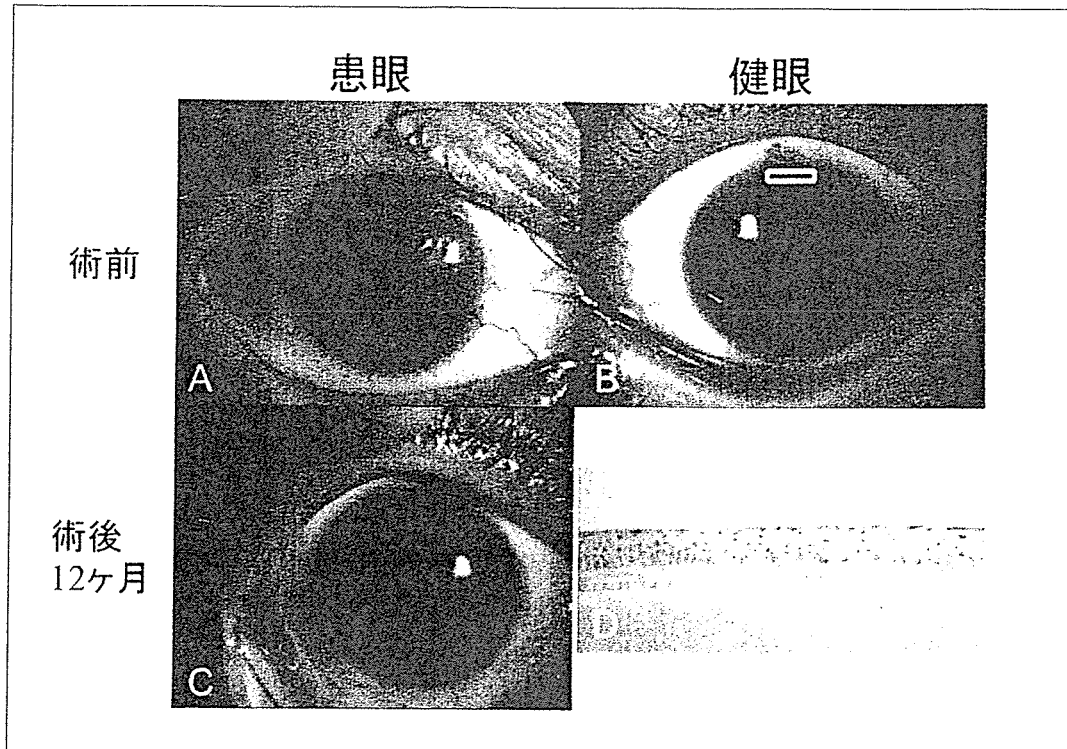


図3 自家培養角膜上皮シート移植の臨床応用例 (角膜化学腐食)



化学腐食眼 (A) に対し、健眼 (B) より角膜輪部組織を少量採取し、培養角膜上皮シートを作成後、自家移植した。術後1年、患眼 (C) の眼表面は安定しており視力も回復している。移植した培養角膜上皮シート (D) は正常角膜上皮に類似する組織所見を呈した。

植においては、拒絶反応を抑制するためにステロイドや免疫抑制薬の投与が必須であると同時に、その副作用が問題となる。そこで keyhole limpet hemocyanin 抗原 (以下 KLH) による Th2 反応の誘導による Th1/Th2 バランスの操作を行い、Th1 反応を抑制する検討を行ったところ、allo 移植においても有用であり、拒絶反応を抑制できることが明らかとなった²³⁾。奏効機序としては、強い Th2 反応時に産生される大量の IL-10 が大きく関係していることが想像される。IL-10 は抗炎症作用を有しており、Th1 型炎症性サイトカインの産生を抑制し、抗原提示細胞表面の class II MHC 発現を減弱させて抗原提示を抑制する作用を有している。この作用が拒絶反応抑制や血管侵入抑制に関与している可能性が示唆された。このような方法は、allo 角膜上皮幹細胞移植における拒絶反応のような Th1 型反応の抑制方法として今後大いに期待されるものである。臨床研究では、

拒絶反応抑制のために、ステロイドに加えてシクロスポリン全身投与を使用した。

II-2.4 同種移植の臨床成績

Allo 培養角膜上皮幹細胞シート移植の実施にあたっては、従来の外科的治療法では対処できない重症 ocular surface 疾患、すなわち Stevens-Johnson 症候群、重症熱・化学腐食、眼類天疱瘡を対象疾患とした。手術適応は、急性期あるいは慢性期の急性増悪で生じた遷延性上皮欠損の上皮修復目的と、慢性期の視機能回復目的の二とおりとした。2004 年からは、培養上皮シートの長期安定性と術後成績を踏まえて、先天無虹彩症と ocular surface の上皮系腫瘍にも適応を拡大した。

大学倫理委員会の承認に基づいて羊膜処理、培養上皮シート作成を行い、全症例において、十分なインフォームドコンセントのもとに文書同意を取得し、手術を施行した。1999 年 1 月

図4 allo 培養角膜上皮シート移植の臨床実績

疾患名	急性期	慢性期
SJS	3例 5眼	11例 11眼
角膜化学腐食	4例 4眼	4例 4眼
眼類天疱瘡	5例 6眼	4例 4眼
その他疾患		5例 5眼
合計	12例 15眼	24例 24眼

SJS: Stevens-Johnson 症候群

から 2006 年 6 月までに allo 培養角膜上皮幹細胞シート移植を行った症例は 36 例 39 眼であり、急性期の上皮修復目的で手術を施行した症例が 12 例 15 眼、慢性期の視機能回復目的で手術を行ったものが 24 例 24 眼である(図4)。移植眼の全てにおいて、移植 48 時間後に移植した培養上皮が角膜表面にほぼ完全に生着していることを、フルオレセインを用いた生体染色法により確認した。

手術方法は前述した自家培養角膜上皮幹細胞シート移植と同様であるが、自家移植の症例に比べて重症例が多く、慢性炎症による癍痕性角膜実質混濁を伴う症例を含んでいた。このため角膜実質混濁がある場合には、ドナー角膜上皮を擦過除去した表層角膜移植を併用した。同種移植による拒絶反応を抑制するため、術後投薬として、オフロキサシン点眼、0.1% デキサメタゾン点眼、自家調整 0.05% シクロスポリン点眼(4回/日)を局所に行い、ベタメタゾン(1-2mg/日)を術後1ヶ月以上、シクロスポリン(2-3mg/kg/日)を術後3ヶ月以上にわたって全身投与した。Stevens-Johnson 症候群と眼類天疱瘡では、ミコフェノール酸モフェチルとエンドキサン内服を追加した。

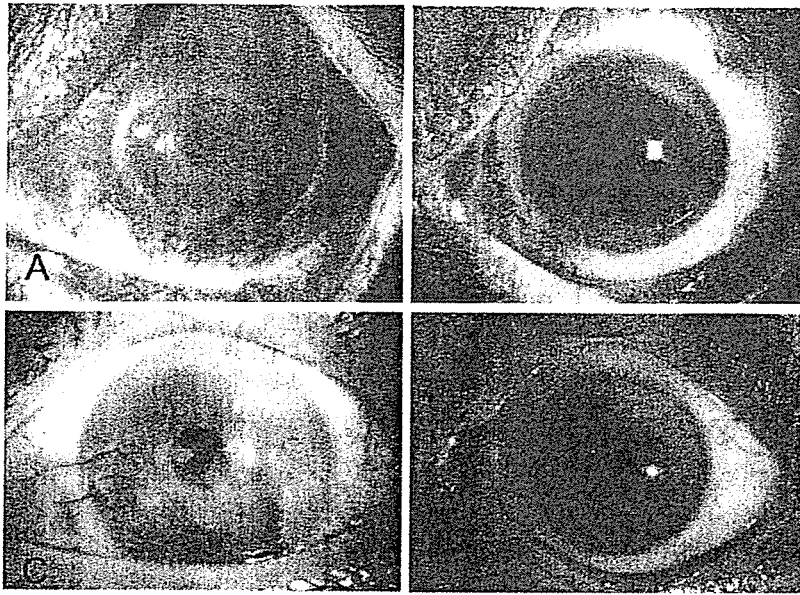
Stevens-Johnson 症候群、熱・化学腐食、眼類天疱瘡に生じる遷延性上皮欠損は、角膜融解から角膜穿孔、あるいは角膜感染症といった重篤な状態に至りやすく、臨床的には非常に危険

である。これらの遷延性上皮欠損に従来の角膜上皮移植を施行しても、上皮修復などに問題があった。Allo 培養角膜上皮幹細胞シート移植では、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⁴⁾⁵⁾、極めて速やかに ocular surface が消炎した(図5A・B)。術後の涙液中 IL-8 濃度が、従来の治療方法に比べて培養シート移植後で極めて低値であることが一因と我々は考えている。長期経過では、瞼球癒着、角膜実質混濁のような癍痕性変化と涙液減少が従来の治療方法に比べて少なかった²⁴⁾。

慢性期の Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡に対する視機能回復目的の従来型角膜上皮移植は、早期に結膜再侵入をきたし予後不良であるため一般的には禁忌とされてきた。しかし、これらの重症疾患に対して allo 培養角膜上皮幹細胞シート移植を施行したところ、術後の ocular surface は概ね安定していた(図5C・D)。長期観察できた 14 眼における術後1年の視力は改善が 11 眼(79%)、不変が 3 眼(27%)であった。

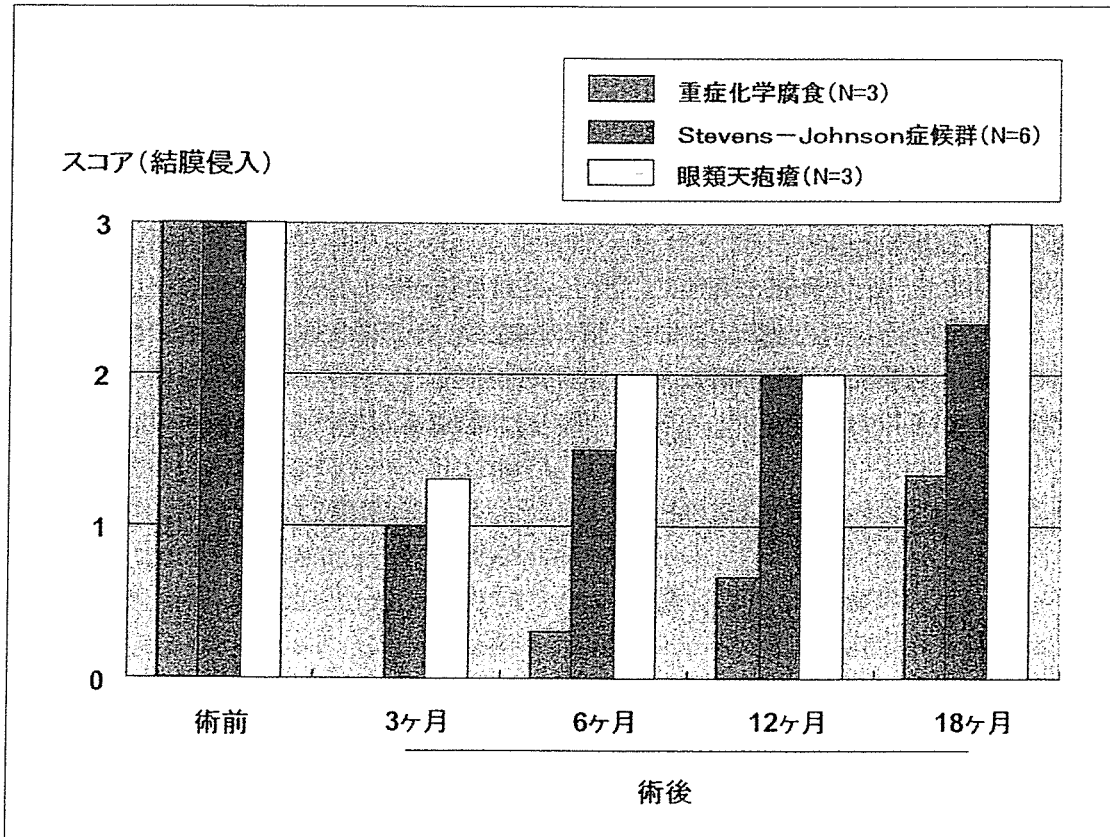
術後合併症としては、術後経過観察中に、明らかな拒絶反応を 4 眼(10%)に²⁵⁾、軽度の角膜感染症を 6 眼(15%)に認めた。このうち 5 例は慢性期 Stevens-Johnson 症候群患者であり、全例で MRSA または MRSE を検出した。ステロイド緑内障を 3 眼(8%)に生じ、2 眼で緑内障手術を施行した。

