

20030396

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

羊膜を用いた再生上皮シートによる
角膜再生の基礎的・臨床的研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 坪田 一男

平成 16 (2004) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書		
「羊膜の基礎的研究と臨床応用」	—————	1-7
坪田 一男		
II. 分担研究報告書		
1 「口腔粘膜上皮シートの 臨床応用に関する研究」	—————	8-12
木下 茂		
2 「羊膜上培養上皮層の確立」	—————	13-14
大橋 裕一		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	—————	15-16
IV. 研究成果の刊行物・別冊	—————	17

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

「羊膜の基礎的研究と臨床応用」

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

研究要旨 羊膜を用いた上皮シートの臨床的有用性と問題点について検討し、この技術の臨床応用の具現化と製品化に向けての検討を行う、という本研究の目的に向け、本年度において重要な成果が得られた。マルチセンタースタディー（他施設共同研究）における輸送条件を確立し、上皮細胞の供給源としての SP 細胞の分離培養ならびに上皮細胞への分化誘導を可能にした。また、羊膜上に培養した角結膜上皮において、HLA-G (MHC class 1 分子) の発現がタンパクレベルでも増加し、術後の炎症や免疫反応の抑制に関与している可能性が考えられた。さらに、角膜実質の供給源として合成ポリマーと羊膜シートを架橋したハイブリッド表層角膜片の開発など、製品化へ確実に近付きつつある。臨床応用については、マルチセンタースタディーが開始されるとともに口腔粘膜上皮の移植も開始され、臨床的有用性と問題点についてさらに明らかにされつつある。

A. 研究目的

今回の研究では、羊膜を用いた上皮シートの臨床的有用性と問題点について検討し、この技術の臨床応用の具現化と製品化に向けての検討を中心に研究を行う。また、羊膜の持つ抗炎症作用の解明と免疫学的特性について研究すると共に、共同研究者の開発したバイオポリマーを用いた人工角膜作成での羊膜の応用、さらに上皮幹細胞 (SP 細胞) のシートへの導入や口腔粘膜上皮による培養シートの作成と臨床応用についても検討する。

B. 研究方法

1. マルチセンタースタディーの開始ならびに運搬法・保存法の検討
京都府立医科大学と東京歯科大学眼科の間でいくつかの条件下で上皮シート輸送を行い、温度管理、輸送容器、および輸送された上皮シートの viability について検討を行なった。輸送中の温度測定は、容器とともに温度・湿度センサーを置いて実際に輸送して調べた。組織変化は HE 染色に

て観察し、Viability の測定は、calsein および PI 染色によって判定した。

2. 羊膜の抗炎症作用の証明、免疫学的特性の解明

羊膜上に再生した結膜上皮の HLA 遺伝子発現の変化をマイクロアレイで調べた。また、角膜上皮での HLA-G のタンパクレベルでの発現を免疫染色で検討した。

3. 上皮幹細胞の分離・培養とその応用

Hoechst33342 による DNA 染色を行い、活発な色素排出能を持つ細胞 (side population 細胞: SP 細胞) の分離を試みた。さらに、この SP 細胞の性質を調べ、培養によって角膜上皮細胞に分化させうるかどうかについて検討した。

4. 口腔粘膜上皮への臨床応用

両眼性の眼表面疾患の再建には、他家細胞の移植が行われてきたが、拒絶反応や免疫抑制に関連する副作用が大きな問題であった。これを克服するために、自己の口腔粘膜上皮細胞を採取して羊膜上に培養して上皮シートを作成し、これを移植に用いることを検討した。

5. 合成ポリマーと羊膜シートを架橋した膜移植片の応用

合成ポリマー（PVA）の上にヒト羊膜を重合させることで、ポリマー上への上皮細胞の生着を促すことができるかどうかを検討した。これをウサギ角膜に移植して、上皮化が得られるかどうかについても検討した。

＜倫理面への配慮＞本研究で用いる羊膜組織は、帝王切開時に提供して頂くものであり、文書によるインフォームドコンセントによって承諾を得ている。また、羊膜移植の臨床応用に関しては、平成8年に東京歯科大学倫理委員会の承認を、上皮シート移植に関しては、平成13年に東京歯科大学倫理委員会の承認を得ている。本手術を施行するに当たってはレシピエントに十分な説明を行い承諾を得ると共に、近親者の輪部組織よりの細胞採取が必要な場合には、ドナーからのインフォームドコンセントも得ている。さらに今回新たに計画した口腔粘膜上皮移植についても、平成15年に東京歯科大学市川総合病院倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. マルチセンタースタディーにおける運搬法・保存法の研究

計10回の上皮シート輸送を行い検討を行なった結果、4℃および室温のいずれにおいても上皮シートはほぼ正常な組織構造と viability を保っていたが、室温輸送の方が、Cell viability の回復が速い傾向にあり、輸送後培養条件に6-24時間戻すことでさらに良好な状態を得ることができた。温度および湿度を完全に一定に保つことは困難であったが、魔法瓶の原理を応用した容器に入れることで実際的に十分な条件に保つことができた。これらの結果を受けて、2004年1月より

