

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 木下 茂

平成18(2005)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
培養粘膜上皮移植術の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. 粘膜上皮幹細胞移植術の開発に関する基礎的研究	----- 7
坪田 一男	
2. 粘膜上皮幹細胞に関する基礎的研究	----- 12
橋本 公二	
3. 自己血清を用いた粘膜上皮幹細胞シートの開発に関する研究	----- 17
島崎 潤	
4. 粘膜上皮幹細胞移植術における基質の開発に関する研究	----- 21
中村 隆宏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 26
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 30

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、基礎および臨床的側面からその安全性、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。現在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再評価をした結果、本術式は、角膜および結膜等の眼表面再建に有用であり、現在提唱されている難治性眼表面疾患に対する外科的再建術の一つの手術法として一定のコンセンサスが得られた。また、全層角膜移植や白内障手術などの他の手術法と併用する手法も確立されたことにより、視力回復可能な症例も増え、手術適応患者も拡大する可能性も示唆された。今後の課題としては、移植した培養口腔上皮シートの眼表面での生物学的特性を厳密に評価し、当術式の医学的な適応範囲を規定する段階にきている。

坪田一男 慶応義塾大学眼科
教授

橋本公二 愛媛大学皮膚科
教授

島崎 潤 東京歯科大学眼科
教授

中村隆宏 同志社大学再生医療センター
講師

する細胞ソースに関しての細胞生物学的な特性を理解することであり、幹細胞に代表される増殖・分化能の高い細胞群を研究対象とする。もう一つには、ニッチを含めた培養環境の整備である。組織を生体外で再生、再構築させるためには、単に分離した幹細胞を培養すればいいのではなく、細胞が正常に分化・増殖しやすい細胞外の環境（ニッチ）を整える必要がある。組織工学技術の導入により生体材料等を用いて細胞の足場を適切に構築し、また細胞の正常な分化・増殖に必要なシグナル因子（増殖因子、サイトカイン）などと組み合わせることによってはじめて、幹細胞を用いて生体外で組織を再生することが可能となる。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

A. 研究目的

Stevens-Johnson症候群、熱化学外傷、眼類天疱瘡等などの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、さまざま基礎および臨床的側面から安全性、倫理面に配慮し、かつ臨床的効果が高い治療法を開発をすすめている。そのアプローチとしては、一つには移植に使用

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と考え。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再評価を行い、また併用可能な新しい術式にも焦点を当て、現状の課題と問題点を明らかにする。

B. 研究方法

1) 培養口腔粘膜上皮移植

前年度より評価する移植症例をさらに増やし、両眼性の難治性眼表面疾患の3-4眼を対象に自己培養口腔粘膜上皮移植術を施行した。術前の口腔内の管理を厳密に行い、対象者から約2X2 mmの口腔粘膜組織を採取した。口腔粘膜上皮細胞のみを分離し、羊膜上で約2週間培養した。培養過程では、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、角膜上を被覆している病的結膜癒痕組織を除去後、0.04%MMCで結膜下組織を処理し、19mm径の培養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。

2) 培養口腔粘膜上皮移植併用術

両眼性の難治性眼表面疾患において、その眼表面の再建のみでは視力回復が十分ではない症例が混在する。一つには、眼内の白内障の併発であり、もう一つには、角膜実質の癒痕化による混濁である。前者に対しては可能であれば眼表面再建術と同時に白内障手術も併用できれば理想的であり、眼内手術用器具を駆使し、より安全な白内障手術法を開発した。後者に対しては、一期的に培養口腔粘膜上皮を施行して眼表面を安定化させ、その後、視力

回復を目的として角膜実質混濁部を置換する全層角膜移植術を試行する術式を開発し、その臨床評価を行った。

3) 培養口腔粘膜上皮シートの眼表面における生物学的特性の検討

培養口腔粘膜上皮移植後、視力回復を目的として全層角膜移植術を施行した4症例の手術時に得られた角膜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形態学的特徴を分析した。また、免疫染色法を用いてその細胞骨格タンパクをはじめとした上皮の細胞生物学的特徴を考察した。

C. 研究結果

1) 自己培養口腔粘膜上皮移植の中間成績

34眼中33眼(97%)で、移植に耐える十分に重層化した培養上皮シートが作成できた。眼表面再建術を行った24眼では、23眼で術後早期に完全な上皮生着が得られ、最終的に19眼で眼表面の安定化が得られ角膜の透明性を回復した。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、角膜周辺部からの表層血管侵入が認められ、その程度は症例によりばらつきを認めたが、最終的に術後6ヶ月以内には安定鎮静化した。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。

2) 同時併用手術成績

白内障により視力回復が困難な9症例に関して、培養口腔粘膜上皮移植術と同時に白内障手術を併用した。角膜上

を被覆している癒痕組織を除去後、眼内の視認性がよければそのまま白内障手術を施行し、視認性が悪い場合は硝子体手術用の眼内照明装置を使用することにより安全に白内障手術を施行した。術後、白内障手術操作および挿入した眼内レンズに関連する合併症等は認められなかった。

