

Mini Review

培養口腔粘膜上皮シートによる眼表面再建術

中村隆宏, 木下 茂

京都府立医科大学大学院医学研究科 視覚機能再生外科学

Cultivated oral mucosal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction

Autologous cultivated mucosal epithelial cells from a non-ocular surface origin were investigated to determine their possible use in ocular surface reconstruction. An ocular-surface injury was created in one eye of each of the adult albino rabbits used, via lamellar keratectomy. Next, oral mucosal biopsies were taken from these rabbits and then cultivated for 2-3 weeks on denuded amniotic membrane. The cultivated oral epithelial sheets were examined by electron microscopy (EM) and immunohistochemically labeled for several keratins. EM revealed that the epithelial cells were very similar in appearance to those of *in vivo* normal corneal epithelium. It also showed that they had numerous desmosomal junctions and were strongly attached to a basement membrane with hemi-desmosomes. Immunohistochemistry confirmed the presence of non-keratinized, stratified keratins 4/13 and cornea-specific keratin 3. All of the corneas that were transplanted with the autologous cultivated oral epithelial sheets were clear and epithelialized 10 days after transplantation. From these results, we conclude that the autologous transplantation of cultivated oral epithelium is a feasible procedure for ocular surface reconstruction.

Rec.10/3/2003, Acc.11/13/2003, pp43-46

Takahiro Nakamura, Shigeru Kinoshita

Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medical Science, Integrated Medical Science, Surgery and Regenerative Medicine, Ophthalmology

Key words oral epithelium, corneal epithelium, amniotic membrane, cellular surgery, ocular surface reconstruction

はじめに

正常の眼表面(Ocular surface)は角膜上皮と結膜上皮という独自の分化をとげた表面外胚葉由来の粘膜から構成されており, 涙液とともに眼表面の恒常性を維持している。角膜の組織構造は表層から, 角膜上皮層, 角膜実質層, 角膜内皮層の3層の細胞層に分けることができ, その最表層にあたる角膜上皮は厚さ約50 μmの非角化重層扁平上皮で, 外界の刺激から眼球を物理的, 生物学的に保護する重要な役割を果たしている。角膜上皮幹細胞は, 細胞生物学的, 分子生物学的研究の進歩により, 角膜周辺部に位置する角膜輪部の基底層に存在するとされている(図1A)^{1,2)}。角膜輪部, すなわち角膜上皮幹細胞が喪失した場合, 生体反応性に周辺の結膜上皮が炎症, 血管新生などを伴って眼表面を覆い著しい視力障害をきたす(図1B)。このように, 角膜上皮幹細胞の異常をきたす疾患は“難治性眼表面疾患”と呼ばれ, その病態の解明, 治療法の開

発についてさまざまな研究がなされてきた。

眼表面再建術の開発

これまで, 難治性眼表面疾患に対する外科的治療としては, ドナーの組織を用いた角膜上皮移植術(角膜上皮形成術, 角膜輪部移植術)^{3,4)}や培養角膜上皮移植術⁵⁻⁸⁾が行われてきた。しかし, 角膜移植に必要なドナーには数的制限があり, またアロ移植のために術後多量の免疫抑制剤を長期にわたり使用する必要がある。患者自身のQuality of lifeや術後の拒絶反応, 感染症について考慮した場合, さらなる移植法の開発が必須となる。難治性眼表面疾患の多くは両眼性であるため, 自己の角膜上皮を利用することはできず, 拒絶反応の危険性のないオート移植の開発を検討した場合, その細胞ソースの選択が鍵となる。我々は, 眼表面以外の粘膜上皮を用いた手術法の開発を目的とし, 再生医療学的見地も踏まえ, 自己の培養口腔粘

膜上皮を用いた眼表面再建の可能性について検討した。

羊膜を用いた培養口腔粘膜上皮シートの開発

生体組織を *in vitro* で再生させるためには、細胞が分化増殖しやすい細胞外の環境、すなわち細胞の足場(細胞外マトリックス, キャリアー)の整備が必要である。特に、難治性眼表面疾患では、その上皮の再建のみならず、細胞外マトリックスを含めた基質の正常化が必須であると考えられる。生体材料の羊膜は、子宮内で胎児と胎盤を包んでいる無血管の薄い膜であり、厚い基底膜を持ち、瘢痕、炎症抑制効果、新生血管抑制効果、創傷治癒促進効果など、さまざまな効果が報告されている⁹⁻¹³。我々は、この羊膜を基質に用いた培養口腔粘膜上皮シートの開発に着手した(図2)。

