

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月16日現在

機関番号：32650

研究種目：基礎研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591951

研究課題名（和文） 培養口腔粘膜上皮シートと血管新生

研究課題名（英文） vascular invasion and cultivated oral mucosal epithelial sheets

研究代表者

佐竹 良之 (YOSHIYUKI SATAKE)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60385143

研究成果の概要（和文）：培養口腔粘膜上皮シート移植は瘢痕性角結膜上皮症に対する眼表面再建術のひとつで、両眼性の角膜輪部機能不全に対しても拒絶反応のない自己組織由来の培養上皮シート移植が可能であることから非常に臨床的有効性が高い外科的治療法である。培養口腔粘膜上皮シートには羊膜を基質としたものと基質をもたないものがある。臨床経過中に移植した培養上皮シート下に視力低下の原因となる血管新生を認めることがある。この臨床所見は、基質を有する培養口腔粘膜上皮シート移植後にその傾向が高いことから、基質（羊膜）の有無が発症機序に関与している可能性が考えられた。まず最初に培養口腔粘膜上皮シートでの血管新生促進・抑制因子の発現と基質の有無との関係を検討した。mRNA、蛋白レベル共に、血管新生促進・抑制因子発現と基質の有無との間に関連は認めなかった。次に、培養口腔粘膜上皮シート移植後の角膜移植時に摘出された角膜組織の病理組織学的検討を検討したが、症例ごとの眼表面の微小環境の影響が強く、基質の有無による影響を確認することは困難な状況であった。そこで、家兎口腔粘膜から作製した培養上皮シートを角膜輪部機能不全家兎モデルに移植し、基質の有無による影響を検討した。基質のない培養口腔粘膜上皮シートは角膜実質との接着が良好で平滑な眼表面が得られていたのに対し、基質がある培養口腔粘膜上皮シート移植眼では移植上皮シートと角膜実質との接着性が低く、上皮シート下への上皮細胞や周辺からの線維組織を伴う血管侵入が観察され、ヒトの臨床所見で認められた血管侵入が家兎モデルでも同様に観察された。以上のことから、移植した培養口腔粘膜上皮シートと角膜実質との接着性が、移植上皮シート下のスペースへの細胞浸潤、血管侵入を引き起こす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Transplantation of cultivated oral mucosal epithelial sheets is one of the surgical procedures to reconstruct ocular surface in patients with limbal stem cell deficiency. The major advantage of this treatment is the absence of the need for postoperative immunosuppressive therapy. There are two types of cultivated oral mucosal epithelial sheets with or without amniotic membrane as a substrate. Since vascular invasion underneath transplanted sheet, which might cause decreased visual acuities were common in cases of the transplantation of cultivated oral mucosal epithelium sheets with a substrate during postoperative courses, this finding was considered a possibility of the existence substrate is involved in the pathogenesis. First, I examined the relationship between the existence of substrate and the expression of angiogenic growth factors and angiogenesis inhibitors in cultivated oral mucosal epithelial sheets. There was no difference of the expression of these factors at both transcription and protein level. Next, the histopathological examination of corneal tissue harvested at the time of secondary keratoplasty following the transplantation of cultivated oral mucosal epithelial transplantation, and examined was performed. Each pathological finding had strong influence of microenvironment of ocular surface, and it was in the difficult situation to confirm the influence by the existence of a substrate. Therefore, we examined histopathologically the prognosis of cultivated epithelial sheets prepared from rabbit

oral mucosa by using the rabbit model of limbus stem cell dysfunction. Cultivated epithelial sheets without substrate obtained good adhesion to corneal stroma and smooth ocular surface. On the other hand, cultivated epithelial sheets with substrate had low adhesion and epithelial cell invasion and vascular invasion accompanied with fibrosis from the peripheral underneath transplanted epithelial sheets were observed. Similar findings of vascular invasion underneath transplanted oral mucosal epithelial sheets also obtained in rabbit model. These data suggests the adhesiveness with transplanted oral mucosal epithelial sheets and corneal stroma may cause the vascular invasion underneath transplanted sheets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,800,000	540,000	2,340,000
23年度	900,000	270,000	1,170,000
24年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：移植・再生医療、眼表面再建、血管新生

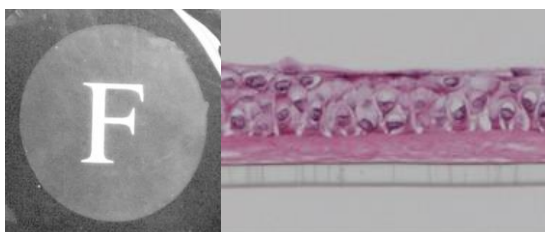
1. 研究開始当初の背景

瘢痕性角結膜上皮症は、眼類天疱瘡、Stevens-Johnson 症候群/中毒性表皮壊死症、角膜化学傷・熱傷などの眼表面での強い炎症により引き起こされる角膜輪部機能障害に伴う上皮障害、結膜の瘢痕、涙液分泌不全、眼瞼の異常をきたす疾患群である。このような病態に対する通常の角膜移植は予後不良であったことから以前は手術適応外であった。その後、角膜上皮幹細胞が輪部組織に存在することが判明し、輪部移植や羊膜移植などで眼表面再建が始まった。近年は、細胞工学の進歩により輪部組織や口腔粘膜上皮の基底細胞を *in vitro* で培養することで上皮シートの作製が可能となり、術直後からの眼表面の上皮化が得られる利点がある。培養上皮シート移植には、輪部基底細胞を用いた培養角膜上皮移植と、口腔粘膜の基底細胞を用いた培養口腔粘膜上皮移植とがある。培養角膜上皮移植を選択する場合、片眼性疾患の場合はもう一方の健康な眼から輪部組織を採取して培養角膜上皮シートを作製することは可能であるが、両眼性疾患の場合は、ドナー角膜の輪部組織を用いて培養角膜上皮シートを作製する必要がある。この場合、他家移植となることから術後の拒絶反応を抑制するために免疫抑制剤の局所・全身投与が不

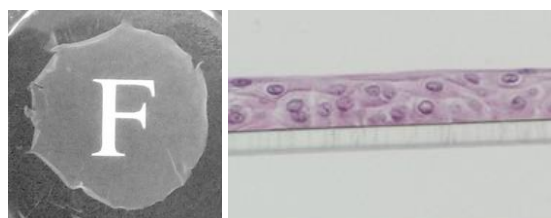
可欠である。この患者への負担を改良すべく発案されたのが培養口腔粘膜上皮シート移植である。患者自身の口腔粘膜より上皮シートを作製して自己移植することで、術後の免疫抑制剤は不要で、ステロイド薬の使用も最小限に制限でき、角膜表面だけでなく結膜表面の再建も行なえる利点がある。ただし、術後、安定した眼表面が得られた症例でも上皮シート下に血管侵入を認めることがあり、瞳孔縁まで進行して視力低下の原因になることもある。当施設では、培養口腔粘膜上皮シートを作製するにあたり、羊膜を基質として用いて培養シートを作製する場合とフィブリンコート・ウェルで基質をもたない培養上皮シートを作製し臨床応用している。基質の有無で比較した場合、明らかに基質のない培養口腔粘膜上皮シートでの血管侵入が少ない傾向が認められる。これまで血管侵入を検討した報告では、正常角膜、羊膜を基質とした培養角膜上皮シートと培養口腔粘膜上皮シートにおける血管新生の促進・抑制因子の発現様式は検討されているが、基質の有無による血管新生の検討は全くされていない。

図1 培養口腔粘膜上皮シート

・基質(羊膜)あり



・基質なし



2. 研究の目的

基質(羊膜)の有無による培養口腔粘膜上皮シートにおける血管新生促進・抑制因子の発現様式の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 培養口腔粘膜上皮シートの作製

口腔粘膜上皮基底細胞を羊膜上もしくはファイブリンコート・ウェル上で培養し、基質(羊膜)を有する培養上皮シートと基質をもたない培養上皮シートを作製する。

(2) 培養口腔粘膜上皮シート移植

培養口腔粘膜上皮シートを用いた眼表面再建が必要な患者に対して、インフォームド・コンセント取得など当該施設倫理委員会に提出した実施計画書に基づき移植を実施する。移植後は専門外来(角膜再生外来)で定期的に経過観察を行ない、眼表面の状態、血管侵入の程度など *in vivo* での臨床データ収集を行う。

(3) 検体の収集

口腔粘膜組織(口腔粘膜採取時)、手術に使用しなかった培養口腔粘膜上皮シート(基質を有する上皮シート、基質をもたない上皮シート)、二期的角膜移植時もしくは再手術時に移植した培養上皮シートを含んだ臨床検体を採取する。

(4) ヒト培養口腔粘膜上皮シート(基質あり・なし)での血管新生促進因子・抑制因子の発現様式を RT-PCR、免疫染色で確認する。血管新生促進因子 (VEGF, Flt-1, KDR, bFGF)、血管新生抑制因子 (TSP-1, PEDF, edostatin, angiostatin)

