

寧に抜去する必要がある。

## 参考文献

- 1) Kinoshita S, Ohashi Y, Kiritoshi A et al : Palisades of Vogt in ocular surface disease. Proceedings of the XXV International Congress of Ophthalmology. Kugler & Ghedini : Amsterdam, pp. 1200-1203, 1987
- 2) Schermer A, Galvin S, Sun TT : Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103 : 49-62, 1986
- 3) Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G et al : Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : implications on epithelial stem cells. *Cell* 57 : 201-209, 1989
- 4) Buck RC : Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26 : 1296-1299, 1985
- 5) Thoft RA, Friend J : The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 : 1442-1443, 1983
- 6) Kenyon KR, Tseng SC : Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 96 : 709-722, 1989
- 7) Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT et al : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 349 : 990-993, 1997
- 8) Nishida K : Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 22 : S28-34, 2003
- 9) Nishida K, Kinoshita S, Ohashi Y et al : Ocular surface abnormalities in aniridia. *Am J Ophthalmol* 120 : 368-375, 1995
- 10) Shimazaki J, Shimmura S, Fujishima H et al : Association of preoperative tear function with surgical outcome in severe Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 107 : 1518-1523, 2000
- 11) Tsai RJF, Tseng SC : Effect of stromal inflammation on the outcome of limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea* 14 : 439-449, 1995
- 12) Tseng SC, Tsubota K : Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* 124 : 825-885, 1997
- 13) Kim JC, Tseng SC : Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14 : 473-484, 1995
- 14) 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* 122 : 38-52, 1996
- 15) Kim JS, Kim JC, Na BK et al : Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 70 : 329-337, 2000

- 16) Tseng SC, Li DQ, Ma X : Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 179 : 325-335, 1999
- 17) 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* 116 : 431-441, 1998
- 18) Solomon A, Pires RT, Tseng SC : Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology* 108 : 449-460, 2001
- 19) Prabhasawat P, Tesavibul N, Komoluradej W : Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. *Br J Ophthalmol* 85 : 1455-1463, 2001
- 20) Hanada K, Shimazaki J, Shimmura S et al : Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. *Am J Ophthalmol* 131 : 324-331, 2001
- 21) Tsai RJ, Li LM, Chen JK : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal cells. *N Engl J Med* 343 : 86-93, 2000
- 22) Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR : Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Am J Ophthalmol* 130 : 543-544, 2000
- 23) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T et al : Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108 : 1569-1574, 2001
- 24) Rama P, Bonini S, Lambiase A et al : Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 72 : 1478-1485, 2001
- 25) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y et al : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 77 : 379-385, 2004
- 26) 西田幸二 : ヒト培養角膜上皮シート移植を用いた眼表面再建. *眼科* 46 : 1057-1061, 2004
- 27) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y et al : Corneal reconstruction using tissue-engineered cell sheets comprising autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351 : 1187-1196, 2004
- 28) Hayashida Y, Nishida K, Yamato M et al : Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 1632-1639, 2005



## CASE STUDY 1 .....

**症例**：69歳. 男性.

**現病歴**：10年前から角膜潰瘍を繰り返し，4年前から視力低下が進行していた. 近医より精査加療目的で紹介となる.

**既往歴**：手術歴，トラコーマ，Stevens-Johnson症候群などの既往はない.

**初診時所見**：視力は左眼0.01 (n.c.). palisade of Vogtは消失しており，周辺から角膜上への結膜の侵入を認め，これが視力低下の原因と考えられた(図1). また瞼球癒着，睫毛乱生を認めた. 角膜実質の混濁，浮腫は強くなかった. これらから眼類天疱瘡による角膜上皮幹細胞疲弊症と診断された.

**経過**：自家口腔粘膜上皮を採取し，温度応答性培養皿上で培養して上皮シートを作製した. これを用いて自家培養口腔粘膜上皮シート移植および羊膜移植を行った. 角膜上を覆っていた不透明な組織を除去すると透明な実質が現れ(図2a, b)，ここに低温処理によって剥離した培養上皮シートを無縫合で移植した(図2c, d). 上皮シートの支持体を除去して手術を終了した(図2e, f). 術後経過は良好である. 術後14ヵ月の段階で上皮欠損はなく，透明に保たれている. 矯正視力は0.8である(図3).

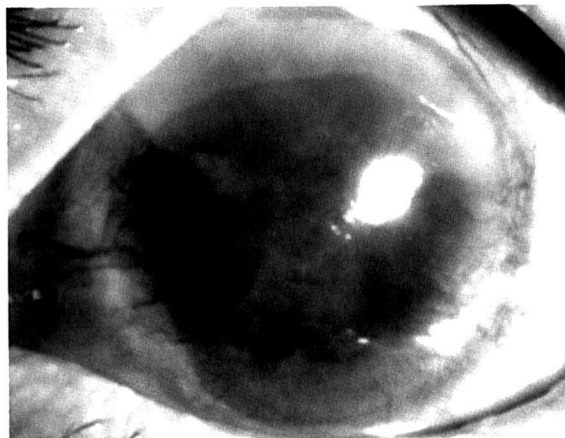


図1 術前の前眼部写真

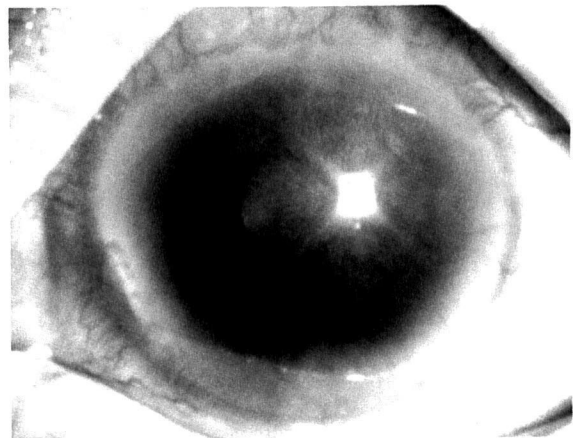


図3 術後の前眼部写真

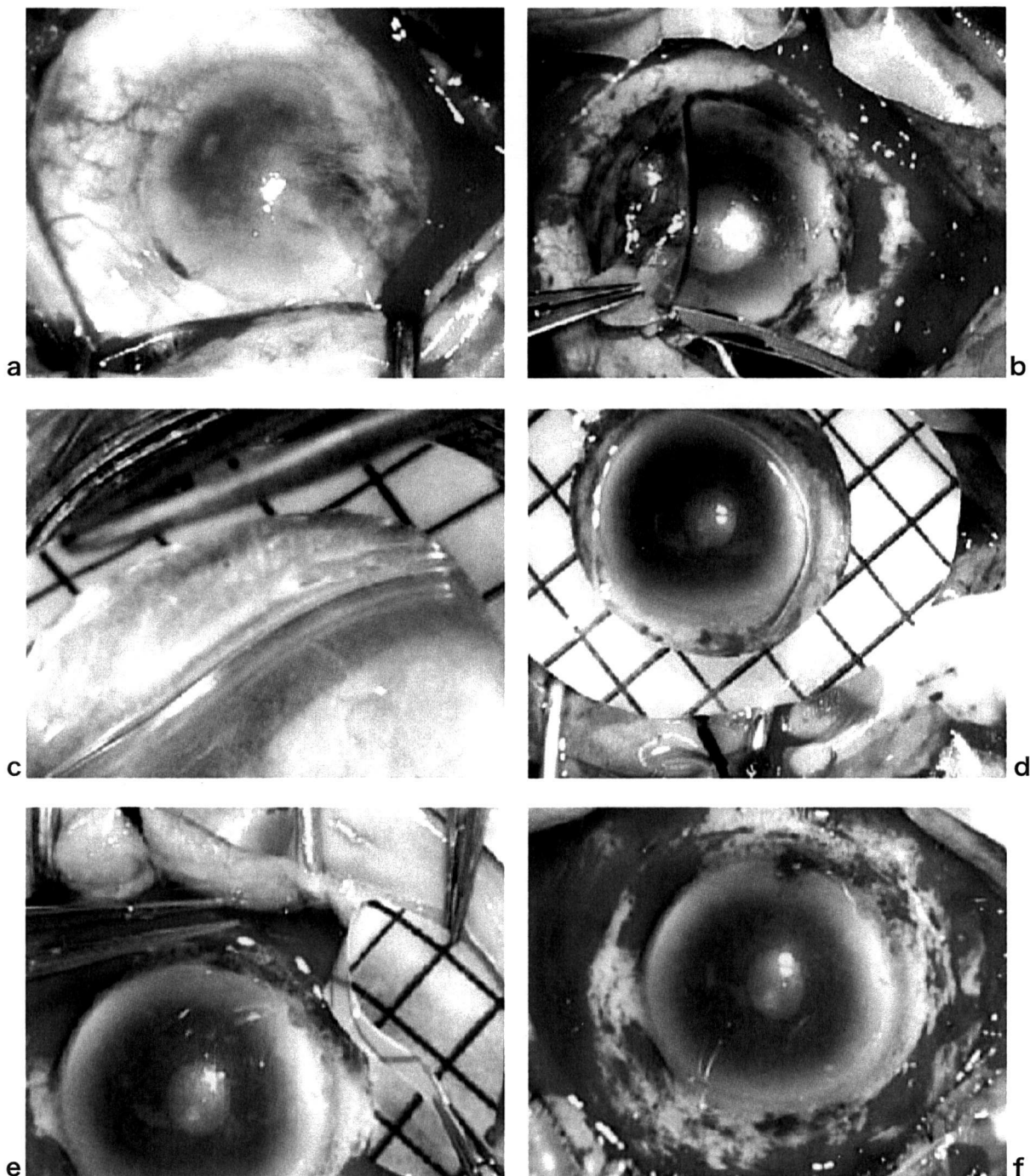


図2 術中写真

- a: 角膜は血管新生を伴った結膜によって被覆されている。
  - b: 角膜上を覆った結膜組織を切除。
  - c: 低温処理によって培養口腔粘膜上皮細胞シートを回収。
  - d: 上皮細胞シートを角膜へ移植。
  - e: 細胞シートの支持体を切除。
  - f: 角膜は培養細胞シートによって被覆された。
- (文献27)より引用

## 角膜移植の現状と再生医療への展望

*Current status of corneal transplantation and perspective on regenerative medicine*

### Keywords

角膜移植  
角膜上皮幹細胞  
拒絶反応  
温度応答性培養皿  
口腔粘膜上皮  
再生医療

林 竜平 西田 幸二

東北大学大学院医学系研究科 眼科・視覚科学分野

### Summary

Although corneal transplantation using donor cornea is a well established therapeutic method for severe ocular surface diseases, it also suffers from the problems such as donor shortage and rejection. In order to solve these problems, we have developed a unique tissue-engineered epithelial cell sheet transplantation using a temperature-responsive culture dish and patients' own stem cells. This therapeutic method provided good results for the treatment of severe ocular surface diseases.