培養口腔上皮移植後、視力回復を目的に全層角膜移植術を施行した4症例に関して、移植後全例で2段階以上の視力を回復し、眼表面は安定して再建された。

3) 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移植後、全層角膜移植を行った4症例の移植した上皮シートの形態学的特徴を電子顕微鏡を用いて解析した。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粘膜の特徴的な所見である微絨毛を持つ形態であった。周辺部角膜では、細胞は中央部に比べ小さく、結膜上皮の形態の細胞も混在していた。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 の発現は認めた。また、角膜型ケラチン 3 はその発現を認めたが、ケラチン 12 の発現は認められなかった。また、結膜上皮の特徴である Muc5ac の発現も認めなかった。基底膜関連蛋白であるラミニン 5 やコラーゲン 7 は、正常角膜上皮と同様に発現していた。以上のことより、移植した培養口腔粘膜上皮シートは、眼表面で生着し、正常に機能していることが形態学的・組織学的側面から示唆された。

D. 考察

再生医学的手法による治療技術の開発は、これまでの角膜移植の歴史にも大きな変化をもたらした。特に角膜上皮をはじめとする眼表面の再建では、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、“cellular surgery” という新しい概念として確立されつつある。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り、拒絶反応等の危険性がない。よって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、結果的に患者の身体的、精神的負担を軽減させることができることが大きな利点である。但し、この治療手法は新しい概念であるため、基礎および臨床的なさまざまな角度から、その手術方法、有効性、適応範囲を厳密に規定する必要がある。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再建を臨床応用したが、中間成績ではいずれも眼表面再建が可能であり、一定の有効性が認められることが示された。また、移植後の上皮の電子顕微鏡による組織学的検討や免疫組織学的検討でも、移植した培養口腔粘膜上皮シートが異所性である眼表面に粘膜としての性質を保持し生着していることが示された。また、他の術式を併用することにより、培養口腔粘膜上皮移植の適応が拡大する可能性が示された。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性があり、現在、口腔粘膜上皮幹細胞シートの生物学的特性を検討中である。また一連の課題と

して、本術式では大部分の症例で、術後の上皮シート下への血管侵入を認める点が挙げられる。涙と前房水によりその恒常性が維持されている角膜は、生体内では極めて特殊な無血管の構造を持っている。一方、他の大部分の組織と同様に口腔粘膜は血管支配により維持されている。よって、術後の移植片への表層血管侵入は、口腔粘膜上皮細胞自身が、誘引する因子を分泌している可能性がある。これまでの経過観察では、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の病態を解明すると同時に、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動物実験レベルで再評価する必要がある。

E. 結論

培養口腔粘膜上皮移植による眼表面再建術は、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、若年者に幅広く適応がある可能性が示唆された。今回の中間成績により、さらに臨床使用に関する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、本術式の生物学的有用性ならびにその適応範囲や術後合併症に関し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, 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.
2. Qiao H, Hisatomi T, Sonoda K, Kura S, Sassa Y, Kinoshita S, Nakamura T, Sakamoto T, Ishibashi T. The characterization of hyalocytes: the origin, phenotype, and turnover. *Br J Ophthalmol.* 89; 513-517: 2005.
3. 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* 24; 722-729: 2005.
4. Kinoshita S, Nakamura T. The Promise and challenges of regenerative medicine - Corneal cells for regeneration. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 54; 63-83: 2005.
5. Connon C, Kawasaki S, Liles M, Koizumi N, Yamasaki K, Nakamura T, Quantock AJ, Kinoshita S. Gene expression and immunolocalization of calcium activated chloride channel during the stratification of cultivated and developing corneal epithelium. *Cell Tissue Res.* 13; 1-6: 2005.
6. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S. Current Concepts and Challenges in Ocular Surface Reconstruction using Cultivated Mucosal Epithelial Transplantation. *Cornea* 24; S32-8: 2005.
7. Sonoda KH, Nakao S, Nakamura T,

- Oshima T, Qiao H, Hisatomi T, Kinoshita S, Ishibashi T. The cellular events in normal and inflammatory conditions at cornea. *Cornea*. 24; S50-54: 2005.
8. 中村隆宏：角膜、結膜、口腔上皮の培養移植法. 眼科診療プラクティス3 オキュラーサーフェスのすべて P. 298-303 文光堂、東京、2005.
 9. 中村隆宏：癬痕性トラコーマ. 角膜疾患 外来でこう診てこう治せ P. 104-105 Medical View 社、東京、2005.
 10. 中村隆宏：無虹彩症. 角膜疾患 外来でこう診てこう治せ P. 106-107 Medical View 社、東京、2005.
 11. 中村隆宏：Meesmann 角膜上皮ジストロフィ、上皮基底膜ジストロフィ. 角膜疾患 外来でこう診てこう治せ P. 152-153 Medical View 社、東京、2005.
 12. 中村隆宏、木下茂：実用化のはじまった再生医療—角膜再生医療. *Medical Science Digest* 31(4); 29-32: 2005.
 13. 中村隆宏、木下茂：角膜再生医療の現状 日本再生医療学会雑誌 4(2); 53-59: 2005.
 14. 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. *眼紀* 56; 481-487: 2005
 15. 中村隆宏：眼表面の再生工学(1) 臨床眼科増刊号 59(11); 163-169: 2005.
 16. 中村隆宏：難治性眼表面疾患に対する外科的再建術の開発. *Aging & Health* 14(3); 38-39: 2005.
 17. 中村隆宏：培養口腔粘膜上皮移植
- あたらしい眼科 22(12); 1647-1648: 2005.
- ## 2. 学会発表
- ### 国内
1. 中村隆宏、関山英一、曾我部寿代、堀切智子、稲富勉、外園千恵、横井則彦、木下茂：翼状片に対する凍結乾燥羊膜移植術. 第28回日本眼科手術学会、大阪、2005. 1. 29.
 2. 稲富 勉、中村隆宏、小泉範子、外園千恵、木下 茂：自己培養口腔粘膜上皮移植と同種角膜移植による二期的手術戦略: 第28回日本眼科手術学会、大阪、2005. 1. 28.
 3. 中村隆宏、稲富勉、関山英一、曾我部寿代、堀切智子、小泉範子、外園千恵、木下茂：ヒト自己血清を用いた培養上皮移植システムの開発. 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. 18.
 4. 関山英一、中村隆宏、木下茂：眼表面粘膜上皮における血管新生関連因子発現マッピング. 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. 18.
 5. 稲富 勉、中村隆宏、小泉範子、外園千恵、木下 茂：自家培養口腔粘膜上皮移植術の適応と有効性の検討. 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. 18.
 6. 山岸哲哉、稲富勉、外園千恵、中村隆宏、小泉範子、木下茂：培養粘膜上皮移植眼に対する白内障手術戦略. 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. 18.
 7. 谷岡秀敏、川崎諭、山崎健太、稲

