プログラム

18：00-18：10　開会挨拶

座長：西田　幸二（大阪大学眼科）

進行：大家　義則（東北大学眼科）

18：10-18：20　自己紹介

18：20-18：50　発表および質疑応答

・多施設臨床研究への進行状況について

西田　幸二　（大阪大学眼科）

・施設、患者登録について

山口　拓洋、佐々木　優香（東北大学未来医工学治療開発センター）

18:50-19:50　多施設共同臨床試験についてのディスカッション

19:50-20:00　閉会挨拶

出席者名簿

西田　幸二（大阪大学　眼科学　教授）
天野　史郎（東京大学　眼科学　教授）
山口　拓洋（東北大学　医学統計学分野　教授）
白石　敦　（愛媛大学　眼科学　准教授）
近間　泰一郎（広島大学　眼科学　准教授）
嶋澤　るみ子（長崎大学大学院医薬薬学総合研究科　生命医科学講座　准教授）
辻川　元一（大阪大学　眼科学　助教）
林　竜平（大阪大学　眼科学　助教）
横倉　俊二（東北大学　眼科学　助教）
林田　康隆（大阪大学附属病院・未来医療センター　特任助教）
高柳　泰（東北大学未来医工学治療開発センター　臨床応用部門　助手）
相馬　剛至（大阪大学医学部附属病院　眼科学　医員）
佐々木　優香（東北大学未来医工学治療開発センター　検証・情報管理部門　データマネージャー）
大家　義則（東北大学病院　眼科学　医員）

「自家培養口腔粘膜上皮シート移植による
角膜上皮再生治療法の多施設共同臨床試験」班
（H21-臨床研究-一般-014）
平成 22 年度第 2 回班会議
議事録

出席者：大阪大学：西田幸二、林竜平、林田康隆、相馬剛至
東京大学：天野史郎
愛媛大学：白石敦
広島大学：近間泰一郎
東北大学：山口拓洋、横倉俊二、高柳泰、佐々木優香、大家義則
長崎大学：嶋澤るみ子（敬称略）
日時：平成 23 年 1 月 29 日（土）　18：00ー20：00
場所：国立京都国際会館 1F　Room101
書記：大家義則

発表
・多施設共同臨床研究への進行状況について
西田幸二、大家義則より下記内容が報告された。
・大阪大学・東北大学の課題「角膜上皮幹細胞疲弊症に対する自己培養口腔粘膜上皮細胞シートの臨床試験」が厚生労働大臣から許可された。(1 月 4 日付)
・本試験の試験計画について
角膜上皮幹細胞疲弊症に対する治療を行う。3 年間のうちで患者のリクルートおよび手術までを終了する。4 施設でおのおの 3 例を組み入れて対象症例は 12 例とする。主要評価項目は 1 年後の結膜化がなく、かつ上皮欠損のない面積をグレーディングをもちいて評価する。有効性副次的評価項目は視力（矯正視力：小数視力により評価）、角膜血管新生、角膜混濁とする。安全性副次的評価項目は予測される眼合併症の評価、臨床検査値変動を含むすべての有害事象とする。
・輸送容器の開発について
東北大学で作製した培養細胞シートを大阪大学へ輸送して細胞シートの評価を行った。ウサギ細胞シートおよびヒト細胞シートについて 4-5 時間の輸送に関しては空輸が可能であることを確認した。

臨床試験の開始手順として、施設登録・患者登録の方法について山口、佐々木より下記内容が説

明された。
施設登録について
・CPC の準備等含め、試験開始準備が整う 4 月を目途にデータセンターより　関連書類を送付する。その後、各施設は施設登録を実施する。
・IRB の承認通知書、施設登録依頼書、臨床検査基準値一覧を　データセンターに FAX 送付し、登録を行う。
・データセンターに送付した書類および、データセンターからの登録完了の　通知は各施設で保管すること。
・施設登録完了後、患者登録が可能となる。
・登録された医師のみが、患者を登録することができる。
患者登録について
・大阪大学と東北大学で登録方法が異なる。大阪大学は仮登録・本登録の
　2 段階登録、東北大学は患者登録は 1 度のみ。
・患者登録票をデータセンターに FAX 送付し、登録を行う。
・データセンターに送付した書類および、データセンターからの登録完了の
　通知は各施設で保管すること。
なお、試験開始前に、データセンターより関連資料として手順等が記載された
記入の手引きが送付されるので、実際の登録はそちらを参照し実施すること。

議題および決定事項
・輸送当日の手術を念頭に輸送後 12 時間おいて細胞シートの状態を確認する研究を追加することとする。そして倫理審査委員会およびヒト幹指針用の書類を作製する（大家担当）。
・大阪―松山便が ANA のみとなった。やはり ANA 便における輸送の検討が必要となると考えられる。
・細胞シート輸送中の温度、気圧関連のデータは製造施設に保存することとする。
・広島大学は厚労科研の枠組みとは別に実施施設の一つとして研究を進める。
・重篤な有害事象が発生した場合、すぐに状況を実施施設からデータセンターに書面をファックスする。データセンターはこれを全実施施設へと e-mail にてすぐに知らせる。
・予期される有害事象のうちグレード 3 以上のものについては 1 カ月に 1 回各実施施設からデータセンターへ状況をファックスにて送り、データセンターからは全実施施設へ e-mail にて知らせる。
・有害事象報告用の CRF を作製する（データセンター担当）。
・有害事象共有に関する点はプロトコールに記載することとして、実施施設の倫理委員会へかけて修正する。
・大阪大学、東北大学については共同で高度医療へ申請を行う。（大阪大学・林田先生が担当）東

大・愛媛大についてもヒト幹指針承認後に高度医療の承認を目指す。

研究成果の刊行に関する一覧表

論文タイトル （雑誌名、巻頁数）	刊行年	刊行書店名	執筆者氏名
角膜再生医療(bios, vol.15-Ⅱ)	2010	ライフメディコム	大家義則、西田幸二
新たな多能性幹細胞'Muse細胞'の発見 （再生医療, vol.9 No.4)	2010	メディカルレビュー	林竜平、西田幸二
再生医療　Bio Research & Trial	2010	バイオプレス	林竜平、西田幸二

