

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592614

研究課題名(和文) 培養口腔粘膜上皮による眼表面再構築と上皮分化制御による視機能再生への展開

研究課題名(英文) Visual rehabilitation and biological analysis of cultivated oral mucosal epithelium and reconstructed ocular surface

研究代表者

稲富 勉 (Inatomi, Tsutomu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00305583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：正常な角結膜上皮が消失する難治性眼表面疾患の治療には再生医療を用いた眼表面以外の再生上皮を用いた治療戦略の有効性が期待される。口腔粘膜上皮は高い増殖活性や眼表面粘膜との類似性など代用上皮として有用性が高い。培養口腔粘膜上皮移植による眼表面再建治療としての臨床効果について評価できた。培養口腔粘膜上皮は固有組織とは異なる細胞性質を発現してくるが、眼表面に異所的に生着しても眼表面上皮への分化誘導はされず、口腔粘膜特有の粘膜特性や血管新生を誘導し固有の細胞分化を維持していることが確認された。口腔粘膜や移植上皮の細胞分化機転や幹細胞特性の解明は今後の眼表面構造の理解や治療開発に寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：Ocular surface reconstruction using tissue-engineered epithelial transplantation is a new therapeutic modality to overcome severe ocular surface disorders. Oral mucosal epithelium has a high proliferative capacity and similarity with ocular surface suggesting the possible use of alternative epithelium. In this study we have demonstrated that cultivated oral mucosal epithelial transplantation improved the clinical outcome. Biological characters and gene expression patterns of ocular surface epithelium and oral mucosal epithelium were analyzed. Cultivation of oral mucosal epithelium induced the different gene expression profiles, however, the phenotype of surviving transplanted oral mucosal epithelium was the same as in vivo oral mucosal epithelium suggesting that cultivated oral mucosal epithelium does not transdifferentiate into corneal epithelium. These basic findings were expected to contribute for further understanding for ocular surface mechanisms and developing a new therapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：再生医療 角膜上皮 口腔粘膜上皮 眼表面再建 細胞分化 血管新生

1. 研究開始当初の背景

角膜上皮組織は重層扁平上皮で構成され、機能的には眼表面バリアーと屈折機能を担っている。両機能の獲得には正常な重層化と最表層上皮の非角化を特徴とした上皮分化が必須であり、その分化誘導と制御には涙液中の因子や神経制御が深く関与している。組織構築の維持には角膜輪部基底部に存在する上皮幹細胞の永続的な細胞分裂が不可欠である。また角膜の光学特性には組織の透明性と無血管組織が深く関与しており、角膜の血管抑制環境が重要な役割を果たしている。恒常性の崩れる難治性角結膜上皮疾患の病態には、角膜上皮幹細胞疲弊と眼表面上皮分化異常が関与し、眼表面の皮膚化様変化により失明状態に至る。

角膜上皮は高度に分化した組織であり、組織培養での再生は困難であったが、我々は世界に先駆けて羊膜基質を応用することで角膜上皮再生に成功した。この培養粘膜上皮シート移植技術を重症疾患の新規治療方法として応用し、1999年より培養角膜上皮移植、2002年より自己培養口腔粘膜上皮移植による眼表面再生を臨床的にも実現してきた。自家培養口腔粘膜上皮移植では異所的に口腔粘膜上皮を応用することで免疫学的に寛容な眼表面再建が可能であり、その有効性を先端知見として国内外に発信してきた。しかし臨床的な展開の反面、移植上皮の長期複製能や組織再構築のメカニズムに関しては、まだ未解明な問題点が多く残されている。

特に病的な眼表面環境下では角膜血管新生が著明になり、瘢痕化の進行や生着上皮の角化などの上皮の分化異常が発症し視機能的な再生が十分に維持できない。健全な角膜実質を移植することで血管新生が抑制され、基質からの血管新生抑制効果、上皮自身や涙液からの液性因子および前房からの影響因子が上皮表現系に関与していると考えられる。これらの移植後の上皮分化メカニズムの解明と分化制御が実現できれば長期的な眼表面の安定化と長期予後のさらなる向上が期待できる。本研究の目的はこれらの臨床的課題を背景に、異所性に再生した粘膜上皮の病的環境下に適応すべく分化制御と血管新生抑制の可能性を模索するものである。また本研究にて得られる知見は、再生後の上皮コントロール治療として、次世代の再生医療の発展に寄与すると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、角膜上に異所性に生着した口腔粘膜上皮の細胞生物学的特徴を解析し、角化メカニズムの解明や上皮分化の制御機構を検討する。口腔粘膜上皮の幹細胞マーカーである p75 を主体とした上皮分裂能に関連する因子の発現解析と幹細胞の分布

