

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20326

研究課題名(和文)角膜移植長期予後予測因子の開発

研究課題名(英文)Candidate Prognostic factors relating with the long term outcome of corneal transplantation

研究代表者

丸山 悠子(Maruyama, Yuko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：60516003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：角膜移植の予後のばらつきは何故起きるのか？本研究ではSoilについて検討した。角膜移植対象患者の生体応答は多様であり、男女差、年齢など背景因子により前房水サイトカインプロファイルには多様性の存在することが判明した。角膜移植術前の前房水について移植後6ヶ月のECD基準での3群分け、3ヶ月・6ヶ月のECD変動基準での3群分け、疾病基準での3群分け、性別、Regraftの有無での群分け等で解析し、術前の前房水サイトカインプロファイルで移植後の中期予後効果が予測できることが判明した。前房水中のmiRNAも多様性を示し、SASP量を制御する5種の可溶性miRを同定した。

研究成果の概要(英文)：The findings of this study demonstrated that chCECs are composed of a dysregulated expression of a hierarchy of miR clusters, probably due to the presence of cell state transition (CST) paralleled with the reduced expression of CD44 and SASP. The assay of miRs secreted in CS, with further extended selection, may distinguish the cell-state-transitioned CD44+~+++ chCEC from CD44- effector cells applicable in a cell-injection therapy for corneal endothelial dysfunctions. Secreted miRNA profiles among morphologically-diverse chCEC SPs proved useful for individual distinction. It was found that the 3 to 6month long term outcome of corneal transplantation could be predicted by the cytokine profile before the operation, especially by PDGFbb, IFNg and IL-17in aqueous humors. Five soluble form of miRNAs were identified to be responsible for the elevation of SASP in aqueous humors.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜内皮細胞 再生医療 角膜移植 前房水 代謝産物 サイトカイン miRNA

1. 研究開始当初の背景

角膜の透明性維持に必須の角膜内皮細胞 (CEC) は、霊長類では生体内で増殖しない。生体内では、CEC は、通常 2500 ~ 3000 細胞/mm² の細胞密度 (ECD) で存在するが、外傷や疾病、手術侵襲などにより障害され、400 細胞/mm² 以下に ECD が低下すると角膜は混濁し重篤な視力障害に陥る。角膜機能障害のなかで、角膜内皮機能不全の占める割合は 60% を超える。平成 28 年当時、角膜内皮機能不全に対する唯一の治療法は角膜移植であった。角膜移植は、侵襲的であり、ドナー角膜は世界的に不足しているという問題点を抱えている。加えて、移植したドナー角膜の内皮細胞密度は経年とともに減少していき、長期予後が不良である。したがって、この侵襲的な手術を再度受ける必要性があり、患者に多大な負担を与える。一方で、移植した角膜の ECD が長期にわたり維持されるケースも僅かにみられる。これは、単に角膜のドナー年齢に起因するものではないことが分かっているが、その科学的要因は不明であった。申請者らのグループでは、培養 CEC が形質を異にする複数の亜集団からなるヘテロな集団であることを明らかにし、それらを表面マーカーにより分類する方法を確立した。これら亜集団は、表面マーカーだけでなく、産生する液性因子やエネルギー代謝特性に違いがあることが判明している。この亜集団組成が、長期予後に影響を与える一因ではないかという仮説のもと、移植ドナー角膜の残りから角膜内皮細胞を採取し、申請者らのグループにより確立させた培養法により培養すると、ドナーにより亜集団組成に明らかな違いが認められた。未発表の重要な知見である。申請者らのグループでは、角膜移植の侵襲的、ドナー不足といった問題を解決すべく、ヒト角膜内皮細胞を培養により増殖させ、これを前房内に注

入する「前房内細胞注入療法」に取り組んでいる。現在のところ「前房内細胞注入療法」において、短中期臨床成績においては亜集団細胞組成との相関がみられている。このことから、亜集団細胞組成が角膜移植後の長期臨床成績に影響を与える可能性は十分に考えられるとして本研究課題を申請した。

角膜移植臨床予後成績に影響を与えるもう一つの要因は Soil 側、つまりレシピエントの前房内環境である。いかに優れた Seed を移植しても、Soil 側の環境が整っていなければ無意味である。実際、特定の亜集団の産生する液性因子 (miRNA、SASP、サイトカイン) が、他の亜集団に影響を与え、亜集団不均一性を生み出す一因となっていることも確認している。

