

博士論文

論文題目 角膜再生医療用新素材による水疱性角膜症の
治療法開発に関する研究

氏 名 吉田 絢子

目次

I.	要旨	・・・・・・・・・・・・・・・・	3
II.	序文	・・・・・・・・・・・・・・・・	4
III.	方法		
	i.	角膜内皮細胞移植用キャリアの新規開発	11
	ii.	人工角膜内皮グラフトの作製と動物眼への移植治療	18
IV.	結果		
	i.	角膜内皮細胞移植用キャリアの新規開発	23
	ii.	人工角膜内皮グラフトの作製と動物眼への移植治療	28
V.	考察	・・・・・・・・・・・・・・・・	33
VI.	謝辞	・・・・・・・・・・・・・・・・	43
VII.	参考文献	・・・・・・・・・・・・・・・・	44

I. 要旨

ブタ由来アテロコラーゲンを原料に、透明かつ半球面形状の角膜再生医療用コラーゲンビトリゲル（CV-CERT）を開発した。CV-CERTは、アルブミンを良好に透過し、ウサギ眼内で炎症を惹起しなかった。CV-CERT上にヒト角膜内皮細胞（HCEC）を培養し人工角膜内皮グラフトを作製、ウサギ角膜浮腫モデルに移植した。治療群は、対照群・無治療群に対し術14日後まで、有意に平均角膜厚を改善した。摘出グラフト上、治療群のHCEC生存は良好で、全解析群においてホスト角膜内皮細胞の侵入はなかった。CV-CERTは培養HCEC移植用キャリアとして有用で、人工角膜内皮グラフトは動物眼移植において治療効果を示した。

II. 序文

角膜混濁による失明者は世界で 160 万人にのぼると推測されており、角膜疾患は白内障、緑内障、加齢黄斑変性に次ぐ世界の主要な失明原因となっている¹。角膜とは、眼球前部を構成する組織である。眼球壁として機械的強度を保つだけでなく²、透明で曲面形状を持つというその他の体組織と大きく異なる特徴を持つ。角膜はその透明性により光を眼球内に通し、そのなめらかな曲面形状がレンズの役割を果たすことにより網膜上に焦点を結ぶ手助けをする（図 1A）³。角膜には約 40 ジオプターの屈折力があるとされ、これは実に眼球全体の屈折力の三分の二を担っている⁴。

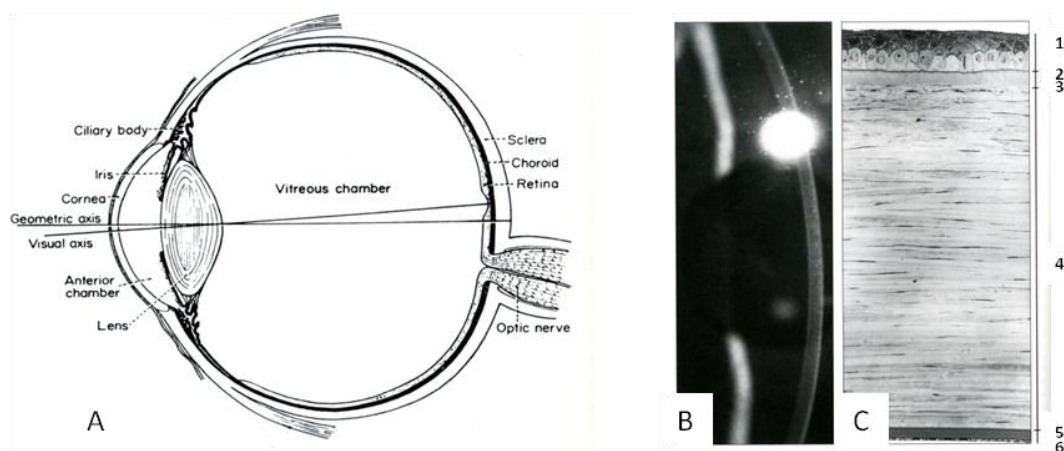


図 1 眼球および角膜解剖（The Eye および Cornea より引用）

（A）眼球模式図。角膜 Cornea と虹彩 iris の間の空間は前房 anterior chamber とよばれ前房水で満たされる。水晶体 lens の後面の硝子体腔 vitreous chamber には硝子体 vitreous body が存在する。（B）正常角膜の細隙灯顕微鏡による高倍率での観察像（C）角膜組織像。上皮（1）、上皮基底膜（2）、ボウマン層（3）、実質（4）、デスメ膜（5）、内皮（6）。

解剖学的には、角膜は大きく三層に分けられる。最外層から、上皮層、実質層、内皮層とよばれる（図 1C）⁵。上皮層は非角化重層扁平上皮細胞よりなりボウマン膜を基底膜としてもち、外部からの刺激に対し生物学的防御をする働きをもつ^{6,7}。角膜厚約 520 μm のうち実質は厚みの大半を占め、機械的強度を保つと同時にコラーゲン線維が規則的に配列することで透明な組織となっている⁸。デスメ膜は内皮細胞の基底膜として存在し、たとえば鉗子分娩など外傷によるデスメ膜の破たんは前房水の流入による角膜浮腫を招く。内皮細胞は単層で六角形の規則正しく配列したモザイクパターンを示す。角膜の最内層で前房水と接しており、前房水の角膜実質内への侵入を防ぐバリア機能^{9,10}と、角膜実質中の水分をくみ出すポンプ機能とをもち^{11,12}、角膜の透明性を維持する役割がある。上皮細胞は生涯にわたり再生可能であるのに対し、内皮細胞はヒトにおいては生体内で再生されないとされている¹³。

水疱性角膜症とは、何らかの原因で角膜内皮細胞がある限度を超えて減少した結果、角膜実質・上皮の浮腫を生じ、視力低下のほか上皮下水分貯留によるびらんなどを伴う病態を指す。ヒトの角膜内皮細胞数は正常で約 3000 個/ mm^2 であり、およそ 500 個/ mm^2 以下になると水疱性角膜症になるといわれている^{14,15}。角膜浮腫の状態が長期間続くと上皮下に線維性瘢痕を生じ不可逆的な混濁となる。臨床的には角膜厚の増加、内皮細胞数の減少、上皮浮腫・びらんなどが観察される（図 2）。原因として Fuchs 角膜ジストロフィによるもののほか¹⁶、白内障手術・レーザー虹彩切開術など内眼手術に続発するものが多い^{17,18}。

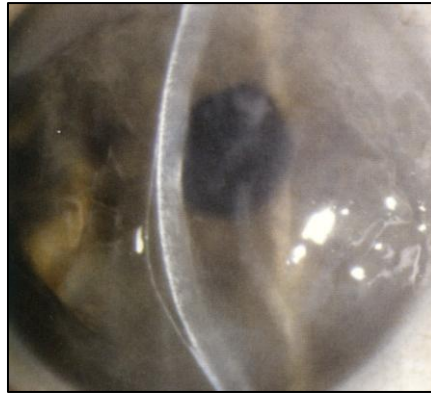


図 2 水疱性角膜症の細隙灯顕微鏡写真（Cornea より引用）
著明な角膜浮腫、角膜混濁のほか角膜中央部下方に巨大ブラの形成がみられる。

上述のように一度傷害をうけた内皮細胞はヒトの生体内で再生しないため、現在のところ角膜浮腫、水疱性角膜症の根本的治療法は角膜移植だけである。薬物治療は対症療法としてのみ用いられる。水疱性角膜症に対する角膜移植としては、古典的には角膜全層を取り換える全層角膜移植 PK (penetrating keratoplasty) が行われるが、近年では DSAEK (Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty) と呼ばれる内皮細胞（と実質の一部）のみを移植する方法もさかんになってきている（図 3）¹⁹⁻²²。DSAEK が PK よりも好まれる理由として、術後回復の早さ、創の強度が保てること、術後不正乱視が少ないこと、拒絶反応の起こりにくく、かつ拒絶反応の程度が軽いことなどが挙げられる²³。

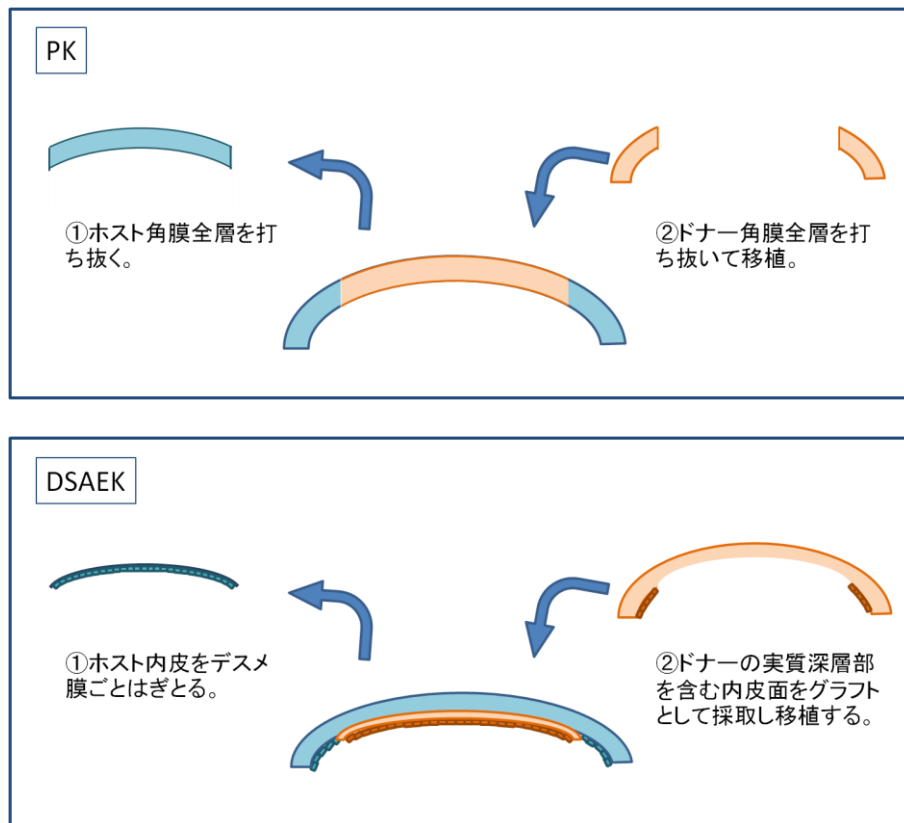


図3 全層角膜移植 PK と角膜内皮移植 DSAEK 模式図

PK では傷害部位によらず角膜全層を取り換えるのに対し、DSAEK では角膜内皮（とその周辺組織）のみを取り換える。DSAEK は術後回復の早さ、創の強度維持、術後不正乱視の軽減、拒絶反応リスクの低減などの利点がある。

角膜移植には問題点がいくつかある。まず、世界的にドナー角膜は圧倒的に不足している²⁴⁻²⁶。日本国内においても近年減ってきているものの平成26年3月末で約2200人の待機患者がいるとされる²⁷。また、ドナー角膜は献体から採取されるため、特に国内において、ドナーが高年齢であることによるドナー角膜の質の低下も問題となる。米国からの輸入角膜を使う方法もあるが、高額である。角膜は無血管組織であることから immune-privileged とされ移植の際の拒絶反応も他の臓器移植に

