

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462695

研究課題名(和文) 再生医療による眼表面粘膜バリアーの再構築と重症瘢痕性疾患への応用

研究課題名(英文) Regeneration of the ocular surface mucosal barrier and clinical application for severe cicatrizing diseases

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)・講師

研究者番号：00305583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：重症眼表面疾患は角結膜上皮幹細胞が消失し、重度の視力障害と瘢痕形成をきたすが、再生医療を用いた培養粘膜上皮移植治療により治療成績を向上させてきた。本研究により、再建された眼表面では口腔粘膜上皮が角結膜上皮には変化せず、細胞特性を維持していること解明した。さらに3T3線維芽細胞やウシ血清など動物由来物質に依存しない新しい培養法を開発し、他の自家細胞ソースとして鼻腔粘膜上皮を応用することで杯細胞を含む眼表面再建が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Severe ocular surface disease lost corneal and conjunctival epithelial stem cells, resulting in severe visual impairment and scar formation. We have developed cultured mucosal epithelial transplantation therapy using regenerative medicine and improved the outcome of treatment. In this study, we analyzed the survived epithelium and proved that the oral mucosal epithelium does not change to the ocular surface epithelium and maintains original cell characteristics. Furthermore, we have developed a new culturing method independent of xeno materials and cultivated epithelial sheets using nasal mucosal epithelium as other cell source. As an alternative cell source, we used nasal mucosal epithelium to generate the cultivated sheet containing goblet cells for ocular surface reconstruction.

研究分野：眼科学と再生医療

キーワード：再生医療 眼表面 角結膜 粘膜バリアー 細胞分化 杯細胞 重層扁平上皮 瘢痕性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

眼表面は角膜および結膜の二つの異なる上皮により構成され、その表面は涙液により被覆され安定した視機能とバリアー機能を維持している。この役割を果たすためには、他の上皮系組織や粘膜組織と異なる、さまざまな眼表面特有の細胞特性と組織構築が必要となる。角膜は透明性を維持した無血管組織でありと同時に重層扁平上皮による粘膜バリアーが表層上皮に備わっている。結膜では杯細胞からのムチン関連因子の分泌や免疫学的な防御機構が備わり眼表面を感染などの攻撃因子から防御している。

重症の瘢痕性角結膜疾患である熱・化学外傷や内因性疾患であるスティーブンス・ジョンソン症候群や眼類天疱瘡は、眼科疾患の中でも極めて予後が不良であり、慢性期治療においても角膜上皮障害や合併症などが多く、治療管理が難しい。これらの疾患群の共通点として、角膜上皮幹細胞が消失し、さらに結膜上皮幹細胞の減少や結膜下組織の異常増殖による瘢痕化が病態として存在する。角膜上皮幹細胞が疲弊すると角膜表面は結膜上皮で被覆され高度の血管新生と角膜混濁を生じる。この病態の外科的治療としては、ドナーの角膜上皮幹細胞を直接的に組織として移植する角膜輪部移植が行われてきた。しかし、眼表面環境での免疫反応は全層角膜移植などに比較して強く、同種移植での角膜上皮移植は高率に拒絶反応を生じるため長期にわたり免疫抑制が必要となる。またドライアイや慢性炎症の環境下においては遷延性上皮欠損や角膜潰瘍などの合併症が問題となる。その臨床的な課題を克服するためには、自家組織を用いた移植再建方法を確立する、高い増殖能や分化細胞を移植する再生医療を開発する、細胞移植により機能的に喪失した眼表面の環境回復を行う、神経再生を獲得させるなどの、従来の移植医療では不可能な成果を再生医療や新しい治療に求められている。本研究では、1999年より臨床応用してきた培養角膜上皮移植、さらに2001年より実施してきた培養口腔粘膜上皮移植の問題点を克服し、さらに重症眼表面疾患への新しい治療の道筋を切り開くための基礎研究と臨床応用を目指している。

## 2. 研究の目的

本研究では難治性眼表面疾患の治療の向上を目標に、再生医療を応用した新しい培養粘膜上皮移植の開発と眼表面に異所性に生着した眼表面以外の粘膜上皮の解析と代用粘膜による視機能回復と眼表面バリアーの再建を研究目的とした。

