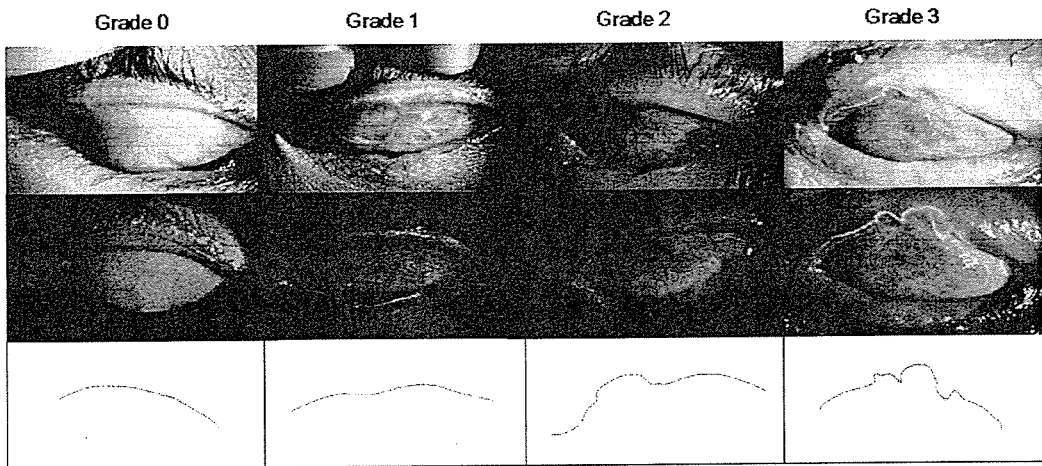


A new way to grade ocular manifestations in Stevens-Johnson syndrome

(C. Sotozono et.al., Figure 2)



(C. Sotozono et.al.,Figure 4)

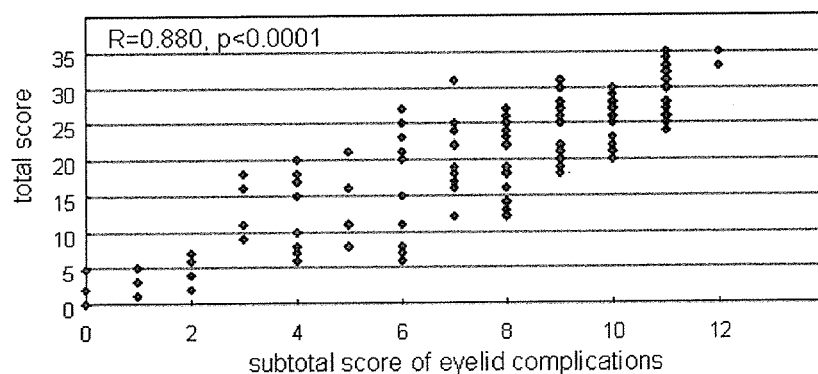
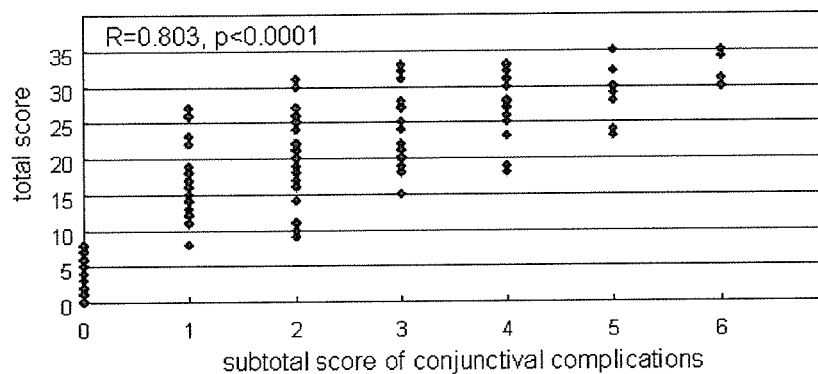
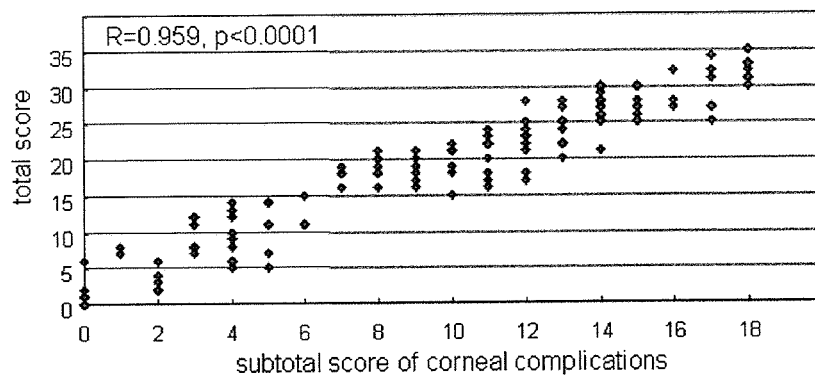


Figure Legends

Figure 1. Grading scores of corneal and conjunctival complications

Figure 2. Grading scores of mucocutaneous junction involvement

A score of grade 1 was assigned for normal mucocutaneous junction, and grades 1, 2, and 3 for mild-, moderate-, and severe irregularity of the mucocutaneous junction, respectively (upper). Fluorescein staining of the conjunctiva was helpful to evaluate the severity of the involvement of mucocutaneous junction (middle and lower).

Figure 3. Correlation between the total score and logMAR visual acuity

The overall total score of 13 components (0-39) versus logMAR showed a significant positive correlation (Spearman, $R=0.806$, $P<0.0001$).

Figure 4. Correlations between subtotal score of 3 categories and overall total score

Subtotal scores of corneal, conjunctival, and eyelid complications versus the total score all showed a significant positive correlation (Spearman, $R=0.959$, $P<0.0001$, $R=0.803$, $P<0.0001$, $R=0.880$, $P<0.0001$, respectively).

