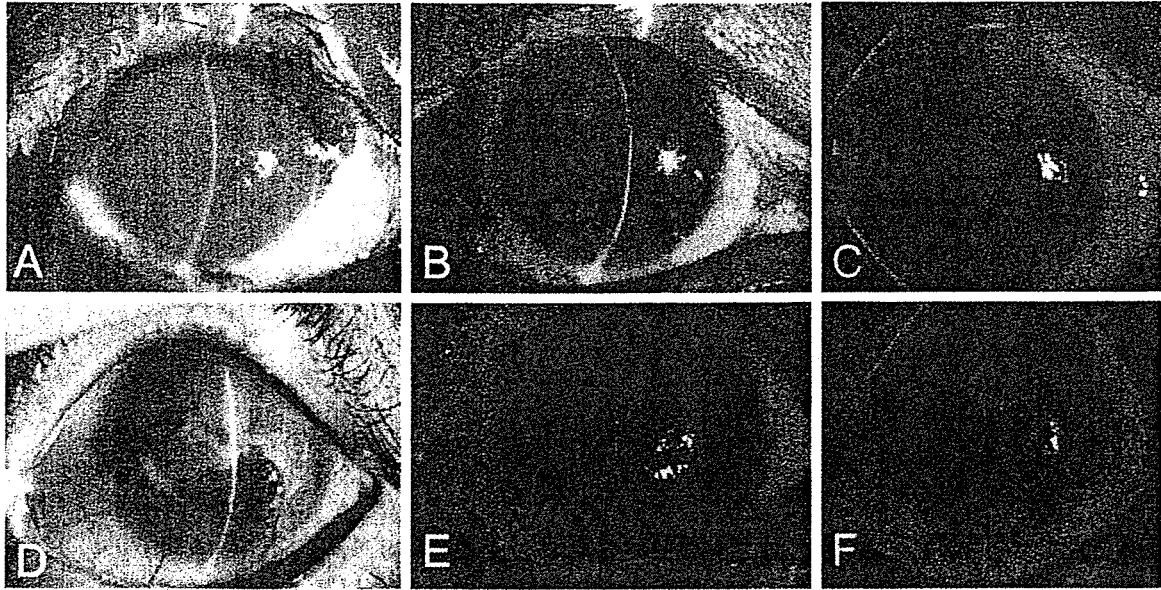


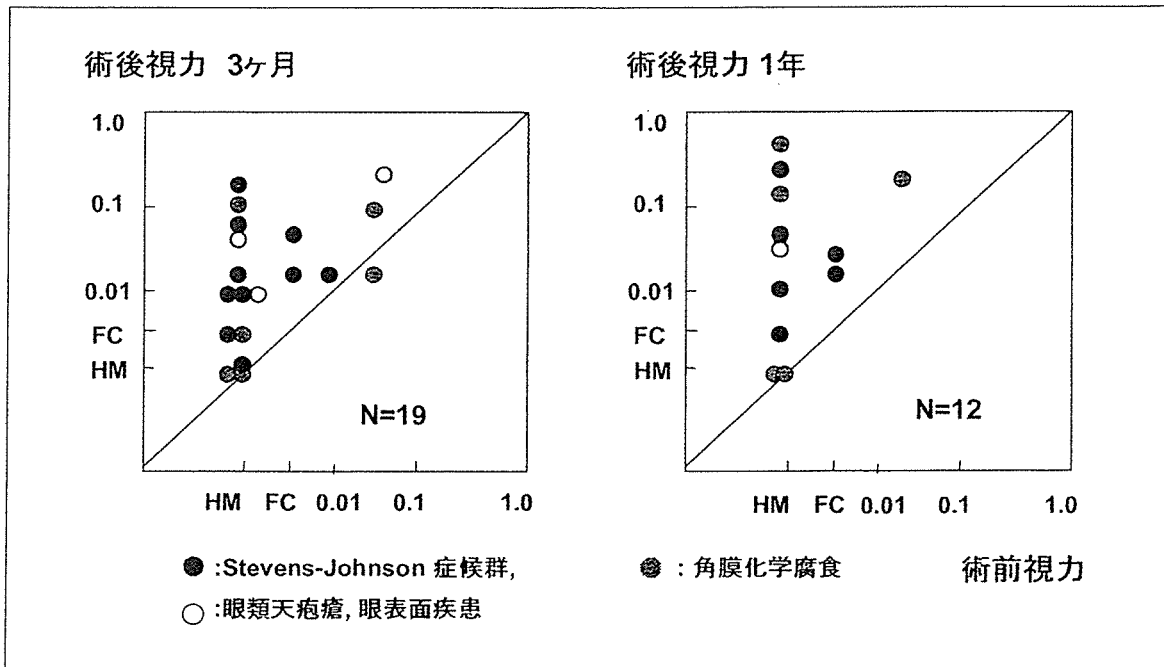
図9 自家培養口腔粘膜上皮シート移植の代表的症例



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



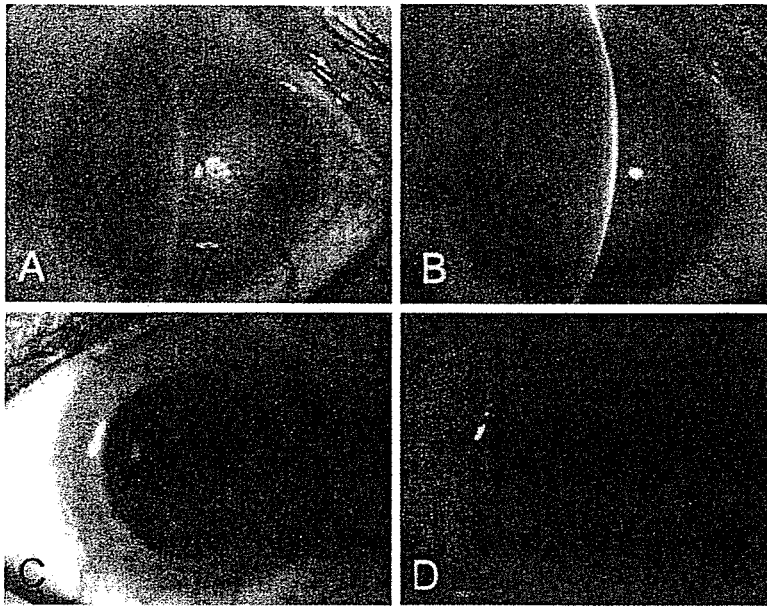
術後3ヶ月において63%で2段階以上の視力改善が可能であった。術後1年の長期経過において3ヶ月より2段階以上視力低下した症例は1眼(8%)であり良好な視力維持が可能であった。

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。

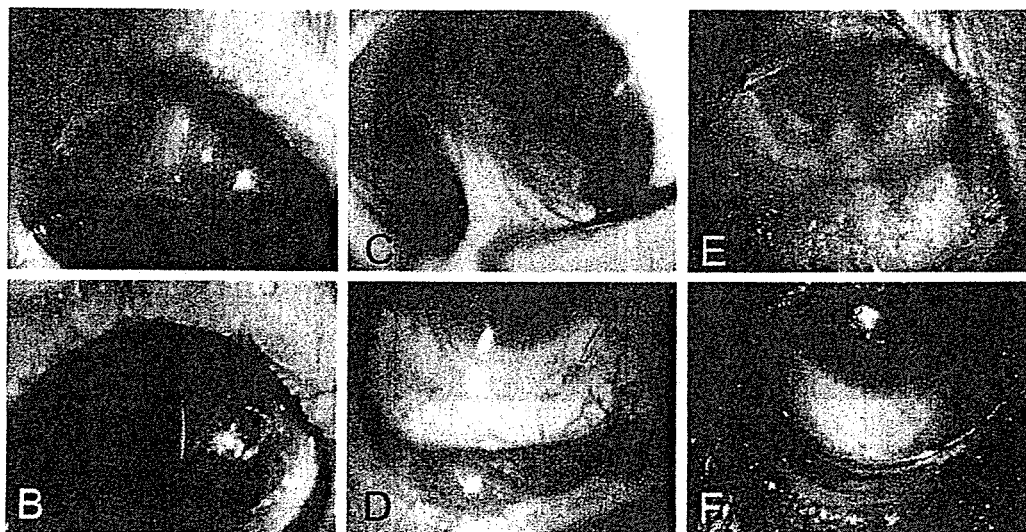
II-3.4 結膜嚢形成を目的とした臨床成績

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、結膜嚢の短縮から癥痕形成により瞼球癒着、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)，熱傷後眼球癒着の術前 (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瘢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

