

Title	角膜の再生医療
Sub Title	Regeneration of the Cornea
Author	坪田, 一男(Tsubota, Kazuo)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.1 (2004. 3) ,p.1- 7
JaLC DOI	
Abstract	The discovery of human embryonic stem (ES) cell lines led to the development of the concept of transplanting stem cells with the potential to differentiate into blood cells, nerve cells and muscle cells. Not only the current standards for transplantation medicine, but the quality of medical services will definitely improve once human ES cells become available. If successful extracorporeal generation of tissues or organs by means of tissue culture is accomplished, it will facilitate regeneration medicine, by which not only transplantation of cells, but also replacement of whole diseased organs or tissues may become a viable objective. Stem cell transplantations in the form of bone marrow transplantation have been extensively applied clinically. Significant advancements in research related to human skin and intestinal mucosal stem cells have already been attained. Following the recent identification of the presence of corneal stem cells, transplantation of the corneal epithelial stem cells has been initiated. The manufacture of corneal epithelial sheets by in vitro incubation of stem cells and their clinical application to transplantation was reported in 2000. Another ongoing project attempts to produce each of the three layers comprising the structure of the cornea separately, and to combine these to produce an artificial cornea. Further research in this area will enable corneal transplantations to use regenerated ES cells or autogenous stem cells while eliminating any reliance on eye bank stem cells.
Notes	総説
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040300-0001">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040300-0001</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

綜 説

角膜の再生医療

東京歯科大学眼科

つば な か い お  
坪 田 一 男

ABSTRACT

Regeneration of the Cornea

*Kazuo Tsubota*

Department of Ophthalmology, Tokyo Dental College Ichikawa General Hospital

The discovery of human embryonic stem (ES) cell lines led to the development of the concept of transplanting stem cells with the potential to differentiate into blood cells, nerve cells and muscle cells. Not only the current standards for transplantation medicine, but the quality of medical services will definitely improve once human ES cells become available. If successful extracorporeal generation of tissues or organs by means of tissue culture is accomplished, it will facilitate regeneration medicine, by which not only transplantation of cells, but also replacement of whole diseased organs or tissues may become a viable objective. Stem cell transplantations in the form of bone marrow transplantation have been extensively applied clinically. Significant advancements in research related to human skin and intestinal mucosal stem cells have already been attained. Following the recent identification of the presence of corneal stem cells, transplantation of the corneal epithelial stem cells has been initiated. The manufacture of corneal epithelial sheets by *in vitro* incubation of stem cells and their clinical application to transplantation was reported in 2000. Another ongoing project attempts to produce each of the three layers comprising the structure of the cornea separately, and to combine these to produce an artificial cornea. Further research in this area will enable corneal transplantations to use regenerated ES cells or autogenous stem cells while eliminating any reliance on eye bank stem cells.

Key words : regenerated cornea, stem cell, eye bank, corneal transplantation

はじめに

ヒト ES 細胞株が樹立され、血液細胞、神経細胞、筋細胞へ分化させた幹細胞を移植するアイデアが現実化しようとしている<sup>1)</sup>。ヒト ES 細胞からの幹細胞が供給できるようになれば、移植医療ばかりでなく医療そのものの質も変わってくると期待されている。細胞レベルの移植ばかりでなく、培養によって組織または器官までも体外で作れるようになることが現実化しつつある。再生医学の走りとも言うべき幹細胞移植は、血液幹細胞移植（骨髄移植）として広く臨床に應用されて

いる。体細胞では皮膚の幹細胞、腸粘膜の幹細胞など上皮細胞の幹細胞の研究が進んでいるが、目の角膜上皮細胞においても最近になって存在位置が確認され<sup>2)</sup>、角膜上皮の幹細胞を移植することによる治療が始まっている<sup>3,4)</sup>。さらに2000年になって幹細胞を *in vitro* で培養して上皮シートを作りこれを移植に使う臨床応用が報告され<sup>5)</sup>、我々も培養上皮移植システムを確立した<sup>6)</sup>。また角膜の3層構造を別々に作りこれをあわせて人工の角膜自体を作るというプロジェクトも進んでいる<sup>7)</sup>。

