

課題番号	LS117
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)  
実施状況報告書(平成23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	ヒト角膜内皮細胞の増殖を可能にする革新的基盤技術の開発と角膜再生医療への応用
研究機関・部局・職名	同志社大学・生命医科学部・教授
氏名	小泉 範子

1. 当該年度の研究目的

<p>通常では増殖しない細胞であるヒト角膜内皮細胞を増殖させ、角膜内皮機能不全に対する新規治療法を開発することを最終目標として、平成23年度は以下の5つを目的とした研究を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li><b>1. 霊長類の角膜内皮幹細胞の未分化性維持に関わる因子の解明</b> 種々のフィーダー細胞を用いた共培養を行い、角膜内皮細胞の幹細胞および幹細胞の未分化性を維持する微小環境を提供するために有用な培養条件を明らかにする。</li> <li><b>2. ROCK阻害剤の作用機序の解明による角膜内皮の細胞増殖の制御</b> 角膜内皮の細胞周期制御分子へのROCKシグナルの影響についての解析を推進する。</li> <li><b>3. 角膜内皮細胞の上皮間葉移行(EMT: Epithelial-Mesencymal Transition)の制御</b> 培養角膜内皮細胞を用いたin vitro EMT誘導モデルを作成し、本モデルを用いることにより形質転換抑制に役立つ薬物をスクリーニングし、1つ以上の候補薬剤を見つける。</li> <li><b>4. 培養角膜内皮細胞を用いた細胞注入治療の開発</b> 臨床応用可能なヒト培養角膜内皮細胞作製技術を確認し、①3回以上継代可能であり、②正常角膜内皮細胞の形態と機能を維持した培養ヒト角膜内皮細胞を安定して作成するためのプロトコールを完成する。</li> <li><b>5. 角膜内皮疾患治療薬の開発</b> 角膜移植予定患者を対象として実施したRhoキナーゼ阻害剤の点眼治療の臨床研究結果の解析を行い、安全性と有用性を評価する。</li> </ol>
--

2. 研究の実施状況

<ol style="list-style-type: none"> <li><b>1. 角膜内皮幹細胞の未分化性維持に関わる因子の解明</b> 4種類のフィーダー細胞および馴化培地を用いてヒト角膜内皮細胞を培養し、正常の角膜内皮細胞の未分化性を維持しながら継代培養を可能にする培養条件を明らかにした(特許出願準備中)。またヒト胎盤由来脱落膜細胞が産生する細胞外基質を用いることにより、動物由来の基質を用いることなくヒト角膜内皮細胞を培養することが可能であることを示した(学会発表済、論文作成中)。</li> <li><b>2. ROCK 阻害剤の作用機序の解明</b></li> </ol>
--

様式19 別紙1

培養サルおよびヒト角膜内皮細胞に対する Y-27632 の細胞増殖に対する影響を評価するために、リアルタイム PCR およびウェスタンブロッティングによる細胞周期関連因子の解析を行った。

3. 角膜内皮細胞の EMT の制御

角膜内皮細胞は培養することによって線維芽細胞様に形態変化し、機能関連タンパクの発現を喪失することから EMT を生じていることが推測される。角膜内皮細胞の EMT を制御する化合物を発見し、複数の化合物の組み合わせによってヒト角膜内皮培養の正常化を可能にする技術を開発した（特許出願中）。

4. 培養角膜内皮細胞の注入治療法の開発

ウサギとサルを用いた培養角膜内皮細胞注入移植を行い、有用性と眼局所安全性の確認を行った（学会発表済、論文発表）。さらに①3 回以上継代可能であり、②正常角膜内皮細胞の形態と機能を維持した培養ヒト角膜内皮細胞を安定して作成するためのプロトコールを作成し、カニクイザル水疱性角膜症モデルへの移植実験による予備的検討を行った（学会発表予定）。