REFERENCES

1. Howard GM. The Stevens-Johnson syndrome. Ocular prognosis and treatment. *Am J Ophthalmol* 1963;55:893-900.
2. Arstikaitis MJ. Ocular aftermath of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 1973;90:376-9.
3. Wright P, Collin JR. The ocular complications of erythema multiforme (Stevens Johnson syndrome) and their management. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1983;103 (Pt 3):338-41.
4. Lehman SS. Long-term ocular complication of Stevens-Johnson syndrome. *Clin Pediatr (Phila)* 1999;38:425-7.
5. Auquier-Dunant A, Mockenhaupt M, Naldi L, et al. Correlations between clinical patterns and causes of erythema multiforme majus, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis: results of an international prospective study. *Arch Dermatol* 2002;138:1019-24.
6. Roujeau JC. Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis are severity variants of the same disease which differs from erythema multiforme. *J Dermatol* 1997;24:726-9.
7. Assier H, Bastuji-Garin S, Revuz J, Roujeau JC. Erythema multiforme with mucous membrane involvement and Stevens-Johnson syndrome are clinically different disorders with distinct causes. *Arch Dermatol* 1995;131:539-43.
8. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989;96:709-22; discussion 22-3.
9. Thoft RA. Keratoepithelioplasty. *Am J Ophthalmol* 1984;97:1-6.
10. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, et al. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998;116:431-41.
11. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001;108:1569-74.
12. Miyata K, Amano S, Sawa M, Nishida T. A novel grading method for superficial punctate keratopathy magnitude and its correlation with corneal epithelial permeability. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1537-9.
13. Nelson JD, Wright JC. Conjunctival goblet cell densities in ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 1984;102:1049-51.
14. Ohji M, Ohmi G, Kiritoshi A, Kinoshita S. Goblet cell density in thermal and chemical injuries. *Arch Ophthalmol* 1987;105:1686-8.
15. Rogers M, Rogers PA. Ocular involvement in the Stevens-Johnson syndrome. *Australas J Dermatol* 1981;22:89-90.
16. Wilkins J, Morrison L, White CR, Jr. Oculocutaneous manifestations of the erythema multiforme/Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis spectrum. *Dermatol Clin* 1992;10:571-82.
17. Bastuji-Garin S, Rzany B, Stern RS, et al. Clinical classification of cases of toxic epidermal necrolysis, Stevens-Johnson syndrome, and erythema multiforme. *Arch Dermatol* 1993;129:92-6.
18. Cote B, Wechsler J, Bastuji-Garin S, et al. Clinicopathologic correlation in erythema multiforme and Stevens-Johnson syndrome. *Arch Dermatol* 1995;131:1268-72.

19. Power WJ, Saidman SL, Zhang DS, et al. HLA typing in patients with ocular manifestations of Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 1996;103:1406-9.
20. Rzany B, Hering O, Mockenhaupt M, et al. Histopathological and epidemiological characteristics of patients with erythema exudativum multiforme major, Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Br J Dermatol* 1996;135:6-11.
21. Paquet P, Pierard GE. Erythema multiforme and toxic epidermal necrolysis: a comparative study. *Am J Dermatopathol* 1997;19:127-32.
22. Leaute-Labreze C, Lamireau T, Chawki D, et al. Diagnosis, classification, and management of erythema multiforme and Stevens-Johnson syndrome. *Arch Dis Child* 2000;83:347-52.
23. Roujeau JC, Kelly JP, Naldi L, et al. Medication use and the risk of Stevens-Johnson syndrome or toxic epidermal necrolysis. *N Engl J Med* 1995;333:1600-7.
24. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996;122:38-52.

最新医学・第62巻・第1号（2007年1月号 別刷）

特報 第43回ベルツ賞受賞論文

1等賞

再生医学による重症角膜疾患の
新規治療法開発への戦略的研究

木下 茂	外園千恵	稲富 勉
中村隆宏	小泉範子	川崎 諭
上田真由美	横井則彦	上野盛夫
笹井芳樹		

最新医学社

特 報

第 43 回
2006年度

ベルツ賞受賞論文

1 等賞

再生医学による重症角膜疾患の
新規治療法開発への戦略的研究

木下 茂****¹ 外園千恵**¹ 稲富 勉**¹
 中村隆宏*² 小泉範子**² 川崎 諭*¹
 上田真由美*¹ 横井則彦***¹ 上野盛夫*^{1,3}
 笹井芳樹**³

Summary

The cornea is the transparent, main optical element of the eye that focuses light onto the retina, and its surface is covered by a non-keratinized, stratified epithelium that serves to protect the corneal interior from ingress by external agents. It is believed that corneal epithelial stem cells exist in the basal cell layer of the limbal region, the transitional zone between the cornea and conjunctiva on the ocular surface, and that the complete loss of corneal epithelial stem cells results in corneal scarring with vascularization which severely affects visual function. This devastating diseased state is known as corneal epithelial stem cell deficiency, the treatment of which has remained unsuccessful worldwide until recently. In efforts to solve this problem, our extensive research has focused on the development of basic understanding and novel therapeutic modalities for corneal epithelial stem cell deficiency, obtaining success in treating these corneas by regenerative medicine. Clearly, ocular surface reconstruction by tissue engineering using somatic stem cells will prove to be the next generation of therapeutic modalities.