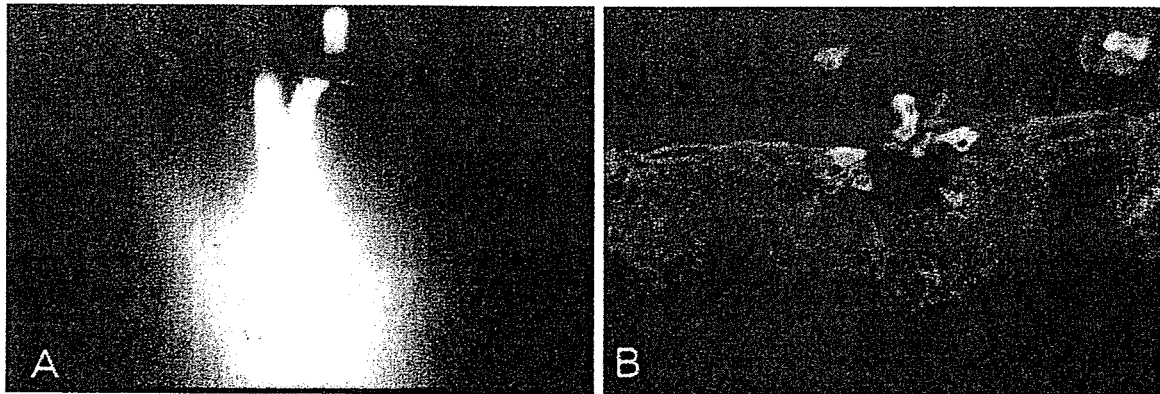
ヒト ocular surface 上皮の幹細胞は，角膜上皮細胞では角膜輪部上皮基底細胞に，そして結膜上皮細胞では結膜嚢上皮基底細胞と散在性に球結膜上皮基底細胞に存在すると報告されている³¹⁾³²⁾。しかし，角結膜組織の免疫染色あるいは組織培養による holoclone 細胞の同定などを日常的に行うことは不可能であり，幹細胞の存在の有無を診る臨床検査法が模索されている。我々は，角膜輪部に見られる縦方向の皺状構造，

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，結膜嚢短縮と眼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

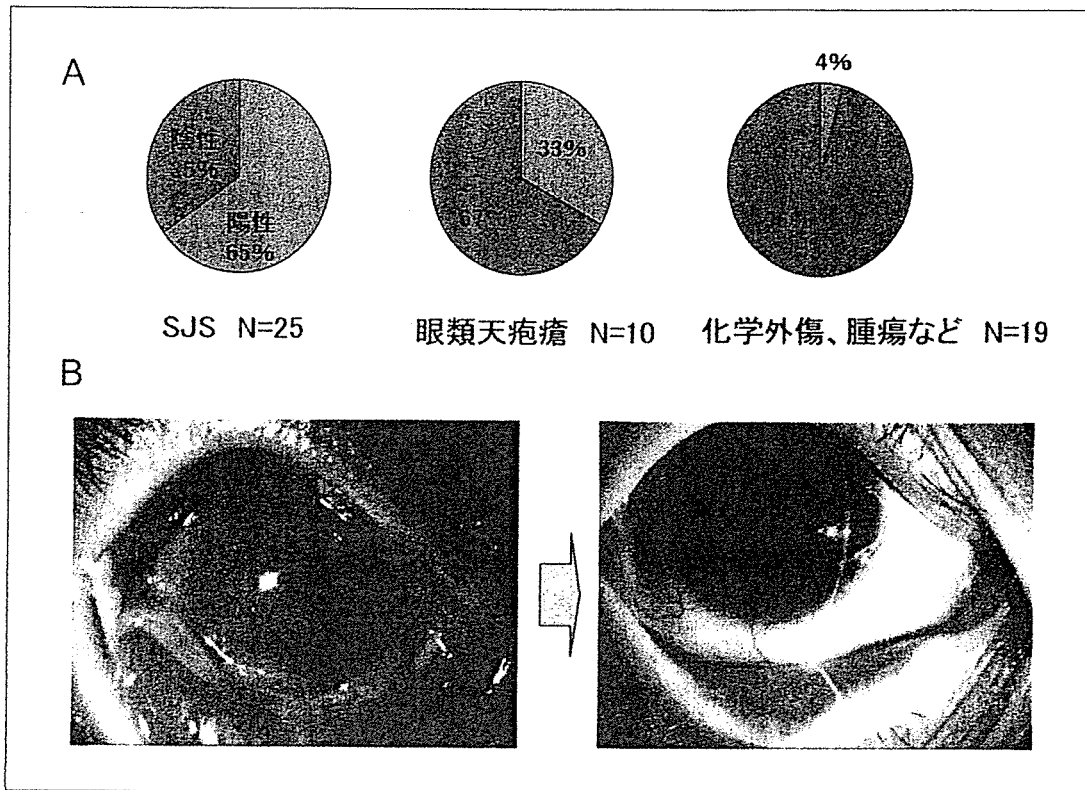
疾患名	眼数	POV消失頻度(%)
角膜化学腐食	39	82
SJS	30	83
眼類天疱瘡	8	100
トラコーマ瘢痕期	10	100
放射線角膜炎	3	100
Salzmann角膜変性	5	100
IDU長期使用例	21	52
抗菌薬点眼の長期使用	22	45

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.

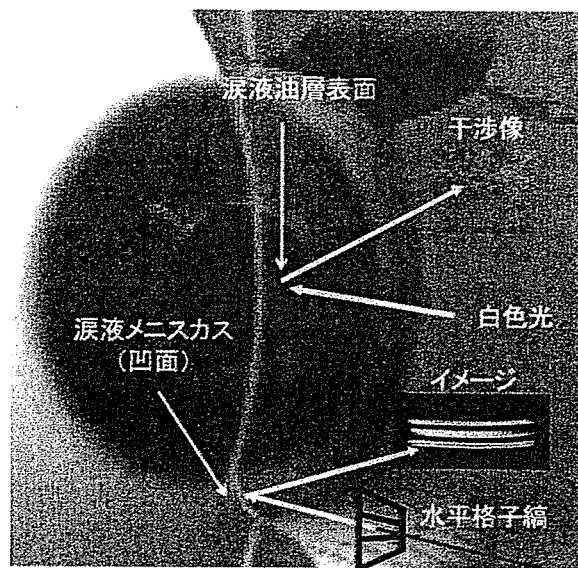
II-4.3 涙液の評価と改善対策

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凹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、