富勉, 小泉範子, 中村隆宏, 横井則彦、小室青、木下茂: 臨床応用を目指したヒト結膜上皮培養シート之作製. 第109回日本眼科学会 京都、2005. 3. 24.

8. 小林史郎、外園千恵、中村隆宏、山崎健太、曾我部寿代、餅田千佳子、木下茂: 羊膜上皮における成長因子発言量と部位による比較. 第109回日本眼科学会 京都、2005. 3. 24.
9. 関山英一、中村隆宏、木下茂: 眼表面粘膜上皮における血管新生関連因子発現マッピング. 第109回日本眼科学会 京都、2005. 3. 26.

海外

1. Nakamura T. Strategy for Corneal Regeneration -Tissue Engineering and Cellular Surgery. Cardiff & KPUM meeting. Kyoto, Japan, 2005.01.25.
2. Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda K.-H, Hisatomi T, Qiao H, Yamada J, Fukata M, Ishibashi T, Harada M, Kinoshita S. Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in the mouse cornea. 2005 Keystone Symposia, Molecular Regulation of Stem Cells, Banff, Canada, 2005.2.12.
3. Sekiyama E, Nakamura T, Kinoshita S. Expression Mapping of Angiogenesis Related Factors in Human Ocular Surface Mucosal Epithelium. 2005 Annual

Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2005.5.4.

4. Connon CJ, Nakamura T, Quantock AJ, Kinoshita S. The Persistence of Transplanted Amniotic Membrane in Corneal Stroma. 2005 Annual Meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), Fort Lauderdale, Florida, U.S.A., 2005.5.5.
5. Tanioka H, Kawasaki S, Yamasaki K, Inatomi T, Koizumi N, Nakamura T, Yokoi N, Komuro A, Kinoshita S. Establishment of a Cultivated Human Conjunctival Epithelium as an Alternative Tissue Source for Autologous Corneal Epithelia Transplantation. 2005 Annual Meeting of the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), Fort Lauderdale, Florida, U.S.A., 2005.5.5.

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基礎的研究」

分担研究者 坪田 一男 慶應義塾大学医学部眼科学教室 教授

研究要旨

羊膜を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、細胞源としてドナー角膜、自己角膜あるいは口腔粘膜からの前駆細胞が用いられている。一方で、安全面で問題となっているのが重層化に必要とされる異種フィーダー細胞の使用である。現在では、マウス由来の3T3細胞を用いるのが一般的となっている。これらの問題点を解決するために、角膜上皮幹細胞の株化および角膜実質幹細胞の分離培養とフィーダー細胞としての応用についてマウスにて検討した。その結果、マウス角膜より50代以上継続培養が可能な上皮幹細胞の分離に成功し、単一細胞から重層化上皮の作成に成功した。また、実質より10代以上継代可能な幹細胞(COPs)を分離し、フィーダーとして使用することが可能であった。今後はこれらの得られた基礎的研究の知見を集積し、口腔粘膜上皮をはじめとする他の上皮系細胞に応用する予定である。

A. 研究目的

重症角結膜上皮疾患の新たな治療法として、眼球表面再構築（Ocular surface reconstruction: OSR）の概念は徐々に普及しつつある。輪部病変が角膜上皮ステムセルを枯渇し、結膜の侵入が見られるステーブンスジョンソン症候群や眼類天疱瘡の症例に対しては通常角膜移植は禁忌とされてきた。ところが幹細胞を移植することによって、一部の症例では長期に渡って角膜上皮を維持することが可能となった。現在では、少量の組織から採取した細胞を、羊膜基質上で培養して移植する、培養上皮シート移植の臨床応用が始まった。しかし、幹細胞の供給と、上皮シートを作成する際に必要となる異種フィーダー細胞が依然として問題となっている。本研究では角膜上皮幹細胞の株化および培養上

