

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09725

研究課題名（和文）長期予後成績に優れる移植用ヒト角膜内皮細胞選別法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a screening method for cultured human corneal endothelial cells maintaining long-term in vivo stability.

研究代表者

戸田 宗豊（Toda, Munetoyo）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任准教授

研究者番号：30550727

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：研究用ドナー角膜から角膜内皮細胞を培養し、凍結保存バンクを調製した。これらの凍結細胞を起眠し、複数の培養条件下で培養して、細胞形態変化を指標に容易に相転移が誘導される群（易相転移性ロット）と誘導されない群（＝健全性を維持する群、難相転移性ロット）とに選別した。両群間の比較解析を行ったところ、細胞老化や接着・細胞骨格に関わる遺伝子等、移植先微小環境における適応能を予測評価するための候補因子が複数同定された。加えて、従来の角膜移植術後の生体内の細胞密度と移植後残部由来培養角膜内皮細胞の品質との相関分析から、培養環境下における安定性は、生体内における細胞の健全度を反映していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療において、移植に供される細胞は、その安全性、有効性を担保するための厳格な品質規格が求められる。一方で、エンドポイントを超えた長期間の予後成績を左右する生体内での安定性に関しては規格化されていないのが現状である。本研究の移植先微小環境に対する適応能の予測評価法の確立に向けた研究成果は、将来的に、長期予後の改善、再手術リスク軽減など、移植を受ける患者の身体的、経済的あるいは精神的負担を大きく減ずることに結び付くと考えられる。

さらに、学術的には、培養角膜内皮細胞における相転移の難易を制御する因子の解明は、ヒト角膜内皮細胞の細胞生物学的挙動を理解するためにも極めて重要である。

研究成果の概要（英文）：Corneal endothelial cells (CECs) were cultured from research donor corneas and cryopreserved. The cell lots from each donor were divided into two groups based on the morphological changes, one in which cell state transition (CST) was easily induced (unstable lot) and the other in which CST was not induced (stable lot). By the DEG analysis between the two groups, some genes related to cellular senescence, adhesion, and the cytoskeleton were identified as candidate factors that could predict and evaluate the adaptability in the recipient microenvironment.

In addition, we found that the quality of cultured corneal endothelial cells from residual peripheral donor corneas was associated with the postoperative corneal endothelial density (ECD) in patients who underwent corneal transplantation. This suggests that the stability of CECs in the culture environment reflects the health of the CECs in the recipient microenvironment.

研究分野：再生医療

キーワード：角膜内皮細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

水疱性角膜症は、角膜の最内層に単層で存在する角膜内皮細胞が、加齢、あるいは手術時の侵襲により減少することで角膜混濁をきたす疾患で、唯一の治療法は角膜移植であった。我々のグループでは、既存の角膜移植術に代わる革新的再生医療である「培養ヒト角膜内皮細胞注入療法」を開発し (Kinoshita, Toda, et al. *New Engl J Med.* 378(11): 995, 2018)、これまでに 60 例を超える水疱性角膜症への臨床研究を実施した。全例において視力改善と角膜正常化、そして高密度な角膜内皮細胞層の再構築に成功し、通常のコルネア移植に優る有効性と安全性を確認してきた。培養ヒト角膜内皮細胞注入療法において根幹となるのは、細胞を懸濁液の状態ですべて注入し、生体内で単層を再建させる術式と注入する細胞を高品質で培養する技術である。ヒト角膜内皮細胞は培養条件下で容易に相転移 (EMT、老化等) を起こし、その本来の機能を減じる、あるいは消失するという課題があったが、培養技術の改良により相転移を起こした細胞をほとんど含まない高純度の細胞を安定的に生産できるようになった (図 1)。原料となるドナー角膜の基準は、ドナー年齢、生体内での細胞密度、死後から保存液に浸漬するまでの時間等を使用しているが、これらに加え、より科学的根拠に基づいた基準を設定することが望まれる。