図5 allo 培養角膜上皮シート移植の代表的症例



- A : 眼類天疱瘡の急性増悪における遷延性上皮欠損（急性期症例）。角膜中央に遷延性上皮欠損を認めるが，保存治療は無効であり炎症が持続した。
- B : A に対する allo 培養角膜上皮シート移植後 1 年。眼表面は移植後速やかに消炎し，1 年後にも安定している。
- C : 化学腐食眼（慢性期症例）
- D : C に対する allo 培養角膜上皮シート移植後 7 年。移植された角膜上皮は長期に安定し，透明性を維持している。

図6 allo 培養角膜上皮シート移植と結膜再侵入



角膜上への結膜侵入を4段階にスコア化し，術後の経時変化を疾患群ごとに比較した。

重症 ocular surface 疾患の長期的問題点として結膜再侵入がある。1年半以上の長期観察できた 12 症例の結膜再侵入について4段階ス

コア評価を行い，経時変化を観察したところ，眼類天疱瘡では全例が結膜再被覆を示したのに対して，重症化学腐食では長期に培養角膜上皮

が生着する傾向にあった(図6)。実際、化学腐食例では、術後7年を経た現在も透明角膜を維持しており(図5C・D)、移植された allo 培養角膜上皮の運命は、ホストの原疾患に依存すると考えられた。なお、いずれも従来の医学常識では手術適応のない症例であったことを踏まえると、allo 培養角膜上皮幹細胞シート移植の結果は良好であり、目的とした上皮修復あるいは視力改善を得ることができたと考えられる。

II-3 培養口腔粘膜上皮シートの研究開発

II-3.1 培養口腔粘膜上皮シート移植のコンセプト

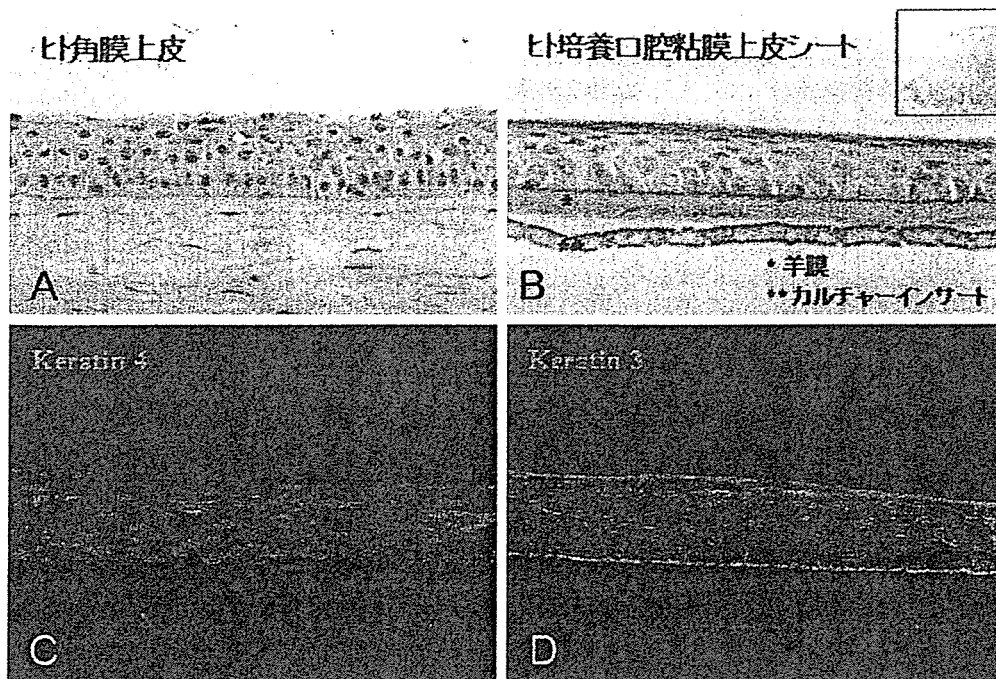
前述のように、auto 培養角膜上皮幹細胞シート移植は極めて有用であるが、多くの重症 ocular surface 疾患は両眼性であり、allo 培養角膜上皮シートを選択せねばならない。しかし、allo 上皮シート移植は、免疫抑制薬の長期使用などの問題点を抱えている。再生医学の考え方からしても自家細胞を利用して組織や臓器を再建することが理想である。そこで、我々は、角膜上皮の代用となりえる粘膜上皮を検討し、そのなかから口腔粘膜上皮細胞を選択した。その理由は、採取が容易なこと、元の組織に負担を与えないこと、そして *in vivo* 口腔粘膜上皮細胞がケラチン3を発現し角膜上皮細胞に類似することなどに着目したからである。

II-3.2 培養口腔粘膜上皮シート作成法の検討

動物実験レベルで、家兎の培養口腔粘膜上皮シートを作成し、作成した口腔粘膜上皮シートを眼表面に自家移植し、その有用性について検討した²⁶⁾。6週齢の日本白色家兎から口腔粘膜を無菌的に採取した。組織を、ディスパーゼを含有するリン酸緩衝液に浸漬し、その後0.05%トリプシン-EDTA溶液に浸漬し、細胞を分離した。10%ウシ胎児血清(FBS)を含有するDMEMに浸漬させることにより酵素活性を停止させ、セルフィルターで余分な組織を除去し、口腔粘膜上皮細胞を単離した。MMC処理

をしたNIH-3T3細胞と羊膜上皮を搔爬した羊膜基質を準備して、その上に口腔粘膜上皮細胞を共培養した。培地には、我々が確立してきた培養角膜上皮シートを作成するのに用いてきた上皮系細胞の生育に必要な培地を使用した。すなわち、DMEM/F12混合培地に、10%FBS、インシュリン(5mg/ml)、コレラトキシン(0.1nM)、ペニシリン-ストレプトマイシン(50IU)、ヒトリコンビナント上皮細胞増殖因子(EGF)(10ng/ml)を添加したものを使用した。上記の培地中で1~2週間培養した。その後、air-lifting法を行い、細胞分化を誘導した。作成した培養口腔粘膜上皮シートの特徴を、組織学的、免疫組織学的、電子顕微鏡的に検討した。免疫組織学的検討では、細胞骨格蛋白である各種のケラチン、すなわち、角膜特異的なケラチン3と12、粘膜特異的なケラチン4と13、表皮特異的なケラチン1と10の局在を検索した。電子顕微鏡的観察では、走査型及び透過型電子顕微鏡を用いて作成した粘膜上皮シートの特性を評価した。羊膜上で培養された家兎口腔粘膜上皮細胞は、約10日間でコンフルエントになり、約20日間で、角膜上皮に類似した5-6層に重層化した上皮層を形成した。上皮層の基底側には円柱形をした基底細胞類似の細胞群が存在した。最表層の細胞は扁平型を呈していたが核を有しており、皮膚とは異なり培養口腔粘膜上皮シートは組織学的に角化していなかった。培養口腔粘膜上皮シートは、細胞間の境界が明瞭で、5-6層によく分化、重層化した上皮の形態を示し、正常の角膜上皮細胞と類似した組織像を示していた。その最表層には無数の微絨毛が存在し、細胞間には多数のデスマゾームによる細胞接着が認められた。また、基底細胞と羊膜間にはヘミデスマゾームによる接着構造が認められた。Air-lifting後の培養口腔粘膜上皮シートのケラチンに対する免疫組織学的検討では、粘膜特異的なケラチンであるケラチン4と13は陽性、表皮角化型ケラチンであるケラチン1と10は陰性であり、組織所見と一致した。さらに角膜上皮特異的なケラチンとされ

図7 ヒト培養口腔粘膜上皮シート



ヒト口腔粘膜上皮は通常、20-30層の重層化した粘膜上皮であるが、適切な培養条件下で作成したヒト培養口腔粘膜上皮シートは4-5層に重層化し、正常角膜上皮と同等の組織構造を示す(B)。培養口腔粘膜上皮シートは粘膜分化型ケラチン4(C)や角膜型ケラチン3(D)を発現し、粘膜の特徴を持ちながら、角膜上皮の特徴を一部併せ持つ性質を持っている。

ているケラチン3も陽性を示したが、ケラチン12は陰性であった。以上のことから、培養口腔粘膜上皮シートの組織学的特徴としては、表皮のように角化の方向へ分化しているのではなく、非角化型の粘膜上皮としての性質を保持しながら、角膜特異的なケラチンの一部(ケラチン3)も同時に保持していることがわかった(図7)。

口腔粘膜を採取した、同じ白色家兎に対して、輪部より5mm外側より角膜および結膜上皮をすべて機械的に擦過除去し、残存上皮がないことを生体染色で確認した。この操作により角膜上皮幹細胞を含む上皮細胞が存在しなくなるため、人為的な角膜上皮幹細胞疲弊症を作成したことになる。4週後、この家兎のocular surfaceは血管侵入を伴った結膜上皮に覆われ、難治性ocular surface疾患と類似の病態を示した。この眼に対して、角膜表面を被覆している結膜組織を除去した後、前述の羊膜上培養口

腔粘膜上皮シートを輪部よりやや内側に10-0ナイロン糸で縫合して移植した。移植後、治療用ソフトコンタクトレンズを縫着した。術後、抗菌薬およびステロイド眼軟膏を1日2回塗布した。移植後2日、10日に、ocular surfaceを詳細に観察した。その結果、ocular surfaceは移植直後から、培養角膜上皮シート移植と同様な透明性を示した。移植48時間後には培養上皮が生着していることを確認した。移植上皮の周囲には、全周にわたり上皮欠損が認められたため、生着している上皮は宿主結膜上皮からの再生ではないことが確認された。移植10日後にも、移植された粘膜上皮シートは眼表面に生着しており、しかも48時間後と比較して粘膜シートより外側へ上皮細胞が伸展していることがフルオレセイン染色により観察された。組織像では、培養口腔粘膜上皮シートは羊膜とともにocular surfaceで生着しており、上皮下の細胞浸潤や角膜実質浮腫は認められなかつ

図8 自家培養口腔粘膜上皮シート移植の臨床実績

疾患	光学的再建術	結膜嚢再建術
SJS	13 例 15 眼	1 例 1 眼
角膜化学腐食	6 例 7 眼	3 例 3 眼
眼類天疱瘡	5 例 5 眼	7 例 7 眼
その他の疾患	3 例 3 眼	4 例 4 眼
合計	27 例 30 眼	15 例 15 眼

