

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11480

研究課題名(和文) ヒト眼発生モデルSEAMを用いた角膜上皮発生機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of corneal epithelial development using SEAM as human eye development model

研究代表者

林 竜平 (Hayashi, Ryuhei)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：70535278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト眼発生モデルであるSEAMを用いて、角膜上皮発生に寄与する成長因子およびECMに由来するシグナル伝達機構の解明を目的とした。p63遺伝子をEGFPで標識したノックインiPS細胞を樹立した。このiPS細胞株を用いてSEAM誘導を行ったところ、角膜上皮誘導には内在的BMPシグナルに加えWNTシグナル阻害が必須であることを明らかにした。ECMに関しては、SEAM誘導には眼組織に広く発現し、かつ、強いインテグリン結合能を有するラミニン511が重要であり、神経外胚葉と角膜上皮を含む表面外胚葉の発生分岐には、インテグリン-ラミニン結合に由来するYAPを介したシグナルが重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒトの眼発生を模倣した細胞モデルであるSEAMを用いて、特に角膜上皮の発生、分化の機序について調べた。角膜上皮は再生医療のための細胞源としてのニーズが高く、我々もiPS細胞を用いた角膜上皮再生医療の開発に取り組んできた。一方で、iPS細胞から角膜上皮を安定的かつ効率的に分化誘導することは容易ではない事も明らかとなってきた。本研究で得られた成果により角膜がどのように発生・分化するのかの理解が深まったことで、角膜上皮を得るための方法が改良され、より安定的かつ効率的に角膜上皮を得ることが可能となった。これにより、再生医療の課題でもあるコスト削減や安全性を高めることが可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the signalling mechanisms derived from growth factors and ECMs that contribute to corneal epithelial development by using a human eye development model, SEAM. First, knock-in iPS cell line labelled with EGFP for the p63 gene was established. This KI iPS cell line was used for SEAM induction and demonstrated that in addition to intrinsic BMP-signalling, WNT-signal inhibition is essential for corneal epithelium induction. Regarding ECMs, only laminin isoform 511, which is widely expressed in ocular tissues and has strong integrin-binding capacity was able to induce typical SEAM formation, and that YAP-mediated signals derived from integrin-laminin binding are important for the developmental branching of neuroectoderm and surface ectoderm, including corneal epithelium.

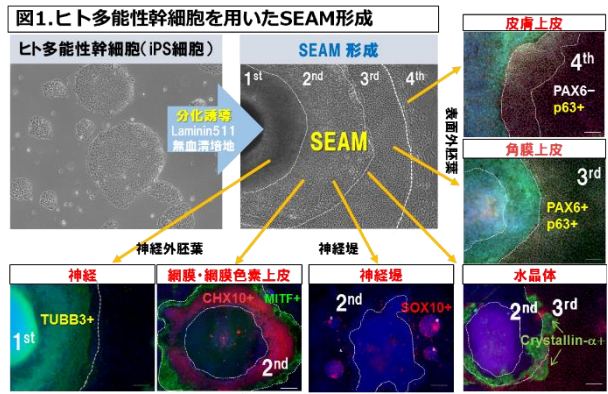
研究分野：幹細胞生物学、再生医学

キーワード：多能性幹細胞 角膜上皮 表面外胚葉 ラミニン BMP WNT YAP

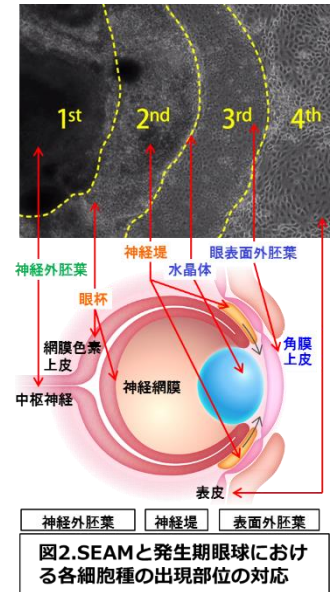
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでにヒト多能性幹細胞を用いて神経、心筋、網膜など数多くの細胞種が誘導されてきた。再生医療の細胞源として期待される角膜上皮についても、その分化誘導法の確立が試みられてきたが、生理的かつ機能的な角膜上皮(幹)細胞の誘導は長らく実現してこなかった。近年我々は、培養液に特別なサイトカインを添加せず、**ラミニン 511**を足場細胞外マトリックス (ECM) として用い、細胞の自律的かつ生理的な分化を促す手法により、**角膜上皮を含む眼を構成する種々の原基細胞群が、規則正しく同心円状にコロニー内に誘導されることを見いだした**(Hayashi R.



