

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10907

研究課題名(和文) 自己少量角膜輪部組織の幹細胞 ニッセスフェロイド維持培養法の確立

研究課題名(英文) Spheroidal cultivation of the human limbal epithelial niche from small limbal tissue.

研究代表者

比嘉 一成 (HIGA, KAZUNARI)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60398782

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)：少量組織から角膜輪部ニッチ培養法について検討した。培養1ヶ月後、形成したスフェロイドの凍結切片を作製し、組織学的解析を行った。また、形成したスフェロイドのコロニー形成能および細胞周期の比較も行った。培養1ヶ月後において少量組織から形成したスフェロイドは輪部の採取部位により形成数が異なっていた。スフェロイド形成数の多い部位では比較的大きなコロニーの形成ならびにSlow cycling cellsも多く観察され、一部組織ではN-cadherinも発現していた。輪部機能不全モデルウサギへスフェロイドの移植を行ったところ、移植1週間後において生着し、角膜へ上皮が進展しているのを確認した。

研究成果の概要(英文)：To improve the cultivation method, we assumed a limited autologous tissue and performed spheroidal cultivation from human small limbal tissue. Uniformly small and round spheroids were formed even from small limbal tissue. Efficiency of spheroidal formation was differed in the derived site of the original limbus. Spheroids derived from the high spheroidal formation site showed the large colony forming efficiency and higher ratio of slow cycling cells. In addition, N-cadherin was infrequently-expressed in epithelial spheroid. Spheroids were maintained post-operative adaptation and epithelial proliferation in a limbal-deficient rabbit transplantation model.

研究分野：眼科学

キーワード：corneal limbal niche

## 1. 研究開始当初の背景

角膜上皮の恒常性を維持するためには、角膜周辺部(輪部)に存在する角膜上皮幹細胞の機能を維持することが重要である幹細胞は自己複製能を保ちながら、歳暮を特定の組織へ長期にわたり供給し、臓器組織の恒常性を維持している。造血幹細胞や皮膚の幹細胞の様にはっきりとした幹細胞の同定にまでは至っていないものの、角膜上皮の幹細胞は角膜輪部の POV (Palisades of Vogt) の上皮基底層に存在し (Chen, Stem cell 2004)、この中で最も細胞内顆粒に乏しく、最も小さい細胞群(直径約 10um)であると考えられている (Romano, IOVS 2003)。今のところ 1:1 で対応する角膜上皮幹細胞マーカーについてはコンセンサスを得られていないものの、角膜上皮幹細胞は p63、ケラチン 15、N-cadherin(N-cad)などに陽性であり、角膜上皮分化マーカーであるケラチン 3/12 や Connexin 43、E-cadherin などが陰性で、Label retaining cells 及び side-population(SP)細胞としての特性を持つと考えられている (Lehrer, J Cell Sci 1998; Pellegrini, PNAS 2001; DePaiva, Stem cells 2005; Hayashi, Stem cells 2006)。一方、幹細胞の周りには幹細胞を維持するための環境(ニッチ)が備わっている (Zhang, Nature 2003; Tumber, Science 2004; Alvarez-Buylla, Neuron 2004)。このニッチを携えた体性幹細胞は様々なストレスに耐性ではあるが、幹細胞ニッチの適切な環境維持が幹細胞の未分化の維持に必須であり、外部環境から保護していると考えられる。我々はこれまで、角膜上皮の幹細胞/前駆細胞を維持するようなニッチの環境因子として、N-cad, Melanocyte, SPARC や低酸素などに注目して研究をおこなってきた (Higa, Exp Eye Res 2005; Shimmura, Mol Vis 2006; Miyashita, IOVS 2007; Higa, IOVS 2009; Higa)。その中で、平成 21 年度からの科研費