対象疾患は視力改善を目的とした光学的再建術 27 例 30 眼と、癒着解除を目的とした結膜嚢再建術 15 例 15 眼に分類される。

た。以上のことより、羊膜上で培養した口腔粘膜上皮シートは眼表面に生着、伸展し、角膜の透明性を維持することが確認された²⁶⁾。

動物モデルでの基礎的データを基に、ヒトへの臨床応用をめざし、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²⁷⁾。この培養上皮シートの *in vivo* 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。

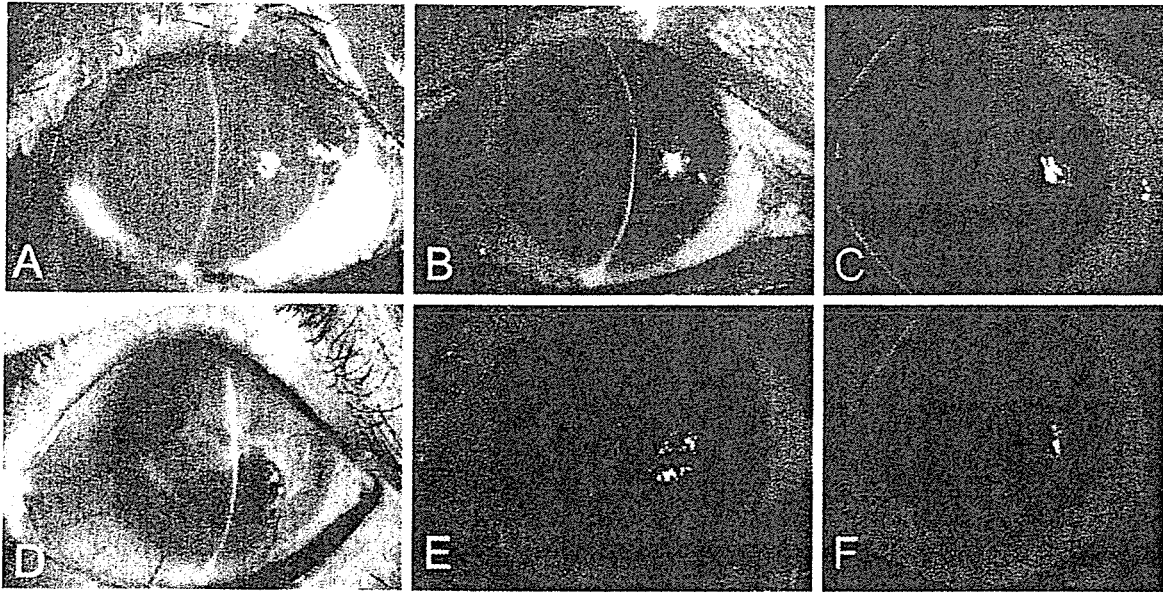
II-3.3 光学的改善を目的とした臨床成績

2001 年より自家培養口腔粘膜上皮シート移植の臨床応用を開始し、2006 年 6 月現在までに 42 症例 45 眼に実施した。培養口腔粘膜上皮シート移植は、角膜表面を再建し光学的な機能回復を目的とする場合と、結膜嚢の再建を目的とする場合の 2 つに分類される²⁸⁾²⁹⁾ (図 8)。全施行例の 45 眼において、光学的機能回復を

目的としたものは 30 眼 (67%) であり、主たる疾患の内訳は Stevens-Johnson 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。この内、自家組織移植として僚眼からの治療の選択肢のない両眼性疾患は 23 眼 77% であった。年齢分布は 7~74 歳であり、最年少である Stevens-Johnson 症候群の 7 歳女兒に施行した自家培養口腔粘膜上皮シート移植の術後経過は良好であり、現在に至るまで有効な治療法がなかった若年症例に対して新しいタイプの再生医学を応用した治療法が確立したことは特記すべきことである。

本手術術式は培養角膜上皮幹細胞シート移植と基本的には同じであり、角膜上の癒着組織を除去した後に 0.04% MMC により周辺部結膜下組織を処理し、19mm 径の培養口腔粘膜上皮シートを移植する。移植後 48 時間における完全な上皮生着率は 97% であり、術中に完全な上皮状態が確認できた症例ではすべてで良好な上皮生着が観察された。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。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

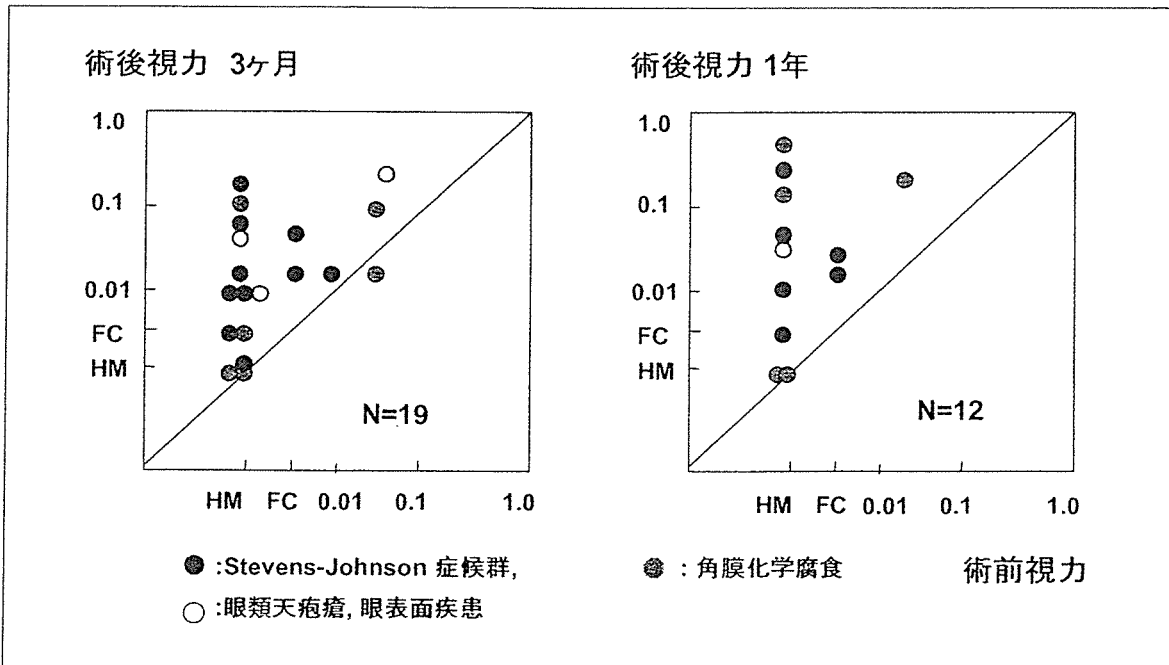
図9 自家培養口腔粘膜上皮シート移植の代表的症例



上段 (A-C) : 急性期症例 (熱傷) に対する移植では早期の上皮化と消炎が可能となり, 長期的な眼表面の安定化が得られた (A: 術前, B: 術後, C: フルオレセイン染色)

下段 (D-F) : 瘢痕期症例 (眼類天疱瘡) では allo 角膜上皮移植と比較, 免疫抑制剤を使用せずに安定した上皮化と瘢痕再発抑制が可能であった (D: 術前, E: 術後, F: フルオレセイン染色).

図10 培養口腔粘膜上皮シート移植による視機能改善



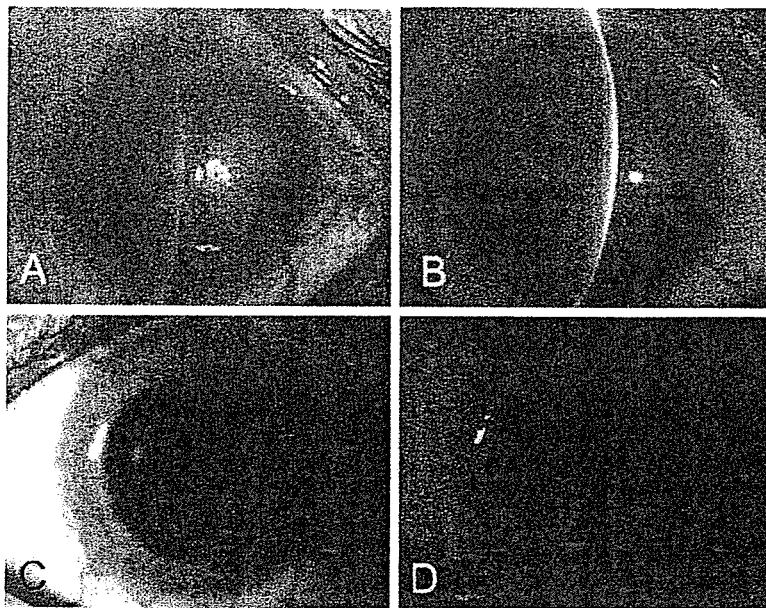
術後3ヶ月において63%で2段階以上の視力改善が可能であった。術後1年の長期経過において3ヶ月より2段階以上視力低下した症例は1眼(8%)であり良好な視力維持が可能であった。

り, 重症 ocular surface 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臨床上十分な機能を

果たしていると考えられた (図9,10).

培養口腔粘膜上皮シート移植では, 培養角膜上皮幹細胞シート移植とは異なり, 新生血管を

図11 培養口腔粘膜上皮シート移植と全層角膜移植術との二期的手術例



重症化学腐食に対して、培養口腔粘膜上皮シート移植と全層角膜移植術を二期的に施行した [A：移植前（受傷後），B：培養口腔粘膜上皮シート移植後，C：二期的全層角膜移植後，D：全層角膜移植後フルオレセイン染色]。術後の眼表面は安定しており（C・D），角膜移植片の生着は維持された。

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。生着した口腔粘膜上皮のケラチン発現パターンは口腔粘膜組織と同一であり、粘膜上皮特異的ケラチンであるケラチン4陽性であり、ケラチン3の発現も維持されていた。しかし角膜上皮特異的ケラチンであるケラチン12は陰性であり、異所性にも口腔粘膜上皮の特性が維持されていることが証明された²⁸⁾。

培養口腔粘膜上皮シート移植をさらに発展させた新規の再建法として、我々は培養口腔粘膜上皮シート移植と全層角膜移植術の二期的手術を考案した。この外科的方法はocular surface疾患とともに角膜混濁、内皮機能不全を合併する例が適応となる。今までに4症例に施行し、すべての症例で良好な視力と術後経過を得ている²⁸⁾³⁰⁾（図11）。これは培養口腔粘膜上皮シートによる自家粘膜幹細胞移植であり、ocular surface上皮増殖の安定化が可能となっていると考えている。全層角膜移植のallo角膜内皮に対する免疫反応がコントロールできるか否かは将来の検討すべき課題である。

