

論文の内容の要旨

論文題目 再生医療の技法を用いた角膜内皮機能不全治療の追求

指導教員 新家 眞 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

学生証番号 41-67485

本田 紀彦

角膜は眼球の外壁の一部を構成する透明組織である。外界からの光を取り入れる窓として、また同時に眼球光学系の屈折力の約 3 分の 2 を担うレンズとして働いている。(図 1)

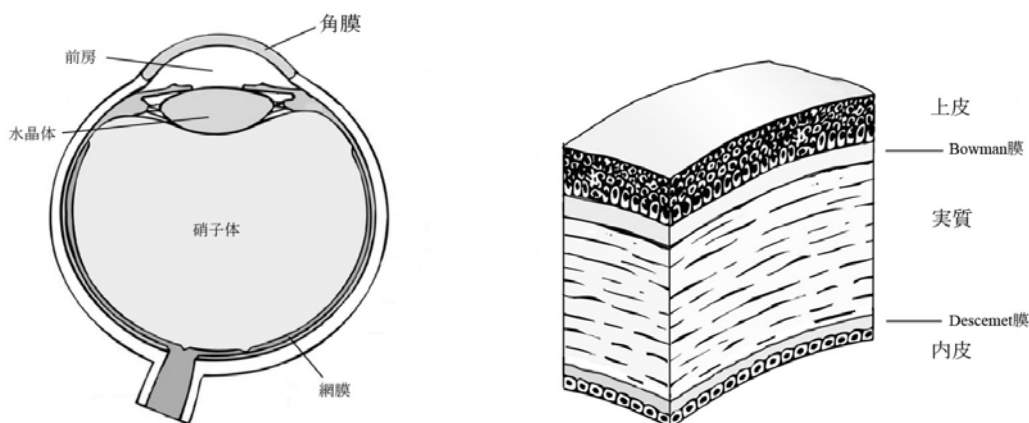


図 1 眼球水平断面における角膜の位置 (左) と角膜の断面構造 (右)

角膜内皮は角膜の裏打ちをする単層扁平上皮であり、角膜の含水率を一定に保つことで、その透明性維持に重要な役割を果たしている。そのためその機能低下は、角膜浮腫を通じて視力低下を起こす。ヒト角膜内皮細胞はきわめて限られた分裂能しか持たないため、細胞数が過度に減少すると角膜浮腫・混濁は不可逆となり、水疱性角膜症に至る。(図 2) 我

が国における主な病因は内眼・レーザー手術であり、その患者数は増加している。

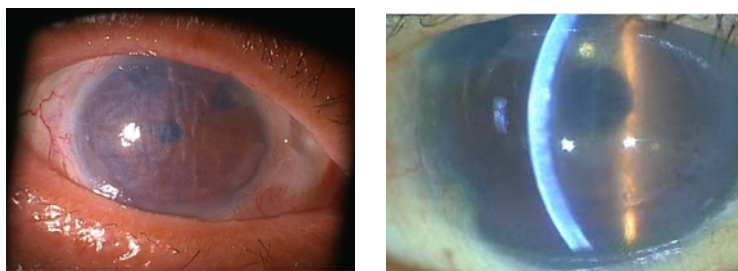


図2 水疱性角膜症 角膜浮腫のため角膜厚は増加し、透明性が低下している。

水疱性角膜症に対する現時点での唯一の治療法は、角膜移植である。その代表格の全層角膜移植術 (Penetrating Keratoplasty; PKP) は 100 年近くの歴史があり有用性も確立しているが、一方でドナー不足、術中術後の合併症のリスクなど多くの問題を抱える。

将来的にこれらを解決しうるのが、再生医療の技法であると私は考えた。つまり培養細胞を生体内に移植し、角膜内皮細胞の機能を補償するという考え方である。実はこういった試みは今までも報告されてはいるが、既報には臨床応用に向け解決すべき課題が多い。

まず臨床応用へ向けては *in vivo* の検討が不可欠であるが、既報ではヒトの水疱性角膜症とかけ離れたモデルが使用されているため、より適切な動物モデル作製を試みた。

