



同志社大学先端医工学研究センター

発行 / 2017年4月

同志社大学先端医工学研究センター

検索



私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

難治性角膜疾患に対する
トランスレーショナル研究の推進と
国際的研究拠点の形成

2014～2016年度研究成果報告書

同志社大学先端医工学研究センター

Advanced Biomedical Engineering Research Center, Doshisha University

同志社大学先端医工学研究センター

Advanced Biomedical Engineering Research Center, Doshisha University



🌐 ホームページ

<http://www.tissue-engineering-doshisha.jp/center/>

同志社大学先端医工学研究センター

検索



CONTENTS

目次

02 ————— ごあいさつ

03 ————— 研究センターへのメッセージ

04 ————— 研究センター設置の目的と研究テーマ

05 ————— 研究成果の概要

　　テーマ1. 医工連携・産学連携による角膜再生医療の開発と産業化の推進

　　12 ————— テーマ2. 難治性角膜疾患の病態解明と治療薬の開発

15 ————— 研究体制

　　研究センターメンバー・共同研究者

17 ————— 海外共同研究者からのメッセージ

20 ————— 研究業績一覧

　　英文原著論文

　　22 ————— 教科書・総説

　　23 ————— 国際学会発表

　　28 ————— 国内学会発表

　　33 ————— その他特別講演など

34 ————— 特許出願

35 ————— 研究成果公開シンポジウム

36 ————— 謝辞

ごあいさつ

同志社大学
先端医工学研究センター センター長
小泉 範子



■ 先端医工学研究センターについて

先端医工学研究センターは、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業および同志社大学の支援を受けて、2014年に同志社大学研究開発推進機構に設置された研究センターです。本研究センターでは研究課題「難治性角膜疾患に対するトランスレーショナル研究の推進と国際的研究拠点の形成」の実現に向けて、同志社大学に研究拠点を形成し、医工連携、国際連携によるトランスレーショナル研究を行います。本事業は5年間のプログラムであり、2016年度末で3年目の区切りを迎えることになりましたので、研究成果の中間報告として本冊子を作成いたしました。



■ 先端医工学研究センターの特徴

本研究センターの特徴は、同志社大学を中心とする“3つの連携”です。一つ目は専門領域や大学の枠を超えた医工連携です。本課題は数年前に生命医科学部医工学科から提案し、趣旨に賛同した医学系、工学系教員が研究センターに参画し、研究室の枠を超えた大学院生の共同指導などを通じて、将来の医学や医療の発展に役立つ新たな研究成果を創生しようとしています。また、同志社大学と研究・教育に関する包括協定を締結し、様々な交流を行っている京都府立医科大学からも、眼科学、ゲノム医科学、分子標的癌予防医学の各分野のエキスパートの先生方に学外メンバーとして参加していただき、医療機器の開発や臨床研究、角膜疾患の遺伝子解析、治療薬の開発にご協力を

いただいております。二つ目に国際連携です。本研究センターの使命は、優れた研究成果を国内外に発信し、同志社大学に難治性角膜疾患研究の国際的研究拠点を形成することです。そこで、すでに研究者レベルでの交流があった米国メイヨークリニック、英国カーディフ大学、ドイツエルランゲン大学の先生方に本研究センターに参画していただき、同志社大学と世界トップレベルの研究機関との国際的な連携関係の構築を進めております。三つ目は社会との連携、すなわち産学連携です。本研究センターで開発する新しい診断・治療技術や治療薬は、企業と連携して製品化することで世界中の病気に苦しむ多くの患者や医療者に届けることができます。そのため本研究センターでは、研究開発推進機構のもとにあるリエゾンオフィスや知的財産センターの協力を得て、企業との共同研究を実施しながら、同志社独自の知的財産権の確保に努めています。



皆様のご協力のもと、本研究センターは順調に研究成果を出しながら3年目を終えることができました。何よりも研究センターを核とした新たな共同研究体制が生まれ、大学院生や海外からのポスドク、研究者との交流が進んだことが最大の成果であると考えます。

これからも皆様のご理解とご協力をいただき、同志社大学の優れた研究成果を世界に向けて発信できるよう、研究センター関係者一同努力してまいりたいと存じます。今後ともどうぞよろしくお願い申し上げます。

2017年4月1日

研究センターへのメッセージ

同志社大学 副学長
研究開発推進機構 機構長
横川 隆一



再生医療というと iPS 細胞を思い浮かべますが、その臨床応用には時間が必要でしょう。しかし、たくさんの人々が今、角膜の疾患に苦しんでいます。iPS 細胞という一つの治療法にとどまらず、いろいろな視点からの解法が求められます。本センター長である小泉範子教授は、「角膜内皮細胞は再生しない」という医学の常識を覆し、その再生化に成功されました。これまで他の治療に使われている薬を応用することによって、その画期的な手法が確立されたという点においても、臨床応用に最も近い治療法です。研究力はもちろんのこと、常識に対する疑問をもち、立ち向かう勇気にも、敬意を表します。

本センターの特徴の一つである医学と工学の連携は、再生医療を効果的に進める上で重要な要素の一つです。しかし、実質的に連携し、研究を進めることのできる環境を構築することは非常に難しく、簡単には進みません。本センターの中核となる研究者が所属する本大学生命医科学部医工学科は、その点で最適な環境です。研究だけではなく、教育の面でも日ごろから議論しあえる環境が、研究者間の信頼関係をさらに密にしています。センター長のお人柄とリーダーシップで、研究グループをまとめ、医工連携を国際的にも展開され、目覚ましい研究成果を上げられています。製薬企業や自治体など社会との連携をさらに強め、角膜の難病に苦しむ人々の目が再び希望の光で輝くように、さらなる研究成果を期待しています。



研究センター設置の目的

- ・重症の視覚障害の原因となる難治な角膜疾患の病気のメカニズムを明らかにし、新しい治療法を開発します。
- ・角膜再生医療の基盤技術の開発実績を持つ同志社大学に研究センターを設置し、医工連携、産学連携による国際的トランスレーショナル研究拠点を形成します。
- ・大学院生や若手研究者を育成し、同志社大学における次世代中核研究者の育成、研究基盤の形成に貢献します。

研究テーマ

テーマ 1 医工連携・産学連携による角膜再生医療の開発と産業化の推進

(グループリーダー：小泉 範子)

