

Progress in the Development of Corneal Endothelial Tissue Engineering for Future Clinical Application

Noriko KOIZUMI^{*}, Naoki OKUMURA^{*,**} and Shigeru KINOSHITA^{**}

(Received October 25, 2011)

This review describes our recent attempts to develop new therapeutic modalities for corneal endothelial diseases using animal models, especially a monkey model in which a proliferative ability of corneal endothelial cells is severely limited similar to humans. First, we describe our attempt to develop new surgical treatments for advanced corneal endothelial dysfunction using transplantation of cultivated endothelial cells. The corneal endothelial cell transplantation can be achieved by two different approaches; one is by transplantation of a corneal endothelial cell sheet cultivated on a type I collagen carrier and another is by transplantation of a corneal endothelial cell sheet cultivated on a human lamellar graft prepared by a similar procedure used in DSAEK surgery. Recently, we reported that the selective Rho-kinase (ROCK) inhibitor, Y-27632, promotes cell adhesion and proliferation and inhibits the apoptosis of primate corneal endothelial cells in culture. Based on these new findings, we are currently developing new surgical and non-surgical treatment modalities for corneal endothelial diseases using the ROCK inhibitor.

Key words: corneal endothelial cells, Rho kinase (ROCK) inhibitor, corneal endothelial dysfunction, tissue engineering,

キーワード: 角膜内皮細胞, Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤, 角膜内皮機能不全, 組織工学

臨床応用を目指した角膜内皮再生医療の開発

小泉 範子, 奥村 直毅, 木下 茂

1. はじめに

人間は外界からの情報の約 8 割を視覚によって認識するといわれ、視覚情報が正しく大脳に伝達されるためには、まず光情報の入口である角膜が光学的に透明でなければならない。角膜は厚さ 520 μ m、直径 12mm の透明組織であるが、その透明性の維持には生体の恒常性を維持するための複雑なメカニズムが働いている。角膜は、外側から順に、上皮、実質、内皮の 3 種類の細胞層から構成される。角膜のほとんど内側に存在する角膜内皮細胞は、バリア機能とポンプ機能を有しており、角膜実質内の水分含有量を一定に保って角膜の透明性を維持する重要な役割を果たしている。

正常の角膜内皮細胞は、およそ 2500-3000 個/mm² の密度の六角形を主とする多角形細胞からなるが、ヒトやサルなどの霊長類の角膜内皮細胞は再生能力が乏しく、生体内ではほとんど増殖しないことが知られている。そのため、外傷やジストロフィ、白内障などの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、残存する細胞が拡大、伸展して障害部分を修復しようとする。その結果として、これらの障害の後には角膜内皮細胞密度の低下が生じる。角膜内皮細胞密度がおよそ 500 個/mm² 以下になると、角膜を透明に保つことができず、すなわち角膜内皮機能不全となる。角膜内皮機能不全となると角膜は膨潤して混濁するが、そのような状態は水疱性角膜

^{*}Department of Biomedical Engineering, Doshisha University, Kyoto
Telephone/Fax: +81-774-65-6125, E-mail:nkoizumi@mail.doshisha.ac.jp

^{**} Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto

症とよばれ、重症の視覚障害の原因となる。

水疱性角膜症に対する唯一の治療法は、ドナー角膜を用いた角膜移植である。古くから行われてきた全層角膜移植術の他に、最近では障害された部分だけを再建する DSAEK(Descemet-stripping automated endothelial keratoplasty) などの角膜内皮移植術が広く行われるようになった。しかしこれらの角膜移植術では、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り、わ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。また、水疱性角膜症に対する角膜移植は、移植後に角膜内皮細胞密度が再び減少し、長期予後が悪いことが問題となっている。

そのような背景のもと、我々は水疱性角膜症による視覚障害を克服するための新しい再生医学的治療法の開発に取り組んでいる。本論文では、我々がやっている臨床応用を目指した角膜内皮再生医療の研究について報告する。

2. 角膜内皮再生医療の試み

角膜内皮の再生医療の分野では、日本の研究チームは世界をリードする研究を行なっている¹⁾。これまでに、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、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^{2)~4)}。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、移植後のウサギ眼において機能し角膜を透明に保つことが示されているが、現在のところ患者に対する治療として臨床応用された方法はない。

