

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

難治性眼表面疾患に対する
培養粘膜上皮幹細胞シート移植術の開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 木下 茂

平成17(2005)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
培養粘膜上皮細胞シート移植術の基礎および臨床応用に関する評価の確立 -----	1
木下 茂	
II. 分担研究報告	
1. 粘膜上皮幹細胞マーカーの同定に関する研究 -----	7
橋本 公二	
2. 粘膜上皮幹細胞シートの開発に関する研究 -----	10
島崎 潤	
3. 粘膜上皮幹細胞移植術の開発に関する研究 -----	14
小泉 範子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	22

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

「培養粘膜上皮移植術の基礎及び臨床応用に関する評価の確立」

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
稲富 勉 京都府立医科大学眼科 学内講師

研究要旨

難治性眼表面疾患に対する培養粘膜上皮幹細胞シート移植術の開発に向けて、さまざま角度からその安全性、倫理面に配慮し、かつ臨床的効果が高い治療法を確立する必要がある。そこで、これまでの培養口腔粘膜上皮移植を基礎および臨床的側面から評価をした結果、本術式は、角膜再建および結膜嚢再建にも有用であり、当疾患に対する異所性の自己組織による眼表面再建術に一定のコンセンサスが得られた。今後の課題としては、術後のグラフト内への血管新生や移植した培養上皮シートの生物学的性状が挙げられた。

橋本公二 愛媛大学医学部皮膚科
教授

島崎 潤 東京歯科大学眼科
助教授

小泉範子 同志社大学再生医療センター
助教授

れまでの基礎および臨床結果を評価し、本術式の問題点、課題等を明らかにすることは、その発展型である培養粘膜上皮幹細胞シート移植術を広く普及させるために必要不可欠である。本研究では、羊膜を基質に用いた培養口腔粘膜上皮移植術の臨床経過を基礎および臨床的側面から評価を行い、その問題点と課題を明らかにした。

A. 研究目的

現在、我々の施設では難治性眼表面疾患（Stevens-Johnson症候群、熱化学外傷、眼類天疱瘡等）に対する培養粘膜上皮幹細胞シート移植術の開発に向けて、さまざま角度から安全性、倫理面に配慮し、かつ臨床的効果が高い治療法の開発をすすめている。一つには細胞ソースに関しての幹細胞の純化の試みであり、一つはニッチを含めた培養環境の整備である。これらの研究を遂行するにあたり、当科で開発してきた培養口腔粘膜上皮移植術のこ

B. 研究方法

1) 培養口腔粘膜上皮移植

両眼を罹患している難治性眼表面疾患の16例19眼（Stevens-Johnson症候群3例5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、その他4例4眼）を対象に自己培養口腔粘膜上皮移植術を施行した。平均年齢は49.1歳、平均術後観察期間は23.5ヶ月である。対象者から約2X2mm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。術式は、癒痕組織を除去後に、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 12 眼（急性期 2 眼、癒痕期 10 眼）、癒着解除等を目的とした結膜嚢再建術が 7 眼であった。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）、術後合併症について検討した。

2) 培養口腔粘膜上皮シートの生物学的検討

培養口腔粘膜上皮移植の症例で、移植後 6 ヶ月の時点での全層角膜移植術施行時に得られた組織を電子顕微鏡で解析し、移植した培養口腔粘膜上皮の表現型を分析した。また、免疫染色法を用いてその細胞骨格タンパクの特性を検討した。

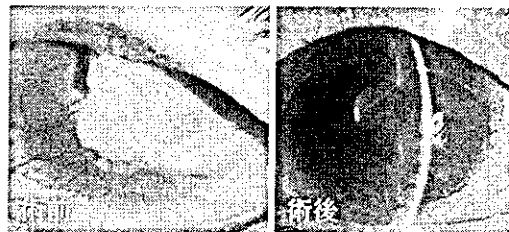
C. 研究結果

1) オート培養口腔粘膜上皮移植

19 眼中 17 眼（89%）で十分に重層化したシートが作成でき、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 11 眼では、10 眼で術後早期に完全な上皮生着が得られ、最終的に 8 眼（72%）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 11 眼（癒痕期症例）の内 8 眼（72%）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。術後全症例で、周辺部からの表層血管侵入が認められ

たが、術後 6 ヶ月以内に安定鎮静化した。移植した培養上皮の性状をフルオレセイン染色で観察した結果、大部分の症例で軽度の点状表層角膜症が認められた。その他、経過観察を行った期間内では重篤な合併症は生じなかった。

Stevens-Johnson 症候群に対する自己培養口腔粘膜上皮移植術の臨床応用例（術前（左）および術後 14 ヶ月（右）の前眼部写真）。術前、眼表面は癒痕組織を伴った結膜侵入、瞼球癒着により著しい視力障害を生じていた。術後、眼表面は周辺からの表層血管侵入は認めるものの、自己の培養口腔粘膜上皮シートで再建されている。



2) 培養口腔粘膜上皮シートの移植後の組織学的検討

培養口腔粘膜上皮シートの移植後 6 ヶ月の眼表面における形態を走査型電子顕微鏡で解析した結果、角膜中央部の培養上皮シートにおいては、正常角膜上皮と同様の微絨毛を持つ形態であったが、周辺部角膜では、細胞は中央部に比べ小さく、結膜上皮の形態に類似していた。培養上皮のケラチンによる染色性では、角化型ケラチン 1/10 はその発現を認めなかったが、粘膜分化型ケラチン 4/13 は認めた。