### 角膜移植術とその問題点

角膜は角膜上皮、実質、内皮の3層からなる透明な無血管組織である(図1 a)。疾患や外傷のため角膜が障害されると透明性が低下し、視力低下、さらには失明に至る場合もある。角膜疾患のために失明などの重篤な視覚障害に至った患者に対して、現在ドナー眼を用いた角膜移植が行われている。1924年にソ連のフィラトウらにより報告されたドナー眼を用いた全層角膜移植は、現在もなお行われている最も普及した角膜移植の術式である。この方法をもとに、拒絶反応を軽減するために術式の改良が試みられ表層角膜移植や深層角膜移植などの術式が開発されてきた。さらに近年では、障害のある部位のみを移植するパーツ移植という考え方から、DSEK (Descemet's Stripping Endothelial Keratoplasty) などの内皮移植などが行われるように

Hayashi, Ryuhei / Nishida, Kohji

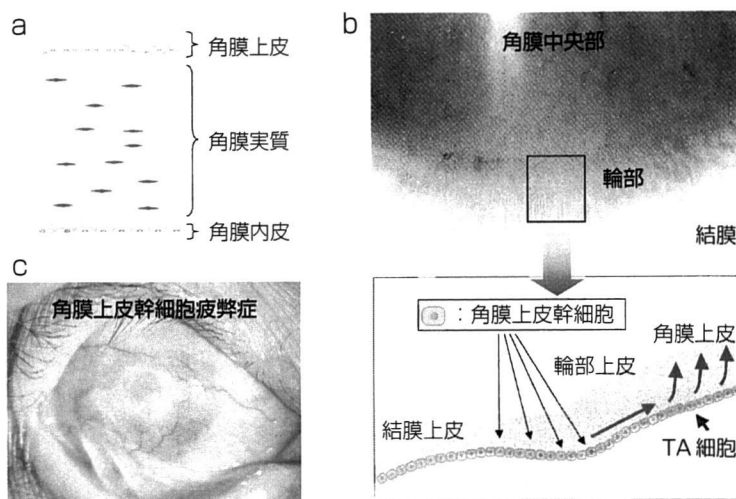
Department of Ophthalmology and Visual Science, Tohoku University Graduate School of Medicine

E-mail : rhayashi@oph.med.tohoku.ac.jp

なってきた。一方で、Stevens-Johnson症候群や、アルカリ・酸などによる化学外傷、熱傷といった眼表面疾患に対しての成績は良好ではない。これは病態そのものに対する理解がなかったことが原因であったが、1980年代前半から後半にかけてSunらによる基礎研究の成果<sup>1)2)</sup>から、角膜上皮の幹細胞が角膜の周辺部の角膜輪部に存在することが提唱され、眼表面疾患の病態の理解や治療法の開発は、角膜上皮幹細胞の概念を基盤として考えられるようになった。つまり、角膜中央部のみを移植する通常の角膜移植では、角膜上皮幹細胞を補充することができなかった。このことから、角膜上皮幹細胞疲弊症の治療のためには角膜上皮の幹細胞を補う治療が必要と考えられるようになり、1980年代後半には輪部移植法が開発された<sup>3)</sup>。輪部移植により幹細胞を移植することが可能となったが、ドナー角膜を用いるため拒絶反応という問題は残ったままであった。さらには、わが国においては深刻なドナー不足の問題を抱えており、不足分は海外からの輸入に頼っているのが現状である。この拒絶反応とドナー不足という問題をクリアするために、後述する患者自身(自家)の幹細胞を用いる再生医療による治療法が登場することとなる。

### 角膜上皮幹細胞と角膜上皮幹細胞疲弊症

角膜上皮は角膜の最表層に存在する厚さ約50 $\mu$ mの非角化扁平重層上皮で



a : 角膜上皮幹細胞は角膜と結膜の間に存在する輪部と呼ばれる組織に存在する。  
 b : 角膜上皮幹細胞は輪部組織の上皮基底部に局在している。  
 c : 輪部の角膜上皮幹細胞が疲弊あるいは消失すると、結膜上皮が侵入してきて癒着化する(角膜上皮幹細胞疲弊症)。

図1 角膜上皮幹細胞と角膜上皮幹細胞疲弊症(→巻頭 Color Gravure 参照)

ある(図1 a)。角膜上皮は、表層細胞のタイトジャンクション形成やムチン産生により外界とのバリア機能を担っている。角膜上皮幹細胞は、角膜と結膜の境界に位置する輪部と呼ばれる組織の上皮基底部に存在すると考えられている(図1 b)。これらの未分化角膜上皮細胞はp63, ABCG2, N-cadherinなどのマーカーを発現し、一方で角膜上皮型分化マーカーのケラチン3, 12を発現せず、また細胞分裂が緩やか(slow-cycling cell)であるなどの性質を有している<sup>4)-6)</sup>。角膜上皮幹細胞は非対称分裂により前駆細胞を生じ、それら前駆細胞が角膜中央部に遊走し、激しく細胞分裂を繰り返すtransient

amplifying cell(TA細胞)となり、角膜上皮細胞が供給されると考えられている。Stevens-Johnson症候群や眼類天疱瘡、熱傷、化学外傷などの重篤な角膜上皮疾患により、輪部の角膜上皮幹細胞が消失あるいは機能不全に陥ると、幹細胞からの角膜上皮細胞の供給が行われなため、隣接する結膜上皮が侵入し、角膜混濁など重篤な視力障害が起きると考えられる(角膜上皮幹細胞疲弊症: 図1 c)。これらの疾患に対して角膜中央部のみを移植する従来の角膜移植法では、角膜上皮幹細胞を補充することができず、結膜上皮の再侵入が起こりうる。そこで「幹細胞の補充」という観点から、前述のよう

にドナー角膜(他家)の輪部上皮を採取し、患者の角膜輪部に移植する輪部移植法が開発されたが、他家移植であるために拒絶反応の問題を解決することができなかった。

### 角膜上皮再生治療法

拒絶反応の問題を解決する方法として、1997年にPellegriniらにより患者自身(自家)の幹細胞・前駆細胞を用いた培養角膜上皮移植法が初めて報告された<sup>7)</sup>。彼女らは片眼性の幹細胞疫症患者に対して、患者の健常眼より輪部に存在する角膜上皮幹細胞・前駆細胞を少量採取し、培養皿上で培養した後に、酵素処理により培養角膜上皮細胞を回収し、疾患眼へ移植した。本手法では、患者自身の幹細胞の補充することが可能である。この報告の後、自家や他家の角膜上皮幹細胞を羊膜やフィブリンゲルなどの基質上で培養し、「角膜上皮+基質」シートを移植する方法も開発された<sup>8)-10)</sup>。これらの再生医療的アプローチは拒絶反応やドナー不足の問題解決に大きく寄与したが、両眼性疾患に適用できないこと、さらに培養上皮細胞シートの回収に酵素処理や基質(羊膜など)の使用が安全性の観点から問題となっていた。つまり、酵素処理を用いて培養角膜上皮細胞シートを回収する方法では、シート自体が酵素処理により脆弱化することや、基質を用いて回収する方法は、基質と宿主角膜実質の接着が不良であること、羊膜やフィブリンゲルなどは

生体由来であるため、その安全性や生体適合性について課題が残されていた。

### 温度応答性培養皿を用いた自家培養上皮細胞シート移植

前述の問題を解決すべく筆者らは、両眼性疾患にも適用可能で、基質および酵素処理を必要としない、独自の自家培養上皮細胞シート移植法を世界に先駆けて開発した(図2a)<sup>11)</sup>。片眼性疾患の場合には、健常眼の輪部、両眼性疾患の場合には口腔粘膜より少量の組織を採取し、上皮幹細胞・前駆細胞を温度応答性培養皿上で培養する。この温度応答性培養皿は東京女子医科大学・岡野光夫教授らが開発したもので、培養皿表面に温度応答性インテリジェントポリマーが共有結合で固定化されており、37℃では培養皿表面が疎水性となり細胞が接着するが、32℃以下では、相転移により表面が親水性となるため細胞が接着できないという性質を有している。

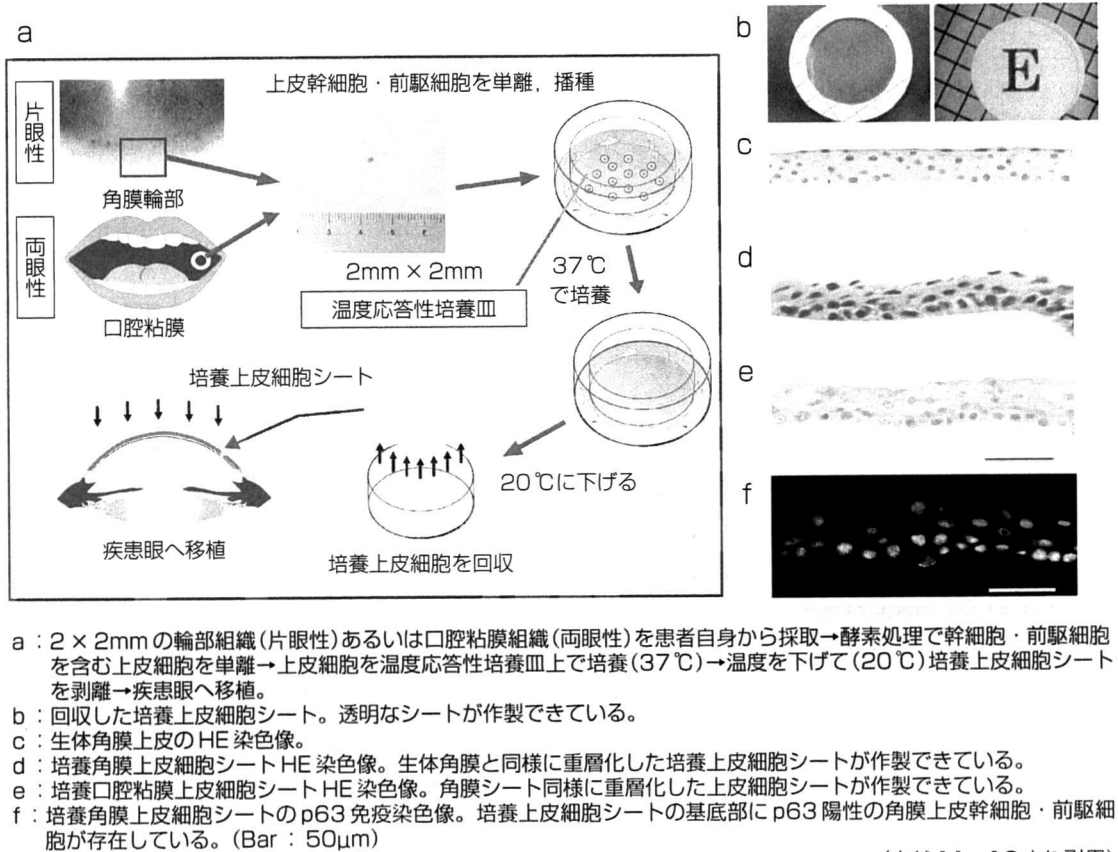
このため、この培養皿上で培養した上皮細胞は酵素処理を必要とせず、温度を下げるという極めて非侵襲的な方法により、培養皿から培養上皮細胞のみシート状で回収することが可能となる。回収した培養上皮細胞シートは、細胞間接着分子や基底部の細胞外マトリックスなどの細胞接着装置が酵素処理で破壊されることなく保持されている。さらに、回収した培養上皮細胞シートは生体の角膜上皮と同様に重層化しており、上皮幹細胞・前駆細胞

(p63陽性細胞)がシート基底部に存在することを確認している(図2b~f)。筆者らは倫理委員会承認のもと、角膜上皮幹細胞疫症患者に対して、温度応答性培養皿を用いた自家培養上皮細胞シート移植の臨床応用を開始した。これまでに、Stevens-Johnson症候群、眼類天疱瘡、熱傷、化学外傷の患者に対して、培養角膜上皮細胞シート移植あるいは培養口腔粘膜細胞シート移植を実施してきたが、移植後の成績は良好であり、有意な視力改善が認められている(図3)<sup>12)</sup>。

これまでに多くの症例で角膜の透明性が長期間維持されていることから、移植した培養角膜上皮細胞シート中の幹細胞・前駆細胞が保持され、移植後も生体中で角膜上皮幹細胞として機能していると考えられた。今後、移植した角膜上皮幹細胞がさらに長期間保持されるかなどについて、さらに注意深く観察を続けていく必要があるが、患者自身の細胞を用いた角膜上皮再生治療法は、これまでに有効な治療法がなかった難治性角結膜上皮疾患に対して、根治的な治療法になりえると考えられる。

### おわりに

筆者らは再生医学に基づいて、基質を用いない角膜上皮再生治療法の開発に取り組んできた。角膜上皮については、世界に先駆けて温度応答性培養皿を用いた自家培養上皮細胞シート移植法の臨床応用に成功し、拒絶反応と



(文献 11, 12 より引用)

図2 温度応答性培養皿を用いた自家培養上皮細胞シート移植法 (→ 巻頭 Color Gravure 参照)

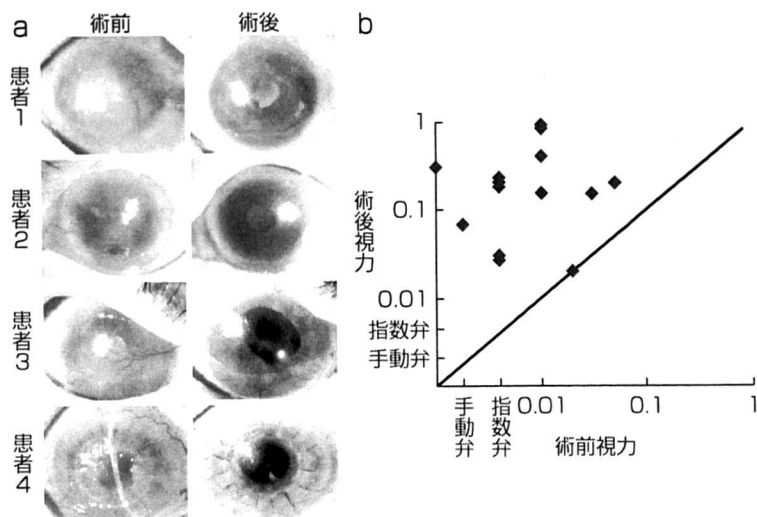
ドナー不足という2つの問題を同時にクリアすることができたことに大きな意義がある。一方で、現在の自家培養上皮細胞シート移植法にも、牛胎児血清 (FBS) やマウス由来フィーダー細胞 (3T3細胞) を用いることによる安全性の問題など課題も残されている。また、角膜内皮や角膜実質の再生医療はいずれもまだ研究段階であり、臨床応用されるに至っていない。これらの再生医療の実現化には、それぞれの組織

幹細胞・前駆細胞の理解をさらに深める必要がある。今後、角膜全層 (上皮、実質、内皮) の再生医療を実現化し、献眼に頼らない、拒絶反応のない、より安全でかつ有効な治療法を提供できるよう、筆者らも日々研究に精進している。

●文献

- 1) Schermer A, Galvin S, Sun TT, et al : Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* **103** : 49-62, 1986
- 2) Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, et al : Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : implications on epithelial stem cells. *Cell* **57** : 201-209, 1989





a : 培養上皮細胞シート移植術後の眼表面像(左:術前, 右:術後)。  
b : 術前視力および術後視力。培養上皮細胞シート移植により視力改善が認められる。

(文献12より引用)

図3 自家培養上皮細胞シート移植による臨床成績(→巻頭Color Gravure参照)

3) Kenyon KR, Tseng SC : Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* **96** : 709-722, 1989  
4) Schermer A, Galvin S, Sun TT : Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*

**103** : 49-62, 1986  
5) Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, et al : Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate : Implications on epithelial stem cells. *Cell* **57** : 201-209, 1989  
6) Hayashi R, Yamato M, Sugiyama H, et al : N-Cadherin is expressed by putative

stem/progenitor cells and melanocytes in the human limbal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* **25** : 289-296, 2007

7) Pellegrini G, Traverso CE, Franzini AT, et al : Long-term resorption of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* **349** : 990-993, 1997  
8) Tsai RJ, Li LM, Chen JK, et al : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal cells. *N Engl J Med* **343** : 86-93, 2000  
9) Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR, et al : Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Am J Ophthalmol* **130** : 543-544, 2000  
10) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al : Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* **108** : 1569-1574, 2001  
11) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al : Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded *ex vivo* on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* **77** : 379-385, 2004  
12) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al : Corneal Reconstruction Using Tissue-Engineered Cell Sheets Comprising Autologous Oral Mucosal Epithelium. *N Engl J Med* **351** : 1187-1196, 2004

# 総説

## 角膜再生医療

大家義則\*, 西田幸二\*

### 1. 再生医療とは

近年、「再生医療」という言葉が注目を浴びている。再生医療にあたる英語はregenerative medicineやtissue engineeringが挙げられるが、このなかでもtissue engineeringの概念を打ち立てたのはRobert LangerとJoseph P. Vacantiである<sup>1)</sup>。Langerらによると、tissue engineeringとは「生物学や工学の原理を用いて損傷を受けた組織を再建するための機能的な代用物を作製する、多分野にまたがる新しい学問」である。その実現のためには、細胞、増殖因子、細胞外マトリックスの三因子が非常に重要であると考えられ、これらを組み合わせて目的とする組織の人工的な再建を行う。すなわち培養細胞を用いて患者の損傷された機能を再建するような方法も含まれるし、コラーゲンや人工のポリマーを用いて増殖因子などを投与することで機能を再建する方法も含まれる。また、その対象となると考えられる組織や臓器は非常に多岐にわたっており、皮膚、骨、軟骨、血管、肝臓、腎臓、角膜、膀胱、肺、歯などがその対象となると考えられる。この技術が発展すれば、対症的な現在までの治療方法から人工物を用いた組織再生という根治療法へのパラダイムシフトとなる大きな可能性をもち、社会的にも大きな注目を浴びているものである。

### 2. 幹細胞とは

また近年「幹細胞」という細胞が注目を浴びているが、ここで簡単に解説しておく。幹細胞とは「多分化能」（複数種類の細胞へ分化する能力）および「自己複製能」（自分自身と同じ性質をもった細胞を産生する能力）を有した未分化な細胞と定義される。すなわち、多分化能を利用して治療に用いることができる多くの種類の細胞を供給できる可能性があるし、自己複製能を利用して多くの数の細胞を得ることができる可能性があり、再生医療に用いる細胞源として期待がかかっている。幹細胞には体性幹細胞と胚性幹（以下ES）細胞の2種類がある。体性幹細胞は骨髄、皮膚、肝臓、角膜などの各臓器や組織に存在する幹細胞で、それぞれの組織に少量存在して、ゆっくりとしか分裂しない（quiescent）が、何らかの刺激があると活発に分裂する。一般に小型で細胞質に対する核の比率（N/C比）が高いという形態的な特徴をもつものが多い。そして周囲の微小環境（niche）が、幹細胞の維持に極めて重要であると考えられている。更に幹細胞から少し分化したTA（transient amplifying）細胞が速い速度で分化増殖することで、大量の分化細胞を作り出す仕組みになっている。一方、ES細胞は初期胚から樹立される細胞で、胎盤以外のすべての細胞へ分化する多分化能（pluripotency）を有しており、試験管内（in vitro）で非常に活発に増殖する。この細胞から目的とする細胞への分化誘導が自由自在に行えれば、再生医療に用いる細胞源として有用であると考えられ