東京歯科大、京都府立医大、愛媛大で各々の施設の倫理委員会の承認を得た上で、多施設共同研究をスタートさせた。

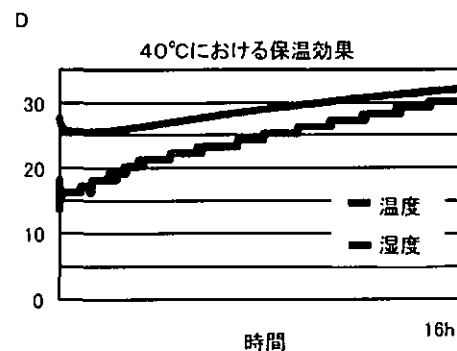
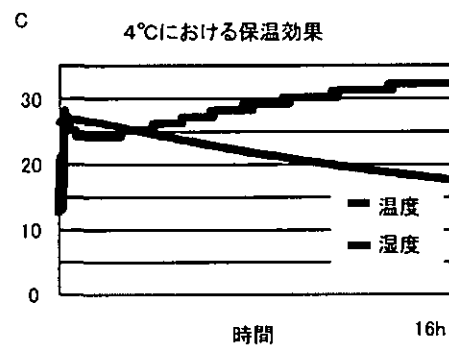
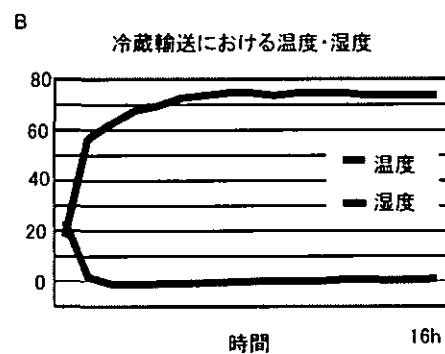
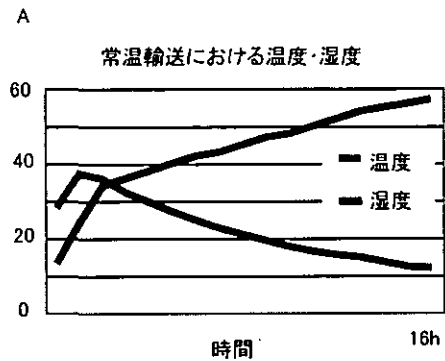


図1 輸送中の温度・湿度変化

A) 常温における輸送中の変化 B) 冷蔵における輸送中の変化 C) 4°Cにおける保温効果 D) 40°Cにおける保温効果

2. 羊膜の抗炎症作用ならびに免疫学的特性の解明

マイクロアレイの結果により HLA-G mRNA の発現が羊膜上に培養した結膜上皮において 2.6 倍増加していたが、他の HLA 分子の発現は減少している傾向を認めた。Real-time PCR において、結膜上皮において HLA-G の発現が羊膜上で増加していたことを以前報告したが、角膜上皮にも HLA-G mRNA が発現し、この発現は INF- γ 刺激により増加した。また、角膜上皮での HLA-G 発現量は羊膜の有無で差を認めなかったが、INF- γ 存在下では発現が 2.7 倍増加していた。免疫染色でも角膜上皮に HLA-G の発現が確認され、INF- γ によりその発現は上昇していた(図2)。Western blot においても同様の結果が得られている。

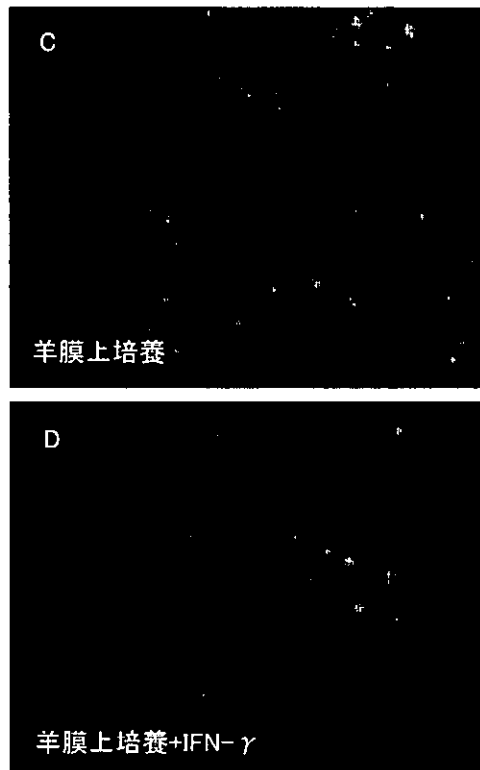
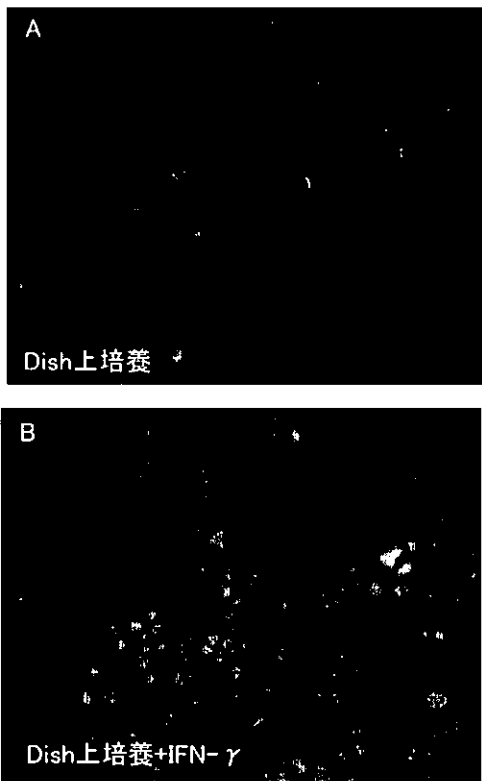
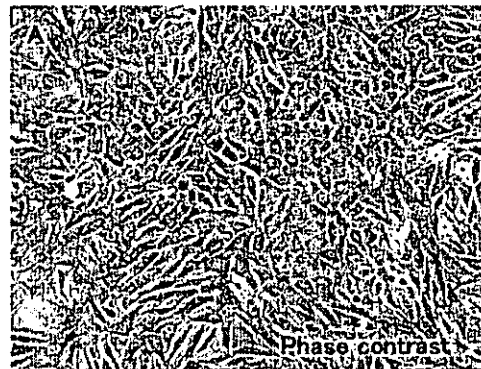