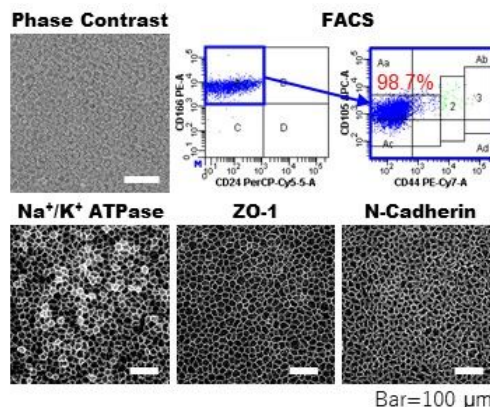


図 1. 高品質な培養角膜内皮細胞

Passage 3 の細胞の位相差像、免疫染色像、表面抗原解析。細胞は見た限りほぼ均質である。

再生医療においては、厳格に品質管理された細胞が使用されるが、規格基準を充足している細胞を投与しても、治療後の長期予後成績には患者ごとに差異がみられる。この原因として、一つは、移植先の生体内微小局所環境 (Soil) が患者ごとに異なることが挙げられる。他方で、移植に供する培養細胞 (Seeds) にも、その一因があると考えられる。移植に供する培養細胞は、定めた品質規格上では同質同等であっても、培養開始前の提供ドナー細胞が異なれば、genetic および epigenetic な背景も異なり、微小環境に対する生体応答は千差万別なはずである。したがって、Soil に由来する因子のみならず、Seeds 由来の因子も長期治療成績に影響を与えることは容易に想像できる。

培養ヒト角膜内皮細胞注入療法においても移植用細胞の高品質化により、治療効果の出現時期、長期予後成績の改善が見られるようになったものの、いまだ患者間の個体差は存在する。この事象に対する本質的な解決策としては、(a) 移植先微小環境 (前房および疾患病態) への治療介入という Soil 側へのアプローチ、そして (b) 様々な Soil 環境において健全性を維持し生体応答の制御が出来る移植培養角膜内皮細胞の選別法の開発という Seeds 側へのアプローチが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、上記 (b) に着目し、さまざまな Soil 環境下でも CST を生じない、あるいは生じにくい移植細胞を選別する方法を確立することを目的とする。このような移植先環境で安定な細胞を生産・選別することができれば、優れた長期予後成績を得ることが可能となる。

前述のように、再生医療において、移植に供する細胞は、安全性は当然のことながら、有効性と相関性の高い品質特性、それを有する細胞の含有率 = 純度などについて厳格な品質規格が求められる。一方で、長期予後成績を左右するエンドポイントを超えた生体内での安定性に関しては、厳格化されていない。生体内における機能に留まらず、移植先微小環境に対する適応能を予測評価する方法が確立できれば、長期臨床成績の改善、再手術リスク軽減などに結び付く。また、培養前の段階でこれを判別できれば、貴重な献眼を目的に応じて選別し、効率よく使用することができるようになる。移植先微小環境に対するヒト角膜内皮細胞の適応能を予測評価する方法を確立し、長期治療成績に優れた移植細胞の選別を実現することが本研究の最終目標である (図 2)。

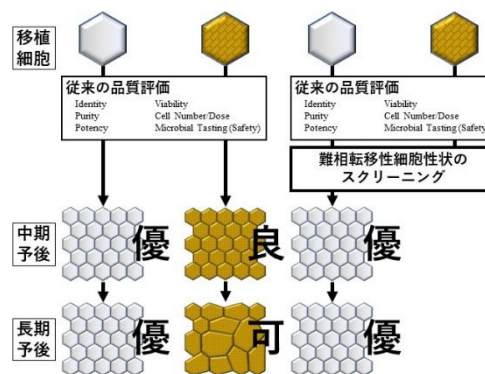


図 2. 長期治療成績を改善するための Seeds 側へのアプローチ

3. 研究の方法

我々は、本研究課題開始時まで、本研究を達成するために必要な以下の2つの手法を確立していた。

① 低 CST 培養法：相転移を抑制しつつ細胞数を約 1000 倍にまで拡大培養できる増幅培養法を確立した。本培養法では、培養ストレスを可能な限り低減しているため、特定因子の添加による相転移を鋭敏に検出できる。

② 凍結保存技術：高品質細胞の凍結保存には高い生存率の達成と相転移の回避という2つの大きな課題があったが、これらを克服し、90%以上の生存率、かつ解凍後の回復培養で相転移を起こさない凍結保存法を確立した。

