

平成 20 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

霊長類を用いた角膜内皮再生医療の開発

小泉 範子¹⁾²⁾¹⁾同志社大学生命医科学部医工学科, ²⁾京都府立医科大学医学部眼科学教室

要 約

霊長類の角膜内皮細胞は生体内では増殖能がきわめて低く、外傷やジストロフィなどによって障害されると不可逆性の内皮機能不全、すなわち水疱性角膜症となり重篤な視覚障害を生じる。我々は角膜内皮機能不全に対する再生医学的治療法の確立を目指し、霊長類を用いた培養角膜内皮シート移植術の開発に取り組んでいる。本研究では、I 型コラーゲンシートを基質として用いてカニクイザル角膜内皮細胞を培養し、密度約 2,800 個/mm² の培養角膜内皮細胞シートを作製した。次に、カニクイザルの片眼の角膜内皮細胞を周辺部まで掻爬し、移植群では直径 6 mm の培養角膜内皮シートを移植した。対照群ではコラーゲンシートのみを移植、あるいは培養角膜内皮細胞懸濁液の前房内注入を行った。対照群では不可逆性の水疱性角膜症となったのに対し、移植群では培養角膜内皮シートが Descemet 膜に接着して角膜は透明性

を回復し、角膜厚は術前のレベルに回復した。その後の経過中に培養角膜内皮シートは前房内に脱落したが、移植後 7 日の宿主角膜には DiI 標識をしたドナー由来の培養角膜内皮細胞が生着していることが確認された。移植群では 6 か月以上、最長 4 年にわたって角膜の透明性が維持され、非接触型角膜内皮スペキュラマイクロスコープで約 1,500~2,000 個/mm² の多角形細胞が認められた。カニクイザルはヒトと同様に生体内での角膜内皮増殖能が乏しいことが知られており、サル眼における培養角膜内皮シート移植の有用性が示唆されたことは、本治療法のヒトへの臨床応用への橋渡しとなる研究成果であると考えられる。(日眼会誌 113 : 1050—1059, 2009)

キーワード : 再生医療, 角膜内皮細胞, 水疱性角膜症, 霊長類, 培養角膜内皮シート移植

A Review

Cultivated Corneal Endothelial Cell Sheet Transplantation in a Primate Model

Noriko Koizumi¹⁾²⁾¹⁾Department of Biomedical Engineering, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University²⁾Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Abstract

Our new surgical treatment for corneal endothelial dysfunction involves replacing damaged the corneal endothelium with healthy corneal endothelial cells cultivated and multiplied *in vitro*. Monkey corneal endothelial cells (MCECs) were cultivated on collagen type-I carriers for four weeks. The corneal endothelium of the monkeys was mechanically scraped, and the cultivated MCEC sheet was inserted into the anterior chamber and fixed to the Descemet's membrane with air. As controls, a collagen sheet without MCECs was transplanted into one eye, and a suspension of cultivated MCECs was injected into the anterior chamber in another eye. In the early postoperative period MCEC sheets were attached to Descemet's membrane and corneal clarity recovered. This was accompanied by a decrease in corneal thickness. Fluorescein DiI labeled donor corneal endothelial cells were detected on the host cornea on postoperative day 7. After transplantation, the

MCEC-transplanted corneas remained clear for up to 4 years, and hexagonal cells of a density more than 1,500~2,000 cells/mm² were observed by *in vivo* specular microscopy. Control eyes showed irreversible bullous keratopathy. We established a model of cultivated corneal endothelial transplantation for corneal endothelial dysfunction in primates whose corneal endothelial cells have less proliferative capacity *in vivo*. Our results suggest that this is a useful model for long-term observation in advance of future clinical application of cultivated corneal endothelial transplantation. Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 113 : 1050—1059, 2009)

Key words : Tissue-engineering, Corneal endothelium, Bullous keratopathy, Primate, Cultivated corneal endothelial transplantation

別刷請求先 : 610-0321 京田辺市多々羅都谷 1—3 同志社大学生命医科学部医工学科 小泉 範子

(平成 21 年 4 月 6 日受付, 平成 21 年 6 月 9 日改訂受理) E-mail : nkoizumi@mail.doshisha.ac.jp

Reprint requests to : Noriko Koizumi, M. D., Ph. D. Department of Biomedical Engineering, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, 1-3 Miyakodani, Tatara, Kyotanabe-shi, Kyoto-fu 610-0321, Japan

(Received April 6, 2009 and accepted in revised form June 9, 2009)

I はじめに

角膜内皮細胞は角膜の最も内側にある一層の細胞層で、バリア機能とポンプ機能を有することによって角膜実質の含水率を一定に保ち、角膜を透明に維持している。ヒトやサルなどの霊長類では生体内における角膜内皮細胞の増殖能がきわめて低いことが知られており、外傷やジストロフィ、眼内手術などの障害によって角膜内皮細胞が脱落すると、角膜内皮細胞密度の低下が生じる。正常の角膜内皮細胞は、密度 2,000~2,500 個/mm² の六角形を主とする細胞からなっているが、角膜内皮細胞密度が数百個/mm² 以下になると角膜内皮機能不全となる。角膜内皮機能不全によって角膜が膨潤、混濁する病態は水疱性角膜症と呼ばれ、角膜移植の主要原因疾患となっている¹⁾²⁾。

水疱性角膜症に対する治療法として、従来は上皮、実質、内皮の 3 層構造のすべてをドナー角膜と置換する全層角膜移植術が行われてきたが、最近では障害された部分だけを再建する角膜パーツ移植の概念が注目されるようになり、角膜実質混濁のない早期の水疱性角膜症に対しては角膜内皮層のみをドナー組織と置換する角膜内皮移植術が開発されている。それらのなかでも Descemet stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK)³⁾ と呼ばれるマイクロケラトームを用いた角膜内皮移植術は、全層角膜移植に代わる水疱性角膜症の外科的治療法として急速に広まりつつある。DSAEK は、全層角膜移植と比較して、角膜乱視が少なく早期の視力回復を得られることや、移植後拒絶反応が少ない可能性などが期待されている。その一方で、1 人の患者を治療するために 1 眼のドナー角膜が必要である点においては全層角膜移植と変わりなく、我が国における慢性的なドナー不足を解決する手段とはならないこと、あるいは移植後に角膜内皮細胞密度が再び減少することが懸念される点については全層角膜移植と同様である。