刊行書籍又は雑誌名 （雑誌のときは雑誌名　巻頁数　論文名）	刊行年	執筆者氏名
Gastrointest Endosc. 2010 Dec;72(6):1253-9. Fabrication of human oral mucosal epithelial cell sheets for treatment of esophageal ulceration by endoscopic submucosal dissection.	2010	Takagi R, Murakami D, Kondo M, Ohki T, Sasaki R, Mizutani M, Yamato M, Nishida K, Namiki H, Yamamoto M, Okano T
Biochem Biophys Res Commun. 2010 Aug 27;399(3):373-8. New culture technique of human eliminable feeder-assisted target cell sheet production.	2010	Takamatsu F, Inoue T, Li Y, Hori Y, Maeda N, Tano Y, Nishida K
Clin Ophthalmol. 2010 Oct 21;4:1181-7. Fluoroquinolone antibacterial eye drops: effects on normal human corneal epithelium, stroma, and endothelium.	2010	Watanabe R, Nakazawa T, Yokokura S, Kubota A, Kubota H, Nishida K
Biomaterials. 2011 Feb;32(4):1080-90. Irreversible optical clearing of sclera by dehydration and cross-linking.	2010	Tanaka Y, Kubota A, Yamato M, Okano T, Nishida K
Jpn J Ophthalmol. 2010 Sep;54(5):494-8. Chromosomal sharing in atypical cases of gelatinous drop-like corneal dystrophy.	2010	Tsujikawa M, Maeda N, Tsujikawa K, Hori Y, Inoue T, Nishida K
Biomaterials. 2010 Dec;31(34):8996-9005. Flow-manipulated, crosslinked collagen gels for use as corneal equivalents.	2010	Duncan TJ, Tanaka Y, Shi D, Kubota A, Quantock AJ, Nishida K
Br J Ophthalmol. 2010 Sep;94(9) 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.	2010	Oie Y, Hayashi R, Takagi R, Yamato M, Takayanagi H, Tano Y, Nishida K

Key Word

角膜再生医療

1. はじめに

「再生医療」という言葉が、近年注目を浴びている。現在まで対症療法のみであったさまざまな治療を、培養細胞や人工のマテリアルを用いることで根治療法へと変換し、大きなパラダイムシフトとなる可能性を秘めているからである。

われわれはその中でも眼科領域とりわけ角膜の新規再生治療法を開発し、臨床応用を行っている。角膜は上皮、実質、内皮の三層に分かれるが、現在までに臨床応用に至っているのは角膜上皮の再生のみである。角膜上皮は4～5層からなる厚さ50 μmの非角化重層扁平上皮であり、角膜上皮の幹細胞は、輪部といわれる角膜と結膜の境界の基底部に存在すると考えられている。

角膜上皮細胞は常に脱落し、turn overを繰り返しているが、輪部に存在する角膜上皮幹細胞が正常であれば、幹細胞から供給された角膜上皮細胞が角膜表面を覆い、角膜の恒常性は保たれる。また、角膜上皮細胞が何らかの原因で障害された場合も輪部の角膜上皮幹細胞が盛んに分裂して、上皮の損傷を修復する。

Stevens-Johnson症候群やアルカリ腐蝕などによって、輪部に存在する角膜上皮の幹細胞が完全に消失した幹細胞疲弊症となると、混濁を伴った上皮が結膜から角膜上へ侵入し、角膜の透明性が失われる。その結果、視力は手動弁や指数弁といった社会的には失明と考えられるような状態となり、患者のQOLは著しく低下する。

2. 自家培養口腔粘膜上皮細胞シートを用いた眼表面再建術

従来の治療法は献眼を用いた角膜移植であったが、他家細胞を用いるため拒絶反応の危険性があり、さらに極めて深刻なドナー不足に陥っていることから、移植がなかなか受けられないことが問題とされていた。これらの問題を一気に解決できる手法として、われわれは自家培養口腔粘膜上皮細胞シートを用いた眼表面再建術を確立し、臨床応用している（図1）[1),2)]。

具体的には患者自身の口腔粘膜上皮組織を採取し、そこから上皮細胞を単離する。これを温度応答性培養皿上でフィーダー細胞と共培養することで、培養上皮細胞シートを作製する。出来上がった培養上皮細胞シートは20℃の低温処理によって剥離を行い、移植に用いる。培養上皮細胞シート作製の細胞源として口腔粘膜上皮細胞を用いることで、完全に角膜上皮の幹細胞を消失してしまった両眼性の幹細胞疲弊症患者にも適応できるようになった。また、培養に温度応答性培養皿を用いることで、従来細胞シートの移植に必須であった酵素処理や器質を用いずに移植が行うことができるようになった。温度応答性培養皿は、32℃以上ではhydrophobic（疎水性）であることから、37℃の培養条件下では培養面に細胞が接着する。しかしこれを32℃

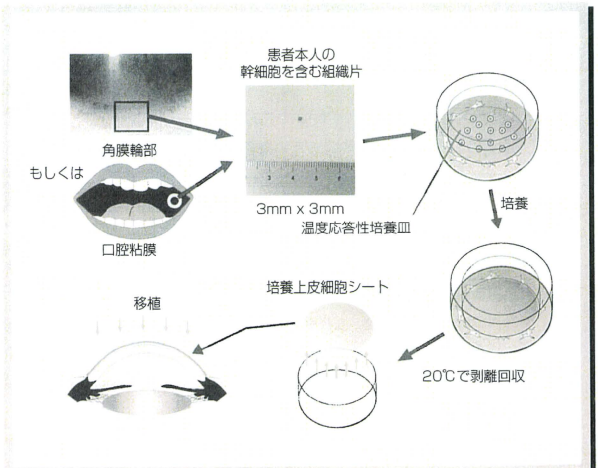


図1　自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植

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
大家義則

おおいえ　よしのり/2001年大阪大学医学部卒業。同年、同大学医学部眼科入局。2003年から大阪労災病院眼科勤務。2006年から西田幸二教授の指導の下、角膜再生医療の研究を行っている。

西田幸二　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
視覚科学分野教授

以下に下げることで表面がhydrophilic（親水性）へと変化し、細胞剥離表面となる。この性質を用いた20℃の低温処理という細胞にとっても極めて低侵襲な状態で培養上皮細胞シートが剥離できる。また、この手法によって、細胞間接着分子であるカドヘリンや基底膜との接着分子であるインテグリン、さらに細胞外マトリックスを保持したまま培養上皮細胞シートの回収が可能であり、培養上皮細胞シートをready to useの状態で回収することができる。また、基質の使用についてはフィブリンや羊膜などを用いる方法も報告されている[3),4),5)]が、これらの方法では動物あるいは他家由来成分による感染症の伝播の危険性や生体適合性の問題がある。われわれはこの方法による自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植によって、長期にわたる視力改善を得られることを確認している（図2）。

3. 角膜再生医療の課題

このように角膜上皮細胞に対する再生医療については、すでに臨床応用が始まっているものの、角膜実質や角膜内皮細胞の再生についてはまだ研究段階である。

とりわけ角膜内皮細胞の再生医療については、わが国における角膜移植の原因疾患の半数以上が角膜内皮疾患である水泡性角膜症であることから、その必要性は極めて高いと考えられている。しかしながら、現在までのところ臨床応用へは至っていない。その理由として、対象となる水泡性角膜症患者の角膜内皮細胞を増殖させることは極めて困難であること、さらに口腔粘膜上皮細胞を角膜上皮細胞の代用として用いたように角膜内皮細胞の代用となるような細胞源がほかに見当たらないことが挙げられる。