Thus, we first investigated the transplantation of cultivated human corneal epithelial stem cells on amniotic membrane for treating corneal epithelial stem cell deficiency. The cultivated sheets were created by co-culture with 3T3 fibroblast, air-lifting, and corneal epithelial stem cell culture on amniotic membrane. These cultivated cells demonstrated the presence of keratin 3 and 12 specific to *in vivo* corneal epithelium, tight junction related proteins, and a reasonable amount of proliferative activity. Trans-

*¹ 京都府立医科大学 視覚機能再生外科学 **¹ 同 講師 ***¹ 同 助教授 ****¹ 同 教授*² 同志社大学研究開発推進機構 再生医療研究センター 講師 **² 同 助教授*³ 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター **³ グループディレクター

plantation of cultivated autologous corneal epithelial stem cell sheets in 5 unilaterally affected patients was completely successful in all cases. Cultivated allogenic corneal epithelial sheets in 36 bilaterally affected patients also survived on the corneal surface in all cases, proving quite effective in achieving ocular surface stability. A few cases, however, developed immunological rejection, opportunistic infection, etc.

Second, and in order to solve the above-mentioned problem, we established a system for the transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial sheets. The histology of the *in vitro* oral mucosal epithelial sheets was similar to that of *in vivo* corneal epithelial sheets. Moreover, the cultivated oral mucosal epithelial sheets expressed positive for keratin 3. Since the transplantation of these sheets survived on the ocular surface and resulted in the recovery of corneal transparency, cultivated autologous oral mucosal epithelium may become a viable substitute for diseased corneal epithelium. In fact, the outcome of our clinical trials involving 45 eyes who received this type of surgery has been a resounding success. Our cultivating system, which uses amniotic membrane as a unique substrate, has proven to be successful for other purposes as well. For example, human retinal pigment epithelial cells and lenses can now be created from human ES cells on amniotic membrane, and it is also possible to produce transplantable human corneal endothelial sheets.

Third, our basic research regarding the ocular surface has successfully produced a wealth of new information. From the biological aspects, we recently showed several unique findings; one being the discovery of a cluster of ectopically-residing, self-maintaining corneal epithelial stem cells in the conjunctiva of healthy human eyes. We also discovered that the high level of thrombospondin-1 is present only just below the corneal epithelium; its unique distribution possibly related to corneal avascularity and integrity. Moreover, and from the aspects of innate immunity, we found that the ocular surface epithelium, both corneal and conjunctival, possess the toll-like receptors (TLRs) 1-10. However, the innate immune response of those TLRs is distinct from that of immune-competent cells, and we suggested that this is indicative of the symbiotic relationship between ocular surface epithelium and microbes inhabiting the ocular surface. In addition, we recently proved the presence of the protein $I\kappa B\zeta$ in ocular surface epithelium, and its existence there may possibly modulate the innate immune response.

As a result of our diligent research in the field of regenerative medicine, both past and present, we have made enormous progress in the basic understanding and development of new therapeutic modalities such as the transplantation of cultivated mucosal epithelial stem cell sheets. We firmly believe that our efforts will lead to the cure of all devastating ocular surface disease in the near future.

目 次

I	緒言
I-1	感覚器研究における本研究の位置づけと意義
I-2	Ocular surface 研究の進捗状況：再生医学から粘膜免疫学そして臨床医学へ
II	角膜の再生医学
II-1	歴史的背景
II-2	培養角膜上皮シートの研究開発
II-2.1	角膜上皮シート作成法の検討
II-2.2	自家移植の臨床成績
II-2.3	同種移植の免疫学的研究
II-2.4	同種移植の臨床成績
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
II-3.2	培養口腔粘膜上皮シート作成法の検討
II-3.3	光学的改善を目的とした臨床成績
II-3.4	結膜嚢形成を目的とした臨床成績
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
II-4.2	眼粘膜免疫の理解
II-4.3	涙液の評価と改善対策
II-4.4	臨床試験へむけた安全対策
II-5	副次的な研究開発
II-5.1	培養角膜内皮シート
II-5.2	羊膜を用いたヒト ES 細胞からの眼組織の再生
II-5.2.1	ヒト ES 細胞の入手方法，維持・継代培養方法
II-5.2.2	AMED 法の開発
II-5.2.3	ヒト ES 細胞からの中枢神経の分化誘導
II-5.2.4	AMED 法によるヒト ES 細胞からの眼組織分化誘導
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
III-2	角膜上皮幹細胞
III-3	結膜における異所性角膜幹細胞

III-4	角膜無血管性に係わる因子
IV	眼粘膜免疫に関する検討
IV-1	眼粘膜における自然免疫
IV-1.1	Ocular surface の非特異的感染防御機構ならびに常在細菌の存在
IV-1.2	Ocular surface 上皮の自然免疫と TLRs
IV-2	重症薬疹：Stevens-Johnson 症候群に対する取り組み
IV-2.1	臨床的解析
IV-2.2	自然免疫異常
V	結び
VI	引用文献