同志社大学では、角膜内皮細胞が障害されることによって角膜の濁りと視力障害を来す水疱性角膜症に対する再生医療の開発に取り組み、細胞注入治療による世界初の角膜内皮再生医療の開発に貢献しました。本研究センターでは、下記の課題に取り組むことで、角膜再生医療の実用化と国際的な普及に向けた研究開発を行います。

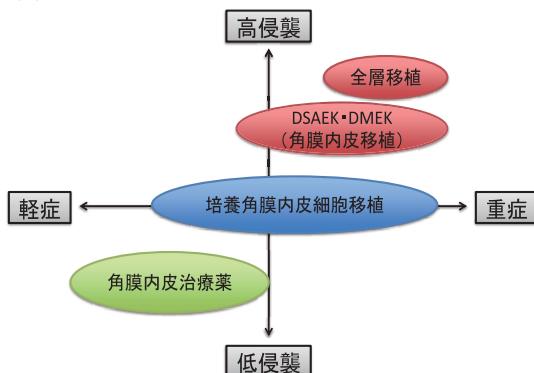
1. 企業治験に適用可能なヒト角膜内皮培養法の開発
2. 細胞外マトリクスを用いた細胞移植治療の高効率化
3. 角膜移植後の慢性炎症の病態解明と制御法の開発
4. 角膜内皮疾患治療のための診断・治療デバイスの開発

テーマ 2 難治性角膜疾患の病態解明と治療薬の開発

(グループリーダー：奥村 直毅)

角膜移植以外に有効な治療法のない難治性疾患である“フックス角膜内皮ジストロフィ”を主たるターゲットとし、疾患の発症および進行のメカニズムを解明し、点眼薬による新しい治療法を開発します。フックス角膜内皮ジストロフィは角膜移植の原因の主たるものであり、本研究センターでは、下記の課題に取り組み、角膜移植に代わる薬物療法の開発を目指した研究開発を行っています。

1. フックス患者より樹立した疾患モデル細胞などを用いた病態のメカニズムの解明
2. フックス患者由来ゲノム、角膜内皮組織の解析による遺伝的背景の解析
3. 疾患モデル細胞を用いた薬剤の効果、作用機序の解明
4. 疾患モデルマウスの作成および、薬剤の効果判定



再生医療および病態解明に基づいた創薬ターゲットの同定により、低侵襲かつ治療効果の高い新規角膜治療法の開発を行う。本研究センターの究極の目的は、サイエンスを基に社会のニーズに応じた真の医療を開発することである。

研究成果の概要

研究テーマ 1 医工連携・产学連携による角膜再生医療の開発と産業化の推進

同志社大学では2003年に設置された寄付教育研究プロジェクト・再生医療研究センター（2011年より炎症・再生医療研究センターに改称）および2008年に新設された生命医学部において角膜内皮再生医療の開発に取り組み、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を行った。本プロジェクト開始までに、文部科学省、厚生労働省、JSTなどからの公的研究費を得て、英文医学論文153編、特許出願16件を行うなどの実績を有する。さらに、これらの成果を臨床医学に還元するため、ヒト角膜内皮細胞培養技術および細胞注入移植のノウハウなどの基盤技術を2012年に京都府立医科大学に技術移転した。これらの基礎研究データおよび動物を用いた前臨床試験データをもとに、世界初の細胞注入治療のFirst-in-Man臨床試験が2013年12月に開始された。

本プロジェクトでは、眼科医である医工学科の奥村直毅准教授、小泉範子教授が京都府立医科大学の客員教員として細胞注入治療の臨床試験に参加し、2017年4月までに約30例の細胞注入治療を実施した。さらに臨床試験から得られた安全性および有効性の向上、企業における製品化に向けた課題を抽出し、同志社大学の研究室へフィードバックした。

2016年度までに行った主たる研究実績を以下に示す。これらの研究の一部は、製薬企業などとの共同研究である。

角膜内皮再生医療の概要図



京都府立医科大学に技術移転し、医師主導型臨床研究として2013年に世界初となるヒトにおける培養角膜内皮細胞注入を実施。
現在(2017年4月)までに30名を超える患者で安全性、有効性を確認しつつある。

【課題 1】移植細胞の細胞密度が細胞注入治療の治療効果に与える影響

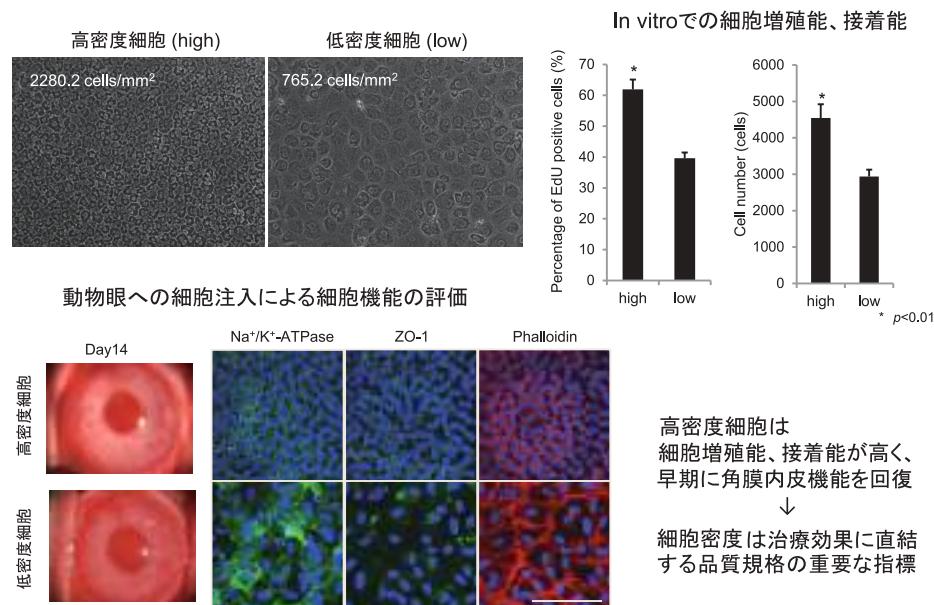
細胞注入治療は、生体外で培養した角膜内皮細胞を前房内に注入移植することによって生着させる画期的な治療技術である。基質を用いない移植であるため、角膜の生理的な構造が維持され、角膜乱視が少なく透明性の高い角膜の再生が期待されている。これまでの臨床研究においても、手術後に角膜が透明化し、良好な視力回復が得られている。

