

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861448

研究課題名(和文) 培養口腔粘膜上皮細胞シート移植後の角膜移植施行における摘出角膜組織の解析

研究課題名(英文) Analysis on corneal tissue after autologous cultivated oral mucosal epithelial cell sheet transplantation

研究代表者

大家 義則(Oie, Yoshinori)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20599881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：培養口腔粘膜上皮細胞シート移植後に角膜移植を施行した4例の患者において、摘出角膜組織を対象として、培養移植後の角膜上皮や実質の組織について解析を行った。移植後1年以上経過しても基底部には幹細胞を含み、シート移植前の培養細胞の性質を維持していることが示唆された。また1例において、角膜上皮特異的ケラチン12が陽性であり、角膜上で周辺環境による影響を受けて角膜上皮化成長したと考えられた。3例においてはMUC16陽性であることから、角膜上皮様に変化していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Corneal epithelium and stroma was evaluated for 4 patients who underwent keratoplasty following cultivated oral mucosal epithelial cell sheet transplantation. Stem cells were maintained in the basal layer more than one year after transplantation. In one case, keratin 12 specific for corneal epithelium was positive. It was suggested that cultivated oral mucosal cells obtained corneal phenotype in consequence of surrounding environment. Also, MUC16 specific for ocular surface was positive in three cases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：眼発生・再生医学

1. 研究開始当初の背景

培養口腔粘膜上皮細胞シート移植は角膜上皮幹細胞疲弊症に対する新規治療法であり、良好な治療成績を収めていることから、従来の標準治療である角膜移植に代わる新規治療法として期待されている。(Nishida K et al. NEJM 2004, Nakamura T et al. Br J Ophthalmol 2004)具体的には患者自身の口腔粘膜上皮組織を採取し、培養上皮細胞シートを作製して患者の角膜に移植する。この治療法により、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。本治療法は厚生労働省の認める先進医療として承認されており、今後治験を通じて細胞シートを医療機器として薬事法の承認を得ることを目指している。また申請者は培養口腔粘膜上皮細胞シート等の再生医療製品の輸送技術開発を行い(Oie Y et al. Tissue Eng Part C Methods. 2014)、この輸送技術を用いて、多施設共同臨床研究を開始している。

現在までのところ移植した培養細胞の長期的な動態については不明な部分が多い。培養口腔粘膜上皮を用いた類似技術の角膜再生治療後の角膜移植症例の組織解析については、いくつかの既報により、培養口腔粘膜細胞の残存が示唆されている(Nakamura T et al. Ophthalmology 2007, Chen HC et al. Invest Ophthalmol Cis Sci 2009)。しかしながら、我々が行っている 3T3J2 細胞や温度応答性培養皿を用いた方法で作製した培養口腔粘膜上皮細胞シート移植後の患者角膜を詳細に解析した報告はない。

2. 研究の目的

現在行っている培養口腔粘膜上皮細胞シート移植の臨床プロトコールでは、角膜上皮幹細胞疲弊症患者に対して、まず培養上皮細胞シートを用いた眼表面再建を行い、術後 1 年経過後に角膜実質や角膜内皮に残存した混濁を認める症例においては角膜移植を追

加する予定としている。そこで本研究においては、培養上皮細胞シート移植後の角膜移植施行症例において摘出角膜組織を対象として、培養移植後の角膜上皮や実質の組織変化について詳細な検討を行う。

培養口腔粘膜上皮細胞シート移植後には著明な視力改善を得ることが出来る症例と視力改善の不十分な例があることが知られている。本研究においては培養口腔粘膜上皮細胞の移植後経過における幹細胞の残存、上皮細胞の phenotype、上皮細胞形態、角膜上への結膜上皮侵入、結膜や角膜実質内炎症などを明らかにする予定であり、これらの要素うちどれが培養上皮細胞シート移植後の上皮再建の程度や視力回復程度などの術後成績に深く関連しているかが証明されると期待される。

3. 研究の方法

培養口腔粘膜上皮細胞シート移植後の角膜移植症例において、摘出角膜に対して以下の項目を解析することで、上皮細胞や実質の動態について評価する。

1) 幹細胞機能

培養上皮細胞シート移植後に長期にわたって上皮細胞が維持されるためには、上皮細胞が常に脱落を続けながら turn over していることから、新たな上皮細胞を生み出し続ける幹細胞の維持が極めて重要であると考えられる。そこで摘出した角膜組織上に幹細胞が残存しているかどうかを調べるために、免疫染色によって幹細胞マーカーである p63 の発現について解析を行う。