5. 角膜内皮疾患治療薬の開発

初期の水疱性角膜症に対する Y-27632 点眼治療の安全性と有用性の検討を行った（学会発表、論文投稿中）。製薬企業との共同研究により製品化の可能性のある ROCK 阻害剤を用いた in vitro 実験を開始した。さらに、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の承認を得て、角膜移植後眼に対する ROCK 阻害剤点眼の臨床研究を開始した。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 4 件
計 5 件	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Okumura N, <u>Koizumi N*</u>, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Hirata K, Torii R, Hamuro J, Kinoshita S: Enhancement of corneal endothelium wound healing by a ROCK inhibitor eye drop. British Journal of Ophthalmol. 95(7): 1006-1009, 2011. (*corresponding author)</li> <li>2. Okumura N, <u>Koizumi N</u>, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Hamuro J, Kinoshita S: The new therapeutic concept of using a rho kinase inhibitor for the treatment of corneal endothelial dysfunction. Cornea. 30 Suppl 1:S54-59. 2011.</li> <li>3. <u>Koizumi N</u>, Okumura N, Kinoshita S: Development of new therapeutic modalities for corneal endothelial disease focused on the proliferation of corneal endothelial cells using animal models. Experimental Eye Reseach. 95: 60-67, 2012.</li> <li>4. <u>小泉範子</u>, 奥村直毅, 木下茂: 臨床応用を目指した角膜内皮再生医療の開発. 同志社大学理工学研究報告. 52(4): 31-36, 2012.</li> </ol>
	(掲載済み一査読無し) 計 0 件
	(未掲載) 計 1 件
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Okumura N, <u>Koizumi N*</u>, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Tsuchiya H, Hamuro J, Kinoshita S: A ROCK inhibitor converts corneal endothelial cell into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. American Journal of Pathology. In press. (*corresponding author)</li> </ol>

