

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5612801号
(P5612801)

(45) 発行日 平成26年10月22日 (2014. 10. 22)

(24) 登録日 平成26年9月12日 (2014. 9. 12)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 L 27/00 (2006. 01)
 A 6 1 L 27/00 V
 A 6 1 L 27/00 D

請求項の数 10 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2001-577863 (P2001-577863)	(73) 特許権者	502385931
(86) (22) 出願日	平成13年4月25日 (2001. 4. 25)		ツァイ、レイ・ジュイーファン
(65) 公表番号	特表2003-532466 (P2003-532466A)		台湾・タイペイ・チェン クン ロード・
(43) 公表日	平成15年11月5日 (2003. 11. 5)		セクション 4・2エフ350
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/013321	(74) 代理人	100064621
(87) 国際公開番号	W02001/080760		弁理士 山川 政樹
(87) 国際公開日	平成13年11月1日 (2001. 11. 1)	(74) 代理人	100098394
審査請求日	平成19年11月8日 (2007. 11. 8)		弁理士 山川 茂樹
審査番号	不服2012-10633 (P2012-10633/J1)	(72) 発明者	ツァイ、レイ・ジュイーファン
審査請求日	平成24年6月7日 (2012. 6. 7)		台湾・タイペイ・チェン クン ロード・
(31) 優先権主張番号	60/200, 036		セクション 4・2エフ350
(32) 優先日	平成12年4月27日 (2000. 4. 27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 上皮幹細胞の増殖方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レシピエント部位に被着される手術用移植片であって、前記移植片は、
 羊膜細胞と完全な状態を有する細胞外マトリックスとからなる羊膜と、そして
 培地中で処理された組織に由来し、次いで前記羊膜に移されることによって、前記羊膜
 上で増殖した角膜の上皮幹細胞とからなり、

前記増殖の前に前記羊膜細胞は死滅しているが、前記細胞外マトリックスの前記完全な
 状態が維持されていることを特徴とする手術用移植片。

【請求項 2】

前記羊膜は基底膜面を有し、

前記上皮幹細胞が前記基底膜面上で増殖することを特徴とする請求項 1 に記載の手術用
 移植片。

【請求項 3】

健康な眼で行われる縁部生検からの縁部組織が前記上皮幹細胞源であることを特徴とす
 る請求項 1 または 2 に記載の手術用移植片。

【請求項 4】

前記羊膜は基底膜面を有し、

前記上皮幹細胞が培地中で処理された組織に由来し、次いで前記羊膜に移され、

前記上皮幹細胞が前記羊膜の前記基底膜面上で e x v i v o に培養されることを特徴
 とする請求項 1 に記載の手術用移植片。

10

20

【請求項 5】

前記上皮幹細胞源は、レシピエント部位に対して生物学的および組織適合性である健康な部位から採取された生検による組織であることを特徴とする前記請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の手術用移植片。

【請求項 6】

損傷したレシピエント部位のための手術用移植片を作成する方法であって、前記方法は、

a) 羊膜細胞と完全な状態をもつ細胞外マトリックスを有する羊膜上に角膜の上皮幹細胞を含んだ生検を外植片として配置するステップと、そして

b) 前記角膜の上皮幹細胞を前記羊膜上で増殖させるステップとを含み、

前記増殖の前に、前記羊膜細胞は死滅しているが、前記細胞外マトリックスの前記完全な状態が維持されていることを特徴とする手術用移植片を作成する方法。

【請求項 7】

前記羊膜は基底膜面を有し、

前記配置する前記ステップは、前記基底膜面上に前記外植片をマウントするステップを有することを特徴とする請求項 6 に記載の手術用移植片を作成する方法。

【請求項 8】

前記マウントするステップにおいて、増殖した前記上皮幹細胞は損傷したレシピエント部位に対し表が上になるように配置されることを特徴とする請求項 7 に記載の手術用移植片を作成する方法。

【請求項 9】

増殖させる前記ステップは、前記羊膜をその外植片と共に、前記上皮幹細胞が直径 2 から 3 cm の面積まで増殖するのに十分な時間培養することを特徴とする前記請求項 6 に記載の手術用移植片を作成する方法。