次の問題は、既報での種々の技法は、効果や安全性などの問題で、いずれもそのままでは臨床応用不能と考えられることである。そこで今回私は臨床応用可能性を重視し、現在臨床で普及が進んでいる DSAEK (Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty) の技法を取り入れることを試みた。DSAEK とはドナー角膜から層状に切り取った内皮+薄い実質のみを前房中に挿入し、レシピエント角膜の裏面に貼り付けるという術式である。(図 3) また将来の発展に向けて、培養内皮細胞のみを移植する手法についても検討を行った。

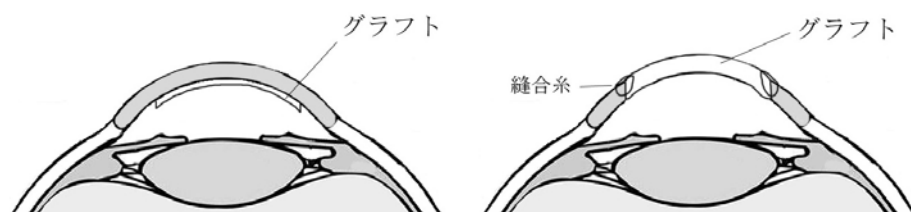


図3 前眼部断面図における DSAEK と PKP の図解 (左) DSAEK は幅 4 mm ほどの狭い切開創からグラフトを挿入して角膜裏面へ接着させる。(右) PKP では 360° の切開によりレシピエント角膜を打ち抜き、グラフトを全周縫合する。

§1 水疱性角膜症動物モデルの作製

水疱性角膜症の動物モデルとして、過去の報告ではウサギ角膜を冷凍凝固することで内皮を脱落させているが、このモデルは二つの重大な問題を抱えている。

まず、ウサギでは内皮機能不全が早期に自然治癒傾向を持つ。さらに冷凍凝固は眼内に強い炎症をもたらす。これらの問題を解決しうる「非炎症、かつ長期に持続する」水疱性角膜症動物モデルの作製を種々の方法で試みた。

(1) サルを用いた水疱性角膜症モデルの作製

ヒトと同様に内皮の分裂能が乏しいとされるサルを用いた検討を行った。まず、内皮細胞を物理的にこすり落として減少させた。(スクレイプモデル) さらに、冷凍凝固を用いる既報の方法も術後に十分な消炎を行った上での利用を試みた。(クライオモデル)

結果、スクレイプモデルでは術後1週間は角膜内皮機能不全の状態となっていた。しかしその後浮腫は減弱し、術後2週の時点では角膜は十分な透明性を回復した。(図4) さらに2回同じ処置を追加したが結果は同じで、最終的に角膜内皮細胞密度の減少すら見られなかった。クライオモデルも、やはり無効であった。



図4 スクレイプモデル 1週後(左)に見られた角膜浮腫は、2週後(右)には消失した。

(2) ウサギを用いた水疱性角膜症モデルの作製

ウサギはサルに比べると多症例での検討を行えること、十分な術後処置や観察を行うことができること、といった利点がある。ただし内皮細胞が高い増殖能を持つという欠点があるため、なるべく長期に安定した非炎症モデルの作製を目指した。

サルと同様の処置法を行うクライオモデル(15例15眼)と、内皮細胞に対して毒性のある0.05%塩化ベンザルコニウムを前房内に注入するモデル(10例10眼)の検討を行った。

クライオモデルは、角膜浮腫を保ちながら非炎症の状態に持ちこむことはできなかった。

塩化ベンザルコニウムモデルでは、4眼で術後3か月以上にわたって浮腫が継続し、炎症も軽度であった。しかし処置に対する反応が一定でないことや、眼内の他の部位への影響の懸念が残った。ただし成功例の組織は、非炎症の角膜内皮機能不全モデルと呼ぶにふさわしく、何らかの工夫が可能であれば、今後利用できるかもしれない。