\* 東北大学大学院医学系研究科  
神経感覚器病態学講座・眼科視覚科学分野  
2010年1月5日受付

ている。

### 3. 細胞を用いたヒトの治療

最も早期に培養細胞を用いたヒトの治療が始まった例が培養表皮である。表皮の培養はアメリカのHoward Greenらのグループによって報告され、臨床応用されてきた。ヒトの表皮細胞（以下keratinocyte）はin vitroでの培養が極めて困難であったが、Greenらは3T3細胞といわれるマウス胎児由来の線維芽細胞を用いてkeratinocyteを培養することでこの問題を解決した<sup>2)</sup>。更に培養液の成分についても改良を行い、現在までGreenらによって開発された3T3細胞とウシ胎児血清を用いた培養方法は、keratinocyte培養のゴールドスタンダードとなっている。そしてGreenらのグループは、1980年からこの培養表皮をヒトの治療にも使用し始めた。具体的には熱傷の患者の治療であり、当初は腕などの部分的な熱傷の患者に用いられていたが、その後3度熱傷で体表の80%以上の皮膚を損傷した極めて重症の、従来の治療法によっては救命不可能である熱傷患者の治療にも成功している<sup>3)</sup>。これらの一連の成功は培養細胞をヒトの疾患の治療に用いて成功した世界初の例であり、極めて画期的なものであった。この培養表皮は現在までに多くの国で重傷熱傷に対する治療法として用いられ、多くの命を救っている。更に、この治療は一部の機関で行われる研究的な治療法として開始されたものであるが、一般化への展開をみせはじめている。すなわち日本ではJ-TEC社が、韓国ではTego Science社が、またアメリカではGenzyme社がそれぞれ規制当局の承認を得て培養表皮細胞の販売を行っている。研究として始まった培養細胞を使った医療が一般的な医療として普及した初のケースである。

### 4. 角膜再生医療

角膜の分野における再生治療についての初めての報告はイタリアのPellegriniらによるものである<sup>4)</sup>。PellegriniらはGreenらが皮膚のkeratinocyteを培養したのと同じ方法で輪部に存在する角膜上皮幹細胞を培養して移植した。すなわち片眼性のアルカリ熱傷の患者2例に対し、健常眼から採取した角膜上皮幹

細胞を培養して自家移植を行った。2年以上の長期の経過観察後にも上皮は安定しているとの報告であった。この画期的な報告を皮切りに、フィブリンや羊膜などをキャリアとして培養した角膜上皮細胞を移植する手法による治療の有効性の報告が多数の研究からなされた<sup>5, 6)</sup>。この手法によって、健眼から大きな輪部組織を採取する必要があった従来の移植法に比べて、少量の自家組織から移植用の角膜上皮細胞を用意することが可能となり、大きな進歩となった。

しかしながら、この方法は両眼の角膜上皮細胞が完全に消失した患者には適応できないという欠点があった。この欠点を補う方法として、我々は口腔粘膜上皮細胞を細胞源として角膜上皮類似の上皮細胞シートを作製し、自家移植する方法を開発し臨床応用している（図1）<sup>7)</sup>。具体的には移植を受ける患者自身から口腔粘膜上皮を採取し、培養して幹細胞を含む重層化上皮細胞シートを作製する。口腔粘膜上皮細胞を細胞源とすることで、角膜上皮細胞が消失した患者に対しても自家細胞を用いた治療を行うことができるようになった。更に上皮細胞シートは温度応答性培養皿上で培養しており、従来酵素処理が必要であった上皮細胞シートの剥離が20℃の低温処理のみによって可能となった。温度応答性培養皿は32℃以上では疎水性（細胞接着表面）であり、それ以下では親水性（細胞遊離表面）となる。すなわち、通常の培養条件である37℃では細胞シートは培養皿に接着しているものの、20℃に細胞シートを置くことで剥離することができるわけである。この方法によって酵素処理による細胞シート回収時の細胞へのダメージを回避し、カドヘリンなどの細胞間接着分子およびインテグリンなどの基底膜との接着分子を残したままでの細胞シートの回収が可能である。移植用の培養上皮細胞シートを、まさにready to useの状態を用意することが可能となったわけである。我々のグループでは、この画期的な方法を用いた上皮細胞シート移植の臨床応用により、良好な治療成績を収めている。

しかしながら、現在までに臨床応用に成功しているのは角膜の上皮、実質、内皮の三層のうち上皮層についてのみであり、実質および内皮層の再生治療

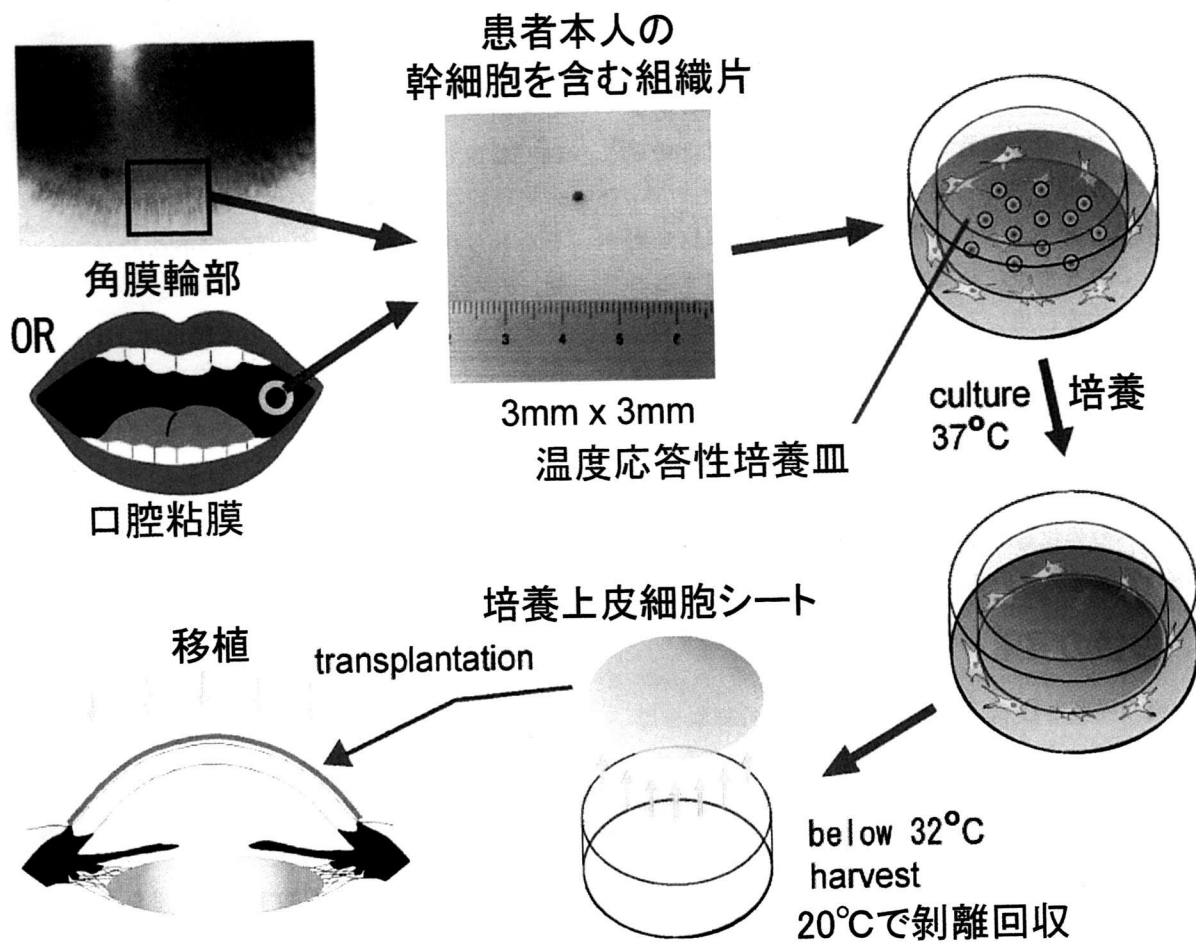


図1 培養口腔粘膜上皮細胞シート移植

法については臨床応用にまで至っていない。その理由としては、実質については角膜の光学のおよび力学的特性を満たすようなコラーゲン構造の人工的な再現が困難であり、現在までに臨床応用で用いることができるような人工実質が作成できていないことが挙げられる。また角膜内皮についてはex vivoでのヒト角膜内皮細胞の培養は可能であり、動物実験においてもその有効性が証明されている<sup>8)</sup>ものの、臨床応用する際に採取可能な自家細胞源が確立していないことが挙げられる。上皮の場合には健常眼からの輪部組織の採取が倫理的に許容され得るものであったが、角膜内皮細胞は眼内に存在する細胞であり、健常眼からの採取が困難と考えられる。

これらの問題点を解決する可能性のある手法として、近年開発された人工多能性幹（以下 iPS）細胞を用いた角膜再生治療法が考えられる。iPS細胞は

京都大学の山中伸弥らによって報告された新型の多能性幹細胞であり、マウスおよびヒトの線維芽細胞に四つの遺伝子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）を導入することで樹立が可能である<sup>9, 10)</sup>。これは分化した体細胞に四つの遺伝子を導入することで細胞のリプログラミング（初期化）が起こり、多能性幹細胞を樹立できるというまさに画期的な報告であった。同様に分化多能性をもつ細胞としてES細胞が挙げられるが、iPS細胞は臨床応用するのにES細胞より有利な点がいくつか挙げられる。第一に倫理的問題が挙げられる。すなわちES細胞は樹立の際に生命の萌芽である初期胚の破壊を伴うことから、その使用については倫理的問題があり、疾患の治療のためとはいえ、生命の始まりである初期胚を破壊してまで行ってよいのかという問題がある。しかしながら、iPS細胞は体細胞から樹立されるものであり、