しかしながら、これらの課題を克服して近い将来に角膜内皮の再生医療への実現に向け、現在、われわれも眼由来の幹細胞やiPS細胞など、さまざまな細胞源を用いた角膜内皮再生の研究に取り組んでいる最中である。

4. 角膜再生医療のこれから

角膜の再生治療については一部がすでに臨床応用の段階であり、その他の多くは研究段階である。

臨床応用されたものについては、これをさらに進めて一般医療として広める努力をすべきである。また、研究段階のものは問題点をひとつひとつ解決し、これらの疾患によって苦しんでいる人の治療に一日でも早く用いることができるように努力する必要がある。

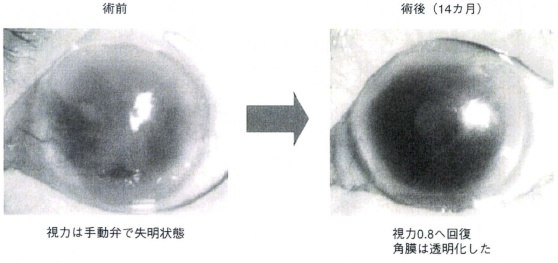


図2　自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植の手術前後の前眼部写真

文献

1) 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;351:1187-1196.
2) 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 2004;77:379-385.
3) Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al:Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. Lancet. 1997;349:990-993.
4) Tsai RJ, Li LM, Chen JK:Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. N Engl J Med. 2000;343:86-93.
5) 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;88:1280-1284.

海外文献紹介

新たな多能性幹細胞 “Muse細胞”の発見

Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al:
Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations.
Proc Natl Acad Sci U S A **107**: 8639-8643, 2010

多能性幹細胞といえば，胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）が想起される。2010年に，ヒトの皮下や骨髄間質から，新たな多能性幹細胞“Muse細胞”が単離されたことが報告された。この多能性幹細胞は1細胞より増殖可能でかつ3胚葉に分化可能な細胞で，長時間のトリプシン処理（8～16時間）後においても生存する極めてストレス耐性の高い細胞であることが示されている。さらに，浮遊培養系においてクラスターを形成し，SSEA-3，OCT3/4，Nanog，Sox2などの多能性細胞マーカーを発現していることが明らかにされた。これらの特性から，著者らはこの細胞をMulti-lineage differentiating stress enduring cells（Muse cells）と命名している。このMuse細胞は皮下や骨髄などのヒト成体組織中に保持されており，細胞表面マーカーであるSSEA-3を用いることで，繊維芽細胞や間葉系細胞などから直接FACSなどで容易に単離・濃縮が可能であることも示されている。

これまでに間葉系幹細胞が多分化能を有することは明らかであるが，これら間葉系細胞は不均一な集団であることから，その多能性が，特定の多能性幹細胞により担われているのか，あるいは，特定の系統へのみ分化可能な細胞が複数存在することにより形成されているのか不明であった。今回の報告では，前者の仮説を明確に支持している報告であると考えられ，今後の間葉系幹細胞研究に重要な意味をもつと考えられる。

さらに，Muse細胞は，免疫不全マウスへの移植実験によって，3胚葉への分化は示すものの，テラトーマを形成しないことが示されている。このことは，Muse細胞は多分化能を有しつつ，一方で，異常増殖を伴わずに分化が正常に制御されていることを示している。これらの特徴は，再生医療の細胞源としての利用を考える上で大きな利点となると考えられる。一方で，Muse細胞はES細胞などと比較して，自己複製能においては劣っていると考えられる。しかし，細胞源として考える場合，対象組織の特性に応じて最適な細胞源を使い分ける必要性もあると考えられる。この点から細胞数を必要としない組織再生にはMuse細胞は有望であると考えられる。いずれにせよ，iPS細胞，ES細胞そしてMuse細胞と細胞源の選択肢が広がることは再生医療の発展にとって有益なことと考えられる。

大阪大学大学院医学系研究科脳神経感覚器外科学（眼科学）

林　竜平，西田　幸二

角膜再生

林　竜平、西田　幸二
大阪大学大学院医学系研究科 脳神経感覚器外科学(眼科学)

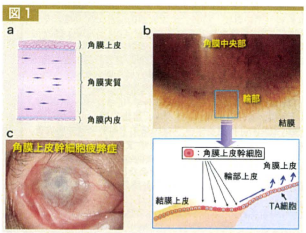
はじめに

角膜は角膜上皮、角膜実質、角膜内皮の3層からなる透明な無血管組織である。角膜疾患のために失明など重篤な視覚障害に至った患者に対して、現在、ドナー角膜を用いた角膜移植法が実施されている。現在の角膜移植は献眼に依存しているが、本邦のみならず全世界的に見ても提供数は絶対的に少なく、多くの患者に対し直ちに移植手術を行うことは困難である。さらに、Stevens-Johnson症候群などの重篤な角結膜疾患では、拒絶反応等のため術後成績は良好ではない。これらのドナー不足および拒絶反応の問題を解決する手段として、患者自身の幹細胞・前駆細胞を用いた再生治療法の開発が進められている。本稿では、筆者らが開発し、既に臨床応用を開始している自家細胞による角膜上皮再生治療法の現状について述べる。

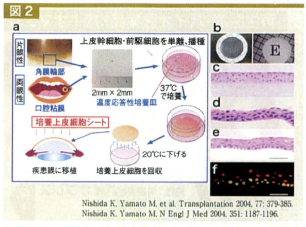
角膜上皮再生治療法

角膜上皮は角膜の最表層に存在する厚さ約50 μmの非角化扁平重層上皮である（図1a）。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。角膜上皮の恒常性は、角膜と結膜の境界に位置する輪部に存在する角膜上皮幹細胞により維持されている。外傷や角膜上皮疾患により、この角膜上皮幹細胞が機能不全に陥ると、幹細胞からの角膜上皮細胞の供給ができなくなり、角膜混濁などの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1c）。そのため、従来の角膜中心部のみを移植する角膜移植法では幹細胞を補給することが出来ず、さらに、他人由来角膜であるため、拒絶反応の問題やドナー不足の問題も抱えていた。

