

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 坪田 一男

平成17（2005）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…………… 8-12
臨床応用に関する研究」
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 羊膜上にヒト角膜上皮細胞を培養して作成した上皮シート移植の臨床応用を行い、多施設共同研究の結果、遠隔地への運搬に関する問題のないことが示された。また、術後の免疫抑制を要さない自己口腔粘膜上皮シートの作成に成功し、臨床応用を達成した。基礎的研究面では、角膜上皮および実質における未分化細胞の分離に成功し、幹細胞を組み込んだ人工角膜の作成に向けて進歩が得られた。羊膜の抗炎症作用について、HLA-G分子を再生角結膜上皮に誘導するメカニズムがあることを示した。さらに、人工ポリマーと羊膜上皮シートを組み合わせたハイブリッド人工角膜を開発し、動物実験でその安全性と術後上皮化が得られることが示された。

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、共同研究者が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

研究参加施設において共通のプロトコールで難治性眼表面疾患患者に対して上皮シート移植を行い、その効果と安全性を調べた。また、当施設における角膜上皮シート移植のこれまでの成績をまとめて検討した。両眼性の眼表面疾患に対し、免疫学的拒絶反応を生じさせない治療法の開発を目的として、自己の口腔粘膜移植の開発と臨床応用を検討した。

羊膜の抗炎症作用の解明のために、羊膜上に再生した角結膜上皮細胞には、免疫

反応を制御する HLA-G が強く発現しているという仮説を検証し、羊膜移植の抗炎症作用との関連性を検討した。さらに、人工角膜の開発を目的に、バイオポリマー上への羊膜上皮シートの接着について検討した。角膜の未分化細胞の分離・同定・培養法を検討した。

倫理面への配慮

羊膜、角結膜組織、口腔粘膜の採取、培養、移植に際しては、ドナーおよび患者に詳細な説明文書を渡した上で文書によるインフォームド・コンセントをとって施行している。羊膜を含めた他家組織の移植に際しては、ドナーの感染症検査を行っている。東京歯科大学倫理委員会において羊膜、口腔粘膜上皮を用いた眼表面再建手術の審査を受け承認されている。本提供に関わるいかなる個人情報も保護され、提供の有無を含め第三者に情報が漏洩されることはない。

C. 研究結果

（角膜上皮シート移植・多施設共同研究）
東京歯科大眼科においてこれまで行わ

れて経過観察のできた33眼についての
 中期的予後を検討した結果、50%強の
 症例で最終的な角膜上皮化が得られて
 いた(下表)。また、東京歯科大眼科にお
 いてはこれまで3例4眼が多施設共同研
 究にプロトコールに従って培養輪部上皮
 移植を受けた。いずれも術後の角膜上皮
 化が得られており、その手術成績は、従
 来の培養上皮移植のそれと同じであり、
 培養上皮シートが安全にかつ効果を損な
 うことなく輸送できることが示された。



図1. 口腔粘膜培養上皮のK3の免疫染色。

	培養法1	培養法2	計
Auto	1/2	6/6	3/8
Allo	3/9	2/7	5/16
Living-related	4/7	2/2	6/9
計	8/18 (44.4%)	10/15 (66.7%)	18/33 (54.5%)
視力改善	9/18	8/15	17/33 (51.5%)

表1. 東京歯科大学における角膜上皮シート移植結果のまとめ。

(口腔粘膜上皮シート移植)

平成15年度に口腔粘膜の採取および
 羊膜上への培養法がほぼ確立したことを
 受け、16年度は培養シートの性質の解
 析と並行して、臨床応用を開始した。東
 京歯科大眼科においては12例13眼の
 培養口腔粘膜上皮移植が施行され、高率
 で培養上皮に生着が認められた。組織学
 的に培養口腔粘膜上皮は角膜上皮に似た
 形態を持ち、ケラチン3を発現するとと
 もに、口腔粘膜上皮様の性質も保持して
 いた(図1)。

(バイオポリマー上への羊膜上皮シート
 の接着)