比べ少ないとされている²⁸。しかし、術後の移植片不全の主要因は拒絶反応であり、およそ 30%を占める^{29,30}。

角膜移植に代わる治療方法を模索する試みが近年なされてきている。たとえば Boston Keratoprosthesis と呼ばれる人工角膜が開発され FDA（米国食品医薬品局 Food and Drug Administration）の承認のもと主に米国で臨床応用がなされている^{23,31}。アクリル樹脂製の前後の部品の上にドナー角膜（実質）をはさみこみ移植される。複数回の角膜移植後や角膜輪部機能不全など通常のドナー角膜移植では視力回復の望みの低い眼に対してよい適応ではある。その反面、移植にドナー角膜を必要とし、また感染や創融解などの問題もあり、実際の適応はまだまだ限られているのが現状である²³。

再生医療とは失われた臓器・組織の機能を、移植などの方法により再建し機能を回復させようとする医療技術を指す。移植用角膜の安定供給、質の向上、拒絶反応の低減をめざした、角膜移植に代わる角膜疾患の新しい治療法を開発する上でも非常に注目されている³²。角膜の再生医療に関する報告は増えてきており^{33,34}、例をあげると、角膜上皮シート移植に関するもの³⁵、角膜内皮細胞移植に関するもの³⁶⁻³⁸などがある。

ヒト角膜内皮細胞（HCEC; human corneal endothelial cells）は in vivo では再生されず、また in vitro でも培養、増殖させるのが非常に難しい。しかし 2000 年ごろより HCEC の in vitro での増殖培養に成功した報告がいくつかある。たとえば、Chen らの報告ではウシ胎児血清（FBS: fetal bovine serum）を含む培養液に FGF (fibroblast growth factor)、EGF (epidermal growth factor)、NGF (nerve growth factor)といった複数の成長因子とビタミン類を加え HCEC の培養に成功したとし³⁹、また、天野らはウ

シ角膜内皮細胞の産生した細胞外マトリクスでコートした培養皿を用い、FBS、bFGFを含む培養液にてHCEC培養に成功したとした⁴⁰。このような培養HCECを治療に応用する研究が行われている^{41,42}。角膜内皮細胞移植を考えると重要なのは、培養した角膜内皮細胞の移植方法である。内皮細胞シートのみを移植する方法、細胞懸濁液を眼内に注入する方法、もしくは何らかの土台（キャリア）にのせて移植する方法などが考えられる。角膜内皮細胞シートのみの移植は技術的に非常に難しい。理由は、シートを移植すべき前房内は直径約11 mm、最大深度約3 mmの非常に狭い空間であり、この中に単層の細胞シートを傷めずに挿入し角膜後面に接着させるのは技術上ほぼ不可能であると言ってよい。また細胞懸濁液を眼内に注入する方法では細胞を本来目標とする角膜後面のみに沈着させるのが困難である。実際我々のグループの過去の実験でも隅角、虹彩といった組織への異所性沈着がみられた。これは緑内障などのリスクとなる。これらの方法に比べ角膜内皮細胞をキャリア上に培養し、キャリアとともに移植する方法は、DSAEKに近い形となり最も臨床応用しやすいと考えられる。

角膜内皮細胞キャリアとして専用開発された素材は今までにない。そのため市販されているコラーゲンビトリゲル膜をキャリアとして用いた報告がある³⁸が、この報告では術後数日でビトリゲル膜は角膜後面から脱落してしまっている。コラーゲンビトリゲル（CV; Collagen Vitrigel）は元来、三次元細胞培養のために竹澤らによって2004年に開発された⁴³。硝子化過程を経ることで、通常のコラーゲンゲル膜にくらべコラーゲン線維密度を約100倍にまで上げることに成功したほか、物質透過性がよいという特徴がある。しかし、この細胞培養用市販CVを角膜内皮細胞キャリアとして用いるにはいくつか問題点がある。まず、市販CVの形状は平坦で

あることから曲面をもつ角膜には完全に密着させることができず、前述の既報の様に、移植片脱落の原因となる。また、市販 CV はとても薄く破れやすいため内皮細胞をいためずに前房内に挿入し、広げかつ角膜後面に張り付けるのは技術的に非常に難しい。さらに、市販 CV はウシ由来のネイティブコラーゲンであり作製過程でウシ血清も用いられている。反芻動物由来物質を人体に投与するのは慎重になる必要がある。くわえてネイティブコラーゲンは、その両端にあるテロペプチドと呼ばれるらせん状構造により、テロペプチドを酵素的に取り除いたアテロコラーゲンよりも抗原性が高いとする報告もある⁴⁴。

これらの問題点を踏まえ、本実験では角膜内皮細胞移植用キャリアとして新しいコラーゲンビトリゲル膜を開発し、その機能評価を行った。またその新規開発されたキャリアを土台とした人工角膜内皮グラフトを実際に作製、動物眼に移植し治療効果を検討したので報告する。

III. 方法

i. 角膜内皮細胞移植用キャリアの新規開発

ブタ由来アテロコラーゲンビトリゲル膜の開発

従来型の CV はウシ由来ネイティブコラーゲンより作製され、作製過程においても FBS が用いられている⁴³。またこれは AGC テクノグラス（静岡市）より市販されていて、 1.0 cm^2 あたり 0.5 mg のコラーゲンを含有している。本実験では以下の手順によってブタ由来アテロコラーゲンを用いて、再生医療用コラーゲンビトリゲル膜（collagen vitrigel for regenerative medicine; CV-RM）および角膜内皮細胞移植用コラーゲンビトリゲル膜（collagen vitrigel for corneal endothelial regenerative treatment; CV-CERT）を作製した。CV-RM および CV-CERT は 1.0 cm^2 あたり $2.0 \pm 0.1\text{ mg}$ のコラーゲンを含有している。まず同量の無血清培養液と 1.0% 再生医療用ブタ由来アテロコラーゲン酸性溶液をまぜあわせ 0.5% アテロコラーゲンゾルを作製した。なお、無血清培養液は Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）, Low Glucose, Pyruvate（Life Technologies、米国）に 20 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)（Life Technologies）および 100 U/ml ペニシリン・100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン（Life Technologies）を含有する。アテロコラーゲン酸性溶液は凍結乾燥粉末の NMP コラーゲン PS（日本ハム、大阪市）を超純水に溶解して調製した。CV-RM は 4.0 ml のコラーゲンゾルを内径 35 mm の平坦底をもつシリンドー内で、ゲル化、硝子化、再水和を行い作製された⁴⁵。コラーゲン線維間に架橋（クロスリンク）させて強度と透明性をあげるため⁴⁶、CV-RM にフナー UV-ークロスリンカー（FS-1500、フナコシ、東京都）にて波長 254 nm の紫外線を以下の 5

条件で照射した。条件(1)–(3)：再硝子化した CV-RM に 800、1200、1600 mJ/cm² の紫外線照射を行い再水和した。その後裏返して同様の操作を 1 回行った。条件(4)、(5)：再硝子化した CV-RM に 600、800 mJ/cm² の紫外線照射を行い再水和した。その後裏返して同様の操作を 3 回繰り返した。したがって各条件の紫外線の総照射量は、(1) 1600、(2) 2400、(3) 3200、(4) 2400、(5) 3200 mJ/cm² となる。

透明性評価

最適な紫外線照射条件を検討するため、種々の条件下で CV-RM の透明性評価を行った。紫外線未照射の CV-RM および紫外線総量 2400 mJ/cm² (600 mJ/cm² x 4) の CV-RM をスペクトロフォトメーター (V-550、ジャスコインタナショナル、東京都) にフィルムホルダー (FLH-267、ジャスコインタナショナル) を用いてセットし、各 CV-RM の吸収スペクトルを波長 200 から 700 nm の範囲で測定した。また上記 5 条件と紫外線未照射の CV-RM において、波長 400 nm に対する吸収スペクトルを測定した。各条件のサンプル数は 3 である。

角膜内皮細胞移植用キャリアの作製

角膜内皮細胞移植用キャリア CV-CERT は、透明で薄くかつ手術操作のための適度な強度をもち角膜の湾曲に沿った形状である必要がある。これらの条件を満たすため、まずカスタムメイドした鋳型 (図 4) を用い、曲率半径 (R) 8 mm の半球面形状の CV 膜を作製し、次に紫外線照射を行う二段階でもって CV-CERT を作製した。

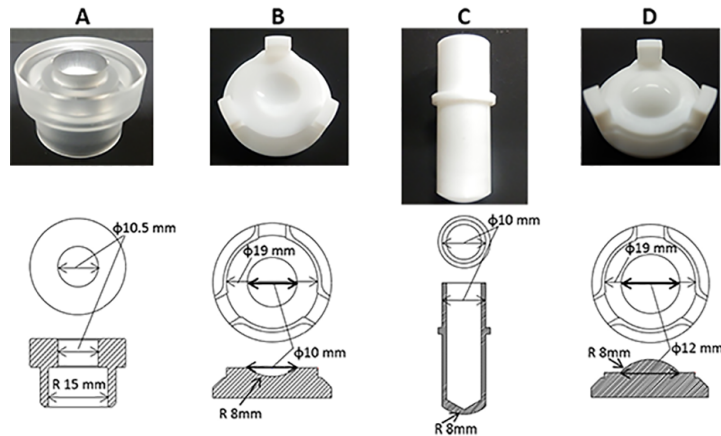


図4 CV-CERTの鋳型の外観および設計図

(A) 内径 15 mm のシリンダー。(B) 曲率半径 (R) 8 mm、深さ 2.0 mm の凹面をもつ底板。(C) R 8 mm の球面形状の先端を持つ外径 10 mm のピストン。(D) R 8 mm、高さ 2.7 mm の凸面をもつ底板。A はアクリル樹脂、B から D はポリテトラフルオロエチレン (PTFE、テフロン) 製である。

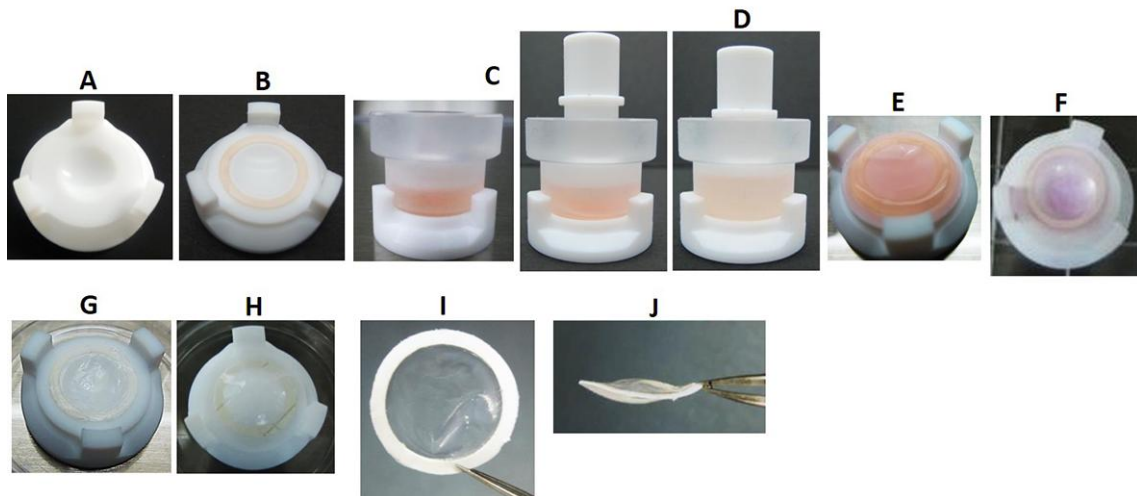


図5 CV-CERTの作製手順

(A、B) 内外径 11/14 mm のナイロン棒を凹面底板にあらかじめのせておく。(C) シリンダーを底板と組み合わせアテロコラーゲンゾルを中に注ぐ。(D) ゲル化の間ピストンをシリンダー内に挿入しておく。(E、F) ピストンとシリンダーを取り除きゲルを乾かし硝子化させる。(G) CV膜を再水和させ、(H) 凸面底板に移動させ硝子化させる。その後紫外線照射を行う。(I、J) 作製された CV-CERT の外観。

