熱傷に対する治療法として用いられ、多くの命を救っている。さらに、この治療は一部の機関で行われる研究的な治療法として開始されたものであるが、一般の医療への展開を見せ始めている。すなわち日本ではJ-TEC社が、韓国ではTego Scienceが、またアメリカではGenzyme社がそれぞれ規制当局の承認を得て培養表皮細胞の販売を行っている。すなわち、研究として始まった培養細胞を使った医療が一般的な医療として普及した初のケースである。

またわれわれのグループが取り組んでいる眼科領域とりわけ角膜の分野は、再生治療法の臨床応用が最も発展してきた分野のうちの一つである。角膜は上皮、実質、内皮と三層に分かれるが、そのいずれが障害されても角膜は混濁し、視力低下の原因となる。われわれは角膜上皮細胞が障害された患者に対して体性幹細胞 (角膜上皮や口腔粘膜上皮の幹細胞) を用いた角膜上皮の再生治療法

を開発して、臨床応用を行っている。角膜上皮の幹細胞は輪部といわれる角膜と結膜の境界部の基底部に存在しており、輪部の幹細胞から新しい上皮細胞が提供されることでturn overを繰り返していると考えられている (図1)。しかしながら、スティーブンスジョンソン症候群や眼類天疱瘡や熱・化学腐蝕などによって引き起こされる角膜上皮幹細胞疲弊症においては、角膜上皮およびその幹細胞が完全に消失して、周辺から結膜が侵入して角膜が白く混濁し、視力が低下する。治療法として、従来は他家由来の角膜を用いた角膜移植しかなかった。しかしながらこの治療法には大きな問題点が二つある。一つ目は深刻なドナー不足であり、治療を必要とする患者の数に対して献眼数が圧倒的に少ない。二つ目は拒絶反応であり幸運にも手術を受けることができたとしても、他家細

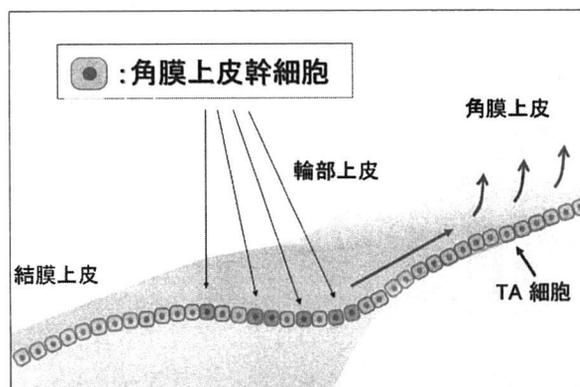


図1

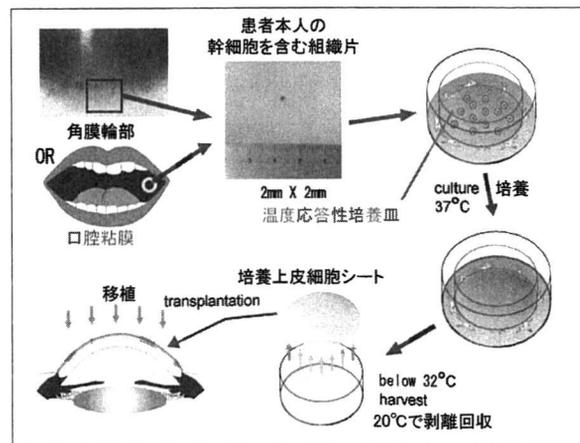


図2

論説

胞を用いるために拒絶反応によって術後早期に視力低下をきたすことが多いという点である。これらの問題を一挙に解決する方法として、われわれは自家培養角膜上皮移植および培養口腔粘膜上皮移植を開発した(図2)。具体的には移植を受ける患者自身から角膜上皮もしくは口腔粘膜上皮を採取し、培養して幹細胞を含む重層化上皮細胞シートを作製する。上皮細胞シートは温度応答性培養皿上で培養することで、20℃の低温処理のみによって細胞シートの回収が可能である。この方法によって酵素処理による細胞シート回収時の細胞へダメージを回避することが可能であり、カドヘリンなどの細胞間接着分子およびインテグリンなどの基底膜との接着分子を残したままで細胞シートの回収が可能である。すなわち培養上皮細胞シートをまさにready to useの状態を用意することが可能となったわけである。われわれのグループではこの画期的な方法を用いた上皮細胞シート移植の臨床応用にすでに成功しており、良好な成績を収めている(図3)⁴⁾。

