

200706023A

厚生労働科学研究費補助金
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19年度 総括・分担研報告書

主任研究者 川北 哲也

平成20 (2008) 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	

II. 分担研究報告

1. 角膜上皮細胞培養条件の研究	5
榛村 重人	

2. 角膜上皮シート作成条件の研究	7
比嘉 一成	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	9
--------------------------	---

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 慶應義塾大学医学部眼科学教室講師

研究要旨

マウス角膜上皮未分化細胞の培養では、低細胞外カルシウムイオン濃度と無血清の培地で、150継代以上、細胞サイズ、形態、未分化マーカーを維持して培養が可能であり、なおかつ継代培養によるコロニー形成能力の低下も認めなかった。

角膜上皮特異的タンパクであるケラチン12の発現を失ったため、眼形成のマスター遺伝子であり、その遺伝子導入によりケラチン12の発現を認めたと報告されているPax6をアデノウイルスベクターを用いて、この未分化細胞に遺伝子導入したが、導入効率は低く、また遺伝子導入された細胞も再度ケラチン12を発現しなかった。このことからPax6はケラチン12を発現する必要十分条件ではないことがわかった。

また80継代を過ぎた細胞の中も自然発生的にケラチン12を発現する細胞集団が存在することがわかった。1%未満の細胞集団ではあるが、免疫染色では明らかに陽性を示した。しかしこれらの細胞をSEM培地、3T3細胞との共培養により重層化させ上皮シートを作成したものの凍結切片では、免疫染色で注意深く観察しても、ケラチン12陽性細胞を見つけることはできなかった。

また角膜実質の上で上皮シートを器官培養することにより、ケラチン12を誘導することを試みたが、この上皮シートとマウス角膜実質とのリコンビナントモデル1週目の組織評価では、生着は得られたが、上皮はケラチン12の発現を誘導するには至らなかった。またケラチン10の発現もなく、角化上皮に異常分化していることもなかった。

異常分化の研究では、継代培養の際、細胞播種密度を高くすると、(5000 cells/cm²以上)

ParacrineなTGF-βの刺激により、Smadを介したシグナルの活性化により、細胞がEMTを起こし

αSMAとp63を同時発現する細胞が出現することがわかり、通常培養時にも注意が必要であることがわかった。また、80継代付近の細胞を調べたところ、通常培養下で1%以下のケラチン12陽性細胞群を含んでおり、いまのところメカニズムは不明だが、この細胞がケラチン12を発現する能力があることを示唆した。

分担研究者

榛村重人

慶應義塾大学医学部眼科学教室 准教授

比嘉一成

東京歯科大学市川総合病院眼科 研究技術員

A. 研究目的

現在、このマウス角膜上皮未分化細胞は150以上の継代を経てもそのクローナルに増殖し、p63とK14を強発現しコンパクトで敷石状の細胞形態は変化していない。p63とK14という重層上皮の基底細胞のマーカーが強陽性ということが示す用に、この細胞をヒトに臨床応用されている培養上皮シート作成の条件（羊膜上培養、SHEM、3T3をフィーダー細胞に使用、エアリフティング）を適用すると、重層化し、マウス角膜培養上皮シートを作成できた。

B. 研究方法

1. 継代培養細胞のコロニー形成率

通常継代した培養細胞を40 cells/cm²で60mm培養皿に播種し、10日後100 cells以上のコロニー数をカウントし、コロニー形成率を求めた。

2. p63の遺伝子導入

Pax6(-)の角膜未分化細胞に、adenoviral vector carrying EGFP-Pax6を導入し、ケラチン12をゆうどうできるかどうかを免疫染色で確認する。

3. リコンビナントモデル

50-80継代の細胞を用いて、角膜上皮重層化シートを以下の方法で作成した。

1. 通常継代した培養細胞をセミコンフルエントになるまで培養する。

2. 3T3細胞と、非接触で共培養する。

3. コンフルエントとなったら、Air-lifting（空気液層に暴露）をする。

その後、マウスの角膜上皮をスクレイパーで除去した全眼球をExplantとして培養容器に固定し上皮シートをその上に置き、Air-liftingで器官培養を1週間行った。1週間後、その組織をOCTに埋没させ、切片を作成し、ケラチン12、10の染色を行った。ケラチン12、10は両方とも陰性であった。

