

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659757

研究課題名(和文) エピジェネティクス解析に基づいた自己結膜組織幹細胞移植の開発

研究課題名(英文) Autologous transplantation of conjunctival epithelial stem cells based on epigenetical control.

研究代表者

三村 達哉 (Mimura, Tatsuya)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：70463867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ドナーヒト眼球と白色家兎眼球の結膜上皮細胞よりスフェア法という方法により、組織幹細胞/前駆細胞を採取した。免疫染色ならびにRT-PCRにより、スフェアを形成する細胞は通常の細胞と比較してBrDUの取り込みが高く、神経未分化マーカーであるNestinが強く発現しており、またメチル化率が低かった。結膜上皮シートを、結膜と角膜上皮を除去した後に移植したところ、術後1か月の間、結膜炎は見られず、角膜は透明性を維持した。これらの結果により移植したシートが角膜上皮再生あるいは結膜上皮再生に利用可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed an adult precursor/stem cell isolation method (the sphere-forming assay) for conjunctival epithelial cells from donor eye and rabbit eye. We demonstrated conjunctival precursor/stem cells possessed the higher proliferative capacity as indicated by BrDU staining and the immature state as indicated by nestin staining compared with cultured differentiated epithelial cells. We cultured conjunctival precursor/stem cells on the amniotic membrane and demonstrated that cultured conjunctival epithelium formed three to four layers on amniotic membrane. After transplantation of reconstructed conjunctival sheet on the rabbit conjunctiva and cornea with corneal epithelial opacity, there was no inflammation in the conjunctiva and cornea maintained corneal clarity. These results suggest that transplantation of reconstructed conjunctival epithelial sheet using cultured precursor/stem cells is a possible treatment strategy for treating total limbal stem cell deficiency.

研究分野：医歯薬学

キーワード：結膜再生

1. 研究開始当初の背景

角膜上皮障害のある患者においては、その代替として自己培養結膜上皮を用いた移植を行っているが、移植後には細胞が徐々に疲弊するため、あらたな細胞を供給する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、結膜組織幹細胞とエピジェネティクス変化の関係に焦点を絞り、DNA、ヒストン、クロマチンのメチル化を起こした特定部位のメチレシオンを抑制することにより、質の良い組織幹細胞を採取し、結膜上皮再生あるいは角膜上皮の再生に利用することを目的としている。

3. 研究の方法

結膜組織幹細胞の採取ならびに幹細胞の遺伝子発現を調べる。また分化した細胞と幹細胞のメチル化の差を調べる。組織幹細胞を用いて、結膜上皮シートを作成する。再生した結膜上皮シートの動物眼への移植研究を行う。

4. 研究成果

ドナーヒト眼球ならびに白色家兎眼球より角膜上皮と結膜上皮を採取し、培養することにより培養細胞を保存凍結した。角膜上皮と結膜上皮ではムチンの産生など、その働きがことなるが、両者とも通常の上皮細胞用培養液で培養ならびに凍結が可能であることを証明した。更に組織幹細胞あるいは通常の培養細胞を用いて結膜上皮細胞を air lifting 法により羊膜上で培養し、重層化した細胞シートを作成した。この再生結膜上皮シートを、角膜上皮と結膜上皮を除去した白色家兎の眼表面に移植した。結膜上皮再生シートを広げて 10-0 ナイロン糸にて縫合し移植を行った。術後 1 か月の間、角膜は透明性を維持し、結膜にも炎症は見られなかった。これらの結果により移植した結膜細胞が移植後の細胞供給源となり、角膜細胞に依存しない、角膜上皮再生あるいは結膜上皮再生に利用可能であることが示唆された。

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 52 件)

1. Iida M, Mimura T, Goto M, Kamei Y, Kondo A, Saito Y, Okuma H, Matsubara M. Excision of congenital bilateral persistent pupillary membrane in a child with exotropia. *The Open Ophthalmology Journal*, 2015, 9, 38-40.
2. Noma H, Mimura T, Yasuda K, Shimura M. Role of soluble vascular endothelial growth factor receptor signaling and other factors or cytokines in central retinal vein occlusion with macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. in press
3. Noma H, Mimura T, Kuse M, Yasuda K,

Shimura M. Photopic negative response in branch retinal vein occlusion with macular edema. *Int Oph*, in press."