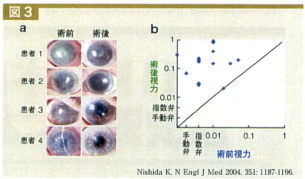
これらの問題を解決する取り組みとして、1997年に患者自身（自家）の細胞を用いた培養角膜上皮移植法が初めて報告された[1]。本手法は、片眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症に対して、患者の健常眼より採取した角膜上皮幹細胞の培養により、培養角膜上皮シートを作製し、疾患眼へ移植する方法である。この報告以降、角膜上皮疾患に対して再生医療のアプローチによる治療法の開発が進められ、拒絶反応の問題解決に寄与してきた[2-4]。しかし一方で、両眼性疾患には適応出来ないことに加え、培養上皮細胞シートの回収方法が課題となっている。つまり、ディスパーゼ等の酵素を用いて培養上皮細胞シートを回収する場合は、酵素処理によるシート自体の脆弱化、また、羊膜やフィブリンゲルなどの基質を用いる場合は安全性や生体適合性の問題が危惧されている。



そこで筆者らは両眼性疾患に適応可能な、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[5]（図2a）。我々は、口腔粘膜上皮にも角膜上皮と同様の粘膜系上皮幹細胞・前駆細胞が存在していることに着目し、口腔粘膜上皮の幹細胞・前駆細胞を細胞源として使用した。つまり、片眼性疾患の場合には、従来法どおり健常眼の輪部上皮を用いるが、両眼性疾患の場合では口腔粘膜上皮より上皮幹細胞・前駆細胞を単離し、温度応答性培養皿上で培養を行った。この温度応答性培養皿は、32度以下に下げると細胞が接着できなくなるため、酵素処理や基質を用いることなく、温度を下げるだけで培養上皮細胞をシート状に回収可能である。回収した培養上皮細胞シートは、*in vivo* 角膜上皮と同様に重層化するだけではなく、基底部には上皮幹細胞・前駆細胞が保持されている（図2c-f）。筆者らは本治療法の動物モデルにおける安全性・有効性を確認し、倫理委員会での承認を得た上で、角膜上皮幹細胞疲弊症患者に対して探索的な臨床研究を既に開始した。その結果、培養上皮細胞シートを移植したほぼすべての症例において角膜の透明性は回復し、少なくとも術後1年間以上にわたって移植した患者自身の幹細胞が生着していると考えられた[6]（図3a-b）。従来の角膜移植法と異なり、本治療法は患者自身の幹細胞を直接補充可能であるため、はこれまでに有効な治療法の無かった角膜上皮幹細胞疲弊症に対してより根治的な治療法になりうると考えている。



Nishida K, Yamato M, et al. Transplantation 2004, 77: 379-385.
Nishida K, Yamato M, N Engl J Med 2004, 351: 1187-1196.



Nishida K, N Engl J Med 2004, 351: 1187-1196.

おわりに

筆者らは再生医学や組織工学に基づいて、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出来たことに大きな意義がある。一方で、両眼性疾患で口腔粘膜上皮細胞シートを移植した場合においては、一部の症例で新生血管の侵入が生じるといった課題があり、さらに角膜内皮疾患に対しては現在のところ再生治療法は開発されていない。これらの問題点に対して、iPS細胞など多能性幹細胞を用いて、角膜上皮や角膜内皮そのものを作り出すことにより新たな再生治療法の研究が必要になってくると考えている。

文献

1) Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. Lancet 1997, 349: 990-993.
2) Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantationof autologous limbal cells. N Engl J Med 2000, 13: 86-93.
3) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. Ophthalmology 2001, 108: 1569-1574.
4) 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 2001, 72: 1478-1485.
5) 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 2004, 77: 379-385.
6) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. Corneal reconstruction using tissue-engineered cell sheets comprising autologous oral mucosal epithelium. N Engl J Med 2004, 351: 1187-1196.

Fabrication of human oral mucosal epithelial cell sheets for treatment of esophageal ulceration by endoscopic submucosal dissection

Ryo Takagi, MSc, Daisuke Murakami, MSc, Makoto Kondo, MSc, Takeshi Ohki, MD, PhD, Ryo Sasaki, DDS, PhD, Manabu Mizutani, PhD, Masayuki Yamato, PhD, Kohji Nishida, MD, PhD, Hideo Namiki, PhD, Masakazu Yamamoto, MD, PhD, Teruo Okano, PhD

Tokyo, Miyagi, Japan

Background: Esophageal stenosis is one of the major complications of aggressive endoscopic resection. Tissue-engineered epithelial cell grafts have demonstrated effectiveness in promoting re-epithelialization and suppressing inflammation causing esophageal scarring and stenosis after endoscopic submucosal dissection (ESD) in an animal model.

Objective: To confirm the reproducibility and efficacy of a human oral mucosal epithelial cell (hOMEC) sheet cultured on temperature-responsive surface in conformity with Good Manufacturing Practice guidelines.

Design: A preclinical study.

Setting: Good Manufacturing Practice grade cell-processing center, animal laboratory.

Subjects: Canine esophageal ulcer models, which were made by ESD.

Interventions: Oral mucosal specimens were obtained from 7 healthy volunteers.

Main Outcome Measurement: Fabricated and transplanted hOMEC sheets were subjected to histological analysis.

Results: The reproducibility of the fabrication of hOMEC sheets was confirmed. In this method, animal-derived materials such as 3T3 feeder layer and fetal bovine serum were successfully excluded from the culture condition. Furthermore, the environment of the culture room and safety cabinet in the cell-processing center was maintained for obtaining sterility assurances during the fabrication. Transplanted hOMEC sheets after ESD were observed to graft onto canine esophageal ulcer surfaces.

Limitations: Small number of subjects, animal model.

Conclusions: Cultured hOMEC sheets were fabricated without animal-derived materials and demonstrated efficacy as a medical device that promotes re-epithelialization of an esophageal ulcer after ESD.

EMR is a relatively noninvasive therapy to remove early-stage cancer in the GI tract compared with open surgery. With the development of endoscopic devices for surgery, a new mucosal resection technique, endoscopic submucosal dissection (ESD), has been developed that permits large en bloc resection of cancerous lesions.[1-3]

Abbreviations: AHS, autologous human serum; CPC, cell-processing center; ESD, endoscopic submucosal dissection; FBS, fetal bovine serum; GMP, Good Manufacturing Practice; hOMEC, human oral mucosal epithelial cell; KCM, keratinocyte culture medium.

DISCLOSURE: *This study was supported by the Formation of Innovation Center for Fusion of Advanced Technologies in the Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT), Japan. All authors disclosed no financial relationships relevant to this publication.*

Copyright © 2010 by the American Society for Gastrointestinal Endoscopy
0016-5107/$36.00
doi:10.1016/j.gie.2010.08.007

Received May 12, 2010. Accepted August 5, 2010.