4. 通常培養におけるEMTの発生頻度

昨年度、TGF-βの刺激によるEMTの誘導実験を行った。高細胞密度で長期に培養すると、αSMAの発現を認めることを発見し、細胞播種密度を変えて（500, 5000, 50000 cells/cm²）培養し、αSMAの発現に差があることを確認し、そのメカニズムにParacrine manner のTGF-βが関与していた。

ELISAで炎症性サイトカインのレベルを測定した。それぞれの細胞密度で1週間培養し、αSMA細胞の陽性率を確認した。

C. 研究結果

1. 継代培養細胞のコロニー形成率

継代培養した細胞においても、細胞播種密度、培地を管理すれば、コロニー形成率（3-5%）、小細胞サイズ、敷石状形態を保つマウス角膜上皮由来の未分化細胞を維持可能であった。

2. p63の遺伝子導入

導入効率は5%未満と低く、EGFP陽性細胞でもPax6の免疫染色を確認できなかった。

3. リコンビナントモデル

ケラチン12、10は両方とも陰性であった。

4. EMTの誘導メカニズム

と、高細胞密度での濃度が密度依存的よりも有意に高く、そのほかIL-1、GM-CSFも高値を示した。-

D. 考察

これらの結果から、コロニーを形成する未分化細胞を継代培養する条件として、低細胞密度が挙げられ、細胞は一定以上の高細胞密度に生体外で培養すると異常分化する可能性が示唆された。

現在、これらの方法を用いて、アメリカアイバンク眼の角膜輪部より単離した角膜上皮細胞を、マウスの場合と同様な培地で培養し、コロニー形成率、および単一のコロニーから2次コロニーが培養皿上できるかどうかを検討している。

また、Pax6を遺伝子導入してもケラチン12の発現を得られなかったことから、Pax6に依存してケラチン

12の発現がなくなったわけではなく、そのほかのメカニズムが関与している可能性が高い。他の角膜上皮細胞株でもケラチン12の発現はなく、Primary Cultureでは数代の継代後、ケラチン12の発現がなくなること、それらにはエピジェネティクスが関与しているとの報告もあり、この細胞にも培養の環境変化によるDNAのメチル化やヒストンのアセチル化による影響が働いていると考え、トリコスタチンAなどの薬剤を用いて、異常なメチル化を抑制すればケラチン12の発現を誘導できるのではないかと、

と考えている。

2) 実用新案登録
なし

E. 結論

マウス角膜上皮未分化細胞を、低細胞密度に保つことにより、ParacrineなTGF- β によるEMTを抑制し、上皮細胞形態を維持することができた。また80継代目の細胞では、通常培養下で1%以下のケラチン12陽性細胞群を含んでいた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

Kawakita T, Shimmura S, Hornia A, Higa K, Tseng SC Stratified epithelial sheets engineered from a single adult murine corneal/limbal progenitor cell. **J Cell Mol Med.** 2008 Mar 4; [Epub ahead of print]

2) 学会発表

Kawakita T, Shimmura S, Tsubota K, Shimazaki J, Tseng SCG Epithelial Mesenchymal Transition Occurred in aged culture during Clonal Expansion of Murine Limbal Epithelial Cells ARVO annual meeting Fortlauderdale, USA 2007/5/9

Kawakita T, Shimmura S, Higa K, Kazuo Tsubota, Tseng SCG Epithelial Mesenchymal Transition by Cellular Senescence Gordon Conference (Aging of Biology) Les Diablerets, Switzerland 2007/9/27

川北哲也 Single Cellからの培養上皮シート作成 角膜カンファランス シンポジウム 東京、2008/2/28

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

1) 特許取得

なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）
分担研究報告書

角膜上皮細胞培養条件の研究

分担研究者 榛村重人

慶應義塾大学医学部眼科学教室 准教授

研究要旨

正常組織における酸素分圧は大気圧下での酸素分圧より低く、生体外における培養でも、さまざまな細胞の分化、増殖に影響を与えることが報告されているため、角膜上皮未分化細胞における低酸素培養の影響を調べた。

