

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09955

研究課題名(和文)角膜移植Graftの環境適応応答破綻に係る移植巣微小環境の解明

研究課題名(英文) Analysis of microenvironment of corneal transplantation to elucidate the molecular mechanism of failed adaptation of corneal graft to the host environment

研究代表者

上野 盛夫 (Morio, Ueno)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40426531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：移植医療において移植片の慢性機能不全は局所微小環境への適応破綻であり、そのメカニズムは細胞競合と細胞同調が基盤にあり、SASP (senescence-associated secretory phenotype)、miRNA, エキソソームを中心とする細胞老化拡散経路に素因があるとする概念を検証した。角膜移植をモデルとして、角膜移植の局所微小環境である前房水における移植片の慢性機能不全に繋がる環境適応応答破綻の分子動態解析を実施し、候補分子としてSASP関連サイトカインやmiRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

移植医療・再生医療の医療現場において移植直後に生じる急性拒絶反応の制御は部分的に奏功していますが、移植片の長期予後は良好ではありません。死体腎移植では50%生着年数は約8年に留まっていますし、角膜移植の術後に角膜内皮細胞は持続的に減少します。これは、まさに晩期臓器不全であり、本機構の解明並びに修復策はありません。本研究で同定した液性因子を介したドナー/ホスト細胞間の細胞競合・細胞同調に係る分子は角膜移植・角膜内皮再生医療を越えて、再生医療・移植医療全般における晩期臓器不全の機序解明の礎となります。

研究成果の概要(英文)：In regenerative medicine, chronic dysfunction of transplanted grafts is caused by their failure of adaptation to the host environment. The mechanism is based on cell competition and cooperation via cellular senescence diffusion pathways by SASP (senescence-associated secretory phenotype), miRNAs, and exosomes. We took corneal endothelium as a model of the failed adaptation, we examined molecular dynamics in aqueous humor which is microenvironment of corneal endothelium to elucidate the mechanism of chronic corneal endothelial failure after corneal transplantation and identified SASP-related cytokines and miRNAs responsible for the mechanism.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜内皮細胞 前房水 微小環境 miRNA

1. 研究開始当初の背景

移植医療・再生医療は損傷した組織を移植片・細胞 (Seeds) で置換することで治療効果を発揮するが、その薬理効果は移植床 (Soil) における組織損傷に対する免疫反応などの局所微少環境の特性に大きく左右される。再生医学領域において、細胞移植治療のソース (Seeds) についての研究は莫大である。我々もヒト角膜内皮細胞から高品質培養ヒト角膜内皮細胞の拡大培養とその弁別に成功し、培養ヒト角膜内皮細胞注入療法の臨床研究・医師主導治験を実施してきた。一方、移植医療において Seeds と両輪をなす移植床 (Soil) に関する研究は国際的にも少ない。臓器・組織・細胞移植の何れにおいても、Soil 側の反応としては急性拒絶という獲得免疫概念が焦点となり、局所微小環境の自然免疫・自然炎症概念に基づく、移植片の慢性機能不全に繋がる環境適応応答破綻の分子動態解析はされていない。実際に臨床においても急性拒絶の制御が部分的に奏功しているが、移植片の長期予後は必ずしも良好ではない。免疫特権部位への移植であるにも関わらず角膜移植の術後には角膜内皮細胞が持続的に減少する。これは、晩期臓器不全と称される適応破綻であり、本機構の解明並びに修復策は全く手づかずにあった。液性因子を介した細胞競合、細胞同調による移植片の環境適応破綻など最新の概念を駆使しての移植床微小環境の科学的解析が不可欠であった。我々は、角膜移植患者、培養ヒト角膜内皮細胞注入再生医療の対象患者 100 人近くの移植床の SASP 関連分子などのプロファイル、細胞相転移 (CST: cell state transition) に係る可溶性 miRNA・細胞外小胞体微粒子 (Exosome など) プロファイルの多様性と動的脆弱性を示すデータを得ていた。長期予後規定因子として、ドナー組織とレシピエント側の局所微小環境の特性の双方の関与を想定した。

細胞競合・細胞同調は細胞集団が持つ基本的な振る舞いであり、多細胞組織の構築と維持に必須のファクターである。細胞同調においてもがん原性炎症による細胞非自律的ながん進展の機構さらに、そのがん原性炎症を担う炎症性サイトカイン産生が SASP (細胞老化に伴って起こる分泌蛋白質の高発現現象) であることが明らかになっていた。我々は角膜移植においてドナー細胞と宿主細胞の間で液性因子を介した細胞同調・細胞競合が生じていることを示唆する所見として、角膜内皮移植 (DMEK) において、ドナー角膜の角膜内皮細胞の形態変化と減少が生じること、その現象は中央部に比して周辺部 (宿主角膜とドナー角膜の接合部) で著明なことを確認していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、角膜移植をモデルとして、移植治療の長期予後改善をめざして Graft の適応応答破綻機構を解明することである。

3. 研究の方法

水疱性角膜症患者から収集した前房水を用いて研究を実施した。前房水は角膜内皮の代謝・栄養を担っており、まさに角膜内皮組織微少環境である。角膜移植の主要な対象疾患である水疱性角膜症の病因にはフックス角膜内皮ジストロフィ、落屑症候群、レーザー虹彩切開術や白内障手術の術後、外傷など多様であり、分子病態は多様であると想定した。前房水中の細胞老化関連サイトカインについて、MCP-1, Eotaxin, IL-8, TNF- α , IL-12, IFN- γ などの SASP

因子を含む 27 種のサイトカインについて BioPlex システムを用いて検定した。SASP 因子を高発現する前房水中の可溶性 miRNA をマイクロアレイについて独立した 2 つの患者群を用いた網羅的に解析した。SASP 因子の発現を抑制する miRNA の機能について、培養ヒト角膜内皮細胞亜集団を用いて SASP 因子の発現に加えて、細胞表面マーカー、機能性蛋白発現、ミトコンドリア機能を検証し細胞の成熟分化・相転移を制御する miRNA を絞り込んだ。2020 年度には前房水における可溶性 miRNA 候補をリアルタイム PCR 法にて解析し、SASP を高発現している水疱性角膜症患者の前房水において対照(白内障患者の前房水)に比して有意に増加している細胞老化関連 miRNA を独立した 2 群で再現性のある結果をもとに絞り込んだ。

4 . 研究成果

角膜移植患者の前房水 200 検体の測定結果より、患者間で前房水中のサイトカインプロファイルが異なること、前房水中の特定のサイトカイン濃度が角膜移植の短～中期予後（移植後 3 ヶ月・6 ヶ月の角膜内皮細胞密度）と対応することが判明した。前房水中のサイトカインがドナー角膜内皮細胞に惹起する老化・細胞変性・形質転換が角膜移植の予後を左右している可能性を臨床検体と臨床情報で確認したことになる。

独立した 2 つの患者群を用いた解析で、SASP 因子の発現を抑制する miRNA のプロファイルを同定した。培養ヒト角膜内皮細胞を用いた検討では、相転移細胞が産生する SASP 因子は、成熟分化細胞のそれよりも高く、SASP 因子発現を抑制する前房水 miRNA が水疱性角膜症の病態指標になる可能性が判明した。16 例の水疱性角膜症患者の前房水の miRNA プロファイルを 100 種の miRNA について多成分解析したところ 86.3%と有意の乖離を示す 2 群の存在が判明した。このことは、miRNA が前房水のサイトカインプロファイルの偏奇に関与する可能性を示唆するものである。

前房水中の環境因子が細胞分化同調破綻の担い手となりドナー角膜内皮細胞に惹起する老化・細胞変性・形質転換が角膜移植の予後を左右している可能性を臨床検体で確認した。SASP 関連サイトカイン発現を抑制する miRNA の機能について、培養ヒト角膜内皮細胞亜集団を用いて SASP 関連サイトカイン発現に加えて、細胞表面マーカー、機能性蛋白発現、ミトコンドリア機能を検証し細胞の成熟分化・相転移を制御する miRNA を絞り込んだ。角膜移植患者の検体の解析と培養ヒト角膜内皮細胞亜集団を用いた検証により角膜内皮機能不全の分子病態メカニズムを明らかにしつつある。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 UENO MORIO, TODA MUNETOYO, NUMA KOHSAKU, TANAKA HIROSHI, IMAI KOJIRO, BUSH JOHN, TERAMUKAI SATOSHI, OKUMURA NAOKI, KOIZUMI NORIKO, YAMAMOTO AKIHISA, TANAKA MOTOMU, SOTOZONO CHIE, HAMURO JUNJI, KINOSHITA SHIGERU	4. 巻 237
2. 論文標題 Superiority of Mature Differentiated Cultured Human Corneal Endothelial Cell Injection Therapy for Corneal Endothelial Failure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 267 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajo.2021.11.012	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 SHIGERU KINOSHITA, MORIO UENO, JUNJI HAMURO
2. 発表標題 'Seeds and Soil Theory' for Corneal Endothelial Cell Survival
3. 学会等名 ARVO 2021 Annual Meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野盛夫
2. 発表標題 老化研究から切り拓く新展開 角膜内皮機能不全の病態解明
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022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
研究 分 担 者	外園 千恵 (Chie Sotozono) (30216585)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関