会議発表	専門家向け 計 29 件
計 31 件	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <u>Koizumi N</u>: New strategy for corneal endothelial tissue engineering. A JSPS-Sponsored Research Symposium at Cardiff University “The Cornea and Tissue Engineering”. Cardiff, U.K., 2011.8.19</li> <li>2. Hatanaka H, Okumura N, <u>Koizumi N</u>, Hamuro J, Kinoshita S: Effect Of PPAR<math>\gamma</math> Agonist On The Fibrotic Change In Retinal Pigment Epithelium And Vitreous Cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2011, Florida, USA, 2011.5.3</li> <li>3. Yamada K, Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, <u>Koizumi N</u>, Kinoshita S: Prostaglandin E Receptor Subtype Ep4 Expression In Human Conjunctival Epithelium And Its Changes In Various Ocular Surface Disorders. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2011, Florida, USA, 2011.5.4</li> <li>4. Kumagai K, <u>Koizumi N</u>, Okumura N, Yamazaki K, Ueno M, Sakamoto Y, Yoshimura N, Hamuro J, Kinoshita S: ROCK Inhibition Regulates the Cell Adhesion of Corneal Endothelial Cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2011, Florida, USA, 2011.5.5</li> <li>5. Okumura N, <u>Koizumi N</u>, Yamasaki K, Ueno M, Sakamoto Y, Sowa Y, Sakai T, Hamuro J, Kinoshita S: ROCK Inhibitor Regulates the G1-S Progression of Corneal Endothelial Cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2011, Florida, USA, 2011.5.5</li> <li>6. <u>Koizumi N</u>, Okumura N, Yamasaki K, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Torii R, Hamuro J, Kinoshita S: Cell-Injection Therapy using Cultivated Corneal Endothelial Cells Combined with a ROCK Inhibitor in a Primate Model. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2011, Florida, USA, 2011.5.5</li> <li>7. <u>Koizumi N</u>, Okumura N, Kinoshita S: New strategy for corneal endothelial tissue engineering. Schepens Eye Research Institute 27<sup>th</sup> Biennial Cornea Conference. Boston, USA, 2011.10.1</li> <li>8. 奥村直毅, <u>小泉範子</u>, 山崎健太, 上野盛夫, 坂本雄二, 羽室淳爾, 木下茂: 角膜内皮細胞の細胞接着に対する Rho キナーゼの影響. 第 115 回日本眼科学会総会, 東京, 2011.5.13.</li> <li>9. 篠宮克彦, 上田真由美, 外園千恵, 稲富勉, 横井則彦, <u>小泉範子</u>, 木下茂: 特発性周辺部角膜潰瘍の病変部結膜組織の免疫組織学的検討. 第 115 回日本眼科学会総会, 東京, 2011.5.13.</li> <li>10. 畑中宏樹, 奥村直毅, <u>小泉範子</u>, 羽室淳爾, 木下茂: PPAR<math>\gamma</math> 作動薬による網膜色素上皮細胞および硝子体細胞の線維性変化への影響. 第 115 回日本眼科学会総会, 東京, 2011.5.13.</li> <li>11. <u>小泉範子</u>, 奥村直毅, 山崎健太, 上野盛夫, 坂本雄二, 高橋浩昭, 鳥居隆三, 羽室淳爾, 木下茂: 水泡性角膜症に対する培養角膜内皮細胞注入治療の試み. 第 32 回日本炎症・再生医学会, 京都, 2011.6.3.</li> <li>12. 奥村直毅, <u>小泉範子</u>, 上野盛夫, 坂本雄二, 高橋浩昭, 鳥居隆三, 羽室淳爾, 木下茂: 角膜内皮機能不全に対する選択的 Rho キナーゼ阻害剤点眼治療法の開発. 第 32 回日本炎症・再生医学会, 京都, 2011.6.3.</li> <li>13. <u>小泉範子</u>: サイトメガロウイルス角膜内皮炎の診断と治療. スリーサム京都 2011. 京都, 2011.7. 8 (2010 年度日本眼感染症学会学術奨励賞 (三井賞) 受賞講演)</li> <li>14. <u>小泉範子</u>, 奥村直毅, 上野盛夫, 羽室淳爾, 木下茂: 角膜内皮再生医療の現</li> </ol>