D. 考察

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。特に眼表面の再建では、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。難治性眼表面疾患に対する培養口腔粘膜上皮移植は、自己組織による再建であるため、拒絶反応等の危険性がなく、術後に多量の免疫抑制剤を長期にわたり使用する必要性がなくなり、患者の身体的、精神的負担を軽減させることができると考えられる。これまで培養口腔粘膜上皮シートによる角膜上皮再建および結膜 (囊) 再建を臨床応用したが、いずれも眼表面再建が可能であった。移植後の上皮の電子顕微鏡による組織学的検討でも、培養口腔粘膜上皮シートが粘膜としての性質を保持していることがわかった。現状の問題点としてはまず、視力改善を目的とした角膜再建では、術後の最高視力において本術式では従来の角膜上皮移植と比較し、やや低い印象がある。考えられる原因として、培養口腔粘膜上皮の性状が電子顕微鏡レベルで形態学的には角膜上皮と同等ではあるが、さらに詳細なレベルでは同一ではなく、そのことが上皮シートの透明性に影響を与えている可能性がある。また、移植後の培養上皮をフルオレセイン染色により詳細に観察した結果、軽度の点状表層角膜症を認めることから、透過光の散乱による視力低下も考えられる。これらのことから、細胞ソースである口腔粘膜上皮は、形態学的には角

膜上皮に類似してはいるが、口腔粘膜としての性質を依然保持していることが示唆される。今後、この細胞ソースを口腔粘膜上皮幹細胞に純化した場合の培養上皮シートの性状を詳細に解析する必要がある。

次の課題として、本術式では大部分の症例で、術後の培養上皮シートへの血管侵入を認める点が挙げられる。角膜は生体内では極めて特殊な無血管の構造を持っており、涙と前房水よりその恒常性が維持されている。一方、口腔粘膜は他の大部分の組織と同様に血管のサポート下で維持されている。よって、術後のグラフト内への表層血管侵入は、口腔粘膜上皮細胞自身が、血管新生を誘引する因子を保持、あるいは分泌している可能性がある。幸い、この血管新生は術後半年以内までには安定化し、術後成績に大きな影響は及ぼしていないが、今後は、この血管新生の誘引因子を探求すると同時に、細胞ソースを口腔粘膜上皮幹細胞に純化した場合の血管新生の程度を評価する必要がある。

E. 結論

我々が開発した培養口腔粘膜上皮移植は、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や問題点を確認した。今後は、培養粘膜上皮幹細胞移植に向け、さらに症例数を増やして、本術式の生物学的効果およびその適応と有効性、合併症について検討を重ねていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, Sotozono C, Nakamura T, Shimizu Y, Kinoshita S. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane - A useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45; 93-99: 2004.
2. Kinoshita S, Nakamura T. Development of cultivated mucosal epithelial sheet transplantation for ocular surface reconstruction. *Artif Organs.* 28(1); 22-27: 2004.
3. 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 disorder. *The Ocular Surface;* 2(1): 21-33: 2004.
4. Kinoshita S, Koizumi N, Nakamura T. Transplantable cultivated mucosal epithelial sheet for ocular surface reconstruction. *Exp Eye Res.* 78(3); 483-491: 2004.
5. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Cannon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, Kinoshita S. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45; 800-806: 2004.
6. Cooper LJ, Fullwood NJ, Koizumi N, Nakamura T, Kinoshita S. An investigation of removed cultivated epithelial transplants in patients after allo-cultivated corneal epithelial transplantation. *Cornea* 23; 235-242: 2004.
7. Endo K, Kawasaki S, Nakamura T, Kinoshita S. The presence of keratin 5 as an IgG Fc binding protein in human corneal epithelium. *Exp Eye Res.* 78(6); 1137-41: 2004.
8. Endo K, Nakamura T, Kawasaki S, Kinoshita S. Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the $\alpha 5$ chain of type IV collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45; 1771-1774: 2004.
9. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S. Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scan.* 82(4); 468-471: 2004.
10. Amemiya T, Nakamura T, Oseko F, Yamamoto T, Fukushima A, Nakanishi A, Kinoshita S, Kanamura N. Human oral epithelial and periodontal ligament cells sheets cultured on human amniotic membrane for oral reconstruction. *J Oral Tissue Engin.* 1(1); 89-96: 2004.
11. Kinoshita S, Nakamura T. Regenerative medicine for the cornea. *JMAJ.* 47(7); 317-321: 2004.
12. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular

surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 88; 1280-1284: 2004.

13. Endo K, Nakamura T, Kawasaki S, Kinoshita S. Pig corneal epithelial cells consist of high- and low integrin beta1-expressing populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45; 3951-3954: 2004.
14. 中村隆宏, 木下茂: 培養口腔粘膜上皮シートによる眼表面再建術. 炎症再生 24(1): 43-46, 2004.
15. 中村隆宏: 角膜上皮再建法. あたらしい眼科 21(2): 153-160, 2004.
16. 中村隆宏: 難治性眼表面疾患における病的角化の分子機構. 日本眼科学会雑誌 108(11):654-664,2004.
17. 中村隆宏: 角膜上皮のステムセル移植. 医学のあゆみ 211(10):909-914, 2004.

