

第 106 回 日本眼科学会総会 宿題報告 II

眼の再生医学

角膜内皮細胞移植

天野 史郎

東京大学大学院医学系研究科眼科学教室

共同研究者

新家 眞, 大鹿 哲郎, 加賀谷文絵, 石井 清, 加治 優一
臼井 智彦, 三村 佳子, 三村 達哉, 野田 康雄, 下村 直樹
鈴木 香(東京大学大学院医学系研究科眼科学教室)
宮田 和典, 永井 祐二(宮田眼科病院)
堀内 正公, 永井 竜二(熊本大学医学部第二生化学教室)
堀 純子(日本医科大学眼科学教室)
刑部 安弘, 細川 幸生(HOYA ヘルスケア)
石井 康雄(ニュービジョン眼科研究所)
服部 俊治, 田中 啓友(株式会社ニッピ)
Anthony P Adamis(Massachusetts Eye & Ear Infirmary)

要 約

再生医療の技術を応用して、培養した角膜の細胞や人工実質を使い臨床応用可能な再構築角膜を作製できれば、角膜不足の解消、角膜移植の定時手術化、バンク化した角膜の細胞の使用などが可能となる。本研究では角膜の透明性維持に重要である角膜内皮細胞に焦点を当て、培養した角膜内皮細胞を用いて角膜を再構築することが可能であるかを検討した。

今回、我々は仔ウシ角膜内皮細胞の産生する細胞外基質でコーティングした培養皿と basic fibroblast growth factor や胎児ウシ血清を含む培地を用いて初代培養することにより、ヒト角膜内皮細胞(human corneal endothelial cell, HCEC)の培養を安定して行うことに成功した。この培養 HCEC を用いて以下の検討を行った。

培養 HCEC へのドナー年齢の影響をみたところ、継代培養された HCEC ではドナー年齢が高いほど大型老化細胞が多く出現した。加齢に伴う生体内での HCEC の老化の原因を明らかにするために、HCEC のテロメア長の測定をサザンブロットで行ったところ、生体内の HCEC は 70 代でも 12 kb と長いテロメア長を有しており、継代培養していくと徐々にテロメア長が短縮した

が、年齢の違いによるテロメア長の差はみられなかった。この結果から、加齢に伴う角膜内皮細胞の老化にテロメア長の短縮は関係ないことがわかった。さらに、HCEC の老化の原因としての advanced glycation end products (AGE) の役割について検討した。前房水の AGE 化蛋白が角膜内皮細胞に発現している AGE 受容体を介して内皮細胞中に取り込まれ、アポトーシスの誘導や活性酸素種の産生により、角膜内皮細胞傷害に働いていることがわかり、AGE が HCEC の老化の一因となっている可能性が示唆された。プリオン感染の危険性のあるウシ材料からの脱却を目指して、ウシ血清の代わりに成人血清を用いて HCEC の培養を行った。成人血清を用いて HCEC の効率的な初代および継代培養が可能であった。

培養 HCEC とヒト角膜実質から角膜を再構築した。HCEC の浮遊液を実質上に播種後、細胞接着を促進するために角膜片を遠心したところ、内皮細胞密度を 2,500 cells/mm²まで高めることができた。この再構築角膜の内皮細胞のポンプ機能をウッシング・チャンバーで検討したところ、観察された電位差は正常角膜 0.40 mV に

別刷請求先：113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学大学院医学系研究科眼科学教室 天野 史郎
(平成 14 年 8 月 15 日受付, 平成 14 年 9 月 9 日改訂受理)

Reprint requests to: Shiro Amano, M. D. Department of Ophthalmology, University of Tokyo Graduate School of Medicine, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

(Received August 15, 2002 and accepted in revised form September 9, 2002)

対して、再構築角膜で 0.30 mV と、再構築角膜は正常角膜内皮の 75% のポンプ機能を有することが確認された。再構築角膜を白色家兎へ移植したところ、角膜の透明性が 6 か月間維持された。蛍光色素でラベルした培養 HCEC を用いた再構築角膜を家兎へ移植したところ、蛍光ラベルされた HCEC が術 1 か月後も移植片上に保たれており、実質上に播種した HCEC が、術後の移植片の透明性維持に働いていることがわかった。

培養 HCEC のキャリアーとして、人工実質とブタ角膜実質の可能性を検討した。アルカリ可溶化コラーゲンをを用いて作製した人工実質は、透明性・生体適合性・細胞接着性が良好であった。ブタ角膜では異種糖鎖抗原 α -gal エピトープの発現が少なく、カニクイサルの角膜層間にブタ角膜実質を移植したところ、超急性拒絶反応は起こさず細胞性拒絶反応を起こした。ブタ角膜実質と培養 HCEC をを用いて作製した再構築角膜は平均で 1,721 cells/mm² の細胞密度を持ち、ウッシング・チャンバーを用いた解析では、正常ブタ角膜内皮の 60% 程度のポンプ機能を示した。

新しい角膜内皮細胞移植法として、自己未分化細胞の応用と、培養 HCEC の前房内投与方法の可能性について検討した。ラット前房内へ投与されたラット骨髄中の単核球が Descemet 膜上に接着して角膜内皮様に変化し、自己の未分化な細胞が角膜内皮様に変化できる可能性が示唆された。培養中に鉄を貪食させた培養家兎角膜内皮細胞を、内皮傷害された家兎の前房内に投与した後、磁石で Descemet 膜への接着を図る角膜内皮細胞移植法

が有効であるか検討したところ、鉄貪食角膜内皮細胞を投与した群では対照群と比較して早期に角膜浮腫が消退し、術後 8 週間にわたって眼圧上昇はみられず、培養角膜内皮細胞の前房内投与が有効であることがわかった。

角膜内皮細胞移植の方法を臨床応用可能にするために何をなしていくべきか、という観点から今後の課題を考えると、① 正常角膜に匹敵するあるいはそれを越える機能・性状を有する再構築角膜を作製するためには、倫理的問題をクリアーした上で胎児などから採取し 2~3 代のごく少ない継代をした角膜内皮細胞を用いたり、播種した内皮細胞の密度や機能をさらに高める方法を開発したりするなど、角膜内皮細胞培養法や細胞播種法において、さらなる改良を加えていく必要がある。② 供給源に限りのあるヒト角膜実質に代わる再構築角膜の実質としては、ブタ角膜実質が有望である。レトロウイルス感染を予防するため無細胞化したブタ角膜実質の有効性について今後検討していく予定である。③ 自己未分化細胞の応用に関しては、角膜内皮細胞特異的マーカーの検索、体性幹細胞の角膜内皮への分化誘導に必要な因子の検討などを課題としてさらなる探求を進めたいと考えている。④ 培養角膜内皮細胞の前房内投与は動物実験により長期的な安全性が確認できれば、有効な方法になり得る。(日眼会誌 106: 805-836, 2002)

キーワード：角膜内皮細胞，細胞培養，細胞老化，人工角膜実質，ブタ角膜実質

A Review

Transplantation of Corneal Endothelial Cells

Shiro Amano

Department of Ophthalmology, University of Tokyo Graduate School of Medicine

Abstract

Though conventional corneal transplantation has achieved great success, it still has several drawbacks including limited availability of donor corneas, recurrent allograft rejection, and subsequent graft failure in certain cases. Reconstructing clinically usable corneas by applying the technology of regenerative medicine can offer a solution to these problems, as well as making corneal transplantation a non-emergency surgery and enabling the usage of banked corneal cells. In the present study, we focused on corneal endothelium that is critical for corneal transparency and investigated the reconstruction of cornea utilizing cultured human corneal endothelial cells (HCECs).

We succeeded in steadily culturing HCECs by using culture dishes pre-coated with extracellular

matrix produced by calf corneal endothelial cells and culture media that contained basic fibroblast growth factor and fetal bovine serum. We performed the following analysis utilizing these cultured HCECs.

The older the donor was, the more frequently large senescent cells appeared in the passaged HCECs. The telomeres of HCECs were measured as terminal restriction fragments (TRF) by Southern blotting. HCECs, *in vivo* from donors in their seventies had a long TRFs of over 12 kilobases. Passaging shortened the TRFs but there was no difference in TRFs among donors of various ages. These results indicated that shortening of telomere length is not related to senescence of HCECs. We investigated the role of advanced glycation end products (AGEs) in the senescence of *in vivo* HCECs. The results

indicated that AGE-protein in the aqueous humor is endocytosed into HCECs via AGE receptors expressed on the surface of HCECs and damages HCECs by producing reactive oxygen species and inducing apoptosis, suggesting that AGEs, at least partly, cause the senescence of HCECs. HCECs were cultured using adult human serum instead of bovine serum to get rid of bovine material that can be infected with prions. Primary and passage culture of HCECs was possible using adult human serum.

We reconstructed the cornea using cultured HCECs and human corneal stroma. The corneal stroma, on which the cell suspension of HCECs was poured, was mildly centrifuged to enhance the HCECs attachment to the stroma. The cell density of HCECs on the reconstructed cornea reached 2,500 cells/mm². The pump function of the reconstructed cornea was measured with an Ussing chamber. The potential difference in the reconstructed cornea and normal cornea was 0.30 mV and 0.40 mV, respectively; indicating that the pump function of the reconstructed cornea is 75% of that of the normal cornea. The reconstructed cornea was transplanted to a rabbit eye and stayed transparent for 6 months after the operation. Fluorescein labeled cultured HCECs remained on the graft 1 month after the transplantation, indicating that transplanted HCECs contributed to the transparency of the graft.

The possibility of using artificial stroma or porcine corneal stroma as a carrier of cultured HCECs was investigated. The artificial stroma made of alkaline-treated collagen could not be sutured but showed good transparency, biocompatibility, and cell-attachability. Porcine corneal stroma, expressing little xeno-sugar antigen α -gal epitope, induced no super acute rejection but mild cellular rejection when transplanted in the cornea of animals possessing natural antibody to α -gal epitope. The cornea reconstructed with porcine corneal stroma and HCECs had an average cell density of 1721/mm² and had approximately 60% of the pump function of a normal cornea.

As new technologies in corneal transplantation, the application of self immature cells and the direct

delivery of cultured HCECs into the anterior chamber were investigated. Part of rat mononuclear cells that were obtained from the bone marrow and injected into the rat anterior chamber transformed into corneal endothelium-like cells, suggesting that self immature cells can transform into corneal endothelial cells. Cultured rabbit corneal endothelial cells that endocytosed iron were injected into the anterior chamber of rabbits whose corneal endothelium was cryo-injured, and were pulled to Descemet's membrane by putting a magnet on the eyelid. In these rabbits, corneal edema decreased more quickly than in the control group and no intraocular pressure rise was observed during 8 weeks after the operation, suggesting that the direct delivery of cultured HCECs into the anterior chamber can be an alternative method of choice.

The following obstacles should be addressed to make the transplantation of cultured corneal endothelial cells clinically applicable. ① To reconstruct a cornea that is the same as or superior to the normal cornea, more innovation is necessary in the method of culturing and seeding HCECs. We should consider utilizing HCECs obtained from fetuses after clearing ethical issues. Moreover, we need to develop a method to enhance the cell density and the cell functions. ② Porcine corneal stroma is promising as a carrier of HCECs instead of human corneal stroma, which is in very limited supply. The usefulness of porcine corneal stroma acellularized to prevent retrovirus infection should be evaluated. ③ To make the self immature cells applicable to corneal transplantation, we should elucidate the corneal endothelial cell specific markers and the factors that are necessary to induce self immature cells to become corneal endothelial cells. ④ The direct delivery of cultured HCECs into the anterior chamber can be an alternative method of choice when its long-term safety is confirmed. (J Jpn Ophthalmol Soc 106 : 805-836, 2002)

Key words : Corneal endothelial cell, Cell culture, Cell senescence, Artificial stroma, Porcine stroma

I 緒 言

日本における角膜移植の待機患者数は、日本眼病学会の資料によると、平成 13 年度末で 5,498 名と報告¹⁾されている。ただし、これは待機リストに登録されている人数であり、実際に視力回復に角膜移植が必要な患者

数はこの数倍以上いると考えられている。これに対して、平成 12 年度の 1 年間に移植された角膜数は、国内ドナーによるものが 1,523 眼、海外ドナーによるものが 1,127 眼であった¹⁾。単純に計算すると、待機患者が手術を受けるのに約 2 年間待たなければならないということになる。こうした提供角膜数の慢性的な不足状態を解

決するには、一般啓蒙活動を通してアイバンク登録者数を増加させていくことが最良の方法であるが、アイバンク関係者らの熱心な活動にもかかわらず、国内での提供角膜数が伸び悩んでいるというのが現状である。

提供角膜数の慢性的な不足状態を解決するために、人工角膜を人工高分子化合物から作製する試みは以前から報告²⁾³⁾されている。Poly(methyl methacrylate), poly(tetrafluoroethylene), silicon, poly(vinylpyrrolidone), poly(2-hydroxyethylmethacrylate)を始めとして多数の材質が試された。いずれも、動物眼に移植されると短期的には透明性が維持されるものの、数か月後から1年後には、人工角膜とドナー組織の間に上皮が侵入し、脱落してしまうことが多く、また感染を起こす例も多い²⁾。こうした結果から、人工高分子化合物から作製した人工角膜で臨床応用可能なものは、未だ報告されていない。

こうした現状の中で、細胞や成長因子のような生理活性物質を人工材料に組み込み、特定の組織を再生させることを目的とする再生医療が近年大きな注目を集めている。再生医療の技術を応用して、培養した角膜の細胞や人工実質を使い臨床応用可能な再構築角膜を作製できれば、角膜不足の解消、角膜移植の定時手術化、バンク化した角膜の細胞の使用などが可能となる。

角膜を再構築する際の構成因子の候補としては、もともと角膜の構成因子である角膜上皮細胞、角膜実質細胞、細胞外基質、末梢神経、角膜内皮細胞などが考えられる。これらの中で、角膜上皮は移植を受けるホストの上皮幹細胞が健全であれば再生されること、神経は通常角膜移植と同様にホストの末梢神経の再生が期待できることから、本研究では角膜の透明性維持に重要である角膜内皮細胞に焦点を当て、培養した角膜内皮細胞を用いて角膜を再構築することが可能であるかを検討した。

II 培養ヒト角膜内皮細胞の性状

1. ヒト角膜内皮細胞の培養

ヒト角膜内皮細胞(human corneal endothelial cell, HCEC)の培養は困難とされてきたものの、これまでにいくつかのグループからその報告がある。Joyceら⁴⁾のグループでは、fibroblast growth factor, epidermal growth factor, nerve growth factorと8% fetal bovine serum(FBS)を含む培地を使用し、培養皿のコーティングはせずにHCECの培養を行っている。Engelmannら⁵⁾のグループでは、ゼラチンでコーティングした培養皿と10% FBSを含む培地を用いてHCECの培養を行っている。いずれの報告でも、継代5~6代目を超えると大型細胞が多数出現し、それ以上の培養は困難で、継代3~5代目までの細胞を使用して実験を行っている。今回、我々はGospodarowiczらの方法^{6)~8)}を基に、仔ウシ角膜内皮細胞の産生する細胞外基質(extracellular

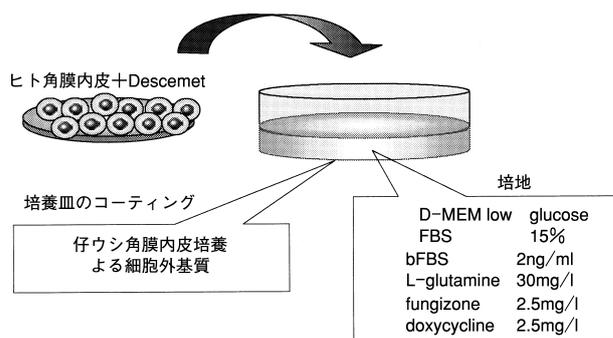


図1 我々のヒト角膜内皮細胞(HCEC)培養法。
D-MEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
FBS: fetal bovine serum

matrix, ECM)でコーティングした培養皿と、basic fibroblast growth factor(bFGF)や15% FBSを含む培地を用いて初代および継代培養することにより、HCECの培養を安定して行うことに成功した(図1)⁹⁾。

まず、HCECの培養に用いる培養皿を仔ウシ角膜内皮細胞が産生するECMでコーティングするために、仔ウシ角膜内皮細胞の培養を行った。仔ウシ角膜からDescemet膜についた状態の角膜内皮細胞を剥離し、60mm培養皿に入れ、Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose(シグマ社)に10% FBS, 5%ウシ血清, bFGF 2ng/ml, L-glutamine 30mg/l, fungizone 2.5mg/l, doxycycline 2.5mg/l, 2% dextranを加えた培地で培養した。0.05% trypsinと0.53% ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)を加えて細胞を剥離し、細胞浮遊液を35mm培養皿には1ml, 60mm培養皿には3mlを加えた。約1週間後に、コンフルエントになったことを位相差顕微鏡で確認した後、0.14%水酸化アンモニウム処理を5分間行うことで細胞を融解させ、リン酸緩衝液(PBS)(-)で3回洗浄した。この培養皿を使用するまで清潔下で2週間以上4°C冷蔵保存した。このように、仔ウシ角膜内皮細胞が産生するECMでコーティングした後に冷凍保存した培養皿を以下のHCECの培養で使用した。

アメリカのロッキーマウンテンライオンズアイバンクから輸入した角膜を全層角膜移植に使用した後、残った周辺部角膜から内皮細胞の付着したDescemet膜を剥がし、仔ウシ角膜内皮細胞が産生したECMでコーティングした35mm培養皿に内皮面を下にして載せた。Dulbecco's modified Eagle's medium low glucoseに15% FBS, bFGF 2ng/ml, L-glutamine 30mg/l, fungizone 2.5mg/l, doxycycline 2.5mg/l, 2% dextranを加えた培地を用いた。3日間静置し、それ以降1日おきに培地の交換を行った。10~20日後にトリプシン処理して継代し、それ以降1:16の継代を行った。

仔ウシ角膜内皮細胞の産生したECMでコーティングした培養皿を用いたHCECの初代培養では、Descemet

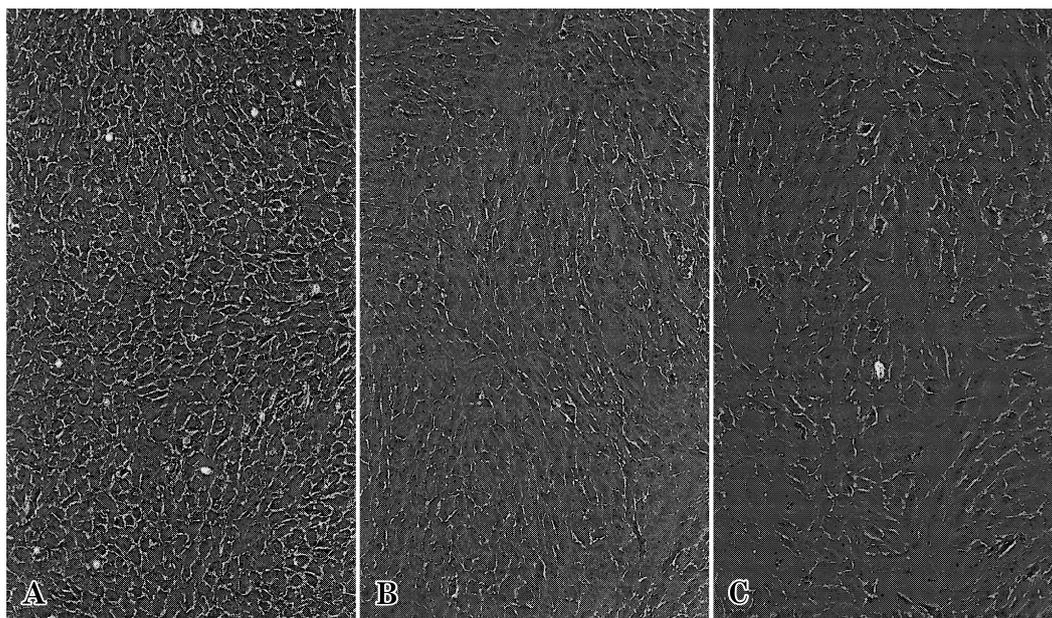


図 2 各年齢層のドナーから得た HCEC を継代 4 代目まで培養しコンフルエントの状態になった時の細胞形態。

A: 4 歳, B: 44 歳, C: 75 歳. 文献 9 より改変引用.