図2 角膜上皮細胞におけるHLA-Gの細胞免疫染色
青-核染色(DAPI)、赤-HLA-G(Rhodamine)



3. 上皮幹細胞の分離・培養とその応用

ウサギおよびヒト角膜輪部よりSP細胞を採取することができ、その頻度は細胞全体の0.5-3%程度であった。SP細胞はBcrp遺伝子を発現していたが、角膜上皮の分化マーカーであるケラチン12は発現していなかった。SHEM培地で培養することで、SP細胞は敷石状の形態をとり、ケラチン12を発現するようになった(図3)。



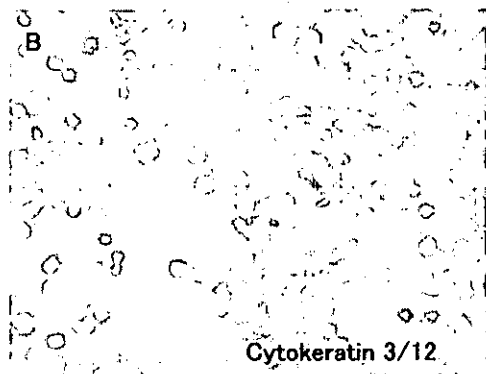


図3 SP細胞の分化誘導

A) SP細胞を分化誘導した上皮様細胞

B) Cytokeratin3/12の免疫染色

また、角膜から分離したSP細胞はsphere状の細胞塊をつくり、増殖することが確認された (図4)。

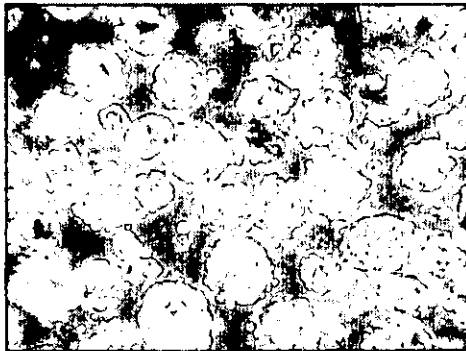


図4 角膜由来のsphere状の細胞塊

4. 口腔粘膜上皮への臨床応用

ウサギおよびヒト口腔粘膜を少量採取し、ここから羊膜上に上皮細胞を培養することが可能となった。得られた上皮シートは4-5層に重層化し、形態的に角膜上皮類似となっていた (図5)。東京歯科大学市川総合病院倫理委員会の承認を得た上で、2004年1月より臨床応用を行い、これまで3例に施行し現在経過観察中である。

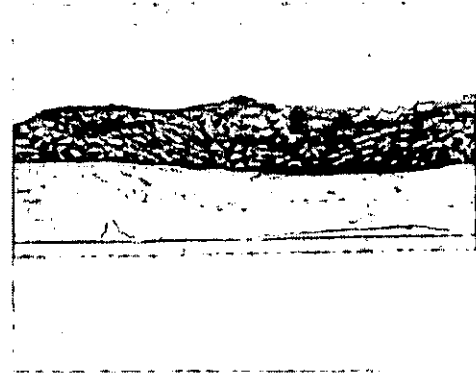


図5 羊膜上に培養した口腔粘膜培養上皮

5. 合成ポリマーと羊膜シートを架橋した膜移植片の応用

PVA に羊膜を重合させたハイブリッド移植片の作成に成功した。さらに、この羊膜上に角結膜上皮細胞を培養することに成功した。再生した上皮細胞と羊膜の間には基底膜および接着構造を認めた。

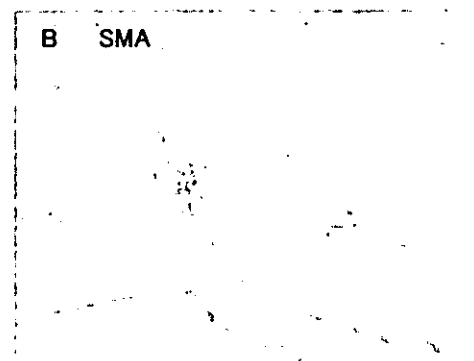
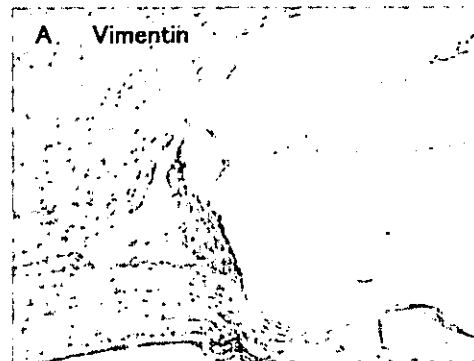