2. 学会発表

国内

1. 日比野佐和子、小泉範子、中村隆宏、稲富勉、外園千恵、横井則彦、木下茂: 急性期化学外傷に対する培養粘膜上皮移植術の治療成績. 第27回日本眼科手術学会、東京、2004. 1. 30.
2. 稲富勉、中村隆宏、東原尚代、小泉範子、日比野佐和子、外園千恵、木下茂: 自己培養口腔粘膜上皮移植術による新しい手術法: 結膜嚢再建術. 第27回日本眼科手術学会、東京、2004. 1. 30.
3. 下村智恵美、稲富勉、中村隆宏、小泉範子、外園千恵、横井則彦、木下茂: 急性増悪した眼類天疱瘡の遷延性角膜上皮欠損に対する治療成績. 第28回角膜カンファレンス、第20回日本角膜移植学会、米

子、2004. 2. 20.

4. 中村隆宏、伊藤若菜、曾我部寿代、稲富勉、外園千恵、木下茂、吉谷信、清水慶彦、Rigby H, Fullwood NJ: ヒト凍結乾燥羊膜移植術の開発. 第28回角膜カンファレンス、第20回日本角膜移植学会、米子、2004. 2. 20.
5. 関山英一、中村隆宏、川崎諭、木下茂: ヒト培養粘膜上皮シートにおける血管新生関連因子の発現. 第28回角膜カンファレンス、第20回日本角膜移植学会、米子、2004. 2. 21.
6. 稲富勉、中村隆宏、小泉範子、外園千恵、金村成智、木下茂: 自家培養口腔粘膜上皮移植術の眼表面再建への応用. 第28回角膜カンファレンス、第20回日本角膜移植学会、米子、2004. 2. 21.
7. 中村隆宏、稲富勉、外園千恵、木下茂: ヒト凍結乾燥羊膜による眼表面再建術の開発. 第3回日本再生医療学会、幕張、2004. 3. 25.
8. 谷岡英敏、福岡秀記、川崎諭、山崎健太、中村隆宏、稲富勉、外園千恵、木下茂: 重篤な眼表面疾患(SJSおよびOCP)の結膜組織における免疫組織学的検討. 第108回日本眼科学会、東京、2004. 5. 17.

海外

1. Nakamura T, Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, and Kinoshita S. Ocular Surface Reconstruction Using Cultivated Mucosal Epithelial Stem Cells. XVI International Congress of Eye Research (ICER), Sydney, Australia, 2004.9 3.
2. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N,

- Sotozono C, Kinoshita S. Clinical application of cultivated mucosal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction. XVI International Congress of Eye Research (ICER), Sydney, Australia, 2004.9 2.
3. Amemiya T, Yamamoto T, Nakamura T, Fukushima A, Nakamura T, Kinoshita S, Kanamura N. Development of an oral mucosa epithelium sheet using the amniotic membrane. The 82nd General Session and Exhibition of the International, American, and Canadian Associations for Dental Research. Hawaii, USA, 2004. 3.13
 4. Tanioka H, Fukuoka H, Kawasaki S, Yamazaki K, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S. The immunohistochemical investigation of conjunctiva in Stevens-Johnson syndrome and ocular cicatricial pemphigoid. 2004 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2004.4.25.
 5. Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda K.-H, Hisatomi T, Qiao H, Yamada J, Ishibashi T, Harada M, Kinoshita S. Distribution and Characterization of Bone Marrow-Derived Cells in the Mouse Cornea. 2004 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2004.4.28.
 6. Sekiyama E, Nakamura T, Kawasaki S, Kinoshita S. Expression of

Angiogenesis Related Factors in Human Cultivated Mucosal Epithelial Sheets. 2004 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2004.4.29.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 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

「粘膜上皮幹細胞マーカーの同定に関する研究」

分担研究者 橋本 公二 愛媛大学医学部皮膚科学 教授

研究要旨

難治性眼表面疾患に対して、異所性粘膜である口腔粘膜上皮幹細胞を細胞ソースとした培養口腔粘膜上皮幹細胞移植術の開発を目指し、口腔粘膜上皮幹細胞マーカーの同定に関して検討した。口腔粘膜上皮にはさまざまな分化度の細胞群が存在すると考えられ、遺伝子発現プロファイルや clonal analysis を用いた手法により、現在そのマーカー候補を引き続き検討中である。

A. 研究目的

難治性眼表面疾患の大部分は両眼性疾患であり、自己の角膜上皮幹細胞は消失しているため、自己角膜上皮による眼表面再建は不可能である。現在、これらの疾患に対して、異所性粘膜である口腔粘膜を細胞ソースとした培養口腔粘膜上皮シートを用いた眼表面再建術が考案されている。口腔内の粘膜上皮にはさまざまな分化度をもった細胞群が存在すると予想されるが、これまで口腔粘膜上皮幹細胞に関する知見は極めて乏しく、その細胞生物学的特性は不明な点が多かった。本研究では、培養口腔粘膜上皮幹細胞移植術の開発を念頭に、口腔粘膜上皮幹細胞マーカーの同定を検討した。

B. 研究方法

遺伝子発現プロファイルによる網羅的な相対的遺伝子発現解析により、目的となる幹細胞マーカーの候補遺伝子の絞り込みを試みた。また、皮膚の表皮細胞（PNAS 1987）や角膜上皮細胞（JCB 1999）で報告されているこれまでの幹細胞研究手法に従い、細胞の *in vitro* における増殖能により細胞の

キャラクターを選別する single cell clonal analysis を施行した。正常ボランティアより口頭および文書で同意を得た後、抜歯時に得られる口腔粘膜を採取した。Dispase, trypsin/EDTA 処理後、口腔粘膜上皮細胞浮遊液を作成した。フィーダー細胞としてマイトマイシンC処理した3T3細胞を使用し、口腔粘膜上皮細胞を培養した。一週間後、コロニー形成した細胞群を回収し、1wellあたり1個播種するように継代培養し、そのコロニー形成率により細胞を holoclone (95%, stem cell), meroclone (5-95%, young TA cell), paraclone (5%), TA cell) に選別を試みた。

