

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04477

研究課題名（和文）脱細胞化角膜実質足場での再生メカニズム解析と角膜類似構造体の構築に関する研究

研究課題名（英文）Study on a regeneration mechanism of corneal stroma in a decellularized scaffold and on the methods to construct corneal stromal like architecture

研究代表者

小林 尚俊（kobayashi, hisatoshi）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・非常勤講師

研究者番号：90354266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000 円

研究成果の概要（和文）：還流培養系で脱細胞組織上に上皮細胞を播種し培養を継続した結果、全面に多層上皮化層が形成された。この上皮層に傷を付け連続性を壊し上皮の再生機序を探索した。上皮先端から欠損部へ上皮細胞が移動し再上皮化が進む様子が観察された。再上皮化が進む中、一部上皮化の進行が遅く実質内への細胞浸潤が起こるケースが見られた。免疫染色でMMPの発現、ケラチンの発現状態を検索した結果、脱細胞組織上の多層上皮層ではケラチンの発現が弱く、MMPの発現が継続していた。実質へ浸潤した細胞ではMMPの発現が顕著でありケラチンの発現は認められなかった。角膜上皮が実質内へ浸潤し、後成学的に細胞の分化状態が変化した可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜治療の第一選択肢は献眼によるアログラフトを使用するものであるが、献眼数が少なく輸入眼に頼るのが現状である。この状況を改善するために、豚角膜から細胞成分を除去して免疫拒絶反応を低減させて人角膜治療に用いる試みがなされている。この治療は、有望であるが、未だ詳細な再生メカニズムが分かっているわけではなく、これを解き明かすことがこの治療法の信頼性の向上につながる。脱細胞組織の上皮化、および、組織内への細胞浸潤のメカニズムなどの一部が本研究より明らかになり、今後の実用化に向けた医療デバイスとしての製品デザインに資する結果が得られたことは、学術的にも、実用上に於いても大きな意義を持つものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Epithelial cells were seeded on the decellularized tissue in a perfusion culture system, and the culture was continued. We investigated the epithelial regeneration mechanism by scratching the epithelial layer and breaking the continuity. It was observed that epithelial cells migrated from the tip of the epithelium to the defect site and re-epithelialization progressed. While re-epithelialization progressed, there were some cases where progress of epithelialization was slow and cell infiltration into the parenchyma occurred. As a result of examining the expression of MMP and keratin by immunostaining, the expression of keratin was weak in the multi-layered epithelial layer on the decellularized tissue, and the expression of MMP continued. Cells that infiltrated the parenchyma showed marked expression of MMP, but no expression of keratin. It suggested that the corneal epithelium infiltrated into the parenchyma, and epigenetically changed the state of cell differentiation.

研究分野：角膜再生

キーワード：脱細胞角膜足場 再生メカニズム 上皮化 細胞浸潤

1.研究開始当初の背景

これまでの研究で、脱細胞角膜実質足場内へのホスト細胞が浸潤し実質を再生組織化する過程において上皮細胞との相互作用が角膜実質再生に大きな影響を与える可能性が得られている。この詳細なメカニズムを解明するために、細胞培養系において上皮と脱細胞化実質の相互作用の詳細な検討が必要となった。

2.研究の目的

脱細胞化角膜実質足場に関して、角膜上皮との相互作用を詳細に検討し、脱細胞化足場を欠損部位へ組み込んでいく手法を確立することを目的とした。

3.研究の方法

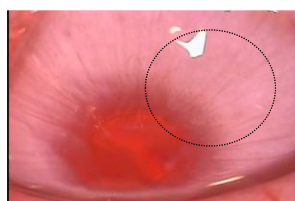
通常の細胞培養で用いられる分散した角膜上皮細胞を播種する方法と生体組織中で起こるシート状上皮の這い出しによる脱細胞角膜実質足場の被覆を起こさせる方法を比較し、上皮化と組織再生過程の構造変化と細胞侵入状態などを免疫組織学的手法を用いて検討し、脱細胞角膜実質足場の構造変化と実質細胞の侵入と再生などを解析した。