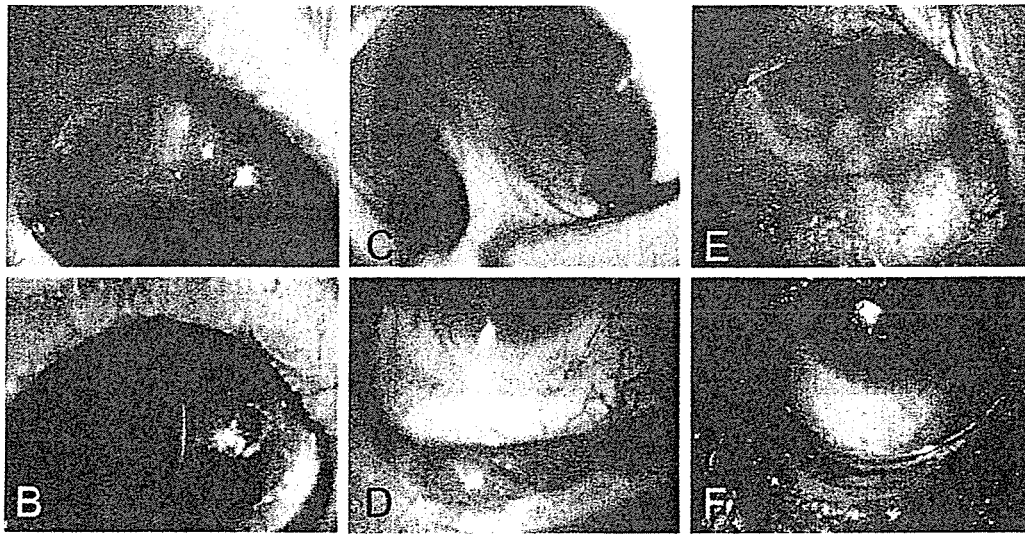
II-3.4 結膜嚢形成を目的とした臨床成績

角膜上皮幹細胞のみならず結膜上皮幹細胞が

疲弊する病態では、結膜嚢の短縮から癒着により瞼球癒着、偽翼状片へと進行し、視機能障害に至る。これらの治療としてはこれまでに、僚眼からの結膜移植や羊膜移植などによる外科的再建が試みられてきたが、両眼性疾患や慢性炎症を伴う疾患では十分な治療予後を得られていない。我々は代用結膜上皮として培養口腔粘膜上皮シート移植を15眼に応用し、結膜嚢形成における有効性を検討した。対象となる疾患群は、Stevens-Johnson症候群が1例1眼、熱・化学腐食3例3眼、眼類天疱瘡7例7眼で、その他の疾患は4例4眼であった。術式は瞼球癒着の解除後に結膜下増殖組織を除去し、0.04% MMCを5分間作用させ、広範囲な結膜欠損症例では羊膜移植を併用し、培養口腔粘膜上皮シート移植を施行した。

全例で十分な結膜嚢再建と上皮化が可能であった。再手術を必要とする重度再発が上方再建1眼、側方再建1眼の2眼（13%）に生じ、再手術を必要としない軽度再発が1眼（7%）に認められたが、全体としては、培養口腔粘膜上皮シート移植による結膜嚢再建の有効性が十分に示された（図12）。また本術式による結膜嚢再建は、進行性の角膜上皮幹細胞疲弊症の予防としても有効であり、『角膜上皮幹細胞保

図12 培養口腔粘膜上皮シート移植による結膜嚢再建例



培養口腔粘膜上皮シート移植により上方，側方，下方の結膜嚢再建を施行し，良好な再建結果を得ることができた [眼類天疱瘡の術前 (A) および術後 (B)，熱傷後瞼球癒着の術前 (C) と術後 (D)]。また同様の術式により広範に進展した腫瘍性疾患 (扁平上皮癌) での眼表面再建にも応用が可能であった [術前 (E) および術後 (F)]。

護』作用を持つと期待された。さらには，広範に伸展した眼表面腫瘍である3例3眼 (扁平上皮癌2例2眼，悪性黒色腫1例1眼) において，腫瘍の完全切除後に生じた広範な結膜欠損を培養口腔粘膜上皮シートにより再建した。3症例すべてで早期の上皮創傷治癒が可能であり，術後長期においても癒痕抑制が可能であった (図12)。結論として，培養口腔粘膜上皮シート移植は，ocular surface への粘膜上皮幹細胞を供給することにより，結膜上皮幹細胞疲弊に対しても有効と考えられた。

II-4 臨床からのフィードバックと課題

II-4.1 角膜上皮幹細胞の理解

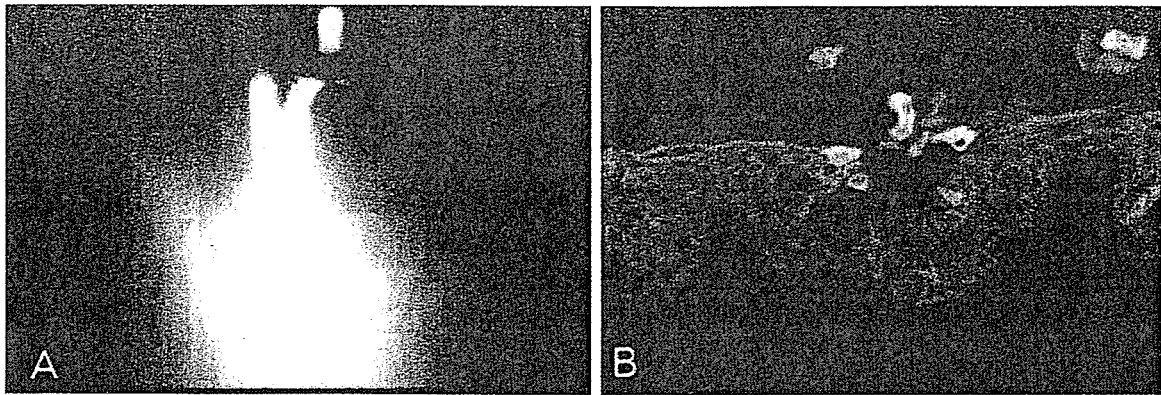
ヒト ocular surface 上皮の幹細胞は，角膜上皮細胞では角膜輪部上皮基底細胞に，そして結膜上皮細胞では結膜嚢上皮基底細胞と散在性に球結膜上皮基底細胞に存在すると報告されている³¹⁾³²⁾。しかし，角結膜組織の免疫染色あるいは組織培養による holoclone 細胞の同定などを日常的に行うことは不可能であり，幹細胞の存在の有無を診る臨床検査法が模索されている。我々は，角膜輪部に見られる縦方向の皺状構造，

いわゆる palisades of Vogt，に着目し，この palisades of Vogt の有無と角膜上皮幹細胞疲弊について検討した (図13, 14)。その結果，角膜上皮幹細胞喪失では palisades of Vogt の消失が高率に生じ，かつ角膜周辺部表層血管新生を伴うことを見出した³⁾。このような所見を示す Stevens-Johnson 症候群，眼類天疱瘡，熱・化学腐食などでは，角膜への結膜上皮侵入とともに上皮傷害を生じることも多く，臨床的にも角膜上皮幹細胞疲弊症という一つの範疇の疾患群が存在すると思われた。また，結膜上皮幹細胞疲弊症では，結膜嚢短縮と瞼球癒着を生じる可能性が高いと推測された。したがって，臨床的指標と基礎的指標が一致するかどうかを今後とも詳細に検討する必要が求められている。

II-4.2 眼粘膜免疫の理解

Ocular surface は常に外界と接しており，皮膚・口腔・腸内などと同様に常在細菌が棲息する。腸管では，非特異的炎症を生じる炎症性腸疾患が着目されており，腸内の常在細菌に関係する異常炎症反応が，その病態に関与していると考えられている³³⁻³⁵⁾。炎症性腸疾患と同様

図13 ヒト角膜輪部の Palisades of Vogt



A：ヒト角膜輪部の細隙灯写真

B：ヒト角膜輪部切片の免疫染色。K12（赤），K1（緑）の発現を認める。

図14 Palisades of Vogt の完全消失を示す疾患

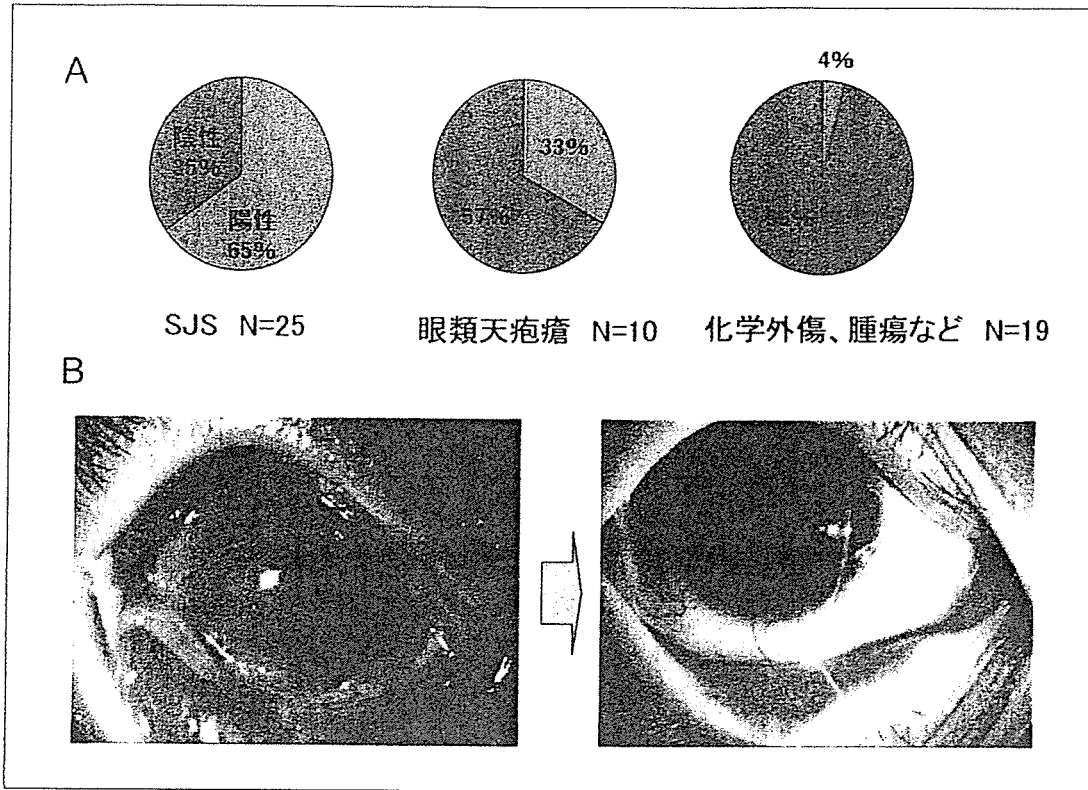
疾患名	眼数	POV消失頻度(%)
角膜化学腐食	39	82
SJS	30	83
眼類天疱瘡	8	100
トラコーマ瘢痕期	10	100
放射線角膜炎	3	100
Salzmann角膜変性	5	100
IDU長期使用例	21	52
抗菌薬点眼の長期使用	22	45

に、ocular surface の粘膜上皮炎症性疾患の病態を考えるためには、粘膜免疫からのアプローチが必要であると考えられる。特に、外科的治療の有無にかかわらず非特異的炎症が持続する Stevens-Johnson 症候群では重要である。この非特異的炎症は低濃度ステロイド点眼薬だけではコントロールし難く、このような炎症制御が困難なために角膜上への結膜侵入を防止できないことがある。

そこで、Stevens-Johnson 症候群と常在細菌叢の関係を検討したところ、急性期 4 例 8 眼の結膜囊培養検査から、MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) を 2 眼、MRCNS (methicillin-resistant coagulase nega-

tive *Staphylococcus*) を 2 眼検出した。また外科的治療を施され、同程度に免疫抑制を行っていると考えられる通院患者の結膜囊細菌検査を行ったところ、Stevens-Johnson 症候群患者より高頻度 (70%) に MRSA/MRCNS が検出された (図15A)。これらは感染症を発症していない MRSA/MRCNS 保菌者である³⁶⁾。このような Stevens-Johnson 症候群の MRSA 保菌者で菌量が増えると、ocular surface 全体に炎症を生じて視力低下をきたし、MRSA の除菌により著しい炎症が沈静化する (図15B)。Ocular surface からの MRSA 検出は、入院中の高齢者でも高頻度に認められるが、Stevens-Johnson 症候群のような著しい ocular surface

図15 重症角膜疾患と眼表面の保菌



A : allo 角膜上皮移植後における眼表面の MRSA/MRCNS 保菌率

B : Stevens-Johnson 症候群と MRSA 保菌. MRSA 除菌により眼表面が消炎し, 視力が向上した.

