

- 5) Thoft RA, Friend J : The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **24** : 1442-1443, 1983
- 6) Thoft RA : Keratoepithelioplasty. *Am J Ophthalmol* **97** : 1-6, 1984
- 7) Kinoshita S, Ohashi Y, Ohji M, et al : Long-term results of keratoepithelioplasty in Mooren's ulcer. *Ophthalmology* **98** : 438-445, 1991
- 8) Kenyon KR, Tseng SCG : Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* **96** : 709-722, 1989
- 9) Pellegrini G, Traverso CE, Franzini AT, et al : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* **349** : 990-993, 1997
- 10) Tsai RJF, Li LM, Chen JK : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* **343** : 86-93, 2000
- 11) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al : Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* **108** : 1569-1574, 2001
- 12) Shimazaki J, Aiba M, Goto E, et al : Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* **109** : 1285-1290, 2002
- 13) Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, et al : Sterilized, freeze-dried amniotic membrane — A useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45** : 93-99, 2004
- 14) Rama P, Bonini S, Lambiase A, et al : Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* **72** : 1478-1485, 2001
- 15) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded *ex vivo* on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* **77** : 379-385, 2003
- 16) Grueterich M, Espana EM, Touhami A, et al : Phenotypic study of a case with successful transplantation of *ex vivo* expanded human limbal epithelium for unilateral total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* **109** : 1547-1552, 2002
- 17) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al : Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scand* **82** : 468-471, 2004
- 18) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al : Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* **119** : 298-300, 2001
- 19) Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, et al : Successful regrafting of cultivated corneal epithelial transplantation using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea* **22** : 70-71, 2003
- 20) Nakamura T, Endo K, Cooper L, et al : The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44** : 106-116, 2003
- 21) Nakamura T, Kinoshita S : Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea* **22** : S75-80, 2003
- 22) Kinoshita S, Koizumi N, Nakamura T : Transplantable cultivated mucosal epithelial sheet for ocular surface reconstruction. *Exp Eye Res* **78** : 483-491, 2004
- 23) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al : Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* **88** : 1280-1284, 2004
- 24) Kinoshita S, Koizumi N, Sotozono C, et al : The concept and the clinical application of cultivated epithelial transplantation for ocular surface disorder. *The Ocular Surface* **2** : 21-33, 2004
- 25) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al : Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* **351** : 1187-1196, 2004
- 26) Griffith M, Osborne R, Munger R, et al : Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* **286** : 2169-2172, 1999
- 27) Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, et al : Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45** : 800-806, 2004
- 28) Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al : Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45** : 2992-2997, 2004

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

中村 隆宏

京都府立医科大学大学院医学研究科視覚機能再生外科学講座

Experimental Transplantation of Cultivated Oral Mucosal Epithelium for Severe Ocular Surface Disease

Takahiro Nakamura

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University School of Medicine

自己粘膜上皮を用いた眼表面再建術の開発を目指し、培養口腔粘膜上皮シート移植術の有効性について検証した。白色家兎から口腔粘膜上皮細胞を分離し、羊膜上で2～3週間培養した。あらかじめ結膜上皮を侵入させておいた角膜上の結膜組織を除去した後、作成した培養口腔粘膜上皮シートを眼表面に自家移植し、その生着性などを検討した。羊膜上で培養した口腔粘膜上皮シートは4～5層に重層化し、正常の角膜上皮層と類似した組織像を示した。その最表層細胞には無数の微絨毛が存在し、細胞間には多数のデスモゾーム、ヘミデスモゾームが認められた。ケラチンに対する免疫染色性では、粘膜分化型ケラチン4/13および角膜型ケラチン3が陽性であった。自家移植後10日において移植した培養上皮は眼表面に残存・生着し、角膜は透明性を回復した。そのヒトへの臨床使用においても、眼表面が再建可能であることがわかった。今回我々が開発した家兎動物モデルによる自己培養口腔粘膜上皮シート移植術は、ヒト眼表面再建に有用な術式であることがわかった。(眼 紀 56:481-487, 2005)

キーワード：羊膜、角膜上皮、口腔粘膜上皮、眼表面再建、細胞移植

A study was conducted to investigate the possibility of using autologous cultivated oral mucosal epithelial cells in ocular surface reconstruction. Oral mucosal cells from adult albino rabbits were purified and cultivated for 2 to 3 weeks on a denuded amniotic membrane (AM). The donor rabbits' eyes, which had been manipulated beforehand to induce severe stem cell insufficiency, were denuded of cornea and then surgically reconstructed by transplantation of the autologous cultivated oral epithelial sheet. Each cultivated oral epithelial sheet had 4 to 5 layers of stratified, well-differentiated cells, which were very similar in appearance to those of normal corneal epithelium. The cells had numerous desmosomal junctions and were attached to a basement membrane with hemi-desmosomes. Immunohistochemistry confirmed the presence of mucosa-specific keratins 4/13 and cornea-specific keratin 3 in the cultivated oral epithelial sheets. Corneas that were grafted with the cultivated oral epithelial sheets were clear, and all had epithelialized by 10 days after surgery. From these results, autologous transplantation of cultivated oral epithelium is feasible for ocular surface reconstruction, and the technique used in rabbits would appear to be adaptable for clinical use in humans. (Folia Ophthalmol Jpn 56:481-487, 2005)

Key Words : Amniotic Membrane, Corneal Epithelium, Oral Mucosal Epithelium, Ocular Surface Reconstruction, Cellular Surgery

はじめに

ポストゲノム時代の21世紀に、にわかに注目を集めているのが再生医療・再生医学研究である。組織・臓器を種々の幹細胞などを用いて生体外 (*in vitro*) で再生させ移植す

る手法は、従来の移植医療にかわる新しい細胞治療といえる。一般的に眼科領域における治療は、ヒトの生死ではなく、「視機能の改善」を第一目的としており、視機能にかかわる各眼球組織の再生に関する基礎および臨床研究が精力的にすすめられている。とくに眼表面の再生に関する我が国の研究レベルは世界的にみても高く、この分野のオピニ

オンリーダーとして、その医学情報の発信源となっている。本稿では、眼表面、とくに角膜上皮の再生に関して、培養上皮シートを用いた細胞治療による *in vitro* から *in vivo* へのパラダイムシフトを踏まえ、そこから発展した自己培養口腔粘膜上皮シートを用いた新しい細胞移植の流れについて紹介する。

組織再生の3大要素

生体が再生する現象は日常のあらゆる場面でみられる。イモリやプラナリアの再生は驚くべき現象であり、ヒトでも胎児や新生児の傷はほとんど跡を残さず治癒する。一方、老人の傷や骨折はなかなか治癒しない。これらの原因として、年齢とともに生体内の幹細胞自体が減少していることが推測される。つまり生体組織の再生は、この幹細胞の質的量的性質に依存するということができる。生体には大きく組織幹細胞と胚性幹細胞に分けることができる。仮にこれらの幹細胞を正確に分離し、その機能を保持させたまま分化増殖させることが可能であれば、少量の幹細胞より大量の組織再生が可能となる。

再生の第1のキーファクターは前述の幹細胞であるが、いかに正確に幹細胞を分離できたとしても、それを単に用いるだけでは生体組織の再生は困難である。正常あるいは正常に近い生体組織を再生させるためには、細胞が分化増殖しやすい細胞外の環境（ニッチェ）を整備する必要がある。このニッチェにおいてとくに重要になってくるのが、細胞の足場となる基質である¹⁾。生体材料を用いて基質を適切に構築し、また細胞の増殖分化に必要なシグナル因子などと組み合わせることによって初めて、分離した幹細胞が生体組織を再生することが可能となる。よって、組織を

再生するにあたっては、この幹細胞、基質、シグナル因子の3要素に関する知見を集積する必要がある（図1）。

Ocular surface と幹細胞

外界と直接接する眼表面（ocular surface）は角膜上皮、結膜上皮という異なった分化をとげた表面外胚葉由来の非角化重層扁平上皮群より構成されており、涙液とともに眼表面の恒常性維持をつかさどっている。角膜は、上皮、ボーマン膜、実質、デスメ膜、内皮の5層からなり、各層がそれぞれの機能分担と整然とした組織構造を有し、角膜の透明性維持に重要な働きをしている。生体・組織を維持するのに必要な幹細胞とは一般的に、長期にわたり増殖可能で、自己複製能をもち、自身とは異なる前駆細胞や分化した細胞を作る能力をもつと考えられている²⁾。角膜には三つの

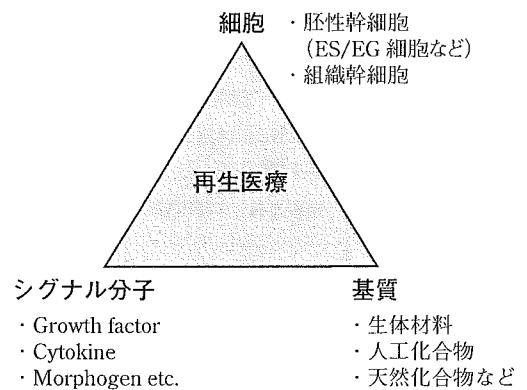


図1 組織再生のための3大要素
再生医療研究における組織再生には、幹細胞、基質およびシグナル因子の三つの要素を包括的に利用する必要性がある。

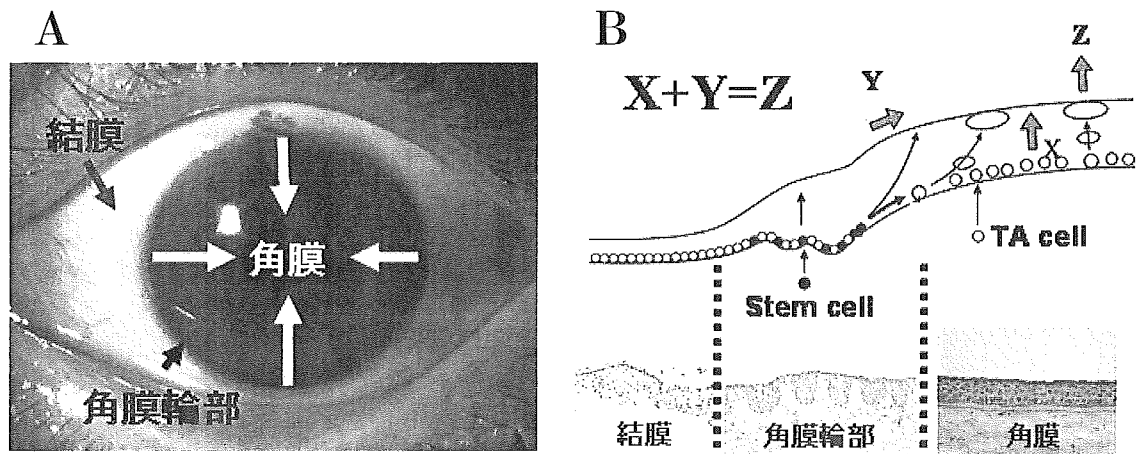


図2 Ocular surface と XYZ 理論
角膜輪部の基底部に存在する角膜上皮幹細胞は、角膜中央部へ求心性の動きをして角膜上皮を供給し、その恒常性を保っている (A)。角膜上皮の細胞動態に関しては、X：角膜上皮基底細胞の分裂、Y：角膜輪部から角膜中央部へ移動、Z：角膜上皮表層細胞の脱落として $X+Y=Z$ の均衡を保ちながら、その恒常性が維持されている (B)。