図5 A) Vimentin, B) α -SMA の免疫染色

さらにこのハイブリッド移植片をウサギ角膜内に移植した結果、 α SMA, Vimentin

の染色において特にめだつた反応は見られなかった(図5)。また、培養上皮細胞が安定して生着するかについても検討中である。

D. 考察

マルチセンタースタディーにおける運搬法・保存法の研究で輸送法が確立され、培養上皮の輸送は常温で温度変化の少ないことが重要であることが示唆された。また、口腔粘膜上皮の培養にも成功し、両眼性の重傷疾患への新しい供給源として有用であることが示唆された。今後は臨床的有用性と問題点について検討する。

羊膜の抗炎症作用ならびに免疫学的特性において、羊膜は角結膜上皮におけるHLA-Gの発現を増加させることにより、術後の炎症や免疫反応の抑制に関与している可能性が考えられた。一方、角膜由来のSP細胞はsphere状の細胞塊を形成し、継代も可能であることから、細胞の供給源として有用であることが示唆された。また、SP細胞には角膜上皮細胞へ分化可能な細胞が存在することが確認された。

合成ポリマーと羊膜上培養上皮シートを架橋した膜移植片の応用として、家兎への移植で生体反応性の低い移植片であることが示唆された。このことから、この合成ポリマーと羊膜上培養上皮シートの架橋は角膜実質の供給源として有用であることが示唆された。

E. 結論

本年度の研究によって、ここ数年臨床に用いられてきた培養輪部上皮シート移植の効果と安全性をさらに明らかにすることができた。さらに多施設共同研究を行うことで、将来の製品化に向けての問題点を明らかとすることができると考えられる。また、現在までの検討でもっとも大きな問題

点と考えられる拒絶反応の克服に対し、自己口腔粘膜上皮シート移植の可能性が現実味を帯びてきており、現在行なわれている臨床研究の結果が待たれる。これらの臨床研究と並行して羊膜の持つ抗炎症作用の解明や角膜上皮幹細胞の分離・培養といった基礎的研究も着実に進んでいる。特に幹細胞の培養が可能となれば、少数の組織から多数の上皮シートの作成が可能となり、より多くの患者が医学の進歩の恩恵をこうむることができるようになることを期待される。

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, Tsubota K. Donor source affects the outcome of ocular surface reconstruction in chemical or thermal burns of the cornea. *Ophthalmology* 111; 38-44: 2004.
2. Shimazaki J, Kosaka K, Shimmura S, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation with conjunctival autograft for recurrent pterygium. *Ophthalmology* 110; 119-124: 2003.
3. 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.
4. 島崎潤. 羊膜移植. *日本の眼科* 74; 19-22: 2003.
5. 島崎潤. 羊膜による角膜再生. *眼の再生医学. 眼科診療プラクティス* 91. 東京, 文光堂, 20-24: 2003.

6. 榛村重人, 坪田一男. 幹細胞移植による角膜再生医療. ここまで進んだ再生医療の実際. 186-191: 2003.
2. 学会発表
- 1) 国内
1. 島崎潤. 羊膜あれこれ. 第24回あやめ会懇談会, 永田眼科, 奈良市, 2004/3/4.
2. 島崎潤. 羊膜を用いた眼表面疾患の細胞治療. バイオロジクス・フォーラム設立記念シンポジウム, 東京, 2003/2/7.
3. 島崎潤. 羊膜移植術 -マイアプローチ. (インストラクションコース・スキルトランスファー) 第26回日本眼科手術学会, 京都市, 2003/1/31-2/2.
4. 榛村重人. 角膜再生の作成および移植に関する研究. 平成15年度東京歯科大学口腔科学研究センターワークショップ, 千葉市, 2004/2/28
5. 坪田一男. 角膜上皮の再生医療. 第6回日本組織工学会, 東京, 2003/6/12-13.
6. 島崎潤. 輪部移植第28回角膜カンファレンス, 第20回日本角膜学会, 米子市, 2004/2/18-21.
7. 比嘉一成, 大島三冬, 石橋直子, 相場昌代, 榛村重人, 島崎潤, 坪田一男. 角結膜上皮におけるHLA-Gの発現と羊膜による影響. 第28回角膜カンファレンス, 第20回日本角膜学会, 米子市, 2004/2/18-21.
8. 臼井あけ美, 榛村重人, 松崎有未, 岡野栄之, 坪田一男. ヒト角膜輪部由来Side Population細胞の特性に関する検討. 第28回角膜カンファレンス, 第20回日本角膜学会, 米子市, 2004/2/18-21.
9. 宮下英之, 榛村重人, 小林尚俊, 田口哲志, 加藤直子, 臼井あけ美, 島崎潤, 田中順三, 坪田一男. 人工角膜材料としてのコラーゲン固定化ポリビニルアルコールゲルの有用性の検討. 第28回角膜カンファレンス, 第20回日本角膜学会, 米子市, 2004/2/18-21.
10. 吉田悟, 只野貴示枝, 榛村重人, 島崎潤, 松崎有未, 岡野栄之, 坪田一男. マウス角膜幹細胞の分離・培養とその分化誘導に関する検討. 第3回日本再生医療学会総会, 幕張, 2004/3/23-25.
11. 臼井あけ美, 榛村重人, 松崎有未, 岡野栄之, 比嘉一成, 清野泰子, 坪田一男. ヒト角膜輪部由来Side Population細胞の特性に関する検討. 第3回日本再生医療学会総会, 幕張, 2004/3/23-25.
12. 島崎潤, 相場昌代, 榛村重人, 坪田一男. 培養角結膜上皮シートの作成および生着に関わる要因. 第3回日本再生医療学会総会, 幕張, 2004/3/23-25.
- 2) 海外
1. Tseng S, Tsubota K, Kenyon K. Ocular surface reconstruction by stem cell transplantation and amniotic membrane transplantation. Instruction course. American Academy of Ophthalmology, Annual Meeting, Anaheim, U.S.A., 2003/11/15-18.
2. Oshima M, Aiba M, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Molecular analysis of differentiation in conjunctival epithelium cultivated on human amniotic membrane by real-time RT-PCR. Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Ft. Lauderdale, U.S.A., 2003/5/4-9.
3. Takano Y, Fukagawa K, Miyake-Kashima M, Tanaka M, Shimazaki J, Tsubota K, Fujishima H. A case of allergic corneal ulcer in Aropic Keratoconjunctivitis (AKC) persistent for six months that healed by amniotic membrane