一方で、移植された細胞が生体内で機能を発揮し、角膜が透明化するまでは数週間の時間がかかるることは解決するべき課題である。また、移植後に長期間にわたって良好な視力を維持するためには、高密度の角膜内皮細胞が生着することが望まれる。

そこで本プロジェクトでは、これらの臨床的治療効果と、移植前の培養角膜内皮細胞の細胞密度の関連性に着目した。まず、高密度と低密度の培養角膜内皮細胞の細胞増殖能、細胞接着能を *in vitro* の系で比較し、さらにウサギ水疱性角膜症モデルに移植を行って *in vivo* での

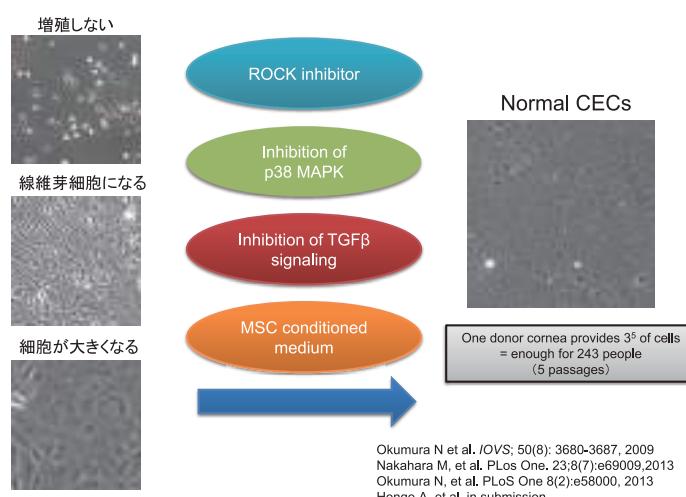
機能および最終的な生体内での細胞密度を比較した。その結果、高密度細胞は低密度細胞に比較して、細胞増殖能、細胞接着能が高く、注入移植後に早期に角膜の透明化が得られ、移植後により高密度の角膜内皮層を再建できることが明らかとなった。以上の結果より、角膜内皮細胞密度は細胞の機能に密接に関連する因子であり、品質規格の基準の一つとして有用であることを示した。

- Okumura N, Kusakabe A, Hirano H, Inoue R, Okazaki Y, Nakano S, Kinoshita S, Koizumi N: Density-gradient centrifugation enables the purification of cultured corneal endothelial cells for cell therapy by eliminating senescent cells. Sci Rep. 7;5: 15005, 2015.



【課題 2】高機能な移植用角膜内皮細胞を効率的に培養するための技術開発

正常な角膜内皮細胞は六角形を主とする多角形単層細胞からなる。しかし増殖能に乏しいヒト角膜内皮細胞を生体外で培養すると、線維芽細胞様に形質転換するとともに細胞密度が低下し、角膜内皮細胞としての機能が低下する。本プロジェクトでは、細胞培養液と培養基質のそれぞれに関し、新たな細胞培養技術の開発を行った。



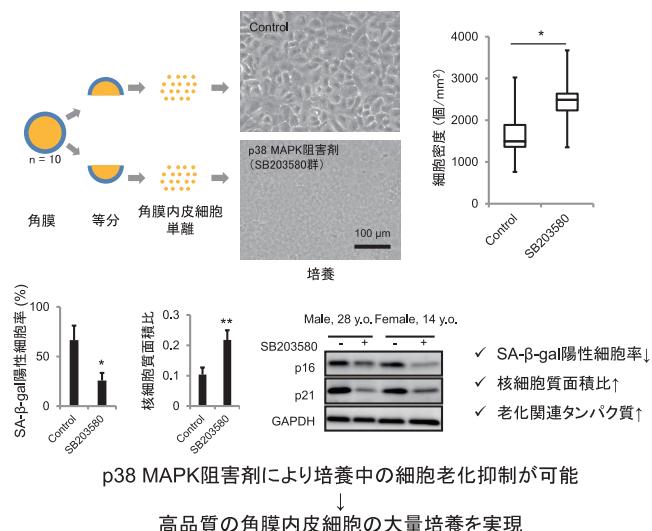
複数の基盤技術の開発により角膜内皮細胞の大量培養法の確立

■ p38MAP キナーゼ阻害剤による細胞老化の抑制

ヒト角膜内皮細胞培養における形質転換や細胞密度の低下は培養によるストレスによって生じる p38MAP キナーゼ経路の活性化による細胞老化に関連するものであり、p38 MAP キナーゼ阻害剤を培養液中に添加して細胞老化を抑制することにより、高品質なヒト角膜内皮細胞を生産できることを示した。

・本郷茜，奥村直毅，中原マキ子，小泉範子：p38 MAP キナーゼ阻害剤の角膜内皮の細胞老化への影響 . 第 16 回日本再生医療学会総会
2017

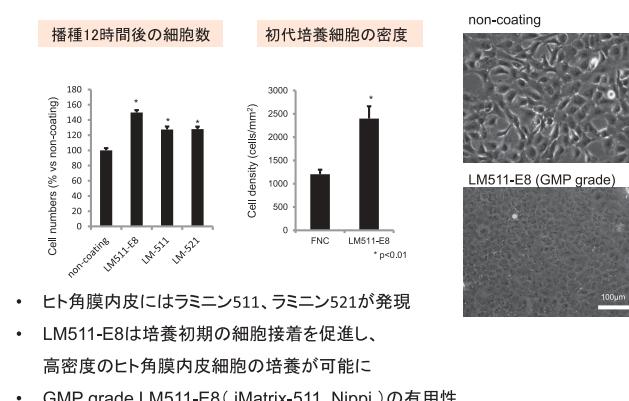
・Hongo A, Okumura N, Koizumi N, et al. in revision



■ ラミニン 511-E8 フラグメントを用いた高密度内皮細胞の培養

正常なヒト角膜内皮細胞の基質を構成しているラミニンのサブタイプを PCR および免疫染色により同定し、ラミニン (LM)511 および 521 であることを明らかにした。さらにそれらのラミニンでコーティングをした培養皿で培養することにより、高密度で良好な形態を示すヒト角膜内皮細胞の培養が可能であった。さらに、インテグリン結合能を有する LM511-E8 フラグメントの組み換えタンパクを用いた効率的なヒト角膜内皮細胞培養が可能であることを示した。本製品は再生医療用の細胞調整のための GMP 製品がすでに販売されており、臨床用培養角膜内皮細胞の細胞調整に有用であると考えられた。本研究はドイツ Erlangen 大学との共同研究である。

・Okumura N, Kakutani K, Inoue R, Matsumoto D, Shimada T, Nakahara M, Kiyanagi Y, Itoh T, Koizumi N: Generation and feasibility assessment of a new vehicle for cell-based therapy for treating corneal endothelial dysfunction. PLoS ONE. 11(6): e0158427. 2016.