研究によって、我々は N-cad 陽性の角膜輪部上皮直下で直接上皮と相互作用するニッシェ様の実質側の細胞 (Aquaporin-1 陽性細胞) が存在することを見出した (Higa, Stem Cell Res 2013)。この結果をもとに平成 24 年度より行った科研費研究により、角膜上皮幹細胞とニッシェを保ったまま培養可能なモデルとして、角膜輪部組織から分離した輪部上皮基底細胞周辺の細胞塊 (スフェロイド) の維持培養法を確立した。この培養法では上皮未分化マーカーを維持するスフェロイドを 1 つの輪部組織から約 800 個作成することが可能であり、そのまま少なくとも 1 カ月以上維持でき、かつ 1 個のスフェロイドから角膜輪部上皮と同様のフェノタイプを示す上皮シートを作成することができた。以上のことから、我々が確立した上皮幹細胞及びニッシェモデルであるスフェロイドは、角膜上皮再生医療の細胞源としても有用であると考えられた。しかし、臨床応用、特に今後の再生医療新法下で再生医療を行う上では自己組織の使用が望ましく、この場合細胞源の組織がごく少量となることが予想される。また、臨床応用においては細胞保存法、移植法の最適化も必要である。そこで、これらの課題を解決するため本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、ごく少量の輪部組織からスフェロイドの作成が可能な維持培養法を確立する。あわせて、保存法や移植法についても検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 限られた組織からスフェロイドの分離・維持培養条件の検討

これまで輪部組織全体からスフェロイドの分離を行ってきたが、本研究では自己の限られた輪部組織からの分離を視野に入れ、ドナー角膜の輪部 2x2mm からスフェロイドの作成を試みる (図 1)。

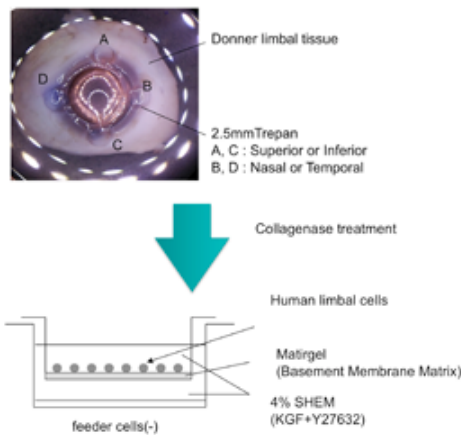


図1. 限られた組織からの分離・培養法。

これまでの方法を参考にしながらコラゲナーゼ処理の濃度、時間条件を検討するとともに培養スケール条件も検討する。培養条件は連携協力者(宮下)と協力して行う。分離培養が上手くいかない場合、酵素的ストレス、酸化的ストレス、不栄養性ストレス等を組み合わせた条件で分離を行い、培養を行う。

#### (2) 限られた組織から作成したスフェロイドの組織学的解析

作成したスフェロイドを経日的に回収し、組織切片を作成する。組織学的解析はヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色ならびに免疫染色にておこなう。免疫染色は角膜輪部基底層で発現するN-cadherin、角膜輪部上皮のフェノタイプを示すケラチン15ならびにp63の抗体を用いて行う。核は4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)を用いて染色した。

組織学的解析により、適した培養期間を選定する。

#### (3) 限られた組織から作成したスフェロイドの増殖能の解析

作成したスフェロイドを経日的に回収し、増殖能について解析する。増殖能の解析は回収したスフェロイドをシングルセルに分離し、コロニー形成能と細胞周期で観察

する。コロニー形成能はRhodamine B染色にて、細胞周期はフローサイトメトリーを用いたDNA細胞周期解析をおこなう。また、スフェロイド中の未分化細胞を検出するため、最初3日間のみ5'-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)ラベルを行って、BrdUの免疫染色により、BrdU陽性のSlow cycling cellsの検出も行った。

#### (4) 保存法の確立

スフェロイドの保存条件を検討するため、研究協力者(兼子)と協力し、保存前後における角膜輪部上皮フェノタイプ、増殖能への影響を観察する。保存後におけるスフェロイドの組織学的解析と増殖能の解析は上記(2)(3)と同様に比較検討し、角膜フェノタイプならびに増殖能が最も温存される保存法を開発する。