et.al. Nature 2016; 図1)。各細胞帯の最も内側の zone-1 には神経細胞、内側から 2 番目の zone-2 では、初期に神経堤、その後に網膜細胞、zone-3 には角膜上皮原基、zone-2 から 3 にかけて水晶体、最も外側の zone-4 には非眼表面の上皮細胞が誘導された。これらの発生様式は、実際の眼球組織の発生様式と高い相関性を示した(図2)。つまり、内側の神経系細胞は、後眼部側の視神経・神経網膜に一致し、外側の上皮系細胞は、前眼部側の眼瞼表皮・角膜上皮・水晶体に一致する。このことから、このヒト多能性幹細胞由来の外胚葉性コロニー; **SEAM (Self-formed Ectodermal Autonomous Multi-zone)** は、ヒトの眼球発生を高度に模倣した細胞モデルであり、ヒト眼発生を培養皿上でリアルタイムに解析するための強力なツールであると考えた。一方で、SEAM 形成および角膜発生には、足場 ECM としてのラミニン 511 (α5, β1, γ1) が重要であることが示唆されているものの、角膜上皮の発生のメカニズムや眼発生が選択的に誘導される機構については、in vivo の角膜・眼球の発生同様、明らかになっていない。



一方、我々は、この SEAM 中の角膜上皮(幹)細胞を、3 種類の特異的表面抗原に対する抗体を組み合わせることにより FACS で単離し、角膜上皮組織を再構築することに成功している(図3)。我々はこのヒト iPS 細胞から角膜上皮組織を作製する技術を用いて、失明に至る重篤な疾患である「角膜上皮幹細胞疲弊症」に対する再生治療法の開発に取り組んでいる。しかし、ヒト iPS 細胞からの角膜上皮細胞への分化誘導効率は決して高くなく、また不安定であることが明らかとなってきた。これは、

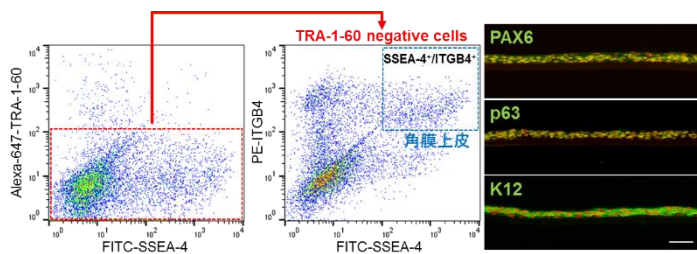


図3. SEAMからの角膜上皮幹細胞の単離と上皮組織(シート)の作製

これは、現行の標準的な SEAM 法では角膜以外の眼構成細胞も誘導されるため、必ずしも角膜上皮誘導に最適化されていないことが、その理由の一つであると考えている。角膜上皮発生機構を明らかにすることで、角膜上皮への選択的な分化誘導法を確立することが出来れば、再生医療の実用化に向けて大きな意味を持つ。

2. 研究の目的

そこで本研究においては、ヒト眼発生モデルである SEAM を用いて、ヒト角膜上皮発生を決定する制御機構を明らかにする。特に①**角膜上皮発生に必須な液性因子(主に WNT, BMP, TGF シグナル) および②足場 ECM (主にラミニンアイソフォーム) に由来するシグナル伝達機構を解明することを第一の目的とする**(図4)。さらに、研究期間内に上記の目的を達成できた場合に、SEAM 法を用いたさらなる基盤研究の発展のために、③**角膜上皮以外の組織、特に、神経堤や結膜上皮の発生制御機構に関する検討を行い、眼発生全体の理解を深める。**

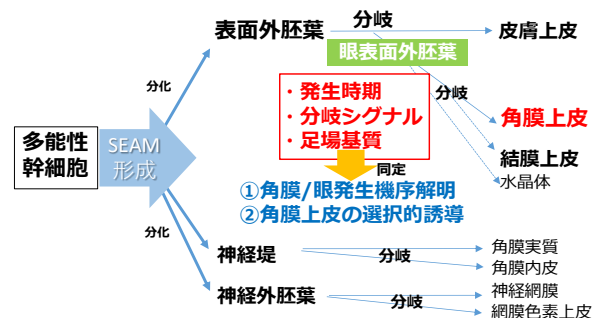


図4. 多能性幹細胞由来眼発生モデル SEAM を用いた角膜上皮および眼発生機構の解明

3. 研究の方法

これまでの予備検討の結果より、ラミニン 511 コーティング上では典型的な SEAM 形成が認められるのに対して、足場 ECM として汎用される Matrigel では、明確な SEAM 形成ならびに角膜

上皮誘導も認められなかったことから、SEAM 形成や角膜上皮誘導における、足場 ECM の重要生が示唆されている。また、選択的阻害剤を用いた予備検討の結果からは、角膜上皮分化には、発生初期の BMP シグナルが必須であることを確認している。本研究では、SEAM 法における角膜上皮発生に対する①選択的阻害剤および成長因子添加の影響、②足場 ECM 条件の影響、③角膜上皮系列以外の分化機構について検討を行う。具体的な計画は以下に示した。

①角膜上皮発生に及ぼす選択的阻害剤および成長因子の添加の影響

本実験を行うための細胞ツールとして、表面外胚葉・上皮マーカーの p63 遺伝子を EGFP で標識したノックイン iPS 細胞株の作製を行う。本 iPS 細胞株を利用することにより、角膜上皮を含む表面外胚葉系列の細胞を蛍光顕微鏡下でリアルタイムに観察可能でかつ、FACS による単離も可能となり、上皮細胞への分化誘導の詳細な検証が可能となる。本細胞株を用いて、SEAM 形成の初期 (~7d) を含めた各期間において、各種選択的阻害剤 (BMP, TGFβ, Wnt 阻害剤等)、Wnt 活性化剤、成長因子 (BMP, TGFβ, レチノイン酸 (RA) 等) の添加実験を行い、顕微鏡観察による SEAM 形成の状態観察、定量的 PCR、FACS、免疫染色による分化細胞の同定を行いその効果を検証する。また細胞分化の中でも特に、同じ表面外胚葉に由来する角膜上皮とそれ以外の上皮 (皮膚上皮など) との発生分岐についても検討する。

②角膜上皮発生に及ぼす足場 ECM 条件の影響に関する検討

ラミニンアイソフォーム E8-fragment (ラミニン 111, 211, 332, 411, 511; 研究協力者の関口より供給)、その他 ECM (Matrigel, Vitronectin 等) を用いて培養皿にコーティングを行い、その上で SEAM 形成実験を行う。必要に応じてコーティング濃度の検討および ECM の組み合わせも検討する。①と同じく、SEAM 形成の状態、定量的 PCR、免疫染色および FACS による角膜上皮発生を指標として、角膜上皮誘導に必要な ECM、特にラミニンアイソフォームを探索する。ラミニンアイソフォームの違いにより分化指向性の差異が認められる場合には、各アイソフォームによる下流の特異的シグナル伝達の有無を重点的に探索し、さらに、角膜上皮発生に寄与するシグナル伝達経路の探索を行う。また、各アイソフォームが示す分化方向性を解析すると同時に、マウスの発生期眼球における各アイソフォームの発現パターンを免疫染色法で比較検討することにより、生体の角膜上皮発生に重要な ECM 等を決定する。

③角膜上皮系列以外の分化誘導機構に関する検討

①②の研究項目が達成された場合には、角膜上皮以外の眼細胞の分化機構に関する研究に着手することにより、眼球全体の発生の理解を深める。特に角膜上皮と発生学的起源が同じである結膜上皮や角膜発生に重要な役割を果たす神経堤細胞の発生について検討を行う。

4. 研究成果

①角膜上皮発生に及ぼす選択的阻害剤および成長因子の添加の影響

まず初めに、角膜上皮を含む表皮外胚葉系列細胞の標識のため p63 遺伝子の下流に EGFP を導入した p63-EGFP KI iPS 細胞株を樹立した。樹立した p63-EGFP KI iPS 細胞は蛍光顕微鏡下で表面外胚葉領域である中央から 3 番目の領域 (zone-3) が蛍光標識されることを確認した (図 5, Kobayashi Y, Havashi R et al. Stem Cell Res 2017)。

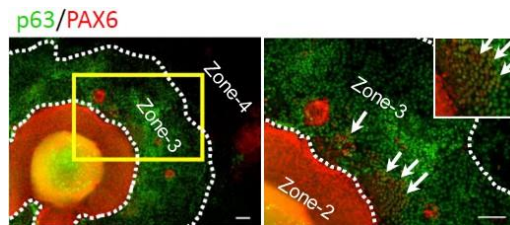


図 5. p63-EGFP KI iPS 細胞株の樹立

樹立した KI iPS 細胞株を用いた、分化誘導初期

(10d) における各種シグナル阻害剤を用いた実験結果により、BMP 阻害 (LDN; LDN193189)、TGF 阻害 (SB; SB431542) もしくは WNT 活性化 (C; CHIR 99021) によって SEAM 形成および p63 陽性表面外胚葉細胞への分化が強く阻害され、RA 処理により増大した (図 6)。特に BMP シグナル阻害では zone-3 の角膜上皮領域が選択的に消失した。一方で、その中でも角膜上皮原基である (PAX6+/p63+) 細胞は、BMP 阻害もしくは RA 添加によって強く抑制された。BMP4 自体の添加による影響はほとんど見られなかった。このことから、内在的な BMP シグナルが角膜上皮の発生に特に重要であることが明らかとなり、RA は PAX6 陰性の表皮細胞の分化に重要であったが、角膜上皮原基の発生にはむしろ抑制的に働くことが明らかとなった (図 7)。またこれらの発生分岐は比較的早い時期に起きている可能性が示唆された。