transplantation. Association for
Research in Vision and Ophthalmology,
Annual Meeting, Ft. Lauderdale, U. S. A.,
2003/5/4-9.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む）

1. 特許取得

医療用材料及びその製造方法について
の特許申請を2004年2月4日に行
っている。(特願2004-028581)

2. 実用新案登録 なし

3. その他

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
「口腔粘膜上皮シートの臨床応用に関する研究」

分担研究者 木下 茂 京都府立医科大学眼科教授

研究要旨

【目的】京都府立医科大学眼科ではこれまでに難治性角結膜上皮疾患を対象としてアロ培養角膜上皮移植を31症例に行った。それらの長期の臨床経過を検討する。また患者本人の口腔粘膜上皮を少量採取し、角膜様上皮シートを作成して移植するオート培養口腔粘膜上皮移植を2002年より開始した。この臨床適応と有用性について検討する。【方法】1) これまでにアロ培養角膜上皮移植を行った症例のうち、術後経過が1年6ヶ月以上に至った20症例の経過と所見をレトロスペクティブに解析し、本移植の長期予後を検討した。2) オート培養口腔粘膜上皮移植を12例14眼に行い、短期経過について検討した。【結果】1) 急性炎症を伴う遷延性上皮欠損にアロ培養角膜上皮移植を行った症例は、長期経過においても術後の癒痕性変化が従来の治療による経過に比べて格段に少なかった。慢性期症例でも長期にわたって視機能の回復に一定の効果をあげることができた。2) オート培養口腔粘膜上皮移植は、眼表面再建術を9眼に、結膜嚢形成を5眼に行い、いずれも良好な結果を得た。【考察】培養角膜上皮移植は長期経過においても有効であり、難治性疾患のみならず他の上皮性疾患にも応用可能と考えられた。培養口腔粘膜上皮移植は眼表面再建のみでなく結膜嚢形成にも有用である。

C. 研究目的

難治性眼表面疾患（Stevens-Johnson症候群、重症化学外傷、眼類天疱瘡）に対する角膜上皮の移植は長期予後が著しく不良であることが知られている。京都府立医科大学眼科では、羊膜上にin vitroで角膜上皮を培養し上皮シートを作成することに世界でも先駆けて成功し、学内倫理委員会の承認のもとに1999年以後現在までに難治性眼表面疾患を対象として培養角膜上皮移植を31症例に行った。今回、アロ培養角膜上皮シート移植を行い1年6ヶ月以上の経過観察を行った20症例の長期経過を検討した。一方、口腔粘膜を少量採取して培養し角膜様シートを作成することに成功し、これによりオート（自家）培養口腔粘膜上皮移植が可能となった。オート培養口腔粘膜上皮移植を難治

性眼表面疾患の眼表面再建術、あるいは結膜嚢形成に用いて、その適応と効果を検討した。

D. 研究方法

1) アロ培養角膜上皮移植の長期経過

対象はStevens-Johnson症候群が10例12眼、化学外傷が6例6眼、眼類天疱瘡が4例4眼の合計20例22眼であり、平均の術後経過観察期間は35ヶ月である。眼表面の状態、視力、合併症についてレトロスペクティブに検討した。眼表面の状態は、結膜充血、瞼球癒着、臨床的結膜侵入、上皮角化、上皮欠損、角膜混濁の6項目を4段階にスコア化して評価した。