2) 上皮細胞の phenotype

角膜上皮は K3 や K12 を発現するのに対して、結膜上皮は K4、K13、MUC5AC を発現していることが知られており、これらマーカーの発現について免疫染色を行う。

3) 上皮細胞の形態

正常の角膜上皮は基底側から、基底細胞、翼細胞、表層細胞と異なる形態を持つ細胞が存在する。基底細胞は小型でN/C比の高い未分化な細胞であり、表層細胞は大型で扁平な形態である。そこで摘出角膜組織をHE染色および電子顕微鏡(SEMやTEM)で細胞形態(大きさ、N/C比、細胞内器官)を解析する。

4)バリア機能

角膜上皮の重要な機能としてバリア機能が挙げられる。角膜上のバリア機能マーカーとして眼表面特異的ムチンであるMUC16やタイトジャンクション関連タンパクであるZO-1の発現について免疫染色で解析を行う。

4. 研究成果

培養口腔粘膜上皮細胞シート移植後の4例の患者において全層もしくは表層角膜移植を施行し、摘出角膜組織を対象として、培養移植後の角膜上皮や実質の組織変化について、HE染色及び免疫染色に加えて電子顕微鏡(TEM)で検討を行った。

HE染色ではいずれの症例においても上皮層は重層化しており、基底部には小型の細胞を認めた。重層度合いにはばらつきがあり、3例において2層~4層程度であったが、1例においては10層以上の重層化が見られており、口腔粘膜組織に類似していた。細胞形態は基底細胞が表層細胞よりも小さく、傾向を認めた。

免疫染色では、4例全例においてp63, K3/76, K4, K13陽性細胞を認めた。さらにMUC16が3例で、ZO-1, K12が1例で陽性であった。K15, p75は全例でも陰性であった。

電子顕微鏡を用いた評価では上皮細胞は正常の携帯をしており、lamina densaやlamina lucidaが確認された。タイトジャンクションやアドヘランスジャンクション、デスモソームも確認された。

これらの結果から、培養口腔粘膜上皮細胞は角膜上に移植後も基底部にはp63陽性の幹細胞を含み、K3/76およびK4, K13陽性であるこ

とから、培養口腔粘膜上皮細胞は眼表面に移植されて1年以上経過しても、シート移植前のphenotypeを維持していることが示唆された。また1例において、角膜上皮特異的ケラチンであるK12が陽性であり、角膜上で角膜上皮化成したと考えられた。3例においてはMUC16陽性であることから、角膜上皮様に変化していることが確認された。

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)

1. Oie Y, Nishida K. Triple procedure: cataract extraction, intraocular lens implantation, and corneal graft. *Curr Opin Ophthalmol*. 2017; 28: 63-66.
2. Oie Y, Watanabe S, Nishida K. Evaluation of visual quality in patients with Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Cornea* 2016; 35: S55-58.
3. Oya F, Soma T, Oie Y, Nakao T, Koh S, Tsujikawa M, Maeda N, Nishida K. Outcomes of photorefractive keratectomy instead of phototherapeutic keratectomy for patients with granular corneal dystrophy type 2. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2016; 254: 1999-2004.
4. Koh S, Ikeda C, Fujimoto H, Oie Y, Soma T, Maeda N, Nishida K. Regional differences in tear film stability and meibomian gland in patients with aqueous-deficient dry eye. *Eye Contact Lens*. 2016; 42: 250-5.
5. Watanabe S, Oie Y, Fujimoto H, Soma T, Koh S, Tsujikawa M, Maeda N, Nishida K. Relationship between corneal guttae and quality of vision in patients with mild Fuchs' endothelial corneal dystrophy.