ES細胞のような初期胚の破壊を伴わないので、この倫理的な問題を回避することができる。第二に自家細胞からの樹立が可能であることから、移植を必要とする患者自身の細胞を用いることで拒絶反応の危険がない細胞を移植できるという点が挙げられる。すなわち、患者自身の線維芽細胞からiPS細胞を樹立し、これを治療に必要な細胞へと分化誘導することでその治療に用いることができれば、まさにオーダーメイドの患者自身の細胞を用いた夢のような細胞、組織の構築が可能となる可能性がある。そこで我々のグループは、自家細胞を用いた治療法の重要な細胞源としてiPS細胞を考えており、iPS細胞の角膜細胞への分化誘導法や誘導細胞の移植法について現在研究を進めているところである。

## 5. 今後の展望

今後の展望として、培養細胞とりわけ幹細胞を用いた治療法は更に広まっていくことが予想される。そこで、今後の課題についてここで述べる。体性幹細胞は各組織に存在しているが、患者自身から採取して実際に臨床で用いるためには、採取の安全性が重要である。角膜上皮の幹細胞は輪部に存在しており、比較的容易に採取することが可能である。間葉系幹細胞は骨髄や脂肪に存在することが知られており、患者からの採取はやや侵襲的であるが、可能であると考えられる。一方で、神経幹細胞は側脳室のsubventricular zone (SVZ) や海馬のsubgranular zone (SGZ) に存在すると考えられており、少なくとも現在の技術では患者からの安全な採取は極めて困難であると考えられる。ある細胞種を細胞源とするためには、採取方法の改善や細胞源についての基礎的な研究を進めていかななくてはならない。

次にES細胞についてだが、倫理的な問題および造腫瘍性の問題が非常に大きいと考えられる。倫理的な問題は前述の初期胚破壊の問題である。アメリカではGeron社がヒトES細胞から分化誘導したoligodendrocyteの前駆細胞を用いた脊髄損傷に対する治療の治験をFDA (Food and Drug Administration) が承認し、世界初のES細胞を用いた臨床研究が開始される予定となっている。日本では研究目的のES細胞の使用についても非常に厳しい規制があり、臨床

での治療目的のES細胞の使用については認められていない。今後、臨床でのES細胞使用についても十分な議論を尽くすべき時期である。また、iPS細胞はES細胞と同様の多能性をもちながら、初期胚破壊の倫理的な問題がないので、臨床応用には向いているかもしれない。しかしながらiPS細胞はES細胞同様、極めて増殖力の旺盛な細胞であることから、分化誘導した細胞を移植に用いる際には、手術前に造腫瘍性を完全に否定することが重要であると考えられ、検査のための適切なプロトコルの作成が求められる。

## 6. 最後に

このように、再生医療は培養表皮や我々が開発した培養口腔上皮移植シート移植など、体性幹細胞を用いた一部の治療法が臨床応用の段階であり、その他の多くは研究段階である。これらの先進的な治療法には大きな期待がかかっている一方で、克服すべき課題も多い。今後はこれらの課題を一つひとつ解決していき、臨床応用を実現していく必要がある。そして我々は、臨床を開始するだけでなく臨床応用された治療方法をより安全でより有効なものとし、広めていくように努力していかなければならないと考える。

### ■文 献

- 1) Langer R & Vacanti JP : Tissue engineering. *Science*, **260** : 920-926, 1993.
- 2) Rheinwald JG & Green H : Serial cultivation of human epidermal keratinocytes : The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, **6** : 331-343, 1975.
- 3) Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, et al : Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med*, **311** : 448-451, 1984.
- 4) Pellegrini G, Traverso CE, Franzini AT, et al : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*, **349** : 990-993, 1997.
- 5) Tsai RJ, Li LM & Chen JK : Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med*, **343** : 86-93, 2000.
- 6) Rama P, Bonini S, Lambiase A, et al : Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency.

- Transplantation, **72** : 1478-1485, 2001.
- 7) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al : Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*, **351** : 1187-1196, 2004.
- 8) Sumide T, Nishida K, Yamato M, et al : Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J*, **20** : 392-394, 2006.
- 9) Takahashi K & Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126** : 663-676, 2006.
- 10) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131** : 861-872, 2007.

---

(別刷請求先) 大家義則 〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1 東北大学大学院医学系研究科神経感覚器病態学講座・眼科視覚科学分野

# A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction

Yoshinori Oie,<sup>1,2</sup> Ryuhei Hayashi,<sup>1</sup> Ryo Takagi,<sup>3</sup> Masayuki Yamato,<sup>3</sup> Hiroshi Takayanagi,<sup>4</sup> Yasuo Tano,<sup>2</sup> Kohji Nishida<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology and Visual Science, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School, Suita, Japan

<sup>3</sup>Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

<sup>4</sup>Translational Research Center, Tohoku University, Sendai, Japan

## Correspondence to

Dr Kohji Nishida, Department of Ophthalmology and Visual Science, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai 980-8574, Japan; knishida@oph.med.tohoku.ac.jp)

Accepted 20 February 2010

## ABSTRACT

**Background/aims** To cultivate human oral mucosal epithelial cell sheets with post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction.

**Methods** Human oral mucosal epithelial cells obtained from three healthy volunteers were cultured with x-ray-treated dermal fibroblasts (fibroblast group) and NIH/3T3 feeder layers (3T3 group) on temperature-responsive culture dishes. Media were supplemented using clinically approved products. Colony-forming efficiency was determined in both groups. Histological and immunohistochemical analyses were performed for cell sheets. Cell viability and purity of cell sheets were evaluated by flow cytometry.

**Results** Colony-forming efficiency in the fibroblast group was similar to that in the 3T3 group. All cell sheets were well stratified and harvested successfully. The expression patterns of keratin 1, 3/76, 4, 10, 12, 13, 15, ZO-1 and MUC16 were equivalent in both groups. The percentage of p63-positive cells in the fibroblast group ( $46.1 \pm 4.2\%$ ) was significantly higher than that in the 3T3 group ( $30.7 \pm 7.6\%$ ) ( $p=0.038$ , *t* test). The cell viability and purity were similar between the two groups.

**Conclusion** This novel culture method using dermal fibroblasts and pharmaceutical agents provides a safe cell processing system without xenogenic feeder cells for ocular surface reconstruction.

Tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium have been successfully used to reconstruct eyes affected with severe ocular surface disorders.<sup>1,2</sup> However, it is possible that murine fibroblast feeder layers used for human transplantation can transmit murine diseases. In addition, it has been reported that human embryonic stem cells cultured on mouse feeder layers generate immunogenic non-human sialic acid.<sup>3</sup> Therefore, a new processing method that does not use animal-derived material should be developed to avoid this problem.

The use of human adipose tissue-derived and bone marrow-derived mesenchymal stem cells is reported to generate transplantable epithelial cell sheets.<sup>4,5</sup> The risks associated with xenogenic feeder layers can be avoided with these methods. However, the harvesting of adipose tissue or bone marrow is invasive; therefore, an alternative cell source for feeder layers is required for autologous cell therapy.

Dermal fibroblasts have been used as a feeder layer to culture skin keratinocytes,<sup>6,7</sup> and dermal fibroblast can be easily cultured.<sup>8</sup> It is thus thought that dermal fibroblasts can be utilised as an alternative candidate for mesenchymal stem cells or NIH/3T3 cells in culturing oral mucosal epithelial cells.

The supplements in conventional keratinocyte culture medium (KCM) are reagents used for laboratory research. The laboratory-grade supplements in KCM should be replaced with pharmaceutical products approved by the Ministry of Health, Labour and Welfare for clinical application. Modified KCM, which adopted the use of clinical agents as culture supplements, was equally as efficient as conventional KCM in the fabrication of canine, transplantable, stratified epithelial cell sheets.<sup>9</sup>

In particular, we investigated a novel culture method of human oral mucosal epithelial cell sheets using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified KCM with clinically approved supplements.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of feeder layers

Human dermal tissues were obtained from three healthy volunteers who provided written informed consent. Human tissue was handled according to the Declaration of Helsinki.

Dermal fibroblasts were cultured using the explant procedure.<sup>8</sup> To prepare feeder layers, human dermal fibroblasts were lethally irradiated with 40 Gy and then trypsinised and seeded onto tissue culture dishes (60 mm diameter; BD Biosciences, San Diego, California, USA) at a density of  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> (fibroblast group). As a positive control, lethally irradiated NIH/3T3 cells were prepared at a density of  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> (3T3 group).

### Reverse transcription PCR

Total RNA was obtained from human dermal fibroblasts and NIH/3T3 cells using the GenElute mammalian total RNA kit (Sigma, St Louis, Missouri, USA). Reverse transcription was performed with the SuperScript First-Strand Synthesis System for reverse transcription PCR (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), according to the manufacturer's suggested protocol, and cDNA was used as the template for PCR. The reverse transcription PCR thermocycle programme consisted of an initial step at 94°C for 5 min and 30 cycles at 94°C for 30 s and 58°C for 30 s and 72°C

for 30 s (PCR Thermal Cycler MP; Takara, Shiga, Japan). The primer pairs are shown in table 1.

### Preparation of modified KCM

Modified KCM was supplemented with clinically approved products. The medium consisted of Dulbecco's modified eagle medium and Ham's F12 medium (Gibco-Invitrogen) at a 3:1 ratio, supplemented with 10% autologous human serum, 5 µg/ml insulin (humulin; Eli Lilly, Indianapolis, Indiana, USA), 2 nM triiodothyronine (thyronamin; Takeda, Osaka, Japan), 0.4 µg/ml hydrocortisone (saxizon; Kowa, Tokyo, Japan), 100 nM L-isoproterenol (proternol; Kowa), 2 mM L-glutamine (Gibco), 10 ng/ml epidermal growth factor (Higeta Shoyu, Chiba, Japan), and 40 µg/ml gentamicin (gentacin; Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, USA).