Current affiliations: Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science (R.T., D.M., M.K., T. Ohki, R.S., M.Yamoto, T. Okano), Department of Surgery, Institute of Gastroenterology (T. Ohki, M. Yamamoto), Department of Oral and Maxillofacial Surgery (R.S.), Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan, Graduate School of Science and Engineering (D.M., M.K., H.N.), Waseda University, Tokyo, Japan, CellSeed Incorporation (M.M.), Tokyo, Japan, Department of Ophthalmology and Visual Science (K.N.), Tohoku University Graduate School of Medicine, Miyagi, Japan.

Reprint requests: Teruo Okano, PhD, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, TWIns, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan.

If you would like to chat with an author of this article, you may contact Dr. Okano at tokano@abmes.twmu.ac.jp.

Moreover, ESD with hook-knives has been applied to the removal of early-stage esophageal cancer.[4] However, large esophageal defects after ESD cause esophageal stenosis.[5] To prevent esophageal stenosis, cultivated autologous oral mucosal epithelial cell grafts are transplanted in a canine esophageal ulcer model endoscopically after ESD, resulting in effectively enhanced wound healing.[6]

To fabricate cell grafts containing cultivated epithelial cells, 3T3 feeder layer is an important factor because, in the process, human epidermal keratinocytes induced colony formation and formed stratified squamous epithelium in the presence of fetal bovine serum (FBS).[7] With the advances in epithelial cell culture methods, cultivated keratinocyte grafts are used in the treatment of skin defects including severe burns,[8] ulcers,[9] and giant congenital nevi.[10] As cultivated epidermal keratinocytes, oral mucosal epithelial cells cocultured with 3T3 feeder layer are used as epithelial cell grafts for gingival defects,[11] skin defects,[12] and corneal reconstruction.[13] However, it is desirable to eliminate the murine 3T3 feeder layer and FBS from the culture for clinical application to reduce possible infectious pathogen transmission from animal-derived materials. Our previous studies demonstrated that temperature-responsive cell culture inserts with micropores are useful for fabricating the stratified epithelial cell grafts without the feeder layer and FBS.[14,15]

In this study, human oral mucosal epithelial cells (hOMECs) obtained from 7 healthy volunteers were cultured for fabricating transplantable hOMEC grafts in a cell-processing center (CPC) following Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines. Moreover, fabricated hOMEC sheets were investigated for showing their effectiveness in clinical use.

Take-home Message

- Cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheets transplanted on an esophageal ulcer after endoscopic submucosal dissection (ESD) can promote re-epithelialization in a canine model. Fabrication of human autologous oral mucosal epithelial cell sheets in accordance with Good Manufacturing Practice (GMP) should be useful to treat esophageal ulceration after ESD.
- GMP-grade cultured epithelial cell sheets were successfully fabricated from oral mucosal epithelial cells of 7 healthy volunteers, and the epithelial cell sheets were confirmed to integrate with the ulcer surfaces of the canine esophagus after ESD within 1 hour.

MATERIALS AND METHODS

GMP-grade CPC

Preparation and cultivation of hOMEC were carried out in a GMP-grade CPC at room temperature; humidity, atmospheric pressure, and cleanliness were regulated and monitored. Moreover, a standard operating procedure was prepared for optimizing the working environment in the CPC and the preparation of hOMEC sheets.

Preparation of cultured hOMECs

This study was approved by the Institutional Review Board of Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan. Oral and written informed consent was obtained from healthy volunteers. After the oral cavity was sterilized with topical povidone-iodine (Iwaki, Tokyo, Japan), punch biopsy samples 5 or 6 mm in diameter of oral mucosal tissue were surgically excised from the buccal mucosal epithelium by using local anesthesia with lidocaine hydrochloride (AstraZeneca, London, UK). Wounds were then sutured.

Biopsy specimens were washed with povidone-iodine (Meiji, Tokyo, Japan) and Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma, St. Louis, MO) and treated with 1000 U/mL dispase (Godo Shusei, Chiba, Japan) for 2 hours at 37°C. The oral mucosal epithelium was separated from the substantia propria by using surgical forceps and treated with 0.25% trypsin/0.1% ethylenediamine tetraacetic acid (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, Calif) for 20 minutes at 37°C. Disaggregated cells were suspended in a keratinocyte culture medium (KCM) composed of a basal mixture of 3 parts Dulbecco's modified Eagle's medium and 1 part nutrient mixture F-12 Ham (Sigma), and supplemented with 2 nmol/L triiodothyronine (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan), 5 μg/mL insulin (Eli Lilly, Indianapolis, Ind), 10 ng/mL epidermal growth factor (Higeta Shoyu, Chiba, Japan), 0.4 μg/mL hydrocortisone (Kowa Pharmaceutical, Tokyo, Japan), 1 nM cholera toxin (List Biological Laboratories, Campbell, Calif), 0.25 mg/mL amphotericin B (Bristol-Myers Squibb, New York, NY), 40 μg/mL gentamicin (Schering-Plough, Kenilworth, NJ), and 5% FBS (Moregate BioTech, Queensland, Australia) or autologous human serum (AHS). Suspended hOMECs were filtered through a 40-μm cell strainer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), seeded on a temperature-responsive cell culture insert (CellSeed, Tokyo, Japan) at a density of 4 to 8 $\times$ 10^4 cells/cm^2, and cultured for approximately 2 weeks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. The morphology of cultured hOMECs was observed by a phase-contrast microscope (TE300; Nikon, Tokyo, Japan). After cultivation, the hOMECs were harvested from the temperature-responsive cell culture inserts by reducing the temperature to 20°C.

ESD and endoscopic transplantation

All animals were treated in accordance with experimental procedures approved by the Committee for Animal Research of Tokyo Women's Medical University. Male beagle dogs received intramuscular injections of medetomidine hydrochloride (0.2 mg/kg) and intravenous injection of propofol (1 mg/kg). An endotracheal tube was then inserted, and anesthesia was maintained by using sevoflu-

rane and nitrous oxide inhalation. Three canines were used as animal models. Two artificial ulcers per canine were created in the lower and posterior wall of the esophagus by ESD.[4] The size of the ulcers after ESD was approximately 2 cm in diameter. The ulcer covered almost half of the circumference of the section of esophagus. After the ESD, cultured hOMEC sheets were transplanted according to the methods previously reported.[6] One artificial ulcer site received 1 hOMEC sheet, and the other served as the control ulcer site. One hour after transplantation, esophagectomy was performed and then the animals were killed.

Histological analysis

Harvested hOMEC sheets and dissected tissues from canine esophagus were fixed with 10% neutral buffered formalin. The fixed specimens were then routinely processed into 3-μm thick paraffin-embedded sections. Hematoxylin and eosin staining was performed by conventional methods. For immunohistochemical analyses, deparaffinized sections were treated with anti–pan-cytokeratin (5D3) (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), CD29 (K20) (DakoCytomation), Ki67 (MIB-1) (DakoCytomation) at 4°C overnight. All sections were peroxidase stained by using an LSAB 2 kit (DakoCytomation), according to the manufacturer's suggested protocol.