#### (5) 移植法の確立

スフェロイドの移植条件を検討するため、ウサギに輪部機能不全モデルを作成し、スフェロイドの眼表面への移植を行う。移植法はこれまですでに臨床で行われている角膜輪部移植を参考にする。また、スフェロイドを生着させるために、組織接着剤等を使用し、移植後の安定を図る工夫を行う。移植法に関しては連携研究者(榛村)と協力し、最も優れた移植法を開発を行う。

#### (6) 移植後の経過観察

移植後はスリットランプ、フルオレセイン染色等を用いて角膜上皮の経過観察し、どの移植法が適したものか判定するのに役立つ。

#### (7) 移植後の組織学的解析

移植後の組織学的解析を行うため、H.E.染色ならびに予め取り込ませたフェルカルボトランをベルリンブルーで染色を行う。

#### 4. 研究成果

培養1ヶ月後において少量組織から形成したスフェロイドは輪部の採取部位により形成数が異なっていた(図2)。

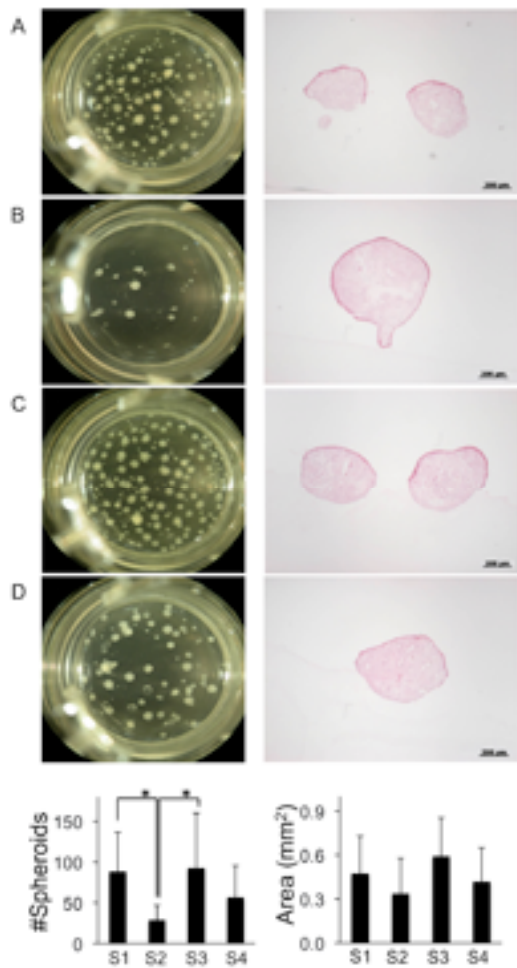


図2. 限られたそれぞれの組織から培養したスフェロイド(A-D左図)とその組織切片のヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色(A-D右図)。形成したスフェロイドの数(左グラフ)と大きさ(右グラフ)

スフェロイド形成数の多い部位では比較的コロニー形成率(CFE)が高く、大きなコロニーの形成が見られた(図3)。また、BrdU陽性のラベルリテイニング細胞や Slow cycling cells も多く観察され(図4)、一部組織ではN-cadherinも発現していた(図5)。1ヶ月間培養したスフェロイドを少量の保存液でも保存可能か検討するため、直接液体窒素が触れることがない2段階容器を用い

て保存を行った(図6)。

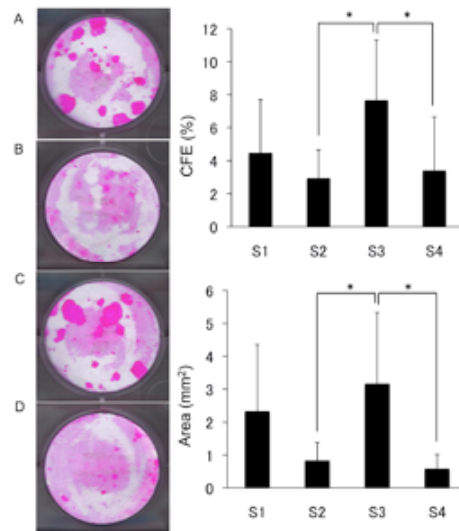


図3. それぞれのスフェロイドから形成した上皮のコロニー(A-D)。染色はローダミンB。それぞれのスフェロイド由来コロニーのコロニー形成率(上グラフ)とコロニーの面積(下グラフ)。