そのような背景のもと、我々は水疱性角膜症に対する新しい治療法として、培養した角膜内皮細胞を用いた再生医学的治療法の開発に取り組んでいる。本稿では、我々が行っている臨床応用を目指した角膜内皮再生医療の開発に向けた取り組みを紹介する。

II 角膜内皮再生医療を目指した取り組み

角膜の再生医療、とりわけ角膜上皮の再生医療の領域では、日本の研究グループがこれまでに優れた技術を開発し、Stevens-Johnson 症候群や重症化学腐食などの重症眼表面疾患の治療法として既に臨床応用が行われている⁴⁾。同様に角膜内皮の再生医療に関しても、日本の研究チームは世界をリードする研究成果を報告してきた。1990 年代には既に、ウシ角膜内皮細胞の基質やその代用としての IV 型コラーゲンを用いることにより、生体外

での培養が困難であったヒト角膜内皮細胞の培養が可能になり^{5)~8)}、2000 年代に入ってから、培養した角膜内皮細胞をコラーゲンシートや羊膜などのキャリアを用いて移植する方法や⁹⁾¹⁰⁾、温度応答性培養皿を用いて培養した角膜内皮細胞シートをキャリアなしで移植する試みがウサギを用いた動物実験で報告されている¹¹⁾¹²⁾。また、スフェア法を用いて角膜内皮の前駆細胞を採取し¹³⁾、前房内に注入して Descemet 膜上で角膜内皮細胞へと分化させるコンセプトの治療法の開発も行われており¹⁴⁾¹⁵⁾、ウサギ水疱性角膜症モデル眼に対する角膜内皮前駆細胞の前房内注入による治療法の試みがなされている^{16)~18)}。

これらの移植実験では、生体外で培養して作製した角膜内皮細胞が、移植後の家兎眼において機能し角膜を透明に保つことが示されており、既に角膜内皮再生医療の臨床応用が実現する日も近いことが期待されている。このような状況のなか、我々はヒトへの臨床応用を目指した培養角膜内皮移植術の開発を行うため、霊長類を用いた角膜内皮研究を行っている。近年、動物福祉の観点から可能な限り動物を用いる試験研究を減らし、*in vitro* の研究モデルを用いることが推奨されているが、我々は角膜内皮細胞の特殊性から、ヒトへの臨床応用を目指した角膜内皮研究を行うためには、ヒトと同じ霊長類であるサルを用いた移植実験が必要であると考え、霊長類を用いた再生医療研究の実績と優れた飼育・研究設備を有する滋賀医科大学動物生命科学研究センターにおいて、2004 年からカニクイザルを用いた角膜移植実験を実施している。

III カニクイザル培養角膜内皮シートの作製

他の研究目的で安楽死させたカニクイザルから採取した角膜から、Descemet 膜ごと角膜内皮細胞を剥離し、1.2 U/ml のデイスパーゼを用いて角膜内皮細胞を採取した。それらを FNC コーティングミックス® (Athena ES 社) でコーティングを施した細胞培養用プレート上に播種して初代培養を行った。初代培養細胞は 10~14 日でコンフルエントに達するが、それらを新しいコーティングプレートで継代培養し、3~4 継代した角膜内皮細胞を I 型コラーゲンシート (Vitrigel®, アサヒテクノグラス社) に播種し、さらに 3~4 週間培養して培養角膜内皮細胞シートを作製した。初代培養および継代培養には、10% ウシ胎仔血清、2 ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor) および抗菌薬を加えた DMEM 培地を用いている。

I 型コラーゲンシート上で培養したカニクイザル角膜内皮細胞は、細胞密度約 2,800 個/mm² の六角形細胞を主とする多角形細胞からなり (図 1)、角膜内皮細胞のバリア機能に関連する ZO-1 およびポンプ機能に関連する Na⁺-K⁺ATPase を発現していた (図 2)。