皮への応用を検討した。また、角膜実質幹細胞のフィーダー細胞としての利用についても検討した。

B. 研究方法

1) 角膜上皮幹細胞の分離

マウス角膜を酵素処理し、無血清、低カルシウム、低密度条件で長期培養を行った。培養2、3週後より増殖した上皮細胞を同様な条件で継代し、単一クローンから得られた上皮細胞を、フィーダー細胞との共培養で重層化上皮を作成した。

2) 角膜実質幹細胞(COPs)の分離

上皮を完全に除去した角膜実質を酵素処理し、EGF, B27, LIFなどの成長因子と共に、無血清浮遊培養を行った。角膜実質細胞への分化能、および、他の間葉系細胞への分化能を調べるために血清入り培地にて接着培養を行った。各種分化マーカーの発現は、免

疫染色およびPCRにて確認した。

3) COPsのフィーダー細胞としての応用

1 2代継代したCOPsを血清入り培地にて線維芽細胞へと分化誘導させた。マイトマイシンC処理をして、ヒト輪部上皮細胞のコロニー形成率、および重層化上皮シートの作成を試みた。

C. 研究結果

1) 角膜上皮幹細胞の分離

無血清、低カルシウム、低密度培養により、マウス角膜上皮より clonal growthを示す未分化上皮細胞株 (TKE2) の分離に成功した (図1)。現時点で50回以上継代に成功しており、血清およびカルシウムを加えることで最終分化マーカーである involucrinを発現することが確認された。

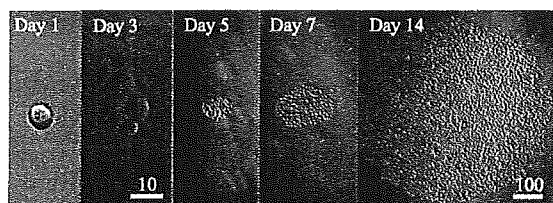


図1

羊膜を基質として、TKE2から重層化上皮シートの作成に成功した。上皮シートはK14陽性であり (図2)、involucrinを発現した。

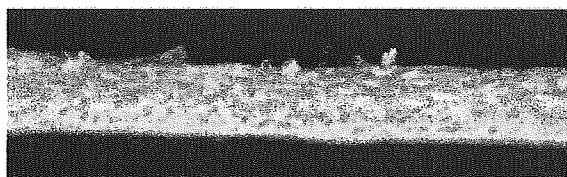
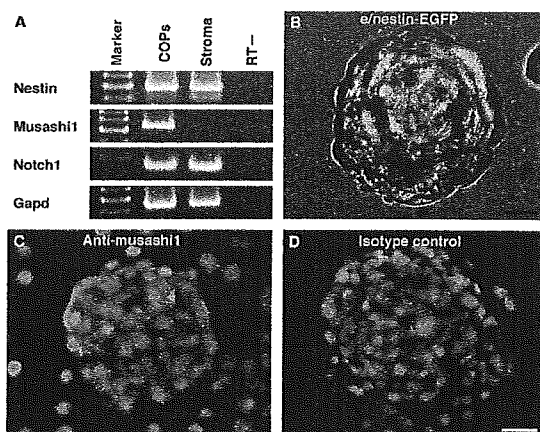


図2

2) 角膜実質細胞の分離

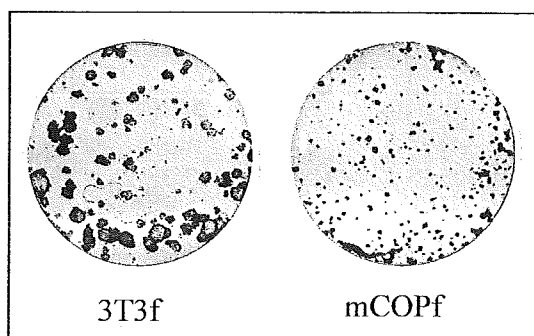
無血清浮遊培養にて、マウス角膜実質より幹細胞 (COPs) の分離に成功した (図3)



COPs は神経系細胞、脂肪細胞、および軟骨様細胞への分化能を示した。

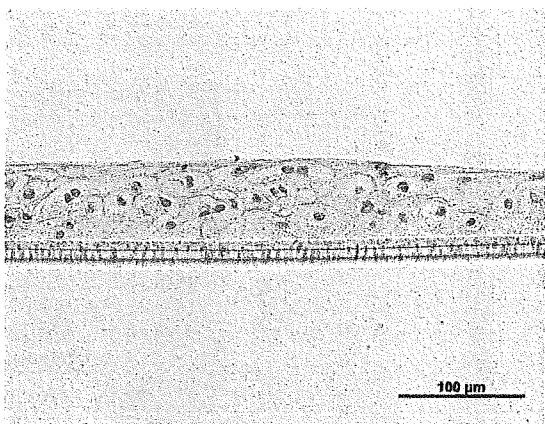
3) COPs のフィーダー細胞としての応用

浮遊培養系で継代した COPs を、接着培養にて線維芽細胞に分化誘導させた。マイトマイシンC処理にて増殖を止めた後、フィーダー細胞として用いた。ヒト輪部上皮細胞を共培養した結果、3T3細胞と同様の効率でコロニーの形成が見られた。しかし、個々のコロニーの大きさは小さい傾向にあった (図4)。



