

令和元年6月13日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11331

研究課題名(和文) 口腔粘膜由来間葉系幹細胞の眼表面疾患モデルにおける効果

研究課題名(英文) Effect of human oral mucosa mesenchymal cells in ocular surface model

研究代表者

佐竹 良之 (Yoshiyuki, Satake)

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：60385143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：眼表面疾患モデルにおける細胞治療の効果を調べるため、ウサギ創傷治療モデルの結膜下に口腔粘膜由来間葉系細胞の移植を検討した。培養液を移植したコントロールに比べて口腔粘膜由来間葉系細胞移植した角膜欠損部位では比較的早く創傷治癒が促進されている可能性が認められた。上皮化した眼表面組織において、SPION(Fe₃O₄：四酸化三鉄)を取り込んだ細胞が存在しており、ベルリンブルー染色で検出することができた。また、抗ヒト核抗体を用いた免疫染色においても同様に移植部位に陽性像を観察することができた。以上のことから移植した口腔粘膜由来間葉系細胞は眼表面に生着し、創傷治癒を促進する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに口腔粘膜由来の間葉系幹細胞を用いた報告はない。間葉系幹細胞は採取した組織や部位によって異なる性質を持つことが考えられ、角膜への応用を考慮すると、神経堤由来因子を含んだ口腔粘膜由来間葉系幹細胞を用いた眼表面再建に効果的であることが予想される。本研究において神経堤由来因子を含んだ口腔粘膜由来間葉系幹細胞は移植により眼表面に生着し、創傷治癒を促進する効果があることがわかってきた。以上のことから難治性眼表面疾患に対する新しい細胞治療法として期待される。

研究成果の概要(英文)：To estimate the effect of cell therapy in ocular surface disease, we performed subconjunctival human oral mucosa mesenchymal cells (hOMMCs) transplantation in the rabbit wound healing model. A tendency to promote the corneal epithelial wound healing was observed in hOMMCs transplanted wound healing model compare to control model. In the ocular surface epithelialized tissues, SPION (Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles) imported Berlin Blue positive hOMMCs were existed in the subconjunctia. We also observed anti-human nuclei positive cells in the subconjunctia. These data is possibility that hOMMCs engrafted in the subconjunctia and promoted wound healing in the ocular surface.

研究分野：眼科学

キーワード：間葉系幹細胞 神経堤由来細胞 細胞治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などの間葉系に属する細胞へ分化する能力を持っており、皮膚、脂肪組織、歯髄などさまざまな組織に存在する事が報告されている(J.G. Toma, Nat Cell Biol, 2001; S. Gronthos, J Cell Physiol, 2001; S. Gronthos, Proc Natl Acad Sci USA, 2000)。この間葉系幹細胞は存在する組織の恒常性の維持や創傷治癒過程で重要な働きをしている(J.G. Tome. Nat Cell Boil, 2001; S. Growths. J Cell Physiology, 2001)。近年の再生医療における間葉系幹細胞の報告では、拡張型心筋症や虚血性心筋症における心機能と自覚症状の改善、重症末梢血動脈疾患における血管再生効果、放射線障害性腸炎における修復効果など、再生誘導作用、抗炎症作用、血管新生や繊維化抑制作用といった様々な作用や効果があることが明らかとなりつつあり、様々な疾患の局面で間葉系幹細胞の効果が期待されている。これまで我々は、侵襲性の比較的低い口腔粘膜上皮下組織から間葉系細胞を分離・培養し解析を行っており、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞さらに神経細胞への分化が可能であることが解ってきた。また、フローサイトメリーの解析で口腔粘膜上皮下細胞は間葉系幹細胞に非常に似た細胞が存在することもわかってきている(Matsumura et al. Oral Dis, 2014)。さらに我々は single cell から増殖したヒト口腔粘膜由来間葉系細胞が骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、神経細胞へと胚葉を超えて分化可能であることが分かって来た。