### Oral mucosal epithelial cell culture

Human oral mucosal epithelial tissues were obtained from the same three healthy volunteers, respectively. Therefore, we performed the comparison of the two feeder layers three times in the current study. After the oral cavity of each volunteer was sterilised with topical povidone-iodine, a 3×3 mm specimen of

oral mucosal tissue was surgically excised from the interior buccal mucosal epithelium under local anaesthesia with propitocaine. Oral mucosal epithelial cells were collected by removing all epithelial layers after treatment with dispase II (2.4 U/ml; Invitrogen), at 4°C for 4 h. Separated epithelial layers were treated with trypsin-EDTA (Invitrogen), and resuspended cells were plated on temperature-responsive culture inserts (CellSeed, Tokyo, Japan) at an initial cell density of  $2.0 \times 10^5$  cells/23 mm insert, with feeder cells separated by cell culture inserts.<sup>1</sup> The cells were cultured for 14–17 days.

For colony-forming assays, 3000 or 5000 primary oral mucosal epithelial cells were seeded onto culture dishes (60 mm diameter; BD Biosciences) with irradiated feeder layers. After cultivation for 10–12 days, dishes were fixed and stained with rhodamine B. Colony-forming efficiency was defined as the ratio of the number of colonies to the number of cells inoculated. Colony size was also calculated using scanned photos of stained dishes with Axio Vision LE (Carl Zeiss, Jena, Germany).

### Cell morphology

Cultured epithelial cells were observed under a phase contrast microscope, and microphotographs were taken at 100-fold magnification (Axiovert40; Carl Zeiss) to examine cell morphological aberrations and deficits.

### Sheet recovery test

After examination with phase contrast microscopy, cultured epithelial cells were subjected to incubation at 20°C for 30 min. Then, a donut-shaped support membrane (18 mm outer diameter, 10 mm inner diameter, polyvinylidene difluoride; Millipore, Bedford, Massachusetts, USA) was placed on the epithelial cells. Finally, cells were challenged with harvesting in the presence of support membranes. Harvested epithelial cell sheets were divided into two parts. Half of the cell sheets were subjected to flow cytometry and the other half were subjected to histological analyses.

### Cell viability and epithelial cell purity

Cell viability was evaluated with a dye exclusion test. An aliquot of cell suspension was incubated in Dulbecco's modified eagle medium with 7-aminoactinomycin D (BD Biosciences) staining at room temperature for 10 min, and subjected to flow cytometry (FACS Calibur; BD Biosciences).

After trypsin-EDTA treatment, an aliquot of the cell suspension was centrifuged, fixed and permeabilised with the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Then, the cell suspension was split into two tubes, and incubated with either a FITC-conjugated anti-pancytokeratin IgG2a antibody (clone Pan1-8; Progen, Heidelberg, Germany) or a FITC-conjugated mouse control IgG2a antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) at room temperature for 60 min. After being washed twice with PBS, nuclei were stained with 7-aminoactinomycin D and the cells were examined by flow cytometry.

### H&E staining and immunofluorescence analyses

The portion of cell sheets to be used in histological analyses was divided into two quadrants. One quadrant was fixed with formalin and embedded in paraffin. H&E staining was performed to observe the morphology and degree of stratification of the cultured epithelial cells. Microphotographs were taken with a light microscope (BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan).

The other quadrant of cell sheets was embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Seiki, Tokyo, Japan) and processed into

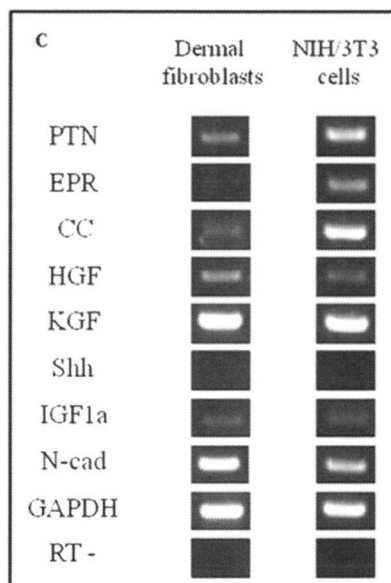
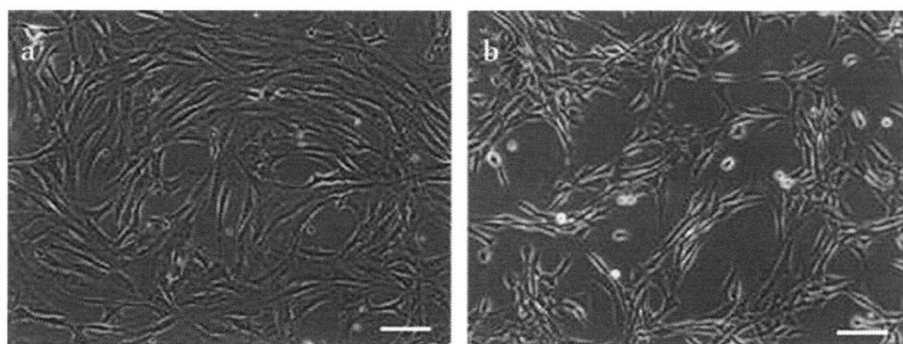
**Table 1** Primer sequences

| Gene   | Primer sequence (5' → 3')  | Product size (bp) |
|--------|--|-------------------|
| hPTN   | Forward: AGAGGACGTTTCCAAC TCA<br>Reverse: TATGTTCCACAGGTGACATC         | 551               |
| hEPR   | Forward: AGGAGGATGGAGATGCTCTG<br>Reverse: TCAGACTTGGGGCAACTCTG         | 498               |
| hCC    | Forward: TCCTCTCTATCTAGCTCCAG<br>Reverse: TCCTGACAGGTGGATTTCCGA        | 500               |
| hHGF   | Forward: GCCTGAAAGATATCCCGACA<br>Reverse: TTCCATGTTCTTGCCACACA         | 523               |
| hKGF   | Forward: AGGCTCAAGTTGCACCAGGCA<br>Reverse: TGTGTGTCGCTCAGGGCTGGA       | 495               |
| hShh   | Forward: CGGAGCGAGGAAGGAAAG<br>Reverse: TTGGGGATAAACTGCTGTAGGC         | 262               |
| hIGF1a | Forward: ATGCACACCATGTCCTC<br>Reverse: CATCCTGTAGTCTTGTTC              | 390               |
| hN-cad | Forward: ATGCTGACGATCCCAATTG<br>Reverse: GATGTCTACCTGTTCTCA            | 317               |
| hGAPDH | Forward: ACCACAGTCCATGCCATCAC<br>Reverse: TCCACCACCCTGTGTGCTGTA        | 452               |
| mPTN   | Forward: GGACCTCTGCAAGCCAAAAA<br>Reverse: GCAGCTCAGCTCCAACTGCTTC       | 317               |
| mEPR   | Forward: AGCTGCACCGAGAAAGAAGGA<br>Reverse: AGAAGTGCTCACATCGCAGACC      | 318               |
| mCC    | Forward: AGCTCTGGCTGGAGTGAAC TA<br>Reverse: CCTGCAGCAGCTCCTTTACTGT     | 343               |
| mHGF   | Forward: GGTGAAAGCTACAGAGGTCCCA<br>Reverse: ATGGTATTGCTGGTCCCTCG       | 314               |
| mKGF   | Forward: CGAGGCAGACAGCAGACCGG<br>Reverse: GTGTCGCTCGGGCTGGAAC          | 504               |
| mShh   | Forward: CCCAAAAGCTGACCCCTTTAG<br>Reverse: TCCACTGCTCGACCCTCATAGT      | 335               |
| mIGF1a | Forward: TATGGCTCCAGCATTCCGA<br>Reverse: GCGGTGATGTTGTCATTTCT          | 319               |
| mN-cad | Forward: AGAGGGATCAAAGCTGGGACGTAT<br>Reverse: TCCACCCTGTTCTCAGGGACTCTC | 360               |
| mGADPH | Forward: ATCACTGCCACCAGAGACTG<br>Reverse: TGCTGTTGAAGTCGACAGGAGA       | 325               |

CC, cystatin C; EPR, epiregulin; GAPDH, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; h, human; HGF, hepatocyte growth factor; IGF1a, insulin-like growth factor 1a; KGF, keratinocyte growth factor; m, mouse; N-cad, N-cadherin; PTN, pleiotrophin; Shh, sonic hedgehog.



**Figure 1** Feeder layers. Human dermal fibroblasts (a) and NIH/3T3 cells (b) were examined using phase-contrast microscopy. Gene expression was analysed by reverse transcription PCR. Both human dermal fibroblasts and NIH/3T3 cells expressed many factors for the maintenance of stem/progenitor cells and the growth of epithelial cells (c). Scale bars: 100  $\mu$ m (a, b). CC, cystatin C; EPR, epiregulin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HGF, hepatocyte growth factor; IGF1a, insulin-like growth factor 1a; KGF, keratinocyte growth factor; N-cad, N-cadherin; PTN, pleiotrophin; Shh, sonic hedgehog.



3- $\mu$ m thick frozen sections. Cryosections from the cell sheets were immunostained with monoclonal antibodies against keratin 1 (K1, LHK1; Abcam, Cambridge, UK), keratin 3/76 (K3/76, AE5; Progen), keratin 4 (K4, 6B10; Abcam), keratin 10 (K10, DE-K10; DakoCytomation, Glostrup, Denmark), keratin 13 (K13, 1C7; American Research Products, Belmont, Massachusetts, USA), keratin 15 (K15, LHK15; Millipore), p63 (4A4; Santa Cruz Biotechnology), ZO-1 (1A12; Zymed, South San Francisco, California, USA), MUC16 (Ov185; Abcam), a polyclonal antibody against keratin 12 (K12, L-15; Santa Cruz Biotechnology), followed by incubation with Alexa488-labelled secondary antibodies (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Nuclei were co-stained with Hoechst 33342 (Sigma), and the cell sheets were mounted with PermaFluor (Beckman Coulter, Miami, Florida, USA). Slides were observed using confocal laser scanning microscopy (LSM-710; Carl Zeiss). The same concentration of corresponding normal, non-specific IgG was used as negative control. The percentage of p63 and K15-positive cells in each cultured cell sheet was calculated.

### Statistical analysis

Data were analysed using t tests;  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### RESULTS

Human dermal fibroblasts had morphological characteristics similar to those of NIH/3T3 cells (figure 1a,b). The gene expression pattern of dermal fibroblasts was similar to that of

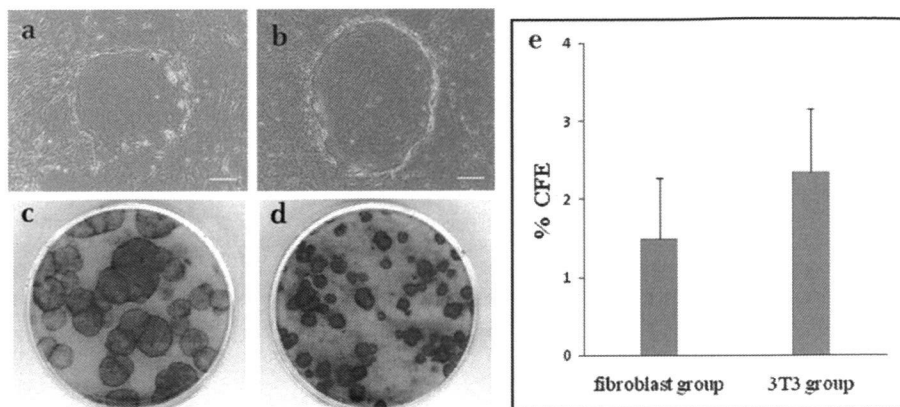
NIH/3T3 cells (figure 1c). Although dermal fibroblasts did not express epiregulin (EPR), other genes including pleiotrophin (PTN), cystatin C (CC), hepatocyte growth factor (HGF), keratinocyte growth factor (KGF), insulin-like growth factor 1a (IGF1a) and N-cadherin (N-cad) were expressed by both dermal fibroblasts and NIH/3T3 cells.

Colony-forming assays revealed that human dermal fibroblasts as well as NIH/3T3 cells are able to support the ex-vivo expansion of oral mucosal epithelial cells (figure 2a–d). The mean colony-forming efficiency of the primary cultures was  $1.5 \pm 0.8\%$  in the fibroblast group and  $2.3 \pm 0.8\%$  in the 3T3 group (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ) (figure 2e), and the difference was not statistically significant ( $p=0.266$ , t test). The colony size in the fibroblast group ( $15.0 \pm 11.5 \text{ mm}^2$ ) was larger than that in the 3T3 group ( $6.4 \pm 2.1 \text{ mm}^2$ ). However, the difference was not statistically significant ( $p=0.271$ , t test).

Oral mucosal epithelial cell sheets were successfully cultured with human dermal fibroblasts and NIH/3T3 cells (figure 3a,b), and all of the cell sheets were successfully harvested by reducing the temperature to  $20^\circ\text{C}$  for 30 min. Therefore, all of the cell sheets passed the recovery test. The harvested cell sheets in both groups, flattened at their basal and apical surfaces, were composed of four to five layers of small basal cells, flattened middle cells and polygonal flattened superficial cells (figure 3c,d).

Immunofluorescence analyses revealed that cell sheets in both groups have a similar marker expression pattern (figure 4). K3/76, a marker for corneal and oral mucosal differentiated epithelial cells,<sup>10</sup> was positive in both groups. K12,

**Figure 2** Colony-forming assay. Human dermal fibroblasts (a) as well as NIH/3T3 cells (b) supported the ex-vivo expansion of human oral mucosal epithelial cells. Cells were cultured for approximately 10 days, followed by fixation and staining with rhodamine B (c, dermal fibroblasts; d, NIH/3T3 cells). Colony-forming efficiency (CFE) was calculated, and no statistically significant differences were found between the human dermal fibroblasts and NIH/3T3 cells (e). Scale bars 100  $\mu$ m (a, b).

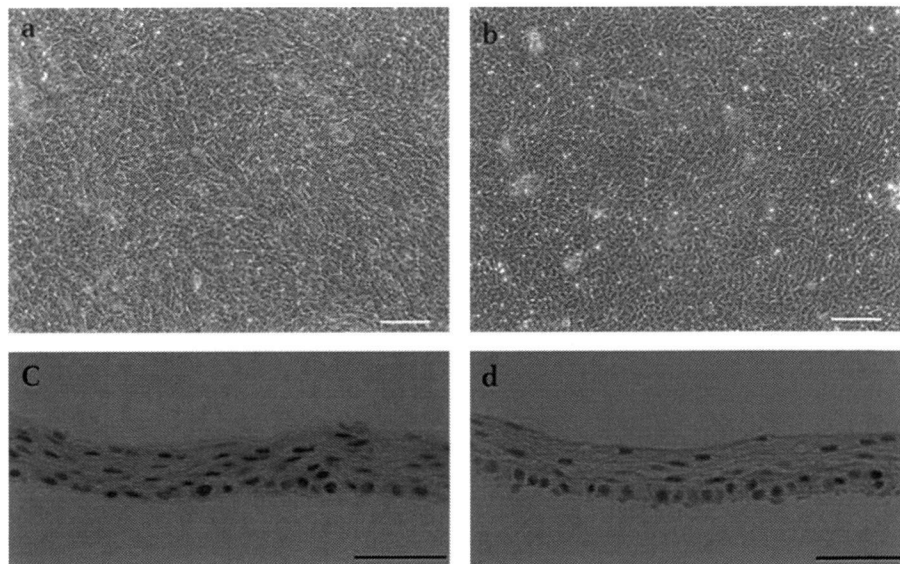


a corneal-epithelium-specific marker,<sup>10</sup> was not expressed in either group. Although K4 and K13 are markers for mucosal stratified squamous epithelia,<sup>11 12</sup> only K4 was detected in the superficial cells in both groups. K1 and K10, markers for supra-basal cells in the epidermis,<sup>13</sup> were negative in both groups. ZO-1, a marker of tight junctions,<sup>14</sup> and MUC 16, a membrane associated-mucin specific to ocular surfaces, were expressed in both groups.

p63, which has been proposed to be a corneal epithelial stem/progenitor cell marker,<sup>15</sup> was expressed in the basal cells of both groups (figure 5a,b). The percentage of p63-positive cells in the fibroblast group ( $46.1 \pm 4.2\%$ ) was significantly higher than that in the 3T3 group ( $30.7 \pm 7.6\%$ ) ( $p=0.038$ , t test) (figure 5e). K15, a specific basal cell component of the epidermis and other stratified squamous epithelia,<sup>16</sup> was positive in basal cells in both groups (figure 5c,d). There were no significant differences between the percentages of K15-positive cells in the fibroblast group ( $24.0 \pm 3.7\%$ ) and the 3T3 group ( $20.6 \pm 2.5\%$ ) ( $p=0.257$ , t test) (figure 5f).

The cell viability of the cultured cell sheets in the fibroblast group and the 3T3 group was  $88.7 \pm 4.1\%$  and  $85.9 \pm 3.5\%$ , respectively. The purity of the epithelial cells in the cultured sheets was  $98.2 \pm 1.9\%$  and  $96.3 \pm 3.6\%$ , respectively. There were no statistical differences in cell viability ( $p=0.408$ , t test) or purity ( $p=0.466$ , t test) between the groups.

**Figure 3** Human oral mucosal epithelial cell sheets. Examination of cell morphology was performed using phase-contrast microscopy (a, dermal fibroblasts; b, NIH/3T3 cells) and H&E staining (c, dermal fibroblasts; d, NIH/3T3 cells). Scale bars 100  $\mu$ m (a, b), 50  $\mu$ m (c, d).