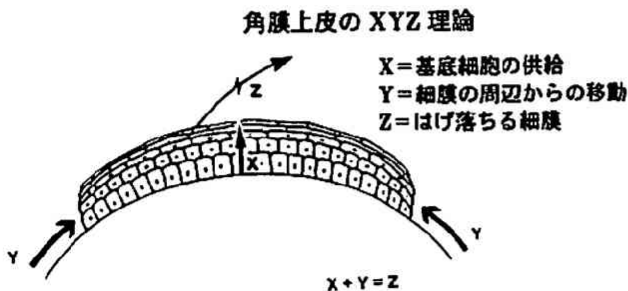
本稿では角膜上皮の幹細胞研究の現状とその技術をもとにした透明組織の再建について述べたい。この領

域は現在急速に臨床応用が進んでいる分野である。近い将来はアイバンクからのステムセルの供給に頼ることなく、ES細胞や自己のステムセルを用いて再生角膜による治療も可能となると思われる。

### 角膜上皮のステムセル

角膜上皮は5~7層の扁平上皮細胞であり、皮膚と違って角化をしない。従来より基底細胞が分裂を行うことが知られていたが、これは現在 transient amplifying cells と呼ばれ、寿命のある細胞群と考えられている。血液細胞で言えば末梢血細胞にあたる。ちょうど血液細胞にとって骨髄細胞にあたるものが、角膜上皮のステムセルである。角膜上皮のステムセルは slow cycling cell であることが確認されている。ステムセルから非常にゆっくりとした細胞分裂によって transient amplifying cell が供給され、この細胞が盛んな細胞分裂をくりかえすことによって細胞層を維持する。Richard Thoft 教授の XYZ 理論によると、はげ落ちる細胞数 Z は基底細胞の供給 X と周辺からの移動の Y の和によって保たれるわけだが、この X が transient amplifying cell の分裂にあたる<sup>9)</sup>。そして Y にあたるものが、ステムセルからのゆっくりとした供給である(第1図)。

今までステムセルの存在自体、およびその場所についてはさまざまな論議があったが、近年ステムセルは角膜輪部に存在することがわかってきた<sup>2,9,10)</sup>。この概念は今まで理解できなかったさまざまな現象を説明することができる。たとえばアルカリ外傷で角膜上皮に血管が高度に侵入してしまうのは、角膜上皮細胞のステムセルが消失したため、周辺より結膜上皮細胞が角膜実質上に侵入