2. 研究の目的

前房内に存在する液性因子またはエクソソームに内包されるこれら因子も、移植した CEC の亜集団組成を変化させるものと考えられる。これら液性因子が病変 CEC 由来のみであれば、病変組織 (細胞) の除去のみで対応できるが、前房内環境に存在または近接する CEC 以外の細胞が作り出すものが存在するのであれば、薬剤等による前房内環境のコンディショニングが必要になると考えられる。この問題に関しては、個々の亜集団の産生する液性因子および病変ドナー角膜、術前、前房水に存在する液性因子の比較解析により、どの因子が病変 CEC 由来なのか、CEC 以外の産生する液性因子のうち角膜移植臨床予後成績に影響を与える因子があるのかを明らかにする。予備的知見として、術前の前房水に含まれるサイトカインを解析したところ、サイトカインプロファイルは患者により多様性を示すが、発現パターンにより幾つかのグループに分類できるという結果が得られている。これまで当研究室では、いくつかの阻

害剤が培養条件下で亜集団組成を大きく変化させることも確認しており、薬剤による前房内環境のコンディショニングは実現可能であると思われる。以上の Seed および Soil の多様性と長期予後の相関を調べ、①どの亜集団細胞が存在すると長期予後がよいのか？どの亜集団が存在すると悪いのか？②それら亜集団細胞の分泌する液性因子、miRNA、エキソゾーム、サイトカイン、代謝産物のうち予後に影響を与える因子はあるのか？それは何か？③前房水液性因子（上述同様の）の中に予後に影響を与える因子はあるのか？それは何か？を明らかにすることで、長期予後と相関する因子を同定し、世界初の角膜移植の長期予後予測技術の開発につなげる。

さらに、本研究課題においては各レシピエントに移植したドナー角膜の亜集団組成の解析と臨床結果の情報が得られるため、従来の角膜移植（組織）と前房内細胞注入療法による再生医療の科学的比較にもつながるものである。

3. 研究の方法

① ドナー角膜 (Seed) 側の解析

角膜移植残り部分からの内皮細胞の採取・初代培養。継代時に

- 亜集団解析 (FACS)
- 培養下における ECD
- 何継代まで培養可能か？(P5 まで解析)

また、培養上清を採取し、②'に用いる。

② 前房内環境 (Soil) 側の解析

移植細胞に影響を与える因子として、サイトカインや miRNA などが考えられる。したがって、

レシピエント前房水(術前)を採取し、

- BioPlex によるサイトカインプロファイルの解析

移植術後の前房水の採取は、患者への負

担を考慮すると困難なため、培養上清中の液性因子の解析から推測する。

③ 臨床長期予後成績のモニタリング

術後半年、1年、2年の ECD、角膜厚、角膜内皮細胞の形態、細胞の大きさなど Specular microscopy による内皮細胞状況、Gutatta 用組織の有無などの推移をモニターする

術後半年、1年の臨床成績と照らし合わせ、Soil 側液性因子のうち長期予後不良に関連すると思われる候補を絞り込む。

④ どの亜集団が存在すると長期予後がよいのか？どの亜集団が存在するとよくないのか？統計処理で明確化する。

4. 研究成果

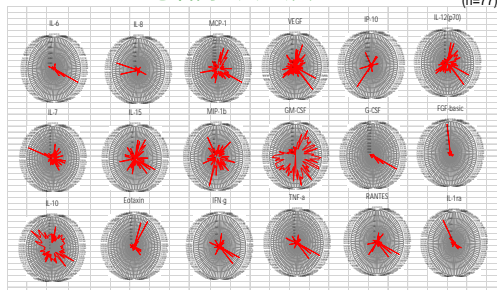
イ) 培養角膜内皮細胞中のエフェクター細胞比率と角膜移植後 3 ヶ月、6 ヶ月の内皮細胞密度との相関：

エフェクター細胞亜集団は CD44-CD24-CD26-CD133cd166-なる細胞表面抗原特性で表示される。99 例の角膜移植例についてこのエフェクター細胞比率と角膜移植後の予後成績との相関の有無を検討したが、P1 ~ P5 の何れの培養継代においても相関は全く認められなかった。エフェクターの細胞形質は新鮮組織における角膜内皮細胞の形質と一致することを免疫組織染色で確認したものである。本細胞表面形質で規定される細胞亜集団がなお不均質である可能性を示唆する。なお、各々の患者の移植前の前房水中のサイトカインを網羅的に検索し、エフェクター比率との相関を示すサイトカインの抽出を試みたが、相関するサイトカインは 27 Plex で検出される前房水内サイトカイン 18 種の中には存在しなかった。

ロ) 前房水中のサイトカインプロファイル
次の図に 77 人の患者さんの前房水中のサイトカインプロファイルをレーダーチャートとして示す。特筆すべきは患者間でプル

ファイルが大きく異なることである。角膜移植患者(n=77)の前房水中のサイトカインを Bio-Plex マルチプレックス免疫アッセイにて網羅的に解析した。各患者間で前房水中のサイトカインプロファイルは大きく異なっていた。主成分解析にて、角膜移植の原因疾患による群分けは、前房水中のサイトカイン (MCP-1, IP-10, IL-6, IL-8, IL-1ra, Eotaxin, IL7) で分別された。また、術後 3 ヶ月で角膜内皮細胞密度が維持されている群と減少している群では術前の前房水中のサイトカイン (IFN γ , IL-17, PDGF-bb) で選別されることが判明した。