の検索を行い、培養幹細胞移植としての効果を裏付ける。再構築後の角膜表面での p75 陽性細胞の分布を検討し、培養口腔粘膜上皮シートでの p75 陽性細胞の含有比率と上皮創傷治癒効率との相関を検討する

再生組織での血管誘導のメカニズムを解明し、臨床治療として克服できていない再生眼表面の上皮分化制御および血管抑制の可能性を模索する。また口腔粘膜上皮と角膜上皮を比較することで無血管組織である角膜の血管抑制機構を解明する。

3. 研究の方法

1) 培養口腔粘膜上皮移植の臨床効果

培養口腔粘膜上皮移植を用いた瘢痕性角結膜疾患に対する眼表面再建術の有効性をレトロスペクティブに解析した。視力改善を目的とした瘢痕期再建、上皮化を目的とした急性期疾患、結膜嚢再建を目的とした瘢痕性疾患の3群における臨床効果を解析する。

2) 培養上皮と組織での細胞特徴の比較

口腔粘膜および眼表面上皮、それぞれから分離培養した上皮シートでの遺伝子発現を解析する。また免疫組織学的に PAX6 などの眼組織特異的因子、tight junction などの接着因子、ケラチン、ラミニンを主体とした上皮特異的骨格因子、MUC1, 16, 4, 5AC などのムチン関連因子、角化関連因子、血管新生関連因子 TSP1、VEGF、bFGF、さらに p64、p75 などの細胞分裂関連因子について発現パターンを解析する。

3) 眼表面生着後の培養口腔粘膜上皮

眼表面生着上皮の細胞特性を共焦点顕微鏡により観察し、基底細胞密度や表層上皮形態について解析する。また血管新生、上皮重層化、について染色および画像解析により形態解析を行う。

4. 研究成果

1) 培養口腔粘膜上皮移植後の長期眼表面生着と臨床的評価

培養口腔粘膜上皮移植による眼表面再建の臨床効果について検討することができた。急性期症例、角膜再建および結膜再建について有効性を各種臨床パラメーターを用いて評価できた。また風呂レセイン染色性や共焦点レーザー顕微鏡により眼表面での長期生着とその組織構築を明らかにできた。臨床的な有害事象や合併症の頻度について検討し、自己組織移植により従来のアロ移植に比較し感染症、遷延性上皮障害などを低く抑制することができた。

2) 眼表面上生着上皮の生物学的特性

培養口腔粘膜上皮の角膜上皮および結膜上皮との生物学的特性の差異を明確にできた。細胞増殖活性に関与する p75 発現パターンやクローナルアッセイによる増殖活性評価により培養上皮シートには高い増殖能を有していることを証明した。また分化因子であるケラチン発現パターン、MUC16 などの糖

タンパク発現パターンについて解析した。また眼表面での transdifferentiation が部分的には生じているものの、角膜上皮とはことなる表現型を維持していることを示した。

3) 再建眼表面組織の検討

再建後上皮ではフルオレセイン染色性、上皮重層化構造が異なる。特に涙液減少環境では容易に metaplasia を生じ、上皮重層化と血管新生が誘発される。この現象は可逆的であり輪部支持型コンタクトレンズ装用などにより軽減され、移植後の術後管理としては重要な利点となった。また神経再生が生じない状態でも高い増殖能が維持されている。

4) 新生血管誘導と制御

口腔粘膜上皮では TSP1 などの血管新生抑制因子の発現がないため移植後早期から血管新生およびリンパ管新生が生じる。この現象は抗 VEGF 点眼により抑制することができ、炎症期における血管新生を同薬剤にて臨床的にも抑制可能であった。しかし抗 VEGF 薬剤には口腔粘膜上皮に対する増殖抑制作用があることが示され、バランスのとれた使用が必須であると考えられた。