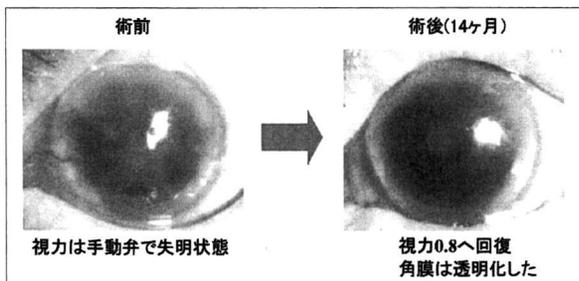


図3

しかしながらわれわれが臨床応用に成功しているのは角膜の上皮、実質、内皮の三層のうち上皮層についてであり、実質および内皮層の再生治療法については臨床応用にまで至っていない。その理由としては実質については角膜の光学的および力学的特性を満たすようなコラーゲン構造の人工的な再現が困難であり、現在までに臨床応用で用いることができるような人工実質が作成できていないことがあげられる。また角膜内皮については

ex vivoでのヒト角膜内皮細胞の培養は可能であり、動物実験においてもその有効性が証明されているものの⁵⁾、臨床応用する際に採取可能な自家細胞源が確立していないことがあげられる。上皮の場合には健常眼からの輪部組織の採取が倫理的に許容できうるものであったが、角膜内皮細胞は眼内に存在する細胞であり、健常眼からの採取が困難と考えられる。

これらの問題点のなかでも特に角膜内皮の自家細胞源の問題を解決する可能性のある手法として近年開発された人工多能性幹(iPS)細胞を用いた角膜再生治療法が考えられる。iPS細胞は京都大学の山中伸弥らによって報告された新型の多能性幹細胞であり、マウスおよびヒトの線維芽細胞に4つの遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を導入することで樹立が可能である^{6,7)}。これは完全に分化した体細胞に4つの遺伝子を導入することで細胞のリプログラミング(初期化)が起こり、多能性幹細胞を樹立できるというまさに画期的な報告であった。同様に分化多能性を持つ細胞としてES細胞があげられるが、iPS細胞は臨床応用するのにES細胞より有利な点がいくつかあげられる。第一に倫理的な問題があげられる。すなわちES細胞は樹立の際に受精卵の破壊を伴うという倫理的な問題がある。しかしながら、iPS細胞は体細胞から樹立されるものであり、ES細胞のような初期胚の破壊を伴わないので、この倫理的な問題を回避することができる。第二に自家細胞からの樹立が可能であることから、移植を必要とする患者自身の細胞を用いることで拒絶反応の危険がない自家細胞を移植できるという点があげられる。すなわち患者自身の線維芽細胞からiPS細胞を樹立し、これを治療に必要な細胞へと分化誘導することでその治療に用いることができれば、まさにオーダーメイドの患者自身の細胞を用いた夢のような細胞、組織の構築が可能となる可能性がある。そこで、われわれのグループは自家細胞を

論説

用いた治療法の重要な細胞源としてiPS細胞を考えており、iPS細胞の角膜内皮細胞への分化誘導法や誘導細胞の移植法について現在研究を進めているところである。

最後に、幹細胞を用いた医療がさらに広まっていくため課題について述べる。体性幹細胞は各組織に存在しているが、患者自身から採取して実際に臨床で用いるためには、採取の安全性が重要である。角膜上皮の幹細胞は輪部に存在しており、比較的容易に採取することが可能である。間葉系幹細胞は骨髄や脂肪に存在することが知られており、採取はやや侵襲的であるが、可能であると考えられる。一方で神経幹細胞は側脳室のsubventricular zone (SVZ) や海馬のsubgranular zone (SGZ) に存在すると考えられており、少なくとも現在の技術では患者からの安全な採取は極めて困難であると考えられる。ある細胞腫を細胞源とするためには、採取方法の改善や細胞源についての基礎的な研究を進めていかななくてはならない。次に胚性幹細胞についてだが、倫理的な問題および造腫瘍性の問題が非常に大きいと考えられる。アメリカではGeron社がヒトES細胞から分化誘導したoligodendrocyteの前駆細胞を用いた脊髄損傷に対する治療の治験をFDAが承認し、世界初のES細胞を用いた臨床研究が開始される予定となっている。日本では研究目的のES細胞の使用についても非常に厳しい規制があったが、今後臨床でのES細胞使用についても十分な議論

を尽くすべき時期である。また、iPS細胞はES細胞と同様の多能性を持ちながら、初期胚破壊の倫理的な問題が無いので、臨床応用には向いているかもしれない。しかしながら、iPS細胞やES細胞は極めて増殖力の旺盛な細胞であることから、分化誘導した細胞を移植に用いる際には、手術前に造腫瘍性を完全に否定することが重要であると考えられ、造腫瘍性の検査のための適切なプロトコルの作製が求められる。

このように再生医療は培養表皮やわれわれが開発した培養口腔上皮移植シート移植など、体性幹細胞を用いた一部の治療法が臨床応用の段階であり、その他の多くは研究段階である。これらの先進的な治療法には大きな期待がかかっている一方で、克服すべき課題を解決していき、臨床応用を実現していく必要がある。そしてわれわれは臨床を開始するだけでなく、臨床応用された治療方法をより安全でより有効なものとし、広めていくように努力していかなければならないと考える。

- 1) Science 1993; 260: 920.
- 2) Cell 1975; 6: 331
- 3) N Engl J Med 1984; 311: 448.
- 4) N Engl J Med 2004; 351: 1187.
- 5) FASEB J 2006; 20: 392.
- 6) Cell 2006; 126: 663.
- 7) Cell 2007; 131: 861.