角膜内皮基底膜成分の同定とGMP gradeラミニンフラグメントによる培養の効率化

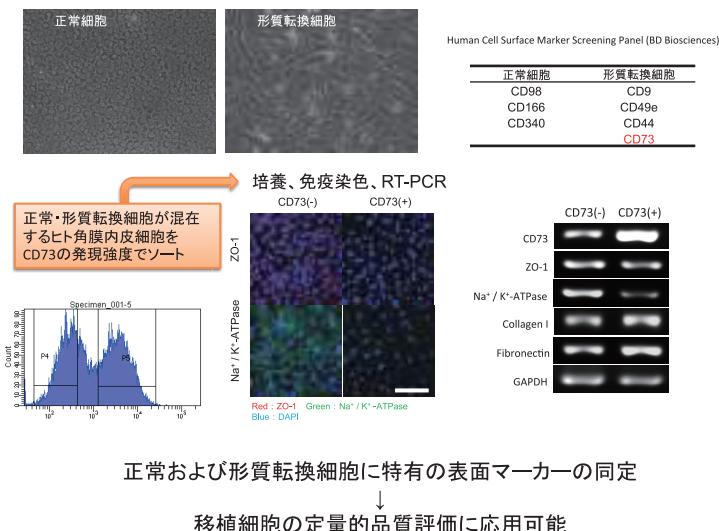
【課題3】移植に適した細胞を同定、分離するための技術の確立

細胞を用いた再生医療では、移植に適した細胞の品質規格の設定が必要であり、また細胞に対するダメージの少ない方法で細胞を分離する技術の開発が望まれている。本プロジェクトでは、形質転換した角膜内皮細胞を、正常な角膜内皮細胞と識別するための細胞表面マーカーの探索および培養角膜内皮細胞の品質評価のための画像解析ソフトの開発、さらに形質転換した細胞を細胞に優しい手技によって分離することを試みた。

■ 培養角膜内皮細胞の形質転換における細胞表面マーカー探索

フローサイトメトリーを用いた表面抗原の解析により、線維芽細胞様の形質転換細胞と、正常な細胞にそれぞれ特異的に発現しているCDマーカーを複数見出した。形質転換細胞と正常細胞が混在するヒト角膜内皮細胞を、形質転換細胞マーカーの一つであるCD73の発現強度によりソーティングを行い、2群の細胞を分離し、再び培養することによってCD73陰性細胞は正常角膜内皮細胞の機能に関するマーカーの発現が高いことを確認した。以上のことから、これらのCDマーカーは移植用角膜内皮細胞の品質規格に有用であると考えられた。

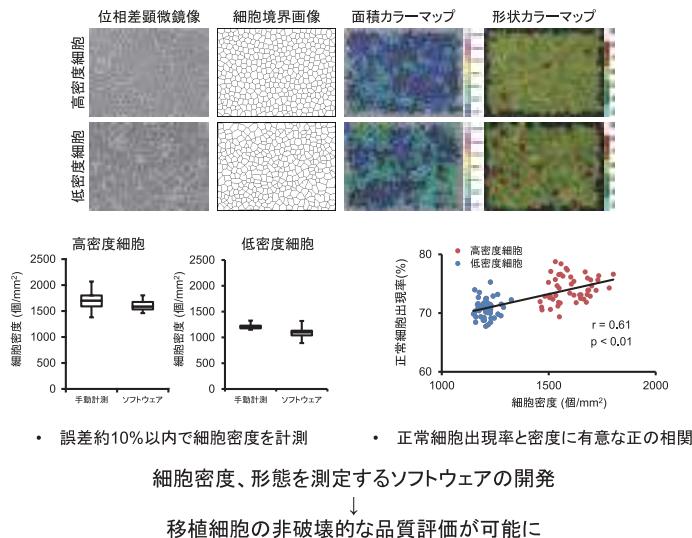
- Okumura N, Hirano H, Numata R, Nakahara M, Ueno M, Hamuro J, Kinoshita S, Koizumi N: Cell surface markers of functional phenotypic corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 55(11):7610-7618, 2014.



■ 培養角膜内皮細胞の品質評価のための画像解析ソフトの開発

臨床的に生体内における角膜内皮細胞の健常性を示す指標として、細胞密度、細胞面積の変動率、六角形細胞率が広く用いられている。細胞移植に用いる細胞の品質規格にも同様の指標を用いることが有用であると考えられるが、培養細胞の位相差顕微鏡による観察画像は細胞のコントラストが低く、臨床で用いられている画像解析プログラムを適応することは困難であり、熟練した研究者や医師が目視によって解析している。本プロジェクトでは、同志社大学生命医科学部医情報学科・医療情報システム研究室（廣安知之教授、日和悟助教）との連携のもとで、培養角膜内皮細胞の品質評価のための画像解析ソフトの開発を行った。本システムでは、3つの品質指標のそれぞれを定量的に計測することが可能であり、さらに細胞の形状および面積についてはカラーマップを作成することで、定量的かつ効率的な評価を可能であり、将来的な角膜内皮再生医療の製品化に向けた有用なツールとなりえる。