R 8 mm、深さ 2.0 mm の凹面底板（図 4 B）にアテロコラーゲンゾルに浸した内径 11/14 mm のナイロン支持体をあらかじめのせた。内径 15 mm のシリンダー（図 4 A）と底板を組み合わせ、アテロコラーゲンゾルを 0.7 ml をそそぎ入れた（図 5 A-C）。先端が R 8 mm、外径 10 mm のピストン（図 4 C）をシリンダーにセットし 2 時間ゲル化させた（図 5 D）。ピストンとシリンダーを取り除き乾燥、硝子化させた（図 5 E、F）。続いて再水和した CV 膜を底板からはずし、R 8 mm、高さ 2.7 mm の凸面底板（図 4 D）上に移動させたのち再硝子化した（図 5 G、H）。再硝子化された CV 膜に紫外線を照射し、CV-CERT を完成させた（図 5 I、J）。紫外線照射量に関しては前述の透明性評価の結果に基づいて決定した。

膜透過性評価

CV-CERT の膜透過性を膜透過性測定装置（Permcell、ビードレックス、福岡県）を用いて測定し、市販 CV（CA-CV）と比較した（図 6）。CV-CERT 4 枚および CA-CV 3 枚の測定を行った。Permcell は 2 つのチャンバーからなっている。測定対象の薄膜をチャンバー間に挟み込み、一方のチャンバーに 30%FBS、もう一方にリン酸緩衝液（PBS）をいれ一定時間経過後、PBS 側から試料を採取し透過タンパクの大きさと量とを測定した。測定開始後 1 時間、1 日、3 日および 5 日後に各 100 μ l ずつ採取し、すべてのサンプリングが完了するまで -80°C の冷凍庫で保存した。

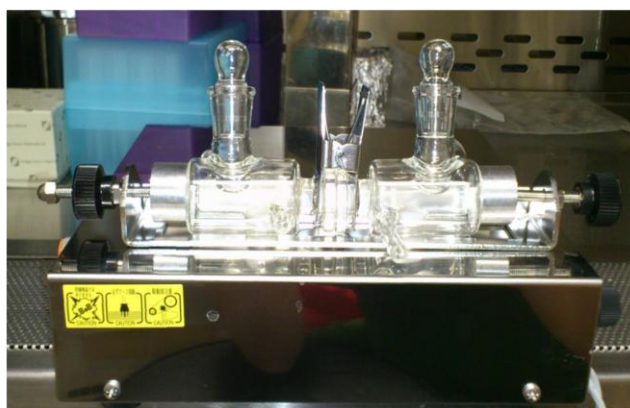
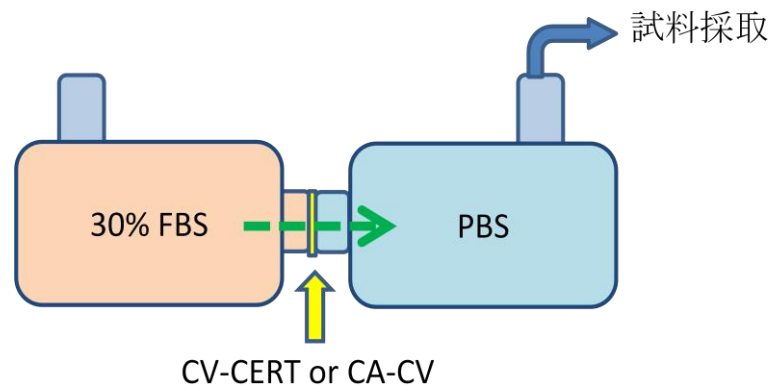


図6 膜透過性装置模式図（上）と実物の写真（下）

膜透過性装置 Permcell は2つのチャンバーよりなる。一方に 30% FBS、もう一方に PBS を同量入れ、チャンバー間に測定対象である CV-CERT もしくは CA-CV を挟み込んで実験を行った。30% FBS 中のタンパクは薄膜を通して PBS 側に拡散する。試料は PBS 側から、1 時間、1 日、3 日、5 日後に 100 μ l ずつ採取した。

透過タンパクの大きさを測定するため SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) を行った。試料溶解後 35 μ l を電気泳動に用い、ゲル (Any kD ミニプロティアン TGX プレキャストゲル、Bio-Rad、米国) の銀染色を行った (Silver Stain II Kit、和光純薬工業、大阪府)。溶解した試料 10 μ l はタンパク量の測定のためビスンコニン酸 (bicinchoninic acid; BCA) アッセイに用いた。BCA アッセイキット (Thermo Fisher Scientific、米国) を用いプレートリーダー

(ARVO、パーキンエルマージャパン、東京都)を用いて 560 nm の吸光度を求めた。吸光度スペクトルより各試料のタンパク濃度を算定した。タンパク透過率は各試料のタンパク濃度を 30% FBS のタンパク濃度で除して算出した。

動物実験

すべての動物実験は ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Researchおよび東京大学動物実験実施規則に基づいて行われた。3.5 kg から4.5 kgのオスのNew Zealand White Rabbitを使用した。麻酔はケタミン (50 mg/kg体重) およびキシラジン (15 mg/kg体重) の筋肉注射にて十分に深く導入し、0.4%オキシブプロカイン点眼を術前、術中にかけて使用した。検体採取は深麻酔後ペントバルビタールの心腔内過量投与により安楽死させ行なった。

生体適合性評価

CV-CERTの生体適合性を評価するためウサギ角膜に2種類の移植実験を行った(図7)。CV-CERTの角膜実質内移植をウサギ4羽の右眼に実施した。ウサギ眼角膜周辺部に角膜厚のおよそ半分ほどの深さの創口を作製し、そこから角膜実質中間層をナイフ (Katena Eye Instruments、米国) で剥離切開した。直径8 mmの皮膚生検用パンチ (カイインダストリーズ、岐阜県) でCV-CERTを打ち抜き、創口より角膜実質内に移植した。

CV-CERTの前房内 (角膜後面) 移植をウサギ4羽の右眼に実施した。トロピカミド・塩酸フェニレフリンにて散瞳しヘパリンを少量前房内に注射したのち、ウサギ

角膜周辺部より長さ3 mmの創を作製し前房内へ貫通させた。直径3 mmに打ち抜いたCV-CERTを前房内に挿入しエアタンポナーデにより角膜後面に張り付けた。CV-CERTの12時の位置を一針10-0ナイロンで縫合し角膜に固定した。

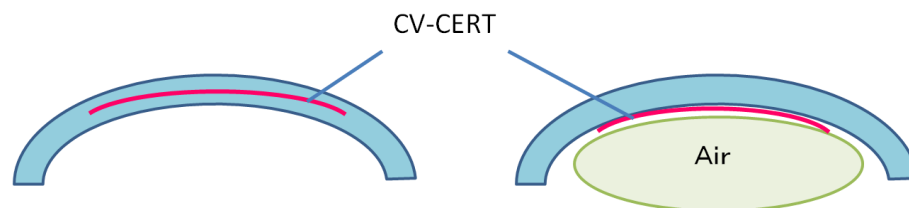


図7 CV-CERT生体適合性試験模式図

左が実質内移植、右が前房内（角膜後面）移植の模式図。ウサギ角膜に図のようにCV-CERTの移植手術を行った（各群N = 3）。

これらのウサギは術後一ヵ月（POM1）まで毎週、それ以降はPOM4まで毎月、細隙灯顕微鏡による観察および前眼部写真撮影を行った。POM4で殺処分を行い、採取した眼球はホルマリン固定後パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色を行った。

CV の形状による角膜後面への付着能の評価

曲面形状がウサギ角膜に隙間なく付着するか確認するため、CV-CERT もしくは CV-RM（紫外線照射あり）をウサギ角膜後面に付着させる実験を行った。各群3羽ずつ右眼に移植した。前実験同様3 mmの創口からCV-CERT もしくは CV-RM をウサギ前房内に折りたたんで挿入し、前房内で展開、角膜後面にエアタンポナーデに

より付着させた（図 7 右）。CV 膜と角膜間に縫合は置かなかった。またデスメ膜は除去していない。POM1 まで毎週細隙灯顕微鏡による観察と前眼部の撮影を行った。

ii. 人工角膜内皮グラフトの作製と動物眼へ移植治療

CV-CERT 上へのヒト角膜内皮細胞の播種・培養と組織学的検討

CV-CERT 上にヒト角膜内皮細胞 HCEC を播種する方法について検討した。播種するための HCEC は、研究用輸入ドナー角膜（Sight Life、米国）から採取し培養した。培養法については既報に準じて行った⁴⁷。ドナー角膜のデスメ膜を剥離しコラゲナーゼ A（Sigma-Aldrich、米国）で処理したのち、トリプシン・EDTA（Sigma-Aldrich）に incubate して HCEC を採取、アテロコラーゲンコートした培養皿に播種し、培養・継代した。培養液は low-glucose DMEM（和光純薬工業）に 10% FBS、20 ng/mL basic fibroblast growth factor（和光純薬工業）、0.3 mmol/L アスコルビン酸 2 リン酸（和光純薬工業）および抗生剤抗真菌剤（Sigma-Aldrich）を含有する。

次に、湾曲した CV-CERT 上に均一に HCEC を播種する方法を検討した。HCEC は 3 から 5 継代させたものを用いた。まず再水和した CV-CERT を 12 ウェルプレートに張り付けいったん乾燥させた。こうすることで CV-CERT が底面に張り付く形で平坦になる（図 8 A）。この上から HCEC を 1 ウェルあたり 1.3×10^6 個播種し一晩培養した。翌日ウェルの底から CV-CERT を丁寧にはがし内径 9.8 mm の O リング上に浮かせるように乗せ培養を一週間継続した（図 8 B）。



図 8 CV-CERT 上への細胞の播種法の開発

PBS にて再水和した CV-CERT を 12 ウェルプレート of ウェル底面に張り付けいったん乾燥させる (A)。その上に HCEC を 1 ウェルあたり 1.3×10^6 個播種し一晩培養した。翌日ウェルの底面から CV-CERT を丁寧にはがし、O リング上に浮かせるように乗せ一週間培養を継続した(B)。

正常 HCEC が CV-CERT 上に均一に培養されているか確認するため組織学的検討を行った。上記のように CV-CERT 上に HCEC を培養した人工角膜内皮グラフトに 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)、アリザリンレッド S、HE 染色を行った。画像処理ソフトウェア ImageJ (National Institutes of Health、米国) を用いて、DAPI 画像のうち 4 か所の 0.1 mm 四方内の細胞数を求め、単位面積(mm^2)あたりの細胞数を算出した。CV-CERT の厚みを Image J を用いて HE 染色画像より測定した。CV-CERT 上に培養した HCEC に対し ZO-1 (zonula occludens-1) および Na, K-ATPase (sodium-potassium adenosine triphosphatase) の免疫染色を行った。一次抗体はそれぞれ、rabbit anti-ZO-1 polyclonal antibody (#40-2200、Invitrogen、米国) および Anti-Na⁺/K⁺ ATPase α -1 (#05-369、Merck Millipore、ドイツ) を用いた。二次抗体として Alexa Fluor 488 (Invitrogen) を用いた。

ウサギ水疱性角膜症モデルの作製と人工角膜内皮グラフトの移植

まず、術後のグラフト上残存 HCEC の追跡のため、CV-CERT 上に播種する HCEC の蛍光染色を行った。使用されたのは PKH26GL (Sigma Aldrich) という赤色蛍光色素で長期間の追跡が可能となるものである。その後上述と同様に染色された HCEC を CV-CERT 上に播種・培養し、手術に用いた。