細胞層があるが、幹細胞に関する研究では、角膜上皮幹細胞に関する研究がすすめられている。すなわち1980年代からの細胞生物学的、分子生物学的研究により、1. 角膜上皮に特異的な細胞骨格タンパク keratin 3/12 陰性の細胞群が角膜輪部基底層に存在する³⁾、2. この細胞が BrdU ラベルにより slow-cycling cell である⁴⁾、3. 培養条件下でも高い増殖能を保持し⁵⁾、4. epithelial growth factor (EGF) などの増殖因子によく反応する⁶⁾、といった様々な状況証拠から、角膜周辺部に位置する角膜輪部の基底層に存在すると考えられている。臨床的には、角膜、結膜の境界部に一致して存在する色素沈着を伴った palisade of Vogt (POV) と呼ばれる放射状の柵状構造にある⁷⁾。角膜上皮幹細胞は、定常状態では非常にゆっくりとした細胞周期で角膜上皮を供給しているが、創傷治癒過程など、必要時には速やかに分裂増殖し、角膜上皮基底細胞 (TA cell: transient amplifying cell) を供給する。角膜輪部で増殖した角膜上皮幹細胞は、一部は幹細胞として角膜輪部にとどまり、残り (TA cell) は角膜周辺部から角膜中心部に向かって分化・増殖する (centripeatal movement)。この角膜上皮の細胞動態は、 $X+Y=Z$ (X: 角膜上皮基底細胞の分裂, Y: 角膜周辺部から角膜中央部への移動, Z: 角膜上皮表層細胞の脱落) として、角膜上皮細胞の供給と脱落の均衡が保たれている (XYZ 理論) (図2)⁸⁾。

難治性眼表面疾患

Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡、熱化学外傷などの疾患では、角膜上皮幹細胞を含む角膜輪部領域が広範囲に障害されるため、正常な角膜上皮は供給不可能となり、周辺の結膜上皮が炎症、癬痕、血管新生などを伴って眼表面を覆い著しい視機能障害を来す。その慢性癬痕期には眼表面の非角化粘膜上皮は病的角化を来し、不可逆的となる。このように、角膜上皮幹細胞の機能不全を来す疾患は「難治性眼表面疾患」あるいは「角膜上皮幹細胞疲弊症」と呼ばれており、その病態・病理の解明、治療法の開発についてこれまで様々な基礎および臨床研究がなされてきた。これらの疾患に対する根本的な治療戦略としては、炎症を消退させて慢性癬痕期まで待ち外科的再建をするというのが世界的にコンセンサスを得られている考え方であった。

眼表面再建術の開発の歴史

これまで、難治性眼表面疾患に対する外科的再建法としては、結膜移植術⁹⁾、角膜上皮形成術 (keratoepithelioplasty)^{10,11)} や角膜輪部移植術 (limbal transplantation)^{12,13)} などが開発されてきた。概念的には、喪失した角膜上皮細胞を結膜上皮からの再生上皮で補充する手法が結膜移植術であり、幹細胞を含む角膜輪部からの再生上皮で再建する移植

が角膜輪部移植術である。角膜輪部を含まない周辺部角膜上皮の移植が角膜上皮形成術であるが、両者に明瞭な境界はない。いずれの移植法も、*in vivo* における移植片からの再生上皮により眼表面の再建 (*in vivo expansion* 法) をねらう手術法であり、第一世代の眼表面再建術といえる。

上述の移植法では、片眼性疾患では健眼から移植片を採取可能であるが、症例数には限りがあり、また移植片の採取領域にも限界がある。両眼性の疾患ではドナー角膜を利用することとなる。しかし我が国におけるドナー不足の問題があり、角膜アイバンク普及事業を更に発展させる必要性があると同時に、再生医療学的見地から、必要とする移植片が少量であればドナー側の侵襲も少なく理想的である。そこで難治性眼表面疾患に対する眼表面再建術として近年注目を集めているのが培養上皮移植術である。必要とする細胞を少量採取して生体外で培養上皮シートを作成したのちに移植するというコンセプトは、これまでの角膜移植の長い歴史のなかで細胞移植 (cellular surgery) の分野を確立したといえる (図3)。その先駆けとなったのは、1997年 Pellegrini らによる臨床報告である¹⁴⁾。この発表以降、培養角膜上皮移植に関する基礎および臨床研究が世界的に精力的に行われることとなり、これまでその培養基質には、生体材料由来の羊膜¹⁵⁻¹⁷⁾、滅菌処理された凍結乾燥羊膜¹⁸⁾、生体吸収性高分子のフィブリン¹⁹⁾、また基質を用いない培養方法として温度応答性培養皿を用いた手法、などが報告されている²⁰⁾。このような *in vitro* から *in vivo* への橋渡しは、第2世代の眼表面再建術と位置付けることができる。

“アロからオートへ”
培養口腔粘膜上皮移植術の開発

前述のとおり、重症の難治性眼表面疾患に対してはこれ

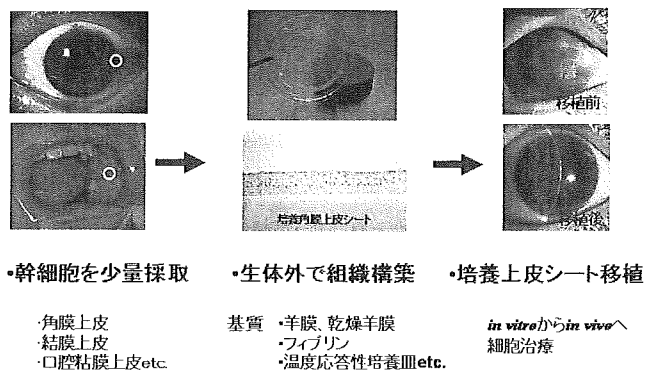


図3 Ocular surface 再建に対するコンセプト
増殖能力の高い様々な組織幹細胞などを細胞ソースとし、組織工学の技術を応用して *in vitro* の環境で種々の基質を利用し、生体に近い組織構造をもった培養上皮シートを作成する。その後、*in vivo* へ培養上皮シートによる細胞移植を行い、恒久的な眼表面再建を目指す。

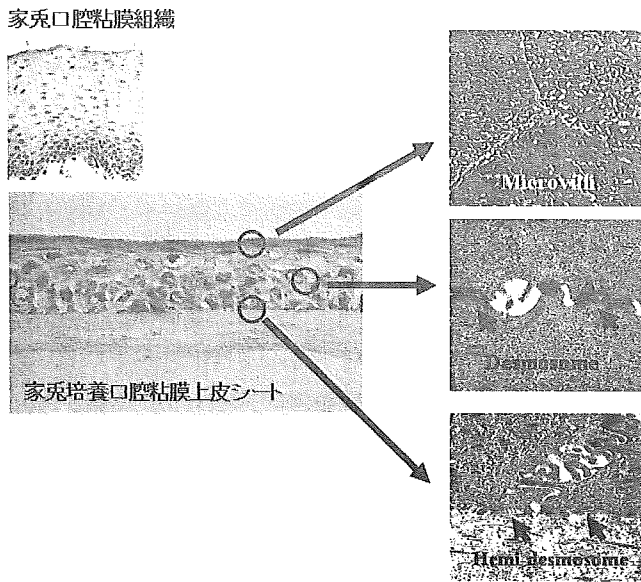


図4 家兎培養口腔粘膜上皮シートの組織像
家兎正常口腔粘膜組織は20~30層の重層化した組織であるが、羊膜上で2~3週間培養後、5~6層の正常角膜上皮と同様の上皮層を形成する(HE染色)。その組織形態を電子顕微鏡で詳細に観察すると、その表層は無数の微絨毛(microvilli)が観察され、desmosomeにより細胞間は接着し、羊膜基質とはhemi-desmosomeにより基底膜を形成している。これらの細胞接着装置は、正常角膜上皮に認められる構造である。

まで、角膜輪部移植や培養角膜上皮移植など様々な外科的治療法が考案され、それなりの成功をおさめてきた。とくに培養角膜上皮移植の出現により、急性期の症例に対しても積極的な外科的治療により眼表面が劇的に再建されることがわかった²⁰⁾。しかしながら難治性眼表面疾患の大部分は両眼性であり、これらの治療法の多くは他人(アロ)のドナー組織を用いた移植に頼らざるを得ず、術後の拒絶反応や感染症などの問題が術後成績に大きく影響を与えているのが現状であった。そこで我々の研究チームは、自己(オート)の眼表面以外の粘膜上皮を用いた移植法の開発を模索し、様々な細胞ソースのなかから、その細胞生物学的特徴および組織採取による利便性などを考慮した結果、角膜型 keratin 3 をその細胞骨格タンパクにもつ口腔粘膜上皮に注目し、羊膜を基質に用いた培養口腔粘膜上皮シートの作成を検討した^{22, 23)}。

1. 家兎動物モデル

まず我々の研究チームは、家兎動物モデルを用いた実験を行い、羊膜の口腔粘膜上皮培養の基質として適合性を検討した。使用した羊膜は、口頭および文書でのインフォームドコンセントの後、3カ月以内の感染症検査(B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、梅毒)陰性の妊婦より、手術室で帝王切開時に無菌的に採取したものを使用した。白色家兎の口腔粘膜を4mm²採取し、trypsin/EDTAなどの操作により口腔粘膜細胞浮遊液を作