C. 研究結果

遺伝子発現プロファイルによる網羅的解析から、ある特定の増殖因子ファミリーのいくつかの因子が、口腔粘膜上皮において高い増殖能を持つ細胞集団を形成することを発見した。口腔粘膜上皮細胞を用いた single cell clonal analysis でも、holoclone (stem cell) に分類される増殖能の極めて高い細胞群は既報のとうり存在

した。その比率に関しては現在解析中である。

D. 考察

近年の再生医学研究により、神経、表皮、肝臓などのさまざまな組織幹細胞研究が飛躍的に進歩しているが、口腔粘膜上皮幹細胞に関する研究はほとんど報告されていないのが現状である。現在までのデータより、口腔粘膜上皮においても holoclone に代表される極めて増殖能の高い細胞群が存在することがわかった。今後は、これらの細胞群の遺伝子発現の差異を詳細に検討し、そこから得られた情報を幹細胞研究にフィードバックする予定である。将来的に本研究により口腔粘膜上皮幹細胞に関する知見が解明されれば、難治性眼表面疾患に対する粘膜上皮再建のみならず、広くは口腔領域、消化管、気管、尿道など、さまざまな領域の粘膜上皮系幹細胞に対する細胞生物学的特性への理解が深まり、各組織、臓器の再生医療研究に多大に貢献しうるものと考えられる。

E. 結論

ヒト口腔粘膜上皮において、生体外で極めて増殖能力の高い細胞群が存在することがわかった。この細胞群が幹細胞を含めどのレベルの細胞群に含まれるのかは今後の検討課題である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, Sayama K, Hashimoto K.:

All-trans-retinoic acid induces interleukin-8 via the nuclear factor-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 123:1078-85, 2004

2. Shirakata Y, Ueno H, Hanakawa Y, Kameda K, Yamasaki K, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: TGF-beta is not involved in early phase growth inhibition of keratinocytes by 1alpha,25(OH)2vitamin D3. *J Dermatol Sci.* 36:41-50, 2004
3. Niiya H, Azuma T, Jin L, Uchida N, Inoue A, Hasegawa H, Fujita S, Tohyama M, Hashimoto K, Yasukawa M.: Transcriptional downregulation of DC-SIGN in human herpesvirus 6-infected dendritic cells. *J Gen Virol.* 85:2639-42, 2004
4. Kohno S, Nakagawa K, Hamada K, Harada H, Yamasaki K, Hashimoto K, Tagawa M, Nagato S, Furukawa K, Ohnishi T.: Midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for malignant glioma therapy. *Oncol Rep.* 12:73-8, 2004.
5. Dai X, Yamasaki K, Yang L, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Hashimoto K.: Keratinocyte G2/M growth arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is caused by Cdc2 phosphorylation through Wee1 and Myt1 regulation. *J Invest Dermatol.* 122:1356-64, 2004
6. Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L,

- Yoshimura A, Hashimoto K.: SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 327:100-5, 2005
7. Ishii K, Harada R, Matsuo I, Shirakata Y, Hashimoto K, Amagai M.: In vitro keratinocyte dissociation assay for evaluation of the pathogenicity of anti-desmoglein 3 IgG autoantibodies in pemphigus vulgaris. *J Invest Dermatol.* in press
 8. Hanakawa Y, Shirakata Y, Nagai H, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K.: Cre-loxP adenovirus-mediated foreign gene expression in skin-equivalent keratinocytes. *Br J Dermatol.* in press
 9. 橋本公二: 上皮再生の現状と新たな展望。 *Medical Science Digest* 28:8-10, 2002. 12
- in skin equivalent model using replication-deficient adenovirus vector system. 32nd annual meeting of the European Society for Dermatological Research September 19, 2002, Geneva, Switzerland
3. Hashimoto K, Shirakata Y, Yamasaki K: Cre-loxP adenovirus mediated foreign gene expression in skin equivalent keratinocytes. Symposia "GENE THERAPY" 20th World Congress of Dermatology June 5, 200, Paris, France
 4. Hashimoto K, M Tohyama: HHV-6 associated drug eruption (HADE). Symposia "CUTANEOUS DRUG ERUPTIONS & DRUG HYPERSENSITIVITY" 20th World Congress of Dermatology June 1, 200, Paris, France

学会発表

1. Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hashimoto K: Betacellulin is an autocrine growth factor for human epidermal keratinocytes, and its auto- and cross-induction are mediated via the JNK pathway. 63rd annual meeting of the Society for Investigative Dermatology May 15, 2002, Los Angeles, USA
2. Shirakata Y, Hanakawa Y, Yamasaki K, Tokumaru S, Yang L, Dai X, Yahata Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Efficient transgene expression

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 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

「粘膜上皮幹細胞シートの開発に関する研究」

分担研究者 島崎 潤 東京歯科大学眼科 助教授

研究要旨

難治性眼表面疾患に対する培養粘膜上皮細胞シートを用いた眼表面再建術は、新しい再生医療として精力的に開発が進められている。現在の培養上皮シート作成時にはウシ胎児血清を使用するのが主流であるが、可能であればヒト自己血清を用いるほうが理想的である。本研究では、培養粘膜上皮幹細胞シートの開発を念頭に、その培養時の安全性や倫理的課題を克服するため、ヒト自己血清を用いた培養粘膜上皮細胞シートの開発を検討した。その結果、自己血清を用いた培養粘膜上皮細胞シートは、ウシ胎児血清を用いたシートと同等の組織学的、細胞生物学的特徴を示した。