- Ophthalmology 2015; 122: 2103-9.
6. Duncan TJ, Baba K, Oie Y, Nishida K. A novel method using quantum dots for testing the barrier function of cultured epithelial cell sheets. Invest Ophthalmol Vis Sci 2015; 56: 2215-23.
 7. Oie Y, Nishida K. Translational research on ocular surface reconstruction using oral mucosal epithelial cell sheets. Cornea. 2014;33(Suppl 11):S47-52
 8. Soma T, Hayashi R, Sugiyama H, Tsujikawa M, Kanayama S, Oie Y, Nishida K. Maintenance and distribution of epithelial stem/progenitor cells after corneal reconstruction using oral mucosal epithelial cell sheets. PLoS One. 2014 Oct 24;9(10):e110987. doi: 10.1371/journal.pone.0110987.
 9. Koh S, Ikeda C, Watanabe S, Oie Y, Soma T, Watanabe H, Maeda N, Nishida K. Effect of non-invasive tear stability assessment on tear meniscus height. Acta Ophthalmol. 2015; 93: r135-9.
 10. Koh S, Maeda N, Ikeda C, Asonuma S, Mitamura H, Oie Y, Soma T, Tsujikawa M, Kawasaki S, Nishida K. Ocular forward light scattering and corneal backward light scattering in patients with dry eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55(10):6601-6606
 11. Yoshihara M, Maeda N, Soma T, Fuchihata M, Hayashi A, Koh S, Oie Y, Nishida K. Corneal Topographic Analysis of Patients With Mooren Ulcer Using 3-Dimensional Anterior Segment Optical Coherence Tomography. Cornea. 2015; 34: 54-9
 12. Fujimoto H, Maeda N, Soma T, Oie Y, Koh S, Tsujikawa M, Nishida K. Quantitative regional differences in corneal endothelial abnormalities in the central and peripheral zones in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55(8):5090-5098
 13. Koh S, Maeda N, Ikeda C, Oie Y, Soma T, Tsujikawa M, Watanabe H, Nishida K. Effect of diquafosol ophthalmic solution on the optical quality of the eyes in patients with aqueous-deficient dry eye. Acta Ophthalmol. 2014; 92: e671-5.
 14. Oie Y, Kamei M, Matsumura N, Fujimoto H, Soma T, Koh S, Tsujikawa M, Maeda N, Nishida K. Rigid gas permeable contact lens-assisted cataract surgery in patients with severe keratoconus. J Cataract Refract Surg. 2014; 40: 345-8.
- 〔雑誌論文〕(計6件)
1. 大家義則 眼科と再生医療 先進医療 navigator 今日の再生医療 2017: 52-4.
 2. 大家義則 眼表面疾患の再生医療 臨床眼科 2017; 71: 182-6.
 3. 西田幸二、大家義則 角膜上皮幹細胞疲弊症に対する自己培養口腔粘膜上皮細胞シート移植法の多施設共同臨床試験 臨床評価刊行会 臨床評価 2015; 43(1):234-6.
 4. 大家義則、西田幸二 培養上皮細胞シートを用いた角膜上皮の再生医療 再生医療 2016; 15: 362-6.
 5. 大家義則 再生医療の進歩と臨床応用 10 . 角膜 Journal of clinical rehabilitation 別刷 2016; 25: 1088-91.

6. 大家義則 第 69 回日本臨床眼科学会講演集 眼科再生医療研究会 SIG 報告 臨床眼科 2016; 70: 980-982

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 大家義則 自家体性幹細胞を用いた角膜上皮の再生医療 普遍的な治療を目指して 角膜カンファランス 2017 2017 年 2 月 16 日 福岡県 シンポジウム 1 角膜移植フロンティアへの挑戦
2. 大家義則 フックス角膜内皮ジストロフィの重症度分類と診断基準 角膜カンファランス 2017 2017 年 2 月 16 日 福岡県 シンポジウム 2 角結膜疾患の診断基準を考える
3. 大家義則、Andrew Winegarner、相馬剛至、高静花、川崎諭、辻川元一、前田直之、西田幸二 両眼急性水腫による角膜穿孔に対して表層角膜移植を施行したペルーシド角膜変性の 1 例 角膜カンファランス 2017 2017 年 2 月 16 日 福岡県 口演
4. Yoshinori Oie, Eri Tachibana, Shinya Watanabe, Shizuka Koh, Takeshi Soma, Motokazu Tsujikawa, Satoshi Kawasaki, Naoyuki Maeda, Kohji Nishida Evaluation of pachymetry and epithelium map in patients with mild Fuchs endothelial corneal dystrophy using optical coherence tomography アジア角膜学会 2016 年 12 月 9 日 ソウル 口演
5. Yoshinori Oie Evaluation of corneal neovascularization using OCT angiography 京都コルネアクラブ シンポジウム 2016 年 11 月 26 日 京都府 口演
6. 大家義則、橘依里、渡辺真矢、高静花、相馬剛至、辻川元一、川崎諭、前田直之、西田幸二 軽症フックス角膜内皮ジストロフィにおける角膜上皮厚及び角膜厚の解析 第 70 回日本臨床眼科学会 2016 年 11 月 3 日 京都府 口演
7. 大家義則 培養口腔粘膜および角膜上皮細胞を用いた眼表面再建 第 70 回日本臨床眼科学会 インストラクションコース 再生医療ナナメヨミ 2016 2016 年 11 月 4 日 京都府 口演
8. Yoshinori Oie Ocular surface reconstruction using cultivated epithelial cell sheet -Dawning of a new era- ISER2016 シンポジウム 2016 年 9 月 28 日 東京 口演
9. Yoshinori Oie, Takeshi Soma, Hayato Mitamura, Hiroshi Takayanagi, Motokazu Tsujikawa, Satoshi Kawasaki, Naoyuki Maeda, Ayumi Shintani, Kohji Nishida Long term outcomes of ocular surface reconstruction with cultivated oral mucosal epithelial cell sheet transplantation compared to allogenic limbal transplantation. ARVO annual meeting 2016 2016 年 5 月 1 日 シアトル ポスター
10. 大家義則 角結膜疾患に対する再生医療 第 120 回日本眼科学会総会 日本眼科学会専門医制度第 63 回講習会プログラム 2017 年 4 月 9 日 宮城県 口演
11. 大家義則、西田幸二 角膜再生医療 体制幹細胞から多能性幹細胞へ 第 120 回日本眼科学会総会 シンポジウム次世代を担う新しい角膜治療 2016 年 4 月 7 日 宮城県 口演
12. Yoshinori Oie Regenerative medicine for cornea -Spread of advanced technology- APA02016 symposium New concept of corneal research for future therapeutic modalities 台湾 台北 2016 年 3 月 26 日 口演
13. 大家義則、西田幸二 培養上皮細胞シ-