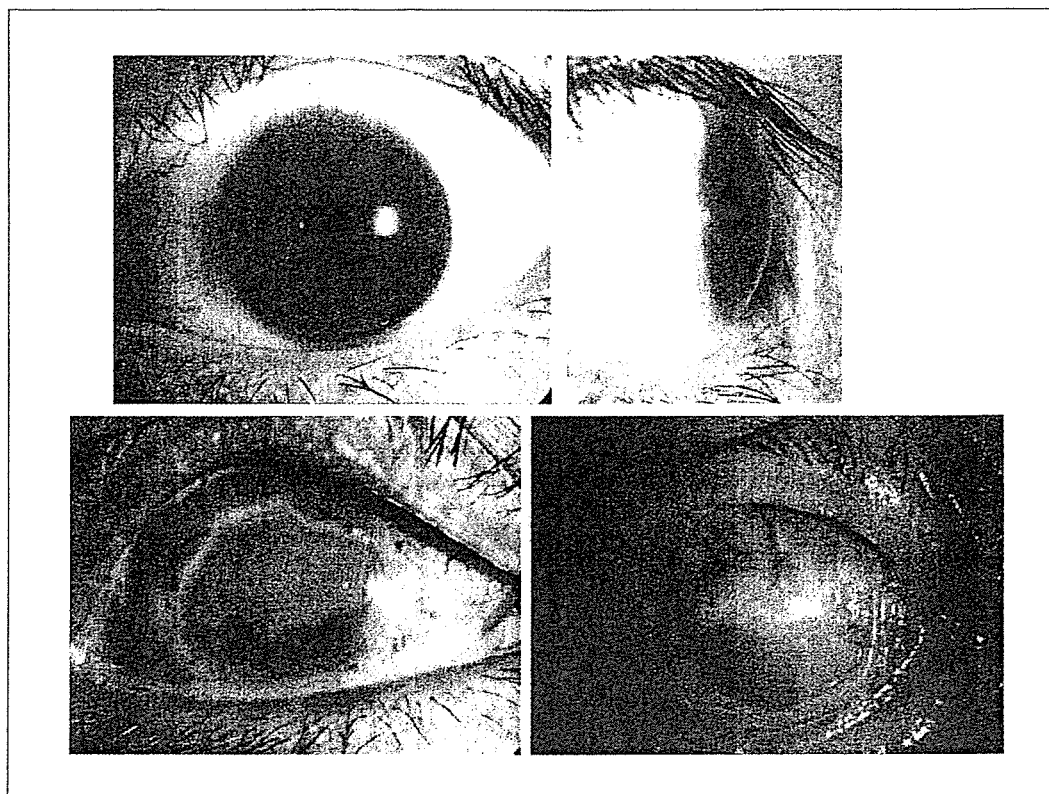
I 緒 言

I-1 感覚器研究における本研究の位置づけと意義

感覚器のなかで，視器である「眼」は，極めて特殊に分化した臓器であり，ヒトではおよそ 400nm から 800nm までの可視光を視細胞に集光させ，その刺激を大脳で視覚情報処理することで，我々は「見る」ことができている。「眼」がこのような役割を果たすためには，大きく二つの生物学的な機能が担保されている必要がある。その一つは網膜に光が到達するように角膜，水晶体，硝子体が透明性を保つことである。今ひとつは，網膜視細胞が光に反応し，視覚情報が脳に伝達することである。

我々の研究は，前者の眼組織の透明性，特に角膜の透明性，に関わるものであり，臨床現場と密接に結びついたものである。その骨子を要約すると以下のようなになる。角膜が透明性を保つためには，表皮外胚葉から発生し，角膜表面を覆う，特殊に分化した粘膜上皮である角膜上皮細胞が正常に機能することが必須であるが，さまざまな疾病によりこのことが障害される。特に，角膜上皮幹細胞が障害された場合には角膜の透明性は極度に傷害され，失明状態になる(図 1)。そこで，角膜上皮幹細胞を生物学的に理解し，再生医学的アプローチにより角膜上皮幹細胞疲弊症に角膜上皮幹細胞群あるいは類似

図1 正常角膜と重症角膜疾患



A : 正面および側面からみた正常角膜, B : 重症化学外傷の急性期における遷延性上皮欠損, C : Stevens-Johnson 症候群慢性期の角膜混濁

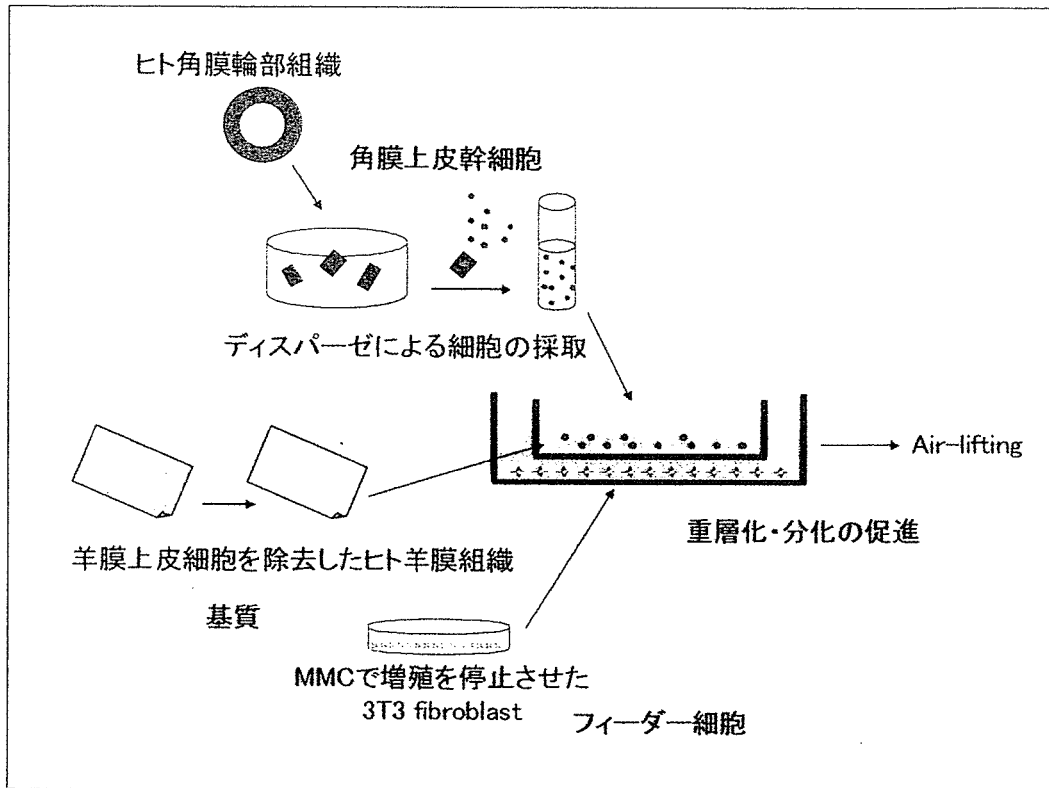
の細胞群を移植し治療しようとする研究開発を試みた。さらに、角膜上皮細胞は単に生物学的に眼表面 (ocular surface) に位置するだけではなく、眼粘膜自然免疫とも深く関係している。このため、さまざまな疾病における眼粘膜自然免疫を基礎的に理解し、角膜をターゲットにした再生医療の治療成績をさらに向上させるための研究を行った。我々の研究は、国際的にも高く評価されており、文部科学省、厚生労働省からも数多くの研究補助を得てきたトランスレーショナルな研究プロジェクトである。臨床現場においても、今まで治療不可能と考えられてきた ocular surface 疾患である角膜化学腐食、眼類天疱瘡、Stevens-Johnson 症候群などの患者に視力回復という福音をもたらしつつある。