4.研究成果

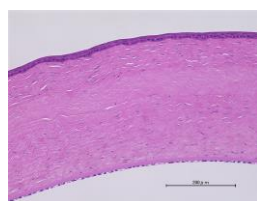
実験計画書の段階で使用を予定していた脱細胞化角膜は、動物への埋入初期に不透明な状態で、透明化するのに2-3週間を要する弱点があり将来の臨床で問題が生じる恐れがあったため、これを改良する研究を並行してすすめてきた。具体的には、以下の通りである。東京芝浦臓器株式会社より購入した成体ブタ眼球から強角膜を採取し、採取した強角膜を10%グリセロール含有培地に浸漬し、冷間等方加圧装置（Dr. CHEF）を用い、10℃にて600MPaの高静水圧印加処理を10分間行った。その後、3.5% w/v デキストラン、0.2 mg/ml DNase I、0.01 mg/ml ゲンタマイシンを含む培地による振盪洗浄を48時間行い、細胞残渣を除去した。さらに脱細胞化角膜を50wt%スクロース溶液に浸漬後、凍結乾燥することによりガラス化した脱細胞化角膜を得た。得られた脱細胞化角膜は実験に使用するまで4℃にて保存した。この方法で得られたサンプルは、旧処理法で得られる不透明な脱細胞角膜足場と比較すると可視光の透過性が格段に向上した材料となった。この脱細胞化角膜の透明化処理・保存処理法では、各種多価水酸基を有する実質構造保護剤を用いて前記条件で脱細胞処理を行うことでプロセス中の角膜の構造変化を抑えて透明性の向上が確認され、糖の添加を併用して脱水処理、その後凍結乾燥処理を行うことで透明な状態で保存安定性を向上させることに成功した。透明化処理を施した試料に関して各計画の大幅な変更はあったが、旧脱細胞角膜足場より優れた改良型脱細胞角膜足場材料の開発が進み、新規性の高い成果が得られた。この改良型のサンプルに関して実験計画を見直し、当初計画で初年度に予定していたモデル表面における相互作用の検討を次年度以降実施とし、改良サンプルを持ち

た予備的な細胞培養試験、家兔を用いた材料の機能性、安全性試験を追加実施した。L929細胞を用いた毒性試験では、作製直後のサンプルに対して試験を行った結果、保存処理剤除去処理が不十分な場合には細胞の増殖に影響が出る可能性が示されたが、十分な除去処理を行うことで細胞毒性は認められなくなることが確認され、その後、保存を6か月行ったサンプルに対して再度毒性試験を実施した結果、6か月後のサンプルでも、洗浄処理を十分に行えば、細胞毒性はほとんど認められず改良前の足場と同等の安全性が確保されている結果となった。このサンプル上に、角膜上皮細胞を播種して静置培養を行い、上皮細胞の生着性と増殖性を確認した結果、細胞の生着と増殖が確認された。また、家兔角膜内ポケットへの埋入試験を行い、角膜混濁や血管侵入などの所見も見られず、サンプルの透明性も継続的に維持される結果となり、*in vivo*における最低限の安全性が確認された。

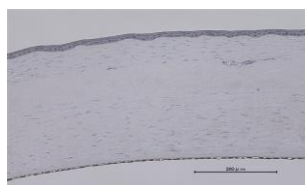
再生メカニズムの解析を行うために、*In vitro* 培養系に改良を加え、上皮細胞と脱細胞化角膜実質足場の相互作用の検討を継続した。超高压処理により作製した脱細胞角膜実質足場を長期還流培養に用いる足場を固定する治具に組み込んだ状態で角膜上皮細胞を播種し、上皮細胞の生着状態を安定化させるため、静置培養を行った後に、還流培養用の装置へ移行し組み込み、上皮化の進行状況を観察する手法を確立した。具体的には、静置培養における細胞播種数の最適化により、20000cells/cm² とかなりの高濃度で上皮細胞を播種する必要