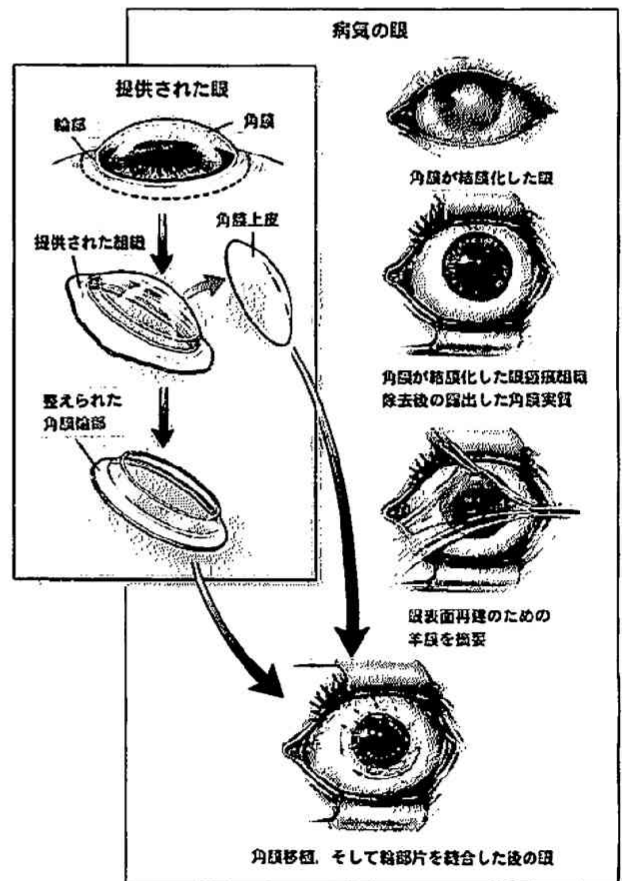


第1図 角膜輪部に角膜上皮のステムセルが存在し、これが角膜中央部に動いて上皮基底細胞になる。これが transient amplifying cell と呼ばれる寿命のある細胞である。(Thoft R, et al: The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. Invest Ophthalmol Vis Sci 4: 1442-1443, 1983 より転載許可を得て掲載)

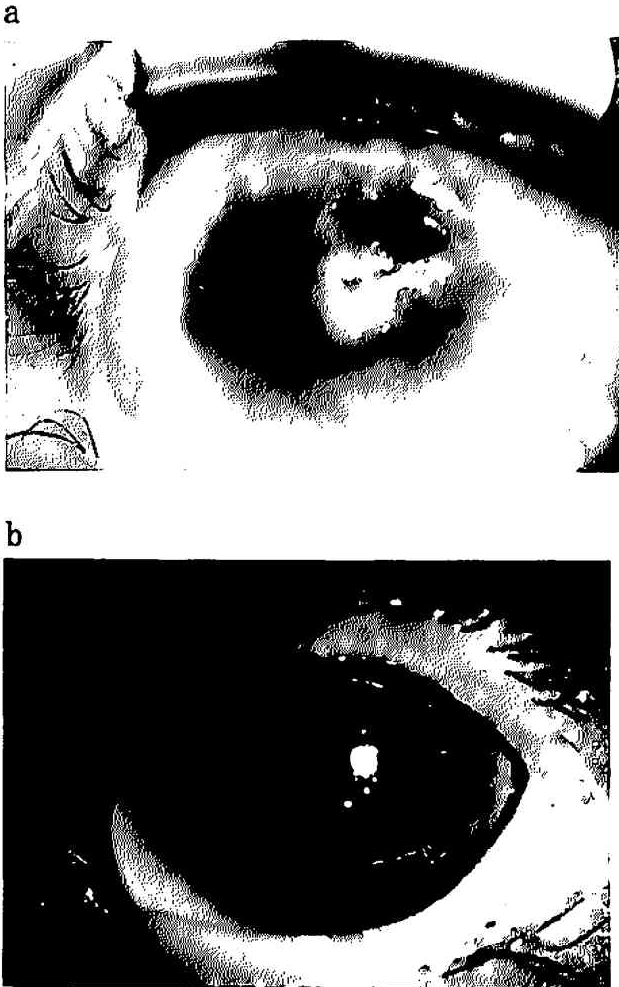
していると解釈されている<sup>11)</sup>。視力が障害されるのはこのためである。

### 角膜上皮のステムセル移植

スティーブンス・ジョンソン症候群や化学傷・熱傷などの重症疾患は、角膜ステムセルを含む輪部も広範囲に障害される。輪部機能不全を伴う疾患の眼表面を再構築するには、角膜上皮のステムセルを移植する必要がある。すでに臨床応用されている術式として、障害されていない健眼から組織を採取して移植する自家移植の方法が普及している<sup>12)</sup>。角膜上皮を供給するためには輪部全周は必要なく、健眼から一部を移植するだけで角膜上皮の構築ができることが証明された<sup>12)</sup>。自家移植であるから拒絶反応は認められず、熱傷や、化学傷の症例で片眼が健



第2図 角膜上皮のステムセル移植概念図 (Tsubota K, et al: Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelium stem-cell transplantation. N Engl J Med 340: 1697-1703, 1999 より転載許可を得て掲載)