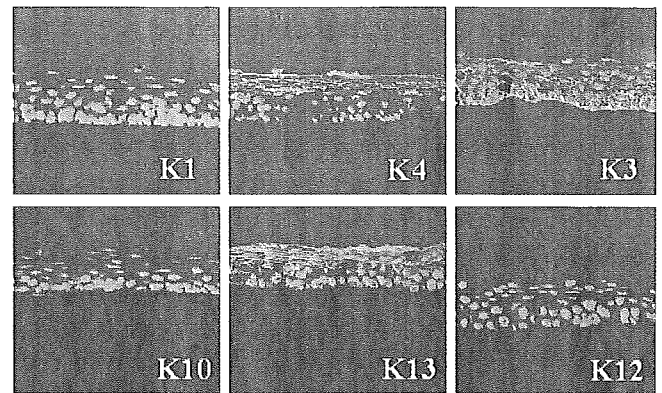


図5 家兎培養口腔粘膜上皮シートの keratin に対する免疫染色像

羊膜を基質に用いた培養口腔粘膜上皮シートの特徴を上皮の細胞骨格タンパクである keratin による免疫染色で解析した。その結果、角化型 keratin1/10 は発現しておらず、粘膜分化型 keratin4/13 および角膜型3は発現していた。角膜型 keratin12 の発現は認められなかった。以上の結果より、細胞骨格タンパクの側面からみた培養口腔粘膜上皮シートは、非角化粘膜上皮の性質をもち、かつ角膜型ケラチンの特徴の一部をもつという特性を示した。

成、羊膜上で約2~3週間培養した。また、培養過程では3T3線維芽細胞とカルチャーインサートをはさんでの共培養、空気暴露により上皮細胞に分化誘導を施す air-lifting 法を併用した。培地は原則として、supplemented hormone epithelial medium を改変して使用した。その結果、羊膜上で培養した口腔粘膜上皮細胞は、1週間で羊膜基質上で敷石状に増殖しコンフルエントになった。また、培養後2~3週間で口腔粘膜上皮細胞は5~6層に重層化し、正常角膜上皮の基底細胞、翼細胞、表層細胞に相当する形態を保持していることがわかった。電子顕微鏡を用いた形態学的検討では、培養口腔粘膜上皮シートは上皮細胞間の接着に関与する desmosome や hemi-desmosome を形成し、その表層には粘膜上皮の性質を示す無数の微絨毛や glycolyx 様構造物が存在していた(図4)。また、最表層の細胞間では、tight junction によりバリア機能が保持されていることがわかった²²⁾。上皮系の細胞骨格の代表的なタンパクである keratin に対する免疫染色性では、表皮に発現する角化型 keratin 1/10 は発現しておらず、粘膜分化型の keratin 4/13 の発現は認められた。また、角膜型 keratin 3/12 のうち、keratin 3 の染色性は認められたが keratin 12 の染色性は認められなかった。以上のデータより、我々が作成した培養口腔粘膜上皮シートは、非角化粘膜としての性質をもちつつ、細胞骨格の側面からは、角膜の性質を一部もつ上皮シートであることがわかった(図5)。

2. 家兎培養口腔粘膜上皮シート移植モデル

培養口腔粘膜上皮シートの *in vivo* での機能を評価する目的で、家兎眼表面の障害モデルを作成し自家移植を行った。家兎眼表面は機械的な表層角膜切除により、眼表面疾患モ

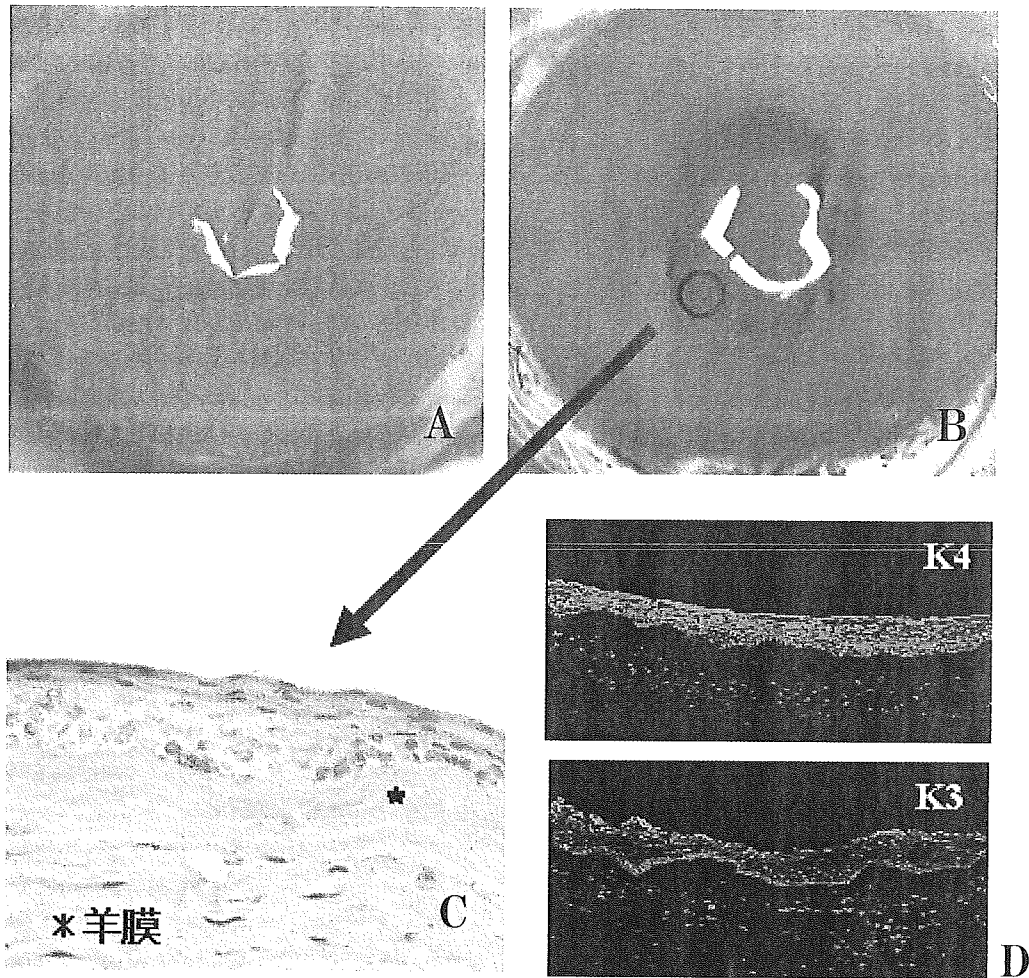


図6 家兎培養口腔粘膜上皮シート移植術

- A: 術前の家兎眼表面疾患モデル 角膜表面は血管新生を伴った結膜で覆われている。
 B: 自己培養口腔粘膜上皮シート移植術後10日の眼表面 角膜表面は自己の培養口腔粘膜上皮シートで再建され、透明性を回復している。
 C, D: 自己培養口腔粘膜上皮シート移植術後10日の角膜組織像 培養口腔粘膜上皮シートは角膜実質上で生着しており、ホストの実質に細胞浸潤や浮腫は認めず、眼表面の培養上皮シートはkeratin 4 や 3 の染色性を保持している。

デルを作成した。移植後48時間において、培養口腔粘膜上皮シートは眼表面に生着し透明性を維持していた。移植片の周囲は全周にわたりフルオレセインの染色性が認められたため、残存している角膜上の上皮は周囲の結膜上皮のコンタミネーションではないことが確認された。移植後10日において眼表面は透明性を保ち、その角膜全層の組織学的考察では、培養口腔粘膜上皮シートは角膜実質上に生着しており、実質内の浮腫や細胞浸潤なども認められず、眼表面での生体適合性は良好であることがわかった。Keratin に対する免疫組織化学的検討では、*in vitro* での発現と同様に、粘膜分化型 keratin 4/13 および角膜型 keratin 3 に対する免疫染色性を示していた。また、移植後、家兎は動きのある物体を目で追従することが確認され、視機能も改善していることがわかった。よって、今回我々が作成した培養口腔粘膜上皮シートは、その組織学的、細胞生物学的見地

からみて、角膜上皮に類似の分化、重層化した非角化粘膜上皮の性質をもち、短期成績ではあるが血管のサポートのない眼表面という生体内で極めて特殊な環境においても生着し、眼表面再建術における角膜上皮の代用となり得る可能性が示唆された (図6)。

3. 臨床応用

動物モデルでの基礎的データをもとにヒトへの臨床応用を目指し、ヒト培養口腔粘膜上皮シート作成に着手した。まず、十分なインフォームドコンセントを得た後、ヒト正常口腔粘膜組織を採取し、培養上皮シート作成の詳細な条件設定を試みた。家兎培養口腔粘膜上皮シート作成の条件ではシート作成が困難であり、動物種間での細胞増殖速度や分化能などの細胞動態の違いが観察されたが、培養液も含めた培養操作過程の改変により、ヒト培養口腔粘膜上皮シート作成は可能となった。この培養上皮シートの *in vivo*

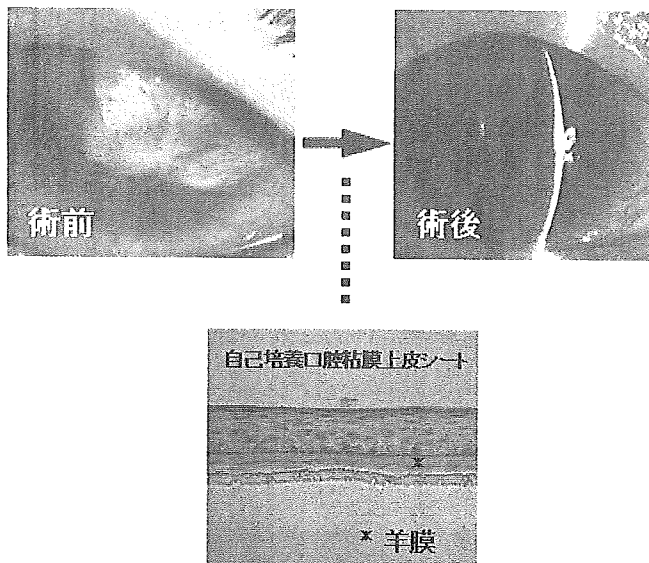


図7 自己培養口腔粘膜上皮シート移植の臨床応用例 (慢性期 Stevens-Johnson 症候群)

術前、眼表面は結膜侵入と癬痕化、瞼球癒着を伴い著しい視力障害を示す。自己の培養口腔粘膜上皮シートを作成し移植後1年、周辺からの血管侵入は認められるが、角膜表面は自己培養口腔粘膜上皮シートで再建され、透明性を保っている。

における機能的評価目的に、家兎の眼表面に異種移植した。その結果、ヒト培養口腔粘膜上皮シートは家兎モデルと同様に、角膜上皮と同様の形態学的特徴を保持し、眼表面に生着することがわかった²⁴⁾。