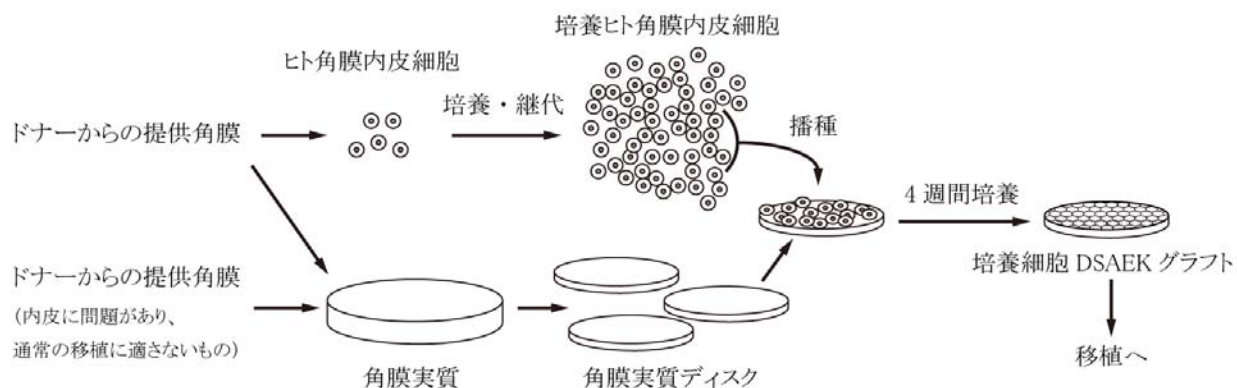
考察

今回種々の方法で不可逆、非炎症性の角膜内皮機能不全動物モデルを作ることを試みたが、結論から言えば安定したモデルを作製することはできなかった。しかし検討の中で、いくつかの貴重な知見が得られた。サルの内皮細胞は少なくともある条件下では十分な分裂能を持つと考えられた。またウサギのクライオモデルでは、眼内炎症の強度と内皮機能の障害程度は不可分のものである可能性が示唆された。これらの結果は、まだ完全に解明されていないヒト水疱性角膜症の病態について、さらにヒト角膜内皮細胞の生理について知る端緒となる可能性がある。

現時点で角膜内皮機能不全の治療法を *in vivo* で検討する際は、コントロールの取り方に注意を払いながら目的に応じたモデルを選択していくことが現実的な解決策と考えられた。

§ 2 培養ヒト角膜内皮細胞を用いた角膜内皮機能不全治療の試み

今回私は、現在臨床で普及の進んでいる DSAEK の技法を生かした培養 HCEC の移植（培養細胞 DSAEK）を試みた。具体的には、薄い角膜実質片の上に培養ヒト角膜内皮細胞を播種し、DSAEK の手法で眼内へ移植するという方法である。（シエーマ参照）



(1) 培養ヒト角膜内皮細胞を用いた DSAEK の試み

1) 培養細胞 DSAEK グラフトの作製

ヒト角膜内皮細胞 (Human Corneal Endothelial Cells; HCEC) は、in vitro では適切な培養条件において増殖する。今回の検討では分離培養第 3~4 世代の HCEC を使用した。

研究用ヒト強角膜片から厚さ 120~150 μm 、直径 8 mm の角膜実質ディスクを作製し、その上に 4.0×10^5 個の培養 HCEC (蛍光ラベル済) を播種した。その後 28 日間培養を行って、「培養細胞 DSAEK グラフト」とした。培養終了時のグラフトの透明性は良好で、HCEC は生体の角膜内皮と同様の性状を持ち、平均細胞密度は 1656 cells/mm^2 であった。(図 5)

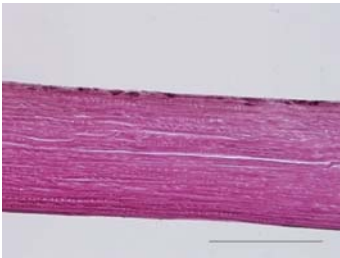


図 5 培養細胞 DSAEK グラフトの組織切片 bar = 100 μm

2) ex vivo モデルを用いたグラフト挿入法の比較

DSAEK ではグラフト挿入時に生じる内皮細胞の損失が、臨床上最大の課題のひとつとなっている。今回 ex vivo の新規システムで、折りたたみ法 (taco-folding 法)、引き込み法 (Busin glide 法、lens glide 法) の 3 種類の挿入法を比較した。(各群 4 枚ずつ)

いずれの群でも通常 DSAEK と同様の細胞脱落パターンが認められた。脱落面積は図 6 の通りで、折りたたみ法群では、いずれの引き込み法の群に対しても有意に大きかった。