ウサギ眼における水疱性角膜症モデルとしてデスメ膜を内皮細胞ごと除去する手術を行った。そこに人工角膜内皮グラフト (CV-CERT 上に HCEC 培養したもの) 移植もしくは CV-CERT 単独の移植を続けて行った (図 9)。人工角膜内皮グラフト移植したものを治療群 (N=9) とし、CV-CERT 単独移植したものを対照群 (N=3)、デスメ膜剥離のみのものを無治療群 (N=3) とした。手術は、トロピカミド・塩酸フェニレフリンで散瞳したウサギ右眼にヘパリン・エピネフリンを混入したオキシグルタチオン溶液前房灌流下で行った。デスメ膜剥離のため先端形状が上向きかぎ状の逆シンスキーフックを用いて、直径 8 mm の大きさを角膜内皮面を擦過したのちデスメ膜をはがし取った。角膜周辺部に 3 mm の創口作製後、天野・外山式 DSAEK グラフトインサーター⁴⁸を用いて、直径 6 mm に打ち抜いた人工角膜内皮グラフトもしくは CV-CERT 単独を挿入した (図 10)。エアタンポナーデをしてグラフトを角膜後面にデスメ膜剥離部と同心円状に張り付けた。創口は 10-0 ナイロンにて縫合した。リン酸デキサメタゾン 1 mg、ゲンタマイシン 3 mg の結膜下注射およびシクロスポリン (10 mg/kg 体重) の筋肉注射を施行して術終了とした。

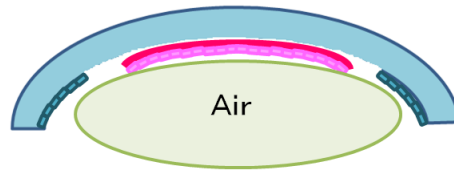


図9 人工角膜内皮グラフト移植模式図

ホストデスメ膜を直径 8 mm で内皮細胞ごとにはがし取り、直径 6 mm のグラフトを同心円状にはりつけた。グラフト・ホストデスメ膜間には実質が露出した状態になっている。



図10 天野・外山式 DSAEK グラフトインサーターに CV-CERT を装填したところグラフトは内皮面を上セットし（左）、内皮保護のため少量の粘弾性物質をのせた。透明部を下に押し下げるように本体にセットするとグラフトがロール状になる。本体を反転し手元のレバー操作によってグラフトを押し出すことができる（右）。この図では視認性のため CV-CERT はトリパンプブルーにて着色してある。

術後（POD）1、3、7、10、14 日目に細隙灯顕微鏡による観察・前眼部写真撮影、パキメーター（SP-100、トーマーコーポレーション、愛知県）による中央部角膜厚測定を行った。測定は 1 眼あたり 3 回実施し平均値をとった。術直後同様、観察日にはリン酸デキサメタゾン 1 mg、ゲンタマイシン 3 mg の結膜下注射およびシクロスポリン（10 mg/kg 体重）の投与を行った。POD14 に摘出した眼球より角膜切

片を切り出して CV-CERT を採取した。DAPI 染色を施行、蛍光顕微鏡を用いて CV-CERT 表面の観察を行った。

統計解析

統計解析として透明性評価および膜透過性評価では Student の t 検定を行った。

人工角膜内皮グラフト移植での中央部角膜厚の比較では分散分析後 Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。それぞれ P 値 0.05 以下のものを有意差があるとした。統計処理ソフトウェアは JMP Pro 9.0.2 (SAS Institute、米国) を用いた。

IV. 結果

i. 角膜内皮細胞移植用キャリアの新規開発

CV-RM の透明性における紫外線照射の効果

ブタ由来アテロコラーゲンを用いて再生医療用コラーゲンビトリゲル薄膜 CV-RM を作製した。また、CV-RM に紫外線を照射しコラーゲン線維間に架橋をもたらすことで、CV-RM に強度を持たせかつ透明性を向上させた。図 11 A は紫外線未照射の CV-RM (灰色ライン) と総紫外線照射量 2400 mJ/cm^2 ($600 \text{ mJ/cm}^2 \times 4$) の CV-RM (黒色ライン) における波長 200 から 700 nm に対する吸収スペクトルである。両者とも波長 300 nm 以下においては吸収率が極端に増加しているのに対し、可視光領域である 400 から 700 nm の間では徐々に減少している。図 11 B は紫外線照射方法を 5 通り変えた CV-RM における波長 400 nm の吸収率を表している。紫外線照射量 2400 mJ/cm^2 ($600 \text{ mJ/cm}^2 \times 4$) のものがもっとも透明性が高かった。この結果より CV-CERT 作製時の紫外線照射量は 2400 mJ/cm^2 ($600 \text{ mJ/cm}^2 \times 4$) と決定した。

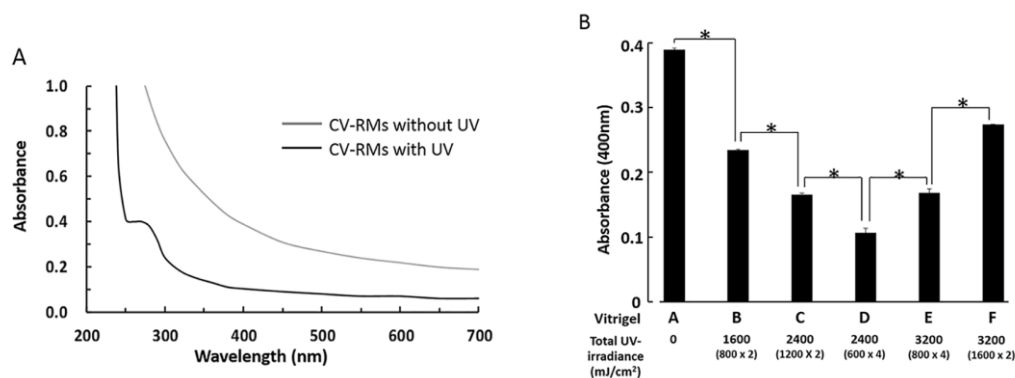


図 11 CV-RM の透明性における紫外線照射の効果

(A) 波長 200 から 700 nm に対する、紫外線未照射 CV-RM (灰色ライン) と照射紫外線総量 2400 mJ/cm² (600 mJ/cm² x 4) の CV-RM (黒色ライン) の吸収スペクトル。両者とも 300 nm 以下では吸収率が著しく高く、400 nm 以上の可視光領域では徐々に減少していた。(B) 様々な紫外線照射量の CV-RM における波長 400 nm の吸収率。各群 N=3。誤差範囲と*はそれぞれ標準偏差およびスチューデント t 検定で P<0.01 以下を示す。

CV-CERT の作製

上記の結果を踏まえ、CV-CERT は以下のように作製された。再硝子化された凹底鋳型上の薄膜に対し 600 mJ/cm² の紫外線を照射後、再水和した。その後凸底鋳型上に移動させ 600 mJ/cm² の紫外線を照射、再水和した。この手順を再度反復し照射紫外線総量を 2400 mJ/cm² とした。なお、CV-CERT の作製および透明性評価の実験は共同研究機関である農業生物資源研究所の竹澤俊明氏および押方歩氏のもとで行われた。

膜透過性評価

CV-CERT の透過タンパクの大きさを測定し市販 CV (CA-CV) と比較するため膜透過性評価を行った。30%FBS 中からこれらの CV 膜を通過したタンパクの大きさと量をそれぞれ SDS-PAGE と BCA アッセイにて測定した (図 12)。SDS-PAGE では CA-CV、CV-CERT ともアルブミンの大きさ (約 66 kD) のバンドを確認でき良好な透過性を示した (図 12 A)。CV-CERT のタンパク透過率は 1 日目から CA-CV より高く、5 日目には有意に高かった ($p = 0.032$ 、図 12 B)。

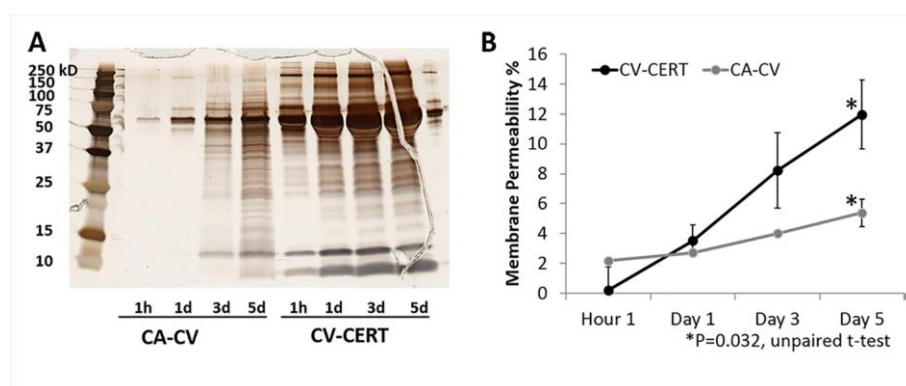


図 12 CA-CV および CV-CERT の膜透過性評価

(A) SDS-PAGE 後ゲルの銀染色を行った。左側のバンドは CA-CV、右側は CV-CERT のもの。アルブミンのサイズ (約 66 kD) のバンドはともに確認でき、良好な膜透過性をしめした。(B) BCA アッセイにて測定されたタンパク濃度から求めた CV-CERT (黒色) と CA-CV (灰色) のタンパク透過率の時間推移。縦軸は 30% FBS に対する透過率を示す。5 日目には 2 群の差が有意に大きかった (* $P=0.032$ 、スチューデント t 検定)。誤差範囲は標準誤差を示す。1 時間後の透過率は A と B で差があるものの、B では有意差は認められなかった。

ウサギ眼における生体適合性の評価

CV-CERT の生体適合性を評価するためウサギ眼（角膜実質内、角膜後面）に CV-CERT を移植し経過観察を行った。この実験においては抗菌剤、ステロイド等の抗炎症剤の投与は行っていない。4 カ月の観察期間中、角膜実質内に移植された CV-CERT は透明で（図 13 A 左）明らかな浮腫もみられなかった（図 13 A 中央）。HE 染色においては上皮細胞層菲薄化や実質中への細胞浸潤なども認められなかった（図 13 A 右）。角膜後面に付着させた CV-CERT も石灰化や融解などを起こしておらず（図 13 B 左・中央）、HE 染色においても明らかな細胞浸潤などを認めなかった。これらの結果より CV-CERT はウサギ角膜実質内および前房内において生体適合性は高く、明らかな有害事象を起こさないことが明らかになった。

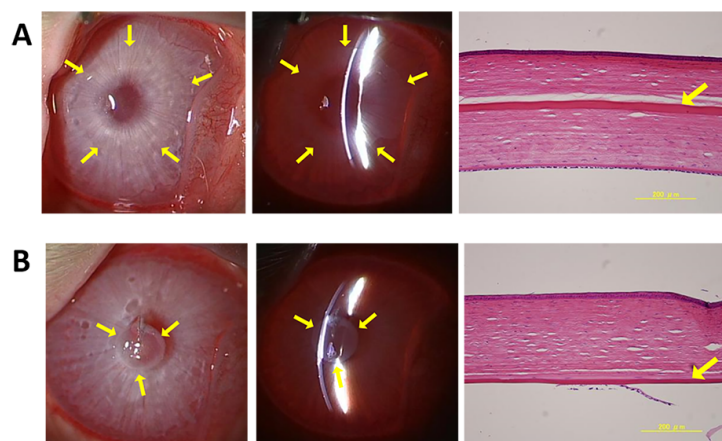


図 13 ウサギ眼における CV-CERT の生体適合性評価

(A) CV-CERT のウサギ角膜実質内移植。4 カ月の観察期間中、細隙灯顕微鏡観察において角膜および CV-CERT は透明で上皮欠損や炎症などを起こさなかった