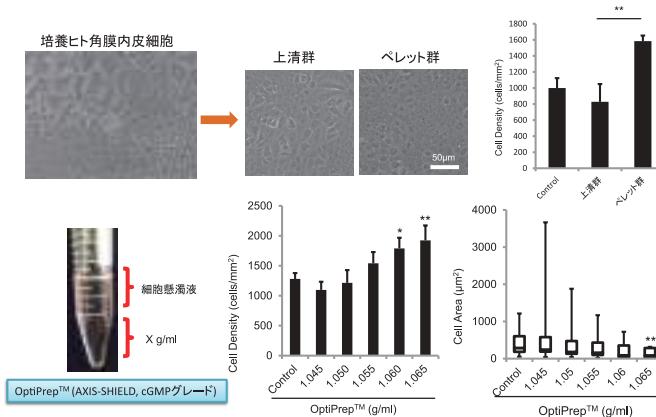
- 石田直也, 奥村直毅, 本郷茜, 日和悟, 小泉範子, 廣安知之: 培養角膜内皮細胞の品質評価を目指した自動画像解析ソフトウェアの開発 . 第16回日本再生医療学会総会, 2017
- Hiroyasu T, Goto Y, Okumura N, Koizumi N, Hiwa S, Furutani H: Automatic quality evaluation of the cultured in-vivo corneal endothelial cell - Panorama generated by the partial image. 22nd International Symposium on Artificial Life and Robotics (AROB2017), Oita, JAPAN, 2017
- Okumura N, Ishida N, et al. in revision



■ 簡便で細胞にやさしい細胞分離方法の開発

一般的に細胞の分離にはセルソーターが用いられるが、GMP 施設でのセルソータ導入は非常に高価である。また、非常に脆弱なヒト角膜内皮細胞をソーティングすることは実際には困難である。本プロジェクトでは、血球細胞の分離などに用いられている細胞毒性の無い密度勾配遠心剤（OptiPrep™）を用いることにより高密度細胞と低密度細胞を分離できる方法を開発した。OptiPrep™ は cGMP 製品が販売されており、臨床用培養角膜内皮細胞の細胞調整に利用可能であると考える。

- Okumura N, Kusakabe A, Hirano H, Inoue R, Okazaki Y, Nakano S, Kinoshita S, Koizumi N: Density-gradient centrifugation enables the purification of cultured corneal endothelial cells for cell therapy by eliminating senescent cells. Sci Rep. 7;5: 15005, 2015.



GMPグレードの試薬を用いた遠心分離により簡便に高密度細胞を純化

【課題4】細胞注入治療の製品化に向けた新しい細胞注入液の開発

2013年から厚生労働省の承認を得て実施されている細胞注入治療の臨床試験では、細胞培養液をベースとする細胞注入液を用いている。我々は将来的な細胞治療薬の製品化を行うために、より安全で治療効果の高い細胞注入液の開発が課題であると考えた。本研究では、角膜内皮細胞の接着性を指標に種々のMEMベースの各種培地からスクリーニングを行い、最も角膜内皮細胞の細胞接着を促進したRELAR®培地をもとに、ホルモンや成長因子などの生理活性物質を含まない新規細胞注入液cell therapy vehicle(CTV)を作製した。

CTVはin vitroおよびin vivoの動物モデル眼を用いた検討により、従来の注入液と同等あるいはそれ以上の細胞接着能を有しており、細胞注入治療に応用できる可能性が示唆された。本研究は株式会社細胞科学研究所との共同研究である。

-
- Okumura N, Kakutani K, Inoue R, Matsumoto D, Shimada T, Nakahara M, Kiyanagi Y, Itoh T, Koizumi N: Generation and feasibility assessment of a new vehicle for cell-based therapy for treating corneal endothelial dysfunction. PLoS ONE. 11(6): e0158427. 2016.



【課題 5】接触型角膜内皮スペキュラーによる細胞観察技術の確立

眼科の臨床診療における患者の角膜内皮細胞の観察には、短時間で簡便に測定できる非接触型の角膜内皮スペキュラー観察装置が用いられる。しかし非接触型角膜内皮スペキュラーでは角膜中央部の限られた範囲の画像データしか得られず、角膜疾患のある患者や移植後患者では撮影できないことも多い。本プロジェクトでは京都府立医科大学の木下茂教授との連携により、接触型角膜内皮スペキュラーを用いて動物および患者角膜内皮細胞の観察を行い、接触型角膜内皮スペキュラー（接触スペキュラー）による診断技術を確立するとともに、眼科疾患や手術が角膜内皮細胞に与える影響を評価した。現在、京都府立医科大学において、細胞注入治療後の患者角膜内皮細胞の変化に関する研究が行われている。

-
- Tanaka H, Okumura N, Koizumi N, Sotozono C, Sumii Y, Kinoshita S: Panoramic view of human corneal endothelial cell layer observed by a prototype slit-scanning wide-field contact specular microscope. Br J Ophthalmol. 308893, 2016.

【課題 6】接触型角膜内皮スペキュラーを用いた角膜内皮細胞減少のメカニズムの解明

我々は角膜移植後の患者角膜を接触スペキュラーで撮影し、拒絶反応を生じていない移植後の透明な角膜において、角膜内皮面に炎症細胞様の白色細胞が存在することを見出した。そこで、ウサギ角膜移植モデルを作成し、接触型角膜内皮スペキュラーを用いた観察を行うことにより、他家角膜移植眼では拒絶反応を受けていない透明角膜において、角膜移植後の患者と同様の白色細胞が存在していることを明らかにした。さらに同志社大学生命医科学部医工学科バイオマテリアル研究室（森田有亮教授、仲町英治教授）の協力を得て、多光子励起顕微鏡を用いた移植後角膜組織の3D観察を行った。本研究により、これらの炎症細胞が移植後の角膜内皮細胞減少の原因になっている可能性が示唆された。本研究は、同志社大学特別研究員(PD)のElena Koudounaが中心となって行った。

-
- Koudouna E, Okumura N, Okazaki Y, Nakano S, Inoue R, Fullwood NJ, Hori J, Kinoshita S, Koizumi N: Immune cells on the corneal endothelium of an allogeneic corneal transplantation rabbit model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 58(1): 242-251, 2017.