マウス未分化角膜上皮細胞において、低カルシウム無血清培地にて、2%の低酸素下と通常酸素下にて培養した。コロニー形成率、1コロニーあたりの細胞数、および増殖曲線で細胞増殖能と未分化細胞の評価を行った。また、細胞増殖が停止するまで継代を行い、細胞集団倍加数を求めた。分化に対する影響は、角膜上皮未分化マーカー、角膜上皮分化マーカーで評価を行った。その結果、低酸素下の角膜上皮細胞は通常酸素濃度下と比較し、統計学的に有意にコロニー形成率が高く、増殖も有意に促進していた。低酸素下のヒト角膜上皮細胞の継代可能回数も有意に増加した。また低酸素下の細胞における角膜上皮未分化マーカーの発現は通常酸素下培養と有意な差を認めなかったが、角膜上皮分化マーカーの発現は通常酸素下培養よりも有意に減少していた。

低酸素培養法を用いることにより、未分化細胞培養においては、より早く、未分化性の高い細胞を増殖させることができる可能性が示唆された。この方法で増殖させた細胞でより未分化細胞を含んだ時重層化上皮シートが作成できるならば、ヒト臨床応用へ実現できる可能性は高い。

A.研究目的

正常組織における酸素分圧は大気圧下での酸素分圧より低く、生体外における培養でも、さまざまな細胞の分化、増殖に影響を与えることが報告されているため、角膜上皮未分化細胞における低酸素培養の影響を調べることにした。

B.研究方法

マウス未分化細胞において、角膜輪部からDispase処理にて、上皮細胞を単離し、低カルシウム無血清培地にて、2%の低酸素下と通常酸素下にて培養した。コロニー形成率、1コロニーあたりの細胞数、および増殖曲線で細胞増殖能と未分化細胞の評価を行った。また、細胞増殖が停止するまで継代を行い、細胞集団倍加数を求めた。分化に対する影響は、角膜上皮未分化マーカー (K15, p63)、角膜上皮分化マーカー (K3, Involucrin) のRT-PCR, Western blot, および免疫染色で評価を行った。

C.研究結果

低酸素下の角膜上皮細胞は通常酸素濃度下と比較し、統計学的に有意にコロニー形成率が高く、増殖も有意に促進していた。低酸素下のヒト角膜上皮細胞の継代可能回数も有意に増加した。

低酸素下の細胞における角膜上皮未分化マーカー (K15, p63) の発現は通常酸素下培養と有意な差を認めなかったが、角膜上皮分化マーカー (K3, Involucrin) の発現は通常酸素下培養よりも有意に減少していた。(RNA, 免疫染色ともに)

D.考察

これらの結果から、未分化細胞培養においては、低酸素培養法を用いることにより、より早く、未分化性の高い細胞を増殖させることができる可能性がある。

この方法で用いた細胞でより未分化細胞を含んだ時重層化上皮シートが作成できるならば、ヒト臨床応用へ実現できる可能性は高い。

E.結論

低酸素培養法はヒト細胞同様にマウス角膜

輪部上皮細胞の増殖を促進し、また分化を抑制した。低カルシウム、無血清培地と組み合わせることで、より少ない細胞数から多くの未分化細胞を継代することが可能となった。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1) 論文発表

Miyashita H, Higa K, Kato N, Kawakita T, Yoshida S, Tsubota K, Shimmura S. Hypoxia enhances the expansion of human limbal epithelial progenitor cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48:3586-3593, 2007.

