

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 木下 茂

平成19（2007）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 -----	11
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-----	15
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 -----	19
中村 隆宏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	28

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

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、再生医療学的見地に立ち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、倫理面を考慮し、かつ臨床的効果が高い治療法を確立する必要がある。現在まで施行された培養口腔粘膜上皮移植を基礎および臨床的側面から中長期的に再評価をした結果、本術式は、角膜および結膜を含めた眼表面再建に有効性を示し、これまで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最終的に一定のコンセンサスが得られた。また、白内障手術との同時手術や二期的に全層角膜移植などの手術法を併用する再建法も確立され、視力回復可能な手術適応患者も拡大した。さらに、術後の問題点としてあげられたグラフト内への血管新生に関しても、血管新生抑制因子である TSP1 がその分子機構の強く関与していることが示唆された。

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

A. 研究目的

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）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、倫理的側面を考慮し、かつ臨床的効果が高い治療

法を確立する必要がある。我々は、本研究目的を遂行するためのアプローチとしてまず、移植に使用する細胞集団に関する細胞生物学的な特性を理解する必要があると考え、上皮幹細胞に代表される増殖・分化能の高い細胞群に関する知見を研究対象とした。また、幹細胞ニッチを含めた培養環境の整備の必要性についても考慮した。さらに、培養時の安全性や倫理的課題、培養基質の安全性についても検討を加えた。これら一連の研究課題を遂行するにあたり、まず当科で開発してきたこれまでの培養口腔粘膜上皮移植術の基礎および臨床結果を中長期的に再評価し、本術式の問題点、課題等を明らかにした。

B. 研究方法

1) 培養口腔粘膜上皮移植の臨床応用

最終的に 2006 年 6 月までに施行した 42 症例 45 眼を対象に、自己培養口腔粘膜上皮移植術を施行した。光学的機能回復を目的としたものが 30 眼 (67%) あり、疾患の内訳は SJS 症候群 13 例 15 眼、熱・化学腐食 6 例 7 眼、眼類天疱瘡およびその類縁疾患は 5 例 5 眼、その他が 3 例 3 眼であった。年齢分布は 7~74 歳であった。学内歯科にて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。酵素的処理にて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、眼表面を被覆している病的癒痕組織を除去後、0.04% MMC で結膜下組織を処理し、19mm 径の培養口腔粘膜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

難治性眼表面疾患において、白内障や角膜実質混濁が併発している症例では、培養上皮シートによる眼表面の再建のみでは視力回復困難である。そこで我々は、眼内手術用器具を駆使し、より安全な白内障同時手術法を開発した。また、実質混濁症例では、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、角膜実質混濁部を全層角膜移植術で置換する術式を開発し、その中長期的な臨床成績の評価を行った。

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—術後血管新生の病態に関する考察

これまでの培養口腔粘膜上皮移植後に、移植したシートの生物学的な特徴

として、シート下の表層性血管新生が挙げられる。培養角膜上皮移植時にはこのような現象は観察されないため、移植後血管新生の原因としては、培養口腔粘膜上皮シートの固有の性質と推察される。そこで、培養角膜上皮シート並びに培養口腔粘膜上皮シートにおける血管新生関連因子の発現の有無を網羅的に検討した。

C. 研究結果

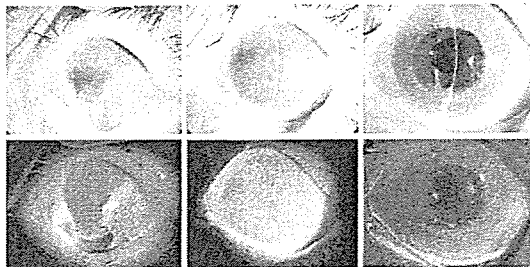
1) 自己培養口腔粘膜上皮移植の中長期成績

45 眼中 44 眼 (約 98%) で、移植に耐えうる十分に重層化した培養口腔上皮シートが作成できた。眼表面再建術を行った 30 眼では、29 眼で術後早期に完全な上皮生着が得られた。観察期間が 3 ヶ月以上の 19 眼における視力については、2 段階以上の視力改善が 12 眼 (63%) に認められ、視力は極めて安定していた (最長観察期間 36 ヶ月)。術後視力は既存する角膜混濁や内眼状態に大きく左右されるが、0.1 以上の最高矯正視力を得た症例は 19 眼中 7 眼 (37%)、さらに全症例での最高視力は 0.6 であり、難治性眼表面疾患であることを考慮すると、培養口腔粘膜上皮シート自体の光学特性が代用角膜上皮として临床上十分な機能を果たしていると考えられた。結膜嚢形成術を行った 15 眼では、全例で上皮生着と結膜嚢再建が得られたが、長期観察下での眼類天疱瘡 2 眼では、緩徐な結膜下組織の再増殖が認められた。培養口腔粘膜上皮シート移植とは異なり、新生血管をほぼ全例の周辺部角膜に認めるが、術後 6 ヶ月以降で沈静化する傾向を示した。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 punctate keratopathy 様の軽度の染色性が認められた。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。眼表面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 ICG 染色液、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6症例に関しては、移植後全例で2段階以上の視力を回復し、最長観察機関 21ヶ月においても眼表面は安定して再建された(図1)。