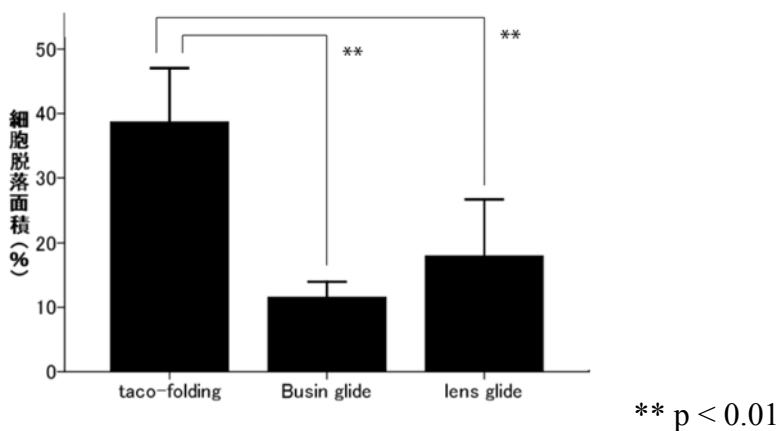


図 6 各挿入法による細胞脱落面積の比較

3) ウサギ眼を用いた in vivo での培養細胞 DSAEK の評価

培養細胞 DSAEK の in vivo における評価を行うため、実際臨床で行われている DSAEK の技法に準じてウサギ眼へ移植手術を行った。(図 7)

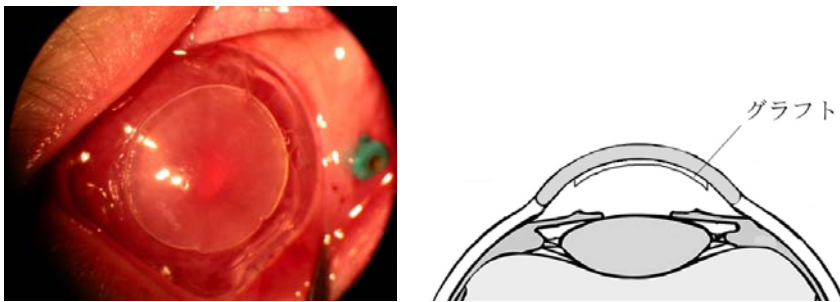


図 7 グラフト挿入後、空気を注入して角膜裏面にグラフトを接着させた状態。

培養細胞 DSAEK 群とコントロール群、それぞれ 7 匹 7 眼とした。コントロール群においては、細胞を播種しない角膜実質ディスクを挿入した。手術後は経時的に術眼の観察と検査を行い、手術から 28 日後にウサギは安楽死させて、組織の評価を行った。

培養細胞 DSAEK 群では時間経過とともに角膜浮腫は減少し透明性も回復するが、コントロール群では経過観察期間内に強い浮腫が引くことはなかった。(図 8) この傾向は中心角膜厚の推移でも確認された。(図 9) なお経過中、重大な合併症は認めなかった。

組織切片では、コントロール群に比べて培養細胞 DSAEK 群では実質浮腫はかなり軽度であった。グラフト裏面はドナー由来の単層細胞層で覆われ、免疫染色では tight junction の形成も示唆された。

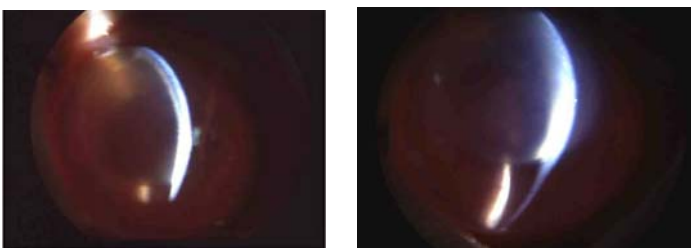


図 8 術後 28 日時点での前眼部所見 (左) 培養細胞 DSAEK 群 (右) コントロール群
培養細胞 DSAEK 群では角膜浮腫の軽減が見られ、眼内の透見性も良い。