の炎症を生じることはない. 本疾患の ocular surface の炎症には, 何らかの機序で, 常在細菌が関与していることを示唆していると考えられる.

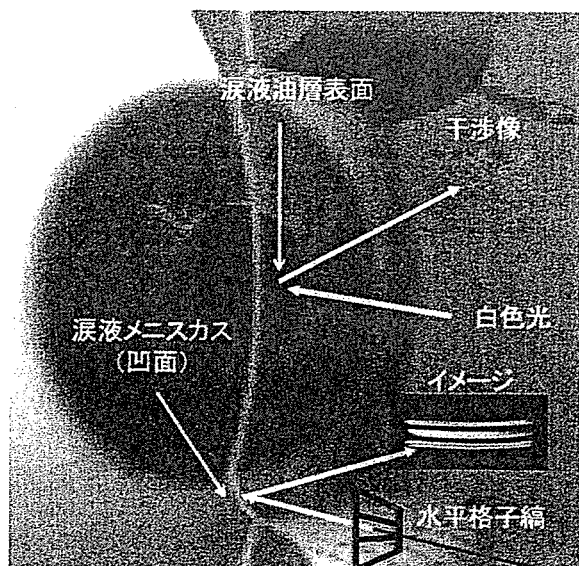
II-4.3 涙液の評価と改善対策

眼表面は涙液層と上皮層からなり, 両者の相互作用は眼の光学系を維持している. 上皮に対して涙液は水分, 酸素, 各種の栄養分の供給源になると共に, 老廃物をターンオーバーさせる媒体として働くため, 上皮の新陳代謝にとって不可欠である. 生理学的に見て涙液の重要な特性は, その「安定性 (stability)」であり, その特性により上皮は乾燥から免れている. 従って涙液の安定性が失われて破綻すると上皮との相互作用が消失して上皮障害を生じる. 近年の研究によれば, 涙液層 (約 3 μ m)³⁷⁾ は, 最表層の油層とその下の液層からなり, 液層には結膜杯細胞由来の分泌型ムチン (MUC5AC, MUC7)

が濃度勾配を持ちながら分布し, 分泌型ムチンと上皮細胞に発現する膜型ムチン (MUC1, MUC16, MUC4) の相互作用により, 涙液の安定性が維持されるものと推察されている³⁸⁾.

重症 ocular surface 疾患である Stevens-Johnson 症候群, 眼類天疱瘡, 熱・化学腐食, 移植片対宿主病, しばしば涙液が量的あるいは質的に高度に障害されており, その結果として涙液と上皮の相互作用が失われ, 重症の上皮障害が引き起こされる原因の1つになっている. すなわち, 重症 ocular surface 疾患においては, 高度の結膜炎によって生じる結膜の線維増殖性変化が結膜嚢門蓋部において涙腺の導管を巻き込む結果, 高度の涙液減少を生じると共に, その一方で, 結膜炎が上皮の分化障害を引き起こして³⁹⁾ 眼表面上皮の病的角化を生じ, 本来親水性であるべき眼表面上皮の濡れ性を低下させる. さらに, 結膜炎がマイボーム腺に波及して導管上皮の角化に基づくマイボーム腺

図16 インターフェロメトリー法 (図上方) およびメニスコメトリー法 (図下方) の原理



機能不全を引き起こして油層の量的、質的障害を生じうる。その結果、重症の眼表面疾患においては、しばしば涙液減少と蒸発亢進の合併した高度のドライアイが生じて、患者の QOL (Quality of Life) を高度に低下させる原因の1つとなっている。

このような重症 ocular surface 疾患の病態解明とそれに基づく治療法の開発のためには、涙液および上皮の障害の客観的な評価が不可欠であり、我々はその評価法の開発に取り組んできた。まず、非侵襲的かつ定量的に ocular surface の涙液貯留量を評価できるビデオメニスコメトリー法 (図16) を確立した⁴⁰⁾⁴¹⁾。この方法では、下眼瞼中央の涙液メニスカスの凹面形状の表面に水平格子縞を投影してその鏡面反射像の線幅を求め、光学式に当てはめて解析することにより、涙液メニスカスの曲率半径 (R) を算出する。ここで求められるRは、眼表面全体の貯留涙液量と一次相関するため⁴²⁾、Rの値を比較することにより、個々の眼における涙液貯留量を比較することが可能であるとともに、点眼後のRの経時変化をモニターすることにより、涙液ターンオーバーに関する情報を得ることができる⁴³⁾。本手法は、ドライアイのみならずコンタクトレンズ装用眼⁴⁴⁾⁴⁵⁾の涙液動態の評価、

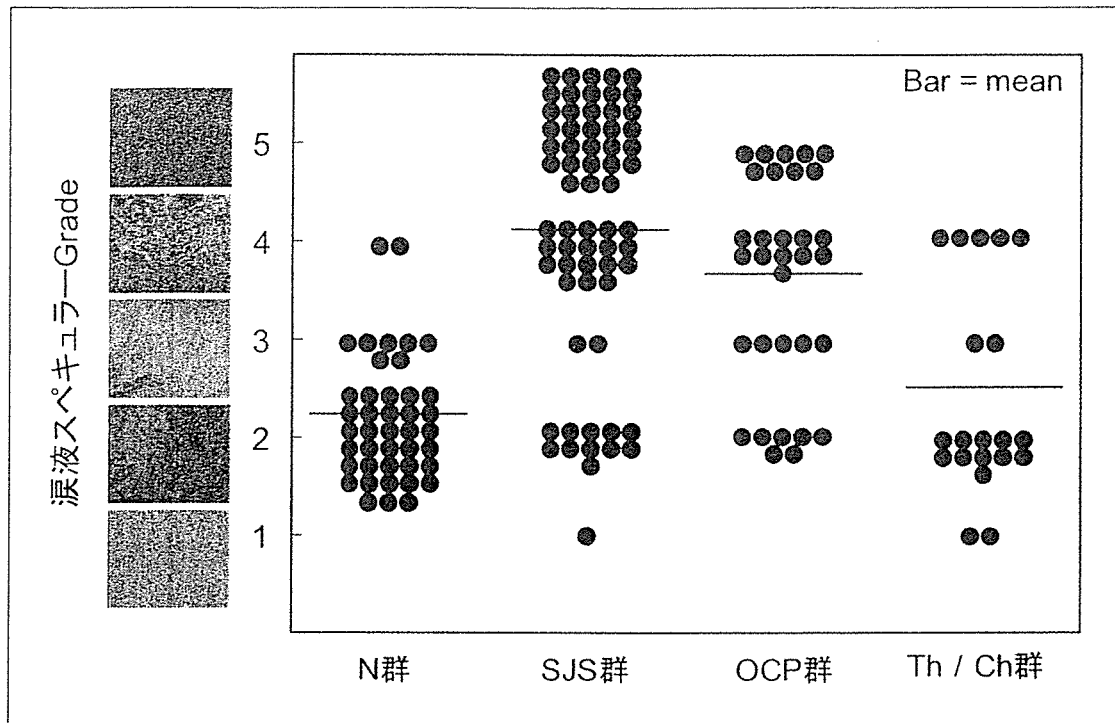
涙液検査法の比較⁴⁶⁾⁴⁷⁾、点眼液の動態評価⁴⁸⁾や副作用の検討⁴⁹⁾など幅広い活用性を有している。

一方、涙液の油層情報を光学的に解析する手法 (涙液スペキュラー観察法またはインターフェロメトリー法) も共同開発した⁵⁰⁾。本法は、涙液油層の表面と油層と液層の界面における反射光の干渉像の観察により涙液油層の厚み情報や涙液層の安定性に関する情報 (Non-invasive breakup⁵¹⁾) を得る方法であり、本法による涙液層の Grade 分類 (Grade 1, 2, 3, 4, 5: Grade 1~4 は油層の干渉像が観察領域の全面に観察され、涙液の液層が確保されている状態。一方、Grade 5 は非薄化した不安定な涙液層と上皮表面が観察され、涙液の障害が最重症であることを示す状態) を既に確立した⁵⁰⁾。本 Grade 分類に基づけば、簡便なドライアイのスクリーニング法が活用可能であり、他施設でも広く利用されるに至っている (図17)。

その他、さまざまな領域への応用の可能な上皮障害の定量的な評価法 (バリアー機能の評価) としてのフルオロフォトメトリー法^{49)51)~59)}、Oxford で開発されたマイボメトリー法⁵³⁾⁶⁰⁾ を発展させたレーザーマイボメトリー法⁶¹⁾ (眼瞼縁でのマイボーム腺の油量を測定する方法) やマイボーム腺の腺構造の評価法 (Mathers の方法⁶²⁾ を発展させた超高感度ビデオマイボグラフィ法) も完成し、我々の施設では、これらの非侵襲的涙液評価法を駆使することにより、ocular surface 疾患の病態の把握や治療効果の判定を客観的に行うことが可能となった。

重症 ocular surface 疾患 [Stevens-Johnson 症候群 (SJS 群: 37 名 69 眼; 平均 47.1 歳), 眼類天疱瘡 (OCP 群: 17 名 32 眼; 平均 63.6 歳), 熱・化学腐食 (Th/Ch 群: 16 名 22 眼; 42.6 歳)] および正常ボランティア群 (N 群: 29 名 42 眼; 平均 49.3 歳) におけるメニスコメトリー法、インターフェロメトリー法、マイボグラフィ法を用いた群間の比較検討では、① R に有意差はなく (涙液貯留量に有意な差はない) (図18)、② 涙液油層 Grade は、SJS 群、

図17 涙液スペキュラーと重症角膜疾患

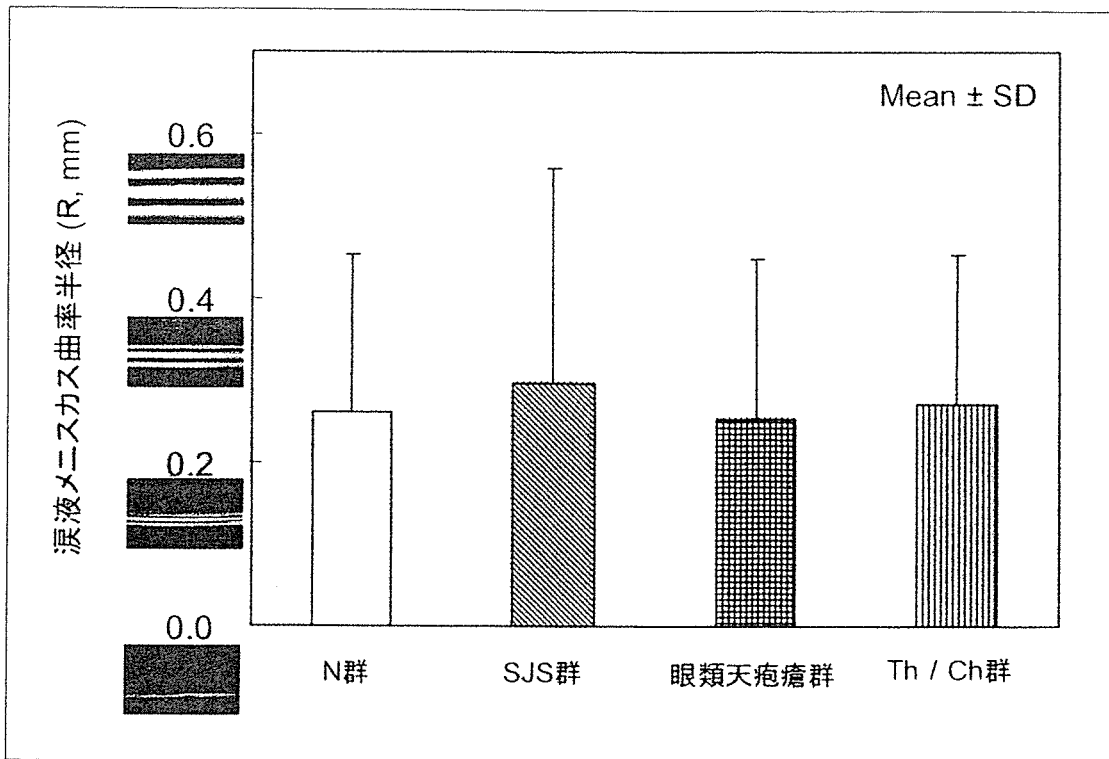


健常眼 (N群), Stevens-Johnson 症候群 (SJS 群), 眼類天疱瘡 (OCP 群), 熱・化学腐食 (Th/Ch 群) における涙液スペキュラー Grade を比較した。N 群に比べて, SJS 群, OCP 群で有意に Grade は高く (それぞれ, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0601$), SJS 群, OCP 群で高度な角膜の濡れ性の低下を示す Grade 5 がそれぞれ, 66.7%, 53.1% に見られた。

OCP 群で有意に高 Grade 5 を示し (SJS, OCP 群でドライアイは高度) (図17), ③ SJS 群, OCP 群でマイボーム腺の組織構造の高度の破壊 (severe gland dropout) を示す例が有意に多く認められた (図19)。このことから, SJS, OCP では, 涙液量は保たれていたが, 角膜上の涙液が質的に高度に障害された状態にあることが推察された。涙液量が保たれている理由として, これらの ocular surface 疾患では, 涙点が結膜の癒痕形成に巻き込まれて閉塞している場合が多いことが関与していると思われる。また, マイボーム腺の破壊所見は, マイボーム腺組織における慢性的な炎症の関与を示唆していると考えられた。以上の眼表面上皮およびマイボーム腺の変化は, 先に述べたように高度の結膜炎から一元論的に説明しうるものと考えられるため, 重症の眼表面疾患に対する治療の鍵は, 涙液の観点から見ても, 抗炎症治療が鍵になると考えられる。

以上のことから, 重症の眼表面疾患に対する今後の改善対策を涙液の視点から考察すると, これら重症 ocular surface 疾患の急性期においては十分な結膜の消炎を行い, 炎症の結果としての結膜の線維増殖による涙腺機能の障害, および結膜上皮の分化障害を回避して, 涙液量とムチンの確保による涙液層の安定化をめざすことが最も重要である。また慢性期においては, 涙液減少と蒸発亢進によるドライアイを改善するために, 人工涙液の頻回点眼, および涙液量の極端な減少例に対しては, 涙点プラグ挿入を含む涙点閉鎖を行うことが重要と考えられる。そして, 涙点閉鎖の適応決定のために, あるいは眼表面再建を考えるために, 涙液の量的 (メニスコメトリー法), 質的 (インターフェロメトリー法) 評価を行って涙液の条件を的確に把握しておくことが重要と思われる。さらに, ocular surface の再建においては, 結膜嚢・涙液メニスカスの再建による貯留涙液量の確保,

図18 涙液メニスカス曲率半径と重症角膜疾患



健常眼 (N群), Stevens-Johnson 症候群 (SJS 群), 眼類天疱瘡 (OCP 群), 熱・化学腐食 (Th/Ch 群) における涙液メニスカス曲率半径 (R, mm) を比較した (縦軸には, 各スケールに近似の代表的なイメージを示した). 各群に有意な差は見られず ($p=0.1315$, one-way ANOVA), 涙液貯留量に差はないと考えられた.

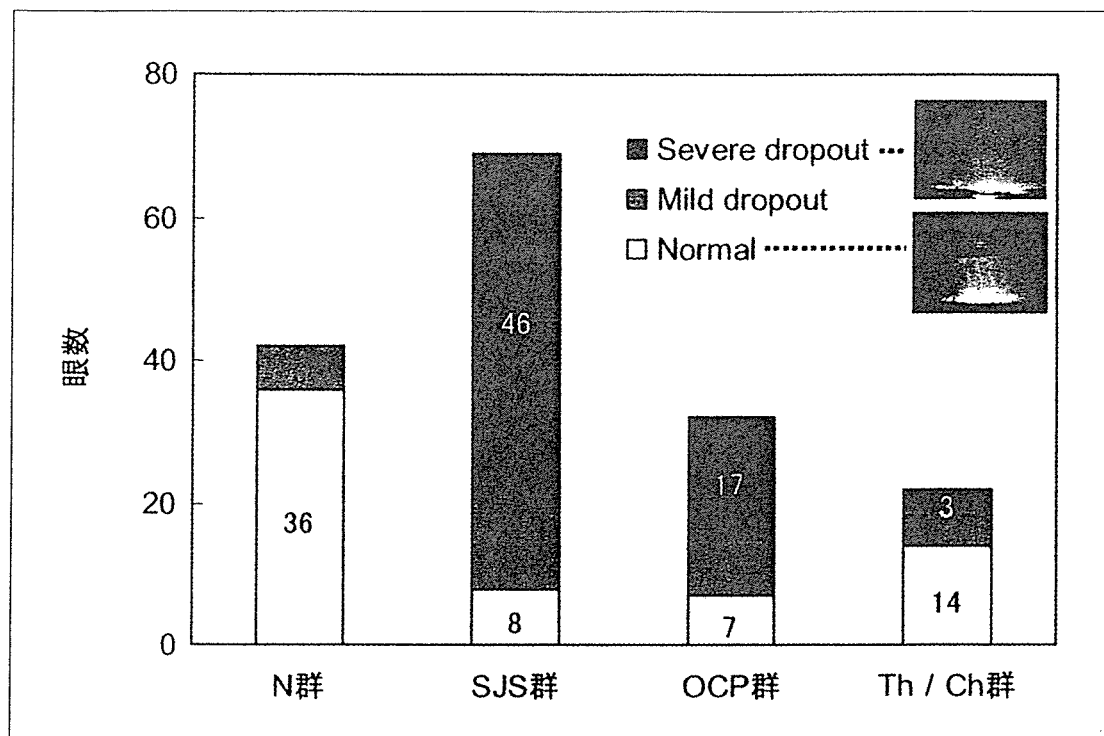
上皮移植および消炎による上皮の親水性の回復が治療上の大きな鍵を握っていると思われる. 高度のマイボーム腺機能不全に対しては, 油性点眼を含めたマイボーム腺機能不全への対策が今後の課題である.

II-4.4 臨床試験へむけた安全対策

これまでの一連の再生医療技術の開発の中で, 我々が特に留意しなければならないのは, その医療技術が臨床試験における安全性, 倫理面の課題を克服しているかどうかである. 特に, 培養上皮シートの作成過程で使用する血清やフィーダー細胞の課題を克服する必要がある. そこで我々は, 従来使用されてきたウシ胎児血清 (FBS) の代替として, ヒト自己血清を用いた移植システムの開発を手がけた. まず, 患者の自己血清を用いた培養上皮移植術を開発し, その臨床成績を検討した²⁹⁾⁶³⁾⁶⁴⁾. 対象は, 京都府

立医大眼科で 2004 年 2 月から 2005 年 3 月までに ocular surface 再建術を施行した培養角膜上皮移植患者 8 例 8 眼, 培養口腔粘膜上皮シート移植患者 7 例 7 眼, 平均観察期間 (11.8 ± 4.1 ヶ月) である. 自己血清で作成した培養粘膜上皮シートの細胞生物学的考察を, 免疫染色法, 電子顕微鏡を用いて解析した. いずれも ocular surface 再建を目的として培養粘膜上皮シートを移植し, その眼表面における生着性を検討した. その結果, 自己血清を用いて作成した培養粘膜上皮シートは独自の分化型ケラチン, 基底膜関連タンパクの染色性を示し, 正常角膜上皮と同等の細胞接着装置等の構築も認められた. 術後早期 (2-7 日) における培養上皮の眼表面での生着を全例 (100%) で確認した. 2 段階以上の視力改善が認められた症例は, 培養角膜上皮シート移植 7 例 (88%), 培養口腔粘膜上皮シート移植 6 例 (86%) であった. こ

図19 マイボーム腺の組織破壊と重症角膜疾患



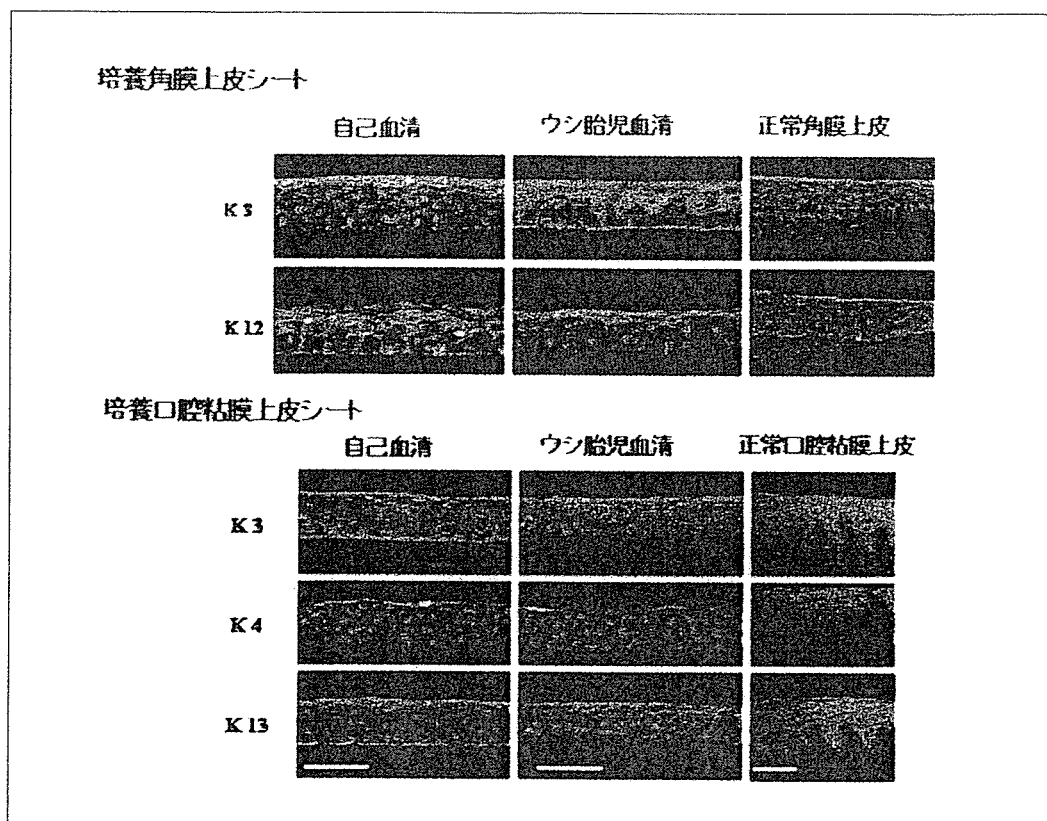
マイボグラフィ法を用いてマイボーム腺の組織破壊 (gland dropout) 程度を、健常眼 (N群), Stevens-Johnson 症候群 (SJS 群), 眼類天疱瘡 (OCP 群), 熱・化学腐食 (Th/Ch 群) で比較した。N群に比べて, SJS 群, OCP 群で有意に gland dropout の割合が高かった (それぞれ, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0742$)。

