

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11461

研究課題名(和文) 未分化増殖性ヒト角膜内皮細胞亜集団の in vitro 分化成熟法の創出

研究課題名(英文) Establishment of an in vivo cell differentiation method that induces an undifferentiated human corneal endothelial subpopulation to mature corneal endothelial cells

研究代表者

戸田 宗豊 (Toda, Munetoyo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：30550727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の重層化・線維芽細胞様形態への変化を抑えた改変増幅法を確立し、増幅効率を本研究課題開始当初の約1.5倍にまで増加させ、ヒト角膜内皮細胞未分化増殖性亜集団を5週間で約10,000倍まで増幅する増幅工程法を確立した。また、多能性分化細胞の分化誘導に用いられている機能性低分子化合物の混合物を用いた分化誘導前処理により分化誘導効率が上昇することを見出し、分化誘導工程で上記未分化増殖性亜集団を～85%の成熟分化角膜内皮細胞含有率で分化成熟させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一眼から100人水準の増幅であった治験時製法に比べ大幅に増幅効率が改善された。本技術の応用により、Fuchs 角膜ジストロフィー患者を含む300万人以上の潜在患者への適用が可能となり、本邦が世界をリードする革新的角膜移植術である「培養ヒト角膜内皮細胞前房内注入療法」を世界的なレベルにまで発展させることができると期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this present study, we successfully established a modified cell expansion method that increases the efficiency of expanding an undifferentiated human corneal endothelial cell (CEC) subpopulation to approximately 1.5 times higher than the previously used method by suppressing the stratification of the cells and the changes to a fibroblast-like morphology. Our novel method successfully expands an undifferentiated human CEC subpopulation by approximately 10,000 times over a 5-week period. Moreover, we found that pretreatment with specific functional low-molecular-weight compounds used for the induction of the differentiation of pluripotent differentiated CECs increases the efficiency of those cells to differentiate to mature CECs. These findings allowed us to successfully establish a cell differentiation method that induces an undifferentiated human CEC subpopulation to mature CECs at an efficiency of approximately 85%.

研究分野：医歯薬学

キーワード：角膜内皮細胞 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 成熟分化型ヒト角膜内皮細胞の増幅培養技術提供により、DSAEKなどの既角膜移植術を遥かに凌ぎ、一眼から100人水準の機能不全角膜内皮組織の再建という革新的医療技術を本研究代表者も参画して完成させた。一方で、Fuchs角膜ジストロフィー(FECD)患者を含む300万人以上の潜在患者への適用にはこの水準での増幅法で対応するには困難であり、さらに高効率な増幅培養技術が求められた。

(2) 角膜内皮細胞(CEC)の幹細胞から成熟分化細胞への細胞分化系譜は全く未知であり、体性幹細胞の存在すら不明である。研究代表者らは、培養ヒトCECが、幹細胞様未分化増殖性細胞、中程度分化低増殖性細胞、老化休止期細胞、非増殖性成熟分化細胞の少なくとも4亜集団以上から構成され、これらを相互識別する方法を確立した(Invest Ophthalmol Vis Sci., 2016;57:4749)。iPSの増殖のために開発された無血清培地でLaminin-511 E8フラグメントで刺激する条件下で培養するとCD44^{med}の均一未分化増殖性亜集団が高効率で得られることを見出し、短期間で細胞を増幅させることが可能となった。一方で、ヒト生体内のCECと類似の細胞特性を有するのはの成熟分化細胞であり(Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016;57:4385)、高い臨床効果を得るためには上記幹細胞様未分化増殖性細胞を高効率で成熟分化細胞に分化させる技術が必要であった。

2. 研究の目的

一眼より5000人以上に移植注入可能な成熟分化ヒト角膜細胞を2ヶ月以内に生産できる次世代培養法の創出を目標とする。CD44⁺CD90⁺の未分化細胞をこの水準で増幅する技術は完成したことをもって本課題に挑戦した。未分化幹細胞様増殖性亜集団を成熟分化細胞に分化させる技術が開発できれば、前房内細胞移入再生医療という本邦初の革新的医療技術をさらに発展させ、世界展開にも繋がる。