合成ポリマーであるPVAの上に羊膜
 を重合させ、その上に上皮細胞を培養し
 たハイブリッド表層人工角膜を作成した
 (図2)。動物実験を行った結果、移植後
 に本人工角膜上に上皮の再生が見られ、
 組織学的にも再生上皮と人工角膜との良
 好な接着が観察された(図3)。

上皮

羊膜

固定用ポリマ

図2. 羊膜固定化 PVA 上に角膜上皮を培
 養したハイブリット人工角膜の組織像。

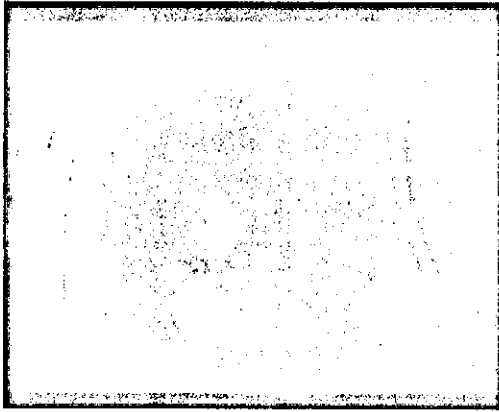


図3. ハイブリット型人工角膜を移植したウサギ角膜のフルオレセイン染色。

(羊膜の抗炎症作用)

H15年度において角結膜上皮の HLA-G mRNA の発現が羊膜上に培養すると増加していたのを受けて、角膜由来の HLA-G の機能について検討した。角膜由来の HLA-G をベクターを用い K562 へ感染させ、NK 細胞の細胞障害性への影響を検討したところ、HLA-G の発現により細胞障害性が減少傾向をした。この減少によって、羊膜の持つ抗炎症作用への関与が強く示唆された。

(未分化角膜上皮細胞の分離)

Hechst 色素の排出能が高い side population (SP) 細胞を、ウサギおよびヒト角膜より分離した。この SP 細胞の多くは輪部上皮基底細胞でコロニー形成能を有する細胞が認められ (図4)、一方で実質細胞やメラノサイトも含まれていた (図5)。SP 細胞を SDEM 培地で培養することで角膜上皮様に分化した。また、角膜実質細胞より sphere 細胞を分離することに成功し、分化角膜上皮のマーカであるケラチン12は発現せず、ABCG2 などの未分化マーカを発現していた (図6)。これらが未分化で神経細胞などへの多分化能を持つ角膜実質由来