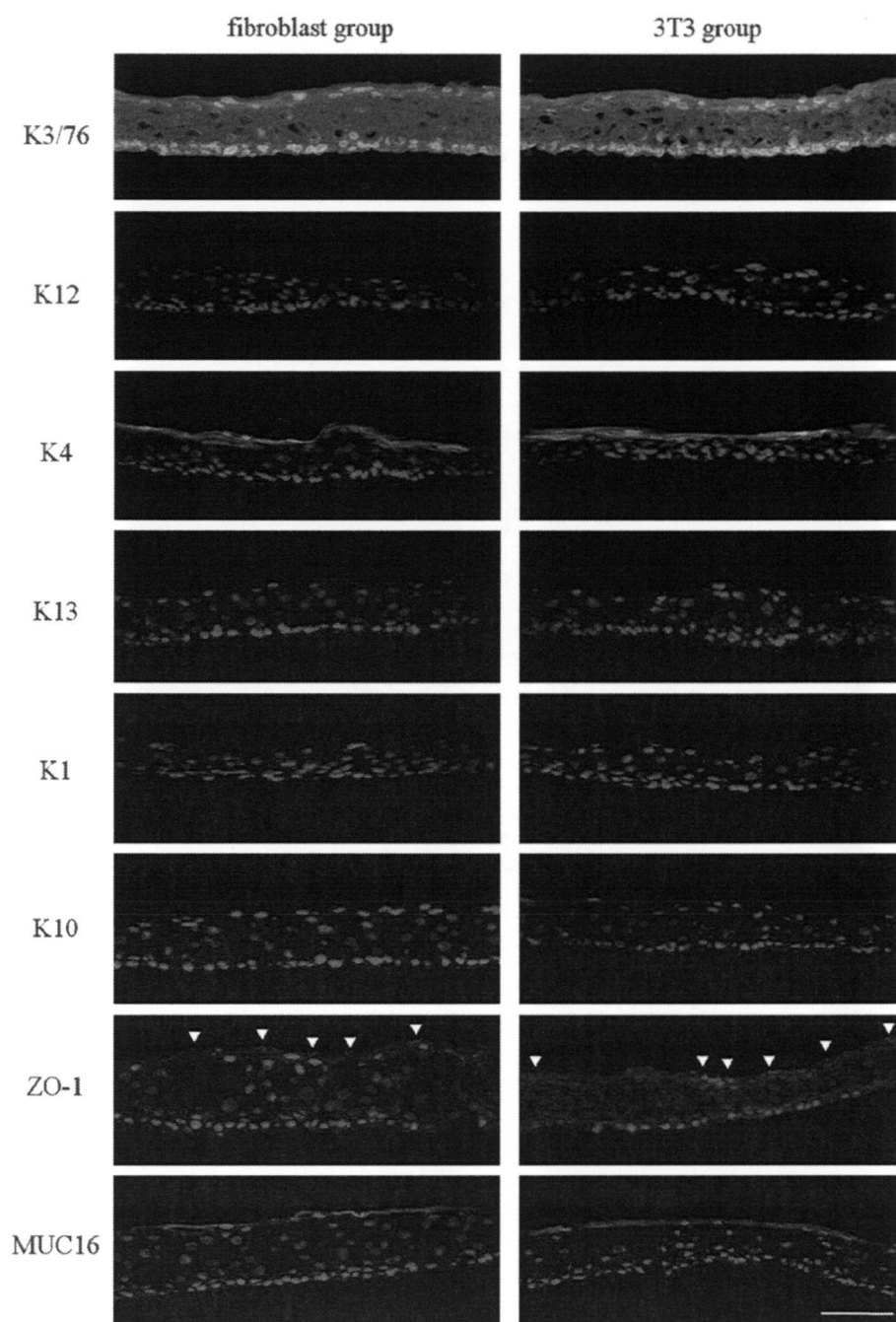


## DISCUSSION

Dermal fibroblasts were shown to express many genes required for the maintenance of epithelial stem/progenitor cells and the proliferation of epithelial cells. Sugiyama *et al*<sup>4</sup> reported the expression of PTN, EPR, CC, HGF, KGF and IGF1a by human mesenchymal stem cells. In the current study, human dermal fibroblasts were confirmed to express N-cadherin in addition to these factors. The colony-forming efficiency with human dermal fibroblasts was similar to that with NIH/3T3 cells, and a colony-forming assay revealed that human dermal fibroblasts can expand oral mucosal epithelial cells well. In addition, immunofluorescence analyses revealed that cell sheets cultured with human dermal fibroblasts, as well as with NIH/3T3 cells, expressed markers such as K3/76, ZO-1, MUC16, p63, and K15. Moreover, cell sheets cultured with human dermal fibroblasts contained more p63-positive cells than those cultured with NIH/3T3 cells. Therefore, it was suggested that human dermal fibroblasts can maintain stem/progenitor cells in expansion more efficiently than NIH/3T3 cells.

The cultivation of epithelial cells with 3T3 feeder layers has been already established.<sup>18</sup> Also, a number of investigators has reported positive results for clinical treatments with cultured epithelial cells using 3T3 feeder layers.<sup>1 18 19</sup> However, 3T3 cells<sup>3</sup> have the potential risk of transmitting murine infectious diseases. The use of xeno-free feeder cells, especially autologous

**Figure 4** Immunohistochemical analyses of human oral mucosal epithelial cell sheets. Staining of human oral mucosal epithelial cell sheets cultured with dermal fibroblasts and NIH/3T3 cells with anti-keratin 3/76 (K3/76), anti-keratin 12 (K12), anti-keratin 4 (K4), anti-keratin 13 (K13), anti-keratin 1 (K1), anti-ZO-1 and anti-MUC16 antibodies. Nuclei were co-stained with Hoechst 33342. ZO-1 expression is marked with arrows. Scale bars 50  $\mu$ m.

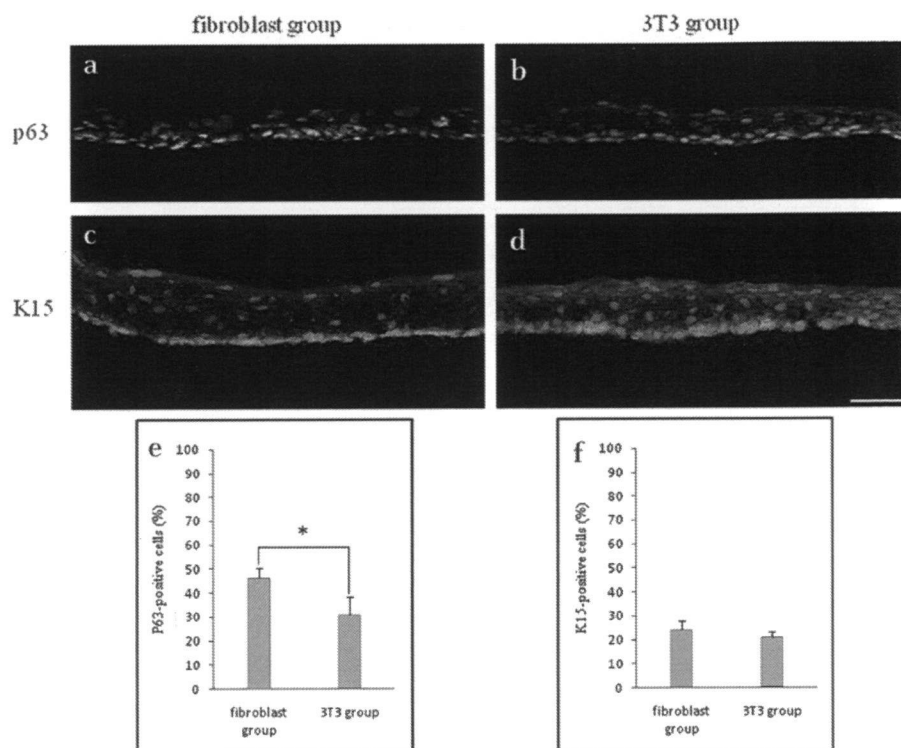


feeder layers, can prevent this problem. Although human adipose tissue-derived or bone marrow-derived mesenchymal stem cells can be used to generate transplantable epithelial cell sheets, dermal fibroblasts can be obtained with much less invasion to patients. Therefore, dermal fibroblasts are more desirable as an autologous feeder cell source than mesenchymal stem cells. Whereas the colony-forming efficiency of human limbal epithelial cells was  $1.9 \pm 1.8\%$  with bone marrow-derived mesenchymal stem cells,<sup>5</sup> that of human oral mucosal epithelial cells was  $1.5 \pm 0.8\%$  with human dermal fibroblasts in the current study. The colony-forming efficiency in these two reports cannot be compared directly, because of differences in

the cultured epithelial cell type, media and sera. However, both feeder layers are thought to be able to generate transplantable epithelial cell sheets.

A xeno-free culture method of keratinocytes derived from skin using human dermal fibroblast has already been reported.<sup>7</sup> Therefore, it is well known that human dermal fibroblasts have a feeder effect on keratinocytes. Here, we cultured oral mucosal epithelial cells using human dermal fibroblast feeder layers. We are planning to use the cultured cell sheets for ocular reconstruction in future experiments. Zakaria *et al*<sup>21</sup> recently reported a new culture and transplantation method of limbal epithelial cells without xenogenic materials. If oral mucosal epithelial cells

**Figure 5** Analyses of human oral mucosal epithelial cell sheets for stem/progenitor markers. Anti-p63 staining (a, b) and anti-keratin 15 (K15) staining (c, d) of human oral mucosal epithelial cell sheets cultured with dermal fibroblasts and NIH/3T3 cells. Nuclei were co-stained with Hoechst 33342. Scale bar 50  $\mu$ m. The percentage of p63-positive cells in the cell sheets cultured with dermal fibroblasts was significantly higher than that in cell sheets cultured with NIH/3T3 cells (e). The percentage of K15-positive cells was not significantly different between the groups (f). \* $p < 0.05$ , t test.



can be cultured successfully, this method can also be an alternative to the method using 3T3 cells.

We recently developed a validation system for tissue-engineered epithelial cell sheets to be used in corneal regenerative medicine.<sup>22</sup> There has been no other established evaluation method for epithelial cell sheets before transplantation to date. However, the quality of cell sheets for clinical use can be standardised even in different facilities. We evaluated cell sheets using our validation method and obtained positive results. We thus believe that the oral mucosal epithelial cell sheets cultured with this method can be successfully used for ocular reconstruction.

It was previously reported that fibroblasts can affect the phenotypic characterisation of keratinocytes in co-culture.<sup>22, 23</sup> However, epithelial cell sheets cultivated in the current study did not express K1 or K10, markers for suprabasal cells in the epidermis. Therefore, we propose that the phenotypic characterisation of keratinocytes cultured in the current study did not reflect that of the epidermis.

We also demonstrated that modified KCM worked well to generate oral mucosal epithelial cell sheets. Many methods using cholera toxin have been reported for the cultivation of human corneal or oral mucosal epithelial cells and human epidermal keratinocytes.<sup>17, 18, 24</sup> Agents known to increase the level of cellular cyclic AMP, including cholera toxin and isoproterenol, have been reported to increase the growth of colonies of cultured human epidermal cells and keratinocytes derived from other stratified squamous epithelia.<sup>25</sup> We also demonstrated the effectiveness of modified KCM with isoproterenol in the current study.

In conclusion, our novel culture system with post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells with clinically approved products is effective and safe. Therefore, this system can be used as an alternative cultivation method for human oral mucosal epithelial cell sheets.

**Funding** This study was funded by the Ministry of Health Labor and Welfare, and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology in Japan.

**Competing interests** None.

**Ethics approval** This study was conducted with the approval of the institutional review board of Tohoku University School of Medicine.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

## REFERENCES

- Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 2004;**351**:1187–96.
- Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004;**88**:1280–4.
- Martin MJ, Muotri A, Gage F, et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 2005;**11**:228–32.
- Sugiyama H, Maeda K, Yamato M, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a novel feeder layer for epithelial cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;**2**:445–9.
- Omoto M, Miyashita H, Shimamura S, et al. The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;**50**:2109–15.
- Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;**76**:1274–8.
- Bullock AJ, Higham MC, MacNeil S. Use of human fibroblasts in the development of a xenobiotic-free culture and delivery system for human keratinocytes. *Tissue Eng* 2006;**12**:245–55.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961;**25**:585–621.
- Takagi R, Yamato M, Yang J. Preparation of keratinocyte culture medium for clinical applications for regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2010; In press. [4]
- Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;**103**:49–62.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;**31**:11–24.
- Cooper D, Schermer A, Sun TT. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest* 1985;**52**:243–56.
- Fuchs E, Green H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 1980;**19**:1033–42.