【請求項 10】

前記移植片を外科的にレシピエント部位に固定した後で前記羊膜から前記外植片を取り除くことを特徴とする前記請求項 6 に記載の手術用移植片を作成する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、上皮幹細胞および縁部 (limbal) 幹細胞の疲弊症、より具体的には、上皮幹細胞疲弊症の例えば角膜表面再建術におけるこの問題を治療するための方法および移植片に関する。

【0002】

(従来技術)

眼に関しては、正常な眼球表面は角膜、縁部および結膜上皮によって覆われている。これらの明確に区分された細胞表現型は、安定な眼球前方の涙液膜と一緒にあって眼表面の完全な状態を維持している。化学火傷または熱傷、スティーヴンス - ジョンソン症候群、眼の瘢痕性類天疱瘡、縁部領域における度重なる外科手術および凍結療法、コンタクトレンズ装着および重篤な微生物感染に起因する重篤な縁部上皮損傷が、縁部および上皮幹細胞疲弊症の原因となりうる。縁部上皮幹細胞疲弊症は通常、角膜表面上への結膜内生 (conjunctivalization)、血管新生、慢性炎症および線維内生ならびに角膜混濁として現れる。

【0003】

縁部疲弊症が片側性または非対称に病変のある両側性である場合には、自家縁部組織移植が推奨されている。自家縁部移植の主要な関心事の一つは、角膜縁の 2 から 3 実働時間の領域を測り 1 または 2 個の縁部移植片を健康な他眼から摘出しなければならないことである。ドナー眼で可能性のある合併症について記載した一つの報告がある。ウサギによる実験からも、事前に縁部摘出をしてから、続いて中心角膜上皮をドナー眼から摘出する場合には、縁部疲弊症が起きることが分かった。Pellegrini 他 (Lancet

10

20

30

40

50

、349巻、990～993ページ、1997年）は、合計2例の縁部疲弊症患者における角膜表面再建術のために、3T3線維芽細胞支持細胞層上で増殖させた角膜上皮細胞シートの移植について報告した。

【0004】

最近、基質置換として羊膜を移植することが、完全縁部上皮幹細胞疲弊症のウサギにおいて角膜表面を再建するのに有効であることがKimおよびTseng (Cornea、15巻、473～84ページ、1995年)によって明らかにされた。

【0005】

(発明の要旨)

本発明の一実施態様では、健康な眼から微小な縁部生検により、および培養で得られた縁部幹細胞および上皮細胞を特別に処理した羊膜上で増殖させる。基質としてこのような羊膜を用いることは、炎症を起こしていない縁部間質を修復し、縁部幹細胞および上皮幹細胞集団を増殖させることに役立つ。得られる「製品」を擦過した角膜表面に移植片として移植し、続いて表面角膜切除 (heretectomy: ヘレテクトミィ) によって線維血管性内生を除去することができる。眼以外の損傷身体領域の場合には、健康な上皮細胞の生検は、同一または類似した生物学的/組織学的特性を有する、すなわち損傷した領域と組織適合性のある隣接した組織領域から行う。

【0006】

(好ましい実施形態の説明)

縁部生検は健康な眼で行い、その眼は、患者の他眼であっても別の生体からであってもよい。眼をBetadine (登録商標) (プルビドン (povidone) - ヨード) で消毒する。無菌条件の下で、上皮細胞および角膜間質組織の一部を含む縁部組織1から2mm²を縁部縁から分離し、No. 66 Beaver (登録商標) ブレード (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) による層状角膜切除により表面の角膜間質から切除する。この組織を、1ml当たり0.5% DMSO (ジメチルスルホキシド)、2ug マウスEGF (上皮成長因子)、1ug ウシインスリン、0.1ug コレラ毒素および5% ウシ胎仔血清を追加したDMEM (ダルベッコの改良イーグル培地) およびHamのF12 (1:1の比) を有する培地1.5mlの入った35mmの皿に入れ、無菌の層流フード中で培養するため、直ちに実験室に送った。

