

平成 17 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

培養ヒト角膜内皮細胞移植

三村 達哉

東京大学大学院医学系研究科眼科学教室

要 約

近年、培養ヒト角膜内皮細胞(Human corneal endothelial cell, HCEC)を用いた再生医療の研究が様々な動物モデルを用いて検討されている。本論文では、これまで報告された培養 HCEC を用いた再生角膜の研究を比較検討するとともに、我々の HCEC 再生の治療的戦略について紹介する。

方 法：白色家兎またはヌードラットの水泡性角膜症モデルを作製し、各種方法により培養 HCEC および角膜内皮組織幹細胞の移植を試みた。5代継代した培養 HCEC をコラーゲン上で培養し、HCEC シートのポンプ機能の指標である Potential Difference (PD) と Short Circuit Current (SCC) を測定した。ヌードラットもしくは、白色家兎の Descemet 膜を除去した後に、培養 HCEC を用いて再構築した角膜あるいは、培養 HCEC シートを移植した。また、白色家兎の水泡性角膜症モデルに対して、スフェア法により作製したヒト角膜内皮組織幹細胞を前房内に投与して、角膜内皮面に移植した。

結 果：HCEC シートの PD と SCC はヒト角膜の 80~95%、76~82% であった。いずれの実験モデルにおいても、培養 HCEC もしくは、組織幹細胞を移植した群における術後角膜厚は対照よりも有意に小さく、角膜浮腫および眼圧上昇は認めなかった。術後 4 週の内皮密度はいずれのモデルにおいても 2,500 cells/mm² 以上であった。またいずれの移植モデルにおいても組織学的に蛍光標識をした一層の HCEC が内皮面に接着しているのが観察された。

結論：培養 HCEC に正常角膜と同様にポンプ機能があることが証明された。培養 HCEC により再構築した角膜、あるいはヒト角膜内皮組織幹細胞の移植後の角膜浮腫抑制効果が確認された。培養 HCEC および、組織幹細胞の臨床応用への可能性が示唆された。(日眼会誌 110: 879-897, 2006)

キーワード：角膜内皮細胞、移植、細胞培養、コラーゲン

A Review

Cultured Human Corneal Endothelial Cell Transplantation

Tatsuya Mimura

Department of Ophthalmology, University of Tokyo Graduate School of Medicine

Abstract

Researchers have demonstrated the feasibility of transplanting human cultured corneal endothelial cells (HCEC) in various animal models. This review provides an overview of recent advances in our understanding of cultured corneal endothelial cell transplantation. We propose HCEC transplantation with a collagen sheet as the substitute carrier of HCEC. We also propose a novel strategy for corneal endothelial cell deficiency with the injection of adult human corneal endothelial precursors (HCEP).

Using white rabbits or nude rats as keratopathy models, cultured HCEC were seeded on a collagen sheet. Descemetorhexis was performed on rabbit eyes. The HCEC collagen sheet was brought into the anterior chamber and fixed to the posterior stroma (HCEC group). Rabbit corneas with collagen sheet transplantation after descemetorhexis (collagen group) and with only descemetorhexis (no transplantation group) were the controls, respectively. As for HCEP transplantation, HCEP, isolated from

別刷請求先：113-8655 東京都文京区 7-3-1 東京大学大学院医学系研究科眼科学教室医局 三村 達哉

(平成 18 年 4 月 26 日受付, 平成 18 年 7 月 27 日改訂受理) E-mail: mimurat-tky@umin.ac.jp

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

(Received April 26, 2006 and accepted in revised form July 27, 2006)

rabbit corneal endothelial cells by sphere-forming assay, were injected into the anterior chamber and a face-down position was maintained for 24 hours in the rabbits (HCEP group).

Pump function parameters of the HCEC sheets were 76-95% of those of human donor corneas. Mean corneal thickness in the HCEC group was significantly less than in the collagen and no transplantation groups 1, 3, 7, 14, 21, and 28 days ($p < 0.05$) after surgery. Cells were spread over the rear corneal surface in the HCEC group. In HE staining, marked stromal edema was present in the collagen and in the no transplantation groups, but not in the HCEC group with collagen sheets bearing monolayer cells. In the HCEP group, injected spheres were spread over the rear surface of the cornea and

corneal edema was markedly suppressed.

Our findings indicate that transplantation of cultured HCEC from adult human donor cornea by means of a collagen sheet can maintain the function of corneal dehydration. This suggests the feasibility of transplantation using cultured HCEC with a collagen sheet for corneal endothelial cell dysfunction. Additionally, adult precursor injection therapy can be also an effective strategy for corneal endothelial cell deficiency in place of conventional full-thickness corneal transplantation.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 110 : 879-897, 2006)

Key words : Corneal endothelial cell, Transplantation, Cell culture, Collagen

I はじめに

角膜移植は1906年にZirm Eによって初めて成功して以来¹⁾, 移植法が確立した手術で, 世界中で施行されている手術である²⁾. アメリカでは年間, 45,000件の角膜移植が行われている. 一方, 本邦においては年間, 約2,600眼の角膜が移植されているが, 移植手術を必要とする患者数に対して, 提供角膜数が慢性的に不足しているのが現状である.

提供角膜数の慢性的, 相対的不足状態を解決するために, 過去に人工の高分子化合物を用いて人工角膜を作製する試みを実施されてきたが³⁾⁴⁾, いずれも動物眼における手術の結果は長期生着性および透明性に関して今ひとつであった³⁾. 近年, 医療分野では再生医療が大きな注目を集めており, 従来の移植医療に代わる新しい治療法になり得ると考えられる. 再生医療の技術を用いて培養した角膜上皮細胞, 角膜実質細胞や角膜内皮細胞を人工材料に組込むことにより, 角膜を再構築することが可能となれば, 現在の慢性的なドナー不足を解消する解決策になるのではないかと考えられる. 角膜を構築する上皮細胞においては角膜の輪部が健全であれば, 角膜上皮欠損が生じた場合でも角膜上皮細胞は生体内で再生される. さらに, 重症の角膜上皮障害の患者に対して, 生体外で自己角膜上皮細胞を培養して自己角膜実質上に戻す角膜上皮再生医療が, 既に行われている. 一方, 角膜疾患の大部分を占める角膜内皮障害による水疱性角膜症に関しては現在のところ, 全層角膜移植に頼るしか他に方法がない. しかし, ドナー不足は深刻であり, 角膜内皮再生医療の臨床応用に期待がかかっている.

培養した内皮細胞を用いた再構築角膜はこれまでにいくつかの動物モデルにおいて試行されている. 初期の研究はネコ⁴⁾, 家兎⁵⁾⁶⁾, ウシ⁷⁾, マウス⁸⁾のDescemet膜

上, またはゼラチンシート上⁹⁾¹⁰⁾に播種して作製された. また, 胎児や若年者の培養ヒト角膜内皮細胞(Human corneal endothelial cell, HCEC)を用いた再構築角膜を移植した報告^{11)~13)}もある. 成人ドナーより得られた培養HCECを用いて再構築した角膜についても組織学的に検討されている^{14)~18)}.

角膜内皮細胞は神経堤由来の細胞で, 角膜実質と前房水の間に位置する六角形の単層細胞である. 角膜内皮細胞におけるバリアー機能およびポンプ機能は角膜実質内の水分をハイドレーションすることにより角膜の透明性を維持する重要な働きをしている. したがって, 白内障術後の水疱性角膜症やFuchs角膜内皮変性, 角膜内皮炎などのように角膜内皮細胞が障害された場合は角膜実質に浮腫が生じ, 角膜透明性が低下するために視力低下が生じる. 通常生体内では障害された部位周辺の細胞が増殖, 遊走し, 欠損部を補うことにより, 瘢痕も含めた創傷治癒がなされる. しかし, 角膜内皮細胞は, 生体内では増殖能が低下しており^{19)~21)}, このことが生体内における内皮の創傷治癒が期待できない理由となっている. また, 角膜内皮細胞が損傷を受けると, 損傷部分は増殖した細胞によって埋めることができず, 創傷治癒機転は細胞の進展移動と代償的拡大により, 細胞の表面積を大きくして隙間を埋めようとする. その結果, 角膜内皮細胞の単位面積当たりの密度が減少する. したがって, 角膜内皮細胞の面積を増やすことにより創傷を治癒させた場合は, 角膜の機能には自ずと限界が生じ, 破綻すると水疱性角膜症などの疾患を惹き起こすこととなる. それに対する治療は角膜移植である. しかし, 少なくとも日本国内では, 角膜ドナーが極端に不足しているという現状があり, また, 移植には適合性の問題もあり, 角膜移植による治療は万全な治療法とは言い難い. 水疱性角膜症が不可逆的であることは, 生体内での角膜

内皮細胞の増殖能が極めて低い点にある。最近の *in vitro* の研究では生体内における HCEC は G1 期に抑制されているのみで、培養系で増殖因子による刺激を加えることにより分裂することが分かっている^{22)~24)}。したがって、培養した角膜内皮細胞を用いて生体外で角膜内皮を再生することができれば、移植医療に用いることができると考えられる。

今回、培養した角膜内皮細胞を用いて、各種方法により角膜の再構築を試みた。また、再構築した角膜の機能解析および動物への培養角膜内皮の移植を試みた。さらに、今後の移植医療を見据えて、角膜内皮から得られた組織幹細胞を利用した角膜組織再生医療についても検討を行った。

II HCEC の培養

1. 細胞外基質

いくつかのグループから HCEC の培養法が紹介されているが、角膜内皮細胞の培養には確立した方法はない。数少ない報告の中で、Engelmann ら¹⁵⁾²⁵⁾のグループはゼラチンでコーティングした培養皿と 10% fetal bovine serum (FBS) を含む培地で HCEC の培養を行っている。Joyce の研究室^{18)26)~30)}のグループでは fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF), nerve growth factor (NGF) と 8% の FBS を含む培地で、fibronectin を主体とした fibronectin and type I collagen (FNC) でコーティングした培養皿を使用して培養している。また、Gospodarowicz ら^{31)~33)}は、仔ウシの角膜内皮細胞が産生する細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) を用いて HCEC を培養している。

HCEC の培養は非常に困難であり、いずれの研究室においても、初代培養では ECM を用いて培養している。ECM の種類としては、I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、laminin, FNC coating mix, 仔ウシ角膜内皮細胞が産生する ECM などが用いられている。我々は主に、Gospodarowicz ら^{31)~33)}の報告による仔ウシ角膜内皮細胞が産生する ECM と Joyce の研究室^{18)26)~30)}が報告している FNC を用いて HCEC を培養している。

仔ウシ角膜内皮細胞が産生する ECM を得るためには、仔ウシ角膜内皮細胞を培養する必要がある。初代培養は仔ウシ角膜から Descemet 膜ごと採取した小片を 10% FBS, 5% FBS, bFGF 2 ng/ml, 2% dextran を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose (DMEM low glucose) の培地で培養している。継代した仔ウシ角膜内皮細胞がコンフルエントとなった時点で、0.14% 水酸化アンモニウム処理を加えることにより、仔ウシ角膜内皮細胞由来の ECM コーティング培養皿を作製することができる³⁴⁾。FNC は原液で手に入り、培養皿上に容易にコーティングすることが可能な手軽なコーティング薬である。

2. HCEC の培養法

本邦では日本人ドナー角膜を研究に使用することは禁じられているため、アメリカのアイバンクより輸入した角膜から HCEC を採取して、培養している。細胞の培養法としては、Descemet 膜ごと培養皿に接着させて培養する方法と、collagenase, dispase, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) などの酵素により Descemet 膜から HCEC を採取して、培養液中に懸濁した HCEC を培養皿上に播種する方法がある。

Descemet 膜ごと培養する場合は、培養皿上に小片の Descemet 膜を内皮面が下になるようにして置き、15% FBS, bFGF 2 ng/ml を含んだ DMEM low glucose 中に 2 日静置して、Descemet 膜の培養皿上への接着を図っている。