第3図 角膜上皮のステムセル移植の術前・術後  
(Tsubota K, et al : Treatment of severe dry eye.  
Lancet 348 : 123, 1996 より転載許可を得て掲載)

常な症例が適応となる。

しかし、両眼が傷害された症例に角膜上皮のステムセルを移植するには、ドナー組織が必要である。ドナー角膜輪部移植は中央の透明な角膜を移植する従来角膜移植とは異なり、周辺の組織のみを移植する(第2図)。ドナー輪部に含まれるステムセルが後に transient amplifying cell (TAC) 細胞に移行しつつ、レシピエント角膜を再生すると考えられている。移植したステムセルが永続的に機能しているかは常に議論されている点であるが、我々はドナーとレシピエントの性別が異なる症例において、輪部移植後一年以上経過してもドナー由来の細胞が中央角膜に存在することを証明した<sup>13)</sup>。角膜輪部移植は諸外国でも普及しつつあり、適応を慎重に選ぶことによって本来の角膜移植では救済できなかった症例も治療の対象となった(第3図)<sup>14)</sup>。ところが、ここで問

題となるのはドナー不足である。アメリカなどの一部先進国以外ではドナー角膜数が慢性的に不足しており、この問題を解消するために最近では患者自身の組織を利用する方法や数少ないドナー組織を有効利用する試みが始まった。将来的には、ドナー組織を必要としない方法としてステムセルから必要な細胞を分化誘導する技術が可能になると予想される。

### 羊膜移植

胎盤組織の羊膜を角膜上皮基底膜の代替組織として用いる方法がアメリカのグループによって報告された<sup>15)</sup>。羊膜には厚い基底膜があり、上皮細胞の接着、遊走を促すIV型、V型コラーゲンとラミニンを豊富に含んでいる。角膜上皮がなかなか修復しない遷延性上皮欠損に対して、羊膜移植によって上皮化を促進させることが可能である。羊膜には多くの生理機能があると考えられており、新生血管抑制、抗炎症効果、上皮細胞の接着亢進、増殖組織の癒着抑制が挙げられている。また、羊膜そのものは免疫原性が低く、拒絶反応が少ないことも利点と言える。羊膜を代理基底膜として用いることで、ケラチンなどの角膜上皮固有の遺伝子が正常に分化することも証明されている<sup>16)</sup>。上皮化組織の重度な癒着化を来す翼状片や、眼類天疱瘡の手術ではすでに羊膜は必需品となっている(第4図)。

羊膜は基底膜移植以外にも、炎症を抑えることを目的に一次的な被覆(パッチ)として眼球表面に被せる場合もある。細胞浸潤や充血を抑制し、炎症を抑えることによって、基底膜としての効果との相乗効果があると考えられている<sup>17)</sup>。また、羊膜中に含まれる様々な成長因子



第4図 羊膜移植(再生医療 Vol. 2, No. 3より転載許可を得て掲載)

やサイトカインも創傷治癒過程に貢献しているという報告もあり、角膜輪部移植と羊膜移植を組み合わせることにより、今まで治療が不可能であった症例にも治療の望みがでてきた。

### 培養角膜上皮移植

ステムセル不全を来した片眼性症例では、健常眼の角膜より輪部組織を採取することが可能であるとすでに述べた。病変が広範囲におよぶ症例では、まず基質として羊膜を移植して、その上に上皮を進展させる方法がとられてきた。しかし、創傷治癒が遅くなる症例では炎症が悪化し、それによってさらに上皮化が得られないと言う悪循環に陥る場合がある。最悪な場合は、貴重な自己組織が無駄になることもあり得る。そこで限られた組織で広い範囲を被覆するために、tissue engineeringの技術によって、あらかじめ羊膜上に上皮を培養した移植片を用いる方法が開発された。培養シャーレ内に羊膜を一層敷き、ドナー角膜、あるいは患者より採取した少量の細胞を培養する。とくにエアリフトと呼ばれる方法で、培養細胞面を空気と接することにより重層化した上皮が2~3週間で得られる(第5図)<sup>6)</sup>。