【0007】

羊膜 (Bio Tissue, Miami, Fl. から入手) を培養系として用い、その教示を参照により本明細書に組み込むTseng SCG (Am. J. Ophthalmol、124巻、765～774ページ、1997年) およびTseng (米国特許6, 152, 142) によって報告されているように入手し、処理して保存する。羊膜を、基底膜面を上にして培養プレート上に滑らかに貼り、使用前に一夜、5% CO₂ および95% 空気の下に37℃で、加湿したインキュベータ中に置いた。縁部外植片の培養は、一部改良を加えて以前に記載されたように行う (Tsai およびTseng, Invest Ophthalmol Vis Sci、29巻、1565-1576ページ、1988年; およびTsai 他, Invest Ophthalmol Vis Sci、35巻、2865～2875ページ、1994年)。これらの参考文献で教示されているように、プラスチック製の基質上に移す代わりに、上皮幹細胞を含む縁部外植片を前述の培地1mlの入った35mmの皿中の羊膜の基底膜面に植える (移す)。培地を2日毎に交換し、2から3週間培養を維持すると、上皮幹細胞が成長して広がり、角膜表面再建術用、直径約2から3cmの面積を覆う細胞層が形成される。他の組織修復については、必要に応じ、上皮幹細胞層をほとんど用いることができる。

【0008】

角膜修復の例を続けると、角膜縁部におけるペリオトミー (periotomy) 後、縁部周辺の (perilimbal) 結膜下癒痕および炎症を起こしている組織を除去して裸の強膜とする。角膜の線維血管性組織は、同種移植縁部移植について記載されている方法 (Tsai およびTseng, Cornea、13巻、389～400ページ、1994年) と同様の方

10

20

30

40

50

法でNo. 57および66 Beaverブレードによる層状角膜切除によって除去する。部分から完全縁部角膜損傷はあるが正常な中心角膜を持つこれらの患者の場合には、羊膜と共に培養した縁部上皮幹細胞を区分状の縁部角膜移植片、またはレシピエント眼のサイズに従って作られた縁部等価体として用い、対応するレシピエント縁部領域（90°から360°まで）に移植する。完全縁部および角膜表面損傷のある患者の場合には、全層状角膜組織、または縁部角膜等価体として新規な移植片を用い、層状角膜移植として移植して全領域を覆う。

【0009】

処理した羊膜基剤上で、培養した、適当なサイズの上皮幹細胞シートを貼り、上皮面を上にして全欠損を覆うが、これは蛍光染色またはゆるく付着した元の移植片の存在によって容易に識別することができる。次いで、移植片を障害部位に固定する。障害を受けた角膜の場合には、角膜側の結節10-0ナイロン縫合、および強膜上固定(episcleral anchorage)した周囲結膜縁との結節8-0 Vicryl (登録商標) 縫合により固定することができる。全手順中、培養上皮幹細胞層は、ヒアルロン酸ナトリウム(hyaluronate) Healon (登録商標) (Pharmacia & Upjohn AB, Uppsala, Sweden) のコーティングにより曝露、乾燥および摩耗から保護する。元の外植片組織は、外科手術の終了時に羊膜から取り除くことができる。この移植片が角膜全体にわたる場合には、眼を一夜圧迫眼帯をあて、翌日から1週間、治療用コンタクトレンズをつける。初めの一週間は1日4回、次の2週間は1日2回、局所用酢酸ブレドニゾロン1%溶液を投与し、続いて2から3ヶ月間は1日2回、0.1%フルオロメトロンを手術領域周辺の結膜炎症の重症度に応じて投与する。

【0010】

前述のように、移植片は特別に処理した羊膜の基底膜面上で培養する。2から3週間後、上皮幹細胞が成長し、羊膜上に直径が約2から3cmのシートを形成する。フラットマウント(flat-mount)調製物は、上皮幹細胞層がPASおよびAlcianブルー染色に陰性であり、裸の羊膜が紫に染色することを示す。組織学的検査は、上皮シートがシートの縁では4から5層の幹細胞層から構成され、縁と元の外植片組織との間の領域では1から4層の細胞層から構成されていることを示す。超微細構造検査は、ゆるく幅の広い細胞間隙および基底膜構造が、基底細胞-羊膜接合点で高電子密度の細胞間質が巣状に凝集して存在することを示している。