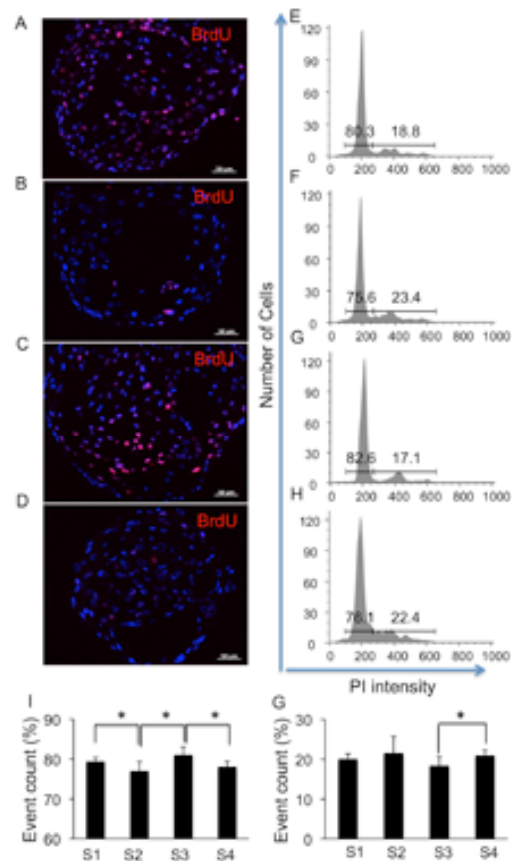


図4. BrdUラベルリテイニング細胞(A-D)

と細胞周期 (E-H)。細胞周期における G0/G1 期 (I) または S-G2/M 期 (G) の割合を棒グラフにしたもの。

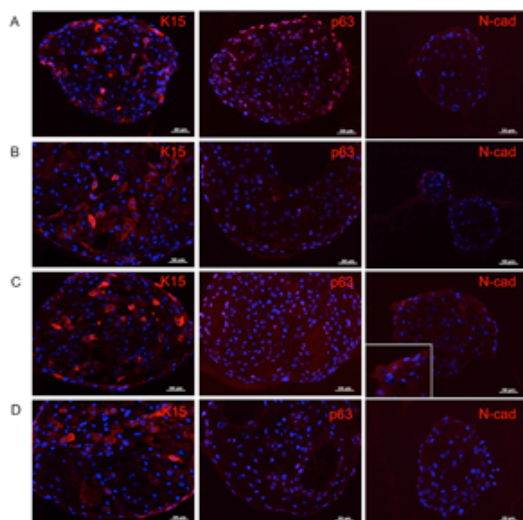


図5. それぞれのスフェロイドにおける K15、p63 ならびに N-cadherin の免疫染色(A-D)。左図 K15、中図 p63、右図 N-cadherin)。核染色は DAPI。

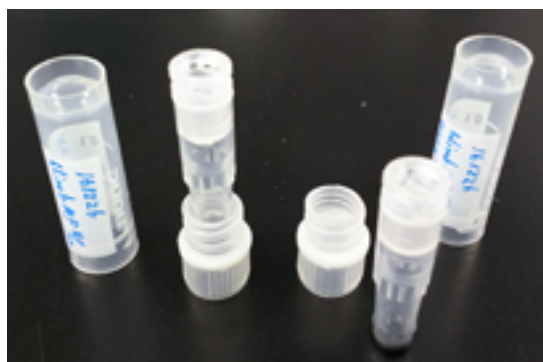


図6. 通常のセラムチューブ内に少量の保存液でも保存できるように内側に保存チューブを組み合わせたもの。

短期保存は1週間後、長期保存は1年後のスフェロイドを用いて行った。保存終了したスフェロイドをあらかじめ用意しておいたマイトマイシンC処理した3T3上に播種し、10日から1週間培養を行った。形成した上皮のコロニーはローダミンBにて染色した。短期保存では昨年度と同様に-80C ならびに液体窒素での保存では増殖能への大きな違いは見られなかったが、1年間の長期保存では

