

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462759

研究課題名(和文) ヒト臍帯由来間葉系幹細胞移植による眼表面癒痕組織の再生

研究課題名(英文) Regeneration of ocular surface fibrosis by human mesenchymal stem cell transplantation

研究代表者

山中 修 (YAMANAKA, Osamu)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：50254545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト臍帯由来間葉系幹細胞(hUSMC)の生物学的特性。マウスアルカリ外傷モデルへのhUSMC投与で癒痕化が抑制された。この癒痕作用はグリコプロテインやhUSMCがTGF β やTNF α などの成長因子やサイトカイン、マクロファージの活性化を介して炎症を制御している可能性がある。癒痕組織の病理学的解明hUSMCの癒痕抑制作用を理解するため通常癒痕化関連因子を検索した。癒痕過程ではTNF α やcateninが深く関与しこれらの因子を制御することで癒痕抑制が可能であると発表した

研究成果の概要(英文)：We investigated the biological functions of human umbilical mesenchymal stem cells (hUMSC). hUMSC suppressed scar formation of alkali burn mouse model. Our findings showed that hUMSC mediated the activation of growth factors or cytokines such as TGF β and TNF α to suppress fibrosis. We suggested that TNF α and catenin deeply associated the process of scar formation. hUMSC could be a novel alternative for treating ocular surface fibrosis.

研究分野：眼創傷治癒

キーワード：創傷治癒 幹細胞 線維化

1. 研究開始当初の背景

我々は眼表面の癒痕化疾患に対し、これまでトランスフォーミング成長因子ベータ(TGF)シグナルの調節を標的とした実験を行い良好な成績をおさめている。抑制的 Smad である Smad7、抗 TGF 作用を持つドミナントネガティブ p38、PPAR や BMP7 のアデノウイルスベクターによる遺伝子強制発現で角結膜の癒痕化を抑制し、TGF の下流シグナルである Smad と組織癒痕化との密接な関係を報告した。しかしながらウイルスベクターを用いた臨床応用は癌化の問題など安全性の面で解決しなければならない点が残されている。現在、臨床ではヒトの組織、細胞を用いて眼表面の組織再建が行われている。角膜移植や角膜上皮細胞シートの移植である。しかしながら角膜移植は角膜輪部の機能が欠損した症例では十分な角膜細胞の再生効果が期待できない。日本の角膜移植の現状を考えると圧倒的にレシピエントの数が多く、十分なドナーが確保されておらず、迅速な移植手術は困難な状況である。また近年のレーザー屈折矯正手術の普及により角膜移植に提供できる角膜は将来的に減少することが予想される。これに対し本研究では安全性、簡便性の点で間葉系幹細胞に注目し、間葉系細胞移植術による組織再建を目的としている。

2. 研究の目的

眼表面の癒痕化疾患は時に失明につながる。その治療、予防は視覚の質(Quality of vision)の向上に貢献する。ヒト間葉系幹細胞(hMSC)は容易に入手でき、抗炎症作用と組織再生作用を有すると考えられている。現在、各種幹細胞移植による組織再生が試みられるようになってきたが、間葉系細胞を用いた組織再建はまだ確立されていない。またその組織再生の作用機序も明らかではない。本研究では比較的容易に得られるヒト臍帯由来間葉系幹細胞(hUMSC)を用いる予定であり、hUMSC 移植により眼表面の癒痕組織を正常組織に再生する事、その機序を解明することが目的である。

3. 研究の方法

1) hUMSC の安定した供給の確立と生物学的特徴の同定。インフォームドコンセントのもとヒト臍帯を入手し hUMSC の培養を行い安定した hUMSC の供給をめざす。

2) hUMSC 移植による癒痕抑制効果の確認と作用機序の解明。マウス角膜アルカリ化学外傷を作成し hUMSC 移植による癒痕抑制効果を確認する。我々は TGF シグナル伝達経路が癒痕化に深く関与しており、そのシグナルを制御する事で良好な癒痕抑制が得られることを報告してきた。hUMSC 移植も TGFβシグナルを制御することで組織再生を可能としている可能性が考えられる。また同時に癒痕形

成過程のシグナル伝達、蛋白発現についてもアルカリ外傷モデル以外にもマウス結膜癒痕モデルを作成し検討を行う

3) hUMSC 移植による既存癒痕組織の再生。マウスアルカリ化学外傷ではアルカリ暴露後、無処置では重篤な角膜混濁が存続する事が知られている。野生型マウスにまずアルカリ外傷を作製し角膜混濁を形成する。その後、癒痕角膜に対して TGF やインターロイキン 1、6 などの炎症、癒痕化に関与する成長因子やサイトカイン、癒痕化のマーカーである SMA の発現、Smad、p38、JNK、ERK シグナル伝達経路の活性化について検討し、2)と同様の手技で癒痕化の改善、その作用機序について調べる。同様に各種ノックアウトマウスに角膜癒痕を作成したのち hUMSC 移植を行い、その作用機序をシグナル伝達の面から確認する

