

## 第 106 回 日本眼科学会総会 宿題報告 I

## 眼の再生医学

## Ocular Surface の再生

木下 茂

京都府立医科大学医学部眼科学教室

## 共同研究者

中村 隆宏, 川崎 諭, 小泉 範子, 上野 盛夫, 石野 豊, 伴 由利子  
 鄭 守, 足立和加子, 都築 祐勝, 遠藤 健一, 餅田千佳子, 山田 潤  
 丸山 和一, 猪木 敬子, 谷藤 典子, 寺井 和都, 鈴木 智, 佐野洋一郎  
 稲富 勉, 外園 千恵, 横井 則彦 (京都府立医科大学医学部眼科学教室)

西田幸二 (大阪大学大学院医学系研究科感覚器外科学)

Andrew J. Quantock (Department of Optometry, Cardiff University, United Kingdom)

Leanne J. Cooper, Nigel J. Fullwood (Institute of Environmental and Natural Sciences,  
 Lancaster University, United Kingdom)

## 要 約

幹細胞を用いた再生医学的手法による ocular surface の外科的再生は次世代の治療法である。この治療方法を両眼性の重症眼表面疾患に適用することを考え、同種 (アロ) 角膜上皮細胞および自家 (オート) 口腔粘膜上皮を羊膜上に培養して上皮シートを作製し、移植する方法を検討した。このため、まず第 1 に、従来のアロ角膜上皮移植成績を要約して有効率を明らかにした。さらに、keyhole limpet hemocyanin 抗体 (KLH) を用いた Th 1 から Th 2 へのシフトによる免疫反応抑制方法が有効であることを示した。第 2 に、羊膜をキャリアーとしたアロ培養角膜上皮 stem cell 移植術を詳細に検討した。3T-3 線維芽細胞との共培養、細胞分化誘導のための air-lift 法、ヒト角膜上皮 stem cell の羊膜上での培養により細胞シートを作製した。この培養角膜上皮細胞シートは角膜上皮特異的ケラチン 3 と 12, tight junction 関連蛋白, そしてテロメラーゼ活性を示した。アロ培養角膜上皮シートは, *in vivo* への移植で生着し, 急性期の Stevens-Johnson 症候群, 眼類天疱瘡, 角膜腐食などに劇的に奏効した。しかし一部では拒絶反応, 日和見感染症のような術後合併症を生じた。第 3 に, オート培養

口腔粘膜上皮移植法の確立を目指して, 羊膜上で家兎培養口腔粘膜上皮シートを作製し, 移植実験を行った。培養口腔粘膜上皮シートは角膜上皮細胞層に類似した組織像を示し, 角膜特異的ケラチン 3 を発現した。家兎の自家移植では, 移植上皮シートは眼表面に生着し, 角膜透明性が回復した。培養口腔粘膜上皮シートは角膜上皮層の代用となる可能性が示された。第 4 に, 同様の手法を用いて, 羊膜上に移植可能なヒト培養角膜内皮細胞シートを作製し, これを家兎に異種移植し, 短期生着状況を検討した。角膜内皮細胞密度は  $3,000 \text{ cells/mm}^2$  以上で移植でき, 移植後もポンプ機能が働いていることを示した。最後に, ヒト角膜上皮 stem cell を示す幹細胞マーカーを探索する目的で, レーザーマイクロキャプチャー法と独自開発した遺伝子発現解析技術 (iAFLP) を用いて, 角膜上皮 stem cell が存在するとされる角膜輪部基底細胞から, 幾つかの幹細胞マーカー候補を同定した。(日眼会誌 106: 837-869, 2002)

キーワード: 眼表面, 角膜上皮, 口腔粘膜上皮, 角膜内皮, 組織工学, 幹細胞, 羊膜

別冊請求先: 602-0841 京都市上京区河原町通り広小路上ル梶井町 465 京都府立医科大学眼科学教室 木下 茂  
 (平成 14 年 9 月 4 日受付, 平成 14 年 10 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Shigeru Kinoshita, M.D. Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, 465 Kajii-cho, Hirokoji, Kawaramachi-dori, Kamigyo-ku, Kyoto 602-0841, Japan

(Received September 4, 2002 and accepted in revised form October 11, 2002)

---

## A Review

---

# Ocular Surface Reconstruction by Tissue Engineering

Shigeru Kinoshita

Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine

### Abstract

Ocular surface reconstruction by tissue engineering using somatic stem cells is a second-generation modality. In order to treat bilaterally affected, severe ocular surface disorders, we investigated the transplantation of two types of cultivated mucosal epithelia: allogenic corneal epithelial stem cells, and autologous oral mucosal epithelial cells. For this, first, we summarized the clinical results of allogenic keratoepithelioplasty and limbal transplantation. In addition, we showed that the immunological shift from Th 1 to Th 2 by using keyhole limpet hemocyanin was effective in suppressing the incidence of immunological rejection. Second, we investigated the transplantation of cultivated human corneal epithelial stem cells onto amniotic membrane. The cultivated sheet was created by co-culture with 3T3 fibroblasts, using the air-lift method, in cultivating the corneal epithelial stem cell on the amniotic membrane. These cultivated cells demonstrated positive keratin 3 and 12 specific to *in vivo* corneal epithelium, tight junction related proteins, and telomerase activity. The transplanted allogenic human corneal epithelial sheet survived on the corneal surface in all cases, and was quite effective for achieving ocular surface stability in the acute phase of Stevens-Johnson syndrome, ocular cicatricial pemphigoid, or chemical injury. However, a few cases developed immunological rejection or oppor-

tunistic infection. Third, to establish the transplantation of the autologous cultivated oral mucosal epithelial sheet, we performed animal experiments using rabbits. *In vitro* oral mucosal epithelial sheet showed histology similar to that of *in vivo* corneal epithelial sheet. It expressed positive keratin 3 as well. Since the autologous transplantation of this sheet survived on the ocular surface with the recovery of corneal transparency, a cultivated oral mucosal epithelium may become a substitute for corneal epithelium. Fourth, we created a cultivated human corneal endothelial cell sheet on amniotic membrane using a similar technique, and transplanted it to a rabbit eye as a xenograft. The transplanted corneal endothelial cell density was over 3,000 cells/mm<sup>2</sup>, and it was actively functioning even after the transplantation. Lastly, to explore cell markers for corneal epithelial stem cells, we established a technique using laser micro-capture, and introduced amplified fragment length polymorphism (AFLP), identifying several candidate molecules as stem cell markers. (J Jpn Ophthalmol Soc 106 : 837–869, 2002)

**Key words :** Ocular surface, Corneal epithelium, Oral mucosal epithelium, Corneal endothelium, Tissue engineering, Stem cell, Amniotic membrane.

## I 緒 言

角膜疾患の中で治療に難渋するものは重症眼表面疾患である。Stevens-Johnson 症候群, 眼類天疱瘡, 薬剤性偽眼類天疱瘡, さらに角膜腐食などがこの範疇の疾患としてとらえられている。これらの疾患への根本的な外科的治療は, 瘢痕期まで待つというのが国際的にも広く認められた現在の考え方である。我々は自己結膜上皮移植に始まり<sup>1)2)</sup>, アロ角膜上皮移植<sup>3)~6)</sup>, 羊膜移植<sup>7)~10)</sup>へと発展した眼表面再建術 (ocular surface reconstruction) が主として瘢痕期の病態を治療する方法であることから, 急性期の病態にアプローチできる新しい外科的治療方法を模索してきた。その一つが培養角膜上皮など

の粘膜上皮でシートを作製し, 急性期の大きな角結膜上皮欠損を被覆し, 角膜実質を含めた創傷治癒過程を改善しようという発想である。方法には様々なものが考えられる。角膜上皮細胞だけでシートを作製する<sup>11)~13)</sup>, 角膜上皮細胞を合成高分子, コラーゲン, フィブリンなどの基質上で培養してシートを作製する<sup>14)~17)</sup>, 羊膜のような生体素材を基質として角膜上皮細胞シートを作製する<sup>18)~22)</sup>, などである。その中で, 我々は羊膜を基質とするアプローチで培養上皮シート作製を研究してきた。一方で, 角膜上皮細胞移植を考えた場合, 角膜上皮ステムセルの特異的マーカーを発見することは, 培養角膜上皮細胞の質的向上には必須のことである。このような考え方から, 過去数年にわたって我々が研究してきたいく

つかの研究成果をここに要約して記述する。基礎的研究が臨床的な広がりを見せつつあるという意味では興味深い成果もあるが、基礎的研究としては不明な点が多く、今後のさらなる研究成果が待たれるところである。

## II Ocular surface 再建のためのアロ角膜上皮移植術

### 1. 臨床における角膜上皮移植術

#### 1) 角膜上皮移植術の開発の経緯

1977 年, Thoft ら<sup>23)</sup>によって提唱された, 角膜上皮と結膜上皮を一体としてとらえようとする ocular surface という概念は, 眼表面疾患のとらえ方と治療の考え方に大きな変革をもたらした。この考え方の中から, 角膜上皮ステムセルの存在<sup>24)</sup>や, その臨床的な指標としての palisades of Vogt の存在<sup>25)</sup>が注目されるようになり, 従来 of 角膜移植術では対応し得なかった幹細胞疲弊症と総称される疾患群が治療の対象として取りあげられるようになった<sup>26)</sup>。このような背景のもとに, allograft (アロ)角膜上皮移植術が開発され<sup>34)</sup>, 術後長期の経過観察のプロセスから, その適応と限界が明らかにされるとともに, 近年の新しい角膜上皮移植法へと進歩を遂げてきた。当然のことながら, 片眼性の例には autograft の角膜輪部移植も行われてきた<sup>27)</sup>。

角膜上皮ステムセルの存在は, 角膜上皮に特異的なケラチン 3, 12 陰性の細胞群が輪部基底細胞に存在すること<sup>24)</sup>, この細胞が BrdU のパルスラベルで初めて染まる slow cycling cell であること<sup>28)</sup>, 輪部上皮細胞が旺盛な outgrowth で証明される高い増殖能を持ち<sup>29)</sup>, 増殖因子によく反応し<sup>30)</sup>, 角膜上皮に障害が生じると活発に増殖すること<sup>31)</sup>, 輪部に眼表面の腫瘍が生じやすいことなどから想定されてきた<sup>26)</sup>。この細胞は自己複製能, 多分化能をもった, 組織特異的のステムセルと考えられており, ステムセルの疲弊した状態では, 角膜上を補うべき角膜上皮細胞が不足し, 結膜上皮が角膜上に侵入して, 結膜上皮とその上皮下線維組織によって置換された状態になると考えられている。こうした角膜上皮ステムセルが消失する角結膜上皮疾患としては, 先天欠損の無虹彩症, 急性喪失の化学腐食, Stevens-Johnson 症候群, 慢性疲弊の眼類天疱瘡などを挙げることができる<sup>26)32)</sup>。

幹細胞疲弊症に対するアロ角膜上皮移植術には, transient amplifying cell (TA cell) を角膜表層実質とともに移植する角膜上皮形成術 (keratoepithelioplasty)<sup>34)</sup>および, 角膜上皮幹細胞を含む輪部組織を移植する輪部移植 (limbal transplantation)<sup>5)6)</sup>がある。これらの上皮移植術を考える場合には, 対象となる眼表面疾患の ocular surface の涙液層, 結膜上皮層の観察, 特に上皮の異常分化(角化)と上皮下線維組織増殖の程度の評価が重要である。その一つの方法として, impression cytology を用いた結膜杯細胞頻度を指標とした結膜上皮の分

化を評価する方法が簡便でかつ有用である。原発性の幹細胞疲弊症では, 結膜上皮に分化異常が証明され, 細胞の核細胞質比は減少して扁平上皮化を生じ, 結膜杯細胞は観察されず, 病的な角化の像を示すからである<sup>33)</sup>。

結膜上皮の分化の過程には, 細胞周囲の外部環境が大きくかかわっていることが知られている。例えば, 角膜実質内に移植された結膜上皮は, 角膜上皮に特異的とされるケラチン 3 を発現し得るが, 塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF 2) で角膜新生血管を生じさせておくと, 移植された結膜上皮は, 角膜上皮様に分化転換されないという。さらに, 病的角化の背景には, transglutaminase 1 (TG-1) の発現が強く関与していることも証明されており<sup>34)</sup>, Stevens-Johnson 症候群では TG-1 が強く発現し, 上皮基底細胞における Ki 67 の発現と増殖能が亢進している<sup>35)</sup>。さらに, 臨床的には炎症反応のみられない Stevens-Johnson 症候群の癒痕期結膜にも炎症性サイトカインの発現が証明されている<sup>36)</sup>。すなわち, Stevens-Johnson 症候群を始めとする原発性の角結膜上皮疾患に対するアロ角膜上皮移植が困難な背景には, 持続する炎症が上皮角化, 線維性増殖を誘導して, 上皮移植の長期成績を低下させる要因となっていることが明らかになってきた。このために, 羊膜移植<sup>9)</sup>や 0.04% マイトマイシン C の術中塗布が用いられるようになってきたが, その作用機序としては結膜下線維芽細胞の増殖抑制と浸潤炎症細胞の活性抑制効果の両者が関与していると推測される。さらに, 近年, 培養角膜上皮シート移植による速やかな上皮化が, 術後早期の消炎に劇的に奏功することがわかってきた<sup>22)</sup>。

#### 2) 角膜上皮移植術の成績

角膜上皮移植術の対象疾患は, その目的により大きく 2 つに分類される。1 つは健常な角膜上皮の供給による視力改善および ocular surface の安定を目的とするもので, この対象となる疾患群は, Stevens-Johnson 症候群 (SJS), 眼類天疱瘡 (OCP), 化学・熱による角膜腐食 (角膜腐食) などの癒痕性角結膜疾患と, 膠様滴状角膜ジストロフィ (GDLD), Salzmann 角膜変性 (SCD) などの上皮変性疾患である。いま 1 つは原疾患の治療を目的として行うもので, 蚕食性角膜潰瘍を代表とする周辺部角膜潰瘍 (周辺部潰瘍), 角結膜上皮腫瘍 (腫瘍), 再発翼状片などである。我々の施設においても, 1992 年 4 月から上述のような疾患に対して角膜上皮移植術を行ってきた。その中で, 術後 2 年以上にわたって経過観察を詳細に行うことのできた 79 例 85 眼の成績を検討した。対象となった症例は男性 52 例 57 眼, 女性 27 例 28 眼であり, 手術時平均年齢は  $53 \pm 18$  (平均値  $\pm$  標準偏差) 歳 (20 ~ 80 歳), 術後平均観察期間は 4 年 1 か月  $\pm$  2 年 (平均値  $\pm$  標準偏差) (2 ~ 8 年 10 か月) であった。対象疾患は, 健常な角膜上皮の供給による視力改善および上皮安定を目的としたものが 42 例 47 眼であり, その内訳は, SJS

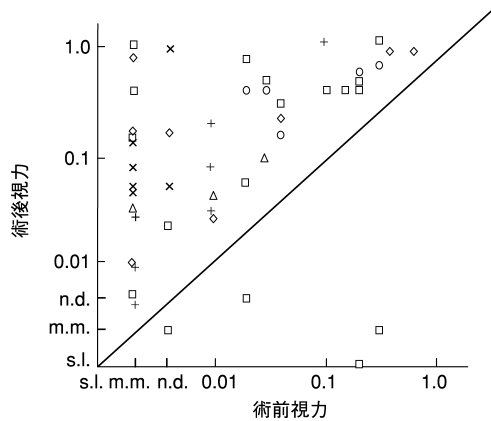


図1 角膜上皮移植術の術前術後矯正視力。

◇：Stevens-Johnson症候群(SJS)，△：眼類天疱瘡(OCP)，□：角膜腐食，×：GD，○：Salzmann角膜変性(SCD)，+：特発性角結膜上皮症(OSD)

8例8眼，OCP 3例3眼，角膜腐食14例18眼，原因不明の特発性角結膜上皮症(OSD)7例7眼，GDLD 6例6眼，SCD 4例5眼であった。一方，原疾患の治療を目的とした疾患群は37例38眼で，周辺部潰瘍11例12眼，腫瘍7例7眼，再発翼状片19例19眼であった。視力改善および上皮安定性獲得目的で手術を行った症例のうち，術後2年の時点で2段階以上の視力改善および上皮安定の得られた症例は39眼(83%)であり，SJS・OCPで82%，角膜腐食で78%，OSDで71%であった。GDLDとSCDでは，全例で視力の改善および上皮安定が得られた。

これら症例の術前と術後2年の矯正視力を図1に示す。術前より矯正視力が低下した症例は角膜腐食の4眼のみであり，これらのうち2眼は木下分類のグレード4，他の2眼は急性期症例であった。術前より視力低下した時点，あるいは角膜への高度な結膜侵入を生じた時点をも「不成功」と定義したKaplan-Meier生存曲線を図2に示す。GDLDとSCDでは術後5年を経過しても成功率100%を維持しており，SJS・OCPと角膜腐食でも70%以上，OSDで60%以上の成功率を得ていた。一方，原疾患の治療を目的とした症例では，原疾患の再発抑制率は術後2年の時点で92%(35/38眼)であり，周辺部潰瘍で100%，腫瘍で86%，再発翼状片で89%であった。原疾患の再発した時点をも「不成功」と定義したKaplan-Meier生存曲線を図3に示す。周辺部潰瘍では100%，再発翼状片では約90%の成功率が得られていた。以上から，ドナー角膜からlenticuleを作製して行うアロ角膜上皮移植術は，術後長期にわたり視力改善，上皮安定，原疾患の再発抑制において有効であると考えられた。

### 3) ドナー角膜上皮の運命

角膜上皮移植術では，viabilityの高い角膜上皮細胞

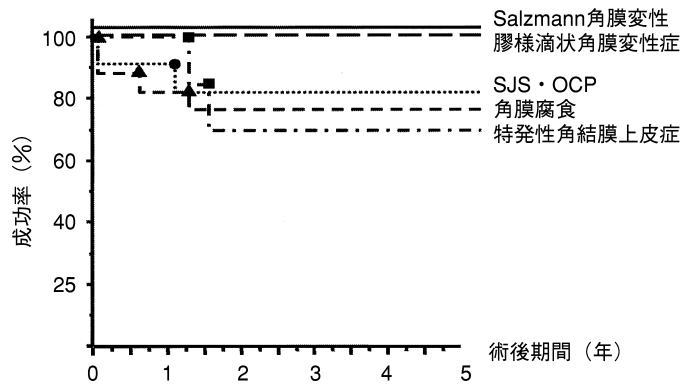


図2 視力改善を目的とした角膜上皮移植術の術後成績。

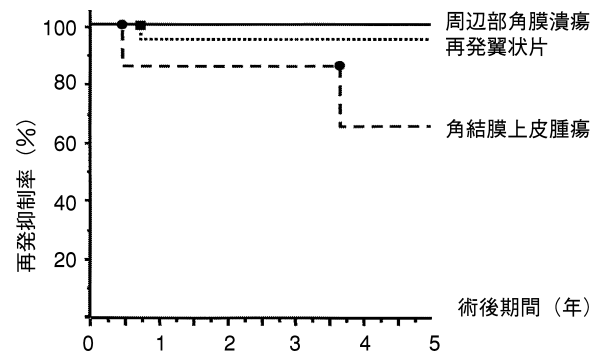


図3 原疾患の治療を目的とした角膜上皮移植術の術後成績。

を如何に供給できるかにかかっている。理論的には，アロ角膜上皮細胞は増殖能が継続する限り再生上皮細胞を供給することになるが，実際には拒絶反応や増殖能の低下，さらには再生上皮の中央向きの動き<sup>37)</sup>により宿主結膜上皮細胞に徐々に置換されていくことが知られている<sup>38)</sup>。我々の行ってきた角膜上皮移植術では，いったん生着した角膜上皮の運命は3つのパターンをとることになる。①ドナー角膜上皮が生着する，②宿主結膜上皮に置換され，その上皮は角膜上皮化生し，透明性の高い上皮として維持される，③炎症の再燃，感染症，拒絶反応などで血管侵入を伴った結膜上皮に置換される(図4)。しかし，どの程度の期間を経てこの変化が進行しているのかは不明な点も多い。我々は角膜上の表層上皮を面状に採取できる impression cytology と fluorescence in situ hybridization(FISH)法を組み合わせることにより，角膜上皮移植後のドナー細胞生着状態を検討した。対象としてドナーと宿主で性別の異なる症例を選択し，上皮細胞の性染色体を判別することによりドナー由来か宿主由来かを検討した。FISH法ではX染色体はローダミンで赤蛍光色に，Y染色体はフルオレセインで緑蛍光色にラベルした<sup>39)</sup>。二次元的な表層上皮細胞は，XX染色体あるいはXY染色体の細胞群のみで構成されるパターン，両者の細胞がモザイク状に存在す

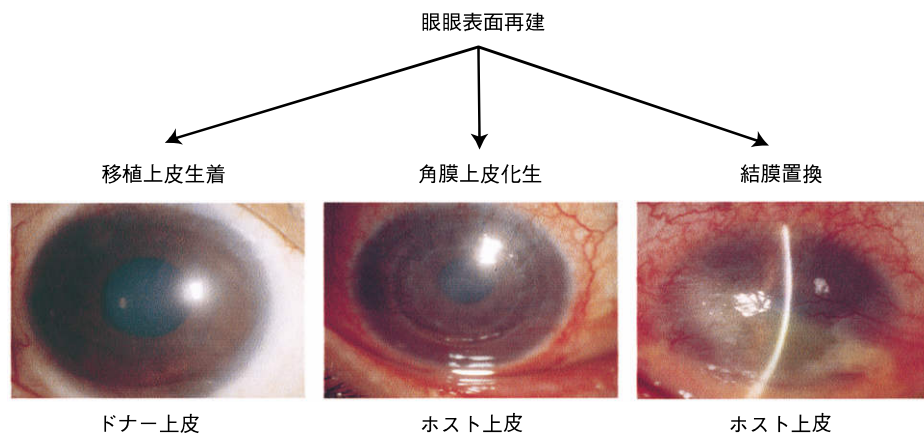


図 4 アロ角膜上皮移植後の眼表面の推移。

アロ角膜上皮移植術後の眼表面は 3 つのパターンの運命をたどる。

るパターンのいずれかであった(図 5)。角膜上は、移植初期にはドナー角膜上皮のみで被覆されていたが、その後ドナー、ホスト上皮がモザイク形成を見せながら最終的にはホスト上皮のみに置換された。今回の検討では、角膜上皮形成術を施行した症例でも術後 5 年以上でドナー角膜上皮の生着がみられることがあり、ドナー周辺部角膜を用いた上皮移植でも長期間にわたり上皮細胞増殖能を保持する例があることが判明した(図 6)。臨床的には、移植されたドナー角膜上皮あるいは角膜上皮化生したホスト結膜上皮により被覆されている状態であれば、視力回復が得られた手術成功例であると考えられた。

