

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～16年度 総合研究報告書

主任研究者 坪田 一男

平成17(2005)年 4月

# 目 次

## I. 総合研究報告書

「羊膜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」…………… 1-15

坪田 一男

II. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 16-18

III. 研究成果の刊行物・別刷…………… 19

「羊膜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」

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  
分担研究者 木下 茂 京都府立医科大学眼科教授  
大橋 裕一 愛媛大学医学部眼科教授

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しても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。

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。

口腔粘膜培養上皮の臨床応用

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。

B. 研究方法

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。

羊膜の抗炎症作用の証明と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、その機能についても検討した。

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るかどうかについて検討した。

### 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. 結果

#### 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

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 (表 1)。計 10 回の上皮シート輸送を行

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。これまで 8 眼が多施設共同研究にプロトコ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。

	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。

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

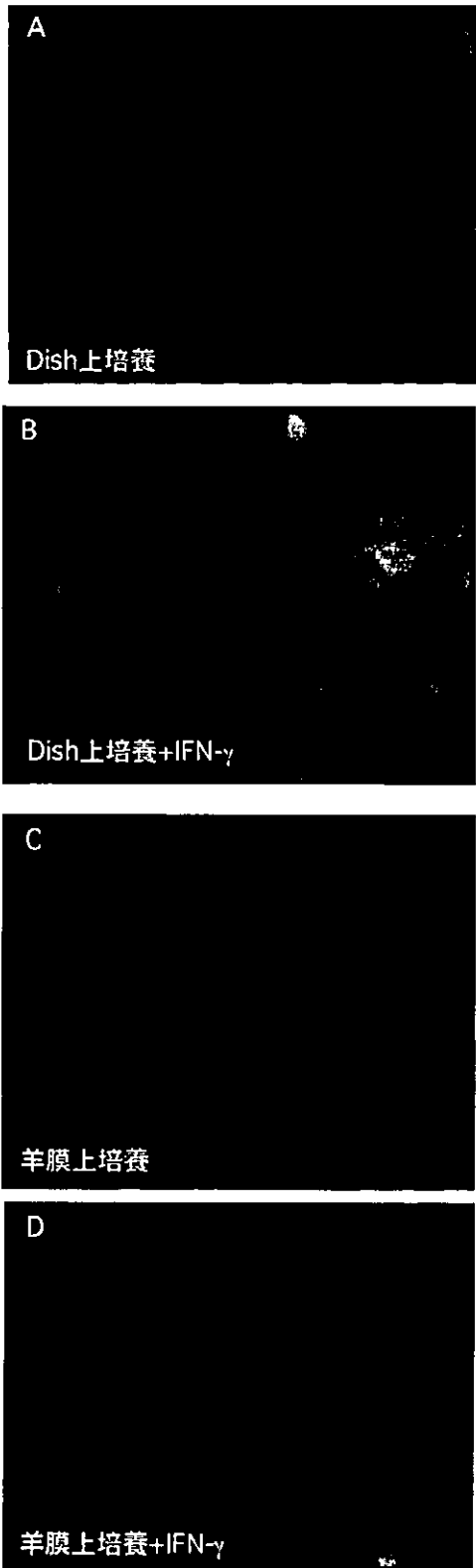


図1 角膜上皮細胞におけるHLA-Gの細胞免疫染色  
青-核染色(DAPI)、赤-HLA-G(Rhodamine)

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 $\text{INF-}\gamma$ 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、 $\text{INF-}\gamma$ 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、 $\text{INF-}\gamma$ によりその発現は上昇していた(図1)。Western blotにおいても同様の結果が得られている。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をベクターに組み込み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示した。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。

#### 上皮幹細胞の分離・培養とその応用

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。

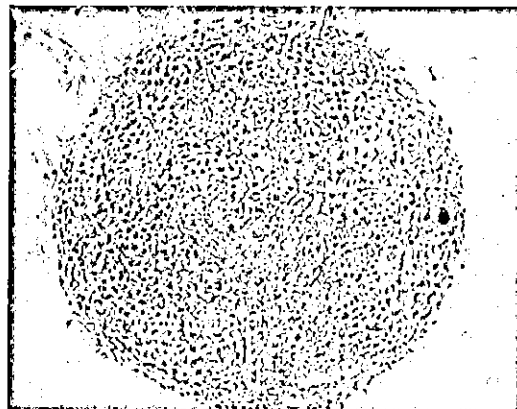


図2. SP細胞からコロニーを形成した角膜上皮様の細胞。

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2）、一方で実質細胞やメラノサイトも含まれていた（図3）。SP細胞をSHEM培地で培養することで角膜上皮様に分化した。