の細胞であることも示された。

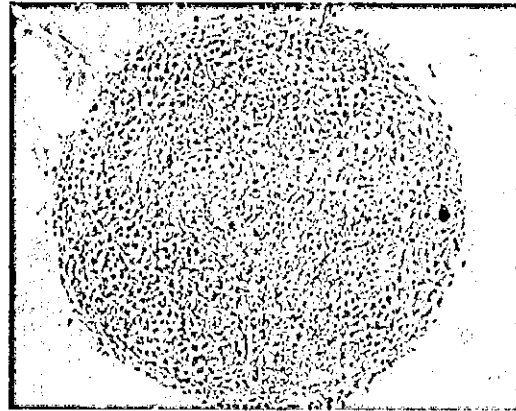


図4. SP 細胞からコロニーを形成した角膜上皮様の細胞。

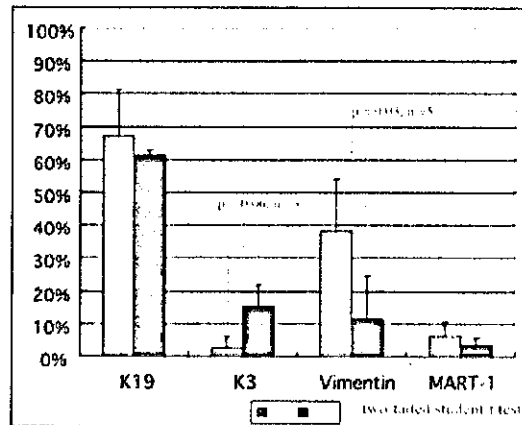


図5. SP 細胞におけるマーカ発現。

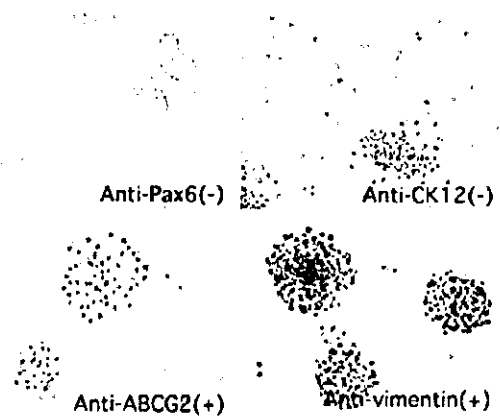


図6. 角膜実質より分離した sphere 細胞におけるマーカ発現

D. 考察

1) 達成度について

『羊膜を用いた再生上皮シートによる角膜再生』という目的に沿った成果が得られたと考えられる。従来、再生医療の応用としての眼表面治療法の開発が注目を集めてきたが、その安全性やメカニズムの解明は不完全であり、多くの施設で広く行ってさらにビジネス化を目指すには問題点も多かったが、これらの点に関して着実な進歩が見られた。研究計画書に書かれた全項目について、ほぼ計画通りの進捗が見られたばかりでなく、未分化細胞に関する研究や培養口腔粘膜上皮シートの研究においては、計画を上回る成果が得られ、角膜上皮再生の研究は基礎・臨床の両面においてこの数年で質的にも量的にも大きな広がりが見られた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

基礎的検討としては、角膜上皮、角膜実質よりの未分化細胞を再現性を持って分離することができるようになった。これらの細胞の characterization も遺伝子解析やタンパク発現などの面から解析を行い、これらが多分化能を有する未分化な細胞群であり、培養条件を変えることで本来の細胞の性質を持つように誘導することができることが示された。角膜上幹細胞研究は約20年の歴史を持つが、ここ数年でその成果は確実に上がっており、わが国におけるこの分野の研究は国際的に見ても高い評価を得ている。更に、臨床的に応用範囲の広い羊膜の抗炎症作用のメカニズム解析においては、これまでわれわれが解明した羊膜内のヒアルロン酸の関与以外に、羊膜上に再生した角膜上皮に immuno-modulation の働きがある HLA-G 分子の発現を誘導することが

関係していることが示された。このメカニズムは、抗炎症作用として全く新しいメカニズムであり、羊膜の持つユニークな性質をまた一つ明らかにすることができた。

臨床面でも再生上皮シート移植は着実な進展が見られた。これまで臨床応用がなされている角膜輪部上皮細胞をソースとする上皮シート移植は更に症例数が重ねられ、かつ本研究の参加施設以外にも広がりを見せて、いまや眼科治療法の一つとして認知されるにいたった。さらに今回の多施設共同研究によって、遠隔地に上皮シートを運搬しても安全性や効果に大きな問題がないことが示されたことは、近い将来へのビジネス化へつながる成果といえる。また、従来免疫学的拒絶反応が大きな問題であった他家上皮シートに加え、自己の角膜以外の細胞ソースを用いた上皮シートとして、培養口腔粘膜上皮シートが開発され、臨床応用されるにいたった。これまでの経験では、本シートは角膜上皮シートよりも透明性や抗血管新生効果の面ではやや劣るものの、上皮シートの安定性や免疫抑制に伴う緑内障や感染などの合併症が少ないという利点が示された。

3) 今後の展望について

角膜上皮未分化細胞に関しては、これを培養上皮シートや人工角膜実質に組み込むことができるかの研究が待たれる。われわれは、未分化実質細胞を feeder 細胞としてもちいて角膜上皮の培養を行う試みにも着手しており、これが完成されれば 3T3 などの異種細胞を用いない培養法の開発につながる。臨床面でも、角膜上皮シート・口腔粘膜上皮シートの移植を今後症例を重ねることで、各々の治療法の適応が明らかとなり、将来的には疾

患によって使い分けることができるのではないかと期待される。また、上皮シートの運送や保存の安全性と効果が示されたことで、本治療法のビジネス化に向けての動きが加速されている。近い将来、より多くの施設で上皮シート移植がおこなう事ができるようになり、より多くの患者が光を取り戻すことにつながる事が期待される。