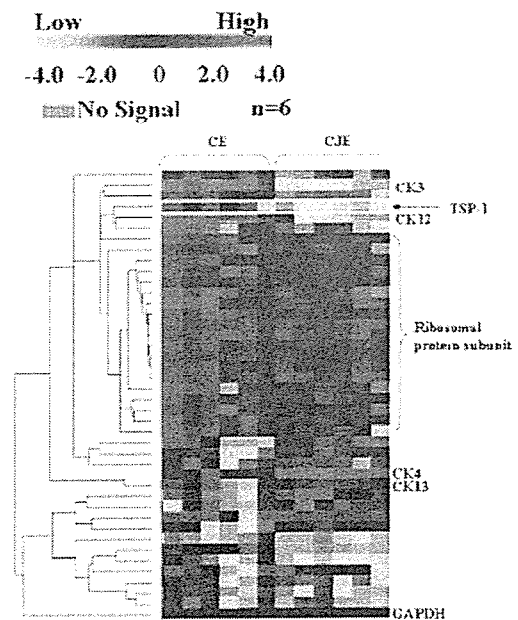


(図1) SJS 患者に対する培養口腔粘膜上皮移植+全層角膜移植術の二期的手術例

3) 術後血管新生の病態に関する考察

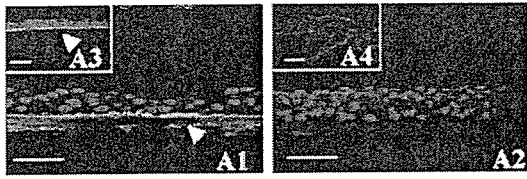
角膜は生体内で無血管性を維持する数少ない組織であり、この機構には角膜上皮が深く関係すると想像されてきた。実際、培養角膜上皮シートは新

生血管を誘発しないが、培養口腔粘膜上皮シートは新生血管を誘発する。そこで、眼表面上皮の血管新生関連因子に対する理解を深めるため、まずヒト角膜上皮細胞と結膜上皮細胞を採取して、主要な 36 の血管姿勢関連因子の発現を introduced amplified fragment length polymorphism (iAFLP) 法で比較し、その後、real-time PCR、*In situ* hybridization 法、免疫染色法、免疫電顕法で確認を行った。iAFLP の結果、thrombospondin-1 (TSP-1) の発現のみが角膜上皮において有意に亢進しており(図2)、この結果は real time PCR などで確認された。



(図2) 角膜上皮、結膜上皮の血管新生関連因子の発現プロファイル

TSP-1 の局在は、角膜上皮基底細胞内基底側、角膜上皮下ポーマン膜に認められたが、結膜上皮には認めなかった。興味深いことに、培養角膜上皮シートには TSP1 の発現が確認されたが、培養口腔粘膜上皮シートにはその発現を認めなかった(図3)。



(図3) 培養角膜上皮シート (A1) と培養口腔粘膜上皮シート (A2) の TSP1 の発現

単一の血管新生抑制因子の欠落では角膜血管新生は来たさないと報告もあり、角膜無血管は種々血管新生関連因子の発現バランスにより制御されていると推測されるが、主要血管新生抑制因子のひとつである TSP-1 が、培養口腔粘膜上皮シートには存在せず、角膜上皮シートに存在することは、TSP-1 が術後血管新生の病態に関与している可能性が示唆された。

D. 考察

角膜上皮をはじめとする眼表面の再建では、再生医学的手法による治療技術の開発により、これまでの長い角膜移植の歴史にも大きなパラダイムシフトをもたらした。特に組織工学技術の導入により、必要とする細胞を少量採取して移植片である培養上皮シートを作成後、*in vivo* へ移植する培養上皮シート移植術が、“細胞移植”という新しい概念として確立された。我々が開発した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く、術後に多量の免疫抑制剤を長期にわたり使用する必要性がない。但し、この治療手法は異所性粘膜上皮を用いる手術方法であり、基礎および臨床的側面を踏まえ、さまざまな角度

から包括的に、その手術方法、有効性、適応範囲を規定する必要性がある。これまで培養口腔粘膜上皮シートによる眼表面再建術を臨床応用したが、その中長期成績ではいずれも外科的再建が可能であり、代用粘膜上皮として機能することがわかり、一定の有効性が認められることが示された。これらの結果は、今後口腔粘膜上皮幹細胞を用いた当術式を遂行するにあたって、その有効性に関する基本的な裏づけになると推察される。また、全層角膜移植術をはじめとする他の手術との併用による臨床の中長期成績では、いずれも臨床的に有効性を示し、本術式の適応が拡大することが明らかとなった。さらに本術式の課題として、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たが、この血管新生の誘引の病態に関しても、血管新生抑制因子のひとつ TSP1 がその病態に関与していることが示唆された。今後は、TSP1 がどのような形で眼表面での血管新生の病態に関与しているのかを TSP1 ノックアウトマウス等を用いて詳しく検討する予定である。