I-2 Ocular surface 研究の進捗状況：再生医学から粘膜免疫学そして臨床医学へ
Ocular surface の重症疾患は、さまざまな薬

物療法による保存的治療あるいはいわゆる角膜移植のような外科的治療でも対応しがたく、臨床現場では永らく放置されてきたというのが現実である。このような状況で、治療法の糸口を見出すためには、角膜上皮細胞の分子細胞生物学的特徴を基礎的に理解し、新規治療方法を考案、開発することが必須であった。このため、我々は 1990 年代にはヒトゲノムプロジェクトの一環としてボディマッププロジェクトを行い、ocular surface のヒト角膜上皮細胞とヒト結膜上皮細胞の遺伝子発現プロファイルを明らかにし¹⁾²⁾、両者の遺伝子発現パターンの相違などの情報を蓄積してきた。また、角膜上皮幹細胞に関する基礎的データを蓄積してきた³⁾。さらに、角膜上皮細胞が光暴露と高酸素暴露にもかかわらず、酸化ストレスを消去する機構などにも興味を持って研究してきた。

今回の主題となる角膜再生医学には、1990 年代後半から着手した。すなわち、前述の基礎

図2 羊膜を基質とした培養ヒト角膜上皮シートの作成



的情報を基にして、角膜上皮幹細胞と羊膜を用いて同種 (allo) 培養角膜上皮シートを作成することに成功し (図2), 1999年, 京都府立医大倫理委員会の承認のもとに, プロトタイプとも言うべき培養角膜上皮シートの移植臨床試験を開始した⁴⁾⁵⁾。その後, さまざまな試行錯誤とさらなる研究開発を経て, 臨床医学へ応用できる信頼度の高いシステムを構築した。

2001年には, 本来の再生医学的アプローチともいうべき自家口腔粘膜上皮細胞による自家 (auto) 培養口腔粘膜上皮シート作成に成功し⁶⁾, このシートを用いた移植により, 角膜再生医療への新たな糸口を見出した⁶⁻⁸⁾。現在までに, 培養角膜上皮シート移植 (auto と allo を含む) を41例44眼, 培養口腔粘膜上皮シート移植を42例45眼に施行している。さらに, ocular surface の粘膜免疫, 特に上皮細胞における Toll like receptors (TLRs) を介した自然免疫の理解は ocular surface 重症疾患の病態把握と治療に必須のものであり, 基礎研究を行っている。さらに, 本研究の副次的項目ではあるが,

関連領域で非常に大きな研究成果も得ている。例えば, 角膜上皮シート作成のための羊膜を用いた培養系から発した系で, ヒト ES 細胞から眼組織細胞の分化誘導に成功している⁹⁾。これらの研究成果は, 我々の再生医学トランスレショナル研究がもたらしたものであり, 基礎から臨床への橋渡し研究の重要性を示すものである。我々の研究が, 再生医学の一研究分野をリードするものと確信している。

II 角膜の再生医学

II-1 歴史的背景

我々の初期の動物実験から, 角膜輪部上皮が角膜上皮創傷治療に極めて重要な働きをすることが分かり¹⁰⁾¹¹⁾, その後 Sun らの研究グループが, 1986年, マウス輪部上皮基底細胞にケラチン3が発現していないこと¹²⁾, さらに, 1989年, slow cycling な細胞が同部位に存在することから角膜上皮幹細胞が輪部上皮基底細胞に存在する可能性を提唱した¹³⁾。一方 Tseng らが, 1995年, 羊膜 (胎盤の一部) の移植が結膜下

線維芽細胞の増殖抑制に効果を示すことを報告し¹⁴⁾, ocular surface 再建に新たな時代が訪れた。1997年, Pellegriniらは, 培養角膜上皮シート作成の成功と2例の臨床例を報告し¹⁵⁾, これが角膜再生医療の幕開けとなった。当時, 我々のグループも似かよった研究を行っていたが, この時点では一歩先を越された形となった。培養角膜上皮シート作成の研究は1980年代から行われていたが, 成功例はこの1997年のPellegriniの報告が始めてであった。

II-2 培養角膜上皮シートの研究開発

II-2.1 角膜上皮シート作成法の検討

ヒト角膜上皮は, 約50 μ mの厚さの特異に分化した非角化重層扁平上皮であり, 光学的に均一で透明な表面を形成し, 微生物や涙液蛋白の角膜内への侵入を防御する生物学的バリアーである。このように外界からのストレスに暴露されるocular surfaceに生着しうる角膜上皮シートを培養条件下で作成するためには, *in vivo*の角膜上皮細胞に類似した細胞層を*in vitro*で作成することが必要である。また, 移植時にハンドリングの容易な培養上皮シートの作成が必須である。過去には, I型およびIV型コラーゲンシートや角膜実質を基質とした培養角膜上皮シートの作成が試みられたが, 眼表面に生着する培養上皮シートの作成は困難であった。

そこで我々は, 角膜輪部上皮から角膜上皮幹細胞を採取し, 羊膜を基質として培養条件を調整し, 培養角膜上皮シート作成法の研究開発に入った。我々の目指した培養上皮シートの性状は, 基底細胞層において正常な細胞増殖と羊膜との強固な接着構造を持つこと, そして最表層細胞において強固なタイトジャンクションを構築していることであった。