2002年より京都府立医科大学研究審査委員会のガイドラインに従い、急性期および慢性期の難治性眼表面疾患に対するヒトへの臨床応用を開始した(図7)^{25, 26)}。口腔粘膜採取に際しては、培養過程におけるコンタミネーションを予防するため、採取前に厳密な口腔内管理を歯科で行った。清潔操作下で約2~3mm²の口腔粘膜を採取し、dispase, trypsin-EDTA 処理にて口腔粘膜上皮細胞浮遊液を作成後、羊膜上で培養口腔粘膜上皮シートを作成した。手術に関しては、基本的に全身麻酔下で行った。標準的な術式として、角膜上の病的結膜組織を除去し、角膜実質を露出させた。結膜下組織も可能な限り切除し、増殖性変化が強い症例では、術中にマイトマイシンC(0.04%, 5分間)処理を行った。生理食塩水で十分に洗浄後、培養口腔粘膜上皮シートを角膜表面に10-0ナイロンで縫着した。培養上皮シートをフルオレセイン染色し、上皮に欠損がないかどうかを確認後、治療用ソフトコンタクトレンズを装用し手術を終了した。基本的な術後投薬として、局所では抗菌薬(オフロキサシン)、副腎皮質ステロイド薬(以下ステロイド)(デキサメサゾン)の点眼に加え、ドライアイ対策にBSS点眼を施行した。全身的には、ステロイド内服を術後1カ月以上投与した。

我々の施設では、自己口腔粘膜上皮移植術に関して、角

膜上皮の再建のみならず、結膜嚢の再建にも臨床応用を行い、現在その長期観察による適応と問題点を検討している²⁶⁾。また羊膜のほかに、温度感受性シートを用いた本手術法で、慢性期のStevens Johnson 症候群、眼類天疱瘡の臨床試用においても角膜上皮の修復が可能であることが報告された²⁷⁾。ただしいずれの手術法でも、臨床経過のなかで角膜周辺からの血管新生を生じる症例が多いのが現状であり、拒絶反応は回避できるが、培養上皮シートの生物学的性状の違いや疾患による差異など、長期の臨床成績を詳細に検討し、本術式の適応や特性を検討する必要がある。我々の手術方法では現在まで長期観察が最長で35カ月であるが、眼表面は培養口腔粘膜上皮シートで引き続き再建され透明性を維持しており、少なくともこの術式がこれまで不可能であった両眼性の難治性眼表面疾患に対するオート移植の可能性に一石を投じたのは間違いのない事実である。

眼表面再生の展望

再生医学研究の進歩は、腎臓移植とならんで古い歴史をもつ角膜移植にも大きな革新をもたらした。*In vitro* から *in vivo* への細胞移植治療は、角膜内皮移植などとともに従来型の全層角膜移植から、傷害されている部位のみを置換する角膜パーツ移植法へのパラダイムシフトを引き起こした。しかし、これらの治療法は再生医療学的見地からも有効な治療法として期待されてはいるが、必ずしも万能ではなく、長所ばかりでないのも事実である。とくに、本術式は移植までにヒトによる操作が入るため、その安全性と倫理面の問題にも配慮する必要がある。培養過程で使用する血清や feeder 細胞、培養基質の安全性など、エビデンスに基づいた再生医療の実現を進めていくのが我々の責務である。また、従来型の移植法と比較して培養上皮移植の長期での臨床成績を詳細に検証する必要がある。更に、培養上皮シートの質的向上も同時に研究する必要がある。それには、組織幹細胞、基質、シグナル因子など、組織再生に必要な3要素に関する知見を集積する必要があると同時に、将来的にはその幹細胞をマスターセルとして保存・利用する研究も必要になるとと思われる。今後このラインの研究の発展に期待したい。

謝辞

稿を終えるにあたり、受賞講演の機会を与えてくださいました日本角膜学会学術奨励賞選考委員各位、第28回角膜カンファレンス・第20回日本角膜移植学会総会長の井上幸次教授に心より感謝申し上げます。また、本研究に関し直接ご指導、ご助言を賜りました京都府立医科大学眼科 木下 茂教授および教室員各位に深謝を申し上げます。

文 献

- 1) Langer R & Vacanti JP: Tissue engineering. Science 260: 920-926,

- 1993.
- 2) Potten CS & Loeffler M : Stem cells : Attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110 : 1001-1020, 1990.
 - 3) Schermer A, Galvin S et al : Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103 : 49-62, 1986.
 - 4) Cotsarelis G, Cheng SZ et al : Existence of slow cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : Implications on epithelial stem cells. *Cell* 57 : 201-209, 1989.
 - 5) Ebato B, Friend J et al : Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 1450-1456, 1987.
 - 6) Kitazawa T, Kinoshita S et al : The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 : 1773-1778, 1990.
 - 7) 木下 茂, 大路正人他 : Palisades of Vogt の消失する角膜疾患. *臨眼* 40 : 363-366, 1986.
 - 8) Thoft RA & Fried J : The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 : 1442-1443, 1983.
 - 9) Thoft RA : Conjunctival transplantation. *Arch Ophthalmol* 95 : 1425-1427, 1977.
 - 10) Thoft RA : Keratoepithelioplasty. *Am J Ophthalmol* 97 : 1-6, 1984.
 - 11) Kinoshita S, Ohashi Y et al : Long-term results of keratoepithelioplasty in Mooren's ulcer. *Ophthalmology* 98 : 438-445, 1991.
 - 12) Kenyon KR & Tseng SCG : Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96 : 709-722, 1989.
 - 13) Tsai RJF & Tseng SCG : Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 13 : 389-400, 1994.
 - 14) Pellegrini G, Traverso CE et al : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349 : 990-993, 1997.
 - 15) Tsai RJF, Li LM et al : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 343 : 86-93, 2000.
 - 16) Koizumi N, Inatomi T et al : Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108 : 1569-1574, 2001.
 - 17) Shimazaki J, Aiba M et al : Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 109 : 1285-1290, 2002.
 - 18) Nakamura T, Yoshitani M et al : Sterilized, freeze-dried amniotic membrane—A useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 : 93-99, 2004.
 - 19) Rama P, Bonini S et al : Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 72 : 1478-1485, 2001.
 - 20) Nishida K, Yamato M et al : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 77 : 379-385, 2003.
 - 21) Koizumi N, Inatomi T et al : Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 119 : 298-300, 2001.
 - 22) Nakamura T, Endo K et al : The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 106-116, 2003.
 - 23) Kinoshita S, Koizumi N et al : Transplantable cultivated mucosal epithelial sheet for ocular surface reconstruction. *Exp Eye Res* 78 : 483-491, 2004.
 - 24) Nakamura T & Kinoshita S : Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. *Cornea* 22 : S75-80, 2003.
 - 25) Nakamura T, Inatomi T et al : Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 88 : 1280-1284, 2004.
 - 26) Kinoshita S, Koizumi N et al : The concept and the clinical application of cultivated epithelial transplantation for ocular surface disorder. *The Ocular Surface* 2 : 21-33, 2004.
 - 27) Nishida K, Yamato M et al : Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351 : 1187-1196, 2004.

(2004年12月13日受付)

発行所

日本眼科紀要会

567-0047 茨木市美穂ヶ丘 3-6 山本ビル 302号室 ☎ 072-623-7878

前眼部の再生工学 (1)

眼表面の再生工学

中村 隆宏*

はじめに

近年、あらゆる場面でよく耳にする「再生医学」とは、傷害され失われた組織・臓器を分裂能力を有した特殊な細胞（幹細胞、前駆細胞など）により修復させようとする学問分野である。その再生には、細胞のみならず、細胞外の環境を適切に整える必要性があり、細胞の足場や増殖因子を用いるといった組織工学技術の応用が必須となる。「再生工学」とは文字どおり、このような再生医学と組織工学という2つの研究領域の融合を意味する。そして、バイオテクノロジーの飛躍的な進歩に支えられた近年の再生工学研究の発展には目を見張るものがあり、特に眼科領域における再生工学の技術開発および臨床応用への進展は、他の臨床医学領域に比べ一歩進んでいるといえる。本項では、眼表面の再生工学の現状と課題について述べる。

眼表面と幹細胞

現代社会ではさまざまな情報が氾濫しており、その情報の90%は視覚を中心とする感覚器を介してわれわれは得ている。視覚器の障害がもたらす損失は正常人には創造できないほど大きなものであり、quality of life (QOL) とともに quality of

vision (QOV) の重要性が認識されている。視覚情報が最初に通過する角膜は、前眼部の1/6の面積を占める透光体組織であり、高い透明性を示し、外界からの物理的・生理的バリア機能の役割を果たしている。角膜は、上皮、実質、内皮の3つのコンパートメントから構成されており、眼表面(オキュラーサーフェス ocular surface) とは、この角膜上皮およびそれを取巻く結膜上皮などの表面外胚葉由来の粘膜上皮群をまとめてさす。

眼表面の恒常性を保つためには、それぞれの上皮を維持する増殖能力の高い幹細胞の存在が必要不可欠である。角膜上皮幹細胞に関しては、動物実験およびさまざまな臨床的状況証拠から、角膜輪部の基底層に存在すると考えられている^{1,2)}。結膜上皮幹細胞に関しては、結膜嚢に存在するという説と、結膜に広く分布するという説があり、結論には至っていない^{3,4)}。Stevens-Johnson 症候群や眼類天疱瘡、熱化学外傷などの重症の眼表面疾患では、これらの幹細胞が枯渇するために眼表面の恒常性が維持できず、重度の視力障害が生じる(図1)。したがって、これらの疾患に対しての基本的な治療戦略としては、あらかじめ生体外で上皮幹細胞を用いて上皮層を再構築し、移植する培養上皮移植術が考えられ、再生医学研究が重要な土台となる。

* なかむら・たかひろ：同志社大学研究開発推進機構再生医療研究センター，京都府立医科大学大学院医学研究科視覚機能再生外科学教室
別刷請求先：中村隆宏 〒602-0841 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町 465 京都府立医科大学大学院医学研究科視覚機能再生外科学教室