膜上の HCEC が徐々に増殖伸展した。その後の継代培養では、継代後約 7 日で 35 mm 培養皿がほぼコンフルエントの状態となった。

今回我々が行った HCEC の培養法の特徴は、仔ウシ角膜内皮細胞の産生する ECM でコーティングした培養皿を用いたことである。この方法を用いることで、HCEC の初代培養時に細胞の接着が良好となり、初代培養とそれ以降の継代培養を安定して行うことが可能となった。これまでの他のグループからの報告では、HCEC の培養が可能であっても、継代 5 代目までに老化大型細胞の出現が多くなり、それ以上の継代は難しかった⁴⁾⁵⁾。今回の方法では継代 5 代目を超える場合でも、大型細胞の出現率はドナーが 70 代であっても 30% 以下であり、それ以降の継代も十分可能であった。ただし、この方法では仔ウシ角膜内皮細胞が残存して、HCEC の培養に混ざってしまうことが懸念される¹⁰⁾。そこで、0.14% 水酸化アンモニウム処理の後、PBS(-)で 3 回よく洗浄して細胞成分を残さないようにした。また、使用するまで 2 週間以上冷蔵保存をすることにより、培養皿上に残ったウシ細胞も生存することがないようにした。今後、仔ウシ角膜内皮細胞の産生する ECM の詳細な分析により、こうした ECM をウシ由来でない材料を使用して作製することを検討していく予定である。

2. 培養 HCEC へのドナー年齢の影響

上記の方法で継代培養した HCEC を用いて、下記の検討を行った。まず、細胞を提供するドナー年齢の影響について検討した。2~75 歳までの各年齢層にわたる 7 人のドナーからの角膜内皮細胞を上記の同一条件で培養していき、継代 4 代目の細胞がコンフルエントの状態に

なった時の細胞を位相差顕微鏡下で写真撮影した。写真上に透明なプラスチックシートを置き、細胞の輪郭をシートになぞった。各ドナーにつき別の場所を撮影した 3 枚の写真を用い、サンプリングした細胞の数は 1,254~2,333 個であった。トレースした細胞のイメージを細胞解析装置(セルアナラシスシステム, 甲南社)で解析し、各ドナーでの細胞面積のパラメータを計算した。

各ドナーから得た細胞を継代 4 代目まで培養した細胞がコンフルエントの状態になった時の状態の代表例を図 2 に示す。ドナー年齢が高いほど大型細胞が多くみられることがわかる。細胞面積のヒストグラムを採ると、若いドナーでは細胞面積が 100~1,600 μm^2 の範囲に強いピークがあり、細胞面積が均一であることを示した(図 3 A)。ドナー年齢が高い場合も、細胞面積の大部分は同じ範囲にあったが、大型細胞の出現頻度が増加していた。2,000 μm^2 以上の大きな細胞の出現率はドナー年齢が高いほど大きくなった(図 3 A~C)。ドナー年齢と継代 4 代目の平均細胞面積の関係をみると、統計学的に有意な正の相関関係がみられた(図 4, Pearson 相関係数, $r=0.935$, $p=0.0007$)。

我々の方法を用いてあらゆる年齢層のドナーから角膜内皮細胞の継代培養を行うことが可能であった。培養された細胞の形態は、生体内の角膜内皮細胞と同様に、年齢が上がるほど平均細胞面積が増加した。2,000 μm^2 以上の細胞の出現率をみると、年齢と統計学的に有意な正の相関関係がみられた。これは、各年齢層のドナーから培養した HCEC をトリプシン処理した後の細胞直径はドナー年齢が高いほど大きくなることを述べた以前の報告¹¹⁾と一致する結果であった。

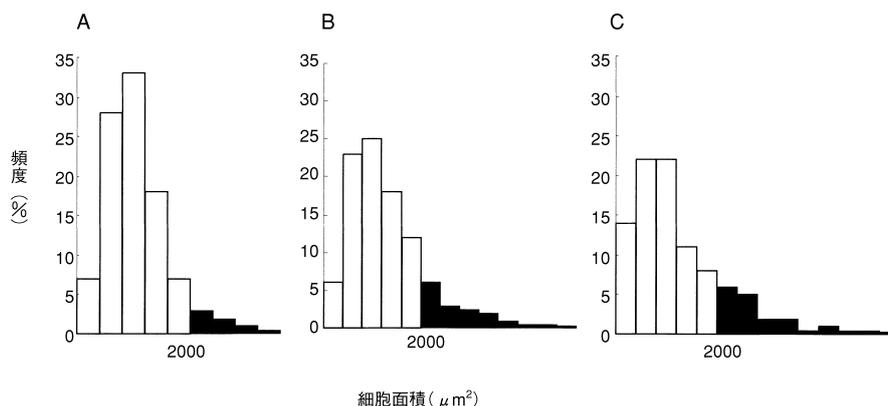


図 3 各年齢層のドナーから得た HCEC を継代 4 代目まで培養しコンフルエントの状態になった時の細胞面積の分布。

A: 4 歳, B: 44 歳, C: 75 歳. ドナー年齢が高いほど黒く塗った 2,000 μm^2 以上の大きな細胞の出現率が高くなった. 文献 9 より改変引用.

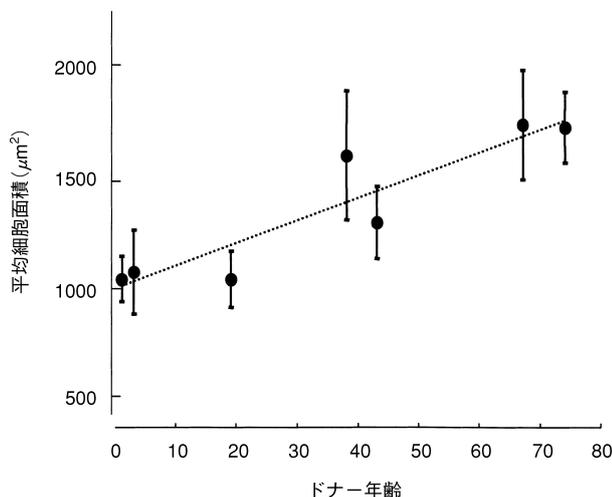


図 4 ドナー年齢と継代 4 代目の平均細胞面積の関係. 統計学的に有意な正の相関関係が認められた (ピアソン相関係数, $r=0.935$, $p=0.0007$). 文献 9 より改変引用.

今回は細胞面積拡大の指標として 2,000 μm^2 を選んだが, 実際に培養中の HCEC がどこまで拡大すると老化した細胞といえるのかはわからない. ただ, これまでの経験から比較的年齢の高いドナーからの HCEC は長期培養をしていると, 若いドナーからの HCEC よりも生存期間が短く, 8~10 代も継代をすると大部分の細胞が大型細胞になってしまい, 継代培養ができない状態となる. これに対して, 若いドナーからの HCEC は継代 10~15 代まで行っても細胞の大きさの均一性や倍加時間はほぼ一定に保たれる. こうした観察や, 生体内で HCEC の平均細胞面積が 2,000 μm^2 を超えると, 角膜内皮全体の機能が破綻し, 水疱性角膜症の状態へと進行していくことなどから, HCEC の機能や分裂能をその面積から推定する際の指標として 2,000 μm^2 を用いたことは, 妥当であったと考えた.

今回の結果から, HCEC は人間の加齢とともに老化しており, 再構築角膜作製の際はドナー年齢の若い角膜から内皮細胞を得た方がより小さな細胞面積をもった細胞群を得られることがわかった. 生体内の HCEC の平均細胞面積がある値以上に拡大すると, 内皮全体のポンプ機能やバリア機能などが失われ, 水疱性角膜症に陥ることを考えると, 培養された HCEC においても細胞面積が小さい方がより高い機能を有していることが強く示唆される. したがって, できるだけ若いドナーから得た HCEC を使用した方が, より高い角膜内皮機能を持つ再構築角膜を作製できる. 倫理的問題をクリアした上で, 胎児から得た HCEC の使用を検討したい.

3. HCEC 老化の機序

それでは, こうした生体内での角膜内皮細胞老化の機序は何であろうか. 細胞や個体の老化はサイエンスの最近のホットなトピックスの一つであるが, 細胞老化の機序としては, DNA 末端にあり DNA の安定と複製に寄与するテロメアが短縮すること^{12)~14)}, 紫外線や活性酸素種などによる細胞障害が蓄積すること¹⁵⁾などが考えられている. 今回は HCEC の老化の機序として, テロメア長短縮と advanced glycation end products (AGE) の形成について検討した.

1) テロメア長の測定

ヒト角膜内皮細胞のテロメア長について検討した. 実際にはテロメア反復配列と制限酵素サイトまでの長さを含めた terminal restriction fragments を測定した. 対象は各年齢層のアイバンクアイの角膜から直接採取した HCEC, 4 代あるいは 8 代目まで継代培養した HCEC, 対照として末梢血中の白血球とした. 各サンプルからゲノム DNA を抽出し, 制限酵素 Hinf I で処理した後, 電気泳動してサザンブロッティングした. プロブの塩基配列はテロメア反復配列 (5'-TTAGGG-3') に対する相補的配列 (5'-CCCTAA-3') を 4 回反復した配列とした.

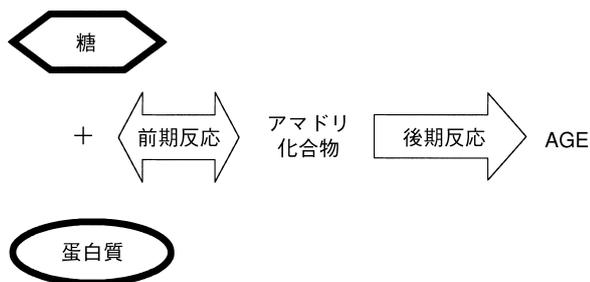


図 5 Advanced glycation end products(AGE)の形成過程.

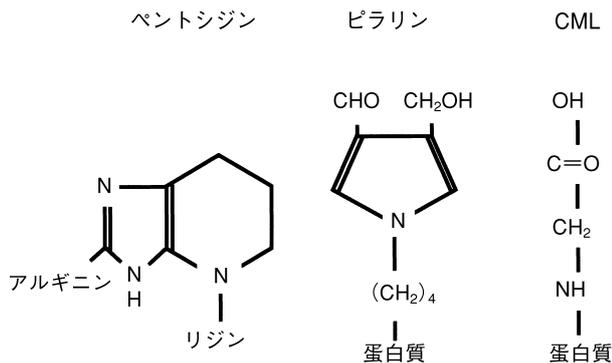


図 6 AGE の代表的な構造.

各細胞間, 各染色体間によりテロメア長にばらつきがあるため, サザンプロットではスメア状になったが, シグナルの最強点を持って各サンプルのテロメア長とした。

生体内から直接採取した HCEC は, 70 歳のドナーで 12.0 kilobase (kb), 72 歳のドナーで 12.1 kb と 70 代でも長いテロメア長を有していた。4 代継代後のテロメア長は, 2, 4, 20, 39, 44, 68, 75 歳のドナーでそれぞれ 11.5, 10.4, 9.8, 10.4, 10.6, 9.2, 9.8 kb であり, 8 代継代後のテロメア長は, 4, 75 歳のドナーでそれぞれ 8.9, 8.4 kb であった。このように, 継代培養していくと徐々にテロメア長が短縮したが, 年齢の違いによるテロメア長の差はみられなかった。対照として測定した白血球では年齢が高いほどテロメア長の短縮がみられた。この結果から, HCEC は生体内で分裂しないことから予想されることであるが, 加齢に伴う HCEC の老化にテロメア長の短縮は関係ないことがわかった。

Egan ら¹⁶⁾は各年齢層から得たヒト HCEC のテロメア長が年齢に関係なく 12 kb と長く保たれており, ヒト HCEC が生体内で分裂能を持たない原因はテロメアが短縮しているためではないと報告している。今回の結果は, 彼らの結果と一致するものであった。さらに, 我々はヒト HCEC を継代培養した時にそのテロメア長が短縮することを確認した。これはドナー年齢に関係なく, HCEC の継代数に限りがあることを示す結果であった。

2) AGE の役割の検討

加齢とともに蓄積する細胞障害の原因としては, 紫外

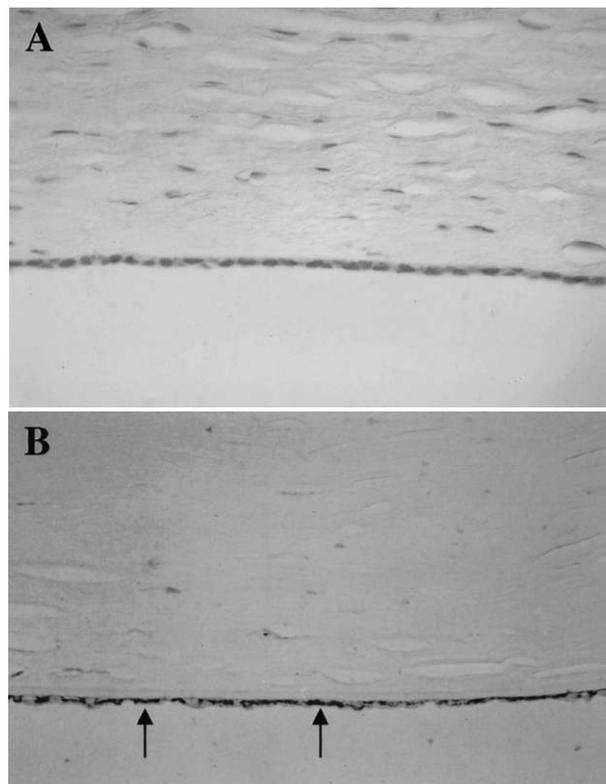


図 7 胎児(A)および成人(B)の角膜内皮での AGE の形成.

胎児角膜では AGE はみられず, 成人では AGE の形成が強くみられた(矢印)。オリジナル倍率(A, B)× 100。

線, 活性酸素種などがよく知られているが, もう一つの要因として知られる AGE に注目し, 角膜内皮細胞老化の原因としての役割について検討した。

蛋白のアミノ基はグルコースなどの還元糖のアルデヒド基と反応し, アマドリ化合物を形成する¹⁷⁾。血糖値管理の指標として用いられているヘモグロビン A_{1c}は, 血中ヘモグロビンの N 末端アミノ酸が前期反応の糖化を受けたものである¹⁸⁾。前期反応アマドリ化合物がさらに脱水, 酸化, 縮合, 環状化などの反応を経由して, 蛍光・褐色変化・分子架橋形成を特徴とする AGE を生じる(図 5)¹⁹⁾。AGE の代表的な構造としては, ペントシジン²⁰⁾, ピラリン²¹⁾, カルボキシメチルリジン(N^ε-carboxymethyl lysine, CML)²²⁾などがある(図 6)。生体内蛋白における AGE 形成は加齢とともに進行するが, 糖尿病患者では高血糖に伴い, その進行が加速されている。これまで, 生体内の蛋白で形成された AGE が, 白内障^{23)~26)}や加齢黄斑変性²⁷⁾などの加齢性疾患, 糖尿病網膜症²⁸⁾²⁹⁾・腎症^{30)~32)}などの糖尿病合併症の発症や進展に寄与していることが示されている。

生体内のヒト角膜内皮細胞における AGE の形成を C-ML に対するモノクローナル抗体 6 D 12³³⁾を用いた免疫染色で検討した。対象は, いずれも東京大学医学部附属病院における剖検例の角膜であった。結果は, 胎児角膜

では AGE はみられず、成人では検討した 6 眼のいずれにおいても AGE の形成がみられた(図 7)。

角膜内皮における AGE 形成の機序を探るために、AGE 受容体である galectin-3 および receptor for AGE (RAGE) の角膜内皮における発現を検討した³⁴⁾。まず、galectin-3 および RAGE に対する抗体を以前の報告³⁵⁾³⁶⁾の方法により作製した。ヒト galectin-3 をコードする DNA を pET ベクターの EcoRI サイトに挿入し、大腸菌にトランスフォームした。大腸菌溶解液からガラクトース結合 Sepharose 4 B カラムを用いて 32 kDa の蛋白として galectin-3 を抽出した³⁷⁾。このヒト・リコンビナント galectin-3 を 1.0 mg 含む 50% フロイント完全アジュバントを兎の皮下 20 か所に注入し、さらにヒト・リコンビナント galectin-3 を 0.5 mg 含む 50% フロイント不完全アジュバントの注射を 5 回、ブースターとして行った。最後の注射から 10 日後に血清を採り、アフィニティー・クロマトグラフィで IgG を抽出した。Galectin-3 蛋白は種差が余りなく、今回作製した抗ヒト galectin-3 抗体はヒト、マウス、ラット、ウシの galectin-3 と反応することを western blotting で確認した。

次に、RAGE に対する特異的な抗体の作製を行った。キーホール・リンペット・ヘモサイアニンに結合させたヒト RAGE ペプチド断片(SEEPEAGESSTGGP)0.5 mg を含む 50% フロイント完全アジュバントをウサギの皮下 20 か所に注入し、さらに 3 回の注射をブースターとして行った。抗 galectin-3 抗体と同様に IgG を精製した。使用したペプチド断片部分のアミノ酸配列はヒト: EEPEAGESSTGGP, ウシ: EEPEAAESSTGGP であり、相同性が 90% 以上であることから、本抗体はウシ RAGE と反応することが十分考えられた。

今回作製した抗 galectin-3 ポリクローナル抗体と抗 RAGE ポリクローナル抗体を使用してウシ角膜における AGE の受容体の発現を免疫染色で検討したところ、角膜内皮細胞に強い陽性反応がみられた(図 8 A, C)。

次にメッセンジャー RNA レベルでの両受容体の角膜内皮細胞での発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) で検討した。新鮮ウシ角膜内皮細胞からトータル RNA を抽出し Superscript II (Gibco BRL 社)を用いて cDNA を作製した。ジーンバンクに登録されているヒト galectin-3 のシークエンスを元に、センスプライマーは 5'-CCTATC CTGGGGCCTA-TCC-3' (ヒト galectin-3 の 171-189 番目のヌクレオチドに対応)、アンチセンスプライマーは 5'-GAAGCGTGG-GTTAAAGTGAAGGC-3' (ヒト galectin-3 の 519-542 番目のヌクレオチドに対応)とした。RAGE に対するプライマーは、以前に報告³⁸⁾されているウシ RAGE のシークエンスを元に、センスプライマーは 5'-AAGTCCT-GTCTCCCCAGGGAG-3' (194-214 番目のヌクレオチドに対応)、アンチセンスプライマーは 5'-TCAAGGCC-

TCCTGTGCTGCT-3' (1240-1260 番目のヌクレオチドに対応)とした。これらのプライマーを用いて、94°C 60 秒、58°C 60 秒、72°C 60 秒を 30 サイクルの PCR で cDNA を増幅した。PCR 産物は TA ベクターを用いてサブクローニングし、シークエンサー(モデル 310, Applied Biosystems 社)を用いてシークエンスを決定した。

Galectin-3 に対する PCR では 240 bp と 330 bp の 2 本のバンドがみられ、予測された長さ 370 bp よりも短かった(図 8 B)。短い PCR 産物が形成された原因は、galectin-3 に対するセンスプライマーが PGAY の繰り返し配列に対するものであったためと考えられた。各 PCR 産物のシークエンスは同じ 3'側配列を持ち、5'側配列は異なっていた。最も長い PCR 産物はヒト galectin-3 の 226~542 番のヌクレオチドと対応していた。RAGE に対する PCR では予測された長さのバンドがみられ、PCR 産物のシークエンスはウシ RAGE と一致した(図 8 D)。このように、AGE の受容体である galectin-3 および RAGE の発現が蛋白レベルでもメッセンジャー RNA レベルでも角膜内皮細胞にみられた。

次に、AGE 化蛋白が実際に角膜内皮細胞に取り込まれるかどうかを *in vitro* の系で確認した。HCEC と同様の方法で培養したウシ角膜内皮細胞の培養液中に AGE 化したウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) または対照として AGE 化していない BSA を加え、24 時間後に抗 CML 抗体 (6 D 12) を用いた免疫染色で AGE の局在を調べたところ、対照では AGE 化蛋白がみられないのに対して、AGE-BSA では角膜内皮細胞質に AGE 化蛋白の取り込みがみられた(図 9)。

さらに、こうして角膜内皮細胞中に蓄積された AGE 化蛋白の角膜内皮細胞への影響をみるために、ウシ角膜内皮細胞の培養液中に AGE 化 BSA (0~10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加え、培養角膜内皮細胞におけるアポトーシスの発生を ApopTag *in situ* apoptosis detection kit (Intergen 社)を用いた terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling 法で解析した。すると、AGE の濃度があがると図 10 に示すような濃縮した核、クロマチンの断片化、細胞体積の減少といった特徴を有するアポトーシスを誘導された細胞がみられるようになった。培養液中の AGE 濃度依存性に培養角膜内皮細胞のアポトーシス発生数が増加した(図 11)。さらに、ウシ角膜内皮細胞培養液中に AGE 化 BSA (0~10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加えた時に産生される活性酸素種の濃度をニトロブルーテトラゾリウム還元量で測定した³⁹⁾⁴⁰⁾。その結果、AGE 化 BSA の濃度依存性に活性酸素種の産生量が増加することがわかった(図 12)。

前房水中には AGE 化蛋白が存在することが報告⁴¹⁾⁴²⁾されている。今回の実験でアポトーシスの誘導や活性酸素種の産生を惹き起こした AGE 化蛋白の濃度は前房水中の AGE 化蛋白濃度よりも高い濃度であった。ヒト角

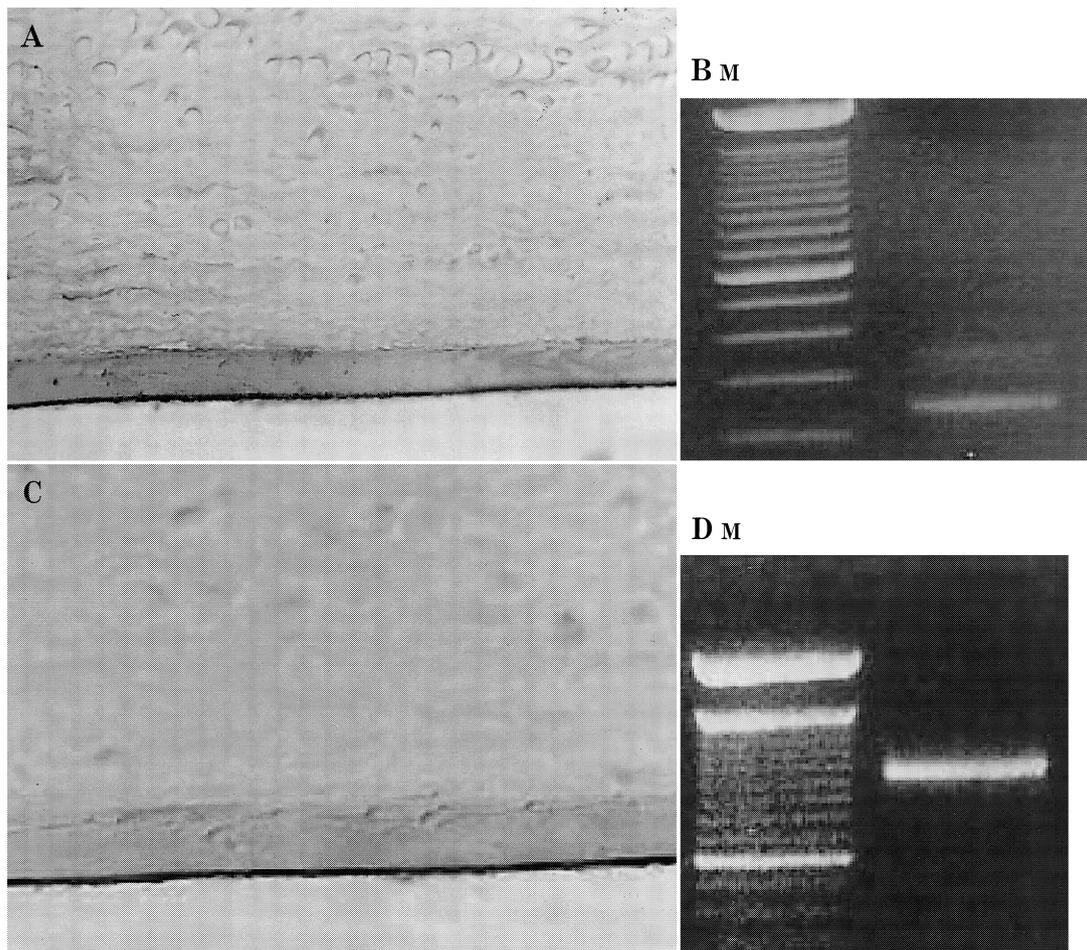


図 8 ウシ角膜内皮における galectin-3(A, B)と receptor for AGE(C, D)の発現。
免疫染色(A, C)および reverse trascription-polymerase chain reaction(RT-PCR) (B, D)で galectin-3 と receptor for AGE の発現がみられた。
M : marker. オリジナル倍率(A, C)×100. 文献 34 より改変引用.