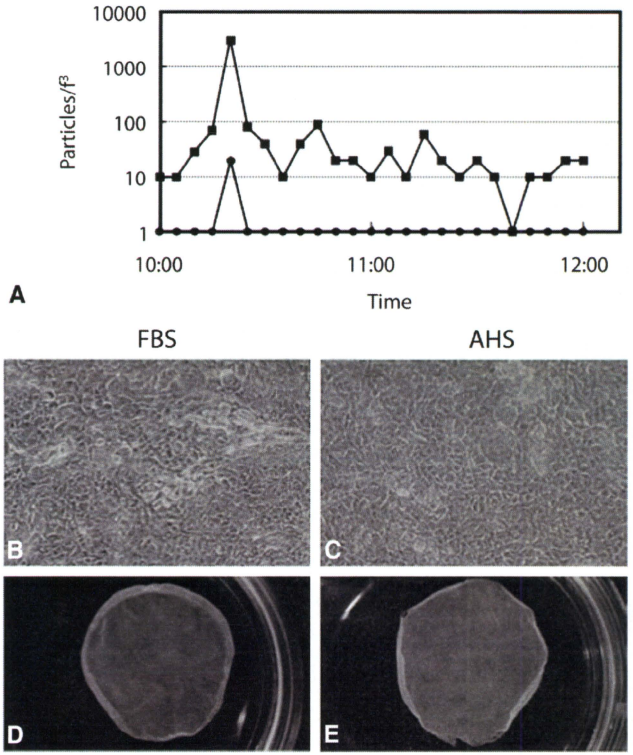


Figure 1. Cultivation of hOMECs in the CPC. **A**, The results of monitoring the cleanliness of the cell culture room and biological safety cabinet during medium replacement. Aerosol particles larger than 0.5 μm were counted by a particle counter. The solid squares and circles represent the number of particles found in the culture room and safety cabinet of the CPC, respectively. **B, C**, Observations of cultured hOMECs by a phase-contrast microscope. hOMECs were cultivated on temperature-responsive culture inserts at a density of 4×10^4 cells/cm^2. **D, E**, Harvested hOMEC sheets from temperature-responsive cell culture inserts. The left (**B, D**) and right (**C, E**) photographs are cells or cell sheets cultured with FBS and AHS, respectively.

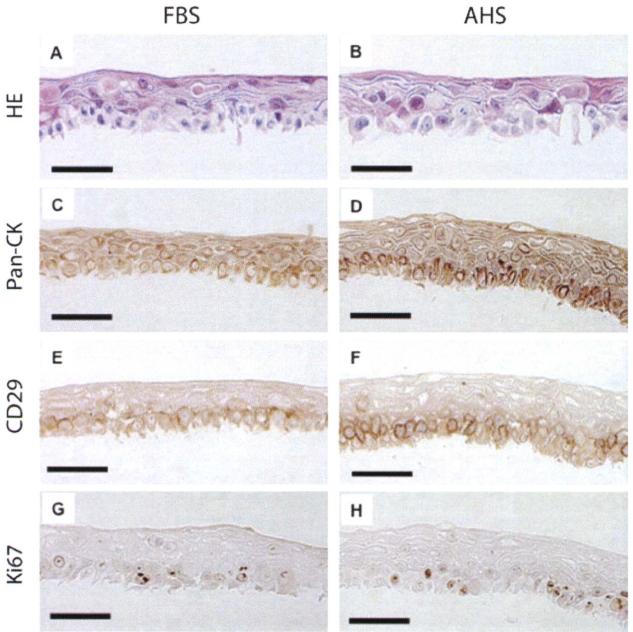


Figure 2. Histological analysis of harvested hOMEC sheets. hOMECs were cultured on temperature-responsive culture inserts with culture media supplemented with FBS (**A**, **C**, **E**, **G**) and AHS (**B**, **D**, **F**, **H**). **A**, **B**, Harvested hOMEC sheets became paraffin-embedded sections and H&E-stained paraffin sections. In a similar paraffin block, hOMEC sheets were stained with anti–pan-cytokeratin (Pan-CK) (**C**, **D**), anti-CD29 (**E**, **F**), and anti-Ki67 (**G**, **H**). Bars = 50 μm.

RESULTS

Cultivation of hOMECs in the CPC

The monitoring system of the controlled area in the CPC indicated that the cleanliness classes (particles/f^3) of the cell culture room and the biological safety cabinet were kept to be less than 10,000 particles/f^3 and 100 particles/f^3, respectively, during cultivation (Fig. 1A). Moreover, the sterilization tests of adherent bacteria in the culture room and the safety cabinet were performed at approximately 3-week intervals, and the results confirmed that the culture room and cabinet remained sterile (data not shown).

hOMECs were seeded on temperature-responsive cell culture inserts without the 3T3 feeder layer, cultured with KCM supplemented with FBS or AHS, and observed to cover the entire insert surfaces for 12 days (Fig. 1B, C). After 16 days of culture, expanded hOMECs cultured in both media were successfully harvested as intact contiguous sheets from the temperature-responsive inserts (Fig. 1D, E).

Histological analysis of cultured hOMECs

Histological analysis of fabricated hOMEC sheets cultivated with KCM supplemented with FBS or AHS was performed. The deparaffinized and hematoxylin and eosin-stained sections represented the stratified cell layer of cultured hOMECs (Fig. 2 A, B). The results of immunohistochemical analysis revealed that cytokeratin was found in all cell layers of harvested cell sheets (Fig. 2C, D). CD29, which is a putative marker of epithelial stem/progenitor cells,[16] and was also found in the basal layer of hOMEC sheets (Fig. 2E, F). Expression of Ki67, which is the nuclear antigen of proliferating cells,[17] was observed sparsely in the basal layer of hOMEC sheets (Fig. 2G, H).