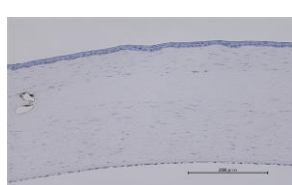
埋入8週後の顕微鏡所見



3か月後のHE染色組織像
透明維持、血管細胞浸潤なし。炎症の所見なし



3か月後のα-SMA免疫染色像



3か月後のマクロファージ免疫染色像

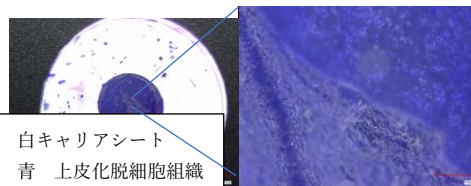
炎症所見は軽微

マクロファージの浸潤は軽微

家兔実質内ポケットへの6か月の埋入結果



還流培養システム



白キャリアシート
青 上皮化脱細胞組織

脱細胞組織全面に多層上皮化を確認

があった。還流培養装置への細胞播種済み脱細胞角膜の仕込みのタイミングの検討では、1週間ほどの静置培養が必要であることが判明した。また、還流培養の培養液の還流速度などの検討を行い、2.0ml/hrの流速での還流培養で問題なく長期培養を行うことができることを確認した。豚から作成した脱細胞化組織を人に埋入する場合の超急性期の免疫拒絶を

引き起こすとトリガーとしての α GAL の有無が問題となってきたため、脱細胞化角膜の再生のメカニズムの一つとして、 α GAL の除去が適切に行われているかを評価した。この結果、脱細胞化処理を行った角膜実質組織では、 α GAL の消失が確認されて、急性期の免疫拒絶は起きにくい材料であることが分かった。

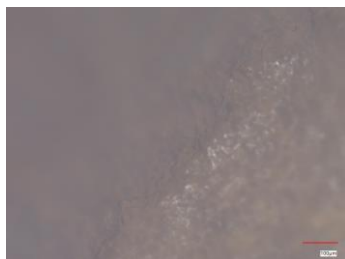
還流培養系でエアリフトをトリガーとして分化誘導を行い、多層上皮化を試みた。上皮細胞を播種して培養を4週間ほど継続した後の脱細胞化組織に対して組織学的検討を行った。

結果、上皮細胞を播種した脱細胞組織の全面に渡り多層上皮化が達成された。

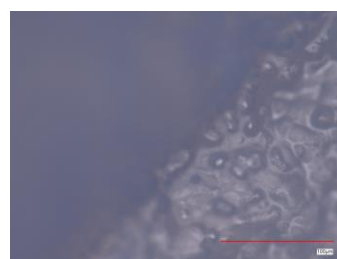
続いて、この培養組織にスクラッチ法を利用して、形成した角膜上皮層の連続性を壊し、上皮の再生機序を探索した。再上皮化の挙動をタイムラプス顕微鏡で観察を行った結果、傷の先端から上皮が移動し再上皮化が進んでいる様な像が観察できた。