A. 研究目的

現在、さまざまな基質を用いた培養粘膜上皮細胞シート移植による眼表面再建術が開発されている。現行の培養上皮細胞シート作成時には、ウシ胎児血清やフィーダー細胞を使用する場合が多い。特に昨今の BSE、未知の病原体等の諸問題を考慮すれば、培養時のウシ胎児血清の代替を検討する必要がある。本研究では、培養粘膜上皮幹細胞シートの開発を念頭において、その培養時に添加する血清の倫理的課題を克服するため、安全性・倫理面に配慮したヒト自己血清を用いた培養粘膜上皮細胞シートの開発を検討した。

B. 研究方法

1) ヒト自己血清の調整

正常ボランティアより口頭および文書で同意を得た後、30 ml採血した。遠心分離後、血清を56℃30分間で不活化(非働化)した。フィルター処理

後、クライオチューブに分注し、-80℃で保存した。

2) ヒト自己血清を用いた培養粘膜上皮細胞シートの作成

ヒト自己血清を用いた培養粘膜上皮細胞シートの作成条件を厳密に規定した。細胞は正常ボランティアより口頭および文書で同意を得た後、抜歯時に得られる口腔粘膜を一部使用した。培養基質には、EDTA処理により上皮を除去した羊膜基質を使用した。培養液成分としてはインシュリン、EGF、コレラトキシンを含む標準的な角膜上皮培養液を用い、必要に応じて細胞増殖因子等を加味して改変した。同時に3T3 feeder cellの調整、air-lifting法の併用などの培養手法を用いた。

3) 生物学的特性の検討

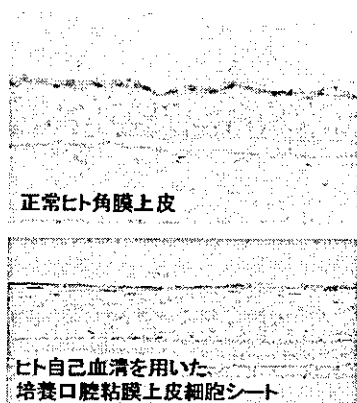
ヒト自己血清を用いた培養粘膜上皮細胞シートの組織学的形態を走査型・透過型電子顕微鏡を用いて解析した。また細胞骨格タンパクであるケラチン1/10、4/13及び3/12の局在を免疫組織化学法にて検討した。比較対照と

しては従来のウシ胎児血清を用いた培養粘膜上皮細胞シートを使用した。

C. 研究結果

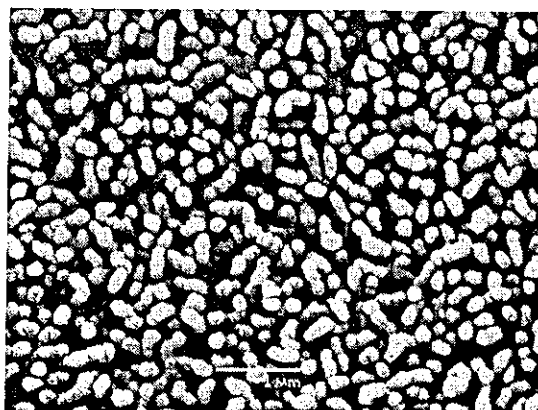
1) ヒト自己血清を用いた培養口腔粘膜上皮細胞シート作成

ヒト自己血清を用いた培養口腔粘膜上皮細胞の増殖を検討した結果、培養開始後の1週間以内はウシ胎児血清による培養系の増殖が、ヒト自己血清に比べ上回っていたが、最終的には同等の増殖レベルに達した。その組織像はHE染色で4-5層の重層扁平上皮の様相を呈し、正常角膜上皮、ウシ胎児血清を用いた培養口腔粘膜上皮細胞シートと同様の構造を示した。



2) 組織学的検討

ヒト自己血清を用いた培養口腔粘膜上皮細胞シートの走査型電顕像



走査型電顕像からは、細胞の境界は明瞭であり、強拡大像では、その最表層に無数の微絨毛が確認され、粘膜上皮としての性質を保持していることがわかった。

ヒト自己血清を用いた培養口腔粘膜上皮細胞シートの透過型電顕像



透過型電顕像からは、培養上皮細胞間は無数のデスモゾームによる接着構造が確認され、最表層にも無数の微絨

毛が認められた。

3) 生物学的特性

ヒト自己血清による培養口腔粘膜上皮細胞の細胞骨格タンパクであるケラチンの発現を検討した結果、角化型ケラチン 1/10 及び角膜型ケラチン 12 の発現は認められず、粘膜分化型ケラチン 4/13 及び角膜型ケラチン 3 の発現は認められた。この発現パターンは、ウシ胎児血清を用いた培養口腔粘膜上皮細胞シートと同様であった。

D. 考察

培養粘膜上皮幹細胞シート作成の開発において、その安全性・倫理面が保証された培養上皮シートを開発するため、ヒト自己血清を用いた適切な作成の条件およびその評価を行った。今回の結果より、我々が作成したヒト自己血清を用いた培養口腔粘膜上皮細胞シートは、従来のウシ胎児血清を用いた培養上皮細胞シートと同様の組織学的構造、生物学的特徴を示した。これらのデータより、ヒト自己血清を用いる当手法は、従来のウシ胎児血清を用いる手法に取って代わる、より安全で倫理面に配慮した培養上皮細胞シート作成法となりえる可能性が示唆された。今後は、このヒト自己血清を用いた培養粘膜上皮細胞シート作成を、実際の難治性眼表面疾患患者から自己血清を採取し、培養上皮細胞シートを作成後、臨床使用し、その安全性、生物学的効果、手術成績を評価する予定である。