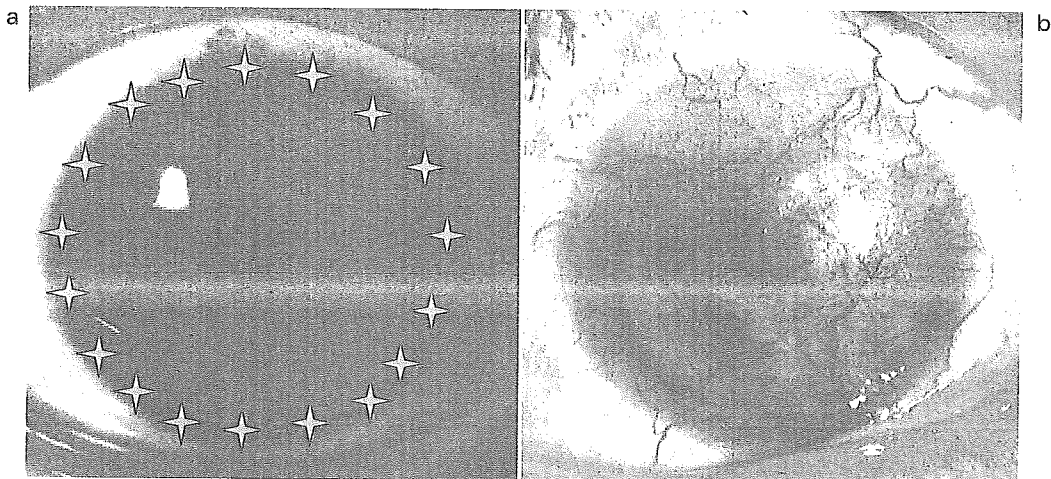


図1 難治性眼表面疾患の概念

a: 角膜とそれを取巻く結膜の境界部に位置する角膜輪部(☆)に角膜上皮幹細胞が存在すると考えられている。この部位が種々の原因で高度に傷害されると、角膜表面は正常な角膜上皮が供給不可能となり、周囲の結膜上皮により被覆され、著しい視力障害が生じる。
 b: Stevens-Johnson 症候群の前眼部写真。

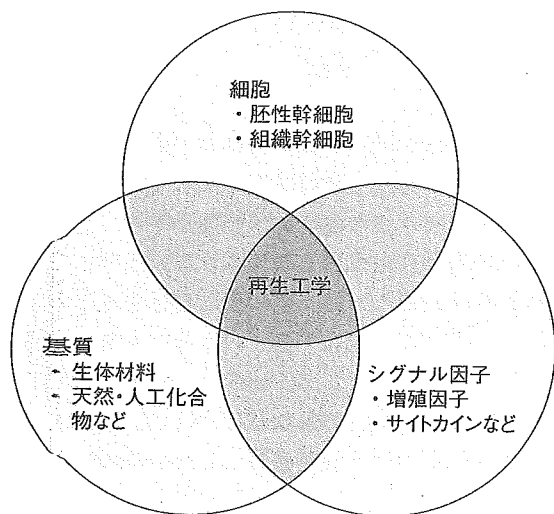


図2 再生工学の3大要素

細胞、基質、シグナル因子を包括的に理解し応用しなければならない。

再生工学の3要素

組織・臓器を生体外で再生させるためには、単に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を整える必要性がある。組織工学技術の導入により生体材料など

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組織を再生することが可能となる。この組織工学 (tissue engineering) を用いた再生医学の概念には、基質、細胞およびシグナル因子の3つの重要な柱が挙げられる (図2)⁵⁾。

1. 基質の役割

難治性眼表面疾患では、その上皮の再建のみならず、細胞外マトリックスを含めた基質の正常化が必須であると考えられる。現在まで眼表面再生における基質としては、生体材料の羊膜、生体吸収性高分子のフィブリンなどが報告されている^{6,7)}。

羊膜は、子宮内で胎児と胎盤を包んでいる半透明の薄い膜であり、上皮細胞とコラーゲンやラミニンからなる厚い基底膜、その下に緻密層や海綿層と呼ばれる羊膜基質からなる。羊膜には血管成分がないために拒絶反応が起こりにくいと考えられ、外科手術の際の癒着防止や皮膚の熱傷後の上皮修復促進などの目的で古くから用いられてきた。これまで羊膜には、瘢痕抑制効果、炎症・新生血管抑制効果、角結膜上皮の増殖分化促進効果など、さまざまな効果が報告されている。羊膜の

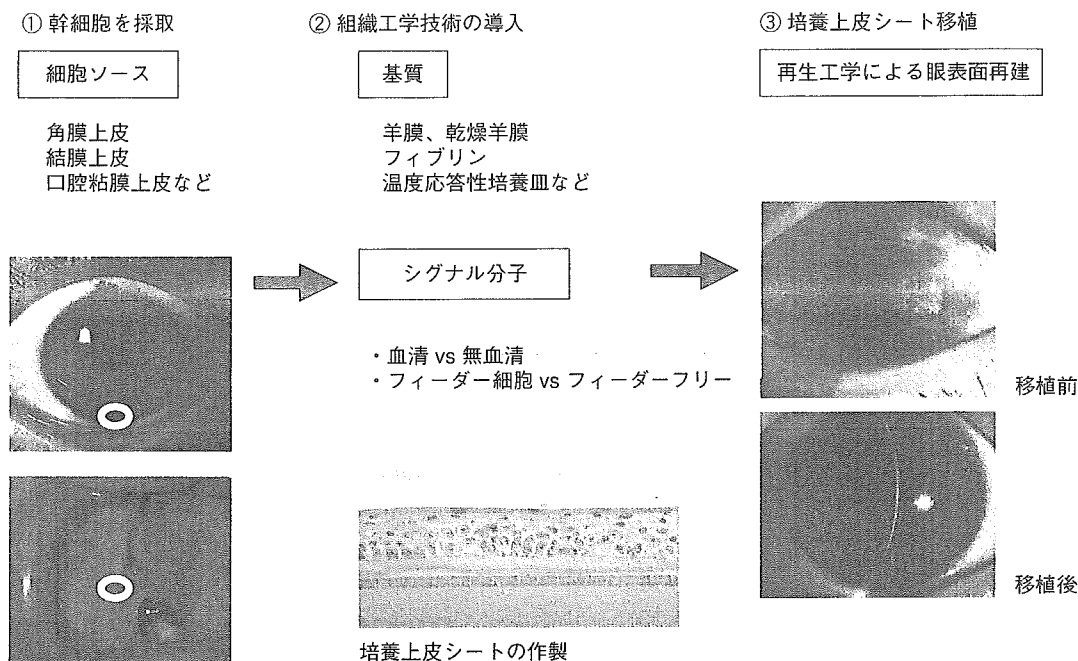


図3 再生工学による眼表面再建のストラテジー

基底膜の成分は、眼表面の角膜上皮や結膜上皮の基底膜に類似していることが報告されており、眼表面再建術の基質としてふさわしいことがわかっている⁸⁾。

現在、この凍結保存羊膜を用いた眼表面再建術は、世界中の多施設で臨床応用され一定のコンセンサスが得られているが、上皮-実質のコミュニケーションがどの程度再構築されているのか、また使用する羊膜の感染などの安全面に関するきちんとした規定がないなどの問題がある。前者に対しては、近年、温度応答性培養皿を用いた基質を用いない上皮シート移植術が開発され⁹⁾、後者に関しては、滅菌・常温保存可能な凍結乾燥羊膜が開発されている¹⁰⁾。いずれも、その長期における臨床的効果が有用であるかどうかは、今後の解決すべき課題である。

2. 細胞の選択

再生工学で使用する細胞ソースは、大きく自己(オート)由来と同種(アロ)由来の細胞とに分けられる。患者自身の細胞を使用することが可能であれば、拒絶反応の心配がなく、患者自身の術後

管理を含めた予後に大きな利益をもたらすと予想される。現状では、自己の細胞を利用することができる症例は限定的で、同種由来の細胞を使用することになるが、拒絶反応や感染症の問題が術後成績に大きく影響すると予想される。

また、使用する細胞がどのような分化度かは重要である。ES細胞などの胚性幹細胞では、あらゆる細胞種に分化できる可能性のあるポテンシャルの高い細胞であるが、必要とする細胞に分化誘導するにはかなり厳密な条件設定が必要であり、臨床用に向けてのハードルは依然高い。一方、各組織・臓器に存在する組織幹細胞を使用するには、その幹細胞の存在を規定するマーカーなどの指標が必要であり、再生工学研究とともに幹細胞研究が必須である。眼表面再生の現状では、角膜上皮や結膜上皮の信頼できる幹細胞マーカーの存在が規定されてはいないが、さまざまな状況証拠から存在する部位は予想されるため、幹細胞を含む細胞群を用いた移植となる。仮にコンセンサスの得られる幹細胞マーカーが同定されれば、真の意味での培養上皮幹細胞移植術が確立されること

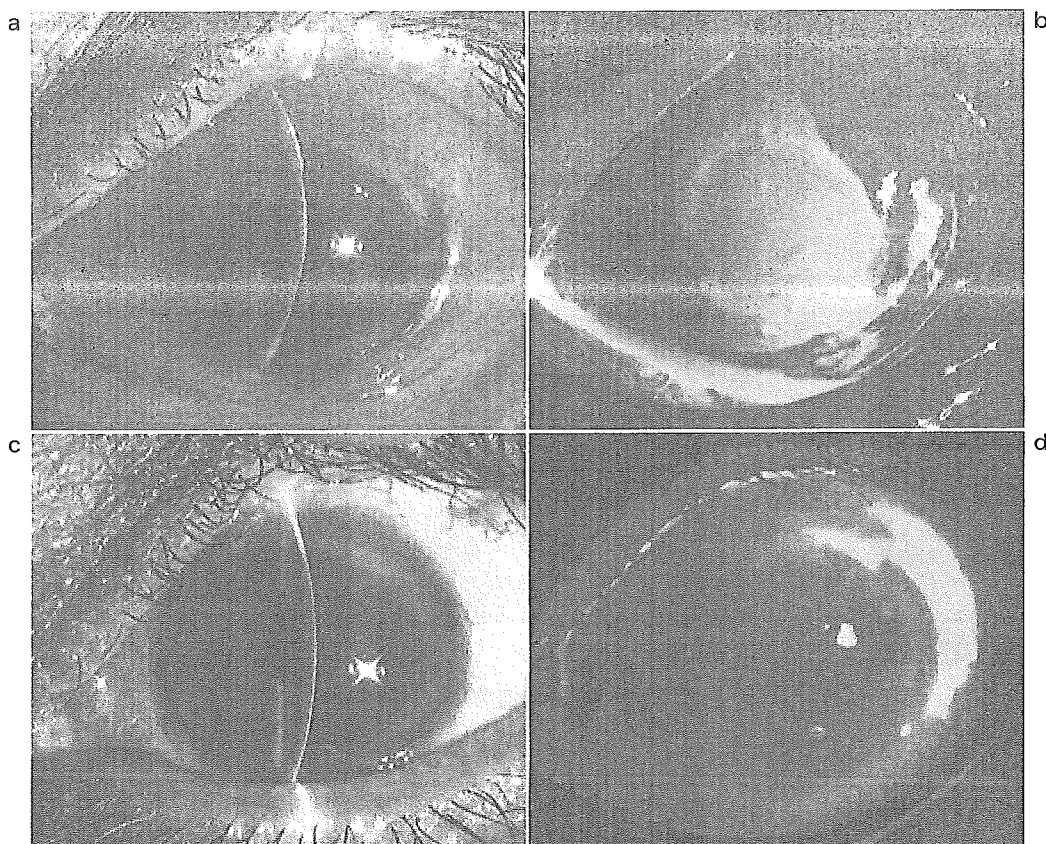


図4 同種（アロ）培養角膜上皮移植術の臨床応用例（眼類天疱瘡）
術前，角膜は癒痕化と血管侵入を伴った結膜侵入，遷延性上皮欠損を認める（a, b）。術後1年，角膜表面は同種培養角膜上皮シートで再建された（c, d）。