(左・中央)。HE 染色では CV-CERT 周囲に細胞浸潤などは見られず、また上皮細胞の重層も保たれていた (右)。矢印は角膜実質内の CV-CERT を示す。(B) CV-CERT のウサギ前房内 (角膜後面) 移植。4 カ月の観察期間中、角膜および CV-CERT は透明で炎症や石灰化などをおこさず、上皮欠損や角膜後面沈着物なども確認されなかった (左・中央)。HE 染色にて上皮はたもたれ、CV-CERT 上には内皮細胞の進展がみられる (右)。矢印は角膜後面に付着した CV-CERT を示す。

CV の形状による角膜後面への付着性の評価

CV の形状の違いによる、移植時の角膜への付着性に対する影響を評価した。平坦形状である CV-RM（紫外線照射あり）もしくは半球面形状である CV-CERT のウサギ角膜後面への移植を行った（各群 N=3）（図 14）。CV-RM は術直後より大きな皺襞を生じているのに対し（図 14 A 上）、CV-CERT は角膜に隙間なく付着して皺はない（図 14 B 上）。術 1 ヶ月後、空気は吸収されているため CV-RM は角膜後面から脱落しているのに対し、CV-CERT は角膜後面に付着したままであった。

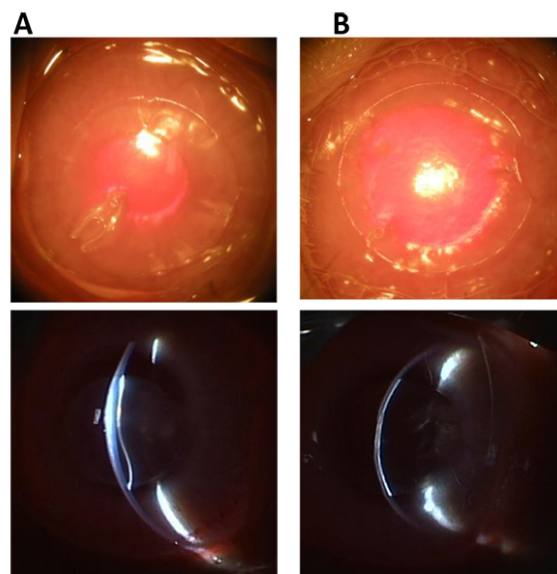


図 14 平坦形 CV-RM (A) と半球面形 CV-CERT (B) のウサギ角膜後面への付着性の比較

それぞれ上段はエアタンポナーデを行った直後の手術顕微鏡写真、下段は POM1 での細隙灯顕微鏡写真。CV-RM はエアタンポナーデ後大きな皺襞を生じ（A 上）、時間経過とともに角膜後面よりはがれて脱落している（A 下）。一方、CV-CERT は術直後より角膜に隙間なく付着し（B 上）、POM1 まで脱落しなかった（B 下）。

ii. 人工角膜内皮グラフトの作製と動物眼へ移植治療

CV-CERT 上への HCEC の播種・培養と組織学的検討

半球面形状である CV-CERT 上に均一に HCEC を播種する方法を考案した。HE、DAPI、アリザリンレッド S 染色にて、CV-CERT 上に HCEC が端から端まで一層に均一に分布しているのが確認できた（図 15 A-C）。また CV-CERT の厚みは、 $21.2 \pm 0.9 \mu\text{m}$ で、HCEC の細胞密度は $2650 \pm 100 /\text{mm}^2$ であった。細胞間のタイトジャンクションを形成するとされる ZO-1 タンパクおよびナトリウムポンプをつかさどる Na, K-ATPase もそれぞれ染色されることが確認された。

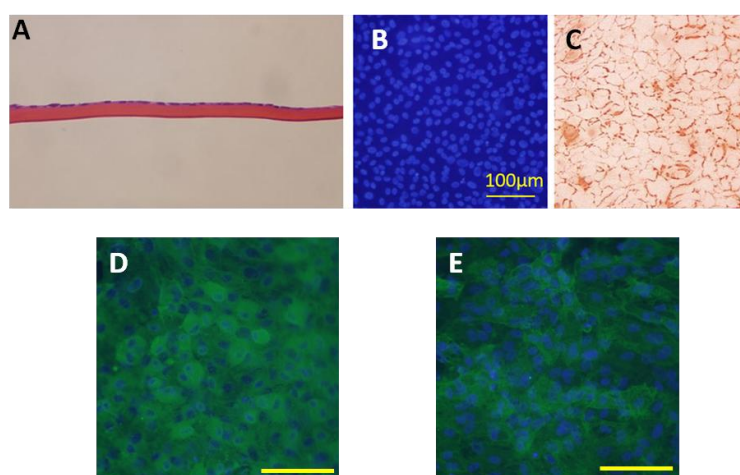


図 15 作製された人工角膜内皮グラフトの組織像

HE (A)、DAPI (B)、アリザリンレッド S (C) 染色で、細胞は一層構造をなし CV-CERT 上に均一に分布していた。CV-CERT の厚みは $21.2 \pm 0.9 \mu\text{m}$ であった。平均細胞密度は $2650 \pm 100 /\text{mm}^2$ であった。(D) (E) はそれぞれ ZO-1、Na, K-ATPase の染色像である。スケールバーは $100 \mu\text{m}$ を示す。

ウサギ水疱性角膜症モデルの作製と人工角膜内皮グラフトの移植

デスメ膜を直径 8 mm の大きさに除去し角膜内皮機能を失わせたウサギ角膜に、直径 6 mm の人工角膜内皮グラフト (CV-CERT + HCEC) 移植、同直径の CV-CERT 単独移植、移植手術なしの 3 群に分け移植手術を行った。それぞれ治療群 (N=9)、対照群 (N=3)、無治療群 (N=3) と呼ぶ。術後 14 日目まで細隙灯顕微鏡による観察および中央部角膜厚の測定を実施した。なお人工角膜内皮グラフト作製時、播種する HCEC にあらかじめ蛍光染色を施し、術後の追跡を行った。術後の代表的な前眼部写真を図 16 に示す。治療群においては経過中を通して軽度から中等度の浮腫が残ってはいたがグラフト移植部を通して瞳孔縁の透見が可能であった。他方、対照群、無治療群とも術翌日より全経過を通して非常に強い角膜浮腫を呈しており、角膜混濁を生じていた。瞳孔縁の透見は不良であった。

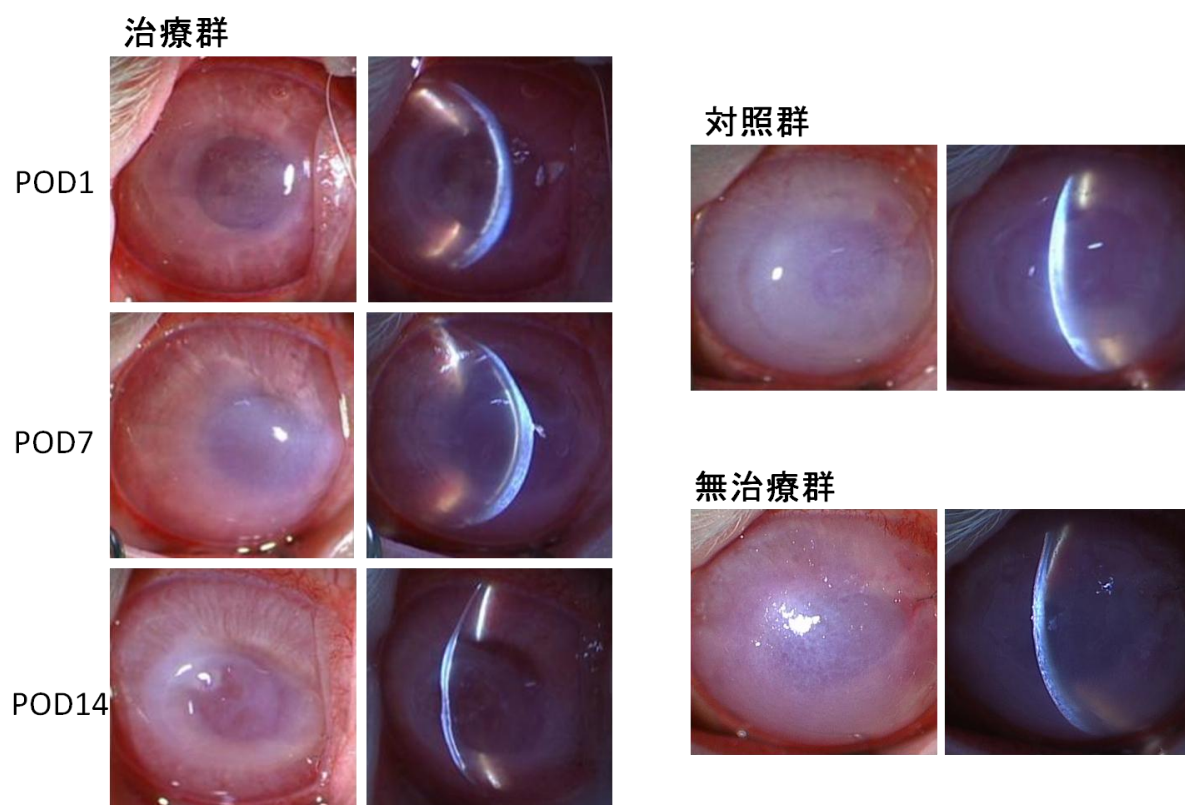


図 16 人工角膜内皮グラフト移植術後前眼部写真

治療群において経過中角膜浮腫はある程度残っていたがグラフトを通して瞳孔縁が確認できる。この症例での POD1、7、14 での中央部角膜厚はそれぞれ 799、1190、783 μm であった。対照群、無治療群とも強度の浮腫のため角膜が混濁し、瞳孔縁の透見性が低い (POD7)。全経過を通して角膜厚は測定不能 (機器測定上限 1200 μm) であった。

POD14 に治療群、対照群においてグラフトを摘出し蛍光顕微鏡にて CV-CERT 上に残存する HCEC およびホスト由来浸潤細胞の観察を行った。図 17 に術後摘出した人工角膜内皮グラフトの蛍光顕微鏡像を示す。グラフト全体に蛍光を発する細胞が認められ HCEC 残存は良好であった。対照群においては PKH 陽性細胞は認められず、DAPI 染色においてホスト由来の細胞も認められなかった。治療群 9 眼のうち、1 眼においては HCEC の残存が一部にしか認められず、ホストの角膜内皮細胞由来

と考えられる細胞が CV-CERT 上全面に進展していた。もう 1 眼も宿主由来細胞が約 3 分の 1 に進展していた。これらの 2 眼については角膜厚の評価からは除外した。

