

20000425

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「ヒト羊膜を用いた再生表層角膜移植片における免疫学的研究」

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 坪田 一男

平成13（2001）年3月

## 目次

I. 総括研究報告書		
「ヒト羊膜を用いた表層角膜移植片 における免疫学的研究」	_____	1
坪田 一男		
II. 分担研究報告書		
1 「ヒト羊膜を用いた培養角膜上皮移植に 関する研究」	_____	4
木下 茂		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	6
IV. 研究成果の刊行物・別冊	_____	7

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

\*タイトル「ヒト羊膜を用いた再生表層角膜移植片における免疫学的研究」

主任研究者 坪田 一男 東京歯科大学角膜センター眼科教授  
研究協力者 篠崎 尚史 東京歯科大学角膜センター長  
島崎 潤 東京歯科大学眼科助教授  
榛村 重人 東京歯科大学眼科講師  
比嘉 一成 東京歯科大学眼科研究室主任

研究要旨

ヒト羊膜上に角膜上皮細胞を培養する技術の確立に成功した。培養された上皮細胞は重層化し、羊膜との間に基底膜が再構築されていた。この培養上皮細胞は、瘢痕性角結膜症患者に一部移植され、現在経過観察中である。また、羊膜の抗炎症効果のメカニズム解明のために、羊膜中のヒアルロン酸に注目し、その局在と、リンパ球接着に及ぼす影響について研究した。

その結果、リンパ球上の CD44 と羊膜のヒアルロン酸を介する系が炎症細胞の接着に重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的 本研究では胎盤から分離した羊膜を基質として、その上に角膜上皮を派生する Transient Amplify Cell (TAC) もしくはその前駆細胞系を培養し、角膜上皮細胞をシートとして移植する技術を確認することで、再生表層角膜移植片の作成を計るものである。この技術の確立により角膜移植患者への適応の拡大と移植待機期間の短縮をはかるものである。さらに、スティーブンスジョンソン症候群や OCP 等の難治性角膜疾患患者にも適応の拡大が期待される。同時に、自己もしくはアロの細胞を用いることで拒絶反応を抑制することも可能となり、移植組織の生着率の向上が期待できる。

また、羊膜の持つ様々な特性の中で重要なものとして抗炎症作用があげられる。そのメカニズムに羊膜中のヒアルロン酸が関与していることが示唆され、その機序を解明し、羊膜移植の成果を向上させることを目的とする。

B. 研究方法 羊膜上に恒久的な角膜上皮細胞を供給するために羊膜培養法、羊膜保存

法、ならびに角膜上皮細胞の培養法について検討した。また、羊膜の持つ抗炎症作用機序の解明のため、羊膜の基礎的研究を検討した。

（倫理面への配慮）本研究では帝王切開時に提供して頂く羊膜とドナー角膜もしくは近親者の輪部より提供して頂く角膜上皮幹細胞の入手が必要で、羊膜ならびに近親者からの提供に関しては生体ドナーであり、承諾書を作成して、インフォームドコンセント後、承諾を頂いている。

C. 研究結果 ヒト保存羊膜上に角膜上皮細胞を培養することを試みたところ、in vitro において培養することに成功した。しかし、羊膜上に培養された上皮細胞は未熟なものであり、上皮細胞本来の機能を備えたるために十分ではなかった。今後は十分な上皮細胞を得るため、細胞の重層化などの検討を行い、培養条件を検索する。また、羊膜には高濃度のヒアルロン酸が確認され、接着系を介した抗炎症効果も期待された。

また、羊膜には炎症細胞が浸潤するため、T リンパ球培養細胞を用い検討した。その結果、

ヒアルロン酸をリガントする接着分子の CD44 が発現している細胞 (Molt4) で羊膜への接着が確認され、CD44 の発現が認められない Jurkat で羊膜への接着は認められなかった。これは CD44 を介した反応が炎症細胞の接着に重要であることを示唆しており、羊膜の持つ抗炎症作用はヒアルロン酸と大きく関わりがあると考えられた。

D. 考察 1) 達成度について 本研究において、基質として用いた羊膜上にヒト角膜上皮細胞の培養に成功したことは多大な成果である。また、この状態で一部臨床応用も行われていることから達成度は高いと考えられた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について 一部臨床応用された新しい眼表面再建法の成果は New England Journal of Medicine, Lancet, Investigative Ophthalmology and Visual Science, Ophthalmology などに掲載され、国際的にも注目を集めている。今回の研究成果により手術適応にならなかった症例にも治癒の道が開けることが期待され、社会的意義も大きいと考えられる。

