

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592054

研究課題名(和文) 複合型粘膜上皮移植と免疫系制御による眼表面再生医療への展開

研究課題名(英文) The Development of the regenerated mucosal epithelial transplantation for immunomodulation and ocular surface reconstruction.

研究代表者

稲富 勉 (INATOMI TSUTOMU)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：00305583

研究成果の概要(和文)：我々は、角膜上皮幹細胞や口腔粘膜上皮などの粘膜上皮幹細胞を培養・分化させ、眼表面に移植する再生医療の開発に成功した。培養粘膜上皮では基底細胞にP75が発現した非角化重層扁平上皮組織が再構築される。しかし眼組織特有のPAX6遺伝子は誘導されない。細胞ケラチン構成の解析では、皮膚型のK1,K10の発現は誘導されない。またK4、K3、K13の発現が認められるが、角膜特異的とされるK12の発現は認めず、完全な角膜上皮への分化誘導はおこらない。血管新生、リンパ管新生は移植後早期に誘導される。In vivo confocal microscopyでは高密度の基底細胞構造を含む重層化構築が観察できる。また抗VEGF抗体の点眼により血管新生が有意に抑制され表現系を制御することができた。

研究成果の概要(英文)：We have successfully generated cultivated corneal epithelial sheet and oral mucosal epithelial sheet which are applicable for ocular surface reconstruction. These epithelial sheets expressed p75 in the basal region suggesting the high potential for cell proliferation. Ectopically survived oral mucosal epithelium on the cornea expressed neither PAX6 gene nor K1 and K10. However, these cells expressed K4, K3 and K13, but not K12. The phenotype of surviving transplanted oral mucosal epithelium on the cornea was the same as *in vivo* oral mucosal epithelium, suggesting that cultivated oral mucosal epithelium does not transdifferentiate into corneal epithelium. Peripheral neovascularization and lymphanogenesis were induced in early post-operative phase. *In vivo* confocal microscopic analysis revealed well-organized stratified epithelium containing the proper cell density of basal cells and flattened apical cells. Anti-VEGF treatment could inhibit the progression of vessels and control the phenotype of surviving epithelial cells on the ocular surface.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：再生医療、角膜上皮、口腔粘膜上皮、血管新生、眼表面再建

1. 研究開始当初の背景

眼表面は角膜と結膜から構成され、両者が涙液を介して眼球の最前線として視機能とバリアー機能を担っている。角膜は他の組織には類を見ない高度の透明性を維持することにより光を透過し、視機能の一端を担っているが、失明原因の一つである癬痕性角結膜上皮症では、角膜輪部に存在する角膜上皮幹細胞が病的炎症により疲弊し、角膜上皮の供給が滞り、さらに眼表面が癬痕化に至ることで透明性を失い、重度の視力障害に陥る。眼表面再建術を用いた治療法の基本的なコンセプトは①疲弊した角膜上皮もしくはそれを代償する粘膜上皮幹細胞移植による眼表面上皮組織の再構築と安定化、②角膜による光学的な視覚機能の回復、③炎症コントロールによる生着上皮の長期維持、眼表面の癬痕化および原疾患の再燃の抑制である。これらの観点から我々は羊膜基質上に上皮幹細胞を培養・分化させ、上皮シートとして移植する再生医療の開発に成功してきた。多くの難治性疾患に福音をもたらしているものの、さらに発展させ治療予後を向上させるには、感染や乾燥により強い耐性をもった粘膜再建が重要と考えている。そのために、我々は①眼表面上皮以外の複数の粘膜上皮の特性を生かした複合的な眼表面組織構築を再生し、非特異的な粘膜防御機能を強化すること、②眼表面に分布するマクロファージのレドックス環境を制御することでの免疫反応の抑制効果、③移植後の血管・リンパ管新生を制御する3点に注目し、新しい発想での集学的な治療方法の開発と展開に期待を寄せている。