- 状と展望. 第 65 回日本臨床眼科学会, 東京, 2011.10.7.
15. 畑中宏樹, 奥村直毅, 小泉範子, 羽室淳爾, 木下茂: PPAR $\gamma$  作動薬による網膜色素上皮細胞および硝子体細胞の線維性変化への影響. 第 65 回日本臨床眼科学会, 東京, 2011.10.8.
  16. 稲富勉, 外園千恵, 中村隆宏, 小泉範子, 都田桂子, 松山琴音, 木下茂: 自家培養口腔粘膜上皮シート移植による結膜嚢再建効果の検討. 第 65 回日本臨床眼科学会, 東京, 2011.10.8.
  17. 外園千恵, 稲富勉, 中村隆宏, 小泉範子, 横井則彦, 都田桂子, 松山琴音, 木下茂: 難治性角結膜疾患に対する自家培養口腔粘膜上皮シート移植のレトロスペクティブ調査. 第 65 回日本臨床眼科学会, 東京, 2011.10.8.
  18. 上田真由美, 外園千恵, 稲富勉, 横井則彦, 小泉範子, 木下茂: 特発性周辺部角膜潰瘍の病変部結膜におけるプロスタグランジン E2 受容体 EP3 の発現. 第 65 回日本臨床眼科学会, 東京, 2011.10.8.
  19. 布川将来人, 山口浩明, 小泉範子, 奥村直毅, 横内久猛, 廣安知之: 進化的画像処理を用いた細胞抽出の検討. 進化計算シンポジウム 2011, 宮城, 2011.12.17.
  20. 小泉範子: 角膜内皮再生医療の近未来像. 角膜カンファレンス 2012 第 36 回日本角膜学会総会 第 28 回日本角膜移植学会. 東京, 2012.2.24.
  21. Ho LTY, Caterson B, Meek KM, Quantock AJ, 奥村直毅, 小泉範子: Elevated keratan sulphate in the corneal stroma cultured at low oxygen tension. 角膜カンファレンス 2012 第 36 回日本角膜学会総会 第 28 回日本角膜移植学会. 東京, 2012.2.23.
  22. 日野智之, 外園千恵, 上田真由美, 小泉範子, 福本暁子, 稲富勉, 木村直子, 渡辺彰英, 木下茂: 羊膜移植が奏功した抗 BP180 型粘膜類天疱瘡の 2 例. 角膜カンファレンス 2012 第 36 回日本角膜学会総会 第 28 回日本角膜移植学会. 東京, 2012.2.23.
  23. 平田香菜, 中村隆宏, 外園千恵, 稲富勉, 奥村直毅, 小泉範子, 横井則彦, 木下茂: 結膜扁平上皮癌における GPR49 の発現の検討. 角膜カンファレンス 2012 第 36 回日本角膜学会総会 第 28 回日本角膜移植学会. 東京, 2012.2.23.
  24. 沼田諒平, 奥村直毅, 中原マキ子, 上野盛夫, 木下茂, 金村米博, 笹井芳樹, 小泉範子: ヒト脱落膜由来間葉細胞から作成したマトリクスを用いたヒト角膜内皮細胞培養法の検討. 角膜カンファレンス 2012 第 36 回日本角膜学会総会 第 28 回日本角膜移植学会. 東京, 2012.2.23.
  25. 山本雄士, 稲富勉, 小泉範子, 外園千恵, 中川紘子, 宮本佳菜恵, 細谷友雅, 横井則彦, 木下茂: サイトメガロウイルス角膜内皮炎に対するガンシクロビルを併用した角膜移植の治療成績. 角膜カンファレンス 2012 第 36 回日本角膜学会総会 第 28 回日本角膜移植学会. 東京, 2012.2.23.
  26. 古賀彩加, 上田真由美, 石井優, 小泉範子, 木下茂: LysM-GFP マウスを用いた角膜アルカリ外傷における炎症病態の解析. 角膜カンファレンス 2012 第 36 回日本角膜学会総会 第 28 回日本角膜移植学会. 東京, 2012.2.24.
  27. 堀内稔子, 中川紘子, 稲富勉, 上田真由美, 中村隆宏, 小泉範子, 外園千恵, 横井則彦, 木下茂: 全層角膜移植の 11 年間の動向と治療成績. 角膜カンファレンス 2012 第 36 回日本角膜学会総会 第 28 回日本角膜移植学会. 東京, 2012.2.24.
  28. 小泉範子, 稲富勉, 大橋裕一, 井上幸次, 望月學, 西田幸二: サイトメガロウイルス角膜内皮炎の発症状況に関する実態調査. 角膜カンファレンス 2012 第 36 回日本角膜学会総会 第 28 回日本角膜移植学会. 東京, 2012.2.25.
  29. 奥村直毅, 小泉範子, 坂本雄二, 鳥居隆三, 上野盛夫, 羽室淳爾, 木下茂: 霊長類角膜内皮障害モデルを用いた選択的 Rho キナーゼ阻害剤点眼治療法の開発. 角膜カンファレンス 2012 第 36 回日本角膜学会総会 第 28 回日本角膜移植学会. 第 116 回日本眼科学会総会, 東京, 2012.2.25.

一般向け 計 2 件

1. 小泉範子: 角膜内皮再生医療の現状と展望. 第 158 回岡山眼科医会生涯教育講座.

様式19 別紙1

	岡山, 2011.7.24. 2. <u>小泉範子</u> : サイトメガロウイルス角膜内皮炎の診断と治療. 京都府眼科医会夏季集 団会. 京都, 2011.7.30.
図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状 況  計0件	(取得済み) 計0件  (出願中) 計0件
Webページ (URL)	1. 同志社大学 HP および生命医科学部ホームページ <a href="http://biomedical.doshisha.ac.jp/news.cgi?c=news1-2&amp;pk=98">http://biomedical.doshisha.ac.jp/news.cgi?c=news1-2&amp;pk=98</a> 「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(小泉範子教授)らの 研究が日経産業新聞1面に報道」2012.2.15. 2. 同志社大学 HP および生命医科学部ホームページ <a href="http://biomedical.doshisha.ac.jp/news.cgi?c=news1-2&amp;pk=94">http://biomedical.doshisha.ac.jp/news.cgi?c=news1-2&amp;pk=94</a> 「生命医科学部医工学科の学生の発表が第22回日本緑内障学会で優秀ポスター賞 を受賞」2011.11.07.
国民との科 学・技術対話 の実施状況	1. 2011年6月6日 駿台予備学校生命医科学特別講演会(駿台予備学校京都校)97名 の現役高校生および浪人生を対象に、「再生医療で光を取り戻す—角膜再生医療の 実際—」のテーマで再生医療および組織幹細胞を用いた角膜疾患に関する特別講 演を行った。講演の後、学生との集団および個別面接による対話を実施した。 2. 2011年6月18日 同志社学内高校説明会(同志社大学)同志社高校、同志社香里 高校、同志社女子高校、同志社国際高校の学生約110名を対象に、研究室公開およ び最新の研究機器を用いた参加者体験型の公開実験を行い、角膜再生医療研究につ いて紹介した。 3. 2011年7月24日 同志社大学オープンキャンパス(同志社大学)広く一般からの 来訪者約80名に対する研究室公開および最新の研究機器を用いた参加者体験型の 公開実験を行い、角膜再生医療研究について紹介した。 4. 2011年10月21日 第10回「再生医療の実用化に関するニーズ発表会」神戸臨床 研究情報センター(TRI)財団法人先端医療振興財団が主催する表記の発表会にお いて、一般・企業からの参加者55名を対象に「実用化を目指した角膜内皮再生医 療の開発」のタイトルで講演を行った。 5. 2011年11月30日 「再生医療集中セミナー:再生医療の全体像を見わたせる分か りやすい解説講座」(京都リサーチパーク)企業・研究者ら20名を対象に「角膜内 皮再生医療の現状と展望」のタイトルで講演を行った。
新聞・一般雑 誌等掲載 計1件	日経産業新聞. 2012年2月10日. 1面. 「角膜内皮の再生 臨床へ 細胞を培養、13年度から 移植待ち減らす」
その他	

4. その他特記事項 なし

## 実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

## 1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	113,000,000	48,000,000	1,000,000	64,000,000	0
間接経費	33,900,000	14,400,000	300,000	19,200,000	0
合計	146,900,000	62,400,000	1,300,000	83,200,000	0

## 2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を 除く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	47,063,872	1,000,000	0	48,063,872	47,355,596	708,276	0
間接経費	14,400,000	300,000	0	14,700,000	14,700,000	0	0
合計	61,463,872	1,300,000	0	62,763,872	62,055,596	708,276	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	32,015,890	蛍光顕微鏡、眼球組織、角膜組織、実験試薬
旅費	2,941,960	研究成果発表(アメリカ)、実験・共同研究(滋賀医科大)
謝金・人件費等	10,986,658	研究員人件費
その他	1,411,088	角膜送料、動物実験施設利用料
直接経費計	47,355,596	
間接経費計	14,700,000	
合計	62,055,596	

## 4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
HSオールインワン 蛍光顕微鏡一式	株)キーエンス	1	12,600,000	12,600,000	2011.4.14	同志社大学
T3000 Thermocycler		1	1,249,500	1,249,500	2011.6.8	同志社大学
CO2インキュベ ーター	MCO-19AIC(UV)	1	945,000	945,000	2011.10.26	同志社大学