

Title	Ocular Surface Reconstruction using Autologous Rabbit Oral Mucosal Epithelial Sheets Fabricated ex vivo on a Temperature-Responsive Culture Surface
Author(s)	林田, 康隆
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45416">https://hdl.handle.net/11094/45416</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	はやし だ やす たか 林 田 康 隆
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 19336 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Ocular Surface Reconstruction using Autologous Rabbit Oral Mucosal Epithelial Sheets Fabricated ex vivo on a Temperature-Responsive Culture Surface (角結膜上皮疾患に対する温度応答性培養皿を用いた自己口腔粘膜上皮シート移植術の開発)
論文審査委員	(主査) 教授 田野 保雄 (副査) 教授 片山 一郎 教授 宮崎 純一

#### 論文内容の要旨

##### [ 目 的 ]

角膜上皮の幹細胞は角膜周辺部の輪部の基底部に存在していることは広く知られているが、この角膜上皮幹細胞が消失した疾患（角膜上皮幹細胞疲弊症）では角膜表面は血管を伴った混濁した結膜瘢痕組織で被覆され、患者は著しい視力障害を来す。この疾患に対しては幹細胞を補充する治療が必要であるが、拒絶反応を生じないという大きな利点から、自己の幹細胞を用いた再生医療が理想的である。熱・化学外傷後などの片眼性疾患の場合は健常眼の輪部に存在する角膜上皮幹細胞を細胞源とする再生治療が有用であるが、両眼性の疾患の場合は自己の角膜上皮幹細胞の利用が不可能である。そこで本研究では両眼性角膜上皮幹細胞疲弊症に対して、自己の口腔粘膜上皮幹細胞を細胞源とした自家培養上皮細胞シート移植術を開発することを目的とした。

##### [ 方 法 ]

雄の白色家兎 (NZW : 2.0 kg) から口腔粘膜上皮組織を 3 mm 径のサイズで採取し、Dispase と Trypsin-EDTA 処理により口腔粘膜上皮細胞を単離後、温度応答性カルチャーインサート (温度応答性インテリジェントポリマーである N-isopropylacrylamide を培養床にグラフト化したカルチャーインサート) 上に  $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$  の細胞数で播種し、マイトマイシン C 処理を行った 3T3 フィーダー細胞上で 2 週間培養を行った。同時に組織から単離した口腔粘膜上皮細胞及び細胞シートに幹細胞/前駆細胞が保持されているかを検討するために、コロニーアッセイを行った。さらに細胞シートに対して p63、コネキシン 43、 $\beta 1$ -インテグリンに対する抗体を用いて蛍光免疫組織化学染色を行った。作成した口腔粘膜上皮シートを低温処理により回収し、予め作製しておいた角結膜上皮疾患モデルの家兎に対して自家移植を行った (n=10)。モデルは作製したが移植はしない家兎を対照群とした。術後の投薬はオフロキサシン点眼薬とバタメサゾン点眼薬を 1 日 4 回点眼した。移植群及び対照群に関して前眼部細隙灯顕微鏡検査にて経時的に観察し、術後 4 週目の時点の角膜組織を HE 染色で観察するとともにケラチン 3、12 (角膜上皮特異的) ケラチン 4、13 (粘膜上皮特異的) ケラチン 1、10 (角化上皮特異的) の発現を蛍光免疫組織化学染色で検討した。

## 〔 成 績 〕

温度応答性培養皿上で培養したウサギ口腔粘膜上皮細胞シートは2週間でコンフルエントとなった。培養開始3週後に温度応答性インテリジェントポリマーの臨界温度(32°C)以下の20°Cに30分間放置するだけで、細胞シートを培養皿から侵襲を加えることなく剥離、回収することができた。回収した口腔粘膜上皮細胞シートは3~5層に重層化しており、基底細胞層にp63陽性、コネキシン43陰性、 $\beta$ 1-インテグリン陽性細胞が検出され、基底細胞層に幹細胞/前駆細胞が保持されていることが示唆された。コロニーアッセイにおいて細胞源とした口腔粘膜上皮細胞の中に幹細胞/前駆細胞が含まれていることや、作製したシートの中に幹細胞/前駆細胞が保持されていることが証明された。自家移植術において透明な培養上皮細胞シートは、角膜表面上に無縫合で移植することができ、術後1、2、3、及び4週に至るまで角膜表面は透明に維持された。また、移植した上皮のケラチン発現パターンは正常角膜上皮と類似していた。

## 〔 総 括 〕

口腔粘膜上皮細胞を細胞源として、角膜上皮層に組織学的に類似した、幹細胞/前駆細胞を保持している培養上皮細胞シートを作製することができた。この培養上皮細胞シートの自家移植により、損傷した家兎角膜表面を透明に再建することができた。本法は自己角膜上皮幹細胞の利用不能な両眼性疾患に対して、有用な再生治療法となりうる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では両眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症に対して、自己の組織を用いた角膜再生治療法の確立を目指し、温度応答性培養皿を用いて口腔粘膜上皮細胞シートのみを回収、自家移植するシステムを家兎モデルで構築した。まず、温度応答性培養皿上で家兎口腔粘膜上皮細胞をフィーダー細胞との共培養系を用いて上皮細胞シートの作製に成功した。作製した粘膜上皮細胞シートを角膜上皮幹細胞疲弊症モデルの家兎に自家移植することも可能であった。細胞シートは3-5層に重層化しており移植に耐えうる強度を有し、自家移植後は眼表面に生着し、角膜表面は透明に再建された。また、組織学的にも移植後上皮は正常角膜の特性に近づいていた。以上より、本研究における口腔粘膜上皮細胞シート移植術は自己角膜組織の利用不可能な両眼性の疾患に対して、有用な再生医療となる可能性がある。

この方法は医学的に有用であると判断し、学位論文に値する。