【課題 7】臨床応用可能な角膜冷凍凝固装置の開発

同志社大学では、Fuchs 角膜内皮ジストロフィなどによる初期の角膜内皮障害に対して、経角膜冷凍凝固による部分的な角膜内皮細胞除去を行い、Rho キナーゼ阻害剤の点眼を行うことによって角膜内皮機能を再生させる治療法を報告した (Koizumi N, et al. Cornea, 2013; Okumura N, et al. IOVS, 2013)。本プロジェクトでは、英国カーディフ大学の Andrew J. Quantock 教授との共同研究として、凝固サイズと凝固時間の制御が可能な角膜冷凍凝固装置の開発を行った。本研究に必要な技術交流のために、学部間連携を行っているカーディフ大学から大学院生の Alina Akhbanbetova が同志社大学特別研究学生として来日、同志社大学大学院生命医科学研究科の中野新一郎がカーディフ大学特別研究学生として留学するなど、活発な若手研究者、大学院生の交流を行った。

- Akhbanbetova A, Nakano S, Littlechild SL, Young RD, Zvirgzdina M, Fullwood NJ, Weston I, Weston P, Kinoshita S, Okumura N, Koizumi N, Quantock AJ. A surgical cryoprobe for targeted transcorneal freezing and endothelial cell removal. *Journal of Ophthalmology* 2017; in press.

【課題 8】鼻粘膜組織を用いた眼表面の再生医療

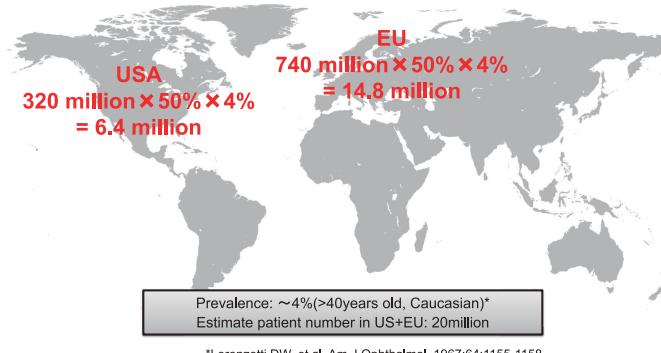
京都府立医科大学の中村隆宏准教授、木下茂教授らは、Stevens-Johnson 症候群などの重症疾患による角膜障害に対して、角膜上皮や口腔粘膜などを用いた粘膜上皮シートによる眼表面の再生医療の開発を行い、すでに多数の症例の治療を実施している (Nakamura T, et al. Br J Ophthalmol, 2004; Nakamura T, et al. Prog Retin Eye Res, 2016)。これらの眼表面再生医療において、重症ドライアイを合併する症例では、移植後の粘膜上皮シートの細胞の維持が困難であり、適応外となる場合がある。そこで、本プロジェクトでは、鼻粘膜上皮を用いることにより、ムチンを分泌する機能を持つ粘膜上皮シートの作成法を確立し、動物眼を用いた検討により眼表面の再生医療における有用性を検討した。本研究は中村准教授の指導のもと、同志社大学大学院生命医科学研究科の大学院生らが参加して行った。

- 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.* 4(1): 99-109, 2015.



Fuchs 角膜内皮ジストロフィ (Fuchs endothelial corneal dystrophy: FECD) は角膜内皮面に異常な細胞外マトリクス (extracellular matrix: ECM) による滴状の沈着物 (guttae) を生じると同時に、角膜内皮細胞の障害が生じる疾患である。FECD による角膜内皮障害が進行すると角膜内皮機能不全により、角膜実質内の水分量の調節が破綻し、多量の水分が貯留することにより角膜は白濁して重症の視力障害を来たす。

FECD は欧米では有病率が約 4% と高く、我が国でも厚生労働省の難治性疾患に指定されている疾患である。FECD は有病率が高く、角膜移植の原因疾患として特に欧米では最も多いものである。一方で、病態の詳細は不明であり、現在唯一の治療法は角膜移植である。本研究テーマでは、FECD の病態の解明、および角膜移植に代わる薬物治療法の開発を行う。



FECD患者は欧米では約4%とされ、角膜移植の主たる原因である。薬物治療が可能になれば、多くの患者を重篤な視力障害が救うことが可能になり、社会的意義が大きい。

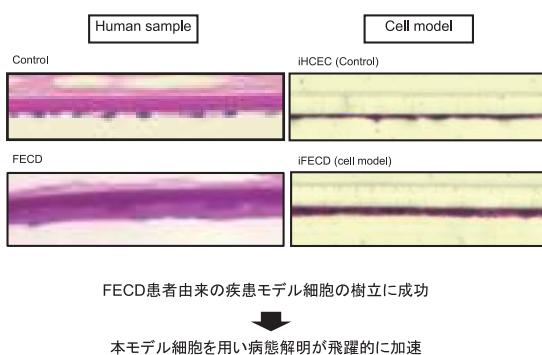
【課題 1】細胞外マトリクス產生亢進機序の解明

FECDにおいて、角膜内皮とデスマ膜の間に ECM の沈着により guttae とデスマ膜の肥厚が生じる。この ECM の沈着は、臨床的にも組織学的にも FECD に典型的なものである一方、その產生亢進メカニズムは不明であった。

我々は Erlangen 大学（ドイツ）の Friedrich Kruse 教授、Ursula Schlötzer-Schrehardt 教授との共同研究により、ドイツ人 FECD 患者の角膜内皮を角膜移植時に採取し、角膜内皮細胞を培養し不死化することで FECD 疾患モデル細胞を作製した。コントロールとして FECD に罹患していないドナーより採取した角膜内皮細胞を同様に培養し不死化した。これらの疾患モデル細胞を解析することにより、FECD においては上皮間葉系移行に関係する遺伝子である Snail1 および ZEB1 が亢進していることを明らかにした。さらに、TGF-β による刺激に対して、コントロールと比べて、FECD 疾患モデル細胞では Snail1 および ZEB1 の上昇が著明であり、フィプロネクチンや I 型コラーゲンの產生が亢進することを明らかにした。Snail1 および ZEB1 を siRNA によりノックダウンすることにより ECM の產生が抑制された。反対に、Snail1 および ZEB1 の強制発現により ECM の產生が促進された。

これらの結果より、FECD における ECM の沈着には上皮間葉系移行、あるいは少なくとも上皮間葉系移行に関係する遺伝子が関与し、TGF-β による制御を受けていることが示された。

- Okumura N, Minamiyama R, Ho L, Kay EP, Kawasaki S, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse F, Young RD, Quantock AJ, Kinoshita S, Koizumi N: Involvement of ZEB1 and Snail1 in excessive production of extracellular matrix in the Fuchs endothelial corneal dystrophy. Laboratory Investigation. 95, 1291-1304, 2015.



