

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月1日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究B

研究期間：2011～2012

課題番号：23791998

研究課題名（和文） 上皮間葉移行制御による水疱性角膜症に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文） Development of new therapy for corneal endothelial dysfunction by modulating epithelial-mesenchymal transition

研究代表者：

奥村 直毅（OKUMURA NAOKI）

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号：10581499

研究成果の概要（和文）：角膜内皮細胞は TGF ベータシグナルの活性化により、機能を喪失し、線維化関連のタンパク質を発現し EMT を生じることを明らかにした。さらに、TGF ベータ受容体阻害剤を用いることで、角膜内皮細胞の EMT を阻害して機能を維持できることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

We established an optimum condition for the cultivation of HCECs. When exposed to culture conditions, both primate and human CECs showed two distinct phenotypes; contact-inhibited polygonal monolayer and fibroblastic phenotypes. The use of SB431542, a selective inhibitor of the transforming growth factor-beta (TGF- β) receptor, counteracted the fibroblastic phenotypes to the normal contact-inhibited monolayer, and these polygonal cells maintained endothelial physiological functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	429,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：

キーワード：角膜移植、角膜内皮細胞、Rho キナーゼ阻害剤、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

角膜内皮細胞は、ポンプ機能とバリア機能を有し、角膜の透明性の維持に不可欠な細胞である。Fuchs 角膜内皮ジストロフィ、加齢、外傷、眼科手術などにより角膜内皮障害が生じると、角膜が不可逆的に混濁し重症の視覚障害をきたす（水疱性角膜症）。水疱性角膜症に対しては、現在唯一の治療法として、ドナー角膜を用いた角膜移植が行われている。しかしながら、水疱性角膜症に対する角膜移植の治療成績は必ずしも良好ではなく、角膜移植に伴う種々の合併症、ドナー不足、患者への高負荷も克服すべき問題であり患者に優しい斬新な新規治療法の開発が強く望まれている。水疱性角膜症患者の角膜内皮においては、細胞密度の低下、線維芽細胞様への

転換が問題点として認識されている。

2. 研究の目的

臨床応用が見込まれる研究成果として、上皮間葉移行（EMT）誘導に拮抗し臨床適用可能な多数の薬剤の *in vitro* におけるスクリーニングを行い、

①TGF- β 拮抗物質、②選択的 Rho キナーゼ阻害剤、③PPAR γ アゴニストなどの有効性を確認している。これらの範疇に含まれる薬剤はそれぞれ、骨折治療薬、脳血管系治療薬、糖尿病治療薬として臨床応用されており安全性は高く、本課題の水疱性角膜症における角膜内皮機能喪失に対する治療薬剤に供するに、眼科領域においても臨床応用の可能性が非常に高いと考えられる。これらの薬剤

の角膜内皮細胞の EMT に与える影響を検討することで、水疱性角膜症治療の開発に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

3-1. 角膜内皮細胞の EMT 制御による角膜内皮機能維持・獲得を目指した基礎研究
培養ヒトおよびサル角膜内皮細胞に対して TGF β により EMT を誘導し、EMT 関連分子の発現解析を行う。また、細胞間接着関連分子およびポンプ機能関連分子の発現解析を行い、EMT による機能喪失について検討する。さらに TGF- β 拮抗物質、選択的 Rho キナーゼ阻害剤、PPAR γ アゴニストの EMT 抑制による、角膜内皮機能維持・獲得効果および作用メカニズムについて検討する。

2. 薬剤を用いた角膜内皮の EMT 制御による新規治療法の開発

ウサギを用いて角膜冷凍凝固による EMT モデルを作製し、上記の薬剤投与による、EMT 制御、角膜内皮機能維持・獲得効果について角膜組織のフラットマウントによる免疫組織学的解析、リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析を行う。また、薬剤の投与経路、薬剤用量、副作用について検証し、臨床応用にむけた最適な薬剤適用法を開発する。