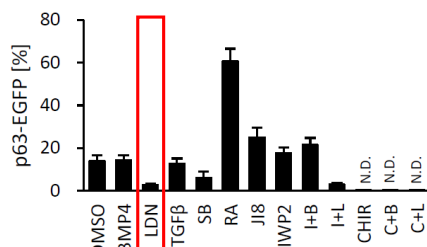


図 6. 阻害剤の表面外胚葉分化への影響

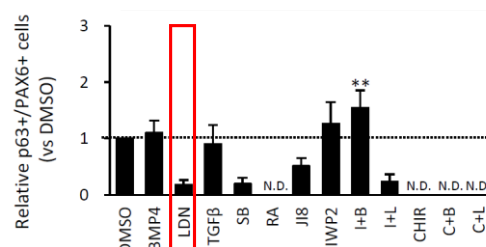


図 7. 阻害剤の角膜上皮原基分化への影響

ほとんど見られなかった。このことから、内在的な BMP シグナルが角膜上皮の発生に特に重要であることが明らかとなり、RA は PAX6 陰性の表皮細胞の分化に重要であったが、角膜上皮原基の発生にはむしろ抑制的に働くことが明らかとなった (図 7)。またこれらの発生分岐は比較的早い時期に起きている可能性が示唆された。

これまでの阻害剤添加実験の結果からは、WNT シグナルの活性化は角膜上皮発生を完全に阻害し、IWP2 (I) など WNT 活性の阻害剤はむしろ角膜上皮原基の誘導を促進することを見出した。さらに、IWP2 と BMP4 を併せて添加した場合においてより強い角膜上皮原基の誘導効果が認められた。次に、実際の角膜発生において WNT シグナル阻害に関与すると考えられる分子についての探索を行った。WNT シグナル阻害分子として、SFRPs, DKKs, WISE, WIF1 等の初期 SEAM の各領域における発現を定量的 PCR にて確認したところ、SFRP2 および DKK1 が SEAM の中央部～中間部の神経外胚葉領域に強く発現していた (図 8)。また、ELISA によりこれらのタンパク質は実際に SEAM 培養の上清中に産生されていることを確認した。そこで、SFRP2 および DKK1 に対する中和抗体の添加による角膜上皮原基誘導の効果について検討したところ、それぞれ単独および組み合わせで有意な角膜上皮発生の抑制効果を示した (図 9)。以上のことから、**角膜上皮原基の発生は近傍の神経外胚葉由来細胞より産生される BMP や SFRP2、DKK1 等により制御されていることが示唆された。**

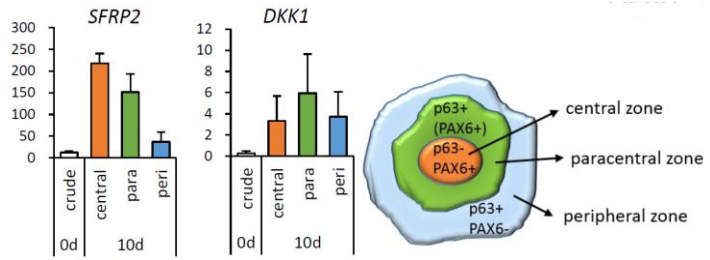


図 8. WNT 阻害分子 SFRP2, DKK1 の初期 SEAM 内での発現

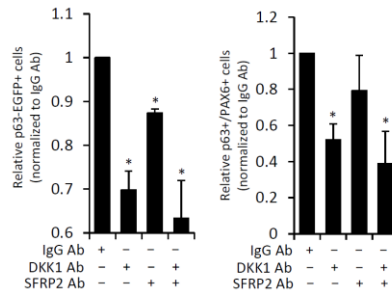


図 9. DKK1 および SFRP2 中和抗体の添加による表面外胚葉 (p63⁺) および角膜上皮原基 (p63⁺/PAX6⁺) の発生に対する効果

②角膜上皮発生に及ぼす足場 ECM 条件の影響に関する検討

ECM に関しては、ラミニンの各アイソフォーム (111, 211, 332, 411, 511) E8 フラグメントおよび Matrigel, Vitronectin をコーティングした培養皿上で、SEAM 法による眼細胞分化を行った。その結果、標準使用するラミニン 511 上では、多系統の眼細胞を含む典型的な多帯状コロニーが形成されるのに対して、他の ECM ではいずれも典型的な分化形態を示さないことが明らかとなった (図 10)。さらに興味深いことに、分化誘導を 12 週間まで継続し角膜