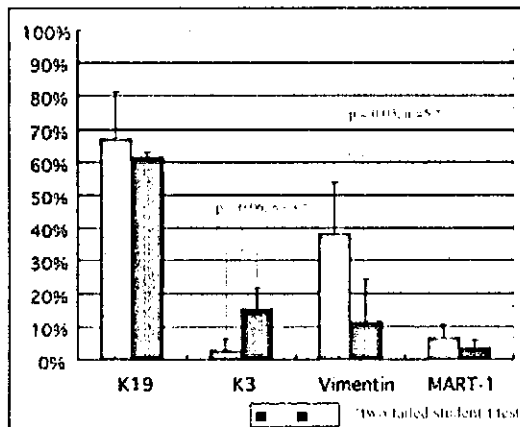


図3. SP細胞におけるマーカーの発現。

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ーであるケラチン12は発現せず、ABCG2などの未分化マーカーを発現していた（図4）。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。

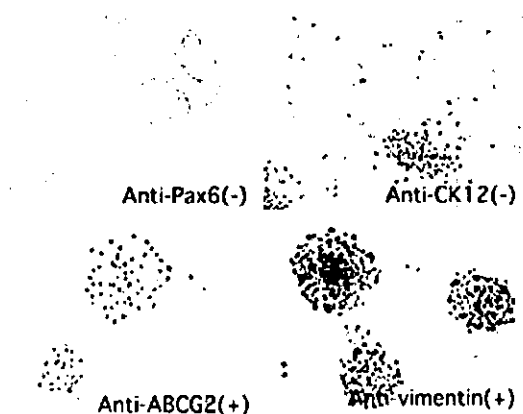


図4.角膜実質より分離した sphere 細胞におけるマーカーの発現

#### 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。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、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5）。



図5.口腔粘膜培養上皮のケラチンの免疫染色。

#### 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6）。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7）。

上皮

羊膜

### 固定用ポリマ

図6. 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。

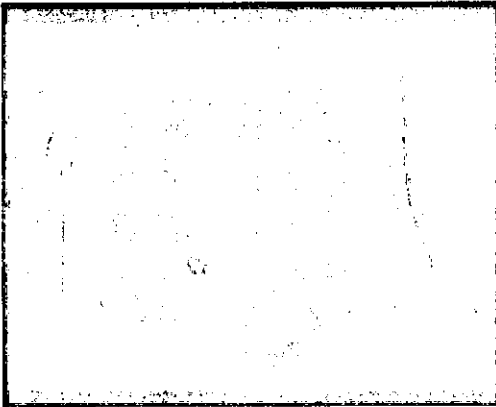


図7. ハイブリット型人工角膜を移植したウサギ角膜のフルオレセイン染色。

#### 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。角膜上皮幹細胞研究は約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結膜上皮に 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見された。

### 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

(平成15年度分)

### 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.
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.

(分担分)

## 2. 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; 106-16: 2003.
- 2) 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.
- 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)
- 11) 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 - 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

### 2) 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
  13. 岡奈央子、宇野敏彦、島村一郎、俊野敦子、原祐子、川\_ 史朗、大橋裕一。再発翼状片に対する羊膜移植術の連続手術成績」；第 28 回角膜カンファレンス 第 20 回日本角膜移植学会 2004 年 2 月 19 日～21 日
- 3) 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.
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.

(平成16年度分)

### 3. 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.
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
- 4) 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. 瘢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.
  4. Shimazaki J, Aiba M, Shimmura S, Tsubota K. Transplantation of cultivated limbal and conjunctival epithelium for various ocular surface disorders.
  5. 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).
  6. 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.
  7. Usui A, Shimmura S, Matsuzaki Y, Hideyuki O, Higa K, Seino Y, Tsubota K. Immature side population cells in human limbal epithelium.
  8. 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.
  9. 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.
  10. Shimazaki J. New surgical techniques for ocular surface reconstruction using cultivated corneal and oral mucosal epithelial sheet.
- (分担分)
4. 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  $\beta$ 1-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. in press
  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. 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
  20. 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.
  21. 中村隆宏: 角膜上皮再建法. あたらしい眼科 21(2): 153-160, 2004.
  22. 中村隆宏: 培養上皮移植. 日本角膜移植学会誌 5: 19-25, 2004.
  23. 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.
  24. 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
- 5) 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
  3. 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.
  4. 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.
- 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.
- 6) 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

生体適合性高分子膜を張り合わせて  
架橋結合処理した羊膜を用いた移植用  
材料及びその製造方法に関する特許を  
出願中

##### 2. 実用新案登録      なし

##### 3. その他

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-isopropylacrylamide)-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
----------------------------	---	--------	----	---------	------

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