

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11467

研究課題名(和文) 羊膜由来間葉系幹細胞の眼表面疾患モデルにおける効果

研究課題名(英文) Effect of human amniotic membrane mesenchymal cells in ocular surface model

研究代表者

島崎 潤 (Shimazaki, Jun)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40170930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：羊膜由来間葉系細胞(AMF)は、*in vitro*創傷治癒モデルにおいて角膜上皮創傷治癒を促進することを報告した。本研究では、*in vivo*眼表面疾患モデルにおけるAMFの効果について検討した。AMFはMSCsマーカーのうち、CD29、CD44、CD73、CD90を強発現し、炎症性物質分解酵素や神経堤由来関連因子、線維芽細胞マーカーも発現していた。ウサギ角膜創傷治癒モデルにおいてAMF培養上清(AMF-sup)点眼により、ウサギ角膜上皮の創傷治癒を促進した。以上のことから、AMFはMSCsとは異なるフェノタイプを示した細胞群であり、その培養上清は上皮の創傷治癒を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の施設では既に羊膜バンクにより羊膜の採取から保存提供まで行っており、これまでに培ってきた知識と技術を利用して、羊膜から比較的容易に間葉系幹細胞の分離も行うことが可能である。羊膜中に存在する間葉系幹細胞は眼表面上皮に対し、その培養上清が創傷治癒効果があることがわかってきた。これらのことは、眼表面疾患に対して羊膜を用いたより効果的な治療が行える可能性があると同時に、難治性眼表面疾患に対する新しい細胞治療法としても期待される。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) have the ability of tissue regeneration effects, such as the improvement of cardiac function, revascularization, and intestinal tissue repair, etc. MSCs are important for tissue homeostasis and wound healing. MSCs have been reported to exist in amniotic membrane (AM), which has the ability of anti-inflammatory effect and healing promoting effect, etc. To estimate whether our isolated human AM fibroblasts(AMF) were involved in the effect of AM, we examined the effect of AMF on rabbit corneal epithelium *in vivo*. Some mesenchymal stem cells (CD29, CD44, CD73, CD90) and neural crest origin related markers (CD49d, CD56) were expressed on AMF cell surface. AMF supernatant (AMF-sup) tended to promote rabbit corneal epithelial wound healing. This data may suggest that the isolated AMF were promoting the wound healing, which may partially explain the effects of AM in ocular surface construction.

研究分野：眼科学

キーワード：間葉系幹細胞 神経堤由来細胞 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

羊膜は外胚葉由来の上皮と中胚葉由来の間葉系細胞からなる胚膜の一つである。妊娠中の母体内において、この羊膜は胎児を包み込む最も胎児側の膜である。羊膜には抗炎症作用や創傷治癒促進効果などが知られているだけでなく、コラーゲンを豊富に含んだ血管のない免疫寛容組織であり、角膜、皮膚、血管、気管、鼓膜など様々な臓器の代替基質として臨床応用されるなど、再生医療の分野でも注目されている。

スティーブンス・ジョンソン症候群などの症例では重度のドライアイを伴ったケースも多く存在し、我々は以前からその眼表面を再建させるため、羊膜を基質としたドナー由来の角膜上皮幹細胞の移植を行ってきた[1]。また、より安定した上皮化をはかるため、角膜上皮幹細胞を羊膜上に培養した培養上皮シートの移植も行ってきた[2]。一方で、我々は羊膜の基礎的な研究についても行っている。例えば、羊膜上に角膜上皮や結膜上皮を培養すると免疫調節に関与する MHC class I の一つである HLA-G の発現が上昇すること[3]、重篤な炎症をともなった眼表面疾患にこの羊膜を物理的なカバーとして用いると、炎症細胞が羊膜にトラップされ抗炎症効果をもたらすこと[4]、さらに、その効果は羊膜に豊富に存在するヒアルロン酸と炎症細胞で発現する CD44 を介して接着しトラップされていることなどについて報告した[5]。

骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などの間葉系に属する細胞へ分化する能力を持った間葉系幹細胞は、皮膚、脂肪組織、骨髄、歯髄などさまざまな組織に存在する事が報告されており[6, 7, 8]、これらの間葉系幹細胞は存在する組織の恒常性の維持や創傷治癒過程において重要な働きをしていると考えられる[6, 7]。近年の再生医療における間葉系幹細胞の報告では、拡張型心筋症や虚血性心筋症における心機能と自覚症状の改善、重症末梢血動脈疾患における血管再生効果、放射線障害性腸炎における修復効果など、再生誘導作用、抗炎症作用、血管新生や線維化抑制作用といった様々な作用や効果があることが明らかとなりつつあり、様々な疾患の局面で間葉系幹細胞の効果が期待されている。羊膜においても、間葉系幹細胞の存在が報告され、この羊膜由来の間葉系幹細胞を移植すると、心筋細胞や肝細胞へ分化するなど、臓器の機能を回復させる効果を持つことも解ってきた [9, 10]。間葉系細胞の眼表面への応用として、近年、骨髄由来の間葉系幹細胞をウサギやラットのアルカリ外傷モデルへ移植した報告もあり、角膜疾患に対する間葉系幹細胞の効果も期待されている [11, 12]。

2. 研究の目的

本研究の申請者は平成 26 年 4 月から 28 年 3 月までの文部科学省科学研究費補助金(基盤 C)「羊膜と間葉系幹細胞の関連性とその効果と保存について」で、羊膜から分離した間葉系細胞が骨芽細胞、神経細胞への分化誘導可能で、in vitro Wound healing モデルにおいて創傷治癒促進効果を持つことが分かってきた。

以上の研究成果は、羊膜から分離した間葉系細胞 (AMF) によって、角膜の眼表面再建で創傷治癒促進効果を発揮する可能性を示唆している。そのため、本研究では、我々がこれまでに構築してきた羊膜の生物学を基盤として、in vivo 眼表面疾患モデルにおける AMF の効果を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) AMF の準備: AMF はこれまでに分離培養してきた物を使用する。増殖後においては間葉系幹細胞のマーカーの発現を再確認する。また、分化能(骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、神経細胞、角膜実質細胞)においても定期的に確認する。

(2) 実験動物の準備：上皮欠損モデルは麻酔下でウサギ角膜に組織生検トレパンと角膜上皮を削除するグラインダーを用いて角膜上皮中央部分に 8mm 径の上皮欠損を作成したものを使用した。

(3) AMMCs または羊膜 (AM) 培養上清の投与：AMF 培養中の培養上清を取り除き、DMEM/F12 (FCS-) (DF-) で 37 ℃ , 5% CO₂ 環境下 2 日間インキュベーションした上清を使用した (AMF-sup) 。 AM は当院羊膜バンクから供給されたものを使用し、同様に DMEM/F12 (FCS-) (DF-) で 37 ℃ , 5% CO₂ 環境下 2 日間インキュベーションした上清を使用した (AM-sup) 。 投与方法は点眼 (5 回 / 日を 3 日間) または結膜下注射 (0.5ml を 1 回) で行った。コントロールは AMF を培養する前の DF- を使用し比較した。

(4) 投与後の眼表面の観察：ウサギ上皮欠損モデルにおいて、フルオレセイン染色による上皮欠損部位の投与直後から上皮化するまで経時的な観察を行った。投与直後の上皮欠損部位の面積を 100% としてその割合を画像処理ソフト (Image J) で解析した。

4 . 研究成果

AMF は MSCs マーカーのうち、CD29、CD44、CD73、CD90 を強発現していたが、CD105、CD146、CD166、STRO-1 の発現はほとんど認められなかった (図 1) 。炎症性物質分解酵素である CD10 や神経堤由来関連因子、線維芽細胞マーカーの発現が観察されたが、造血系や血管内皮のマーカーの発現は認められなかった (図 1 , 2) 。

