

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20285

研究課題名(和文) 培養上皮内における未分化細胞と増殖秩序

研究課題名(英文) Label retaining cells in long term cultured confluent epithelial cell sheets

研究代表者

庭野 博子(Niwano, Hiroko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号：90748518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療にも用いられる培養上皮中に、生体と同様の、ゆっくり増殖する未分化細胞が存在するか検討した。コンフルエント直前の初代培養角膜輪部上皮細胞にEdUを3日間連続投与後、コンフルエントのまま6ヶ月間培養し、ゆっくり増殖する細胞をLabel retaining cells (LRCs)として検出した。EdU陽性率は標識直後の58.8%から追跡後は8.8%まで有意に減少したが、未分化細胞マーカーK15陽性細胞塊では34.8%、K15陰性細胞では6.0%で、K15陽性細胞で高い傾向にあるものの有意差は認められなかった($p=0.09$)。結果は研究協力者の論文で発表した。

研究成果の概要(英文)：To confirm whether the cultured epithelial sheets contain slow cycling cells as like in vivo tissue, the researcher labeled proliferating cells in limbal epithelial cells around confluence by serial 3 day feeding of EdU, and cultured confluent sheets for additional 6 months. Although EdU rate was significantly decreased from 58.8% to 8.8%, EdU rate in undifferentiated epithelial cells (K15+ cell clusters) was 34.8%, was not significantly different from the rete 6.0% in K15 negative differentiated cells ($p=0.09$), due to its high variance. We published our data including this study in Scientific Reports on 2017, 10.1038/srep43557.

研究分野：眼科

キーワード：角膜上皮 幹細胞 培養

1. 研究開始当初の背景

生体の角膜輪部上皮等の重層上皮においては、ゆっくり増殖する幹細胞、一過性に激しく増殖する TA 細胞、最終分化細胞からなる増殖秩序が存在する。一方、体外でもこれら重層上皮の未分化細胞を増殖させることができ、培養上皮シートとして臨床応用されている。研究開発当初、研究代表者の所属するグループは培養上皮を継代無しのコフルエントのシートのみで長期間(1年間)維持できる型を確立した。ここから、この培養上皮シート中にも生体と同様の増殖秩序が存在するのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、コフルエント状態の培養上皮シートにおける増殖秩序の解析を目的とし、既存の核酸標識・長期追跡を組み合わせて、ゆっくり増殖する細胞を Label retaining cells(LRC)として検出した。併せて、激しく増殖する細胞を通常の核酸パルス標識で検出した。

3. 研究の方法

ヒト角膜輪部上皮細胞の初代培養は、我々の研究室で確立した方法で行った (Miyashita H et al., 2013, Stem Cells Transl. Med.)。具体的には、6 well plate の底にヒト間葉系幹細胞を播種、コフルエントで MMC 処理してフィーダー細胞とした後、ウェル上に競るカルチャーインサートを用意し、米国アイバンクドナー角膜の輪部から dispase 処理で回収した上皮細胞を播種した。培地には DMEM/F12, FBS (4%), insulin, T3, hydrocortisone, isoproterenol, 抗生剤、KGF, Y-27632 を用い、コフルエント後は毎日培地交換を行った。

LRC 検出実験では、セミコフルエント状態の初代培養角膜輪部上皮細胞に対し、1 μ M の核酸アナログ EdU で 3 日間連続標識した後、EdU を含まない培地で 6 ヶ月間培養した。この処理により、セミコフルエントで増殖する多くの細胞が DNA 内に EdU を取り込むが、6 ヶ月間培養する間に増殖する細胞では EdU が希釈され、またターンオーバーで脱落する細胞は培養上皮シートからそのまま脱落するため、ほとんど増殖せずかつ上皮シートから脱落しない細胞のみが EdU を維持する LRC として検出できる。

併せて、コフルエントで長期培養中の上皮シートに対して 24 時間のみ EdU (10 μ M) で標識を行い、この間に増殖した細胞を検出した。

EdU の検出は、固定後に市販キットを用い

て whole mount staining で行った。またこのとき、未分化上皮細胞マーカーである KRT15 も併せて蛍光免疫染色で検出した。

4. 研究成果

LRC 検出において、EdU の陽性率は 58.8% \pm 9.6% (平均 \pm 標準偏差) から 8.8% \pm 3.1% まで有意に低下した (n=4, p<0.01)。LRC はまとまって分布する傾向にあり、既報と同様に培養上皮シートにもゆっくり増殖する細胞がある事が示唆された。

次に未分化上皮特異的ケラチン K15 との二重染色を行ったところ、培養 6 ヶ月で上皮シートは K15 陰性細胞と K15 陽性細胞塊に分かれるが、K15 の分布と LRC は必ずしも一致しなかった。K15 陰性細胞の LRC 率が 6.0% \pm 3.9% に対して K15 強陽性細胞の LRC 率は 34.8% \pm 20.6% で、多い傾向にあるものばらつきが大きく、有意差はなかった (n=4, p=0.09)。むしろ LRC は K15 陽性細胞塊を含む広い範囲に広がっており、基底層から表層細胞にまで連続する LRC の流れも観察された。なお、平行して Flow cytometry による解析も試みたが、K15 の FCM 解析が難航し、結果を得ることはできなかった。