## 2. 実験的アロ角膜上皮移植における免疫反応抑制法

アロ角膜上皮移植、特に輪部移植では、拒絶反応を回避することがステムセルを温存する唯一の方法であり、手術の成否を決定する。そこで、アロ輪部移植における拒絶反応は、主に T-helper 1 型(以下、Th 1)の反応、すなわち、遅延型過敏反応によって生じるため<sup>40)</sup>、これに相対する T-helper 2 型(以下、Th 2)の反応を強力に誘導し、Th 1 反応を抑制させ、拒絶反応を抑制できるか否かをマウスの系を用いて検討した。今回は、この目的のために、Th 2 反応を誘導する keyhole limpet hemocyanin 抗原(以下、KLH)<sup>41)</sup>の有効性を検討した。

誘導方法は、ホストである BALB/c マウス(H-2<sup>d</sup>)の腹腔内に不完全フロイドアジュバンドと混合した KLH(50  $\mu$ g)を投与し、28 日後に完全フロイドアジュバンド(以下、CFA)と混合した KLH 50  $\mu$ g を頸部皮下に再度免疫した。対照群は CFA のみで免疫した。再免疫と同時に、B 10. D 2 マウス(H-2<sup>d</sup>)をドナーに用いた角膜輪部移植を行った。移植方法は、全角膜上皮および輪部とその周辺結膜上皮を完全に擦過除去した BALB/c マウス角膜輪部に、角膜内皮を除去して角膜輪部をらせん状に切除したドナー輪部移植片を 11-0 ナイロン糸 5 針で端端縫合した(図 7)。術後から毎日、スリットランプを用いて角膜混濁を 5 段階で評価し(score: 0=透明

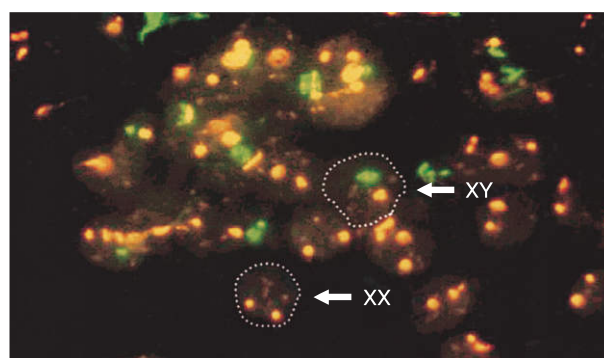


図 5 FISH 法による移植細胞の同定。

ドナーとホストの性不一致例の impression cytology で X 染色体を特異的に認識するプローブ(オレンジ色)と Y 染色体を特異的に認識するプローブ(黄緑)を使用して FISH 法でホスト上皮細胞とドナー上皮細胞の存在を調べた。FISH: fluorescence *in situ* hybridization

角膜、1=軽度角膜上皮浮腫、虹彩血管明瞭透見、2=びまん性角膜混濁、虹彩血管不明瞭透見、3=角膜混濁、虹彩血管不透見、4=前房不透見)、score 2 以上を拒絶反応陽性とした。同時に、角膜上皮再生を 0.5% メチレンブルー染色で観察した。さらに、角膜侵入血管を各象限毎に評価し(score: 0=侵入血管なし、1=移植片を越さない血管侵入、2=角膜中心までの距離 1/2 に達しない血管侵入、3=角膜中心に達しない血管侵入、4=角膜中心部に達した血管侵入)、比較検討した。

その結果、対照群(n=18)では移植 3 日後から角膜混濁が出現し、移植 10 日後にはすべて拒絶された。一方、Th 2 反応誘導群(n=15)では透明生着率が有意に上昇した(拒絶率 40%,  $p < 0.001$ )(図 8)。角膜血管侵入は移植 7 日後の実験群で有意に抑制されており( $p < 0.01$ )、観察終了時まで抑制されていた( $p < 0.01$ )(図 9)。移植後の組織所見においては、対照群で角膜実質内に多数の浸潤細胞と血管侵入をみたのに対して、Th 2 反応誘導群では浸潤細胞はほとんどみられず、角膜実質内に血管侵入もみられなかった。

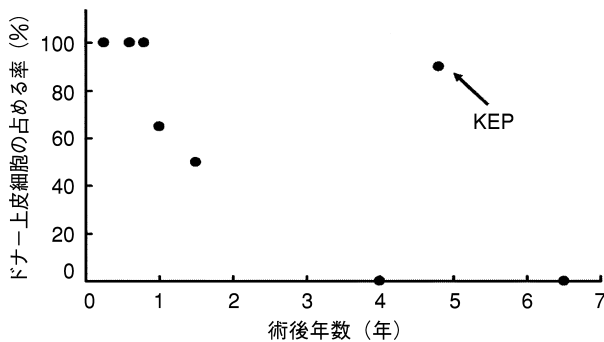


図 6 FISH 法による眼表面上皮細胞の推移の解析。

眼表面の上皮細胞は術後早期にはドナー上皮のみで構成されるが、やがて宿主上皮とのモザイクとなり、最終的には宿主上皮に置換される。驚くべきことに、角膜上皮形成術(KEP)の1例(矢印)で術後5年という長期においてもドナー上皮がほぼ完全に残存している症例があった。

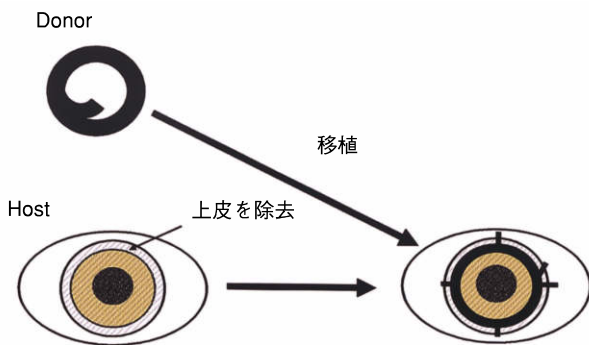


図 7 マウス輪部移植実験の概略。

ドナー輪部をらせん状に切除 lenticule (1×10 mm) を作製。宿主上皮を輪部外側まで擦過除去し、輪部にドナー lenticule を 11-0 ナイロン糸で 5 針端端縫合。

角膜輪部移植は全層角膜移植とは異なり、ドナーの抗原提示細胞を含む移植であること、血管、リンパ管、抗原提示細胞の豊富な角膜輪部に移植を施行することにより、抗原提示されやすく、高率に拒絶反応が生じる。このため、マウスモデルにおける輪部移植の検討では、心臓移植などとほぼ同時期に拒絶され、その拒絶日数は移植後約 10 日であった。このように、免疫寛容が存在しない角膜輪部移植においては拒絶反応を抑制するために、ステロイドや免疫抑制薬の投与が必須であると同時に、その副作用が問題視されている。そこで、Th2 反応の誘導による Th1/Th2 バランスの操作を行い、Th1 反応を抑制する検討を行ったところ、アロ角膜輪部移植においても有用であり、拒絶反応を抑制でき得ることが明らかとなった。奏効機序としては、強い Th2 反応時に産生される大量のインターロイキン(IL)-10 が大きく関係していることが想像される。IL-10 は抗炎症作用を有しており<sup>42)~44)</sup>、Th1 型炎症性サイトカインの産生を抑制し、抗原提示細胞表面の class II (MHC) 発現を

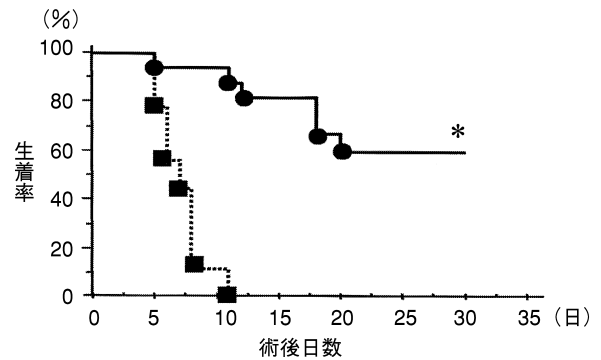


図 8 上皮移植術後の生存率の比較。

対照群(■, n=18)は、移植3日後から角膜混濁が出現し、移植10日前後にすべて拒絶された。それに対し keyhole limpet hemocyanin (KLH) 投与群(●, n=15)では有意に透明生存率が上昇した(拒絶率 40%, \*:  $p < 0.001$ )。

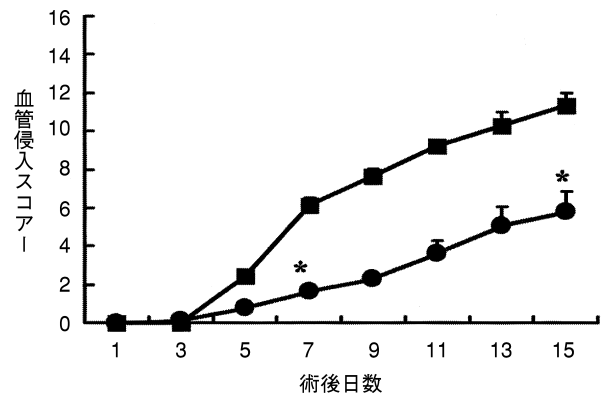


図 9 上皮移植術後の血管侵入の推移。

移植7日後において、対照群(●)と KLH 投与群(■)には有意な差が存在し( $p < 0.01$ )、観察終了時まで抑制されていた( $p < 0.01$ )。

減弱させて抗原提示を抑制する作用を有している<sup>45)~47)</sup>。この作用が拒絶反応抑制や血管侵入抑制に関与している可能性が推測された。このような方法は、アロ角膜上皮移植の拒絶反応のような Th1 型反応の抑制方法として、今後大いに期待されるものである。

### III 羊膜をキャリアーとした培養細胞シート移植法

#### 1. 培養角膜上皮ステムセル移植

##### 1) 我々の培養角膜上皮シート作製法の変遷

培養角膜上皮シートの作製法にはいくつかの方法が報告されているが、我々は羊膜を基質として、またキャリアーシートとして使用する方法を試みた。何故なら、1980 年代から試みられてきた培養上皮シート作製の研究で、*in vivo* へ培養上皮細胞を移植生着できたことを直接的に証明した報告は我々の知る限り存在せず、この研究の初期段階では羊膜という「未知の天然基質の魅力」<sup>48)49)</sup>、例えば IV 型、V 型コラーゲンの豊富な基質で

ある、からスタートしようと考えたのである。

#### (1) 羊膜の採取と保存

羊膜の採取と保存の方法は、京都府立医科大学倫理委員会において 1998 年 1 月に承認された方法に従った<sup>50)</sup>。具体的には、全身合併症のない帝王切開予定の妊婦で、3 か月以内の血清検査で感染症(B 型, C 型肝炎, 梅毒, ヒト免疫不全ウイルスなど)が陰性である人を対象とし、羊膜の採取ならびに臨床使用について文書による同意を得た上で帝王切開時に羊膜を採取した。産科分娩室で帝王切開時に取り出された胎盤から無菌的に羊膜を採取し洗浄した後、抗生物質を添加した 50% グリセロール/Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)中で  $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫に保存した。

#### (2) 角膜上皮ステムセル培養の基質としての羊膜の検討(上皮あり, 上皮なし羊膜の比較)

羊膜上皮ありと、上皮なしの羊膜を基質として用いて家兎の角膜上皮細胞を培養し、角膜上皮の伸展面積と、組織学的構造を比較した。羊膜上皮なしの羊膜は、凍結保存した羊膜を 0.02% EDTA 中に浸し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 2 時間インキュベートした後、羊膜上皮を機械的に搔爬したものをを用いた。

全身麻酔下で 5 匹の家兎の角膜中央部および輪部から、直径 3 mm, 厚さ  $100\ \mu\text{m}$  の角膜片を採取し、角膜片各一個を羊膜上に置き、マイトマイシン C で処理した 3T3 fibroblast とともに 28 日間培養した。培養液は、DMEM と HamF-12 培養液を 1:1 で混合したものに、ウシ胎仔血清, インスリン, コレラトキシン, 上皮細胞増殖因子(EGF)および抗生物質を添加したものをを用いた。培養開始 5, 7, 14 日後に培養角膜上皮を羊膜ごとエタノールで固定した後ヘマトキシリンで染色し、写真撮影後、コンピュータに画像を取り込み、NIH image を用いて上皮細胞伸展面積を測定した。さらに、培養開始 7, 21, 28 日後に、培養角膜上皮の組織学的構造を走査および透過電子顕微鏡を用いて観察した。

培養上皮の伸展面積を比較した結果を図 10 に示した。角膜中央上皮の伸展面積は、上皮あり羊膜の上では  $1.82 \pm 2.62$  (平均値  $\pm$  標準偏差)  $\text{mm}^2$ , 上皮なし羊膜の上では  $131.83 \pm 28.31\ \text{mm}^2$ , 輪部上皮の伸展面積は、上皮あり羊膜の上では  $4.58 \pm 4.56\ \text{mm}^2$ , 上皮なし羊膜の上では  $505.39 \pm 134.20\ \text{mm}^2$  であった。角膜中央部上皮および輪部上皮は、上皮ありの羊膜に比べて、上皮なしの羊膜の上では有意に速い速度で伸展した。

走査電子顕微鏡による観察では、上皮ありおよび上皮なしの羊膜の上に、時間経過とともに角膜輪部上皮が伸展していく様子がみられ、細胞間に密な接着が形成される様子が観察された(図 11)。また、上皮あり羊膜の上では、羊膜上皮の微絨毛の上に被さるように角膜上皮が伸展していく様子が観察された。光学顕微鏡および透過電子顕微鏡による観察では、上皮あり羊膜の上には 4 層

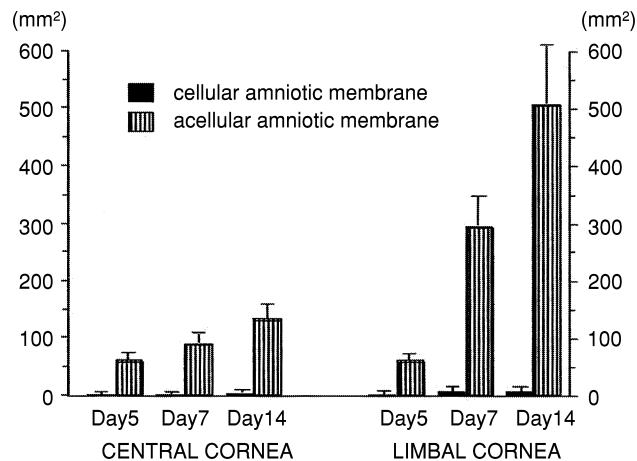


図 10 上皮あり(■)と上皮なし(▨)の羊膜の上で培養した家兎角膜上皮の伸展面積の比較。(文献 51 より転載)

程度の角膜上皮が重層化しており、基底部には羊膜上皮と思われる細胞内顆粒を含む細胞がみられ、その上に位置する培養角膜上皮細胞との間にデスモゾーム構造がみられた(図 12)。上皮なし羊膜の上には、4~6 層に重層化した角膜上皮がみられ、円柱形の基底細胞から、扁平な翼細胞様の表層細胞へと形態的に分化した細胞層を形成していた(図 13)。角膜上皮細胞間にはデスモゾームが基底細胞と羊膜基質の間には部分的に基底膜が形成されていた。

これらの結果から、羊膜上皮を除去した上皮なしの羊膜は、角膜上皮細胞の基質として適しており、上皮なしの羊膜を基質として用いることにより、*in vivo* の角膜上皮に類似した、形態的に分化し重層化した上皮細胞層を再現することが可能であることが判明した<sup>51)</sup>。

#### (3) 家兎を用いた自家培養角膜上皮ステムセル移植

以下の動物実験は、すべて ARVO statement for Animal Research in Ophthalmic and Vision Research および京都府立医科大学動物実験委員会において承認された方法に従って行った。

全身麻酔下で、7 匹の家兎の片眼に輪部から 5 mm 外側まで含めた深さ約  $100\ \mu\text{m}$  の角膜表層切除を行い、外傷眼を作製した。外傷を作製した家兎のうち、4 匹の正常眼から 2 mm 四方の小角膜輪部片を採取し、羊膜上皮を除去した羊膜の上で 3 週間培養した。培養方法は、Rheinwald ら<sup>52)</sup>が報告している皮膚培養の方法を応用して 3T3 fibroblast cell との共培養、培養上皮の表面を空気に触れさせる air-lifting<sup>53)</sup>などの手法を用いた。外傷を作製して 1 か月後に、すべて結膜上皮で覆われた家兎眼に対して、再び輪部から 5 mm 外側まで含めた表層角膜切除を行い、角膜輪部上皮を培養していた 4 眼では直径 7 mm の自家培養角膜上皮を羊膜ごと移植した。残りの 3 眼では、対照として直径 7 mm の上皮を除去した羊膜のみを移植した。術後はソフトコンタクトレン

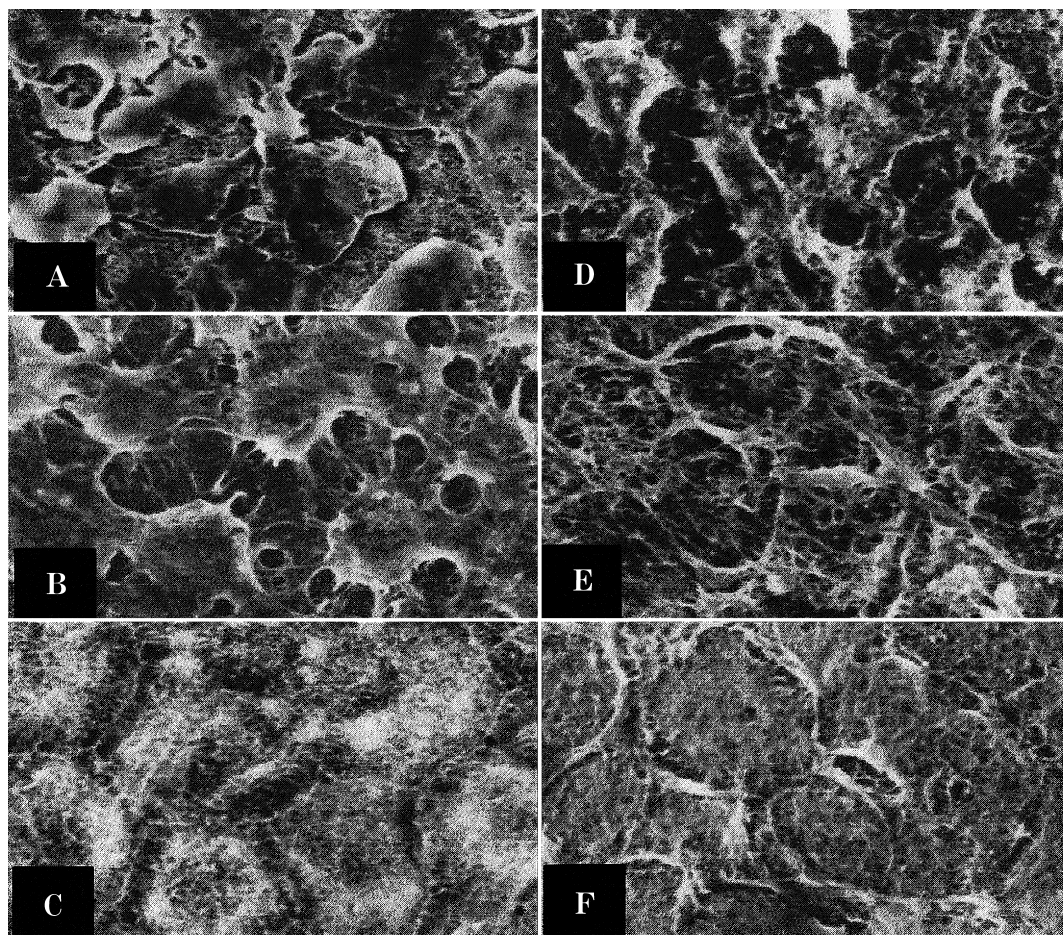


図 11 走査電子顕微鏡で観察した培養家兎角膜輪部上皮。

上皮あり羊膜の上で、7日間(A)、21日間(B)、28日間(C)培養した角膜輪部上皮と、上皮なし羊膜の上で7日間(D)、21日間(E)、28日間(F)培養した角膜輪部上皮、上皮あり羊膜の上では、角膜輪部上皮は羊膜上皮の微絨毛の上を覆うように伸展していくのがみられた(A)。(文献 51 より転載)

ズを装着させ、移植2、5日後にコンタクトレンズを外してフルオレセイン染色を用いて眼表面を観察した。

培養角膜上皮移植眼および対照眼の前眼部写真を図14に示した。移植2日後に、培養角膜上皮を移植した眼では移植片の上は上皮で覆われており、フルオレセインには染色されず、さらに移植片から外側に向けて上皮の伸展がみられた。この時点では上皮の周りはリング状の上皮欠損部で囲まれており、この中央の上皮が移植された培養角膜上皮であることは明瞭であった。培養角膜上皮を移植した眼では、術後5日には角膜上はほぼ上皮に被覆されていた。一方、対照として羊膜のみを移植した眼では、5日を経ても羊膜上は全上皮欠損の状態であった<sup>49)</sup>(図14)。