(1) 培養口腔粘膜移植治療の問題点の解析。2001年より培養口腔粘膜上皮移植を臨床応用し、眼表面疾患の治療に成果を上げてきた。一方、培養口腔粘膜上皮は本来の組織と異なる細胞特性と組織構築が形成されるが、治療

の長期効果においても未解決な問題点や改良すべき点も多く存在する。本研究では治療症例の臨床経過および臨床的問題点をレトロスペクティブに解析し、臨床効果と問題点を解析することを目的とした。

### (2) 異所性生着上皮の解析。

口腔粘膜上皮は本来の口腔組織において維持されている粘膜型の重層扁平上皮である。また粘膜分泌細胞としての杯細胞への分化能がないこと、臨床的には角膜上皮と異なり血管新生を誘導する上皮特性をもつ。本研究では培養口腔粘膜上皮として異所性に眼表面に生着した上皮の組織特性について検討し、今後の再生医療における改良点を模索することを目的とした。

### (3) 新規培養方法の確立と改良。

本研究までに開発してきた培養口腔粘膜上皮移植は従来の角膜上皮培養方法を基盤としており、マウス由来の3T3線維芽細胞との共培養とウシ由来の血清成分を培養方法に応用してきた。今後のより安全な再生医療に対しては動物由来成分による培養系の確立が必須であり、新しい培養方法の確立を目的とした。

### (4) 多種の細胞ソースを用いた培養粘膜上皮移植の探索。

培養口腔粘膜上皮には杯細胞への分化機能がないとされている。重症の瘢痕性眼表面疾患では結膜上皮の病的変化により結膜幹細胞が消失し、臨床的には結膜組織の短縮や結膜下組織の線維化により瞼球癒着を生じる。杯細胞は眼表面に分泌型ムチンであるMUC5ACを供給し、その他にもトレフォイル因子など眼表面上皮の保護、涙液の安定被覆、感染防御機構としての役割を果たしている。口腔粘膜上皮以外の杯細胞含有粘膜を応用することで、疲弊した杯細胞供給と2次的な臨床効果を期待することができる。本研究では鼻腔粘膜などの新規粘膜の眼表面再建への応用の可能性を模索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養口腔粘膜上皮移植の臨床効果に関する解析

培養口腔粘膜上皮移植を施行した症例をレトロスペクティブに解析し、移植後早期の血管新生やコンタクトレンズ装用後の視力変化や上皮変化について生体共焦点顕微鏡などを用いて解析した。

### (2) 異所性生着培養口腔粘膜上皮の解析

培養口腔粘膜上皮移植により再建された症例で、角膜混濁が強度のため2期的に角膜移植を施行した症例の組織サンプルを用いて細胞特性について免疫組織学的に解析した。

### (3) 再建後角膜の角膜知覚

培養口腔粘膜上皮移植により再建された眼表面の角膜知覚再生状態を知覚計であるコンボネ角膜知覚計を用いて測定し、神経再生状態に関して生体共焦点顕微鏡を用いて観

察した。

(4) ゼノフリーによる新規培養方法の開発  
従来の培養方法に含まれる動物由来因子である3T3線維芽細胞とウシ胎児血清を用いない培養方法を開発した。培養液への添加物の効果を検討し、作成できた培養口腔粘膜上皮シートの組織的な解析、粘膜上皮や増殖関連因子の発現検索、さらに増殖能の比較にはコロニー形成能や p75 発現量を比較検討した。また家兎への移植実験により生着上皮の組織特性を免疫組織学的手法により解析した。

(5) 鼻腔粘膜上皮を用いた培養上皮シート作成と杯細胞誘導の検討

鼻腔粘膜より上皮成分を抽出し、培養と分化誘導を羊膜上に行い、上皮特性の解析と杯細胞の誘導の有無を検討した。杯細胞の機能的な解析には組織学的検討に加え、分泌型ムチンである MUC5AC の発現能について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 培養口腔粘膜上皮移植の臨床効果と血管新生。

培養口腔粘膜上皮は重篤な合併症なく移植することが可能であり、スチーブンス・ジョンソン症候群では術後 24 週間までは有意な視力改善が得られている。血管新生は周辺部に術後早期より観察され、術後 3 から 6 か月をピークに伸展するが、それ以降は活動性が低下する。長期的には眼表面炎症の慢性化や再燃により血管新生の増加やドライアイなどの眼表面環境により移植上皮の肥厚性変化が観察される。口腔粘膜上皮移植後には眼表面での知覚は著しく低下しており、羊膜基質を超えての神経再生は観察されない。今後の移植後の組織管理においては、血管新生の制御および神経再生が課題であり、抗 VEGF や NGF などの抗血管新生因子や神経再生因子の薬物治療の開発が課題である。