4. 研究成果

角膜内皮障害は角膜の混濁を生じ重症の視力障害の原因となるが、角膜内皮障害時に角膜内皮細胞が上皮間葉移行

(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) により角膜内皮機能を喪失するという着想のもと研究を実施し、角膜内皮細胞の EMT を低分子薬剤により抑制すること可能であり、角膜内皮の EMT による機能喪失を遮断できることを見出した。角膜内皮細胞は TGF ベータシグナルの活性化により、機能を喪失し、線維化関連のタンパク質を発現し EMT を生じることを明らかにした。さらに、TGF ベータ受容体阻害剤を用いることで、角膜内皮細胞の EMT を阻害して機能を維持できることを見出した。この知見は申請者らが進めている角膜内皮再生医療に応用可能であり現在 First in man による臨床研究の細胞培養の最終プロトコルに応用している。またさらには EMT 制御による角膜内皮障害治療という新規の分野の可能性を示し、創薬を視野に入れた開発を行う基盤的技術を開発した。

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 6 件) すべて査読有り

1. Okumura N, Kay EP, Nakahara M, Hamuro J, Kinoshita S, Koizumi N:

Inhibition of TGF- β signaling enables human corneal endothelial cell expansion in vitro for use in regenerative medicine. PLoS ONE 8(2):e58000, 2013

2. Hatanaka H, Koizumi N, Okumura N, Takahashi H, Tanioka H, Young RD, Jones FE, Quantock AJ, Kinoshita S: A Study of Host Corneal Endothelial Cells After Non-Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. Cornea. 32(1):76-80, 2012.

3. Hatanaka H, Koizumi N, Okumura N, Kay EP, Mizuhara E, Hamuro J, Kinoshita S: Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Phenotypic Changes of Retinal Pigment Epithelium Induced by TGF β are Prevented by PPAR γ Agonists. Invest Ophthalmol Vis Sci, 53(11):6955-63. 2012

4. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, et al: A ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. Am J Pathol. 181(7): 268-277, 2012

5. Yamamoto M, Quantock AJ, Young RD, Okumura N, Ueno M, Sakamoto Y, Kinoshita S, Koizumi N; A selective inhibitor of the Rho kinase pathway, Y-27632, and its influence on wound healing in the corneal stroma. Mol Vis. 18:1727-39, 2012

6. Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S: Development of new therapeutic modalities for corneal endothelial disease focused on the proliferation of corneal endothelial cells using animal models. Exp Eye Res. 95(1): 60-67. 2012.

[学会発表] (計 49 件)

1. 北野絢嗣、奥村直毅、上野盛夫、中原マキコ、沼田諒平、坂本雄二、羽室淳爾、木下茂、小泉範子: Rho キナーゼ阻害剤を併用した培養角膜内皮細胞移植の開発. 第 12 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2013.