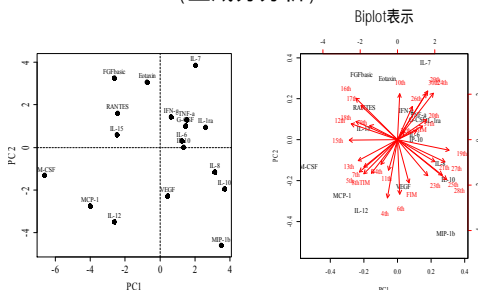
前房水中のサイトカインプロファイルは患者間で大きく異なる



角膜移植患者の前房水中のサイトカインを Bio-Plex Multiplex Immunoassays にて網羅的に解析
大きな課題 Medication Noiseの処理 患者背景の多様性

細胞注入 31 例の術前・前房水に含有される特性を 31 人の患者さんを要素として多成分解析しますと、サイトカインの種類は 4 グループに分かれました。

前房水: サイトカインの分布 (主成分分析)

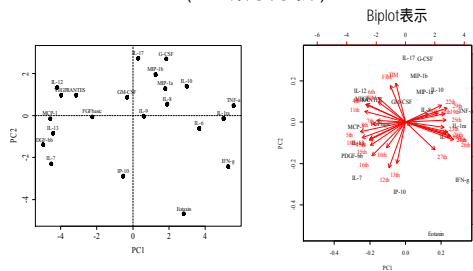


Cytokine mapping showed distinguishable profiles among four disease groups. PC analysis has been used to identify the first 2 PC which explain 45.0% of the variation within the data set.

細胞注入 31 例の術前・前房水に含有される特性を 31 人の患者さんを要素として多成分解析しますと、サイトカインの種類は 4 グループに分かれました。

細胞注入 31 例の術前・血清に含有される特性を 31 人の患者さんを要素として多成分解析しますと、サイトカインの種類は大きく 3 グループに分かれました。前房水における群組成と大きく異なり、局所の Soil の重要性を示唆しております。

血清: サイトカインの分布 (主成分分析)

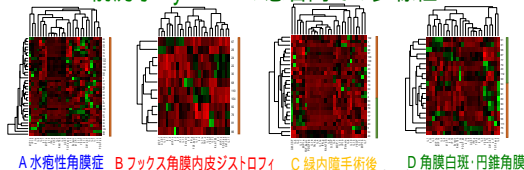


Cytokine mapping showed distinguishable profiles among four disease groups. PC analysis has been used to identify the first 2 PC which explain 51.0% of the variation within the data set.

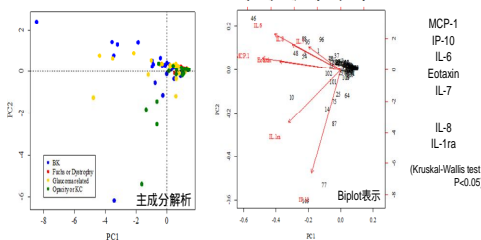
細胞注入 31 例の術前・血清に含有される特性を 31 人の患者さんを要素として多成分解析しますと、サイトカインの種類は大きく 3 グループに分かれました。前房水における群組成と大きく異なり、局所の Soil の重要性を示唆しております。

角膜移植の原因疾患による 4 群分けでは、下図のヒートマップで明らかのように原因疾患によりサイトカインプロファイルは大きく異なり、多成分解析により、前房水中のサイトカイン (MCP-1, IP-10, IL-6, IL-8, IL-1ra, Eotaxin, IL7) で 4 群は分別された。

前房水 Cytokine の患者間での多様性 藤田さん 吉井先生



A 水疱性角膜症 B フックス角膜内皮ジストロフィ C 緑内障手術後 D 角膜白斑・円錐角膜



Cytokine mapping showed distinguishable profiles among four disease groups. PC analysis has been used to identify the first 2 PC which explain 53.6% of the variation within the data set.