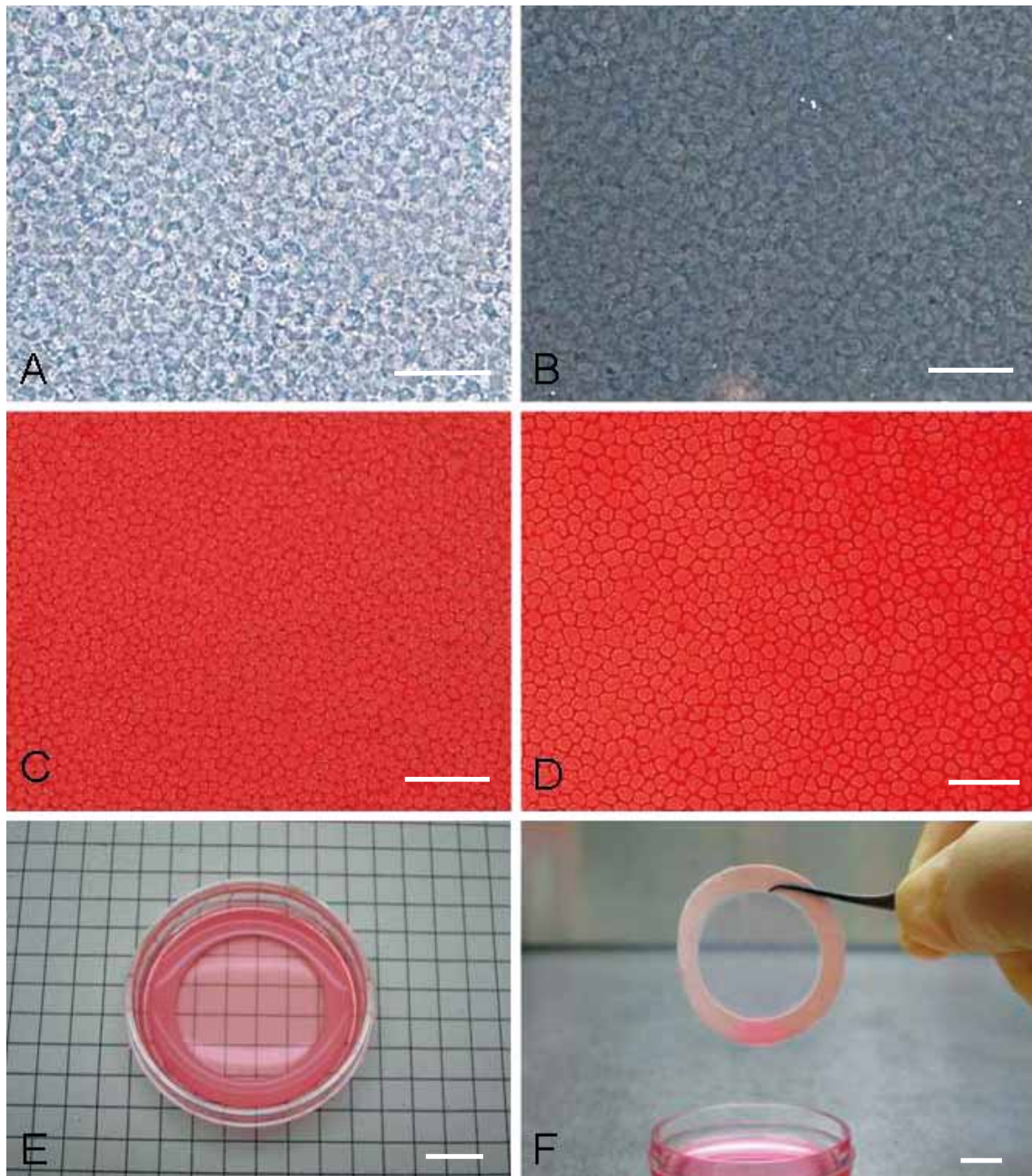


図 1 I 型コラーゲンシートを基質として作製したサル培養角膜内皮シート。

A, B: コーティングプレート上で初代培養したサル角膜内皮細胞。それぞれ細胞密度 $2,720$ 個/ mm^2 , $3,013$ 個/ mm^2 ではほぼ均一な多角形細胞からなる。C, D: I 型コラーゲンシート上で継代培養したサル角膜内皮細胞シートのアリザリン染色写真。細胞密度は約 $2,800$ 個/ mm^2 で、角膜内皮細胞として良好な形態を維持していた。E: 35 mm プレートの底面に貼り付けられた I 型コラーゲンシートの上に作製したサル培養角膜内皮シート。F: シートはプレートの底面から容易に剝離することができる。Scale bars: $50\ \mu\text{m}$ (A~D), $10\ \text{mm}$ (E, F)。

(文献 23 より許可を得て転載)

IV カニクイザルを用いた培養角膜内皮シート移植術

以下の実験は、滋賀医科大学動物実験委員会の承認を受けたプロトコールに従って、滋賀医科大学が定めるサルを用いた動物実験資格を有する研究者のみで行った。6 頭のカニクイザルにケタミンとキシラジンの混合液の

筋肉注射による麻酔を行った後、イソフルランの吸入麻酔により全身麻酔を行った。カニクイザル培養角膜内皮シート移植は、ヒトの角膜移植に準じる設備と清潔な環境下において、各個体の片眼のみを用いて行った。また、実験中のサルは脈拍、血圧、動脈血酸素飽和度のモニタリングを行うなど、苦痛を与えないよう動物福祉に配慮して移植実験を行った(図 3)。

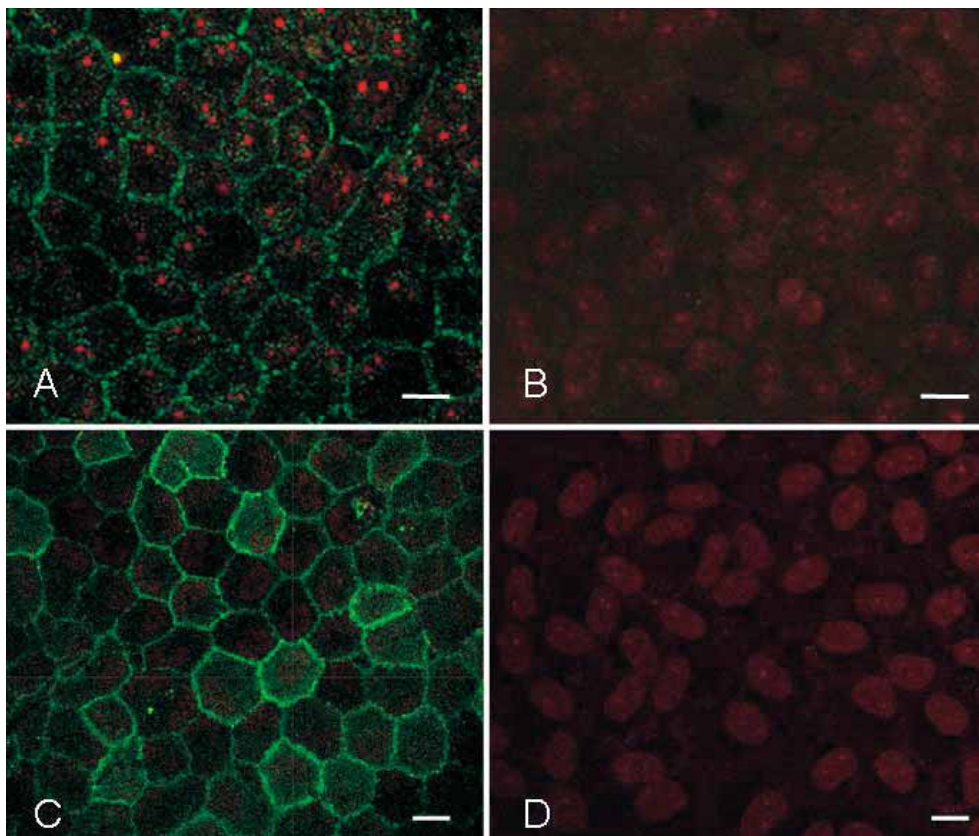


図 2 サル培養角膜内皮シートの免疫染色.

I 型コラーゲンシート上で培養した図 1 の細胞は、角膜内皮細胞の機能に関連する蛋白質である ZO-1 (A) および $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ (C) を発現している (緑). B, D は一次抗体を除外した陰性対照. 赤は propidium iodide による核染色を示す. Scale bars : 15 μm .

(文献 23 より許可を得て転載)



図 3 霊長類を用いた移植実験の様子.

ヒトの角膜移植に準じる設備を用いてカニクイザルの移植実験を行っている. 処置中はパルスオキシメーターで動物の全身状態を管理している (滋賀医科大学動物生命科学センターにて).