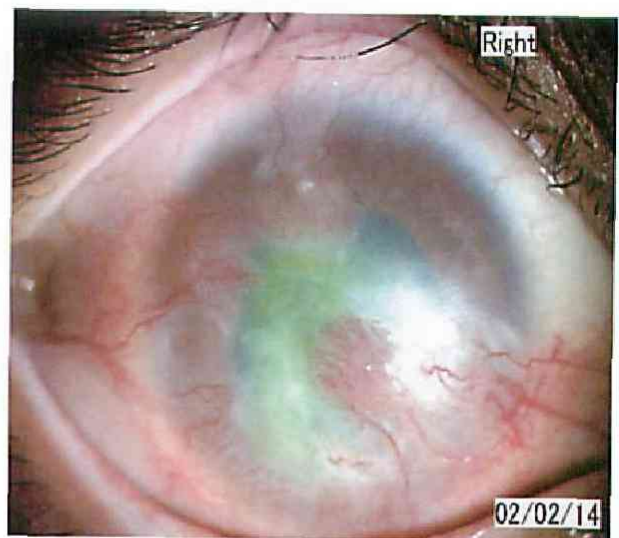
培養上皮移植は、羊膜単独の移植に比べて早期より創傷治癒が得られるメリットがあり、炎症を抑える効果がある。また、増殖した細胞の中には未分化な細胞も含まれていることが示唆されており、少量のステムセルから角膜上皮を再生できる可能性を秘めている。我々の施設でも倫理委員会の承認を得てすでに20例以上の症例に対して本術式を行っており治療成績も向上している(第6図)。

培養上皮移植は少量の細胞で大きな移植片が作成でき

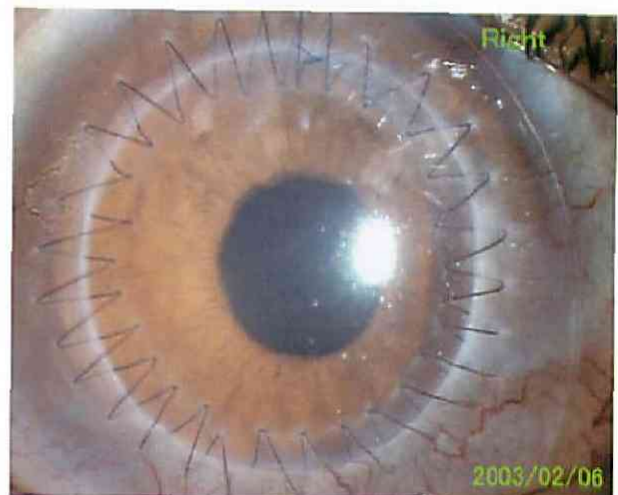


第5図 羊膜上に培養された角膜上皮の位相差写真

### 術前



### 術後



第6図 角膜上皮のステムセルの自己培養移植を行った症例(アルカリ外傷)の術前、術後。術前の写真で、透明な角膜上皮が一部存在することがわかる。この部分を培養して移植した。角膜実質も混濁していたので、培養移植後に通常の角膜移植を併用した。