E. 結論

羊膜を基質として用いて上皮シートをin vitroで作成し、これを眼表面に移植する再建手術の実用化は、着実に進歩している。本研究においてその基礎的裏づけと臨床応用の実現が達成され、更に今後の発展や応用が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, et al. Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea* 2005; 24: 206-12.
2. Homma R, Yoshikawa H, Takeno M, et al. Induction of epithelial progenitors in vitro from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 4320-6.
3. Onguchi T, Takano Y, Dogru M, et al. Clinical evaluation of the accuracy of intraocular pressure measurement by Tono-Pen XL in eyes with amniotic membrane patching. *Am J Ophthalmol*

2005; 139: 570-1.

4. 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.
 5. 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.
 6. Shimmura S, Miyashita H, Konomi K, et al. Transplantation of corneal endothelium with Descemet's membrane using a hydroxyethyl methacrylate polymer as a carrier. *Br J Ophthalmol* 2005; 89: 134-7.
 7. 島崎 潤、眼表面再建術の最近の進歩. *臨床眼科* 2004; 58(3): 257-260.
 8. 島崎 潤、カラーアトラス-羊膜移植. *歯科学報* 2004; 104(1): 81-83.
 9. 島崎 潤、角膜パーツ移植. *医学のあゆみ* 2004; 211(10): 989-993.
 10. 榛村重人, 坪田一男. 眼組織の再生. *現代医療* 36(1): 45(45)-48(48), 2004.
 11. 榛村重人, 坪田一男. 角膜. *バイオマテリアル-生物材料-* 22 (3): 205-208, 2004. \
 12. 榛村重人. 水疱性角膜症に対する羊膜移植. *あたらしい眼科* 21(7): 915-916, 2004.
2. 学会発表
- 1) 国内
 - 第 3 回日本再生医療学会総会, 千葉市, 2004/3/23-25.
 1. 榛村重人, 宮下英之, 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

- してのハイブリッド・ポリマーの有用性.
2. 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 11 回 HAB 研究機構学術年会. 東京, 2004/5/18.
 3. 篠崎尚史. 再生医療としての角膜移植
第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京, 2004/7/13-14.
 4. 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.
 5. 吉田悟, 榛村重人, 只野貴示枝, 比嘉一成, 宮下英之, 島崎潤, 松崎有未, 岡野栄之, 坪田一男. マウス角膜からの未分化細胞の分離・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, 千葉市, 2004/3/23-25.
 6. 島崎潤. 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 108 回日本眼科学会総会, 東京, 2004/4/16.
 7. 島崎潤. 角膜再生と人工角膜の開発.
第 7 回日本組織工学会, 東京, 2004/7/1-2.
 8. 島崎潤. シンポジウム 3: 皮膚・眼・歯周: 角膜再生と人工角膜の現状
第 70 回日本中部眼科学会, 大阪, 2004/11/26-28.
 9. 島崎潤. 癍痕性角結膜症上皮疾患への応用. -羊膜移植の現状と未来-
海外
The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U.S.A., 2004/4/25-29.
 1. Shimazaki J, Aiba M, Shimmura S, Tsubota K. Transplantation of cultivated limbal and conjunctival epithelium for various ocular surface disorders.
 2. Shimmura S, Miyashita H, Konomi K, Taguchi T, Kobayashi H, Tanaka J, Shimazaki J, Tsubota K. Transplantation of Descemet's membrane with endothelium by continuous curvilinear descemetorhexis (CCD).
 3. 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.
 4. Usui A, Shimmura S, Matsuzaki Y, Hideyuki O, Higa K, Seino Y, Tsubota K. Immature side population cells in human limbal epithelium.
 5. Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H, Taguchi T, Kato N, Usui A, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K. Collagen-immobilized poly (vinyl alcohol) hydrogel as an artificial cornea scaffold.
 6. Oshima M, Higa K, Ishibashi N, Aiba M, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Expression of HLA-G in the human corneal epithelium.
 - XIII. Afro-Asian Congress of Ophthalmology, Istanbul, Turkey, 2004/6/18-22.
 7. Shimazaki J. New surgical techniques for ocular surface reconstruction using cultivated corneal and oral mucosal epithelial sheet.
- 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