になる。

3. 増殖因子

基質，細胞とともに組織再生に必要なもう1つの因子は細胞成長因子などのシグナル因子である。培養過程でのこれらの因子を適切に条件設定することは，細胞が正常に分化増殖して3次元構築できるかどうかの鍵となる。培養過程に関するこれまでの報告では，大きく分けて血清を用いる培養系と血清を用いない無血清の培養系がある。血清は主にウシ胎児血清を用いるのが主流であり，細胞増殖をサポートするという側面からは，ロット差はあるものの無血清培養系よりも優れている。ただし BSE をはじめ未知の感染症に曝される危険性があり，可能であれば患者自身の自己血清を用いた培養系の確立が必要である。

一方，培養過程では細胞の増殖・分化をサポート

とするフィーダー細胞も重要である。これまで，マウス由来の 3T3 細胞を直接あるいは間接的に用いた培養系が開発されているが，血清の問題と同様に，動物由来の未知の感染症が懸念されている。今後，可能であれば，ヒト由来のフィーダー細胞，あるいはフィーダーフリーの培養系の開発が求められる。

再生工学による眼表面再生

上述の再生工学のポイントに留意しつつ，これまで報告されている再建法を紹介する（図3）。

1. 培養角膜上皮移植

難治性眼表面疾患において片眼性の場合，健眼より角膜上皮幹細胞が存在すると考えられる角膜輪部組織を少量採取して培養角膜上皮シートを

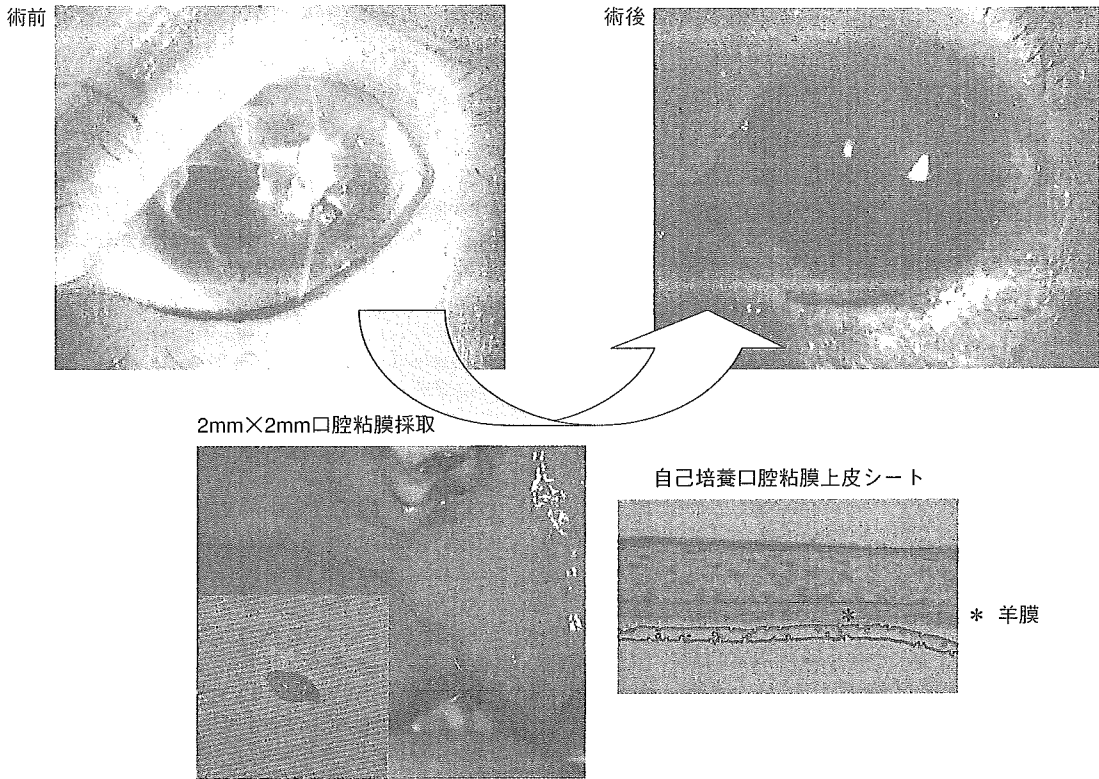


図5 自己培養口腔粘膜上皮移植術の臨床応用例 (Stevens-Johnson 症候群)

① 厳密な口腔内管理後、培養に必要な少量 (2 mm×2 mm) の口腔粘膜を採取する。② 2週間羊膜上で培養し口腔粘膜上皮シートを作製する。③ 術前、角膜は瘢痕を伴った結膜侵入により高度の視力障害が認められるが、自己培養口腔粘膜上皮移植後1年4か月、周辺からの血管侵入を認めるものの、眼表面は上皮欠損なく安定している。

作製し、患眼に移植する自己培養角膜上皮移植術が、拒絶反応もなく理想的である。羊膜、フィブリンを基質に用いた当術式の臨床応用がこれまで報告されている^{7,11,12)}。

ただし大部分の症例は両眼性であり、自己の角膜輪部組織は利用できない。そのためドナー眼球による同種 (アロ) 培養角膜上皮移植術が開発されてきた。特に、羊膜を基質に用いた当手法は、これまで世界の多施設で臨床応用が報告されており、組織採取や培養方法から移植、術後管理に至るまで安定した術式となりつつある (図4)^{13,14)}。本術式は、従来外科の手術が禁忌と考えられてきた急性期の症例に対して極めて有効であり、培養上皮シートによる速やかな眼表面の上皮化により、術後の炎症、瘢痕を長期にわたり抑制し、オキュラーサーフェスの再建に有効である¹⁵⁾。また、

さまざまな要因により移植片が混濁し、再度、眼表面の再建が必要となった場合にも、比較的安全に再手術が施行できるなどの利点も挙げられる¹⁶⁾。しかしながら、現状では、同種移植による術後の感染症や拒絶反応などの問題が手術成績に大きく影響している。

2. 培養結膜上皮移植

眼表面を構成する結膜上皮は、採取が比較的容易であり、結膜上皮が角膜上皮に分化するかどうかという議論の余地は残るが、細胞ソースの候補となりうる。結膜上皮幹細胞に関する知見が不明瞭な部分が多いため、どこから細胞を採取するのが適切かは今後の検討課題であり、また杯細胞を含めた培養結膜上皮シートの細胞生物学的考察も必要と思われる。これまで、自己の結膜上皮を羊膜上で無血清培養して、眼表面再建に利用したと

臨床報告されている¹⁷⁾。

3. 培養口腔粘膜上皮移植

難治性眼表面疾患に対する外科的再建法としては、これまで主に前述のドナー角膜を用いた同種(アロ)培養角膜上皮移植術が行われてきた。しかし、アロ移植ゆえに術後多量の免疫抑制薬を長期にわたり使用する必要があり、拒絶反応や感染症が術後成績に大きく影響を与えているのが現状であった。そこで、オート移植の開発を旨とし、眼表面以外の自己粘膜上皮のなかで口腔粘膜上皮に着目し、自己の培養口腔粘膜上皮シートを用いた眼表面再建術が開発された。異所性粘膜であるため、その細胞生物学的特性に関しては未知数であったが、家兎での動物実験レベルでその有効性を確認され¹⁸⁾、ヒトへの臨床応用も報告された^{19,20)}。これまで、報告されている手法は羊膜を基質に用いた方法および温度応答性培養皿を用いた方法であり、熱化学外傷、Stevens-Johnson症候群、眼類天疱瘡などの難治性眼表面疾患への臨床試用においても上皮修復に成功している(図5)。ただし、周辺からの血管新生が必発であり、上皮シートの性状も角膜上皮のそれとは完全に同一ではない。今後、培養口腔粘膜上皮シートの眼表面での生着性・細胞動態などを注意深く評価し、本手術法の治療効果などを検討していく必要がある。

おわりに

再生医学と組織工学が融合した横断的な再生工学的研究の進歩は、眼表面再建の歴史に大きな革新をもたらした。基質、細胞および増殖因子などを適切に用いた *in vitro* から *in vivo* への細胞移植治療は、従来型の全層角膜移植から、傷害されている部位のみを置換する角膜パーツ移植法へのパラダイムシフトを引き起こした。これらの治療法は再生工学的見地からも有効な治療法として期待されているが、しかし必ずしも万能ではなく、利点ばかりでないのも事実である。例えば、本術式は移植までにヒトによる操作過程が入るため、その安全性と倫理面の問題にも配慮する必要がある。

また、従来型の再建法と培養上皮移植の長期での臨床成績を比較・検証する必要性もある。今後このラインの研究の発展に期待したい。

文献

- 1) Schermer A, Galvin S, Sun TT : Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* **103** : 49-62, 1986
- 2) Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G et al : Existence of slow cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : implications on epithelial stem cells. *Cell* **57** : 201-209, 1989
- 3) Wei ZG, Wu RL, Lavker RM et al : In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34** : 1814-1828, 1993
- 4) Pellegrini G, Golisano O, Paterna P et al : Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* **145** : 769-782, 1999
- 5) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. *Science* **260** : 920-926, 1993
- 6) Kim JC, Tseng SC : Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* **14** : 473-484, 1995
- 7) Rama P, Bonini S, Lambiase A et al : Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* **72** : 1478-1485, 2001
- 8) Endo K, Nakamura T, Kawasaki S et al : 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) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y et al : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* **77** : 379-385, 2003
- 10) Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H et al : Sterilized, freeze-dried amniotic membrane-A useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45** : 93-99, 2004
- 11) Pellegrini G, Traverso CE, Franzini AT et al : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with

- autologous cultivated corneal epithelium. Lancet 349 : 990-993, 1997
- 12) Tsai RJE, Li LM, Chen JK : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. N Engl J Med 343 : 86-93, 2000
 - 13) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T et al : Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. Ophthalmology 108 : 1569-1574, 2001
 - 14) Shimazaki J, Aiba M, Goto E et al : Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. Ophthalmology 109 : 1285-1290, 2002
 - 15) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T et al : Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. Arch Ophthalmol 119 : 298-300, 2001
 - 16) Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M et al : Successful regrafting of cultivated corneal epithelial transplantation using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. Cornea 22 : 70-71, 2003
 - 17) Tan DT, Ang LP, Beuerman RW : Reconstruction of the ocular surface by transplantation of a serum-free derived cultivated conjunctival epithelial equivalent. Transplantation 77 : 1729-1734, 2004
 - 18) Nakamura T, Endo K, Cooper L et al : The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 44 : 106-116, 2003
 - 19) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C et al : Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. Br J Ophthalmol 88 : 1280-1284, 2004
 - 20) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y et al : Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. N Engl J Med 351 : 1187-1196, 2004