角膜内皮細胞の増殖能は、動物種による違いが大きいことが知られており、ヒトやサルなどの霊長類ではほとんど角膜内皮細胞が増殖しないのに対し、ウサギやマウスの角膜内皮細胞は生体内でも高い増殖能を持つ。我々は、このような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を持つ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。

以下の動物実験は、同志社大学および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、動物福祉に配慮して実施した。

3. 培養角膜内皮シート移植術の開発

3.1 I型コラーゲンシート

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、ディスペーゼを用いて角膜内皮細胞を採取し、10% ウシ胎仔血清、2ng/mL bFGF (basic fibroblast growth factor) および抗菌薬を加えた DMEM 培地を用いて初代培養を行った。3-4回の継代培養を行ったカニクイザル角膜内皮細胞を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週間培養してカニクイザル培養角膜内皮細胞シートを作製した。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2800個/mm²の六角形細胞を主とする多角形細胞からなり、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を発現しており、正常の角膜内皮細胞と極めて類似した性質を示すことを確認した⁶⁾。

次に、カニクイザル6頭6眼の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、直径6mmの円形の培養サル角膜内皮シートを前房内に移植した。そのうち1眼では、DiI(1,1-dioctadecyl-3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)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、角膜切開創を縫合し、前房内に空気を注入してシートを角膜裏面に接着させた。コントロールとして、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。

コラーゲンシートのみ移植、および培養角膜内皮細胞の懸濁液を注入したコントロール眼では、ヒトにおける水疱性角膜症の同様に著明な角膜浮腫を示し、1年以上にわたって改善しなかった。このことから、カニクイザル眼では、ヒトと同様に生体内における角膜内皮細胞の増殖能は限られており、ヒ

トに準じる角膜移植モデルとして適切であることが確認された。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デスメ膜に接着しており、角膜浮腫は軽度であった。経過観察中に、最終的には移植したコラーゲンシートが角膜裏面から脱落したにも関わらず、すべての個体において角膜が透明性を回復した。DiI 標識をした内皮シートを移植した個体から摘出した角膜組織の観察の結果、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、角膜内皮機能を回復した可能性が示された⁶⁾⁻⁸⁾。

すべての眼で移植後 6 ヶ月まで透明角膜を維持し、移植後 6 ヶ月の時点で行った角膜内皮スペキュラーによる観察では、密度 2000 個/mm² 以上で形態的にも正常角膜内皮細胞に類似した角膜内皮細胞が確認された。また移植眼では角膜浮腫の改善は角膜厚の減少として確認でき、移植後 6 ヶ月で術前の角膜厚に回復した。最長観察個体では、移植後 5 年が経過

した現在まで角膜の透明性を維持しており、移植した角膜内皮細胞が長期間にわたって機能を維持することが確認できた。本研究の結果より、生体内で増殖能が乏しいとされる霊長類の角膜内皮細胞は、生体外に取り出して細胞培養を行うことによって、移植後の眼内においても増殖能を維持することができる可能性が初めて示され、角膜内皮疾患に対する新しい治療法の開発につながる発見となった。

3.2 ヒト角膜実質組織を用いた培養角膜内皮シート移植 (培養 DSAEK)

次に我々は、ヒト角膜実質組織をキャリアとして用いた培養角膜内皮シート移植を試みた。米国アイバンクから入手した研究用ヒト角膜組織から、DSAEK 手術に用いられるマイクロケラトーム (モリア社製) を用いて、厚さ 150-200 μ m、直径 8mm の表層角膜実質片を作成し、-20 $^{\circ}$ C の冷凍庫で 4 週間凍結保存してヒト由来の角膜実質細胞を死滅させた後に、