- トを用いた角膜上皮の再生医療 普遍的医療を目指して 第 15 回日本再生医療学会総会 シンポジウム SY-14 神経・感覚器・上皮の再生医療 2016 年 3 月 18 日 大阪府 口演
14. 大家義則、相馬剛至、三田村勇人、高柳泰、辻川元一、川崎諭、前田直之、西田幸二 自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植および他家角膜輪部移植の長期治療成績の検討 第 15 回日本再生医療学会総会 2016 年 3 月 17 日 大阪府 口演
 15. Yoshinori Oie Drawing of a new era in regenerative medicine for the cornea. 角膜カンファランス 2016 Asia video symposium 2016 年 2 月 19 日 長野県 口演
 16. 大家義則、相馬剛至、高静花、川崎諭、辻川元一、前田直之、西田幸二 角膜上皮幹細胞疲弊症患者における OCT angiography による角膜新生血管の評価 角膜カンファランス 2016 2016 年 2 月 18 日 長野県 口演
 17. 大家義則 培養口腔粘膜上皮細胞シート移植による眼表面再建術のトランスレーショナルリサーチ 角膜カンファランス 2016 2016 年 2 月 18 日 長野県 口演 学術奨励賞記念講演
 18. 大家義則 角膜上皮再生医療 シンポジウム 7 角膜手術と先端医療～実現に向けて～ 第 39 回日本眼科手術学会学術総会 2016 年 1 月 31 日. 福岡県 口演
 19. 大家義則 培養口腔粘膜および角膜上皮細胞を用いた眼表面再建術 再生医療ナメヨミ 2015 第 69 回日本臨床眼科学会インストラクションコース 2015 年 10 月 22 日 愛知県 口演
 20. 大家義則、相馬剛至、三田村勇人、高柳泰、高静花、辻川元一、川崎諭、前田直

之、西田幸二 自家培養口腔粘膜上皮細胞シート移植と他家角膜輪部移植の長期成績の比較 第 69 回日本臨床眼科学会 2015 年 10 月 24 日 愛知県 口演

21. 大家義則. 治療用ソフトコンタクトレンズの付着菌についての検討. 第 58 回日本コンタクトレンズ学会総会 2015 年 7 月 11 日 大阪府 日本コンタクトレンズ学会学術奨励賞受賞講演
22. Yoshinori Oie. Regenerative medicine for the cornea -present and future. APAO2015 2015 年 4 月 2 日. 広州.中国 口演

〔図書〕(計 2 件)

1. 大家義則 角膜ジストロフィ 眼科グラフィック 2017; 6: 19-22.
2. 大家義則 眼類天疱瘡 一目でわかる眼疾患の見分け方 角結膜疾患、緑内障 メディカルレビュー 2016 100

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

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

(4) 研究協力者

高 静花 (KOH, Shizuka)

橋田 徳康 (HASHIDA, Noriyasu)