これらの手法を用いて、下記のとおり実施した。

(1) **培養環境下安定性の異なる培養ヒト角膜内皮細胞凍結保存バンクの作成と In vitro 変性評価**：研究用ドナー角膜から角膜内皮細胞を単離し、コラゲナーゼ処理後に、上記の培養法で拡大培養する。Passage 2 または 3 の時点で相転移を起こしていないロット*を凍結保存し、バンク化する。5 ドナー分以上の角膜から調製する。得られた凍結保存細胞バンクを解凍・再播種し、上記の培養法に変性因子を添加して細胞に暴露し（相転移誘導性の異なる条件下での培養）、細胞の変性度合いを指標に易相転移性群と難相転移性群に分類するとともに、相転移に係わる因子とその経路を推定する。変性因子としては、生体内で ECD の低下や EMT を引き起こすと推定されるサイトカイン (Yamaguchi, IOVS, 2016) や ER ストレスの原因となる代謝産物 (Cabrerizo, Acta Ophthalmol, 2017) 等を用いる。また、我々は、「培養ヒト角膜内皮細胞注入再生医療の高度化」課題において、角膜前房環境を miRNA、SASP を軸に解析しており、これらの情報も活用する。

(2) **トランスクリプトーム解析による健全性破綻経路の推定**：(1) で分類した難相転移性細胞と易相転移性細胞の環境応答の違いを次世代シーケンサー (NGS) によるトランスクリプトーム解析により明らかにする。(1) の相転移誘導性の異なる条件下での培養のうち、顕著にドナー間差が見られる条件を中心に、培養した細胞から RNA を抽出し、RNA-Seq 用ライブラリーを調製する。変性因子添加の有無間で Differential expression analysis を実施し、相転移・病変経路を特定し、角膜内皮細胞の健全性を規定する因子の候補を同定する。得られた候補について個別解析を行い、移植先微小環境に対する適応性を予測評価できる因子を絞り込む。

(3) **従来型角膜移植術 in vivo 成績による検証**：角膜移植をモデルとして、移植予後成績に基づいて解析する (図 3)。

イ) 角膜移植同ドナー由来の培養細胞のバンク化：角膜移植後の海外ドナー角膜輪部から角膜内皮細胞を採取・培養し、凍結保存・バンク化する。50 例を目標とする。

ロ) 角膜移植予後成績との関連づけ：イ) の細胞について、図 1 のフローサイトメーターによる評価を中心とした品質評価を行う。これと角膜移植予後成績の相関分析を行い、培養環境下安定性と移植後生体内安定性との関連を調べる。

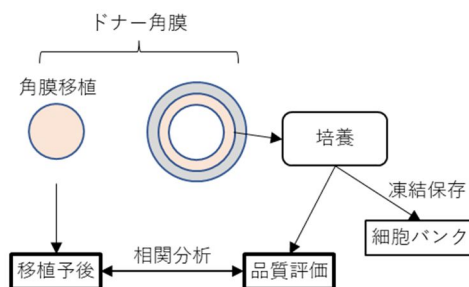


図 3. 方法 (3) の概略図

4. 研究成果

(1) 8 ドナー分の研究用角膜から角膜内皮細胞を単離し、培養後、凍結保存細胞ストックを作成した。これらを解凍し、転移誘導性の異なる 12 種の条件で培養したところ、予想通り、同じ条件であってもドナー間で相転移の起こりやすさに差がみられ (図 4) 培養環境下安定性の異なる培養ヒト角膜内皮細胞のセルバンクを作成することに成功した。これらを細胞の相転移の程度を指標に易相転移性群と難相転移性群に区分した。

8 ドナー中 1 ロットについては 12 培養条件中 1 培養条件でのみしか相転移がみられず、難相転移群の中でも極めて優れた環境耐性を示した。このことから、移植先微小環境に対する応答性に大きな個体差がある可能性が示唆された。