分担研究者 木下 茂 京都府立医科大学眼科教授

研究要旨

平成16年2月から平成17年3月の間に、難治性角結膜疾患に対する培養角膜上皮シート移植を東京大学歯科、京都府立医科大学、愛媛大学の三施設で8症例8眼に対して施行した。培養角膜上皮シート移植の移送を行ったものはこのうち3例であるが、移送による不利益は生じなかった。脱落した1例をのぞく7例中6例で術前より視力が向上し、6例で良好な眼表面再建を得た。

C. 研究目的

Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡、薬剤性偽眼類天疱瘡、重症の熱・化学外傷は角膜上皮幹細胞が消失し、このため著しい癒痕形成を眼表面に生じる疾患である。上皮移植を行っても予後不良であることが多いことから、難治性角結膜疾患として位置づけられている。京都府立医科大学眼科学教室で開発し1999年より臨床応用を行っている「角膜上皮シート移植術」は、これらの疾患に対して良好な成果をあげている。本研究では、この角膜上皮シートを移送し多施設での移植を行うことの問題点と、その可否について検討した。

D. 研究方法

Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡、薬剤性偽眼類天疱瘡、重症の熱・化学外傷およびその他の幹細胞疲弊による癒痕性角結膜上皮症を対象疾患とし、三施設で症例のエントリーを行った。東京歯科大学および愛媛大学の症例においては、京都府立医科大学で作成した培養上皮シートを陸上移送して移植を実施した。アロ培養角膜上皮シート移植による眼表面再建効果、視力回復効果、QOL 改善効果、

ならびに安全性を検討した。なお本研究については、GCP に準拠した学内自主臨床研究として各大学倫理委の承認を得ている。

C. 研究結果

Stevens-Johnson 症候群4例、眼類天疱瘡2例、化学外傷1例、特発性角結膜上皮症1例、先天無虹彩1例の7例7眼に対して、アロ培養角膜上皮移植を行った。このうち移植シートを移送した症例は Stevens-Johnson 症候群2例と化学外傷1例である。移送に伴う不利益を生じた症例はなく、全症例において予定通りの手術を施行することができた。7例中6例において術後早期より培養上皮シートは生着し炎症所見は極めて軽度、視力も著明に改善した。1例において手術後9日に上皮欠損を生じたため羊膜移植手術を行い、脱落症例とみなした。合併症としては、1例において術後早期に感染所見を生じたが1週以内に治癒した。拒絶反応を生じた症例はない。現時点で眼表面再建効果は7例中6例で良好、1例で遷延性上皮欠損あり、視力および QOL は7例中6例で術前より向上した。

D. 考察

培養角膜上皮シート移植を国内移送することについて、今回移送による移植を行った3症例ではとくに問題を生じなかった。培養角膜上皮シート移植は今回の7例中6例で良好な成果を得ており、難治性角結膜疾患に対する有用な治療方法として今後さらに発展させるべきであると考えられた。

E. 結論

難治性角結膜疾患に対する培養角膜上皮シート移植は眼表面再建、視力改善およびQOL改善のために有用である。培養角膜上皮シート移植を国内の複数の施設行うことが可能となるよう、今後症例を増やして検討し、長期的な予後についてさらに経過を観察する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

2. 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 Scand.* 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. Kinoshita S, Nakamura T. The Promise and challenges of regenerative medicine - Corneal cells for regeneration. *Ernst Schering Res Found Workshop.* in press.
 15. Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda KH, Hisatomi T, Qiao H, Yamada J, Fukata M, Ishibashi T, Harada M, Kinoshita S. Characterization and distribution of bone-marrow derived cells in mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46;497-503: 2005.
 16. Cooper LJ, Kinoshita S, German M, Koizumi N, Nakamura T Fullwood NJ. An investigation into the composition of amniotic membrane used for ocular surface reconstruction. *Cornea* in press
 17. Nakamura T, Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S. Ocular Surface Reconstruction Using Cultivated Mucosal Epithelial Stem Cells. *Exp Eye Res (Suppl)* 79: S179, 2004.
 18. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S. Clinical application of cultivated mucosal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction. *Exp Eye Res (Suppl)* 79, 2004.
 19. 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.
 20. 中村隆宏: 角膜上皮再建法. *あたらしい眼科* 21(2): 153-160, 2004.
 21. 中村隆宏: 培養上皮移植. *日本角膜移植学会誌* 5: 19-25, 2004.
 22. 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.
 23. 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)
2. 学会発表