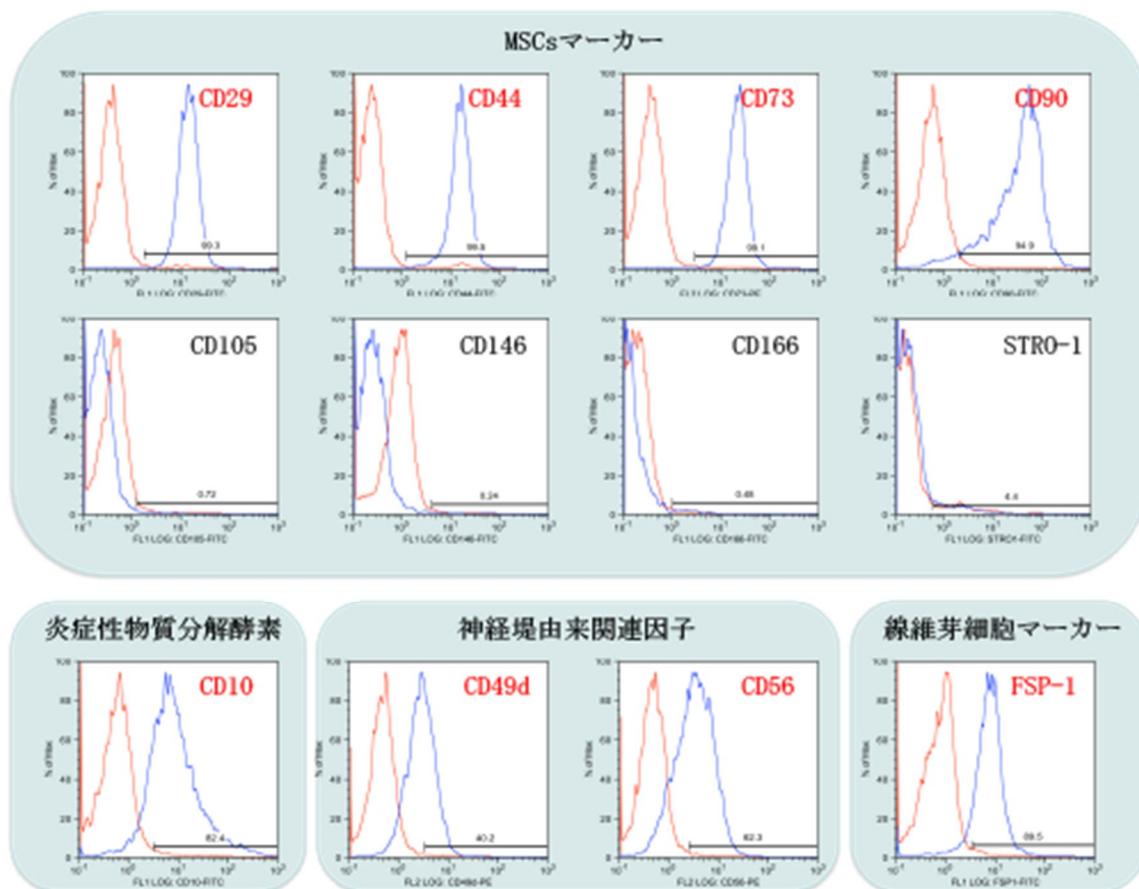


図 1) AMF における MSCs マーカー (CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD146、CD166、STRO-1)、炎症物質分解酵素 (CD10)、神経堤由来関連因子 (CD49d、CD56)、線維芽細胞マーカー (FSP-1)、のフローサイトメトリー。赤線は Isotype control。

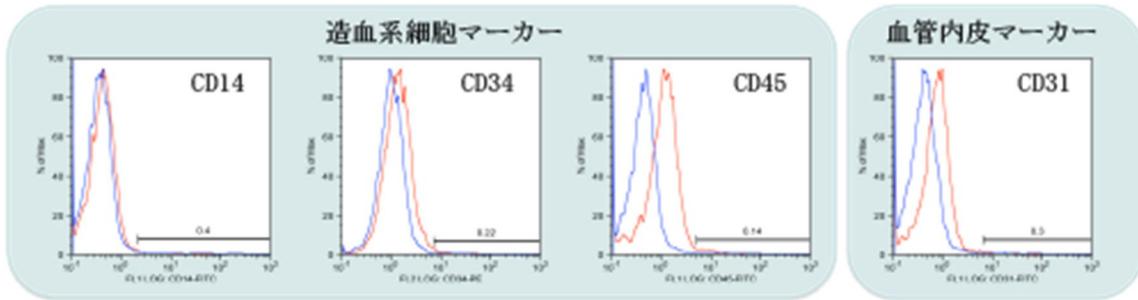


図 2) AMF における造血系細胞マーカー (CD14, CD34, CD45)、血管内皮マーカー (CD31) のフローサイトメトリー。赤線は Isotype control。