E. 結論

ヒト自己血清を用いた培養粘膜上皮細胞シート作成は、従来使用されてきたウシ胎児血清法と同等の培養手法

であり、難治性眼表面疾患患者に臨床使用できることがわかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimazaki J, Shinozaki N, Shimmura S, et al. Efficacy and safety of international donor sharing: a single-center, case-controlled study on corneal transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 216-20.
- 2) Shimazaki J, Shimmura S, and Tsubota K. Donor source affects the outcome of ocular surface reconstruction in chemical or thermal burns of the cornea. *Ophthalmology* 2004; 111: 38-44.
- 3) 島崎 潤、眼表面再建術の最近の進歩. *臨床眼科* 2004; 58(3): 257-260.
- 4) 島崎 潤、カラーアトラス-羊膜移植. *歯科学報* 2004; 104(1): 81-83.
- 5) 島崎 潤、角膜パーツ移植. *医学のあゆみ* 2004; 211(10): 989-993.

2. 学会発表

国内

1. 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 回角膜カンファランス, 第 20 回日本角膜移植学会, 米子市, 2004/2/19-21.
2. 比嘉一成, 大島三冬, 石橋直子, 相庭昌代, 榛村重人, 島崎潤, 坪

田一男. 角結膜上皮における HLA-G の役割と羊膜による影響. 第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京, 2004/7/13-14.

3. 島崎潤. 角膜再生と人工角膜の開発. 第 70 回日本中部眼科学会, 大阪, 2004/11/26-28.
4. 島崎潤. 癬痕性角結膜症上皮疾患への応用. 羊膜移植の現状と未来. 第 108 回日本眼科学会総会, 東京, 2004/4/16.

海外

- 1) Shimazaki J, Aiba M, Shimmura S, Tsubota K. Transplantation of cultivated limbal and conjunctival epithelium for various ocular surface disorders. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U.S.A., 2004/4/25-29.
- 2) Higa K, Oshima M, Ishibashi N, Aiba M, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Changes of the HLA-G expression in the corneal and conjunctival epithelium cultivated on the amniotic membrane. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U.S.A., 2004/4/25-29.
- 3) Oshima M, Higa K, Ishibashi N, Aiba M, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Expression of HLA-G in the human corneal epithelium. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U.S.A., 2004/4/25-29.
- 4) Shimazaki J. New surgical techniques for ocular surface reconstruction using cultivated corneal and oral

mucosal epithelial sheet. XIII. Afro-Asian Congress of Ophthalmology, Istanbul, Turkey, 2004/6/18-22.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 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

「粘膜上皮幹細胞移植術の開発に関する研究」

分担研究者 小泉 範子 同志社大学再生医療研究センター 助教授
研究協力者 中村 隆宏 同志社大学再生医療研究センター 講師

研究要旨

近年、羊膜を基質に用いた難治性眼表面疾患に対する培養粘膜上皮移植術は、細胞治療による新しい再生医療として注目されている。現在報告されている培養粘膜上皮移植術の倫理的問題点として、滅菌操作が行われていない羊膜を使用している点である。本研究では、培養粘膜上皮幹細胞移植の開発を念頭において、その基質の倫理的課題を克服するため、安全性・倫理面に配慮した滅菌操作可能な羊膜の開発を検討した。その結果、凍結乾燥させた後、 γ 線滅菌処理を施行した羊膜は、常温保存可能で従来の羊膜と同等の細胞生物学的特徴を保持していた。

A. 研究目的

難治性眼表面疾患に対する外科的再建術として、さまざまな基質を用いた培養粘膜上皮移植による眼表面再建術が開発されている。その中で、生体由来材料の羊膜は、抗炎症、癒痕抑制などの効果を持ち、また粘膜上皮の基質として極めて有用であることが報告されている。現在使用されている羊膜は、その特性から清潔操作下で処理後使用されているが、滅菌操作は施行されていない。近年、種々の病原体が注目を集めているように、今後ヒト羊膜を生体材料として用いるにあたっては滅菌操作が重要なポイントとなる。本研究では、培養粘膜上皮幹細胞移植術の開発を念頭において、その基質の倫理的課題を克服するため、安全性・倫理面に配慮した滅菌操作可能な羊膜の開発を検討した。

B. 研究方法

1) 乾燥羊膜の作成

羊膜に適切な滅菌操作を施行するために、羊膜を乾燥状態にする最適な方法を検討した。口頭、および文書による同意を得た後、感染症フリーの妊婦より帝王切開時に羊膜を採取した。採取した羊膜は清潔操作下でEDTAに浸漬後、上皮細胞を除去した。乾燥方法としては、自然乾燥法、凍結乾燥法にて羊膜を処理した。作成した乾燥羊膜は、真空パック下にて γ 線滅菌処理を行った。