羊膜は, 京都府立医科大学倫理委員会で承認された方法に従って採取し, 研究に使用した。感染症がなく合併症のない帝王切開予定の妊婦から文書による同意を得た後に, 帝王切開時に羊膜を無菌的に採取し, 洗浄した後に-80°C

で凍結保存した¹⁶⁾。ヒト羊膜はIV型およびV型コラーゲンからなる基底膜とその上を覆う1層の羊膜上皮細胞から構成される¹⁷⁾。我々は家兎の角膜上皮幹細胞を含む組織(limbal explant)を採取し, 羊膜上皮細胞の付着したヒト羊膜(上皮あり羊膜)と, 羊膜上皮細胞を0.02% EDTAで処理したのちに機械的に搔爬したヒト羊膜(上皮なし羊膜)を基質として比較検討した。その結果, 培養において上皮あり羊膜では角膜輪部上皮細胞の伸展, 増殖が羊膜上皮細胞によって著しく阻害される一方, 上皮なし羊膜では羊膜のコラーゲン基質の上を速やかに角膜輪部上皮細胞が伸展することが明らかとなった¹⁸⁾。さらに長期の培養にあたっては, 3T3 fibroblastとの共培養と, コンフルエント後の培養に培養細胞の表面を空気に接触させるair-lifting技術を用いることにより, *in vivo*の角膜上皮細胞に類似した, 重層化して形態的に分化した上皮細胞シートを作成することが可能であることがわかった。また上述の explant法によって作成した羊膜上培養角膜上皮幹細胞シートを家兎眼に移植し, 移植後の眼表面で生着することを確認した¹⁶⁾。

次に, 我々は, 家兎眼で確立した角膜上皮幹細胞培養法を応用して, Northwest Lion Eye Bank (Seattle, WA, USA)から研究目的に使用する許可を得たヒト強角膜組織から採取した角膜上皮幹細胞の培養を行った。角膜上皮幹細胞を含む培養角膜上皮シートを作成するために, ディスパーゼを用いた酵素処理により角膜上皮幹細胞を分化した角膜上皮細胞とともに細胞懸濁液(cell-suspension)として回収し, 上皮なしの羊膜上で培養するcell-suspension法による培養角膜上皮幹細胞シート作成法の有用性を検討した¹⁹⁾²⁰⁾。4週間培養して作成した培養角膜上皮幹細胞シートの性質を確認するために, *in vivo*のヒト角膜上皮細胞に特異的に発現している細胞骨格タンパクであるケラチン3およびケラチン12の発現を免疫染色で確認した。また電子顕微鏡による細胞の微細構造ならびに細胞間接着の形成を検討した。その結果,

上皮なし羊膜の上で上述のような方法で培養したヒト角膜上皮幹細胞は、表層では4-5層に重層化してケラチン3およびケラチン12を発現しており、角膜上皮細胞として分化していることが明らかとなった¹⁹⁾。また角膜上皮細胞間にはデスモゾームを、基底部の上皮細胞と羊膜基質の間にはヘミデスモゾームを形成しており、さらに、最表層細胞はタイトジャンクションを形成してバリアー機能を獲得していることが電子顕微鏡による観察により確認された²⁰⁾。重症 ocular surface 疾患では、眼瞼の異常や睫毛乱生、重症ドライアイを合併することが多く、このように優れた細胞間接着構造が発達し、バリアー機能を獲得していることは、術後の眼表面で移植した培養角膜上皮細胞が定着するために必要不可欠な要素であると考えられた。なお、基底細胞に十分な増殖能力が保持されていることは言及するまでもないことであった。

II-2.2 自家移植の臨床成績

動物およびヒトレベルで培養角膜上皮幹細胞シート作成法を確立した後、1999年より学内倫理委員会の承認を得て、培養角膜上皮幹細胞シート移植の臨床応用を開始した。臨床試験を施行するにあたり、全症例において十分なインフォームド Consent のもとに口頭および文書で同意を取得し、手術を施行した。

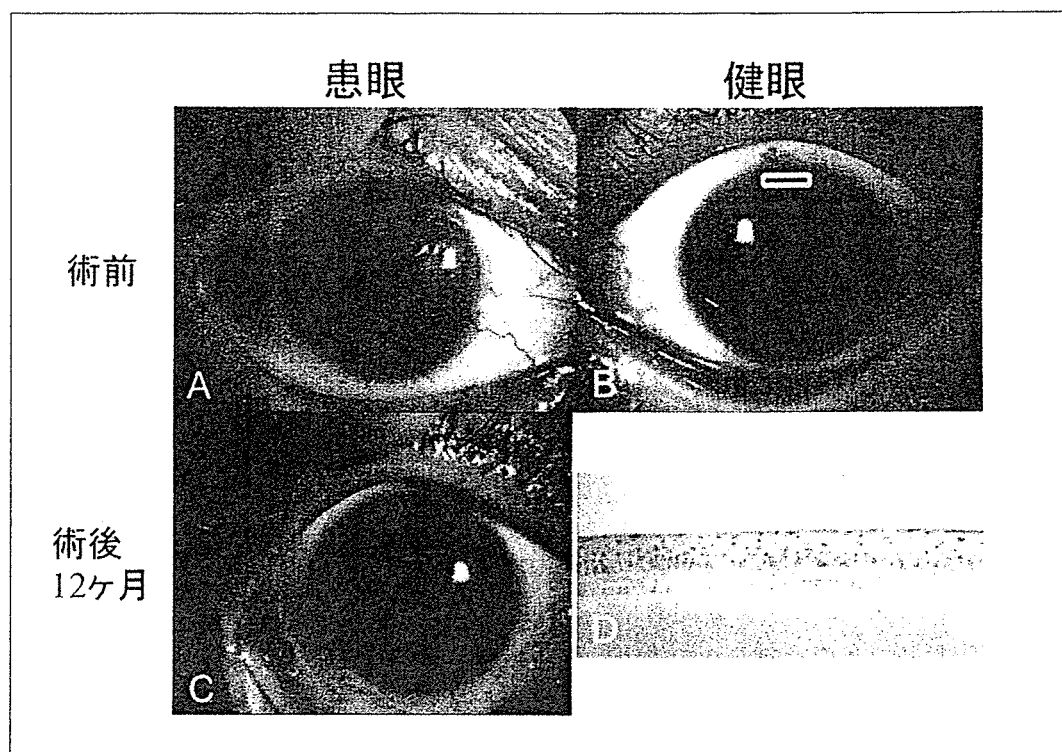
まず、片眼性の重症 ocular surface 疾患に対して、健眼より少量(1×4mm)の角膜上皮幹細胞が含まれる角膜輪部組織を採取した。直ちに上皮を除去した羊膜基質上に培養した。Air-lifting法を併用して2週間で培養角膜上皮幹細胞シートを作成し、自家移植を行った²¹⁾。対象症例は計5例5眼。熱・化学腐食例2例、放射線角膜炎1例、特発性2例であった。典型的な手術方法は以下のとおりである。まず輪部より約3mm外方で全周性に結膜を切開し、角膜表面および角膜周囲を覆う瘢痕性結膜組織を除去した。結膜下結合組織を可能な限り切除したのち、結膜下に0.04%マイトマイシンC(MMC)に浸したスポンジを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。つぎに培養角膜上皮幹細胞シートをカルチャーインサートから切り出し、これを角膜輪部付近に10-0ナイロン糸で縫着した。羊膜と角膜実質間の血液貯留を防ぐためにドレーナージ用小切開をシート周辺部の4箇所につき、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。コンタクトレンズは定期的に交換しながら連続装用を継続的に行った。術後の投薬としては、局所ではオフロキサシン、0.1%デキサメタゾンの点眼を行い、全身的には消炎を目的としてベタメタゾン内服(1-2mg/日)を術後1ヶ月間投与した。全例において、移植48時間後に培養上皮が角膜表面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って確認した。術後の経過観察中、感染症等の重篤な合併症はなく、術後4年経過した最長期間観察例でも、眼表面は引き続き自己の培養角膜上皮シートで恒常性が維持されており、良好な視力が維持されていることがわかった。以上のことより、再生医学的手法を用いた自家培養角膜上皮幹細胞シート移植は、極めて安全で有効な外科的再建法であることがわかった(図3)。

II-2.3 同種移植の免疫学的研究

片眼性疾患には前述の方法を用いることができるが、両眼性疾患あるいは急性期の疾患にはallo培養角膜上皮幹細胞シート移植を選択せざるを得ないことは納得できることである。このallo培養角膜上皮幹細胞シートの使用は生物学的には問題ないが、免疫学的には問題を生じる可能性がある。すなわち、allo培養角膜上皮幹細胞シート移植では、拒絶反応を回避することが角膜上皮幹細胞を温存する唯一の方法であり、手術の成否を決定する。そこで、マウス角膜上皮移植モデルを用いて検討したところ、マウスモデルにおけるallo角膜上皮幹細胞移植は、心臓移植などとほぼ同時期に拒絶され、その拒絶日数は移植後約10日であった。このように免疫寛容が存在しないallo角膜上皮幹細胞移

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²⁹⁾。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。

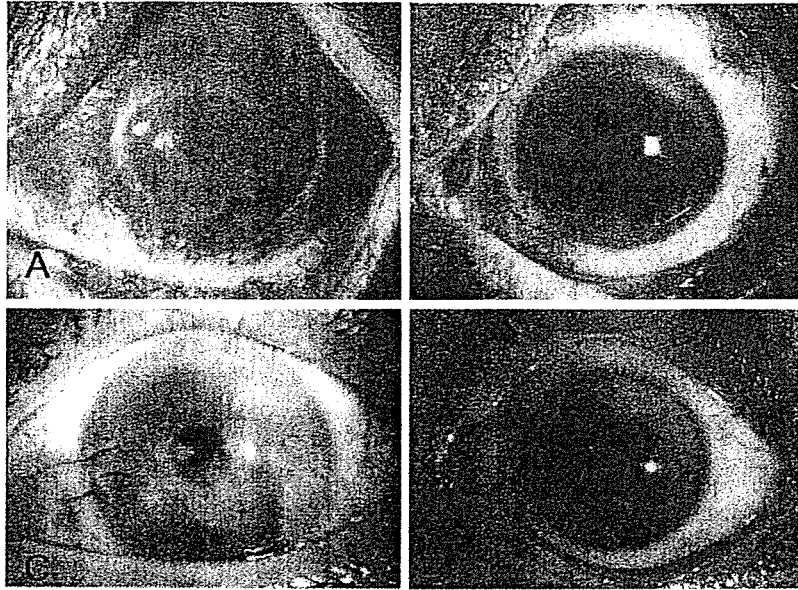
Stevens-Johnson 症候群、熱・化学腐食、眼類天疱瘡に生じる遷延性上皮欠損は、角膜融解から角膜穿孔、あるいは角膜感染症といった重篤な状態に至りやすく、臨床的には非常に危険