角膜上皮は高度に分化した組織であり、in

vitro での組織培養は非常に困難であったが、我々は世界に先駆けて羊膜基質を応用して角膜上皮を組織培養することに成功した。さらにこの培養角膜上皮シートを用いた移植法を確立し、その臨床成績を眼科再生医療の先端知見として国内外に発信してきた。また、正常な眼表面組織を両眼性に消失した患者においては培養に必要な自己角膜上皮細胞を採取することが不能であるため、自家組織移植として口腔粘膜上皮に着目し、臨床応用可能な自家培養口腔粘膜上皮移植術として2002年より臨床応用を行ってきた。この眼表面組織に依存しない新しい自家移植法は治療予後を著しく改善した。我々は、さらなる臨床応用や治療成績の向上を図るため、異所性に生着した再生上皮の細胞動態に関しての解析をおこなっている。現在までの研究において得た知見として、眼表面に異所性に生着した口腔粘膜上皮はオリジナルと異なる角膜上皮に類似した組織構築を再生するが、ケラチン発現パターンでは口腔粘膜上皮の特性を維持し、血管新生作用においても角膜の無血管組織とは異なる反応が認められている。光学的機能の回復には二期的な角膜移植を追加することで良好な臨床成績が得られているが、その理由として我々は本術式により角膜輪部に新たな自家口腔粘膜上皮幹細胞群が分布し、上皮供給とアロ抗原に対する組織バリアーが相乗的に機能的している可能性を推測している。また角膜実質上では血管新生が抑制されることにより透明性が維持されているが、角膜特異的な表面の再構築と安定化が可能となっている。

さらなる治療適応の拡大と難治性疾患の克服には次世代の再生医療の発展が不可欠で

ある。我々の注目する次世代の眼表面再生医療の開発課題は①涙液分泌機能のさらに低下している眼表面環境下での眼表面再生と再生上皮の生着維持、②粘膜上皮バリアー機能の物理的および免疫的強化、再生眼表面の炎症および血管・リンパ管新生の制御、④再生上皮の増殖能の長期的維持と幹細胞特性の消失抑制である。

2. 研究の目的

本研究では眼表面組織以外の粘膜上皮移植での眼表面再生の可能性を検討し、眼組織特異的遺伝子の誘導の可能性やムチン産生などによる眼表面保護効果が獲得しえないかを検討する。瘢痕性角結膜症の眼表面再建後の炎症反応と血管・リンパ管新生のコントロールの可能性を検討する。抗炎症効果がもたらされた時に移植後に分布する p63, p75 など角膜上皮もしくは口腔粘膜上皮の増殖能を反映する細胞マーカーの発現細胞の動態を検討する。

3. 研究の方法

(1) 粘膜上皮培養系の確立と細胞生物学的特性の解析

ヒト角膜上皮および口腔粘膜上皮から細胞成分を抽出し、MMCにより不活化した線維芽細胞をフィーダーとして培養を行う。羊膜上に培養し、コンフルエントになった時点で air-lifting により重層化を行う。免疫組織学的に PAX6 遺伝子発現およびケラチンタンパクのプロファイルについて検討する。増殖活性については P63 および P75 の発現について検討する。

(2) 眼表面上における他臓器粘膜上皮の細胞特性の検討

①眼表面上に生着した眼外細胞の生物学的特性について免疫組織学的に検討する。眼表

面での生着構造は *in vivo confocal scanning* を用いて観察し、基底細胞密度およびその形態を検討する。また神経再生についても角膜知覚と合わせて検討する。

②ケラチンプロファイルを検索し、また眼表面特異的分子である MUC16, MUC5AC の発現を検索する。

(3) 抗炎症作用の血管・リンパ管新生に与える影響の検討

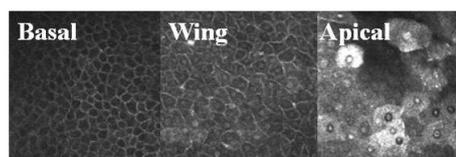
生着組織における血管新生状態を観察し、*avastin* 分子の制御を検討するため *in vitro* における角膜上皮および口腔粘膜上皮に対する *avastin* の細胞抑制作用を検討する。また移植後の眼表面に点眼を行い血管新生抑制効果について検討する。

4. 研究成果

角膜輪部から採取した幹細胞を含む上皮より羊膜上に培養した上皮シートには角膜上皮に特異的な K12, K3 の発現が誘導された。また基底細胞には増殖活性のマーカーである K15 の発現が観察された。約 5%の細胞にトリチウムサイミジンの取り込みが観察され、分化した上皮シートでは増殖活性が抑制されていることが確認できた。

また角膜上皮シートを移植した再建角膜上を *in vivo* 共焦点レーザー顕微鏡で観察すると非常に高密度の基底細胞構造を観察できさらに表層に向かって wing cell および apical cell の組織構築の再生が観察できた (図)。

しかし組織構築内には神経再生は観察されず、眼表面構造が neurotrophic な状態で再生されていることがわかる。原因としては
基質である羊膜が神経再生に対して物理的なバリアーとして