4. Miyama A, Mimura T, Noma H, Goto M, Kamei Y, Kondo A, Saito Y, Okuma H, Matsubara M. Specific IgG for cat allergens in patients with allergic conjunctivitis. *Int Oph*, in press.
5. Noma H, Mimura T, Yasuda K, Shimura M. Role of inflammation in diabetic macular edema. *Ophthalmologica* in press.
6. Mimura T, Yamagami S, Noma H, Kamei Y, Goto M, Kondo A, Matsubara M. Specific IgE for wheat in tear fluid of patients with allergic conjunctivitis. *Cutan Ocul Toxicol*. 2014;1-10, Posted online on 31 Mar 2014. [Epub ahead of print]
7. Mimura T, Yamagami S, Kamei Y, Goto M, Kondo A, Matsubara M. Measurement of Specific Tear IgE With ImmunoCAP Rapid. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* in press.
8. Yokosako K, Mimura T, Funatsu H, Noma H, Goto M, Kamei Y, Kondo A, Matsubara M. Glycolysis in patients with age-related macular degeneration. *Open Ophthalmol J*. 2014 Jul 23;8:39-47.
9. Takeda S, Mimura T, Matsubara M. Effect of treatment with dorzolamide/timolol combination on the visual field in glaucoma patient. *Clin Ophthalmol*. 2014 Aug 25;8:1579-90.
10. Takeda S, Mimura T, Matsubara M. Effect of 3 years of treatment with a dorzolamide/timolol (1%/0.5%) combination on intraocular pressure. *Clin Ophthalmol*. 2014 Sep 9;8:1773-82.
11. Noma H, Mimura T, Yasuda K, Shimura M. Role of soluble vascular endothelial growth factor receptors-1 and -2, their ligand, and other factors in branch retinal vein occlusion with macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Jun 3;55(6):3878-85.
12. Noma H, Mimura T, Shimada K. Role of inflammation in previously untreated macular edema with branch retinal vein occlusion. *BMC Ophthalmol*. 2014 May 18;14(1):67(p1-9).
13. Mimura T, Ichinose T, Yamagami S, Fujishima H, Kamei Y, Goto M, Takada S, Matsubara M. Airborne particulate matter (PM2.5) and the prevalence of allergic conjunctivitis in Japan. *Sci Total Environ*. 2014 May 3;487C:493-499
14. Mimura T, Yamagami S, Fujishima H, Noma H, Kamei Y, Goto M, Kondo A, Matsubara

- M. Sensitization to asian dust and allergic rhinoconjunctivitis. *Environ Res.* 2014 May 7;132C:220-225.
15. Mimura T, Noma H, Funatsu H, Kondo A, Matsubara M. Retinal neuroprotective effect of Sirtuins. *SM Ophthalmol* 2014;2(1):1-4.
  16. Noma H, Mimura T, Yasuda K, Shimura M. Vascular endothelial growth factor and its soluble receptors-1 and -2 in iris neovascularization and neovascular glaucoma. *Ophthalmologica.* 2014;232(2):102-9
  17. Noma H, Mimura T, Kuse M, Shimada K. Association of electroretinogram and morphological findings in central retinal vein occlusion with macular edema. *Clin Ophthalmol.* 2014 Jan 9;8:191-7.
  18. Mimura T, Noma H, Yamagami S. Conjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2014;24(2):140-1.
  19. Noma H, Mimura T, Masahara H, Shimada K. Pentraxin 3 and other inflammatory factors in central retinal vein occlusion and macular edema. *Retina.* 2014 Feb;34(2):352-9.
  20. Noma H, Mimura T, Tatsugawa M, Shimada K. Aqueous flare and inflammatory factors in macular edema with central retinal vein occlusion: a case series. *BMC Ophthalmol.* 2013 Dec 11;13:78(p1-6).
  21. Noma H, Mimura T. Aqueous soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in macular edema with branch retinal vein occlusion. *Curr Eye Res.* 2013 Dec;38(12):1288-90.
  22. Mimura T, Kaji Y, Noma H, Funatsu H, Okamoto S. The role of SIRT1 in ocular aging. *Exp Eye Res.* 2013 Jul 26;116C:17-26.
  23. Mimura T, Noma H, Funatsu H, Yamagami S. Next-generation sequencers: what can we learn? *J Bioanal Biomed* 2013;5(2):1-1.
  24. Mimura T, Yamagami S, Kamei Y, Goto M, Matsubara M. Specific IgE in tear fluid and features of allergic conjunctivitis. *Curr Eye Res.* 2013 Sep;38(9):917-25
  25. Noma H, Shimizu H, Mimura T. Unilateral macular edema with central retinal vein occlusion in systemic lupus erythematosus: a case report. *Clin Ophthalmol* 2013;7:865-867.
  26. Noma H, Shimada K, Mimura T. Influence of retinal ischemia on macular function after pars plana vitrectomy for macular edema with branch retinal vein occlusion. *Int Ophthalmol.* 2013 Dec;33(6):677-86.
  27. Noma H, Funatsu H, Shimada K, Mimura T. Influence of pars plana vitrectomy on macular sensitivity and morphology in patients with branch retinal vein occlusion and serous retinal detachment. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina.* 2013 Mar 1;44(2):160-7.
  28. Mimura T, Yamagami S, Kamei Y, Goto M, Matsubara M. Influence of axial length on conjunctivochalasis. *Cornea.* 2013 Aug;32(8):1126-30.
  29. Mimura T, Noma H, Funatsu H. Epigenetic regulation of retinal stem cells. *International Journal of Stem Cell Research and Transplantation (IJST)* 2013 Mar; 103:1-2
  30. Noma H, Mimura T, Shimada K. Changes of macular sensitivity and morphology after pars plana vitrectomy for macular edema with central retinal vein occlusion: a case series. *BMC Ophthalmol.* 2013 Feb 5;13(1):2(p1-7).
  31. Mimura T, Yamagami S, Amano S. Corneal Endothelial Regeneration and Tissue Engineering. *Prog Retin Eye Res.* 2013 Jul;35:1-17.
  32. Noma H, Shimada K, Mimura T. Visual function after pars plana vitrectomy in macular edema with branch retinal vein occlusion. *Int Ophthalmol.* 2013 Jun;33(3):227-36
  33. Noma H, Funatsu H, Mimura T. Changes of inflammatory factors after intravitreal triamcinolone acetate for macular edema with central retinal vein occlusion. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2013 Apr;29(3):363-5
  34. Noma H, Mimura T, Shimada K. Retinal function and morphology in central retinal vein occlusion with macular oedema. *Curr Eye Res.* 2013 Jan;38(1):143-9.
  35. Noma H, Mimura T, Eguchi S. Association of inflammatory factors with macular edema in branch retinal vein occlusion. *JAMA Ophthalmol.* 2013 Feb 1;131(2):160-5.
  36. Mimura T. Bilateral eyelid erythema associated with false eyelash glue. *Cutaneous and Ocular Toxicology* 2013 Mar;32(1):89-90
  37. Mimura T, Usui T, Yamagami S, Miyai T, Amano S. Relationship between total tear IgE and specific serum IgE in autumnal allergic conjunctivitis.