【課題 2】小胞体ストレス応答の解明

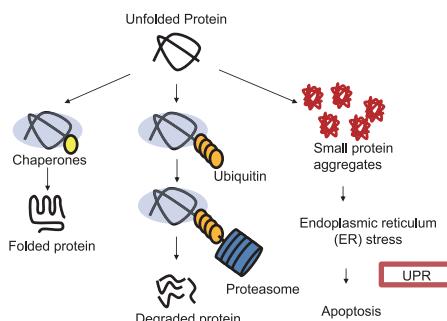
これまでに Johns Hopkins 大学の Engler らは FECD の病態に小胞体ストレスが関係する可能性を報告してきた。我々は、小胞体ストレスが関係するのであれば角膜内皮細胞に変性タンパク質が蓄積するとの仮説のもと、Erlangen 大学（ドイツ）の Friedrich Kruse 教授との共同研究として、患者組織においてドイツ人 FECD 患者の角膜内皮を角膜移植時に採取し、組織学的な検討を行った。その結果、患者角膜内皮において変性タンパク質が蓄積しており、その一部はフィプロネクチンや 1 型コラーゲンと共に局在することを明らかにした。この結果は、FECD 患者において ECM の沈着を来すフィプロネクチンや 1 型コラーゲンなどの ECM の一部が変性タンパク質となって蓄積していることを端的に示す成果であった。

そこで、このような変性タンパク質が小胞体ストレスを介して細胞障害を生じるのか、またそうであればどのような機序であるのかということを、細胞レベルで詳細に Eunduck Kay 教授（University of South California、同志社大学）と共同して検討した。我々が樹立した疾患モデル細胞においてもコントロールの細胞と比べて変性タンパク質が増加しており、フィプロネクチンや 1 型コラーゲンと共に局在することが明らかになった。さらに、小胞体の 3 つのストレスセンサーである IRE1、PERK、ATF6 が全て活性化しており、アポトーシスを生じるミトコンドリア経路を活性化していることを明らかにした。

これらの結果より、FECD の病態の本質は「TGF- β シグナルの活性化により細胞外マトリックス関連分子が過剰に産生されることで、変性タンパク質が蓄積し小胞体ストレスによる細胞死が生じること」であるという独自の病態仮説を提唱するに至った。

- Okumura N, Kitahara M, et al. in revision.

Unfolded Protein Response (UPR)



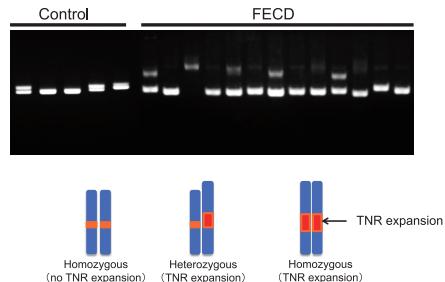
FECDの病態の本質は過剰なECM産生による
UPRを介した細胞死であるとの仮説のもと研究を推進

【課題 3】FECD 患者遺伝子解析

FECD は 50 代で発症し、20-30 年かけてゆっくりと進行する。一方で、より早期に発症する家系の報告があるために early onset と late onset として分類される。いわゆる FECD は late onset であり、ごく一部の患者では SLC4A11 や ZEB1 の遺伝子変異が発症の原因となりうる可能性が報告されたが、やはり依然として大多数の患者では原因遺伝子についてはまったく不明である。しかし、2010 年 Mayo clinic の Baratz らはゲノムワイド関連解析 (GWAS) による解析を行い、TCF4 遺伝子の一塩基多型 (SNP : Single Nucleotide Polymorphism) (rs613872) が Fuchs 角膜内皮ジストロフィと強く関連することを報告した。さらに、2012 年には、同研究チームは TCF4 遺伝子の第 3 イントロンに 3 塩基の繰り返し配列の延長があることを発見した。我々も Keith Baratz 教授、京都府立医科大学ゲノム医学の田代啓教授、中野正和准教授、眼科学の木下茂教授らとの共同研究により日本人の FECD 患者においても 47 名中 12 名 (26%) に TCF4 遺伝子の第 3 イントロンに繰り返し回数の伸長が認められることを確認した。

さらに、ドイツ人患者の血液および角膜内皮を 400 人以上より採取し、血液ゲノムと角膜内皮の cDNA のライブラリーを構築した。京都府立医科大学眼科学の佐藤貴彦博士との共同研究により、マイクロアレイ解析を行い、患者角膜内皮において TGF- β 1/2、TGF 受容体 (I 型 /II 型)、またフィプロネクチンをはじめとする細胞外マトリックス関連分子の発現が亢進していることを確認した。このことは、FECD 患者における TGF- β シグナルの亢進を強く示唆するものである。また、TCF4 遺伝子の解析を行うことで、TCF4 遺伝子が FECD 患者において正常者と比べて約 3 倍程度に有意に発現が亢進していることを明らかにした。今後、TCF4 遺伝子の病態への関与について検討を進める予定である。

- Nakano M, Okumura N, Nakagawa H, Koizumi N, Ikeda Y, Ueno M, Yoshii K, Adachi H, Aleff R, Butz M, Highsmith E, Tashiro K, Wieben E, Kinoshita S, Baratz K: Trinucleotide Repeat Expansion in the TCF4 Gene in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy in Japanese. Invest Ophthalmol Vis Sci. 56(8):4865-4869, 2015.
- Okumura N, Hayashi R, et al. in preparation.



日本人FECD患者の20-80%においてTCF4の第3イントロンにトリプレットリピートの伸長を有することを報告。現在、国内外の複数の医療機関とFECD患者遺伝子の解析プロジェクトを行中。

【課題4】TGF- β シグナル阻害による細胞障害の抑制効果

TGF- β およびその受容体が患者角膜内皮組織で高く発現しており、またTGF- β によりFECDにおけるECMの沈着に関与する上皮間葉系移行に関する遺伝子が制御されていることを明らかにしてきた。さらに興味深いことに、TGF- β 刺激により、我々が樹立したFECD疾患モデル細胞においてのみ細胞死が誘導され、コントロールの細胞では細胞死が生じないことを発見した。この現象を詳しく解析することにより、TGF- β 刺激によりFECD疾患モデル細胞においてはコントロールの細胞と比べて、変性タンパク質が多く産生され、それに伴い小胞体ストレスセンサーが活性化することを明らかにした。さらに、小胞体ストレスセンサーの中でもPERKがp38 MAPKシグナルを介してCHOPを誘導して、ミトコンドリア経路(intrinsic pathway)によるアポトーシスを引き起こすことを明らかにした。

そこで、TGF- β シグナル阻害はこれらの経路を阻害することによりアポトーシスを抑制し、角膜内皮の細胞障害を抑制するのではないかと想を得た。実際に、FECD疾患モデル細胞においてTGF- β シグナルをTGF- β 受容体阻害剤、siRNA、smad3阻害剤で阻害することで、どの阻害方法においても同様に変性タンパク質を抑制し、それに伴い小胞体ストレスセンサーの活性化を抑制することを明らかにした。また、CHOPの活性化を抑制しintrinsic pathwayの活性化を抑えることが可能であることを示した。TGF- β シグナルはFECDの治療ターゲットとなりうる可能性を示したものである。現在、in vivoのモデル動物を用いての有用性の検討を開始している。

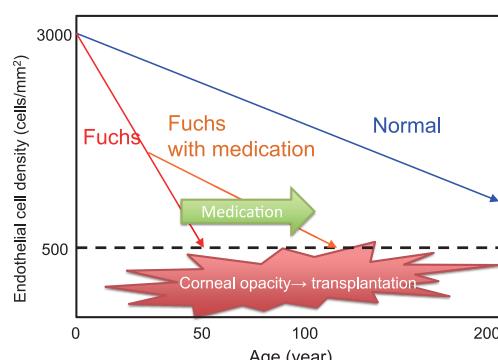
- Okumura N, Hashimoto K, et al. in revision.

【課題5】p38 MAPKシグナル阻害による細胞障害の抑制効果

FECD疾患モデル細胞において小胞体ストレスセンサーが活性化した際に、PERKがp38 MAPKシグナルを介してCHOPを誘導して、ミトコンドリア経路(intrinsic pathway)によるアポトーシスを引き起こすことを明らかにした。そこで、TGF- β シグナルのみならずp38 MAPKシグナルもFECDの治療ターゲットとなりうる可能性があるとの仮説のもと検証試験を行った。

具体的にはFECD疾患モデル細胞、複数の小胞体ストレス誘導方法で小胞体ストレスを誘導した培養角膜内皮細胞全てにおいて、p38 MAPKシグナル阻害が、CHOPを抑制することによりintrinsic pathwayの活性化を抑え、細胞障害を阻害することが可能であることを明らかにした。p38 MAPKシグナル阻害剤はFECDの治療薬となりうる可能性があるために、薬剤としての本格開発に向けての研究を続けている。これらのアポトーシスに関する研究は京都府立医科大学分子標的癌予防医学の酒井敏行教授、曾和義広准教授らの支援を受けて実施した。

- Okumura N, Onishi T, et al. in revision.



現在、早期発見されたとしても、進行し高度な視力障害を生じてから角膜移植を行う。研究テーマ2では、早期発見後に薬物治療を開始することで角膜移植を回避することを可能にする技術の開発をゴールとする。

研究センターメンバー・共同研究者



小泉 範子 (センター長)

・生命医科学部医工学科
ティッシュエンジニアリング研究室 教授



奥村 直毅 (副センター長)

・生命医科学部医工学科
ティッシュエンジニアリング研究室 准教授



井上 望

・米国ラッシュ大学 医学部 整形外科学 教授
・同志社大学 嘴託研究員



仲町 英治

・生命医科学部医工学科
バイオマテリアル研究室 教授



森田 有亮

・生命医科学部医工学科
バイオマテリアル研究室 教授



廣安 知之

・生命医科学部医情報学科
医情報システム研究室 教授



Elena Koudouna

・2015 年度 同志社大学 特別研究員
・英国カーディフ大学 博士研究員
・同志社大学 嘴託研究員



EunDuck Park Kay

・2016 年度 同志社大学 客員教授
・南カリフォルニア大学 名誉教授
・同志社大学 嘴託研究員



中村 隆宏

・京都府立医科大学
感覚器未来医療学講座 准教授
・同志社大学 連携准教授



中野 正和

・京都府立医科大学大学院
医学研究科ゲノム医科学 准教授
・同志社大学 嘴託研究員



佐藤 貴彦

・京都府立医科大学大学院
医学研究科視覚機能再生外科学 助教
・同志社大学 嘴託研究員



上田 真由美

・京都府立医科大学
感覚器未来医療学講座 准教授
(2014 年度メンバー)



木下 茂

・京都府立医科大学
感覚器未来医療学講座 教授
・同志社大学 連携教授



田代 啓

・京都府立医科大学大学院
医学研究科ゲノム医科学 教授



酒井 敏行

・京都府立医科大学大学院
医学研究科分子標的癌予防医学 教授



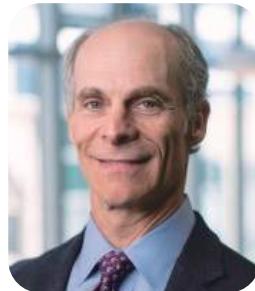
Andrew J. Quantock

・Cardiff 大学
School of Optometry and Vision Sciences 教授



Friedrich E. Kruse

・Erlangen 大学医学部眼科 教授



Keith Baratz

・米国 Mayo Clinic 眼科 教授

研究に参加した大学院生

同志社大学大学院 生命医科学研究科 医工学・医情報学専攻

▶医工学コース

平野 浩惇	南山 龍輝	中野 新一郎	岡 雄太郎	大倉 翔貴
辻本 勇氣	小田嶌 愛	藤井 佳大	久田 晋之介	堀場 正寛
井上 亮太	岩本 美優	角谷 和哉	岸本 麻帆	北原 美優
日下部 綾香	橋本 佳祐	本郷 茜	前川 ほのか	仲川 謙
小田 莉恵	尾形 佳祐	岡崎 友吾	楊 政昊	遠藤 真子
林 良祐	東岡 航基	各務 貴斗	松本 大輝	奥田 浩和
大西 貴子	島田 知輝	井上 拓	小島 良太郎	齊藤 朋子
中原 海渡				

▶医情報学コース

林沼 勝利	田中 那智	後藤 優大	石田 直也	岡田 雄斗
-------	-------	-------	-------	-------

研究員・研究補助員

中原 マキ子	渡辺 恭子	上田 江美	矢野 修一
--------	-------	-------	-------

事務局

高野 恵	白石 有里
------	-------