2) 国内

1. 中村隆宏：難治性眼表面疾患に対する培養口腔粘膜上皮移植術の開発(第一回日本角膜学会学術奨励賞受賞記念講演)、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. 19.
2. 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(平成 15 年度日本眼科学会学術奨励賞受賞記念講演)、第 108 回日本眼科学会総会、東京、2004. 4. 17.

一般講演

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.

3) 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.
- 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.

6. その他

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 |

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。冷凍ヒト羊膜を解冻後に 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。この羊膜上に同上的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

1. Toshino A, Shiraishi A, Zhang W, Suzuki A, Kodama T, Ohashi Y. Expression of keratinocyte transglutaminase on cornea in vitamin a deficient rats. Current Eye Research in press 2005

学会発表

1. 原 祐子、白石 敦、田中裕子、大橋裕一、白方裕司、橋本公二 ヒト角膜

上皮細胞における Toll like receptor (TLR3) の発現動態 第 29 回角膜カンファレンス, 第 21 回日本角膜移植学会、徳島、2005.2.17.

2. 田中裕子、原 祐子、白石 敦、大橋裕一、揚 旅軍、白方裕司、橋本公二 ヒト皮膚繊維芽細胞含有コラーゲンをを用いた培養角膜上皮シートの作成 第 29 回角膜カンファレンス, 第 21 回日本角膜移植学会、徳島、2005.2.17.

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 (2004 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, 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
Homma R, Yoshikawa H, Takeno M, Kurokawa MS, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N.	Induction of epithelial progenitors in vitro from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	45	4320-4326	2004
Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K.	Hyaluronic Acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma.	Cornea	24	206-212	2005
Nakamura T. Ishikawa F. Sonoda KH. Hisatomi T. Qiao H. Yamada J. Fukata M. Ishibashi T. Harada M. Kinoshita S.	Characterization and distribution of bone-marrow derived cells in mouse cornea	Invest Ophthalmol Vis Sci.	46	497-503	2005
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
Ishino Y. Sano Y. Nakamura T. Connon 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

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
---	---	-------------------------------	----	---------------	------

Donor Source Affects the Outcome of Ocular Surface Reconstruction in Chemical or Thermal Burns of the Cornea

Jun Shimazaki, MD, Shigeto Shimmura, MD, Kazuo Tsubota, MD

Purpose: To study the association between surgical approach and postoperative results in chemical and thermal burns of the cornea.

Design: Retrospective, interventional, noncomparable case series.

Participants: Thirty-two eyes of 32 patients with chemical ($n = 27$) or thermal ($n = 5$) burns of the cornea that were associated with total limbal dysfunction. Eight eyes had a history of previous keratoplasty.

Intervention: Patients were treated by amniotic membrane transplantation combined with either conjunctivolimbic autograft transplantation (autograft group, $n = 11$) or keratolimbic allograft transplantation (allograft group, $n = 21$). Fifteen eyes had simultaneous penetrating keratoplasty (simultaneous group), and 6 had keratoplasty several months after ocular surface reconstruction (2-step group).

Main Outcome Measures: Reconstruction of the corneal surface by corneal epithelium, clarity of the cornea, and incidence of postoperative complications. The outcome was compared between the autograft and allograft groups and also between the simultaneous and 2-step groups.

Results: At final examination, 17 eyes (53.1%) showed stable corneal epithelialization. Preoperative conditions were similar in the autograft and allograft groups and also in the simultaneous and 2-step groups. The autograft group showed significantly better results than the allograft group in both corneal epithelialization (Kaplan-Meier analysis, $P = 0.003$) and clear cornea ($P = 0.010$). Although the incidences of corneal epithelialization and clear corneas did not significantly differ between the simultaneous and 2-step groups, the former had a higher rate of endothelial rejection in the central graft ($P = 0.019$).