まず我々の研究チームは、家兎を用いた動物実験を行い、上皮を搔爬した羊膜が口腔粘膜上皮の培養の基質として適しているかを検討した。使用した羊膜は、3ヵ月以内の感染症検査(HBV, HCV, HIV, 梅毒)陰性の妊婦より、口頭および文書でのインフォームドコンセントの後、手術室で帝王切開時に無菌的に採取したものを使用した。白色家兎の口腔粘膜を2mm²採取し、trypsin/EDTAなどにより口腔粘膜細胞浮遊液を作成し、羊膜上で約3週間培養した。また、培養過程では3T3線維芽細胞とインサートをはさんでの共培養、上皮細胞に分化誘導を施す air-lifting法を併用した(図2)¹⁴。培地は原則として、角膜上皮培養に使用されているSHEM(supplemented hormone epithelial medium)を改変して使用した。その結果、羊膜上で培養した口腔粘膜上皮細胞は、羊膜基質に接着、生育し、1週間でコンフルエントになった。また、培養後2~3週間で口腔粘膜上皮細胞は5~6層に重層化し、正常角膜上皮の基底細胞、翼細胞、表層細胞に相当する形態を保持していることがわかった(図3A, B)。走査型、透過型電子顕微鏡を用いた形態学的検討では、培養口腔粘膜上皮シートは上皮細胞間の接着に参与するデスマゾームやヘミデスマゾームを形成していることもわかった。また、その表層には粘膜上皮の性質を示す無数の微絨毛が存在し、最表層の細胞間は、タイトジャンクションによりバリア機能が保持されていることがわかった(図3C, D)。上皮系の細胞骨格蛋白のケラチンに対する免疫染色性では、皮膚表皮に発現する角化型ケラチン1/10は発現しておらず、粘膜分化型のケラチン4/13の発現は認められた。また、角膜型ケラチン3/12のうち、ケラチン3の染色性は認められた¹⁵。正常の口腔粘膜上皮はケラチン3の発現が認められ、生体内でも極めてユニークな粘膜といえ、

我々が作成した培養口腔粘膜上皮シートは、非角化粘膜としての性質を持ちながら、細胞骨格の側面からは、角膜の性質を一部持つシートであることがわかった。

自己培養口腔粘膜上皮シートによる眼表面再建術

作成した培養口腔粘膜上皮シートの生物学的特徴を考察後、家兎眼表面に培養口腔粘膜上皮シートを用いて自家移植を行った。家兎眼表面は表層角膜切除により、眼表面疾患モデルを作成した(図4A)。移植直後の時点で、眼表面は従来使用してきた培養角膜上皮シートと類似の透明性を示していた。移植後48時間において、粘膜上皮シートは透明性を維持しており、フルオレセイン染色にて眼表面に欠損なく残存していることを確認した(図4B)。移植片の周囲は全周にわたりフルオレセインの染色性が認められたため、残存している上皮は周囲の結膜上皮のコンタミネーションではないことが確認された。移植後10日において、培養口腔粘膜上皮シートは眼表面に残存し、かつ48時間後と比較して粘膜上皮シートより外側へ伸展していることが観察された(図4C, D)。また、この時点での角膜全層の組織学的考察では、培養口腔粘膜上皮シートは眼表面で生着しており、実質内の浮腫や細胞浸潤なども認められず、眼表面での生体適合性は良好であることがわかった¹⁵。ケラチンに対する免疫組織化学的考察では、*in vitro*での発現と同様に、ケラチン4/13, 3に対する免疫染色性を示していた。また、移植後、家兎は動きのある物体を目で追うことが確認され、視機能も改善していることが明らかとなった。

以上のことより、今回我々が作成した培養口腔粘膜上皮シートは、その組織学的、細胞生物学的観点からみて、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持つことがわかった。また、羊膜上で培養した口腔粘膜上皮シートは短期成績ではあるが、眼表面という生体内で極めて特殊な環境においても生着、生存し、術後の透明性を維持するにあたって、角膜上皮の代用となりえる可能性が示唆された¹⁵。

眼表面再生の今後の展望

以上のような一連の基礎的実験データを踏まえ、我々の施設では2002年より、大學倫理委員会および研究審査委員会のガイドラインに従って十分なインフォームドコンセントを行った上で、本学歯科および産婦人科の協力を得て、難治性眼表面疾患に対する自家培養口腔粘膜上皮移植術を開始した¹⁶⁻¹⁷。現在、移植後1年以上の症例を注意深く観察しているが、上皮修復といった観点からは、

