

## Tissue engineering for ocular surface reconstruction

### Noriko KOIZUMI

#### 1 緒 言

幹細胞を用いた再生医療は次世代の医療として注目されており、様々な分野における難治性疾患に対する治療法開発への応用が期待されている。眼科領域では、羊膜を角膜幹細胞培養のキャリアとして用いた眼表面再生医療の研究が行われており、臨床応用が最も進んでいる領域の一つである。京都府立医科大学では、他に有効な治療法のない難治性眼表面疾患に対して、羊膜を用いて角膜や口腔粘膜などの細胞を培養したシートを作り、眼表面を再建する再生医療技術を応用した治療法を行っており、これまでに約7年間の経過において有用性を確認している。

#### 2 生体材料としての羊膜

羊膜 (amniotic membrane) は妊婦の子宮内において、胎児と胎盤を覆う薄い生体膜であり、厚い基底膜と一層の上皮細胞からなる。眼科領域では、眼表面手術における再建材料として 1990 年代から凍結保存羊膜が使用されるようになった。羊膜には癒痕形成抑制、増殖因子を介した眼表面上皮の増殖促進<sup>1)</sup>、抗炎症<sup>2)</sup>、新生血管抑制など、様々な作用があることが知られている。また羊膜の基底膜のコラーゲンは、眼表面の角膜上皮の基底膜に類似していることが報告されており<sup>3)</sup>、眼表面再建術の基質としてふさわしいことが知られている。

京都府立医科大学では、1998年に京都府立医科大学倫理委員会の承認を受けて、羊膜移植の臨床応用を開始した<sup>4)-7)</sup>。倫理委員会で承認された方法に従って、帝王切開予定の妊婦から文書による同意を得た後、帝王切開時に羊膜を採取し、-80度で凍結保存したものを手術に用いる。

#### 3 羊膜を用いた培養角膜シート移植

角膜は眼球の最表層に位置する厚さ約 520  $\mu\text{m}$  の透明組織であり、表面から順に、上皮、実質、内皮の3層構造からなる。角膜上皮の幹細胞は、角膜と結膜の境界部(輪部)にあることが知られており、角膜の透明性維持に重要な役割を果たしている。角膜上皮幹細胞は、スチーブンス・ジョンソン症候群や眼類天疱瘡などの自己免疫疾患や化学薬品による外傷によって広範囲に障害されることがある。角膜上皮幹細胞が消失すると、角膜表面は不透明な結膜上皮で被覆されて著しい視力障害をきたす。これらの疾患は難治性眼表面疾患とよばれ、従来の角膜移植では治すことのできない重傷疾患である。培養粘膜シート移植の概念は、生体外で培養した粘膜上皮シート(角膜上皮あるいは口腔粘膜上皮)を用いて難治性眼表面疾患を再建するというものである(図1)。

移植後の眼表面にシートが生着するためには、角膜上皮培養のキャリアの選択が非常に重要であると考え、我々は眼表面再建術に用いていた羊膜組織をキャリアとして用いることにより、培養角膜上皮シートの作成を行った<sup>8)-10)</sup>。我々が開発した羊膜を用いた培養角膜上皮シートは、ドナーの角膜組織から採取した角膜組織から、幹細胞を含む上皮細胞を回収し、細胞懸濁液(Cell suspension)として羊膜上に培養することにより作成する。我々の培養法の特徴は、培養皮膚シートの作成に用いられている 3T3 fibroblast との共培養を行い、細胞培養の後半に表層上皮細胞を空気に触れさせる、air-lifting とよばれる手法を用いていることである<sup>10)</sup>。これらを含む培養条件の工夫を行うことにより、培養角膜上皮シートは生体の角膜上皮と同様に4-5層に重層化して分化した形態をしめし、角膜上皮に特異的な細胞骨格タンパクであるケラチン3やケラチン12を発現する。また、角膜上皮細胞間および基底細胞と羊膜基質の間に

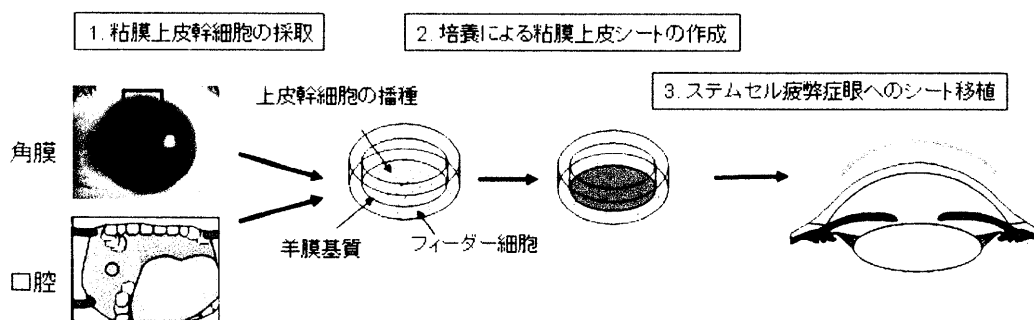


図1 培養粘膜上皮シート移植による角膜再生医療

は電子顕微鏡で認められるデスモゾームやヘミデスモゾームなどの接着構造が豊富に認められ、さらに最表層の上皮には、外界からの微生物の侵入を妨げるバリア機能を担う、タイトジャンクションの発現が認められる。