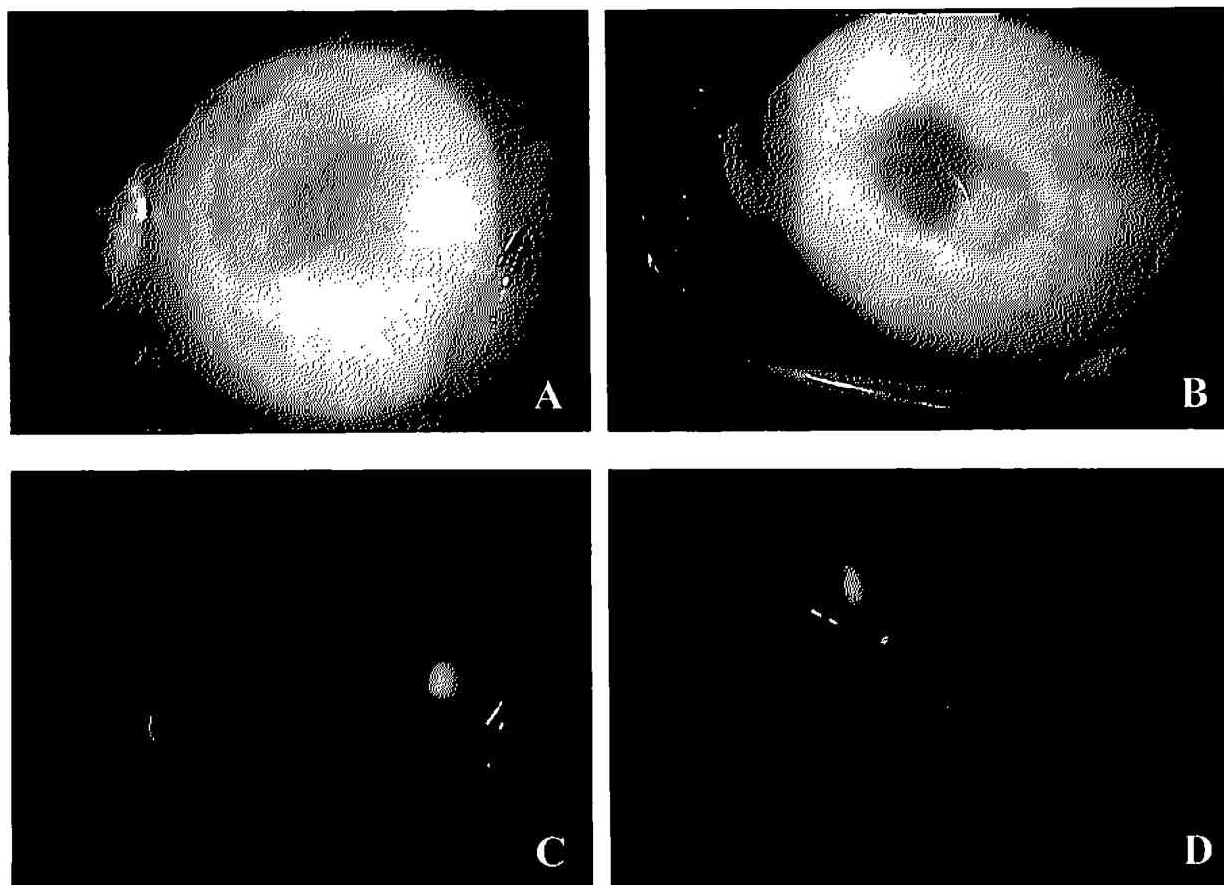
る利点がある一方で、改善しなければならない問題もある。培養液は血清を添加する必要があるものの、ウシ血清ではプリオンによる汚染が絶対ないという保障はなく、臨床サンプルに使用すべきでないという意見もある。我々はレシピエントとなる患者からのヒト血清を培地に添加するようにしている。2mm角の小さな組織でも、2か

ら3週間で35 mmの培養皿一面ほどの細胞が得られる。羊膜上に培養された角膜上皮細胞シートは、細胞-細胞間のタイトジャンクションや、デスモゾームの構築が認められ、ヘミデスモゾームや接着点を介して基底膜に接着している。