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、若年者に幅広い適応性が示された。今回の中長期成績により、さらに臨床使用に関する有効性や問題点、シートの生物学的特性を確認した。今後は、培養粘膜上皮幹細胞移植に向け、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。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
論文発表

1. Cannon CJ, Nakamura T, Quantock AJ, Kinoshita S. The persistence of transplanted amniotic membrane in corneal stroma. *Am J Ophthalmol.* 141(1); 190-2: 2006.
2. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S. The mid-term results of ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol.* 141(2); 267-275: 2006.
3. Sekiyama E, Nakamura T, Cooper LJ, Kawasaki S, Hamuro J, Fullwood NJ, Kinoshita S. Unique distribution of thrombospondin-1 in human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47; 1352-1358: 2006.
4. Ueno M, Matsumura M, Watanabe K, Nakamura T, Osakada F, Takahashi M, Kinoshita S, Sasai Y. Neural conversion of embryonic stem cells by an inductive activity on human amniotic membrane matrix. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103; 9554-9559: 2006.
5. Sekiyama E, Nakamura T, Kawasaki S, Sogabe H, Kinoshita S. Different expression of angiogenesis-related factors between human cultivated corneal- and oral epithelial sheets. *Exp Eye Res.* 83(4); 741-6: 2006.
6. Tanioka H, Kawasaki S, Yamazaki K, Ang LPK, Koizumi N, Nakamura T, Yokoi N, Komuro A, Inatomi T, Kinoshita S. Establishment of a cultivated human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47(9); 3820-7: 2006.
7. Inatomi T, Nakamura T, Kojyo M, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol.* 142(5); 757-64: 2006.
8. 中村隆宏、木下茂、：角膜の再生医療 ティッシュエンジニアリング 2006 p.158-166.
9. 中村隆宏：角膜再生医療の臨床医学の歩み 217(5); 445-450: 2006.

2. 学会発表
国内

1. 稲富 勉、中村隆宏、小泉範子、外園千恵、木下 茂：ALTK と培養角膜上皮移植を併用した眼表面再建術：第 29 回日本眼科手術学会、東京、 2006. 1. 28.
2. 関山英一、中村隆宏、羽室淳爾、木下茂：眼表面粘膜上皮におけるトロンボスポンジン 1 の発現解析：第 30 回角膜カンファレンス、第 22 回日本角膜移植学会、東京、2006. 2. 9.
3. 千原秀美、稲富 勉、荒木美治、中村隆宏、小泉範子、外園千恵、横井則彦、木下茂、荒木やよい：培養口腔粘膜上皮移植により再建し

- た結膜扁平上皮癌の1例：第30回角膜カンファレンス、第22回日本角膜移植学会、東京、2006.2.9.
4. 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の現状と有効性の検討：第30回角膜カンファレンス、第22回日本角膜移植学会、東京、2006.2.10.
 5. 中村隆宏：難治性眼表面疾患に対する培養粘膜上皮幹細胞移植術の開発に関する研究。厚生省ヒトゲノム再生医療等研究推進事業 研究成果発表会“先端医学研究の進歩と今後” 東京 2006.2.24.

Surface Reconstruction. 2006 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2006.5.4.

4. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation. American Academy of Ophthalmology. Las Vegas, USA, 2006.11.13.

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 | |

海外

1. Sekiyama E, Nakamura T, Cooper L.J, Kawasaki S, Hamuro J, Fullwood N.J, Kinoshita S. Unique Distribution of Thrombospondin-1 in Human Ocular Surface Epithelium. 2006 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2006.5.1.
2. Nakamura T, Rigby H, Sekiyama E, Sogabe H, Fullwood N.J, Kinoshita S. Development of Hybrid-Typed Cultivated Epithelial Sheet Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. 2006 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Florida, USA, 2006.5.3.
3. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S. Effect of Autologous Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation on Ocular

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。将来的にヒト由来細胞をフィーダーとして用いることを視野に、昨年分離に成功したマウス角膜実質幹細胞をフィーダー細胞として用いることが可能かを検証した。また、羊膜を用いない培養上皮シート作成技術としてフィブリンを用いた方法を開発した。

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ィ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。さらには、

羊膜を用いないで上皮シートを作成する技術についても検討をした。

B. 研究方法

1) 角膜実質幹細胞 (COPs) の培養

昨年度分離に成功したCOPsを浮遊培養系で継代し、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。

2) COPs feederを用いた培養上皮シートの評価

重層化上皮シートをHE染色、免疫組織学的な手法を用いてサイトケラチン3 (K3)、connexin 43 (Cx43)、integrin β 1、p63について発現を評価した。