また、ヒト輪部上皮細胞を COPs フィ

ーダー細胞と共培養した結果、重層化した上皮シートが得られた (図5)。



D. 考察

本年度は、マウス由来ではあるものの、角膜上皮幹細胞、および実質幹細胞の分離に成功した。上皮幹細胞は、無血清培地にて50継代以上維持することに成功し、血清とフィーダー細胞にて重層化した上皮シートが作成できることを確認した。基底膜細胞マーカーであるK14は発現するが、分化マーカーのK12は *in vitro* で見られなかった。一方で、実質幹細胞(COPs)は、様々な間葉系細胞への分化が確認された。COPsをマイトマイシン処理してフィーダー細胞として使える可能性が示された。またコロニー形成率などで3T3細胞に劣る面があるが、今後は両細胞から分泌される液性因子、接着分子などを解析してより効率の良い細胞の開発を目指す。今後は、これらの基礎的研究技術を発展させると同時に、口腔粘膜上皮をはじめとする上皮系細胞にも応用していく予定である。

E. 結論

角膜上皮および実質幹細胞から重層化上皮シートが作成できることが確

認された。両細胞とも単一細胞から起こしたクローンより作成することが可能であり、ヒト細胞で実現できれば細胞供給問題の解決法として大いに期待できることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Asano-Kato N, Fukagawa K, Okada N, Kawakita T, Takano Y, Dogru M, Tsubota K, Fujishima H. TGF-beta1, IL-1beta, and Th2 cytokines stimulate vascular endothelial growth factor production from conjunctival fibroblasts. *Exp Eye Res.* 80(4):555-560, 2005.
2. Asano-Kato N, Fukagawa K, Okada N, Dogru M, Tsubota K, Fujishima H. Tryptase increases proliferative activity of human conjunctival fibroblasts through protease-activated receptor-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(12):4622-4626, 2005.
3. Dogru M, Asano-Kato N, Tanaka M, Igarashi A, Shimmura S, Shimazaki J, Okada N, Takano Y, Fukagawa K, Tsubota K, Fujishima H. Ocular Surface and MUC5AC Alterations in Atopic Patients with Corneal Shield Ulcers. *Curr Eye Res.* 30(10):897-908, 2005.
4. Dogru M, Okada N, Asano-Kato N, Tanaka M, Igarashi A, Takano Y, Fukagawa K, Shimazaki J, Tsubota K, Fujishima H. Atopic Ocular Surface Disease: Implications on Tear Function and Ocular Surface Mucins. *Cornea.* 24(8 Suppl 1):S18-S23, 2005.
5. Dogru M, Stern ME, Smith JA, Foulks GN, Lemp MA, Tsubota K. Changing trends in the definition and

- diagnosis of dry eyes. *Am J Ophthalmol.* 140(3):507-508. No abstract available, 2005.
6. Dogru M, Tsubota K. Current concepts in ocular surface reconstruction. *Semin Ophthalmol.* 20(2):75-93, 2005. Review.
 7. Dogru M, Tsubota K. Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol.* 140(2):305-306, 2005.
 8. Fujishima H, Fukagawa K, Okada N, Takano Y, Tsubota K, Hirai H, Nagata K, Matsumoto K, Saito H. Prostaglandin D2 Induces Chemotaxis in Eosinophils Via Its Receptor CRTH2 and Eosinophils May Cause Severe Ocular Inflammation in Patients With Allergic Conjunctivitis. *Cornea.* 24(8 Suppl 1):S66-S70, 2005.
 9. Higa K, Shimmura S, Miyashita H, Shimazaki J, Tsubota K. Melanocytes in the corneal limbus interact with K19-positive basal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 81(2):218-223, 2005.
 10. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea.* 24(2):206-212, 2005.
 11. Ishida R, Kojima T, Dogru M, Kaido M, Matsumoto Y, Tanaka M, Goto E, Tsubota K. The application of a new continuous functional visual acuity measurement system in dry eye syndromes. *Am J Ophthalmol* 2005, 139(2):253-258, 2005.
 12. Kojima T, Dogru M, Matsumoto Y, Goto E, Tsubota K. Tear film and ocular surface abnormalities after eyelid tattooing. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 21(1): 69-71, 2005.
 13. Kojima T, Ishida R, Dogru M, Goto E, Matsumoto Y, Kaido M, Tsubota K. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: A prospective randomized case-control study. *Am J Ophthalmol* 139(2):242-246, 2005.
 14. Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H, Taguchi T, Asano-Kato N, Uchino Y, Kato M, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K. Collagen-immobilized poly (vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 76B:56-63, 2005.
 15. Okada N, Fukagawa K, Takano Y, Dogru M, Tsubota K, Fujishima H, Matsumoto K, Nakajima T, Saito H. The implications of the upregulation of ICAM-1/VCAM-1 expression of corneal fibroblasts on the pathogenesis of allergic keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(12):4512-4518, 2005.
 16. Onguchi T, Takano Y, Dogru M, Tsubota K, Shimazaki J. Clinical evaluation of the accuracy of intraocular pressure measurement by Tono-Pen XL in eyes with amniotic membrane patching. *Am J Ophthalmol.* 139(3):570-571, 2005.
 17. Shimmura S, Miyashita H, Konomi K, Shinozaki N, Taguchi T, Kobayashi H, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K. Transplantation of corneal endothelium with Descemet's membrane using a hydroxyethyl methacrylate polymer as a carrier. *Br J Ophthalmol* 89(2):134-137, 2005.
 18. Shimmura S, Shimazaki J, Omoto M, Teruya A, Ishioka M, Tsubota K. Deep lamellar keratoplasty (DLKP) in keratoconus patients using viscoadaptive viscoelastics. *Cornea.* 24(2):178-181, 2005.
 19. Shiraishi K, Tsuzaka K, Yoshimoto K, Kumazawa C, Nozaki K, Abe T,