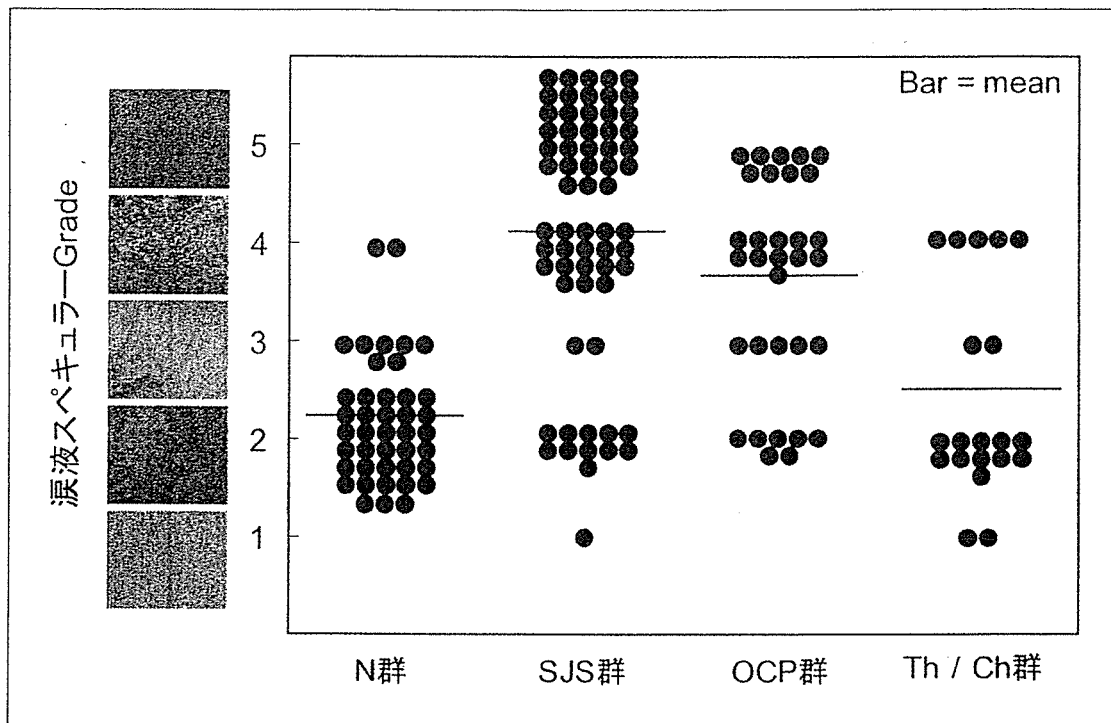
涙液検査法の比較⁴⁶⁾⁴⁷⁾、点眼液の動態評価⁴⁸⁾ や副作用の検討⁴⁹⁾ など幅広い活用性を有している。

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

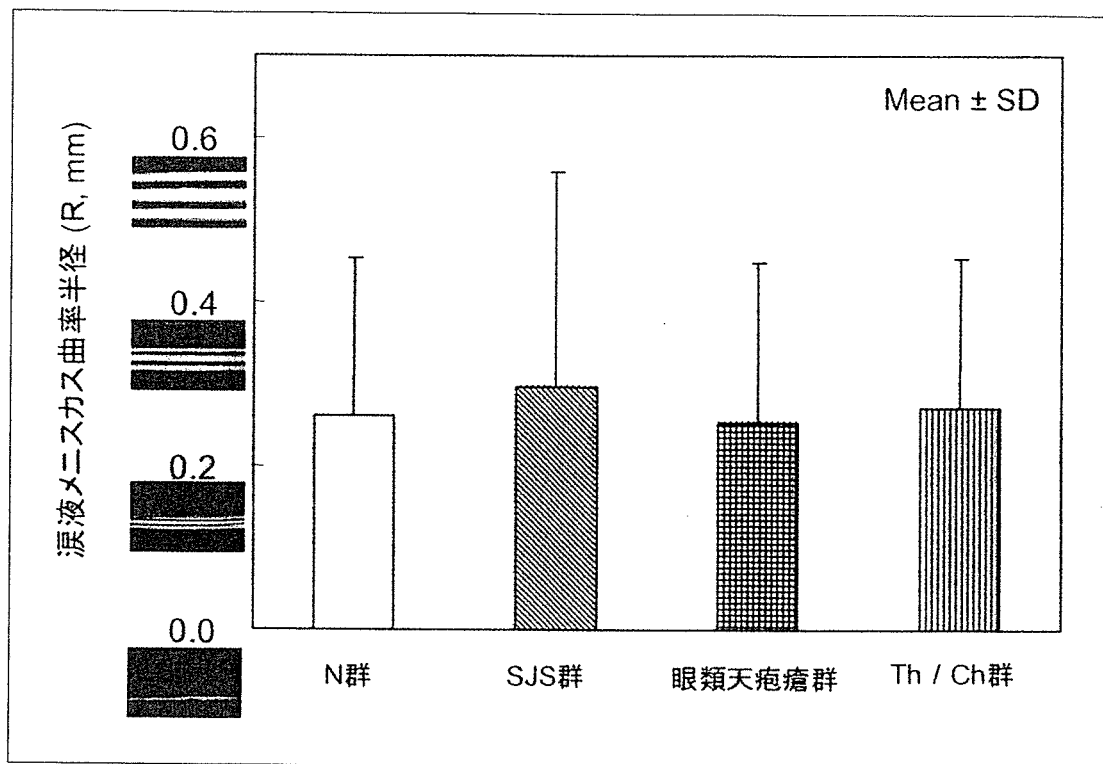


健常眼 (N群), Stevens-Johnson 症候群 (SJS 群), 眼類天疱瘡 (OCP 群), 熱・化学腐食 (Th/Ch 群) における涙液スペキュラー Grade を比較した. N群に比べて, SJS 群, OCP 群で有意に Grade は高く (それぞれ, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0601$), SJS 群, OCP 群で高度な角膜の濡れ性の低下を示す Grade 5 がそれぞれ, 66.7%, 53.1% に見られた.

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こと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.

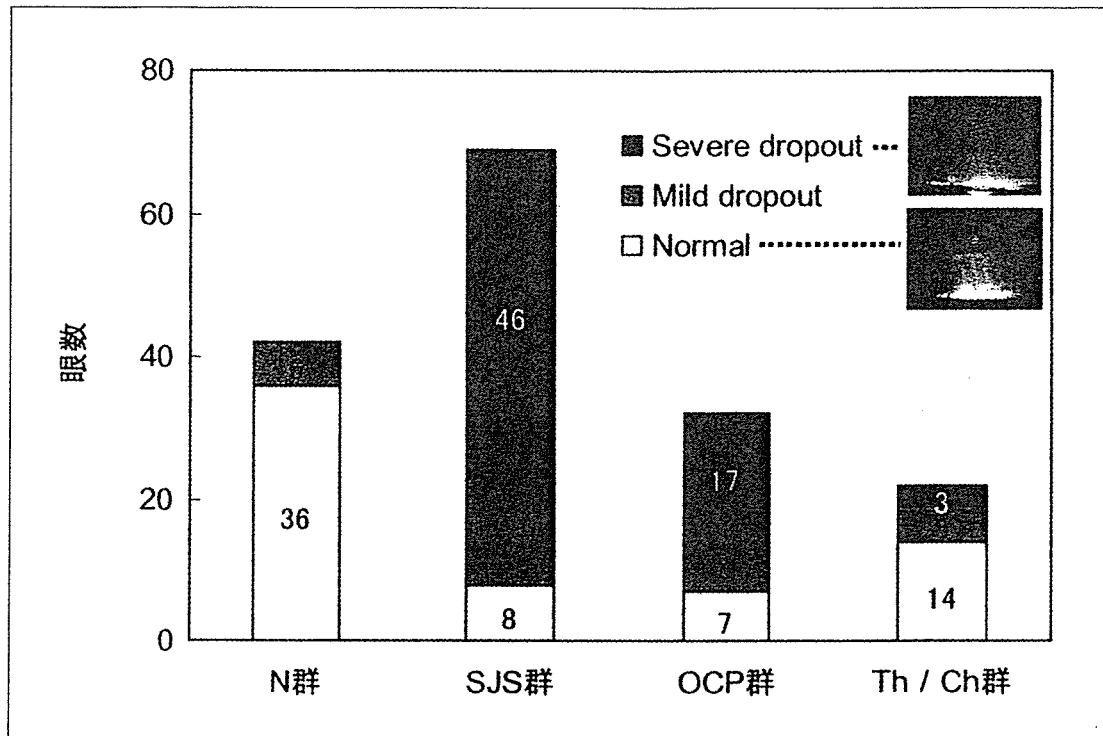
上皮移植および消炎による上皮の親水性の回復が治療上の大きな鍵を握っていると思われる. 高度のマイボーム腺機能不全に対しては, 油性点眼を含めたマイボーム腺機能不全への対策が今後の課題である.