4. 研究成果

1) hUMSC の安定した供給の確立と生物学的特徴の同定。海外研究協力者である University of Cincinnati, Dr Kao 研究室で hUMSC の培養の指導を H26 年 5 月より定期的に指導をうけた。同大学の培養ではシンシナティ大学 IRB に承認をうけたプロトコールのもと実施された。臍帯は 70% エタノールで洗浄し血液成分は EBSS で洗浄し、血管は除去した。組織を細かく粉碎し 0.05% トリプシンと 300U コラゲナーゼを含む alpha-MEM 培養液で 4 時間 37°C でインキュベートした。その後、細胞懸濁液をフィルターで濾過し遠心分離した(400×g)。その後、10%牛胎児血清添加 alpha-MEM で 5% CO₂、37°C で 16 時間培養し、浮遊細胞は除去した。培養液は 3 日ごとに交換し、4 世代継体培養の後、実験に供した。当初は単離培養に成功したが、その後、線維芽細胞の混入、成長が約 50% でおこった。そのため、安定した hUSMC の供給と細胞の生体としての質の同一性を図るため市販の hUSMC を用いることに変更した。これにより安定した hUSMC の準備が可能となった。(ATCC cell solutions PCS-500-010)

2) hUMSC 移植による癒痕抑制効果の確認と作用機序の解明。1)癒痕過程に係る因子の検討。まず hUSMC 移植に平行した実験として癒痕化過程を解明するため癒痕モデル(in vivo, in vitro)を用いて各種サイトカインや成長因子の関与を調べた。In vitro モデルは角膜上皮細胞、結膜線維芽細胞を用いた。in vivo モデルはマウスアルカリ外傷モデル、マウス結膜切開癒痕モデルを用いた。マウス癒痕モデルでは TNFαやβカテニンが癒痕化に関与していることを見いだした。例えば TNFα 欠失マウスではコントロールに比べて癒痕化が重篤になり TGFβシグナル伝達経路の一つである Smad の活性化が認められた。また癒痕関連因子である TGF、CTGF、MCP-1、コラーゲンの発現がコントロールより有意に亢

進していた。この癒痕形成は抑制型 Smad (Smad7) を点眼することで防げた。内因性 TNF α は Smad の活性化を制御し癒痕化を予防している可能性がある。一方、癒痕過程では β カテニンが発現し線維化に参与している可能性も見いだした。マウス癒痕モデルと TGF β 添加培養細胞癒痕モデルの双方で β カテニンの発現が亢進していることを発見した。この β カテニンの発現を阻害剤 (ICG-001) で阻害すると癒痕関連因子である一型コラーゲンやファイブロンネクチン、平滑筋アクチンの発現が抑制され、癒痕化が抑制された。この過程で β カテニンは Smad とクロストークしておりお互いにその発現に影響していることがわかった。² hUMSC の生物学的特性。hUSMC を培養に使った hUSMC 分泌物が含まれる培養上清液を培養角膜上皮細胞に与えて invitro での創傷治癒について検討した。細胞シートを作成し 1ml ピペットチューブで細胞シートに線状の細胞欠損部を作成する。欠損部周囲からの細胞による欠損部修復過程を観察したところ、コントロールに比べ hUSMC 培養上清液は欠損部の修復を促進した。また創傷端では細胞増殖の指標となる Ki67 の発現が増強していることが免疫染色よりわかった。hUSMC は細胞増殖を含めた創傷治癒促進に関与するタンパク質を分泌している可能性が示唆された。次にアルカリ外傷モデルに hUSMC を移植して癒痕抑制効果を判定した。アルカリ外傷モデルは麻酔下に 1 規定水酸化ナトリウムを用いてアルカリ化学外傷をマウス角膜に作成する。その後、角膜実質に 33 ゲージ針でトンネルを作製し hUSMC を含む PBS 2 μ l (hUSMC 1 \times 10⁴/ μ l) を注射した。術後 14 日後、hUSMC 移植により癒痕化は抑制され癒痕関連因子である一型コラーゲンやファイブロンネクチン、平滑筋アクチンの発現が抑制された。また Smad3 のリン酸化は抑制されており hUSMC の癒痕抑制作用は TGF シグナルを介している可能性が示唆された。

3) hUMSC 移植による既存癒痕組織の再生。既存角膜癒痕組織への投与も施行したが角膜癒痕組織を完全に再生し角膜の透明性を獲得するには現在のところ至っていない。

参考文献

Ocul Surf. 2016 Apr;14(2):121-34. Extrinsic and Intrinsic Mechanisms by Which Mesenchymal Stem Cells Suppress the Immune System. Coulson-Thomas VJ, Coulson-Thomas YM, Gesteira TF, Kao WW.

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 7 件)

¹ Inhibition of development of

laser-induced choroidal neovascularization with suppression of infiltration of macrophages in Smad3-null mice. Iwanishi H, Fujita N, Tomoyose K, Okada Y, Yamanaka O, Flanders KC, Saika S. Lab Invest. 2016 Mar 7. doi: 10.1038/labinvest.2016.30.

² Modulation of Smad signaling by non-TGF components in myofibroblast generation during wound healing in corneal stroma. Saika S, Yamanaka O, Okada Y, Sumioka T. Exp Eye Res. 2016 Jan;142:40-8. doi: 10.1016/j.exer.2014.12.015.

³ Pathobiology of wound healing after glaucoma filtration surgery. Yamanaka O, Kitano-Izutani A, Tomoyose K, Reinach PS. BMC Ophthalmol. 2015 Dec 17;15 Suppl 1:157. doi: 10.1186/s12886-015-0134-8.

⁴ Mesenchymal stem cells for treating ocular surface diseases. Zhang L, Coulson-Thomas VJ, Ferreira TG, Kao WW. BMC Ophthalmol. 2015 Dec 17;15 Suppl 1:155. doi: 10.1186/s12886-015-0138-4.

⁵ Transient Receptor Potential Channels and Corneal Stromal Inflammation. Okada Y, Reinach PS, Shirai K, Kitano-Izutani A, Miyajima M, Yamanaka O, Sumioka T, Saika S. Cornea. 2015 Nov;34 Suppl 11:S136-41. doi: 10.1097/ICO.0000000000000602.

⁶ Effects of the loss of conjunctival Muc16 on corneal epithelium and stroma in mice. Shirai K, Okada Y, Cheon DJ, Miyajima M, Behringer RR, Yamanaka O, Saika S. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 May 8;55(6):3626-37. doi: 10.1167/iovs.13-12955.

⁷ Lumican binds ALK5 to promote epithelium wound healing. Yamanaka O, Yuan Y, Coulson-Thomas VJ, Gesteira TF, Call MK, Zhang Y, Zhang J, Chang SH, Xie C, Liu CY, Saika S, Jester JV, Kao WW. PLoS One. 2013 Dec 18;8(12):e82730. doi: 10.1371/journal.pone.0082730. eCollection 2013.

[学会発表](計 9 件)

¹ Yamanaka O Matricellular proteins modulate TGF /Smad signal in EMT in an injured lens 日本眼科学会総会 2016 4 月 宮城 仙台市

² 山中修 他 結膜創傷治癒過程での TGF / -catenin クロスオーバー 日本眼科学会総会 2015 4 月 北海道 札幌市

3 山中修 他 培養ヒト結膜線維芽細胞での TGF / β -catenin クロスオーバー 日本緑内障学会 2014 9月 大阪 大阪市

4 Yamanaka O et al Effects of beta catenin inhibitor, ICG-001, on cultured human conjunctival fibroblast. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2014 May Florida, USA

5 山中修 他 β -catenin 阻害の培養線維芽細胞に対する影響 日本眼科学会総会 2014 4月 東京 有楽町

6 Yamanaka O et al Loss of TNF alpha accelerates inflammatory fibrosis during wound healing in conjunctiva in mice. Gordon Research Conference 2014. Feb.

7 山中修 他 ルミカンの創傷治癒における機序と可能性 日本結合組織学会 2013 6月 和歌山 和歌山

8 山中修 他 結膜創傷治癒における TNF alpha の役割 日本眼科学会総会 2013 4月 東京 有楽町

9 Yamanaka O et al Endogenous TNFalpha is required for normal tissue repair in mouse conjunctiva. The Association for Research in Vision and Ophthalmology. 2013 May Seattle, USA

〔図書〕(計 1 件)

1 山中修 他 組織修復における matrixcellular protein の役割 医学の歩み 2014 248

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 修 (YAMANAKA, Osamu)
和歌山県立医大 医学部 博士研究員
研究者番号：50254545

(2) 研究分担者

雑賀 司珠也 (SAIKA, Shizuya)
和歌山県立医大 医学部 教授
研究者番号：40254544

(4) 研究協力者

カオ ウィンストン (KAO, Winston)
シンシナティ大学 医学部 教授