成熟分化CECの特性は、表面抗原、代謝産物、産生サイトカイン、分泌EVsの諸局面から明らかにしており(Invest Ophthalmol Vis Sci., 2016;57:4393、4295、4452)。本研究で、幹細胞様未分化増殖性細胞の特性に就いての解析を充実し、細胞骨格・ECMの修飾に働くもの、ミトコンドリアの発現・その機能の修飾に働くもの、解糖系に働く酵素の阻害剤、アミノ酸代謝に働くDNAメチル化などエピジェネティック修飾物質、抗酸化応答と同化作用双方を精妙に調節するNRF2活性化剤など、多岐に亘る機能性低分子化合物を探索し、培養微小環境を改善することで分化誘導に繋げる。また、増殖期と静止期にある細胞の環境適応戦略の違い(例、Glu代謝)を代謝物質やp62-NRF2-Keap1回路経路の代謝リプログラミングの視点からも評価する。分化経路の解明は独り上記目的のみならず、内皮機能不全の病態理解にも画期的進歩をもたらすものであると考える。

3. 研究の方法

幹細胞様未分化増殖性細胞の特性解析により分化誘導に優れる候補化合物を選定し、選んだ機能性低分子化合物を用いた培養微小環境の改善を行い、成熟分化細胞特性により分化効率を判定し、効率的成熟分化法を最終的に実践検証する。

我々は、課題開始時点で成熟分化CEC並びに未分化増殖性前駆細胞双方をほぼ均一に培養生産することに成功している。双方の細胞特性の比較解析により得られる細胞特性の違いと分化誘導のための培養条件(分化誘導因子・エピジェネティック阻害剤、細胞骨格修飾剤、エネルギー代謝修飾剤 etc.)を分化誘導候補化合物として探索する。

成熟分化誘導の評価は共通して、既に解析結果が得られている下記の成熟分化細胞特性を指標とする。(1)細胞表面抗原による亜集団解析、(2)機能タンパク発現、(3)細胞形態、(4)産生タンパク(産生サイトカイン)、(5)代謝産物、(6)細胞外小胞体微粒子(EVs)。

(A) 幹細胞様未分化増殖性細胞の特性解析

無血清培地で増殖させた幹細胞様未分化増殖性細胞について特性解析を実施する。(1)メタボローム解析、(2)分泌EVs、(3)miR、(4)ミトコンドリア膜電位、(5)分化成熟過程で変動するリン酸化シグナル。得られた情報と既知の成熟分化細胞特性の比較により、候補となる機能性低分子化合物を選定し、培養微小環境の改善に取り組む。

(B) 候補化合物による分化誘導

(ア) 細胞骨格修飾剤

未分化幹細胞様増殖性細胞からの分化成熟過程には、佐谷らのadipocyteでの報告(Nobusue et al. Nat Commun. 2013;26:3368)と同じく、RhoA-Rock signalingを介した細胞骨格のリモデリングが関わっていると考えている。事実、Y-27632は、分化成熟促進作用を有するが、この過程で佐谷らの報告と同様、CECでもアクチン骨格の脱重合作用を持つことが予備的試験により認められている。したがって、下記のようなアクチン重合阻害剤を培地に添加し、分化成熟が促進されるかを検討する。

- ・ Latrunculin A、Swinholide A
- ・ CK-666、CK-869 (Lomakin et al. Nat Cell Biol. 2015;17:1435)

(イ) エピジェネティック阻害剤

相転移や老化細胞において miR-184 の発現量が成熟分化 CEC に比べ低下することが判明している。miR-184 はグリオーマおよび乳がん細胞において CD44 の発現を抑制することが報告されている (Fenget et al. Int J Exp Pathol. 2015;8:9376)。CEC は成熟分化と共に CD44 の発現が低下することを考えると本 RNA 干渉が CEC の増殖、分化に大きな影響を持つことが想定される。この分子機構には、c-Myc、HDAC 経路の関与の可能性が想定される。従って、培養液への HDAC 阻害剤による分化誘導促進効果を検討する。

(ウ) アミノ酸欠損、あるいは増補培地による分化誘導

無血清培地で増殖させた CEC (増殖性未分化 CEC) はメチオニンを欠損させた無血清培地で培養すると死滅すること、すなわち、ヒト ES/iPS 細胞と同様に高いメチオニン要求性を持つことを明らかにしている。このことから、白木 (東京工業大学) らによるヒト ES/iPS 細胞のメチオニン代謝による未分化維持・分化制御機構の解析法をもとに検証する。すなわち、メチオニン除去培地で一定時間培養後、メチオニンの代謝産物である S-アデノシルメチオニン濃度の低下、p53 シグナルの活性化、Nanog の発現低下、細胞増殖の抑制が引き起こされるかを検証する。また、メタボローム解析の結果から、成熟分化 CEC の培養上清では、Ser、BCAA (Ile, Leu, Val) の消費が高い、すなわち、これらのアミノ酸の要求性が高いことを明らかにしている。したがって、これらのアミノ酸の増補により分化が促進されるかを検討する。

(エ) 細胞-ECM 相互作用・細胞-細胞間相互作用

インテグリン-ECM 間相互作用による分化誘導: 生体内環境を模倣し、デスメ膜成分であるラミニニン-511、-411 等の各種ラミニン、Type IV コラーゲンをコーティングしたプレート上で培養を行い、分化誘導を試みる。

(オ) 代謝修飾剤

グルコース欠損培地で培養すると成熟分化 CEC が増加する。これは、成熟分化細胞ではグルコース代謝ではなくミトコンドリアにおける OXPHOS により効率よくエネルギーを得ているのに対し、相転移細胞では主に解糖系を利用しているためだと考えられる。また、FECD 患者では Nrf2 が不安定化し細胞枯死に至るとされる (Bitar et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012;53: 5806)。抗酸化応答の鍵分子 Nrf2 経路の活性化 (Milder et al. Epilepsy Res. 2012; 100:295) Bach1/2 系を含め、ミトコンドリア呼吸系を活性化する低分子化合物も広く探索する。

4. 研究成果

細胞の増幅工程においては、培地添加物の選別を行い、細胞の重層化・線維芽細胞様形態への変化を抑えた改変増幅法 (図 1) により増幅効率を約 1.5 倍にまで増加させ、1 週間で約 7.5 倍、5 週間で約 10,000 倍にまで未分化増殖性細胞を増幅することが可能となった (図 2)。

分化誘導工程については Latrunculin A、Swinholide A、CK-666、CK-869 などの細胞骨格修飾剤や エピジェネティック阻害剤、あるいは細胞-細胞外マトリクス相互作用など当初の計画にあった分化誘導法を試みるも顕著な分化誘導効果はみられなかったが、多能性分化細胞の分化誘導に用いられている機能性低分子化合物の混合物を用いて分化誘導前に前処理を行うことにより 30~80% の分化誘導効率を達成した (図 3)。しかしながら、ドナー角膜による分化誘導効率の差異が大きいことが課題として残された。そこで、

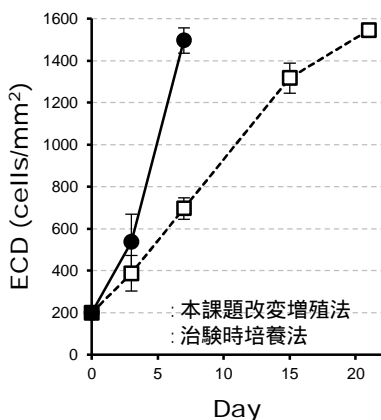


図 2: 改変増殖工程と治験時培養法の細胞増殖の比較

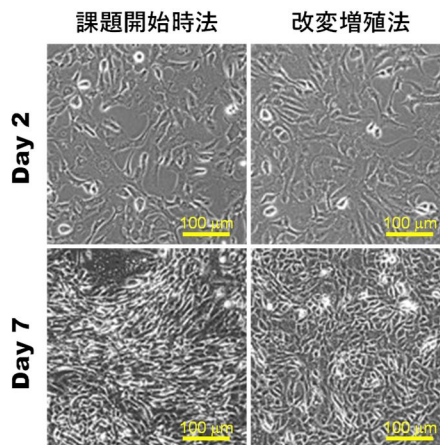


図 1: 課題開始時増殖工程、改変増殖工程で培養した細胞の形態

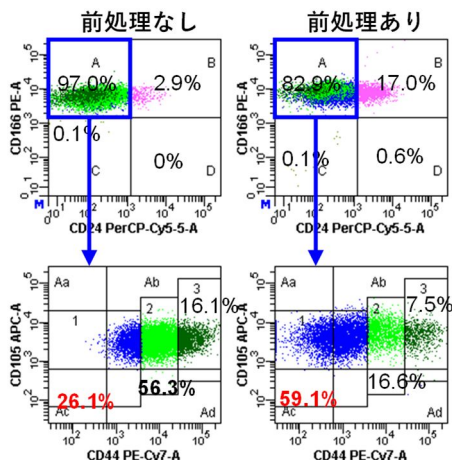


図 3: 分化誘導前処理の分化誘導に対する効果

それぞれの機能性低分子化合物が未分化増殖性細胞にどのような変化を与えるのかをフローサイトメーターにより解析したところ、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤の一つが阪大・西田らのグループにより報告されている角膜内皮前駆細胞 (Hara S. et al. Stem Cells Dev. 2014;23(18): 2190) に類似した p75NTR 陽性細胞の含有率を大幅に増加させることを見出した (図4)。一方で、