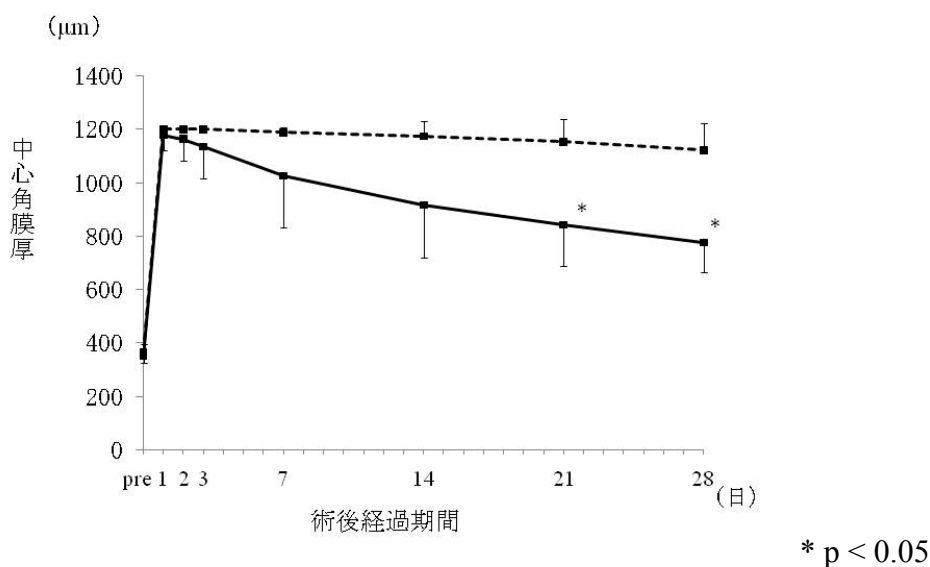


図9 術後角膜厚の推移 培養細胞 DSAEK 群（実線）では術後経過とともに角膜厚が低下し、術後 21 日、28 日の時点ではコントロール群（点線）に比して有意差が見られる。

(2) 培養ヒト角膜内皮細胞単独シートの試作

キャリアを用いない培養 HCEC シートは、より生理的であり、高い視機能や感染症・術後炎症のリスク低下が得られる可能性がある。多孔質の酸化アルミニウム板上に HCEC を 4×10^5 個を播種し 1 週間の培養を行った上で、ピペッターの水流を当てて端から細胞を慎重に剥がした結果、EDTA など細胞間架橋を弱める可能性のある酵素処理を行うことなく、角膜内皮細胞単独シートを作製することができた。顕微鏡所見は正常ヒト角膜内皮の状態に類似しており、細胞密度は約 $3000 \sim 3500$ cells/mm² であった。免疫染色にて内皮に発現するタンパクも確認された。

考察

角膜内皮機能不全の治療法として現在行われている角膜移植が持つ様々な問題点を克服するために、今回私は再生医療の技法を用いた治療法の開発を試みた。

検討した培養細胞 DSAEK では、播種、培養を経た HCEC は生体の角膜内皮細胞に類似した形態を持っており、ウサギ眼における検討でも一定の有効性が確かめられた。培養 HCEC 移植は提供角膜をそのまま移植に用いるよりも、はるかに多くの患者の治療を行うことができる。さらに今回私が試みた方法は、現在臨床において市民権を得ている技法の応用であるため、安全性は高い上、手術手技のラーニングカーブを経る必要もない。新規

の治療法を臨床に持ち込むに当たり、これは大きな利点といえる。

ただし臨床応用に向けては解決すべき問題もいくつか残っている。たとえば、ウサギ眼での検討にて角膜浮腫の消失までには至らず、この結果は再建角膜内皮の機能が不十分であることを示唆している。より細胞密度を上げるなど、培養細胞 DSAEK グラフトの質を向上させることが望ましい。

こういった改善への努力は必要ではあるが、培養細胞 DSAEK は、従前の報告に比べると、培養細胞を用いた角膜内皮機能不全の治療という大きな目的へかなり近づくことのできた方法であると考えている。今後も臨床応用へ向けた検討を重ねていきたい。

その上で今後の研究のさらなる発展の方向性を考えると、まずヒト角膜実質片よりも優れたキャリアの探索が挙げられる。そしてキャリアなしの培養 HCEC 単独シートは、より生理的な状態を達成できる。今回作製したシートは特殊な薬物や処置を必要とせずに作れるため、安全性という点でも優れている。今後移植法の工夫が必要であるが、培養 HCEC 移植の将来像として価値を持つものと考ええる。さらに移植用の細胞ソースは、将来的には自己組織から得られるよう、研究を進めていかねばならない。

今回の培養細胞 DSAEK を中心とした研究成果が臨床応用へとつながり、再生医療の実用化への突破口のひとつとなれば、望外の喜びである。