以上の結果から、家兎眼において自家培養角膜上皮移植を行い、培養角膜上皮シートが眼表面に生着することが確認された。培養角膜上皮シートを用いれば、眼表面の異常組織を手術時に剝離した後生ずる上皮欠損部を即座に被覆することができるため、術後創傷治癒が迅速であり、これまでの角膜上皮移植術では避けられなかつ

た術後早期の炎症再燃と遷延性上皮欠損の可能性を抑制することができると考えられ、重症眼表面疾患に対する有効な治療法になると考えられた。

#### (4) Cell-suspension 法によるヒト角膜上皮ステムセル培養法の開発

本研究には、米国 Northwest Lion Eye Bank から提供されたヒト角膜を用いた。Cell-suspension 法には、Gipson らの方法<sup>11)</sup>を応用して角膜輪部組織を1.2 IUのディスパーゼに浸して37°Cで1時間インキュベートした後、培養液中に回収した輪部上皮細胞を用いた<sup>54)</sup>。ディスパーゼ処理によって輪部上皮を回収した後の角膜組織を電子顕微鏡で観察した結果、ステムセルを含むと考えられる輪部の上皮細胞はすべて回収されていることが確認された。これらのステムセルを含むと考えられる細胞を、約 $3 \times 10^4$  cell/mlの濃度の細胞浮遊液として、上皮なしの羊膜を敷いた3枚のカルチャーインサート(2.7 cm 径)に培養した。Explant 法は、2 mm 四方で厚さ100  $\mu$ mの角膜輪部組織を、カルチャーインサート1枚当たり3片静置させて培養した。3T3 fibroblast と

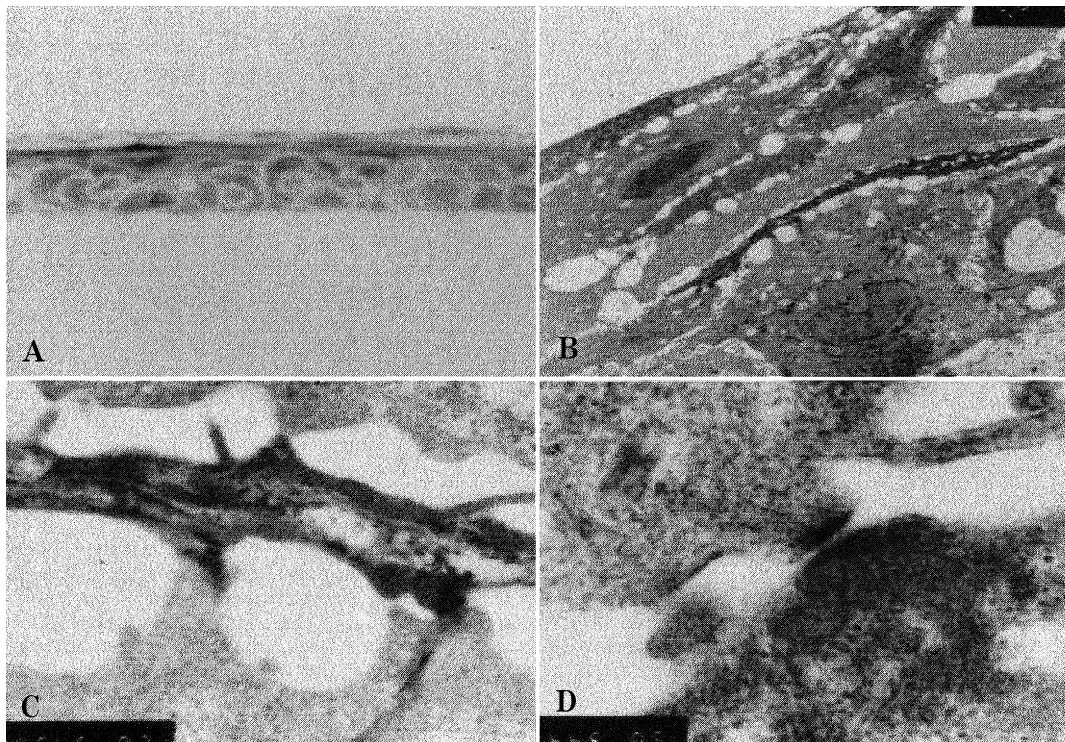


図 12 上皮あり羊膜の上で 28 日間培養した家兎角膜輪部上皮.

A: 約 4 層に重層化した上皮がみられた。B: 基底部には細胞内顆粒を含む羊膜上皮と考えられる細胞がみられた。輪部上皮は羊膜上皮の上に重層していた。角膜上皮細胞と羊膜上皮細胞の間(C), および角膜上皮細胞間(D)にはデスモゾームがみられた。(文献 51 より転載)

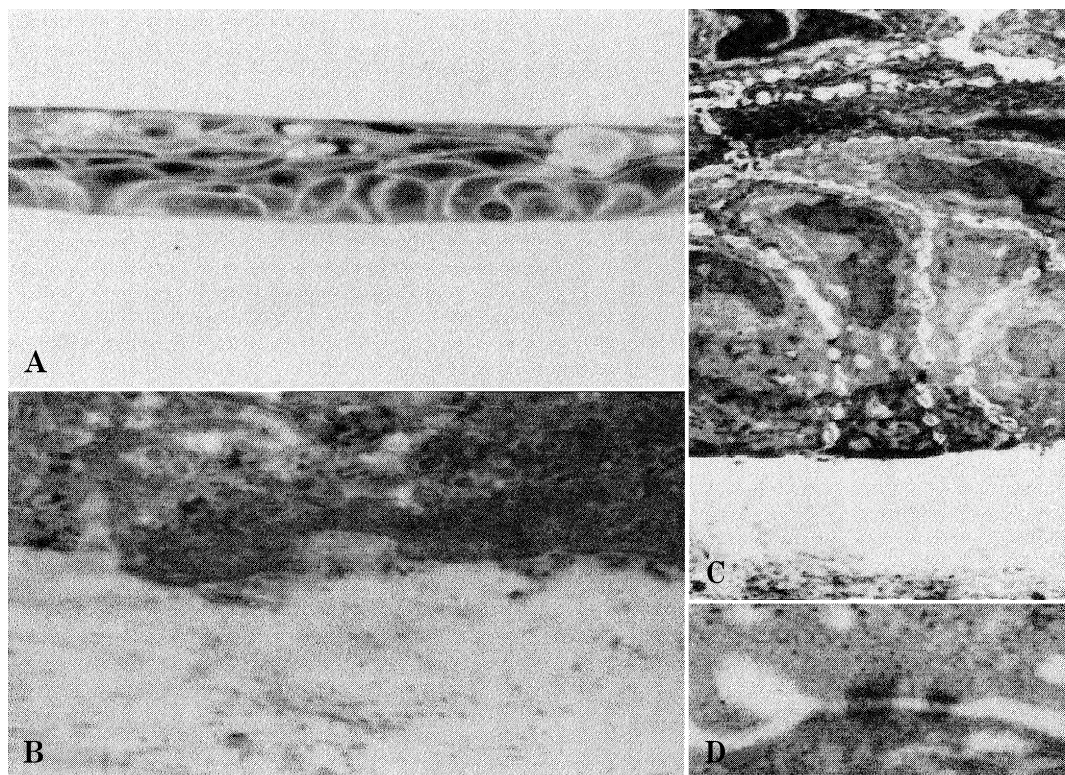


図 13 上皮なし羊膜の上で 28 日間培養した家兎角膜輪部上皮.

A: 約 4~6 層に重層化した上皮がみられた。B: 基底部の細胞は円柱形で、表層へ行くほど扁平な形態を示した。C: 羊膜との接着は良好であるが、完全な基底膜は形成されていなかった。D: 角膜上皮細胞間には多数のデスモゾームがみられた。(文献 51 より転載)

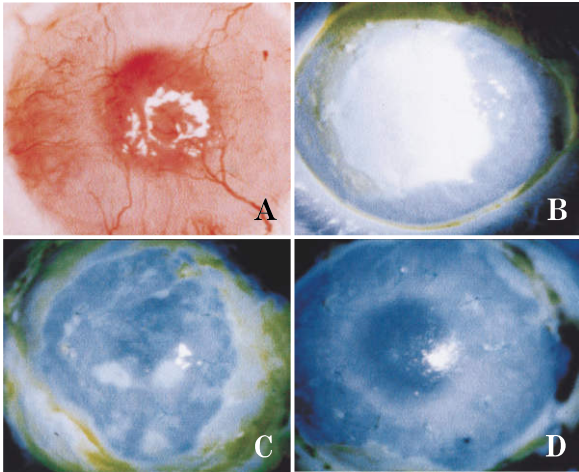


図 14 家兎における自家培養角膜上皮移植。

A: 外傷作製 1 か月後の家兎眼。眼表面は結膜上皮で覆われていた。B: 羊膜のみを移植した対照眼では、5 日後の移植片上はすべて上皮欠損であった。C: 結膜上皮を切除後、直径 7 mm の培養角膜上皮を移植した。2 日後には移植片は生着し、移植片の外側へも上皮が伸展していた。周囲は 360° の上皮欠損で囲まれているため、中央の上皮は移植した培養角膜上皮であることがわかる。D: 5 日後には角膜上ほぼ移植上皮で覆われた。(文献 49 より転載、一部改変)

の共培養や air-lifting, 細胞培養液などは前述した方法を用いた。28 日後に固定した培養角膜上皮細胞を、光学顕微鏡、走査および透過電子顕微鏡で観察した。さらに、透過電子顕微鏡で観察した画像をもとに、隣接する上皮細胞間の細胞間距離およびデスモゾームの数(3  $\mu\text{m}$  当たり)を計測した。また、無固定で凍結切片を作製し、角膜上皮に特異的なケラチン 3 およびケラチン 12 の免疫染色を行った。

光学顕微鏡による観察では、cell-suspension 法および explant 法で作製した培養角膜上皮はいずれも 5~6 層に重層化し、基底部の円柱状の細胞から表層の扁平な細胞へと形態的に分化した上皮層を形成していた。走査電子顕微鏡による観察では、いずれの培養角膜上皮シートにも密に連続した多角形の上皮細胞層が形成されていた。上皮細胞の直径は約 50~60  $\mu\text{m}$  で、表面は多数の微絨毛で覆われており、*in vivo* の角膜上皮細胞に類似した形態を示した。透過電子顕微鏡による観察では、どちらの培養角膜上皮も 5~6 層に重層化しており、上皮細胞間にはデスモゾームが、基底部の上皮細胞と羊膜基質の間にはヘミデスモゾームが形成されていたが(図 15), explant 法で培養した上皮では隣接する基底細胞間の細胞間隙が cell-suspension 法で培養した上皮に比べて有意に大きく、また隣接する基底細胞間に形成されたデスモゾームの数が有意に少なかった( $p < 0.001$ ) (図 16)。Cell-suspension 法と explant 法で作製した上皮はどちらもケラチン 3, ケラチン 12 を発現していたが、cell-suspension 法で作製した上皮では、これらのケラチンの発現がより表層細胞に局限していた<sup>54)</sup>(図 17)。

これらの結果から、cell-suspension 法によって、形態学的により *in vivo* の角膜上皮に近い上皮細胞シートを作製できる可能性が推測された。現在のところ、ステムセルを直接同定することは困難であるが、cell-suspension 法で培養した角膜上皮シートには理論的にステムセルが数多く含まれている可能性があり、培養角膜上皮による眼表面再建術には、cell-suspension 法で作製

した培養角膜上皮シートがより適していると考えられた。

## 2) 羊膜上のヒト培養角膜上皮シートの性状解析

ヒト培養角膜上皮ステムセルシートについて、細胞分化と増殖をいくつかの方法で検討した。その 1 つは、air-lifting 法により表層角膜上皮細胞が強固な tight junction 形成を行い、*in vivo* への移植をより確実にできると我々は考えているが、その実証を行った。もう 1 つは、このシートは角膜上皮ステムセルを含んでいるはずであるが、その実証としてテロメレース測定を試みた。さらに、DNA チップを用いて、培養角膜上皮シートと正常角膜上皮の遺伝子発現の差異を検討した。

### (1) Air-lifting 法による羊膜上培養ヒト角膜上皮細胞の分化促進

羊膜上でヒト角膜上皮ステムセルを 3 週間培養液中で培養した後、さらに 1 週間、培養液中で培養したもの (air-lifting なし) と、培養液量を減じて最表層細胞を空気に接触させたもの (air-lifting あり) とを比較検討した。比較は、horseradish peroxidase (HRP) の透過性<sup>55)</sup>、走査電子顕微鏡像、tight junction 関連蛋白<sup>56)</sup>の発現パターン、その半定量 polymerase chain reaction (PCR) などについてであった。

方法としては、まず培養角膜上皮細胞の形態と HRP の透過性を透過電子顕微鏡で観察した。リン酸緩衝液 (PBS) 中に 100 mg/ml 濃度で溶解した HRP 200  $\mu\text{l}$  を培養細胞層の頂端側に滴下し、45 分後に 2.5% glutaraldehyde で 12 時間固定した。過剰な HRP を洗浄後、0.02% diaminobenzidine (DAB) と反応させた。1% osmium tetroxide で 90 分間後固定した後アルコール系列で脱水し、polybed 812 (Polysciences inc., Warrington, PA) 中に包埋した。50~70 nm の超薄切片を作製し透過電子顕微鏡で観察した。さらに、HRP の透過性実験用に用意したサンプルをアルコール系列での脱水後 hexamethyldilisane 中に 10 分間浸潤し乾燥させ、走査電子顕微鏡で観察した。次に、tight junction 関連蛋白の

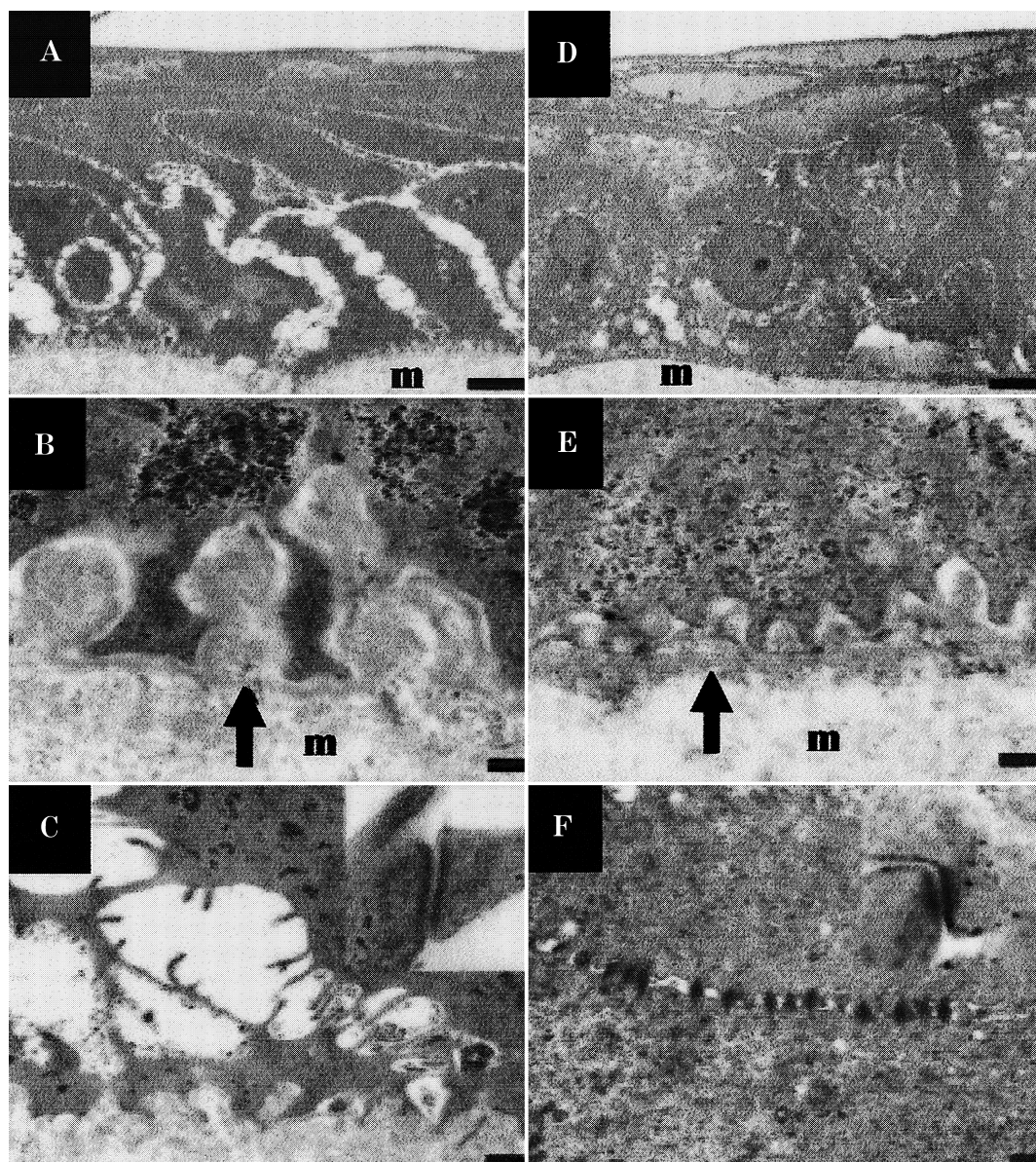


図 15 Explant 法と cell-suspension 法により作製したヒト培養角膜輪部上皮シートの透過電子顕微鏡による観察。

Explant 法で培養した上皮(A, B, C)と, cell-suspension 法で培養した上皮(D, E, F)はどちらも *in vivo* の角膜上皮に類似した重層化した上皮層を形成していた。上皮下には基底膜が形成されており(→), 基底細胞と羊膜の間はヘミデスモゾームによる接着がみられた(B, E)。Explant 法と cell-suspension 法を比較すると, explant 法の上皮では基底細胞間に間隙がみられ, デスモゾームによる接着も少なかった(A, C)。一方, cell-suspension 法の上皮では, 細胞間隙が狭く, デスモゾームも多くみられた(D, F)。(文献 54 より転載)

局在について免疫組織化学間接蛍光抗体法で検討した。7  $\mu$ m の凍結切片を作製し, 7% paraformaldehyde で 10 分間固定を行い, 1% bovine serum albumin (BSA) で非特異的な反応をブロックした後に, 各々の蛋白質に特異的な一次抗体を反応させた。使用した抗体はウサギ抗 ZO-1 抗体とウサギ抗 claudin-1 抗体 (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA), ヤギ抗 occludin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) である。さらに, FITC で蛍光標識した二次抗体と反応させた。核を propidium iodide (PI) (Vector Laboratories,

Burlingame, CA) で染色した後に多焦点顕微鏡 (Fluoview, Olympus) で観察した。第 3 に, immunoblotting を行った。培養細胞シートを機械的に培養フィルタから剥離し, 100 mM EDTA と 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) で蛋白質を抽出した。Micro BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) で蛋白量を定量し, 一定量の蛋白をポリアクリルマイドゲル上に泳動した。泳動された蛋白をニトロセルロース膜に移動させた後に, 抗 occludin 抗体と抗 claudin-1 抗体, さらに対照のために抗 actin 抗体と反応させた後に, ECL (Amersham,

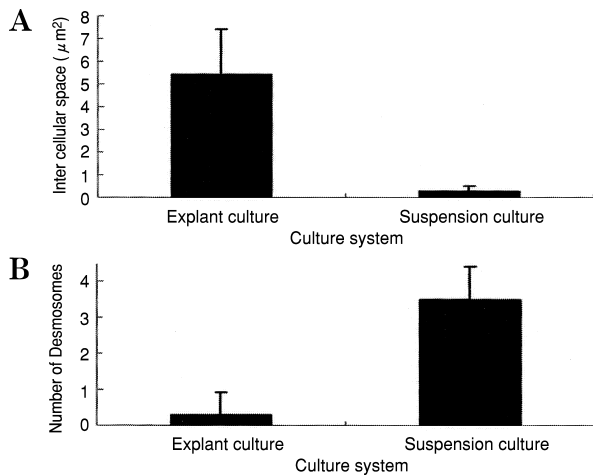


図 16 Explant 法と cell-suspension 法によるヒト培養角膜輪部上皮の比較。

A: 基底細胞の細胞間隙の比較。B: 細胞間に形成されたデスモゾームの数の比較(細胞境界 3 μm 当たり)。(文献 54 より転載)

Arlington Heights, IL) 溶液を用いて発光させて、X-ray film (Hyperfilm, Amersham) 上に現像した。シグナルは Image Master VDT-CL でコンピュータに取り込んだ後に、Master Total Lab ver 1.00 (Amersham) で解析した。初期の蛋白質の誤差を是正するために occludin および claudin-1 と actin の比で比較し、t-test で検定を行った。最後に、occludin と claudin-1 について半定量的 reverse transcription (RT)-PCR を行った。培養細胞シートを機械的に培養フィルタから剥離し、Trizol reagent (GIBCO BRL) で total RNA を抽出した。Occludin と claudin-1, および内部対照として G3 PDH の各々に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。あらかじめ予備実験を行い、反応生成物がリニア範囲のサイクル数を各々の遺伝子に対して設定した。用いたプライマーは、

G 3 PDH ;

ACCACAGTCCATGCCATCAC(sense),

TCCACCACCTGTTGCTGTA(antisense),

occludin ;

TATGAGACAGACTACACAAGTGGCGGCGA-GTCC(sense),

ATCATAGTCTCCAACCATCTTCTTGATGT-G(antisense),

claudin-1 ;

TCAGCACTGCCCTGCCCCAGT(sense),

TGGTGTGGGTAAGAGGTTGT(antisense)