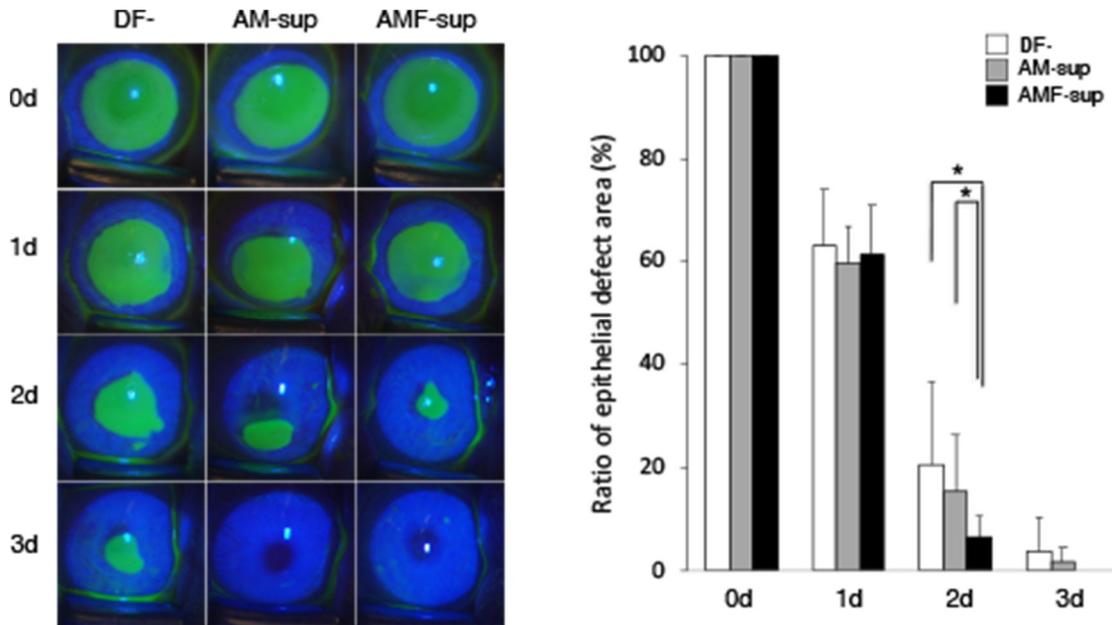


図 3) ウサギ角膜の創傷治癒モデルにおける AM-sup と AMF-sup の点眼効果。モデル作成直後から上皮化までの眼表面におけるフルオレセイン染色 (左図)。緑色部分は上皮欠損部位。モデル作成直後 (0d) を 100% とした時の上皮欠損部位の面積 (右図)。 $P < 0.05$ ($n=6$)。

