



Title	Ocular instillation of conditioned medium from mesenchymal stem cells is effective for dry eye syndrome by improving corneal barrier function
Author(s)	今泉, 務
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/101456">https://hdl.handle.net/11094/101456</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨  
Synopsis of Thesis

氏名 Name	今泉 務
論文題名 Title	Ocular instillation of conditioned medium from mesenchymal stem cells is effective for dry eye syndrome by improving corneal barrier function (間葉系幹細胞由来培養上清の点眼は角膜のバリア機能を改善し、ドライアイに効果を示す)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕	
<p>ドライアイは様々な要因により発症し、涙液の産生量や質の低下を特徴とした角膜上皮障害を誘導する。特にシェーグレンシンドromeなどの重度のドライアイにおいては、角膜の炎症やバリア機能の低下を伴うなど複雑な病態を伴うため、十分な治療法が確立されていない。そのため、複数の特性を有する革新的な治療薬の開発が求められている。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞(hAdMSCs)は、脂肪組織に存在している体性幹細胞であり、組織からの単離が比較的簡易であること、多様な生理作用を有することから細胞製剤として臨床応用が進んでいる。さらに近年、hAdMSCsの分泌物を含む培養上清(hAdMSC-CM)に関しても、複数の作用点を介して様々な薬効を有することが報告され、細胞を使用しないより安全でコストの低い新規創薬ツールとしての開発が期待されている。一方で、ドライアイ等の角膜疾患に対するhAdMSC-CMの効果は十分に評価されていない。そこで本研究では、hAdMSC-CMのドライアイ治療薬としての可能性を検証するため、ドライアイの特徴である角膜上皮細胞(hCECs)の細胞死や炎症、バリア機能障害に対する機能評価やドライアイモデルラットに対するhAdMSC-CMの点眼による有効性の評価を行った。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>hAdMSCsを80%コンフルエントまで培養後、培養上清回収用の培地としてhCECsの培養培地に交換し、72時間培養後のhAdMSC-CMを回収した。hAdMSC-CMの評価には、<i>in vitro</i>モデルとして塩化ベンザルコニウム(BAC)誘導型角膜上皮障害モデル、<i>in vivo</i>モデルとして眼窩内・眼窩外涙腺摘出ドライアイモデルラットを用いた。まず、hCECsを播種し、hAdMSC-CMを添加24時間培養後、BACを処理し、再度hAdMSC-CMに交換した。48時間培養後の角膜上皮細胞の細胞死をAlamarblue assayにより評価したところ、BACによるhCECsの細胞死をhAdMSC-CMが抑制した。また同時に、炎症性サイトカインの遺伝子発現をqRT-PCRにて解析したところ、BACによるIL6やIL1A、MMP9の発現増加をhAdMSC-CMが抑制したことから、hAdMSC-CMがhCECsの細胞死や炎症性サイトカインの発現を抑制することが明らかになった。続いてバリア機能への作用を評価するため、セルカルチャーワークサート上にhCECsを播種し80%コンフルエントまで培養後、同様にhAdMSC-CMの添加やBACの処理を行った。その結果、BACによるバリア機能の指標である電気抵抗値(TER)の低下をhAdMSC-CMが改善した。また、バリア機能に関連するタンパク質の発現を免疫染色により評価したところ、BACによるTJP1やCDH1、MUC16の発現低下をhAdMSC-CMが改善し、さらにTJP1の細胞間への分布を促進した。以上の結果より、hAdMSC-CMがhCECsのバリア機能を高めることが明らかになった。続いて、hAdMSC-CMの作用機序を明らかにするため、RNA-seq解析や薬理学的阻害剤を用いた解析を行った。まず、hAdMSC-CMにより発現が低下した遺伝子に注目したところ、TGFβやJAK-STAT経路に関連する遺伝子が含まれていることが明らかになった。続いて、TGFβやJAK-STAT経路の薬理学的阻害剤のBAC誘導型角膜上皮障害モデルに対する効果を検証したところ、TGFβやJAK-STAT経路の阻害によりhAdMSC-CMと同様にBACによるhCECsの細胞死の抑制、炎症性サイトカインの発現抑制、バリア機能の亢進効果が認められ、hAdMSC-CMの効果はTGFβやJAK-STAT経路に関連する可能性が示された。さらに、ドライアイモデルラットにおける有効性を評価するため、SDラットの眼窩内・眼窩外涙腺を摘出することで涙液低下に伴う角膜上皮障害を発症するドライアイモデルを作成した。本モデルに対し、hAdMSC-CMを1日3回1週間点眼したのち、フルオレセイン染色にて上皮障害を評価したところ、hAdMSC-CMが角膜の上皮障害を改善した。また、角膜の構造をHE染色や免疫染色により解析したところ、ドライアイモデルの角膜の菲薄化やバリア機能に関連するTJP1やCDH1、MUC4などの発現低下をhAdMSC-CMが改善した。以上の結果より、hAdMSC-CMがドライアイモデルラットの角膜のバリア機能を改善することで角膜上皮障害を抑制することが明らかになった。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>hAdMSC-CMはTGFβおよびJAK-STAT経路に関連する複数の治療特性を有しており、hAdMSC-CMの点眼は角膜バリア機能を改善することによりドライアイの革新的な治療薬となる可能性を示した。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 今泉 務		
論文審査担当者	(職)	氏 名
主 査	大阪大学教授	西田 伸二 署名
副 査	大阪大学教授	林亮彦 署名
副 査	大阪大学教授	東木範行 署名

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、治療薬が確立されていない重度のドライアイに対し、新たな創薬シーズとして期待されるヒト脂肪由来間葉系幹細胞の培養上清（hAdMSC-CM）の効果を検証した。まず、*in vitro*ヒト角膜上皮障害モデルにおいて、hAdMSC-CMがヒト角膜上皮細胞の細胞死の抑制、炎症性サイトカインの発現抑制、バリア機能の亢進作用を有することを示した。また、RNA-seq解析や薬理学的阻害剤を用いた検討から、hAdMSC-CMの作用機序としてTGFbやJAK-STAT経路が関与することを明らかにした。さらに、涙腺摘出ドライアイ動物モデルにおいて、hAdMSC-CMの点眼がバリア機能を改善し、角膜の菲薄化や角膜上皮障害を抑制することを明らかにした。以上の結果より、hAdMSC-CMが多様な薬理作用を有し、バリア機能の改善することで重度のドライアイに対して革新的な治療薬となる可能性を見出した。上記のような理由から、本研究は学位の授与に値すると考えられる。