3) フィブリンを用いた上皮シート

羊膜を用いないで上皮シートを作成する技術について検討を行った。外科用フィブリン製剤を基材として上皮シートを作成し、タンパク分解酵素阻害剤であるアプロチニンと共に培養

を行った。最後にアプロチニンを除去することで、上皮シートをキャリアのない状態で回収した。家兎角膜に移植して、羊膜上皮シートと比較検討を行った。

C. 研究結果

1) 角膜実質幹細胞 (COPs) の培養
浮遊培養系で10代以上継代したCOPs細胞 (図1 A) を接着培養系に継代することで線維芽細胞に分化させた (B)。マイトマイシンC処理を施したCOPs由来フィーダー細胞にヒト角膜上皮を共培養させた。

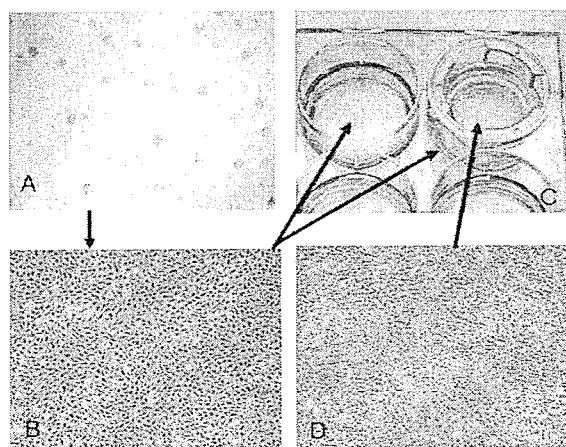


図1
3T3フィーダーを用いた場合と同じ手法で上皮シートを作成することが可能であった。

2) COPs feederを用いた培養上皮シートの評価

COPsフィーダーを用いた上皮シートは3T3と同程度の重層化を示した。分化マーカーであるK3の発現はやや強い傾向が見られたが、Cx43、インテグリンβ1、p63は同様の染色像を示した。(図2)

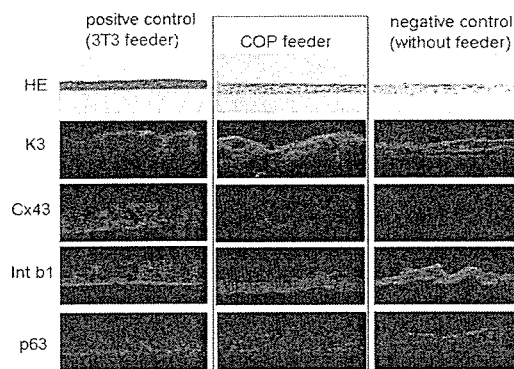


図2

3) フィブリンを用いた上皮シート
可溶性フィブリンを基材として上皮シートを作成することに成功をした。図3に示すように、羊膜を用いた上皮シートと重層化はほぼ同等で、かつ透明性はより優れていた。

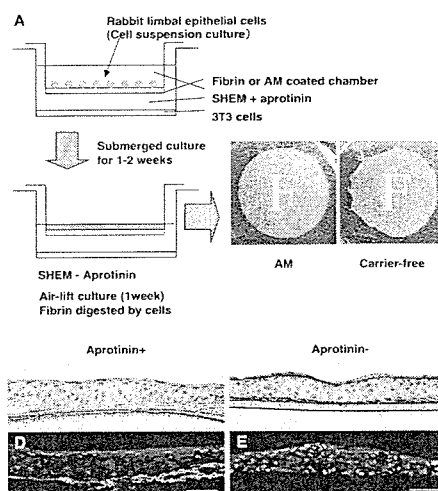


図3
一方で、上皮シートの様々なマーカーを免疫組織学的に検証を行ったところ、フィブリンシートのほうが分化マーカーであるK3、K12などの発現が多く、未分化マーカーが少ない蛍光が認められた (図4)。

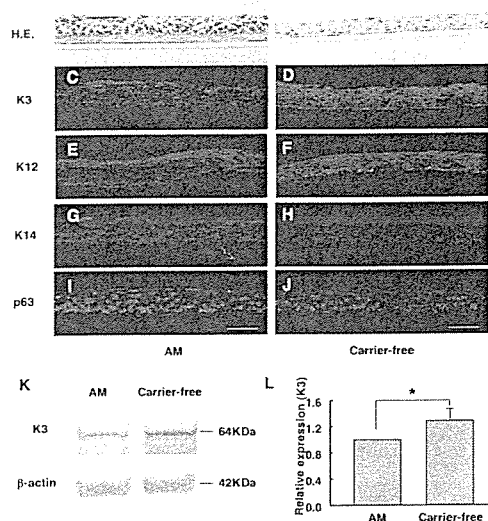


図 4

しかしながら、上皮シートを酵素処理して再度前駆細胞の存在を評価したところ羊膜シートと比較をしても差が認められなかった。また家兎に移植をしても、フィブリン上皮シートは無縫合で移植することが可能であり、臨床応用も可能と考えられた。