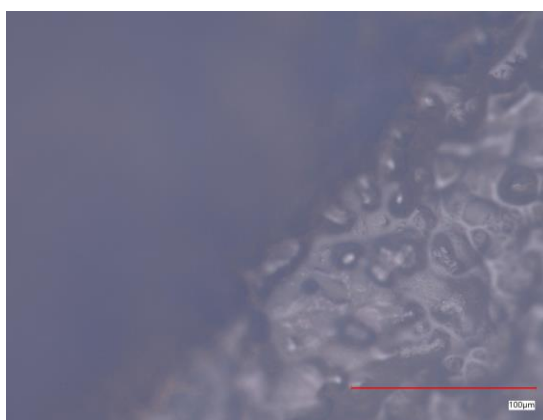
スクラッチ部



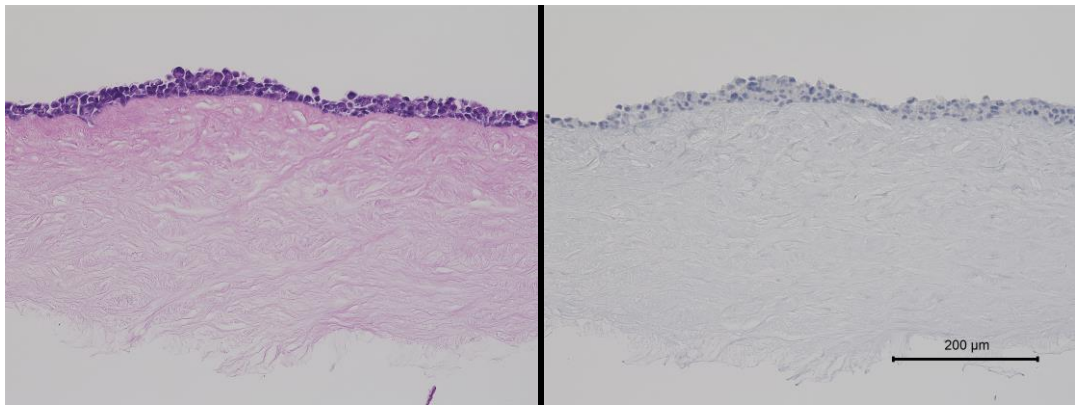
境界部の弱拡大像



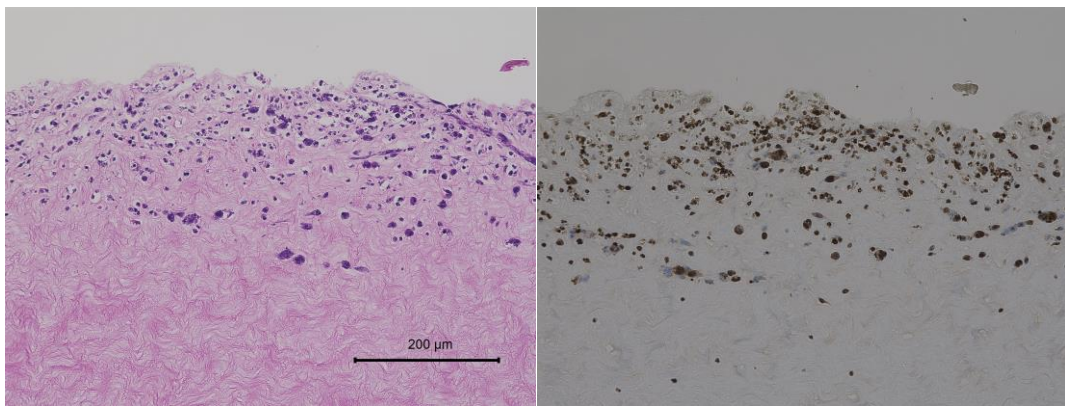
境界部の強拡大像



多層上皮部からスクラッチにより傷ついた脱細胞組織表面へ上皮が移動している像



HE 染色：幼弱ではあるが多層化した上皮 ケラチン染色：ケラチンの発現は弱い
還流培養により形成した脱細胞角膜実質上の多層上皮



HE 染色：実質に浸潤した角膜上皮 MMP13：浸潤細胞では MMP13 が強発現
脱細胞角膜実質足場内に上皮が浸潤したケースの組織像

各ステージに相当する組織を組織学的検討を進めた結果、綺麗に上皮化が進んでいるケース多い中、上皮化があまり進行せず、実質内への細胞浸潤が起こっているケースが散見された。それぞれの組織に対して免疫染色の手法を使って、MMP の発現、ケラチンの発現状態などを検索した結果、多層上皮化を達成した上皮層の上皮においても弱いながら MMP の発現が継続していること、および、ケラチンの発現が弱いことが判明した。また、実質内への細胞浸潤が認められたケースでは、浸潤している細胞で MMP の発現が顕著であった。また、浸潤細胞においてはケラチンの発現は認められなかった。一方、今回の実験では、ヒト角膜上皮のみを播種して実験を行っていることから、浸潤した細胞はヒト角膜上皮であり、何らかの条件で、角膜上皮が実質内へ浸潤して行き、後成学的に細胞の分化状態が変化した可能性をも示唆する結果となった。