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



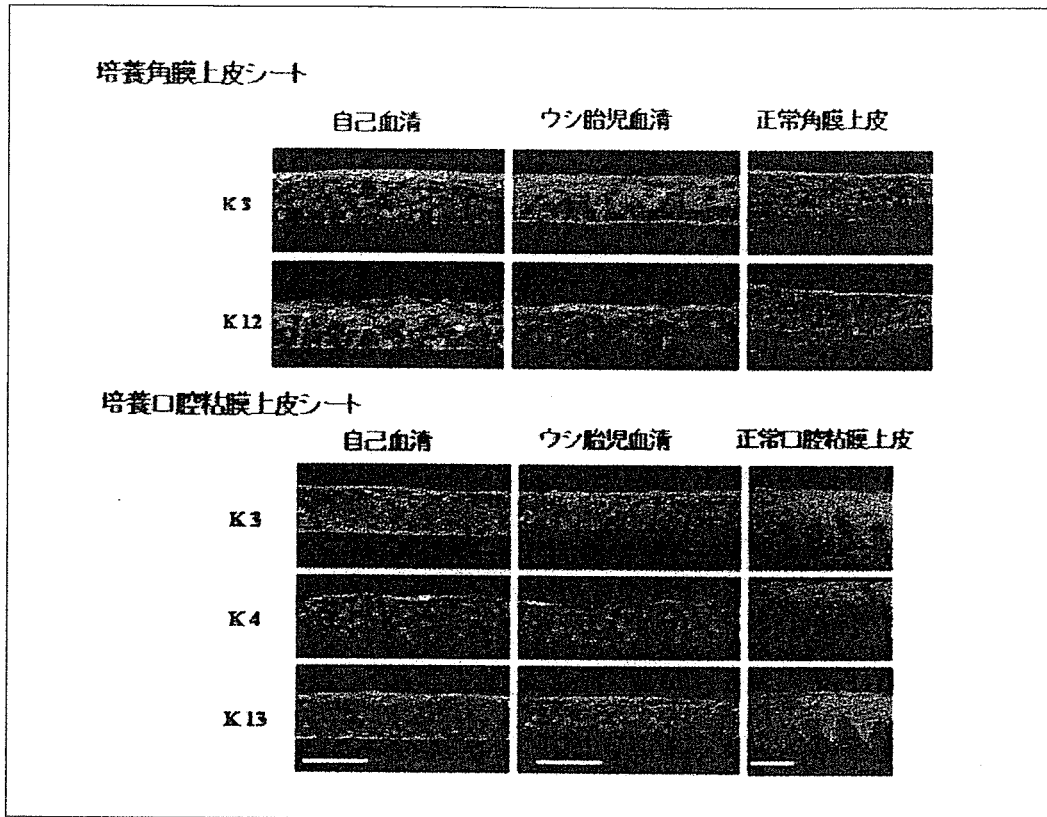
マイボグラフィ法を用いてマイボーム腺の組織破壊 (gland dropout) 程度を、健常眼 (N群)、Stevens-Johnson 症候群 (SJS 群)、眼類天疱瘡 (OCP 群)、熱・化学腐食 (Th/Ch 群) で比較した。N群に比べて、SJS 群、OCP 群で有意に gland dropout の割合が高かった (それぞれ、 $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0742$)。

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

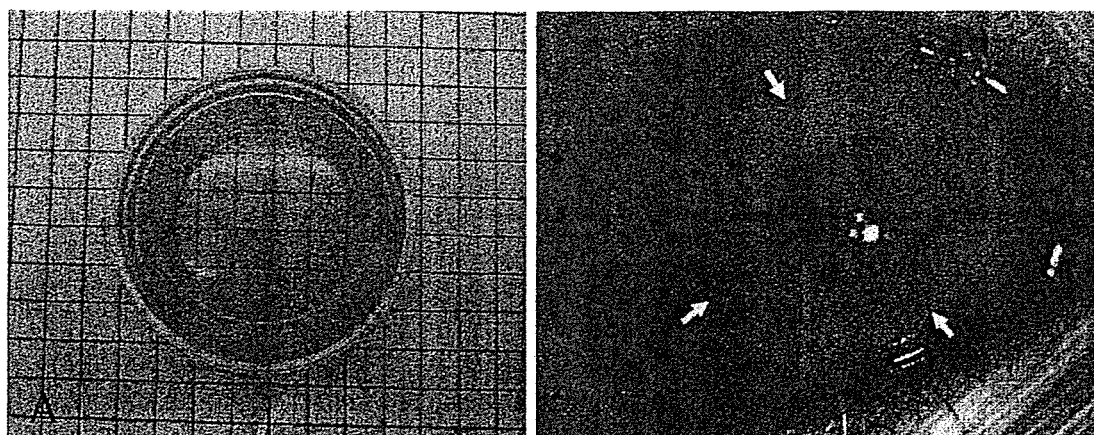
角膜内皮細胞は角膜の最内層にある一層の細胞群であり、健全な角膜においては六角形の角膜内皮細胞が 2500-3000cells/mm²の密度で存在する。角膜内皮細胞はバリアー機能とポンプ機能により角膜実質内の水分含有量を一定に保ち、角膜の透明性維持に重要な役割を果たしている。角膜内皮細胞は加齢による生理的な減少以外に、外傷や疾病、あるいは内眼手術による侵襲によって急激に脱落して細胞密度が低下することがある。霊長類の角膜内皮細胞は生体内では増殖しないことが知られており、一定密度（通常は 500cells/mm²以下）に細胞密度が低下すると、角膜の透明性を維持することができなくなり、著明な角膜浮腫と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)。

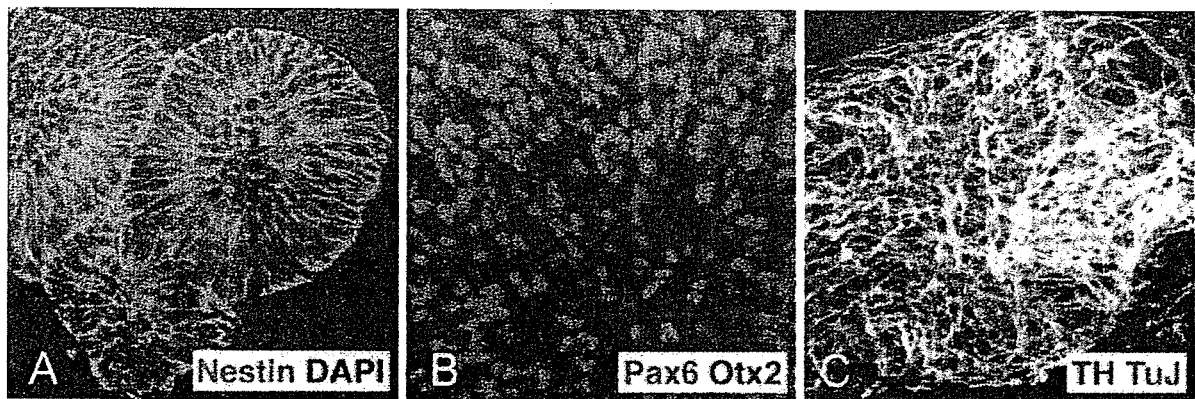
II-5.2 羊膜を用いたヒトES細胞からの眼組織の再生

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ーであるネスチン (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ー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, ピルビン酸, 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