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 19 件)

Upregulation of Toll-like receptor 5 expression in the conjunctival epithelium of various human ocular surface diseases. Yamada K, Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. Br J Ophthalmol. 2014. 査読あり

LRIG1 as a Potential Novel Marker for Neoplastic Transformation in Ocular Surface Squamous Neoplasia. Nagata M, Nakamura T, Sotozono C, Inatomi T, Yokoi N, Kinoshita S. PLoS One. 9(4):e93164, 2014. 査読あり

Clinical outcomes in descemet stripping automated endothelial keratoplasty with internationally shipped precut donor corneas. Nakagawa H, Inatomi T, Hieda O, Sotozono C, Yokoi N, Iliakis B, Miller TD, Ulrickson C, Kinoshita S. Am J Ophthalmol. 157(1):50-55, 2014. 査読あり

Interaction between conjunctival epithelial cells and mast cells induces CCL2 expression and piecemeal degranulation in mast cells. Iwamoto S, Asada Y, Ebihara N, Hori K,

Okayama Y, Kashiwakura J, Watanabe Y, Kawasaki S, Yokoi N, Inatomi T, Shinomiya K, Murakami A, Matsuda A. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013, 3;54(4):2465-73. PMID:23482464 査読あり

Immunohistochemical analysis of inflammatory limbal conjunctiva adjacent to Mooren's ulcer. Shinomiya K, Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Yokoi N, Koizumi N, Kinoshita S. Br J Ophthalmol. 2013 ;97(3):362-6. PMID:23292924 査読あり

Visual improvement after cultivated oral mucosal epithelial transplantation. Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Yokoi N, Ueta M, Matsuyama K, Miyakoda K, Kaneda H, Fukushima M, Kinoshita S. Ophthalmology. 2013;120(1):193-200. PMID:23084239 査読あり

Expression of prostaglandin E receptor subtype EP4 in conjunctival epithelium of patients with ocular surface disorders: case-control study. Ueta M, Sotozono C, Yamada K, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. BMJ Open. 2012 ;2(5). PMID: 23065448 査読あり

Clinical outcomes of phototherapeutic keratectomy in eyes with Thiel-Behnke corneal dystrophy. Hieda O, Kawasaki S, Wakimasu K, Yamasaki K, Inatomi T, Kinoshita S. Am J Ophthalmol. 2013;155(1):66-72. PMID: 22967865 査読あり

HLA-A*0206 with TLR3 polymorphisms exerts more than additive effects in Stevens-Johnson syndrome with severe ocular surface complications. Ueta M, Tokunaga K, Sotozono C, Sawai H, Tamiya G, Inatomi T, Kinoshita S. PLoS One. 2012;7(8):e43650. PMID:22912896 査読あり

HLA-class I gene polymorphisms in Japanese Stevens-Johnson syndrome patients with ocular surface complications. Nakaji S, Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Kinoshita S. Nihon

Ganka Gakkai Zasshi. 2012 Jun;116(6):581-7.

PMID:22774598 査読あり

Indications and surgical outcomes of amniotic membrane transplantation. Hino T, Sotozono C, Inatomi T, Fukuoka H, Nakamura T, Nagata M, Koizumi N, Morio K, Yokoi N, Kinoshita S.

Nihon Ganka Gakkai Zasshi. 2012 ;116(4):374-8.

PMID:22645931 査読あり

Filaggrin mutations are not associated with chronic allergic keratoconjunctivitis. Iwamoto S, Ebihara N, Hori K, Funaki T, Asada Y, Yokoi N, Inatomi T, Kawasaki S, Murakami A, Matsuda A. Br J Ophthalmol. 2012;96(9):1272-3. PMID: 22635822 査読あり

Comparison of corneal and aqueous humor penetration of moxifloxacin, gatifloxacin and levofloxacin during keratoplasty. Fukuda M, Yamada M, Kinoshita S, Inatomi T, Ohashi Y, Uno T, Shimazaki J, Satake Y, Maeda N, Hori Y, Nishida K, Kubota A, Nakazawa T, Shimomura Y. Adv Ther. 2012 ;29(4):339-49.

PMID:22529026 査読あり

Epistatic interaction between Toll-like receptor 3 (TLR3) and prostaglandin E receptor 3 (PTGER3) genes. Ueta M, Tamiya G, Tokunaga K, Sotozono C, Ueki M, Sawai H, Inatomi T, Matsuoka T, Akira S, Narumiya S, Tashiro K, Kinoshita S. J Allergy Clin Immunol. 2012;129(5):1413-1416. PMID: 22421267 査読あり

Prostaglandin E receptor subtype EP3 expression in human conjunctival epithelium and its changes in various ocular surface disorders. Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. PLoS One. 2011;6(9):e25209. PMID: 21966456 査読あり

Mathematical projection model of visual loss due to fuchs corneal dystrophy. Hatou S, Shimmura S, Shimazaki J, Usui T, Amano S, Yokogawa H, Kobayashi A, Zheng X, Shiraishi

A, Ohashi Y, Inatomi T, Tsubota K. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 7;52(11):7888-93. PMID:21873666 査読あり

Ocular surface reconstruction using the combination of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation and eyelid surgery for severe ocular surface disease. Takeda K, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Watanabe A, Kinoshita S. Am J Ophthalmol. 2011;152(2):195-201. PMID: 21652025 査読あり

The blood-aqueous barrier breakdown in eyes with endothelial decompensation after argon laser iridotomy. Higashihara H, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. Br J Ophthalmol. 2011;95(7):1032-4. PMID:21436177 査読あり

Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S. Br J Ophthalmol. 2011;95(7):942-6. PMID: 21097786 査読あり

〔学会発表〕(計 11 件)

Tsutomu Inatomi, Takahiro Nakamura, Noriko Koizumi, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita: Update of Ocular Surface Reconstruction Using Cultivated Epithelial Sheet Transplantation. The 24th Asia-Pacific Association of Cataract and Refractive Surgeons, Seoul, 2011.10.14

稲富 勉 . 角膜再生医療と白内障手術 . 第 26 回日本白内障屈折矯正手術学会、福岡市、2011.6.19.

稲富 勉 : 角膜上皮移植のサイエンス. 第 115 回日本眼科学会総会、東京、2011.5.12

稲富 勉 : 培養粘膜上皮移植を用いた新しい術式と手術コンセプト. 第 115 回日本眼科学会総会、東京、2011.5.13.

稲富 勉、外園 千恵、中村 隆宏、小泉 範子、都田 桂子、松山 琴音、木下 茂 . 自家培養口腔粘膜上皮シート移植による結膜嚢再建効果の検討 第 65 回日本臨床眼科学会、東京国際フォーラム、2011.10.8.

外園 千恵、稲富 勉、中村 隆宏、小泉 範子、横井 則彦、都田 桂子、松山 琴音、木下 茂 . 難治性角結膜疾患に対する自家培養口腔粘膜上皮シート移植のレトロスペクティブ調査 第 65 回日本臨床眼科学会、東京国際フォーラム、2011.10.8.

T Inatomi. Treatment for Severe Ocular Surface Diseases 3rd Asia Corneal Society Meeting. 2012.11.29 Manila

T Inatomi. Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. 第28回アジア太平洋眼科学会 Asia-Pacific Academy of Ophthalmology (APAO)(招待講演) 2013. 1.16 Hyderabad

T Inatomi. Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. 23rd Iranian congress of Ophthalmology 2013. 10.29 Teheran

T Inatomi. Updated Ocular Surface Reconstruction using Tissue-Engineered Epithelial Sheet Transplantation. 23rd Iranian congress of Ophthalmology 2013. 10.30 Teheran

T Inatomi. New Strategy for Ocular Surface Reconstruction using Cultured Epithelial Sheet Transplantation. The 10th Japan-Taiwan Joint Meeting. 2013.12.1 Taiwan

〔図書〕(計 1 件)

Stevens-Johnson 症候群 (眼科疾患最新の治療 2013-2015): P98 (大橋裕一、白神史雄、南江堂) 2013.6.15

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

稲富 勉 (INATOMI、 Tsutomu)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号 : 00305583

(2)研究分担者

川崎 論 (KAWASAKI Satoshi)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号 : 60347458

丸山和一 (Maruyama Kzuichi)
東北大学・大学病院

講師

研究者番号 : 10433422

(3)連携研究者

()

研究者番号 :