Transplantation of cultured hOMEC sheets

To prepare the animal model, it took approximately 2 hours to perform the ESD. After ESD, hOMEC sheets cultured with KCM supplemented with AHS were applied to

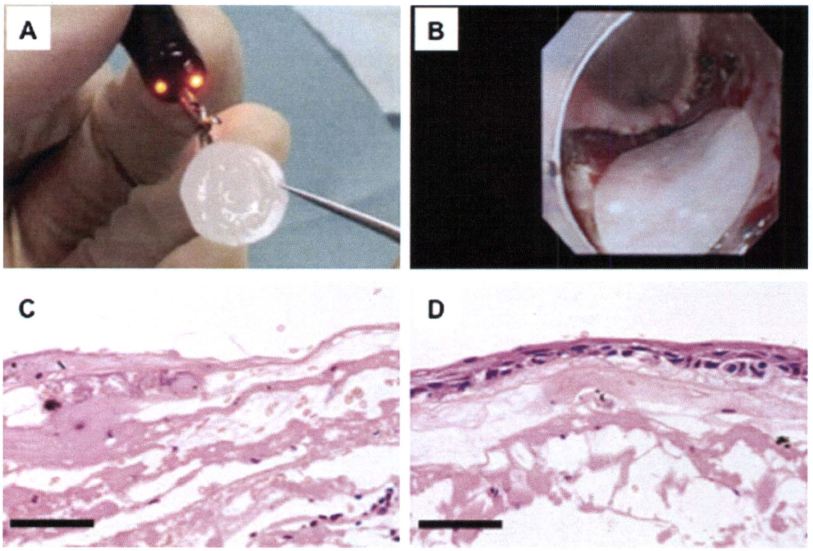


Figure 3. Transplantation of a fabricated hOMEC sheet in a canine esophageal ulcer model. The cultured and harvested hOMEC sheet was collected from the culture insert on a polyvinylidene difluoride support membrane, grasped by endoscopic forceps (**A**), and transplanted on the esophageal ulcer surface after ESD (**B**). One hour after endoscopic transplantation, the canine esophagus was excised and subjected to histological analysis. The esophageal ulcer wound bed (**C**) and transplanted hOMEC sheets cultured in medium supplemented with AHS (**D**) are shown. Bars = 50 μm.

support membranes with endoscopic forceps (Fig. 3A) and successfully transplanted on the canine esophageal ulcer endoscopically (Fig. 3B). The hOMEC sheet-grafting procedure took approximately 10 minutes. The transplanted cell sheet was pushed by endoscopic forceps under the support membrane to allow the cell sheet to attach directly to the host tissue for 10 minutes. One hour after transplantation, the ESD site (Fig. 3C) and the transplanted hOMEC sheets attached to the ulcer surface (Fig. 3D) were shown by histological analysis. The epithelium observed at the ulcer site expressed cytokeratin in all epithelial cell layers (Fig. 4A), CD29 in the basal layer (Fig. 4B), and Ki67 sparsely localized in the basal layer (Fig. 4C).

DISCUSSION

KCM supplemented with AHS allowed hOMECs to proliferate and form stratified epithelium under culture conditions without the 3T3 feeder layer. These results confirmed the reproducibility of hOMECs originating from 7 healthy volunteer donors. Furthermore, KCM replacing FBS with AHS did not affect cytokeratin, CD29, and Ki67 expression in fabricated hOMEC sheets. In the previous study, it was demonstrated that human embryonic stem cells cultured in medium containing FBS express nonhuman sialic acid.[18] Because of this, replacing FBS with AHS might be suitable for a culture medium with which to fabricate hOMEC grafts for clinical application.

In a previous study, effective treatment of epithelialization of esophageal ulcers after ESD was shown by the transplantation of cultured autologous canine oral mucosal epithelial cell sheets[6] and noncultured autologous swine oral mucosal epithelial cells.[19] However, there is no study in which hOMEC sheets cultured without feeder cells were transplanted on the esophageal ulcer surface. In this study, the results of transplantation with high reproducibility showed the cultured hOMECs attached to the canine esophageal ulcer wound surface under physiological conditions with esophageal peristalsis. Additionally, CD29 was expressed in the basal layer of transplanted hOMEC sheets. CD29 is reported to play an important role in keratinocyte migration during cutaneous wound healing.[20] The esophageal ulcer surface was dissected along the longitudinal plane of the submucosal layer, which consists of collagenous fibers and fibronectin, and fibronectin is deposited in the wound-healing site.[21] Therefore, CD29 may play an

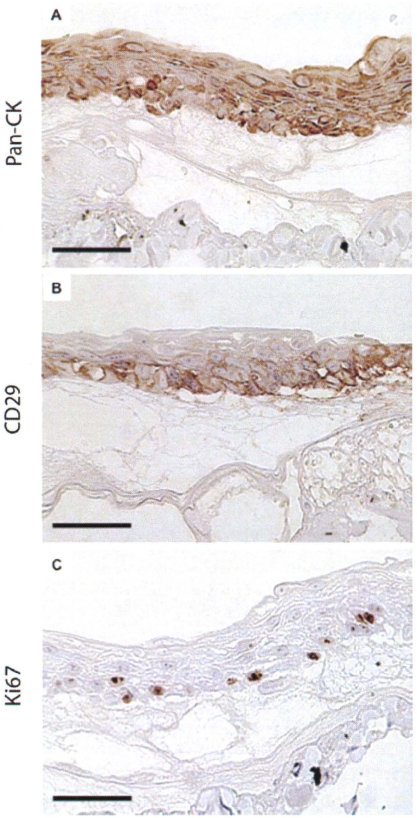


Figure 4. Immunohistochemical analysis of transplanted hOMEC sheets. hOMEC sheets cultured with AHS transplanted on the canine esophageal ulcer wound surface were stained anti–pan-cytokeratin (Pan-CK) (**A**), anti-CD29 (**B**), and anti-Ki67 (**C**). Bars = 50 μm.

important role in attaching the graft to the esophageal ulcer surface. Moreover, Ki67-positive proliferating hOMECs were successfully attached to the esophageal ulcer surface after ESD. Although transplantation of cell sheets in this study demonstrated only the adhesive property of the hOMEC sheet, the results of histological analysis suggest that the fabricated hOMEC sheets were effective cultured epithelial cell grafts for promoting re-epithelialization of the ulcer surface after ESD.

Because hOMEC sheets were fabricated in accordance with GMP guidelines, the cleanliness class and sterilization of the culture room were maintained to meet appropriate criteria for clinical products during cell culture operations. These results suggest that the cultured hOMEC sheets and the methods of cultivation were beneficial for fabricating transplantable epithelial cell grafts for clinical application to promote the re-epithelialization of ulcers after ESD.

ACKNOWLEDGMENTS

The author thanks Mr. Sigeru Ichikura, Mr. Hiroaki Sugiyama, Ms. Yoshiko Nohmi, Yuka Izawa, and Sachiko Oguri (CellSeed Inc., Tokyo, Japan), and Norio Ueno (Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan) for their useful comments and technical criticism.