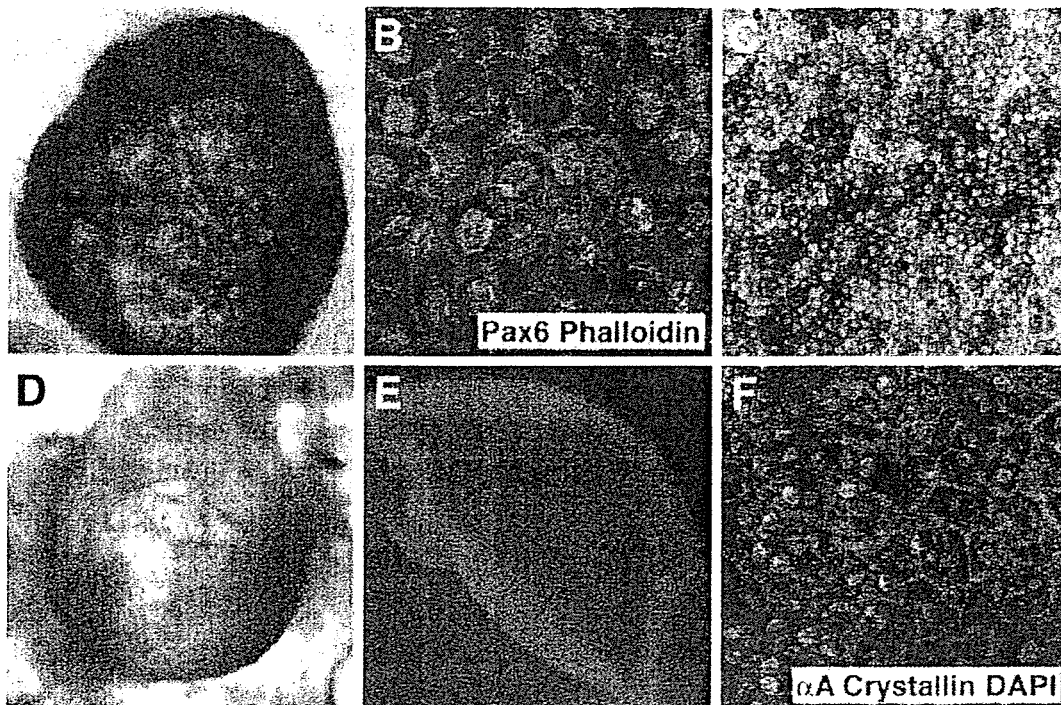
り細胞懸濁液から MEF を除去できた。このようにして回収した 5~20 細胞からなる未分化ヒト ES 細胞塊を, ラミニンコーティングした上皮なし羊膜上で無血清培地にて培養したところ, 未分化ヒト ES 細胞は羊膜に接着しコロニーを形成した。我々は, 羊膜マトリックスを培養基質としたこの培養条件を AMED (Amniotic membrane Matrix-based ES cell Differentiation) 法と名付けて, さらなる詳細な解析を行った⁹⁾。

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ー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抜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

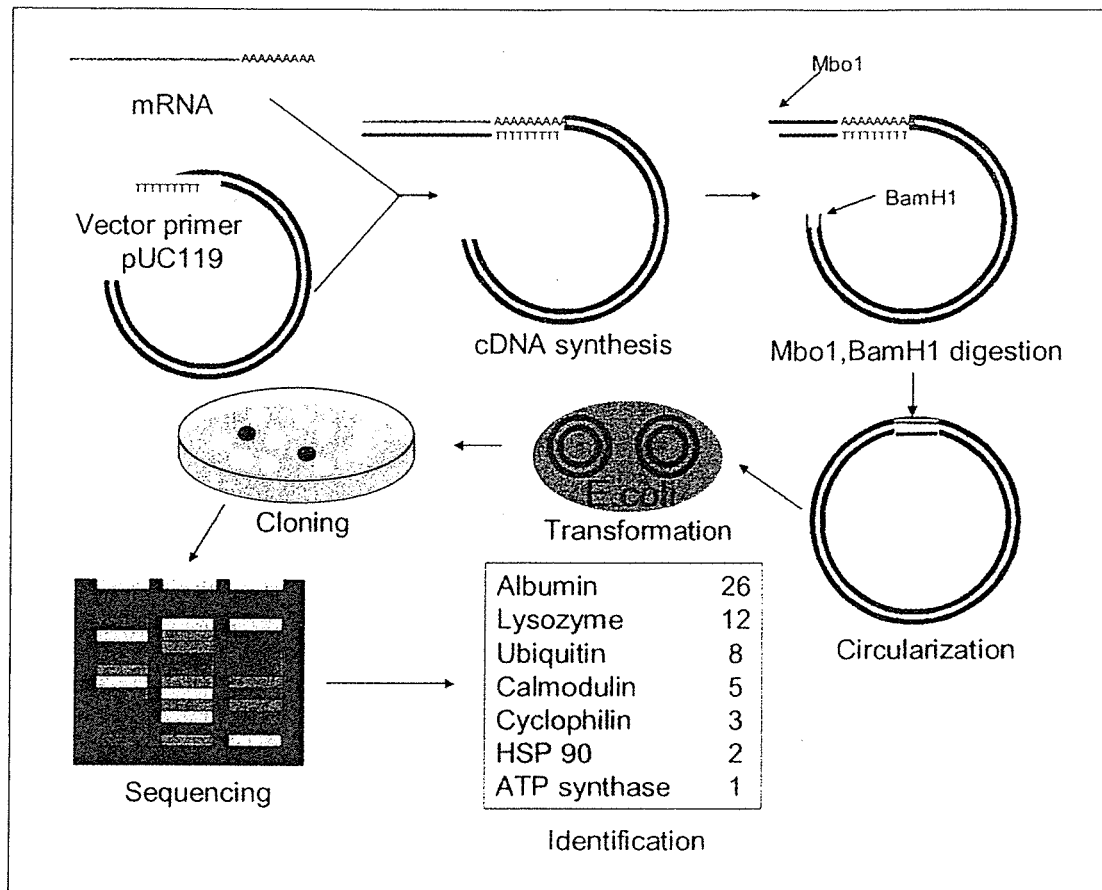
の細胞移植治療のための細胞ソース作成方法として極めて有望であると考えられる。

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MboI制限酵素にて消化すると同時に、GGATCCの6塩基を認識するBamHI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、

図24 Bodymap project における遺伝子発現解析法



pUC119 プラスミドベースのベクタープライマーにて cDNA 合成を行い，制限酵素で消化した後に環状化し，大腸菌に組み込みクローニングする．Poly A の逆方向よりシーケンスして，得られた配列を GS (Gene Signature) とし，フィルタリング，クラスタリングの後，GenBank データベースに対して類似性検索を行い遺伝子同定，リスティングを行った．

Reis-Bucklers 角膜変性症の原因遺伝子であることが明らかとなっている⁷⁵⁾．結膜上皮細胞についての解析では，全く異なった遺伝子発現パターンを示し⁷⁾，眼表面という同一の環境にあり，組織学的にも類似した形態を示すにもかかわらず，二つの細胞は細胞機能的に大きく異なることが示された．

III-2 角膜上皮幹細胞

角膜上皮細胞には，独自の幹細胞が角膜と結膜の境界部である輪部に存在することがほぼ確実となっている．免疫染色の結果より p63⁷⁶⁾，ABCG2⁷⁷⁾ を初めとする様々な遺伝子が角膜上皮幹細胞のマーカーとして報告されている．我々は角膜上皮幹細胞の細胞学的性質を理解す