D. 考察

より安全な上皮シートを作成する技術として、角膜実質幹細胞をフィーダーとして用いる方法と、羊膜を用いずに上皮シートを作成する方法を検討した。その結果、マウス由来ではあるが、角膜実質幹細胞フィーダーでも上皮シートが作成できることがわかった。今後はヒトからも角膜実質幹細胞を分離する方法を検討する予定である。

また、羊膜を用いない培養シートも外科用フィブリン製剤を用いることで実現することができた。家兎への移植も可能であり、将来的にはヒトへの臨床応用が十分可能であると考えられた。

E. 結論

角膜実質幹細胞由来フィーダー細胞とフィブリンを用いることで、キャリアーを必要としない上皮シートが作成可能であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

英語論文

1. Shimmura S, Miyashita H, Higa K, Yoshida S, Shimazaki J, Tsubota K. Proteomic analysis of soluble factors secreted by limbal fibroblasts. *Mol Vis* 2006;12:478-84.
2. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Ocular surface epithelium epithelial cells upregulate HLA-G when expanded in vitro on amniotic membrane substrates. *Cornea* 2006;25:715-721.
4. Yoshida S, Shimmura S, Kawakita T, Den S, Shimazaki J, Tsubota K. Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4780-4786.
6. Yoshida S, Shimmura S, Matsuzaki Y, Okano H, Tsubota K. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells* 2006;24:2714-2722.
7. Higa K, Shimmura S, Kawakita T, Miyashita H, Itabashi Y, Fukuda K, Shimazaki J, Tsubota K. Proliferation and differentiation of transplantable epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier. *Invest*

Ophthalmol Vis Sci 2007;48:597-604.

日本語論文
なし

学会発表
国内

1. 加藤直子、榛村重人、宮下英之、比嘉一成、吉田悟、川北哲也、坪田一男. 翼状片の発生機序における β カテニンの役割、第30回角膜カンファレンス、東京、2006/2/9
2. 宮下英之、榛村重人、森藤史、吉田悟、坪田一男. マウス角膜実質組織幹細胞のフィーダー細胞としての応用、第30回角膜カンファレンス、東京、2006/2/9
3. 吉田悟、榛村重人、島崎潤、松崎有未、岡野栄之、坪田一男. マウス角膜における神経提由来組織幹細胞、第30回角膜カンファレンス、東京、2006/2/9
4. 比嘉一成、榛村重人、板橋裕史、福田恵一、坪田一男、島崎潤. フィブリンコートウェルを用いた培養上皮シートの作成と移植、第30回角膜カンファレンス、東京、2006/2/9
5. 榛村重人、吉田悟、松崎有未、岡野栄之、坪田一男. マウス角膜における神経提由来組織幹細胞、第5回日本再生医療学会、岡山、2006/3/8
6. 榛村重人、比嘉一成、吉田悟、川北哲也、島崎潤、坪田一男. 角膜上皮未分化細胞を用いたマウス培養上皮シート移植実験系の開発、第110回日本眼科学会、大阪、2006/4/14

海外

1. Shigeto Shimmura, Hideyuki Miyashita, Satoru Yoshida, Jun Shimazaki and Kazuo Tsubota. The use of keratocyte progenitors as feeder cells for epithelial sheet cultivation. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, 2006/5/2
2. Yoshida S, Shimmura S, Matsuzaki Y, Shimazaki J, Okano H, Tsubota K. Multipotent cornea stromal precursors are of neural crest origin and not the bone marrow. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, 2006/5/2.
3. Shimmura S. Transplantable carrier-free corneal epithelial sheets engineered with a biodegradable fibrin sealant. V Congresso Societa Italiana Cellule Staminali e Superficie Oculare, Rome, Italy 2006/6/2

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
研究協力者 中村 隆宏 同志社大学再生医療研究センター 講師

研究要旨

Stevens-Johnson 症候群や眼類天疱瘡などの難治性眼表面疾患に対して、異所性粘膜上皮である自己の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の細胞動態に関して検討した。単一細胞からの幹細胞の特徴を解析する clonal analysis 法により、口腔粘膜上皮においても Holoclone (幹細胞) が存在し、この細胞群が神経成長因子のレセプターである p75 を高頻度に発現していることがわかった。この p75 (+) 細胞群は、p75 (-) 細胞群と比較し、高い細胞増殖能、コロニー形成能、3次元組織構築能を示し、p75 がヒト口腔粘膜上皮幹細胞・前駆細胞のマーカーの可能性が示唆された。