【0011】

眼の治療に特有の本発明の実施形態に関しては、 14.8 ± 1.9 ヶ月という平均(\pm SD)追跡期間により、スネレン視力スケールに基づく様々な程度の視力改善が示される。すべての眼が2から4日以内に完全再上皮形成を示し、平均(\pm SD)期間は 2.7 ± 0.8 日である。再建された角膜表面では1から2週間以内に炎症が減少し、血管新生が消退する。手術から1ヶ月後には、角膜透明度が改善され、表面は滑らかで濡れやすくなっている。

【0012】

縁部角膜損傷の面積に応じ、特別に調製した羊膜基質上で増殖した培養上皮幹細胞を縁部等価体または縁部角膜等価体として使用することができる。

【0013】

移植のために比較的大きな角膜縁部片を採取することに起因するドナー眼の縁部疲弊症がウサギで報告されている。したがって、本発明の新たな方法および得られる移植片は、角膜縁部の小片を採取するに過ぎないことから、ドナー眼の可能性のある合併症を実質的に減少させる。さらに、本方法はまた、非対称病変のある両側性縁部疲弊症の眼で行うことができる。特別に前処理した羊膜上での自家上皮幹細胞のex vivo増殖により、2から3週間で移植に十分な上皮幹細胞が得られる。両側性完全縁部疲弊症の患者の場合には、適合性のあるソース、別の関連生体からの角膜縁部を本発明に従って使用することを考慮すべきである。

【0014】

移植のために独自に前処理をした羊膜をベースとする自家上皮幹細胞を使用することにより、上皮化を容易にすること、炎症および瘢痕化を軽減すること、および基底間質性組織が破壊されている場合の基質置換を含む羊膜移植に固有のすべての有益な効果も得られる。最も重要なことには、T s e n g に従って前処理された羊膜は、上皮幹細胞を保存し増殖させるための天然基質を提供し、角膜再建術に必要な自家細胞集団を形成する。さらに、自家細胞のみを移植するため、移植後に免疫抑制を必要としない。このように移植された同種幹細胞の場合には、他の細胞タイプのない上皮幹細胞のみを移植することから、拒絶反応発生率を減らすことができる。

【 0 0 1 5 】

前述のように、この独自の移植片および特別に処理した羊膜を使用することによる外植片からの上皮幹細胞を増殖させるその形成方法には、眼の外科手術以外の使用法、例えば火傷した皮膚領域の、特に外植片のドナー部位が小さいことが必要である場合の修復がある。同様に、小さな外植片を入手する生検は縁部組織である必要はない。外植片は、健康な組織を有し、上皮幹細胞を含み、移植片についてレシピエント部位と組織適合性がなければならない。レシピエント部位と同一の身体部分から生検ができない場合には、損傷した眼がレシピエント部位であり他の眼 - 健康な眼 - がドナー外植片を提供する好ましい実施形態のとおり、対応する同様の身体部分を外植片として選択することができる。

【 0 0 1 6 】

独自の本発明の手術用移植片およびその作製方法は、当業者が大幅な実験をすることなく実施し、特許請求の範囲に記載される本発明の精神および範囲内にある変更形態を開発するのに十分開示されたと考えられる。

10

20

フロントページの続き

合議体

審判長 松浦 新司

審判官 富永 保

審判官 加賀 直人

(56)参考文献 特開平8 - 266614 (JP, A)

特開昭63 - 260549 (JP, A)

米国特許第6152142 (US, A)

あたらしい眼科, 1999年, vol. 16, no. 2, p. 155 - 160

あたらしい眼科, 1999年, vol. 16, no. 2, p. 161 - 166

Transactions of the American Ophthalmologica
l Society, 1999年, vol. 97, p. 891 - 986

American Journal of Ophthalmology, 1997年, vol
. 124, p. 765 - 774

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L27/00