の結果より, 自己血清を用いた培養粘膜上皮シート移植術は, 従来の FBS を用いた移植法と同等の細胞生物学的特徴, 臨床効果を示し, より安全で倫理面に配慮した移植法であることがわかった (図20)。

次に培養基質の安全性にも配慮した。特に我々が使用してきた羊膜は生体材料であり, 従来から清潔操作下で扱われてはきたが, 滅菌操作が不可能であった。そこで, より安全で倫理面に配慮した生体医療材料の開発を念頭に, 滅菌, 常温保存可能なヒト羊膜を開発し, 眼表面再建の基質としての適合性を検証した⁶⁵⁾。感染症 (B・C型肝炎, HIV, 梅毒) 陰性の妊婦より予定帝王切開時に無菌的に羊膜を採取し, 羊膜上皮を処理後, 真空凍結乾燥させ, γ 線滅菌を施行した。作成した凍結乾燥羊膜の物理学的特性を力学的検査で, 細胞生物学的特性を種々の細胞外マトリックスに対する免疫染色により

検討した。さらに学内のヒトを対象とした研究審査委員会の承認後, 凍結乾燥羊膜を翼状片切除後の結膜増殖抑制を目的として鼻側強膜に移植し, その効果と生体適合性を検証した。その結果, 作成した凍結乾燥羊膜は, 溶液中では柔軟性を示し, 縫合可能であった。一点支持力, 耐破断張力試験などの力学的検査では, 従来の凍結保存羊膜と比較して統計学的に有意差はなかった。また, 種々のコラーゲンサブタイプ, ラミニンに対する免疫染色性も凍結保存羊膜と同等に認められた。翼状片切除後の強膜上に移植した結果, 凍結乾燥羊膜は眼表面で生着し, 異物反応, 炎症所見等を認めなかった⁶⁶⁾。以上のように, 我々が開発したヒト凍結乾燥羊膜は, 従来の凍結保存羊膜と同等の物理学的, 細胞生物学的特性を保持し, 眼表面での生体適合性も認められたことから, 安全な基質として広く臨床応用できると考えられた。

図20 ヒト自己血清を用いた培養粘膜上皮シートの作成



培養角膜上皮シート並びに培養口腔粘膜上皮シートをヒト血清および従来のウシ胎児血清で作成し、その細胞生物学的特徴を比較した結果、ケラチンなどの細胞骨格蛋白の発現に差はなく、ヒト自己血清を用いても安全に培養上皮シートを作成することが可能であることがわかった（文献²⁹⁾を一部改変）。

II-5 副次的な研究開発

II-5.1 培養角膜内皮シート

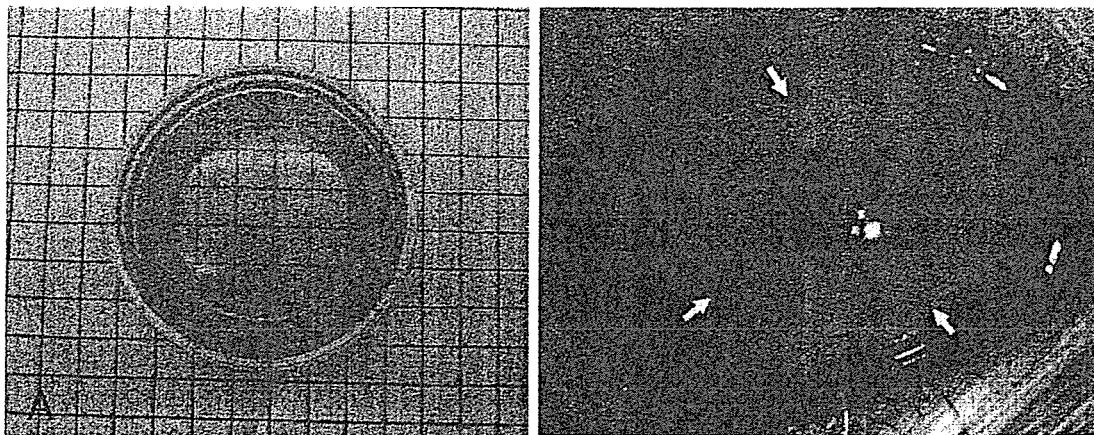
角膜内皮細胞は角膜の最内層にある一層の細胞群であり、健全な角膜においては六角形の角膜内皮細胞が $2500-3000\text{cells}/\text{mm}^2$ の密度で存在する。角膜内皮細胞はバリアー機能とポンプ機能により角膜実質内の水分含有量を一定に保ち、角膜の透明性維持に重要な役割を果たしている。角膜内皮細胞は加齢による生理的な減少以外に、外傷や疾病、あるいは内眼手術による侵襲によって急激に脱落して細胞密度が低下することがある。霊長類の角膜内皮細胞は生体内では増殖しないことが知られており、一定密度（通常は $500\text{cells}/\text{mm}^2$ 以下）に細胞密度が低下すると、角膜の透明性を維持することができなくなり、著明な角膜浮腫と混濁を生じて視力は著しく低下する。このような病態を水疱性角膜

症とよび、現在行われている唯一の治療法は角膜の上皮、実質、内皮の三層構造をすべて入れ替える全層角膜移植術である。

我々は水疱性角膜症に対する再生医学的治療法として、培養角膜内皮シート移植術の開発を行っている。これまでに、培養粘膜上皮シートの基質として用いてきた羊膜を基質として用いることにより、ヒトの角膜内皮細胞を培養してシートを作成することが可能になった。次に我々は培養ヒト角膜内皮シートを家兎眼へ移植し、培養角膜内皮シートが家兎の角膜実質に接着し角膜の透明性を維持する機能があることを確認した⁶⁷⁾。

角膜内皮の再生医学的治療法を確立する上では、動物種による角膜内皮細胞の特殊性が重要な意味を持つ。ヒトやサルなどの霊長類の角膜内皮細胞は生体内ではほとんど増殖能を持たな

図21 コラーゲンシートを基質とした培養角膜内皮シート移植の開発



A：I型コラーゲン薄膜上で4週間培養したカニクイザル角膜内皮細胞

B：カニクイザル眼への培養角膜内皮シート移植。Aのシートは動物眼への移植が可能であった。

いのに対し、家兎やマウスなどの角膜内皮細胞は生体内でも旺盛な増殖能を持つ。そのために家兎を用いた移植実験では、移植された家兎に残存する角膜内皮細胞の増殖を無視することができず、移植後長期の経過を評価することが困難である。そこで我々はヒトに近い動物であるサルを用いて培養角膜内皮シート移植のモデルを作成し、ヒトへの臨床応用を目指した研究を開始した。初めに、種々のマトリックスでコーティングしたシャーレ上でカニクイザル角膜内皮細胞を培養し、継代培養を行って角膜内皮細胞を増幅した。その結果、サル角膜内皮細胞はI型およびIV型コラーゲンでコーティングしたシャーレ上では接着、増殖させることができたことがわかった。次にそれらの培養角膜内皮細胞を羊膜やI型コラーゲンシートの基質を用いて培養し、角膜内皮細胞の機能に関連するタンパクであるZO-1および Na^+ , K^+ -ATPaseの発現を免疫染色で検討した。羊膜やI型コラーゲンシートを基質とした培養角膜内皮シートは細胞密度が $2,500\text{cells}/\text{mm}^2$ 以上でZO-1および Na^+ , K^+ -ATPaseを発現していることを確認した。この培養角膜内皮シートはカニクイザル眼に移植することが可能であり、今後培養角膜内皮シート移植後の長期経過を観察する動物モデルとして有用であると考えられる(図21)。

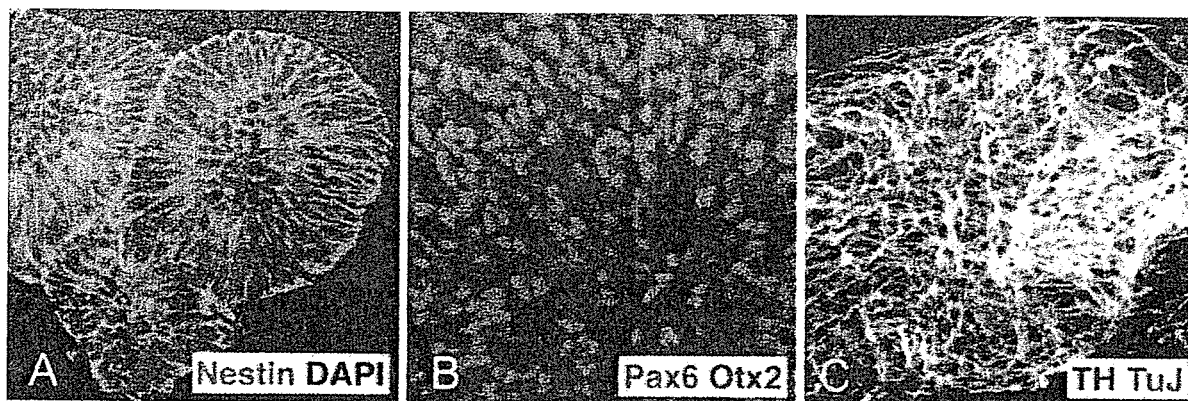
II-5.2 羊膜を用いたヒト ES 細胞からの眼組織の再生

ヒト胚性幹細胞(ES細胞: Embryonic Stem Cell)は、眼科領域の再生医療材料として有用性が高いと考えられるが、従来ヒトES細胞の培養は技術的に難しく、分化誘導も安定しないという問題があった。そこで我々は、ES細胞に対して優れた細胞培養基質である羊膜が増殖・分化支持活性を有するかどうかを検討した。

II-5.2.1 ヒト ES 細胞の入手方法、維持・継代培養方法

ヒトES細胞は京都大学再生医科学研究所より入手し、ヒトES細胞を用いた実験は全て理化学研究所神戸研究所で施行した。同研究所は「ヒトES細胞を用いた神経細胞、感覚系細胞への分化誘導と再生医療への応用のための基礎的研究」についてのヒトES細胞の使用を文部科学大臣より認可されている。ヒトES細胞の維持培養および継代培養はSuemoriらの方法⁶⁸⁾に準じて行った。羊膜の採取と保存は培養角膜上皮シートの際と同じ方法で京都府立医科大学で行い、保存羊膜を理化学研究所神戸研究所へ移送してヒトES細胞の培養基質として用いた。本共同研究は京都府立医科大学倫理委員会および理化学研究所神戸研究所倫理委員会の承認のもとに施行した。

図22 AMED 法によるヒト ES 細胞からの神経細胞の分化誘導



- A: AMED 法で培養したヒト ES 細胞の大部分は神経前駆細胞のマーカであるネスチン (緑) を発現している。青は核染色像を示している。
- B: AMED 法で処理したヒト ES 細胞は Pax6 (緑) または Otx2 (赤) のどちらかだけを発現している。
- C: クラス III β チューブリン (緑) 陽性の成熟神経細胞の多くがドーパミン作動性神経細胞のマーカであるチロシン水酸化酵素 (赤) を共発現している。