である。2% アガロースゲルに泳動し、シグナルをデンストメータ (4200 E scanner, PDI, NY) で取り込んだ後に解析ソフト (Quantity One, PDI, NY) で解析した。初期の RNA 量の誤差を是正するために occludin および claudin-1 と G 3 PDH の比で比較した。

その結果、どちらのグループにおいても、4, 5 層の重層上皮を形成していた。Air-lifting(+) の培養群では隣接する最表層細胞は強く密着しており、HRP/DAB の反応生成物は最表層細胞の膜外側に集積しており、細胞間にはみなかった(図 18)。Air-lifting(-) では細胞間隙が大きく、HRP は細胞間隙を通過した。走査電子顕微鏡での観察でも air-lifting(+) は air-lifting(-) に比較して細胞間距離が狭く、強固に咬み合っていた(図 19)。Air-lifting(+) の培養群においては、ZO-1 と occludin は最表層細胞の隣接する細胞間の頭頂部に局在し、*in vivo* 角膜上皮における分布に類似していた。Air-lifting(-) の培養群では最表層細胞の細胞質内に ZO-1 と occludin 抗体による染色をみたが、細胞間頭頂部の局在はみなかった。抗 claudin-1 抗体により、Air-lifting(-) では最表層細胞の頂端壁と側底壁の両方がびまん性に染色されたが、air-lifting(+) では側底壁の方が頂端壁よりも強く染色された。すなわち、air-lifting により tight junction 関連蛋白質はより tight junction の部位に局在し、*in vivo* 正常角膜上皮に近い分布となった(図 20)。一方、occludin と claudin-1 の培養細胞シート中の発現量は蛋白質レベルでも mRNA レベルにおいても、air-lifting の有無で差はみられなかった。

Tight junction は上皮細胞や内皮細胞の頂端部に存在し隣り合った細胞同士を強く接着させる構造で、膜貫通蛋白質である occludin や claudin および ZO-1 などの裏打ち蛋白質によって構成されている<sup>56)~59)</sup>。細胞同士をただ密着させるだけでなく、様々な分子やイオンを選択的に透過させていることも明らかとなっている<sup>60)</sup>。角膜上皮の最表層細胞間にも tight junction が存在し、外界とのバリア形成に重要な役割を担っている。我々の目的とする培養角膜上皮移植では、術後初期の培養細胞の脱落を防止して、より良い術後経過を得るためには、強固な細胞間接着を持つ培養上皮シートが必要とされる。皮膚移植に用いる皮膚細胞培養のために開発された air-lifting 法は細胞分化を誘導すると考えられており<sup>61)~63)</sup>、我々は羊膜上角膜上皮細胞培養にこの air-lifting 法の応用を試みた。Air-lifting 法は、tight junction 関連蛋白質を junction の部位に集合させるようになり、トレーサー物質の透過性を最表層細胞間で阻止した。これらのことから、air-lifting によって表層細胞は分化し、成熟した tight junction を構成するようになり、培養上皮シートのバリア機能は向上すると考えられた。以上から、air-lifting 法は臨床に用いる培養角膜上皮シート作製に有効であると考えられた。

## (2) 培養角膜上皮の細胞増殖活性

S 期細胞頻度ならびにテロメレーズの観点から検討した。特に、テロメレーズは、血液、皮膚、腸管上皮などのように生涯にわたり再生を繰り返す組織特異的の存在を推測するマーカーとなるとされており<sup>64)</sup>、

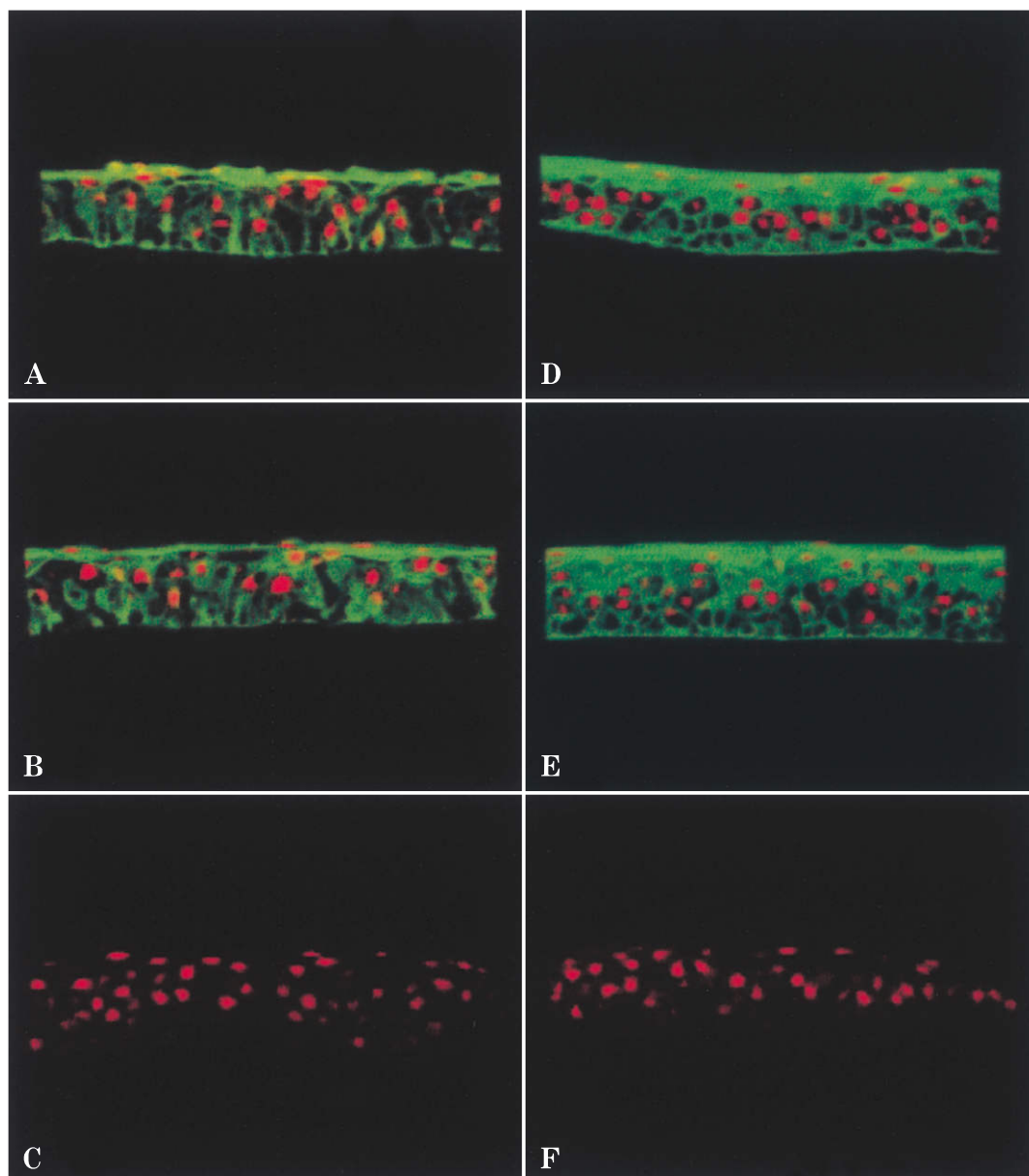


図 17 Explant 法と cell-suspension 法によって作製した培養角膜輪部上皮における K 3, K 12 の発現。  
A : explant 法培養上皮における K 3 の発現。B : explant 法培養上皮における K 12 の発現。C : K 3 陰性対照。D : cell-suspension 法による培養上皮における K 3 の発現。E : cell-suspension 法による培養上皮における K 12 の発現。F : K 12 陰性対照。(文献 54 より転載)

角膜輪部に陽性であれば、角膜上皮stemセルの存在を強く推測することになる。さらに、テロメレーズが培養角膜上皮シートにも陽性であれば長期間の増殖能力を推測させることになる。

#### i) S 期細胞頻度

Air-lifting が重層化した最表層上皮の接着構造の構築に重要なことは先の実験で証明したが、残る移植シートに要求される特性として細胞増殖能が高く保持されているかどうかが問題となる。そこで、我々は explant および cell suspension の両方法で作製された移植用角膜上皮シートの S 期細胞数を比較検討した。方法は、air-lifting により分化誘導された上皮シートの BrdU の取り込

み量で比較した。Explant 法で作製したシート 5 サンプルと cell suspension 法で作製したシート 3 サンプルを比較検討した。図 21 に示すように、explant 法では 100 個の基底細胞に対して 5.0%，cell suspension 法では 4.9% に S 期細胞がみられ、両者の S 期細胞数頻度に有意差はなかった。BrdU 陽性細胞の分布は基底細胞が主体であったが、1～2 層上方の細胞にもみられた。この増殖活性データからも我々の作製している培養角膜上皮シートは、増殖活性を保ちつつ分化誘導された状態にあることがわかる。

#### ii) テロメレーズ活性

羊膜上培養角膜上皮細胞のテロメレーズ活性を ex-

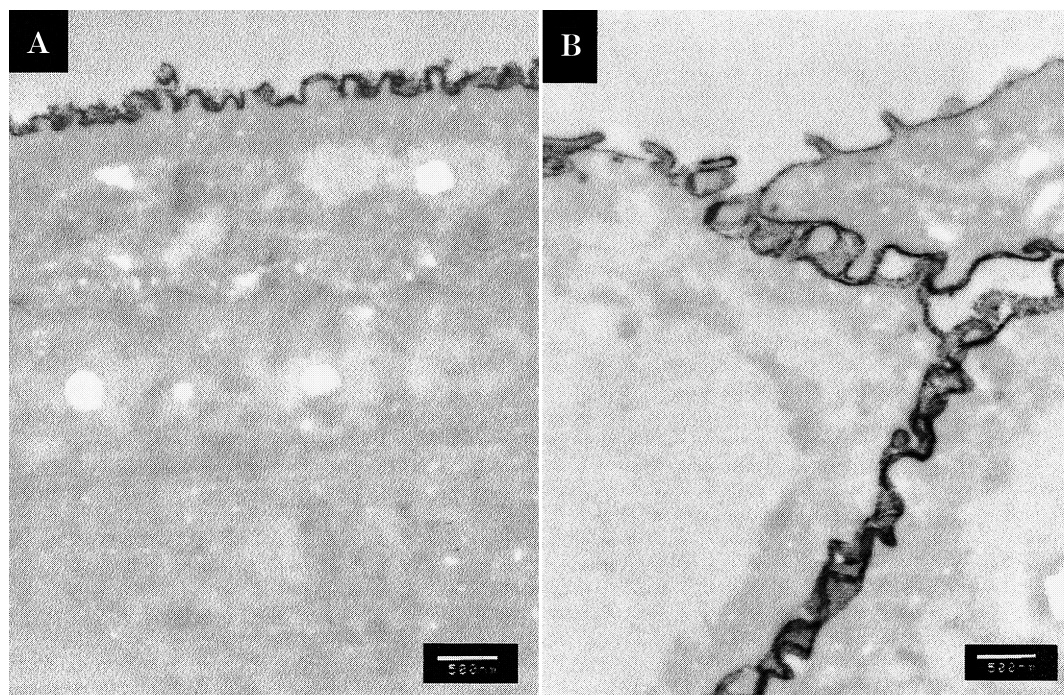


図 18 HRP 処置後の培養角膜上皮の透過電子顕微鏡写真.

Air-lifting を行ったもの (A) では HRP は頂端側に集積していて細胞間は侵入していない。Air-lifting を行っていないもの (B) では、HRP は細胞間隙に侵入している。HRP: horseradish peroxidase. パーは 500 nm

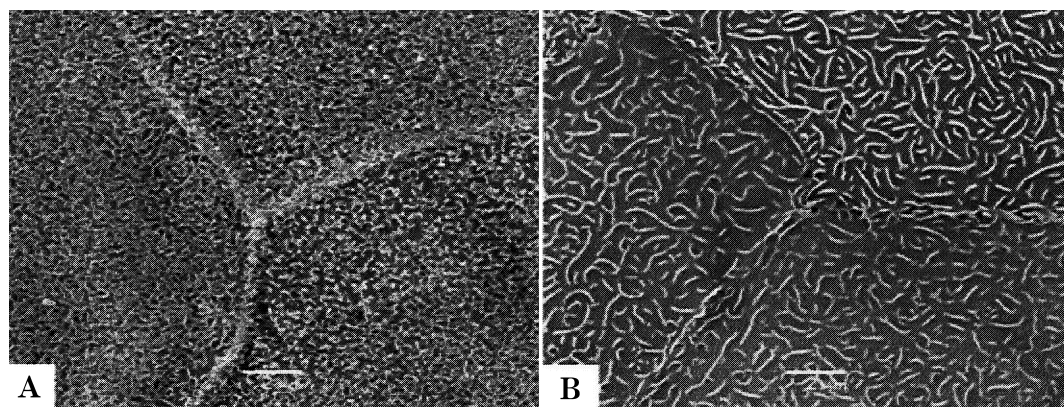


図 19 培養角膜上皮の走査電子顕微鏡写真

Air-lifting を行ったもの (A) は air-lifting を行っていないもの (B) に比較して、微絨毛の密度が高く、細胞間の噛み合わせが密である。パーは 2  $\mu$ m

plant 法, cell suspension 法のそれぞれについて検討した。比較対照として、海外ドナー角膜から採取した正常角膜中央部上皮と角膜輪部上皮、さらに不死化角膜上皮細胞のテロメラーゼ活性を測定した。方法としては、テロメラーゼ測定に広く用いられている Kim ら<sup>65)</sup>が開発した PCR を利用したテロメラーゼ活性測定法 Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) アッセイに、微弱なテロメラーゼ活性しか有しないと考えられるサンプルからの測定が可能となるよう、PCR 阻害物質の除去や DNA シークエンサーの利用などの改良を加えた方法<sup>66)</sup>を用いた。まず、各サンプルに lysis バッファ

を加え細胞抽出液を作製し、吸光度を測定し蛋白量を 400 ng/ $\mu$ l に調整した。ビオチン標識した TS プライマーと細胞抽出液を 30°C で 30 分静置(この間に細胞抽出液に含まれたテロメラーゼがビオチン標識した TS プライマーを伸長する)後、ストレプトアビジン (Dynabeads® M-280 Streptavidine, DYNAL. A. S., Oslo, ノルウェイ)を用いて 6 塩基のテロメア配列が付加されたビオチン標識 TS プライマーを精製し、それを鋳型として PCR 反応 (Gene Amp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA) を行った。6 塩基のラダー配列が増幅された PCR 産物を DNA シークエンサ

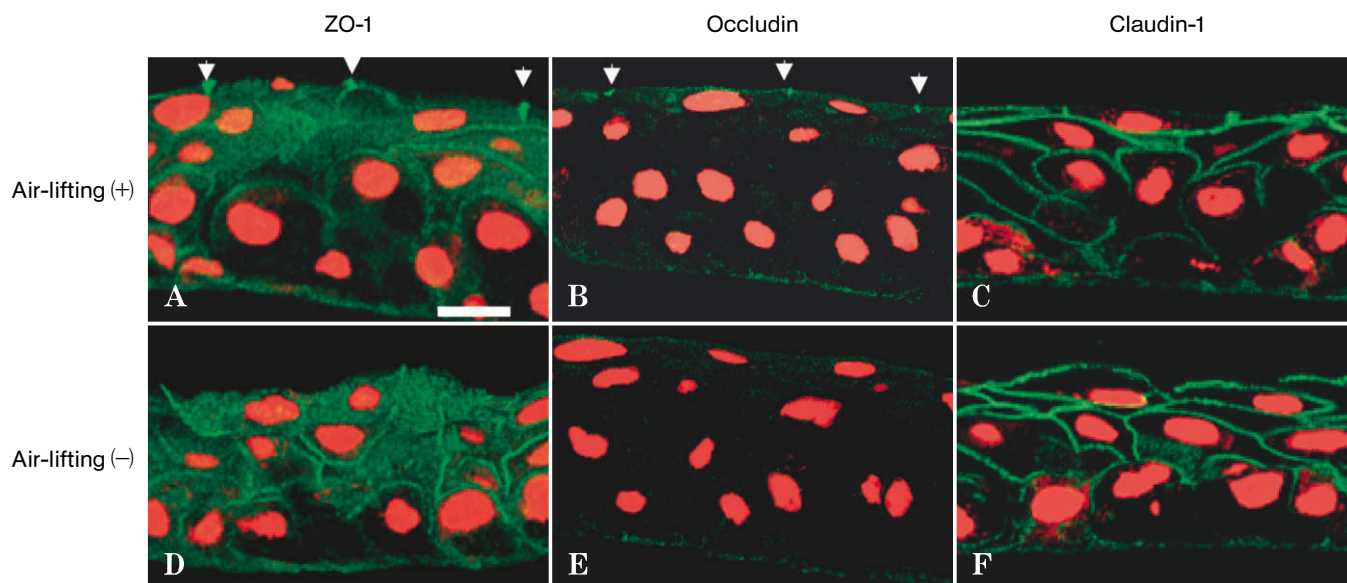


図 20 Tight junction 関連蛋白質の間接免疫蛍光染色.

Air-lifting を行った培養角膜上皮では ZO-1 (A) と occludin (B) が細胞間の頭頂部, すなわち tight junction の位置に局在している (矢印). Air-lifting を行っていないものでは ZO-1 (D) と occludin (E) は細胞質内にシグナルがみられる. Claudin-1 の染色は air-lifting を行っていないものでは, 細胞の頂端壁も側底壁もびまん性に染まっている (F) が, air-lifting を行ったものでは最表層細胞の側底壁が頂端壁より強く染まる傾向がある (C). バーは 20  $\mu$ m

ー (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA) で電気泳動後, 解析ソフト (Gene ScanR Software, Applied Biosystems, Foster City, CA) で解析した. テロメラーゼ活性は 6 塩基ごとのピークとして検出され, さらにガウス最小二乗法を用いてカーブフィッティングを行い, その面積を算出することによりテロメラーゼ活性の定量を試みた.

その結果, 角膜輪部上皮細胞には, 不死化角膜上皮細胞の 20% に相当する強いテロメラーゼ活性をみたが, 角膜中央部上皮細胞にはほとんどみなかった. さらに, 羊膜上培養角膜上皮細胞シートでは explant 法と cell suspension 法のいずれの方法で作製した培養細胞からも同程度の明らかなテロメラーゼ活性をみた (図 22). このことは, 我々の作製している羊膜上培養角膜上皮シートがテロメラーゼ活性を有する細胞, すなわち stem cell を有していることを示しており, 培養角膜上皮移植術では移植後の長期間にわたり培養角膜上皮シートから角膜上皮細胞が供給されることが考えられた.

### (3) 羊膜上培養角膜上皮の遺伝子発現解析

同一眼から採取した周辺部角膜上皮, 中央部角膜上皮 (以下, 周辺部, 中央部), そして周辺部角膜上皮を cell suspension 法と explant 法<sup>54)</sup>で羊膜上で 4 週間培養し, 角膜上皮が 5~6 層に重層化した後採取した培養角膜上皮細胞 (以下, explant, cell suspension) の遺伝子発現を比較解析した. 周辺部, 中央部, explant, cell suspension, 各々から上皮細胞を採取した後, total RNA を抽出し, ビオチンでラベルした cDNA プロンプ (ex-

plant, 周辺部, 中央部) とフルオレセインでラベルした cDNA プロンプ (cell suspension) を作製した. cDNA マイクロアレイ法 (パーキンエルマー社製 MICROMA-X) で 2,400 個の既知遺伝子に関し, explant と cell suspension, 周辺部と cell suspension, 中央部と cell suspension の組み合わせで 1 枚のスライドに競合的にハイブリダイゼーションさせた後洗浄し, フルオレセインを Cyanine 3 (cy 3, 緑色), ビオチンを Cyanine 5 (cy 5, 赤色) で蛍光発色させた. 共焦点レーザーキャナー (パーテック) で蛍光強度を読み取り (図 23), Microassay Suite 2.7.1 で解析した. cy 3 と cy 5 の蛍光色素キャリブレーション補正をした後, G 3 PDH を内部標準とし, 発現比を比較検討した.

この結果は, 以下のとおりであった. Explant と cell suspension の比較では, 比較可能な 382 個の遺伝子発現がみられ, 238 遺伝子 (62%) で発現比が 2 倍以内であった. 周辺部と cell suspension の比較では, 164 個の遺伝子発現がみられ, 100 遺伝子 (61%) で発現比が 2 倍以内であった. 中央部と cell suspension の比較では, 536 個の遺伝子発現がみられ, 266 遺伝子 (50%) で発現比が 2 倍以内であった. 発現比が 5 倍以上であったのは, explant と cell suspension では, osteopontin, serine protease, Kruppel-related DNA-binding protein の 3 個であった. 一方, 周辺部と cell suspension では 23 個, 中央部と cell suspension では 58 個であり, apolipoprotein J, alpha enolase, keratin II, transketorase などの遺伝子は *in vivo* で発現が高く, vitronectin recep-

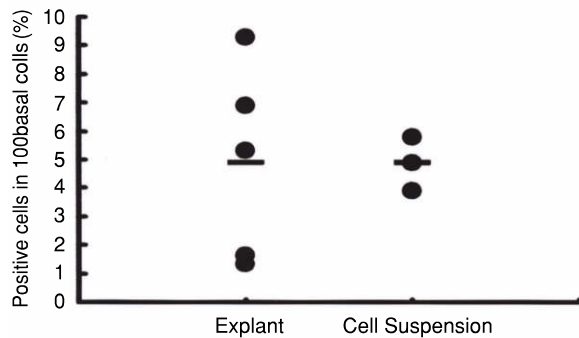
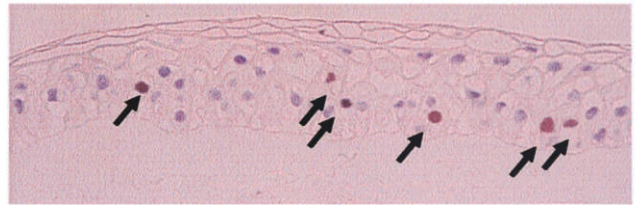


図 21 Explant 法および cell suspension 法で作製した上皮シートでの S 期細胞の割合.