- Cornea. 2013 Jan;32(1):14-9
38. Mimura T, Noma H, Yamagami S. Visual Accommodation and Advances in Management of Presbyopia. Biol Syst 2012;2(1)107:1-2.
  39. Noma H, Shimada K, Mimura T. Foveal Sensitivity and Morphology in Major and Macular Branch Retinal Vein Occlusion. Open Ophthalmol J. 2012;6:104-9.
  40. Noma H, Mimura T. Macular sensitivity and morphology after intravitreal injection of triamcinolone acetonide for macular edema secondary to central retinal vein occlusion. Clin Ophthalmol. 2012;6:1901-6.
  41. Mimura T, Yamazaki K. Use of the femtosecond laser for cataract surgery with intraocular lens implantation. J Transplant Technol Res 2012;2(3)e116:1-2.
  42. Mimura T, Yokoo S, Yamagami S. Tissue engineering of corneal endothelium. J. Funct. Biomater. 2012, 3(4), 726-744
  43. Mimura T, Noma H, Funatsu H. Development of surgical treatment for vitreous disease. Surgical Science 2012 Nov;3(11):507-513
  44. Noma H, Funatsu H, Mimura T. Association of electroretinographic parameters and inflammatory factors in branch retinal vein occlusion with macular oedema. Br J Ophthalmol. 2012 Dec;96(12):1489-93.
  45. Noma H, Funatsu H, Mimura T, Shimada K. Comparison of the efficacy of intravitreal triamcinolone acetonide for cystoid macular edema with versus without serous retinal detachment in branch retinal vein occlusion: influence on macular sensitivity and morphology. BMC Ophthalmol. 2012 Aug 9;12(1):39(p1-10).
  46. Noma H, Funatsu H, Mimura T, Shimada K. Perifoveal Microcirculation in Macular Oedema with Retinal Vein Occlusion. Open Ophthalmol J. 2012;6:63-64.
  47. Noma H, Funatsu H, Mimura T, Shimada K. Macular sensitivity and morphology after intravitreal injection of triamcinolone acetonide for macular edema with branch retinal vein occlusion. Retina. 2012 Oct;32(9):1844-52.
  48. Noma H, Funatsu H, Mimura T. Pigment epithelium-derived factor is related to macular microcirculation in patients with macular edema and branch retinal vein occlusion. Int Ophthalmol.

2012 Oct;32(5):485-9.

49. Mimura T, Usui T, Yamagami S, Miyai T, Amano S. Relation between Total Tear IgE and Severity of Acute Seasonal Allergic Conjunctivitis. Curr Eye Res. 2012 Oct;37(10):864-70.
50. Noma H, Funatsu H, Mimura T, Shimada K. Functional-morphological changes after intravitreal injection of triamcinolone acetonide for macular edema with branch retinal vein occlusion. J Ocul Pharmacol Ther. 2012 Jun;28(3):231-6.
51. Mimura T, Nakashizuka T, Kami J, Kohmura M, Sato S, Dou K, Mori M. Bilateral choroidal detachment after cord blood stem cell transplantation in an adult patient with acute myeloid leukemia. Int Ophthalmol. 2012 Aug;32(4):379-81
52. Mimura T, Mori M, Obata H, Usui T, Yamagami S, Funatsu H, Noma H, Amano S. Conjunctivochalasis: associations with pinguecula in a hospital-based study. Acta Ophthalmol. 2012 Dec;90(8):773-782.

〔学会発表〕(計 41 件)

紙面の都合上、代表的なもののみ記載する。  
三村達哉 角膜内皮の老化と再生 第 80 回東京女子医大東医療センター講演会 東京 2013 年 10 月

三村達哉 ヒト角膜内皮細胞の全ゲノム解析による DNA メチル化プロファイル 第 1 回城北眼科フォーラム 東京 2014 年 5 月

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三村達哉 (Mimura Tatsuya)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70463867

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし