

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791962

研究課題名(和文)生体共焦点顕微鏡を用いた角膜輪部の観察による角膜上皮幹細胞ニッチに関する研究

研究課題名(英文)Observation of limbal stem cell niche using in vivo confocal microscope

研究代表者

大家 義則(Oie, Yoshinori)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20599881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円、(間接経費) 510,000円

研究成果の概要(和文)：原田病と診断されている9例16眼を対象として、点眼麻酔ののち、生体共焦点顕微鏡をもちいて角膜輪部を観察し、pallisade of Vogt部における角膜輪部基底細胞の長径および面積を計測した。平均年齢は $51 \pm 12$ 歳、男性13眼、女性3眼であった。原田病における角膜輪部基底細胞の長径および面積はおのこの $16.1 \pm 1.1 \mu\text{m}$ および $135 \pm 15 \mu\text{m}^2$ であり、正常眼と比べて角膜輪部基底細胞が大きい傾向が認められた。原田病においては角膜輪部のメラノサイトが破壊され、それによって角膜上皮幹細胞ニッチが変化して、角膜輪部基底細胞が正常より大きくなっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Longest diameter and dimension of limbal basal cells were evaluated using in vivo confocal microscope (Heidelberg Retina Tomograph 2 Rostock Corneal Module) for patients with Harada disease. Sixteen eyes of nine patients were included. Average age was 51, 13 eyes with men, 3 eyes with women. Longest diameter and dimension of limbal basal cells in patients with Harada disease were  $16.1 \mu\text{m}$  and  $135 \mu\text{m}^2$ , respectively. It was suggested that limbal basal cells in Harada disease were larger than in normal eyes because of destruction of melanocyte in limbal niche.

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：眼発生・再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

角膜上皮は4~5層からなる厚さ50 $\mu$ mの非角化重層扁平上皮であり、角膜上皮の幹細胞は輪部といわれる、角膜と結膜の境界部の基底部に存在すると考えられている(Cotsarelis G et al. Cell 1989)。角膜上皮細胞は常に脱落し、turn over を繰り返しているが、輪部に存在する角膜上皮幹細胞が正常であれば、幹細胞から供給された角膜上皮細胞が角膜表面を覆い、角膜の恒常性は保たれる。また、角膜上皮細胞が何らかの原因で障害された場合も輪部の角膜上皮幹細胞がさかんに分裂して、上皮の損傷を修復する。

Stevens-Johnson 症候群やアルカリ腐蝕などによって輪部に存在する角膜上皮幹細胞が完全に消失すると、角膜上皮幹細胞疲弊症という状態となり、混濁を伴った結膜上皮が角膜上へ侵入し、角膜の透明性が失われる(Nishida K et al. Cornea 2003)。その結果、視力は手動弁や指数弁といった社会的には失明と考えられるようなものとなり、患者のQOLは著しく低下する。

これまで角膜上皮幹細胞疲弊症の治療法として、他家角膜を用いた輪部移植が行われてきたが、高率に発生する拒絶反応及び深刻なドナー不足という二つの大きな問題点があった。

近年、これらの問題を解決するために角膜上皮幹細胞疲弊症に対する培養角膜および口腔粘膜上皮細胞シートをもちいた角膜再生手術が報告され、その有効性及び安全性が確立しつつある(図1)<sup>1,2)</sup>(Pellegrini G et al. Lancet 1997, Nishida K et al. NEJM 2004, Nakamura T et al. Br J Ophthalmol 2004)。具体的には角膜輪部あるいは口腔粘膜上皮組織を採取し、そこから上皮幹細胞を単離する。これを羊膜などのキャリアーあるいは温度応答性培養皿上でフィーダー細胞と共培養することで、培養上皮細胞シートを作製する。培養上皮細胞シート作製の細胞源として口

腔粘膜上皮細胞を用いた場合には、完全に角膜上皮の幹細胞を消失してしまった両眼性の幹細胞疲弊症の患者にも適応できるようになった。これらの治療法により、これまで極めて長期予後が不良であった角膜上皮幹細胞疲弊症の治療成績が飛躍的に向上した。

さらに自己由来フィーダー細胞および医薬品を用いた培地成分による、より安全な培養ヒト口腔粘膜上皮細胞シート作製法の開発も行った(Oie Y et al. Br J Ophthalmol 2010)。

## 2. 研究の目的

幹細胞ニッチとは「幹細胞維持に必要な特異的微細環境」であり、その概念は1978年にSchofieldらによって初めて提唱された。幹細胞ニッチ内においては、幹細胞は未分化性を維持することが可能であるが、一度ニッチから離れると、幹細胞は分化に向かい未分化性は失われると考えられる。幹細胞ニッチの構成要素としては、液性因子、細胞外基質、細胞間接着分子などの因子複合的に作用することで、幹細胞の未分化性が維持されると考えられる。しかしながら、角膜上皮幹細胞の局在や性質は明らかにされているものの、角膜上皮幹細胞維持機構、すなわち「角膜上皮幹細胞ニッチ」の詳細は明らかではない。

現在までに角膜上皮幹細胞ニッチについて考えられている仮説としては、角膜上皮幹細胞とN-cadherinを介したメラノサイトとの接触(Hayashi R et al. Stem Cells)(図2)や血管の重要性などいくつかの報告がある。また今後の培養上皮細胞シートを用いた角膜上皮再生医療発展のために、角膜上皮幹細胞の幹細胞ニッチのより詳細な研究が極めて重要であると考えられる。

生体共焦点顕微鏡は前眼部の微細な構造を細胞レベルで、しかもin vivoで低侵襲に観察することができることから、in vivo biopsyとも呼ばれ注目されている(Chikama T Mol Vis 2008)。さらに、生体共焦点顕微鏡は角膜輪部に存在する角膜上皮幹細胞のin vivo観

察が可能であることが報告されており (Kobayashi A et al. Cornea 2005, Takahashi N Jpn J Ophthalmol 2009) (図3) 角膜上皮幹細胞ニッチの解明に極めて有用なツールであると考えられる。

そこで本研究においては、生体共焦点顕微鏡を用いて角膜輪部の角膜上皮幹細胞ニッチを直接観察することで角膜上皮幹細胞ニッチを解明することを目的とする。特に角膜上皮幹細胞の形態と色素細胞の数の変化に注目することで、それらの相関について検討を行う。

### 3. 研究の方法

原田病はメラノサイトに対する自己免疫疾患であり、原田病患者においては角膜輪部のメラノサイトが破壊されていることが考えられることから、それに伴って角膜上皮幹細胞ニッチが破壊されている可能性がある。

予備検討において、原田病に見られる杉浦徴候(輪部における色素の減少)に一致する、生体共焦点顕微鏡観察における角膜輪部における色素細胞の減少をきたす症例があることが分かっている(図4)。

初年度においては、この知見をさらに多数例において確認するため、慢性期原田病患者の角膜輪部を生体共焦点顕微鏡にて観察し、輪部における色素細胞の減少が角膜上皮幹細胞ニッチに与える影響について検討する。具体的には、色素細胞の減少と角膜輪部基底部の細胞の直径、面積、密度などの形態変化の相関についての検討をおこなう。色素細胞の減少が角膜輪部基底部の細胞の形態変化との関連が示唆されれば、色素細胞の角膜上皮幹細胞ニッチ維持への影響が示唆されるものと考えられる。研究協力者の林らはN-cadherinを介したメラノサイトと隣接する角膜上皮幹細胞の関係に注目しており(Hayashi R et al. Stem Cells 2007)、本研究においても色素細胞の変化と隣接した角膜上皮幹細胞の形態変化について注目しながら観

察を行う。

### 4. 研究成果

原田病と診断されている9例16眼を対象として、点眼麻酔ののち、生体共焦点顕微鏡(Heidelberg Retina Tomograph Rostock Corneal Module)をもちいて角膜輪部を観察し、pallisade of Vogt部における角膜輪部基底細胞の長径および面積を計測した。平均年齢は $51 \pm 12$ 歳、男性13眼、女性3眼であった。原田病における角膜輪部基底細胞の長径および面積はおおのこの $16.1 \pm 1.1 \mu\text{m}$ および $135 \pm 15 \mu\text{m}^2$ であった。正常の角膜輪部基底細胞の大きさはZheng Tらの報告においては40~59歳では $10.70 \mu\text{m}$ であり、Kobayashi Aらの報告においては $10.6 \mu\text{m}$ である。これら正常眼における報告と比べて、原田病患者においては角膜輪部基底細胞が大きい傾向が認められた。以上の結果より、原田病においては角膜輪部のメラノサイトが破壊され、それによって角膜上皮幹細胞ニッチが変化して、角膜輪部基底細胞が正常より大きくなっている可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 5件)

1. Oie Y, Kamei M, Matsumura N, Fujimoto H, Soma T, Koh S, Tsujikawa M, Maeda Nishida K. Rigid gas permeable contact lens-assisted cataract surgery in patients with severe keratoconus. J Cataract Refract Surg. 2014; 40: 345-8.
2. Oie Y, Nishida K. Regenerative medicine for the cornea. Biomed Res Int. 2013; 2013: 428247.
3. Oie Y, Nozaki T, Takayanagi H, Hara S, Hayashi R, Takeda S, Mori K, Moriya N, Soma T, Tsujikawa M, Saito K, Nishida K. Development of a cell sheet transportation technique for

regenerative medicine. Tissue Eng Part C Methods. 2014; 20: 373-82.

4. Koh S, Maeda N, Ikeda C, Takai Y, Fujimoto H, Oie Y, Soma T, Tsujikawa M, Nishida K. Effect of instillation of eyedrops for dry eye on optical quality. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013; 54: 4927-33.
5. 大家義則, ヒト臨床試験のための培養口腔粘膜上皮細胞シートの輸送技術開発. 再生医療. 2014; 13: 58-63

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 大家義則, 小林由紀, 本田愛, 藤本久貴, 中尾武史, 橋田徳康, 林竜平, 相馬剛至, 辻川元一, 西田幸二. タイ王国における培養口腔粘膜上皮細胞シートを用いた角膜上皮再生治療および遠隔診療の実施. 第 13 回再生医療学会総会. 2014 年 3 月 5 日. 京都府. 口演
2. Yoshinori Oie. Ocular surface reconstruction using oral mucosal epithelial cell sheet. Qatar-Japan Symposium on Tissue Regenerative therapy. 2014 年 1 月 27 日. Doha(カタール).
3. 大家義則, 小林由紀, 本田愛, 藤本久貴, 中尾武史, 橋田徳康, 林竜平, 相馬剛至, 辻川元一, 西田幸二. タイ王国での角膜上皮再生医療と遠隔診療の実施. 角膜カンファランス 2014. 2014 年 1 月 30 日. 沖縄. ポスター.
4. Yoshinori Oie, Satoru Andojo, Natsumi Konno, Hiroshi Takayanagi, Takayuki Nozaki, Shizu Takeda, Takeshi Soma, Motokazu Tsujikawa, Kohji Nishida. Development of tissue and cell sheet transportation technique for regenerative medicine. Air transport system of oral mucosal tissue and cell sheets for clinical trial. ARVO (the

association for research in vision and ophthalmology) annual meeting. 2013 年 5 月 5 日 ~ 9 日. Seattle (アメリカ合衆国). ポスター

5. Yoshinori Oie. Regenerative medicine for cornea. APAO2013. 2013 年 1 月 18 日. Hyderabad. (インド) 口演
6. Yoshinori Oie. Ocular surface reconstruction using human oral mucosal epithelial cell sheets. The 19<sup>th</sup> annual meeting of Kyoto Cornea Club 2013. 2013 年 11 月 30 日. 京都府 口演
7. Yoshinori Oie, Takeshi Soma, Ryuhei Hayashi, Motokazu Tsujikawa, Kohji Nishida. Termis-AP Meeting 2013. 2013 年 10 月 25 日. Wuzhen. (中国) 口演
8. 大家義則, 安堵城悟, 金野なつみ, 高柳泰, 野崎貴之, 武田志津, 林竜平, 相馬剛至, 辻川元一, 西田幸二. 臨床試験を目指した口腔粘膜組織および培養口腔粘膜上皮細胞シートの空輸技術開発 第 12 回再生医療学会総会. 2013 年 3 月 22 日. 神奈川県. 口演
9. 大家義則, 野崎貴之, 金野なつみ, 高柳泰, 原進, 武田志津, 林竜平, 相馬剛至, 辻川元一, 西田幸二. ヒト臨床試験のための培養口腔粘膜上皮細胞シートの輸送技術開発. 第 12 回日本再生医療学会総会. 2013 年 3 月 21 日. 神奈川県. YIA 受賞者講演.
10. 大家義則, 安堵城悟, 金野なつみ, 高柳泰, 野崎貴之, 武田志津, 林竜平, 相馬剛至, 辻川元一, 西田幸二. 臨床試験のための口腔粘膜組織および培養口腔粘膜上皮細胞シートの空輸技術開発. 第 117 回日本眼科学会. 2013 年 4 月 5 日. 東京都. ポスター.
11. 大家義則. 自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植の多施設共同臨床試験. 第 117

回日本眼科学会. 2013年4月6日. 東京都. モーニングセミナー.

12. Yoshinori Oie、Ryuhei Hayashi、Hiroshi Takayanagi、Susumu Hara、Takayuki Nozaki、Shizu Takeda、Takeshi Soma、Motokazu Tsujikawa、Kohji Nishida. Cell transport system for clinical trial using cultured human oral mucosal epithelial cell sheets. ISSCR annual meeting. 2012年6月15日. 神奈川県. ポスター.
13. 大家義則、林竜平、高柳泰、原進、野崎貴之、武田志津、相馬剛至、辻川元一、西田幸二. ヒト臨床試験のための培養口腔粘膜上皮細胞シートの輸送技術開発. 第11回日本再生医療学会総会. 2012年6月12日. 神奈川県. 一般口演.
14. 大家義則、林竜平、高柳泰、原進、野崎貴之、武田志津、相馬剛至、辻川元一、西田幸二. 培養口腔粘膜上皮細胞シートの輸送システム開発. 角膜カンファレンス2012. 2012年2月23日. 東京都. 一般.

〔図書〕(計 5件)

1. 大家義則. “角膜結膜癒痕の鑑別”. オキュラーサーフェス疾患. 医学書院. 2013, p. 98-108, (眼科臨床エキスパート).
2. 大家義則. 角膜上皮の再生医療. 眼科手術. 2013, 26, p. 553-558.
3. 大家義則. “培養上皮細胞シート移植”. 角膜・結膜・屈折矯正. 文光堂. 2013, p. 97-103, (眼手術学 4).
4. 大家義則、西田幸二. “角膜(総説)”. 上皮・感覚器. 朝倉書店. 2013, p. 26-31, (再生医療叢書 4).
5. 大家義則、西田幸二. “角膜(角膜上皮の再生)”. 上皮・感覚器. 朝倉書店. 2013, p. 39-44, (再生医療叢書 4).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大家 義則 (OIE YOSHINORI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 20599881

(2) 研究分担者

なし ( )

(3) 連携研究者

なし ( )