

厚生労働科学研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

---

角膜上皮細胞の生体外での  
未分化能維持の研究

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 川北 哲也

平成19 (2007) 年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

---

角膜上皮細胞の生体外での未分化能維持の研究.....2
川北 哲也

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）  
総括研究報告書

角膜上皮細胞の生体外での未分化能維持の研究

主任研究者 川北哲也

東京歯科大学 市川総合病院眼科 講師

研究要旨

目的： マウス角膜上皮未分化細胞をモデルとして、より少ない組織から未分化上皮細胞を分離し、その表現型を保持したまま増殖させる方法を開発し、そのメカニズムを解明する。さらにその増殖プロセスで、細胞培養条件の変化により、異常分化する可能性があるかどうかを検討する。

方法： 我々が樹立したマウス角膜上皮未分化細胞を羊膜上で培養し、重層化マウス上皮シートを作成した。それらの分化マーカー（p63、Keratin 12、Keratin 14、Involucrin、Pax6）の発現を、免疫染色、RT-PCRを用いて調べた。また細胞培養条件を変えることにより、この細胞が異常分化するかどうかを観察するため、まず細胞播種密度をかえて培養し、 $\alpha$ -SMA、p63、S100A4の発現を調べた。上皮の異常分化のメカニズムについては、腎臓や肺組織の線維化にかかわる上皮間葉系移行の観点から、Smad-TGF- $\beta$  signaling (Smad4)、Wnt pathway ( $\beta$ -catenin, Lef-1, E-cadherin)について、免疫組織学的検討を行った。さらに、高細胞密度で培養した細胞培養液は回収し炎症性サイトカイン濃度の測定した。

結果： 長期継代培養した細胞からも重層化マウス上皮シートは可能であった。その上皮は免疫染色ではKeratin 12(-)、Pax6(-)、Keratin 14(+) Keratin 10 (-) p63(+) Involucrin上層(+)であり、RT-PCRの結果も同様であった。細胞培養中、高細胞密度の領域で、 $\alpha$ -SMAの発現を認め、さらに同領域で、Smad4、 $\beta$ -catenin発現の核内移行、Lef-1、E-cadherin発現の細胞間から細胞質への移動を認めた。細胞培養液中のTGF- $\beta$  1, 2の濃度は、上皮を刺激するレベルに上昇しており、GM-CSF, IL-1 $\alpha$ も上昇していた。

結論： 角膜輪部由来のひとつの細胞から角膜を覆うことが可能な上皮シートが作成できた。角膜輪部上皮細胞といった組織分化度の高い細胞でも、その環境条件によっては上皮間葉系移行を誘発し癒痕を引き起こしうる未分化細胞が存在し、生体内でも同様の事が起こっている可能性が示唆された。

## 分担研究者

榛村 重人

慶應義塾大学医科部眼科学教室・講師

比嘉 一成

東京歯科大学眼科・助教

## A. 研究目的

化学外傷、熱傷などに続発する重症角結膜疾患においては、角膜上皮幹細胞が存在すると考えられている角膜輪部が傷害されており、角膜上皮が供給されないために、結膜上皮が新生血管を伴って侵入するのみならず、強い炎症によりその結膜上皮下に線維芽細胞の侵入によるファイブrosisを形成する。この角膜上皮を再建するために、自己の片眼、他眼、自己口腔粘膜を用い、生体外で培養し、移植するアプローチを当院では開始している。その上皮培養の方法を、マウスを用いて検討し、より少ない組織から幹細胞の未分化能を維持する方法を開発し、臨床応用することにより、より安全に角膜上皮再生医療が行われるようになる。また広く上皮幹細胞の培養、増殖における研究にも貢献すると考えられる。

多くの施設で角膜上皮幹細胞の分離が試みられている。角膜上皮細胞は体内でも血管に栄養されておらず、観察しやすいという利点もあり、幹細胞及びその微小環境(ニッチ)の研究において優れたモデルといえる。角膜上皮幹細胞の培養研究は、まだまだ不明な点が多く、今回申請する研究はマウス角膜上皮細胞を用いたin vitroの研究であり、マウス角膜、輪部上皮細胞の培養、継代に成功しているのは我々のグループのみであり、誰も着手していない。この研究では、少数のマウス角膜上皮幹細胞から成体マウスの角膜を覆うだけの細胞数に、未分化性を保持したまま増殖させ、なおかつ生体内もしくは角膜実質とのリコンビナントで角膜の表現型に分化をすることを確認する、またその細胞が継代により、細胞老化、