Descemet 膜から酵素処理により採取した HCEC を培養する場合は、cup 状になった角膜内皮面に dispase を入れて、パステールピペットにより Descemet 膜から細胞を回収する方法、HCEC のついた Descemet 膜を採取して collagenase により、細胞外基質 (Descemet 膜) のみを溶解させた後に、残った HCEC を採取する方法などがある。最近では Joyce の研究室^{18)26)~30)}が開発した方法に従って EDTA 処理によって HCEC を回収して培養する方法を行っている。Joyce の研究室^{18)26)~30)}の方法は、摘出した Descemet 膜を 8% の FBS を含んだ OptiMEM-1 に入れ 37°C で一昼夜インキュベートした後に、0.02% の EDTA 溶液に Descemet 膜を入れ、細胞間接着を弱めた後に、パステールピペットを用いて回収した HCEC を、8% FBS, 5 ng/ml EGF, 20 ng/ml NGF, 100 μg/ml bovine pituitary extract, 20 μg/ml ascorbic acid, 200 μg/ml calcium chloride, 0.08% chondroitin sulfate を含んだ Opti-MEM-1 で培養する方法である (図 1)。

継代については、初代 HCEC は 1:1~1:4 の割合で継代し、継代 2 代目以降は 1:16 の割合で行っている。通常、継代 2 代目以降は必ずしも ECM を必要とはしないが、ドナー角膜の内皮細胞密度が低い場合や、ドナー年齢が高い場合は ECM を用いた方が好ましい。

3. ヒト血清による培養

FBS などに代表されるウシ由来の材料はウシ海綿状脳症の危険性がある。また、ヒト以外の由来の材料を使用することはウイルスを含めた人畜共通感染症の危険性もある。我々は FBS の代わりに成人血清を用いて初代 HCEC を培養した。15% FBS と 15% 成人血清における培養を比較すると増殖曲線、培養 HCEC の形態ともに差はなかった³⁵⁾。今後、培養 HCEC を臨床応用するためには、ヒト由来のコーティング、成人血清、ヒト由来の増殖因子による HCEC の培養法の確立が必要となる。

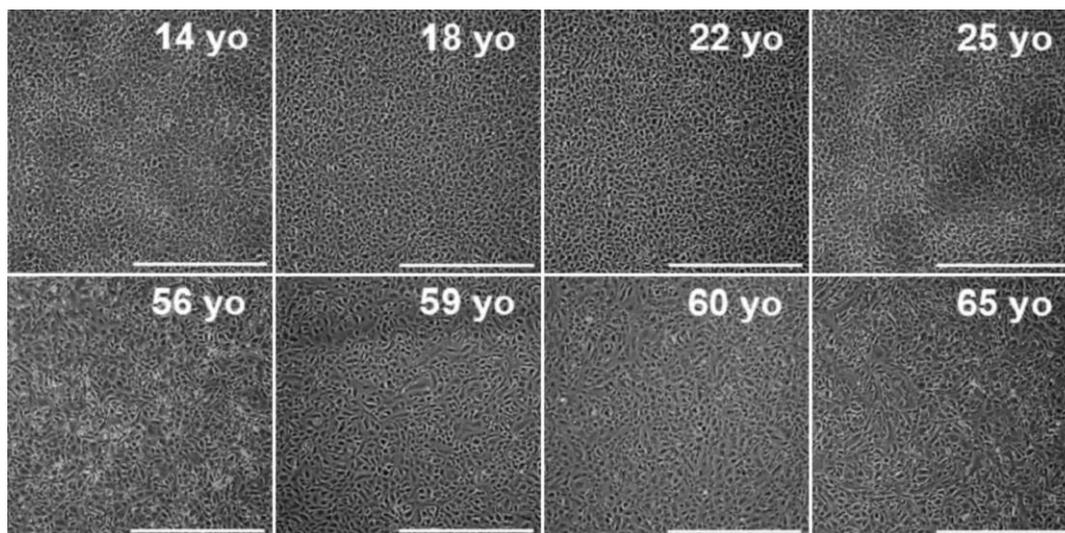


図1 培養ヒト角膜内皮細胞(HCEC)。

継代2代目で比較すると、若年者のドナー由来の培養HCECの方が高齢者よりも良好な形態を示している。
Bar=1 mm.

4. HCECのポンプ機能

培養HCECを用いた再構築角膜を移植した後に、移植角膜が透明性を保つためには培養HCECがポンプ機能を保持している必要がある。近年、我々の研究室で Na^+ と HCO_3^- のcotransporter(NBC-1)の2種類のisoformである腎臓型(kNBC-1)と膵臓型(pNBC-1)が培養HCECに発現していることが発見された³⁶⁾。また再構築させた角膜自体のポンプ機能をウッシングチャンバーにて測定したところ、正常ヒト角膜の電位差約0.4 mVに対して再構築角膜では約0.3 mVであった。いずれも Na^+ 、 K^+ -ATPaseの阻害薬であるウアバインを投与すると0に低下した³⁵⁾³⁷⁾³⁸⁾。この結果は培養HCECにより再構築した角膜が Na^+ 、 K^+ -ATPaseに依存するポンプ機能を有していることを示唆しており、培養HCECの臨床応用への可能性にさらに近づいた。

III 培養HCEC移植の概略

培養角膜内皮細胞の移植delivery法として多施設よりいくつかの方法が提案されている。①Descemet膜上に培養HCECを播種³⁵⁾³⁹⁾⁴⁰⁾、②ブタ角膜実質上培養HCEC³⁵⁾、③羊膜上培養HCEC³⁹⁾⁴¹⁾、④人工実質上培養HCEC⁴²⁾、⑤温度応答性培養皿により作製したHCECシート^{43)~45)}、⑥培養内皮細胞前房内投与⁴⁶⁾⁴⁷⁾が報告されている。我々の研究室では培養HCECの移植後の機能評価をするための*in vivo*の実験モデルとして、①②③④⑥を採用している。

HCECを用いて全層角膜を再構築する方法として上述の①②③④⑤が挙げられるが、最も生体内に近い状態を再現した再構築角膜は①である。これは角膜内皮細胞を除去して露出したDescemet膜上に培養HCECを直接播種する方法で、播種細胞数を増やし、遠心を加

えることにより、最近では3,000 cells/mm²以上の内皮細胞密度が得られることが分かっている(図2)。移植実験に際しては異種移植間の拒絶反応を抑えるために、内皮細胞はヒト由来のHCECであるが、播種するキャリアは移植する動物種の角膜実質を用いている。すなわち、白色家兎角膜に培養HCECを播種したものを白色家兎に全層角膜移植(PKP)を行う実験系(図3, 4 A)³⁵⁾、ルイスラット角膜に培養HCECを播種してヌードラットにPKPを行う実験系である⁴⁰⁾(図3 B, 4 B)。いずれも術後角膜浮腫が早期に改善し、HCECを播種していない角膜を移植した群と比較して有意に術後角膜厚は低下した。

前述の②③④⑤のように、羊膜³⁹⁾⁴¹⁾(図3 C, 4 C)や人工実質などのキャリア上に培養HCECを播種して作製する内皮シートや温度応答性培養皿により作製した内皮シート^{43)~45)}も、移植後の角膜透明性に働くことが動物実験で証明されている。内皮シートの移植法としては、強角膜切開により角膜深層にポケットを作製し、特殊なトレパンを用いて深層角膜のみを除去してシートを移植する方法、Descemet膜を前房内側から切除した後に内皮シート単独を移植する方法⁴²⁾⁴⁸⁾(図5~7)、マイクロケラトームを併用することにより深層移植片を移植する方法⁴⁹⁾⁵⁰⁾(図8)、さらにこれを改変して内皮と薄い実質を含んだ深層角膜を移植する術式⁵¹⁾⁵²⁾などが提案されている。

キャリアを使用することなく、培養内皮細胞を単独で前房内に投与し、露出したDescemet膜に接着させる術式もある⁴⁶⁾⁴⁷⁾(図3 D, 4 D)。眼内手術で内皮細胞が脱落した場合に、周辺の細胞が遊走する前に、露出した部分のDescemet膜に培養HCECを移植することにより、内皮細胞脱落に伴うポンプ機能障害、バリアー機能障害

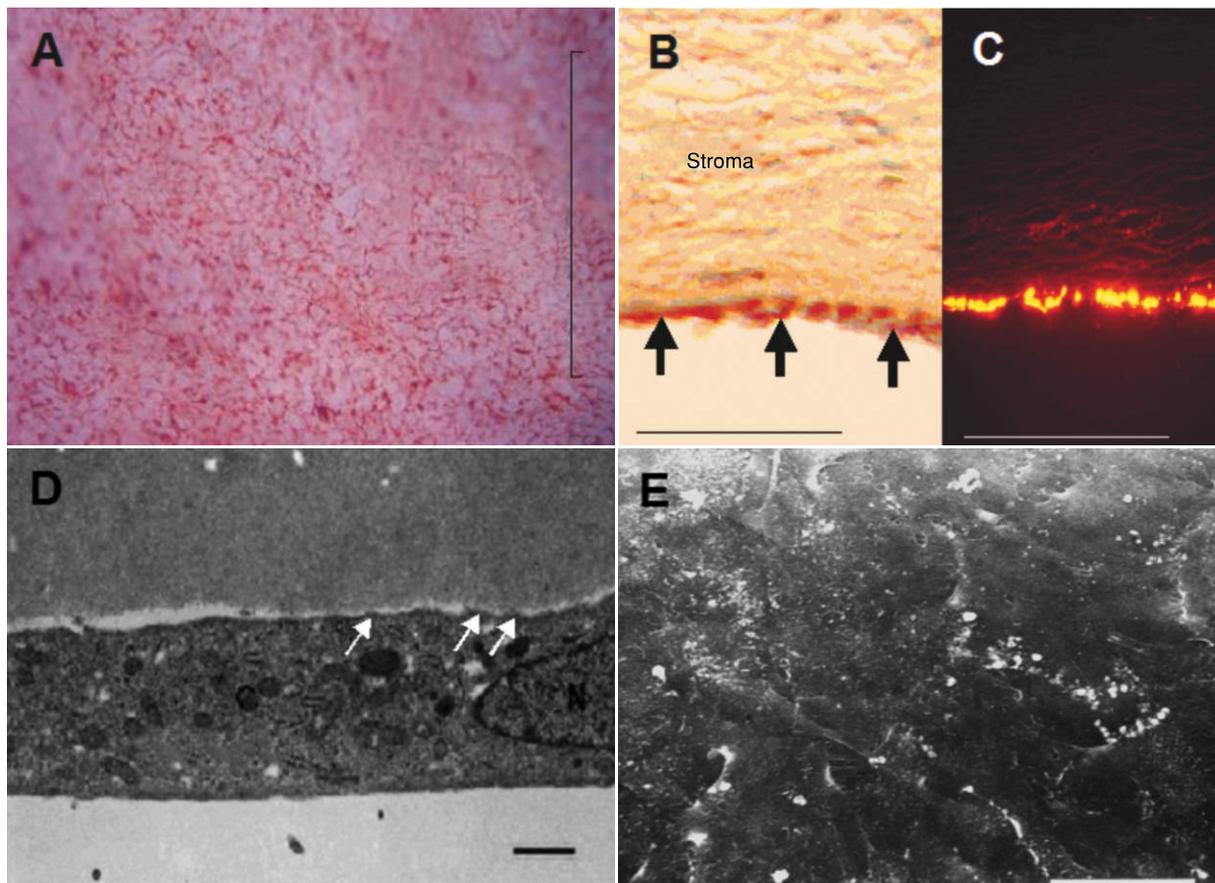


図 2 培養 HCEC を用いた再構築角膜の組織学的検討。

- A：再構築角膜の内皮面をトリパンブルーとアリザリンレッドにより二重染色を行った。角膜内皮面の全体を培養 HCEC が被覆している。Bar=100 μm 。
- B：組織切片のヘマトキシリン-エオジン染色。培養 HCEC が重層化することなく、単層の状態内で皮面に接着している(矢印)。Stroma：実質側。Bar=100 μm 。
- C：B と同部位の内皮面において fluorescent marker chloromethyl-benzamidodialkylcarbocyanine 蛍光色素で蛍光標識された培養 HCEC が観察されるため、接着した細胞が移植した培養 HCEC であることが分かる。Bar=100 μm 。
- D：透過型電子顕微鏡写真。基底膜である Descemet 膜と培養 HCEC がヘミデスモゾームを介して接着している(矢印)。Bar=0.1 μm 。
- E：走査電子顕微鏡写真。接着した培養 HCEC の内皮面は正常ヒト角膜内皮細胞と同様に平坦な六角形の形態を示している。Bar=0.1 μm 。

を防ぐことが可能となり、最も理想的な内皮移植法である。この方法の利点は切開、縫合を行わないシンプルな術式であることと、術後乱視を懸念する必要がないことである。しかしながら、細胞を前房内に投与すると、通常は線維柱帯から眼外に排泄され、角膜内皮面に接着することはない。そこで、培養 HCEC の角膜裏面に接着させることを目的として、継代 3 代目の HCEC に鉄粉を貪食させた後、クライオにより角膜内皮細胞を脱落させた家兎前房内に培養 HCEC を投与し、磁場により内皮細胞を内皮面に接着させる方法について検討した。クライオのみを施行した群やクライオ後に通常培養内皮細胞を投与した群と比較して、磁場により細胞を接着させた群では術後角膜浮腫は早期に改善し、術後角膜厚が対照と比較して有意に低下した。術後 1 年の経過におい

ても眼圧上昇は認めず、網膜電図(ERG)による検査ではジデローシスによる網膜視機能の低下は認めなかった。シンプルな術式ではあるが、鉄粉を使用しないで内皮面に接着させる方法があれば、細胞の前房内投与による移植法はさらに望ましいと考えられる。

IV コラーゲンをキャリアとした 培養 HCEC シートの移植

1. コラーゲン上培養 HCEC シートの有用性

培養内皮細胞を単独で前房内から角膜裏面に接着させる内皮移植は、家兎を用いた *in vivo* の実験では角膜透明性維持に働いた。しかし、臨床的にこの移植法を施行するにはいくつかの問題がある。第一に、角膜内皮細胞に鉄粉を取り込ませることは術後の眼内鉄症を起こす可能

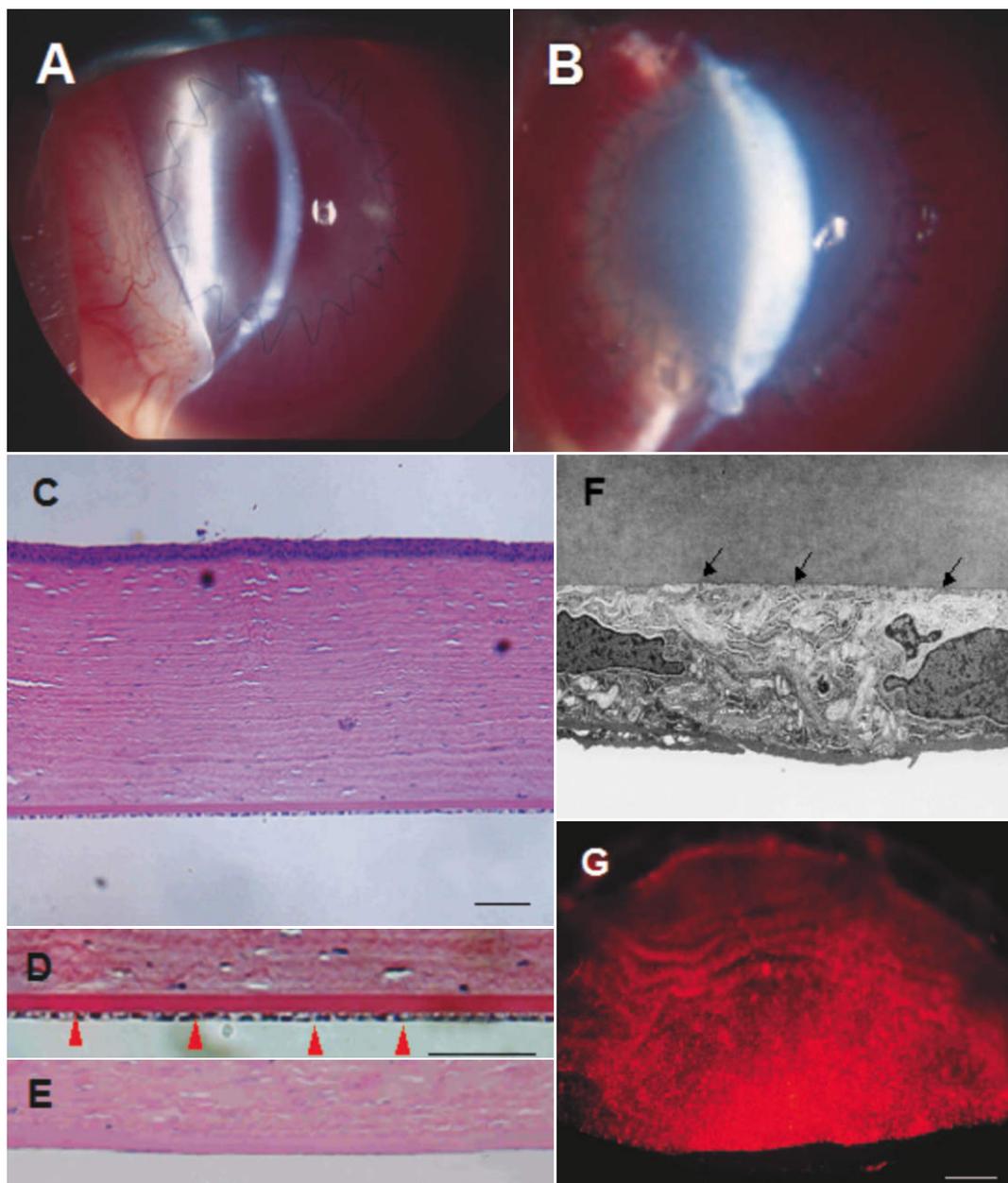


図 3 家兎への再構築角膜移植。

内皮細胞を除去した家兎角膜実質に培養 HCEC を播種して角膜を再構築した。再構築角膜もしくは内皮細胞を除去した角膜の全層角膜移植を家兎に試行した。再構築角膜移植群では移植後角膜透明性が保たれているが(A)，一方，内皮細胞を除去した角膜を移植した対照では角膜浮腫が改善されていない(B)。術後1か月の組織学的検討では，再構築角膜移植群では角膜実質浮腫を認めず，内皮細胞は単層の状態の内皮面に接着している(C, D:ヘマトキシリン-エオジン染色)。一方，対照では内皮細胞は認めない(E)。透過型電子顕微鏡による観察では Descemet 膜との間にヘミデスモゾームが形成されている(F, 矢印)。フラットマウントの状態では，蛍光顕微鏡下で観察すると蛍光標識された細胞が移植片の内皮面全体に局在している(G)。Bar=100 μ m

性がある。第二に，内皮面に接着しなかった培養細胞が線維柱帯に接着し，上強膜静脈還流量を低下させ，術後眼圧上昇を来す可能性がある。術後1年の観察ではこれらの合併症はみられなかったが，患者を納得させるだけの長期的な安全性が確認できない以上，臨床的にリスクの可能性がある術式は避けるべきである。また，術前に角膜内皮細胞を脱落させる必要性があり，未だ検討の余

地は残されている。培養角膜内皮細胞をドナー角膜実質に接着させて動物モデルに移植した研究もあるが^{6)11)~13)31)32)35)37)~40)53)~55)}，その場合にはドナーの角膜実質が必要となりドナー角膜不足を解消する手段とはなり得ない。そこで，ドナー角膜を必要とせず，また，内皮面に接着不能の細胞が惹き起こす合併症を克服するために，確実に培養細胞のみを内皮面に移植する術式が望まれ

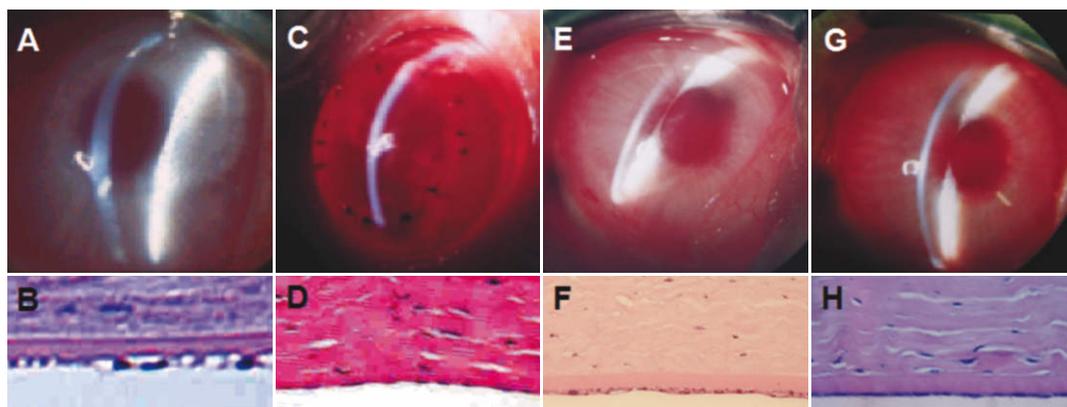


図 4 培養 HCEC の各種移植法。

A, B: 白色家兎角膜実質上培養 HCEC の全層角膜移植後 6 か月(白色家兎眼), C, D: ルイスラット角膜実質上培養 HCEC の全層角膜移植後 1 か月(ヌードラット眼), E, F: Descemet 膜剝離後, ヒト羊膜上培養 HCEC の前房内移植後 1 か月(白色家兎眼), G, H: 培養家兎角膜内皮細胞前房内移植後 1 年(白色家兎眼)。いずれのモデルにおいても, 移植後培養 HCEC が内皮面に接着し, 術後の角膜透明性が維持された。Bar=10 μ m。

る。次のステップとして, 我々は培養細胞とその細胞のキャリアとなる人工コラーゲンを用いて, 培養内皮シートを作製し, その機能を解析するとともに, *in vivo* でも角膜透明性維持に働くか検討を行った⁴²⁾。

2. 培養角膜内皮シートの作製

1) 再構築角膜内皮シートの作製

コラーゲンシートの作製にあたってはニッピ研究所との共同研究によって行っている。I 型コラーゲンをアルカリ可溶化させ, 抽出した後に乾燥させ, 紫外線滅菌を 2 時間行うことにより, コラーゲンシートを作製した⁵⁶⁾⁵⁷⁾。作製したコラーゲンシートの厚さは約 10 μ m で, 生体内の Descemet 膜の厚さに近似している。実験に用いる前にコラーゲンシートはリン酸緩衝生理食塩水により 10 分間, 湿潤させ, 生検用トレパンを用いて移植に適した大きさの直径 6 mm にしている。コラーゲンシート上に 1.0 μ g/mm² の濃度で human plasma fibronectin をコーティングした後に, 継代 5 代目の HCEC を播種する。細胞の接着を促進するために培養皿ごと 1,000 rpm で 10 分間の遠心を加えている。その後, 24 時間培養液中に静置することにより培養 HCEC がシート状に接着し, 透明な内皮シートが作製できる(図 5 A~C)。作製したシートのポンプ機能を測定するとともに, *in vivo* での検討を行った。

2) ポンプ機能測定

ウッシングチャンバーの間に再構築内皮シートを挟み, ショートサーキットカレントアンプリファァを用いて, 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^{58)~61)}。また, Na⁺, K⁺-ATPase 阻害薬であるウアバインを 0.1 mM の濃度になるようにバッファァ中に加え, 電位差, 短絡電流の変化を測定した。アメリカアイバンクより提供された研究用ヒト角膜を陽性対照とし, コラーゲンシートを陰性対照とした。

3) 家兎への移植

体重が 2.0~2.4 kg のニュージーランド白色家兎に全身麻酔を行った後に, 眼付属組織をイソジン溶液にて消毒し, 滅菌ドレープを眼球周囲にかぶせて手術を行った。角膜上方 12 時方向よりスリットナイフを用いて強角膜切開を行い(図 5 D), 粘弾性物質で前房内を満たした。角膜中央表面に手術用マーキングペンにより直径 6 mm のマーキングを行い, 先端を折り曲げた 30 ゲージの針により角膜内皮面の Descemet 膜を正確に円形に切除し(図 5 E), 前房内から眼外に摘出した(図 5 F)。再構築した HCEC シートを human plasma fibronectin によりコーティングし, 前房内から, Descemet 膜が切除された実質部分にシートを接着させて移植した(図 5 G)。シートの挿入が困難な場合は折りたたみ式のシリコンプレートを用いた。接着が弱い場合は, 前房内を空気で置換し, 接着効率を高めた。移植後, 強角膜切開部分は 10-0 ナイロンで 2~3 針の単縫合を施行した。コラーゲン上培養 HCEC シートを移植した群を HCEC 群とし, Descemet 膜を摘出した群を陰性対照群とした。各群とも 4 例 4 眼とした。