2. 迎田生、齋藤高志、北野絢嗣、奥村直毅、

- 小泉範子、田畑泰彦: 選択的 Rho キナーゼ阻害剤徐放化ポリ乳酸粒子の作製. 第 12 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2013.
3. 沼田諒平、奥村直毅、Kay EunDuck、中原マキコ、上野盛夫、木下茂、小泉範子: Rho キナーゼ阻害剤の角膜内皮細胞に対する増殖促進作用機序の検討. 第 12 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2013.
 4. 奥村直毅、辻本勇氣、Kay EunDuck、沼田諒平、太田礼、上野盛夫、羽室淳爾、木下茂、小泉範子: Rho キナーゼ阻害剤の培養角膜内皮細胞に対する基質接着性促進機序の検討. 第 12 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2013.
 5. 奥村直毅: 角膜内皮再生医療の実現化に向けて. 卓越した大学院拠点 合同リポート, 滋賀, 2013.
 6. 小林正和、中村隆宏、安田誠、畑結衣子、大倉翔貴、奥村直毅、小泉範子、久育男、木下茂: 難治性眼表面疾患に対する培養鼻粘膜上皮シートの開発. 角膜カンファレンス 2013 第 37 回日本角膜学会総会・第 29 回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.
 7. 中野新一郎、奥村直毅、北野絢嗣、太田礼、坂本雄二、羽室淳爾、上野盛夫、木下茂、小泉範子: ROCK 阻害剤 Y-39983 の角膜内皮細胞増殖に対する効果の検討. 角膜カンファレンス 2013 第 37 回日本角膜学会総会・第 29 回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.
 8. 迎田生、齋藤高志、北野絢嗣、奥村直毅、木下茂、田畑泰彦、小泉範子: ポリ乳酸粒子を用いた選択的 Rho キナーゼ阻害剤徐放化の検討. 角膜カンファレンス 2013 第 37 回日本角膜学会総会・第 29 回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.
 9. 辻本勇氣、奥村直毅、Eunduck P Kay、沼田諒平、上野盛夫、羽室淳爾、木下茂、小泉範子: Rho キナーゼ阻害剤の培養角膜内皮細胞に対する接着促進機序の検討. 角膜カンファレンス 2013 第 37 回日本角膜学会総会・第 29 回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.
 10. 小田嶋愛、奥村直毅、Eunduck P Kay、陳文、上野盛夫、木下茂、小泉範子: Rho キナーゼ阻害剤の角膜内皮細胞に対するアポトーシス抑制効果の検討. 角膜カンファレンス 2013 第 37 回日本角膜学会総会・第 29 回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.
 11. 沼田諒平、奥村直毅、Eunduck P Kay、中原マキ子、上野盛夫、木下茂、小泉範子: Rho キナーゼ阻害剤の霊長類角膜内皮細胞に対する増殖促進機序の解明. 角膜カンファレンス 2013 第 37 回日本角膜学会総会・第 29 回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.
 12. 奥村直毅、椎名隆、鈴木進悟、中村紳一朗、坂本雄二、上野盛夫、羽室淳爾、木下茂、松山晃文: 霊長類水疱性角膜症モデルを用いた培養角膜内皮細胞注入療法の有用性および安全性評価. 角膜カンファレンス 2013 第 37 回日本角膜学会総会・第 29 回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.
 13. 北野絢嗣、奥村直毅、山崎健太、中原マキ子、上野盛夫、羽室淳爾、木下茂、小泉範子: ウサギ水疱性角膜症モデルを用いた培養角膜内皮細胞注入療法の開発. 角膜カンファレンス 2013 第 37 回日本角膜学会総会・第 29 回日本角膜移植学会, 和歌山, 2013.
 14. Okumura N: Paradigm Shift for Corneal Endothelial Regeneration, 28th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress. 2013. INDIA
 15. 奥村直毅: 角膜内皮の再生医療. 日本角膜移植学会・日本角膜学会共催懇談会「角膜再生医療の最先端と将来展望」, 京都 2012.
 16. 奥村直毅: 角膜内皮障害に対する新しい治療法の開発, 第 21 回動物生命科学研究所センター学術講演会, 滋賀 2012.
 17. 奥村直毅: 水疱性角膜症に対する新しい治療法の開発, 参天製薬講演会, 京都 2012.
 18. 奥村直毅: 角膜内皮治療の新たな展開, 第 116 回日本眼科学会総会, 東京 2012.
 19. 北野絢嗣、奥村直毅、山崎健太、中原マキ子、沼田諒平、上野盛夫、羽室淳爾、木下茂、小泉範子: ウサギ水疱性角膜内皮症モデルを用いた培養角膜内皮細胞注入療法の開発. 第 33 回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012.
 20. 小泉範子、奥村直毅、坂本雄二、中原マキ子、山崎健太、土屋英明、上野盛夫,

- 羽室淳爾, 木下茂: ヒト培養角膜内皮細胞を用いた角膜内皮前房注入の試み. 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012.
21. 奥村直毅, 小泉範子, 坂本雄二, 上野盛夫, 羽室淳爾, 木下茂: 角膜内皮機能不全患者に対する Rho キナーゼ阻害剤点眼の有用性の検討. 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012.
 22. 沼田諒平, 奥村直毅, 中原マキ子, 上野盛夫, 木下茂, 金村米博, 笹井芳樹, 小泉範子: ヒト脱落膜由来間葉細胞から作成したマトリクスを用いたヒト角膜内皮細胞培養法の検討. 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012.
 23. 小泉範子, 奥村直毅, 上野盛夫, 坂本雄二, 山崎健太, 鳥居隆三, 羽室淳爾, 木下茂: 霊長類水疱性角膜症モデルを用いた培養角膜内皮細胞注入治療の開発. 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012.
 24. 奥村直毅, 小泉範子, 坂本雄二, 上野盛夫, 鳥居隆三, 羽室淳爾, 木下茂: 角膜内皮障害に対する選択的 Rho キナーゼ阻害剤点眼の有用性の検討. 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012.
 25. 畑中宏樹, 奥村直毅, 小泉範子, 水原英理, 羽室淳爾, 木下茂: PPAR γ 作動薬による霊長類網膜色素上皮細胞の線維性変化への影響, 第116回日本眼科学会総会, 東京 2012
 26. 奥村直毅, 小泉範子, 坂本雄二, 上野盛夫, 羽室淳爾, 木下茂: 水疱性角膜症患者における選択的 Rho キナーゼ阻害剤点眼の有用性の検討, 第116回日本眼科学会総会, 東京 2012.
 27. 小泉範子, 奥村直毅, 坂本雄二, 山崎健太: ヒト培養角膜内皮細胞を用いた角膜内皮前房注入治療の試み, 第116回日本眼科学会総会, 東京 2012
 28. Numata R, Okumura N, Nakahara M, Ueno M, Kinoshita S, Kanemura Y, Sasai Y, Koizumi N: Cultivation of human corneal endothelial cells on a pericellular matrix prepared from human decidua-derived mesenchymal cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2012. USA
 29. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Yamasaki K, Torii R, Hamuro J, Kinoshita S: Rock inhibitor eye drops accelerate corneal endothelium wound healing in a primate model. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2012. USA
 30. Hatanaka H, Okumura N, Koizumi N, Mizuhara E, Hamuro J, Kinoshita S: Effect of the PPAR γ agonist on the fibrotic change in primate retinal pigment epithelial cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2012. USA,
 31. Koizumi N, Okumura N, Sakamoto Y, Yamasaki K, Nakahara M, Torii R, Ueno M, Hamuro J, Kinoshita S: Cell-injection therapy using cultivated human corneal endothelial cells in a primate model. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2012. USA,
 32. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Yamasaki K, Torii R, Hamuro J, Kinoshita S: Rock inhibitor eye drops accelerate corneal endothelium wound healing in a primate model. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2012. USA
 33. Okumura N: New Therapeutic Modality of Using ROCK Inhibitor for Corneal Endothelial Disease, 27th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress. 2012.KOREA
 34. 平田香菜, 中村隆宏, 外園知恵, 稲富勉, 奥村直毅, 小泉範子, 横井則彦, 木下茂: 結膜扁平上皮眼における GPR49 の発現の検討, 角膜カンファレンス 2012 第36回日本角膜学会総会・第28回日本角膜移植学会, 東京, 2012.
 35. 奥村直毅, 小泉範子, 坂本雄二, 鳥居隆三, 上野盛夫, 羽室淳爾, 木下茂: 霊長類角膜内皮障害モデルを用いた選択的 Rho キナーゼ阻害剤点眼治療法の開発, 角膜カンファレンス 2012 第36回日本角膜学会総会・第28回日本角膜移植学会, 東京, 2012.
 36. Leona T. Y. Ho, Bruce Caterson, Keith M. Meek, Andrew J. Quantock, Naoki Okumura Noriko Koizumi: Elevated keratan sulphate in the corneal stroma cultured at low oxygen tension, 角膜カンファレンス 2012 第36回日本角膜学会総会・第28回日本角膜移植学会, 東京, 2012.