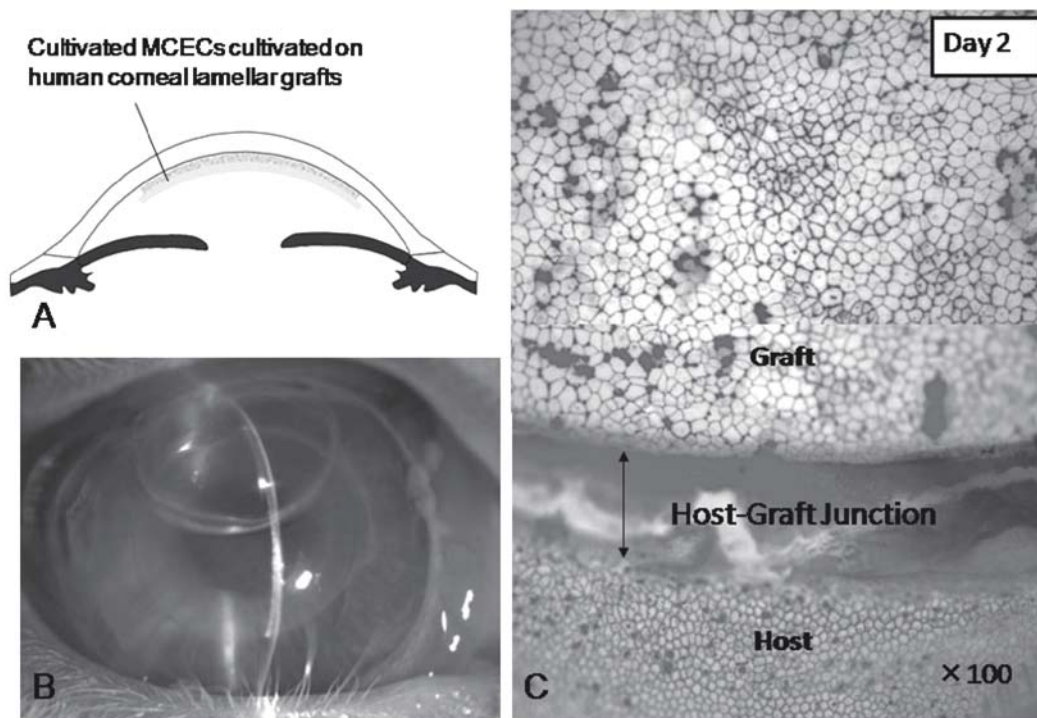


Fig.1. Cultivated corneal endothelial transplantation (cultivated-DSAEK) in a rabbit bullous keratopathy model.

カニクイザル培養角膜内皮細胞 (2×10^5 個) を播種した。4 週間培養後の角膜組織には、細胞密度 2240 個/ mm^2 で正常の角膜内皮細胞に極めて類似した形態の培養角膜内皮細胞が再建されており、角膜内皮細胞の機能に関連する ZO-1 および Na^+/K^+ -ATPase の発現が認められた。次に、3.1 と同様の方法で角膜内皮細胞を除去したウサギおよびカニクイザル眼に DSAEK と同様の手術方法を用いて移植した。移植翌日には、移植片は角膜裏面に接着し、角膜浮腫は軽度であった。ウサギ眼を用いた移植 48 時間後の組織学的観察では、手術操作によるドナー角膜内皮細胞の障害を認めず、DSAEK の手術手技によって培養角膜内皮細胞シート移植が可能であることが確認された (Fig.1.)。また、ヒトと同様に生体内で角膜内皮細胞が増殖しにくい動物であるカニクイザルを用いた長期観察では、角膜は移植後 2 週間で透明性を回復し、移植後の角膜厚は $1042\mu\text{m}$ (1 週間後) から $600\mu\text{m}$ (8 ヶ月後) へと著明な改善が認められた。8 カ月後の角膜内皮スペキュラーでは、密度 1841 個/ mm^2 の角膜内皮細胞が観察された。本研究におけるカニクイザル眼への移植はアログラフト (他家移植) であったが、3 年後の現在まで拒絶反応の所見を認めていない。本研究の結果より、ヒト角膜実質組織を用いた培養角膜内皮細胞移植 (培養 DSAEK) の臨床応用の可能性が示唆された⁹⁾。

3.3 培養角膜内皮シート移植のメリット

水疱性角膜症に対する現在の唯一の治療法である角膜移植術には、ドナー不足のみならず、移植後に角膜内皮細胞が再び減少し、再移植が必要になるという問題点がある。培養角膜内皮シートを用いた角膜内皮機能不全の治療では、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がある以外に、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ち続け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り、より長期間にわたって、よりよい視力回復が得られる可能性がある⁸⁾。

4. ROCK 阻害剤を用いた

ヒト角膜内皮細胞培養法の開発

カニクイザルを用いた研究で得られた成果に基づいて、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た研究を行なっている。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。我々の培養条件では *in vitro* で継代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、ES 細胞の培養における有用性が報告されている 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¹⁰⁾、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 (Fig.2)¹¹⁾。現在では、さらに細胞培養法の改良を重ねることによって、ようやく安定してヒト角膜内皮細胞の継代培養を行うことが可能になりつつある。