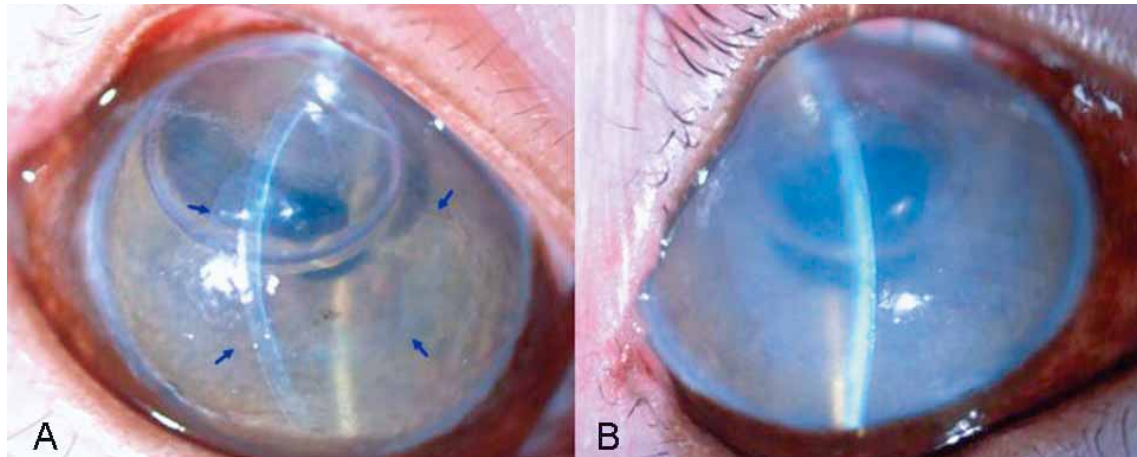


図 4 培養角膜内皮シート移植 24 時間後の角膜所見.

A: 培養角膜内皮シート移植眼では、シートが角膜裏面に接着し(矢印)、軽度の角膜浮腫を認めた。術後炎症は軽度である。B: 対照眼では角膜浮腫が強く、前房の透見性は不良であった。

(文献 23 より許可を得て転載)

1. 角膜内皮障害眼に対する培養角膜内皮シート移植

6 頭 6 眼の周辺部角膜に 3 mm の切開創を作製し、前房内を灌流しながら 20 G のシリコンニードルを用いて角膜内皮細胞を可能な限り周辺部まで機械的搔爬により除去した。カニクイザルの角膜の直径は約 10 mm であるが、そのうち 9 mm 以上の角膜内皮細胞が搔爬されていることを、0.04% トリパンプルーによる染色を行って術中に確認した。次に角膜切開創を 6 mm に拡大し、4 頭 4 眼ではレンズグライドをキャリアとして用いて直径 6 mm の円形の培養サル角膜内皮シートを前房内に挿入した。内皮シートは直径 6 mm のトレパンで打ち抜いた後、角膜内皮細胞側が下向きになるように粘弾性物質を塗布したレンズグライドにのせ、コラーゲンシートが Descemet 膜側、角膜内皮細胞が前房側となるように眼内に挿入した。そのうち 1 頭では、DiI で蛍光標識を行った培養サル角膜内皮シートを移植した。シートを前房内に挿入後、10-0 ナイロン糸で角膜切開創を縫合し、前房内にフィルターを通した空気を注入してシートを角膜裏面に接着させた。対照として、角膜内皮細胞を培養していないコラーゲンシートの移植を 1 眼で、また培養サル角膜内皮細胞の懸濁液の前房内注入を 1 眼で行った。注入した細胞の数は、移植した直径 6 mm の培養角膜内皮シートに含まれる角膜内皮細胞数と同じ数となるように設定した。移植手術が終了後にデキサメタゾンの結膜下注射と抗菌薬眼軟膏の点入を行い、翌日から 0.1% ベタメタゾン眼軟膏点入を 1 日 1 回、10 日目まで行った。全身的な免疫抑制治療は行わなかった。

2. カニクイザル水疱性角膜症モデル

コラーゲンシートのみを移植、および培養角膜内皮細胞の懸濁液を注入した対照眼では、移植翌日から著明な角膜浮腫を認めた(図 4)。対照眼はその後角膜の透明性を回復することなく、6 か月の時点では血管新生や角

膜浮腫と混濁を伴ったヒトにおける進行した水疱性角膜症の状態を示し、1 年以上にわたって改善しなかった(図 5)。このことから、カニクイザル眼では、過去に報告されているとおり生体内における角膜内皮細胞の増殖能は限られており^{19)~22)}、周辺部に残存したホストの角膜内皮細胞のみからでは角膜の透明性を回復することができないことが明らかとなった。

3. 培養角膜内皮シート移植後の角膜所見

一方の培養角膜内皮シート移植眼では、翌日にはすべての個体で培養角膜内皮シートがホストの Descemet 膜に接着していた。前房内には手術終了時に注入した空気が残存しており、角膜浮腫は軽度であった。1~2 週間にはホストの角膜は良好な透明性を回復したが、その間にすべての個体において培養角膜内皮シートが前房内に脱落した(図 5)。この結果は当初我々が予想した結果とは異なっていたため、角膜が透明性を回復した機序を明らかにするために DiI 標識をした内皮シートを移植した 1 頭 1 眼の角膜を術後 7 日目に摘出して、角膜組織ならびに脱落した内皮シートを蛍光顕微鏡で観察した。観察の結果、DiI で標識をしたドナー角膜内皮細胞が、内皮シート上のみならずシートよりも外側の露出した Descemet 膜上にも認められた(図 6)。このことは、間接的にはあるが移植したドナーの角膜内皮細胞が、移植後の眼内において増殖して外側の Descemet 膜上に広がった可能性を示唆していると考えた。

コラーゲンシートは眼内では分解吸収されないため、培養角膜内皮シート移植を行った残りの 3 頭 3 眼のうち 1 眼ではシートの摘出を行った。残りの 2 眼では周辺部角膜裏面に残存していたが、以降の観察に支障を来さなかったためそのまま観察した。すべての眼で移植後 6 か月まで透明角膜を維持しており、移植後 3 か月以降には 3 眼のうち 2 眼において非接触型角膜内皮スペキュラー