100 個の基底細胞の領域にそれぞれ 5.0% と 4.9% の BrdU 陽性細胞があった. 両方法に差はなく, 細胞増殖活性がある程度抑制された上皮シートが作製されていることがわかる. 矢印は BrdU 陽性細胞.



tor alpha subunit, vimentin, cyclin A 1 などの遺伝子は *in vitro* で発現が高かった. 周辺部と cell suspension, 中央部と cell suspension の比較の両方で 100 倍以上の発現比を示したのは, apolipoprotein J のみであった. また, クラスター解析により, explant と cell suspension, 周辺部と中央部の遺伝子発現がより近位であった (図 24). このことから, cell suspension 法と explant 法による羊膜上培養角膜上皮の遺伝子発現には高い相同性がみられ, 両者が培養角膜上皮シートとして類似した性質を有することが推測された.

### 3) 臨床試験

臨床試験を施行するに当たり, 羊膜移植については 1998 年大学倫理委員会の承認を得ており, 「allograft の培養角膜上皮移植術」の実施に当たっては 1999 年に追加承認を得た. この承認に基づいて羊膜処理, 細胞培養を行い, 全症例において, 十分なインフォームド・コンセントのもとに文書同意を取得し, 手術を施行した. 羊膜上培養角膜上皮シートを用いて培養角膜上皮移植を行った症例は 23 例 25 眼であり, 急性期に上皮修復目的で手術を施行した症例が 7 例 9 眼, 慢性期(瘢痕期)に視力回復目的で手術を行ったものが 16 例 16 眼であった (表 1). Stevens-Johnson 症候群, 眼類天疱瘡, 角膜腐食例であった. 今回まとめた手術例の手術実施期間は 1999 年 7 月~2001 年 12 月までで, 術後の経過観察期間は急性期症例が  $23.9 \pm 3.8$  (平均値  $\pm$  標準誤差) か月, 慢性期症例が  $19.2 \pm 3.6$  か月であった. 移植眼すべて (100%) において, 移植後 48 時間後に移植したほぼすべての培養上皮が角膜表面に生着していることを, フルオレセインを用いた生体染色法によって確認した (図 25).

典型的な手術方法は, 以下のとおりである (図 26). まず, 輪部から約 3 mm 外方で全周性に結膜を切開し, 角膜表面および角膜周囲を覆う瘢痕性結膜組織を除去する. 結膜下結合組織を可能な限り切除した後, 結膜下に 0.04% マイトマイシン C (MMC) に浸したスポンジを 5 分間作用させ, 300 ml 以上の生理食塩水で眼表面を十

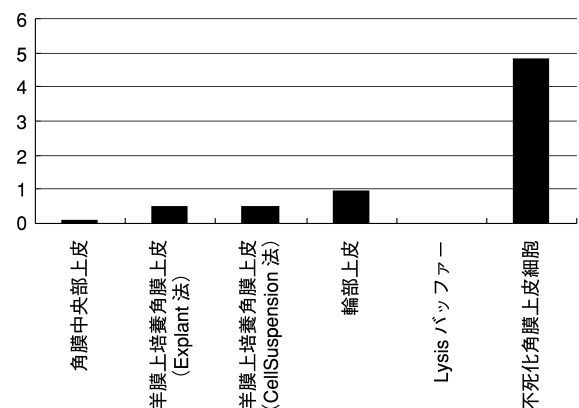


図 22 テロメラーゼ活性の定量.

輪部上皮のテロメラーゼ活性は不死化角膜上皮の約 20% であった. 羊膜上培養角膜上皮のテロメラーゼ活性では, explant 法と cell suspension 法は同程度であった. 縦軸は相対活性を示す.

分に洗浄する. 角膜実質混濁がある場合にはドナー角膜上皮を擦過除去した表層角膜移植を併用する. 次に, 培養角膜上皮シートをカルチャーインサートから切り出し, 患者角膜上でインサートの底面素材である polycarbonate を羊膜下から剥離して引き出し, 羊膜上培養角膜上皮シート単体にする. これを角膜輪部付近に 10-0 ナイロン糸で縫着する. 羊膜と角膜実質間の血液貯留を防ぐためにドレナージ用小切開をシート周辺部の 4 か所に置き, 治療用ソフトコンタクトレンズを装着して手術を終了する. コンタクトレンズは定期的に交換しながら連続装用を継続的に行った. 術後の投薬としては, 局所ではオフロキサシン, 0.1% デキサメサゾンの点眼に加えて, 自家調整の 0.05% シクロスポリン点眼 (4 回/日) を行い, 全身的にはベタメサゾン内服 (1~2 mg/日) を術後 1 か月以上, シクロスポリン内服 (2~3 mg/kg/日) を術後 3 か月以上投与した. Stevens-Johnson 症候群と眼類天疱瘡では, さらにシクロフォスファミド内服を追加した.

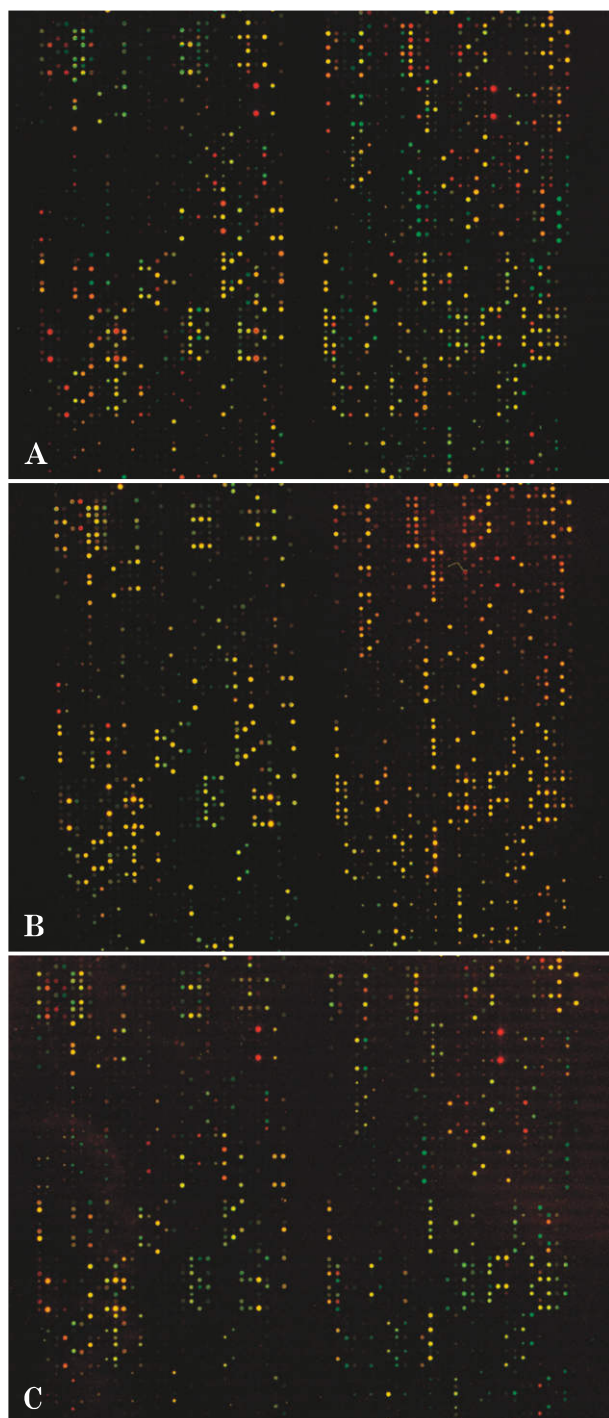


図 23 DNA マイクロアレイのアレイビュー。

A: Explant と cell suspension, B: 周辺部と cell suspension, C: 中央部と cell suspension. Explant, 周辺部, 中央部は赤色に発色, cell suspension は緑色に発色させてある。黄色は発現量がほぼ等しい遺伝子である。

培養角膜上皮ステムセル移植の基本コンセプトは、従来外科的治療の対象となり得なかった急性期の重症眼表面疾患への新しい外科的アプローチを開発するというものである<sup>22)67)</sup>。何故なら、Stevens-Johnson 症候群、重症角膜化学外傷では急性期に全角膜上皮欠損とともに著

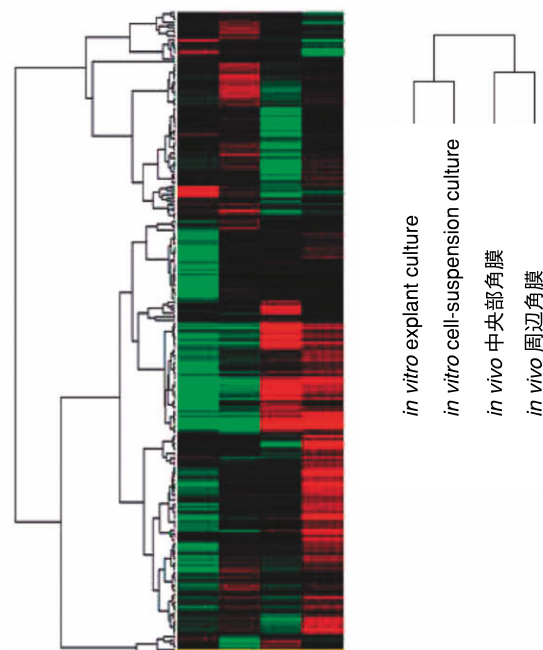


図 24 *In vivo* および *in vitro* 角膜上皮細胞の遺伝子発現のクラスター解析。

赤は発現量が多い遺伝子, 緑は発現量が少ない遺伝子, 黒はその中間を示す。 *in vitro* の群, *in vivo* の群がそれぞれ近い遺伝子発現パターンを示した。

表 1

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| 急性期                 | 7 例 9 眼   |
| Stevens-Johnson 症候群 | 3 例 5 眼   |
| 化学外傷                | 3 例 3 眼   |
| 眼類天疱瘡               | 1 例 1 眼   |
| 慢性期                 | 16 例 16 眼 |
| Stevens-Johnson 症候群 | 9 例 9 眼   |
| 化学外傷                | 3 例 3 眼   |
| 眼類天疱瘡               | 4 例 4 眼   |

しい炎症が生じ、しばしば遷延性上皮欠損の状態となる。強い炎症を伴う遷延性上皮欠損は、角膜融解から角膜穿孔、あるいは角膜感染症といった重篤な状態に至りやすく、臨床的には非常に危険である。しかし、従来の角膜上皮移植である角膜上皮形成術や輪部移植では、角膜全体の上皮化を得るまで術後 1～2 週間待たねばならず、これら急性期の遷延性上皮欠損に角膜上皮移植を施行しても、上皮化が得られない、移植片が生着しにくい、拒絶反応が生じやすいといった問題があった。このため、これらの疾患の急性期は上皮移植術の適応外とされてきたからである。しかし、保存治療のみでは結膜上皮が結合組織を伴って侵入し、瞼球癒着も進行し、視力予後は著しく不良となる。そこで、このような急性炎症を伴った遷延性上皮欠損眼、すなわち有効な治療のなかった病態に対して、培養角膜上皮シート移植を行ったわけである<sup>22)</sup>。当然、急性期に効果があれば、慢性期に

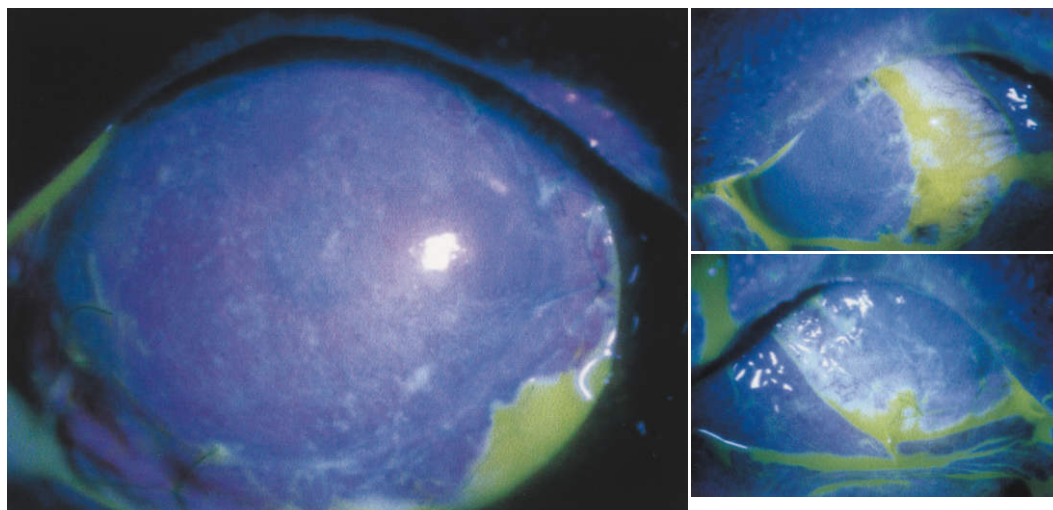


図 25 培養角膜上皮移植術後 48 時間での眼表面の状態。

移植された羊膜上の培養上皮細胞は瞬目のストレスに耐え、眼表面にしっかりと生着している。

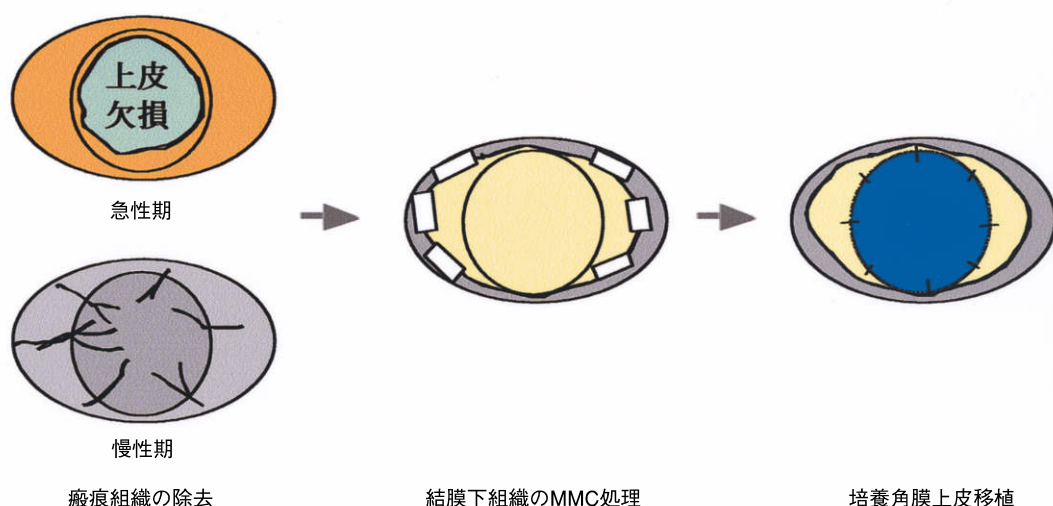


図 26 培養角膜上皮移植術の概要。

急性期、慢性期の角膜上を覆う瘢痕、肉芽組織とともに結膜上の異常粘膜組織を除去し、結膜下組織の増殖を抑える目的でマイトマイシンC(MMC)処理を行う。この上に羊膜上に培養した角膜上皮細胞を移植する。

も適応が拡大することになる。実際の症例を提示する。

症例：7歳男児。1999年3月に熱発と全身の紅斑でStevens-Johnson症候群を発症した。全身状態が改善するも、眼所見は改善せず6月18日当科に紹介された。初診時、両眼の角膜に遷延性上皮欠損があり、保存治療を行ったが上皮は伸展せず、上皮欠損部の角膜融解が生じ始めた。両眼の結膜囊からメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を検出したため、1%アルベカシン点眼により菌の陰性化を行い、同年9月3日に両眼の培養角膜上皮移植術を施行した。術後、上皮の状態は安定しており、次第に上皮と角膜実質が透明化した(図27)。現在の矯正視力は、右眼0.05、左眼0.04であり、拡大読書器などを使用して元気に学校生活を送っている。この

症例に培養角膜上皮を行わなかった場合には、角膜穿孔から失明するか、あるいは強い瞼球癒着を伴って角膜は厚い結膜組織で被覆され、著しい視力障害を残した可能性が高いと考えられる。化学外傷急性期、急性増悪した眼類天疱瘡に対しても同様の手術を行い、危険回避のみならず視力的にも良好な結果を得ている(図28,29)。

急性期症例に手術を行うに当たって予想された利点としては、培養上皮のついたシートを移植するため、術後の角膜上皮化を待たなくてよいことがあった。上述したように、移植48時間後に培養上皮は角膜全面を被覆して生着しており、上皮はしばしば羊膜を越えて結膜側にoutgrowthしていた。予想外の利点としては、培養角膜上皮移植後に極めて速やかに眼表面が消炎したことで

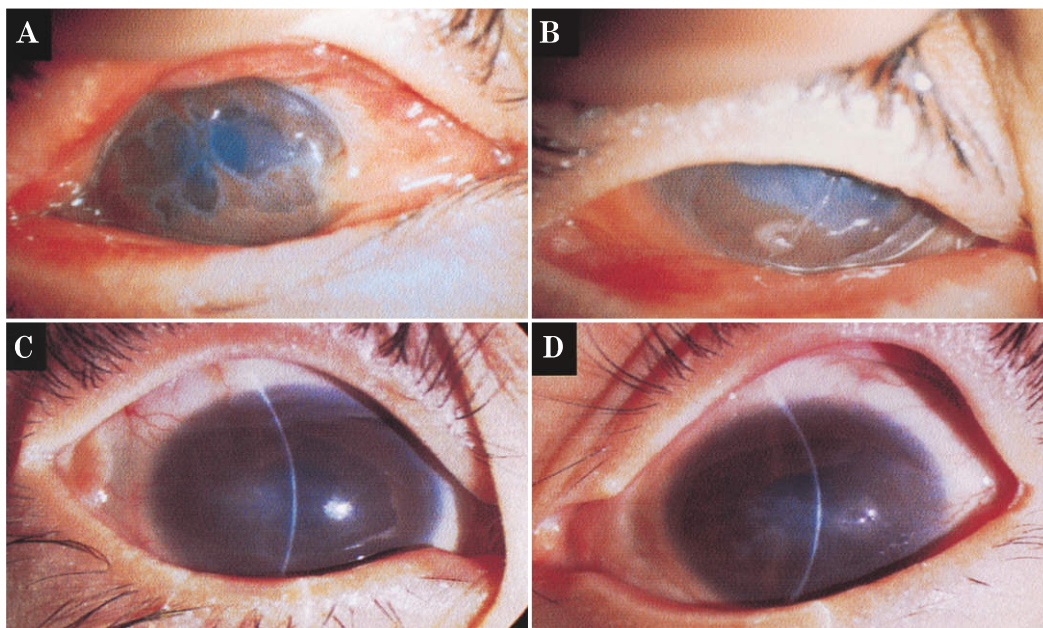


図 27 7 歳男児, Stevens-Johnson 症候群の急性期に対する培養角膜上皮移植術.

術前(A, B)には両眼に著明な炎症と遷延性上皮欠損がみられた。術後2年4か月(C, D)には眼表面は良好に再建され、消炎された状態にある。A, C: 右眼, B, D: 左眼。

ある。またさらに長期経過では、瞼球癒着、睫毛乱生、実質混濁といった瘢痕性変化が従来の保存治療による経過に比べて格段に少なかった。培養角膜上皮移植が急性期の眼表面の炎症を沈静化させること、通常であれば、これらの眼に生じたと考えられる瘢痕性変化を最小限に抑制することは、従来の角膜上皮移植術では期待できなかった大きな効果である。

慢性期症例に対しては、視力回復目的で手術を行った。Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡に対する角膜上皮移植は、早期に結膜再侵入を来し予後不良であるため、一般的には禁忌とされてきた。しかし近年、羊膜移植の併用や免疫抑制薬の開発により、これらの疾患や重症化学外傷に対して眼表面再建術がなされるようになってきた。慢性期にあるこれら重症疾患に対して培養角膜上皮移植を行ったところ、術後の上皮は安定しており、視機能の回復という面で一定の効果をあげることができた。化学外傷による瘢痕性変化に対して培養角膜上皮移植を行った症例(41 歳, 男性)を図 30 に示す。術前矯正視力 0.02 に対して、術後 2 年 10 か月の現在の視力は 0.5, 眼表面の透明性は良好で安定しており、満足できる結果となっている。このような慢性期症例に対しては、培養角膜上皮移植と従来の角膜上皮移植のいずれにより適応があるかは、今後の長期予後を解析する必要があると思われた。

両眼に遷延性上皮欠損を生じた急性期の Stevens-Johnson 症候群の症例において、長期予後を比較するため、右眼に培養角膜上皮移植を、左眼に輪部移植を行った。移植後短期の所見は左右眼ともに良好で、角膜表層の透

明性は良好であった。しかし、術後 2 年の時点で右眼に瘢痕性変化をみないのに対して、左眼には実質混濁が出現しており、術後 3 年の現在も実質混濁が増強しつつある(図 31)。この症例において手術前後に経時的に涙液を採取し、涙液に含まれる IL-8 の濃度を測定した。IL-8 は好中球の走化因子であり、急性炎症にさまざまな関与することが知られており、正常人の基礎分泌性涙液には  $731.4 \pm 116.2$  (平均値  $\pm$  標準誤差) pg/ml, 反射性涙液には  $276.1 \pm 47.5$  pg/ml の IL-8 が存在することが報告<sup>68)</sup>されている。患者の術前涙液には極めて高濃度の IL-8 が検出され、培養上皮移植後は速やかに、輪部移植後は緩徐に涙液中 IL-8 濃度が低下した(図 32)。本症例の両眼の比較から、培養角膜上皮は、上皮再生に時間を要する輪部移植や角膜上皮形成術に比べて、消炎と瘢痕抑制効果が高いと推測され、涙液中の IL-8 濃度の早期の正常化も関係していると想像された。

矯正視力の推移を図 33 に示す。急性期例は視力回復が主目的ではなく、受傷時には視力が良好なことがあるが、9 眼中 6 眼(67%)で視力は改善、3 眼でやや悪化した。その中で白内障進行による悪化が 1 例あった。慢性期症例では、16 眼中 12 眼(75%)で視力は改善、3 眼で不変、1 眼で悪化しており、眼類天疱瘡や角化の強い Stevens-Johnson 症候群の症例で視力改善が悪い傾向があった。術後合併症としては、明らかな拒絶反応が 4 眼(21%)にみられた。術後に一過性に小さな上皮欠損を生ずることがあるが、ほとんどは短期で修復され、遷延性上皮欠損は急性期症例で 1 眼、慢性期症例で 1 眼であり、島崎ら<sup>20)</sup>の報告に比べて少なかった。角膜感染症は

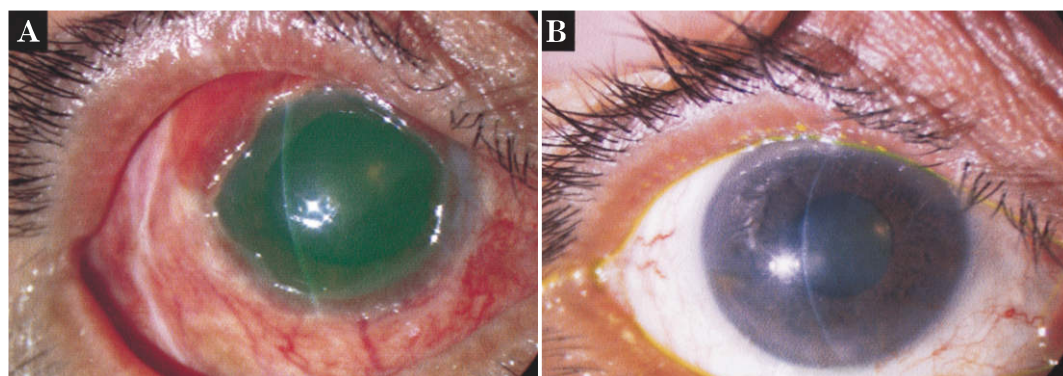


図 28 化学外傷の急性期の培養角膜上皮移植術。

術前(A)には遷延性上皮欠損がみられたが、術後6か月(B)には眼表面は良好に再建され、消炎されている。

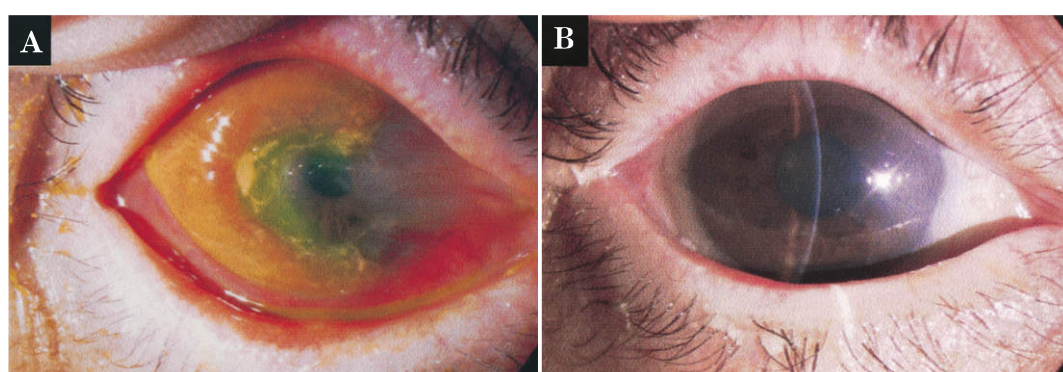


図 29 眼類天疱瘡の急性増悪例に対する培養角膜上皮移植。

偽翼状片術後より増悪し、著明な炎症、遷延性上皮欠損、瞼球癒着、肉芽組織の増生がみられた(A)。術後8か月には(B)、眼表面に良好に再建され、消炎されている。

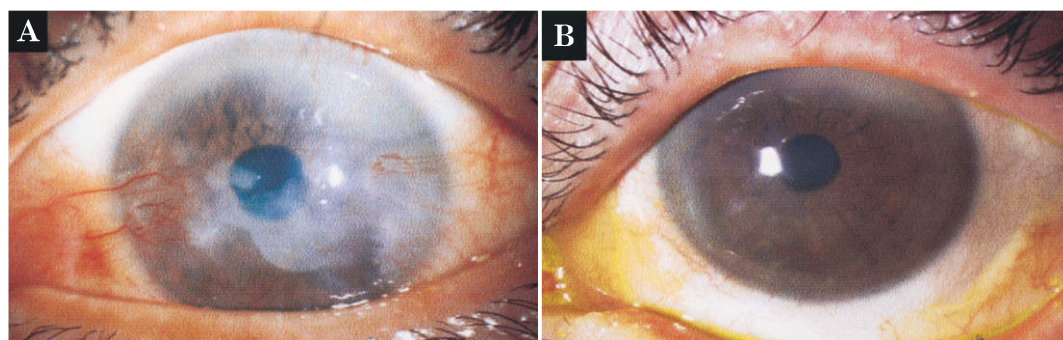


図 30 化学外傷の慢性期に対する培養角膜上皮移植術。

術前(A)にみられた角膜上の瘢痕組織を除去し培養角膜上皮細胞を移植した。術後2年8か月の時点(B)で再発はみられず、眼表面は良好に再建されている。

3眼に生じ、1眼は連続装用していたソフトコンタクトレンズからMRSAを検出<sup>69)</sup>、もう1眼は重症アトピー性皮膚炎患者であり、眼瞼からMRSEを検出した。またMRSAあるいはMRSEの保菌が3眼にみられた。拒絶反応による再混濁などにより、5眼(26%)に6回培養角膜上皮シートの再移植(25例とは別の手術)を行った。白内障の進行が5眼にみられ、再移植時に白内障の同時手術を行ったものが2眼、白内障手術を単独で行っ

たものが3眼であった。いずれも角膜の透明性は良好であり、超音波水晶体乳化吸引術と眼内レンズ挿入を施行した。一過性の眼圧上昇を生じた症例が2眼、緑内障手術(線維柱体切開術)を施行した症例が1眼であった。再移植時の所見として、結膜上皮侵入により混濁した上皮は羊膜と一塊となって角膜実質面から容易に剝離できた。羊膜下の角膜実質はほぼ透明であり、培養角膜上皮シートが実質の瘢痕性変化を抑制していると考えられ

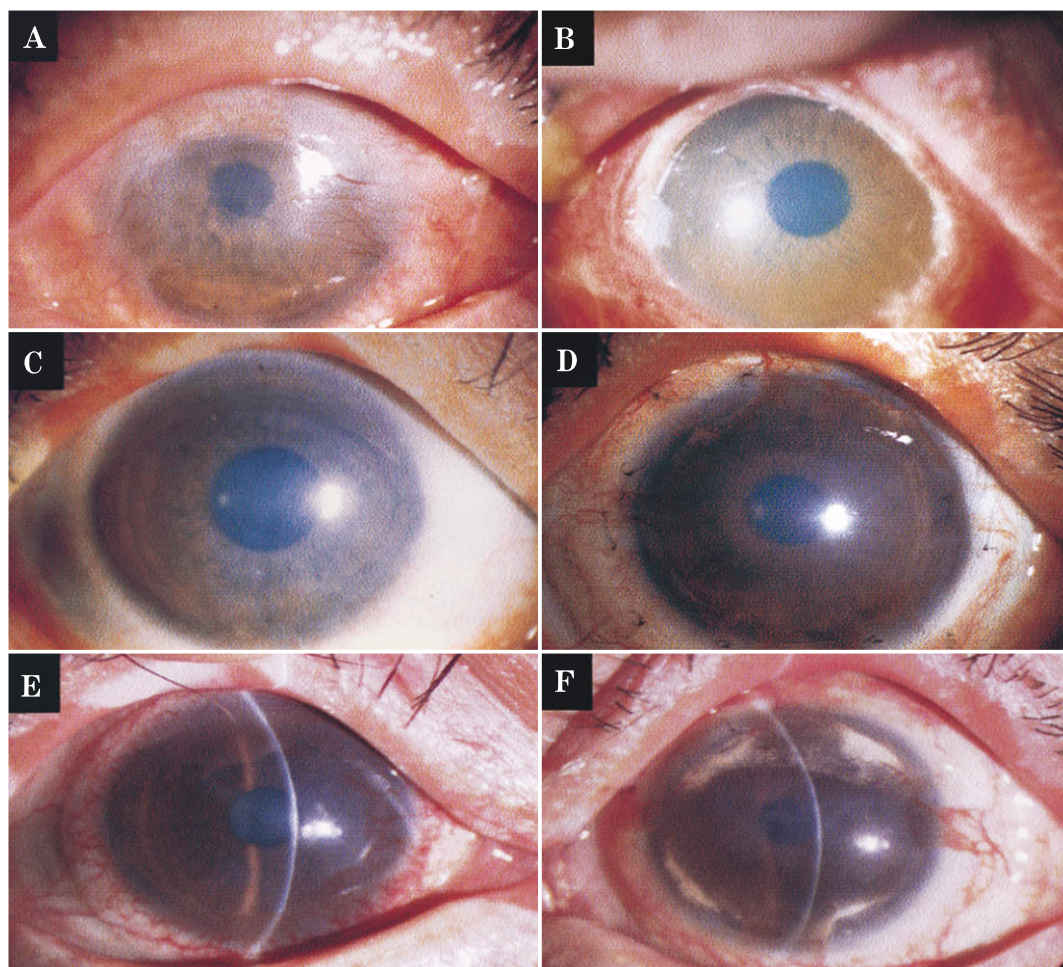


図 31 急性期 Stevens-Johnson 症候群(両眼)に対する培養角膜上皮移植および輪部移植の比較。  
培養角膜上皮移植(C, E)の方が輪部移植(D, F)に比べ術後2年での角膜瘢痕が少ない。A, B: 術前。  
C, D: 術後2か月。E, F: 術後2年。

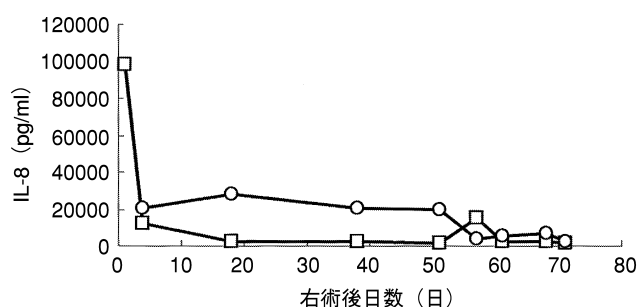


図 32 涙液中 IL-8 の推移。  
培養角膜上皮移植を行った右眼では輪部移植に比べ術後早期から有意に涙液中 IL-8 が低下している。  
—□— 右眼: 培養角膜上皮移植  
—○— 左眼: 輪部移植

た。再移植が容易であることも培養上皮移植の大きな利点であると考えられた<sup>70)</sup>。

## 2. 培養口腔粘膜上皮移植術

角膜腐食, Stevens-Johnson 症候群, 眼類天疱瘡などの重症眼表面疾患では, 角膜上皮ステムセルは消失, 結膜上皮は重篤な細胞障害を示す両眼性のものが多く, こ

れまで, これらの治療法の多くはアロ角膜上皮移植であり, 拒絶反応が術後成績に大きく影響を与えているのが現状である。そこで, 自己粘膜上皮を用いた移植法の開発を念頭に, 羊膜上で家兔の培養口腔粘膜上皮シートを作製し, 作製した口腔粘膜上皮シートを家兔の眼表面に自家移植し, その有用性について検討した。

### 1) 家兔口腔粘膜上皮細胞の回収

以下の動物実験は, すべて ARVO statement for Animal Research in Ophthalmic and Vision Research および, 京都府立医科大学動物実験委員会において承認された方法に従って行った。6 週齢の日本白色家兔から口腔粘膜を滅菌済み器具で無菌的に採取した。採取した口腔粘膜をペニシリン, ストレプトマイシン, ゲンタシンを含有する PBS で 30 分室温で 2 回浸漬した。組織をディスパーゼを含有する PBS に浸漬し, その後 0.05% トリプシン-EDTA 溶液に浸漬して細胞を分離した。酵素活性を 10% ウシ胎仔血清 (FBS) を含有する DM-EM に浸漬させることにより停止させ, セルフフィルタで余分な組織を除去し, 口腔粘膜上皮細胞を単離した。

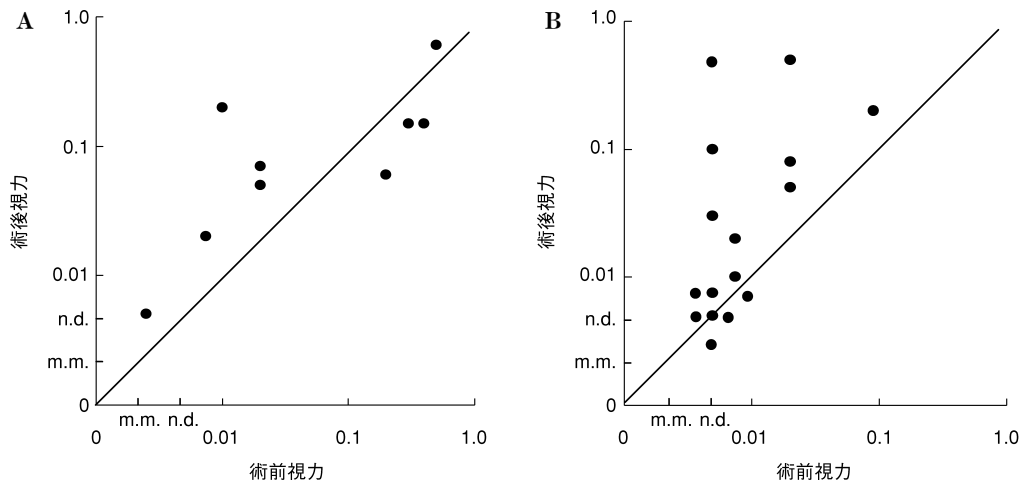


図 33 急性期症例と慢性期症例の術後視力。

急性期の症例(A)は視力改善が目的ではないが、9眼中6眼で視力改善をみた。慢性期の症例(B)では16眼中12眼で視力改善をみた。術後視力は両群ともに最終観察時のデータを使用した。

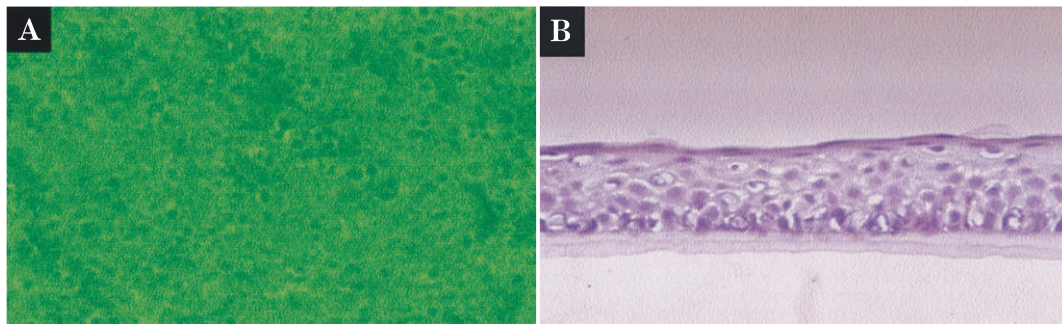


図 34 羊膜上で培養口腔粘膜上皮。

家兎口腔粘膜上皮を羊膜上で培養後10日の位相差顕微鏡像(A)。羊膜上に口腔粘膜上皮が生着しコンフルエントになっている。培養3週間後のHE染色組織像(B)。羊膜上に5~6層の重層化した培養口腔粘膜上皮が観察され、その最表層は角化していない。(文献71より転載、一部改変)

## 2) 口腔粘膜上皮シート

作製方法：口腔粘膜上皮シートの作製は、培養角膜上皮シートと同様な方法で行った。すなわち、MMC処理をしたNIH-3T3細胞と羊膜上皮を搔爬した羊膜基質を準備して、その上に口腔粘膜上皮細胞を共培養した。培養器具としては6穴のカルチャーディッシュと、それに付随するカルチャーインサートを用いた。カルチャーディッシュ上に $1 \times 10^4$ 個/cm<sup>2</sup>の細胞密度のNIH-3T3細胞懸濁液を播種し、細胞を培養した。カルチャーインサート上に搔爬した上皮側を上にして羊膜基質を静置して貼り付け、室温で乾燥させた。その後、羊膜を貼り付けたカルチャーインサート上に $1 \times 10^5$ 個/cm<sup>2</sup>の細胞密度の口腔粘膜上皮細胞を含む細胞懸濁液を播種した。以上の操作後、カルチャーディッシュとカルチャーインサートを組み合わせ、同じ培地中に培養した。培地には、我々がこれまでに確立してきた培養角膜上皮シートを作製するのに用いてきた上皮系細胞の生育に必要な培地を使用した。すなわち、DMEM/F12混合培地に、10%

FBS、インシュリン(5 mg/ml)、コレラトキシン(0.1 nM)、ペニシリン・ストレプトマイシン(50 IU)、ヒトリコンビナントEGF(10 ng/ml)を添加したものを使用した。上記の培地中で2週間培養した。その後、air-lifting法を用いて1週間培養し、細胞分化を誘導した。Air-lifting法とは、培地の液面を粘膜シート面までにし、粘膜上皮の表面を空气中に暴露する方法である<sup>53)</sup>。作製した培養口腔粘膜上皮シートの特徴は、組織学的、免疫組織学的、電子顕微鏡的に検討した。免疫組織学的検討では、細胞骨格蛋白である各種のケラチン、すなわち、角膜特異的なケラチン3と12、粘膜特異的なケラチン4と13、表皮特異的なケラチン1と10の局在を検索した。電子顕微鏡的観察では、走査および透過電子顕微鏡を用いて作製した粘膜上皮シートの特性を評価した。

結果：羊膜上で培養された家兎口腔粘膜上皮細胞は、約10日間でコンフルエントになり、約20日間で、角膜上皮に類似した5~6層に重層化した上皮層を形成した(図

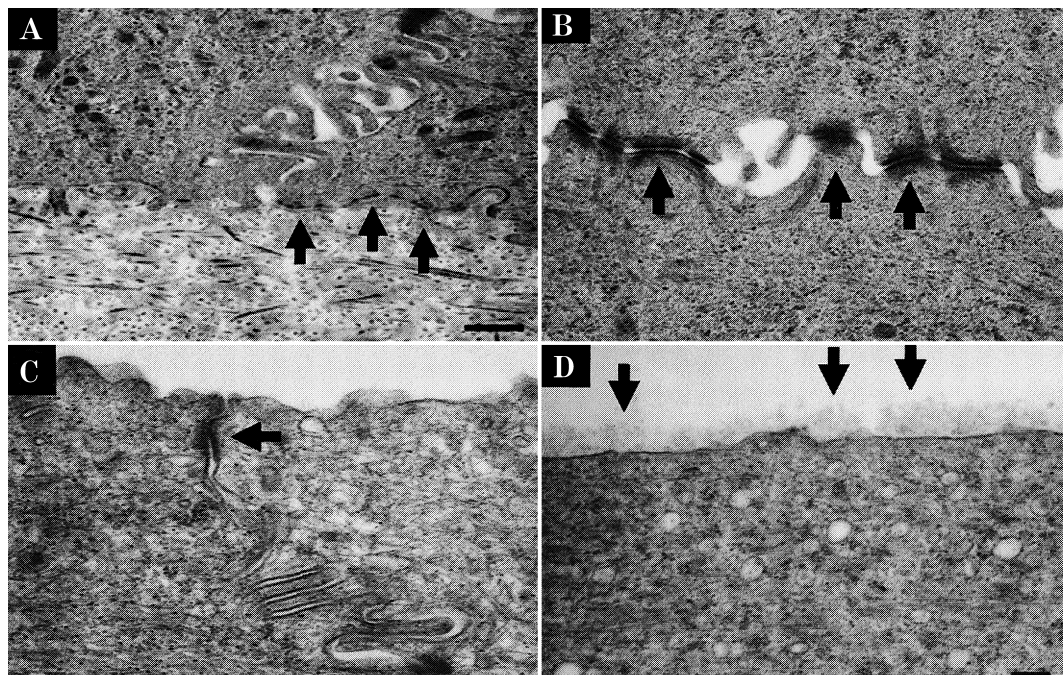
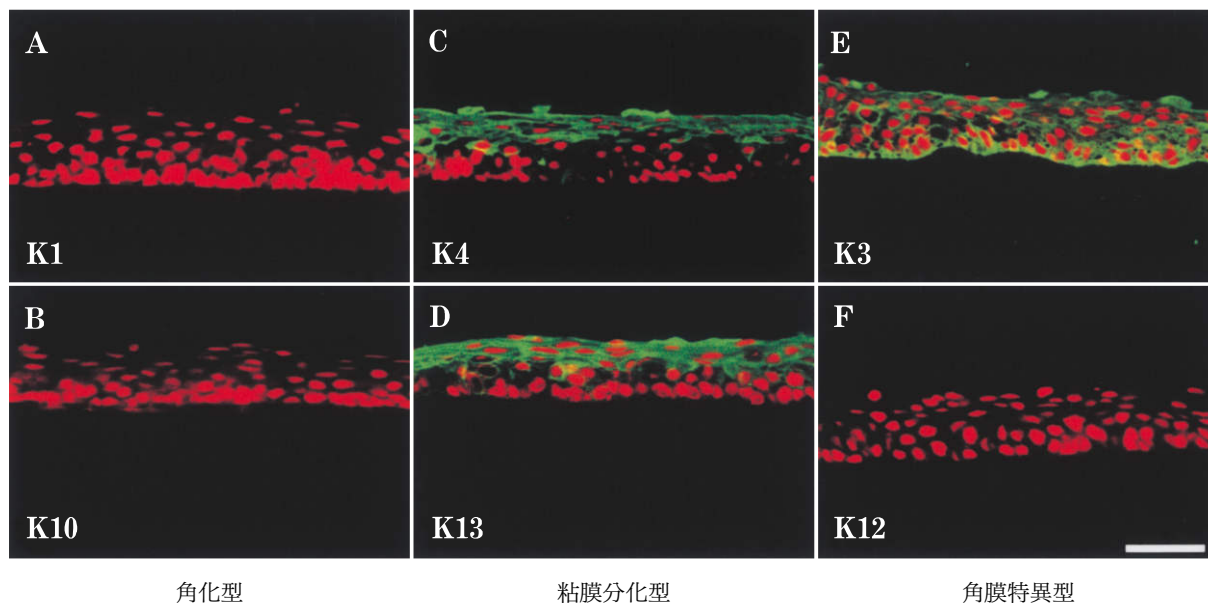