2) オート培養口腔粘膜上皮移植

両眼を罹患している難治性角結膜上皮疾患の12例14眼（Stevens-Johnson

症候群 3 例 4 眼、熱化学外傷 4 例 5 眼、眼類天疱瘡 2 例 2 眼、特発性角結膜上皮症 3 例 3 眼を対象にオート培養口腔粘膜上皮移植術を施行した。平均年齢は 43.7 歳、平均術後観察期間は 6.4 ヶ月である。対象者から約 2 X 2 mm の口腔粘膜組織を採取し、口腔粘膜上皮細胞のみを分離、羊膜上で 2 週間培養し重層化させた。3T3 線維芽細胞との共培養、上皮分化誘導を促す air-lifting 法を併用した。手術はこれまでに行ってきた培養角膜上皮移植と同様であり、瘢痕組織を除去後に、0.04%MMC で結膜下組織を処理し、19mm 径の上皮シートを用いて角膜表面もしくは結膜嚢を再建した。術式の内訳は視力改善を目的とした眼表面再建術が 9 眼（急性期 2 眼、瘢痕期 7 眼）、癒着解除を目的とした結膜嚢再建術が 5 眼である。患者本人の口腔粘膜上皮を細胞ソースとする上皮シート作成の成功率と安定性、目的到達度（視力改善あるいは結膜嚢再建）、合併症について検討した。

C. 研究結果

1) アト培養角膜上皮移植の長期経過

急性炎症を伴う遷延性上皮欠損に対して移植した症例（7 例 9 眼）は全例で速やかな眼表面の消炎と上皮修復を認め、瞼球癒着、角化を生じず治癒した。長期の経過においても瘢痕性変化に乏しく、従来の保存治療による経過に比べて格段に予後良好であった。慢性期症例（13 例 13 眼）では Stevens-Johnson 症候群で結膜充血が 1~1.5 年持続する症例を認め、眼類天疱瘡全例で術後に小さいが難治な上皮欠損を生じた。手術例の多くは術後、緩除に結膜上皮に置換されたと考えられたが、眼表面の瘢痕形成が乏しく角膜の透明性を長く維持していた。最終観察時の視力は術前より改善しているものが 9

眼 41%、悪化しているものが 4 眼 18%であった。拒絶反応を 5 眼、角膜感染症（MRSA、MRSE）を 4 眼に認めた。

2) オート培養口腔粘膜上皮移植

14 眼中 12 眼（86%）で十分に重層化したシートが作成でき、すべての重層化した培養口腔粘膜上皮シートが生着した。眼表面再建術を行った 9 眼では、8 眼で術後早期に完全な上皮生着が得られ、最終的に 7 眼（78%）で眼表面の安定化が得られた。一期的な視力改善を目的とした 7 眼（瘢痕期症例）の内 5 眼（71%）で 2 段階以上の視力改善を得た。結膜嚢形成術では、全例で上皮生着と結膜嚢再建が得られたが、眼類天疱瘡 2 眼では、緩徐な結膜下組織の再増殖が認められた。経過観察を行った期間内では感染症の発症はなく、重篤な合併症を生じなかった。

D. 考察

培養角膜上皮シート移植は長期経過においても角膜の透明性を維持する症例が多く、眼表面の瘢痕形成が少ないという特徴を認めた。また従来の上皮移植に比べて長期に安定した視力を保持できる傾向にあった。

自家培養口腔粘膜上皮シートによる角膜上皮再建術と結膜嚢再建術を開発したが、両眼性の瘢痕性角結膜上皮症に対して培養自己口腔粘膜シートでの眼表面再建が可能であった。自家移植であるため免疫抑制療法を必要とせず、投薬を軽減し合併症を回避できる有用な治療法の一つとなり得ると考えられた。

E. 結論

近年注目を集めている再生医学研究は、角膜移植の歴史にも大きな変化をもたらしている。特に Ocular surface の再生では、組織工学 (Tissue engineering)

の進歩により、必要とする細胞を少量採取して *in vitro* で培養上皮シートを作成後、*in vivo* へ移植する培養上皮移植術が、細胞移植という新しい概念として位置づけられている。生体外での組織再生には、細胞ソースの選択、適切な細胞外マトリックスの構築ならびに正常分化をもたらす増殖因子の開発が必要不可欠である。現在では、角膜上皮、結膜上皮および口腔粘膜上皮等の細胞を用いて、羊膜やフィブリンなどの培養基質上での移植法の開発が行われている。

我々が開発した培養角膜上皮移植は、術後にすみやかな上皮化が得られるため、従来の慢性期での移植のみならず、急性期においてもその適応が拡大している。今回、その長期予後が良好であることを確認した。また、自己組織を用いた培養上皮移植法は、免疫抑制剤使用の必要性がなく、拒絶反応の危険性がないため、両眼性、難治性症例や高齢者、若年者に適応があり、今回臨床使用してその有効性を確認した。今後さらに症例数を増やして、適応と有効性、合併症について検討を重ねていく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, Fullwood NJ, Tanifuji N, Tsuzuki M, Koizumi N, Inatomi T, Sano Y, Kinoshita S. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44; 106-116: 2003.
- 2) Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, Inoki K, Sano Y, Sotozono C, Kinoshita S. Successful re-grafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea.* 22; 70-1: 2003.
- 3) Ban Y, Dota A, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, Mochida C, Kinoshita S. Tight Junction-Related Protein Expression and Distribution in Human corneal epithelium. *Exp Eye Res.* 76(6); 663-669: 2003.
- 4) Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, Koizumi N, Dota A, Mochida C, Kinoshita S. Comparison of Ultrastructure, Tight Junction-Related Protein Expression and Barrier Function of Human Corneal Epithelial Cells Cultivated on Amniotic Membrane With and Without Air-Lifting. *Exp Eye Res.* 76(6); 735-743: 2003.
- 5) Nakamura T, Kinoshita S. Ocular Surface Reconstruction Using Cultivated Mucosal Epithelial Stem Cells. *Cornea* 22; S75-80: 2003.
- 6) Kinoshita S, Koizumi N, Sotozono C, Yamada J, Nakamura T, Inatomi T: The concept and the clinical application of cultivated epithelial transplantation for ocular surface disorders. *The Ocular Surface* 2:21-33, 2004
- 7) 中村隆宏：基質 (Matrix) の役割. 眼科診療プラクティス 91: 6(2); 122-123 眼の再生医学. 文光堂、東京、2003.
- 8) 稲富勉、中村隆宏、鄭守：眼組織の移植. 先端医療シリーズ 23 眼科の最