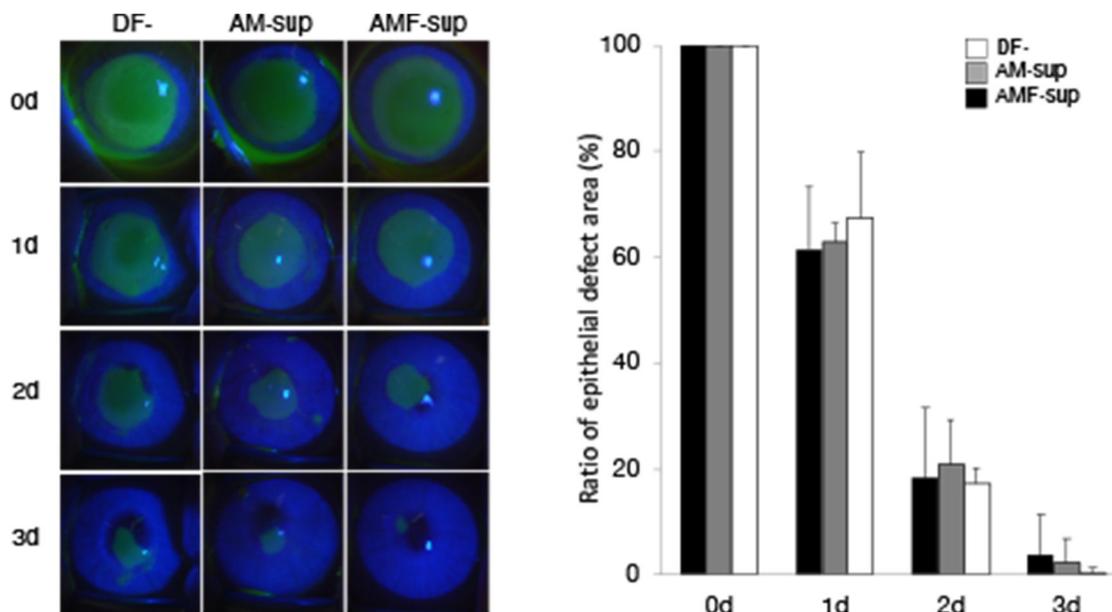


図 4) ウサギ角膜の創傷治癒モデルにおける AM-sup と AMF-sup の結膜下注射の効果。モデル作成直後から上皮化までの眼表面におけるフルオレセイン染色 (左図)。緑色部分は上皮欠損部位。モデル作成直後 (0d) を 100% とした時の上皮欠損部位の面積 (右図)。

AMF 培養上清 (AMF-sup) の点眼により、3 日目 (3d) には全て完全に上皮化し、ウサギ角膜上皮の創傷治癒を有意に促進した (図 3)。AMF-sup の結膜下注射による効果は観察されなかった (図 4)。以上のことから、AMF は MSCs とは異なるフェノタイプを示した細胞群であり、その培養上清は上皮の創傷治癒を促進することが示唆された。AMF は羊膜の持つ創傷治癒促進効果の一部の役割を担っている可能性が考えられた。

<引用文献>

- 1 Tsubota K, Satake Y, Kaido M, et al. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 1999;340:1697-1703.
- 2 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* 2002;109:1285-1290.
- 3 Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Ocular surface epithelial cells up-regulate HLA-G when expanded in vitro on amniotic membrane substrates. *Cornea* 2006;25:715-721.
- 4 Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001;20:408-413.
- 5 Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Hyaluronic acid-CD44 interaction mediates the adhesion of lymphocytes by amniotic membrane stroma. *Cornea* 2005;24:206-212.
- 6 Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001;3:778-784.
- 7 Gronthos S, Franklin DM, LeDy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001;189:54-63.
- 8 Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13625-13630.
- 9 Fujimoto KL, Miki T, Liu LJ, et al. Naive rat amnion-derived cell transplantation improved left ventricular function and reduced myocardial scar of postinfarcted heart. *Cell Transplant* 2009;18:477-486.
- 10 Manuelpillai U, Tchongue J, Lourensz D, et al. Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl(4)-treated mice. *Cell Transplant* 2010;19:1157-1168.
- 11 Ke Y, Wu Y, Cui X, et al. Polysaccharide hydrogel combined with mesenchymal stem cells promotes the healing of corneal alkali burn in rats. *PLoS One* 2015;10:e0119725.
- 12 Zeng W, Li Y, Zeng G, Yang B, Zhu Y. Transplantation with cultured stem cells derived from the human amniotic membrane for corneal alkali burns: an experimental study. *Ann Clin Lab Sci* 2014;44:73-81.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Higa, K. Higuchi, J. Kimoto, R. Satake, Y. Yamaguchi, T. Tomida, D. Shimazaki, J.	4. 巻 60(12)
2. 論文標題 Effects of Amniotic Membrane-Derived Fibroblast Supernatant on Corneal Epithelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 3718-3726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.19-27041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 比嘉一成、樋口順子、佐竹良之、山口剛史、富田大輔、島崎 潤
2. 発表標題 羊膜由来間葉系細胞培養上清のウサギ角膜上皮創傷治癒モデルへの影響
3. 学会等名 角膜カンファランス2018
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 比嘉一成、樋口順子、佐竹良之、山口剛史、富田大輔、島崎 潤
2. 発表標題 ウサギ角膜上皮創傷治癒モデルにおける羊膜由来間葉系細胞培養上清の効果
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Kazunari Higa, Junko Higuchi, Yoshiyuki Satake, Takefumi Yamaguchi, Daisuke Tomida, Jun Shimazaki.
2. 発表標題 Effects of amniotic membrane mesenchymal stem cells for the corneal epithelial proliferation and differentiation.
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology- Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	佐竹 良之 (Satake Yoshiyuki) (60385143)	東京歯科大学・歯学部・非常勤講師 (32650)	
連携研究者	比嘉 一成 (Higa Kazunari) (60398782)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	