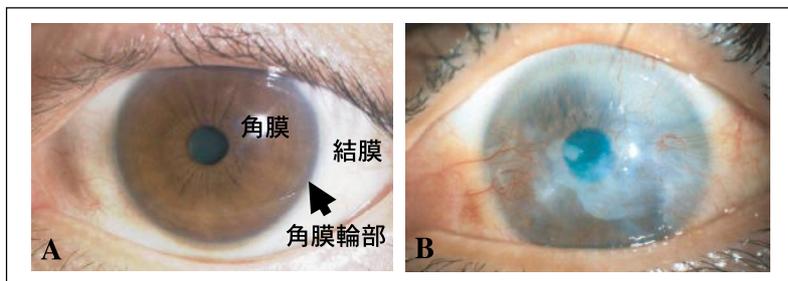


図1

A:正常眼表面.
B:難治性眼表面疾患(化学外傷眼)眼表面は周辺からの炎症,血管新生を伴った結膜により覆われている.

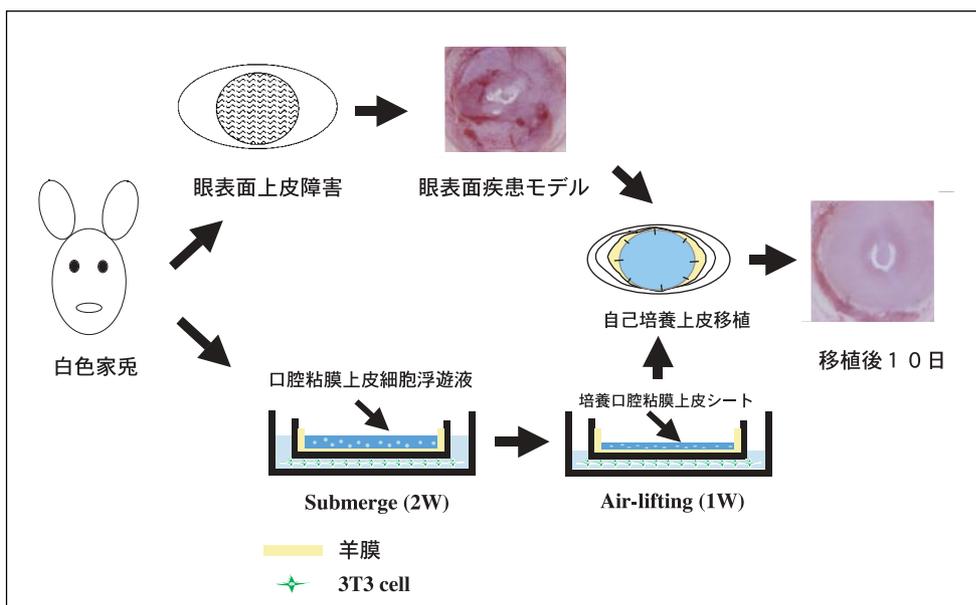


図2 自己培養口腔粘膜上皮シート移植術の動物実験モデル

白色家兎より口腔粘膜を採取した後,羊膜を基質として培養口腔粘膜上皮シートを作製.同家兎の角膜表面に自己移植して眼表面を再建した.

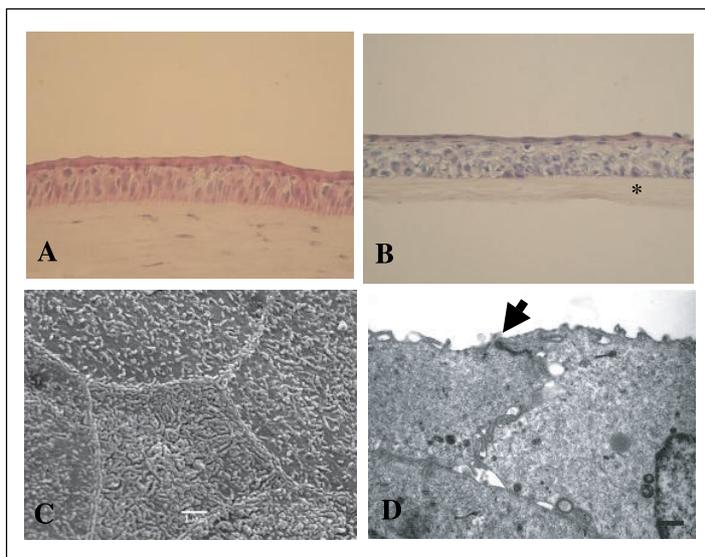


図3

A:家兎正常角膜上皮の組織像(HE染色)
B:家兎培養口腔粘膜上皮シートの組織像(HE染色).*羊膜基質
C:家兎培養口腔粘膜上皮シートの走査型電顕像 無数の微絨毛が観察される.
D:家兎培養口腔粘膜上皮シートの透過型電顕像 矢印はタイトジャンクションを示す.