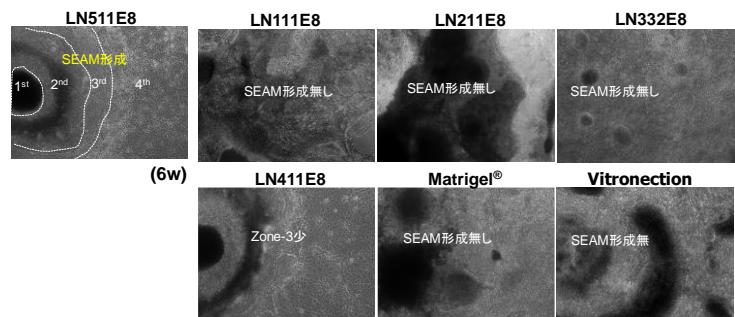


図 10. 足場 ECM (ラミニンアイソフォーム, Matrigel Vitronectin) の SEAM 形成に及ぼす影響 (分化誘導 6 週間)

上皮細胞への分化誘導効率を FACS により調べたところ、ラミニン 511 および 332 を用いた場合のみ高い誘導効率を示し、その誘導効率はラミニン 332 の方が高いことが示された (図 11)。そこで生体の眼発生においてどのようなラミニンアイソフォームが発現しているのかについてマウス胎児を用いた眼球組織の免疫染色を実施した。その結果、E15.5 角膜上皮には主にラミニン α 3 鎖、 α 5 鎖が高発現しており、 α 3 鎖は角膜上皮をはじめ結膜、表皮等の重層上皮組織に特異的であった (図 12)。以上の結果より、少なくとも角膜上皮発生には、発生期角膜において実際に発現しているラミニンアイソフォームがその分化を促進することが示唆された。また、ラミニン 511 は角膜上皮を含む眼細胞全体に広く発現していることから、典型的な 4 領域を有する SEAM 形成はラミニン 511 上でのみ誘導される理由として、眼細胞への広い発現分布が関与していると考えられた。

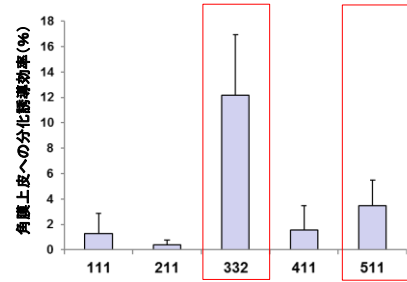


図 11. 角膜上皮への分化誘導効率

次に SEAM 中に誘導される同心円状の帯状領域がいかんして形成されるかについての検討を行った。まずコロニー

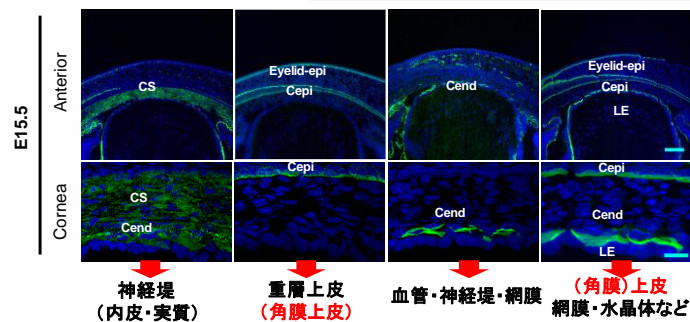


図 12. マウス眼 (E15.5) におけるラミニンアイソフォーム発現

内における神経外胚葉・表面外胚葉分化について調べたところ、強いインテグリン結合能を有するラミニン 511 上においては、コロニー内部において、中央部（推定 zone-1, 2）での神経外胚葉分化と周辺部（推定 zone-3, 4）での表面外胚葉分化という、2 方向性分化が起きており、このことが初期 SEAM 形成の重要なイベントであることが示唆された。一方、その他のインテグリン結合能が比較的低いラミニンアイソフォーム（332 や 211）ではこのような 2 方向性の分化が起きにくく、特にラミニン 332 は上皮、211 は神経堤分化が選択的に誘導された。ラミニン 511 上での iPS 細胞コロニーの状態を詳細に調べたところ、ラミニン 511 のインテグリンへの強い結合能により、コロニー内の細胞密度と機械的圧力の偏りにより生じることを明らかとした（図 13）。これにより機械的刺激（圧力）を感知する転写共役因子 YAP タンパク質の局在変化が生じ、YAP が核外移行するコロニー中央部では主に神経分化が、YAP が核内に留まる周辺部では主に上皮分化が引き起こされると考えられた（図 14）。一方ラミニン 332 の場合はコロニー全体で細胞密度は比較的均一でかつ低く、結果として YAP は核内に留まり、上皮細胞への分化が促進された。以上の結果より、眼全体の発生を模倣する SEAM の誘導には眼組織に広く発現し、かつ、強いインテグリンとの結合能を有するラミニン 511 が必須であるが、角膜上皮細胞を含む上皮系列の細胞の誘導には、上皮細胞に特異的に発現し、インテグリン結合能が中程度のラミニン 332 が有効であると考えられた (Shibata S, [Hayashi R et al. Cell Rep.](#) 2018)。

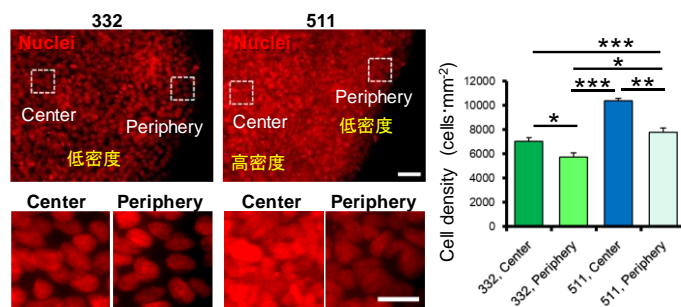


図 13. ラミニン 332, 511 上の分化初期 iPS コロニー内の細胞密度

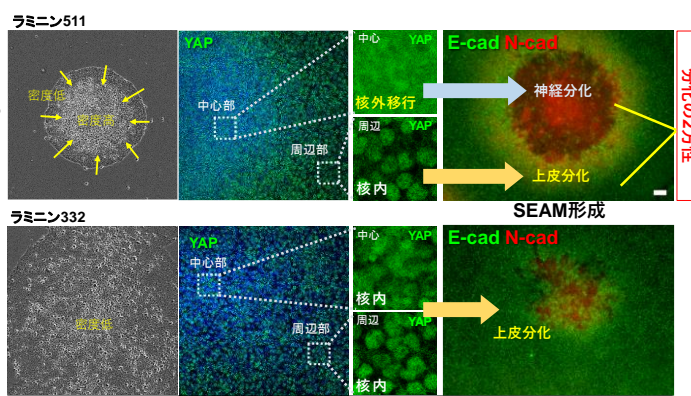


図 14. ラミニン 332, 511 上の iPS コロニー内における YAP タンパク質の局在と神経・上皮分化の違い

③角膜上皮系列以外の分化誘導機構に関する検討

角膜上皮発生に関連する結膜上皮や神経堤への発生機構に関する研究にも着手した。角膜上皮と同様に眼表面外胚葉に由来する結膜上皮ではあるが、通常の SEAM 法においてその発生は抑制されている。そこで SEAM を眼発生モデルとしてその発生分岐に関わる因子について検討したところ、角膜上皮の分化は KGF で促進され、結膜上皮はむしろ EGF 等により誘導が促進された。また神経堤については、眼神経堤マーカー PITX2 を EGFP で標識した PITX2-EGFP ノックイン iPS 細胞株を樹立することに成功し (Okubo T, [Hayashi R et al. J. Biol. Chem.](#) 2020)、本細胞株を用いることで眼神経堤細胞の誘導を可視化し、その誘導条件を検討することが容易となった (図 15)。

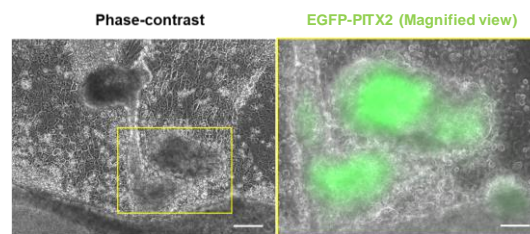


図 15. PITX2-EGFP KI iPS 細胞株の樹立

以上の結果より、角膜上皮の初期発生においては、液性因子としては BMP シグナルならびに SFRP2, DKK 等による WNT シグナル阻害が重要であり、足場 ECM としては適度なインテグリン親和性を有するラミニンアイソフォームの存在とそれに由来する YAP シグナリングが重要であることが分かった。さらには角膜上皮だけでなく同じ表面外胚葉に由来する結膜上皮細胞や眼神経堤の発生に重要なシグナルの一部が明らかとなった。