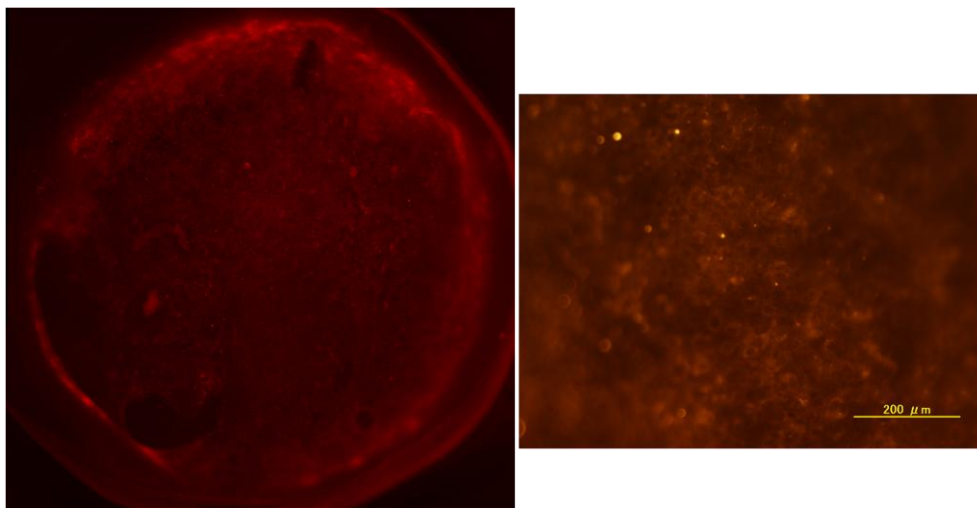


図 17 術後摘出した人工角膜内皮グラフトの蛍光顕微鏡像

(左) グラフト全体、(右) グラフト中央部。グラフト全体に蛍光性の細胞が残存しているのが確認できる。また拡大画像においても細胞の脱落がないのが確認できる。対照群の CV-CERT 上には細胞侵入像は確認されなかった。スケールバー 200 μm 。

測定した各群の中央部角膜厚の平均値の推移を図 18 に示す。対照群、無治療群の全例において経過中角膜厚は装置の測定上限である 1200 μm を超えていたため測定不能であった。これらの角膜厚は 1200 μm で代用して算定した。分散分析では、POD1、3、10、14 で有意差がみられ ($P < 0.05$)、Tukey-Kramer の HSD 検定による 3 群比較では POD1 および 14 において治療群は他 2 群に比べ有意に角膜厚が薄かった。

人工角膜内皮細胞シート移植後の角膜厚変化

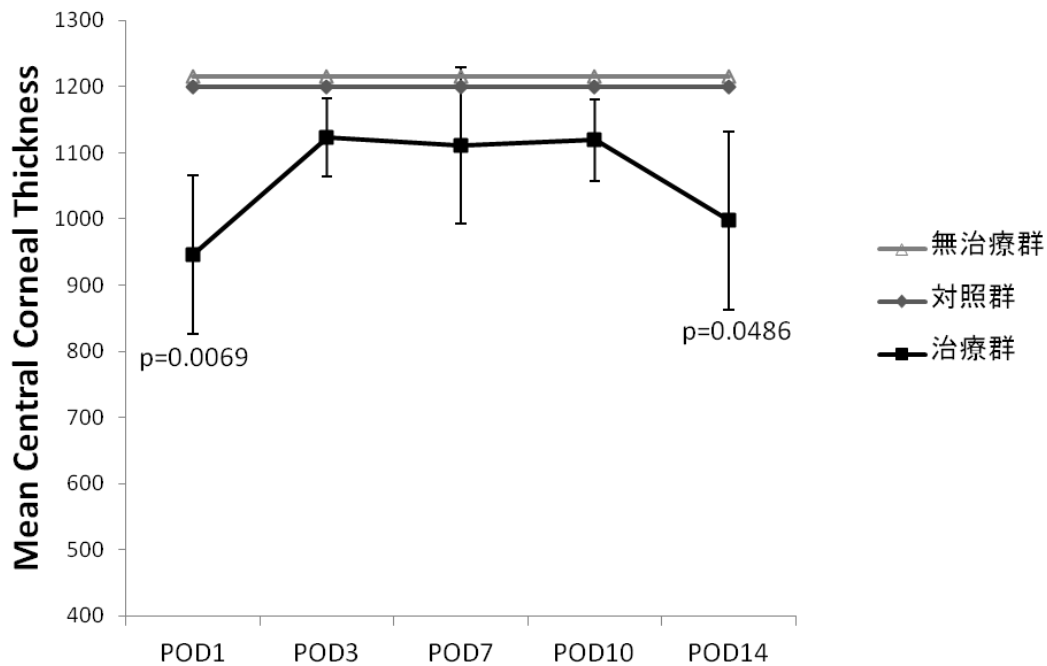


図 18 人工角膜内皮グラフト移植術後の中央部角膜厚平均値の推移

治療群、対照群、無治療群をそれぞれ黒色、濃灰色、淡灰色のラインで示す。対照群・無治療群の角膜厚は全例、全観察日において測定不能であった。3 群比較では、POD1 および POD14 において治療群の角膜厚は他 2 群よりも有意に薄かった ($p < 0.05$ 、Tukey-Kramer の HSD 検定)。誤差範囲は標準偏差を示す。なお角膜厚測定装置の測定上限は 1200 μm であり、測定不能の場合 1200 μm で代用して算定した。

V. 考察

本研究では、角膜内皮細胞移植用のキャリア CV-CERT を新規に開発し、培養ヒト角膜内皮細胞と組み合わせることで人工角膜内皮グラフトを作製、ウサギを用いた動物実験にてその治療効果を検証した。

CV-CERT は従来型の基礎研究用 CV と同じく乾燥した状態で常温保存が可能なコラーゲン薄膜で、取り扱いを容易にするため薄膜の周囲にナイロン支持体に取り付けられている。移植に用いる際は、皮膚生検用パンチなどで、最大 11 mm まで必要な直径に打ち抜いて使用できる。CV-CERT にはいくつかの特長がある。第一に反芻動物由来物質によるリスクをなくすため、原材料をブタ由来のコラーゲンとし、また作製過程において血清を使用していない。ブタの人工心臓弁の移植が実際に行われていることからわかるように⁴⁹、人体に移植するにはブタ由来の物質はウシなどの反芻動物由来物質よりも安全とされているため好ましい。第二にアテロコラーゲンを使用していることである。アテロコラーゲンはネイティブコラーゲンよりも抗原性が低いとされている。実際、ウサギ眼に移植し観察した 4 ヶ月間明らかな毒性や炎症惹起は見られなかった。第三に作製過程において硝子化させることに加えて紫外線照射を施行したことで、透明性と強度を両立した点である。第四に新しく鋳型を開発することで平面でなく角膜に沿った半球面形状にすることに成功したことである。

抗原性を考慮しアテロコラーゲンを原材料としたが、アテロコラーゲンの問題点はネイティブコラーゲンに比べて強度に劣るという点であった。通常、強度を上げるためには使用コラーゲン量を増やして膜をより厚くする必要があるが、単純にコラーゲン量を増やし厚みを増せば透明性が下がり、人工角膜としては用いることが

できない。これらを克服するため紫外線照射を行いコラーゲン線維間に架橋させた。紫外線照射量や回数を変えた CV を数通り作製し、ある程度の機械的強度を保ちつつ透明性の高い照射方法を決定した。実際、ウサギ角膜内において CV-CERT は透明で散乱光のもとでは角膜との区別が困難であった（図 13）。強度に関しても十分であり、手術の際、創口より折りたたんで挿入、前房内で広げ、角膜後面に接着させる一連の操作において、術者は CV-CERT を破損することなく非常にスムーズに取り扱うことができた。今回の人工角膜内皮グラフト移植に限らず、角膜移植全般において、角膜内皮細胞を損傷することなく移植するということは手術手技の最も重要なポイントであり、角膜内皮細胞キャリアが手術操作に支障のない強度を持つということは必要不可欠である。

CV-CERT の吸光度は人工角膜として非常に適していると考えられる。紫外線照射量を決定する際、我々は紫外線領域を含む広いスペクトルの波長に対しての CV-CERT の吸光度を測定した。興味深いことに、紫外線領域（300 nm 以下）においての吸光度は可視光領域においてのそれよりも著しく高かった。角膜の眼における重要な役割のひとつとして、眼表面で紫外線を吸収することで眼内の水晶体や網膜を紫外線による傷害から守ることがある。CV が有害な紫外線を吸収し可視光線はよく透過したことは、角膜自体のもつ役割に非常に類似している。これは CV-CERT が生体由来の物質を原料としているからかもしれない。以上より透明性が高い（可視光の吸収率が低い）だけでなく、紫外線防御の観点からも CV-CERT が人工角膜素材として適していると考えられる。

CV-CERT のタンパク透過率は良好であった。対照として用いた市販 CV の膜透過性も良好でおよそ 150 kD のタンパクを透過させ、これは過去の報告とほぼ一致し

ている⁵⁰。また、CV-CERTの5日目のタンパク透過率は市販CVの2倍以上であった。角膜は上皮を介して涙液から酸素の供給を受け、内皮を介して前房水からグルコースが供給されている。CV-CERTは血清アルブミン（分子量約66 kD）も透過させたことから、はるかに分子量の小さいグルコースの透過にも問題はないと考えられる。実際、移植片の膜透過性が低いと角膜上皮の菲薄化が起こりうるが⁵¹、CV-CERTの角膜実質内移植後においてもウサギ角膜上皮に菲薄化が見られなかったことはCV-CERTの膜透過性が良好であることを示している。

湾曲した角膜裏面への接着性を高めるため、CV-CERTが曲面形状をもつように設計した。CV-CERTがウサギ角膜後面に隙間なく付着したのに対し、平面形状であるCV-RMは脱落した。これら2種類のCVは基本的に同じ材料・製法でできており、異なる点はその形状のみである。したがってCV-CERTのみが角膜に付着し続けたことは、角膜内皮細胞キャリアとして、その曲面形状の重要性を裏付けている。今回作製されたCV-CERTは曲率半径8 mmの半球面形状である。この形状はウサギ角膜に対して良好に付着したが、ヒト角膜には付着しないことも懸念される。ウサギ角膜とヒト角膜とは曲率半径が違うことに加え⁵²、角膜が実際には周辺部はより平坦（曲率半径が大きい）な非球面であるためである。しかしながらヒトへの応用を考えた場合もこれについては大きな問題にはならないと考えている。理由は、薄い角膜実質と内皮細胞のみを角膜裏面に接着させる実際に臨床で実施されている角膜内皮移植術において、ホストとドナーの角膜の曲率は必ずしも一致しないことがほとんどであり、それでも通常移植に差し支えない。また、CV-CERTの鋳型自体を必要に応じて非球面や曲率半径の違ったものに改良し、形状をカスタマイズすることも可能だからである。

本研究で用いられた CV-CERT は無菌操作で作製されたのち、エチレンオキシサイドガス滅菌をされている。滅菌法としてガンマ線、電子線滅菌なども考えられるが、これらの電磁波によりさらなるコラーゲン線維間架橋が起こる懸念があるため今回は用いなかった。

本実験では CV-CERT 上に均一に角膜内皮細胞を播種・培養することに成功した。単に CV-CERT 上に細胞を播種するだけでは CV-CERT のおわん形の底に細胞がたまってしまい細胞は単層かつ均一にならないであろう。一度水和した CV-CERT をウェルの底面に湾曲をつぶすようにはりつけ再乾燥させてから細胞を播種し、ある程度細胞が接着したところで底からはがし元の形状に戻すという一連の作業により、HE 画像でも示したような均一な細胞層が出来上がった。この方法により細胞密度もポンプ機能に支障ないとされる $2650 / \text{mm}^2$ となり、正常ヒト角膜のそれとほぼ同じレベルを実現した。ZO-1、Na, K-ATPase はそれぞれバリア機能、ポンプ機能の指標とされるタンパクでこれらが染色されることも確認された。