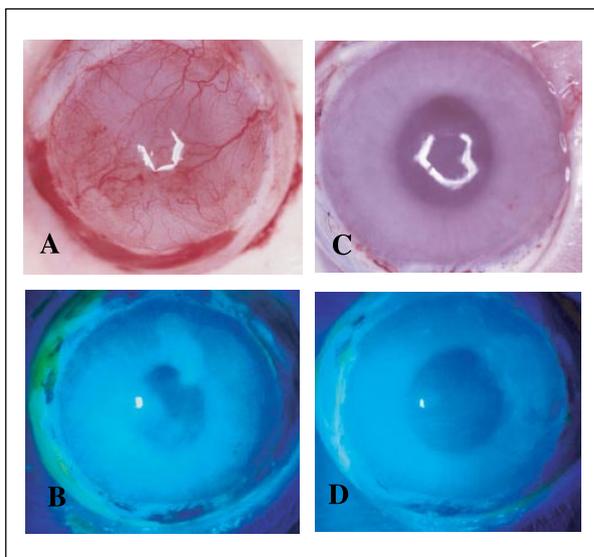


図4 家兎培養口腔粘膜上皮移植術

A:術前の家兎眼表面 眼表面は血管新生を伴った結膜で覆われている.
B:自己培養口腔粘膜上皮移植術後48時間の眼表面(フルオレセイン染色像).
C:自己培養口腔粘膜上皮移植術後10日の眼表面.
D:自己培養口腔粘膜上皮移植術後10日の眼表面(フルオレセイン染色像).

本手術法は成功をおさめている。また同時に、長期にわたる培養上皮の寿命や血管新生等の問題も含め、現在本術式の適応が明らかになりつつある。いずれにしても、難治性眼表面疾患に対する眼表面再建術はこれまで、その大部分がドナー組織を用いたアロ移植であったため、拒絶反応との戦いが我々角膜専門医にとっては最大の懸案事項であった。そうした状況の中、本手術法は自己粘膜を用いたオート移植の可能性に一石を投じたことは間違いないと確信する。今後、培養上皮シートの幹細胞研究の観点を踏まえた質的向上や、新しい基質を用いた上皮シートの開発など、現在プロジェクトは進行中である。

謝 辞

本研究は、第23回日本炎症再生医学会発表優秀演題に採択され、このような執筆の機会を与えていただき、関係諸氏に深く感謝いたします。また、本研究は文部科学省研究費補助金の一部を用いて行った。

文 献

- 1) Schermer A, Galvin S, Sun TT: Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*, 103: 49-62, 1986.
- 2) 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.
- 3) Thoft RA: Keratoepithelioplasty. *Am J Ophthalmol*, 97: 1-6, 1984.
- 4) Kenyon KR, Tseng SCG: Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*, 96: 709-722, 1989.
- 5) 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.
- 6) Tsai RJF, Li LM, Chen JK: Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med*, 343: 86-93, 2000.
- 7) 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.
- 8) Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura 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.
- 9) Kim JC, Tseng SCG: Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*, 14(5): 473-484, 1995.
- 10) Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY: Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res*, 70: 329-337, 2000.
- 11) Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC: Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol*, 85: 444-449, 2001.
- 12) Tseng SC, Li DQ, Ma X: Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol*, 179: 325-335, 1999.
- 13) Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F: Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*, 19: 348-352, 2000.
- 14) Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, Koizumi N, Dota A, Mochida C, Kinoshita S: Comparison of Ultrastructure, Tight Junction-Related Protein Expression and Barrier Function of Human Corneal Epithelial Cells Cultivated on Amniotic Membrane With and Without Air-Lifting. *Exp Eye Res*, 76(6): 735-743, 2003.
- 15) Nakamura T, Endo K, Cooper L, Fullwood NJ, Tanifuji N, Tsuzuki M, Koizumi N, Inatomi T, Sano Y, Kinoshita S: The Successful Culture and Autologous Transplantation of Rabbit Oral Mucosal Epithelial Cells on Amniotic Membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44: 106-116, 2003.
- 16) Kinoshita S: Ocular surface reconstruction by tissue engineering. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 106: 837-868, 2002.
- 17) Nakamura T, Kinoshita S: Ocular Surface Reconstruction Using Cultivated Mucosal Epithelial Stem Cells. *Cornea*, 22: S75-S80, 2003.