REFERENCES

1. Gotoda T, Yamamoto H, Soetikno RM. Endoscopic submucosal dissection of early gastric cancer. J Gastroenterol 2006;41:929-42.
2. Hirao M, Masuda K, Asanuma T, et al. Endoscopic resection of early gastric cancer and other tumors with local injection of hypertonic saline-epinephrine. Gastrointest Endosc 1988;34:264-9.
3. Gotoda T, Kondo H, Ono H, et al. A new endoscopic mucosal resection procedure using an insulation-tipped electrosurgical knife for rectal flat lesions: report of two cases. Gastrointest Endosc 1999;50:560-3.
4. Oyama T, Tomori A, Hotta K, et al. Endoscopic submucosal dissection of early esophageal cancer. Clin Gastroenterol Hepatol 2005;3:S67-70.
5. Katada C, Muto M, Manabe T, et al. Esophageal stenosis after endoscopic mucosal resection of superficial esophageal lesions. Gastrointest Endosc 2003;57:165-9.
6. Ohki T, Yamato M, Murakami D, et al. Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. Gut 2006;55:1704-10.
7. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 1975;6:331-43.
8. Gallico GG 3rd, O'Connor NE, Compton CC, et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. N Engl J Med 1984;311:448-51.
9. Phillips TJ, Kehinde O, Green H, et al. Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. J Am Acad Dermatol 1989;21:191-9.
10. Gallico GG 3rd, O'Connor NE, Compton CC, et al. Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. Plast Reconstr Surg 1989;84:1-9.
11. de Luca M, Albanese E, Megna M, et al. Evidence that human oral epithelium reconstituted in vitro and transplanted onto patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site. Transplantation 1990;50:454-9.
12. Ueda M, Hata K, Horie K, et al. The potential of oral mucosal cells for cultured epithelium: a preliminary report. Ann Plast Surg 1995;35:498-504.
13. 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.

14. Murakami D, Yamato M, Nishida K, et al. The effect of micropores in the surface of temperature-responsive culture inserts on the fabrication of transplantable canine oral mucosal epithelial cell sheets. Biomaterials 2006;27:5518-23.
15. Murakami D, Yamato M, Nishida K, et al. Fabrication of transplantable human oral mucosal epithelial cell sheets using temperature-responsive culture inserts without feeder layer cells. J Artif Organs 2006;9:185-91.
16. Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. Cell 1995;80:83-93.
17. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 1983;31:13-20.
18. Martin MJ, Muotri A, Gage F, et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. Nat Med 2005;11:228-32.
19. Sakurai T, Miyazaki S, Miyata G, et al. Autologous buccal keratinocyte implantation for the prevention of stenosis after EMR of the esophagus. Gastrointest Endosc 2007;66:167-73.
20. Grose R, Hutter C, Bloch W, et al. A crucial role of beta 1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair. Development 2002;129:2303-15.
21. Richard AF, Clark MD. Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. Invest Dermatol 1990;94:128S-34S.

Online Audio and Podcasting

Audio and Podcasts of article abstracts published in *Gastrointestinal Endoscopy* are now available online. Recordings are edited by Ian Gralnek, MD, MSHS, Senior Associate Editor, and performed by Deborah Bowman, MFA, Managing Editor of *Gastrointestinal Endoscopy*.

Log on to **www.giejournal.org** to listen to recordings from the current issue.

Biochemical and Biophysical Research Communications 399 (2010) 373–378

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

New culture technique of human eliminable feeder-assisted target cell sheet production

Fumihiko Takamatsu, Tomoyuki Inoue *, Yingli Li, Yuichi Hori, Naoyuki Maeda, Yasuo Tano †, Kohji Nishida

Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School, Suita, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 July 2010
Available online 24 July 2010

Keywords:
Transplantation
Cell culture
Regenerative medicine

ABSTRACT

Cultured cell sheets for transplantation generally have been co-cultured with animal feeder cells, which carry risks because of different species and results in non-contact culture between the feeder and target cells. We developed a new technique to produce human eliminable feeder-assisted target cell sheets by novel human-derived genetically modified feeder cells. Three genes (*human-derived telomerase reverse transcriptase gene, enhanced green fluorescent protein gene,* and *herpes simplex virus thymidine kinase gene*) were transducted into human stromal cells, which enabled genetically modified feeder cells to be immortalized, labeled, and eliminated as needed. A target cell sheet was produced as one sheet by assisting the genetically modified feeder cells and successfully transplanted *in vivo* without their contamination. Genetically modified human eliminable feeder cells could be a promising tool for cultivated cell sheet transplantation.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Clinical applications of regenerative medicine have been performed recently in many fields, in which the potential for a cultivated cell sheet transplantation technique has been investigated for keratinocytes [1,2], corneal epithelial cells [3–9], oral mucosal epithelial cells [10], corneal endothelial cells [11], urothelial cells [12], and cardiomyocytes [13]. Among the cultivated cell sheets, animal-derived feeder cells, such as keratinocytes [1,2], corneal epithelial cells [3–9], oral mucosal epithelial cells [10], and urothelial cells [12], are needed to produce cell sheets. However, these culture methods using animal feeder cells can cause unknown infections and contamination from xenogeneic feeder cells [14]. Furthermore, using animal-derived feeder cells resulted in non-contiguous culture between feeder cells and target cultured cells, enabling direct stimulation for proliferation or differentiation [15,16].

We developed a technique of human eliminable feeder-assisted target cell sheet production. We focus on the production of cultivated corneal epithelial cell sheets as a model which has been used clinically to treat severe ocular diseases [5–8], and report the efficacy of a novel genetically modified human-derived feeder cell line with the properties of immortalization, labeling, and elimination as needed.

2. Materials and methods

2.1. Culture of human corneal stromal cells

Corneas were obtained from an eye bank in the USA. Epithelial and endothelial cells were removed with sterile surgical forceps from the remaining corneal scleral rims after keratoplasty. Corneal stroma was cut into a few pieces and placed endothelial cell-side down on 35 mm culture dishes containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nikken Biomedical Laboratory) with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen), 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin (Invitrogen). Corneal stromal cells were cultured at 37 °C in 5% CO_2 and 95% air, and the medium was changed every 2–4 days.

2.2. Construction of lentiviral vector and preparation of lentivirus

Lentiviral vectors were constructed using Gateway Technology (Invitrogen). Replication-defective, self-inactivating lentiviral vectors were prepared with EF1α as an internal promoter, a phosphoglycerate kinase (PGK) promoter-neomycin resistance gene (pLentiNeo) or a PGK promoter-puromycin resistance gene (pLentiPuro) [17], and these were attR-containing destination vectors. The entry vectors containing attL were prepared as follows. Human-derived *TERT* and an internal ribosome entry site (IRES)–*EGFP*

Abbreviations: TERT, human-derived telomerase reverse transcriptase; HSV-TK, herpes simplex virus thymidine kinase; EGFP, enhanced green fluorescent protein; MMC, mitomycin C.

* Corresponding author. Address: Department of Ophthalmology, Osaka University Medical School, Room E7, 2-2 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan. Fax: +81 6 6879 3458.
E-mail address: tomonoue@gmail.com (T. Inoue).
† Deceased.

0006-291X/$ - see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.079