3) 今後の展望について 今後さらに本研究によって羊膜上への上皮細胞培養法が確立されれば、角膜移植患者への適応の拡大と移植待機期間の短縮が期待できる。また、羊膜の基礎的研究としてその特性を知ることで抗炎症作用や拒絶反応への応用が期待できる。

E. 結論 羊膜を基質とした培養角膜上皮細胞を供給するための羊膜保存法、羊膜ならびに角膜上皮細胞の培養条件の検討により、提供輪部組織より角膜上皮細胞の羊膜上への培養に成功した。培養上皮は羊膜との間に基底膜を介して接着し、3~4 層に重層化していた。この培養羊膜—角膜上皮の眼表面への移植は癬痕性角結膜症患者に一部臨床応用され、

良好な結果が得られている。(現在投稿中)

本研究で得られた成果は最終目的の免疫学的な部分も含めた再生表層角膜移植法の確立に大きく前進したと考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Shimazaki J, Shimmura S, Fujishima H, Tsubota K. Association of preoperative tear function with surgical outcome in severe Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 2000; 107: 1518-1523.

2. Shimmura S, Ando M, Shimazaki J, Tsubota K. Complications with one-piece lamellar keratolimbal grafts for simultaneous limbal and corneal pathologies. *Cornea* 2000; 19: 439-442.

##### 2. 学会発表

###### 1) 国内

1. 坪田一男. 角膜上皮の再生. 第6回難病治療研究会, 東京, 2000/6/30.

2. 島崎潤. 最近の角膜移植の進歩. 杏林大学眼科セミナー, 東京, 2000/8/23. 00/12/14.

3. 藤島浩. 羊膜の緑内障手術への応用. 第1回グラネアの会, 蔵王, 2000/3/10.

第104回日本眼科学会, 京都, 2000/4.

島崎潤, 榎本昌代, 小山理恵子, 北條麻紀, 榛村重人, 坪田一男. 羊膜の培養結膜細胞におよぼす変化.

第54回日本臨床眼科学会, 東京, 2000/11.

大橋由枝, 榛村重人, 後藤英樹, 島崎潤, 坪田一男. 角膜穿孔に対する羊膜移植の成績.

第21回日本眼炎症学会, 2000/7.

坪田一男. 角膜上皮のステムセル移植.

###### 2) 海外

Paulista Hospital, Sao Paulo, Brazil, 2000/5.

Shimazaki J. Ocular surface reconstruction using amniotic membrane.

Santa Casa Hospital, Sao Paulo, Brazil, Oftalmo Center, Ribeirao Preto, Brazil, 2000/5.

Shimazaki J. Anterior segment reconstruction using amniotic membrane.

Instituto del Ojo, Molina, Santa Cruz, Bolivia, 2000/5.

Shimazaki J. Ocular surface reconstruction. L.V. Prasad Eye Institute, Hyderabad, India, 2000/5.

Shimazaki J. Ocular surface reconstruction with limbal and amniotic membrane transplants.

VII symposio Internacional de Atualizaca em Oftalmologia da Santa Casa de Sao Paulo. 2000/6.

Tsubota K. Efficacy and safety of corneal epithelial stem cell transplantation.

The 2nd Meeting of the Asia Pacific Society of Cornea and Refractive Surgery, Chiba, Japan, 2000/2.

Tsubota K. Conjunctival stem cell transplantation.

Shimazaki J, Maruyama F, Shimmura S, Fujishima H, Tsubota K. Immunological rejection of the central graft following limbal allograft transplantation.

The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, 2000/5.

Tsubota K, Enomoto M, Shimmura S, Goto E, Shinozaki N, Shimazaki J. Ocular surface reconstruction by cultivated conjunctival-limbal allografts on amniotic membrane.

Shimazaki J, Shimmura S, Inoue H, Tsubota K. Anti-inflammatory effects of amniotic

membrane grafting in ocular surface disorders.

Enomoto M, Hojo M, Oyama R, Shimazaki J, Tsubota K. Differentiation of conjunctival epithelium cultivated on human amniotic membrane.

Third International Conference on the Lacrimal Gland, Tear Film and Dry Eye Syndromes; Basic Science and Clinical Relevance. Maui, Hawaii, USA, 2000/11.