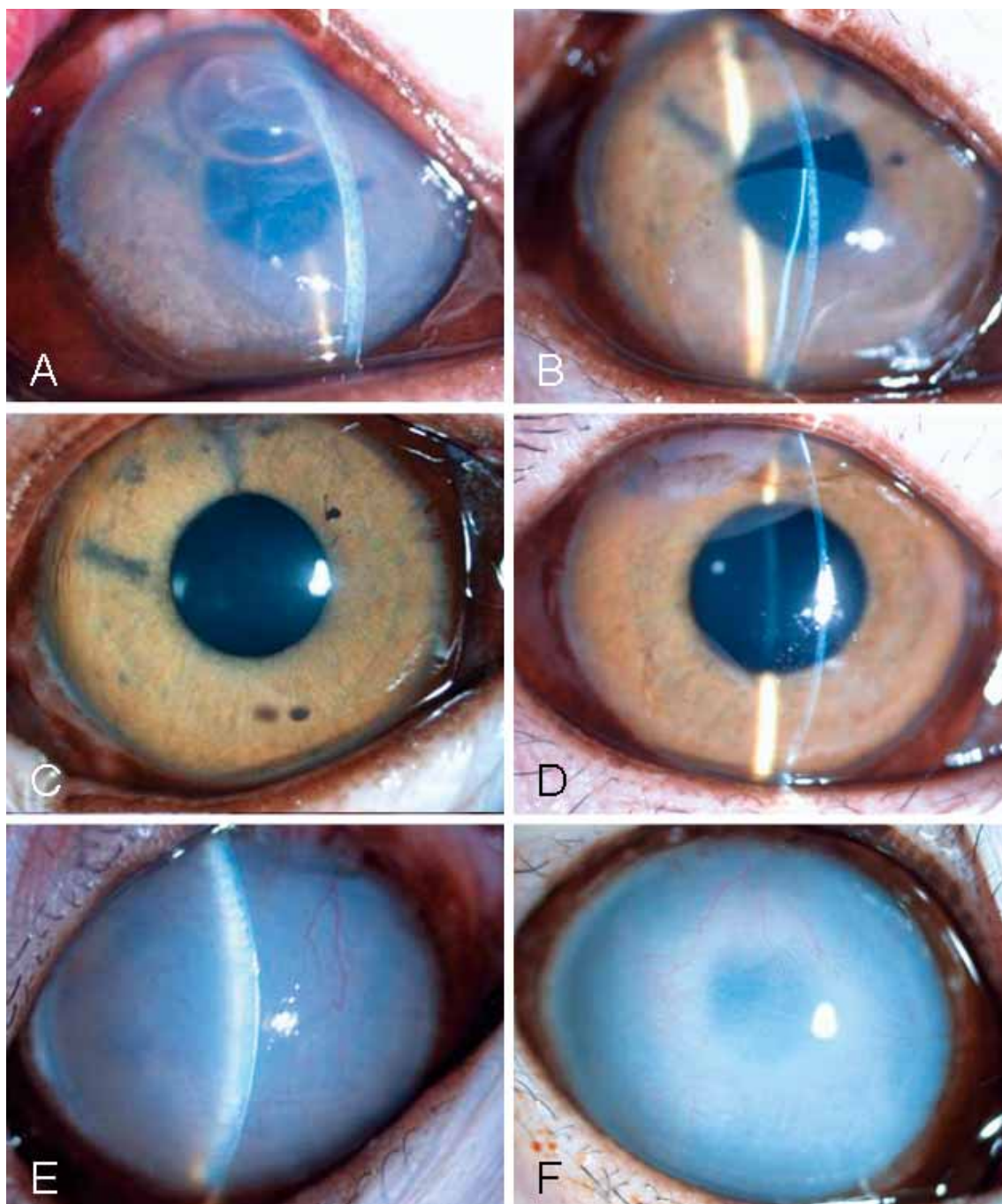


図 5 サル培養角膜内皮シート移植術後所見の経時的变化。

A：移植 5 日後までは培養角膜内皮シートが角膜裏面に良好に接着しており，角膜浮腫は軽度であった．
 B：移植 14 日後には，角膜は完全に透明性を回復しているが，その間に培養角膜内皮シートは前房内に脱落していた．
 C：移植 6 か月後にも角膜は透明性を維持していた．その間に，脱落したシートは摘出した．
 D：培養角膜内皮シート移植を行った別の個体でも，同様の経過をたどり，6 か月まで角膜は透明性を維持した．この個体では脱落したシートは上方角膜裏面に認められる．
 E：角膜内皮細胞なしのコラーゲンシートのみ移植を行った対照眼では，6 か月後には強い角膜浮腫と血管新生を認めた．
 F：培養角膜内皮細胞の懸濁液を前房内注入した対照眼でも，6 か月後には同様に強い角膜浮腫と血管新生を認めた．これらの対照眼では，いずれも手術後早期から不可逆性の角膜内皮機能不全となり，1 年以上にわたって回復することはなく，ヒトの水疱性角膜症と類似した経過となった．

(文献 23 より許可を得て転載)

の撮影が可能であった．移植後 6 か月の角膜内皮細胞密度はそれぞれ $2,475$ 個/ mm^2 と $1,992$ 個/ mm^2 であり，形態的にも正常角膜内皮細胞に類似した多角形細胞が観

察された(図 7)．超音波角膜厚測定装置により角膜厚を測定したところ，対照眼では角膜厚が測定限界以上の $1,200\ \mu\text{m}$ であったのに対し，内皮シート移植眼では移

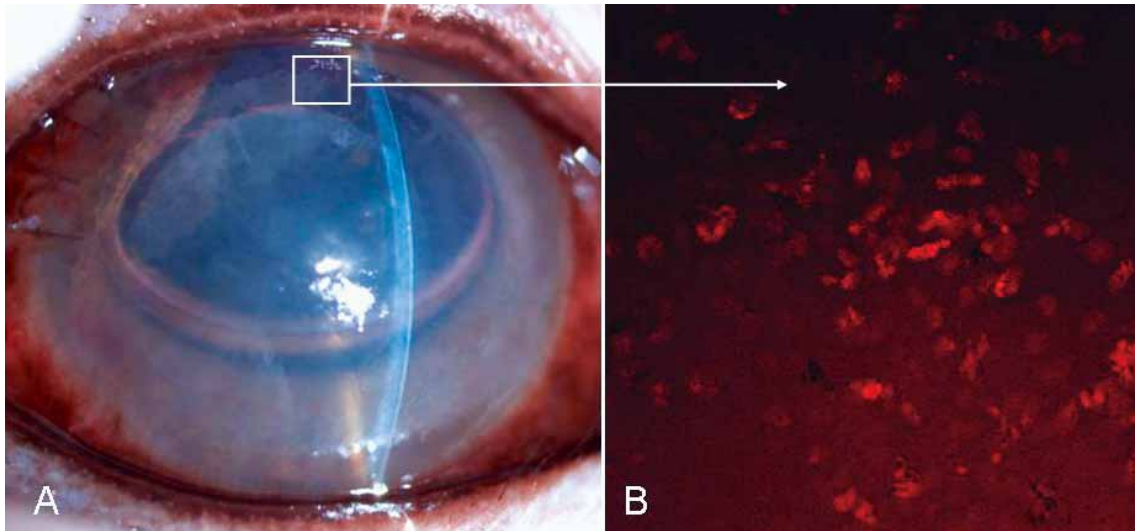


図 6 DiI 標識した培養角膜内皮シート移植眼の 7 日目の観察.