2) 物理学的特性の検討

作成した乾燥羊膜の物理学的特性（強度）を検討するため、その耐破断張力、一点支持力を検討した。比較対照としては従来の凍結保存された羊膜を使用した。

3) 生物学的特性の検討

作成した乾燥羊膜の組織学的形態を走査型・透過型電子顕微鏡を用いて解析した。また羊膜の持つ細胞外マトリクス（collagen 1/3/4/5/7,

fibronectin, laminin5) の局在を免疫組織化学法にて検討した。比較対照としては従来の凍結保存された羊膜を使用した。

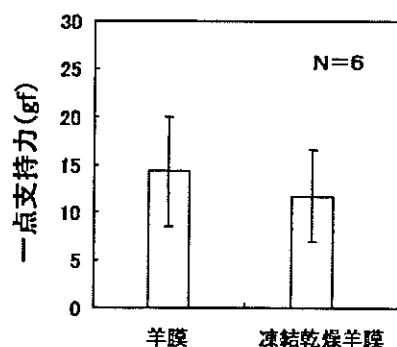
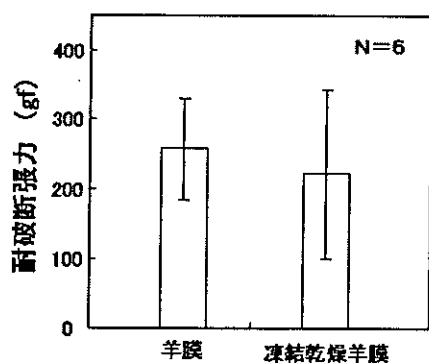
C. 研究結果

1) 乾燥羊膜の作成法の検討

自然乾燥した羊膜は、セッシで保持するも容易に破断し、10-0ナイロン糸による縫合も不可能であった。一方、凍結乾燥した羊膜はセッシを用いて保持することができ、また縫合可能であった。さらに凍結乾燥羊膜は、湿潤状態でもその柔軟性を保持した。以上より、羊膜の乾燥操作過程は、凍結乾燥法が最適であることがわかった。

2) 物理学的特性

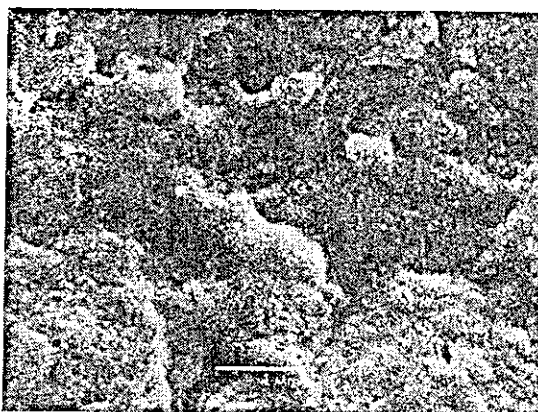
従来の羊膜、凍結乾燥羊膜の強度を耐破断張力、一点支持力を用いて検討した。



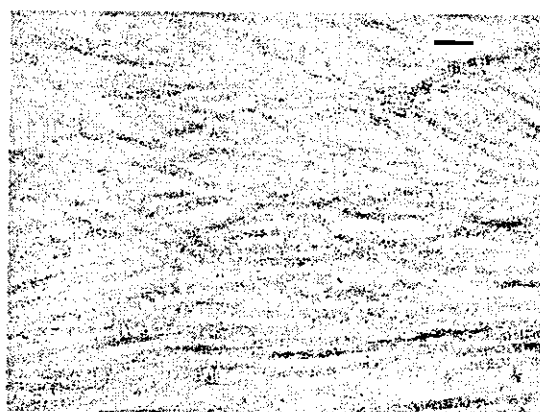
羊膜、凍結乾燥羊膜の耐破断張力、一点支持力に関して統計学的に有意差はなかった (t-test, N=6)。

3) 生物学的特性

凍結乾燥羊膜の走査型電顕像

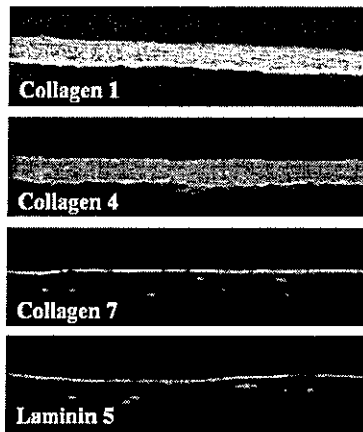


凍結乾燥羊膜の透過型電顕像



凍結乾燥羊膜の形態を電子顕微鏡で解析した結果、走査型電顕像から乾燥羊膜の上皮成分は完全に除去されており、その基底膜を含む細胞外マトリクスも保存されていることがわかった。透過型電顕像からは、羊膜のコラーゲン構造は凍結乾燥過程後も傷害なく保存されていることがわかった。羊膜および凍結乾燥羊膜の種々の細胞外マトリックスの発現を免疫染色にて検討した結果、羊膜基質全層に collagen1/2/4/5 および fibronectin が認められ、基底膜に一致して collagen7 および laminin5 の発現が

認められた。その発現パターンは、凍結乾燥羊膜においても同等であった。凍結乾燥羊膜の細胞外マトリックスの発現



D. 考察

羊膜を基質に用いた培養粘膜上皮幹細胞移植術の開発において、その安全性倫理面がクリアされた移植術を開発するため、適切な羊膜の処理方法を検討した。今回の結果より、我々が作成した滅菌処理済みの凍結乾燥乾燥羊膜は、縫合可能であり、従来の羊膜と同等の力学的強度および柔軟性保持していた。形態学的にも凍結乾燥羊膜は上皮成分の残存はなく、凍結乾燥過程での基底膜成分、コラーゲン成分は保持されていた。その細胞外マトリックスも同様に保持していた。これらのデータより、滅菌処理された凍結乾燥羊膜は、従来の羊膜と同等の細胞生物学的効果を示す可能性があり、より安全で倫理面に配慮した培養粘膜上皮幹細胞移植術の基質となりえる可能性が示唆された。今後は、この凍結乾燥羊膜を用いた培養粘膜上皮幹細胞シートの作成および動物レベルにおける移植実験を行う予定である。