異常分化といった現象を起こすことがないかも検証していく。

## B. 研究方法

我々は世界ではじめてマウス角膜上皮細胞の分離培養に成功し、その培養には、低細胞外カルシウムイオン濃度と無血清が必要であることを明らかにした。(Invest Ophthalmol Vis Sci. 45(10):3507-12. 2004)。その細胞培養方法により、p63強陽性、かつClonalに培養可能なマウス角膜上皮細胞の分離培養に成功した。

現在この細胞を用いて、ひとつの未分化角膜上皮細胞から、角膜を覆う重層化培養上皮シートを作成し、マウスに移植を開始している。また、この細胞を用いて、いろいろな培養条件下で他系統の細胞への分化誘導、および脱分化を誘導する研究をする。

### 1. マウス角膜培養上皮細胞の分離培養、上皮シート作成

我々が樹立したマウス角膜上皮未分化細胞を、羊膜上(アンモニア処理にて羊膜上皮細胞を除去した羊膜)で2週間培養する。培養期間後期、3T3 fibroblastとの共培養、培養液を減らし培養細胞の表面を空気に触れさせるair-liquid法を併用し重層化を促進させる。培養液としてはKSPMを用い、重層化させる際にSHEMにかえる。こうして重層化させたマウス上皮シートは一部移植前に分化マーカー(p63, Keratin12, Keratin14, Keratin10, Pax6, involucrin)での組織学的検討、とRT-PCRを行った。

### 2. マウス上皮シートをウサギ、マウス角膜へ移植

マウス、ウサギの角膜上皮を、輪部を含め、大きく擦過除去する。フルオレセイン染色で上皮完全欠損を確認し、さらに結膜上皮を輪部で全周に渡り切除することにより、角膜輪部機能不全モデルを作成する。同時にマウス角膜上皮シート移植を施行し、ウサギには上皮保護にコンタクトレンズを挿入、瞼板縫合を行っ

た。マウスにはコンタクトレンズを入れず瞼板縫合を行った。上記の方法以外にウサギ実質とマウス上皮シートのリコンビナントの器官培養も行い、実質(ニッチ)だけでも上皮の表現型を変化させるのを調べる。

### 3. *in vitro*での分化、脱分化のメカニズムの解明

このマウス上皮細胞はある条件下では平滑筋、癒痕組織に認められるMyofibroblastのマーカである $\alpha$ -SMAを発現する。その事実は上皮マーカであるp63との二重染色にて確認した。どのような条件下で上皮が間葉系細胞のマーカを発現するかを調べるため、細胞播種密度に着目し、低密度(50 cells/cm<sup>2</sup>)から高密度(50000 cells/cm<sup>2</sup>)で細胞形態、 $\alpha$ -SMA、S100A4の発現を免疫染色で調べた。またそのメカニズムについて、Smad4(Smad-mediated TGF- $\beta$  signaling)、 $\beta$ -catenin、LEF-1、E-cadherin(Wnt pathway)の発現を免疫染色で調べた。さらに、高細胞密度の培養液を回収し、Boiplex®を用いて炎症性サイトカインの濃度を測定、及びこの回収培養液の低細胞密度培養への影響を調べた。

### 倫理面の配慮

本研究では、ヒト羊膜を*in vitro*でマウス角膜上皮を培養の際の基質として用いている。当施設では産婦人科の協力のもと帝王切開時に無菌的に胎盤組織を採取している。提供してくださる妊婦に対して、治療に用いられる場合と、研究用に使用する場合があることを十分に明した上で、口頭および文書にてインフォームド・コンセントを取っている。提供くださる妊婦が各種ウイルス(HBV, HCV, HIV, 梅毒)に感染していないことを確認してから採取している。羊膜の研究への応用について、平成8年に当該施設の倫理委員会に実施計画書を提出し受理されている。

また動物モデルにおいては、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を遵守して行った。

### C. 研究結果

1. 長期継代培養した細胞からも重層化マウス上皮シートを作成できた。免疫染色ではKeratin 12(-)、Pax6(-)、Keratin 14(+)Keratin 10 (-) p63(+)Involucrin 上層(+)で、RT-PCRの結果も免疫染色の結果を支持していた。

2. ウサギ角膜輪部機能不全モデルへの上皮シート移植は、炎症が強いため上皮の生着が困難であった。瞼板縫合、保護用コンタクトレンズ挿入といった眼瞼結膜による機械的刺激の防御を行ったが、実験の再現性が良好でなかった。またマウスモデルでは、移植シートが容易にとれてしまった。その原因としては、瞼板縫合をどれだけ追加しても、糸がきれてしまうことが一因であった。