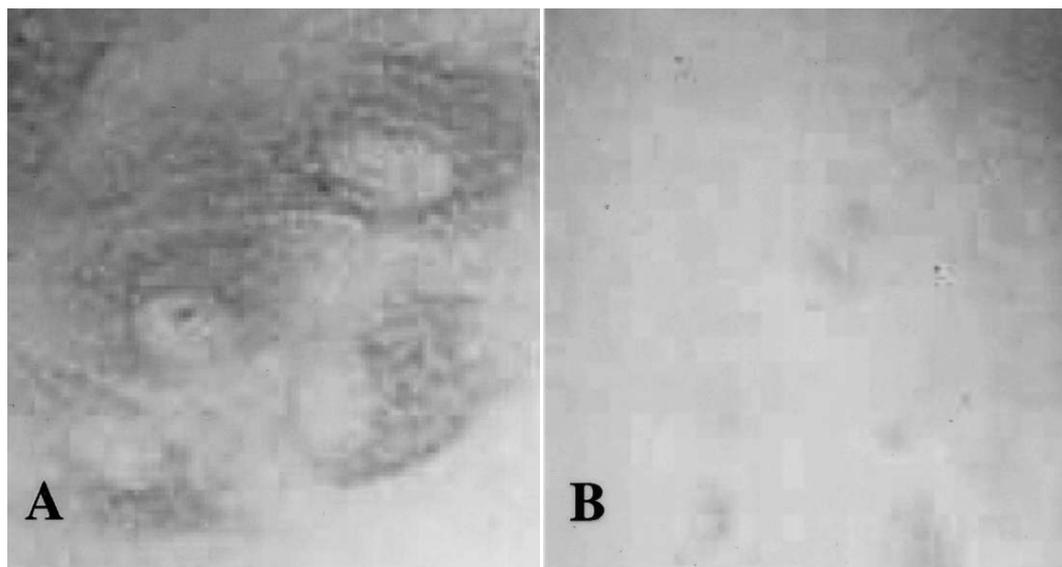


図 9 培養ウシ角膜内皮細胞の培養液中に AGE 化したまたは対照として AGE 化していないウシ血清アルブミン(bovine serum albumin, BSA)を加え 24 時間後の AGE の局在。
対照(B)では AGE 化蛋白がみられないのに対して AGE-BSA では角膜内皮細胞質に AGE 化蛋白の取り込みがみられた(A)。文献 34 より改変引用。

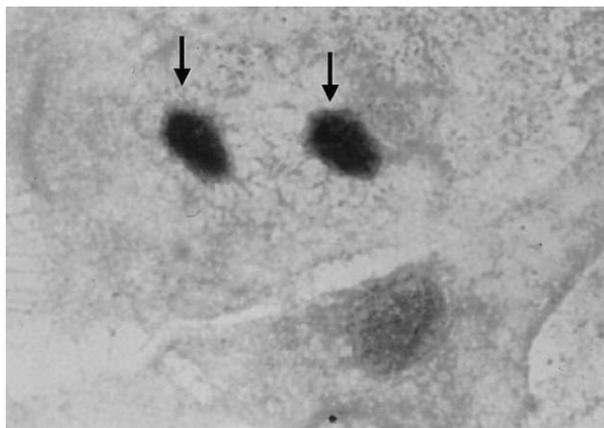


図 10 AGE 化ウシ血清アルブミン(BSA)によりアポトーシスを誘導された培養ウシ角膜内皮細胞(矢印)。濃縮した核，クロマチンの断片化，細胞体積の減少といった特徴を有した。文献 34 より改変引用。

膜内皮細胞は一生おきかわっていくことがないため，その細胞内に蓄積される AGE 化蛋白の量は前房内の濃度よりも高くなっていることが予測され，また，AGE の細胞内での作用も長期間働くことが考えられる。したがって，AGE 化蛋白によるアポトーシスの誘導や活性酸素種の産生といった反応が生体内の HCEC で発生している可能性が考えられる。

AGE の受容体として，これまで galectin-3⁴³⁾，RAGE⁴⁴⁾⁴⁵⁾，80 K-H⁴⁶⁾，OST-48⁴⁶⁾，macrophage scavenger receptors⁴⁷⁾が報告されている。これらの受容体と結合した AGE 化蛋白は細胞内のシグナル伝達経路を活性化させる。特に重要であるのは活性酸素種の産生と抗酸化機構の低下³⁸⁾から酸化ストレスを増加させる系である⁴⁸⁾。活性酸素種の産生は，角膜内皮細胞のポンプ機能の低下や核・細胞質内器の傷害を惹き起こすことが知られている⁴⁹⁾⁵⁰⁾。また，酸化ストレスの増加は蛋白の酸化から細胞内の AGE 形成を加速させたり，RAGE などの AGE 受容体の発現亢進から AGE の取り込みを進行させることで，さらに AGE 化蛋白の細胞内での蓄積の悪循環を惹き起こす³⁸⁾⁵¹⁾⁵²⁾。また，酸化ストレスの増加は，NF- κ B の発現亢進からインターロイキン-1(IL-1)や腫瘍壊死因子(TNF)といったサイトカインの発現を促進する⁵³⁾⁵⁴⁾。こうした機序を介して AGE が血管内皮細胞⁵⁵⁾，肺上皮細胞⁵⁶⁾，ニューロン⁵⁷⁾などのアポトーシスを惹起することが報告されている。今回の結果からは，前房水の AGE 化蛋白が角膜内皮細胞に発現している AGE 受容体を通して内皮細胞中に取り込まれ，アポトーシスの誘導や活性酸素種の産生を通して，角膜内皮細胞傷害に働いていることが示唆された。

4. 成人血清によるヒト角膜内皮細胞の培養

ウシ由来の材料の使用は，ウシ海綿状脳症の発生していない産地のウシ由来のものを使用すればプリオンフリーの状態であると考えられるが，再構築角膜の臨床応

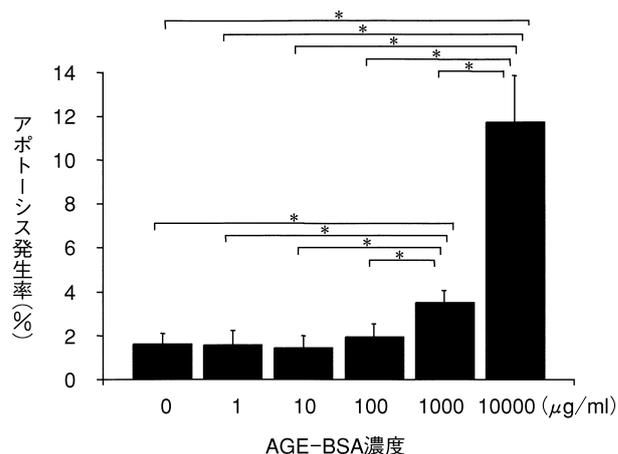


図 11 AGE 化 BSA の培養液中濃度とアポトーシス発生率。

培養液中の AGE 化 BSA 濃度依存性に培養角膜内皮細胞のアポトーシス発生数が増加した。*：一元配置分散分析および Scheffe 多重比較， $p < 0.05$ 。文献 34 より改変引用。

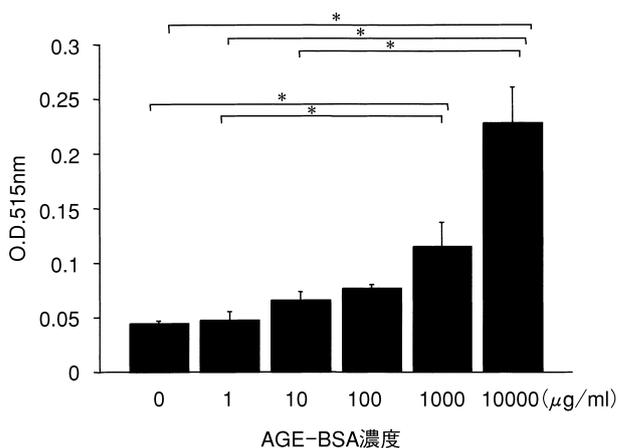


図 12 AGE 化 BSA の培養液中濃度と産生活性酸素種濃度。

培養液中の AGE 化 BSA 濃度依存性に培養角膜内皮細胞の活性酸素種産生量が増加した。*：一元配置分散分析および Scheffe 多重比較， $p < 0.05$ 。文献 34 より改変引用。

用を考えた時，ウシ由来の材料を他のもので代替できるのであればその方が好ましい。こうした目的に向けての第一歩として，通常細胞培養に使用される FBS ではなく，これまでに報告のない成人血清を用いての角膜内皮細胞の培養が可能かどうかを検討した。

成人から空腹時に採取した静脈血を，2,000 rpm で 20 分間遠心分離し血清を採り，56°C30 分間で補体の非働化をし，孔径 0.22 mm のミリポアフィルタで濾過滅菌したものを培養に使用した。HCEC の初代培養時から継続して培養した場合と，継代 3 代目で凍結保存した後に継代培養をした場合で，15% FBS と 15% 成人血清をそれぞれ使用した場合の細胞形態，増殖速度を比較

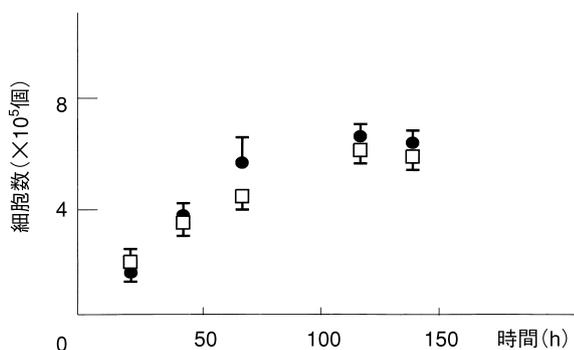


図 13 FBS(□)と成人血清(●)での HCEC 継代 3 代目の増殖曲線の比較。

FBS と成人血清の間に差はみられなかった。

した。

初代培養時、FBS と成人血清の間で、ヒト角膜内皮細胞の形態に差はみられなかった。さらに、3 代目まで継代した場合も両者間で細胞形態に差はみられなかった。継代 3 代目の増殖曲線を比較しても FBS と成人血清の間に差はみられなかった(図 13)。

継代 3 代目で凍結保存した後に継代培養をした場合も、FBS と成人血清の間で、ヒト角膜内皮細胞の形態に差はみられず、増殖曲線を比較しても FBS と成人血清の間に差はみられなかった(図 14)。

こうした結果から、FBS の代わりに成人血清を使用してヒト角膜内皮細胞の培養が可能であることがわかった。FBS は細胞増殖を促進する因子が成人血清よりも多く含まれており、細胞培養には有利である。しかし HCEC の場合、初代培養時にウシ角膜内皮細胞が作る ECM でコーティングした培養皿を使用すれば、成人血清に含まれる程度の増殖因子でも十分に初代および継代培養が可能であることがわかった。

我々の方法では初代培養時には、培養皿をウシ細胞が産生する ECM でコーティングしておかなければ細胞の接着が悪いため初代培養が困難となり、ウシ材料から完全に脱却できたわけではない。しかし、成人血清によるヒト角膜内皮細胞の継代培養が可能であることがわかり、培養ヒト角膜内皮細胞の臨床応用へ一歩近づいた。今後、仔ウシ内皮細胞の代わりに他の動物から得られる角膜内皮細胞を使用することで、ウシ海綿状脳症の感染の危険をなくしたり、さらに各種 ECM を組み合わせてコーティングした培養皿を使用したりすることにより、より安全性の高い HCEC 培養法を確立していく必要がある。

5. 小 括

培養ヒト角膜内皮細胞の性状の項を小括すると、①ヒト角膜内皮細胞の培養系を確立し、安定した初代・継代培養に成功した。②継代培養されたヒト角膜内皮細胞ではドナー年齢が高いほど大型老化細胞が多く出現した。③ヒト角膜内皮細胞の老化にテロメアの短縮は関

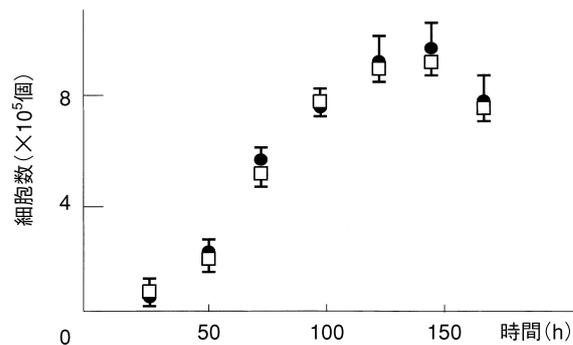


図 14 FBS(□)と成人血清(●)での凍結保存後 HCEC 継代 4 代目の増殖曲線の比較。

FBS と成人血清の間に差はみられなかった。

係なく、AGE が一因となっている可能性が示唆された。

④成人血清でヒト角膜内皮細胞の効率的な培養が可能であることがわかった。

III 培養ヒト角膜内皮細胞を用いた再構築角膜の評価

培養した角膜内皮細胞を用いて再構築角膜を作製する試みはこれまでも報告されている。初期には、培養した家兎やウシの角膜内皮細胞を家兎・ネコ角膜実質⁷⁸⁾⁵⁸⁾、ゼラチン膜⁵⁹⁾、ウシの Descemet 膜⁶⁰⁾、ハイドロジェルレンズ⁶¹⁾などの上に播種したものが作製され、動物への移植が行われた。家兎やウシなどの角膜内皮細胞はヒト角膜内皮細胞と異なり生体内でも増殖能が高く、その培養法や移植への利用法は HCEC とは大きく異なる。次いで、SV-40 large T antigen などの transfection により不死化させた角膜内皮細胞を用いた再構築角膜が報告⁶²⁾⁶³⁾された。不死化した細胞を用いると、培養や移植自体は容易になるが、癌化した細胞を生体に戻すことは臨床の場面では考えづらく、臨床応用には向かない方法である。さらに、角膜内皮細胞だけでなく、上皮・実質細胞を含めた 3 種の細胞を培養し、コラーゲンゲルなどに付着させて、角膜全体の再構築を行った報告^{4)62)64)~66)}もある。角膜全体を再構築するという最終的な目標に向けての大きな前進を示した報告であるが、角膜内皮細胞密度がどれくらい得られているのか不明であり、またコラーゲンゲルのみで実質を作製した場合、非常にもろくて通系すら困難であると考えられる。培養した HCEC とヒト角膜実質を用いた再構築角膜も報告^{4)5)67)~69)}されている。臨床応用を目指して再構築角膜を作製する場合、播種した HCEC の細胞密度をどのように高めるかが問題となる。単純にヒト角膜実質上に HCEC を撒いただけでは得られる細胞密度は 500 cells/mm²程度である。生体内での細胞密度 3000 cells/mm²に近づけるための工夫として、細胞浮遊液の投与を何回にも分けて行う方法³⁾、細胞播種後に遠心することで細胞接着を促進する方法などが報告⁵⁾⁶⁹⁾されている。今回、我々は Engel-

mann らの方法⁵⁾⁶⁹⁾を参考にして、細胞播種後に遠心することで細胞接着を促進する方法を用いた。

臨床応用可能な再構築角膜の作製を目指す時、作製した再構築角膜の機能の評価、内皮細胞密度を高めるための細胞播種法など、検討すべき課題がまだ多く残されている。そこで、我々の方法で継代培養した HCEC を用いて、正常角膜に近い角膜内皮の形態・細胞密度・機能を有する再構築角膜の作製が可能かどうか検討を加えた。

1. 再構築角膜作製法

アメリカのロッキーマウンテンライオンズアイバンクから輸入した新鮮ヒト角膜の内皮面に滅菌蒸留水 500 μ l を滴下して 1 分間静置することで角膜内皮細胞を傷害した後、滅菌綿棒で内皮面を Descemet 膜にできるだけ傷害を与えないように軽く擦過することにより角膜内皮を剝離した。この角膜を 24 ウェル培養皿のウェル内に Descemet 膜を上に向けて置き、40 代のドナーから継代培養した 5 代目の培養ヒト角膜内皮細胞を 2 ml 中に 50 万個含む溶液を露出した Descemet 膜上に滴下した。培養皿に蓋をして、細胞の接着を促進するために培養皿ごと 1,000 rpm で 10 分間遠心した。その後、24~72 時間培養液中に静置した。24 時間以上静置する場合は 1 日 1 回の培地交換を行った。

2. 再構築角膜の組織学的検討

再構築角膜の組織をみたところ、細胞の播種後 3 時間では、細胞は角膜実質面に接着しているものの、細胞質が盛り上がっていた(図 15 A)。細胞播種後 24 時間では、再構築角膜上の角膜内皮細胞は、一層の細胞層が隙間なく配列し、細胞質は正常角膜同様に平坦になっていた(図 15 B)。

再構築角膜上の HCEC の細胞密度を計測するために 0.3% トリパンブルーおよび 0.2% アリザリンレッド S をそれぞれ 1 分間反応させた後に⁷⁰⁾、角膜内皮面の細胞輪郭をパーソナルコンピュータ上の画像として取り込み、細胞密度を計算した。その結果、角膜内皮細胞密度は 1 mm² に 2,380 \pm 264(平均値 \pm 標準偏差)個(n=4)あった(図 15 C)。正常角膜内皮細胞密度には及ばないものの、その 80% 程度の細胞密度を得ることができた。

次いで、再構築角膜上の角膜内皮細胞の性状を共焦点顕微鏡を用いて検討した。この実験では角膜実質としてマウス角膜実質を用いた。内皮細胞を剝離した BALB/c マウス角膜実質上に培養ヒト角膜内皮細胞を播種した後、遠心し、48~72 時間培養した後、閉鎖斑関連蛋白 ZO-1 に対する抗体や propidium iodide (PI) と反応後、共焦点顕微鏡で観察した。PI は DNA の二重らせん構造に結合して赤色蛍光が増強される核酸染色色素であるが、一般に生きた細胞の細胞膜を透過できないため、その染色性により細胞の viability がわかる。まず、再構築角膜をアセトンで固定した後に PI と反応させた場

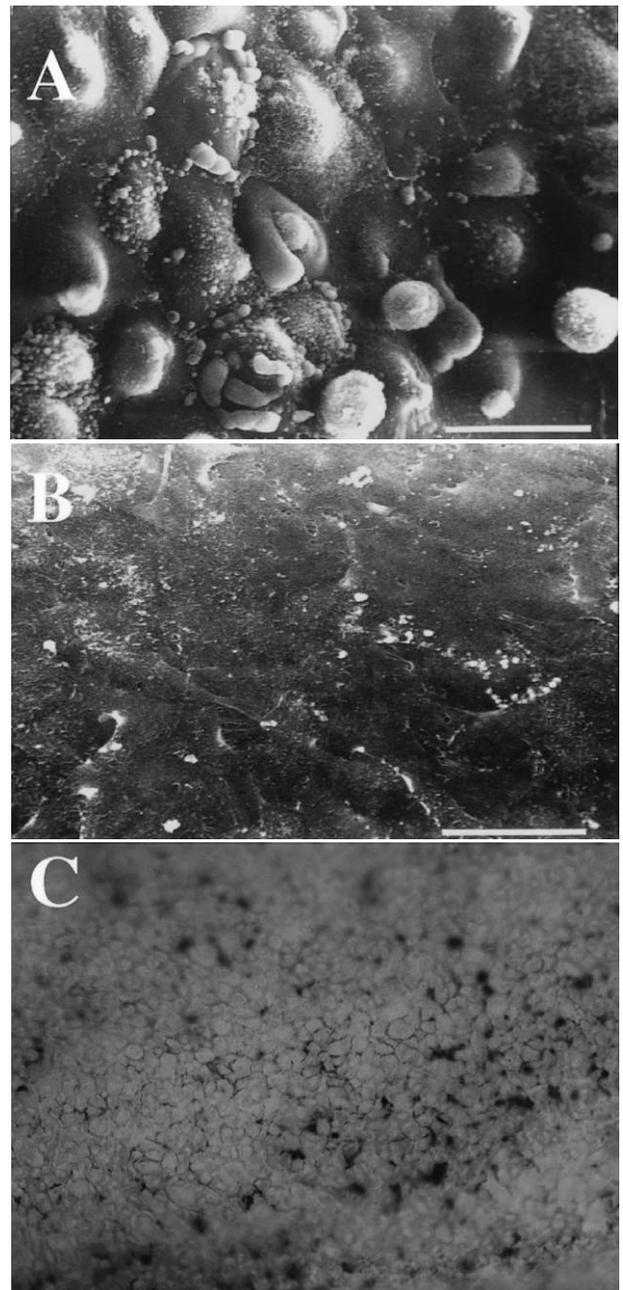


図 15 ヒト角膜実質に HCEC 播種後 3 時間(A)および 24 時間(B, C)後の状態。

播種後 3 時間では細胞は角膜実質面に接着しているものの細胞質が盛り上がっていた(A)。播種後 24 時間では一層の細胞層が隙間なく配列し細胞質は平坦になっていた(B)。細胞密度は平均 2380 \pm 264/mm²であった(C)。A, B のバーは 50 μ m