#### 4 培養粘膜上皮シート移植による角膜再生医療

ドナーの角膜上皮細胞を用いた培養角膜上皮シート移植術は、1999年に京都府立医科大学倫理委員会で承認され、難治性眼表面疾患に対する新しい治療法として臨床応用されている<sup>11)-15)</sup>(図2)。さらに、2002年からは自己の組織を用いた培養口腔粘膜上皮シート移植術が臨床応用されるようになった<sup>16)-18)</sup>。これまでに、スチーブンス・ジョンソン症候群や化学外傷をはじめとする重症疾患約90例に、培養角膜上皮シート移植および培養口腔粘膜上皮シート移植による眼表面再建術を行い、良好な治療成績を得ている。急性期の症例には遷延性上皮欠損の治療と眼表面の安定化を目的として行い、癒痕期の症例には眼表面の再建と視力回復を目的として行った<sup>19)</sup>。

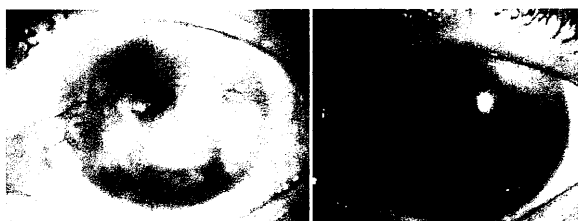


図2 重症眼表面疾患に対する培養角膜上皮シート移植

移植後の眼表面には、培養角膜上皮シートは良好に生着し、眼表面の炎症は急速に沈静化される。術後の合併症として、ドナー由来の培養角膜上皮シートを移植した場合には、拒絶反応が生じるため、ステロイド薬や免疫抑制剤の治療を行うことが必要である。片眼性の化学外傷などの症例に対しては、患者自身の健眼から、少量のステムセルを採取して培養角膜上皮シートを作成する、自己培養角膜上皮シート移植術や<sup>20)</sup>、両眼が障害された患者においても、患者自身の口腔粘膜を採取して角膜上皮様に分化させたシートを作成する、自己口腔粘膜上皮シート移植術などの新しい方法が可能になった。自己の組織を用いた、自己角膜上皮シート移植や培養口腔粘膜上皮移植では、術後に拒絶反応が生じないため、術後の免疫抑制薬の投与は必要がなく、安定した術後の眼表面が得られる。これにより、拒絶反応のリスクの高い、急性期の症例や、より重症な眼表面疾患に対しても、自己の組織を用いた眼表面再建術を行うことができる。

#### 5 安全性が担保された再生医療の実用化をめざして

培養角膜上皮、培養口腔粘膜上皮を含めた、培養粘膜上皮シート移植術が確立されることにより、これまで有効な治療法がなかった重症のステムセル疲労症に対して、外科的再建術の可能性が広がった。現在では、個々の症例に応じた最もふさわしい治療法を選択して行うことができるようになりつつある。

我々は、将来的に羊膜移植や、羊膜を用いた培養粘膜上皮シート移植を、安全性の担保された新しい生体材料、新しい手術手技として普及させたいと考えている。そのための試みとして、滅菌したヒト羊膜組織を凍結乾燥させて、室温で保存することができるような製品の開発を行っている<sup>21)</sup>。また京都府立医科大学では、2006年12月に再生医療細胞治療研究施設(CPC)が完成した。今後、我々の培養粘膜上皮シートも本施設においてGMP準拠の品質管理体制のもとで作成する予定であり、より安全で品質の保障された医療用材料を患者の治療に提供していきたいと考えている。

#### 参考文献

- 1) N.Koizumi, et al, *Curr. Eye Res.*, **20**,173 (2000).
- 2) M.Ueta, et al. *Clin. Exp. Immunol.*, **129**,464 (2002).
- 3) K.Endo, et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 1771 (2004).
- 4) 小泉範子ら, *眼科手術*, **12**, 391 (1999).
- 5) 小泉範子, *診療プラクティス*, **63**, 文光堂, 44 (2000).
- 6) 小泉範子, *羊膜移植. 角膜移植ガイドランス*, 南江堂, 46, (2002).
- 7) 小泉範子, 木下茂, *眼科*, **42**, 245 (2000).
- 8) N.Koizumi, et al, *Cornea*, **19**, 65 (2000).
- 9) N.Koizumi, et al, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 2506 (2000).
- 10) N.Koizumi, et al, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 2114 (2002).
- 11) N.Koizumi, et al, *Arch. Ophthalmol.* **119**, 298 (2001).
- 12) N.Koizumi, al, *Ophthalmology*, **108**, 1569 (2001).
- 13) 小泉範子, *外園千恵*, **46**, 1047 (2004).
- 14) 木下茂, *日本眼科学会雑誌*, **106**, 837 (2002).
- 15) S.Kinoshita, et al, *The Ocular Surface*, **2**, 21 (2004).
- 16) T.Nakamura, et al, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 106 (2003).
- 17) T.Nakamura, et al. *Br. J. Ophthalmol.*, **88**, 1280 (2004).
- 18) S.Kinoshita, et al, *Exp. Eye Res.* **78**, 483 (2004).
- 19) 木下茂ら, *最新医学*, **62**, 132 (2007).
- 20) T.Nakamura, et al. *Acta Ophthalmol. Scand.* **82**, 468 (2004).
- 21) T.Nakamura, et al, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**, 93 (2004).