5. ROCK 阻害剤を用いた新規治療法の開発

現在我々は、細胞接着促進効果を有する ROCK 阻害剤を用いることによって、基質を用いない培養角膜内皮細胞移植 (細胞注入治療) の開発を行なっており、すでにウサギおよびカニクイザルを用いた検討によってその効果を確認した。今後は、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。また、患者自身の角膜内皮細胞が部分的に残存している初期の水疱性角膜症に対しては、患者の角膜内皮細胞の増殖を促進させる薬剤の開発が可能であると考え、ROCK 阻害剤による角膜内皮治療薬の開発を試みている。これまでに、ROCK 阻害剤の点眼投与によって、ウサギの部分的角膜内皮障害モデル眼において角膜内皮の創傷治癒を促進することを確認しており⁹⁾、現在は

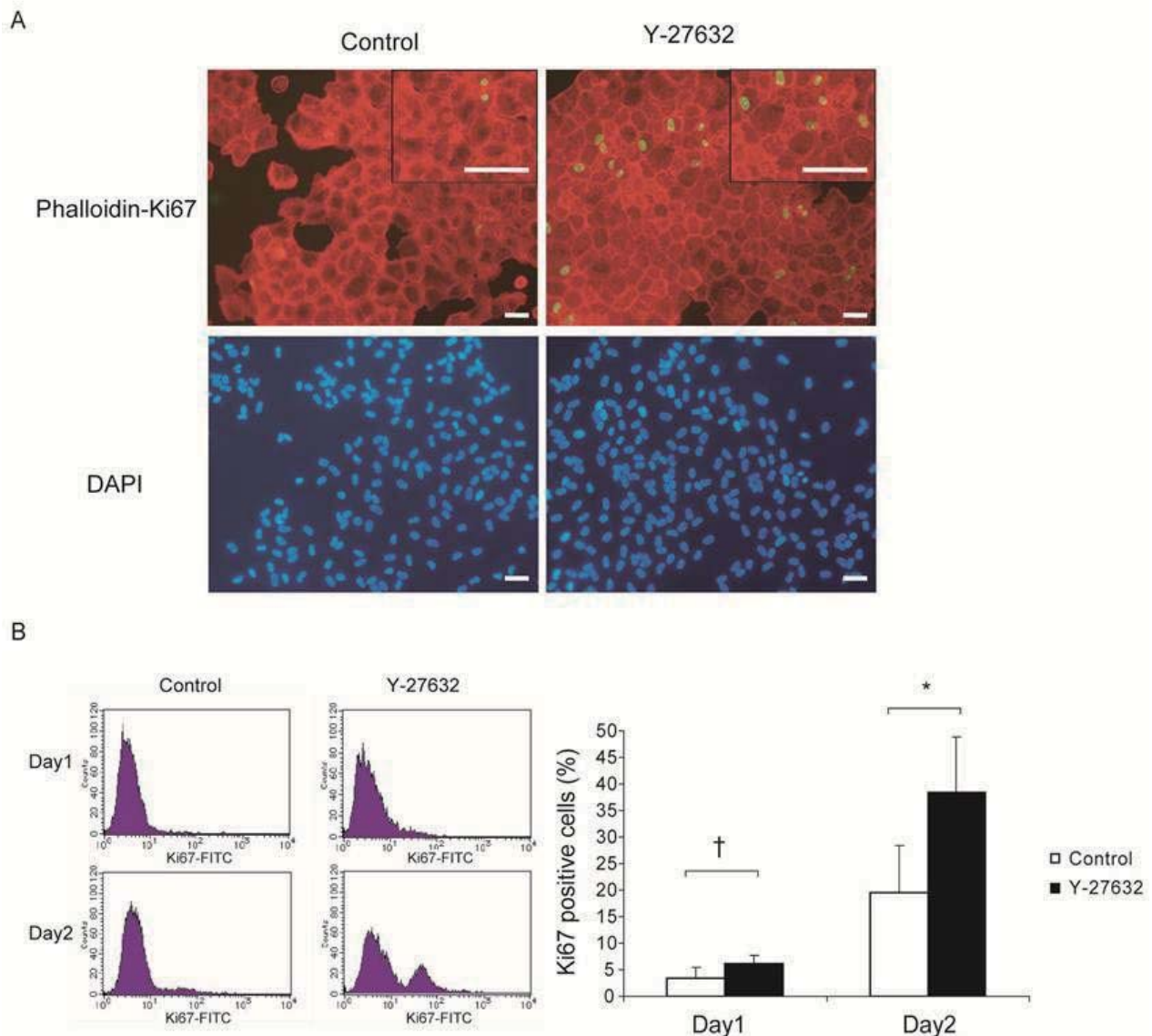


Fig.2. Selective ROCK inhibitor, Y-27632, promoted cell proliferation of primate corneal endothelial cells in culture.(Reprinted from reference No.10 with the permission.)

カニクイザルを用いた検討により，有用性と安全性の検証を行なっている。

今後我々は，様々な先端技術を組み合わせ，臨床の現場で必要とされる新しい治療方法を開発することにより，角膜内皮障害による視覚障害患者に対するよりよい治療法を提供したいと考えている。

本研究の一部は，「2009 年度同志社大学理工学研究 所研究助成金（個人）」，JSTA-STEP フィージビリティスタディ(AS2111180G)および内閣府「最先端・次世代研究開発支援研究プログラム」の支援を受けて行った。霊長類を用いた動物実験は滋賀医科大学動物生命科学研究センターセンター長 鳥居隆三教授のご指導のもと滋賀医科大学において実施した。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 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.” 日本眼科学会雑誌, **111**, 493-503 (2007).
- 2) K. Miyata, M. Murao, M. Sawa, and T. Tanishima, “New wound-healing model using cultured corneal endothelial cells. 1. Quantitative study of healing process.” *Jpn J Ophthalmol*, **34**, 257-266 (1990).
- 3) Y. Ishino, Y. Sano, T. Nakamura, C. J. Connon, H. Rigby, N. J. Fullwood, and S. Kinoshita, “Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation.” *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**, 800-806 (2004).
- 4) T. Mimura, S. Yamagami, S. Yokoo, T. Usui, K. Tanaka, S. Hattori, S. Irie, K. Miyata, M. Araie, and S. Amano, “Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model.” *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**, 2992-2997 (2004).
