

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11492

研究課題名(和文)単純口腔粘膜上皮細胞移植法の家兎モデルでの検討と臨床応用

研究課題名(英文)Simple oral mucosal epithelial transplantation in a rabbit model and clinical application

研究代表者

山上 聡 (YAMAGAMI, Satoru)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：10220245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：角膜上皮の幹細胞疲弊症とは角膜上皮細胞の幹細胞がなくなった状態で、透明な角膜上に血管や線維芽細胞が侵入して視力が極端に低下し、通常の角膜移植では治癒させることのできない難治性疾患である。両眼性の角膜上皮の幹細胞疲弊症に対して口腔粘膜を用いた新しい方法の開発を目的とした検討をおこなった。家兎の角膜上皮疲弊症モデルに家兎の口腔粘膜を細かくしたものをのせ、コンタクトレンズで固定したところ、術後2週目に家兎の角膜の上皮化が得られ安定した状態になった。本法は培養工程などを必要とせず眼表面を上皮化する方法として臨床応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

両眼性の角膜上皮の幹細胞疲弊症に対しては、培養口腔粘膜上皮移植術が行われてきた。しかし非常に高額な清浄度の高い培養設備が必要となるため培養細胞シート作製には多額の費用が必要であり、多くの施設で実施することはできないものであった。今回我々が動物実験で成功した方法は、本人の口腔粘膜を細かく裁断したものをそのまま移植してコンタクトレンズで固定する非常に簡便なもので、培養設備を必要とせず低いコストで実施が可能であることが最もすぐれた点であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Corneal limbal stem cell deficiency is a condition in which corneal epithelial stem cells have been disappeared and blood vessels and fibroblasts invaded into the transparent cornea, leading to severe reduction of visual acuity. We investigated for the development of a new method using oral mucosal epithelium for corneal limbal stem cell deficiency. Rabbit corneal limbal epithelium deficiency model was treated with some fragments of rabbit oral mucosal epithelium and fixed with a contact lens only. At 2 weeks after the operation, the corneal epithelization was obtained. This method is expected to be applied clinically as a method for epithelization of the ocular surface without cell culture process.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜上皮幹細胞疲弊症 口腔粘膜 眼表面再建 家兎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角膜輪部には角膜上皮細胞の幹細胞が存在しているがさまざまな原因で角膜輪部上皮幹細胞疲弊症眼(Limbal stem cell deficiency, LSCD)となる症例がある。片眼性や両眼性のLSCD眼に対しては、それぞれ本人の輪部上皮や口腔粘膜上皮をもちいる培養自己輪部上皮細胞シート移植や培養自己口腔粘膜上皮細胞シート移植などの再生医療が行われてきた。我々は自己結膜上皮を細胞源とする培養自己結膜上皮細胞シート移植をLSCDに対して使用し報告してきた。しかしながら平成27年から再生医療新法が厳格に適用されるようになり、大学での細胞シート作製にも製薬会社での医薬品製造グレードの高コストの高い清浄度が要求されるようになり、数百ページにおよぶ詳細なプロトコール、手順書、記録書が必要で、違反した場合は50万円以下の罰金刑が課せられるなどハードルが非常に高くなった。

このように再生医療を取り巻く環境が大きく変わったなかで、化学外傷などによる片眼性の角膜輪部機能障害患者に対する新しい術式である単純角膜輪部上皮移植(Simple Limbal Epithelial Transplantation, SLET)の1.5年治療成績(Simple Limbal Epithelial Transplantation: Long-Term Clinical Outcomes in 125 Cases of Unilateral Chronic Ocular Surface Burns. Basu S, et al. Ophthalmology. 2016;123:1000 -1010.)が報告された。本法は片眼性のLSCD眼に対して、健眼の輪部上皮幹細胞を採取し細切したのちに眼表面にフィブリン糊とともに塗布する方法であり、増殖因子などを用いる必要がないため医師法下での実施が可能となる。我々は倫理委員会の承認を得て両眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症眼に対し、培養自己結膜上皮細胞シート移植実施の実績を生かして、両眼性の症例に対し本人の結膜を移植する単純結膜上皮移植を開始した。両眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症眼に対する結膜上皮移植後眼であるが、綺麗な上皮化が得られており本術式が有効であることが明らかとなってきた。しかしながら両眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症眼の症例の多くは瞼球癒着を伴っている。培養自己結膜上皮細胞シート移植での培養経験では、瞼球癒着を伴う結膜の培養はほとんど成功せず、両眼性の角膜上皮幹細胞疲弊症眼に対しては、代用上皮として実績のある口腔粘膜上皮の使用が望まれる。しかし角膜上皮幹細胞疲弊症眼に口腔粘膜上皮を用いた単純角膜輪部上皮移植類似の方法での報告はこれまでなされていない。