(2) 異所性に生着した培養口腔粘膜上皮の形態と細胞特性。

異所性に生着した培養口腔粘膜上皮は基質として同時に移植した羊膜上に生着し、十分な接着構造が観察されたが、上皮重層化は症例や部位により 1 - 2 層の菲薄化したものから 8 層程度の肥厚や錯角化が観察された。特に重症ドライアイ症例では細隙灯顕微鏡検査においても上皮肥厚および角化傾向が観察され、輪部支持型コンタクトレンズ装用に耐えうる上皮強度が再生されていると考えられた。細胞特性としてはオリジナルの発現パターンと同様に K13 や K3 の発現が観察されたが、角膜上皮に特異的な K12 は誘導されず、また眼表面上皮に必須であるホメオボックス遺伝子である PAX 6 遺伝子は誘導されず、眼表面上皮への分化転換を示唆する因子は観察されなかった。

(3) ゼノフリーによる新規培養法の確立。  
将来的な再生医療では、長期的な細胞安全性と使用される生体材料等での安全性が求められている。無血清・無フィーダー法による

次世代の培養口腔粘膜上皮シート移植術の開発に成功している。従来の DMEK/F12 を基盤とした培養液に B27、EGF、KGF、Rock 阻害剤である Y-27632、EGCG、Hydrocortisone、Dextran 40 などを添加することで羊膜上で無血清・無フィーダー状態で有効性の高い培養口腔粘膜上皮シートの作成が可能となった。従来の方法と同様の角膜組織構築に類似した 3-5 層の重層化した移植上皮シートが作成された。臨床的に病的眼表面では正常異常に高い増殖能を求められるが、コロニー形成能は従来の方法と同程度であり、さらに総細胞数は有意に高い培養細胞数が可能となった。組織構造においても生着を左右するデスモゾームを主体とした接着構造が電子顕微鏡でも観察された。免疫組織学的な検索においても、タイトジャンクション関連蛋白である ZO1 や接着因子である Desmoplakin の発現が誘導された。基底膜構成蛋白(collagen 7, Laminin 5)や粘膜上皮特性であるケラチン 13 や角膜類似ケラチンである K3 などの発現も維持され上皮シートとして十分な細胞特性が誘導されていることが示された。またこの培養系では増殖能の高い細胞とされる holoclone タイプの含有とさらにマーカーとされる p75 の発現誘導が観察され、今後さらに含有率の高い細胞シート作成への期待が高まった。家兎モデルでの移植においても上皮シート特性は移植後 14 日でも維持されて生着していることが確認された。さらに生着後の K12 発現や DNA チップによる遺伝子解析では従来の方法よりより角膜上皮に近い細胞特性が獲得されており、今後の再生医療への高い貢献が期待される成果が得られている。

(4) 口腔粘膜上皮以外の新規粘膜上皮の応用。

鼻腔粘膜からの培養上皮作成では KGF 添加により杯細胞への分化誘導が可能となった。この杯細胞からは結膜上皮杯細胞と同様に MUC5AC ムチンの発現と分泌が確認でき、代用結膜としての有効性が期待できた。難治性眼表面疾患では角膜上皮幹細胞の疲弊や結膜上皮分化異常が存在し、新しい再生医療による治療として口腔粘膜上皮や鼻腔粘膜上皮を用いた代用再建治療につながる有意義な研究結果が得られている。

(5) 本研究の国際的評価と位置づけ。

培養口腔粘膜上皮移植の概念および技術開発は日本での研究により確立され国際的にも注目と評価を得ている。自家組織を再生医療的に増幅および組織変化させ、病的部位に異所性に移植する方法は、従来の移植法では達成できない治療方法である。特に重症の眼表面疾患である角膜上皮幹細胞疲弊症やさらに慢性炎症を背景とする癬痕性角結膜疾患への利点は大きく、さらに鼻腔粘膜上皮などによる杯細胞移植は新しい治療の道筋を拓くものとして国際的にも注目期待されている。