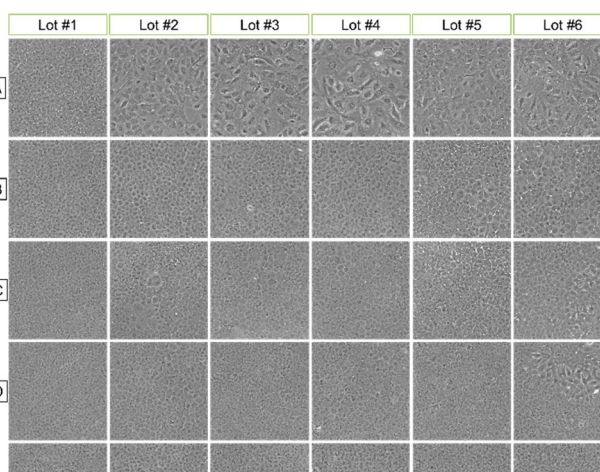


図 4. ドナーによる培養環境下安定性の違い

6 ドナー由来細胞、5 条件での検討結果を例として示した。Lot #1 ではいずれの条件でも相転移はみられなかった。

*本研究では、1 人のドナー角膜に由来する細胞を 1 ロットと称している。

(2) 上記セルバンクの易相転移性群と難相転移性群の各群3ロット(計6ロット)を解凍し、8種類の相転移誘導性の異なる条件下で培養した後、RNAを抽出し、RNAシーケンス用ライブラリを調製した。これらについて、次世代シーケンサー(NovaSeq 6000)による遺伝子発現解析を行い、両群の細胞応答の差異を比較した。その結果、我々が品質評価に用いているCD抗原の発現は、フローサイトメーターでの解析と一致しており、CD166の発現量は全てのロットで差がない一方で、CD44の発現は易相転移性ロットで有意に高かった。さらに、DEG解析を実施し、健全性破綻経路の候補を選定した。その結果、細胞老化に係わるSASP(IL-8 [CXCL8], MCP-1 [CCL2])やCD26等の遺伝子の発現が易相転移群で上昇していた(図5)。加えて、細胞接着、線維化に関わるいくつかの遺伝子群も易相転移群で発現が上昇している一方で、基底膜接着や細胞骨格に関連した一部の遺伝子は、易相転移群で発現が減少していた。以上のように、本研究で、ヒト角膜内皮細胞の健全性に関与すると推測されるいくつかの候補遺伝子を選別できた。

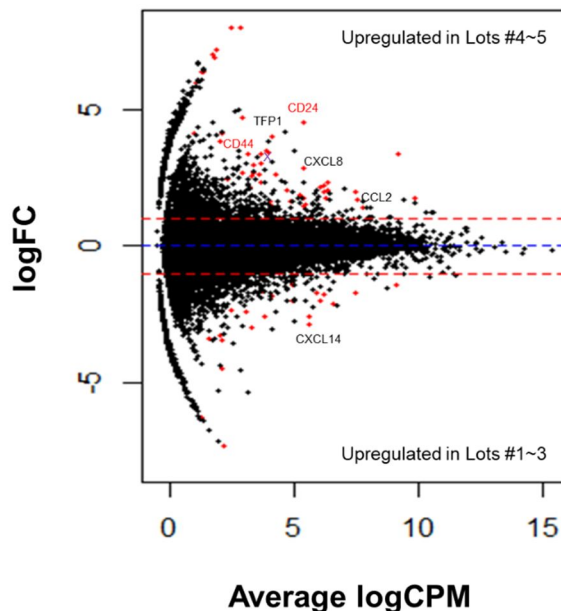


図5. 発現変動遺伝子解析結果 (MA plot) 例として図4の条件Bでの解析結果を示す。ヒト角膜内皮細胞の健全性に関与すると推測されるいくつかの候補遺伝子が抽出された。

(3) 角膜移植手術に使用した後のドナー角膜辺縁残り部分から角膜内皮細胞を採取・培養し、継代時にフローサイトメーターによる品質評価を行った。この結果をもとに、相転移細胞含有率の程度により、3つの群に分類した。各群の角膜移植術における術後の生体内 ECD との相関を調査したところ、その角膜内皮細胞を培養に用いた場合に相転移を起こさず高品質を維持するドナー角膜(相転移細胞含有率少群)は、角膜移植において移植後の生体内での ECD 減少率が低い傾向にあることを見出した(Kitazawa K. et al. Sci Rep. 2022; 3(2):100239、図6)。すなわち、培養環境下における低い相転移性は、生体内における細胞の安定性を反映していることが明らかとなった。このことは、ドナー間で相転移抑制能・移植先環境適応能に差異が存在し、それを *in vitro* の培養ヒト角膜内皮細胞を用いて評価・予測できる可能性があることを示唆している。