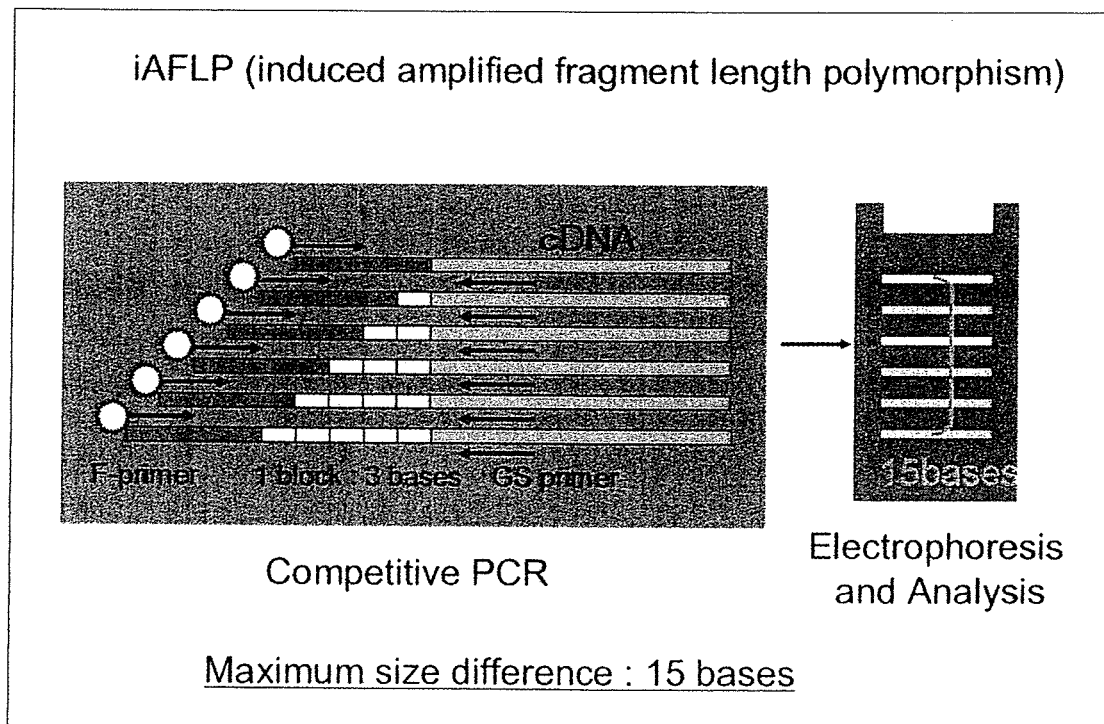
るために遺伝子発現解析を行った．方法はレーザーマイクロキャプチャーを用いて，角膜，輪部，結膜の上皮細胞を基底層，中間層，表層の3つの部位に分けて採取，RNA を抽出し，iAFLP 法によって相対的遺伝子発現解析を行った (図26)．対象とした遺伝子は角膜上皮細胞特異的な遺伝子と機能的に興味深い遺伝子あわせて約 500 とした．遺伝子発現データをクラスター解析したところ，角膜上皮幹細胞を多く含むと考えられる輪部基底細胞は角膜上皮細胞の全ての層と輪部の中間層，表層とはかなり異なる遺伝子発現パターンを示した (図27)．また輪部基底細胞に特異的に発現していた遺伝子のなかでも p75NTR (低親和性 NGF レセプター) は，角膜上皮細胞の幹細胞マーカーであ

図25 角膜上皮細胞における上位発現遺伝子リスト

Order	GS	Occurrence	Definition
1	GS02186	73	sulfated glycoprotein-2 / ApoJ / SP_40,40 / TRMP2
2	GS08025	55	Human mRNA for K12 keratin
3	GS00533	31	ferritin H chain
4	GS06069	28	aldehyde dehydrogenase type III (ALDHIII)
5	GS01706	26	CAPL protein
6	GS01919	22	calcyclin / growth factor-inducible 2A9 / prolactin receptor-associated protein (PRA)
7	GS00336	16	homologue to yeast ribosomal protein L41
8	GS00155	15	thymosin beta-4 / promyelocytic leukemia cell
8	GS00001	15	transforming growth factor-beta induced
10	GS00019	14	elongation factor 1-alpha (clone CEF4)
10	GS00418	14	ribosomal protein L9
10	GS00339	14	NAD(P)H:quinone oxidoreductase
13	GS01808	12	thymosin beta-10
14	GS00163	11	acidic ribosomal phosphoprotein P1
14	GS00463	11	lactate dehydrogenase-A (LDH-A)

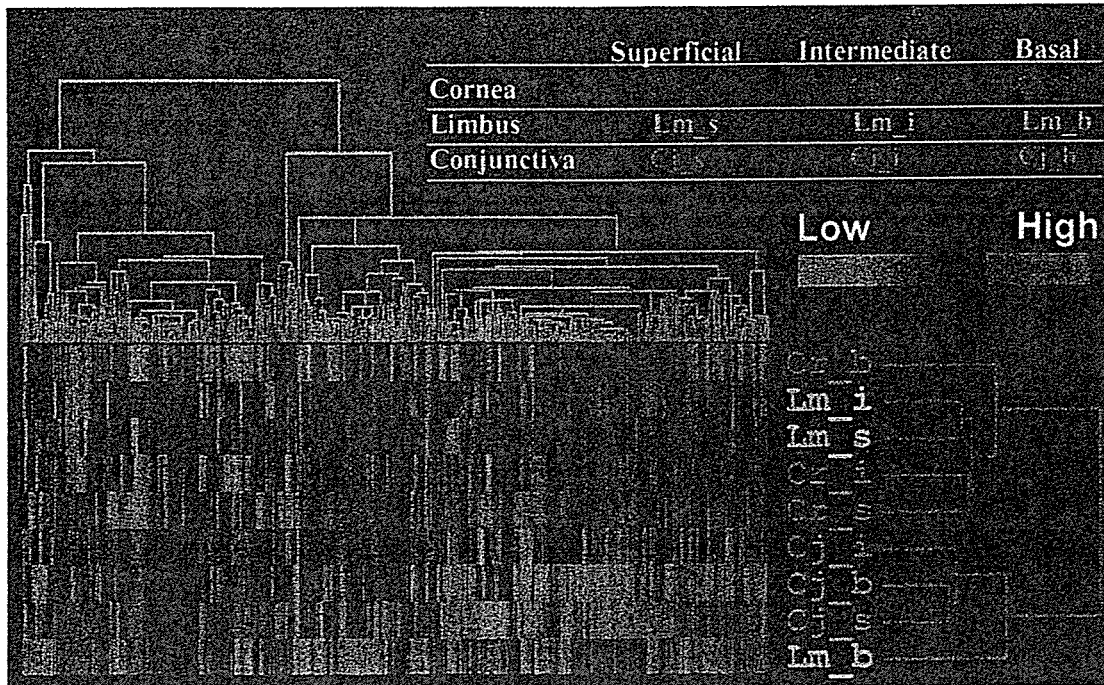
角膜上皮細胞で最も優位に発現している遺伝子は ApoJ で、角膜上皮細胞特異的のマーカであるケラチン 12 は 2 番目に優位な遺伝子であった。

図26 iAFLP による相対的遺伝子発現解析法



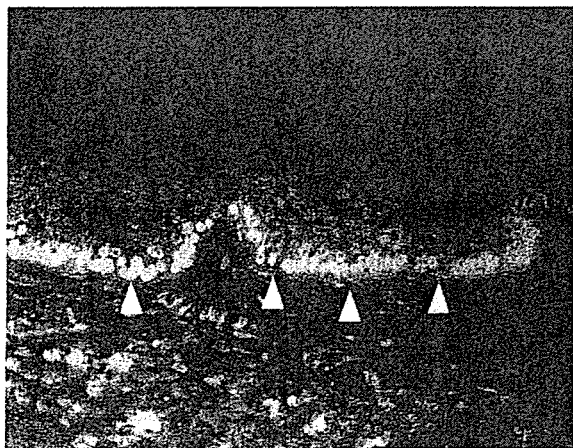
二本鎖 cDNA を制限酵素で消化して、サンプル毎に長さの異なるアダプターを付加する。サンプルを混合した後、制限酵素切断部位の近傍に設置した遺伝子特異的プライマーとアダプターに対する蛍光標識プライマーにて PCR を行う。得られた産物をシーケンサーにて電気泳動すると 3 塩基毎のラダーとなるが、各々の蛍光輝度は各サンプルの遺伝子発現相対量を反映している。

図27 眼表面上皮の層ごとの遺伝子発現解析



眼表面上皮（角膜：Cr，輪部：Lm，結膜：Cj）の基底層（b），中間層（i），表層（s）の遺伝子発現解析結果をクラスター解析したもの。角膜の全ての層と輪部の中間層と表層は類似した遺伝子発現パターンを示したが，ステムセルの存在する輪部上皮細胞はこれらとも，結膜上皮細胞とも違う独特の遺伝子発現パターンを示した。