PC1: A vs B (P=0.002), A vs C (P=0.885), A vs D (P=0.054)
B vs C (P=0.015), B vs D (P=0.623), C vs D (P=0.276)
PC2: A vs B (P=0.599), A vs C (P=0.999), A vs D (P=0.028)
B vs C (P=0.728), B vs D (P=0.179), C vs D (P=0.044)

(Kruskal-Wallis test P<0.05)

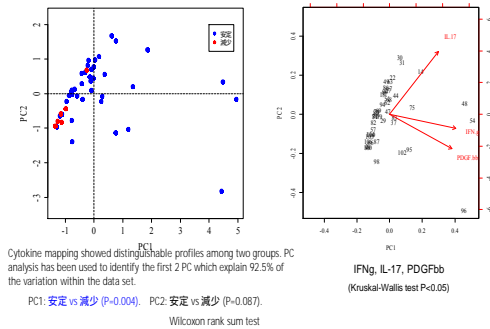
このことは、疾患病態と前房水サイトカインの間に関連のあることを示唆するものと解釈する。また、術後 3 ヶ月で角膜内皮細胞密度が 2000 細胞・mm² で維持され、その後 3 ヶ月で低下する群と退化しない群が

術前の前房水中のサイトカイン（IFN γ , IL-17, PDGF-bb）で選別されることが判明した。

角膜移植の予後と前房水Cytokine

角膜内皮細胞密度変動(安定vs減少)

角膜移植後3ヶ月の角膜内皮密度が2000細胞/mm²以上群内で3ヶ月→6ヶ月で「減少しない群」と「3割以上減少する群」を比較

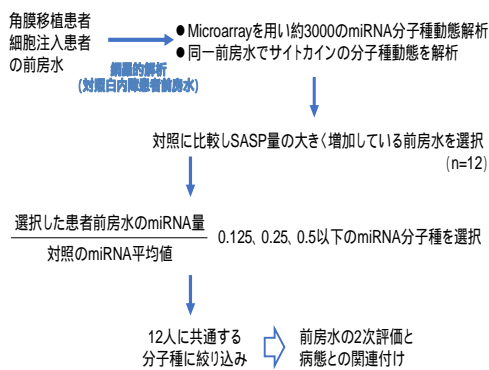


注目すべきは、IFN γ も PDGFbb も培養細胞の高品質性を担保するサイトカインとして選別されたものである。

八) 前房水中の SASP と可溶性 miRNA

ヒト角膜内皮細胞の相転移、就中、細胞老化に IL-8, IL-6, MCP-1 など老化関連分泌経路(SASP)に係るサイトカインが関与するkとが判明しているこの SASP 産生抑制機構が可溶性 miRNA により担われているのではないかと考え、下図のフローで候補 miRNA を選別した。

老化病態に関連するmiR分子種の絞り込み

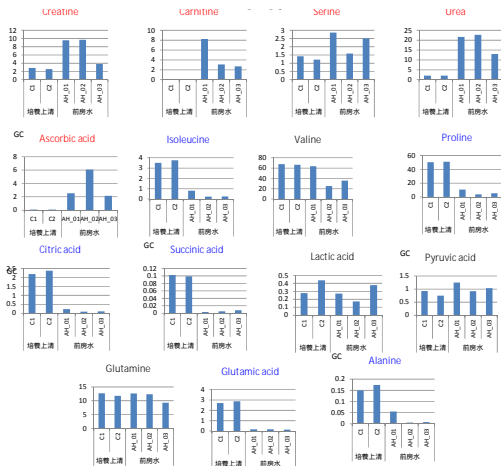


その結果、SASP 産生抑制前房水内可溶性 miRNA として 5 つの分子種〔未発表のため番号は伏せます〕を同定した。これらの分子種は細胞内の miRNA378 の体会により引

き金が引かれたものと考えている。

へ) 前房水中の代謝産物

筑波大・京大・島津ライフ研究所の佐藤教授、園村先生との共同研究で GC/MS, LC/MS 双方を用いて前房水と培養ヒト角膜内皮細胞上清を解析したところ、前房水と培養上清中の代謝物プロファイルは異なることが判明し(下記グラフ参照) Vivo における水疱性角膜症の病態には代謝産物の影響を配慮する必要性が確認された。今後、500 以上の検体にて血漿との比較や白内障、緑内障患者前房水との比較を実施予定である。



Lactic acid と Pyruvic acid は前房水でも培養上清でも同程度に存在 → 培養上清での知見を前房水に応用可能

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1件)

(発表者)羽室 淳爾、Concomitant Evaluation of a Panel of Exosomes and MiRs Playing Roles in the Pathogenesis for Human Corneal Endothelial Dysfunction. Annual meeting-ISEV2017, Toronto, Canada, 18-21, 2017、

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

関連出願としては

PCT/JP2017/5386 2017.2.14 出願人京都公立大学法人京都府立医科大学 があります。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

丸山 悠子 (Maruyama Yuko)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・
視覚機能再生外科学・特任助教
研究者番号：60516003

(2)研究分担者

羽室 淳爾(Hamuro Junji)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・
視覚機能再生外科学・客員教授
研究者番号：80536095

(4)研究協力者

平賀 朝子 (Hiraga Asako)
京都府立医科大学・特任講座 感覚器未来
医療学・研究補助員
藤田 智子(Fujita Tomoko)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・
視覚機能再生外科学・研究補助員