- Tsubota K, Takeuchi T. Critical role of the fifth domain of E-cadherin for heterophilic adhesion with alphaEbeta7, but not for homophilic adhesion. J Immunol. 175(2):1014-1021, 2005.
20. Takahashi Y, Igaki M, Suzuki A, Takahashi G, Dogru M, Tsubota K. The effect of periocular warming on accommodation. Ophthalmology. 112(6):1113-1118, 2005.
21. Yamada M, Mochizuki H, Kawai M, Tsubota K, Bryce TJ. Decreased tear lipocalin concentration in patients with meibomian gland dysfunction. Br J Ophthalmol. 89(7):803-805. 2005.
22. Yoshida S, Shimmura S, Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 46(5):1653-1658, 2005.

日本語論文

なし

1. 学会発表

1. 第29回角膜カンファレンスで発表 TSAS, 実用視力計を用いたドライアイ患者の見え方の評価.
2. 第29回角膜カンファレンスで発表 口腔粘膜培養上移植後のバリアー機能の評価.
3. 第59回臨床眼科学会で発表 スティーブンスジョンソン症候群 (SJ)における実用視力と臨床所見、VFQ25.

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 (特願 2006-030997)

組織幹細胞由来フィーダー細胞

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

「粘膜上皮幹細胞に関する基礎的研究」

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

種々の原因により角膜上皮幹細胞が高度に傷害されて生じる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に関する生物学特性に関して検討した。他の上皮系細胞と同様に、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るが、単一細胞からの幹細胞の特徴を解析する clonal analysis を用いた手法により、口腔粘膜上皮においても幹細胞としての性質をもつ Holoclone が存在することがわかった。また遺伝子発現プロファイルより得られた情報により、neurotrophin receptor p75 が口腔粘膜上皮幹細胞を含む細胞群に高い発現を認めることが明らかとなった。

A. 研究目的

現在、難治性眼表面疾患に対する自己組織を用いた眼表面再建術として、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移植術が開発されている。今後、培養上皮移植術の発展を考える上では、培養上皮シートの生物学的特性を高める必要性があり、使用する細胞ソースを幹細胞リッチにすることができれば理想的である。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ほとんど解析されていない。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の生物学的特性の解析を検討した。

B. 研究方法

1) Clonal analysis

皮膚の表皮細胞 (PNAS 1987) や角膜

上皮細胞 (JCB 1999) で報告されている単一細胞レベルでの幹細胞研究手法 (clonal analysis) 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% \lt , stem cell), meroclone (5-95%, young TA cell), paraclone (5% \gt , TA cell) に選別を試みた。

2) 幹細胞遺伝子発現プロファイル

遺伝子発現プロファイルによる網羅的解析から、Nerve growth factor

(NGF)の低親和性レセプターである p75に注目し、その口腔粘膜上皮における局在、機能解析を行った。

C. 研究結果

1) Clonal analysis データ

口腔粘膜上皮細胞を用いた single cell clonal analysis では、総計 396 クローンの解析を行い、その約 23% が holoclone (stem cell) に分類される増殖能の極めて高い細胞群であった。一方、paraclone (Transient amplifying cell) に分類されるクローンは約 42% であった。Meroclone (young transient amplifying cell) に分類される細胞群は約 35% であった。Holoclone 細胞のオリジナルクローンは、paraclone, meroclone と比較し、比較的円形で均一化した形態をとり、小さい細胞集団から構成されていた。

2) p75 molecule

口腔粘膜上皮組織における p75 の局在を免疫染色法により解析した。その結果、p75 の発現は、口腔粘膜上皮基底細胞層の rete ridge および dermal papillae に限定的に発現していた。その発現パターンはクラスター様であった。p75 陽性細胞の cell cycling status を検討する目的で、その細胞増殖マーカーである Ki67 との二重染色を行った。その結果、p75(+)-Ki67(-) 細胞は全体の約 97% であり、一方、p75(+)-Ki67(+) の細胞群は約 3% であった。以上の結果より、正常口腔粘膜上皮における p75(+) 細胞群は、in vivo の状態では active な細胞増殖期にはない細胞群であることがわかった。