## 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 18 件)

1. White TL, Lewis PN, Young RD, Kitazawa K, Inatomi T, Kinoshita S, Meek KM. Elastic microfibril distribution in the cornea: Differences between normal and keratoconic stroma. *Exp Eye Res*. 査読有 2017;159:40-48. DOI:28315339
2. Kitazawa K, Sotozono C, Koizumi N, Nagata K, Inatomi T, Sasaki H, Kinoshita S. Safety of anterior chamber paracentesis using a 30-gauge needle integrated with a specially designed disposable pipette. *Br J Ophthalmol*. 査読有 2017;101(5):548-550. DOI:28100481
3. Kitazawa K, Kayukawa K, Wakimasu K, Yokota I, Inatomi T, Hieda O, Mori K, Sotozono C, Kinoshita S. Cystoid Macular Edema after Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *Ophthalmology*. 査読有 2017;124(4):572-573. DOI:27986384
4. Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, Sotozono C, Kinoshita S, Masui S. PAX6 regulates human corneal epithelium cell identity. *Exp Eye Res*. 査読有 2017;154:30-38. DOI:27818314
5. Koizumi N, Miyazaki D, Inoue T, Ohtani F, Kandori-Inoue M, Inatomi T, Sotozono C, Nakagawa H, Horikiri T, Ueta M, Nakamura T, Inoue Y, Ohashi Y, Kinoshita S. The effect of topical application of 0.15% ganciclovir gel on cytomegalovirus corneal endotheliitis. *Br J Ophthalmol*. 査読有 2017;101(2):114-119. DOI:27142389
6. Nakamura T, Yokoo S, Bentley AJ, Nagata M, Fullwood NJ, Inatomi T, Sotozono C, Yamagami S, Kinoshita S. Development of functional human oral mucosal epithelial stem/progenitor cell sheets using a feeder-free and serum-free culture system for ocular surface reconstruction. *Sci Rep*. 査読有 2016 ;6:37173. DOI:27841343
7. Morikawa K, Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, Yokoi N, Matsuo Y, Kinoshita S. Indication and Efficacy of Amniotic Membrane Transplantation Performed under Advanced Medical Healthcare. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 査読有 2016;120(4):291-5. DOI:27209857
8. Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, Mitsunaga K, Tanaka A, Nakamura M, Yamakawa T, Furukawa S, Takasaka M, Goshima N, Watanabe A, Okita K, Kawasaki S, Ueno M, Kinoshita S, Masui S. OVOL2 Maintains the Transcriptional Program of Human Corneal Epithelium by Suppressing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Rep*. 査読有 2016 10;15(6):1359-68. DOI:27134177
9. Lekhanont K, Jongkhajornpong P, Chuephanich P, Inatomi T, Kinoshita S. Boston Type 1 Keratoprosthesis for Gelatinous Drop-Like Corneal Dystrophy. *Optom Vis Sci*. 査読有 2016;93(6):640-6. DOI:26990741
10. Jongkhajornpong P, Nakamura T, Sotozono C, Nagata M, Inatomi T, Kinoshita S. Elevated expression of ABCB5 in ocular surface squamous neoplasia. *Sci Rep*. 査読有 2016;6:20541. DOI:26843453
11. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res*. 査読有 2016;51:187-207. DOI:26187034
12. Jongkhajornpong P, Nakamura T, Sotozono C, Inatomi T, Kinoshita S. Phenotypic Investigation of Regenerated Epithelial Cells After Gonococcal Corneal Perforation: A Clinical, Histological, and Immunohistochemical Study. *Cornea*. 査読有 2015;34(11):1508-12. DOI:26203757
13. Nakamura T, Hata Y, Nagata M, Yokoi N, Yamaguchi S, Kaku T, Kinoshita S. JBP485 promotes tear and mucin secretion in ocular surface epithelia. *Sci Rep*. 査読有 2015 21;5:10248. DOI:25996902
14. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Shiraishi A, Ohashi Y, Kandori M, Miyazaki D, Inoue Y, Soma T, Nishida K, Takase H, Sugita S, Mochizuki M, Kinoshita S; Japan Corneal Endotheliitis Study Group. Clinical features and management of cytomegalovirus corneal endotheliitis: analysis of 106 cases from the Japan corneal endotheliitis study. *Br J Ophthalmol*. 査読有 2015;99(1):54-8. DOI:25075122
15. Amemiya T, Nakamura T, Yamamoto T, Kinoshita S, Kanamura N. Autologous transplantation of oral mucosal epithelial cell sheets cultured on an amniotic membrane substrate for intraoral mucosal defects. *PLoS One*. 査読有 2015 ;10(4):e0125391. DOI:25915046
16. Kobayashi M, Nakamura T, Yasuda M, Hata Y, Okura S, Iwamoto M, Nagata M, Fullwood NJ, Koizumi N, Hisa Y, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction with a tissue-engineered nasal mucosal epithelial cell sheet for the treatment of severe ocular