(5) 病理組織(上皮シート移植後の角膜移植時に得られた培養上皮を含んだ臨床検体)の病理組織学的に検討する。

(6) 角膜輪部機能不全家兎モデルを作成し、家兎口腔粘膜から作製した培養口腔粘膜上皮シートを移植し、基質の有無による影響を病理組織学的に検討する。

4. 研究成果

・臨床経過

培養口腔粘膜上皮シートには羊膜を基質として用いるもの(基質あり)と基質をもたないもの(基質なし)を作製し、癬痕性角結膜上皮症患者に対する眼表面再建術として移植した。臨床所見から基質なしシートの移植後では血管侵入が少ない傾向が認められた。

・血管促進・抑制因子の発現

培養口腔粘膜上皮シートでの血管新生促進・抑制因子の mRNA レベルでは、TSP-1 は強発現し、PEDF、bFGF、VEGF では弱い発現を認めたが、Flt-3、KDR の発現は確認できなかった。また、基質ありと基質なしの培養上皮シート間での各因子の発現には差は認められなかった(図2)。

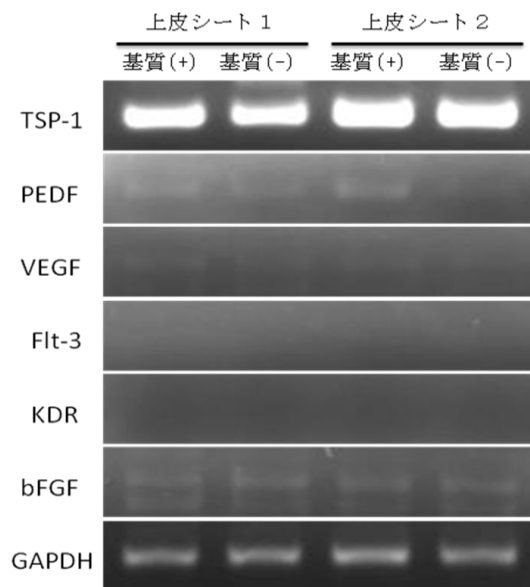


図2 RT-PCR (培養上皮シート)

また、免疫染色においては両培養上皮シートともに TSP-1、bFGF、endostatin、angiostatin の弱い発現が観察されたが、PEDF、VEGF の発現は認めなかった(図3)。免疫染色の結果においても両培養上皮シート

の間に大きな違いは認めなかった。

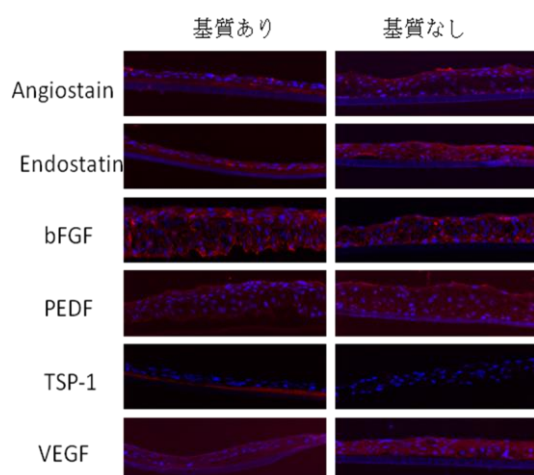


図3 免疫染色(培養上皮シート)

以上の結果から、移植前の培養口腔粘膜上皮シートでは基質の有無で血管新生促進・抑制因子の発現に影響はなく、移植後の眼表面の微小環境が血管新生に影響する可能性が考えられた。そこで、ヒト臨床検体は眼表面微小環境の個体差が非常に大きいため、角膜輪部機能不全家兎モデルを作成し、各培養口腔粘膜上皮シートを移植し組織学的検討を行った。

基質のない培養口腔粘膜上皮シート移植眼では、移植上皮シートと角膜実質の接着性は良好で平滑な眼表面が得られていたのに対し、基質がある培養口腔粘膜上皮シート移植眼では移植上皮シートと角膜実質の接着性が低く、上皮シート下に上皮細胞や周辺からの線維組織を伴う血管侵入が観察され、ヒトの臨床所見で認められる血管侵入は家兎モデルでも同様に観察された。

以上のことから、移植した培養口腔粘膜上皮シートと角膜実質との接着性が、移植上皮シート下のスペースへの細胞浸潤、血管侵入を引き起こす可能性が示唆された。

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1件)

Satake Y, Higa K, Tsubota K, Shimazaki J. Long-term outcome of cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation in treatment of total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 査読あり 2011, 118(8):1524-30. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.01.039.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐竹 良之 (YOSHIYUKI SATAKE)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60385143

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：