図28 角膜輪部上皮における p75NTR の発現



p75NTR は角膜輪部基底層において優位な発現を示す。

る可能性を示し，実際，この遺伝子産物は免疫染色で輪部基底層に特異的に発現していた（図28）。この p75NTR は，食道，子宮頸部，胃粘膜上皮細胞において幹細胞マーカーである可能性が報告されている。

p63は，p53 のホモログとしてクローニン

グされ，これまでに6個以上の alternative spliced form が発見されている⁷⁶⁾。ノックアウトマウスの解析により，この遺伝子は特に表皮細胞の発生・分化過程において重要であることが示されている⁷⁹⁾。また角膜上皮細胞においても p63 陽性細胞が高いコロニー形成能を持ち，幹細胞の性質を色濃く持つことが示されている⁷⁶⁾。数あるアイソフォームのなかでも幹細胞維持に特に重要と考えられているのはN末端の転写活性ドメインを欠く ΔNp63 で，p53 に対する dominant negative effect を持つものと考えられている。p53 は癌抑制，細胞周期停止，アポトーシス，細胞・個体老化に関与するとされ，幹細胞のように個体の一生を通して細胞増殖機能を維持する必要がある細胞にとっては忌むべき存在となる。したがって，ΔNp63 はこの p53 機能の阻害によって幹細胞機能の維持に積極的に関わっている可能性がある。我々は眼表面の上皮細胞において，p63 のどのアイソフォームが関わっているかを検討した。方法は

角膜、輪部、結膜上皮の基底層、中間層、表層の細胞をレーザーマイクロキャプチャーにて選択的に採取し、RNA を抽出して cDNA を合成し、PCR にて cDNA 全体を均一に増幅した。増幅後の cDNA を鋳型として p63 のアイソフォーム特異的なプライマーを用いて PCR を行った。結果として輪部と結膜上皮の基底層～中間層にて $\Delta Np63\alpha$ が発現しており、他のアイソフォームの発現は認められなかった (図 29)。このことから眼表面上皮細胞の幹細胞維持において $\Delta Np63\alpha$ が重要な働きを持つことが示唆された⁸⁰⁾。

III-3 結膜における異所性角膜幹細胞

Ocular surface を構成する角膜上皮細胞と結膜上皮細胞は、輪部を境として棲み分けているものとこれまで考えられてきた。しかしながら我々は、結膜上皮の中に角膜上皮細胞の特異的なマーカーであるケラチン 12 陽性の細胞群が存在することに以前から気づいていた。そこで、我々は結膜上皮中にこのような細胞がどの程度存在するのか、そしてそれはケラチン 12 を発現している結膜上皮細胞であるのか、あるいは結膜上皮中に異所性に存在する角膜上皮細胞クラスターであるのかを検討した。方法はヒト角膜組織、結膜組織に対して免疫染色を行い、ケラチン 12 陽性の細胞群の存在様式を検討し、結膜組織より剥離した結膜上皮細胞に対して FACS, ウエスタンブロッティング, RT-PCR でケラチン 12 陽性細胞の存在率, ケラチン 12 遺伝子の発現について検討した。また結膜組織をケラチン 12 に対して免疫染色し、その連続切片においてケラチン 12 陽性および陰性の細胞群をレーザーマイクロキャプチャーにて選択的に採取し、RNA を抽出、iAFLP 法にて角膜上皮細胞、結膜上皮細胞とともに角膜上皮細胞特異的な 288 遺伝子について遺伝子発現パターンを検討した。結果として、輪部より 5 mm 以上離れた結膜組織 10 例中 9 例においてケラチン 12 陽性細胞が認められ、このような細胞の存在が一般的であることが示された (図 30)。

FACS, ウエスタンブロッティング, RT-PCR の結果より、個体差はあるものの結膜上皮には 0.2% から 1.7% 程度のケラチン 12 陽性細胞が存在することが明らかとなった (図 31)。しかしながら結膜上皮と角膜上皮の間には明確な境界がないため、輪部上皮の一部が結膜上皮のなかに広がっているという可能性も考えられる。そこで角膜上皮には存在しない杯細胞とケラチン 12 陽性細胞の位置関係について検討したところ、ケラチン 12 陽性細胞群に極めて近接した杯細胞の存在も確認され (図 32)、ケラチン 12 陽性細胞の一部は結膜上皮の中に存在していることが証明された。iAFLP による遺伝子発現解析結果によると、結膜上皮中のケラチン 12 陽性細胞の遺伝子発現パターンは角膜上皮細胞のそれと極めて一致しており、また逆に結膜上皮中のケラチン 12 陰性細胞の遺伝子発現パターンは結膜上皮細胞のそれと極めて一致していることが明らかとなり (図 33)、結膜上皮中のケラチン 12 陽性細胞は角膜上皮細胞と同等の細胞学的性質を持つことが示された。これらの細胞は結膜上皮のなかに異所性に存在する角膜上皮幹細胞とその分化した細胞群であると我々は考えている⁸¹⁾。

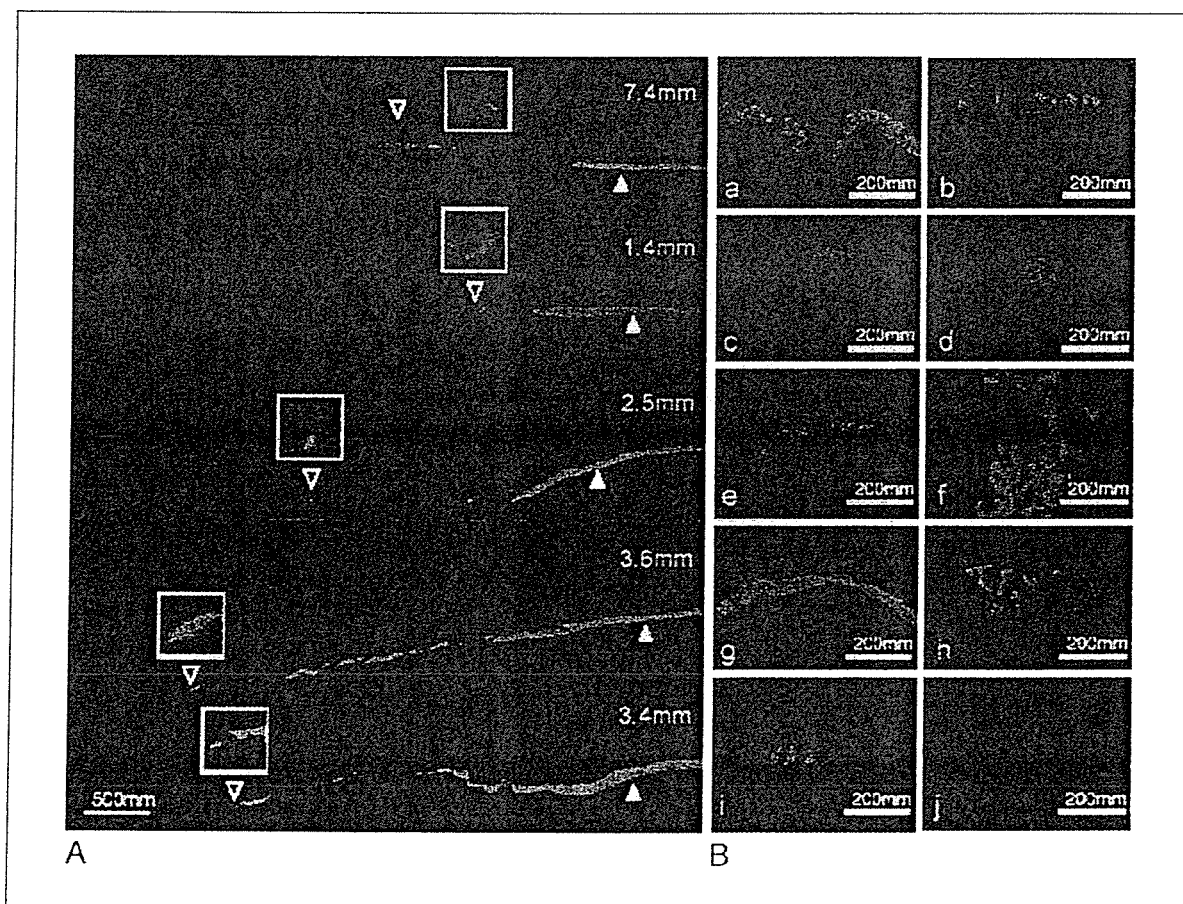
結膜上皮のなかに角膜上皮幹細胞クラスターが存在するのであれば、結膜上皮は角膜上皮細胞の代用細胞として使用できる可能性が出てくる。両眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症では、allo 培養角膜上皮幹細胞シート移植や auto 培養口腔粘膜上皮シート移植が行われているが、前述した口腔粘膜上皮のように、自家結膜上皮細胞を角膜上皮代用細胞として使用することができれば、極めて有効な治療となる可能性がある。我々はヒト結膜上皮細胞が角膜上に移植できるかどうか、移植手術後にも透明性が良好に維持されるかどうかについて検討した。方法は、ヒト結膜組織より酵素的に結膜上皮細胞を剥離したのちヒト羊膜上に播種して培養し、結膜上皮シートを作成した (図 34, 35)。作成した上皮シートを家兎角膜上に異種移植し、免疫抑制薬の使用のもとに移植後の上皮の状態を観察した。

図29 眼表面上皮における p63 アイソフォームの発現

	Cornea			Limbus			Conjunctiva			Southern Blotting	
	Superficial (n=3)	Intermediate (n=3)	Basal (n=3)	Superficial (n=3)	Intermediate (n=3)	Basal (n=2)	Superficial (n=3)	Intermediate (n=3)	Basal (n=2)		
TA domain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNp domain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
a (upper)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
b (lower)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TAp63a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TAp63b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TAp63g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNp63a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNp63b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNp63g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Keratin 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beta actin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

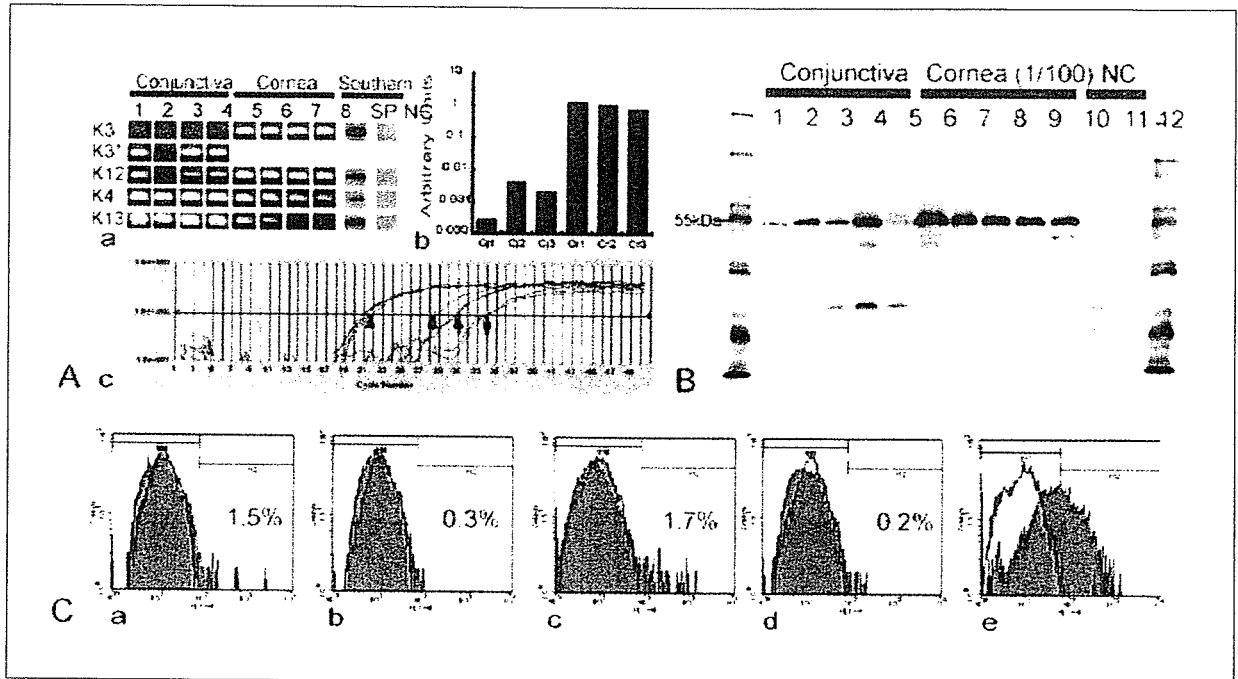
眼表面上皮の基底層、中間層、表層をレーザーマイクロキャプチャーで採取し、RNA 抽出、cDNA 合成後に PCR にて均一に増幅する。増幅した cDNA を鋳型として p63 の各アイソフォームについて PCR を行ったところ、輪部と結膜の基底層～中間層において ΔNp63 アイソフォームが検出された。

図30 結膜におけるケラチン 12 陽性細胞群



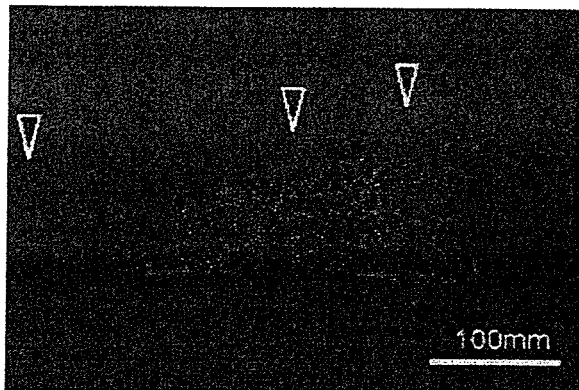
ケラチン 12 陽性細胞群はボーマン膜終端より最長で 7.5mm の位置においても認めることができた (A)。また輪部から 5 mm 以上離れた結膜組織 10 例中 9 例においてケラチン 12 陽性細胞が認められた (B)。

図31 結膜上皮におけるケラチン 12 の発現



結膜上皮におけるケラチン mRNA (A), 12 タンパク (B), 細胞 (C) の存在を検討した。個人差はあるものの、結膜上皮の中には約 0.2~1.7% のケラチン 12 陽性細胞が存在していた。

図32 ケラチン 12 陽性細胞群と杯細胞



ケラチン 12 陽性細胞群 (緑) に極めて近接して、杯細胞 (矢頭) の存在が確認された。

また移植後 2 週間, 1 ヶ月後の角膜を採取して、培養上皮とともに組織学的, 免疫組織学的解析を行った。結果として我々の作成したヒト培養結膜上皮シートは家兎角膜上で手術後 2 週間, 1 ヶ月においても良好に維持され, 手術および手術後のストレスに十分耐えうる物理的・細胞組織学的強度を備えていることが証明された (図36)。採取した組織を電子顕微鏡にて観察したところ, 移植後の培養結膜上皮ではマイクロ

ビライ, デスモゾーム, ヘミデスモゾーム, タイトジャンクション等の微細構造が培養中の結膜上皮のそれと比べ, 明らかに *in vivo* の状況に近いものとなっていた (図37)。これらの組織の免疫組織学的検討では, 培養中および移植後の培養ヒト結膜上皮シートは *in vivo* 結膜上皮細胞の性質を維持していたが, 一方で角膜上皮の特異的のマーカであるケラチン 12 も発現しており, 先に述べた異所性角膜上皮細胞の性質も同時に維持しているものと考えられた (図38)。このことから角膜上に移植した場合には, 角膜上皮細胞の細胞学的特性を発現して有効に働くのではないかと期待される⁸²⁾。

III-4 角膜無血管性に係わる因子

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わずかに誘発する⁸³⁾。そこで, ヒト角膜上皮細胞と結膜上皮細胞を採取して, 主要な 36 の血管新生関連因子の発現