新医療. P.20-23 先端医療技術研究所、東京、2003.

- 9) 雨宮傑、山本俊郎、金村成智、中村隆宏、木下茂：羊膜を用いた培養口腔粘膜上皮シートの作製 近畿北陸地区歯科医学雑誌 第55巻；116-119：2003（歯科との共同）
- 10) 雨宮 傑、山本俊郎、大迫文重、中村隆宏、木下 茂、金村成智：羊膜を用いた培養口腔粘膜上皮ならびに歯根膜由来細胞シートの作製 日本再生歯科医学会誌 1巻1号；25-35：2003（歯科との共同）

2. 学会発表

1) 国内

1. 稲富 勉、中村隆弘、外園千恵、佐野洋一郎、横井則彦、木下茂：重症眼類天疱瘡に対する培養角膜上皮移植術の検討. 第27回角膜カンファレンス 第19回日本角膜移植学会, 軽井沢, 2003. 2. 21.
2. 中村隆宏、遠藤健一、稲富、外園、雨宮傑、金村成智、木下茂：難治性眼表面疾患に対するヒト培養口腔粘膜上皮移植術の開発. 第107回日本眼科学会総会, 福岡, 2003. 4. 17
3. 中村隆宏：生体デバイスとしての培養粘膜上皮シート (Ocular surfaceの再生医療) 第27回角膜カンファレンス, 第19回日本角膜移植学会、シンポジウム、軽井沢, 2003. 2. 21.
4. 中村隆弘、遠藤健一、稲富 勉、外園千恵、木下茂、雨宮傑、金村成智：ヒト羊膜上培養粘膜上皮シートの開発. 第27回角膜カンファレンス 第19回日本角膜移植学会, 軽井沢, 2003. 2. 21.
5. 稲富勉、中村隆宏、小泉範子、外園千恵、横井則彦、木下茂：培養上皮

を用いた眼表面再建の現状. 第109回京都眼科学会, 福岡, 2003. 6. 8

6. 中村隆宏：培養上皮移植（角膜移植の現在と未来）第57回日本臨床眼科学会、シンポジウム、名古屋, 2003. 11. 1
7. 外園千恵、稲富勉、小泉範子、中村隆宏、佐野洋一郎、横井則彦、木下茂：培養角膜上皮シート移植の長期経過. 第57回日本臨床眼科学会, 名古屋, 2003. 11. 1.
8. 中村隆宏、稲富勉、外園千恵、雨宮傑、金村成智、木下茂：培養口腔粘膜上皮シートによる結膜嚢再建術. 第57回日本臨床眼科学会, 名古屋, 2003. 11. 1.
9. 稲富勉、中村隆宏、外園千恵、木下茂、雨宮傑、金村成智：培養自己口腔粘膜上皮シートによる眼表面再建術. 第57回日本臨床眼科学会, 名古屋, 2003. 11. 1.
10. 中村隆宏、稲富勉、外園千恵、木下茂：培養口腔粘膜上皮シートによる眼表面再建、第2回日本炎症再生医学会、京都、2003. 11. 26
11. 雨宮 傑、山本俊郎、中村輝夫、福島淳夫、中村隆宏、木下 茂、金村成智：羊膜上培養家兎口腔粘膜上皮シートの作製. 第1回日本再生歯科医学会、2003. 10. 14
12. 雨宮 傑、山本俊郎、堀 雅文、中村輝夫、福島淳夫、中村隆宏、木下茂、金村 成智：羊膜上培養家兎口腔粘膜上皮シートの作製、第15回日本口腔科学会近畿地方会、2003. 11. 29

2) 海外

- 1) Nakamura T, Endo K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S.