合、すべての内皮細胞の核が染色され、細胞密度が平均で約 2,700/mm²であることがわかった(図 16 A)。再構築角膜を固定せずにそのまま PI と反応させ観察したところ、PI を透過させる比較的 viability の低い細胞が 1 mm²当たり平均で 253 個あり、こうした細胞が全体の約 9% であることがわかった(図 16 B)。再構築角膜をアセトンで固定した後、閉鎖斑関連蛋白である ZO-1 に対する抗体と反応させたところ、細胞間の境界が明瞭に染

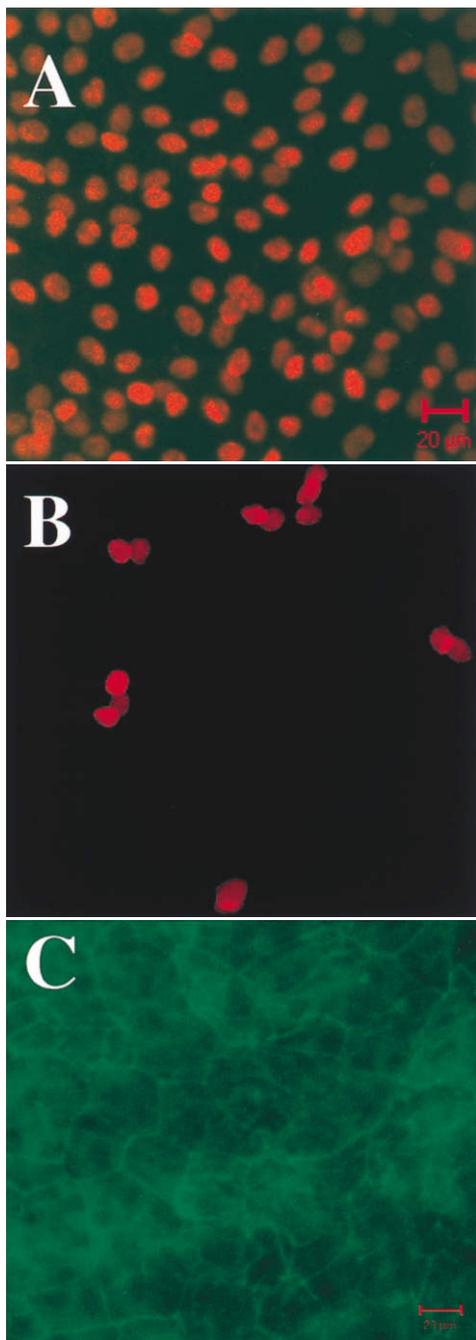


図 16 再構築角膜上角膜内皮細胞の共焦点顕微鏡による観察。
再構築角膜をアセトン固定後に PI と反応させた場合、すべての内皮細胞の核が染色され、細胞密度が平均で約 2,700/mm²であった(A)。再構築角膜を固定せずに PI と反応させ観察したところ、PI を透過させる比較的 viability の低い細胞が全体の約 9% あった(B)。閉鎖斑関連蛋白 ZO-1 が細胞間境界に明瞭に染色され閉鎖斑がすでに形成されていた(C)。

色され、閉鎖斑がすでに形成されていることがわかった(図 16 C)。

今回用いた HCEC の培養液中には血清や growth factor が含まれ、これらの刺激によって HCEC の遺伝子発現は大きく変化していることが予想される。共焦点顕

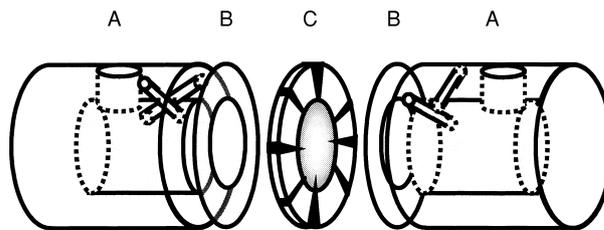


図 17 再構築角膜のポンプ機能測定法。
再構築角膜(C)をゴム(B)およびウッシング・チャンパー(A)の間に挟みショートサーキットカレントアンプリファイアを用いて再構築角膜の作り出す電位差とそれを打ち消すために必要な短絡電流を測定した。

微鏡を用いた検討では、細胞間の接着構造である閉鎖斑の形成に関しては正常の角膜内皮と同様の性状を示した。角膜実質に播種した後に、無血清あるいは低血清の状態で一定期間静置した HCEC の遺伝子発現が生体内の角膜内皮細胞と同じような状態に戻っているかどうかなど、今後、培養 HCEC の遺伝子発現に関しては、マイクロアレイなどを用いた包括的な遺伝子発現の変化の検討が望まれる。

3. 再構築角膜のポンプ機能の解析

次に、再構築角膜のポンプ機能について検討した。前述した方法でヒト角膜実質と培養 HCEC から作製した再構築角膜を、ウッシング・チャンパーの間に挟み、ショートサーキットカレントアンプリファイア(モデル C-EZ-9100, 日本光電社)を用いて、再構築角膜の作り出す電位差とそれを打ち消すために必要な短絡電流を測定した(図 17)。また、Na⁺-K⁺ATPase 阻害剤であるウアブイン投与後の電位差、短絡電流も測定した。

ヒト角膜実質に培養ヒト角膜内皮細胞を播種したものを対象とし、陽性対照として上皮のみを除去し内皮がついた正常ヒト角膜、陰性対照として上皮および内皮を除去したヒト角膜実質を用いて測定した。結果としては、正常内皮の付いたヒト角膜では電位差は上皮側をプラスとして 0.40±0.14(平均値±標準偏差)mV(n=4)であり、これまでの報告とほぼ一致する値であった^{71)~73)}。再構築角膜では、電位差は 0.30±0.07 mV(n=4)で、正常角膜の 75% の値であり、上皮と内皮を除去したヒト角膜実質では電位差は 4 眼とも 0 mV であった。いずれも測定開始 10 分後に Na⁺-K⁺ATPase の阻害剤であるウアブインを 0.1 mM/l になるようにチャンパー内に加えると電位差は 0 mV となった。

短絡電流は再構築角膜で 5.1±3.8(平均値±標準偏差)μA/cm²と、正常角膜での 9.3±0.85 μA/cm²の約 55% の値であった。測定開始 10 分後にウアブインを加えると短絡電流は 0 μA となった。経内皮電気抵抗は再構築角膜で 58.8 Ω・cm²であり、正常角膜での 43.0 Ω・cm²よりも大きな値であった。

これまでの報告では、培養した HCEC を用いて再構

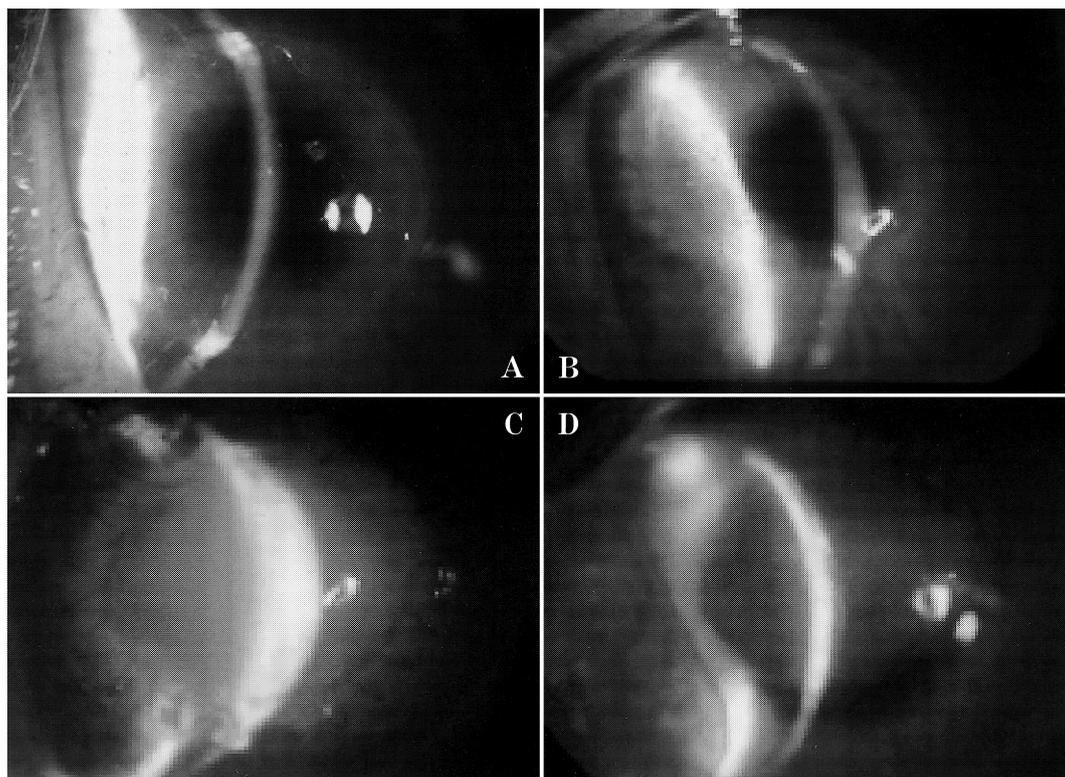


図 18 再構築角膜の家兎眼への移植後の経過。

再構築角膜移植群では術後 6 か月の観察期間中角膜の透明性が保たれた(A: 1 か月, B: 6 か月)。内皮細胞の播種を行わなかった家兎角膜を移植した対照群では移植片の浮腫が強かったが(C: 1 か月), 術後 3 か月を過ぎるころから徐々に浮腫が軽減した(D: 6 か月)。

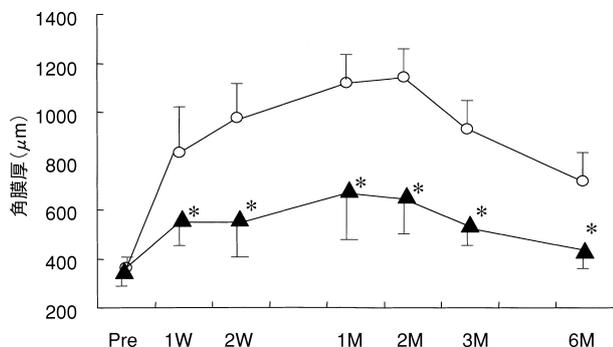


図 19 再構築角膜の家兎眼への移植後の角膜厚の経過。術後 1 週以降, 再構築角膜移植群(▲)では対照群(○)よりも有意に小さな角膜厚を示した(unpaired t-test, *: $p < 0.05$)。

築角膜を作製し, 動物眼に移植してその有効性を検討したものはあるが, 再構築角膜の機能を *ex vivo* で検討した報告はほとんどない。動物眼に移植する *in vivo* での検討は, 臨床応用前に不可欠である。しかし, レシピエントの動物種によっては内皮細胞に増殖能があり, 移植後のレシピエント内皮の影響は無視できないため, *in vivo* の検討のみでは再構築角膜の機能の評価として十分とはいえない。今回の実験では, *ex vivo* における再構築角膜の機能の評価として, 角膜内皮の代表的な機能であるポンプ機能をウッシング・チャンバーで測定され

る電位差として評価した。その結果, 培養 HCEC を用いて作製した再構築角膜が正常角膜には及ばないものの, その 75% 程度のポンプ機能を有していることがわかった。そして, 電位差が $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ の阻害剤であるウアバインでブロックされたことから, 再構築角膜ポンプ機能が生体内の内皮と同様に $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ に依存するものであることがわかった。再構築角膜のポンプ機能が正常角膜に及ばなかった原因としては, 細胞密度が低かったことと, 培養 HCEC 一つ一つの機能が低下していることが考えられる。再構築角膜は $2,000 \text{ cells/mm}^2$ 以上の細胞密度を有していた。臨床的にはこれだけの細胞密度があれば角膜内皮機能が問題になることはない。したがって, 細胞密度は大きな要因ではないのかも知れない。ただし, 細胞密度が $2,000 \text{ cells/mm}^2$ あるといっても, アリザリンレッド染色した内皮面を観察すると, 所々にアリザリンレッドがべったりと染まる無細胞の領域があることがわかった。こうした領域を作らないように細胞播種法をさらに改良する必要がある。また, 培養 HCEC 一つ一つの機能が低下していることもポンプ機能低下の大きな原因であると考えられる。共焦点顕微鏡を用いた検討で, PI を透過させる比較的 viability の低い細胞が全体の約 9% あることが示された。こうした viability の低い細胞をできるだけ作らないように培養法を改良することや, viability の低い細胞を

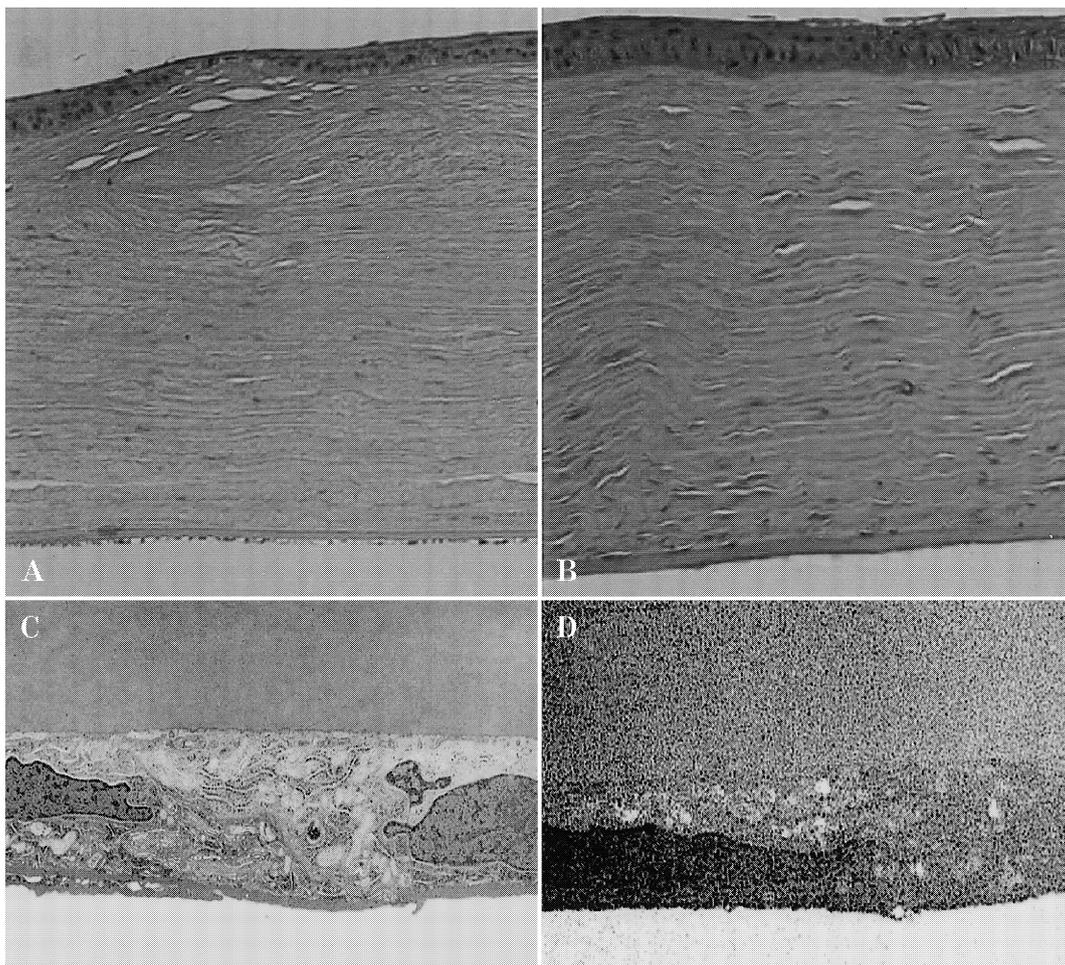


図 20 再構築角膜移植後の組織所見。

再構築角膜移植群 1 か月目ではわずかに角膜の浮腫がみられるものの角膜内皮は一層に配列し(A)，ほぼ正常の内皮と同様の形態を示した(C)．術後 6 か月目においても再構築角膜を裏打ちする角膜内皮細胞の形態は正常角膜内皮細胞と同様であった(B, D)．オリジナル倍率(A, B)×40，(C, D)×8,000．

除去する方法を考案する必要がある．また，ドナー年齢をできるだけ若くし，さらに継代数を減らすことで，viability の低い細胞の出現数を減らすことができるかも知れない．

Ex vivo での再構築角膜の機能評価で，正常角膜に及ばないものの，その 75% のポンプ機能を持つことが確認できたので，次に培養ヒト角膜内皮細胞を用いた再構築角膜の *in vivo* での有効性を検討した．

4. 再構築角膜の家兎への移植

動物を用いる実験では Association for Research in Vision and Ophthalmology の眼科および視覚研究における動物使用に関する宣言を遵守した．ニュージーランド白色家兎の新鮮角膜の内皮面に蒸留水を滴下して 1 分間静置することで内皮細胞に傷害を加えた後，内皮細胞を滅菌した綿棒を用いて剝離した．この角膜を 24 ウェル培養皿のウェル内に Descemet 膜を上に向けて置き，40 代のドナーから継代培養した 5 代目の培養ヒト角膜内皮細胞を 2 ml 中に 50 万個含む溶液を露出した Descemet 膜上に滴下した後，培養皿に蓋をして，細胞の接

着を促進するために培養皿ごと 1,000 rpm で 10 分間遠心した．その後，24 時間培養液中に静置した．レシピエントとなるニュージーランド白色家兎の角膜を 6 mm のヘスバグバロントレパン(カティナープロダクツ社)で切開した後，フィブリン析出を抑制するためヘパリン溶液 1,000 unit/ml を虹彩面上に滴下し，さらに移植片内皮面を保護するために 1% ヒアルロン酸ナトリウムを虹彩面上に滴下した．6.5 mm バロンパンチ(カティナープロダクツ社)で切開した再構築角膜を 10-0 ナイロン糸で 8 針単結紮し，さらに 10-0 ナイロン糸で 24 針の連続縫合を行った後，単結紮糸をすべて抜糸した．手術終了時にデキサメサゾン 60 μg を含む新しい drug delivery system であるシューロデックス®を前房内に入れた．対照として角膜内皮を剝離した後，培養内皮細胞の播種を行わない家兎角膜を移植した．両群とも術後 1 か月の時点で連続縫合糸の抜糸を行った．前眼部の観察・撮影，超音波パキメータによる角膜中央部の厚さ測定を術後 6 か月まで行った．術後 1 か月と 6 か月の時点で角膜を摘出し，組織学的検討を行った．

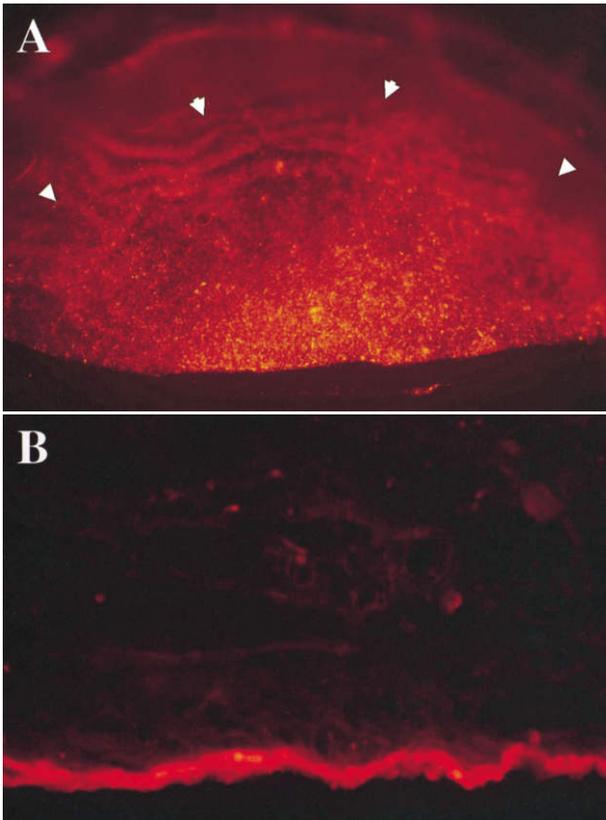


図 21 DiI ラベルした HCEC を使用した再構築角膜移植後 1 か月目。

再構築角膜移植部分(白矢じりで囲む部分)の内皮面は DiI ラベルされた細胞で覆われ(A), 凍結切片による観察でも内皮側が DiI ラベルした細胞で覆われていた(B)。

再構築角膜移植群では術後 6 か月の観察期間中角膜の透明性が保たれた(図 18 A, B)。一方, 内皮細胞の播種を行わなかった家兎角膜を移植した対照群では移植片の浮腫が強かったが(図 18 C), 術後 3 か月を過ぎるころから徐々に浮腫が軽減した(図 18 D)。再構築角膜移植群では術後 1~2 か月に角膜厚の増加をみたが, 術後 6 か月目にはほぼ正常角膜の値に戻った(図 19)。対照群では術後 2 か月間著明な角膜厚の増加がみられ, 3 か月を過ぎてはじめて角膜厚が減少した(図 19)。術後のいずれの時点においても再構築角膜移植群の角膜厚が有意に小さい値を示した。

再構築角膜移植群の術後の移植片を組織学的に検討したところ, 1 か月目ではわずかに角膜の浮腫がみられるものの, 角膜内皮は一層に配列し, ほぼ正常の内皮と同様の形態を示した(図 20)。術後 6 か月目においても再構築角膜を裏打ちする角膜内皮細胞の形態は正常角膜内皮細胞と同様であった(図 20)。

家兎では生体内でも角膜内皮細胞が分裂・増殖することが知られている⁷⁴⁾⁷⁵⁾。今回の実験においても, 周辺部に残っている家兎角膜内皮細胞が分裂増殖して移植片に侵入し, 角膜透明性の維持に寄与した可能性が考えられ

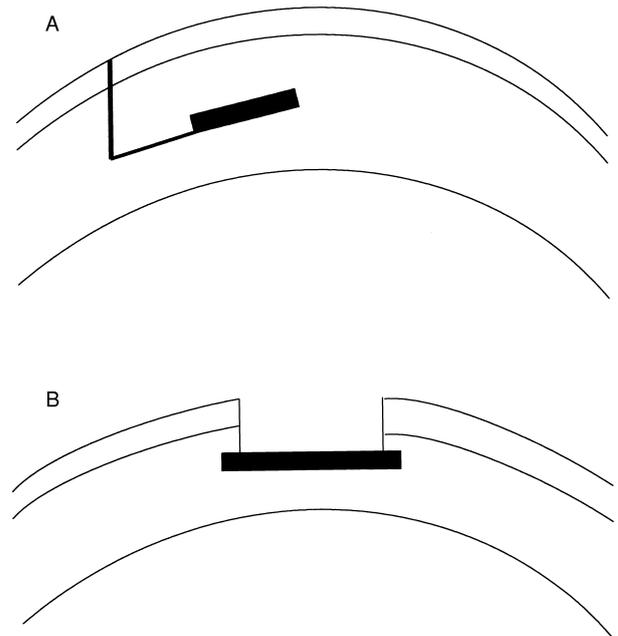


図 22 人工実質の家兎眼への移植法。

直径 3 mm の人工実質(■)を実質ポケット内へ挿入(A)。または中央直径 4 mm の範囲を表層切除し, その周囲にポケットを作製しそこへ直径 5 mm の円形人工実質(■)をはめ込んだ(B)。

る。そこで, Cell Tracker CM-DiI (Molecular Probes 社) という蛍光色素でラベリングした培養ヒト角膜内皮細胞を用いて再構築角膜を作製し, 家兎へ移植後, 経時的に移植片を摘出し, 培養ヒト角膜内皮細胞が移植後どれくらい残っているかを検討した。まず, 継代 4~5 代目の HCEC を培養皿からトリプシナイズした後, DiI 溶液を加えて 37°C, 10% CO₂ で 5 分間 incubation, on ice 15 分間, 遠心後廃液し, さらにペレットを PBS で懸濁して遠心することを 2 回繰り返した。こうして DiI ラベルした HCEC を用いて, 上述したのと同じ方法で再構築角膜を作製し, 家兎眼への移植に使用した。術後 1 か月目に摘出した角膜をフラットマウントの状態で蛍光顕微鏡下で観察したところ, 再構築角膜移植部分の内皮面は DiI ラベルされた細胞で覆われていた(図 21 A)。凍結切片による観察でも内皮側が DiI ラベルした細胞で覆われていた(図 21 B)。検討した 5 つの角膜すべてで, 同様に術後 1 か月の段階で移植片の内皮面は DiI でラベルした細胞で覆われていた。以上の *in vivo* での結果から, 培養した HCEC が生体内で機能して, 角膜の透明性維持に働いていることが確認された。

DiI の蛍光は光に当たることによって減弱していき, 本モデルでは約 1 か月間しか維持されないため, 移植後長期の観察はできなかった。しかし, 移植された培養ヒト角膜内皮細胞が 1 か月の時点で移植片の内皮面全面を覆っていたことから, 1 か月以降も移植片の透明性の維持は培養ヒト角膜内皮細胞によってなされていると推測され

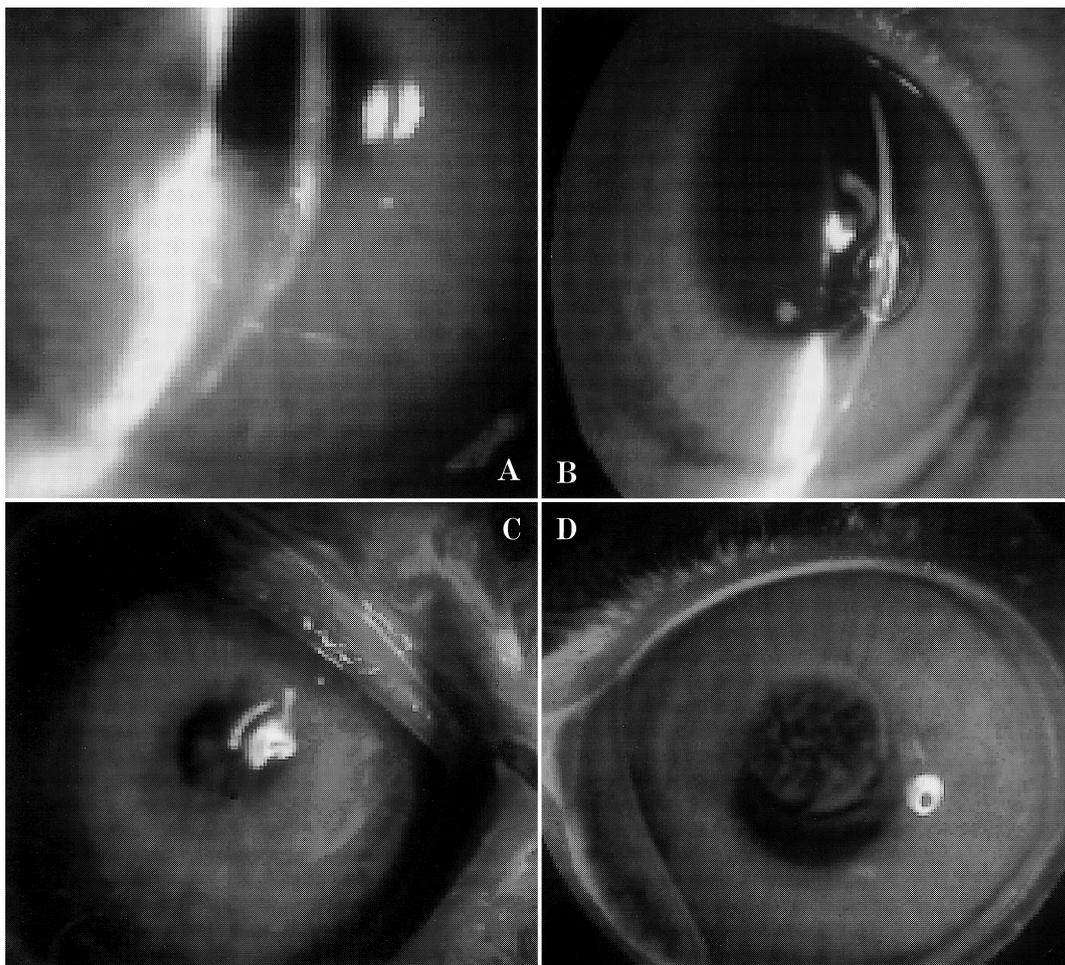


図 23 人工実質移植後の家兎角膜。

実質ポケット内挿入後1か月間，人工実質周囲の炎症はみられず作製した人工実質の生体適合性は良好であった(A：4日，B：1か月)．実質はめ込み後，4日以内に角膜上皮の被覆は完了し(C)，1か月間人工実質上の上皮が維持され上皮の接着性が良好であることがわかった(D)．

た．本モデルにおいて HCEC の移植片上での長期にわたる生存を確かめるためには，ヒトとウサギの種差を利用して，移植片上の細胞の染色体数や Alu 配列を検討する方法がある．あるいは GFP マウスの角膜内皮細胞を培養しマウスモデルで検討する方法がある．いずれも今後の検討に値する．

本モデルでの移植片はゼノグラフトである内皮細胞とアログラフトである上皮細胞+実質から構成されていた．いずれに対しても拒絶反応が発生する可能性があったが，術後の観察期間中に明らかな拒絶反応の所見はなかった．術直後に前房内に投与したシューロデックスによる強力な消炎作用が有効であった．ただし，マイルドな拒絶反応が移植片上の培養 HCEC の脱落を慢性的に惹き起こしている可能性は否定できず，前述したような方法で HCEC の移植片上での長期にわたる生存を確かめることが今後必要である．

5. 小 括

以上，培養ヒト角膜内皮細胞を用いた再構築角膜の評価の項を小括すると，① 内皮細胞を剥がしたヒト角膜

の Descemet 膜上に培養ヒト角膜内皮細胞を撒き，2,500 cells/mm²の細胞密度を実現した．② この再構築角膜の内皮細胞のポンプ機能をウッシング・チャンパーで検討したところ，正常角膜の75%のポンプ機能を有することが確認された．③ 白色家兎へ再構築角膜を移植したところ，術後，培養ヒト角膜内皮細胞が移植片上に保たれ角膜の透明性が維持された．

IV 人工実質，ブタ角膜実質の応用

角膜を再構築する際の実質としてはヒト角膜実質が最適であろう．ヒト角膜実質を使用した再構築角膜が臨床応用可能となれば，内皮密度が足りないため移植に使用できなかった角膜を有効利用することができるようになる．しかし，その供給数には限りがある．そこで，再構築角膜作製時の角膜実質の他の候補として人工実質とブタ角膜実質について検討した．

1. 人工実質の検討

人工的な実質は動物の真皮層から可溶化したコラーゲンを用いて作製した．アルカリ可溶化したコラーゲンで

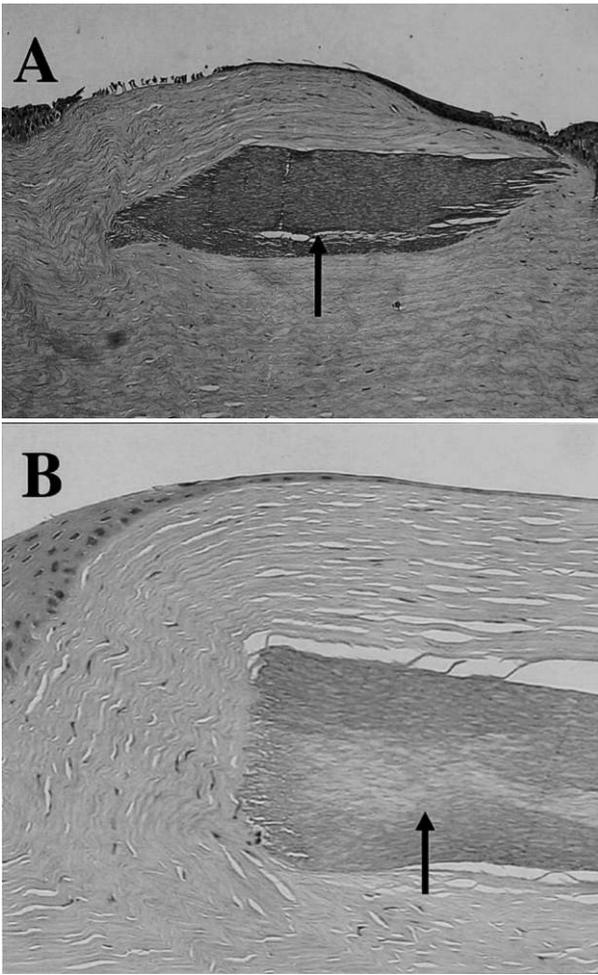


図 24 人工実質移植 1 か月後の家兎角膜組織。

実質ポケット内挿入(A), 実質はめ込み(B)のいずれの術式でも人工実質(矢印)周囲への炎症細胞の侵入はほとんどなかったが, 人工実質上の角膜上皮細胞は正常の5~6層の層構造を示さずかなり菲薄化していた。オリジナル倍率(A)×100, (B)×200。

は, コラーゲン分子が分散した状態で存在し, 中性でも線維形成せず透明な状態を保つ⁷⁶⁾⁷⁷⁾。このアルカリ可溶性コラーゲンを紫外線架橋, 成型することにより透明で抗原性の少ないコラーゲンシートを作製することができる。こうして作製した人工実質を家兎角膜へ移植して, 生体適合性や細胞接着性を検討した。

滅菌された厚さ 100 μm のコラーゲンシートから, 生検用トレパン(カイメディカル社)で直径 3 mm のコラーゲンシートを切り出し, ニュージーランド白色家兎角膜実質に作製したポケット内へ挿入した(図 22 A)。もう一つの方法として, 白色家兎角膜中央直径 4 mm の範囲を表層切除してその周囲にポケットを作製し, そこへ上と同様の方法で作製した直径 5 mm の円形コラーゲンシートをはめ込んだ(図 22 B)。

実質ポケット内への挿入後 1 か月間, 人工実質の透明性は保たれ, 人工実質周囲の炎症はみられず, 作製した人工実質の生体適合性は良好であった(図 23 A, B)。

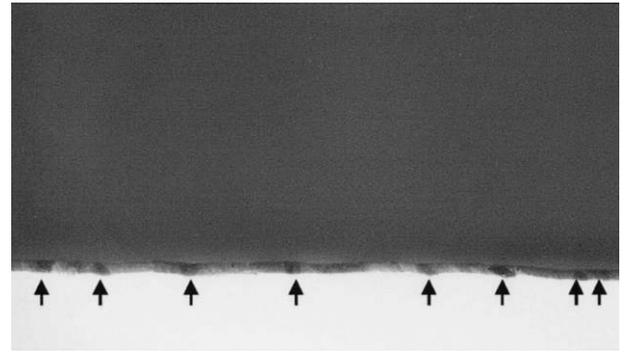


図 25 人工実質上に HCEC 播種後の組織。
HCEC は人工実質上に一層の細胞層を形成した(矢印)。

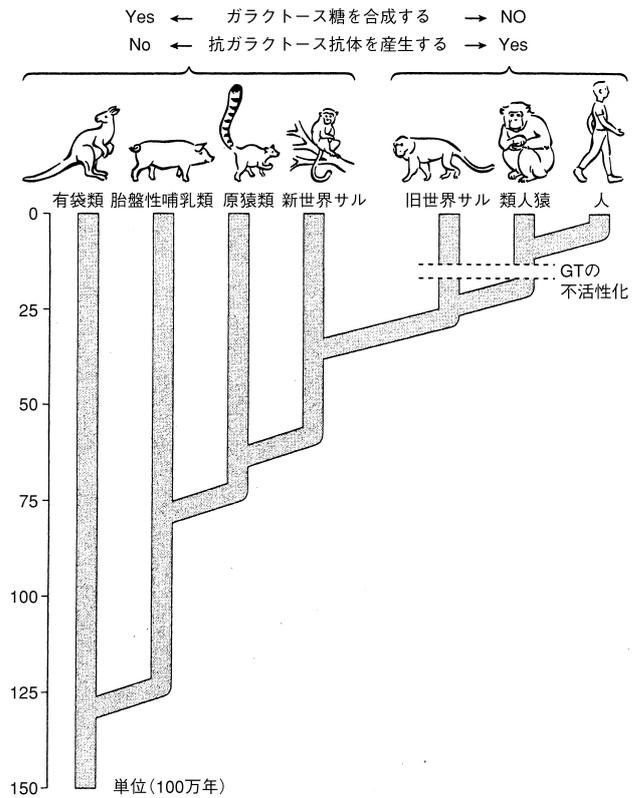


図 26 哺乳類の進化と α -gal エピトープとの関係。
旧世界高等霊長類では α -1,3 ガラクトース転移酵素 (GT) が不活化し, α -gal エピトープを発現しなくなった。文献 80, 81 より引用。

角膜中央部への人工実質はめ込み後, 4 日以内に角膜上皮の被覆は完了し, 観察した 1 か月間, 人工実質上の上皮が維持され, 上皮の接着性が良好であることがわかった(図 23 C, D)。

組織学的検討では, いずれの術式においても, 術後 1 か月の段階で, 移植した人工実質内の周囲に炎症細胞の侵入はほとんどなかった(図 24)。ただし, いずれの術式においても, 術後 1 か月目の組織所見で, 挿入した人工実質上の角膜上皮細胞は正常の 5~6 層の層構造を示さず, かなり菲薄化していた(図 24)。角膜上皮細胞が前房水から栄養されていることを考えると, 今回使用し

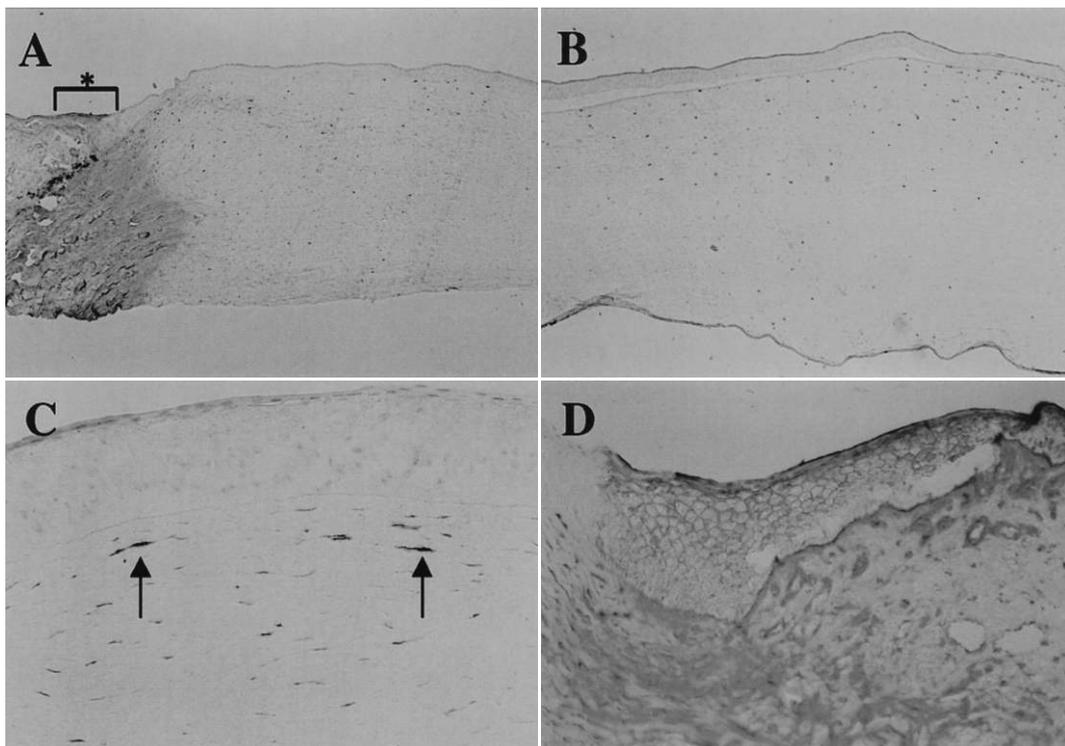


図 27 ブタ前眼部における α -gal エピトープの発現.

輪部(Aの*部分)から結膜側(Aの*部分より左側)では α -gal エピトープの強い発現がみられた(A). 角膜では前方実質内の少数の実質細胞(Cの矢印)に陽性反応をみるのみで、ほとんど α -gal エピトープの発現がみられなかった(B). 強拡大の観察では、輪部および結膜上皮の細胞間と結膜下の血管内皮に α -gal エピトープの発現が強くみられた(D). オリジナル倍率(A, B) $\times 40$, (C, D) $\times 100$.

たコラーゲンシートの物質透過性が正常角膜よりも低かったために上皮の菲薄化が発生した可能性が考えられた。

次に、人工実質上に仔ウシ角膜内皮細胞を培養してECMを形成させた後に培養ヒト角膜内皮細胞を播種したところ、内皮細胞は人工実質上に一層の細胞層を形成し(図25)、人工実質と培養角膜内皮により再構築角膜を作製できることがわかった。

こうした結果から、アルカリ可溶化コラーゲンから作製した人工実質は、透明性、生体適合性、細胞接着性が良好であり、再構築角膜を作製する際の角膜実質の候補として有望であると考えられる。ただし、今回使用したアルカリ可溶化コラーゲンは分子構造上もろく縫合することが難しいため、使用法に限られる。透明でかつ縫合可能、さらに上皮細胞を栄養するために必要な物質の透過性が良好、という条件を満たす人工実質を作製することは、現在の技術では困難な点が多く、今後の技術革新が待たれるところである。

2. ブタ角膜の検討

再構築角膜の実質の候補として、ブタ角膜実質の応用の可能性について検討した。まず、動物の中でもなぜブタに注目したかという点、食肉として大量に飼育・消費されているので経済的・倫理的問題が少ないこと、適度の角膜サイズを持つこと、心臓や肝臓など他の臓器移植

での研究が進んでいることなどの理由がある。ただし、ブタ臓器をヒトに移植する異種移植では、超急性拒絶反応という大きな関門がある。これは移植片に含まれる細胞、特に血管内皮細胞に発現している異種糖鎖抗原 α -gal エピトープにヒトの自然抗体 $\text{anti}\alpha$ -gal が結合し、補体活性化から細胞傷害作用が生じるものである⁷⁸⁾⁷⁹⁾。心臓や肝臓などの臓器では超急性拒絶反応が移植後数分以内に発生し、移植臓器不全となる。 α -gal エピトープは α -1,3 ガラクトース転移酵素により合成される糖鎖末端構造で新世界サルより下等な動物で発現している。旧世界サル以上の高等な動物では α -1,3 ガラクトース転移酵素が不活化しているために α -gal エピトープは存在せず、逆にこれに対する自然抗体を有している⁷⁸⁾⁸⁰⁾⁸¹⁾。これは動物の進化の過程で、約2,000万年前、旧世界(アフリカおよびユーラシア大陸)の高等霊長類がガラクトース鎖を発現する微生物による致死的な感染を受け、その際ガラクトースの発現が低く $\text{anti}\alpha$ -gal 抗体を作ることができた霊長類だけが生き延びたためと考えられている(図26)⁷⁸⁾⁸⁰⁾⁸¹⁾。このため、ブタからヒトへの移植のように、 α -gal エピトープを発現している動物から発現していない動物への異種移植では超急性拒絶反応が発生する。

再構築角膜の実質として、ブタ角膜実質を応用する可能性について検討するために、まずブタ角膜での α -gal

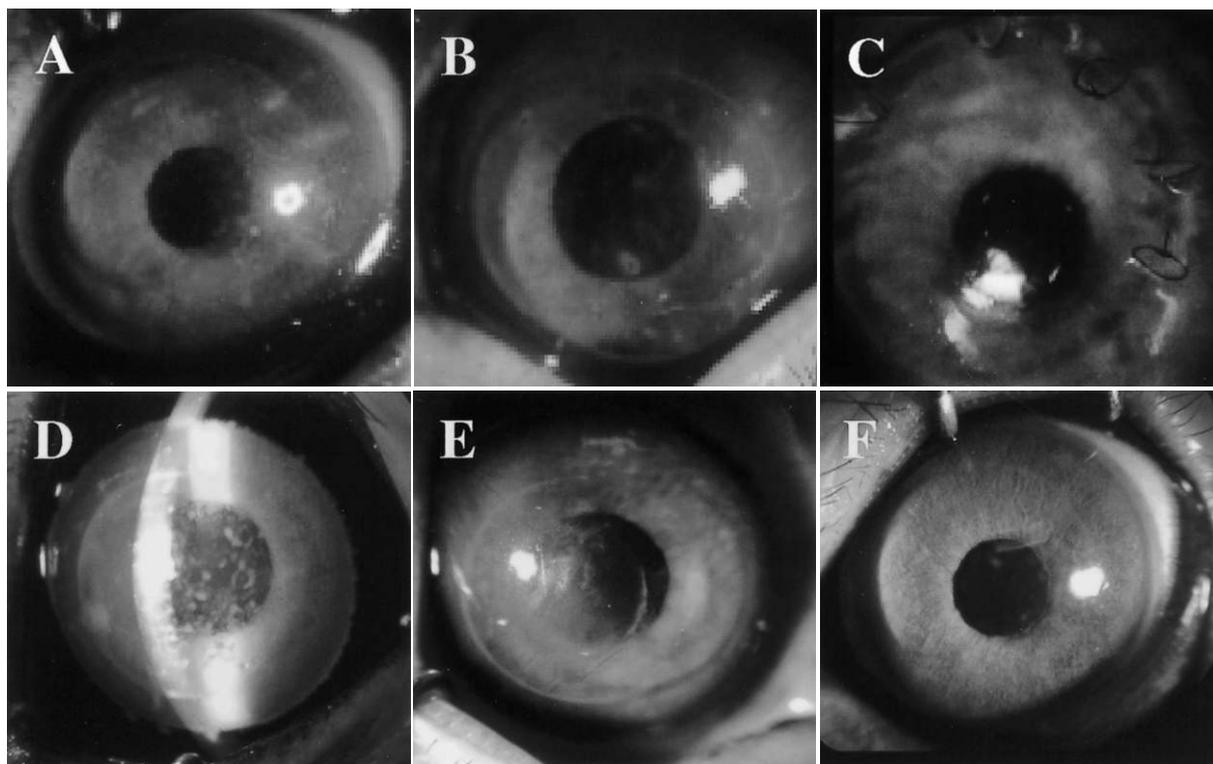


図 28 ブタ角膜実質移植後のカニクイサル角膜所見。

術後1か月まで6眼すべてで移植片の透明性が維持されていた(代表例3眼をA-Cに示す)。6か月まで観察した3眼のうち2眼で移植片部に混濁が発生した(D, E)。残り1眼では6か月間移植片部の透明性が維持された(F)。

エピトープの発現について検討した。 α -gal エピトープに特異的に結合することが知られる *Griffonia simplicifolia* 1 isolectin B₄^{82)~84)} をビオチン化したもの(ベクター・ラボラトリーズ社)をブタ角膜の凍結切片と反応させた後、streptavidin と結合した horseradish peroxidase と反応させ、最後に 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride で発色させた。角膜では前方実質内の少数の実質細胞に陽性反応がみられるのみで、ほとんど α -gal エピトープの発現がみられなかった(図 27)。一方、輪部から結膜・強膜では α -gal エピトープの強い発現がみられた。強拡大の観察では、角膜上皮に α -gal エピトープの発現がないのに対して、輪部および結膜上皮では細胞間に α -gal エピトープの発現がみられた(図 27)。また、結膜下組織では血管内皮に強い発現がみられた(図 27)。

ブタ眼における α -gal エピトープの発現の局在は興味深い。角膜内では、前方実質にいるケラトサイトの一部に α -gal エピトープの発現がみられた。 α -gal エピトープの発現を示すケラトサイトと示さないケラトサイトとでどのような点が異なるのか明らかではないが、ケラトサイトの中にもサブポピュレーションがあるのかも知れない。角膜上皮では α -gal エピトープの発現は全くなかったが、輪部および結膜上皮では細胞間に強い α -gal エピトープの発現があった。また、結膜下組織内の血管内皮と強膜内の ECM にも α -gal エピトープの強い発現が

あった。 α -gal エピトープの発現は血管内皮細胞で強いことが知られているが、線維芽細胞、上皮細胞、平滑筋細胞など他の細胞においても発現があることが報告⁷⁸⁾⁸⁵⁾されている。今回の結果は、これらの報告と一致するものであった。また、角膜において α -gal エピトープの発現がない原因は明らかではないが、無血管であることがその一因となっていると推測された。

では α -gal エピトープをほとんど発現していないブタ角膜実質を、 α -gal エピトープに対する自然抗体を有する動物に移植するとどうなるのであろうか。旧世界サルに属し α -gal エピトープに対する自然抗体を有するカニクイサルの角膜層間にブタ角膜実質を移植する実験を行った。動物実験用に改変したマイクロケラトーム(MK-2000, ニデック社)を用いて新鮮ブタ角膜の中央の同一部位を切除することで、ブタ角膜実質から成る円形角膜片が一つのブタ角膜の異なる層から4~5個作製可能であった。超音波パキメータ(SP-2000, トーメー社)でブタ残余角膜厚を測定し、作製されたブタ角膜片の厚さを計算した。作製された角膜片は直径約5mm、厚さ約150 μ mであった。こうして作製したブタ角膜片のうち、角膜中間層から作製されたものを一つ、1~1.5歳のメスのカニクイサルの右眼角膜実質に作ったポケット内に挿入し、10-0 ナイロン糸で切開部を縫合した。術直後にオフロキサシン眼軟膏を塗布し、それ以降、投薬

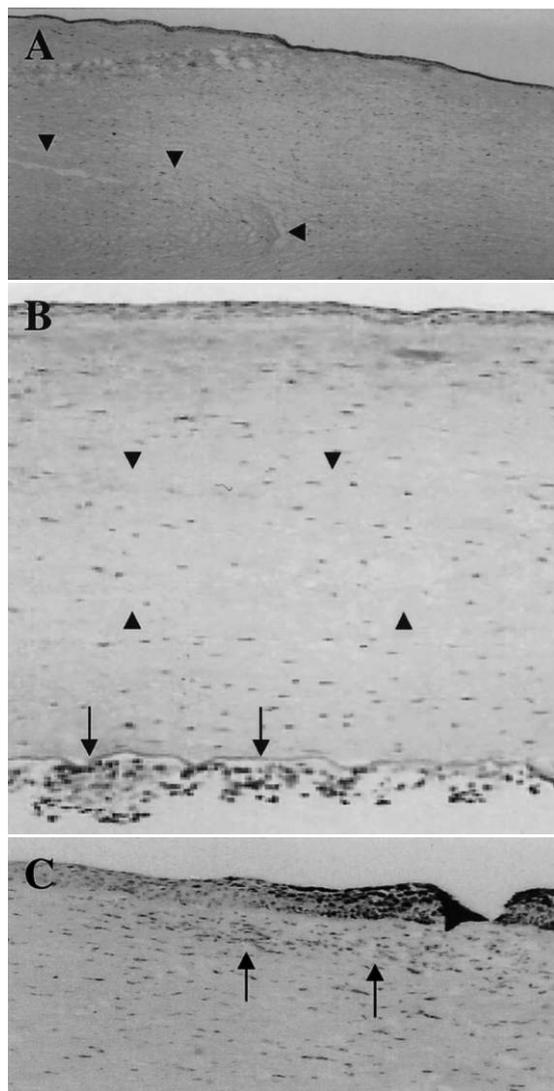


図 29 ブタ角膜実質移植後のカニクイサル角膜組織所見。

A：術後 1 か月目のサル角膜実質内にブタ実質が残っている(矢じりで囲まれる部分)。炎症性細胞の侵入はほとんどみられなかった。B：角膜混濁が発生した 2 眼の術後 6 か月の時点ではブタ角膜実質(矢じりで囲まれる部分)があり、内皮面に炎症性細胞の接着が多くみられた(矢印)。C：サル角膜周辺部実質への炎症性細胞の浸潤がみられた(矢印)。オリジナル倍率(A-C)×40。

は行わなかった。手術は 6 眼に行い、3 眼は術後 1 か月まで、3 眼は術後 6 か月まで観察した。術後 6 か月まで観察した 3 眼では術後 1 か月目に角膜縫合糸を抜糸した。最終観察時にケタミン 25 mg/kg とキシラジン 10 mg/kg の筋肉内注射後にペントバルビタールを静脈内に多量に注入してサクリファイスし強角膜を摘出し組織学的検討を行った。

術後 1 か月まで 6 眼すべてで移植片の透明性が維持されていた(図 28 A～C)。6 か月まで観察した 3 眼では、術後 2～3 か月の間に 1 眼、移植片部分にそれまでに

かった混濁が発生し始めた(図 28 E)。さらに、術後 5 か月と 6 か月の間に他の 1 眼で、移植片混濁が発生した(図 28 D)。移植片混濁が発生した 2 眼では角膜内皮面に細胞性の沈着物の形成がみられた(図 28 D, E)。残りの 1 眼では観察した 6 か月間、移植片部の透明性が維持された(図 28 F)。

組織学的検討では、術後 1 か月目のサル角膜実質内にコラーゲン線維の方向の違いや染色性から区別されるブタ実質が矢じりで囲まれる部分に残っていることがわかった(図 29 A)。術後 1 か月の 3 眼では、サル角膜、ブタ角膜実質ともに炎症性細胞の侵入はほとんどみられなかった(図 29 A)。移植片混濁が発生していた眼の術後 6 か月の時点では、ブタ角膜実質は矢じりで囲まれる部分に残っていることがわかった(図 29 B)。内皮面に炎症性細胞の接着が多くみられ(図 29 B)、サル角膜周辺部実質への炎症性細胞の浸潤がみられた(図 29 C)。

ブタ角膜実質の移植を受けたサル眼での免疫反応を免疫染色で解析した。術後 1 か月目および 6 か月目に摘出したサル角膜の凍結切片を作製し、ヒト CD4, CD8, CD20 (BD Pharmingen 社) および CD56, マクロファージ (DakoA/S 社) に対するモノクローナル抗体と反応させ、ヒストファイブ SAB-PO キット (ニチレイ) を用いたストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法を行い、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride で発色させた。術後 1 か月の 3 眼ではマクロファージの移植片への浸潤がみられたが、T リンパ球、B リンパ球、ナチュラルキラー細胞などはみられなかった(図 30)。術後 6 か月で移植片混濁のあった 2 眼では、移植したブタ角膜実質の中や周囲に CD8⁺ の T リンパ球が多くみられ、またマクロファージもわずかにみられた(図 31)。角膜内皮面の沈着物は、CD4⁺ の T リンパ球やマクロファージを含むことがわかった(図 32)。

異種移植片に対する細胞性拒絶反応は T リンパ球やナチュラル・キラー細胞によって引き起こされることが報告^{86)~90)}されている。今回の組織および免疫染色の結果から、移植片混濁のみられた 2 眼では CD8⁺ あるいは CD4⁺ の T リンパ球が移植片内や周囲に浸潤していることが示され、細胞性拒絶反応が発生していたと考えられた。

次に、ブタ角膜実質を使った再構築角膜について検討した。作製法はヒト角膜実質を使用した場合と同じで、新鮮ブタ角膜から角膜内皮を剝離し、培養ヒト角膜内皮細胞を播種し、遠心して細胞接着を促進させた。ブタ角膜実質を使った再構築角膜の内皮細胞密度は平均で 1 mm² 当たり 1721 ± 594 個 (n=6) であった(図 33)。こうして作製した再構築角膜のポンプ機能をヒト角膜実質の時と同様にウッシング・チャンバーを使用して測定した。上皮のみを機械的に剝離した新鮮ブタ角膜を陽性対照に、上皮と内皮ともに機械的に剝離したブタ角膜実質

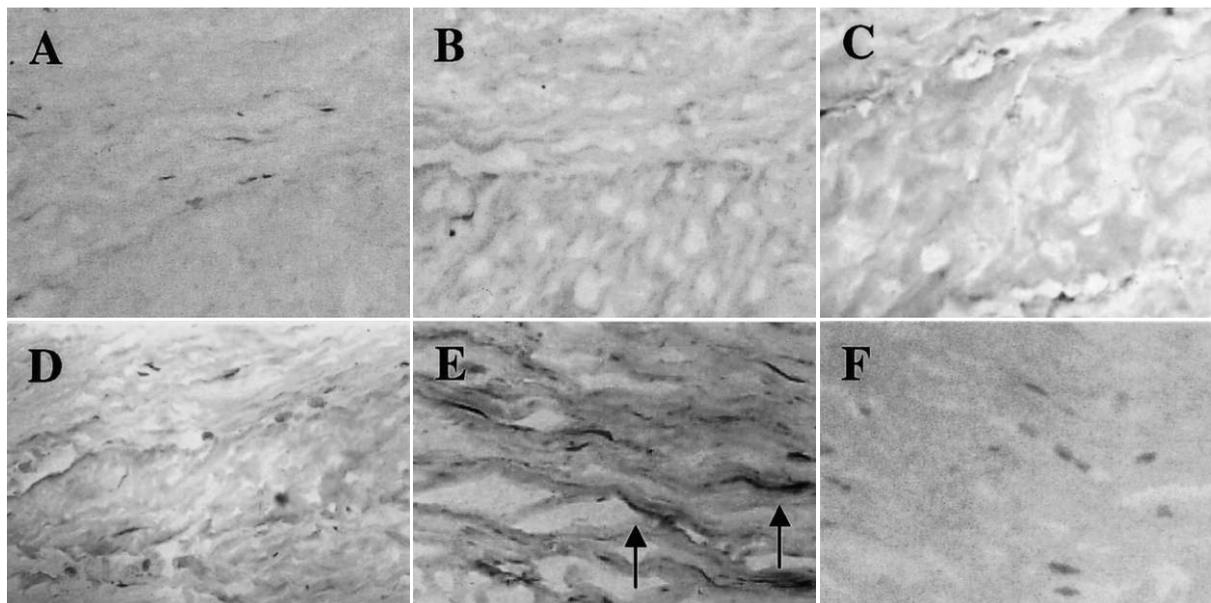


図 30 ブタ角膜実質移植 1 か月後のカニクイサル角膜の免疫染色所見.

A: CD4, B: CD8, C: CD20, D: CD56, E: マクロファージ, F: 陰性対照. マクロファージの移植片への浸潤がみられた(矢印). オリジナル倍率(A~F)×200.

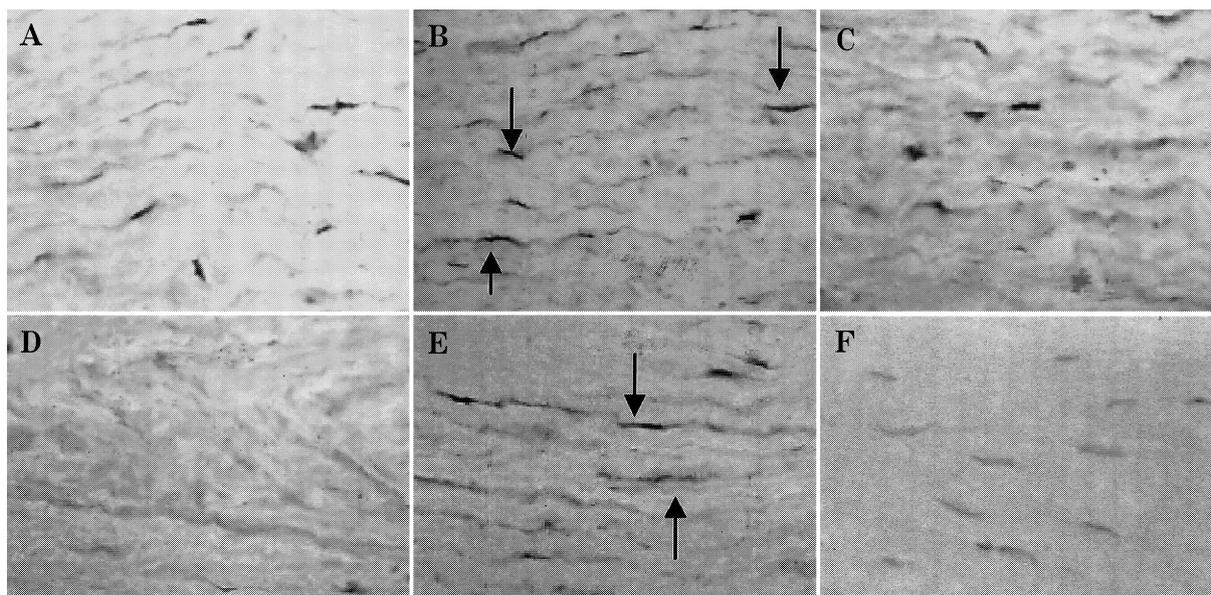


図 31 ブタ角膜実質移植 6 か月後のカニクイサル角膜の免疫染色所見.

A: CD4, B: CD8, C: CD20, D: CD56, E: マクロファージ, F: 陰性対照. $CD8^+$ の T リンパ球およびマクロファージの移植片への浸潤がみられた(矢印). オリジナル倍率(A~F)×200.

を陰性対照とした. いずれも 4 眼の測定を行った. 測定された電位差は, ブタ角膜実質を使った再構築角膜で 0.35 ± 0.12 mV, 陽性対照で 0.58 ± 0.18 mV, 陰性対照で 0 mV であった. いずれの場合も, 測定開始 10 分後に $Na^+K^+ATPase$ の阻害剤であるウアバインを 0.1 mM/1 になるようにチャンバー内に加えると電位差は 0 となった. 短絡電流は, ブタ角膜実質を使った再構築角膜で $5.2 \pm 1.2 \mu A/cm^2$, 陽性対照で $11.4 \pm 2.5 \mu A/cm^2$, 陰性対照で $0 \mu A/cm^2$ であった. いずれの場合も, 測定

開始 10 分後に $Na^+K^+ATPase$ の阻害剤であるウアバインを 0.1 mM/1 になるようにチャンバー内に加えると短絡電流は $0 \mu A$ となった. これらの結果から, ブタ角膜実質を使った再構築角膜では, 正常ブタ角膜の 60% 程度のポンプ機能を有することがわかった. また, これらの電位差, 短絡電流ともウアバインの投与によりほぼ 0 になったことから, $Na^+K^+ATPase$ の働きによるものであることがわかった. 経内皮電気抵抗は再構築角膜で $67.3 \Omega \cdot cm^2$ と, 正常ブタ角膜の $50.9 \Omega \cdot cm^2$ よりわ

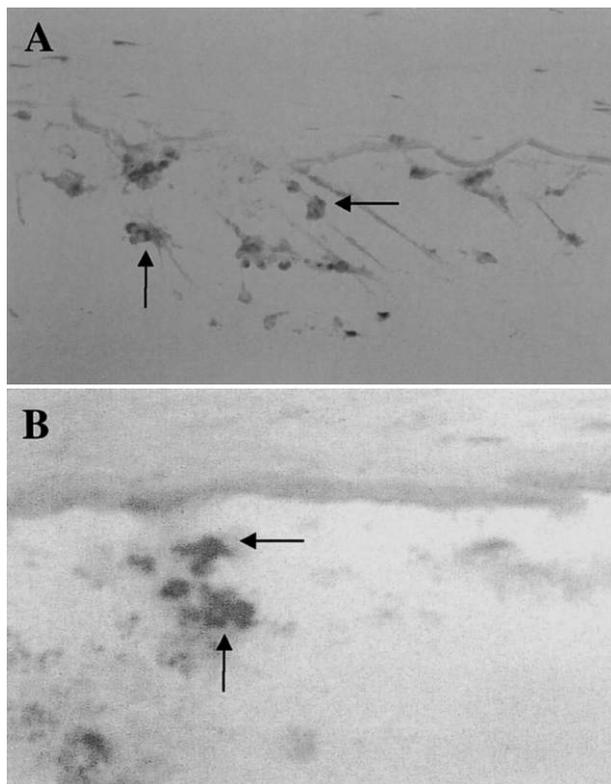


図 32 ブタ角膜実質移植 6 か月後のカニクイサル角膜内皮沈着物の免疫染色所見。

A: CD4, B: マクロファージ。CD4⁺ T リンパ球およびマクロファージが内皮沈着物に含まれていた(矢印)。オリジナル倍率(A, B)×200。

ずかに大きな値であった。

以上の結果から、ブタ角膜実質は α -gal エピトープに対する自然抗体を有する動物に移植された時、他の臓器と異なり、超急性拒絶反応を起こすことはないことがわかった。これは移植されたブタ角膜実質に血管がなく、 α -gal エピトープがほとんど発現していないためと考えられた。ただし術後 6 か月まで観察した 3 眼のうち、2 眼においては移植片混濁、T リンパ球やマクロファージの浸潤がみられ、細胞性拒絶反応が発生していた。この細胞性拒絶反応は、ステロイドなどの免疫抑制性の薬剤を使用していない状態で術後数か月以上経ってから発生していること、アログラフに対する拒絶反応と同様の細胞成分が関与していることなどから、臨床で使用される程度の量のステロイドの使用で発生を予防できる可能性が高いと推測された。

