

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16908

研究課題名（和文）間葉系幹細胞局所投与による眼表面難治疾患制御法の開発

研究課題名（英文）Regulation of Ocular Surface Intractable Disease by Local Administration of Mesenchymal Stem Cells

研究代表者

稲垣 絵海（INAGAKI, Emi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任講師

研究者番号：40464903

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト脂肪由来間葉系幹細胞（以下、ADSC）は、免疫調節機能・抗炎症作用を有する。慢性移植片対宿主病（cGVHD）モデルを用い眼科領域におけるADSCの有効性・安全性評価について検討を実施した。マウスcGVHDモデルを作成し、ADSCの投与を施行した。移植後経時的に角膜上皮障害・角膜混濁スコアを定量し、ADSC移植群は陰性対照群と比して有意な上皮障害改善効果および角膜混濁抑制効果を認めた（ $p>0.05$ ）結論としてADSCの眼結膜下投与はcGVHDの眼表面障害に対して有効性を認め、体内動態・刺激性試験の結果からも、安全性が高く、新たな眼表面疾患への新規モダリティとして期待できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト脂肪由来間葉系幹細胞（以下、ADSC）は、免疫調節機能・抗炎症作用を有することから既存治療に抵抗性を示す免疫疾患等に対する新たなモダリティとして期待されている。本研究によって慢性移植片対宿主病（cGVHD）モデルを用い眼科領域におけるADSCの有効性・安全性評価について実証した。現在詳細なメカニズムの解析について実施をしているところである。失明に繋がるような眼表面難治疾患での適応さらには、他の難治眼炎症性疾患への適応拡大などが今後期待できる。また臨床応用をめざした体内動態試験および家兎を用いた安全性試験も実施し、トランスレーショナルリサーチとしての枠組みをめざしている。

研究成果の概要（英文）：Human adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) have immunomodulatory and anti-inflammatory functions. We evaluated the efficacy and safety of ADSCs in the ophthalmologic field using a chronic graft-versus-host disease (cGVHD) model. A mouse cGVHD model was created, and ADSCs were administered. The corneal surface and corneal opacity scores were quantified over time after transplantation, and the ADSC transplantation group showed significant improvement in epithelial damage and suppression of corneal opacity compared to the negative control group ($p>0.05$). In conclusion, subconjunctival administration of ADSC was found to be effective against ocular surface disorders of cGVHD, and the results of pharmacokinetic and irritation studies showed that ADSC is safe and can be expected as a new modality for new ocular surface diseases.

研究分野：眼科学

キーワード：眼表面難治疾患 慢性移植片対宿主病 間葉系幹細胞 細胞移植治療 安全性試験

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

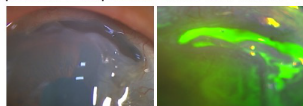
1. 研究開始当初の背景

角膜は眼の透明性に寄与する重要な組織であるが様々な難治疾患で著明な視力低下を来すことが問題になっている。本研究の標的とする疾患は特発性周辺部角膜潰瘍と慢性移植片対宿主病 (cGVHD) に伴う角膜潰瘍です。特発性周辺部角膜潰瘍は、角膜周辺部に生じる難治性潰瘍で、角膜の炎症と眼痛を引き起こす。この病態ではリンパ球、形質細胞、好中球などが潰瘍部や隣接する結膜で認められる。主な誘因は白内障手術、角膜移植術、化学外傷などであり、これらの手術によって放出された角膜組織の抗原に対する自己抗体が生じると考えられている。内科的治療では、ステロイド薬や免疫抑制薬の局所および全身投与による抗炎症療法が行われますが、治療抵抗性や合併症が起こることがあります。重症例では角膜穿孔が生じ、外科的治療として結膜切除、角膜剥離、表層角膜移植、輪部移植、角膜上皮形成術などが行われる。

cGVHD は涙腺、唾液腺、粘膜、関節などを標的とする全身性の自己免疫性疾患であり、眼症状も頻繁に見られます。眼症状としてはドライアイ、網膜出血、眼痛、灼熱感などがあり、重症例では非感染性の角膜潰瘍や穿孔が生じることもある。よってこれらの難治疾患に対する新しい治療法の開発が急務である。

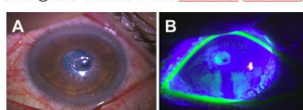
Background Urgent need to develop innovative therapies for refractory ocular surface diseases

Idiopathic Peripheral Corneal Ulcer



Autoantibodies against antigens against corneal tissue is produced, resulting in peripheral refractory ulcers that are often refractory to conservative treatment. In case of perforation, corneal surface transplantation and other. Requires hematological treatment and has a poor visual prognosis

Chronic graft-versus-host disease (cGVHD) corneal ulcer



cGVHD resembles autoimmune disease in lacrimal gland, etc. The disease presents with ocular symptoms in 60% of cases. Severe corneal epithelial damage, perforation in severe cases requiring medical observation and treatment

(Inagaki et al. Mol Vision 2011)

These noninfectious corneal ulcers related to immunologic mechanisms resemble autoimmune diseases and are resistant to treatment with existing therapies

2. 研究の目的

ヒト脂肪由来間葉系幹細胞(以下、ADSC)は、免疫調節機能・抗炎症作用を有することから既存治療に抵抗性を示す免疫疾患等に対する新たなモダリティとして期待されている。本再生医療では、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞を使用する。よって本研究は保存療法が無効な特発性周辺部角膜潰瘍の患者に対して、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞を結膜下に投与することで安全性と有効性を確認することを目的としている。

3. 研究の方法

マウス慢性 GVHD モデルは全骨髄細胞移植モデルを用いた。ドナーを B10. D2/nSnS1c マウス雄、レシピエントを BALB/cCrS1c 雌を標準の移植とした。ドナーマウスより脾臓を 2×10^6 cells、骨髄細胞を 1×10^6 cells 採取し、7 Gy の放射線照射をしたマウスに経静脈的に上記細胞移植を行いマウス慢性 GVHD モデルが作成された。マウス cGVHD モデルを作成し、ADSC を 2×10^5 個、結膜下に単回投与を施行した。ADSC 移植後 3 週間で角膜上皮障害・角膜混濁スコアを定量した

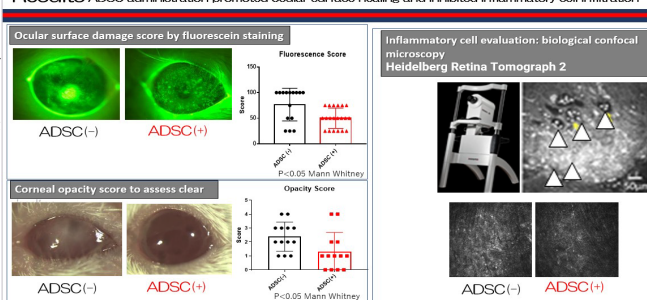
4. 研究成果

ADSC 移植後 3 週間で角膜上皮障害 (フルオレセインスコア) において、ADSC 移植群は陰性対照群と比して有意な上皮障害改善効果および角膜混濁抑制効果を認めた。(p<0.05)

眼結膜下投与後の体内分布評価試験
雄性 BALB/cCrS1c マウスを用いて、レンチウイルスベクターによりルシフェラーゼ遺伝子を導入したヒト脂肪由来

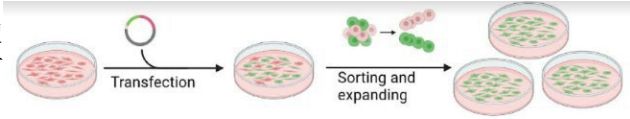
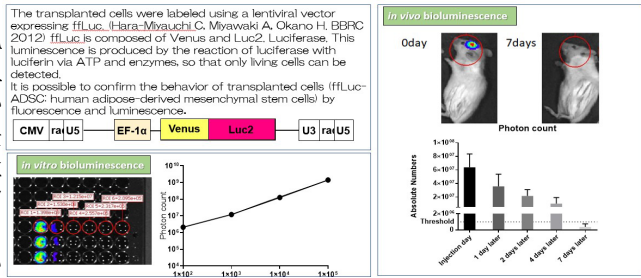
間葉系幹細胞 (以下、「ffLuc-ADSC」) を 2×10^5 cells/body の用量で単回結膜下投与し体内分布を評価した。ffLuc-ADSC の体内分布は、in vivo 発光イメージングによる発光シグナルの検出、及びヒト特異的 Alu 配列のリアルタイム PCR による試料中のヒト由来 DNA の検出により評価した。in vivo 発光イメージング法による評価は ffLuc-ADSC 投与後 1 時間、1 日、2 日、4 日、及び 7 日で行い (n = 5)、リアルタイム PCR 法による評価は ffLuc-ADSC 投与後 1 時間及び 7 日の眼球、眼球周辺組織、肺、肝臓及び脾臓を用いて行った (n = 3)。その結果、in vivo 発光イメージング法では、発光シグナルは投与後、眼球及びその周囲にて検出され、投与後 1 時間を最大値として経時的にシグナルが減弱していくことが明らかとなった。尚、発光シグナルは、in vitro での予備検討及び in vivo での眼球及びその周囲以外のシグ

Results ADSC administration promoted ocular surface healing and inhibited inflammatory cell infiltration

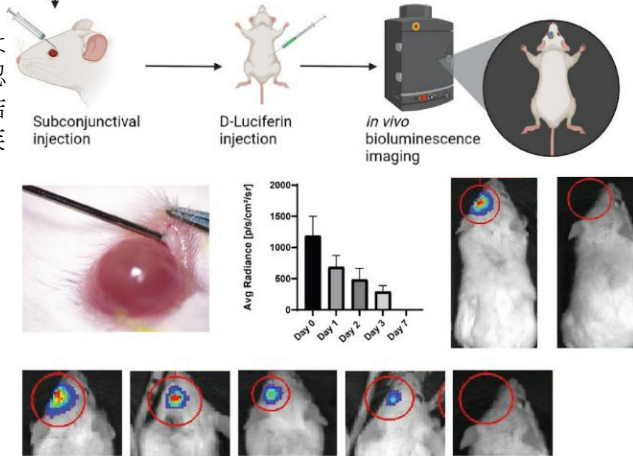


ナルより 1×10^6 Photon count を検出下限値として設定した。

リアルタイム PCR 法では、ヒト由来 DNA は投与後 1 時間に、眼球及び眼球周辺組織で検出されたが、投与後 7 日では、いずれの組織からも検出されなかった (表 3)。従って、本評価法では、ffLuc-ADSC は投与後、眼球、眼球組織に分布するが、7 日以内に消失することが明らかとなった。以上の結果から、本試験条件下において、マウスに単回結膜下投与されたヒト脂肪由来間葉系幹細胞は眼球及び眼球周辺組織に分布し、投与後 7 日までに消失することが示唆された。



以上の結果より ADSC の眼結膜下投与は cGVHD の眼表面障害に対して有効性を認め、体内動態および局所刺激性試験の結果からも、安全性が高く、新たな眼表面疾患への新規モダリティとして期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Rusch RM, Ogawa Y, Sato S, Morikawa S, Inagaki E, Shimizu E, Tsubota K, Shimmura S	4. 巻 22(9)
2. 論文標題 MSCs Become Collagen-Type I Producing Cells with Different Phenotype in Allogeneic and Syngeneic Bone Marrow Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22094895	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 -

1. 著者名 稲垣絵海・羽藤晋	4. 巻 Vol.75 No.11
2. 論文標題 周辺部角膜浸潤・潰瘍	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学書院 病診連携にもとづく疾患別眼科診療ガイド	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲垣絵海、Robert Rusch、野中秀紀、上野惟、玉井里枝、小川葉子、根岸一乃、榛村重人
2. 発表標題 脂肪由来間葉系幹細胞の眼局所投与による細胞移植療法の開発
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------