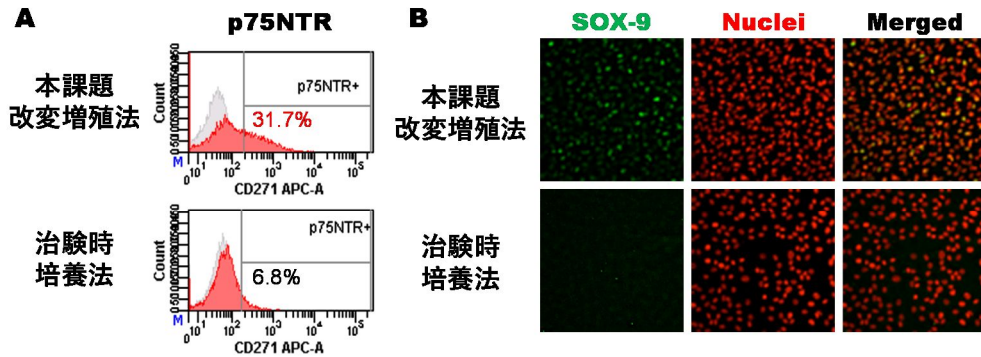


図4: 改変増殖法で培養した細胞の前駆細胞関連マーカの発現

GSK3β 阻害剤である CHIR99021 は、CD166 発現細胞含有率を低下させることが明らかとなった。さらに、BioPlex を用いて増幅工程、分化誘導工程それぞれにおいて各処理の有無で培養上清中のサイトカイン産生がどのように変化するかを網羅的に解析した。以上の解析をもとに、前処理に用いる機能性低分子化合物の組み合わせを改変し、分化誘導効率を改善することができた。また、分化誘導工程に使用する分化誘導培地についても基礎培地および添加物の検討を行った結果、成熟分化 CEC を ~85% の効率で得ることに成功した (図5)。

これらの細胞の純化法としては代謝経路の違いを利用して行なう方法、セルソーターを利用したソーティング法や磁気ビーズを利用した分離法がある。一般的なセルソーターによる方法ではソーティング時の細胞ダメージが大きく、分離後の再播種・培養工程における形態の悪化が懸念された。そこで、既に報告している CD44 Magnetic beads を用いた純化法 (Toda M. et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016;57: 4599) により、分化誘導工程後の細胞の精製を試みた。その結果、図6に示したように未分画のものに比べて処理後の細胞(CD44 陰性画分)で成熟分化 CEC

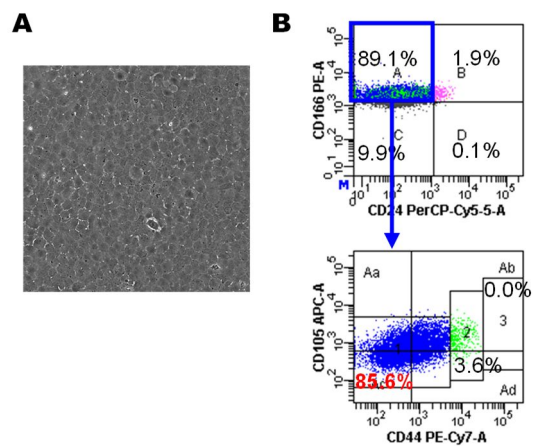


図5: 分化誘導後の細胞形態 (A) とフローサイトメーターによる亜集団純度解析 (B)

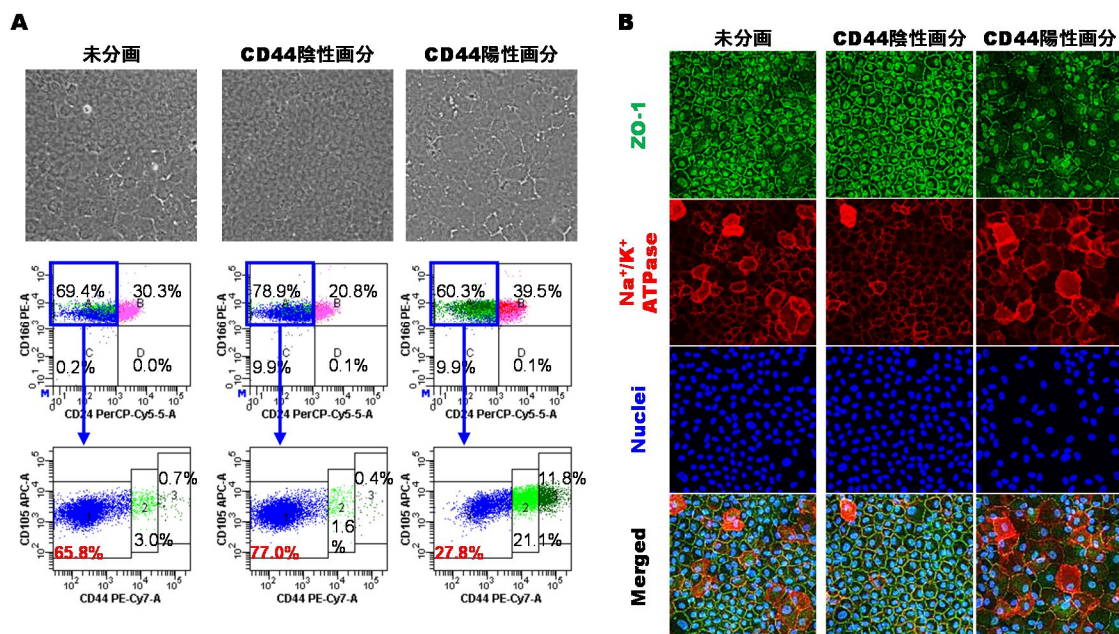


図6: Magnetic Beads により分離した分化誘導後の細胞形態 とフローサイトメーターによる亜集団純度解析(A)、および免疫染色による機能タンパク発現の評価 (B)

の含有率が上昇したものの、依然、非目的細胞工程（相転移細胞）がみられた。純化後に残存していた相転移前駆段階あるいは初期過程の細胞が再培養工程において非目的細胞に転じたと推測される。更に純度を上げるためには、より早期の段階において相転移細胞を判別可能なマーカーが必要であると考ええる。

本研究課題において、臨床において移植注入可能な品質の成熟分化ヒト角膜細胞を得るといふ点では純化方法のさらなる検討などいくつかの課題が残されたものの、5週間で約5000人分相当の細胞数にまで増幅、その後約1か月の分化誘導培養で約80%の分化誘導効率と当初の達成目標に近い成果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toda Munetoyo, Yukawa Hiroshi, Yamada Jun, Ueno Morio, Kinoshita Shigeru, Baba Yoshinobu, Hamuro Junji	4. 巻 60
2. 論文標題 In Vivo Fluorescence Visualization of Anterior Chamber Injected Human Corneal Endothelial Cells Labeled With Quantum Dots	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 4008 ~ 4020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.19-27788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hamuro Junji, Numa Kohsaku, Fujita Tomoko, Toda Munetoyo, Ueda Koji, Tokuda Yuichi, Mukai Atushi, Nakano Masakazu, Ueno Morio, Kinoshita Shigeru, Sotozono Chie	4. 巻 61
2. 論文標題 Metabolites Interrogation in Cell Fate Decision of Cultured Human Corneal Endothelial Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 10 ~ 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1167/iovs.61.2.10	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 戸田宗豊、湯川博、山田潤、上野盛夫、有本知子、外園千恵、馬場嘉信、木下茂、羽室淳爾
2. 発表標題 量子ドット標識ナノ技術による前房内注入培養ヒト角膜内皮細胞の生体内動態の解析
3. 学会等名 角膜カンファランス 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸田宗豊、丸山悠子、上原朝子、北澤耕司、上野盛夫、羽室淳爾、外園千恵、木下茂
2. 発表標題 ドナー角膜内皮細胞の健全性に影響を及ぼす要因の探索
3. 学会等名 第123回 日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Munetoyo Toda, Koji Kitazawa, Morio Ueno, Yuko Maruyama, Asako Uehara, Chie Sotozono, Junji Hamuro, and Shigeru Kinoshita
2. 発表標題 Factors influencing the health and longevity of donor corneal endothelial cells
3. 学会等名 Annual meeting of ARVO 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	木下 茂 (Kinoshita Shigeru)		
研究協力者	外園 千恵 (Sotozono Chie)		
研究協力者	上野 盛夫 (Ueno Morio)		
研究協力者	上原 朝子 (Uehara Asako)		
連携研究者	羽室 淳爾 (Hamuro Junji) (80536095)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授 (24303)	