- 5) T. Sumide, K. Nishida, M. Yamato, T. Ide, Y. Hayashida, K. Watanabe, J. Yang, C. Kohno, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano, and Y. Tano, “Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces.” *FASEB J*, **20**, 392-394 (2006).
- 6) N. Koizumi, Y. Sakamoto, N. Okumura, N. Okahara, H. Tsuchiya, R. Torii, L. J. Cooper, Y. Ban, H. Tanioka, and S. Kinoshita, “Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model.” *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **48**, 4519-4526 (2007).
- 7) N. Koizumi, Y. Sakamoto, N. Okumura, H. Tsuchiya, R. Torii, L. J. Cooper, Y. Ban, H. Tanioka, and S. Kinoshita, “Cultivated corneal endothelial transplantation in a primate: Possible clinical application in corneal endothelial regenerative medicine.” *Cornea*, **27**, S48-55 (2008).
- 8) 小泉範子, “霊長類を用いた角膜内皮再生医療の開発.” 日本眼科学会雑誌, **113**, 1050-1059 (2009).
- 9) N. Koizumi, N. Okumura, and S. Kinoshita, “Development of new therapeutic modalities for corneal endothelial disease focused on the proliferation of corneal endothelial cells using primate animal models.” *Exp Eye Res*, in press.
- 10) K. Watanabe, M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J. B. Takahashi, S. Nishikawa, S. Nishikawa, K. Muguruma, and Y. Sasai, “A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells.” *Nat Biotechnol*, **25**, 681-686 (2007).
- 11) N. Okumura, M. Ueno, N. Koizumi, U. Sakamoto, K. Hirata, J. Hamuro, and S. Kinoshita, “Enhancement of primate corneal endothelial cell survival in vitro by a ROCK inhibitor.” *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **50**, 3680-3687 (2009).
- 12) N. Okumura, N. Koizumi, M. Ueno, Y. Sakamoto, H. Takahashi, K. Hirata, R. Torii, J. Hamuro, and S. Kinoshita, “Enhancement of corneal endothelium wound healing by a ROCK inhibitor eye drop.” *Br J Ophthalmol*, **95**, 1006-1009 (2011).