D. 考察

これまで、表皮や角膜上皮の幹細胞に関する研究は世界中で精力的に行われてきたが、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った。これまでの我々の解析により、口腔粘膜上皮においても表皮や角膜上皮で報告されている 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。また、p75 が口腔粘膜上皮内での発現が基底細胞に限局的に認められ、その細胞増殖状態も活動期ではないことがわかり、幹細胞マーカーの候補分子として示唆された。今後は、これらの細胞群 (holoclone, meroclone, paraclone) の遺伝子発現の差異を DNA chip により詳細に検討し、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。また、p75 陽性細胞群のより詳細な機能解析を行う予定である。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 (Holoclone) が存在することがわかった。また、細胞表面抗原マーカーである p75 は、口腔粘膜上皮細胞内で限定的に存在していることがわかった。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. 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.
2. 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* 124:939-46, 2005.
3. 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.* 152:1391-2, 2005.
4. Shirakata Y, Kimura R, Nanba D, Iwamoto R, Tokumaru S, Morimoto C, Yokota K, Nakamura M, Sayama K, Mekada E, Higashiyama S, and Hashimoto K: Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci* 118: 2363-2370, 2005.
5. Sayama K, Komatsuzawa H, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Ouhara K, Tokumaru S, Dai X, Tohyama M, Ten Dijke P, Sugai M, Ichijo H, Hashimoto K: New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of β -defensins, LL37, and TLR2. *Eur J Immun* 35:1886-1895, 2005.
6. Yang L, Shirakata Y, Tamai K, Dai X, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Shiraishi K, Nagai H, Wang X, Murakami S, Sayama K, Kaneda Y, Hashimoto K: Microbubble-enhanced ultrasound for gene transfer into living skin equivalents. *J Dermatol Sci.* 40:105-114, 2005.
7. Tohyama M, Dai X, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Tokumaru S, Yahata Y, Yang L, Nagai H, Takashima A, Hashimoto K: dsRNA-mediated innate immunity of epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 335:505-11, 2005.
8. Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Nagai H, Yang L, Higashiyama S, Yoshimura A, Sugai M, Hashimoto K: Induction of keratinocyte migration via transactivation of the EGF receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J Immunol.* 175:4662-8, 2005.
9. Sekiguchi A, Kashiwagi T, Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Hashimoto Y, Kimura H, Tohyama

- M, Hashimoto K, Iizuka H.:
Drug-induced hypersensitivity syndrome due to mexiletine associated with human herpes virus 6 and cytomegalovirus reactivation. *J Dermatol* 32:278-81, 2005.
10. Shushakova N, Tkachuk N, Dangers M, Tkachuk S, Park JK, Zwirner J, Hashimoto K, Haller H, Dumler I: Urokinase-induced activation of the gp130/Tyk2/Stat3 pathway mediates a pro-inflammatory effect in human mesangial cells via expression of the anaphylatoxin C5a receptor. *J Cell Sci*. 118:2743-53, 2005.
 11. Gu F, Hata R, Ma YJ, Tanaka J, Mitsuda N, Kumon Y, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nakajima K, Sakanaka M: Suppression of Stat3 promotes neurogenesis in cultured neural stem cells. *J Neurosci Res*. 81:163-71, 2005.
 12. Komine M, Kakinuma T, Kagami S, Hanakawa Y, Hashimoto K, Tamaki K: Mechanism of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17 production and its modulation by roxithromycin. *J Invest Dermatol*. 125:491-8, 2005.
 13. Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M.: Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother*. 55:888-96, 2005
- 学会発表
1. Y. Yahata, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, T. Mochizuki, S. Hirakawa and K. Hashimoto: The MyD88-dependent signaling pathway of the *Sporothrix schenckii* antigen-induced TLR2 natural immune response in HDMEC. 35th Annual ESDR Meeting. Sep 22, 2005, Tübingen, Germany.
 2. K. Sayama, S. Tokumaru, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, X. Dai, M. Tohyama, H. Komatsuzawa, S. Higashiyama, M. Sugai, and K. Hashimoto: The innate antimicrobial peptide LL-37 induces keratinocyte migration via HB-EGF-mediated transactivation of EGF Receptor and STAT3 phosphorylation. 66th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
 3. X. Dai, K. Sayama, Y. Shirakata, K. Yamasaki, Y. Hanakawa, M. Tohyama, Y. Yahata, S. Tokumaru, and K. Hashimoto: STAT5a-PPAR γ is a novel differentiation-regulating pathway in human keratinocytes. 66th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.
 4. Y. Hanakawa, M. Amagai, K. Y. Shirakata, Y. Yahata, S. Tokumaru, M. Tohyama, K. Sayama, and K. Hashimoto: Differential effects of dominant negative mutants of desmocollin 3a and 3b on cell-cell adhesion of keratinocytes. 66th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.

- | | |
|---|--|
| <p>5. S. Tokumaru, Y. Shirakata, Y. Hanakawa, Y. Yahata, X. Dai, M. Tohyama, K.Kameda, K. Sayama, and K. Hashimoto: Endothelin-induced keratinocyte migration requires Arc activation and EGFR transactivation via the ETB receptor. 66th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.</p> <p>6. J. Kishimoto, Y. Ishimatsu-Tsuji, R. Ehama, T. Soma, S. Suzuki, Y. Shirakata and K. Hashimoto: Characterization of human hair generated by cellular grafting. 66th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.</p> <p>7. M. Tohyama, Y. Shirakata, K. Sayama, Y. Hanakawa, X. Dai, Y. Yahata, S. Tokumaru, H. Komatsuzawa, M. Sugai and K. Hashimoto: CCL16, a member of ELR-CXC chemokine, is an endogenous antimicrobial agent derived from keratinocytes. 66th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 4, 2005, St. Louis, USA.</p> <p>8. Y. Shirakata and K. Hashimoto: Successful treatment of dystrophic epidermolysis bullosa with autologous cultured skin. 7th Meeting of the German-Japanese Society of Dermatology, June 4th, 2005, Dresden, Germany</p> | <p>定を含む)</p> <p>1. 特許取得 なし</p> <p>2. 実用新案登録 なし</p> <p>3. その他</p> |
|---|--|