2) 学会発表

宮下英之、比嘉一成、加藤直子、川北哲也、吉田悟、坪田一男、榛村重人 低酸素培養におけるヒト角膜輪部上皮細胞の未分化維持 第7回日本再生医療学会総会 2008年3月13日

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）
分担研究報告書

角膜上皮シート作成条件の研究

分担研究者 比嘉一成

東京歯科大学市川総合病院眼科 研究技術員

マウス角膜上皮未分化細胞の効率的に未分化細胞を多く含む上皮シートを作成する条件として、現在臨床応用されているヒト羊膜を用いる場合と、フィブリンを用いる培養法との比較を行った。

通常羊膜上で培養されている方法と同様の方法で培養した角膜上皮細胞シートと、フィブリンの上で培養した角膜上皮シートを、角膜上皮未分化マーカー、角膜上皮分化マーカーの免疫染色またはRT-PCRにより比較した。また、マウスへの移植をおこなった。

上皮シート自体はフィブリンの上でも作成することができた。どちらの上皮細胞シートも K14と基底層にp63を発現していたが、フィブリンを用いたほうは羊膜を用いたシートよりも、若干分化度が高い傾向が示された。マウス眼表面へのシートの移植では移植後3日目でK14陽性の生着した上皮を観察することが出来た。

フィブリンを用いて、キャリアフリーで細胞を培養しても上皮シートは羊膜上培養と、一見遜色ない時重層化上皮シートが作成できるが、羊膜上に培養したほうがやや未分化な細胞を多く含んでいることが示唆された。

生体接着性などはキャリアフリーの利点と言えるが、移植組織の脆弱性、生体内炎症反応に対する抵抗性、などを考慮すると、臨床応用での選択肢の一つとして、フィブリンを考えることもできるかもしれない。フィブリン生体のみを用いて、キャリアフリーの移植可能な角膜上皮シートが作成可能であったが、羊膜上培養と比較し、分化度が高い傾向であった。

A. 研究目的

TKE2の効率的に未分化細胞を多く含む上皮シートを作成する条件として、現在臨床応用されているヒト羊膜を用いる場合と、フィブリンを用いる培養法との比較を行った。

B. 研究方法

通常羊膜上で培養されている方法と同様の方法で培養した角膜上皮細胞シートと、フィブリンの上で培養した角膜上皮シートを、角膜上皮未分化マーカー (K14, p63,)、角膜上皮分化マーカー (K12, involucrin, connexin43) の免疫染色またはRT-PCR、により比較した。また、マウスへの移植をおこなった。

C. 研究結果

上皮シート自体はフィブリンの上でも作成することができた。どちらの上皮細胞シートも K14と基底層にp63を発現していたが、フィブリンを用いたほうは羊膜を用いたシートよりも、若干分化度が高いようで、終末分化で発現するinvolucrinの発現も高い傾向が示された。
マウス眼表面へのシートの移植では移植後3日目でK14陽性の生着した上皮を観察することが出来た。

D. 考察

フィブリンを用いて、キャリアフリーで細胞を培養しても上皮シートは羊膜上培養と、一見遜色ない時重層化上皮シートが作成できるが、羊膜上に培養したほうがやや未分化な細胞を多く含んでいることが示唆された。生体接着性などはキャリアフリーの利点と言えるが、移植組織の脆弱性、生体内炎症反応に対する抵抗性、などを考慮すると、臨床応用での選択肢の一つとして、フィブリンを考えることもできるかもしれない。

E. 結論

フィブリン生体のりを用いて、キャリアフリーの角膜上皮シートが作成可能であった。キャリアフリーのほうは、やや分化度が高かったが、移植可能な上皮シートであった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

Higa K, Shimmura S, Kato N, Kawakita T, Miyashita H, Itabashi Y, Fukuda K, Shimazaki J, Tsubota K. Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 48:597-604, 2007.

2) 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Kawakita T, Shimmura S, Hornia A, Higa K, Tseng SC.</u>	Stratified epithelial sheets engineered from a single adult murine corneal/limbal progenitor cell.	J Cell Mol Med.	In print		2008
Miyashita H, <u>Higa K, Kato N, Kawakita T, Yoshida S, Tsubota K, Shimmura S.</u>	Hypoxia enhances the expansion of human limbal epithelial progenitor cells in vitro.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	48	3586-93.	2007
<u>Higa K, Shimmura S, Kato N, Kawakita T, Miyashita H, Itabashi Y, Fukuda K, Shimazaki J, Tsubota K.</u>	Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier.	Invest Ophthalmol Vis Sci.	48	597-604	2007