E. 結論

滅菌処理を施行した凍結乾燥羊膜は羊膜と同等の物理学的、細胞生物学的特徴を示し、培養粘膜上皮幹細胞移植術における安全で倫理面に配慮した有用な培養基質となりえる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kinoshita S, Koizumi N, Sotozono C, Yamada J, Nakamura T, Inatomi T. Concept and Clinical Application of Cultivated Epithelial Transplantation for Ocular Surface Disorders. *The Ocular Surface* 2(1):21-33, 2004
- 2) Kinoshita S, Koizumi N, Nakamura T. Transplantable cultivated mucosal epithelial sheet for ocular surface reconstruction. *Exp Eye Res* 78(3): 483-91, 2004.
- 3) Cooper LJ, Fullwood NJ, Koizumi N, Nakamura T, Kinoshita S. An investigation of removed cultivated epithelial transplants in patients after allocultivated corneal epithelial transplantation. *Cornea* 23(3):235-42, 2004.
- 4) Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, Sotozono C, Nakamura T, Shimizu Y, Kinoshita S. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane - A useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45; 93-99: 2004.

- 5) Kinoshita S, Nakamura T. Development of cultivated mucosal epithelial sheet transplantation for ocular surface reconstruction. *Artif Organs*. 28(1); 22-27; 2004.
 - 6) 小泉範子, 外園千恵: 培養角膜上皮移植の臨床経験. *眼科* 46:1047-1055, 2004.
 - 7) 中村隆宏: 角膜上皮再建法. *あたらしい眼科* 21(2): 153-160, 2004.
 - 8) 中村隆宏: 培養上皮移植. *日本角膜移植学会誌* 5: 19-25, 2004.
 - 9) 中村隆宏: 角膜上皮のステムセル移植. *医学のあゆみ* 211(10): 909-914, 2004.
2. 学会発表
- 国内
1. 中村隆宏, 伊藤若菜, 曾我部寿代, 稲富勉, 外園千恵, 木下茂, 吉谷信, 清水慶彦, Rigby H, Fullwood NJ: ヒト凍結乾燥羊膜移植術の開発. 第28回角膜カンファレンス, 第20回日本角膜移植学会, 米子, 2004. 2. 20.
 2. 下村智恵美, 稲富勉, 中村隆宏, 小泉範子, 外園千恵, 横井則彦, 木下茂: 急性増悪した眼類天疱瘡の遷延性角膜上皮欠損に対する治療成績. 第28回角膜カンファレンス, 第20回日本角膜移植学会, 米子, 2004. 2. 20.
 3. 稲富勉, 中村隆宏, 小泉範子, 外園千恵, 金村成智, 木下茂: 自家培養口腔粘膜上皮移植術の眼表面再建への応用. 第28回角膜カンファレンス, 第20回日本角膜移植学会, 米子, 2004. 2. 21.
 4. 関山英一, 中村隆宏, 川崎論, 木下茂: ヒト培養粘膜上皮シートにおける血管新生関連因子の発現. 第28回角膜カンファレンス, 第20回日本角膜移植学会, 米子, 2004. 2. 21.
 5. 中村隆宏, 稲富勉, 外園千恵, 木下茂: ヒト凍結乾燥羊膜による眼表面再建術の開発. 第3回日本再生医療学会, 幕張, 2004. 3. 25.
 6. 川崎論, 山崎健太, 稲富勉, 谷岡秀敏, 小泉範子, Ilene K. Gipson, 木下茂: hTERT 不死化培養角膜上皮細胞と in vivo 角膜上皮細胞との類似性の検討. 第108回日本眼科学会総会, 東京, 2004.4.17.
 7. 谷岡英敏, 福岡秀記, 川崎論, 山崎健太, 中村隆宏, 稲富勉, 外園千恵, 木下茂: 重篤な眼表面疾患 (SJS および OCP) の結膜組織における免疫組織学的検討. 第108回日本眼科学会, 東京, 2004. 5. 17.
 8. 小泉範子: 眼科における生体材料—羊膜を用いた角膜再生医療. 第27回材料講習会 医師と患者が求める材料・技術, 京都, 2004.9.29.
 9. 外園千恵, 東原尚代, 小泉範子, 稲富勉, 横井則彦, 木下茂, 山田昌和, 海道美奈子, 村戸ドール, 坪田一男: Stevens-Johnson 症候群の他覚的眼所見を評価する臨床スコアの試作. 第58回日本臨床眼科学会, 東京, 2004.11.11.
 10. 若山美紀, 稲富勉, 外園千恵, 中村隆宏, 小泉範子, 渡辺彰英, 荒木美治, 横井則彦, 木下茂: 瘢痕性角結膜疾患に対する眼表面再建術と眼瞼形成術の併用の有用性. 第58回日本臨床眼科学会, 東京, 2004.11.11.

海外

- 1) Koizumi N, Rigby H, Fullwood NJ, Koizumi K, Jousseaume AM, Kociok N, Kinoshita S. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for human limbal epithelial cell culture. 2004 Annual Meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), Fort Lauderdale, Florida, U.S.A., 2004.4.28.
- 2) Nakamura T, Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, and Kinoshita S. Ocular Surface Reconstruction Using Cultivated Mucosal Epithelial Stem Cells. XVI International Congress of Eye Research (ICER), Sydney, Australia, 2004.9.3.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特許出願（2003-49947）
羊膜由来医用材料、及びその作製方法
2. 実用新案登録 なし
3. その他