surface diseases. Stem Cells Transl Med. 査読有 2015;4(1):99-109. DOI:25411478

17. Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Yokoi N, Ueta M, Matsuyama K, Kaneda H, Fukushima M, Kinoshita S. Cultivated oral mucosal epithelial transplantation for persistent epithelial defect in severe ocular surface diseases with acute inflammatory activity. Acta Ophthalmol. 査読有 2014;92(6):e447-53. DOI:24835597
18. Yamada K, Ueta M, Sotozono C, Yokoi N, Inatomi T, Kinoshita S. Upregulation of Toll-like receptor 5 expression in the conjunctival epithelium of various human ocular surface diseases. Br J Ophthalmol. 査読有 2014;98(8):1116-9. DOI:24820048

[学会発表](計 13 件)

1. 稲富 勉, Management of bilateral limbal stem cell deficiency. Cultivated oral mucosal epithelial transplantation is the treatment of choice. American Society of Cataract and Refractive Surgery 2017、2017.5.5. ロサンゼルス (米国)
2. 稲富 勉, 角膜再生医療: Progress and Limitation. 角膜カンファレンス 2017、1017.2.16. アクロス福岡(福岡、福岡市)
3. 中村隆宏, 無血清・無フィーダー法による次世代の培養口腔粘膜上皮シート移植術の開発、角膜カンファレンス 2017、2017.2.16. アクロス福岡(福岡、福岡市)
4. 稲富 勉, Real Advantages of COMET for SJS. 2st international Stevens-Johnson syndrome symposium. 2017.1.21. ハートンホテル京都(京都・京都市)
5. 中村隆宏, Ocular surface reconstructoin using defined culture system for severe ocular surface diseases. 2st international Stevens-Johnson syndrome symposium. 2017.1.21. ハートンホテル京都(京都・京都市)
6. 稲富 勉, 最新 & 最善の眼表面疾患のマネージメント. 第 70 回日本臨床眼科学会、2016.11.3 京都国際会議場、(京都、京都市)
7. 稲富 勉, Evolution of Advanced Corneal Surgery Present and Future. 28<sup>th</sup> Myanmar Ophthalmological Conference、2016.10.25、ヤンゴン(ミャンマー)
8. 稲富 勉, Leading Advancements in the Clinical Management and Surgical Treatment of Stevens-Johnson Syndrome、10<sup>th</sup> Kpro Study Group Meeting、2016.4.19、ウエスティン都ホテル、(京都、京都市)

9. 稲富 勉, 瘢痕性変化を“見逃さない” ~ 瘢痕性角結膜上皮症 ~、角膜カンファレンス 2016、2016.2.18 軽井沢プリンスホテル(長野、軽井沢市)

10. 稲富 勉, Medical and Surgical Management in Chronic SJS. 2nd Ocular Surface and Kpro Meeting、2015.6.12.チェンナイ(インド)
11. 稲富 勉, Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress (APAO 2015)、2015.4.3. 広州(中国)
12. 稲富 勉, Evolution of Advanced Corneal Surgery : Present and Future . Aisa ARVO、2015.2.19. ヨコハマグランドインターコンチネンタルホテル(横浜、横浜市)
13. 稲富 勉, Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation (COMET) for Ocular Surface Reconstruction “What are real clinical advantages?” 4<sup>th</sup> Asia Cornea Society Biennial Scientific Meeting、2014.11.12 台北(台湾)

[図書](計 1 件)

1. 稲富 勉, 中山書店、角膜混濁のすべて、専門医のための眼科診療クオリファイ 25 : 培養口腔粘膜上皮移植について教えてください。2015 . pp284-286.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

稲富 勉 (INATOMI, Tsutomu)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号 : 00305583

(2)研究分担者

中村 隆宏 (NAKAMURA, Takahiro)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 30411078