引用文献

- Hayashi, R. et al. Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature* 531, 376-380 (2016).
- Shibata, S. et al. Selective laminin-directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into distinct ocular lineages. *Cell reports* 25, 1668-1679. e1665 (2018).
- Kobayashi, Y., Hayashi, R., Quantock, A. J. & Nishida, K. Generation of a TALEN-mediated, p63 knock-in in human induced pluripotent stem cells. *Stem cell research* 25, 256-265 (2017).
- Okubo, T. et al. Generation and validation of a PITX2-EGFP reporter line of human induced pluripotent stem cells enables isolation of periocular mesenchymal cells. *Journal of Biological Chemistry* 295, 3456-3465 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Shibata S, Hayashi R, Kudo Y, Okubo T, Imaizumi T, Katayama T, Ishikawa Y, Kobayashi Y, Toga J, Taniguchi Y, Honma Y, Sekiguchi K, Nishida K.	4. 巻 14;14(4)
2. 論文標題 Cell-Type-Specific Adhesiveness and Proliferation Propensity on Laminin Isoforms Enable Purification of iPSC-Derived Corneal Epithelium.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 663-676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.02.008.	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 Okubo T, Hayashi R, Shibata S, Kudo Y, Ishikawa Y, Inoue S, Kobayashi Y, Honda A, Honma Y, Kawasaki S, Nishida K.	4. 巻 13;295(11)
2. 論文標題 Generation and validation of a PITX2-EGFP reporter line of human induced pluripotent stem cells enables isolation of periocular mesenchymal cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 3456-3465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010713.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujimoto S, Hayashi R, Hara S, Sasamoto Y, Harrington J, Tsujikawa M, Nishida K.	4. 巻 11:11
2. 論文標題 KLF4 prevents epithelial to mesenchymal transition in human corneal epithelial cells via endogenous TGF- β 2 suppression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 249-257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.08.003.	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 該当する

1. 著者名 Shibata S, Hayashi R, Okubo T, Kudo Y, Baba K, Honma Y, Nishida K.	4. 巻 Jul 2;11
2. 論文標題 The secretome of adipose-derived mesenchymal stem cells attenuates epithelial-mesenchymal transition in human corneal epithelium.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 114-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.06.005.	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 Okubo T, Hayashi R, Shibata S, Kudo Y, Honma Y, Nishida K.	4. 巻 12(6)
2. 論文標題 Use of homeobox gene expression patterns to determine anatomical regions of origin for body surface tissues derived from adult mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Tissue Eng Regen Med.	6. 最初と最後の頁 1412-1419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/term.2673.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shibata S, Hayashi R, Okubo T, Kudo Y, Katayama T, Ishikawa Y, Toga J, Yagi E, Honma Y, Quantock AJ, Skiguchi K and Nishida K.	4. 巻 6:25(6)
2. 論文標題 elective Laminin-Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Distinct Ocular Lineages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 1668-1679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.10.032.	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 該当する

1. 著者名 Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, Takayanagi H and Nishida K.	4. 巻 Nov. 8(1)
2. 論文標題 CD200 facilitates the isolation of corneal epithelial cells derived from human pluripotent stem cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 16550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34845-22018	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 Xu P, Kai C, Kobayashi Y, Yamamoto Y, Tsujikawa M, Hayashi R, and Nishida K.	4. 巻 21;7(6)
2. 論文標題 A new in vitro model of gelatinous drop-like corneal dystrophy by knocking out TACSTD2 and its paralogous gene EpCAM in human corneal epithelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transl Vis Sci Technol.	6. 最初と最後の頁 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.7.6.30.	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 Kobayashi Y, Hayashi R, Quantock AJ, and Nishida K	4. 巻 25
2. 論文標題 Generation of a TALEN-mediated, p63 knock-in in human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cell Res.	6. 最初と最後の頁 256-265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2017.10.015	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 該当する

1. 著者名 Uesugi K, Sakaguchi H, Hayashida Y, Hayashi R, Baba K, Sugauma Y, Yokoi H, Tsujikawa M, and Nishida K	4. 巻 1:58
2. 論文標題 A Self-Assembling Peptide Gel as a Vitreous Substitute: A Rabbit Study.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Investig Ophthalmol Vis Sc.	6. 最初と最後の頁 4068-4075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.17-21536.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihara M, Sasamoto Y, Hayashi R, Ishikawa Y, Tsujikawa M, Hayashizaki Y, Itoh M, Kawaji H, Nishida K.	4. 巻 6:7(1)
2. 論文標題 High-resolution promoter map of human limbal epithelial cells cultured with keratinocyte growth factor and rho kinase inhibitor.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-02824-8	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 Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, Sasamoto Y, Taniwaki Y, Takayanagi H, Tsujikawa M, Sekiguchi K, Quantock AJ, and Nishida K	4. 巻 12(4)
2. 論文標題 Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat Protoc.	6. 最初と最後の頁 683-696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nprot.2017.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 21件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いたin vitro眼発生
3. 学会等名 幹細胞の培養法・培養工学のためのコンソーシアム 第4回シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 Co-ordinated Generation of Ocular Cell Lineages from Pluripotent Stem Cells and its Application to Corneal Regenerative Medicine
3. 学会等名 第六回日中教育交流会_医療フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 Co-ordinated generation of ocular cell lineages from pluripotent stem cells and its application to regenerative medicine
3. 学会等名 KSBB Symposium (Daegu, Korea)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 iPS細胞を用いた角膜再生医療研究へのゲノム編集技術の利用
3. 学会等名 日本炎症再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 iPS細胞を用いた多系列眼細胞への分化誘導と角膜再生治療法の開発
3. 学会等名 第89回九州眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 ラミニンアイソフォームを用いた多能性幹細胞からの眼細胞分化と再生医療への応用
3. 学会等名 第51回日本結合組織学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 iPS細胞を用いた眼細胞分化と再生医療への応用
3. 学会等名 第123回日本眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞による協調的な眼組織発生と角膜機能の再生
3. 学会等名 第122回日本眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuhei Hayashi
2. 発表標題 Co-ordinated generation of multiple ocular cell lineages and fabrication of corneal epithelial tissue from human iPS cells
3. 学会等名 Invited Lecture, Cardiff University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuhei Hayashi
2. 発表標題 Co-Ordinated Generation of Multiple Ocular Cell Lineages and Fabrication of Functional Corneal Epithelial Cell Sheets from Human iPS cells
3. 学会等名 70th JSCB and 51st JSDB co-sponsored by Asia-Pacific Developmental Biology Network (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた眼細胞系列への分化誘導と角膜再生医療への利用
3. 学会等名 第91回日本組織培養学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuhei Hayashi
2. 発表標題 Co-Ordinated Generation of Multiple Ocular Cell Lineages and Fabrication of Corneal Epithelial Cell Sheets from Human iPS cells
3. 学会等名 The 12th Catholic International Stem Cell Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuhei Hayashi
2. 発表標題 Co-Ordinated Generation of Multiple Ocular Cell Lineages and Fabrication of Corneal Epithelial Cell Sheets from Human iPS cells
3. 学会等名 2018 TERMIS World Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた眼発生と角膜再生医療への応用
3. 学会等名 第38回日本眼薬理学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた多系列眼細胞への分化誘導と再生医療への応用
3. 学会等名 日本薬学会東海支部 特別講演会 兼 第52回岐阜薬科大学薬効解析学研究室セミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuhei Hayashi
2. 発表標題 Co-ordinated generation of ocular cells from human iPSCs and its application to corneal regenerative medicine
3. 学会等名 BBSRC JAPAN PARTNERING AWARD SYMPOSIUM (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuhei Hayashi, Yuki Ishikawa, Tomohiko Katayama, and Kohji Nishida
2. 発表標題 CD200 IS A POTENTIAL NEGATIVE MARKER FOR ISOLATING HUMAN PLURIPOTENT STEM CELL-DERIVED CORNEAL EPITHELIAL CELLS
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 iPS細胞を用いた角膜再生医療
3. 学会等名 第38回日本炎症再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryuhei Hayashi
2. 発表標題 Corneal cells induction from human pluripotent stem cells
3. 学会等名 Qingdao International Cornea Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた眼発生と再生医療への応用
3. 学会等名 第2回 幹細胞の培養法・培養工学のためのコンソーシアム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた角膜上皮発生と再生医療への応用
3. 学会等名 角膜カンファレンス2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuhei Hayashi
2. 発表標題 Co-Ordinated Generation of Multiple Ocular-Like Cell Lineages and Fabrication of Functional Corneal Epithelial Cell Sheets from Human iPSCs
3. 学会等名 Gordon Research Conformance 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 林 竜平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 5
3. 書名 プレジジョンメディシン	

1. 著者名 林 竜平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 4
3. 書名 眼科学	

1. 著者名 林 竜平、西田幸二	4. 発行年 2018年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 内分泌・糖尿病・代謝内科	

1. 著者名 林 竜平	4. 発行年 2017年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 Retina Medicine	

1. 著者名 林 竜平	4. 発行年 2017年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 8
3. 書名 眼科	

〔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	関口 清俊 (Sekiguchi Kiyotoshi)	大阪大学・タンパク質研究所・寄附部門教授 (14401)	