DiI で標識をした角膜内皮細胞が、シートよりも外側の宿主眼の Descemet 膜上に認められた (B: original magnification, $\times 200$).

(文献 23 より許可を得て転載)

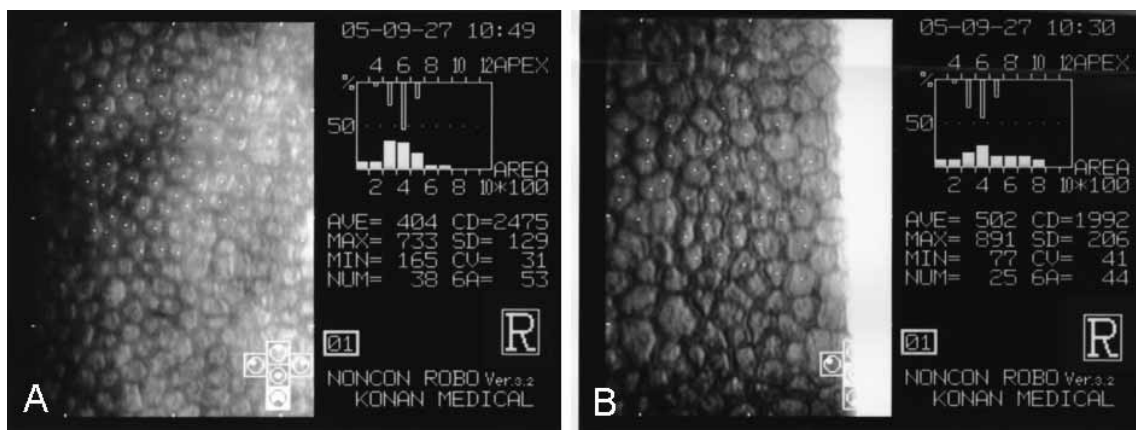


図 7 サル培養角膜内皮シート移植後 6 か月の非接触型スペキュラーマイクロスコープによる観察.

2 頭の個体においてそれぞれ 2,475 個/mm²(A), 1,992 個/mm²(B)の角膜内皮細胞が観察された.

(文献 23 より許可を得て転載)

植後早期には角膜浮腫を認めたものの移植後 6 か月で術前の角膜厚に回復した. 内皮シート移植眼 3 眼のうち 2 眼では、組織を摘出して電子顕微鏡による観察を行い、1 眼ではさらに長期観察を行った.

4. 移植後角膜の組織学的検討

培養角膜内皮シート移植後 6 か月の時点で摘出した角膜組織の走査型および透過型電子顕微鏡による観察を行った. その結果、角膜裏面は直径 15~30 μm の多角形細胞ですきまなく被覆されており、隣接する細胞同士は形態的には正常角膜に類似した結合を形成していた. また、角膜内皮細胞と本来の Descemet 膜の間には、新しく形成されたと考えられる新しい基底膜様構造物が形成されていた(図 8).

5. 内皮スペキュラーによる移植後内皮細胞の長期観察

長期観察を行った 1 眼では、その後も角膜は透明性を

維持しており、2 年後の時点での角膜内皮細胞密度は 1,640 個/mm²であり、移植後 4 年が経過した現在も細胞密度 1,500 個/mm²を維持している(図 9).

V 角膜内皮再生医療における培養角膜内皮シート移植の有用性

サルを用いた培養角膜内皮シート移植の研究によって、カニクイザルではある程度の角膜内皮細胞が障害されるとヒトと同様に不可逆性の水疱性角膜症を生じることが示された. また、生体外で培養した角膜内皮細胞のシートを霊長類の角膜に移植することが可能であり、角膜厚や角膜内皮スペキュラーを用いた術後の評価が可能であった²³⁾²⁴⁾. 本研究の当初のねらいは、コラーゲンシートを基質として作製した培養角膜内皮シートが、ホストの角膜裏面に永続的に生着し、シート上の角膜内皮

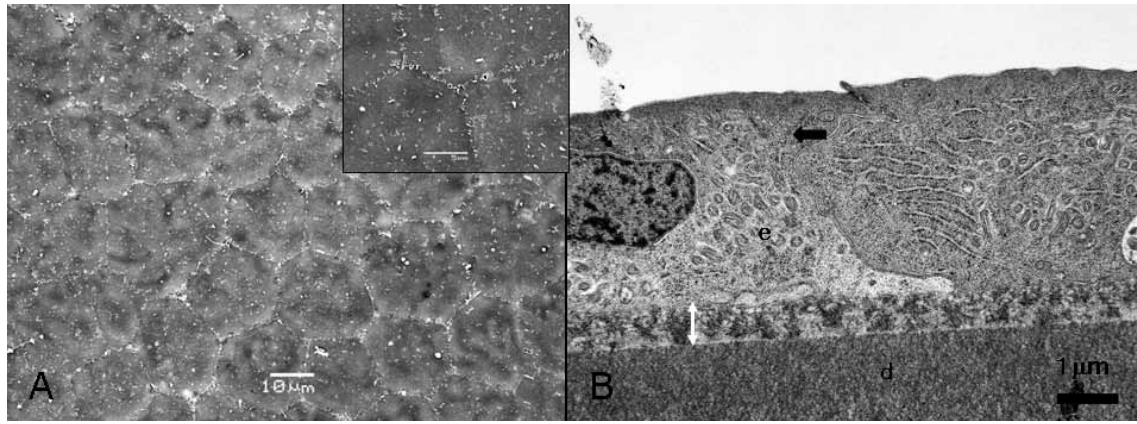


図 8 培養角膜内皮シート移植後 6 か月の摘出角膜の電子顕微鏡による観察。

A：走査型電子顕微鏡による観察では、角膜内皮面は直径 15～30 μm の多角形細胞で均一に覆われており、隣接する細胞間には正常角膜と類似した接合部を形成している様子が観察された。B：透過型電子顕微鏡による観察でも、角膜内皮細胞間の接着は良好であることが示された。角膜内皮細胞(e)は、Descemet 膜(d)との間に新しい基底膜様構造(両矢印)を形成していた。