図 35 透過電子顕微鏡による培養口腔粘膜上皮シート像。

羊膜上培養口腔粘膜上皮の透過電子顕微鏡像。基底細胞は羊膜基質と hemi-desmosome で接着している (A)。細胞間には無数の desmosome が確認される (B)。表層細胞間には tight junction を形成し (C)、その表層には glycocalyx に類似の構造がみられる (D)。(文献 71 より転載、一部改変)



角化型

粘膜分化型

角膜特異型

図 36 羊膜上培養口腔上皮シートのケラチン発現パターン。

角化型のケラチン K 1/10 はともに免疫染色性を示さなかった (A, B)。粘膜分化型のケラチン K 4/13 に対しては中間層から表層にかけて免疫染色性を示した (C, D)。角膜特異的な K 3 は免疫染色性を示したが、K 12 は示さなかった (E, F)。Green：各抗体、Red：核染色。(文献 71 より転載、一部改変)

34). 上皮層の基底側には円柱形をした基底細胞類似の細胞群が存在した。最表層の細胞は扁平型を呈していたが核を有しており、皮膚とは異なり培養粘膜シートは組織学的に角化していなかった。走査電子顕微鏡および透過電子顕微鏡で観察した結果、口腔粘膜上皮シートは細胞間の境界が明瞭で、4～5 層によく分化、重層化した

上皮の形態を示し、正常の角膜上皮細胞と類似した組織像を示していた。その最表層には無数の微絨毛が存在し、細胞間には多数のデスモゾームによる細胞接着がみられた。また、基底細胞と羊膜間にはヘミデスモゾームによる接着構造がみられた (図 35)。

Air-lifting 後の培養口腔粘膜上皮シートのケラチンに

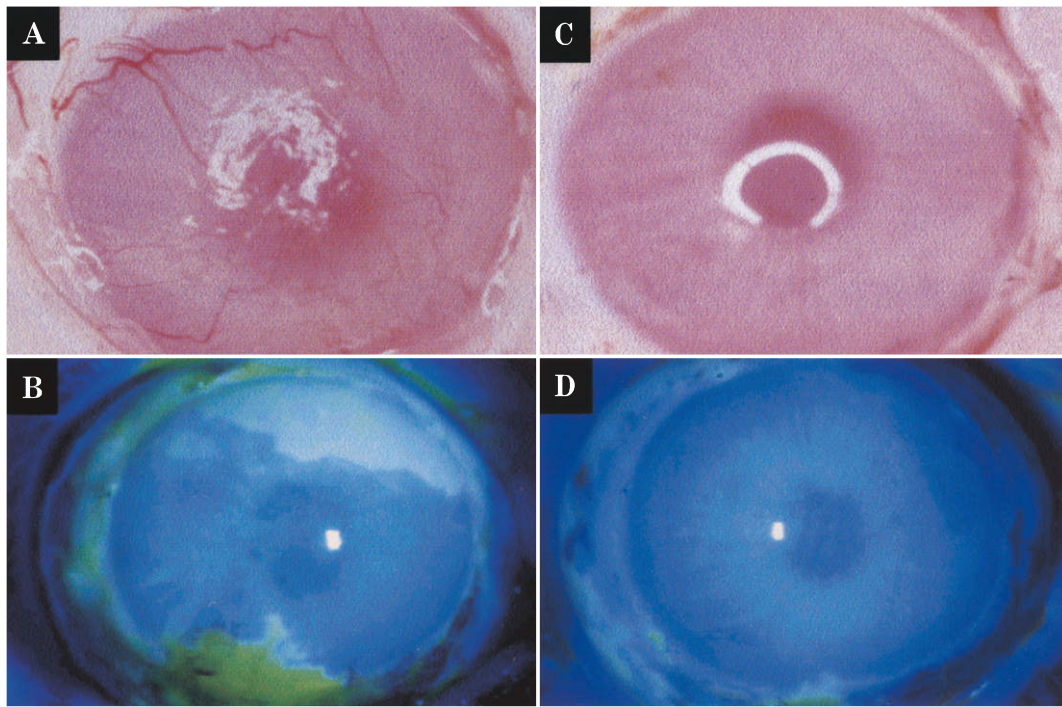


図 37 家兎培養口腔粘膜シート移植の前眼部像。

術前には周囲より瘢痕組織を伴う結膜侵入のため眼表面は透明性を失っている(A)。移植 48 時間後では、移植された粘膜上皮シートはフルオレセイン染色で眼表面に生着している(B)。移植された粘膜シートは術後 10 日でも眼表面に生着して透明性を維持しており(C)、フルオレセイン染色により 48 時間後と比較して粘膜シートより外側へ伸展していることが観察される(D)。(文献 71 より転載、一部改変)

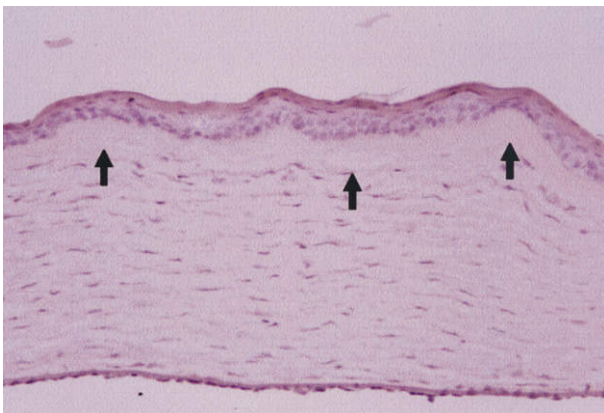


図 38 培養口腔粘膜上皮移植後 10 日の組織像。

羊膜上培養口腔粘膜上皮シートは眼表面に生着しており、シート下に実質浮腫や細胞浸潤などはみられない。矢印は羊膜を示す。(文献 71 より転載、一部改変)

対する免疫組織学的検討では、粘膜特異的ケラチンであるケラチン 4 と 13 は陽性、表皮角化型ケラチンであるケラチン 1 と 10 は陰性であり、組織所見と一致した。さらに、角膜上皮特異ケラチンとされているケラチン 3 も陽性を示したが、ケラチン 12 は陰性であった(図 36)。以上のことから、培養口腔粘膜上皮シートの組織学的性質としては、細胞骨格の側面からでは、表皮のように角化の方向へ分化しているのではなく、非角化型の粘膜上

皮としての性質を保持しながら、角膜特異的ケラチンの一部(ケラチン 3)も同時に保持していることがわかった。なお、*in vivo* の口腔粘膜上皮細胞はケラチン 3 の存在を示したため、口腔粘膜上皮は極めてユニークな粘膜上皮細胞と考えられた。

### 3) 家兎口腔粘膜上皮移植モデル

口腔粘膜を採取した、同じ白色家兎に対して、輪部より 5 mm 外側から角膜および結膜上皮をすべて機械的に擦過除去し、残存上皮がないことを生体染色で確認した。この操作により角膜上皮幹細胞を含む上皮細胞が存在しなくなるため、人為的な眼表面幹細胞疲弊症を作製したことになる。4 週後、この家兎の眼表面は血管侵入を伴った結膜上皮に覆われ、眼表面疾患と類似の病態を示した。

この眼に対して、眼表面を被覆している結膜組織を除去した後、前述の羊膜上培養口腔粘膜上皮シートを輪部よりやや内側で 10-0 ナイロン糸で縫合して移植した。移植後、治療用ソフトコンタクトレンズを縫着した。術後、抗生物質およびステロイド眼軟膏を 1 日 2 回塗布した。移植後 2, 10 日に、眼表面を詳細に観察した。

その結果、眼表面は、移植直後から培養角膜上皮シート移植と同様な透明性を示した。移植 48 時間後には、フルオレセイン染色で眼表面に欠損なく、生着していることを確認した。移植片の周囲には、全周にわたりフルオレセインの染色性がみられたため、生着している上皮

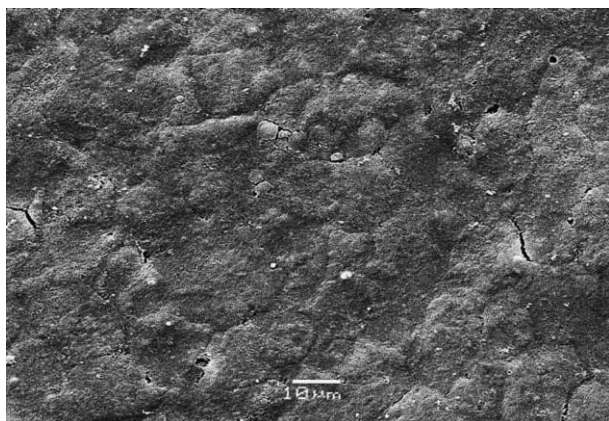


図 39 培養角膜内皮細胞シートの走査電子顕微鏡写真。  
羊膜上の角膜内皮細胞は扁平かつ多角形で連続する角膜内皮層を形成している。

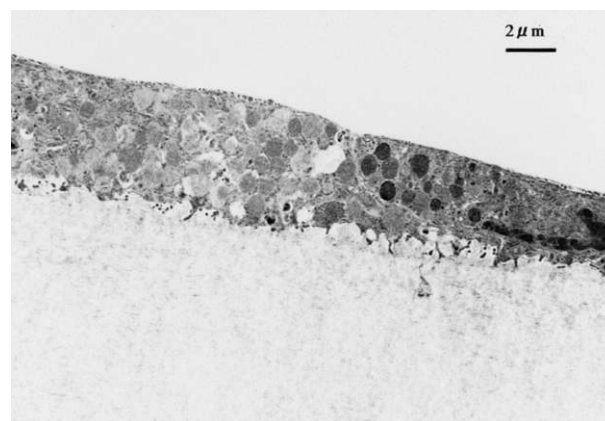


図 40 培養角膜内皮細胞シートの透過電子顕微鏡写真。  
単層で連続する角膜内皮がみられる。

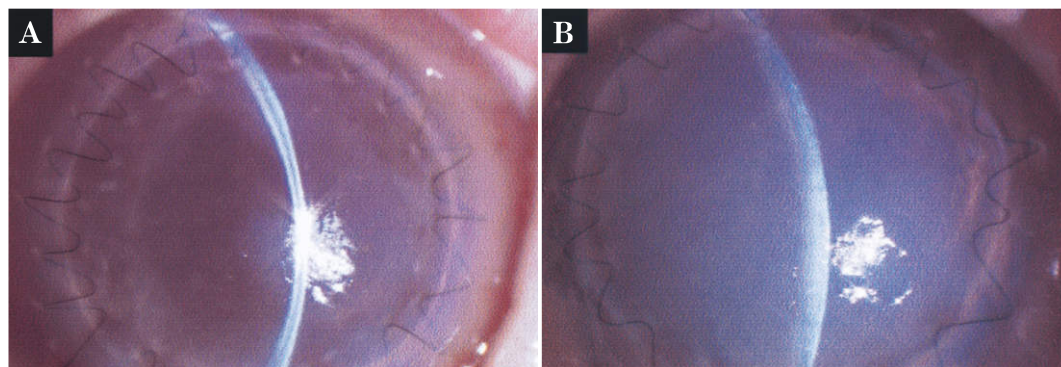


図 41 培養角膜内皮細胞シート移植後 7 日目の前眼部。  
培養角膜内皮細胞シート移植後(A)の角膜は透明性が高いが、対照(B)では著明な角膜浮腫がみられる。

は結膜上皮からの再生ではないことが確認された。移植 10 日後にも、移植された粘膜上皮シートは眼表面に生着しており、しかも 48 時間後と比較して粘膜シートより外側へ上皮細胞が伸展していることがフルオレセイン染色により観察された(図 37)。組織像では、移植シートは羊膜とともに眼表面で生着しており、上皮下の細胞浸潤や実質浮腫などはみられなかった(図 38)。以上のことから、羊膜上で培養した口腔粘膜上皮シートは眼表面に生着、伸展し、角膜の透明性を維持することが確認された<sup>71)</sup>。

#### 4) 考察と今後

重症眼表面疾患は、その大部分が両眼性の疾患であり、自己の角膜上皮ステムセルを用いた眼表面再建術は事実上不可能である。このような疾患に対しては、これまでアロ角膜上皮移植が試みられてきたが、自己の眼表面以外の部位からの粘膜上皮、ことに口腔粘膜上皮を用いた眼表面再建術はこれまでなかった治療概念であり、新しい外科的手術方法である。今回、我々が作製した家兎の羊膜上培養口腔粘膜上皮シートは、その組織学的観

点からみて、角膜上皮に類似の分化、重層化した非角化粘膜上皮の性質を示すシートであることがわかった。また、培養口腔粘膜シートは眼表面という生体で極めて特殊な環境においても生着、生存し、角膜上皮の代用となり得る可能性が推測された。現在、ヒト口腔粘膜上皮シート作製には種々の培養操作過程の改変により成功しており、急性期アルカリ腐食眼への臨床試用においても、上皮修復に成功している。このように、本術式はヒトへの臨床応用段階に入っており、眼表面における適合性を観察中である。

#### 3. 培養角膜内皮細胞移植

羊膜をキャリアーとして培養角膜上皮シートや培養口腔粘膜上皮シートを作製することが可能となったため、この方法をさらに発展させて羊膜キャリアーの上にヒト角膜内皮細胞シートを作製し移植することを試みた。

米国アイバンクから入手したヒト角膜を使用し、角膜内皮を Descemet 膜ごと角膜実質から剝離した後、ディスパーゼ処理で角膜内皮細胞浮遊液を作製し、IV 型コラーゲンでコートしたカルチャーディッシュで培養を



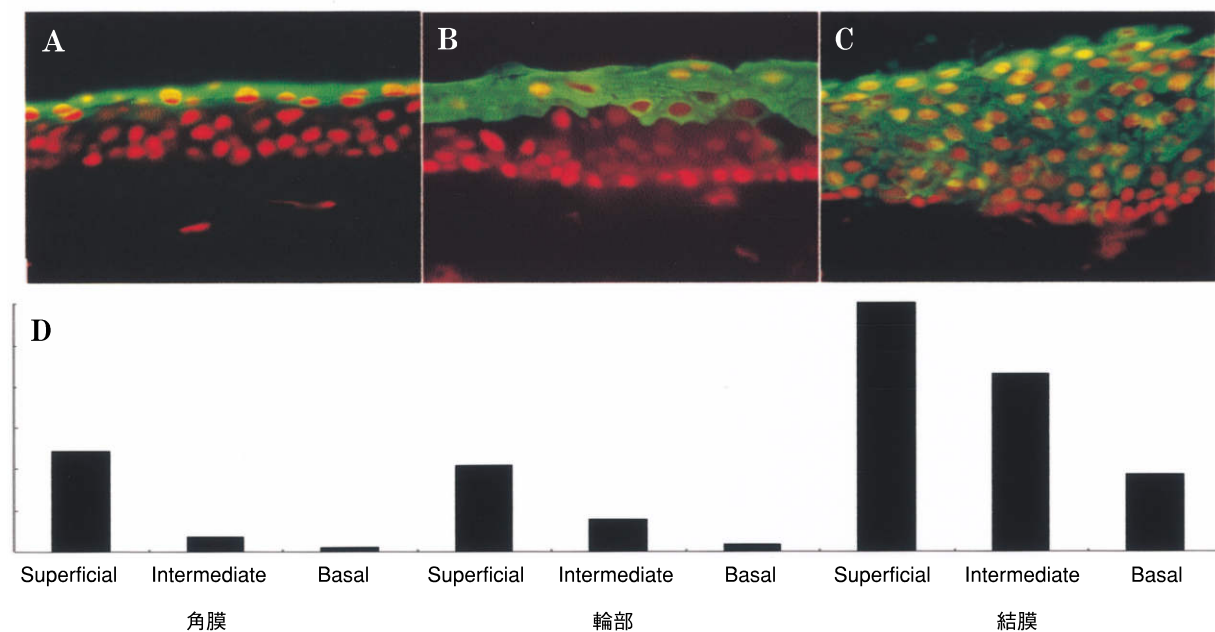


図 45 ケラチン 4 発現における免疫染色と iAFLP 法との比較.

ケラチン 4 は角膜上皮(A), 輪部上皮(B)で表層優位の発現を示した. 結膜上皮(C)では全層に発現をがみられた. 免疫染色(A, B, C)と iAFLP のデータ(D)は高い相関を示した.

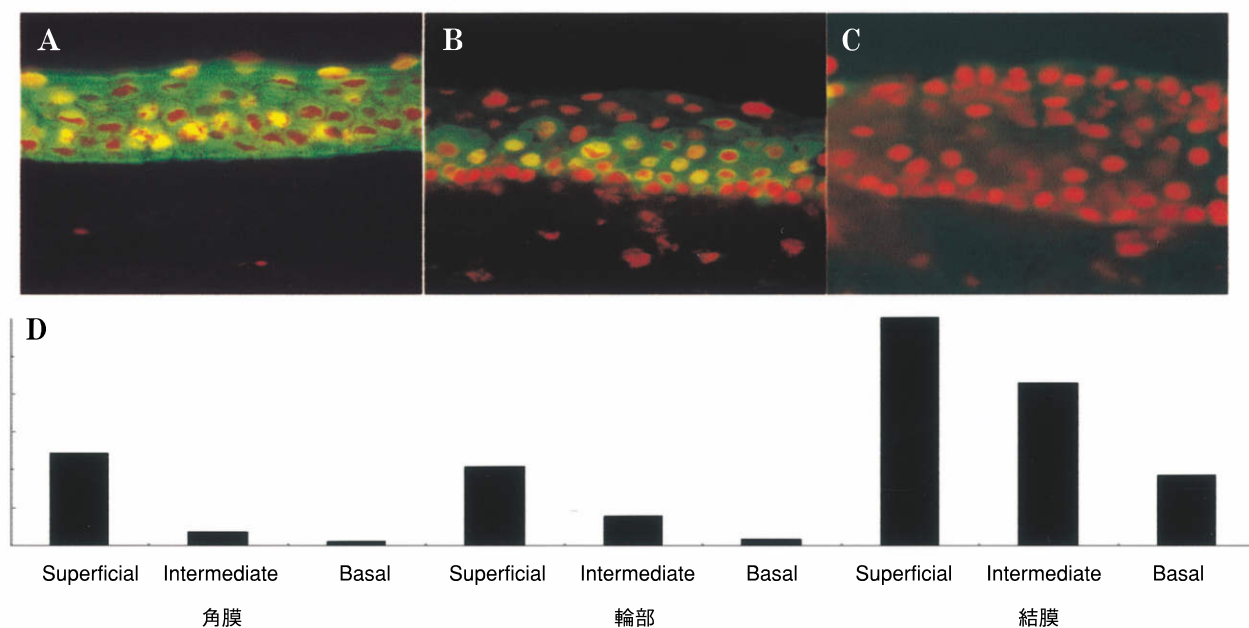


図 46 ケラチン 12 発現における免疫染色と iAFLP 法との比較.

ケラチン 12 は角膜上皮(A)で全層に, 輪部上皮(B)で中間層優位に発現をみたが, 結膜上皮ではほとんど発現していなかった. 免疫染色(A, B, C)と iAFLP のデータ(D)は高い相関を示した.

おり, その細胞間の結合面積を最大にするように強く結合していた. 羊膜には角膜内皮細胞の作り出す細胞外物質がみられた(図 40). 生体内に移植した実験では, 対照群では著明な角膜浮腫がみられたが, 培養角膜内皮細胞シートを移植した群では角膜浮腫はみられず, 角膜の透明性が保たれていた(図 41).