3. 培養角膜内皮シートの評価

1) ポンプ機能

正常内皮の付いたヒト角膜では測定 10 分後の電位差は上皮側を+として 0.48 ± 0.05 (平均値 \pm 標準偏差) mV (n=4) であり, これまでの報告^{58)~61)}とほぼ一致する値であった。再構築角膜では, 電位差は 0.45 ± 0.13 (平均値 \pm 標準偏差) mV (n=4) で, この値は正常角膜の 90% 以上の値であった。上皮と内皮を除去したヒト角膜実質における電位差は 4 眼とも 0 mV であった。短絡電流は正常ヒト角膜で 8.70 ± 1.32 (平均値 \pm 標準偏差) μ A (n=4) で, 再構築内皮シートでは 7.10 ± 1.74 (平均値 \pm 標準偏差) μ A (n=4) であった。いずれも測定開始 10 分後に

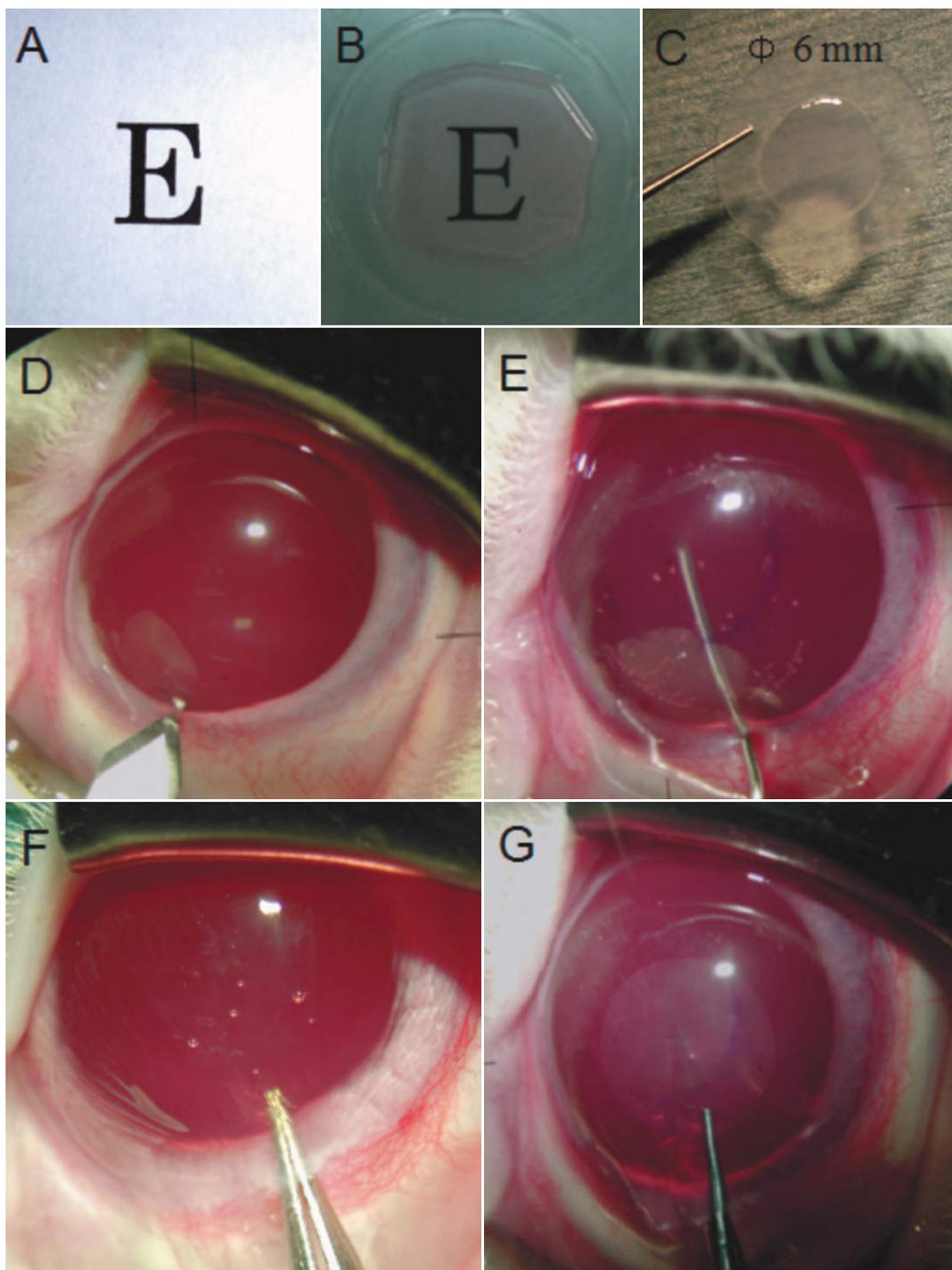


図 5 コラーゲン上培養 HCEC シート移植の術式。

コラーゲン上で HCEC を培養し内皮シートを作製した。E の文字をプリントした紙(A)を再構築内皮シートを通して観察すると鮮明な文字として確認出来るほど、透明性が高いことが分かる(B)。コラーゲン上培養内皮シートの移植法を D~G に示す。D: クレセントナイフにより輪部より強角膜切開。E: 前房内から先端を折り曲げた 30 ゲージの針により角膜内皮面の Descemet 膜を円形に切除。F: 切除した Descemet 膜を眼外に摘出。G: 内皮シートを Descemet 膜が切除された実質部分に移植。

Na^+ , K^+ -ATPase の阻害薬であるウアバインを 0.1 mM/l になるようにチャンバー内に加えると、電位差および短絡電流は 0 mV, 0 μA に低下した。培養 HCEC を用いて作製した再構築内皮シートが正常角膜に匹敵するポンプ機能を有していることが分かった。そして電位

差が Na^+ , K^+ -ATPase の阻害薬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 Na^+ , K^+ -ATPase に依存するものであることが分かった。

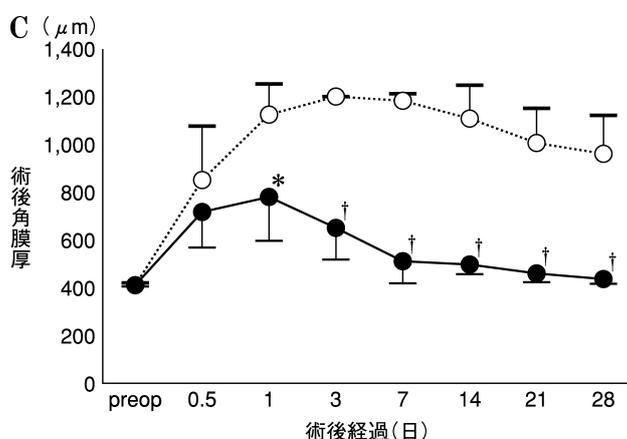
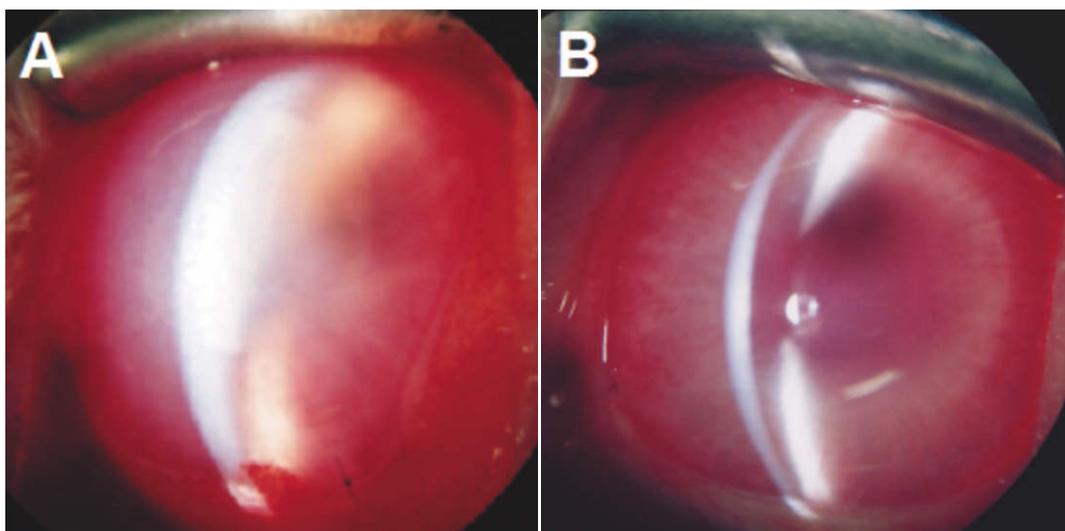


図 6 コラーゲン上培養 HCEC シートの移植後経過。

術後 1 か月の代表的な前眼部写真。

A : Descemet 膜のみを除去した陰性対照群。

B : コラーゲン上培養 HCEC シートを移植した群。HCEC 群では対照と比較して角膜浮腫が抑制され、角膜は透明性を維持している。

C : コラーゲン上培養 HCEC シートを移植した群 (●, n=4) の角膜厚は術翌日以降のすべての時点において、陰性対照群 (○, n=4) と比較して角膜厚が有意に低い (Student's t-test)。* : p<0.05 † : p<0.001

2) 術後評価

各群の代表的な前眼部所見を図の 6 A, B に示す。陰性対照群では強い角膜実質浮腫を認めるのに対し、HCEC 群では実質浮腫を認めず、拒絶反応も認めなかった。細隙灯顕微鏡下にてコラーゲンシートが接着した角膜深層部分に若干の混濁を認めたが、角膜透明性に影響を与えるほどではなかった。術後眼圧はすべての群において上昇しなかった。

各群における術後角膜厚の経過を図 6 C に示す。陰性対照群では術後最終観察時 28 日目まで全観察期間において約 1,000 μm であった。一方、HCEC 群では術後全観察期間において陰性対照群より有意に角膜厚が低かった (1 日目 : p<0.05, 3, 7, 14, 21, 28 日目 : p<0.001)。

3) 組織学的検討

術後 28 日のヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色の結

果を図 7 A~D に示す。陰性対照群では実質浮腫と、びまん性に実質に浸潤した炎症細胞を認めた (図 7 A, B)。一方、HCEC 群では、コラーゲンと実質深層の接着面に軽度の線維芽細胞が観察されたが、実質浮腫や炎症細胞の浸潤は認めなかった (図 7 C, D)。角膜内側には一層の HCEC が接着しているのが観察され、内皮細胞が重層化している部分はなかった。

角膜全体を蛍光顕微鏡下で観察すると、移植したコラーゲンの部分全体に fluorescent marker chloromethyl-benzamidodialkylcarbocyanine (DiI) 蛍光色素を取り込んだ陽性細胞が観察された。いずれの細胞も蛍光色素が確認され、内皮面における HCEC の脱落はなかった。また移植部分より外側のドナー角膜の部位には HCEC の遊走は認めなかった (図 7 E, F)。図 7 G に示すように、コラーゲン上の HCEC は六角形細胞で規則正しく配列しており、生体内の内皮細胞の形態に酷似してい