-80C ではほとんど増殖が見られなくなっていることがわかってきた。一方、保存液の量による影響も検討したが、大きな違いは観察されなかった。

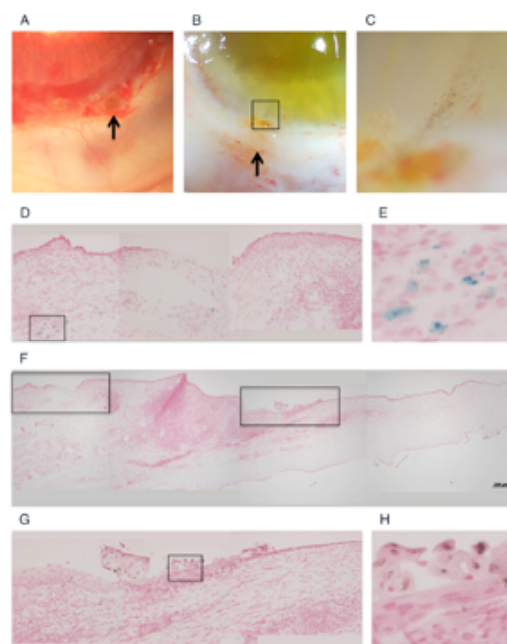


図7. スフェロイドのウサギ輪部機能不全モデルへの移植。A)移植されたスフェロイド(矢印)。B)移植1週間後のスフェロイド(矢印)。C)移植されたスフェロイドから出てきたメラニン色素を有した上皮。D-H)スフェロイド移植部位のベルリンブルー染色。核染色は Nuclear Fast Red 染色。D)Fの左四角の拡大写真。E)Dの拡大写真。スフェロイド移植前に取り込ませたフェルカルボトラン染色(青)。G)Fの右四角の拡大写真。H)Gの拡大写真。メラニン色素を有した上皮(茶褐色)。

1ヶ月培養したスフェロイドが In Vivo で生着し、上皮を供給することができるか観察するため、ウサギ輪部機能不全モデルを作成し、角膜輪部へスフェロイドの移植を行った。移植1週間後において、メラニン色素を有したスフェロイドから、上皮が角膜へ向かって進展しているのを確認することができた(図7)。

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

1. Higa K, Miyashita H, Shimazaki J, Tsubota K, Shimmura S. N-cadherin expression in hypoxic spheroidal cultivation of human limbal epithelial cells. Asia ARVO 2015 Annual Meeting, Yokohama, Japan, 2015/2/16-19.
2. 比嘉一成, 宮下英之, 島崎潤, 坪田一男, 榛村重人 「自己少量角膜輪部ニッチ培養法の検討 (7/21, Poster)」 第36回日本炎症・再生医学会、東京、2015/7/21-22
3. 比嘉一成, 宮下英之, 島崎潤, 坪田一男, 榛村重人. 少量組織から角膜輪部ニッチ培養法の検討. 第40回日本角膜学会総会, 第32回日本角膜移植学会, 北佐久郡, 2016/2/18-20.
4. Higa K, Miyashita H, Shimazaki J, Tsubota K, Shimmura S. Spheroidal cultivation of the human limbal epithelial niche from small limbal tissue. (Poster Session) The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2016Annual Meeting, Seattle, Washington, U.S.A., 2016/5/1-5/5.
5. 比嘉一成, 宮下英之, 島崎潤, 坪田一男, 島崎潤. 角膜輪部ニッチ培養における低酸素の影響. 第37回日本炎症・再生医学会総会, 京都, 2016/6/16-17.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

比嘉一成 (HIGA, Kazunari)  
東京歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 60398782

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )