

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 6 年 6 月 2 0 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18168

研究課題名（和文）角膜疾患治療に用いる口腔粘膜上皮細胞シートの特性解析と品質評価への応用展開

研究課題名（英文）Characterization and Quality Evaluation of Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets for Corneal Disease Treatment

研究代表者

上野山 敦士（Uenoyama, Atsushi）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40804571

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）：本研究は角膜移植用の自家培養口腔粘膜上皮細胞シート作製にあたり、基材の硬さの細胞シートの移植予後への影響を変動発現遺伝子を検討して明らかにすることを目的とする。3種類の基材 UpCell（ヤング率 3 GPa）、Cell Campus（ヤング率 1.76 MPa）、Cellmatrix（ヤング率 5 kPa）上で COMECS を作製し、その発現遺伝子に対してバイオインフォマティクス解析を実施。UpCell と Cellmatrix 間の発現遺伝子の変動比と統計学的有意差は UpCell と Cell Campus のそれより小さかった。一方、UpCell からの回収作業で変動する遺伝子があることも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COMECS は、硬いプラスチック製 UpCell 上で作製されるが、移植床となる眼球は UpCell よりはるかに軟らかい。作製過程の COMECS の“品質/特性”は、移植後の環境変化に影響を受けることが予想される。本課題では足場材の硬さの違いが COMECS の品質/特性にどのような影響を与えるか遺伝子レベルで検討した。本研究の継続により、COMECS の品質管理と移植予後向上に役立つ基盤形成を行い、COMECS 治療の存在価値に貢献する。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to examine the effects of substrates stiffness when manufacturing autologous cultured oral mucosa epithelial cell sheet (COMECS) on corneal wound healing and prognosis after COMECS transplantation by studying differential gene expressions. COMECSs were manufactured on three different substrates such as a thermo-responsive tissue culture dish (UpCell), a type I collagen fibril membrane (Cell Campus), and type I collagen hydrogel (Cellmatrix), whose Young's modulus is 3 GPa, 1.76 MPa, and 5 kPa, respectively. Based on their microarray data, we performed bioinformatics analyses. The fold change ratios and the statistical differences of differential expressed genes (DEGs) between UpCell and Cellmatrix were not as large as those of UpCell and Cell Campus. Additionally, this study found that some DEGs were clearly present when COMECS was harvested from UpCell. Further analyses are required to assess how COMECSs affect wound healing of cornea when mfg different substrates.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医療 自家培養口腔粘膜上皮細胞シート 角膜移植 両側性角膜上皮幹細胞疲弊症 メカノバイオロジー バイオインフォマティクス 発現変動遺伝子 マイクロアレイ解析

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

【眼科疾患に対する口腔粘膜上皮細胞シート移植 (COMET) の特長と将来性】

自家口腔粘膜上皮細胞シート移植 (COMET) は (西田, 2004, NEJM)、患者自身細胞から構成されるため拒絶反応のリスクもないため、角膜上皮幹細胞疲弊症、Stevens-Johnson 症候群などで、視力が著しく低下した患者に対する新規治療法として期待され、現在、世界中の医療施設で実施されている。近年では食道癌切除術後の食道狭窄予防への適用や、外耳道閉鎖症にも適用されている。様々な組織で応用される細胞シートの中で、COMET が唯一、複数の科 (眼科/外科/耳鼻科) で利用されており、その汎用性に大きな特長がある。

COMET のもう一つの大きな特長は、両側性の疾患でも利用できることである。片側性疾患では健常側の正常角膜から組織採取できるので、自家角膜上皮細胞シート移植 (CLET) が作製可能だが、両側性では患者自身の角膜上皮幹細胞が存在する角膜輪部を失っているために CLET の選択肢はない (Figueiredo, 2021)。代替法として提案されているアイバンクから提供された他家角膜細胞による CLET では拒絶反応のリスクが生まれる。最近では、iPS 細胞から誘導された角膜細胞による CLET の報告があるが、まだクリアすべき課題が多い。よって、両側性眼疾患を持つ患者にとって COMET の存在意義は計り知れない。

また、2021 年 6 月には角膜上皮幹細胞疲弊症の治療を目的とし、我が国で自家培養口腔粘膜上皮「オキュラル」が製造販売承認された。同疾患に対する口腔粘膜上皮細胞を用いた再生医療等製品としては世界初で、日本で開発された技術を導入して実用化された国産品で、将来的な COMET の需要が高まり、利用価値が上がっていくことにつながる。

2. 研究の目的

培養口腔粘膜上皮細胞シートは、硬いプラスチック製温度応答性培養皿 (UpCell) で作製されるが、移植床となる眼球はプラスチック皿よりはるかに軟らかい。申請者の予備実験では、軟らかい基盤で培養した口腔粘膜上皮細胞からは、遺伝子レベルでは細胞分化マーカーの亢進や、タンパクレベルで VEGF の発現亢進などが明らかになり、COMET の移植予後に不利な状況が懸念され、培養口腔粘膜上皮細胞シートの“品質/特性”は、培養期間と移植後の劇的変化が予想される。そこで本課題の学術的問いは、①足場材の硬さの違いが口腔粘膜上皮細胞シートの品質/特性にどのような影響を及ぼすか？さらに②その特性を制御/操作することは可能か？とする。

本研究の目的は、角膜上皮細胞シートと比較しながら、足場の硬さが培養口腔粘膜上皮細胞シートに与える影響を、遺伝子発現と液性因子の面から解明することを目的とする。さらに、細胞シートの品質/特性の制御/操作条件は、様々な条件 (培地組成、時間、温度等) が考えられるが、今回は薬学的アプローチからそれに迫り、培養口腔粘膜上皮細胞シートの移植後発生する可能性のある血管侵入という有害事象を回避し、品質管理に役立つ基盤形成を行い、利用価値の一層の向上を目指す。

3. 研究の方法

本学医歯学総合病院のインフォームドコンセントを得た患者から採取した口腔粘膜から口腔粘膜上皮細胞を単離、無血清培地を用いて初代培養した。継代 2 代目の細胞を直径 35mm の I 型コラーゲンコートした温度応答性培養皿 (UpCell)、(ヤング率 3 GPa) に 2 枚、高強度 I 型コラーゲン線維膜 (Cell Campus)、(ヤング率 1.76 MPa)、I 型コラーゲングル (Cellmatrix)、(ヤング率 5 kPa) に口腔粘膜上皮細胞を播種した。細胞密度は 0.6-2.0/cm² とし、播種翌日に 70-80% コンフルエントとなり、48 時間後に 100% コンフルエントになるような密度とした。100% コンフルエントになったところで 10% 血清を添加し、さらに 48 時間培養して培養口腔粘膜上皮細胞シート (COMETS) を作製した。UpCell で作製した COMETS の 1 枚は剥離後、その他は直接細胞シートから mRNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。

培養角膜上皮細胞シートの作製は、市販の凍結角膜上皮細胞と専用培地を購入し、

COMECS と同様に作製し mRNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。サンプル数を増やすために 2 種類の凍結角膜上皮細胞を購入したものの、マイクロアレイ解析の結果から、同一のドナー由来の細胞であることが判明したので、本課題では COMECS のマイクロアレイ解析に留めることとし、培養角膜上皮細胞シートとの遺伝子発現レベル、パターンの比較は将来的な課題とした。

一方、お互いに 1000 倍以上硬さが異なる 3 種類の基盤で作製した COMECS でのマイクロアレイ解析による遺伝子発現レベルの比較検討を実験①とした。加えて、UpCell で作製した COMECS と、温度を低下させて UpCell から剥離して移植に用いる状態にした 2 種類の同一患者由来 COMECS に対しての比較検討を行い、これを実験②とした。また、サンプル数はトータルで 4 例実施したが、現段階で解析が終わっている 2 例の平均を結果として示した。

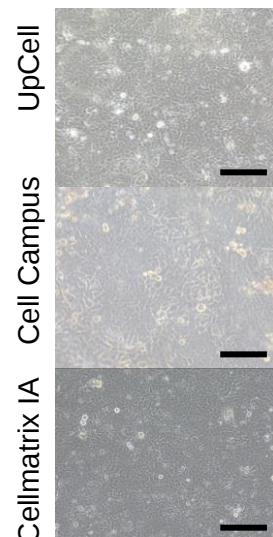
4. 研究成果

実験①：右図に RNA 抽出前の 3 種類の各基盤上で完成した COMECS の代表的な倒立顕微鏡像を示した。(スケール=500 μ m) 免疫染色像による特徴解析は未実施であるが、CellCampus に播種して作製した COMECS を構成する細胞の個々のサイズは他の 2 種の COMECS に比べ大きかった。マイクロアレイ解析結果を参考にして特徴的に変動した遺伝子が発現するタンパクに対する免疫染色を今後予定している。

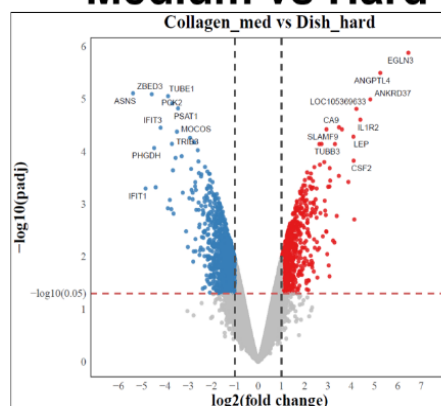
マイクロアレイ解析において全部で 2 万を超える遺伝子に対して、各遺伝子発現レベルの統計学的解析を行った。 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ の発現レベルを示した遺伝子に対して多変量解析を実施し、調整済み p 値が 0.05 未満の遺伝子を、統計学的に発現レベルが有意な遺伝子(DEGs)として、ボルケーノ図を作成し、UpCell VS Cell Campus, (Hard vs Medium) および、UpCell VS Cellmatrix, (Hard vs Soft)においての統計学的に発現レベルが有意な遺伝子(DEGs)の比較を行った。

UpCell (Hard) と比較して Cell Campus (Med) と Cellmatrix (Soft) の結果は異なるパターンを示し、Med の方がボルケーノ図の X 軸における広がりが大きかった。すなわち、変動比 (Fold Change Ratio) = 群間比が大きく、発現遺伝子のばらつきが大きかった。さらに、Y 軸においても広がり大きく、調整済み p 値が示す統計学的有意差を示す遺伝子が多いことを示した。このことは実際に有意差を示した遺伝子数を見ても明らかで、Cell Campus 上で培養した COMECS の DEGs のパターンは、UpCell と異なる傾向が強かったのに比べ、意外にも 100 万倍の硬さの違いのある Cellmatrix 上で作製した COMECS の DEGs は決して大きな差は存在せず、COMECS の移植に関して物理的環境の違いによる移植前後の COMECS の遺伝子変化は少ないことが示唆された。

この結果は、本研究当初の仮説とは異なる結果ではあったものの、そもそも UpCell (Hard)、Cell Campus

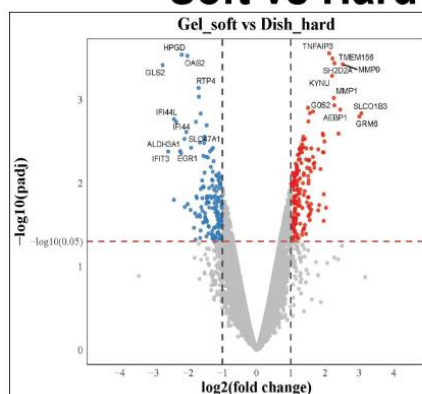


Medium vs Hard



Significantly
Up:630
Down:1096
Not:15788

Soft vs Hard



Significantly
Up:180
Down:163
Not:17316

(Med)、Cellmatrix (Soft) は、いずれも表面がタイプ I コラーゲンではあるものの、材質は、コラーゲン溶液のコーティング、線維性コラーゲン膜、ハイドロゲル、という 3 者 3 様の表面性状/表面構造を呈していることから、純粋にコラーゲン基盤としての硬さだけの比較に留まっていないという本実験系の欠点の結果に由来することが大いに考えられる。従って、PDMS 製樹脂を I 型コラーゲンコーティングした基盤を用いればヤング率だけの影響を検討することができ、コラーゲン濃度を変えたハイドロゲルを基盤にすることで、ヤング率の幅は小さくなるが創傷面の硬さによる口腔粘膜上皮細胞の遺伝子発現レベルの変化の解析が可能になる。しかしながら、現在の COMECS 移植用に用いられている培養器材が UpCell であることから、現実的に UpCell (Hard) を対照とする実験デザインが再生医療的には現実的であり、考慮する点であると申請者は考えている。

さらに、DEGs に対して GO エンリッチメント解析を実施したところ、UpCell VS Cell Campus, (Hard vs Medium) では上昇した GOterm として、O2 levels, cell adhesion, cell movement and organism development。下降した GOterm として、several types of RNA processing and metabolic process があげられた。また、UpCell VS Cellmatrix, (Hard vs Soft)では上昇した GOterm として、cell movement, cell adhesion, cell signaling and signal transduction。下降した GOterm として、defense response to virus and regulation of viral process があげられた。

次にマイクロアレイデータを用いてヒートマップを作成しクラスター解析を行った。この解析では N=2 の UpCell (Hard) に対して、Cell Campus (Med) と Cellmatrix (Soft) の基盤の両方で認めた COMECS の DEGs を明らかにした。その結果 Hard に対して Medium, Soft の基盤両方で認めた

DEGs は上昇が 84 個、下降が 85 個見つけることができた。しかし、クラスター図を見る限り、基盤の硬さよりも、2 例の個体差の違いの影響が強いことがわかった。このことから現在解析している 2 例を追加した COMECS 4 例を用いたマイクロアレイと GO エンリッチメント解析によって結論がどのように変わるか、解析結果が待たれる。

最終的には変動遺伝子発現パターンを解析して、COMECS 移植後の予後の向上に貢献できる所見を得られるようにしたい。

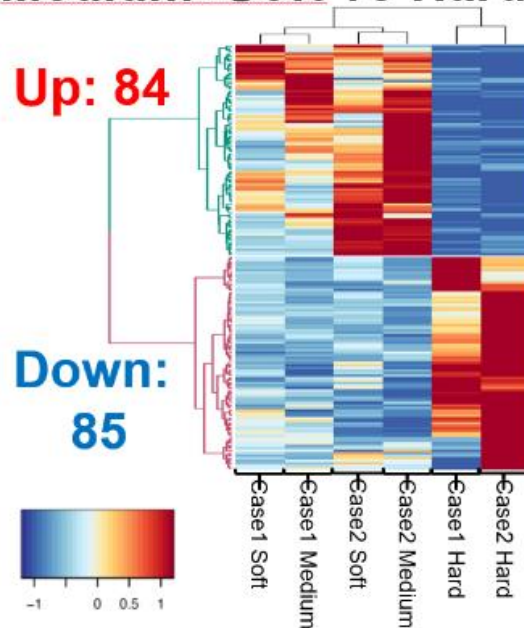
実験②：

作製した COMECS を、角膜移植用に UpCell (Hard) の温度を下降させることで UpCell 上から剥離する途中と、剥がし終えた肉眼的写真を示した。

単純に剥離操作を行っただけではあったが、剥離前後における変動遺伝子が 7 区無からず存在することが明らかとなった。また、Harvest 前 VS 後では上昇した GOterm として、cell

keratinocyte differentiation and lipid homeostasis。下降した GOterm として、cytoplasmic translation and peptide biosynthetic process があげられた。

Medium+Soft vs Hard



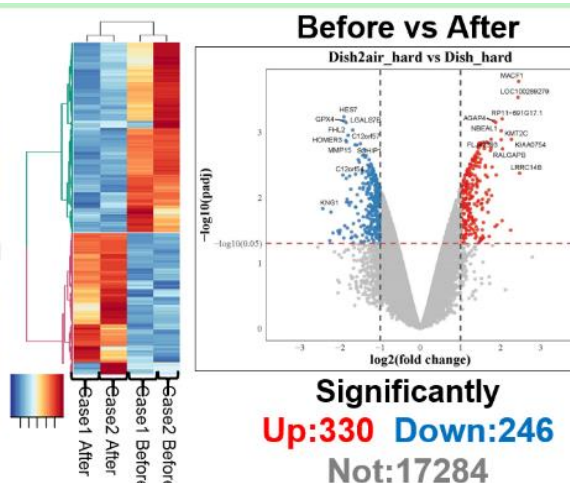
Harvesting COMECS



Half detached



Completely detached



5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 相澤有香， 凌 一葦， 高田 翔， Yortchan Witsanu, 田中凜太郎， 上野山敦士， 鈴木絢子， 奥田修二郎， 富原 圭， 泉 健次
2．発表標題 培養基盤の物性の違いによる培養口腔粘膜上皮細胞シートの遺伝子発現の比較解析
3．学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4．発表年 2024年

1．発表者名 Yuka Aizawa, Yiwei Ling, Sho Takada, Witsanu Yortchan, Rintaro Tanaka, Ayako Suzuki, Atsushi Uenoyama, Shujiro Okuda, Kei Tomihara, Kenji Izumi
2．発表標題 Comparative Analysis of Gene Expression in Cultured Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets (COMECS) Manufactured on Substrates with Different Physical Properties.
3．学会等名 International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment
4．発表年 2024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
---------	---------