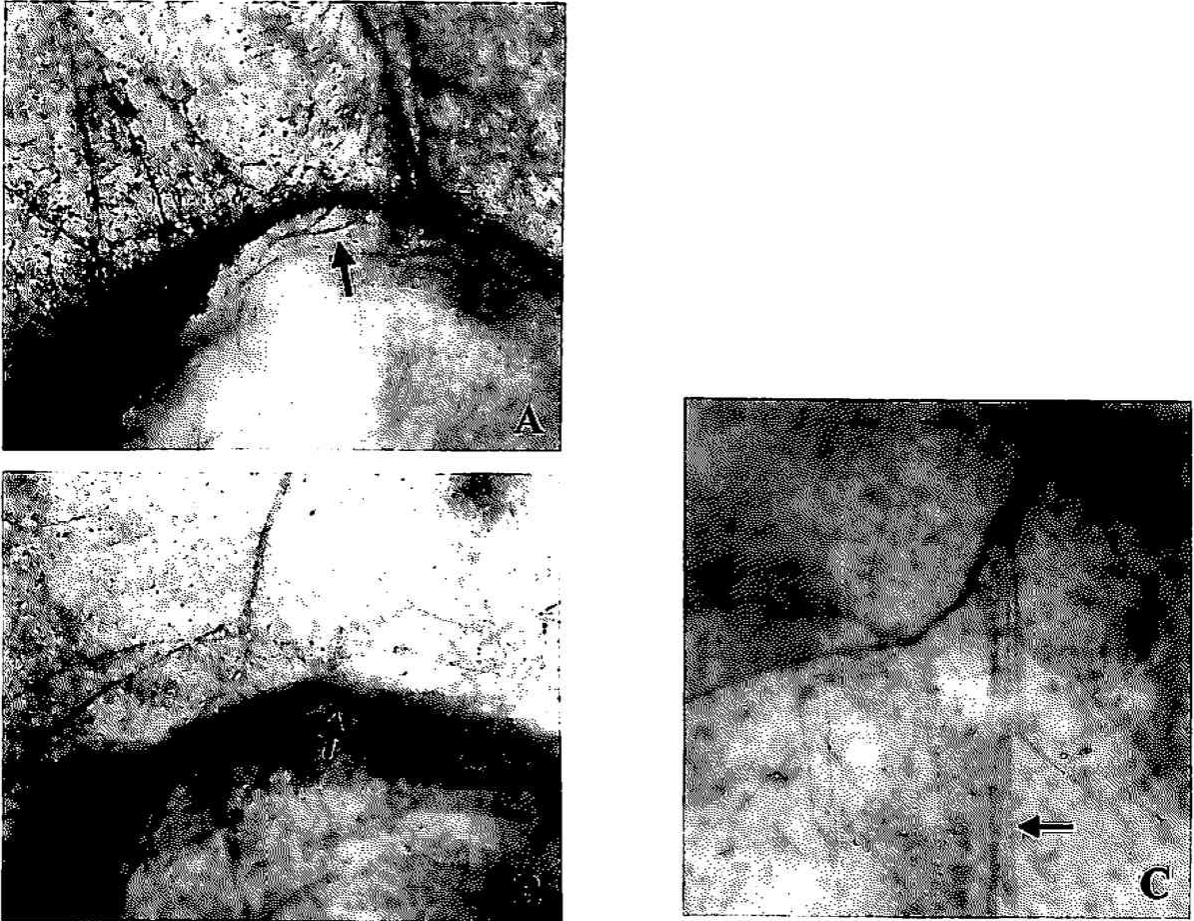
### 人工角膜

組織工学を用いない合成ポリマーを基材とした人工角膜の開発にも長い歴史がある。現在では polymethyl methacrylate (PMMA) や polytetrafluoroethylene (ePTFE) などのプラスチック系素材を用いた人工角膜が患者へ移植されている。これらの人工角膜では生体適合性が最大の問題であり、感染や人工角膜の脱落が問題となる。我々は、合成ポリマーや天然ポリマーを組み合わせる方法で何種類かの人工角膜の開発中である(第7図)<sup>18)</sup>。合成ポリマーと天然ポリマーを配合することに

より、生体内での安定性が改善することを見いだした。炎症細胞の浸潤などの所見はみられず、神経線維が再生する所見も得られた(第8図)<sup>19)</sup>。しかし、周辺の実質細胞の活性化は依然として見られ、角膜の透明性を確保する上では障害となりうる。また、長期での安定性は未だ不明であり、今後更なる素材の改善が必要と考えられた。耐久性の問題点を克服するために、生体適合性の高い素材を開発しなければならない。人工角膜を作成する際にポリマーを必要とするのは、角膜実質の代替となるものが現状ではドナー角膜組織しかないからである。実質に含まれるコラーゲンやグリコサミノグリカンを再構築すれば、角膜実質細胞にとって適切な環境を作成することもできるかもしれない。



第7図 家兎角膜の実質ポケット内に移植した凍結保存ヒト羊膜 (A, C) とコラーゲン系ポリマー (B, D) (Shimmura S, et al : Collagen-poly (N-isopropylacrylamide)-based membranes for corneal stroma scaffolds. Cornea 22 : S81-S88, 2003 より転載許可を得て掲載)



第8図 再生神経 (Shimmura S, et al : Collagen-poly (N-isopropylacrylamide)-based membranes for corneal stroma scaffolds. *Cornea* 22 : S81-S88, 2003 より転載許可を得て掲載)

### おわりに

羊膜と角膜上皮ステムセルを用いた培養上皮移植は、角膜再生医療の第一歩であることは間違いない。しかし、角膜の構造は実質と内皮を含む三層構造であり、最終的に角膜を再生するには各層の再構築も必要となる。現在は実質を作成するための素材開発や、実質細胞の colonization についての研究が盛んに行われている。今後は各細胞層のステムセルを分離同定する作業と、embryonic stem cell (ES細胞) から分化誘導する研究は同時に進行するであろう。そして遺伝子導入技術で免疫回避などによって組織適合性が向上すれば、近い将来に角膜再生が実現すると思われる。

### 文 献

1) Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Waknitz M, Swiergiel J, Marshall V, Jones J : Embryonic stem

cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 : 1145-1147, 1998

- 2) Cotsarelis G, Cheng S, Dong G, Sun T, Lavker R : 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
- 3) Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J : Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelium stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 340 : 1697-1703, 1999
- 4) Tsubota K, Toda I, Saito H, Shinozaki N, Shimazaki J : Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 102 : 1486-1496, 1995
- 5) Tsai R, Li L, Chen J : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 343 : 86-93, 2000
- 6) Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S.

- Tsubota K : Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 109 : 1285-1290, 2002
- 7) Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon C, Laycock N, Hakim M, Song Y, Watsky M : Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 286 : 2169-2172, 1999
  - 8) Thoft R, J Friend : The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 : 1442-1443, 1983
  - 9) Schermer A, Galvin S, Sun T. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103 : 49-62, 1986
  - 10) Wei G, Cotsarelis G, Sun T, Lavker M : Label-retaining cells are preferentially located in fornical epithelium : implications on conjunctival epithelial homeostasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : 236-246, 1995
  - 11) Puangsricharern V, Tseng S : Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 102 : 1476-1485, 1995
  - 12) Kenyon K, Tseng S : Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96 : 709-722, 1989
  - 13) Shimazaki J, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Munkhbat B, Hagihara M, Tsuji K, Tsubota K : Evidence of long-term survival of donor-derived cells after limbal allograft transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1664-1668, 1999
  - 14) Tsubota K, Satake Y, Shimazaki J : Treatment of severe dry eye. *Lancet* 348 : 123, 1996
  - 15) Kim J, Tseng S : Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14 : 472-484, 1995
  - 16) Koizumi N, Cooper L, Fullwood N, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, Kinoshita S : An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2114-2121, 2002
  - 17) Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K : Anti-inflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 20 : 408-413, 2001
  - 18) Shimmura S, Doillon CJ, Griffith M, Nakamura M, Gagnon E, Usui A, Shinozaki N, Tsubota K : Collagen-poly (N-isopropylacrylamide)-based membranes for corneal stroma scaffolds. *Cornea* 22 : S81-S88, 2003