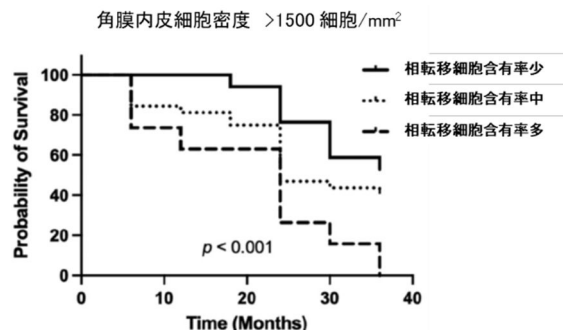


図6. 細胞品質と角膜移植後の生体内細胞密度との相関

上記とは別に、移植後残部からヒト角膜内皮細胞を拡大培養後、凍結保存し、80例分を超えるセルバンクも調製した。今後のより詳細な検討が可能である。

培養環境下に用いた場合に相転移細胞を生じにくいドナー由来の角膜は、移植後の細胞密度が長期間にわたり維持される。

以上のように、本研究課題において、培養環境下での安定性は移植後の生体内の長期予後成績と相関があること、細胞老化、接着、線維化、細胞骨格に関連した一部の遺伝子が培養環境下での安定性に関与していることが明らかとなり、移植先微小環境に対するヒト角膜内皮細胞の適応能を予測評価する方法を確立するための知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kitazawa Koji, Toda Munetoyo, Ueno Morio, Wakimasu Koichi, Tomioka Yasufumi, Uehara Asako, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru	4. 巻 262
2. 論文標題 Donor Corneal Endothelial Cell Maturity and Its Impact on Graft Survival in Glaucoma Patients Undergoing Corneal Transplantation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajo.2024.01.033	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 -

1. 著者名 Kitazawa Koji, Toda Munetoyo, Ueno Morio, Uehara Asako, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru	4. 巻 3
2. 論文標題 The Biologic Character of Donor Corneal Endothelial Cells Influences Endothelial Cell Density Post Successful Corneal Transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ophthalmology Science	6. 最初と最後の頁 100239 ~ 100239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xops.2022.100239	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 -

1. 著者名 Yamashita Tomoko, Asada Kazuko, Ueno Morio, Hiramoto Nao, Fujita Tomoko, Toda Munetoyo, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru, Hamuro Junji	4. 巻 2
2. 論文標題 Cellular Interplay Through Extracellular Vesicle miR-184 Alleviates Corneal Endothelium Degeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ophthalmology Science	6. 最初と最後の頁 100212 ~ 100212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xops.2022.100212	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 -

1. 著者名 Toda Munetoyo, Ueno Morio, Yamada Jun, Hiraga Asako, Asada Kazuko, Hamuro Junji, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru	4. 巻 12
2. 論文標題 Quiescent innate and adaptive immune responses maintain the long-term integrity of corneal endothelium reconstituted through allogeneic cell injection therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-22522-4	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 -

1. 著者名 Morio Ueno, Munetoyo Toda, Kohsaku Numa, Hiroshi Tanaka, Kojiro Imai, John Bush, Satoshi Teramukai, Naoki Okumura, Noriko Koizumi, Akihisa Yamamoto, Motomu Tanaka, Chie Sotozono, Junji Hamuro, Shigeru Kinoshita	4. 巻 237
2. 論文標題 Superiority of Mature Differentiated Cultured Human Corneal Endothelial Cell Injection Therapy for Corneal Endothelial Failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 267 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajo.2021.11.012	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 -

〔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 戸田宗豊、山下智子、北澤耕司、外園千絵、木下茂
2. 発表標題 ヒト角膜内皮細胞の培養下における健全性を規定する因子の探索
3. 学会等名 第128回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2024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	山下 智子 (Yamashita Tomoko) (70470250)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教 (24303)	

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
---------	---------