この研究を進める上で最も問題となったことのひとつに水疱性角膜症の動物モデルの作製が挙げられる。序文でも述べたがヒトの角膜内皮細胞は生体内では再生されない。何らかの理由で内皮細胞が傷害を受けると、代償性に残存細胞が大きくなり遊走することで角膜後面を覆う面積はかせぐが、ポンプとしての機能は落ち内皮機能不全となる¹³。ところがウサギを含む多くの動物において生体内においても角膜内皮細胞は増殖することが分かっている。我々のグループは過去にウサギ前房内に塩化ベンザルコニウムを注射し前房内の細胞を死滅させる方法をとったこともある。これは濃度の調節が難しく、十分に角膜内皮細胞を死滅させると前房内炎症惹起、眼圧上昇とした副作用を生じるため水疱性角膜症モデルとして用いるには限界

があった。また、老齢のサルはヒトと同じように角膜内皮細胞の増殖が悪いため用いられたこともあったが、サルにヒト由来の角膜内皮細胞を移植した際の拒絶反応の強さが問題でグラフトの評価が正当に行えず断念した経緯もある。他グループよりマウス Fuchs ジストロフィモデルの報告もあるが⁵³、マウスの小さな眼球では人工角膜の評価は不可能である。このため、今回の研究ではウサギのデスメ膜を内皮細胞ごとにはぎとり、デスメ膜剥離面より径の小さいグラフトを移植するという方法を用いた。デスメ膜とグラフト間にあえて間隙を作ることで、早期のホスト由来内皮細胞のグラフトへの侵入を防ぐためである。移植術後の観察期間が2週間と比較的短期間でのみ行ったのもホストからグラフトへのデスメ膜の進展を懸念したためである。

移植手術の際に用いた天野・外山式 DSAEK グラフトインサーターはウサギ眼における CV-CERT を用いた人工角膜内皮グラフトの移植にも有用であった。ヒトの眼球と違い、ウサギ眼は前房が浅く角膜はやわらかく硝子体圧が高いため前房深度を保ちづらく、前房内の細かい操作を必要とする今回の様な手術をヒト眼と同じ様に行うのは非常に難しい。そのため硝子体切除術を併用し、前房深度を十分あげてから移植術を行うことが多い。しかし、この新型インサーターを使用することで、硝子体切除術を併用しなくても、前房深度を比較的保ったまま手術を行うことができた。DSAEK インサーターが使えたことは単に手術を容易にただけでなく、CV-CERT の高い強度を裏付け、またグラフト上内皮細胞保護の観点からも非常に有用であった。

本研究の主要評価項目として人工角膜内皮グラフト移植後の中央部角膜厚を測定した。角膜厚は、本実験の様に線維性混濁を伴わない角膜浮腫による混濁を十分に

反映すると考えられ、また実際に角膜混濁を客観的に定量するのが困難なためである。デスメ膜を切除したウサギ眼に人工角膜内皮グラフト移植を行い、その結果、治療群は無治療群および対照群と比べて有意に角膜厚の改善がみられた。無治療群・対照群とも全例、全観察日において角膜厚が測定不能であったため、可能性のある最小値である 1200 μm を用いて統計処理をした。無治療群・対照群の実際の角膜厚はもっと厚かったと考えられる。これにより CV-CERT が角膜内皮細胞移植用キャリアとしての役割をはたし、作製された人工角膜内皮グラフトが一定の治療効果を持ったと言える。

CV-CERT をキャリアとしたヒト角膜内皮細胞移植が動物眼においてある程度成功したことでヒトへの応用にむけ一歩前進した。本研究においてキャリアを用いた角膜内皮細胞移植を目指した背景には、過去にヒト内皮細胞の前房内注入を試みたが⁵⁴、研究の進行につれ異所性沈着や隅角ブロックといった副作用が生じたため断念した経緯があるためである。一方、他グループにおいて Rho-associated kinase

(ROCK) 阻害剤の併用により、前房注入された CEC が角膜後面へ良好に分布したという報告もある⁵⁵。これは細胞接着に抑制的に関与する Rho/ROCK シグナルを阻害することで CEC の角膜実質への接着性を高めたからとされる。将来的には臨床試験などでどの方法がより安全で効率よく内皮機能不全の治療となりうるか明らかになるものと考えられる。

本研究にはいくつかの問題点が挙げられる。

CV-CERT の素材はアテロコラーゲンでありネイティブコラーゲンより抗原性が低いとされており、実際ウサギ眼において明らかな有害事象や免疫反応を起こさなかった。しかしながら、過去の報告にウシ由来アテロコラーゲンを患者に皮下注射

したところ数%に免疫反応を起こしたというものがあり⁵⁶、今回の我々の検討のみでヒトへの臨床応用での安全性が担保されたとは考えにくい。ただし、一般に角膜は immune-privileged と評されるように、皮膚における反応よりも角膜内における反応は小さいもしくは起こらない可能性が高いものと考えている。

人工角膜内皮グラフトを作製する際の、FBS を用いたヒト角膜内皮細胞の培養法についても改善の余地がある。ある種のワクチンは製造過程において FBS が用いられており世界中で使用されているが、FBS によって起こったと考えられる問題は報告されていない。FBS を用いた本培養法でも問題はない可能性が高いが、反芻動物由来の血清を含まないヒト角膜内皮細胞培養法を確立させ潜在的なリスクを減らすのが理想的であると考えている。

本研究の一番の問題点は治療後のウサギ角膜厚である。治療群は他 2 群に比べて有意差を持って改善したものの平均角膜厚は 900 μm を超えていた。正常なウサギの角膜厚は概ね 400 μm であるから、完全に浮腫が改善したとは言い難い。この原因として作製した動物モデルによるところが大きいと考える。おそらくホストデスメ膜とグラフトとの間隙からの前房水の流入が多すぎるため、内皮細胞のポンプ機能の容量を超えてしまい、流入過多の状態が完全に解消されず角膜浮腫が残ったものと推測された。実際、術後観察時、ホストデスメ膜が進展しホスト・グラフト間隙がせまくなった症例ほど角膜厚が薄い印象があった。また、角膜厚の評価からは除外された症例のうち一例はデスメ膜剥離が不完全でフラップ状に残ったデスメ膜がグラフト上に覆いかぶさる形でホスト内皮細胞がグラフト上に進展していた。この症例の POD14 での角膜厚はおよそ 1200 μm であった。培養ヒト角膜内皮細胞よりポンプ機能の強い可能性の高いホストウサギ角膜内皮細胞でも明らかな角膜厚の改善が

みられなかったことから、内皮細胞の排出可能量よりも前房水流入量の多い状態が残ったと考えるのは合理的であろう。水疱性角膜症はおもに角膜内皮細胞のバリア機能の破たんではなくポンプ機能の破たんにより発症する。ところが、今回作製したデスメ膜剥離モデルでは、実質からの前房水の排出量を減らすと同時に流入量を大幅に増やすことで角膜浮腫の状態は作製できたが、流入量はほぼ不変で排出量の小さくなる水疱性角膜症のモデルとしては必ずしも臨床病態を十分に反映したものではなかった。このデスメ膜剥離モデルを用いた実験により治療群は対照群・無治療群に対して有意に角膜厚を改善したことから、移植した人工角膜内皮グラフトのバリア機能（流入量の抑制）は証明できたと言えるが、ポンプ機能については評価できていないといえる。今後、より長期間観察可能かつ水疱性角膜症の病態を確実に再現できる動物モデルの作製が必要である。

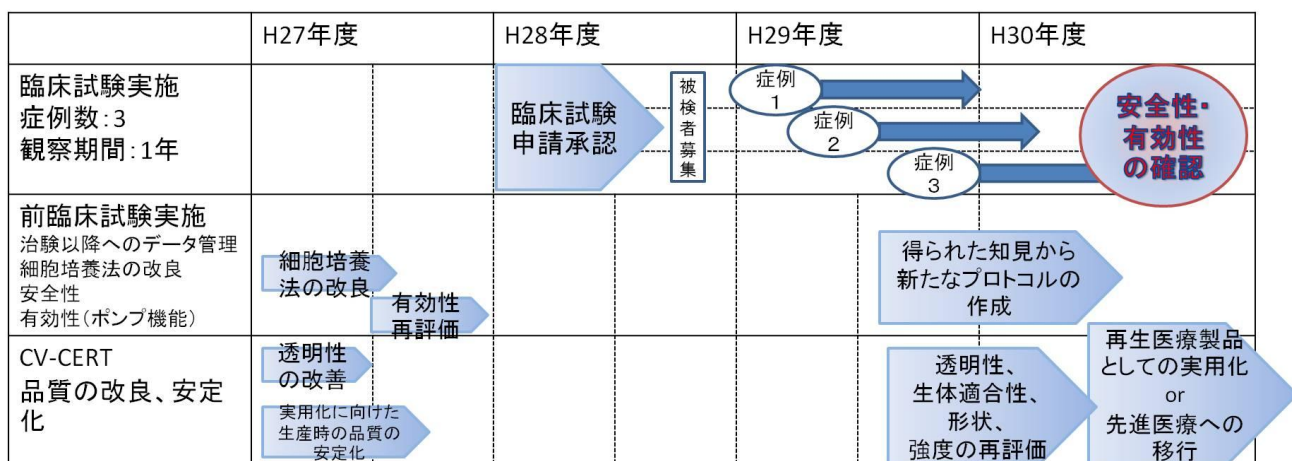


図 19 CV-CERT を用いた人工角膜内皮移植治療の臨床試験へのロードマップ

人工角膜内皮グラフトによる水疱性角膜症治療の臨床研究へのロードマップを図 19 に示す。平成 27 年度中を目途に HCEC 無血清培養法の検索および新培養法のもとでの動物眼での有効性の再評価を行いたい。同時に CV-CERT の品質の改良および実用化に向け品質を安定（厚みなど）させる。ここで CV-CERT に必要な 4 条件（透明性、強度、形状、生体適合性）に関して現時点での目標到達度を考える。まず、透明性に関して、角膜の *in vivo* での透明性は現在の測定法では評価が難しいため目標値が設定しづらい問題がある。他測定法の検討の上、より透明度の高い CV-CERT を開発するのが理想的である。強度に関して、HCEC を傷めることなく手術ができたという点において前臨床段階では変更の予定はない。形状に関して、ある程度ヒトの角膜後面曲率に適合していると考えているので前臨床段階での変更の予定はないが、前述のようにいくつか曲率半径の違う鋳型を用意することも可能である。生体適合性に関してより長期間での観察が望ましいと考えるが、動物眼とヒト眼との違いもあるため最終的な安全性については臨床試験でのみ確認される。再度動物眼での人工角膜内皮グラフトの有効性が確認できれば、平成 28 年度中を目途に、

臨床研究を治験とする方向で申請する。症例数は3、観察期間は1年として人工角膜内皮グラフトの有効性・安定性を確認する。得られた知見より新たなプロトコルの作成、CV-CERTの改良（特に、透明性、曲率）を行い、最終的に再生医療製品としての実用化を目指す。

結論として、本研究では新規開発したコラーゲン薄膜 CV-CERT に培養ヒト角膜内皮細胞を組み合わせることで人工角膜内皮グラフトを作製し、動物モデルにおいて一定の治療効果を得た。細胞培養法、動物モデルの限界もあり本研究の人工角膜内皮グラフトには改良の余地はあるものの、ヒトでの角膜内皮再生医療の実現に向け一歩前進したと考える。

VI. 謝辞

本研究の機会を与えてくださり、大学院入学時より多大なご指導ご鞭撻を賜りました東京大学大学院眼科学講座前教授 天野史郎先生、指導教官として貴重なご指導をいただきました 同准教授 加藤聡先生に謹んで感謝の意を申し上げます。