1 Shimazaki J, Aiba M, Shimmura S, Tsubota K. Transplantation of cultivated corneal epithelial cells on amniotic membrane; preliminary clinical outcomes.

American Academy of Ophthalmology, Instruction Course, Dallas, U.S.A., 2000/10.

Tseng S, Tsubota K. Ocular surface reconstruction by stem cell transplantation and amniotic membrane transplantation.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

移植用細胞片及びその作成方法についての特許申請を平成11年12月9日付けにて取得している。

（出願番号：特許平11-349705号）

2.実用新案登録

3.その他

共同研究予定のオタワ大学チームと共にバイオポリマー単体と培養細胞を組み込んだバイオポリマーの出願を検討中である。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

\*タイトル「ヒト羊膜を用いた培養角膜上皮移植に関する研究」

主任研究者 木下 茂 京都府立医科大学眼科教授  
研究協力者 外園 千恵 京都府立医科大学眼科講師  
小泉 範子 京都府立医科大学眼科医員

研究要旨

ヒト羊膜上に角膜上皮 stem cell 細胞を培養する技術の確立に成功し、大学倫理委員会の承認を得て、重症角結膜上皮疾患に対して臨床応用した。この上皮培養法について詳細に検討し、羊膜上皮細胞を除去すること、air-lifting を行うことが、培養上皮シートを作成するためには必須であることを示した。explant 法のみならず cell suspension 法についても検討した。

A. 研究目的 この研究ではヒト羊膜を基質として、ヒト角膜上皮細胞を培養して、角膜上皮細胞を羊膜上のシートとして移植する技術を確立することにある。この技術の確立により、tissue engineering 的な応用が期待できる。また、急性期のスティーブンスジョンソン症候群などの難治性角結膜疾患患者に対する臨床応用が期待できる。

B. 研究方法 羊膜上に培養角膜上皮細胞を生着させ、In vivo へ移植することについて基礎的ならびに臨床的検討を行った。

（倫理面への配慮）本研究では帝王切開時に採取する羊膜と、一連の培養角膜上皮移植について大学倫理委員会の承認を受け、その制約のなかで行っている。

C. 研究結果 ヒト羊膜上にヒト角膜上皮 stem cell の培養を試みたところ、重層上皮層を形成することに成功した。この過程で、羊膜に付着する上皮細胞の有無がどのように影響するかを検討したところ、羊膜上皮細胞を除去し、その上に角膜上皮細胞を培養するほうが、より強固な接着性を示す培養上皮シートが形成されることが明らかとなった。さらに、培養後期に、air-lifting することによって、最表層の角膜上皮層の tight junction 形成が有意に促進され、臨床応用には、この方法を用いるのが良いと考えられた。培養上

皮層はケラチンの K3 と K12 が陽性であり、角膜上皮としての phenotype を十分に示した。この培養角膜上皮層を用いて、臨床例 13 例に手術を施行した。全例で、培養上皮は角膜上に生着し、良好な角膜上皮層を形成することが出来た。

D. 考察 1) 達成度について 本研究において、羊膜上のヒト培養角膜上皮シートは臨床応用できる状態となった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について 基礎的検討ならびに臨床応用された成果は Investigative Ophthalmology and Visual Science, Archives of Ophthalmology などに掲載され、国際的にも注目を集めており、社会的意義も大きいと考えられる。

3) 今後の展望について 本研究により羊膜上への上皮細胞培養法が確立されることにより、新たな治療方法が出来ることになる。

E. 結論 羊膜を基質とした培養角膜上皮シートを作成し、瘢痕性角結膜上皮症患者に臨床応用し、良好な結果を得た。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1.Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ: Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:2506-2513, 2000.

2.Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S: Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase Stevens-Johnson syndrome. Arch Ophthalmol 119:298-300, 2000.

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Shimazaki J, Shimmura S, Fujishima H, Tsubota K	Association of preoperative tear function with surgical outcome in severe Stevens-Johnson syndrome.	Ophthalmology	107	1518-1523.	2000
Shimmura S, Ando M, Shimazaki J, Tsubota K	Complications with one-piece lamellar keratolimbal grafts for simultaneous limbal and corneal pathologies.	Cornea	19	439-442	2000
Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ	Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane.	Invest Ophthalmol Vis Sci	41	2506-2513	2000
Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, <u>Kinoshita S</u>	Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase Stevens-Johnson syndrome.	Arch Ophthalmol	119	298-300	2000



20000425

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P.6の「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。