そのため、現在、炎症が少なく、再現性の高いウサギ角膜上皮欠損モデルを作成しており、現在その方法論を確立している。

3. マウス角膜輪部上皮細胞を培養する際、高密度(50000 cells/cm<sup>2</sup>)の細胞領域で、 $\alpha$ -SMA の発現を認めた。さらに同領域で、Smad4 の核内移行を認めた。また  $\beta$ -catenin、の核内移行も同領域に認め、LEF-1 も似た同行を観察した。コロニー中心部では細胞間に発現した E-cadherin は周辺部ではしだいに細胞間の発現は減弱した。コロニー形成中に、ある程度コロニーが大きくなるとこういった現象が起こることから、細胞密度が関係あると仮説をたて、細胞播種密度をかえ、液性因子、とくに TGF- $\beta$  に着目し、以下の実験結果を得た。

3-1. 高細胞密度培養のほうが、 $\alpha$ -SMA の発現率が低細胞密度培養よりも有意に高かった。

3-2. 高細胞密度培養において、細胞培養液中の TGF- $\beta$  1, 2 の濃度は上皮を刺激するレベルに上昇していた。

3-3. 低細胞密度培養に高細胞密度培養の培養液 (Volume/Volume; 40%)を加えると、 $\alpha$ -

SMA の発現率が有意に上昇した。

3-4. 高細胞密度培養において、anti-TGF- $\beta$  antibody を加えて培養すると、有意に  $\alpha$ -SMA の発現率が下降した。

#### D. 考察および結論

我々の樹立した角膜輪部由来の未熟細胞 (p63+, K14+, K10-, K12-, Pax6- の表現型を持ち、低密度培養でコロニーを形成する) を用いて、通常培養時に異常分化が誘導されるかどうかを、組織癒痕化の原因のひとつと考えられている上皮間葉系移行のマーカーを用いて調べた。

通常培養時のコロニーの中央部では E-cadherin,  $\beta$ -catenin が細胞間に認められ、Smad4 も核内移行は認められなかったが、コロニーの周辺部では Smad4,  $\beta$ -catenin の核内移行とともに、 $\alpha$ -SMA の発現を認めた。すなわち、Smad-TGF- $\beta$  signaling, Wnt pathway の活性化を認め、その結果、上皮間葉系移行を惹起し、 $\alpha$ -SMA の発現に至ったと考えられる。興味深いことに、この  $\alpha$ -SMA+ の細胞群は、増殖能がないと予想していたが、PCNA との 2 重染色では、 $\alpha$ -SMA+PCNA+ の細胞が存在していた。これは、生体では、癒痕化組織において、増殖性病変を認める際、まさにその場所でも癒痕形成していると考えられている  $\alpha$ -SMA+ 細胞が上皮由来、かつ増殖している可能性を示唆している。眼科領域においては、重症性癒痕性眼表面疾患や翼状片が、このメカニズムに関与している可能性があると考えられる。角膜由来の未熟細胞がこれらの疾患の発症メカニズムに関与しているならば、ヒトの細胞を用いた生体外モデル、またマウスなど動物を用いた生体モデルでそれらを証明する必要があると考えている。それらが証明されれば、どうやって、そういった疾患に対して、上皮間葉系移行による癒痕化を防ぐことができるかに焦点が当てられる。この実験で、マウス細胞モデルでは、TGF- $\beta$  が最も強く関

与していたが、それも同様のメカニズムが主因となっているのかどうかを検証する必要がある。

また昨今、再生医療に置いては、ステムセルバンクといった、自己の細胞または他家細胞を冷凍保存しておいて、必要なときに増やして組織構築させるという考え方がある。しかし、それにはそれぞれの細胞に応じた生体外での分化能、とその組織の細胞ニッチがどういったものなのか、を把握していないと、細胞老化による異常分化、や腫瘍化を招く恐れがあると考えられる。今回の実験では、細胞播種密度という単純なことで、コロニーの周辺部の細胞の性質、形態に異常分化を生じ、それが主に TGF- $\beta$  によるものであることをつきとめた。

ヒト角膜輪部細胞においても、さらなる検討が必須であると考えている。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

1) Kawakita T., Hornia A., Shimmura S., Higa K., Miyashita H., Tsubota K., Shimazaki J., S.C.G. Tseng Coneal epithelial sheet equivalent Generated From A single Murine Corneal/limbal Epithelial Progenitor cell The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting, May 1st-5th, 2006, Florida, U.S.A.

2) Kawakita T., Kawashima M., Satake Y., Higa K., Shimmura S., Tsubota K., Shimazaki J.. Optical Keratoplasty following Cultivated Limbal Epithelial Transplantation: clinical outcome and phenotypic study American Academy of Ophthalmology, Annual meeting, Nov. 11th-14th, Las Vegas, U.S.A. 2006.

G. 知的財産の出願、取得状況(予定を含む)

特許取得

なし

なし

実用新案登録

なし

その他

なし