このヒト口腔粘膜上皮下組織由来間葉系幹細胞(hOMMCs)のうちCD56やPDGFR α といった神経堤由来因子を発現するものは高い分化能を示す(図3)。角膜の発生学的にもこの神経堤由来因子は重要であることから、我々はさらに角膜実質細胞への分化誘導を試みたところ、角膜実質細胞(ケラトサイト)で特異的に観察されるケラトカンの発現を確認することもできた(図4)。間葉系細胞の眼表面への応用として、近年、骨髄由来ならびに羊膜由来の間葉系幹細胞をウサギやラットのアルカリ外傷モデルへ移植した報告もあり、角膜疾患に対する間葉系幹細胞の効果が期待されている(Ke et al. ProsOne, 2015, Zeng et al. Ann Clin Lab Sci, 2014)。

2. 研究の目的

口腔粘膜上皮下の組織から分離した神経堤由来因子の発現を持つ間葉系幹細胞は、角膜の眼表面再建において創傷治癒促進効果を発揮する可能性があると考えられる。本研究では眼表面疾患モデルにおけるhOMMCsの効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) hOMMCsの準備

hOMMCsはこれまでに分離培養してきた物を使用する。増殖後においてはCD56ならびにPDGFR α の発現を確認した。また、分化能(骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、神経細胞、角膜実質細胞)においても定期的に確認を行った。

(2) 実験動物の準備

日本白色家兎上皮欠損モデルでは8mm径の組織生検トレパンを用いて角膜上皮中央部分に上皮欠損を作成した。

(3) hOMMCsの移植

移植は参考論文(Ke et al. ProsOne, 2015, Zeng et al. Ann Clin Lab Sci, 2014)に従って結膜注射にて行う。移植するhOMMCsは移植後のhOMMCsの存在部位の確認するため、

MRI コントラスト造影剤として使われている SPION(Supper Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (Fe₃O₄ : 四酸化三鉄))でラベルし、5.0x10⁵ 個で投与した。コントロールとして、それぞれ検討する時の培地のみの投与する。

(4) 移植後の眼表面の観察

フルオレセイン染色による上皮欠損部位の比較、スリットランプによる透明性の比較ならびに血管新生の観察を行う。上皮欠損部位は画像解析ソフトにより角膜全体に対する割合で数値化し、再上皮化するまで観察する。

(5) 組織学的解析

投与後において家兎の角膜を摘出し、凍結包埋する。組織学的観察はヘマトキシリン・エオジン染色を行って、移植した hOMMCs の存在を確認するため、SPION を鉄の染色で使用するベルリンブルーで染色した。

4. 研究成果

移植後、経日的に観察を行なったところ、培養液を移植したコントロールに比べて口腔粘膜由来間葉系細胞移植した角膜欠損部位では比較的早く創傷治癒が促進されている可能性が認められた(図1)。上皮化した眼表面組織において、SPIONを取り込んだ細胞が存在しており(図2)、ベルリンブルー染色で検出することできた(図3)。また、抗ヒト核抗体を用いた免疫染色においても同様に移植部位に陽性像を観察することができた(図4)。