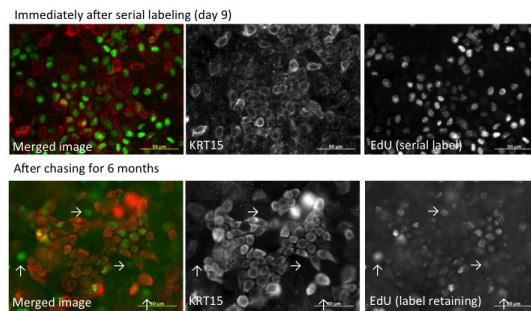


図 1: 培養上皮シートにおける LRC。連続標識直後および 6 ヶ月追跡後の K15 陽性細胞と EdU 陽性細胞。この実験において、6 ヶ月追跡後の EdU 陽性細胞は、ほとんど増殖せず EdU 標識を失わなかった細胞を示す。矢印は K15 陰性の LRC。この写真では K15 陽性細胞塊に LRC が集中しているように見えるものの、実際には角膜輪部組織ロットや上皮シートの部分によってもばらつきが大きく、n=4 での有意差は認められなかった。

平行して、上皮シート内で激しく増殖する細胞を EdU の pulse labeling (10 μ M, 24hr) で検出したところ、培養 1 ヶ月で K15 陽性細胞塊の EdU 陽性率が 2.1% \pm 2.8% に対して K15 陰性細胞で 1.8% \pm 2.2% (n=4)、培養 3 ヶ月で K15 陽性細胞塊の EdU 陽性率が 1.5% \pm 1.0% に対して K15 陰性細胞で 1.9% \pm 2.0% (n=4) であり、ばらつきが大きく有意差は認められなかった (p=0.44, p=0.49)。

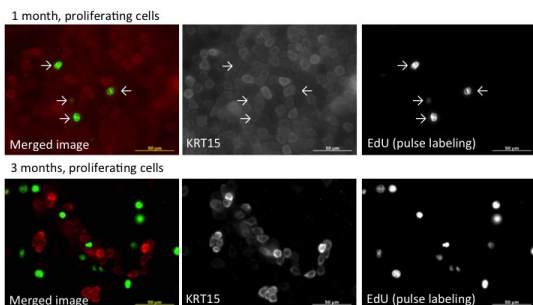


図2：培養1ヶ月目および培養3ヶ月目の培養上皮シートにおける増殖細胞。この実験におけるEdU陽性細胞は、標識24時間の間に増殖してEdUを取り込んだ細胞を示す。矢印はK15, EdU二重陽性細胞。この写真では培養1ヶ月と培養3ヶ月で増殖する細胞がK15陽性細胞からK15陰性細胞に置き換わっている様に見えるが、実際にはK15陽性率も減少するため、K15陽性細胞自体のEdU陽性率(増殖細胞率)はK15陰性細胞のEdU陽性率と有意差が認められなかった。

なお、想定外の結果として、LRC解析用の上皮シートをメラノサイトマーカーであるMELANAおよびPMELでも染色したところ、上皮シート内のメラノサイトの一部もEdU陽性のLRCであった。

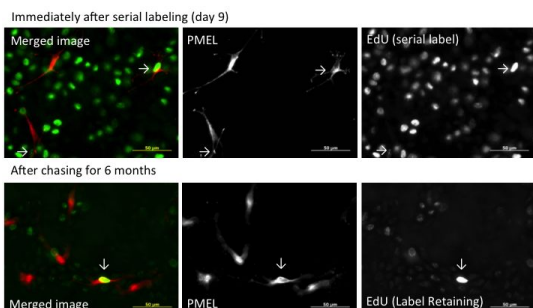


図3：培養上皮シート内のメラノサイトと増殖。メラノサイトマーカーPMEL陽性細胞の一部は連続EdU標識でEdUを取り込み、6ヶ月追跡後も標識を維持する。矢印はPMEL, EdU二重陽性細胞。

これらの結果の一部を研究協力者の宮下英之や榛村重人のデータとともに論文にまとめ、2017年2月のScientific reports誌で発表した。

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 1 件)

Miyashita H, Niwan H, Yoshida S, Hatou S, Inagaki E, Tsubota K, Shimmura S.

Long-term homeostasis and wound healing in an in vitro epithelial stem cell niche model. Scientific Reports, 査読有、vol 7, 2017, Article number 43557 (電子出版のため雑誌の掲載ページという概念なし)、<https://www.nature.com/articles/srep43557>

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 庭野博子, 宮下英之, 坪田一男, 榛村重人, ヒト角膜輪部上皮モデルの創傷治癒後の長期経過、第37回日本炎症・再生医学会、2016/6/16-6/17、京都勧業館みやこめっせ(京都府・京都市)
2. 宮下英之, 庭野博子, 吉田悟, 羽藤晋, 坪田一男, 榛村重人, ヒト角膜輪部上皮モデルにおける創傷治癒、第15回再生医療学会総会、2016/3/17-3/19、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
3. 宮下英之, 庭野博子, 坪田一男, 榛村重人, 培養ヒト輪部上皮モデルにおける創傷治癒、角膜カンファランス 2016、2016/2/18-2/20、軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県・軽井沢町)
4. 庭野博子, 宮下英之, 坪田一男, 榛村重人, 長期培養上皮シートにおける細胞ターンオーバー率、第36回日本炎症・再生医学会、2015/7/21-7/22、虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都・港区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

庭野 博子 (NIWANO HIROKO)
慶應義塾大学・医学部・特任研究員

研究者番号：90748518

(2)研究分担者

若手研究のため無し

(3)連携研究者

若手研究のため無し

(4)研究協力者

榛村 重人 (SHIMMURA SHIGETO)

宮下 英之 (MIYASHITA HIDEYUKI)