2. 研究の目的

両眼性のLSCD眼患者に対して、口腔粘膜上皮による培養を行わないより簡便な組織移植による眼表面再建治療法の開発を目的として、まず家兎での角膜上皮幹細胞疲弊症モデルを作製し、培養工程を経ない口腔粘膜上皮移植(Simple oral mucosal epithelium transplantation, SOMET)を行いその有効性を検討することが目的となる。

3. 研究の方法

家兎の口腔粘膜上皮の採取後、すでに確立した口腔粘膜幹細胞を含む組織に分離し、家兎の角膜上皮幹細胞疲弊症モデルに移植し本治療法の有効性を検討した。検討にあたっては既報の単純角膜輪部上皮移植(Basu S, et al. Ophthalmology. 2016)にしたがって羊膜を使用する方法と羊膜を使用しない方法に分けて羊膜の必要性の有無もあわせて検討した。具体的な方法は以下の通りである。

- (1). 移植用口腔粘膜の採取と幹細胞組織の分離
- (2). 家兎の角膜上皮幹細胞疲弊症モデルの作製と有効性の検討、
- (3). 術後経過観察と組織学的検討

A. 術後の臨床評価

B. 組織学的検討

4. 研究成果

(1) 口腔粘膜上皮の採取と分離

採取した口腔粘膜は、粘膜上皮と上皮下組織で構成され、非角化重層扁平上皮が筋組織を被覆する被覆粘膜 (Lining mucosa) であった。上皮と上皮下組織を分離する2つの方法を比較した。

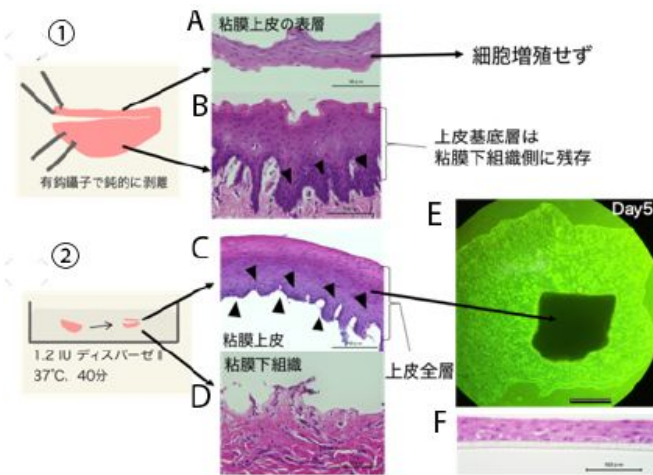
鑷子を用いた方法

1つ目の方法は2本の鑷子を用いて鈍的に組織を粘膜上皮 (図1A) と粘膜下組織 (図1B) の2層に分離した。図1Bに黒い三角 () で示すように、基底層に近い粘膜下組織で、核/細胞質 (N/C) 比の高い細胞を認めた。

ディスパーゼを用いた方法

ディスパーゼはペプチド鎖の中性、非極性アミノ酸のN末端側で切断するプロテアーゼである。組織を1.2IUのディスパーゼIIで37℃ 40分間処理後、鑷子で軽く触れるだけで粘膜上皮 (図1C) を粘膜下組織 (図1D) から剥離することができた。この粘膜上皮は、基底層まで全層を含んでいた。粘膜下組織側には上皮の残存は認めなかった。

図1 口腔粘膜上皮の分離法による増殖能力の比較



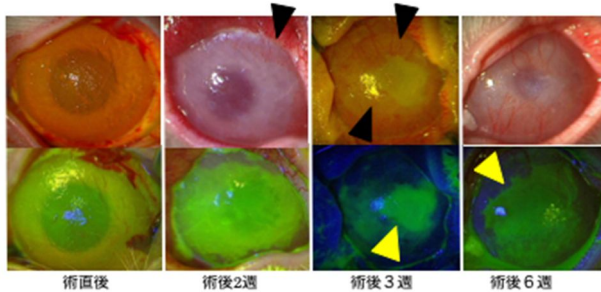
2本の有鉤鑷子で牽引し鈍的に組織を粘膜上皮 (A) と粘膜下組織 (B) の2層に分離すると、Aは粘膜上皮細胞の上層5~6層、Bは粘膜上皮の下層と粘膜下結合組織となる。Bには結合組織付近の粘膜上皮基底層にN/C比の高い基底細胞 () が含まれる。Aの粘膜上皮は3週間培養しても細胞が増殖しない。

1.2IUディスパーゼで分離した粘膜上皮 (C) は乳頭状の基底層を粘膜下結合組織から分離し、表層粘膜上皮細胞からN/C比の高い基底細胞 () までの上皮全層を含む。Cの粘膜上皮を培養すると、培養5日目に上皮組織の周囲に島状のコロニーを形成し (E)、培養3週間目で約5層の上皮細胞シートを形成する (F)。1.2IUディスパーゼで分離した粘膜下結合組織には上皮基底細胞を認めない (D)。

(2) 家兎のLSCDモデルの作製と有効性の検討

局所麻酔下で輪部の外周から5mm以内の結膜および結膜下組織を全て切除し、輪部を含む角膜上皮を360度完全に除去したところ、術後2週間にわたり角膜全体の上皮欠損が維持された。図2にウサギLSCDモデル眼の前眼部写真を示す。角膜上皮欠損の遷延、結膜侵入、角膜血管新生が持続しており、ウサギLSCDモデル眼が作製された。以後の眼表面再建術の治療効果の研究に、本モデルを使用した。なお、術後2週目以降では結膜が角膜内に侵入し上皮欠損の範囲が変動して評価が困難となるため、本研究での術後追跡期間は2週間に設定した。

図2 ウサギLSCDモデル眼の前眼部写真

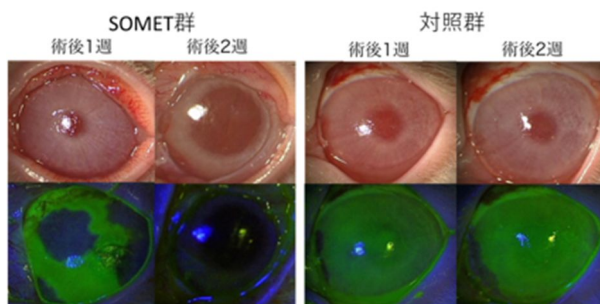


作製したウサギ LSCD モデル眼は術後 2 週目から徐々に角膜血管新生が生じ、術後 3 週には結膜上皮の侵入および著大な角膜血管新生が生じる（黒）。結膜上皮侵入によって術後 3 週に一次的に縮小した角膜上皮欠損領域は術後 6 週に再度拡大し、安定した上皮化を得ることはない（黄）。

（3）術後経過

SOMET 群 4 眼のうち 1 眼は、SCL が脱落しほとんどの移植片が術後 1 週間の初回診察時までに見われていたため、評価から除外した。図 3 に両群の代表的な前眼部写真を示した。

図 3 SOMET 群および対照群の術後前眼部写真



術眼の代表写真を示す。SOMET 群は、術後 1 週で移植片の周りに上皮が進展し、術後 2 週には完全に上皮化した。対照群は、角膜の周辺部に血管新生を認め、術後 2 週にわたり上皮化が進まず、上皮欠損が遷延した。

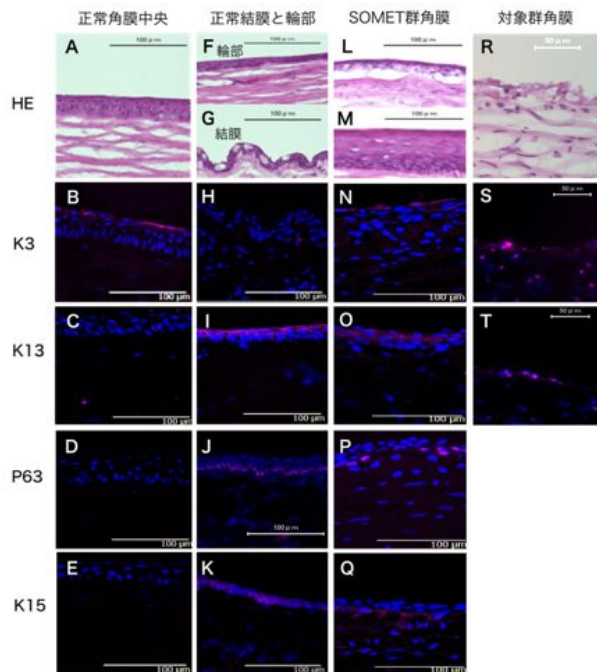
SOMET 群の 3 眼すべてにおいて、術後 1 週間の診察時に移植片の周囲に上皮が進展して島状の上皮化領域が形成され、術後 2 週間で角膜全体が完全に上皮化された。角膜輪部および角膜に隣接する結膜はフルオレセインで染色されており、結膜上皮の侵入ではないことが示された（図 3 左）。SOMET 群とは対照的に、対照群の 4 眼は術後 2 週間で血管新生を認めた。リン酸ベタメタゾンナトリウムと硫酸フラジオマイシンを含む軟膏での治療にもかかわらず、結膜の炎症は対照群で顕著であり広範な瞼球癒着を認めた。対照群では、2 週間以内に完全な上皮化は得られなかった（図 3 右）。