Development of Cultivated Human Oral Mucosal Epithelium Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. 2003 Keystone Symposia, From Stem Cells to Therapy, Steamboat Springs, Colorado, USA, 2003.4.1

- 2) Nakamura T, Endo K, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S. Development of Human Cultivated Oral Mucosal Epithelium on Amniotic Membrane for Ocular Surface Reconstruction. 2003 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2003.5.7.
- 3) Kinoshita S, Nakamura T, Inatomi T, Kanamura N, Sotozono C. Autologous Cultivated Oral Mucosal Epithelial Sheet Can Be Used for Ocular Surface Reconstruction. 2003 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2003.5.8.
- 4) Inatomi T, Koizumi N, Nakamura T, Sotozono C, Kinoshita S. Ocular Surface Reconstruction in Acute Phase of Ocular Surface Disorders Using Cultivated Corneal Stem Cell Transplantation. 2003 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2003.5.8.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- | | |
|-----------|----|
| 4. 特許取得 | なし |
| 5. 実用新案登録 | なし |
| 6. その他 | |

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

羊膜上培養上皮層の確立

分担研究者 大橋裕一 愛媛大学医学部眼科 教授

研究要旨 炎症を伴った角膜輪部疲弊症に対する眼表面の外科的再建において、重層化させた培養角膜上皮シート移植が注目されている。現在報告されている培養シートの倫理的問題点として、牛血清および3T3の使用が挙げられる。これらについて、まず無血清培地によるシート作成を試み、血清添加培地と比較検討した。また、3T3を用いない培養上皮シート作成も試みている。

A. 研究目的

近年、炎症を伴う角膜輪部上皮疲弊症や遷延性角膜上皮欠損などに対し、羊膜上に重層化させた培養角膜上皮シートの移植が試みられ、良好な臨床成績が得られている。現在報告されている上皮シートは血清を添加し3T3と共培養して作成されているという2点で、感染症などの倫理的問題が残存しているため、まずは無血清培地による培養角膜上皮シート作成を試みたので報告する。

B. 研究方法

まず、無血清培地による角膜上皮細胞のプライマリーカルチャーを試みた。白色家兎および輸入ヒト角膜輪部を dispase 処理の後 trypsin で単一細胞とし、それぞれ培養皿に播種した。いずれも5~6代まで継代可能であった。次に、京都府立医大眼科の方法に習い、角膜上皮培養シート作成を試みた。冷凍ヒト羊膜を解凍後に0.02%EDTAで2時間 incubate した後、cell scraper で羊膜上皮を剥離除去し culture insert に張った。この羊膜上に同上の方法で作成した角膜上皮細胞懸濁液 (Epi Life 培地) を播種し、京都府立医大に習った方法で3T3細胞と共培養し、

3日間 Air Lift を行った (CM 培地)。また、下記の結果より血清添加培地でも同方法を試みた。

C. 研究結果

無血清培地では、羊膜上角膜上皮細胞は重層化が不十分で、2~3層にとどまった。無血清培地では十分な重層化が得られなかったため、10%FCS 添加培地にて同様の方法でシート作成を試みたところ、5~6層の重層化が得られた。電子顕微鏡所見でも desmosome, hemidesmosome, microvilli が確認された。

D. 考察

今回、無血清培地での角膜上皮細胞シート作成を試み、細胞は羊膜上に confluent にはなるものの十分な重層化が得られなかった。今後は感染の問題をクリアするために、牛血清の代用として患者血清を用いてシート作成を試みる予定である。

また、3T3の問題については、現在代用となる細胞を用いてシート作成を試みているが、一定の結果が得られつつある。今後も引き続き、組織像、免疫染色、動物実験で臨床応用可能か検討していく予定である。

E. 結論

無血清培地では角膜上皮細胞の分化が不十分で、十分な重層化が得られなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

「マイトマイシン C 術中塗布と羊膜移植を併用した再発翼状片の手術成績」川崎史朗，宇野敏彦，島村一郎，大橋裕一；日本眼科学会雑誌 2003 年 6 月号掲載予定

2. 学会発表

「再発翼状片に対する羊膜移植術の連続手術成績」岡奈央子、宇野敏彦、島村一郎、俊野敦子、原祐子、川崎史朗、大橋裕一；第 28 回角膜カンファランス第 20 回日本角膜移植学会 2004 年 2 月 19 日～21 日

H. 知的所有権の取得状況

なし.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌 (2003 年度)

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, Kosaka K, Shimmura S, Tsubota K	Amniotic membrane transplantation with conjunctival autograft for recurrent pterygium.	Ophthalmology	110	119-124.	2003
Shimmura S, Doillon CJ, Griffith M, Nakamura M, Gagnon E, Usui A, Shinozaki N, Tsubota K.	Collagen-poly(N- isopropylacrylam ide)-based membranes for corneal stroma scaffolds.	Cornea	22	S81-S88	2003
Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, Fullwood NJ, Tanifuji N, Tsuzuki M, Koizumi N, Inatomi T, Sano Y, Kinoshita S	The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	44	106-16	2003
Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, Inoki K, Sano Y, Sotozono C, Kinoshita S	Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease.	Cornea	22	70-1	2003
Ban Y, Dota A, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, Mochida C, Kinoshita S.	Tight Junction-Related Protein Expression and Distribution in Human corneal epithelium.	Exp Eye Res.	76(6)	663-669	2003

Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, Koizumi N, Dota A, Mochida C, Kinoshita S.	Comparison of Ultrastructure, Tight Junction- Related Protein Expression and Barrier Function of Human Corneal Epithelial Cells Cultivated on Amniotic Membrane With and Without Air-Lifting.	Exp Eye Res.	76(6)	735-743	2003
Nakamura T, Kinoshita S	Ocular Surface Reconstruction Using Cultivated Mucosal Epithelial Stem Cells.	Cornea	22	S75-S80	2003

20030396

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