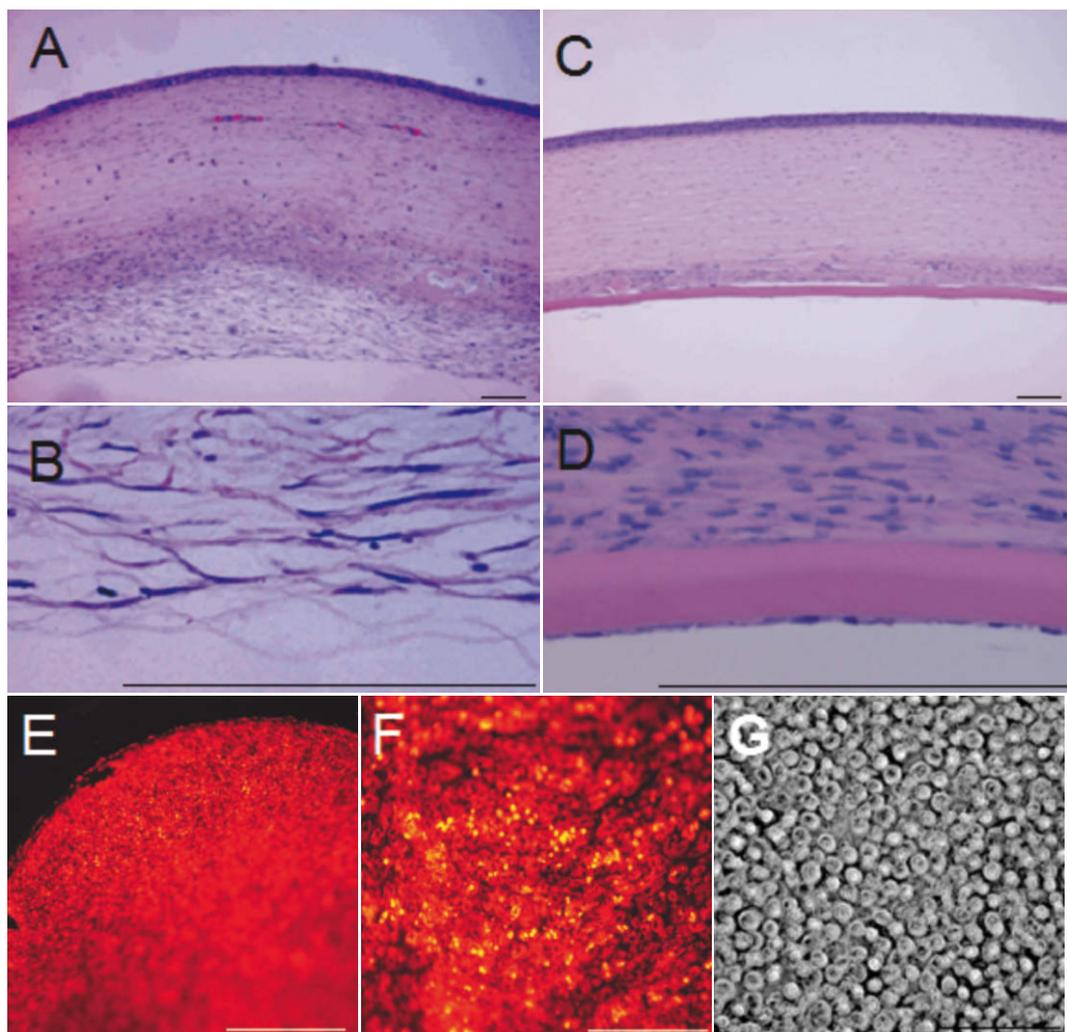


図 7 コラーゲン上培養 HCEC シートの移植後の組織学的検討。

Descemet 膜を除去した陰性対照群では実質の顕著な浮腫を認め、Descemet 膜および内皮細胞は認めない (A, B)。コラーゲン上培養 HCEC シートを移植した群では、コラーゲンと実質深層の接着面に軽度の線維芽細胞が観察されるが、一層の HCEC が内皮面に接着しており (C)、実質浮腫は認めない (D)。内皮面をフラットマウントで観察すると、内皮シートの移植部分のみに蛍光標識された HCEC が確認され、シートの輪郭が明瞭に観察されている (E)。F: 移植された内皮シート中心部。細胞は密接に接着しており、脱落はみられない。G: コラーゲン上の HCEC の Black and White 画像。HCEC は正常内皮同様に規則正しく配列している。Bar = 100 μ m。

た。他の 3 眼においても同様の内皮の形態を示し、内皮細胞密度は $2,325 \sim 2,900$ cells/mm² (平均値 \pm 標準偏差, $2,531 \pm 290$ cells/mm²) であった。なお、術前内皮細胞密度は $3,225 \sim 4,025$ cells/mm² (平均値 \pm 標準偏差, $3,593 \pm 371$ cells/mm²) であった。陰性対照群では内皮細胞は観察されなかった。

4. 培養内皮シート移植における考按

これまでに動物モデルを用いた培養角膜内皮移植術がいくつかの研究グループから報告されているが、臨床的に移植するまでには至っていない。その原因は細胞のキャリアの開発が進んでいないことと、術式が困難であることにある。今までの多くの研究が細胞のキャリアとしてドナー角膜実質を用いているが、この方法では HCEC 以外にアイバンクから提供される角膜が必要と

なるため、本邦における提供角膜不足を解消する手段とはなり得ない。本術式は前房内に内皮シートの挿入により内皮層のみを移植するという、提供角膜を必要としない新しい術式であり、移植後も角膜透明性に働くことが証明された。

近年、深層角膜実質と Descemet 膜と内皮細胞を含んだ角膜深層部分を移植する方法が内皮不全の角膜症に対して施行されている⁶²⁾⁶³⁾。さらに、Melles⁶⁴⁾とその共同研究者は *ex vivo* でドナー角膜から Descemet 膜のみを剝離して移植する方法を紹介している。今回、我々が提案した方法の最大の利点は前房内に移植するのみで、移植部分の縫合を行わないという、非常にシンプルな術式にある。この術式は、PKP に生じ得るような遷延性角膜上皮欠損、角膜感染、前房水漏出、角膜不正乱視、血

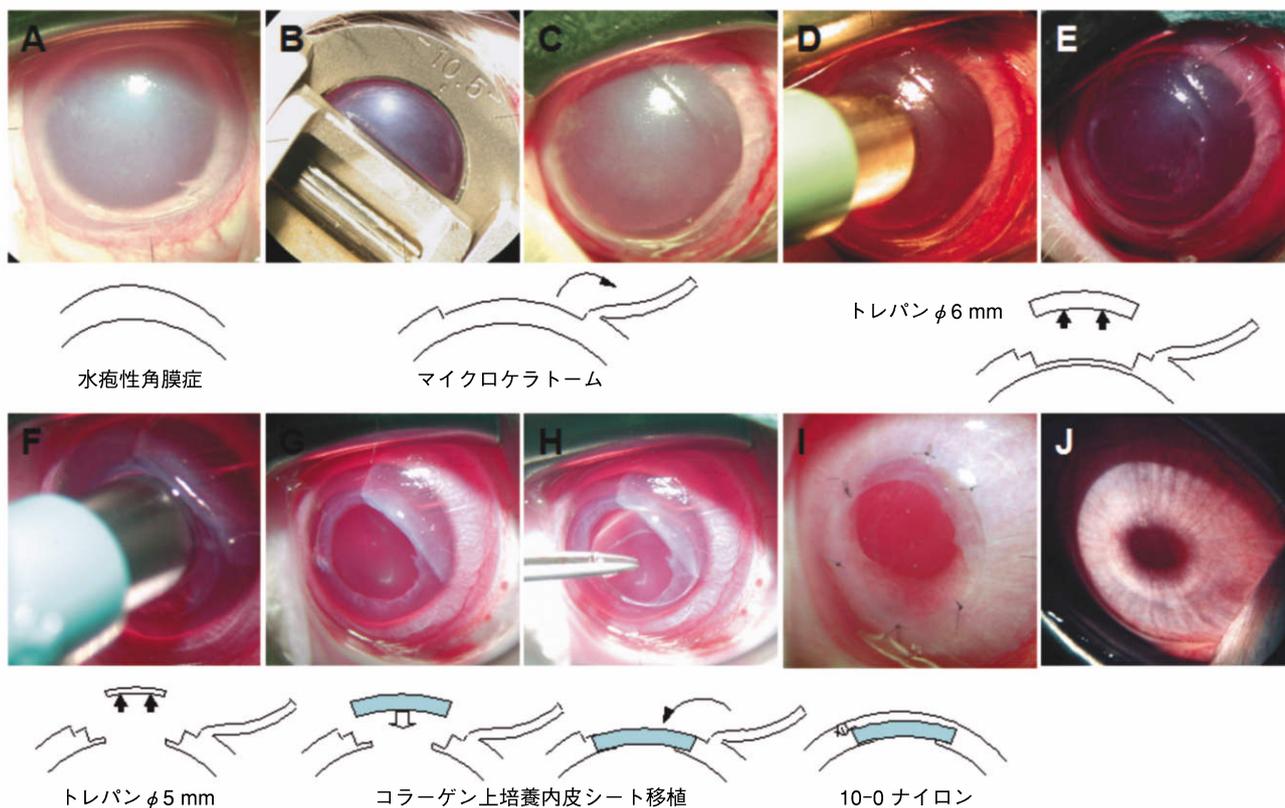


図 8 コラーゲンと培養 HCEC により再構築した深層角膜移植の術式。

実質混濁を伴った内皮細胞障害モデルに対して再構築深層角膜移植を試みた。約 $200\ \mu\text{m}$ のコラーゲン上で HCEC を培養した。A: クライオによる内皮障害後 2 週の術前前眼部。角膜実質の浮腫を認める。B: マイクロケラトームによる角膜上皮フラップ作製。C: スパーテルでフラップをリフトし、実質部分を露出。D: 直径 6.0 mm のトレパンにより残存実質の 3 分の 2 の深さまで切開。E: 深層実質片を層状に剝離し、Descemet 膜を露出。F, G: 直径 5.0 mm のトレパンにより前房内に到達した後、粘弾性物質を入れ、角膜尖刀を用いて、Descemet 膜を除去。H: 再構築深層角膜を縫合せずに、はめ込む。I: 上皮フラップを縫合。縫合糸は術後早期に除去する。J: 術後 1 か月の前眼部所見。術前の角膜浮腫は改善し、拒絶反応およびフラップ解離などの合併症はみられない。

管新生などの術後合併症の危険性が少なく、さらに、移植部分を最小限にすることにより拒絶反応を抑制できる点でも有利である。一般的に角膜分野における異種移植では術後早期における超急性拒絶反応は生じにくいとされ⁶⁵⁾、マウスにおける異種移植の研究では PKP を施行した眼球において超急性拒絶反応はみられないが、平均 2~16 日で例外なく拒絶されることが報告^{66)~69)}されている。我々の研究において異種移植にもかかわらず拒絶反応が確認されなかった理由として、内皮のみの移植に関しては比較的拒絶反応が少なく、前房内に接した内皮面は免疫特権を獲得しやすい場であることが考えられる^{70)~75)}。HCEC 群では術後 1 週で角膜厚が正常化し、対照群よりも角膜厚が小さかった。この結果は移植した内皮シートのポンプ機能により実質部分における水分のハイドレーションが行われたことを示唆している。組織学的にはコラーゲンシートと内皮面の接着部分に線維芽細胞の増殖を認めた。この線維芽細胞がコラーゲンシートと HCEC のどちらに対して反応性に増殖したのか調べるために、我々は HCEC の接着していないコラーゲ

ンシートのみを Descemet 膜を除去した白色家兎に移植する追加実験を行った。術後 1 か月の組織学検討ではコラーゲンシートのみを移植したのもでも、内皮面に線維芽細胞と炎症細胞の接着が観察された。この所見は線維芽細胞が HCEC に対する免疫反応ではなく、コラーゲンシートに対する免疫反応もしくは術後炎症により出現した可能性が高いと考えられる。線維芽細胞はコラーゲンシートと内皮面を接着させる一方で、内皮面の混濁の原因になる可能性もあり得るが、今回の移植した眼球すべてにおいて、角膜の透明性には影響がなかった。

再構築角膜内皮シートのみを移植する方法は、角膜の部分移植という概念に基づいており、前述したように角膜表面の形状保持、拒絶反応抑制などの点で優れた術式であるが、いくつか検討の余地がある。まず、現時点ではこの術式は術者の技量に左右される。本術式では、30 ゲージ針を使用して Descemet 膜を剝離しているが、コラーゲンシートの大きさと同等の大きさに Descemet 膜を円形に切除するには技術を要する。この点に関しては、今後再現性を持って Descemet 膜を切り取ることが

できる内皮層切除用のメスもしくはトレパンを開発する必要がある。次に、コラーゲンシートが術後に剥離する可能性がある。接着が弱いと、前房内に脱落して、虹彩炎や高眼圧症を生じ得る。我々の検討では術後1か月で内皮シートが剥がれた症例はなかったが、長期的に軽度の眼球圧迫などにより脱落する可能性もある。臨床的に使用するためには、術後の内皮シートの剥離を防ぐためにコラーゲンシートと内皮面の間には fibronectin のみならず、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、lamininなどの基底膜成分や生体糊を組み合わせることにより、接着力をさらに高めた接着剤を開発する必要がある。また、術後にコラーゲンシートが剥離した症例に対しては、SF6やC3F8などのガスタンポナーデの使用が解決策になり得ると考えられるが、ガスの前房内置換により移植後の内皮細胞が障害を受ける可能性があり、ガス置換の使用に関しては慎重に検討するべきである。本術式を臨床応用するためには、今後長期的な観察および、よりDescemet膜に近い薄さのコラーゲンシートの開発も必要となる。

V 角膜内皮組織幹細胞移植

1. 幹細胞移植の概略

アロの角膜内皮細胞を移植することは拒絶反応を惹き起こす可能性がある。したがって、自己の細胞を供給源にすることが最も望ましいが、角膜内皮障害のある患者から採取した HCEC は生体外での増殖は期待できないし、たとえ健常眼から HCEC を採取するとしても、深層の内皮細胞を単独で摘出することは技術的に困難である。そこで、角膜内皮以外の組織から採取した自己の未分化幹細胞を利用した研究も検討されている。マウス胎生幹細胞のマウス角膜内皮面への移植、ラット骨髄中の間葉系幹細胞のラット前房内投与による角膜内皮面への移植などが検討されている³⁵⁾。胎生幹細胞や骨髄系幹細胞が角膜内皮細胞へ分化誘導され得るのか、内皮細胞特有のポンプ機能を獲得し得るのかなど未解明な点が多く、現時点では現実性の低い方法である。角膜内皮以外の組織由来幹細胞を用いるためには、角膜内皮細胞のマーカーや分化誘導因子の特定および内皮細胞固有の機能を解析する必要がある。

角膜内皮の組織幹細胞を利用した移植法も最近行われている。幹細胞移植は移植後に移植された場所の組織に適合するように細胞自身が分化することと、移植後の細胞供給源になることを主に期待した方法である。幹細胞移植の研究は骨髄幹細胞を用いた中枢神経再生の分野で始まり、その後、肝臓、中枢神経、網膜などの分野で積極的に研究が行われた。また、中枢神経系⁷⁶⁾、骨髄⁷⁷⁾、皮膚⁷⁸⁾、内耳⁷⁹⁾、網膜⁸⁰⁾、角膜上皮⁸¹⁾、角膜実質⁸²⁾⁸³⁾、角膜内皮^{84)~87)}を含めた多くの組織において、組織幹細胞は培養系においてスフェアと呼ばれる細胞塊を形成することが分かっている。スフェア法は組織幹細胞や

多能性幹細胞を分離する方法として広く用いられている培養法である。我々は角膜内皮細胞から角膜内皮由来の組織幹細胞を分離培養し、現在広く行われている PKP に取って代わり得る幹細胞移植としての戦略的治療に着手している。しかし角膜一枚の内皮から得られる1次スフェアは多くても500個程度であり、大量の組織幹細胞由来スフェアを作製するためには結局のところ、ドナー不足が問題となる。そこで、我々は組織幹細胞を大量に獲得するために、培養細胞からスフェアを形成させる方法を試みた。その結果、RT-polymerase chain reaction や免疫染色では角膜内皮から得られる1次スフェアと培養 HCEC から得られるスフェアに差がないことが確認された^{84)~87)}。本稿では、培養 HCEC から選択的に採取した組織幹細胞を利用した角膜内皮移植について紹介する。

2. 培養 HCEC からの選択的組織幹細胞の採取

培養 HCEC からの組織幹細胞の採取にはスフェア法を用いている。継代5代目の HCEC をメチルセルロース 1.5% (Wako) を含んだ基礎培地で、1 cells/ μ l の濃度でコーティングをしていない 60 mm 培養皿を用いて 37°C、5% CO₂ の湿潤状態で培養をすると、約7日で直径 50 μ m 以上のスフェアと呼ばれる細胞塊が形成される (図9A)。これらの細胞は bromodeoxyuridine の取り込みが盛んで、また神経幹細胞マーカーである nestin および間葉系マーカー vimentin を発現している⁸⁴⁾⁸⁶⁾。また、分化誘導させた細胞は α -smooth muscle actin, nestin, microtubule-associated protein 2, neurone specific enolase などのマーカーを発現する⁸⁴⁾⁸⁶⁾。スフェア由来の HCEC により再構築した角膜内皮シートは正常角膜内皮細胞に酷似した六角形細胞の形態を示し (図9B)、また Na⁺, K⁺-ATPase に依存性のポンプ機能を獲得していることも証明されている。

3. 水疱性角膜症モデルに対する内皮スフェアの前房内投与

家兎水疱性角膜症モデルを作製するために、クライオにより角膜内皮細胞を脱落させた。培養 HCEC から得られたスフェア (HCEC スフェア) を DiI 蛍光色素により標識し、前房内に 25 ゲージの針を用いて注入した。スフェアの対照として 1.0 \times 10⁷個の培養 HCEC を 27 ゲージの針を用いて前房内に注入した。ウサギを次のように4群に分類した。陰性対照群 (角膜内皮障害後、無治療群)、HCEC 群 (角膜内皮障害後、HCEC を前房注入し、24時間うつぶせにした群)、Sphere-face-up 群 (角膜内皮障害後、HCEC スフェアを前房内に注入し、体位を自由にさせた群)、Sphere-face-down 群 (角膜内皮障害後、HCEC スフェアを注入し、24時間うつぶせにした群)。各群とも6例6眼である。

4. 内皮スフェア移植後の術後評価

陰性対照群、HCEC 群、および Sphere-face-up 群で

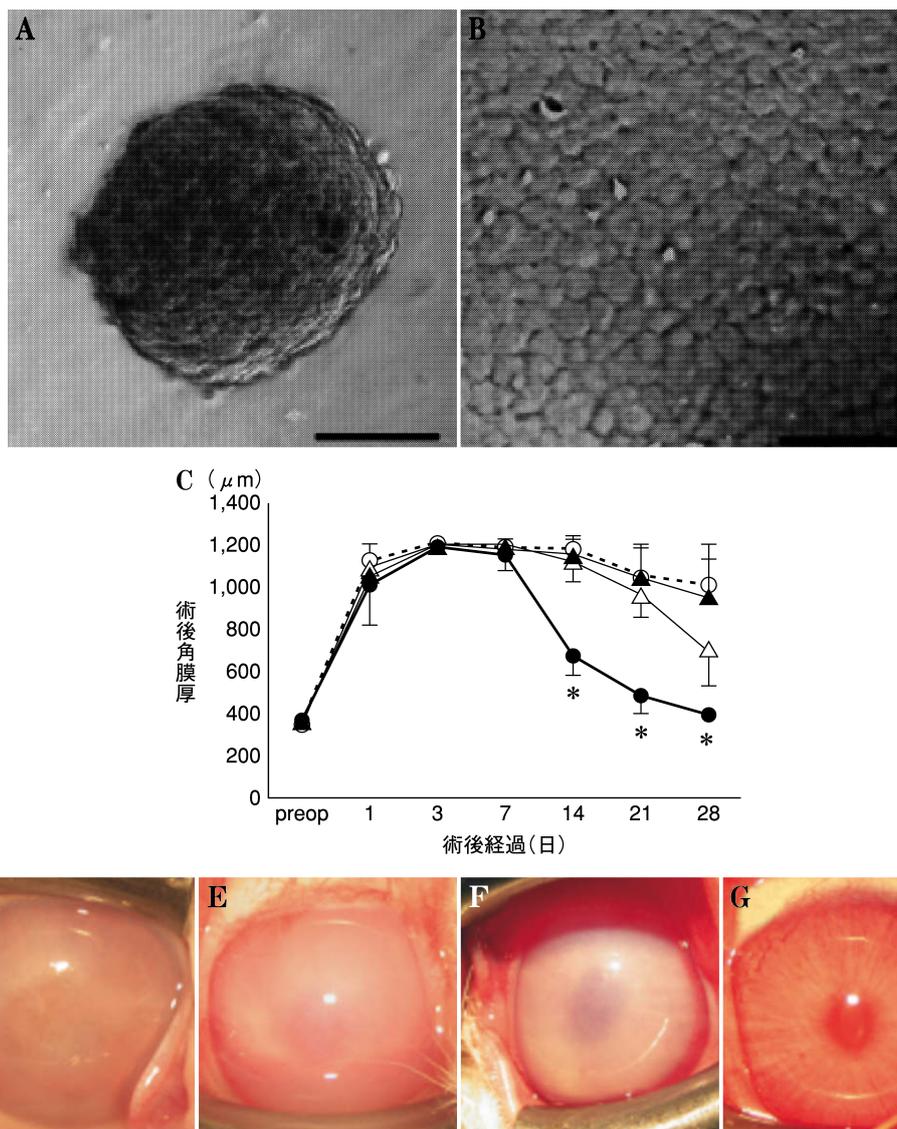


図 9 HCEC 由来組織幹細胞の移植.

継代 5 代目の培養 HCEC よりニューロスフェア法により角膜内皮組織幹細胞を選択的に採取し(A), 内皮障害のある家兎に移植した. 培養細胞より得られたスフェアを培養皿上で再培養すると, 角膜内皮特有の正六角形の形態を示している(B). 培養 HCEC 由来の組織幹細胞または培養 HCEC を次の 4 群に分けて, 角膜内皮細胞を障害した家兎に移植した. 陰性対照群(角膜内皮障害後, 無治療群, n=6), HCEC 群(角膜内皮障害後, 培養 HCEC を前房内に注入し, 24 時間うつぶせにした群, n=6), Sphere-face-up 群(角膜内皮障害後, HCEC スフェアを前房内に注入し, 体位を自由にさせた群, n=6), Sphere-face-down 群(角膜内皮障害後, HCEC スフェアを前房内に注入し, 24 時間うつぶせにした群, n=6). C: Sphere-face-down 群の角膜厚は 3, 7, 14, 21, 28 日目において他の対照と比較して有意に低下している(*: p < 0.001). ○: 陰性対照群, ▲: HCEC 群, △: Sphere-face up 群, ●: Sphere-face down 群. 術後前眼部を観察すると陰性対照群(D), HCEC 群(E), Sphere-face-up 群(F)では角膜混濁が強いが, Sphere-face-down 群では角膜は透明で実質浮腫は認めない(G). Bar=100 μm(A, B)

は術後全観察期間を通して, 角膜厚は約 1,000 μm と低下しないが, Sphere-face-down 群では急速に角膜厚は低下して, 術後 28 日で正常角膜厚に改善した(図 9 C). 術後前眼部所見は対照の 3 群では全例, 角膜浮腫を認めた(図 9 D~F). 一方, Sphere-face-down 群では角膜は透明で虹彩がはっきりと確認できた(図 9 G). 術後観察期間における眼圧上昇はいずれの群においても認めなかった.