組織学的検討

正常角膜中央では（図 4 A）上皮表層で K3 が陽性であり（図 4 B）、K13（図 4 C）、p63（図 4 D）および K15（図 4 E）はすべての層で陰性であった。正常なウサギ角膜輪部および結膜の HE 染色画像を、それぞれ図 4 F および図 4 G に示した。結膜上皮は K3 陰性であり（図 4 H）、K13 は角膜輪部（図 4 I）および結膜上皮において陽性であった。角膜輪部の基底層は、細胞核で p63 陽性（図 4 J）、細胞質で K15 陽性（図 4 K）を示した。術後 2 週間の SOMET 眼は、HE 染色で 3～5 層の上皮細胞が示された（図 4 L）。移植された口腔粘膜上皮は重層扁平上皮構造を残していた（図 4 M）。移植片から進展した上皮は、正常角膜同様上皮表層において K3 陽性であった（図 4 N）。K13 は上皮層で陽性であり（図 4 O）、正常なウサギ口腔粘膜の所見と一致した（図 4）。移植片

から進展した上皮には p63 および K15 陽性細胞を認めなかったが、移植部位の基底細胞は、p63 (図 4P) および K15 (図 4Q) 陽性であった。対照群の角膜 HE 染色では上皮細胞を認めず、露出した角膜実質に多核球が付着していた (図 4R)。また、対照群は K3 (図 4S) および K13 (図 4T) 陰性であった。

図 4 ウサギ眼球摘出標本の免疫組織化学的検討



術眼を摘出し、凍結標本を免疫組織化学的に検討した。左の列はウサギ正常角膜の中央部 (A-E) である。HE 染色で 5～6 層の角膜上皮細胞が示され (A)、上皮層最表面の一層の細胞質で K3 が陽性である (B)。K13 (C)、p63 (D)、および K15 (E) はすべての層で陰性である。中央左の列は正常角膜輪部と結膜である (F-K)。F は正常角膜輪部、G は正常結膜の HE 染色を示す。正常結膜は上皮細胞の間に杯細胞を含む (G)。K3 は結膜では陰性 (H)、結膜から輪部にかけて上層の細胞質で K13 が陽性 (I)、基底層の細胞核において p63 が陽性 (J)、細胞質において K15 が陽性 (K) である。中央右列は SOMET 群の角膜である (L-Q)。SOMET 眼の角膜は HE 染色で中央部は 3～5 層の扁平な上皮細胞層 (L)、移植片が接着した部分では口腔粘膜上皮由来の重層扁平上皮と N/C 比が高い基底細胞層 (M) がある。移植片から進展した上皮細胞層は、最表面層の細胞質で K3 陽性 (N)、表層上皮細胞の細胞質で K13 陽性 (O) である。接着した移植片の基底細胞は、核で p63 陽性 (P)、細胞質で K15 陽性 (Q) である。対照群の角膜 (R-T) は、HE 染色で上皮細胞を認めず露出した角膜実質に多核球が浸潤する (R)、K3 (S) と K13 (T) は陰性である。

以上のように家兎角膜上皮疲弊症モデルにおいて口腔粘膜のデイスパーゼ処理により増殖に必要な細胞を含んでいること、羊膜やフィブリン糊を用いずに移植してソフトコンタクトレンズを装用することで移植片は生着すること、免疫組織学的検討から眼表面は、口腔粘膜で覆われていることが示され、本法の有効性が明らかとなった。我々の考案した単純口腔粘膜上皮移植術は、培養設備を持たない医療施設でも実施可能であり、従来の組織移植よりドナー組織量が少なく低侵襲であること、更に羊膜や接着剤の入手および移植片縫合の手技習得が不要であることから、患者および医療施設の両者にとって治療の負担が軽減されるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inamochi A, Tomioka A, Kitamoto K, Miyai T, Usui T, Aihara M, Yamagami S	4. 巻 9
2. 論文標題 Simple oral mucosal epithelial transplantation in a rabbit model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18088
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54571-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲用 絢、富岡秋子、北本昂大、宮井尊史、臼井智彦、山上聡
2. 発表標題 角膜輪部機能不全モデルウサギに対する単純口腔粘膜上皮移植
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	崎元 暢 (SAKIMOTO Tohru) (20465272)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	
研究分担者	中静 裕之 (NAKASHIZUKA Hiroyuki) (10372997)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	