(文献 23 より許可を得て転載)

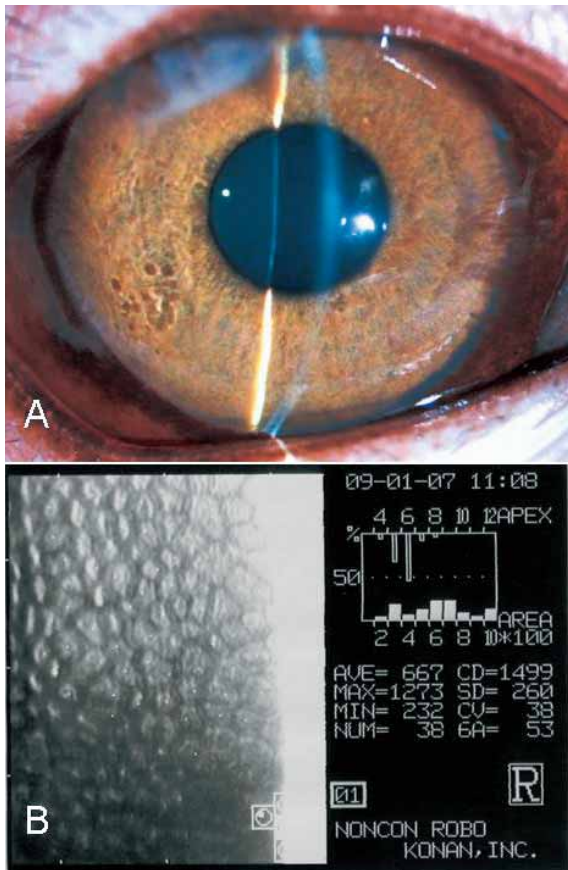


図 9 サル培養角膜内皮シート移植後 4 年の角膜所見。角膜は透明性を維持しており(A)、内皮スペキュラーでは密度約 1,500 個/ mm^2 の角膜内皮細胞が観察された。

細胞の機能によって角膜が透明性を回復することを期待したものであった。しかし実際には、シートが移植後に角膜から脱落するにもかかわらず角膜は透明性を回復し、移植したドナー内皮細胞が、ホストの角膜に遊走、

生着、増殖して角膜の透明性を回復したことを示唆する結果となった。すなわち本実験モデルでは、コラーゲンシートは培養角膜内皮細胞を眼内に移植するためのキャリアとしての役割を果たしたことになる。継代培養を行うことによって生じる細胞の変異や、移植後の眼内ですべてで増殖能を持続できるのかなど、今後安全性を確認する必要があると考えられるが、生体内では増殖能が乏しいとされる霊長類の角膜内皮細胞も、いったん生体外に取り出し、細胞培養を行うことによって、再び眼内に戻した後も増殖能を持続できる可能性があることを示したことは、角膜内皮疾患に対する新しい治療法の開発につながると考えられる。

水疱性角膜症に対する全層角膜移植術には、ドナー不足のみならず、移植後の角膜内皮細胞密度の減少という問題点があるが、培養角膜内皮シートによる角膜内皮機能不全の治療には、1 眼のドナー角膜から複数の移植用内皮シートを作製できるというメリット以外に、あらかじめ非常に高い密度に培養した角膜内皮シートを移植すること、あるいは移植後の眼内においても一定の増殖能を持続させる角膜内皮シートを移植することができるメリットがあると考えられる(図 10)。

VI 臨床応用へ向けた取り組み

カニクイザルを用いた研究で得られた成果をもとに、現在我々は水疱性角膜症あるいは初期の角膜内皮機能不全に対する新しい治療法の臨床応用を目指している。我々の研究グループにおいて、培養角膜内皮移植の臨床応用を行う上で問題となっているのがヒト角膜内皮細胞の培養である。既にいくつかのグループから、ヒト角膜内皮細胞を *in vitro* で培養することが可能であることが報告されているが、我々の培養条件では *in vitro* で継代

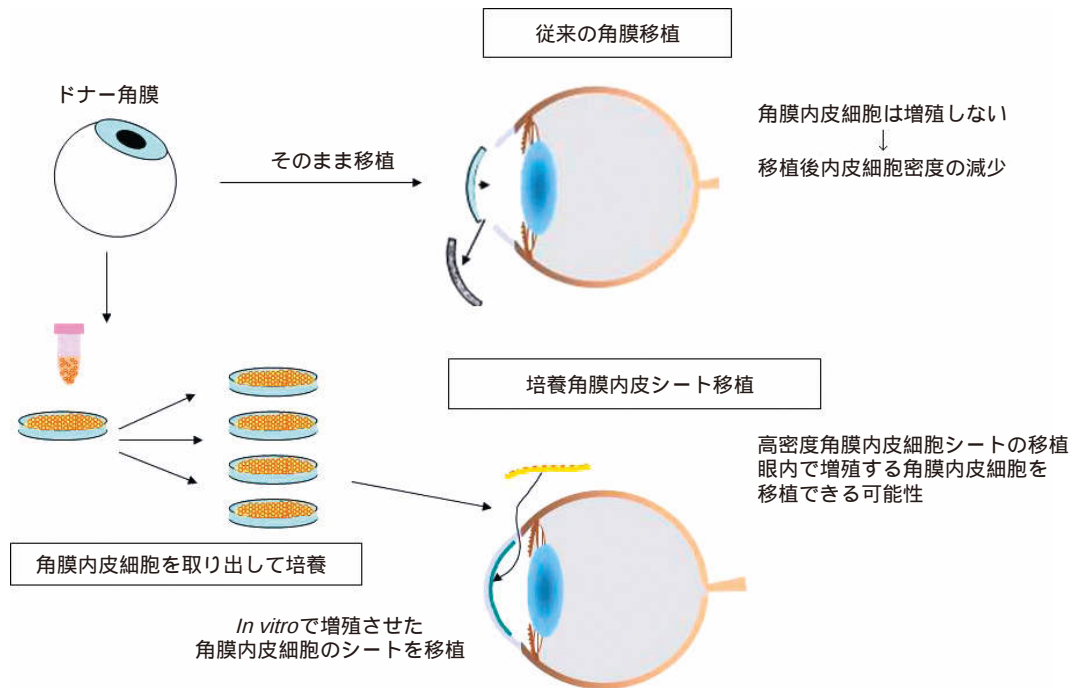


図 10 培養角膜内皮細胞を用いた再生医療のメリット。

ドナー角膜をそのまま移植する通常の角膜移植と比較して、1 眼のドナー角膜で多くの患者に移植手術ができるという点以外にも、あらかじめ細胞密度を非常に高くした角膜内皮細胞シートを移植することができるメリットがある。また、将来的には移植後の眼内で適切な密度まで角膜内皮細胞が増殖することができる移植片を作製できる可能性がある。