A. 研究目的

さまざまな原因により角膜上皮幹細胞が高度の障害されて生じる難治性眼表面疾患に対して、自己の異所性粘膜である口腔粘膜上皮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的な課題としては、移植に用いる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に純化することができれば理想的である。表皮をはじめとする種々の上皮細胞の細胞生物学的研究により、口腔粘膜上皮にも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、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かった。本研究では、培養口腔粘膜上皮幹細胞移植術の開発を念頭に、口腔粘膜上皮幹細胞の生物学的特性の解析を検討した。

B. 研究方法

1) Clonal analysis

昨年度の報告のとうり、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。学内の研究審査委員会の承諾のもと、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。酵素的処理により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はマイトマイシンC処理した 3T3細胞を使用した。単一細胞を播種後、1週間目におけるコロニー形成率により細胞を holoclone (95% \leq , stem cell), meroclone (5-95%, young TA cell), paraclone (5% \geq , TA cell) に選別した。各細胞群の p75 の発現レベ

ルをリアルタイムPCR、免疫染色法を用いて解析した。

2) セルソーティングによるp75 (+) 細胞群の生物学的特性の検討

MACS (magnetic cell sorting) を用いて、細胞表面抗原マーカーであるp75 に対する抗体を利用して、p75 (+) およびp75 (-) の細胞集団をそれぞれ抽出した。それぞれの細胞群に対して、in vitroにおける細胞増殖能、コロニー形成能をBrdU proliferation assay、CFEを用いて解析した。また3次元組織構築能に関しては、羊膜基質上に各細胞群を播種し、約2週間培養した。

C. 研究結果

1) Clonal analysis

解析したクローンのうち、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。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。リアルタイムPCRや免疫染色法においても、holoclone の細胞集団が他と比較しp75の発現レベルが有意に高かった。

2) p75 (+) 細胞群の characterization
MACS により p75 (+) および p75 (-) の細胞集団を抽出後、各細胞集団に対して BrdU cell proliferation assay を行った。その結果、p75 (+) 細胞集団は、in vitro において有意に高い細胞増殖能を示した。また、3T3 細胞との共培養による、コロニー形成能でも、p75 (+) 細胞集団は、有意に高い CFE を示した。羊膜を基質に用いた in vitro における3次元組織構築能でも、p75 (+) 細胞集団は5-6層の重層化

した培養上皮層を形成したのに対して、p75 (-) の細胞集団では、単層の上皮層のみで、正常に分化増殖することが不可能であった。

D. 考察

これまで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が、本研究の成果より、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幹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、in vitro において高い細胞増殖能、コロニー形成能、3次元組織構築能を示すことがわかった。今後は、p75 陽性細胞群を用いて p75 (+) 培養口腔粘膜上皮幹細胞シートを作成し、詳細な生物学的な機能解析を行う予定である。p75 (+) 細胞群は食道上皮の幹細胞マーカーとしても報告されたため、将来的に本研究により粘膜上皮幹細胞に関する知見が解明されれば、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に貢献す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、p75 がヒト口腔粘膜上皮幹細胞・前駆細胞のマーカーの可能性が示唆された。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
論文発表

1. Nanba D, Kinugasa Y, Morimoto C, Koizumi M, Yamamura H, Takahashi K, Takakura N, Mekada E, Hashimoto K, Higashiyama S: Loss of HB-EGF in smooth muscle or endothelial cell lineages causes heart malformation. *Biochem Biophys Res Commun* 350:315-21, 2006
2. Shirakata Y, Kishimoto J, Tokumaru S, Yamasaki K, Hanakawa Y, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Epiregulin, a member of the EGF family, is over-expressed in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci* 45:69-72, 2007
3. Shiraishi K, Yamasaki K, Nanba D, Inoue H, Hanakawa Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S: Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth suppression. *Oncogene* 26:339-48, 2007
4. Yang L, Shirakata Y, Shudou M, Dai X, Tokumaru S, Hirakawa S, Sayama K, Hamuro J, Hashimoto K: New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell Tissue Res* 326:69-77, 2006
5. Sayama K, Hanakawa Y, Nagai H, Shirakata Y, Dai X, Hirakawa S, Tokumaru S, Tohyama M, Yang L, Sato S, Shizuo A, Hashimoto K: Transforming growth factor-beta-activated kinase 1 is essential for differentiation and the prevention of apoptosis in epidermis. *J Biol Chem* 281:22013-20, 2006
6. Yang L, Yamasaki K, Shirakata Y, Dai X, Tokumaru S, Yahata Y, Tohyama M, Hanakawa Y, Sayama K, Hashimoto K.: Bone morphogenetic protein-2 modulates Wnt and frizzled expression and enhances the canonical pathway of Wnt signaling in normal keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 42:111-9, 2006
7. Nakamura T, Endo K, Kinoshita S. Neurotrophin receptor p75 identifies human oral keratinocyte stem/progenitor cells and the role of p75/neurotrophin signaling. *Stem cells* 2006 Nov 16; [Epub ahead of print].