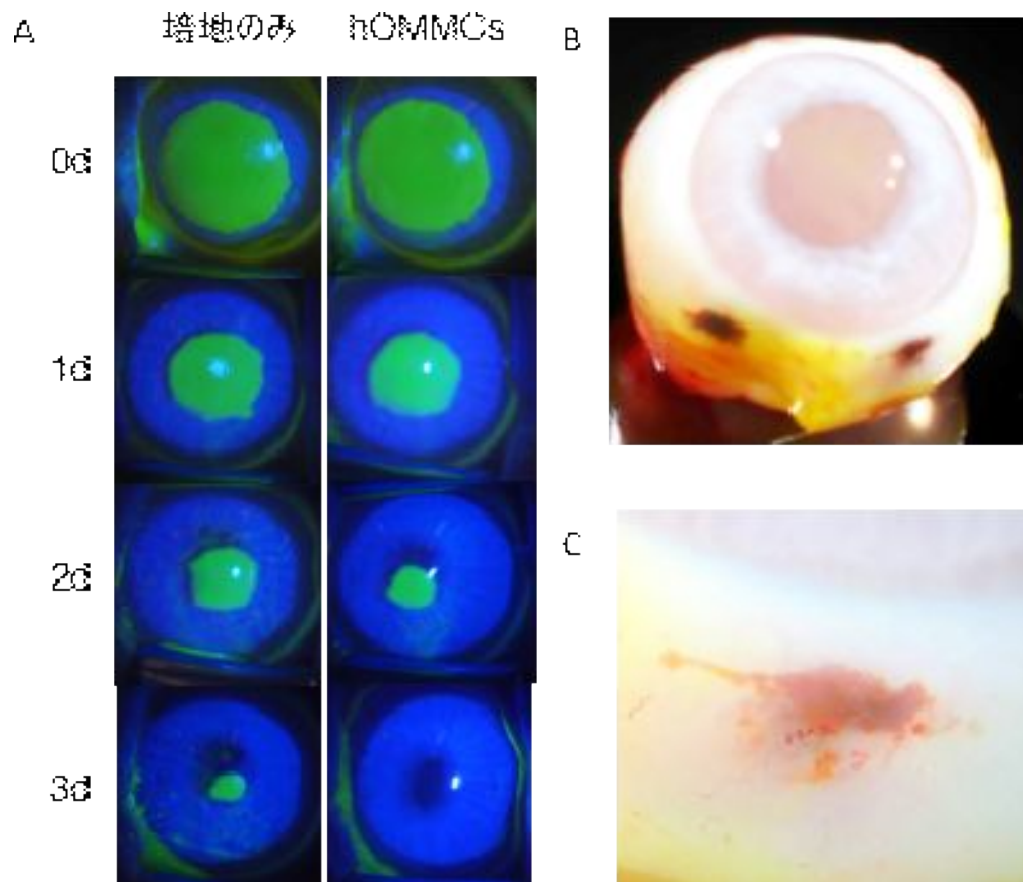


図1 ウサギ創傷治癒モデルにおけるhOMMCsの影響。A)結膜下注射後の上皮化の経日的フルオレセイン染色による観察。B)上皮化後の眼球。茶色部分が結膜下注射を行ったところ。C) 結膜下注射部位の拡大写真。

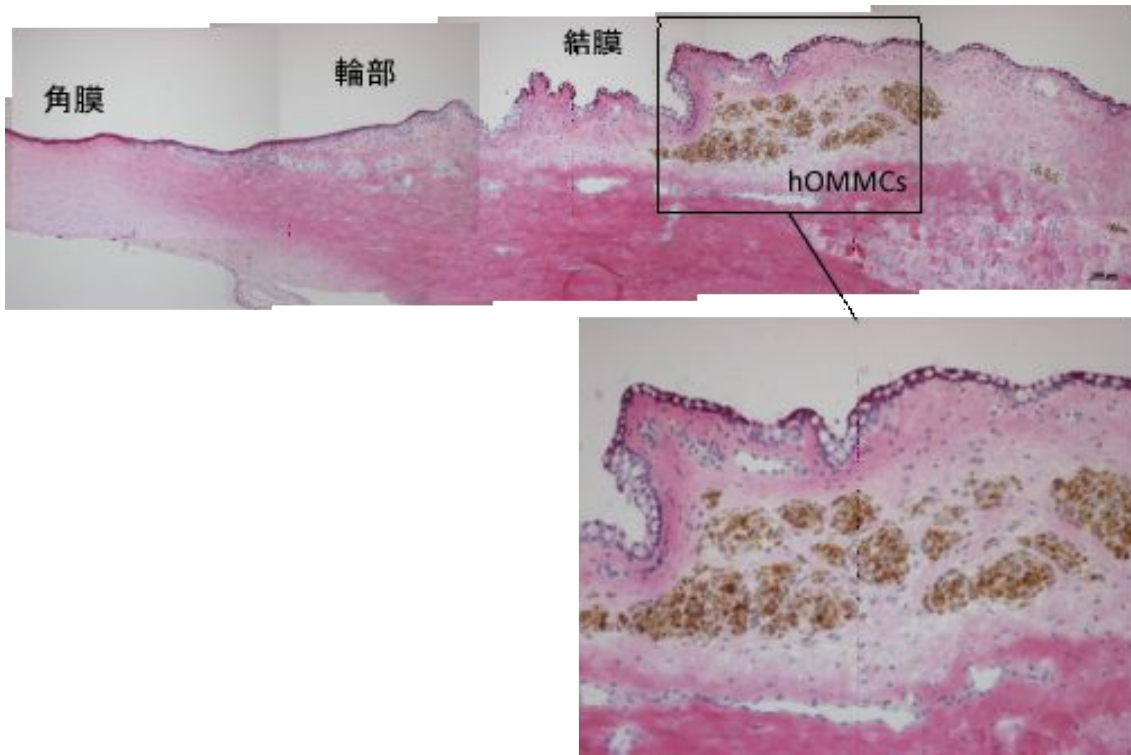


図2 hOMMCs結膜下注射を行ったウサギ角結膜組織のH.E.像。SPIONを取り込んだ細胞は茶色に観察されるように結膜下組織に存在していた。

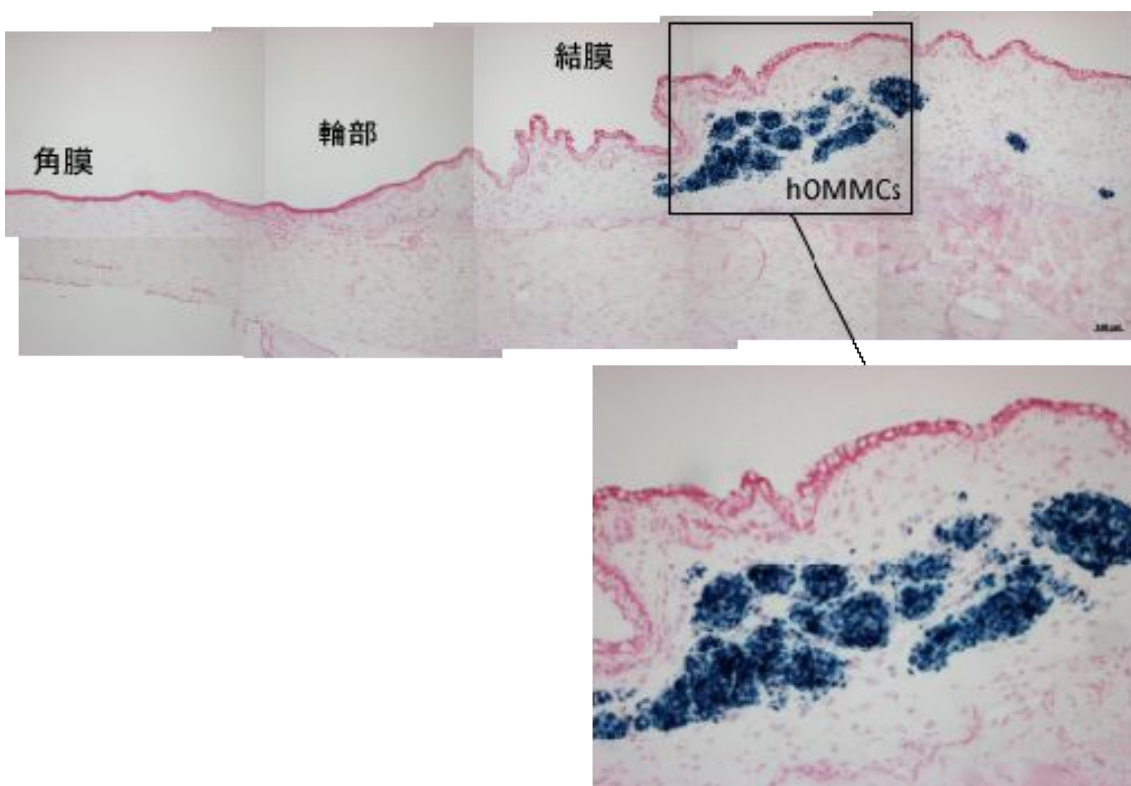


図3 hOMMCs結膜下注射を行ったウサギ角結膜組織のベルリンブルー染色像。SPIONを取り込んだ細胞は紺色に観察されるように結膜下組織に存在していた。

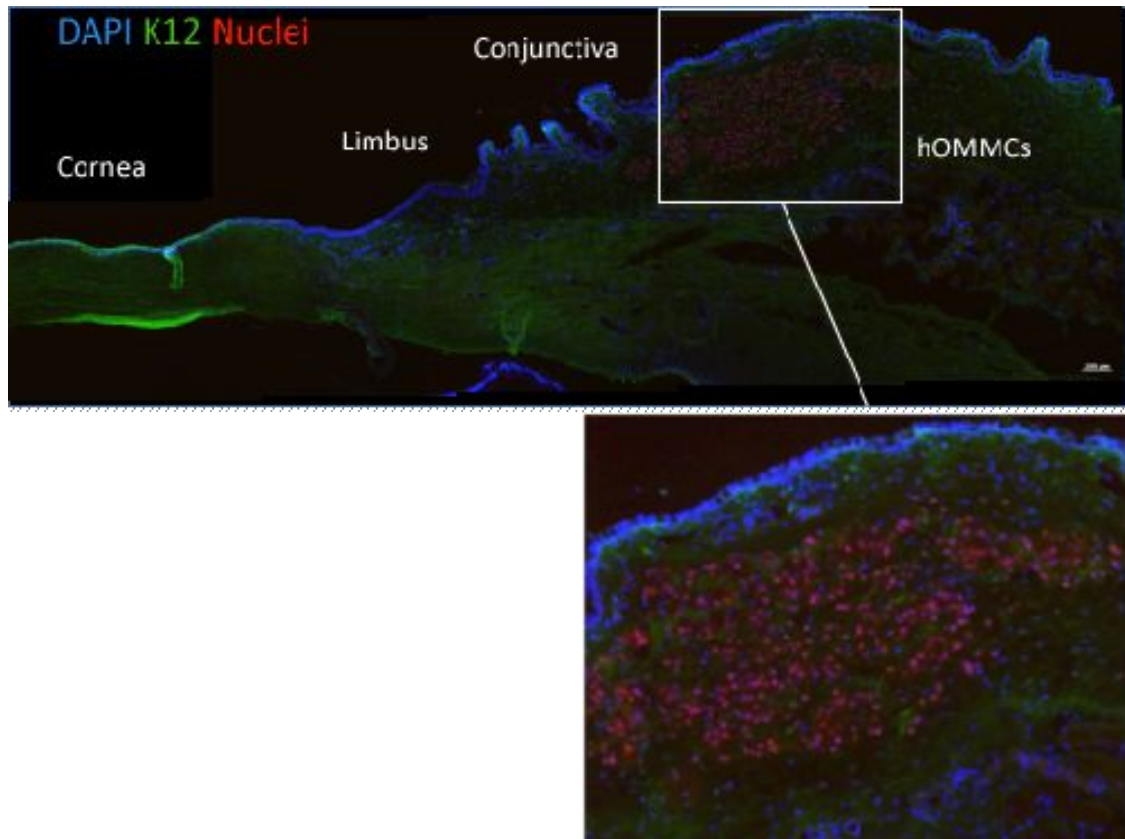


図4 hOMMCs結膜下注射を行ったウサギ角結膜組織の免疫染色像。抗ヒト核抗体陽性細胞は赤色に観察されるように結膜下組織に存在していた。

以上のことから移植した口腔粘膜由来間葉系細胞(hOMMCs)は眼表面に生着し、創傷治癒を促進する可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Higa K, Satake Y, Shimazaki J: Differentiation of human oral mucosa mesenchymal stem cells into keratocytes and their use as feeder cells for a cultivated epithelial sheet. *Future Sci OA*, Published Online:6 Sep 2017 <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0074>, 2017.

〔学会発表〕(計 1件)

比嘉一成, 佐竹良之, 島崎 潤. 多分化能を示す口腔粘膜由来間葉系幹細胞と角膜への応用. 第15回日本再生医療学会総会, 大阪, 2016/3/17-19.

〔図書〕(計 0件)

〔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:

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：島崎 潤
ローマ字氏名：Jun Shimazaki

研究協力者氏名：比嘉 一成
ローマ字氏名：Kazunari Higa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。