最近、 α -gal エピトープを作り出す酵素である α -1,3 ガラクトース転移酵素をノックアウトしたブタが作製された⁹¹⁾。ブタ組織のヒトへの移植を考えた時、 α -gal エピトープは最初の大きな関門であることがわかってきたため、これを持たないノックアウトブタが作られたわけである。角膜においては α -gal エピトープがほとんど発現していないため、角膜移植にはこうしたブタは必要な



図 33 ブタ角膜実質上に播種した HCEC。内皮細胞密度は $1,721 \pm 594/\text{mm}^2$ であった。

いかも知れないが、術後数か月経ってから起きてきた細胞性拒絶反応の原因がわずかに発現している α -gal エピトープが原因となっている可能性は否定できない。そうした点を明らかにするために、 α -gal エピトープを持たないブタから得た角膜を移植する実験は検討に値する。

今回の実験の結果から、ブタ角膜実質は臨床応用を目指した再構築角膜の角膜実質の材料として有望な候補であるといえる。ただし、ブタ組織を使用する際には感染症に十分な注意が必要である。ヒトへの移植に使用するようなブタは厳重な衛生管理がされるから、細菌、寄生虫、原虫などの感染症はあまり心配いらぬであろう。また、ブタでは今のところプリオン病はみつかっていない。一番問題になるのはブタ染色体に内在するレトロウイルスの感染である。これまでの報告^{92)~94)}では、ブタの皮膚や脾臓ランゲルハンス氏島細胞の移植を受けたことがあるか、肝不全や腎不全の治療のための体外環流時にブタ細胞と自分の血液が接触したことがある患者の白血球を用い PCR で検討した結果、ブタ内因性レトロウイルスの感染は 1 例もみなかったと述べられており、レトロウイルスの感染に関してもあまり心配いらぬのかも知れない。ただし、この結果もブタ組織移植時のレトロウイルスの感染を完全に否定するものではない。ブタ組織をヒトに使用するのは奇異と思われるかも知れないが、化学処理したブタの心臓弁はすでに、重症心臓弁障害の患者の治療にこれまでアメリカを中心に 7 万人以上の症例に使用されている^{95)~97)}。化学処理したブタ心臓弁は細胞成分がないため、レトロウイルス感染の危険性はないわけである。ブタ角膜実質を再構築角膜の角膜実質として使用する場合、細胞成分は必ずしも必要ではないので、レトロウイルスの感染の可能性をなくすために無細胞化したブタ角膜実質を使用して作製した再構築角膜の可能性について今後検討していく予定である。

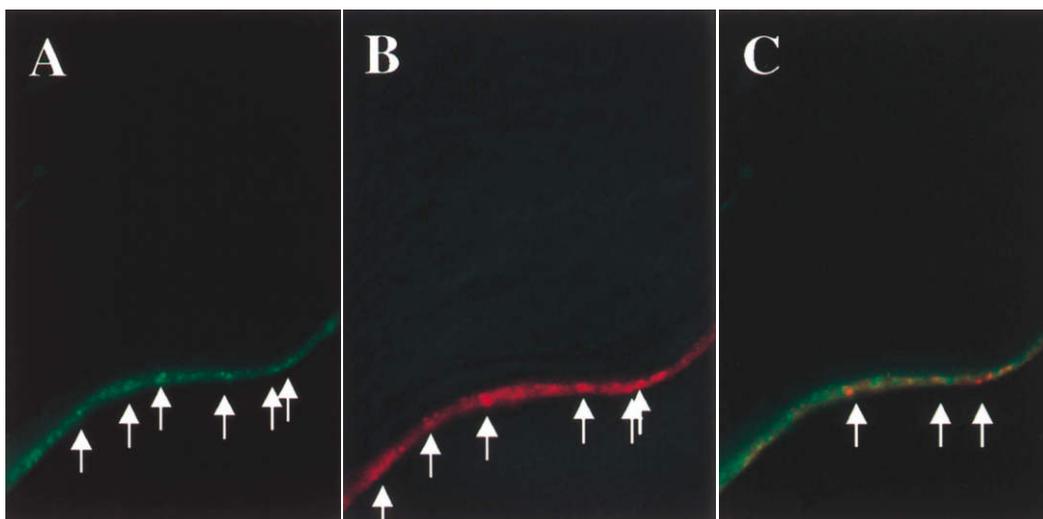


図 34 DiI ラベルした骨髄単核細胞をラット前房内注入後 2 週目の内皮面。

NSE に染まる細胞が角膜内皮面にみられ(A の矢印), また DiI 陽性の細胞も同様に内皮面にみられ(B の矢印), 両者に陽性の細胞も所々観察された(C の矢印)。

3. 小 括

人工実質・ブタ実質の応用の項を小括すると, ①アルカリ可溶性コラーゲンを用いて作製した人工実質は, 透明性・生体適合性・細胞接着性が良好であった。②ブタ角膜では異種糖鎖抗原 α -gal エピトープの発現が少なく, カニクイサルの角膜層間にブタ角膜実質を移植したところ, 超急性拒絶反応は起こさないものの, 術後数か月を経て細胞性拒絶反応を起こした。③ブタ角膜実質と培養 HCEC を用いて作製した再構築角膜は平均で $1,721 \text{ cells/mm}^2$ の細胞密度を持ち, ウッシングチャンバーを用いた解析では, 正常ブタ角膜内皮の 60% 程度のポンプ機能を示した。

V 新しい角膜内皮細胞移植法の模索

ここまで検討してきた培養 HCEC を用いた角膜移植は, 他人由来の HCEC を培養しそれを何らかのキャリアに乗せて移植することを前提としていた。ここでは, 新しい角膜内皮細胞移植法として, 自己細胞を使用する移植法と角膜内皮細胞を直接前房内へ注入する方法の可能性について検討した。

1. 自己未分化細胞移植の可能性

ここまでではいずれも他人の角膜内皮細胞を培養して使用することを前提とした実験であった。アロの細胞である以上は拒絶反応の可能性がある。そこで, 自分の細胞を再構築角膜に使用する方法について検討した。自己の細胞を使う場合, 供給源としては自己の角膜内皮細胞または自己の未分化な細胞を角膜内皮細胞へ分化させる方法が考えられるが, ここでは自己の未分化な細胞を使用する方法について検討した。未分化な細胞としては, 骨髄間質にいる間葉系幹細胞を考えた。間葉系幹細胞は骨, 筋肉, 脂肪組織といった中胚葉系の組織に分化して

いく幹細胞であるが⁹⁸⁾, 可塑性を有しており, 神経系の細胞に分化する可能性もあると考えられている⁹⁹⁾¹⁰⁰⁾。角膜内皮細胞が neural crest 由来の細胞であることから¹⁰¹⁾, 間葉系幹細胞が角膜内皮細胞へも分化する可能性がある。

ラット骨髄細胞はオスリスラット(4~6 週齢)の大腿骨, 脛骨から分離した。麻酔下で下肢の筋肉をはく離し, 大腿骨, 脛骨を取り出し, その両骨端を切断した。18 ゲージシリンジを用いて 5 mM の EDTA を加えた Dulbecco phosphate buffered saline で骨髄内をフラッシュし, 骨髄細胞を回収し, 骨髄中の単核細胞を Histopaque 1083(Sigma 社)を用いて分離した。得られた骨髄単核細胞は蛍光色素 DiI でラベルし, 遊離色素の除去のため十分洗浄した。液体窒素に数秒浸漬させた金属プローブを麻酔下でオスリスラット(8 週齢)の角膜上に 5 秒接着することにより, 角膜内皮の脱落を誘導した。その後, 前房内にラベルされた骨髄細胞をマイクロシリンジを用いて注入した($1 \times 10^5 / 10 \mu\text{l}$)。骨髄細胞を注入したラットの角膜内皮面をフラットマウントと凍結切片で観察した。骨髄細胞注入 2 週間後に角膜を摘出し, 4% パラフォルムアルデヒドで 10 分間固定した。角膜内皮細胞のマーカーとして neuron specific enolase (NSE)¹⁰²⁾ の発現を凍結切片における蛍光免疫組織化学で観察した。固定した角膜は凍結包埋し, 約 8 mm の切片を作製した。切片は良く乾燥させたのち, 5% ヒツジ血清を室温で 1 時間添加した(ブロッキング)。ブロッキングの終了後, ウサギポリクローナル抗 NSE 抗体 (Chemicon 社, $2 \mu\text{g/ml}$) を 4°C , 12 時間反応させた。PBS で洗浄後, FITC-conjugated anti-rabbit IgG (Vector 社, 100 倍希釈) を二次抗体として用いた。サンプルは蛍光顕微鏡 (Leica Microsystems 社) で観察した。

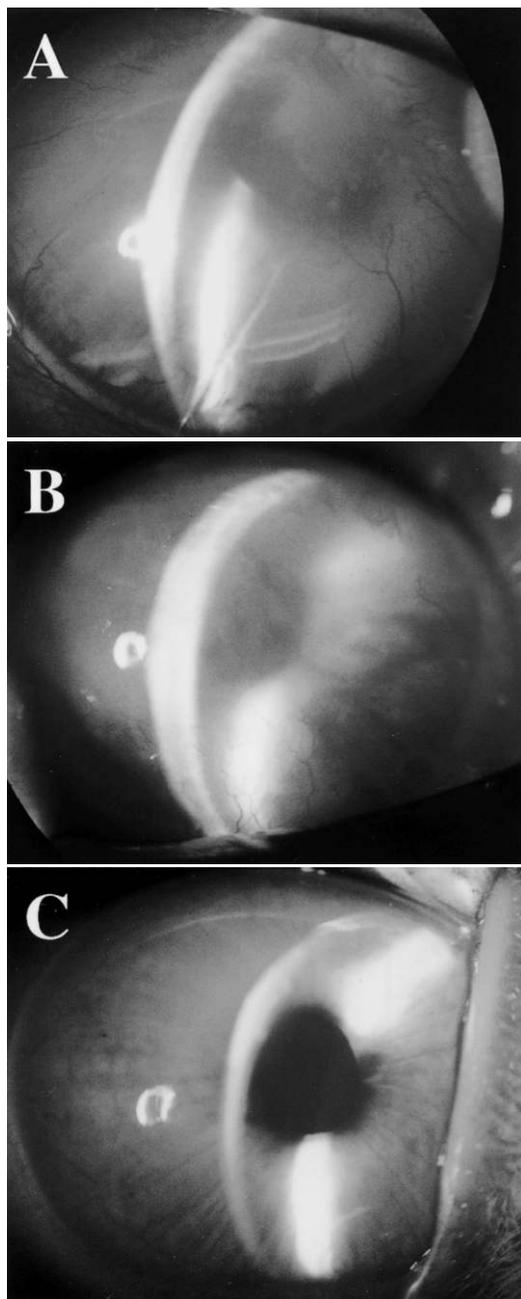


図 35 鉄食食 HCEC 前房内投与 4 週後の家兎角膜。Iron 群(C)ではクライオ群(A)や non-iron 群(B)と比較して角膜浮腫が早期に改善された。

結果としては、角膜内皮のマーカ―として染色した NSE に染まる細胞が角膜内皮面にみられ、また DiI 陽性の細胞も同様に内皮面にみられ、両者に陽性の細胞も所々観察された(図 34)。プレリミナリーな結果ではあるが、自己の未分化な細胞が角膜内皮様に変化できる可能性を示唆する結果であった。

自己の細胞を角膜移植にできれば、角膜移植後拒絶反応の問題がなくなる。術後長期間にわたり使用されているステロイド剤の点眼や全身投与も、術後のごく短期間に術後炎症をおさえるために最小限使用するだけでよくなる。ステロイド使用に伴う緑内障や易感染性といった

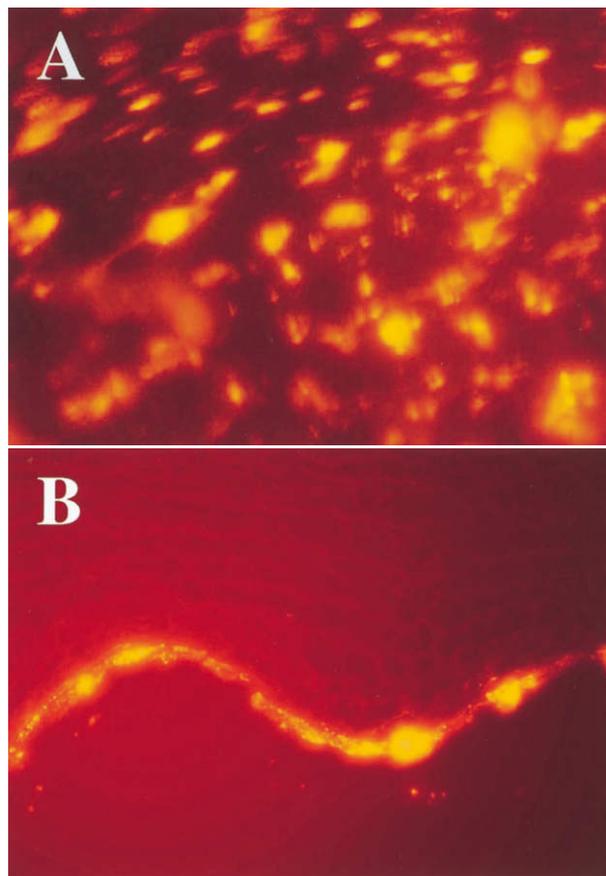


図 36 鉄食食 DiI ラベル HCEC 前房内投与 4 週後の家兎角膜内皮面。

DiI ラベルされた HCEC がフラットマウントでの角膜後面からの観察でも(A)、切片による観察でも(B)、多数みられた。

問題がなくなり、角膜移植の成績の飛躍的な向上が予想される。角膜移植に利用できる自己の細胞としては、まず自己の角膜内皮細胞が考えられる。水疱性角膜症の角膜においても角膜内皮は残存しており、この内皮細胞を集めて、*ex vivo* で増殖させ数を増やして、元に戻すという方法が考えられる。細胞の回収法や移植法など技術的な問題の解決が必要であるが、検討に値する方法である。もう一つの細胞ソースは、自己の体内にある未分化な細胞である。血球や表皮、腸管上皮など次々と置き換わっていく細胞には、その鋳型ともいべき未分化な幹細胞があることが知られていた^{103)~105)}。近年、脳や網膜といった組織を構成し置き換わらないと考えられてきた細胞にも幹細胞のあることがわかってきた^{106)~108)}。成人の体内にあるこうした未分化な細胞はある程度の可塑性をもっていることが指摘されており、今回検討した骨髄中の間葉系幹細胞を neural crest 由来の角膜内皮細胞に分化させることも可能であると考えられる。今後、角膜内皮細胞に分化したことを確認するための角膜内皮細胞特異的なマーカ―を特定し、未分化な細胞を角膜内皮細胞に誘導するために必要な因子を明らかにしていくこと

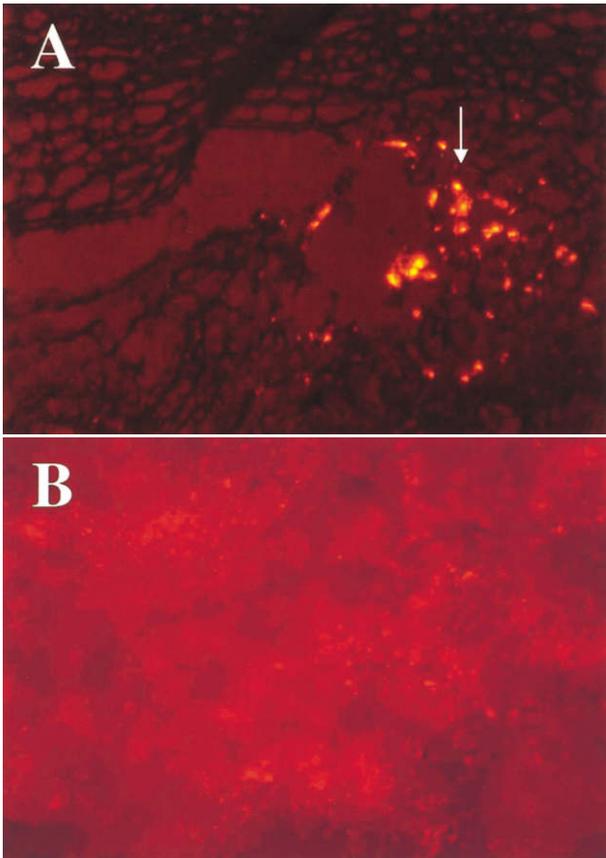


図 37 鉄食食 DiI ラベル HCEC 前房内投与後の細胞の行方。
隅角部(Aの矢印)と脾臓(B)に DiI ラベルされた細胞がみられた。

が課題である。

2. HCEC 前房内注入による移植の可能性

次に、角膜内皮細胞の新しい delivery 法について検討した。ここまで、角膜内皮細胞を何らかのキャリアーに接着させてから移植に使用する方法について検討してきた。水疱性角膜症のように角膜内皮のみが障害されている場合、障害されている内皮細胞だけを移植できないかと考えた。いわゆる細胞移植の考えを角膜内皮に当てはめてみようというわけである。骨髄細胞を前房内投与した実験からもわかるように前房内に内皮細胞を注入するだけでは Descemet 膜への細胞接着の効率が低いと考え、鉄を食食させた内皮細胞を前房内に投与し磁石により Descemet 膜に接着させる方法について検討した。

家兎角膜内皮細胞を HCEC と同様の方法で継代培養した。継代 3 代目の家兎培養角膜内皮細胞の培養液中に spherical iron powder を $5 \mu\text{M}/\text{l}$ になるように加え、培養角膜内皮細胞に鉄を食食させた。内皮細胞が confluent となった時点で、以下の *in vivo* の実験に使用した。*In vivo* の実験として家兎角膜のクライオ傷害モデルを使用した。液体窒素で先端を冷却した金属を家兎角膜に 9 か所に各 10 秒間接触させ、これを 2 回繰り返して行

い角膜内皮細胞を脱落させた。前房洗浄により脱落した角膜内皮細胞を除去した後、鉄を食食させた家兎培養角膜内皮細胞を 30 ゲージハミルトンシリンジで前房内に投与した。術後、ネオジウム磁石(10 Φ, 5 mm, Kenis 社)を眼瞼上に 24 時間テープで固定して磁場により培養角膜内皮細胞の Descemet 膜への接着を図った。以上の操作を加えたものを iron 群とし、クライオ傷害後前房洗浄のみした群をクライオ群、クライオ傷害後、通常の家兎培養角膜内皮細胞を前房内投与した群を non-iron 群とし、各 4 眼行った。術後 8 週目まで前眼部観察、超音波パキメータによる角膜厚測定、pneumatic applanation tonometer (Model 30 classic, Mentor 社)による眼圧測定を行った。

術後 4 週目の時点では、iron 群では他の 2 群と比較して角膜浮腫が早期に改善された(図 35)。Iron 群、クライオ群、non-iron 群それぞれにおける角膜厚は、術後 2 週目で $547 \pm 156 \mu\text{m}$, $1140 \pm 84.6 \mu\text{m}$, $1133 \pm 53.7 \mu\text{m}$ 、術後 4 週目で $508 \pm 101 \mu\text{m}$, $999 \pm 155 \mu\text{m}$, $1034 \pm 96.7 \mu\text{m}$ 、術後 8 週目で $432 \pm 42.1 \mu\text{m}$, $995 \pm 197 \mu\text{m}$, $1081 \pm 77.7 \mu\text{m}$ と、術後 2 週目以降 iron 群で他の 2 群より有意に角膜厚が小さくなった ($p < 0.05$, 一元配置分散分析および Scheffe 多重比較)。いずれの群も、経過観察した 8 週の間、眼圧の上昇はみられなかった。

前房内投与した内皮細胞の行方をみるために、鉄を食食させた家兎内皮細胞をさらに DiI ラベルして、クライオ傷害モデルの家兎前房内に投与した。術後 4 週間目、iron 群の角膜内皮面において DiI ラベルされた細胞が、フラットマウントでの角膜後面からの観察でも、切片による観察でも多数みられたのに対して(図 36)、non-iron 群や negative control 群では DiI ラベルされた細胞はわずかにみられるのみであった。Iron 群でも、投与したすべての細胞が Descemet 膜に接着できたわけではなく、術後 2 日目、切片で観察したところ、隅角部に DiI ラベルされた細胞がみられた(図 37 A)。隅角部から眼外に排泄されたと考え、肝臓と脾臓を観察したところ、肝臓には DiI ラベル細胞はみられなかったが、脾臓には多数の DiI ラベル細胞がみられた(図 37 B)。

以上の結果から、鉄を食食させた培養角膜内皮細胞を前房内に投与し磁石により内皮面に接着させる方法は、有効な培養角膜内皮細胞の投与方法であることがわかった。臨床応用する場面を考えると、水疱性角膜症のような角膜内皮だけが障害されている症例にこの内皮投与方法を応用できれば、現在行われている角膜移植術に伴う術中・術後合併症の多くが解決されることになる。また、自己の細胞を応用する方法とこの方法を組み合わせれば拒絶反応のないより安全な方法となり得る。ただし、この方法には、解明すべき問題点がある。1 つ目は、Descemet 膜に接着できなかった細胞による合併症である。前房内投与した HCEC が隅角部を閉塞することになれ