学会発表

1. Y Shirakata, X Dai, S Tokumaru, Y Hanakawa, M Tohyama, L Yang, K Sayama, and K Hashimoto : PPAR γ /C/EBP α signaling pathway plays a key role in 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced keratinocyte differentiation. The 67th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Philadelphia, Pennsylvania, May4-6, 2006
2. S Tokumaru, Y Shirakata, Y Hanakawa, X Dai, K Kameda, M Tohyama, K Sayama, K Hashimoto: hBD1-induced keratinocyte migration is mediated through HB-EGF/EGFR transactivation mechanism. The 67th Annual

- Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Philadelphia, Pennsylvania, May4-6, 2006
3. L Yang, K Yamasaki, Y Shirakata, X Dai, S Tokumaru, M Tohyama, Y Hanakawa, K Kameda, K Sayama, K Hashimoto: Bone morphogenetic protein-2 modulates Wnt and frizzled expression and enhances the canonical pathway of Wnt signaling in normal human keratinocytes. The 67th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Philadelphia, Pennsylvania, May4-6, 2006
 4. K Shiraishi, Y Shirakata, K Yamasaki, Y Hanakawa, S Higashiyama, K Hashimoto: Pbx1 is a major target of PLZF-mediated melanoma cell growth suppression. The 67th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Philadelphia, Pennsylvania, May4-6, 2006
 5. Y. Shirakata, X. Wang, L. Yang, M. Tohyama, S. Tokumaru, K. Sayama, K. Hashimoto: Keratinocyte growth factor has an anti-apoptotic effect on UVB-irradiated normal human keratinocytes. The 34th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Paris, France, Sep 7-9, 2006
 6. Nakamura T, Endo K, Kinoshita S. Neurotrophin receptor p75 characterizes human oral keratinocyte stem/progenitor cells and the role of neurotrophin/p75 signaling. 2th Advances in Euro Stem Cell meeting, Lausanne, Switzerland, 2006.9.8.
 7. Nakamura T, Endo K, Kinoshita S. Neurotrophin receptor p75 characterizes human oral keratinocyte stem/progenitor cells and the role of neurotrophin/p75 signaling. 2th Advances in Euro Stem Cell meeting, Lausanne, Switzerland, 2006.9.8.
- 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

「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
共同研究者 中村隆宏 同志社大学再生医療研究センター 講師

研究要旨

近年、角膜上皮幹細胞が高度に疲弊して生じる難治性眼表面疾患に対して、培養粘膜上皮細胞シートを用いた眼表面再建術が開発された。現在の培養上皮シート作成の操作過程では、ウシ胎児血清 (FBS) を使用するのが世界的に主流である。しかしながら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移植術を開発した。また、その臨床応用においても、従来のウシ胎児血清と同等の臨床効果を示した。さらに、自己血清を用いた多施設臨床試験においても、培養上皮移植システムの有効性が確認された。

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作成システムを開発した。さらに、ヒトでの臨床応用を施行し、当術式の安全性や有効性、倫理的課題に関して検討を加えた。さらに、一施設のみでの臨床報告ではその有効性に関する保証が低いとため、多施設によるマルチセ

ンタースタディーを行い、当術式の有効性についても検討を加えた。

B. 研究方法

1) ASを用いた培養上皮シート作成
昨年度の報告の通り、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5 6℃ 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。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。

2) ASを用いた培養上皮シート移植の臨床応用

学内の研究審査委員会の承認のもと、難治性眼表面疾患に対して自己血清を用いたアロ培養角膜上皮移植（9症例、平均年齢51歳、最長観察期間20ヶ月）、自己培養口腔粘膜上皮移植（10症例、平均年齢57歳、最長観察期間19ヶ月）をそれぞれ施行した。代表的な手術方法は、まず輪部より3mm外方で全周性に結膜を切開し、角膜表面および角膜周囲を覆う瘢痕性結膜組織を除去した。結膜下組織を可能な限り切除したのち、結膜下に0.04%マイトマイシンCに浸したスポンジを5分間作用させ、300ml以上の生理食塩水で眼表面を十分に洗浄した。次に培養上皮シートを角膜輪部に10-0ナイロン糸で縫着し、治療用ソフトコンタクトレンズを装着して手術を終了した。

3) 多施設臨床試験

各大学の倫理委員会の承認後、アロ培養角膜上皮移植の多施設臨床試験を施行した。参加施設は東京歯科大学眼科、愛媛大学眼科および京都府立医科大学眼科の3施設であった。京都府立医科大学眼科内で作成した自己血清を用いた培養角膜上皮シートを37度下で輸送し、各施設で臨床応用した。