陰性対照群(図 10 A~D), HCEC 群(図 10 E~H), Sphere-face-up 群(図 10 I~L)ではフラットマウントおよび切片における顕微鏡下の観察では角膜内皮面の中央部には細胞を認めなかった. 一方, Sphere-face-down 群では内皮細胞様の正六角形の細胞が内皮面に存在し, 単層の状態で接着していた(図 10 M~P). Sphere-face-down 群における術後 28 日の平均角膜内皮細胞密度は 2,625 から 2,875 cells/mm² の範囲であった(平均値 ± 標

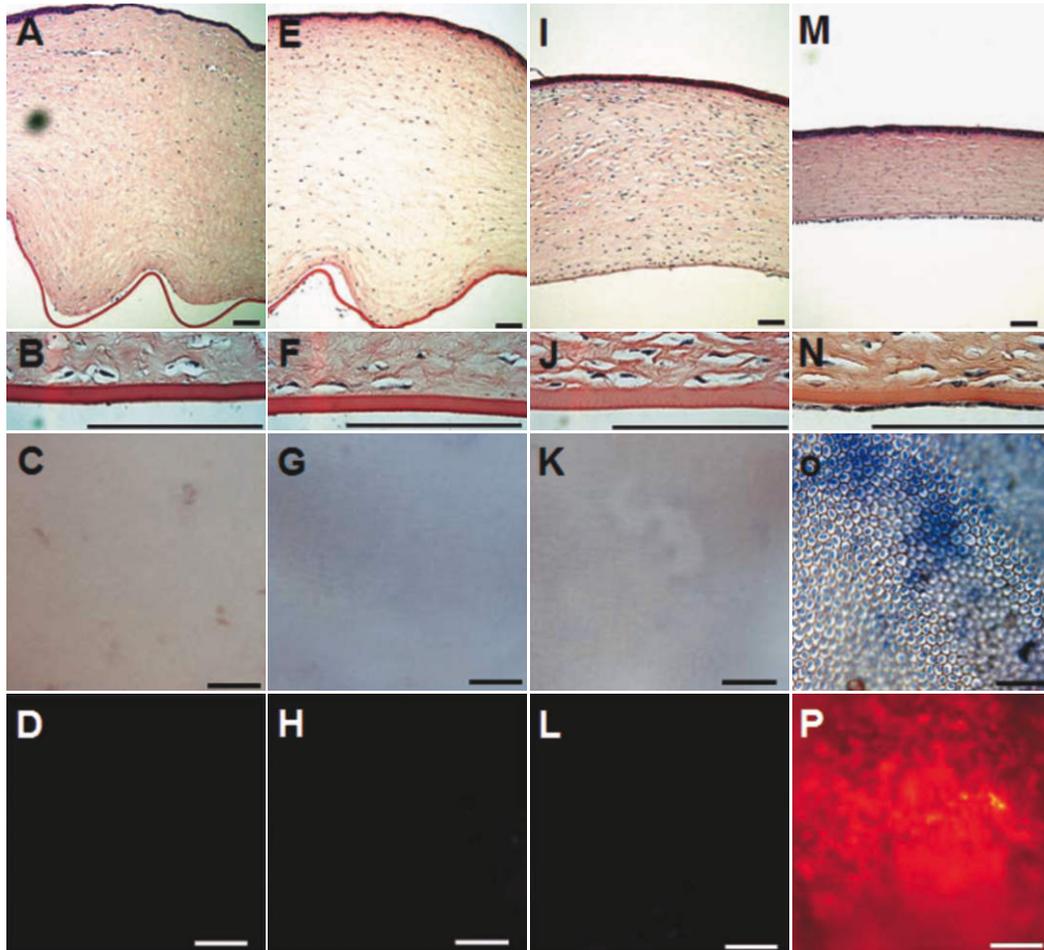


図 10 HCEC 由来組織幹細胞移植後の組織学的検討.

培養 HCEC 由来の組織幹細胞または培養 HCEC を前房内投与法により移植した 1 か月後の移植眼の組織学的検討。フラットマウント像およびクロスセクション像において陰性対照群(A~D), HCEC 群(E~H), Sphere-face-up 群(I~L)では角膜内皮細胞が存在せず, 実質の浮腫が顕著である。一方 Sphere-face-down 群(M~P)では角膜内皮細胞が内皮面を被覆しており, 実質の浮腫が抑制されている。蛍光顕微鏡により, 蛍光標識した細胞が観察されることから, 移植した細胞であることが分かる。Bar=100 μ m

準偏差, $2,781 \pm 97$ cells/mm²).

5. 内皮組織幹細胞移植に関する考按

培養 HCEC 由来のスフェアをウサギ角膜内皮面に移植することにより, 角膜浮腫の改善がみられた。この結果は移植されたスフェアから遊走した細胞が生体内でも角膜内皮細胞の機能であるポンプ機能を働かせたことを示唆している。この研究の最大の功績は角膜透明性維持に働く組織幹細胞を培養細胞から無制限に供給できる可能性を示したことにある。この培養法および移植法に関して, 大きな利点が 2 つ挙げられる。まず, 従来のドナー角膜を使用した PKP もしくは数に制限のある初代組織幹細胞をドナー角膜から採取する方法では解決されなかった慢性的な角膜不足を解決する手段になり得ることである。さらに, 角膜内皮の前駆細胞を供給できるのみならず, 胚性幹細胞(ES 細胞)などと違い, 角膜内皮への分化が位置づけられている細胞であることも重要な意味を持つ。これまで検討してきた培養 HCEC を用

いた再構築角膜を前提とした内皮移植よりも, 組織幹細胞移植術後の角膜内皮細胞密度は高かった。したがって, 組織幹細胞の移植は移植後の細胞供給源として働く可能性があると同時に, ある程度の密度に増殖した場合は cell-cell contact inhibition⁸⁸⁾⁸⁹⁾の作用により増殖を止めるという, 都合の良い細胞供給源として期待できる。現時点で臨床的に使用する上では, 長期的な術後成績および術後合併症, 拒絶反応などの評価が必要ではあるが, 角膜内皮移植に対する幹細胞移植の概念について初めて提唱できたことは, 今後の幹細胞移植の研究ならびに将来的な臨床応用に対する一つのきっかけになるのではないと思われる。

VI おわりに

本研究では従来の角膜移植で生じ得る慢性的な提供角膜不足を打開するために, 動物モデルを用いて角膜内皮再生の戦略を多種類の方法で検討した。角膜内皮細胞障

害による水疱性角膜症は角膜移植の最も良い適応症例であることから、角膜では内皮の再生が最も急を要すると考えられる。本研究により培養 HCEC のポンプ機能が移植後の角膜透明性に働くことが証明された。社会的、倫理的な障壁が大きい中で、本研究で検討した培養細胞および組織幹細胞を用いた再生医療をいかに臨床に結び付けていくかが今後の大きな課題となるだろう。本研究で用いた、クライオモデルや Descemet 膜除去モデルなどの内皮障害モデルでは、術後 1 か月の間、ホスト角膜周辺部からの内皮細胞の遊走や増殖はみられなかったが、げっ歯類の角膜内皮は生体内で増殖する可能性があるため、ヒトと同様に内皮細胞の増殖が生体内で抑制されているサルに代表される霊長類を用いた研究が今後必要となるだろう。

ここで、ドナー角膜を必要としない将来的な再生医療を目指して、角膜再生医療を具現化するための根本的な概念および採取する細胞の起源に関する治療戦略について考察したい。一般的に幹細胞を用いた再生医療を前提に考えた場合、対象となる幹細胞は大きく分けて ES 細胞、生体骨髄幹細胞、臍帯血幹細胞、羊膜幹細胞が提唱されている。これは未分化な細胞の方が様々な組織での分化誘導が可能であるという概念に基づいている。そのため未分化な細胞ほど、再生医療への利用期待度が高いように思われるが、使用可能な幹細胞は分化誘導条件が既に明らかになっているものであり、ES 細胞からの角膜を含めた臓器特有細胞への分化条件は現時点ではほとんど解明されていない。さらに、ES 細胞の使用に関しては生命倫理に触れる恒久的な問題を残しており、骨髄幹細胞や臍帯血幹細胞は血球細胞、神経細胞⁹⁰⁾、あるいは筋肉細胞、脂肪細胞、肝細胞に分化することは可能であるが、どの程度、各臓器特有の細胞に分化誘導され得るのかは不明である。さらに、羊膜幹細胞に関しても、神経系への誘導は確認されているが⁹¹⁾、その分化能に関しては限界がある。したがって、これらの幹細胞を角膜再生医療の中心的なソースとしては未だ検討の余地がある。我々の幹細胞に対する見解は、ES 細胞などの未分化な幹細胞を使用するよりも、分化の系譜ではある程度下流に属していても、角膜を構成する細胞として機能し得る角膜由来の培養細胞や組織幹細胞の方が、より生体内での補填としては適しているという考えである。近年、角膜中心部よりも周辺部の内皮細胞の方が増殖能が高いことが証明され²⁹⁾⁹²⁾、周辺部に組織幹細胞が多く存在することが分かってきた⁸⁷⁾。角膜移植には通常中心部分のみを使用して、周辺部を廃棄しているのが現状であるが、使用しなかった周辺部分の増殖能の高い細胞を角膜内皮再生医療に使用することも、数少ない貴重なドナーを利用するという概念に基づいた立派な医療になり得るのではないかとと思われる。

患者由来の細胞を利用した組織再生は患者自身の細胞

を移植することになり、拒絶反応の抑制や未知の感染症の防御という点で有利である。成人由来幹細胞が生体外において増殖可能で、任意の刺激により各種細胞に分化し得るものであれば、患者自身から幹細胞を採取する方法が最も良いと考えられる。確かに採取する細胞が、患者が必要とする臓器特有の細胞に分化し得ることが第一条件であるが、容易に利用でき、採取による患者への負担が少ないことも重要である。この概念からすると、骨髄針を用いて骨髄幹細胞を採取するよりも、体表面に近い角膜、皮膚、口腔などから幹細胞を採取し角膜を構成する細胞に分化誘導させて角膜を再構築する方が患者の負担は少ない。さらに、移植免疫の問題が解決されるならば、同種同系の培養細胞を用いる方法や、我々が培養 HCEC からスフェアを作製する方法で証明したように、大量に培養した細胞から選択的に採取した組織幹細胞を使用する方法は最も容易かつ、患者への負担が少ない方法である。我々の動物モデルにおける培養細胞移植の方法および移植効果は、今後の患者由来の細胞もしくは組織幹細胞を用いた角膜上皮、実質、内皮の臨床における再生治療の一里塚になると考えられる。近い将来、角膜のみをソースとするのではなく、口腔粘膜上皮や皮膚真皮から比較的容易に得られる組織幹細胞を角膜の各細胞に分化させて移植に応用できることを願っている。これらの応用により、多くの臓器移植を回避でき、その移植術の困難さと費用の多さ、さらに臓器のドナーの問題点を解決できることを期待している。

稿を終えるにあたり、受賞講演の機会を与えてくださいました学術奨励賞選考委員各位、第 110 回日本眼科学会総会長大西克尚教授に心より感謝申し上げます。また、研究面でのご指導をいただきました東京大学新家 眞教授、天野史郎助教授、山上 聡助教授、白井智彦先生、研究にご協力いただきました宮田眼科病院宮田和典先生、New Vision 研究所石井康雄先生、貴重な助言をいただきました東京大学横尾誠一先生、内田彩子先生、柳 靖雄先生、および東京大学大学院医学系研究科眼科学教室の大学院生とスタッフに感謝いたします。

文 献

- 1) Mannis MJ, Krachmer JH : Keratoplasty : a historical perspective. *Surv Ophthalmol* 25 : 333—338, 1981.
- 2) Brady SE, Rapuano CJ, Arentsen JJ, Cohen EJ, Laibson PR : Clinical indications for and procedures associated with penetrating keratoplasty, 1983-1988. *Am J Ophthalmol* 108 : 118—122, 1989.
- 3) Trinkaus-Pandall V : Cornea. In : Lanza RP, et al(Eds) : *Principles of Tissue Engineering*. 2nd ed. Academic press, San Diego, CA, 471—491, 2000.