37. 沼田諒平、奥村直毅、中原マキ子、上野盛夫、木下茂、金村米博、笹井芳樹、小泉範子: ヒト脱落膜由来間葉細胞から作成したマトリクスを用いたヒト角膜内皮細胞培養法の検討, 角膜カンファレンス、2012 第 36 回日本角膜学会総会・第 28 回日本角膜移植学会, 東京,2012.
38. 奥村直毅: 水疱性角膜症に対する新しい治療法の開発. 角膜カンファレンス 2012 第 36 回日本角膜学会総会, 第 28 回日本角膜移植学会, 学術奨励賞受賞記念講演, 東京 2012.
39. 小泉範子, 奥村直毅, 上野盛夫, 羽室淳爾, 木下茂: 角膜内皮再生医療の現状と展望, 第 65 回日本臨床眼科学会, 東京 2011.
40. 小泉範子、奥村直毅、山崎健太、上野盛夫、坂本雄二、高橋浩昭、鳥居隆三、羽室淳爾、木下茂: 水疱性角膜症に対する培養角膜内皮細胞注入治療の試み, 第 32 回日本炎症・再生医学会, 京都, 2011
41. 奥村直毅、小泉範子、上野盛夫、坂本雄二、高橋浩昭、鳥居隆三、羽室淳爾、木下茂: 角膜内皮機能不全に対する選択的 Rho キナーゼ阻害剤点眼治療法の開発, 第 32 回日本炎症・再生医学会, 京都, 2011
42. 畑中宏樹、奥村直毅、小泉範子、羽室淳爾、木下茂: PPAR γ 作動薬による網膜色素上皮細胞および硝子体細胞の線維性変化への影響, 第 65 回日本臨床眼科学会, 東京 2011.
43. Kyoko Kumagai, Noriko Koizumi, Naoki Okumura, Kenta Yamazaki, Morio Ueno, Yuji Sakamoto, Nagahisa Yoshimura, Junji Hamuro, Shigeru Kinoshita. ROCK Inhibition Regulates the Cell Adhesion of Corneal Endothelial Cells: Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, USA. 2011.
44. Noriko Koizumi, Naoki Okumura, Kenta Yamasaki, Morio Ueno, Yuji Sakamoto, Hiroaki Takahashi, Ryuzo Torii, Junji Hamuro, Shigeru Kinoshita: Cell-Injection Therapy using Cultivated Corneal Endothelial Cells Combined with a ROCK Inhibitor in a Primate Model. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, USA. 2011.
45. Naoki Okumura Noriko Koizumi, Kenta Yamasaki, Morio Ueno, Yuji Sakamoto, Yoshihiro Sowa, Toshiyuki Sakai, Junji Hamuro, Shigeru Kinoshita: ROCK Inhibitor Regulates the G1-S Progression of Corneal Endothelial Cells. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, USA. 2011.
46. Hatanaka H, Okumura N, Koizumi, N, Hamuro J, Kinoshita S: Effect of PPAR γ agonist on the fibrotic change in retinal pigment epithelium and vitreous cells. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, Florida, USA. 2011.
47. Okumura N: ROCK inhibitor as a new therapeutic modality for corneal endothelial dysfunction. 5th International Symposium of the UCSD-Doshisha Medical Imaging Research Center, San Diego, USA, 2011.
48. Okumura N: The New Therapeutic Modality of Using a Rho Kinase (ROCK) Inhibitor for the Treatment of Corneal Endothelial Dysfunction. TERMIS Singapore. 2011.
49. Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S: New strategy for corneal endothelial tissue engineering, Schepens Eye Research Institute 27th Biennial Cornea Conference. 2011 USA

〔その他〕

ホームページ
 ティッシュエンジニアリング研究室
<http://tissue-engineering-doshisha.jp/>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
 奥村 直毅 (OKUMURA NAOKI)
 同志社大学・生命医科学部・助教
 研究者番号: 10581499
- (2)研究分担者
 該当なし
- (3)連携研究者
 該当なし