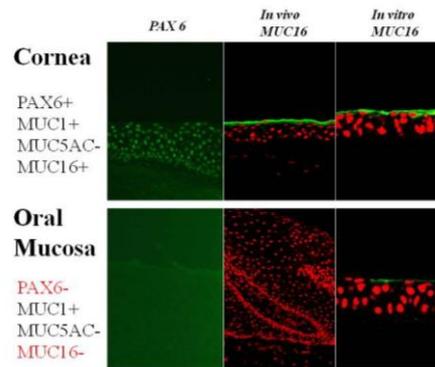


いる可能性が考えられた。

また口腔粘膜組織では角膜と異なり K12 の発現は見られない。また増殖活性の強い細胞として p75 陽性細胞がクリプト構造内に存在しており口腔粘膜上皮幹細胞として機能していることが推測された。培養上皮シートでは組織構築が 5 層程度と角膜に類似しているもののケラチン発現は in vivo 組織と同等であることが確認できた。また上皮シートの基底細胞には p75 陽性細胞が存在し、移植自体で幹細胞に近い細胞群を移植できていることが推測でき、長期的な上皮維持に非常に重要なことである。

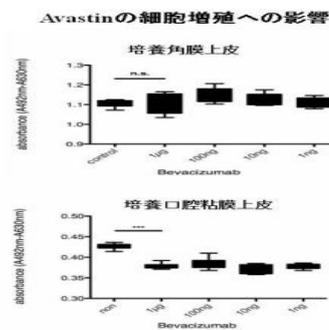
角膜上皮には眼組織特異的なホメオボックス遺伝子である PAX6 が発現しており、角膜上皮幹細胞より作成した上皮シートにも同様の遺伝子発現が維持されている。また分化マーカーである MUC16 や MUC1 の発現が重層化に対応して発現するが口腔粘膜上皮シートにはこれらの遺伝子の誘導は起こらない。また上皮シートを異所的である眼表面上に移植させても眼組織特異的な PAX6 遺伝子やムチン遺伝子は誘導されず、組織構造は比較的角膜に類似するものの細胞特性は大きく異なり、細胞の transformation は起こらないことが確認できた (図)。

また口腔粘膜上皮による眼表面再生の特徴として周辺部からの血管新生がある。本来角膜は無血管組織として維持されているがこの機構は口腔粘膜上皮には作用しない。通常移植後から血管新生が起こり、術後 6 か月程度まで血管伸展が観察される。新規にこの血管新生を制御する方法として抗 VEGF 抗体である Avastin を局所投与する方法を開発した。Avastin の角膜上皮および口腔粘膜上皮に対する増殖抑制効果は角膜上皮には作用しないものの、in vitro の培養口腔粘膜上皮には高濃度添加で抑制効果が認められた。(図)

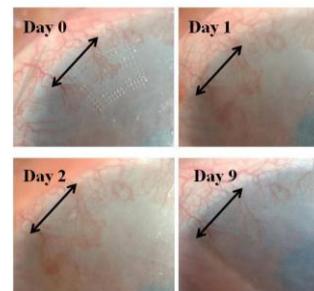


しかし in vivo の点眼実験では投与 2 日目より血管新生の抑制が観察され臨床応用の可能性が示唆された。

本研究をとおして、再生医療である培養粘膜上皮移植の上皮特性が解明され、また異所性



に生着した組織の分化誘導および血管新生を制御することでより眼表面に求められた



機能的な再生を可能とする基礎的な知見が得られ、今後の発展に寄与するものと期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Sotozono C, Ueta M, Koizumi N, Inatomi T, Shirakata Y, Ikezawa Z, Hashimoto K, Kinoshita

- S. Diagnosis and treatment of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis with ocular complications. *Ophthalmology*. 2009 Apr;116(4):685-90.
2. Yamasaki K, Kawasaki S, Young RD, Fukuoka H, Tanioka H, Nakatsukasa M, Quantock AJ, Kinoshita S. Genomic aberrations and cellular heterogeneity in SV40-immortalized human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:604-613.
3. Tanioka H, Yokoi N, Komuro A, Shimamoto T, Kawasaki S, Matsuda A, Kinoshita S. Investigation of the corneal filament in filamentary keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:3696-3702.
4. Miyana M, Sugita S, Shimizu N, Morio T, Miyata K, Maruyama K, Kinoshita S, Mochizuki M. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br J Ophthalmol*. 2010 Mar;94(3):336-40.
5. Nakao S, Maruyama K, Zandi S, Melhorn MI, Taher M, Noda K, Nusayr E, Doetschman T, Hafezi-Moghadam A. Lymphangiogenesis and angiogenesis: concurrence and/or dependence? Studies in inbred mouse strains. *FASEB J*. 2010 Feb;24(2):504-13.
6. Tanioka H, Kawasaki S, Sotozono C, Nakamura T, Inatomi T, Kinoshita S. The relationship between preoperative clinical scores and immunohistological evaluation of surgically resected tissues in chronic severe ocular surface diseases. *Jpn J Ophthalmol*. 2010;54:66-73.
7. Nakatsukasa M, Kawasaki S, Yamasaki K, Fukuoka H, Matsuda A, Tsujikawa M, Tanioka H, Nagata-Takaoka M, Hamuro J, Kinoshita S. Tumor-associated calcium signal transducer 2 is required for the proper subcellular localization of claudin 1 and 7: implications in the pathogenesis of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Am J Pathol*. 2010;177:1344-1355.
8. Matsuda A, Ebihara N, Yokoi N, Okayama Y, Watanabe Y, Kawasaki S, Tanioka H, Walls AF, Hamuro J, Kinoshita S, Murakami A. Basophils in the giant papillae of chronic allergic keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol*. 2010;94:513-518.
9. Kawasaki S, Yagi H, Yamasaki K, Matsuda A, Takeda K, Kinoshita S. A novel mutation of the TGFBI gene causing a lattice corneal dystrophy with deep stromal involvement. *Br J Ophthalmol*. 2010;95:150-151.
10. Fukuoka H, Kawasaki S, Yamasaki K, Matsuda A, Fukumoto A, Murakami A, Kinoshita S. Lattice corneal dystrophy type IV (p.Leu527Arg) is caused by a founder mutation of the TGFBI gene in a single Japanese ancestor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:4523-4530.
11. Ueta M, Sotozono C, Nakano M, Taniguchi T, Yagi T, Tokuda Y, Fuwa M, Inatomi T, Yokoi N, Tashiro K, Kinoshita S. : Association between prostaglandin E receptor 3 polymorphisms and Stevens-Johnson syndrome identified by means of a genome-wide association study. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(6):1218-25.
12. Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. : Prostaglandin E receptor 4 expression in human conjunctival epithelium and its downregulation in devastating ocular surface inflammatory disorders. *Arch Ophthalmol*. 2010;128(10):1369-71
13. Nakamura T, Sotozono C, Bentley AJ, Mano S, Inatomi T, Koizumi N, Fullwood NJ, Kinoshita S. : Long-Term Phenotypic Study after Allogeneic Cultivated Corneal Limbal Epithelial Transplantation for Severe Ocular Surface

Diseases. Ophthalmology.
2010 ;117(12):2247-2254.

14. Ang LP, Tanioka H, Kawasaki S, Ang LP, Yamasaki K, Do TP, Thein ZM, Koizumi N, Nakamura T, Yokoi N, Komuro A, Inatomi T, Nakatsukasa M, Kinoshita S. : Cultivated human conjunctival epithelial transplantation for total limbal stem cell deficiency. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010, 51(2):758-64.

15. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. Br J Ophthalmol. 2010 Nov 19. Epub

16. Sasaki M, Sotozono C, Chihara H, Ueta M, Inatomi T, Yokoi N, Shiota T, Kinoshita S. Characteristic appearance of early-stage Acanthamoeba keratitis.
〔学会発表〕(計 6 件)

1. T Inatomi : Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. 25th APAO Congress. , Beijing, China. 2010.9.19.

2. T Inatomi : Application of Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. 2nd Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting. , Kyoto, Japan. 2010.12.2.

3. T Inatomi : The proper Treatment of Acanthamoeba Keratitis in CL users. 2nd Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting. , Kyoto, Japan. 2010.12.2.

4. T Inatomi, H Adachi, K Mori, H Tanioka, O Hieda, S Kinoshita: Clinical Outcomes of Descemet-Stripping Automated Endothelial Keratoplasty for Bullous Keratopathy with Pre-Existing Glaucoma. World Corneal Congress VI, Boston, USA. 2010.4.7

5. T Inatomi, H Adachi, H Tanioka, O Hieda, S Kinoshita: Corneal Endothelial Cell Loss and Graft Thickness Following Descemet-Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. ARVO, Fort Lauderdale, USA. 2010.5.2

6. T Inatomi, T Nakamura, N Koizumi, C Sotozono, S Kinoshita: Ex vivo expansion of mucoasal epithelium for ocular surface diseases. World Ophthalmology Congress 2010, Berlin, Germany. 2010.6.10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲富 勉 (INATOMI TSUTOMU)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 00305583

(2) 研究分担者

川崎 諭 (KAWASAKI SATOSHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 60347458

丸山 和一 (MARUYAMA KAZUICHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 10433244