Conclusions: In chemical or thermal burns of the cornea with monocular involvement, autografting should be considered as a first choice of surgery. Even in eyes with opaque corneal stroma, it may be safer to perform ocular surface reconstruction first, followed by keratoplasty as a secondary procedure. *Ophthalmology* 2004; 111:38-44 © 2004 by the American Academy of Ophthalmology.

Chemical or thermal burns of the cornea are frustrating disorders, especially when the injury involves the entire corneal limbus, where corneal epithelial stem cells reside. In such limbal deficiency, corneal epithelium is not capable of regenerating over the injured corneal surface, leading to either a persistent epithelial defect (PED) or conjunctivalization. To treat limbal deficiency, transplantation of corneal epithelial stem cells (limbal stem cell transplantation [LSCT]) is required. The treatment was first reported in

1989 by Kenyon and Tseng, who used a conjunctivolimbic autograft (CLAU) obtained from the patient's healthy eye and reported remarkable success.¹ Several other investigators used CLAU for various ocular surface diseases, with encouraging results.²⁻⁸ Later, Tsai and Tseng used cadaver eyes as a source of limbal stem cells (keratolimbic allograft transplantation [KLAL]) and reported favorable clinical outcomes.⁹ Since then, there have been several reports that used KLAL for severe ocular surface diseases/injuries, including chemical and thermal burns.¹⁰⁻¹⁴

Another improvement of ocular surface reconstruction includes the use of preserved human amniotic membrane transplantation (AMT).¹⁵ Amniotic membrane transplantation suppresses subconjunctival fibrosis and inflammation while promoting corneal epithelialization and differentiation, especially when combined with LSCT.¹⁵⁻²⁶ At present, the combination of AMT with either CLAU or KLAL is a popular surgical method for corneal burns. However, there are few reports that have compared these 2 methods. In addition, it is often difficult to determine the timing of corneal transplantation. Conjunctival invasion sometimes makes the observation of corneal clarity difficult. Surgeons must determine whether corneal transplantation should be

Originally received: June 17, 2002.

Accepted: February 24, 2003.

Manuscript no. 220415.

From the Department of Ophthalmology, Tokyo Dental College, Chiba, Japan.

Supported in part by a grant from the Ministry of Health and Welfare, Japan (H12-Saisei-012).

Partially presented at: American Academy of Ophthalmology Annual Meeting, November, 2001; New Orleans.

The authors do not have any proprietary interest in the products mentioned used in this study.

Correspondence to Jun Shimazaki, MD, Department of Ophthalmology, Tokyo Dental College, 5-11-13 Sugano, Ichikawa-shi, Chiba 272-8513, Japan. E-mail: jun@eyebank.or.jp.

Table 1. Causes of Chemical and Thermal Injuries

Chemical	
Alkali	17
Calcium hydroxide	6
Sodium hydroxide	6
Ammonium hydroxide	1
Multiple/unknown	4
Acid	5
Other	5 (povidone iodine, tar, battery fluid, paint, antitheft spray)
Thermal	
Fireworks	3
Other	2

performed simultaneously with LSCT or reserved as a second step. In the present study, we investigated how surgical approaches influence the surgical outcomes with corneal burns. The objective of this study is to provide some insight on surgical decisions in the treatment of severe chemical or thermal burns of the cornea.

Materials and Methods

Thirty-two consecutive eyes of 32 patients with chemical ($n = 27$) or thermal ($n = 5$) burns of the cornea were retrospectively studied. Causes of chemical and thermal injuries are listed in Table 1. All eyes that underwent ocular surface reconstruction had total limbal deficiency. Most eyes had either conjunctival or dermal epithelialization in their ocular surface, and only 3 eyes had epithelial defects at the time of surgery. Limbal function was evaluated by impression cytology or the observation of palisades of Vogt using slit-lamp biomicroscopy.²⁷ In impression cytology, presence of goblet cells on the corneal surface was regarded as a sign of limbal deficiency.²⁸ Eyes with partial limbal deficiency in which the palisades structure was partially visible were treated by excision of fibrous tissue, followed by AMT, and they were not included in this study. Subjects with postoperative follow-ups shorter than 6 months were also excluded.