H. 知的財産権の出願・登録状況（予

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

「自己血清を用いた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 教授

研究要旨

角膜上皮幹細胞が疲弊して生じる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の培養操作過程では、ウシ胎児血清(FBS)を使用するのが世界的に主流であるが、可能であればヒト自己血清(AS)を用いるほうが安全性が担保され理想的である。本研究では、粘膜上皮幹細胞シートの開発を念頭に、その培養操作過程で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、ヒト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細胞増殖性、コロニー形成能、形態学的・細胞生物学的特徴を示した。

A. 研究目的

近年、羊膜をはじめさまざまな培養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過程では、ウシ胎児血清(FBS)やフィーダー細胞を使用するのが主流である。特に昨今のBSEをはじめとする、未知の病原体等の諸問題を考慮すれば、細胞培養時に使用するFBS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(AS)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(AS)の調整

既報の通り、正常ボランティアおよび難治性眼表面疾患患者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。培養に際しては、適宜解凍して使用した。

2) 細胞増殖能、コロニー形成能

ASの角膜上皮、口腔粘膜上皮細胞に対する影響を検討する目的で、その細胞増殖能、コロニー形成能を観察した。比較対照として、FBSを用いた。細胞増殖能は、BrdUを用いたELISAアッセイ系を使用した。コロニー形成能は、フィーダー細胞としてマイトマイシンC処理したNIH-3T3細胞を用い、播種細胞数に対するコロニー形成数をカウントした。

3) ASによる培養上皮シート作成

AS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①ドナー角膜、②正常ボランティアおよび③難治性眼表面疾患患者より口頭および文書で同意を得た後、口腔粘膜を使用した。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。同時にマイトマイシンC処理した3T3細胞をフィーダーとして使用した。比較対照として、FBSを用いて同様に培養上皮シートを作成した。

3) 生物学的特性の検討

ASおよびFBSを用いた培養粘膜上皮細胞シートの細胞生物学的特徴を検討するため、細胞骨格タンパクであるケラチン4/13及び3/12の局在を免疫組織化学法にて解析した。また、基底膜関連の種々の構成分子に対しても免疫染色を行った。

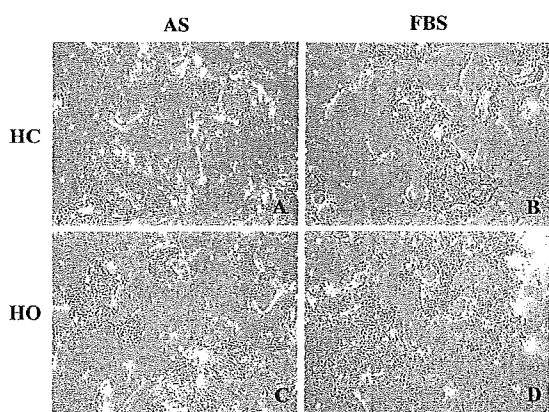
4) 形態学的特性の検討

ASおよびFBSを用いた培養粘膜上皮細胞シートの形態学的特徴を検討するため、走査型・透過型電子顕微鏡を用いて解析した。

C. 研究結果

1) ASの細胞増殖への影響

ASおよびFBSの角膜上皮細胞(HC)、口腔粘膜上皮細胞(HO)への*in vitro*での影響を検討した。その結果、培養後8日の時点で、ASおよびFBSの細胞形態への影響に差はなかった(A-D)。



BrdU ELISA cell proliferation assayを用いた細胞増殖能の解析では、角膜上皮、口腔粘膜上皮において、ASおよびFBSの各細胞増殖能への影響に差は認められなかった。また、*in vitro*におけるコロニー形成能も同様にASおよびFBSで有意な差は認められなかった。

2) 生物学的特性の検討

ASおよびFBSを用いて作成した培養上皮細胞シートの細胞生物学的特徴を解析した。その結果、培養角膜上皮シートではケラチン3・12、培養口腔粘膜上皮シートではケラチン3・4・13の発現を認め、ASおよびFBS間で差は認めなかった。また、基底膜関連の蛋白である、インテグリン $\alpha 6 \cdot \beta 4$ 、コラーゲン4・7およびラミニン5の発現に関しても、ASおよびFBS間で差は認めず、正常と同様に発現していた。

4) 形態学的特性

AS および FBS を用いた培養粘膜上皮細胞シートの形態を電子顕微鏡を用いて解析した。走査型電顕像からはASおよびFBSともに、細胞の境界は明瞭であり、その最表層には粘膜の特徴である無数の微絨毛が確認された。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、基底細胞はヘミデスモゾームにより羊膜と基底膜を形成していることがわかった。

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生物学的評価を