先端医療で使われる重要語句1,500語を一目で分かるように解説

先端医学 キーワード小辞典

編集 長野 敬 河合文化教育研究所主任研究員
 永田和宏 京都大学再生医科学研究所教授・細胞機能調節学
 宮坂昌之 大阪大学・院医・教授・細胞分子認識
 宮坂信之 東京医科歯科大学教授・膠原病・リウマチ内科学

「日進月歩」に進む先端医療で使われる重要語句1,500語を臨床家、医学生にわかるように概説したキーワード辞典。日本語見出しで、英和索引と略語辞典も付した、ポケット用語辞典として最適の1冊。既刊『分子生物学・免疫学キーワード辞典 第2版』の姉妹版。

● B6 頁212 2004年 定価1,890円(本体1,800円+税5%) [ISBN4-260-13656-9]



医学書院

〒113-8719 東京都文京区本郷5-24-3 <http://www.igaku-shoin.co.jp>
 【販売部】TEL 03-3817-5657 FAX 03-3815-7804 E-mail sd@igaku-shoin.co.jp
 振替 00170-9-96693 消費税率変更の場合、上記定価は税率の差額分変更になります。

156. 培養口腔粘膜上皮移植

プレゼンテーション： 中村隆宏 同志社大学再生医療研究センター/京都府立医科大学眼科学教室
 コメント： 榛村重人 慶應義塾大学医学部眼科学教室

■バックグラウンド

近年、再生医療・組織工学研究の発展により従来型の全層角膜移植から、傷害されている部位のみを移植する角膜パーツ移植が開発、導入されている。特に Stevens-Johnson 症候群や眼類天疱瘡、熱化学外傷などの重症の角膜上皮幹細胞疲弊症に対しては、生体外 (*in vitro*) で必要とする角膜上皮幹細胞を用いて培養上皮シートを作製し、移植する手法が開発されてきた¹⁾。重症の角膜上皮幹細胞疲弊症の大部分が両眼性であるため、これらの治療法はドナー角膜を用いたアロ培養角膜上皮移植術が主流であったが、拒絶反応や感染症などの合併症が術後成績に大きく影響していた。このような状況のなか、両眼性の幹細胞疲弊症に対しても自己組織を用いた眼表面再建術の可能性が模索されていた。

■新しい治療法

再建に必要な自己の細胞ソースの候補として、組織採取の利便性、安全性などを考慮して、口腔粘膜を用いた眼表面再建術の有効性が動物レベルで証明された²⁾。生物学的特性として口腔粘膜上皮は、角膜上皮に特異的な細胞骨格蛋白のケラチン3を発現しており、作製した培

養口腔粘膜上皮シートも、タイトジャンクションやデスマゾーム、ヘミデスマゾームなどの角膜上皮と類似の形態学的特徴を有していた。また家兎での移植実験でも、短期成績ではあるが血管のサポートのない眼表面という生体内できわめて特殊な環境においても生着し、眼表面再建術における角膜上皮の代用となり得る可能性が示唆された。これらの基礎的データをもとに、ヒトへの臨床応用が開始された^{3,4)}。

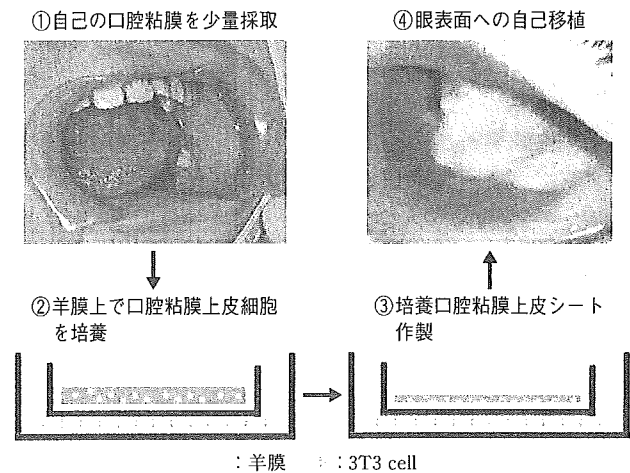
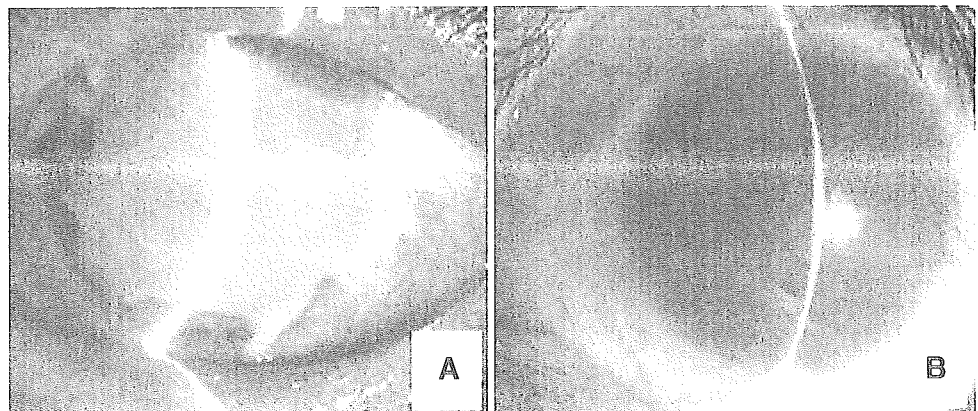


図1 培養口腔粘膜上皮移植の模式図

図2 急性期化学外傷眼に対する臨床応用例

A：術前，B：術後34カ月。
 血管新生は認められるが、眼表面は自己培養口腔粘膜上皮移植術で再建されている。



□実際の手術法

口腔粘膜採取に際しては、培養過程における感染を予防するため、採取前に厳密な口腔内管理を歯科で行う。清潔操作下で約2~3 mm²の口腔粘膜を採取し、酵素処理にて口腔粘膜上皮細胞浮遊液を作製後、自己血清を用いて羊膜上で培養口腔粘膜上皮シートを作製する(図1)。

手術に関しては、基本的に全身麻酔下で行い、標準的な術式として、角膜上の病的結膜組織を除去し、角膜実質を露出させる。つぎに、結膜下組織も可能なかぎり切除し、増殖性変化が強い症例では、術中にマイトマイシンC(0.04% MMC, 5分間)処理を行う。生理食塩水で十分に洗浄後、培養口腔粘膜上皮シートを角膜表面に10-0ナイロン糸で縫着する。培養上皮シートをフルオレセイン染色し、上皮に欠損がないかを確認後、治療用ソフトコンタクトレンズを装着し手術を終了する(図2)。

□本術式の利点

本術式は、自己組織を用いた移植であるため、拒絶反応の危険性はなく、安全であると考えられる。特に、従来のアロ移植で必要であった長期にわたる免疫抑制薬投与の必要性がないことは、患者自身のQOL(quality of life)に大きく貢献している。また、本術式は角膜上皮の再建のみならず、結膜嚢の再建にも有用な症例があることがわかっている。現在まで長期観察が最長で34カ月であるが、眼表面は培養口腔粘膜上皮シートで引き続き再建され透明性を維持しており、少なくともこの術式がこれまで不可能であった両眼性の難治性眼表面疾患に対する自己移植の可能性に一石を投じたのは間違いのない事実であると考えられる。

- 1) Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT et al : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349 : 990-993, 1997
- 2) Nakamura T, Endo K, Cooper LJ et al : The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 106-116, 2003
- 3) Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C et al : Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 88 : 1280-1284, 2004
- 4) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y et al : Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351 : 1187-1196, 2004

□本方法に対するコメント□

培養口腔粘膜上皮移植は、角膜上皮幹細胞疲弊症患者にとって有望な治療法の一つである。特に両眼が傷害された場合には患者本人の角膜上皮幹細胞はまったく残っておらず、同種移植が可能であるものの、長期間の免疫抑制を免れないのが実情である。中村らが報告するように、3年近く良好な経過を維持している症例が存在することは、何らかの前駆細胞が機能していることが示唆される。一方で、本術式を行うには高度な組織工学的な技術が必要であり、実際に施行することができる施設は限られる。また、現在は羊膜を基質として用いる方法と、西田らが報告するキャリアーを用いない方法が平行して開発されており、いずれのストラテジーがより眼表面再生に適しているかについては、今後の報告が待たれる。ただ、いずれの方法でも現在までに重篤な合併症は報告されておらず、安全面では問題はなさそうである。技術改良が重ねられれば、いずれは多くの重症患者にとって朗報となるのは間違いのない。

☆

☆

☆

Tryptase Increases Proliferative Activity of Human Conjunctival Fibroblasts through Protease-Activated Receptor-2

Naoko Asano-Kato,^{1,2} Kazumi Fukagawa,^{1,2} Naoko Okada,^{1,2} Murat Dogru,^{1,2} Kazuo Tsubota,¹ and Hiroshi Fujishima¹

PURPOSE. Tryptase that is released by mast cell degranulation has recently been thought to play a key role in wound healing in allergic bronchitis. Conjunctival fibroblasts secrete mediators and extracellular matrices that could exacerbate inflammation and papillary formation in allergic conjunctivitis. This study was conducted to investigate the effect of tryptase on the proliferation of conjunctival fibroblasts and studied whether this effect was mediated by protease-activated receptor (PAR)-2.

METHODS. Conjunctival fibroblasts were cultured with or without tryptase (0.1 ng/mL to 1.0 μ g/mL), and the proliferation rate was assessed after 48 hours. The effects of tryptase inhibitors (leupeptin, benzamidine) and a PAR-2 agonist (SLIGKV) were examined. The existence of PAR-2 mRNA and protein in conjunctival fibroblasts was examined by RT-PCR and Western blot analysis, respectively. The existence of PAR-2 in cultured conjunctival fibroblasts and conjunctival papillae from patients with vernal keratoconjunctivitis, as well as conjunctival tissue from normal subjects was examined by immunohistochemistry.

RESULTS. Conjunctival fibroblast proliferation was upregulated by tryptase in a dose-dependent manner ($P < 0.001$). Leupeptin and benzamidine inhibited tryptase-induced fibroblast proliferation ($P < 0.05$), and SLIGKV mimicked tryptase's effect. PAR-2 mRNA and protein were detected in cultured conjunctival fibroblasts using RT-PCR and Western blot analysis. PAR-2 immunoreactivity in both the cultured conjunctival fibroblasts and in stromal cells in excised conjunctival tissues was observed.

CONCLUSIONS. Tryptase increased conjunctival fibroblast proliferation and this response appeared to be mediated by PAR-2. Mast cells are the most likely source of tryptase in the conjunctiva and may play an important role in chronic exacerbations with conjunctival papillary formation in allergic conjunctivitis. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:4622-4626) DOI:10.1167/iov.05-0388

Giant papillary formation is a major characteristic of severe chronic allergic conjunctivitis, like atopic keratoconjunctivitis (AKC) or vernal keratoconjunctivitis (VKC). Histopatho-

logically, excised papillae consist of the conjunctival epithelium containing goblet cells, a cluster of inflammatory leukocytes (lymphocytes, plasma cells, eosinophils, mast cells, and neutrophils), and newly formed vessels among excessive fibrosis. Under these conditions, conjunctival fibroblasts are suspected to increase in number and to be activated, secreting soluble inflammatory mediators and extracellular matrix molecules.

An increased number of mast cells¹⁻⁵ and elevated tryptase concentrations⁶⁻¹⁰ have been reported to exist in the tears of patients with allergic conjunctivitis, including AKC and VKC. These facts may indicate that mast-cell-derived tryptase contributes to not only the IgE-mediated early-phase reaction, but also the exacerbation of late-phase inflammation and papillary formation in chronic allergic conjunctivitis.

Tryptase is a trypsin-like serine protease that is released by mast cell degranulation at inflammatory sites. Tryptase has several in vitro functions that may be important in the pathogenesis of asthmatic inflammation: the inactivation of fibrinogen and the inhibition of fibrinogenesis, the activation of tissue matrix metalloproteinases (MMPs) including MMP-3, the inactivation of neuropeptides (including bronchodilatory vasoactive intestinal peptide), the stimulation of lung fibroblast proliferation and collagen synthesis, eosinophil chemotaxis, and the upregulation of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression and of IL-8 synthesis by bronchial epithelial cells.¹¹

The mechanism by which tryptase exerts these effects is not fully understood, although recent evidence has suggested that tryptase may activate protease-activated receptor (PAR)-2. PAR-2 is a member of the PAR family, which includes PAR-1, -3, and -4. The distribution of PAR-2 in human tissue is not fully known, although previous investigations have detected mRNA expression in the stomach, intestine, glandular epithelial cells of salivary glands and the pancreas, vascular endothelial cells, tracheal epithelial and smooth muscle cells, liver, kidney, and central and peripheral nervous systems.¹²⁻¹⁴

The endogenous activation of PAR-2 by trypsin or tryptase requires the cleavage of the extracellular NH₂-terminal domain, revealing a new peptide sequence (tethered ligand) that is able to bind to sites within the second extracellular loop of the seven-transmembrane receptor.^{14,15} The ability of tryptase to activate PAR-2 appears to differ among tissues or cells expressing PAR-2.¹⁵ Akers et al.¹⁶ reported that the proliferation of lung fibroblasts was mediated by PAR-2 activation by tryptase from human mast cells. Frungieri et al.¹⁷ also reported that both recombinant and human mast cells-derived tryptase increased the proliferation of fibroblasts from human foreskin by PAR-2 activation.

In the present study, we assessed the tryptase-induced proliferation of primary cultured conjunctival fibroblasts to investigate the pathogenesis of giant papillary formation. We also investigated the existence of PAR-2 on conjunctival fibroblasts, because this receptor is thought to mediate tryptase-related effects.

From the ¹Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan; and the ²Department of Ophthalmology, Tokyo Dental College, Chiba, Japan.

Submitted for publication March 27, 2005; revised July 3, 2005; accepted October 7, 2005.

Disclosure: N. Asano-Kato, None; K. Fukagawa, None; N. Okada, None; M. Dogru, None; K. Tsubota, None; H. Fujishima, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Naoko Asano-Kato, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University, Shinanomachi 35, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan; naokato@bc.ij4u.or.jp.

TABLE 1. Sequences of PAR-2 and GAPDH Primers

PAR-2	
Forward primer	GTT GAT GGC ACA TCC CAG GTC
Reverse primer	GTA CAG GGC ATA GAC ATG GC
GAPDH	
Forward primer	GTC TTC ACC ACC ATG GAG AAG GCT
Reverse primer	CAT GCC AGT GAG CTT CCC GTT CA

MATERIALS AND METHODS

Human skin β -tryptase was obtained from Promega (Madison, WI). Anti-PAR-2 antibodies (SAM-11) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Leupeptin and benzamidine were obtained from Biogenesis (Poole, UK) and Research Organics (Cleveland, OH). The PAR-2 agonist peptide, SLIGKV (H-Ser-Leu-Ile-Gly-Lys-Val-OH), was obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland). The anti-human mast cell tryptase (MCA1438) was obtained from UK-Serotec, Ltd. (Oxford, UK).

Conjunctival Fibroblast Cultures

Human conjunctival tissue was excised from normal volunteers after obtaining their informed consent. Human conjunctival fibroblasts were established in culture, as previously described.¹⁸ The cells were cultured in 35-mm culture dishes (Iwaki Co., Tokyo, Japan) and were studied from the passages 3 to 9. The purity of each cell type was assessed by cell morphology and immunostaining for vimentin.

Cell Proliferation Assay

Conjunctival fibroblasts were removed from the culture dishes by diluting the cultures 1:10 with 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (Invitrogen-Gibco, Grand Island, NY) in PBS and incubating for 5 minutes. Cells were resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12; Invitrogen-Gibco BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). The cells were cultured in 96-well culture plates (5000 cells per well) for 24 hours in DMEM/F12 supplemented with FCS. Then, the medium was replaced with serum-free DMEM/F12 containing tryptase, tryptase with leupeptin or benzamidine, or SLIGKV. A proliferative assay was then performed with a cell-counting kit (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) after the cultures were incubated at 37°C for 42 hours. Ten microliters of a mixture of 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolium]-1,3-benzene disulfonate, 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid, and 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate was added to each well according to the attached protocols. The cells were then incubated at 37°C for 2 hours, and their absorbance was measured at a wavelength of 415 nm. Each experiment was performed in triplicate using fibroblasts from three different donors.

RT-PCR for PAR-2 mRNA

The conjunctival fibroblasts were cultured in six-well culture plates (2.0×10^5 cells per well) for 72 hours in DMEM/F12 supplemented with FCS. Then, the culture medium was replaced with FCS-free DMEM/F12, and the cells were cultured for 24 hours. The cells were then washed with PBS, and the total RNA was extracted (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). cDNA was obtained (Super Script II; Invitrogen, Carlsbad, CA). We performed reverse transcription followed by PCR amplification. Briefly, 1 ng of cDNA was added to a 24- μ L reaction volume containing 1 μ L of random primers and 23 μ L of buffer (Platinum PCR Super Mix; Invitrogen). The amplification conditions were 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute for 38 cycles. Electrophoresis was conducted on 2% (wt/vol) analytical grade agarose gels that were subsequently stained with ethidium bromide. The sequences of the forward and reverse primers for PAR-2 and GAPDH are shown in Table 1.

Western Blot Analysis for PAR-2

The conjunctival fibroblasts were cultured in six-well culture plates (2.0×10^5 cells per well) for 72 hours in DMEM/F12 supplemented with FCS. Then, the culture medium was replaced with FCS-free DMEM/F12, and the cells were cultured for 24 hours. The cells were washed twice with ice-cooled phosphate-buffered saline and extracted with 100 μ L of NP-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) containing protease inhibitors. Protein extracts were obtained from the lysed tissues using a commercially available protein isolation solution (NP-40 with protein inhibitor cocktails). Ten microliters of protein extract and 10 μ L of sample buffer with bromophenol blue were mixed and reacted at 100°C for 5 minutes, then electrophoresed (NuPAGE 10% BT; Invitrogen) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL; AP BioTech). The membrane was then blocked in a solution consisting of 5% nonfat dry milk and tris-buffered saline (TBS)-Tween 20 (pH 7.4). Immunoreactions were performed using an anti-PAR-2 monoclonal antibody (SAM-11) in 1% nonfat dry milk and TBS-Tween 20 (dilution 1: 500). This step was followed by the addition of a horseradish peroxidase-conjugated goat-anti mouse IgG1 (1:20,000; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). The immune complexes were placed in chemiluminescent reagent (ECL Western Blot detection reagents; GE Healthcare, Piscataway, NJ) and exposed to film.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, conjunctival fibroblasts from three different donors were seeded in four-well chamber slides at a density of 20,000 cells/well in DMEM/F12 containing 10% FCS. The cells were incubated at 37°C for 1 week. The cells were fixed with 4% formalin for 10 minutes at room temperature. Endogenous peroxidase was blocked by 3% H₂O₂ in methanol for 3 minutes, followed by incubation with normal donkey serum to block nonspecific staining for 10 minutes. After washing in TBS (0.1 M, pH 7.4), the cells were incubated with a mouse anti-PAR-2 monoclonal antibody (SAM-11; 10 μ g/mL) for 1 hour at room temperature. For negative control experiments, the primary antibody was replaced with preimmune mouse IgG2a. After washing in TBS for 10 minutes, the samples were processed (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) according to the manufacturer's protocol (3,3'-diaminobenzidine [DAB]-peroxidase staining). The cells were then counterstained with hematoxylin and examined by light microscopy.

PAR-2 or tryptase immunoreactivity was also analyzed in surgically excised conjunctival tissue from three patients with VKC and three normal volunteers. Immediately after excision, the conjunctival specimens were frozen, embedded in OCT compound, and stored at -80°C until the assay. The specimens were cut with a cryostat, air dried, and fixed in acetone for 2 minutes at room temperature. After they were washed in TBS (0.1 M, pH 7.4), the sections were incubated with a mouse anti-PAR-2 monoclonal antibody (10 μ g/mL), anti-human mast cell tryptase antibody (2 μ g/mL), or preimmune mouse IgG1 and IgG2a for 1 hour at room temperature. Then, the samples were processed according to the manufacturer's protocol (Vectastain ABC Universal kit; Vector Laboratories) and counterstained with hematoxylin.

Statistical Analysis

In the cell proliferation study, the mean \pm SD was calculated. The variation between the data sets was tested with ANOVA, and the significance was analyzed with an unpaired *t*-test and the Dunnett test. *P* < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Cell Proliferation by Tryptase Stimulation

We investigated the dose-dependent effect of tryptase on the proliferation of cultured conjunctival fibroblasts. Conjunctival fibroblasts were stimulated with 0.1, 1.0, 10, or 100 ng/mL or 1.0 μ g/mL of tryptase for 48 hours. Each experiment was