このように, 羊膜上皮を剥離した羊膜上に培養角膜内

皮細胞を高密度で播種することにより, 正常角膜に近い細胞密度と形態を示すヒト培養角膜内皮細胞シートを作製することができた. このシートを生体内に移植することにより, 移植した角膜内皮細胞は少なくとも移植後 1 週間は機能していることが推測された. 今後, 培養角膜内皮細胞シートの機能, 移植の長期予後, 移植手術手技についてのより詳しい検討が必要であるが, 角膜内皮障

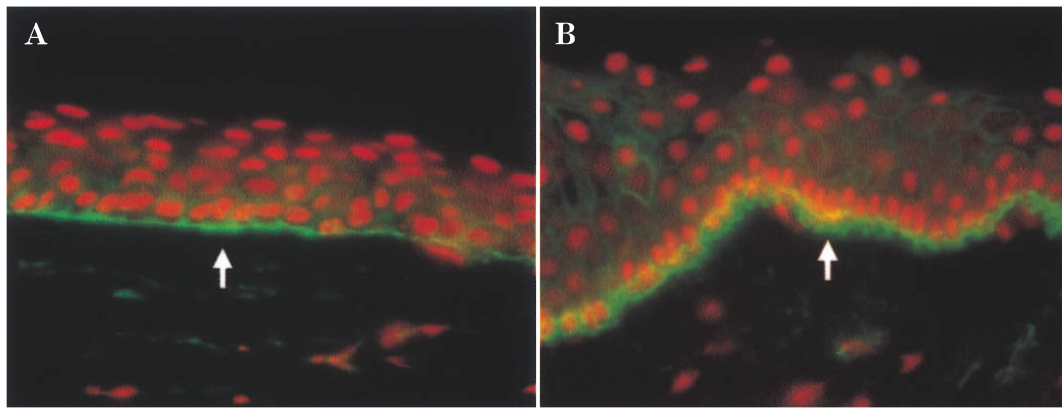


図 47 角膜中央部(A), 角膜輪部における integrin  $\alpha 6$  の発現。

Integrin  $\alpha 6$  は角膜中央(A), 輪部(B)の両方の基底層で発現していたが(矢印), その発現強度は角膜中央部に向かうにつれて減弱していた。

害による水疱性角膜症に対する培養角膜内皮細胞移植の可能性が今回の実験で推定された。

#### IV 角膜上皮stemセルの特徴—遺伝子発現による角膜幹細胞の特徴づけ—

角膜上皮stemセルは角膜と結膜の境界部の輪部基底細胞に存在すると考えられており, 良質な培養角膜上皮シートを作製するためには培養開始時のstemセル含有量を高めることが重要と考えられる。このstemセルの分子生物学的特徴を知ることは, 今後stemセルからの角膜再生を試みるうえでも非常に有用と考えられる。これまでに我々が解析した角膜上皮の発現プロファイル<sup>76)</sup>は, *in vivo* 角膜中央部上皮のデータであり, かつ絶対発現解析であるので厳密な議論をするにはさらに詳細な解析が必要となる。現在のところ, 複数種の細胞から構成される組織から必要とする細胞を選択的に採取するにはレーザーマイクロキャプチャー装置<sup>77)</sup>(図 42)で組織切片をモニターしながら採取するしか方法がない。しかし, ここから得られる細胞は非常に少ないもので, このまま遺伝子発現解析に投入しても, 解析法の感度にはるかに及ばないため思うような結果は得られない。すなわち, 増幅の過程が必須となる。我々は相対遺伝子発現解析の方法として iAFLP 法<sup>78)</sup>を採用した。理由は, ① まだ全遺伝子を網羅した DNA チップがないこと, ② 眼表面の上皮細胞で重要な遺伝子を集めた DNA チップがないこと, ③ これまでに測定した絶対遺伝子発現のデータや配列データを利用するにはチップよりも iAFLP 法の方がプロトコルとして適していたこと, である。この方法に適した増幅法がなかったため, 増幅法の開発から研究をスタートさせた。

iAFLP 法は原理に競合的 PCR を採用している(図 43)。個々のサンプル由来 RNA を pUC 19 ベースのベクタープライマーを使い二本鎖 cDNA として, Mbo I

制限酵素で消化する。これにサンプル毎に異なるアダプター(6 種類ある)をライゲーションし, 6 種類のサンプルを混ぜ合わせた後に蛍光修飾したアダプター特異的なプライマーと遺伝子特異的なプライマーで PCR を行い, 得られた産物を蛍光シーケンサーでフラグメント解析を行う。典型的な電気泳動結果では 6 本のピークが 3 塩基ごとに並ぶことになり, 各々のピークの高さが各々のサンプルでの特定の遺伝子発現相対量を示すこととなる。遺伝子特異的なプライマーは mRNA の polyA 部位と最も 3'側の GATC 配列(Mbo I 認識配列)の間で作製する。この間の配列を我々は gene signature(GS)と呼んでおり, 絶対遺伝子発現解析で得られるのもこの配列である<sup>79)</sup>。GS にはまだ Genbank に登録のない遺伝子も数多く存在しており, 登録がなくてもプライマーが作製できるのが大きな利点である。また, プライマーの作製した位置によって電気泳動で得られる 6 本のピークの位置があらかじめ予測でき, DNA チップで危惧されるクロスハイブリの問題はこのサイズによるバリデーションで解決できる。

数多くの最適化の実験を行い, この方法に適したサンプルの増幅法を確立し, 結果として 1 ng という微量の RNA から正確な遺伝子発現解析が行えることを確認した。この方法を用いて, まず我々は眼表面における 3 種類の上皮細胞, すなわち結膜上皮, 角膜上皮, 輪部上皮の基底層, 中間層, 表層での遺伝子発現を比較してみた。結果を二次元クラスター解析し, サンプル間の類似性について調べたところ, サンプル方向のクラスターは結膜上皮の 3 層は類似しており, 角膜と輪部の表層, 中間層の 4 サンプルは類似していることが判明した。さらに, 角膜上皮基底層はこの 4 サンプルに若干類似しており, 輪部基底層は角膜よりもむしろ結膜上皮に類似していた(図 44)。実験のバリデーション結果は, ケラチン 4 とケラチン 12 に関して, 今回の結果と免疫染色とを比較することで行った。結果は, ケラチン 4 については図

45, ケラチン 12 については図 46 に示すごとく免疫染色と今回の結果の間に高い相関がみられた。以上のことから、今回の実験結果は極めて信頼の置けるものであると考えられた。

角膜上皮ステムセルが存在すると考えられている輪部基底層では、インテグリン  $\alpha 6$ , 腫瘍壊死因子(TNF) レセプター-2, BAD, ケラチン 18, THBS 3 などが特異的に発現していた。この中で皮膚表皮細胞のステムセルマーカ-の可能性が推測されているインテグリン  $\alpha 6$ <sup>80)</sup>に対して免疫染色を行ったところ、輪部基底のみならず、結膜、角膜基底細胞でも染色され、残念ながら輪部基底層に特異的なものではないことが判明した。しかし、その発現強度は輪部基底層でも強く、中央部角膜で弱く染色され(図 47), インテグリン  $\alpha 6$  は輪部基底層で特異的に発現したインテグリン  $\alpha 6$  の遺残である可能性が想定された。

今回対象とした遺伝子は、角膜上皮細胞で比較的发現が多く、かつ角膜上皮細胞に特異的なものである。この中から輪部基底層に特異的な遺伝子を探すという方法には少なからず無理があるのかもしれない。輪部基底層の細胞での絶対遺伝子発現解析を行い、この中で発現量が比較的多く、なおかつ特異的な遺伝子を探すことが必須なようである。このためにはレーザーマイクロキャプチャー法で採取した微量サンプルから発現プロファイルを歪めることなく増幅して、絶対発現解析を行う必要がある。現在、この方法については方法論的な検討を行っている。

稿を終えるに当たり、宿題報告の機会を与えて下さいました日本眼科学会評議員各位、本研究をご支援いただいた京都府立医科大学眼科学教室ならびに明交会各位、そして本研究に至るまでお導き下さいました眞鍋禮三大阪大学名誉教授に心から感謝申し上げます。

また、京都府立医科大学産婦人科学教室の本庄英雄教授には羊膜採取について、歯科の金村成智部長には口腔粘膜採取についてご協力を賜りました。深謝申し上げます。

本研究は、文部科学省研究費補助金、厚生科学研究費補助金、日本アレルギー協会研究補助金、京都府医学振興会研究助成金などにより行われたことを付記して謝意を表します。

## 文 献

- 1) Thoft R : Conjunctival transplantation. Arch Ophthalmol 95 : 1425—1427, 1977.
- 2) 木下 茂, 大橋裕一, 渡辺 潔, 眞鍋禮三 : 二次性角結膜上皮疾患に対する新しい手術法. 臨眼 45 : 519—521, 1991.
- 3) Thoft RA : Keratoepithelioplasty. Am J Ophthalmol 97 : 1—6, 1984.
- 4) Kinoshita S, Ohashi Y, Ohji M, Manabe R : Long-term results of keratoepithelioplasty in Mooren's ulcer. Ophthalmology 98 : 438—445,

- 1991.
- 5) Tsai RJ, Tseng SC : Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. Cornea 13 : 389—400, 1994.
- 6) Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, et al : Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. N Engl J Med 340 : 1697—1703, 1999.
- 7) Kim JC, Tseng SC : Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. Cornea 14 : 473—484, 1995.
- 8) Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono 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.
- 9) Dua HS, Azuara-Blanco A : Amniotic membrane transplantation. Br J Ophthalmol 83 : 748—752, 1999.
- 10) Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D : 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.
- 11) Gipson IK, Grill SM : A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 23 : 269—273, 1982.
- 12) Gipson IK, Friend J, Spurr SJ : Transplant of corneal epithelium to rabbit corneal wounds *in vivo*. Invest Ophthalmol Vis Sci 26 : 425—433, 1985.
- 13) 西田幸二 : 角膜上皮, 角膜内皮の再生医療. バイオマテリアル 20 : 259—268, 2002.
- 14) 大路正人, 木下 茂, 渡辺 潔, 大橋裕一, 眞鍋禮三, 石井康雄, 他 : タイプIVコラーゲンシート上置ける培養角膜上皮. 眼科 42 : 784—788, 1991.
- 15) Friend J, Kinoshita S, Thoft RA, Eliason JA : Corneal epithelial cell cultures on stromal carriers. Invest Ophthalmol Vis Sci 23 : 41—49, 1982.
- 16) Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M : Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. Lancet 349 : 990—993, 1997.
- 17) Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, De Luca M, 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.
- 18) 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.

- 19) Grueterich M, Tseng SC : Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane *ex vivo*. Arch Ophthalmol 120 : 783—790, 2002.
- 20) Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimamura S, Tsubota K : Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. Ophthalmology 109 : 1285—1290, 2002.
- 21) Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR : Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. Cornea 19 : 421—426, 2000.
- 22) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S : Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. Arch Ophthalmol 119 : 298—300, 2001.
- 23) Thoft RA, Friend J : The Ocular Surface. Little, Brown Co, Boston, 1979.
- 24) Schermer A, Galvin S, Sun TT : Differentiation-related expression of a major 64 K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. J Cell Biol 103 : 49—62, 1986.
- 25) 木下 茂, 切通 彰, 大路正人, 大橋裕一, 真鍋禮三 : Pallisades of Vogt の消失する角膜疾患. 臨眼 40 : 363—366, 1986.
- 26) Tseng SC : Concept and application of limbal stem cells. Eye 3 : 141—157, 1989.
- 27) Kenyon KR, Tseng SC : Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. Ophthalmology 96 : 709—722 ; Discussion 722—703, 1989.
- 28) Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM : 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.
- 29) Ebato B, Friend J, Thoft RA : Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 28 : 1450—1456, 1987.
- 30) Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, Araki K, Watanabe H, Ohashi Y, Manabe R : The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. Invest Ophthalmol Vis Sci 31 : 1773—1778, 1990.
- 31) Danjo S, Friend J, Thoft RA : Conjunctival epithelium in healing of corneal epithelial wounds. Invest Ophthalmol Vis Sci 28 : 1445—1449, 1987.
- 32) Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, et al : Characteristics of the human ocular surface epithelium. Prog Retin Eye Res 20 : 639—673, 2001.
- 33) Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA : Goblet cell density in ocular surface disease. A better indicator than tear mucin. Arch Ophthalmol 101 : 1284—1287, 1983.
- 34) Nakamura T, Nishida K, Dota A, Matsuki M, Yamanishi K, Kinoshita S : Elevated expression of transglutaminase 1 and keratinization-related proteins in conjunctiva in severe ocular surface disease. Invest Ophthalmol Vis Sci 42 : 549—556, 2001.
- 35) Nishida K, Yamanishi K, Yamada K, Dota A, Kawasaki S, Quantock AJ, et al : Epithelial hyperproliferation and transglutaminase 1 gene expression in Stevens-Johnson syndrome conjunctiva. Am J Pathol 154 : 331—336, 1999.
- 36) Kawasaki S, Nishida K, Sotozono C, Quantock AJ, Kinoshita S : Conjunctival inflammation in the chronic phase of Stevens-Johnson syndrome. Br J Ophthalmol 84 : 1191—1193, 2000.
- 37) Kinoshita S, Friend J, Thoft RA : Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci 21 : 434—441, 1981.
- 38) Shimazaki J, Kaido M, Shinozaki N, Shimamura S, Munkhbat B, Hagihara M, et al : Evidence of long-term survival of donor-derived cells after limbal allograft transplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci 40 : 1664—1668, 1999.
- 39) Wollensak G, Green WR : Analysis of sex-mismatched human corneal transplants by fluorescence *in situ* hybridization of the sex-chromosomes. Exp Eye Res 68 : 341—346, 1999.
- 40) Miyazaki D, Inoue Y, Yao YF, Okada AA, Shimomura Y, Hayashi K, et al : T-cell-mediated immune responses in alloepithelial rejection after murine keratoepithelioplasty. Invest Ophthalmol Vis Sci 40 : 2590—2597, 1999.
- 41) Yamada J, Yoshida M, Taylor AW, Streilein JW : Mice with Th2-biased immune systems accept orthotopic corneal allografts placed in “high risk” eyes. J Immunol 162 : 5247—5255, 1999.
- 42) Moore KW, O’Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR : Interleukin-10. Annu Rev Immunol 11 : 165—190, 1993.
- 43) de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE : Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes : An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 174 : 1209—1220, 1991.
- 44) Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A : IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. J Immunol 148 : 1792—1796, 1992.
- 45) de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, et al : Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. J Exp Med 174 : 915—924, 1991.

- 46) **Peguet-Navarro J, Moulon C, Caux C, Dalbiez-Gauthier C, Banchereau J, Schmitt D** : Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol* 24 : 884—891, 1994.
- 47) **Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Barthelemy C, Liu YJ, Banchereau J** : Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int Immunol* 6 : 1177—1185, 1994.
- 48) **Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T** : Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea* 18 : 73—79, 1999.
- 49) **Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S** : Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 19 : 65—71, 2000.
- 50) 小泉範子, 稲富 勉, 西田幸二, 外園千恵, 横井則彦, 木下 茂 : 瘢痕性角結膜疾患に対する羊膜移植の治療成績. *眼科手術* 12 : 391—394, 1999.
- 51) **Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ** : Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 2506—2513, 2000.
- 52) **Rheinwald JG, Green H** : Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6 : 331—343, 1975.
- 53) **Zagorski Z** : Experimental studies of the growth in tissue culture of the epithelium and endothelium of rabbit cornea subjected to the effect of low temperature. *Klin Oczna* 45 : 733—737, 1975.
- 54) **Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, et al** : An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 : 2114—2121, 2002.
- 55) **Yokoi N, Niiya A, Komuro A, Yokogaki S, Naka H, Awata T, et al** : Effects of aldose reductase inhibitor CT-112 on the corneal epithelial barrier of galactose-fed rats. *Curr Eye Res* 16 : 595—599, 1997.
- 56) **Tsukita S, Furuse M, Itoh M** : Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 : 285—293, 2001.
- 57) **Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S** : Occludin : A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123 : 1777—1788, 1993.
- 58) **Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S** : Claudin-1 and-2 : Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141 : 1539—1550, 1998.
- 59) **Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA** : Identification of ZO-1 : A high molecular weight polypeptide associated with the tight junction(zonula occludens)in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103 : 755—766, 1986.
- 60) **Ban Y, Rizzolo LJ** : Differential regulation of tight junction permeability during development of the retinal pigment epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 279 : C 744—750, 2000.
- 61) **Prunieras M, Regnier M, Woodley D** : Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol* 81 : 28 s—33 s, 1983.
- 62) **Williams ML, Brown BE, Monger DJ, Grayson S, Elias PM** : Lipid content and metabolism of human keratinocyte cultures grown at the air-medium interface. *J Cell Physiol* 136 : 103—110, 1988.
- 63) **Nolte CJ, Oleson MA, Bilbo PR, Parenteau NL** : Development of a stratum corneum and barrier function in an organotypic skin culture. *Arch Dermatol Ret* 285 : 466—474, 1993.
- 64) **Forsyth NR, Wright WE, Shay JW** : Telomerase and differentiation in multicellular organisms : Turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* 69 : 188—197, 2002.
- 65) **Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al** : Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266 : 2011—2015, 1994.
- 66) **Heine B, Hummel M, Muller M, Heicappell R, Miller K, Stein H** : Non-radioactive measurement of telomerase activity in human bladder cancer, bladder washings, and in urine. *J Pathol* 184 : 71—76, 1998.
- 67) **Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S** : Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 108 : 1569—1574, 2001.
- 68) **Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S** : Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res* 17 : 673—676, 1998.
- 69) **Sotozono C, Inagaki K, Fujita A, Koizumi N, Sano Y, Inatomi T, et al** : Methicillin-resistant staphylococcus aureus and methicillin-resistant staphylococcus epidermidis infections in the cornea, Cornea, in press
- 70) **Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, Inoki K, Sano Y, Sotozono C, et al** : Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease, Cornea, in press
- 71) **Nakamura T, Endo K, Cooper L, Fullwood NJ, Tanihuji N, Tsuzuki M, et al** : The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, in press
- 72) **Raphael B, Lange T, Wood TO, McLaughlin**

- BJ** : Growth of human corneal endothelium on altered Descemet's membrane. *Cornea* 11 : 242—249, 1992.
- 73) **Chen KH, Azar D, Joyce NC** : Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo : A morphologic study. *Cornea* 20 : 731—737, 2001.
- 74) **Bednarz J, Rodokanaki-von Schrenck A, Engelmann K** : Different characteristics of endothelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34 : 149—153, 1998.
- 75) **Hyldahl L** : Primary cell cultures from human embryonic corneas. *J Cell Sci* 66 : 343—351, 1984.
- 76) **Nishida K, Adachi W, Shimizu-Matsumoto A, Kinoshita S, Mizuno K, Matsubara K, Okubo K** : A gene expression profile of human corneal epithelium and the isolation of human keratin 12 cDNA. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 : 1800—1809, 1996.
- 77) **Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, et al** : Laser capture microdissection. *Science* 274 : 998—1001, 1996.
- 78) **Kawamoto S, Ohnishi T, Kita H, Chisaka O, Okubo K** : Expression profiling by iAFLP : A PCR-based method for genome-wide gene expression profiling. *Genome Res* 9 : 1305—1312, 1999.
- 79) **Okubo K, Hori N, Matoba R, Niiyama T, Fukushima A, Kojima Y, et al** : Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat Genet* 2 : 173—179, 1992.
- 80) **Li A, Simmons PJ, Kaur P** : Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 3902—3907, 1998.
-

### Comment : 眞鍋 禮三

著者らは Thoft らによって提唱された角膜上皮と結膜上皮を一体のものとしてとらえる ocular surface という概念をさらに発展させ、これまで不治の疾患として放置されてきた Stevens-Johnson's syndrome, ocular pemphigoid, Mooren's ulcer, severe chemical burns, stem-cell deficiency などを眼表面疾患という新しい疾患群としてとらえることにより、その病態生理を細胞生物学や分子生物学を駆使して解明すると共に、最近急速に進歩した再生医療技術を取り入れて治癒可能な疾患群に変えていった課程を詳しく報告している。すなわち、chemical burn のように片眼性のものに対しては、病的上皮を完全に除去した角膜に健眼からの結膜を自家移植するだけで、拒絶反応は起こらず、炎症性サイトカインも発現しないので、血管新生や線維性増殖は起こらず、移植された結膜上皮は速やかに角膜上皮様に分化転換し、透明治癒させることができるようになったのである。

しかし、大部分の眼表面疾患は両眼性のため、移植上皮を他眼から得ることはできず、アロ角膜上皮を移植するしかないのが、高率に拒絶反応が起こり、炎症性サイトカインが発現して新生血管や線維性増殖が誘発され、移植されたアロ角膜上皮は血管を伴ったホストの結膜上皮に置き代わり、透明治癒させることはできなかったのである。ただし、ドナー角膜上皮を表層実質とともにレンチクルとして移植する「角膜上皮形成術」では、レンチクルを構成する表層実質が血管新生や線維性増殖を阻止することがわかり、移植されたアロ角膜上皮が血管を伴ったホスト結膜上皮に置換されるのを防いで、透明治癒することが明らかになったのである。著者らは「角膜上皮形成術」の適応症として、両眼性の severe chemical burns と Mooren's ulcer をあげ、多くの成功例を報告している。

しかし、残りの眼表面疾患群 (Stevens-Johnson's syndrome, ocular pemphigoid, stem-cell deficiency など) はそれ自身が炎症性サイトカインを発現して血管新生や線維性増殖などを誘発するので、角膜上皮形成術を行っても、移植されたアロ角膜上皮は高率に拒絶され、失敗に終わることがしばしばであった。そこで著者らは、最近著しく進歩した再生医療の技術を取り入れて、角膜上皮形成術で用いたレンチクルを構成する実質片の代わりに羊膜を用い、アロ角膜上皮細胞の代わりにアロ角膜 stem-cell を用いることを案出して、上皮を剥がした羊膜上にアロ角膜上皮 stem-cell を cell-suspension 法で播種培養したところ、培養した角膜上皮は 5~6 層に重層化し、基底部の円柱状細胞から表層の扁平な細胞へと分化し、生体と同様の角膜上皮層を形成させることに成功したのである。

このように羊膜をキャリアーとして培養した角膜上皮シートはレンチクルに比べて遥かに大きいので、病的上皮を除去した角膜実質を完全に覆うことができるため、消炎効果が大きく、炎症性サイトカインの発現を抑え、安定した角膜表面を形成することができたのである。臨床試験でも、不治として諦めていた Stevens-Johnson's syndrome の 67% に視力改善が得られている。

しかし、培養した stem-cell はあくまでもアロ角膜上皮であることから、拒絶反応を完全に避けることは不可能であるとして、最近では 100% の成功率を目指して、自己口腔粘膜上皮細胞を羊膜上で培養し、口腔粘膜上皮シートを作製した上で移植する方法を開発している。著者らは、これは autograft であるので、拒絶反応は起こらず、炎症性サイトカインも発現しないので、口腔粘膜上皮は速やかに角膜上皮様に分化転換し、両眼性の難治性眼表面疾患に透明な眼表面を確実に再生することが可能になったと述べている。

私は、これまで著者らが「眼表面の再建」をライフワークとして粘り強く研究してきた結果を何度も聞かされてきたが、聞く度に新しい成果を報告してくれたことに対して感謝すると共に、今回の成果に対しては最大の賛辞を贈りたいと思っている。