脱細胞組織の状態と播種した上皮細胞の分化状態の関係に関しては、非常に興味深い研究テーマであり、今後の研究課題としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Yoshihide, Funamoto Seiichi, Sasaki Shuji, Negishi Jun, Hattori Shinya, Honda Takako, Kimura Tsuyoshi, Kobayashi Hisatoshi, Kishida Akio	4. 巻 102
2. 論文標題 Re-epithelialization and remodeling of decellularized corneal matrix in a rabbit corneal epithelial wound model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 238 ~ 246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.msec.2019.04.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Selene Rozet, Hisatoshi Kobayashi, Zenta Kajiura, Yasushi Tamada	4. 巻 27
2. 論文標題 Characterization of Antheraea pernyi fibroin films from the aqueous solution prepared by an improved process	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Silk Science and Technology of Japan.	6. 最初と最後の頁 33-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11417/silk.27.33	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林尚俊, 橋本良秀, 根岸淳, 船本誠一, 木村剛, 岸田晶夫.	
2. 発表標題 長期保存可能なヒト角膜移植代替脱細胞化豚角膜移植片	
3. 学会等名 NIMS WEEK 2020	
4. 発表年 2020年	

1. 発表者名 小林尚俊, 橋本良秀, 根岸淳, 船本誠一, 木村剛, 岸田晶夫.	
2. 発表標題 長期保存可能なヒト角膜移植代替脱細胞化豚角膜移植片	
3. 学会等名 産学連携オンラインEXPO（招待講演）	
4. 発表年 2020年	

1．発表者名 小林尚俊，橋本良秀，根岸淳，船本誠一，木村剛，岸田晶夫。
2．発表標題 超高压処理により脱細胞化した透明豚由来角膜実質再生足場の開発
3．学会等名 平成2年AMED成果事業化のためのシーズ相談会（招待講演）
4．発表年 2021年

1．発表者名 Hisatoshi Kobayashi, Yoshihide Hashimoto, Akio Kishida, Jun Negishi, Seiichi Funamoto, Toshiya Fujisato
2．発表標題 Stability and shelf life improvement of the transparent -treated decellularized cornea with ultrahigh hydrostatic pressure treatment
3．学会等名 Virtual World Biomaterials Congress 2020, 11-15 Dec 2020（国際学会）
4．発表年 2020年

1．発表者名 橋本良秀，根岸淳，船本誠一，木村剛，小林尚俊，岸田晶夫。
2．発表標題 角膜実質組織の再構築を目指した透明脱細胞化角膜実質の開発
3．学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4．発表年 2021年

1．発表者名 川久保 彩夏，小橋尚教，玉田 靖，山岡哲二，小林 尚俊
2．発表標題 調製法が異なるシルクフィブロイン基材上でのP19CL6細胞の自発拍動挙動
3．学会等名 2019繊維学会年次大会
4．発表年 2019年

1．発表者名 白川 美德、玉田 靖、山岡哲二、小林 尚俊
2．発表標題 シルク上でのiPS細胞の長期培養挙動
3．学会等名 2019繊維学会年次大会
4．発表年 2019年

1．発表者名 KOBAYASHI, Hisatoshi
2．発表標題 Silk fibroin nanofiber based architecture for corneal stromal regeneration
3．学会等名 biomaterial engineering unit seminar in Chulalongkorn university, Thailand (招待講演) (国際学会)
4．発表年 2019年

1．発表者名 小林尚俊、橋本良秀、岸田晶夫、根岸淳、船本誠一、藤里俊哉
2．発表標題 透明化脱細胞角膜実質足場の保存性と安定性
3．学会等名 第41回バイオマテリアル学会年会
4．発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 乾燥脱細胞化組織の製造方法、脱細胞化組織の保存前処理法、及び、乾燥脱細胞化組織	発明者 岸田晶夫、橋本良秀、 船本誠一、根岸淳、 小林尚俊	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-170530	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Samurai

https://samurai.nims.go.jp/profiles/kobayashi_hisatoshi

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	橋本 良秀	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教	
	(hashimoto yoshihide)		
	(40638384)	(12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------