C. 研究結果

1) ASを用いた培養上皮シート移植の臨床成績

ASを用いて作成したアロ培養角膜上皮シート移植、自己培養口腔粘膜上皮移植では、いずれも移植48時間後には

角膜全面は培養上皮で全て被覆されており、速やかに眼表面の消炎が得られた。アロ培養角膜上皮シート移植では経過観察中、上皮欠損が2例(22%)観察されたが、最終的には上皮修復し、全症例で術後2段階以上の視力向上が認められた。一方、自己培養口腔粘膜上皮移植では、経過観察中、重篤な合併症等は認められず、9例(90%)で術後2段階以上の視力向上が認められた。

2) ASを用いた培養上皮シート移植の多施設臨床試験

京都府立医科大学眼科においてASを用いて作成した培養角膜上皮シートを、3大学で臨床応用を施行した。2004年2月から2006年7月の間に全部で18症例施行し、移植後48時間の時点で17例(94%)で培養上皮シートの完全な生着を確認した。最終観察時の時点で15例(83%)で移植した上皮シートの良好な生着を認めた。

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行った。昨年度の報告のとうり、ASおよびFBSのヒト上皮細胞への影響に有意な差は認められなかった。また、我々が開発したASを用いた培養粘膜上皮細胞シートは、従来のFBSを用いた培養上皮細胞シートと同等の生物学的特性、臨床効果を示すと考えられた。これらのデータより、ASを用いる当手法は、従来のFBSを用いる手法に取って代わる、より安全で倫理面に配慮した培養上皮細胞シート作成法

と考えられた。

E. 結論

ヒト自己血清を用いた培養粘膜上皮細胞シート作成は、従来使用されてきた FBS と同等の生物学的特性を示し、難治性眼表面疾患患者に安全に臨床使用できることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Shimazaki J, Konomi K, Shimmura S, Tsubota K. Ocular surface reconstruction for thermal burns caused by fireworks. *Cornea* 2006, 25: 139-145.
2. Uchino Y, Goto E, Takano Y, Dogru M, Shinozaki N, Shimmura S, Yagi Y, Tsubota K, Shimazaki J. Long-term bullous keratopathy is associated with peripheral conjunctivalization and limbal deficiency. *Ophthalmology* 2006, 113: 1098-1101.
3. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Ocular surface epithelial cells up-regulate HLA-G when expanded in vitro on amniotic membrane substrates. *Cornea* 2006, 25, 715-721.
4. Yoshida S, Shimmura S, Kawakita T, Miyashita H, Den S, Shimazaki J, Tsubota K. Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006, 47, 4780-4786.
5. Nakamura T, Ang LPK, Rigby H, Sekiyama E, Inatomi T, Sotozono C, Fullwood NJ, Kinoshita S. The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens Johnson syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47; 909-916: 2006.
6. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LPK, Koizumi N, Yokoi N, Kinoshita S. Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology.* 113(10); 1765-72: 2006.
7. Ang LPK, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Yokoi N, Kinoshita S. Autologous serum-derived cultivated oral epithelial transplantation for severe ocular surface disease. *Arch Ophthalmol.* 124; 1543-1551: 2006.
8. 御宮知達也, 島崎 潤. 角膜輪部移植術の適応と術後管理. *臨床眼科 増刊号 手術のタイミングとポイント*: 210-215, 2006.
9. 石川達也, 榛村重人, 島崎 潤, 比嘉一成, 宮下英之, 篠崎尚史, 深川和己, 吉田 悟, 斉藤一郎, 藤島浩, 高野洋之, 川口竜二, 坪田一男. 人工角膜の構築と免疫学的研究. *歯科学報* 106: 37-38, 2006.

学会発表

1. Shimazaki J, Kawashima M, Higa K, Shimmura S, Tsubota K. Outcome of cultivated oral mucosal epithelial transplantation in severe bilateral

- ocular surface disorders. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U.S.A., 2006/4/30-5/4.
2. Kawakita T, Hornia A, Shimmura S, Higa K, Miyashita H, Tsubota K, Shimazaki J, S.C.G. Tseng. Corneal epithelial sheet equivalent generated from a single murine corneal/limbal epithelial progenitor cell. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Florida, U.S.A., 2006/4/30-5/4.
 3. Kawakita T, Kawashima M, Satake Y, Higa K, Shimmura S, Tsubota K, Shimazaki J. Optical Keratoplasty following Cultivated Limbal Epithelial Transplantation:clinical outcome and phenotypic study. American Academy of Ophthalmology, Annual meeting, Las Vegas, USA, 2006/11/11-14.
 4. Shimazaki J. Recent advancement on ocular surface reconstruction, 中華医学界九十五年度会員大会学術検討会, Taipei, Taiwan, 2006/6/24-25.
 5. 島崎 潤. 角結膜疾患：診断と治療のポイント. 群馬県眼科医会学術講演会, 前橋市, 2006/3/24.
 6. 島崎 潤. オキュラーサーフェス 最近の進歩. 東海 Ocular Surface Symposium, 名古屋市, 2006/11/4.

Ⅱ. 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