培養したヒト角膜内皮細胞は容易に線維芽細胞様の形態に変化してしまい、正常のヒト角膜内皮細胞のような六角形の形態を維持したまま継代培養を行うことが困難であった。そこで我々は、embryonic stem cell (ES 細胞) を効率的に培養するために有用であることが報告されている Rho キナーゼ阻害薬の一種である Y-27632 を用いることによって²⁵⁾、ヒト角膜内皮細胞を正常の形態を保ったまま、効率的に培養することを試みている。これまでに我々は、Y-27632 はカニクイザル角膜内皮細胞の初代培養および継代培養において、細胞の基質への接着と増殖を促進することによって培養効率を向上させることを報告した²⁶⁾。ようやくヒト角膜内皮細胞の初代培養でも安定した結果が得られつつあり、これらの方法を用いることによって水疱性角膜症に対する新しい治療法としての培養角膜内皮細胞移植を一日も早く実現したいと考えている。さらに角膜内皮再生医療の観点からは、より侵襲の少ない培養角膜内皮細胞移植術や、初期の角膜内皮機能不全に対する角膜内皮治療薬の開発などにも着手しており、多角的なアプローチによる取り組みを行って将来的には角膜移植を行わない角膜内皮疾患治療を実現させたいと考えている。

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の先生方、第 113 回日本眼科学会総会総会長 澤 充教授に心より感謝申し上げます。また、ご

指導を賜りました京都府立医科大学眼科 木下 茂教授、滋賀医科大学動物生命科学研究センター 鳥居隆三教授、研究にご協力いただきました京都府立医科大学 奥村直毅先生、伴由利子先生、谷岡秀敏先生をはじめとする眼科学教室の皆様、滋賀医科大学動物生命科学研究センターの皆様、千寿製薬株式会社コーベクリエイティブセンター 坂本雄二様、同志社大学生命医科学部医工学科ティッシュエンジニアリング研究室のスタッフに心より感謝いたします。

文 献

- 1) Shimazaki J, Amano S, Uno T, Maeda N, Yokoi N, the Japan Bullous Keratopathy Study Group : National survey on bullous keratopathy in Japan. *Cornea* 26 : 274—278, 2007.
- 2) Darlington JK, Adrean SD, Schwab IR : Trends of penetrating keratoplasty in the United States from 1980 to 2004. *Ophthalmology* 113 : 2171—2175, 2006.
- 3) Gorovoy MS : Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 25 : 886—889, 2006.
- 4) 小泉範子, 西田幸二, 天野史郎, 木下 茂 : 日本における角膜再生医療の現状. *日眼会誌* 111 : 493—503, 2007.
- 5) Miyata K, Murao M, Sawa M, Tanishima T : New wound-healing model using cultured corneal endothelial cells. 1. Quantitative study of healing process. *Jpn J Ophthalmol* 34 : 257—266, 1990.

- 6) Miyata K, Murao M, Sawa M, Tanishima T : New wound-healing model using cultured bovine corneal endothelial cells. 2. Role of migration and mitosis studied by immunohistochemistry. Jpn J Ophthalmol 34 : 267—274, 1990.
 - 7) 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.
 - 8) Amano S, Mimura T, Yamagami S, Osakabe Y, Miyata K, Yokoo S, et al : Properties of corneas reconstructed with cultured human corneal endothelial cells and human corneal stroma. Jpn J Ophthalmol 49 : 448—452, 2005.
 - 9) Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) Sumide T, Nishida K, Yamato M, Ide T, Hayashida Y, Watanabe K, et al : Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. FASEB J 20 : 392—394, 2006.
 - 13) Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Araie M, Amano S, Yanagi Y, et al : Comparison of rabbit corneal endothelial cell precursors in the central and peripheral cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 46 : 3645—3648, 2005.
 - 14) Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, Uchida S, Mimura T, Usui T, et al : Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. Invest Ophthalmol Vis Sci 46 : 1626—1631, 2005.
 - 15) Yamagami S, Mimura T, Yokoo S, Takato T, Amano S : Isolation of human corneal endothelial cell precursors and construction of cell sheets by precursors. Cornea 25(Suppl 1) : S 90—S 92, 2006.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) Amano S, Yamagami S, Mimura T, Uchida S, Yokoo S : Corneal stromal and endothelial cell precursors. Cornea 25(Suppl 1) : S 73—S 77, 2006.
 - 19) Van Horn DL, Hyndiuk RA : Endothelial wound repair in primate cornea. Exp Eye Res 21 : 113—124, 1975.
 - 20) Matsubara M, Tanishima T : Wound-healing of corneal endothelium in monkey : an autoradiographic study. Jpn J Ophthalmol 27 : 444—450, 1983.
 - 21) Matsubara M, Tanishima T : Wound-healing of the corneal endothelium in the monkey : a morphometric study. Jpn J Ophthalmol 26 : 264—273, 1982.
 - 22) Tsuru T, Araie M, Matsubara M, Tanishima T : Endothelial wound-healing of monkey cornea : fluorophotometric and specular microscopic studies. Jpn J Ophthalmol 28 : 105—125, 1984.
 - 23) Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Okahara N, Tsuchiya H, Torii R, et al : Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. Invest Ophthalmol Vis Sci 48 : 4519—4526, 2007.
 - 24) Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Tsuchiya H, Torii R, Cooper LJ, et al : Cultivated corneal endothelial transplantation in a primate : Possible clinical application in corneal endothelial regenerative medicine. Cornea 27 (suppl 1) : S 48—S 55, 2008.
 - 25) Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al : A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 25 : 681—686, 2007.
 - 26) Okumura N, Ueno M, Koizumi N, Sakamoto U, Hirata K, Hamuro J, et al : Enhancement on primate corneal endothelial cell survival *in vitro* by a Rock inhibitor. Invest Ophthalmol Vis Sci 50 : 3680—3687, 2009.
-