また、本研究および大学院生活におきまして多くの貴重なご指導をいただきました、東京大学医学部附属病院角膜移植部准教授 山上聡先生には心より感謝申し上げます。同眼科学 横尾誠一先生には多くのご助言ご協力をいただきました。ほんだ眼科クリニック院長 本田紀彦先生にも貴重なご助言をいただきました。関係しました皆様に心より御礼申し上げます。

共同研究者として貴重な技術を提供していただき、こちらの要望にも丁寧に答えてくださいました農業生物資源研究所 竹澤俊明先生、押方歩先生には重ねて深謝申し上げます。

VII. 参考文献

1. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *British Journal of Ophthalmology*. 2011. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300539.
2. Birk DE, Trelstad RL. Extracellular compartments in matrix morphogenesis: Collagen fibril, bundle, and lamellar formation by corneal fibroblasts. *J Cell Biol*. 1984;99(6):2024-2033.
3. Maurice DM. The cornea and sclera. in: Davson H, ed. *The eye*. Vol 1. New York, NY: Academic Press; 1969:489-585.
4. Nishida T, Saika S. Cornea and sclera: Anatomy and physiology in: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, ed. *Cornea*. Vol 1. Elsevier; 2011:3-25.
5. Beuerman RW, Pedroza L. Ultrastructure of the human cornea. *Microsc Res Tech*. 1996;33(4):320-335. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19960301)33:4<320::AID-JEMT3>3.0.CO;2-T [pii].
6. Sack RA, Nunes I, Beaton A, Morris C. Host-defense mechanism of the ocular surfaces. *Biosci Rep*. 2001;21(4):463-480.
7. Thoft RA, Friend J, Kenyon KR. Ocular surface response to trauma. *Int Ophthalmol Clin*. 1979;19(2):111-131.
8. Freegard TJ. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye (Lond)*. 1997;11 (Pt 4)(Pt 4):465-471. doi: 10.1038/eye.1997.127 [doi].
9. McCartney MD, Wood TO, McLaughlin BJ. Freeze-fracture label of functional and dysfunctional human corneal endothelium. *Curr Eye Res*. 1987;6(4):589-597.

10. Petroll WM, Hsu JK, Bean J, Cavanagh HD, Jester JV. The spatial organization of apical junctional complex-associated proteins in feline and human corneal endothelium. *Curr Eye Res.* 1999;18(1):10-19.
11. Geroski DH, Kies JC, Edelhauser HF. The effects of ouabain on endothelial function in human and rabbit corneas. *Curr Eye Res.* 1984;3(2):331-338.
12. Diecke FP, Zhu Z, Kang F, Kuang K, Fischbarg J. Sodium, potassium, two chloride cotransport in corneal endothelium: Characterization and possible role in volume regulation and fluid transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(1):104-110.
13. Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(3):359-389. doi: S1350946202000654 [pii].
14. Bates AK, Cheng H, Hiorns RW. Pseudophakic bullous keratopathy: Relationship with endothelial cell density and use of a predictive cell loss model. A preliminary report. *Curr Eye Res.* 1986;5(5):363-366.
15. Hoffer KJ. Corneal decomposition after corneal endothelium cell count. *Am J Ophthalmol.* 1979;87(2):252-253.
16. Weisenthal RW, Streeten BW. Descemet's membrane and endothelial dystrophies. In: Krachmer JH, manniss MJ, holland EJ, ed. *Cornea.* Vol 1. Elsevier; 2011:845-865.
17. Mian SI, Sugar A. Corneal complications of intraocular surgery. In: Krachmer JH, manniss MJ, holland EJ, ed. *Cornea.* Vol 1. Elsevier; 2011:845-865.
18. Schwartz AL, Martin NF, Weber PA. Corneal decompensation after argon laser iridectomy. *Arch Ophthalmol.* 1988;106(11):1572-1574.

19. Price MO, Price FW. Descemet's stripping endothelial keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol.* 2007;18(4):290-294. doi: 10.1097/ICU.0b013e3281a4775b [doi].
20. 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.* 2006;32(3):411-418. doi: S0886-3350(05)01076-X [pii].
21. Gorovoy MS. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea.* 2006;25(8):886-889. doi: 10.1097/01.ico.0000214224.90743.01 [doi].
22. Chen ES, Terry MA, Shamie N, Hoar KL, Friend DJ. Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty: Six-month results in a prospective study of 100 eyes. *Cornea.* 2008;27(5):514-520. doi: 10.1097/ICO.0b013e3181611c50 [doi].
23. Hannush SB. Preoperative considerations and decision-making in keratoplasty. In: Krachmer JH, manniss MJ, holland EJ, ed. *Cornea.* Vol 1. Elsevier; 2011:1327-1335.
24. de By TM. Shortage in the face of plenty: Improving the allocation of corneas for transplantation. *Dev Ophthalmol.* 2003;36:56-61.
25. Reinhard T, Bohringer D, Bogen A, Sundmacher R. The transplantation law: A chance to overcome the shortage of corneal grafts in germany? *Transplant Proc.* 2002;34(4):1322-1324. doi: S0041134502027835 [pii].
26. Rasouli M, Caraiscos VB, Slomovic AR. Efficacy of routine notification and request on reducing corneal transplantation wait times in canada. *Can J Ophthalmol.* 2009;44(1):31-35. doi: 10.3129/i08-187 [doi].

27. 公益財団法人 日本アイバンク協会. 年度別 登録者数・献眼者数・移植者数
(利用個数)・待機患者数 Web site. <http://www.j-eyebank.or.jp/bank.htm>. Accessed Oct.
21, 2014.
28. Cursiefen C. Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chem Immunol Allergy*. 2007;92:50-57. doi: 10.1159/000099253.
29. Dandona L, Naduvilath TJ, Janarthanan M, Rao GN. Causes of corneal graft failure in india. *Indian J Ophthalmol*. 1998;46(3):149-152.
30. Price MO, Thompson RW,Jr, Price FW,Jr. Risk factors for various causes of failure in initial corneal grafts. *Arch Ophthalmol*. 2003;121(8):1087-1092. doi: 10.1001/archophth.121.8.1087.
31. Khan BF, Harissi-Dagher M, Khan DM, Dohlman CH. Advances in boston keratoprosthesis: Enhancing retention and prevention of infection and inflammation. *Int Ophthalmol Clin*. 2007;47(2):61-71. doi: 10.1097/IIO.0b013e318036bd8b [doi].
32. Mimura T, Yamagami S, Amano S. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res*. 2013;35:1-17. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.01.003; 10.1016/j.preteyeres.2013.01.003.
33. Lynch AP, Ahearne M. Strategies for developing decellularized corneal scaffolds. *Exp Eye Res*. 2013;108:42-47. doi: 10.1016/j.exer.2012.12.012; 10.1016/j.exer.2012.12.012.
34. McIntosh Ambrose W, Salahuddin A, So S, et al. Collagen vitrigel membranes for the in vitro reconstruction of separate corneal epithelial, stromal, and endothelial cell layers. *J*

Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009;90(2):818-831. doi: 10.1002/jbm.b.31351;
10.1002/jbm.b.31351.

35. Lin J, Yoon KC, Zhang L, et al. A native-like corneal construct using donor corneal stroma for tissue engineering. *PLoS One.* 2012;7(11):e49571. doi: 10.1371/journal.pone.0049571; 10.1371/journal.pone.0049571.

36. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(9):2992-2997. doi: 10.1167/iovs.03-1174.

37. Honda N, Mimura T, Usui T, Amano S. Descemet stripping automated endothelial keratoplasty using cultured corneal endothelial cells in a rabbit model. *Arch Ophthalmol.* 2009;127(10):1321-1326. doi: 10.1001/archophthalmol.2009.253; 10.1001/archophthalmol.2009.253.

38. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(10):4519-4526. doi: 10.1167/iovs.07-0567.

39. Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo: A morphologic study. *Cornea.* 2001;20(7):731-737.

40. Amano S. Transplantation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea.* 2003;22(7 Suppl):S66-74.

41. Peh GS, Beuerman RW, Colman A, Tan DT, Mehta JS. Human corneal endothelial cell expansion for corneal endothelium transplantation: An overview. *Transplantation.* 2011;91(8):811-819. doi: 10.1097/TP.0b013e3182111f01 [doi].

42. Proulx S, Brunette I. Methods being developed for preparation, delivery and transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 2012;95(1):68-75. doi: 10.1016/j.exer.2011.06.013 [doi].
43. Takezawa T, Ozaki K, Nitani A, Takabayashi C, Shimo-Oka T. Collagen vitrigel: A novel scaffold that can facilitate a three-dimensional culture for reconstructing organoids. *Cell Transplant.* 2004;13(4):463-473.
44. Pontz B, Meigel W, Rauterberg J, Kuhn K. Localization of two species specific antigenic determinants on the peptide chains of calf skin collagen. *Eur J Biochem.* 1970;16(1):50-54.
45. Takezawa T, Aoki S, Oshikata A, et al. A novel material of high density collagen fibrils: A collagen xerogel membrane and its application to transplantation in vivo and a culture chamber in vitro. In *24th European Conference on Biomaterials* (International Proceedings Division, Ed). 2012:181-185.
46. Miyata T, Sode T, Rubin AL, Stenzel KH. Effects of ultraviolet irradiation on native and telopeptide-poor collagen. *Biochim Biophys Acta.* 1971;229(3):672-680.
47. Shima N, Kimoto M, Yamaguchi M, Yamagami S. Increased proliferation and replicative lifespan of isolated human corneal endothelial cells with L-ascorbic acid 2-phosphate. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(12):8711-8717. doi: 10.1167/iovs.11-7592; 10.1167/iovs.11-7592.
48. Toyama T, Honda N, Usui T, Amano S. New graft inserter for descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea.* 2014;33(4):432-435. doi: 10.1097/ICO.0000000000000073 [doi].

49. Manji RA, Menkis AH, Ekser B, Cooper DK. Porcine bioprosthetic heart valves: The next generation. *Am Heart J*. 2012;164(2):177-185. doi: 10.1016/j.ahj.2012.05.011; 10.1016/j.ahj.2012.05.011.
50. Takezawa T, Nitani A, Shimo-Oka T, Takayama Y. A protein-permeable scaffold of a collagen vitrigel membrane useful for reconstructing crosstalk models between two different cell types. *Cells Tissues Organs*. 2007;185(1-3):237-241.
<http://www.karger.com/DOI/10.1159/000101325>.
51. Amano S. Transplantation of corneal endothelial cells. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 2002;106(12):805-35; discussion 836.
52. Bozkir G, Bozkir M, Dogan H, Ayca K, Guler B. Measurements of axial length and radius of corneal curvature in the rabbit eye. *Acta Med Okayama*. 1997;51(1):9-11.
53. Jun AS, Meng H, Ramanan N, et al. An alpha 2 collagen VIII transgenic knock-in mouse model of fuchs endothelial corneal dystrophy shows early endothelial cell unfolded protein response and apoptosis. *Hum Mol Genet*. 2012;21(2):384-393. doi: 10.1093/hmg/ddr473 [doi].
54. Mimura T, Yokoo S, Araie M, Amano S, Yamagami S. Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(10):3637-3644. doi: 46/10/3637 [pii].
55. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, et al. ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. *Am J Pathol*. 2012;181(1):268-277. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.03.033 [doi].

56. Charriere G, Bejot M, Schnitzler L, Ville G, Hartmann DJ. Reactions to a bovine collagen implant. clinical and immunologic study in 705 patients. *J Am Acad Dermatol.* 1989;21(6):1203-1208.