ば緑内障となるし、虹彩面上に接着した細胞が irido-corneal endothelial 症候群で見られるような虹彩の変化を引き起こす可能性もある。今回の実験では細胞投与後 8 週目まで観察し、眼圧の上昇はみられなかったが、より長期の観察が必要である。2 つ目の問題点は、鉄漏出によるジデローシス発生の可能性である。鉄を貪食させた細胞を眼内に投与する方法であるため、細胞内の鉄が漏出して、網膜などの眼内の組織に傷害を与える可能性は否定できない。この点に関しても、細胞投与後長期にわたっての眼組織の組織学的観察、網膜電図 (ERG) などでの機能的な解析が必要である。動物実験での長期的な検討でこうした問題点がないことを確認した時に始めて臨床応用への道が開ける。

3. 小 括

新しい角膜内皮細胞移植法の模索の項を小括すると、① ラット前房内へ投与されたラット骨髄中の単核球が Descemet 膜上に接着して角膜内皮様に変化し、自己の未分化な細胞が角膜内皮様に変化できる可能性が示唆された。② 鉄を貪食させた培養角膜内皮細胞を前房内に投与した後、磁石で Descemet 膜に接着させる内皮細胞の細胞移植が有効である可能性が示された。

VI おわりに

培養 HCEC を用いた角膜移植を臨床応用可能にするために今後何をなしていくべきか、という観点から今後の課題を考えると、① 本研究により正常角膜の 50～70% の機能を持つ再構築角膜を培養ヒト角膜内皮細胞を用いて作製することが可能であることがわかった。ただし、現在の全層角膜移植術がかなりの成功を収めている以上、再構築角膜を臨床応用するためには正常角膜に匹敵するあるいはそれを超える機能・性状を有する再構築角膜を作製することが必要である。それを実現していくためには、倫理的問題をクリアーした上で胎児などから採取し 2～3 代のごく少ない継代をした角膜内皮細胞を用いたり、播種した内皮細胞の密度をさらに高める方法を開発したりするなど、角膜内皮細胞培養法や細胞播種法において、さらなる改良を加えていく必要がある。② 供給源に限りのあるヒト角膜実質に代わる再構築角膜の実質としては、ブタ角膜実質が有望と考えられた。レトロウイルス感染を予防するため無細胞化したブタ角膜実質の有効性について今後検討していく予定である。③ 自己未分化細胞の応用に関しては、角膜内皮細胞特異的マーカーの特定、未分化細胞の角膜内皮への分化誘導に必要な因子の検討などを課題としてさらなる探求を進めたいと考えている。④ 培養角膜内皮細胞の前房内投与は、動物実験により長期的な安全性が確認できれば、有効な方法になり得ると考えられた。

稿を終えるに当たり、宿題報告の機会を与えていただきました日本眼科学会評議員各位、日本眼科学会会員各位、なら

びに第 106 回日本眼科学会総会長の玉井 信教授(東北大学)、座長の芳をお取りいただいた本田孔士教授(京都大学)に心より深謝申し上げます。

文 献

- 1) 日本眼球銀行協会資料.
- 2) **Trinkaus-Randall V** : Cornea. In : Lanza RP, et al (Eds) : Principles of Tissue Engineering. 2nd ed. Academic press, San Diego, CA, 471—491, 2000.
- 3) **Hicks CR, Fitton JH, Chirila TV, Crawford GJ, Constable IJ**. Keratoprostheses : Advancing toward a true artificial cornea. Surv Ophthalmol 42 : 175—189, 1997.
- 4) **Chen KH, Azar D, Joyce NC** : Transplantation of adult human corneal endothelium *ex vivo* : A morphologic study. Cornea 20 : 731—737, 2001.
- 5) **Engelmann K, Drexler D, Bohnke M** : Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients *in vitro*. Part I : Cell culturing and transplantation procedure. Cornea 18 : 199—206, 1999.
- 6) **Gospodarowicz D, Vlodavsky I, Savion N** : The role of fibroblast growth factor and the extracellular matrix in the control of proliferation and differentiation of corneal endothelial cells. Vision Res 21 : 87—103, 1981.
- 7) **Gospodarowicz D, Greenburg G, Alvarado J** : Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to rabbit cornea : Clinical implications for human studies. Proc Natl Acad Sci USA 76 : 464—468, 1979.
- 8) **Godarowicz D, Greenburg G, Alvarado J** : Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to species with non-regenerative endothelium : The cat as an experimental model. Arch Ophthalmol 97 : 2163—2169, 1979.
- 9) **Miyata K, Drake J, Osakabe Y, Hosokawa Y, Hwang D, Soya K, et al** : Effect of donor age on morphologic variation of cultured human corneal endothelial cells. Cornea 20 : 59—63, 2001.
- 10) **Engelmann K, Friedl P** : Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. In Vitro Cell Dev Biol 25 : 1065—1072, 1989.
- 11) **Blake DA, Yu H, Young DL, Caldwell DR** : Matrix stimulates the proliferation of human corneal endothelial cells in culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 38 : 1119—1129, 1997.
- 12) **Harley CB, Futcher AB, Greider CW** : Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature 345 : 458—460, 1990.
- 13) **Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, et al** : Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 89 : 10114

- 10118, 1992.
- 14) **Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al** : Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11 : 1921—1929, 1992.
 - 15) **Sohal RS, Weindruch R** : Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273 : 59—63, 1996.
 - 16) **Egan CA, Savre-Train I, Shay JW, Wilson SE, Bourne WM** : Analysis of telomere lengths in human corneal endothelial cells from donors of different ages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 648—653, 1998.
 - 17) **Maillard LC** : Action des acides amines sur les sucres ; Formation des melanoidines par voie methodique. *C R Acad Sci(Paris)* 154 : 66—68, 1912.
 - 18) **Rahbar S** : An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta* 22 : 296—298, 1968.
 - 19) **荒木令江, 堀内正公** : Advanced glycation end products (AGE) の生化学. *Diabetes Journal* 21 : 1—9, 1993.
 - 20) **Sell DR, Monnier VM** : Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. *J Biol Chem* 264 : 21597—21602, 1989.
 - 21) **Hayase F, Nagaraj RH, Miyata S, Njoroge FG, Monnier VM** : Aging of proteins : Immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during maillard reaction *in vivo*. *J Biol Chem* 264 : 3758—3764, 1989.
 - 22) **Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW** : Identification of N^ε-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 261 : 4889—4894, 1986.
 - 23) **Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR, Baynes JW** : Oxidation of glycated proteins : Age-dependent accumulation of N^ε-(carboxymethyl) lysine in lens proteins. *Biochemistry* 28 : 9464—9468, 1989.
 - 24) **Araki N, Ueno N, Chakrabarti B, Morino Y, Horiuchi S** : Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *J Biol Chem* 267 : 10211—10214, 1993.
 - 25) **Nagaraj RH, Sady C** : The presence of a glucose-derived Maillard reaction product in the human lens. *FEBS Lett* 382 : 234—238, 1996.
 - 26) **Nakayama H, Mitsuhashi T, Kuwajima S, Aoki S, Kuroda Y, Itoh T, et al** : Immunochemical detection of advanced glycation end products in lens crystallins from streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 42 : 345—350, 1993.
 - 27) **Ishibashi T, Murata T, Hangai M, Nagai R, Horiuchi S, Lopez PF, et al** : Advanced glycation end products in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 116 : 1629—1632, 1998.
 - 28) **Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, et al** : Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* 101 : 1219—1224, 1998.
 - 29) **Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomuta H, Ikeda K, Horiuchi S** : The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia* 40 : 764—769, 1997.
 - 30) **Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, et al** : Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 325 : 836—842, 1991.
 - 31) **Doi T, Vlassara H, Kirstein M, Yamada Y, Striker GE, Striker LJ** : Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 2873—2877, 1992.
 - 32) **Yang CW, Vlassara H, Peten EP, He CJ, Striker GE, Striker LJ** : Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 9436—9440, 1994.
 - 33) **Horiuchi S, Araki N, Morino Y** : Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the Maillard reaction. Evidence for the presence of a common structure. *J Biol Chem* 266 : 7329—7332, 1991.
 - 34) **Kaji Y, Amano S, Usui T, Yamashiro K, Ishida S, Suzuki K, et al** : Expression and function of receptors for advanced glycation end products in bovine corneal endothelial cell. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press.
 - 35) **Hsu DK, Zuberi RI, Liu FT** : Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J Biol Chem* 267 : 14167—14174, 1992.
 - 36) **Zhu W, Sano H, Nagai R, Fukuhara K, Miyazaki A, Horiuchi S** : The role of galectin-3 in endocytosis of advanced glycation end products and modified low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 280 : 1183—1188, 2001.
 - 37) **Levi G, Teichberg VI** : Isolation and physicochemical characterization of electrolectin, a beta-D-galactoside binding lectin from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *J Biol Chem* 256 : 5735—5740, 1981.
 - 38) **Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, et al** : Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 96 : 2262—2271,

- 1997.
- 39) **Zhang H, Agardh CD, Agardh E** : Retinal nitro blue tetrazolium staining and catalase activity in rat models of diabetes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234 : 324—330, 1996.
 - 40) **Baehner RL, Nathan DG** : Quantitative nitro-blue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 278 : 971—976, 1968.
 - 41) **Endo M, Yanagisawa K, Tsuchida K, Okamoto T, Matsushita T, Higuchi M, et al** : Increased levels of vascular endothelial growth factor and advanced glycation end products in aqueous humor of patients with diabetic retinopathy. *Horm Metab Res* 33 : 317—322, 2001.
 - 42) **橋本浩隆** : 糖尿病患者白内障と非酵素的糖化反応の関係. *日眼会誌* 102 : 34—41, 1998.
 - 43) **Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowiec D, Yang Z, Liu FT, et al** : Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE) : A new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med* 1 : 634—646, 1995.
 - 44) **Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al** : Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267 : 14998—15004, 1992.
 - 45) **Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D** : Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 91 : 2155—2168, 1993.
 - 46) **Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowiec D, Shimizu N, Li J, Stitt A, et al** : Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors : Relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80 K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 11047—11052, 1996.
 - 47) **Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, et al** : Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem* 230 : 408—415, 1995.
 - 48) **Wautier MP, Chappay O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL** : Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280 : E 685—694, 2001.
 - 49) **Hull DS, Green K, Thomas L, Alderman N** : Hydrogen peroxide-mediated corneal endothelial damage. Induction by oxygen free radical. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 : 1246—1253, 1984.
 - 50) **Hull DS, Green K, Laughter L** : Cornea endothelial rose bengal photosensitization. Effect on permeability, sodium flux, and ultrastructure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 : 455—460, 1984.
 - 51) **Hamada Y, Araki N, Koh N, Nakamura J, Horiuchi S, Hotta N** : Rapid formation of advanced glycation end products by intermediate metabolites of glycolytic pathway and polyol pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 228 : 539—543, 1996.
 - 52) **Baynes JW** : Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40 : 405—412, 1991.
 - 53) **Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al** : Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269 : 9889—9897, 1994.
 - 54) **Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarollo CA, Pasagian A** : Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins : Role in normal tissue remodeling. *Science* 240 : 1546—1548, 1988.
 - 55) **Min C, Kang E, Yu SH, Shinn SH, Kim YS** : Advanced glycation end products induce apoptosis and procoagulant activity in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract* 46 : 197—202, 1999.
 - 56) **Kasper M, Roehlecke C, Witt M, Fehrenbach H, Hofer A, Miyata T, et al** : Induction of apoptosis by glyoxal in human embryonic lung epithelial cell line L 132. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23 : 485—491, 2000.
 - 57) **Takeuchi M, Bucala R, Suzuki T, Ohkubo T, Yamazaki M, Koike T, et al** : Neurotoxicity of advanced glycation end-products for cultured cortical neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 59 : 1094—1105, 2000.
 - 58) **Jumblatt MM, Maurice DM, McCulley JP** : Transplantation of tissue-cultured corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17 : 1135—1141, 1978.
 - 59) **McCulley JP, Maurice DM, Schwartz BD** : Corneal endothelial transplantation. *Ophthalmology* 87 : 194—201, 1980.
 - 60) **Lange TM, Wood TO, McLaughlin BJ** : Corneal endothelial cell transplantation using Descemet's membrane as a carrier. *J Cataract Refract Surg* 19 : 232—235, 1993.
 - 61) **Mohay J, Wood T, McLaughlin BJ** : Long-term evaluation of corneal endothelial cell transplantation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 95 : 131—148, 1997.
 - 62) **Zieske JD, Mason VS, Wasson ME, Meunier SF, Nolte CJ, Fukai N, et al** : Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells : Importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp Cell Res* 214 : 621—33, 1994.
 - 63) **Aboalchamat B, Engelmann K, Bohnke M, Eggli P, Bednarz J** : Morphological and func-

- tional analysis of immortalized human corneal endothelial cells after transplantation. *Exp Eye Res* 69 : 547—553, 1999.
- 64) **Minami Y, Sugihara H, Oono S** : Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 2316—2324, 1993.
- 65) **Schneider AI, Maier-Reif K, Graeve T** : Constructing an *in vitro* cornea from cultures of the three specific corneal cell types. *In Vitro Cell Dev Biol* 35 : 515—526, 1999.
- 66) **Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NL, et al** : Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 286 : 2169—2172, 1999.
- 67) **Inslar MS, Lopez JG** : Transplantation of cultured human neonatal corneal endothelium. *Curr Eye Res* 5 : 967—972, 1986.
- 68) **Inslar MS, Lopez JG** : Heterologous transplantation versus enhancement of human corneal endothelium. *Cornea* 10 : 136—148, 1991.
- 69) **Bohnke M, Egli P, Engelmann K** : Transplantation of cultured adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients *in vitro*. Part II : Evaluation in the scanning electron microscope. *Cornea* 18 : 207—213, 1999.
- 70) **Singh G, Bohnke M, von-Domarus D, Draeger J, Lindstrom RL, Doughman DJ** : Vital staining of corneal endothelium. *Cornea* 4 : 80—91, 1985/1986.
- 71) **Wigham C, Hodson S** : Bicarbonate and the trans-endothelial short circuit current of human cornea. *Curr Eye Res* 1 : 285—290, 1981.
- 72) **Hodson S, Wigham C, Williams L, Mayes KR, Graham MV** : Observation on the human cornea *in vitro*. *Exp Eye Res* 32 : 353—360, 1981.
- 73) **Hodson S, Wigham C** : The permeability of rabbit and human corneal endothelium. *J Physiol* 342 : 409—419, 1983.
- 74) **Khodadoust AA, Green K** : Physiological function of regenerating endothelium. *Invest Ophthalmol* 15 : 96—101, 1976.
- 75) **Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ** : Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16 : 597—613, 1977.
- 76) **Fujii T** : The effect of amines added to an alkali pretreatment on solubilisation of collagen and on the properties of gelatin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 350 : 1257—1265, 1969.
- 77) **Hattori S, Adachi E, Ebihara T, Shirai T, Someki I, Irei S** : Alkali-treated collagen retained the triple helical conformation and the ligand activity for the cell adhesion via $\alpha 2 \beta 1$ integrin. *J Biochem* 125 : 676—684, 1999.
- 78) **Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CLM, Macher BA** : Man, apes, and Old World monkeys differ from mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 263 : 17755—17762, 1988.
- 79) **Sandrin NS, McKenzie IF** : Gal alpha(1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognized in pigs by human natural antibodies. *Immunol Rev* 141 : 160—190, 1994.
- 80) **Galili U** : Anti-Gal antibody prevents xenotransplantation. *Science and Medicine* 5(5) : 28—37, 1998.
- 81) **Cooper DKC, Lanza RP** : 異種移植とはなにか. 岩波書店, 東京, 75—93, 2001.
- 82) **Goldstein IJ, Winter HG** : The Griffonia simplicifolia I-B₄ isolectin. A probe for alpha-D-galactosyl end groups. *Subcell Biochem* 32 : 127—141, 1999.
- 83) **Wood C, Kabat EA, Murphy LA, Goldstein IJ** : Immunochemical studies of the combining sites of the two isolectins, A4 and B4, isolated from *Bandeiraea simplicifolia*. *Arch Biochem Biophys* 198 : 1—11, 1979.
- 84) **Tempel W, Tschampel S, Woods RJ** : The xenograft antigen bound to Griffonia simplicifolia lectin I-B(4). X-ray crystal structure of the complex and molecular dynamics characterization of the binding site. *J Biol Chem* 277 : 6615—6621, 2002.
- 85) **McPherson TB, Liang H, Record RD, Badylak SF** : Gal alpha(1,3)Gal epitope in porcine small intestinal submucosa. *Tissue Eng* 6 : 233—239, 2000.
- 86) **Bravery CA, Batten P, Yacoub MH, Rose ML** : Direct recognition of SLA-and HLA-like class II antigens on porcine endothelium by human T cells results in T cell activation and release of interleukin-2. *Transplantation* 60 : 1024—1033, 1995.
- 87) **Yamada K, Sachs DH, DerSimonian H** : Human anti-porcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. *J Immunol* 155 : 5249—5256, 1995.
- 88) **Donnelly CE, Yatko C, Johnson EW, Edge AS** : Human natural killer cells account for non-MHC class I-restricted cytotoxicity of porcine cells. *Cell Immunol* 175 : 171—178, 1997.
- 89) **Elsen M, Soares M, Latinne D, Cornet A, Bazin H** : Role of activated natural killer and CD⁴⁺, CD⁸⁺ cells in the cellular rejection of a discordant xenograft. *Transplant Proc* 25 : 447—449, 1993.
- 90) **Friedman T, Shimizu A, Smith RN** : Human CD 4⁺ T cells mediate rejection of porcine xenografts. *J Immunol* 162 : 5256—5262, 1999.
- 91) **Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, et al** : Production of

- alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295 : 1089—1092, 2002.
- 92) **Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM**, et al : Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* 285 : 1236—1241, 1999.
- 93) **Patience C, Patton GS, Takeuchi Y, Weiss RA, McClure MO, Rydberg L**, et al : No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* 352 : 699—701, 1998.
- 94) **Heneine W, Tibell A, Switzer WM, Sandstrom P, Rosales GV, Mathews A**, et al : No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* 352 : 695—699, 1998.
- 95) **Cohn LH, Mudge GH, Pratter F, Collins JJ Jr** : Five to eight-year follow-up of patients undergoing porcine heart-valve replacement. *N Engl J Med* 304 : 258—262, 1981.
- 96) **Cohn LH, Collins JJ Jr, DiSesa VJ, Couper GS, Peigh PS, Kowalkar W**, et al : Fifteen-year experience with 1678 Hancock porcine bio-prosthetic heart valve replacements. *Ann Surg* 210 : 435—442, 1989.
- 97) **Bloomfield P, Wheatley DJ, Prescott RJ, Miller HC** : Twelve-year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bio-prostheses. *N Engl J Med* 324 : 573—579, 1991.
- 98) **Prockop DJ** : Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276 : 71—74, 1997.
- 99) **Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ** : Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 3908—3913, 1998.
- 100) **Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A**, et al : Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol* 164 : 247—256, 2000.
- 101) **Johnston MC, Noden DM, Hazelton RD, Coulombre JL, Coulombre AJ** : Origins of avian ocular and periocular tissues. *Exp Eye Res* 29 : 27—43, 1979.
- 102) **Adamis AP, Molnar ML, Tripathi BJ, Emmer-son MS, Stefansson K, Tripathi RC** : Neuronal-specific enolase in human corneal endothelium and posterior keratocytes. *Exp Eye Res* 41 : 665—668, 1985.
- 103) **Lajtha LG** : Stem cell concepts. *Differentiation* 14 : 23—34, 1979.
- 104) **Doran TI, Vidrich A, Sun TT** : Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells. *Cell* 22 : 17—25, 1980.
- 105) **Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM** : 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.
- 106) **Gage FH** : Mammalian neural stem cells. *Science* 287 : 1433—1438, 2000.
- 107) **Barres BA** : A new role for glia : Generation of neurons. *Cell* 97 : 667—670, 1999.
- 108) **Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ** : Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287 : 2032—2036, 2000.
-

Comment : 北野 周作

大変興味深く拝読し、感銘を覚えた。

培養した角膜の細胞や、人工実質、ブタ角膜実質などを用いて、臨床応用可能な再構築角膜を作ることは、もはや夢物語ではなくなったのである。

私の留学時代(1963-1965)、ボストンのMEEで、ボスのC. H. Dohlmanがプラスチックの人工角膜の臨床応用で悪戦苦闘していたのが思い起こされる。

本論文は特に角膜内皮細胞を中心に、培養した角膜内皮細胞を用いて角膜の再構築が可能かを研究したものである。仔ウシ角膜内皮細胞の産生する細胞外基質(ECM)を用いたのが、安定してヒト角膜内皮細胞(HCEC)を培養できた key point と思われる。

ここを起点に、再構築角膜の作製が試みられ、内皮細胞密度が2,000/mm²以上、そしてウアバインによる抑制で確認された内皮のポンプ機能が正常の75%に達することなどが明らかにされ、再構築角膜の機能が *ex vivo* で確かめられ、次の *in vivo* での有効性の検討へと研究が進められている。

家兎における再構築角膜移植群では、術後6か月の観察期間中透明性が保たれ、培養したHCECが生体内で機能した結果とのことであるが、どの程度長期にHCECが生存し、機能しているのか今後の検討を是非続けていただきたい。

再構築角膜の実質の候補として、ブタ角膜実質が検討されている。超急性拒絶反応は起さず、許容量のステロイドで抑制可能な程度の細胞性拒絶反応がみられている。これに対しては、 α -gal エピトープを持たないブタ、あるいは無細胞化したブタ角膜実質の使用が今後考えられている。

手近な材料として、臨床応用が最も早く期待されるものである。

角膜移植の患者は、その quality of life(QOL)を考えると一刻も早く視力を回復させてあげたい。感染、免疫などの課題の早期解決が望まれる。

最後に残された問題が自己未分化細胞移植であり、骨髓単核細胞が角膜内皮様に変化できる可能性が示唆されている。

特に水疱性角膜症の症例では、HCEC 前房内注入による移植が可能となれば、大きな福音となるであろう。