II-5.2.2 AMED 法の開発

角膜上皮幹細胞の培養に用いるのと同様の方法で、凍結保存した羊膜より上皮を除去した羊膜上皮なしの羊膜をラミニンでコーティングして培養基質として用いた。培養液は、血清の代わりに KnockOut Serum Replacement を用いた培養液で使用した。具体的には、グラスゴウ MEM 培地に KnockOut Serum Replacement, グルタミン酸, ビルビン酸, 非必須アミノ酸, 2-メルカプトエタノールを加え, ペニシリンとストレプトマイシンを添加した液で, 我々が過去に報告した ES 細胞と PA6 ストロマ細胞等のフィーダー細胞とを無血清培地で共培養することにより, ES 細胞を選択的に神経分化する培養方法である SDIA (Stromal cell Derived Inducing Activity) 法⁶⁹⁾⁷⁰⁾ で用いたものと基本的に同じ組成であった。継代培養と同じ要領で未分化ヒト ES 細胞を細胞培養ディッシュから剥がし, 細胞のコロニーを適当な大きさに砕いた後に, 細胞懸濁液をゼラチンでコーティングした細胞培養ディッシュに移して 37°C CO₂ インキュベーターで 2 時間加温した。維持培養の際に, ヒト ES 細胞と共培養しているマウス胎児線維芽細胞 (MEF: mouse embryonic fibroblast) はディッシュの底に吸着するが, ヒト ES 細胞は吸着しないため, この操作によ

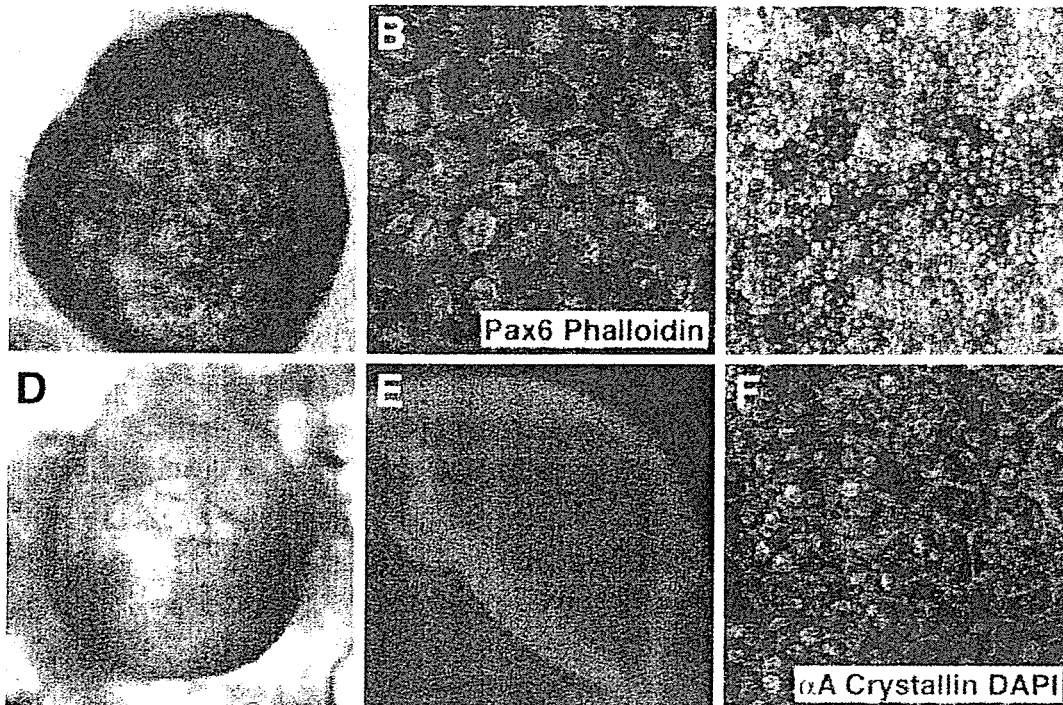
り細胞懸濁液から MEF を除去できた。このようにして回収した 5~20 細胞からなる未分化ヒト ES 細胞塊を, ラミニンコーティングした上皮なし羊膜上で無血清培地にて培養したところ, 未分化ヒト ES 細胞は羊膜に接着しコロニーを形成した。我々は, 羊膜マトリックスを培養基質としたこの培養条件を AMED (Amniotic membrane Matrix-based ES cell Differentiation) 法と名付けて, さらなる詳細な解析を行った⁹⁾。

II-5.2.3 ヒト ES 細胞からの中枢神経の分化誘導

マウス・サル ES 細胞の分化研究より, 眼組織の分化は中枢神経分化と並行して進むことが示唆されており, 例えばドーパミン作動性神経の分化誘導条件は, 網膜分化をも一部促進することが明らかになっている⁷⁰⁾。そこで, まず AMED 法によりドーパミン作動性神経細胞を産生できるかを検討した。

ヒト ES 細胞を羊膜マトリックス上で 15 日間培養した後に, 神経前駆細胞マーカであるネスチンに対する抗体で免疫染色を行ったところ, 85% の細胞が神経前駆細胞であり, これらの神経前駆細胞は神経前駆細胞に特徴的な構造であるロゼットを形成していた (図22A)。次に AMED 法によりほぼ選択的に分化誘導さ

図23 AMED 法によるヒト ES 細胞からの眼組織の分化誘導



- A : AMED 法によりヒト ES 細胞から分化誘導した色素細胞のコロニー
 B : ファロイジン染色 (赤) で上皮系細胞に特徴的な像を示し, Pax6 (緑) を発現している
 C : ヒト ES 細胞から AMED 法により分化誘導された網膜色素上皮細胞の拡大写真
 D : ヒト ES 細胞由来の水晶体様組織
 E : 水晶体様組織は水晶体細胞のマーカであるアルファ A クリスタリン (緑) を発現している
 F : E の共焦点顕微鏡写真. 赤は核染色像を示している

れた神経前駆細胞がどの領域の神経前駆細胞を主に含んでいるかを, 神経の前後軸に沿った領域特異的のマーカで検討した. AMED 法でヒト ES 細胞を 33 日間培養した後に, 前脳~中脳のマーカである Otx2 に対する抗体で免疫染色を行ったところ, 約半数の細胞が Otx2 陽性であった. さらにこれらの Otx2 陽性細胞は Pax6 を発現していなかった (図22B). マウス胚に当てはめて考えると, Otx2 陽性かつ Pax6 陰性の細胞群は中脳領域または前脳腹側領域に特異的であり, AMED 法によりヒト ES 細胞より分化誘導された神経前駆細胞もこの領域に属すると推測できた. これらの神経前駆細胞を羊膜マトリックス上でさらに長期間培養して, 培養開始後 40 日目に成熟神経細胞のマーカであるクラス III β チューブリンおよびドーパミン作動性神経細胞のマーカであるチロシン水酸化酵素に対する抗体で免疫染色を行っ

たところ, 40% の細胞が成熟神経細胞であり, その成熟神経細胞の 30% がドーパミン作動性神経細胞であった (図22C). このことは, 眼組織をヒト ES 細胞から AMED 法を用いて産生できる可能性を示唆した.

II-5.2.4 AMED 法によるヒト ES 細胞からの眼組織分化誘導

そこで我々は, AMED 法によりヒト ES 細胞から眼組織の産生が可能であるかを検討した. 特に網膜はその発生段階において前脳が突出してできた眼胞が起源であるため, 中枢神経を効率よく分化誘導する条件で産生される可能性が高いと考えた. ヒト ES 細胞を羊膜マトリックス上で無血清培地にて 28 日間培養すると, 褐色の細胞塊が出現した (図23A). その細胞は Pax6 を発現しており, さらにファロイジン染色により, 上皮系細胞に特徴的な接着帯に結合するアクチンフィラメントが描出され (図23

B), これらの細胞は網膜色素上皮細胞の特徴を模していた. この網膜色素上皮細胞塊を羊膜から剥離してコラーゲン I でコーティングした細胞培養ディッシュ上で接着させて, FBS と塩基性線維芽細胞増殖因子を添加したダルベッコ MEM 培地で長期間培養すると, 六角形の褐色細胞がディッシュ上に敷石上に広がり, まさに網膜色素上皮に特徴的な形態を示した (図 23C).

さらに AMED 法によりヒト ES 細胞を 50 日以上培養すると, 羊膜マトリックス上に光を当てると輝く水晶体様組織を認めるようになった (図 23D). これらの組織を水晶体細胞のマーカーであるアルファ A クリスタリンに対する抗体で免疫染色したところ, それらの組織塊は水晶体細胞で構成され (図 23E・F), 水晶体の特徴を備えていた.

以上のように, 羊膜は角膜上皮幹細胞と同様にヒト ES 細胞に対しても増殖支持活性を示し, ヒト ES 細胞を選択的に神経細胞へ分化誘導した. さらにこの AMED 法により, ヒト ES 細胞からドーパミン作動性神経細胞, 網膜色素上皮細胞, 水晶体細胞を産生することが可能であった. AMED 法により分化誘導された中脳領域のドーパミン作動性神経細胞は, パーキンソン病に対する移植治療のための有望な細胞ソースであり, 網膜色素上皮細胞は, 加齢黄斑変性の新生血管除去術の際に生じた網膜色素上皮欠損を補填する網膜色素上皮シートの細胞材料となりうる. またヒト ES 細胞から産生された水晶体細胞をもとに, 眼内レンズに代わる調節可能な水晶体を作成して白内障手術後に眼内に移植することが可能になるかもしれない. これら AMED 法により産生された組織は, ヒト由来の安全な生体材料である羊膜を用いてヒトの細胞から作成した細胞であるため, マウス由来の PA6 細胞と共培養することによりヒト・サル ES 細胞より同様の細胞を分化誘導する SDIA 法⁷⁰⁻⁷³⁾ に比して, マウスの細胞由来の病原体や抗原を作成した神経細胞と一緒に持ち込む可能性がゼロである. このため, ヒトへ

の細胞移植治療のための細胞ソース作成方法として極めて有望であると考えられる.

III 角膜上皮分化と幹細胞に関する検討

III-1 角膜上皮の遺伝子発現

Ocular surface は角膜上皮細胞と結膜上皮細胞の 2 種類の粘膜上皮細胞で覆われている. この両者は, 非角化重層扁平上皮細胞であり組織学的には類似しているが, 生物学的性状は大きく異なる. そこで, 我々は角膜上皮細胞と結膜上皮細胞の遺伝子発現解析を行った. 方法は屈折矯正手術の際に採取した角膜上皮細胞あるいは brush cytology で採取した結膜上皮細胞を用いて, total RNA を抽出, pUC119 ベースのベクタープライマーで二本鎖 cDNA を合成した. これを GATC の 4 塩基を認識する Mbo I 制限酵素にて消化すると同時に, GGATCC の 6 塩基を認識する BamH I 制限酵素にてベクター部分を消化し, ライゲーションにて環状化した. これをコンピテント細胞に導入してプレートに播きコロニーを形成させ, コロニーをピックしてヘルパーファージ M13K07 にて一本鎖プラスミドをレスキューした. これを鋳型として PCR を行い, さらにこれをシーケンス反応の鋳型として cDNA の配列を調べた (図 24). 得られた cDNA 配列集団からジャンク配列, ミトコンドリア DNA 等を除外し, 最終的にクラスタリングと Genbank への照合を行い, 遺伝子同定を行った²⁾ (図 25). 角膜上皮サンプルから最終的に有効データとなった 2,793 配列のうちもっとも出現頻度の高かったものは clusterin で, 脂質輸送, 粘膜保護に関するものであった. 免疫組織染色を行ったところ, この遺伝子産物は角膜上皮の最表層に発現していることがわかった⁷⁴⁾. 出現頻度が 2 番目のものはケラチン 12 であり, ボディマッププロジェクトで解析した他の臓器・細胞では全く出現しておらず, 角膜上皮細胞特異性が極めて高いことが示された. 出現順位が 8 番目の beta ig-h3 は, 格子状角膜変性症 type I と type III a, 顆粒状角膜変性症, アベリノ角膜変性症,