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。

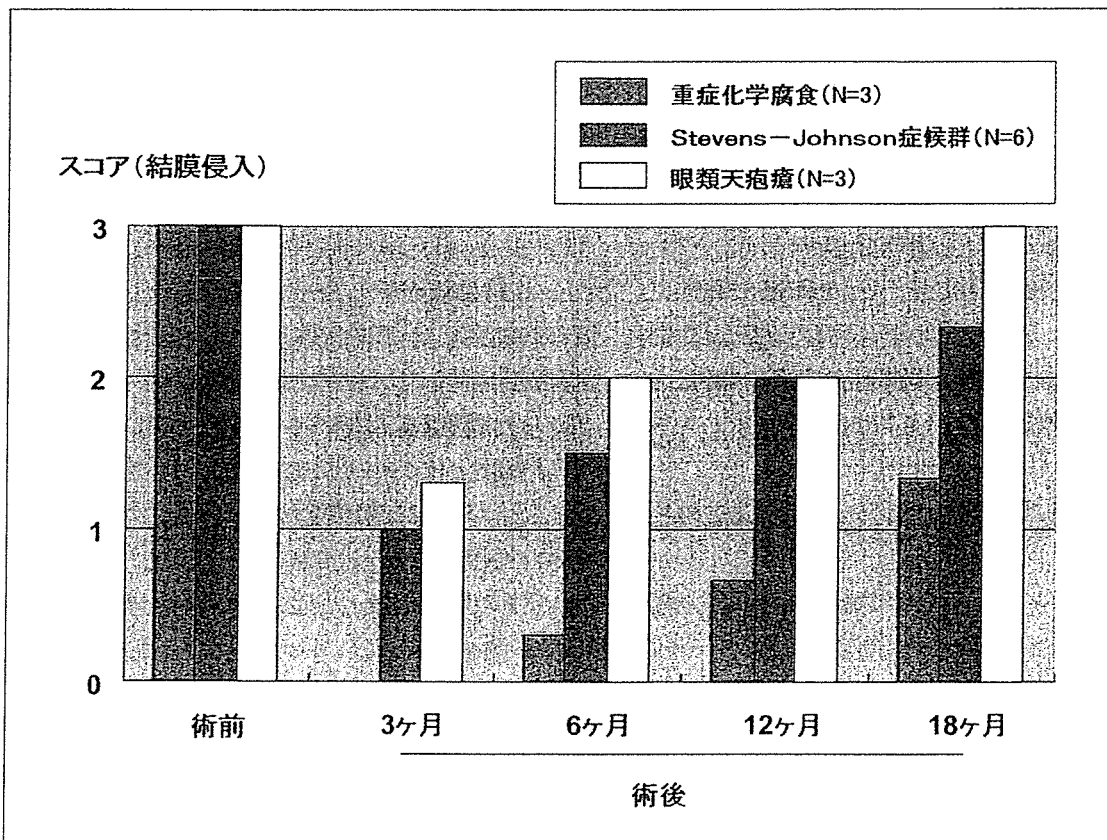
術後合併症としては、術後経過観察中に、明らかな拒絶反応を 4 眼(10%)に²⁵⁾、軽度の角膜感染症を 6 眼(15%)に認めた。このうち 5 例は慢性期 Stevens-Johnson 症候群患者であり、全例で MRSA または MRSE を検出した。ステロイド緑内障を 3 眼(8%)に生じ、2 眼で緑内障手術を施行した。

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

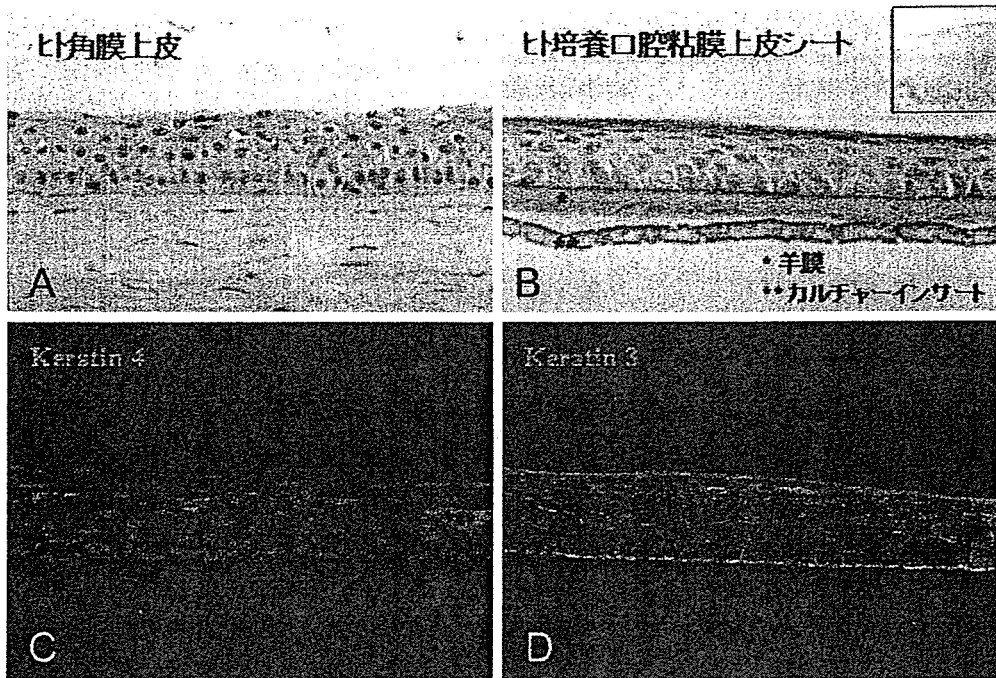
前述のように、auto 培養角膜上皮幹細胞シート移植は極めて有用であるが、多くの重症 ocular surface 疾患は両眼性であり、allo 培養角膜上皮シートを選択せねばならない。しかし、allo 上皮シート移植は、免疫抑制薬の長期使用などの問題点を抱えている。再生医学の考え方からしても自家細胞を利用して組織や臓器を再建することが理想である。そこで、我々は、角膜上皮の代用となりえる粘膜上皮を検討し、そのなかから口腔粘膜上皮細胞を選択した。その理由は、採取が容易なこと、元の組織に負担を与えないこと、そして *in vivo* 口腔粘膜上皮細胞がケラチン3を発現し角膜上皮細胞に類似することな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モ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モ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、粘膜の特徴も持ちながら、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⁸⁾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⁶⁾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