There were 28 male patients and 4 female patients, with a mean age of 42.2 years (range = 14–71). There were 11 patients who had injuries in both eyes. Eight of the 32 eyes had a history of keratoplasty, including penetrating keratoplasty (PK) in 5 eyes, lamellar keratoplasty in 5 eyes, and keratoepithelioplasty in 3 eyes. Some patients received repeated or combined surgeries. One other eye had transplantation of oral mucosa. The demographic profile of the patients is shown in Table 2.

Preoperative corrected visual acuity ranged from hand movements to 20/100, with all but 1 eye (96.9%) less than 20/200. Associated disorders included symblepharon (3 eyes), PEDs (3 eyes), and bullous keratopathy (2 eyes). An association with glaucoma was noted in 5 eyes. Evaluation of glaucoma was not available in 9 eyes due to severe surface irregularity and corneal opacity.

Surgical Treatment

All subjects had LSCT. In unilateral injury, each patient received a full explanation about the advantages and potential risks of both CLAU and KLAL and decided on the procedure to receive. A conjunctivolimbic autograft was not done in patients who had bilateral injury, even when the potential donor eye showed complete clinical recovery. As a result, 11 eyes received a CLAU (autograft group), and 21 eyes received a KLAL (allograft group). Written informed consent was obtained from each patient before surgery.

Surgery was performed under retrobulbar anesthesia. First, all fibrotic conjunctival tissue was excised and scleral and corneal stroma was exposed. Penetrating keratoplasty was performed at the same time as LSCT in 15 eyes (simultaneous group). Another 2 eyes had lamellar keratoplasty at the same time as LSCT. Penetrating keratoplasty was performed as a second procedure in 6 eyes (2-step group). Simultaneous cataract surgery with or without intraocular lens implantation was performed in 10 eyes. Two other eyes received simultaneous trabeculectomy. Then, preserved human amniotic membrane was placed with the epithelial side facing upward and secured to the sclera using interrupted 8-0 vicryl sutures. Preparation and preservation of the amniotic membrane has been described elsewhere.^{16,18}

In the case of CLAU, a conjunctival flap of approximately 5×5 mm was excised from an opposite healthy eye under topical

Table 2. Demographic Findings and Postoperative Complications in Autograft and Allograft Groups

	Autograft				Allograft			
	No PK	Simultaneous PK	2-Step PK	Subtotal	No PK	Simultaneous PK	2-Step PK	Subtotal
No. of eyes	8	2	1	11	3	13	5	21
Male:female	7:1	2:0	1:0	10:1	2:1	13:0	4:1	18:3
Mean age (yrs)	36.3 ± 14.4	53.0 ± 11.3	46	40.2 ± 14.3	30.3 ± 16.2	43.5 ± 20.2	46.5 ± 17.1	43.2 ± 19.1
Chemical	9							
Alkali	3	2	1	6	1	6	4	11
Acid	1	0	0	1	1	2	1	4
Other	2	0	0	2	0	3	0	3
Thermal	2	0	0	2	1	2	0	3
Mean visual acuity	0.011	0.002	0.002	0.0067	0.010	0.005	0.005	0.0067
CVA <20/200	7	2	1	10 (90.9%)	3	13	5	21 (100%)
Glaucoma								
Present	0	1	0	1 (9.1%)	1	1	2	4 (19.0%)
Not present	8	1	1	10 (90.9%)	2	3	3	8 (38.1%)
Unclear	0	0	0	0 (0%)	0	9	0	9 (42.9%)
Schirmer's value	20.4 ± 13.3	19.3 ± 3.5	3.0	15. ± 3.9	32.3 ± 4.6	12.4 ± 9.6	18.2 ± 13.4	18.6 ± 12.4

CVA = corrected visual acuity; PK = penetrating keratoplasty.