- 4) **Gospodarowicz D, Greenburg G, Alvarado J** : Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to species with nonregenerative endothelium : The cat as an experimental model. *Arch Ophthalmol* 97 : 2163—2169, 1979.
- 5) **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.
- 6) **Jumblatt MM, Maurice DM, McCulley JP** : Transplantation of tissue-cultured corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17 : 1135—1141, 1978.
- 7) **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.
- 8) **Joo CK, Green WR, Pepose JS, Fleming TP** : Repopulation of denuded murine Descemet's membrane with life-extended murine corneal endothelial cells as a model for corneal cell transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238 : 174—180, 2000.
- 9) **McCulley JP, Maurice DM, Schwartz BD** : Corneal endothelial transplantation. *Ophthalmology* 87 : 194—201, 1980.
- 10) **Jumblatt MM, Maurice DM, Schwartz BD** : A gelatin membrane substrate for the transplantation of tissue cultured cells. *Transplantation* 29 : 498—499, 1980.
- 11) **Inslar MS, Lopez JG** : Extended incubation times improve corneal endothelial cell transplantation success. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 : 1828—1836, 1991.
- 12) **Inslar MS, Lopez JG** : Transplantation of cultured human neonatal corneal endothelium. *Curr Eye Res* 5 : 967—972, 1986.
- 13) **Inslar MS, Lopez JG** : Heterologous transplantation versus enhancement of human corneal endothelium. *Cornea* 10 : 136—148, 1991.
- 14) **Aboalchamat B, Engelmann K, Bohnke M, Eggli P, Bednarz J** : Morphological and functional analysis of immortalized human corneal endothelial cells after transplantation. *Exp Eye Res* 69 : 547—553, 1999.
- 15) **Engelmann K, Friedl P** : Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 25 : 1065—1072, 1989.
- 16) **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.
- 17) **Bohnke M, Eggli 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.
- 18) **Chen KH, Azar D, Joyce NC** : Transplantation of adult human corneal endothelium *ex vivo* : a morphologic study. *Cornea* 20 : 731—737, 2001.
- 19) **Irvin AR, Irvine AR Jr.** : Variations in normal human corneal endothelium ; a preliminary report of pathologic human corneal endothelium. *Am J Ophthalmol* 36 : 1279—1285, 1953.
- 20) **Kaufman HE, Capella JA, Robbins JE** : The human corneal endothelium. *Am J Ophthalmol* 61 : 835—841, 1966.
- 21) **Capella JA** : The pathology of corneal endothelium. *Ann Ophthalmol* 3 : 397—400, 1971.
- 22) **Joyce NC, Meklir B, Joyce SJ, Zieske JD** : Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 645—655, 1996.
- 23) **Joyce NC, Navon SE, Roy S, Zieske JD** : Expression of cell cycle-associated proteins in human and rabbit corneal endothelium *in situ*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 1566—1575, 1996.
- 24) **Senoo T, Obara Y, Joyce NC** : EDTA : A promoter of proliferation in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2930—2935, 2000.
- 25) **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.
- 26) **Zhu C, Joyce NC** : Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 1743—1751, 2004.
- 27) **Joyce NC** : Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp Eye Res* 81 : 629—638, 2005.
- 28) **Kikuchi M, Harris DL, Obara Y, Senoo T, Joyce NC** : p27^{KIP1} antisense-induced proliferative activity of rat corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 1763—1770, 2004.
- 29) **Konomi K, Zhu C, Harris D, Joyce NC** : Comparison of the proliferative capacity of human corneal endothelial cells from the central and peripheral areas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 4086—4091, 2005.
- 30) **Enomoto K, Mimura T, Harris DL, Joyce NC** : Age-related differences in cyclin-dependent kinase inhibitor expression and retinoblastoma hyperphosphorylation in human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 (in press).
- 31) **Gospodarowicz D, Greenburg G, Alvarado J** : Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to species with nonregenerative endothelium. The cat as an experimental model. *Arch Ophthalmol* 97 : 2163—2169, 1979.
- 32) **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.
- 33) **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.
 - 34) **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.
 - 35) **天野史郎** : 第 106 回日本眼科学会総会, 宿題報告 II, 眼の再生医学, 角膜内皮移植, 日眼会誌 106 : 806—836, 2002.
 - 36) **Usui T, Seki G, Amano S, Oshika T, Miyata K, Kunimi M, et al** : Functional and molecular evidence for Na(+)-HCO₃- cotransporter in human corneal endothelial cells. *Pflugers Arch* 438 : 458—462, 1999.
 - 37) **Amano S** : Transplantation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea* 22(7 Suppl) : S 66—74, 2003.
 - 38) **Amano S, Mimura T, Yamagami S, Osakabe Y, Miyata K** : Properties of corneas reconstructed with cultured human corneal endothelial cells and human corneal stroma. *Jpn J Ophthalmol* 49 : 448—452, 2005.
 - 39) **三村達哉, 天野史郎** : 培養角膜内皮細胞の移植実験. 眼科診療 Q & A 第 33 号. 六法出版, 東京. 124—129, 2004.
 - 40) **Mimura T, Amano S, Usui T, Araie M, Ono K, Hashizume A, et al** : Transplantation of corneas reconstructed with cultured adult human corneal endothelial cells in nude rats. *Exp Eye Res* 79 : 231—237, 2004.
 - 41) **Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Cannon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al** : Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 800—806, 2004.
 - 42) **Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Tanaka K, Hattori S, et al** : Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 2992—2997, 2004.
 - 43) **Ide T, Nishida K, Yamato M, Sumide T, Utsumi M, Nozaki T, et al** : Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials* 27 : 607—614, 2006.
 - 44) **Sumide T, Nishida K, Yamato M, Ide T, Haya-shida Y, Watanabe K, et al** : Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J* 20 : 392—394, 2006.
 - 45) **Hsiue GH, Lai JY, Chen KH, Hsu WM** : A novel strategy for corneal endothelial reconstruction with a bioengineered cell sheet. *Transplantation* 81 : 473—476, 2006.
 - 46) **Mimura T, Shimomura N, Usui T, Noda Y, Kaji Y, Yamagami S, et al** : Magnetic attraction of iron-endocytosed corneal endothelial cells to Descemet's membrane. *Exp Eye Res* 76 : 745—751, 2003.
 - 47) **Mimura T, Yamagami S, Usui T, Ishii Y, Ono K, Yokoo S, et al** : Long-term outcome of iron-endocytosing cultured corneal endothelial cell transplantation with magnetic attraction. *Exp Eye Res* 76 : 745—751, 2003.
 - 48) **Shimmura S, Miyashita H, Konomi K, Shinozaki N, Taguchi T, Kobayashi H, et al** : Transplantation of corneal endothelium with Descemet's membrane using a hydroxyethyl methacrylate polymer as a carrier. *Br J Ophthalmol* 89 : 134—137, 2005.
 - 49) **Busin M, Arffa RC, Sebastiani A** : Endokeratoplasty as an alternative to penetrating keratoplasty for the surgical treatment of diseased endothelium : initial results. *Ophthalmology* 107 : 2077—2082, 2000.
 - 50) **Azar DT, Jain S, Sambursky R, Strauss L** : Microkeratome-assisted posterior keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 27 : 353—356, 2001.
 - 51) **Melles GR** : Posterior lamellar keratoplasty. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 77 : 175—176, 2002.
 - 52) **Melles GR, Lander F, Nieuwendaal C** : Sutureless, posterior lamellar keratoplasty : a case report of a modified technique. *Cornea* 21 : 325—327, 2002.
 - 53) **McCulley JP, Maurice DM, Schwartz BD** : Corneal endothelial transplantation. *Ophthalmology* 87 : 194—201, 1980.
 - 54) **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.
 - 55) **Joo CK, Green WR, Pepose JS, Fleming TP** : Repopulation of denuded murine Descemet's membrane with life-extended murine corneal endothelial cells as a model for corneal cell transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238 : 174—180, 2000.
 - 56) **Stenzel KH, Dunn MW, Rubin AL, Miyata T** : Collagen gels : design for a vitreous replacement. *Science* 164 : 1282—1283, 1969.
 - 57) **Hattori S, Adachi E, Ebihara T, Shirai T, Someki I, Irie 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(Tokyo)* 125 : 676—684, 1999.
 - 58) **Wigham C, Hodson S** : Bicarbonate and the trans-endothelial short circuit current of human

- cornea. *Curr Eye Res* : 285—290, 1981.
- 59) **Hodson S, Wigham C, Williams L, Mayes KR, Graham MV** : Observation on the human cornea *in vitro*. *Exp Eye Res* 32 : 353—360, 1981.
 - 60) **Hodson S, Wigham C** : permeability of rabbit and human corneal endothelium. *J Physiol* 342 : 409—419, 1983.
 - 61) **Wigham CG, Turner HC, Swan J, Hodson SA** : Modulation of corneal endothelial hydration control mechanisms by Rolipram. *Pflugers Arch* 440 : 866—870, 2000.
 - 62) **Terry MA, Ousley PJ** : Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients : early clinical results. *Cornea* 20 : 239—243, 2001.
 - 63) **Terry MA, Ousley PJ** : Replacing the endothelium without corneal surface incisions or sutures : The first United States clinical series using the deep lamellar endothelial keratoplasty procedure. *Ophthalmology* 110 : 755—764, 2003.
 - 64) **Melles GR, Lander F, Rietveld FJ** : Transplantation of Descemet's membrane carrying viable endothelium through a small scleral incision. *Cornea* 21 : 415—418, 2002.
 - 65) **Amano S, Shimomura N, Kaji Y, Ishii K, Yamagami S, Araie M** : Antigenicity of porcine cornea as xenograft. *Curr Eye Res* 26 : 313—318, 2003.
 - 66) **Ross JR, Howell DN, Sanfilippo FP** : Characteristics of corneal xenograft rejection in a discordant species combination. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 2469—76, 1993.
 - 67) **Larkin DF, Takano T, Standfield SD, Williams KA** : Experimental orthotopic corneal xenotransplantation in the rat. Mechanisms of graft rejection. *Transplantation* 60 : 491—497, 1995.
 - 68) **Yamagami S, Isobe M, Yamagami H, Hori J, Tsuru T** : Mechanism of concordant corneal xenograft rejection in mice : synergistic effects of anti-leukocyte function-associated antigen-1 monoclonal antibody and FK 506. *Transplantation* 64 : 42—48, 1997.
 - 69) **Tanaka K, Yamada J, Streilein JW** : Xenoreactive CD 4+ T cells and acute rejection of orthotopic guinea pig corneas in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 1827—1832, 2000.
 - 70) **Streilein JW, Yamada J, Dana MR, Ksander BR** : Anterior chamber-associated immune deviation, ocular immune privilege, and orthotopic corneal allografts. *Transplant Proc* 31 : 1472—1475, 1999.
 - 71) **Niederhorn JY, Mellon J** : Anterior chamber-associated immune deviation promotes corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 2700—2707, 1996.
 - 72) **Niederhorn JY** : The immune privilege of corneal allografts. *Transplantation* 67 : 1503—1508, 1999.
 - 73) **Yamada J, Streilein JW** : Induction of anterior chamber-associated immune deviation by corneal allografts placed in the anterior chamber. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 2833—2843, 1997.
 - 74) **Streilein JW, Niederhorn JY** : Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. *J Exp Med* 153 : 1058—1067, 1981.
 - 75) **Streilein JW, Bradley D, Sano Y, Sonoda Y** : Immunosuppressive properties of tissues obtained from eyes with experimentally manipulated corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 413—424, 1996.
 - 76) **Gage FH** : Mammalian neural stem cells. *Science* 287 : 1433—1438, 2000.
 - 77) **Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al** : Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105 : 369—377, 2001.
 - 78) **Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al** : Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3 : 778—784, 2001.
 - 79) **Li H, Liu H, Heller S** : Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 9 : 1293—1299, 2003.
 - 80) **Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, et al** : Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287 : 2032—2036, 2000.
 - 81) **Zhao X, Das AV, Thoreson WB, James J, Wattnem TE, Rodriguez-Sierra J, et al** : Adult corneal limbal epithelium : a model for studying neural potential of non-neural stem cells/progenitors. *Dev Biol* 250 : 317—331, 2002.
 - 82) **Uchida S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Yokota C, Mimura T, et al** : Sphere formation and expression of neural proteins by human corneal stromal cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 1620—1625, 2005.
 - 83) **Yoshida S, Shimmura S, Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K** : Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 1653—1658, 2005.
 - 84) **Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, Uchida S, Mimura T, Usui T, et al** : Human Corneal Endothelium Precursors Isolated by Sphere-forming Assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 1626—1631, 2005.
 - 85) **Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Yanagi Y, Usui T, Ono K, et al** : Sphere therapy for corneal endothelium deficiency in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3128—3135, 2005.
 - 86) **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* 46 : 3637—3644, 2005.

- 87) **Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Araie M, Amano S** : Comparison of rabbit corneal endothelial cell precursors in the central and peripheral cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 3645—3648, 2005.
- 88) **Senoo T, Joyce NC** : Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 660—667, 2000.
- 89) **Joyce NC, Harris DL, Mello DM** : Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium : contact inhibition and TGF-beta 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2152—2159, 2002.
- 90) **Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB** : Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61 : 364—370, 2000.
- 91) **Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N** : Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease : a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol* 165 : 27—34, 2000.
- 92) **Mimura T, Joyce NC** : Replication competence and senescence in central and peripheral human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 : 1387—1396, 2006.
-