

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18791301

研究課題名（和文） シングルセルからの角膜培養上皮シートの作成

研究課題名（英文） Corneal epithelial sheet from a single progenitor cell

研究代表者

川北 哲也（KAWAKITA TETSUYA）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50408308

研究成果の概要：

シングルセルから作成した角膜上皮シートと成体マウス角膜上皮との表現型、増殖能、未分化度の比較を、RNA、タンパクのレベルで行ったところ、Keratin14、p63といった基底上皮細胞のマーカーが正常上皮と比較して強く発現しており、シート作成後も増殖能を維持していた。細胞を継代する途中では、Keratin12の発現（RNA、タンパク両レベル）を失っていた。この角膜特異的Keratinの発現は、角膜、および輪部実質に上皮を移植することによってもかわらなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：再生医療

1. 研究開始当初の背景

我々は世界ではじめてマウス角膜上皮細胞の分離培養に成功し、その培養には、低細胞外カルシウムイオン濃度と無血清が必要であることを明らかにした。（Invest Ophthalmol Vis Sci. 45(10):3507-12. 2004）。その細胞培養方法により、p63 強陽性、かつ Clonal に培養可能なマウス角膜上皮細胞の分離培養に成功した。このマウス角膜上皮未分

化細胞は、現在一定のダブリングタイムを維持しながら、形質転換せず、携帯を維持しながら 80 継代以上、期間にして 3 年以上培養可能であった。その細胞を羊膜上（アンモニア処理にて羊膜上皮細胞を除去した羊膜）無血清培地で 2 週間培養し、培養期間後期、3T3 fibroblast との共培養+培養液に血清を加え、培養液をなじませた後、培養液を減らし培養細胞の表面を空気に触れさせる air-lift 法を併用して重層化を促進させることができ

た。この上皮細胞の characterization を行い、この細胞を用いてシングルセルから培養上皮シートを作成できることを検討する。

この細胞を用いて、ひとつの未分化角膜上皮細胞から、角膜を覆う重層化培養上皮シートを作成し、角膜輪部機能不全を発症した角膜へ移植することにより、その治療的意義を検討することが目的である。マウス上皮細胞は、継代を重ねるに従い、その角膜特異的 Keratin12 の発現が少なくなっていくことがわかっており、その Keratin12 が上皮シートとして移植後、再度発現するのかどうかを調べる。

角膜上皮幹細胞の同定、培養は、角膜再生医療の重要なテーマの一つである。フィーダー細胞を用いたコロニー形成を元に、さまざまな手法が多施設で試みられている。その先には患者の自己角膜上皮幹細胞を採取し、少数の幹細胞から増殖させ培養上皮シートを作成し、患部に移植するという構想がある。我々はマウスの未分化な角膜上皮細胞の培養に成功しており、この動物移植モデルが成功すれば、こういった少数の幹細胞から増殖させ移植するということが実現する第一歩となると考える。

国内外を問わず、多くの施設で角膜上皮幹細胞の分離が試みられている。今回申請する研究はマウス角膜上皮細胞を用いた *in vitro* の研究であり、世界でマウス角膜上皮細胞を培養しているのは我々のグループのみであり、誰も着手していない。この研究では、たったひとつの細胞から生体の角膜を覆うだけの細胞数に増殖し、なおかつ生体内で角膜正常分化をすることができるかどうかというテーマで行うものであり、独創的であると考える。

2. 研究の目的

シングルセルから培養角膜上皮シートを作成する。作成した上皮シートの上皮表現型と正常角膜上皮とを比較する。またよりよいシングルセルからの上皮シートの培養、作成条件の検討、および移植が可能な培養上皮シートであるかどうかの検討を行う。また培養中に発現を失った Keratin12 が上皮シートとして移植後、再度発現するのかどうかを調べる。

3. 研究の方法

(1) マウス角膜培養上皮細胞の分離培養、上皮シート作成

我々が樹立したマウス角膜上皮未分化細胞を、羊膜上（アンモニア処理にて羊膜上皮細胞を除去した羊膜）で2週間培養する。培養期間後期、3T3 fibroblast との共培養、培養液を減らし培養細胞の表面を空気に触れさせる air-lift 法を併用し重層化を促進させる。培養液としては KSFM または SHEM を用いる。こうして重層化させたマウス上皮シートは一部移植前に分化マーカー（p63、Keratin12）での組織学的検討を行う。細胞の分化度、未分化度の解析としては、分化（Keratin12、involucrin）、未分化マーカーの発現（p63、ABCG2 など）を免疫染色、Western blot、RT-PCR を用いて比較した。

(2) マウス上皮シートをウサギ角膜へ移植

ウサギの角膜上皮を、輪部を含め、大きく擦過除去する。フルオレセイン染色で上皮完全欠損を確認し、さらに結膜上皮を輪部で全周に渡り切除することにより、角膜輪部機能不全モデルを作成する。同時にマウス角膜上皮シート移植を施行し、上皮保護にコンタクトレンズを挿入、瞼板縫合を行う。術7日後に瞼板縫合を解除し、上皮化の有無を確認し、組織を凍結切片にした。

(3) 上皮シート移植後の組織学的評価

培養上皮シート移植後1週間及び2週間の組織を摘出し、凍結切片を作成し、分化マーカー（p63、Keratin12、Connexin43、ABCG2 など）、細胞間隙（E-cadherin、ZO1 など）の免疫染色を施行し、正常角膜への分化の程度をコントロール群（羊膜のみ移植の群、なにも移植しない群）と比較検討する。また Keratin12 が Negative だった場合、角膜として異常分化のマーカー（Keratin10 など）の発現も検討していく。

4. 研究成果

(1) マウス角膜培養上皮細胞の分離培養、上皮シート作成(図1, 2)

我々が樹立したマウス角膜上皮未分化細胞は、増殖能が高く、シングルセルからコロニーを形成可能な細胞であった。(図1) カルシウム、牛胎児血清を加えると、未分化マーカーである DNp63 の発現が低下し、分化マーカーである Cx43 TGF- β RII, の発現が増強した。Keratin12 の発現はタンパクレベルでは、長期培養したものでは、発現を認めなかった。未分化マーカーである Oct3/4, Klf4, K14 は RNA レベルで発現を認めたが、Nanog は陰性であっ

た。こうして重層化させたマウス上皮シートは一部移植前に分化マーカーでの組織学的検討では、基底細胞が p63 陽性、サイトケラチン 14 は全層で陽性であったが、角膜特異的ケラチンであるサイトケラチン 12 は陰性であった。しかし、皮膚特異的ケラチンの発現は蛋白、RNA レベルで陰性であり、皮膚ケラチノサイトに形質転換したものではなかった。

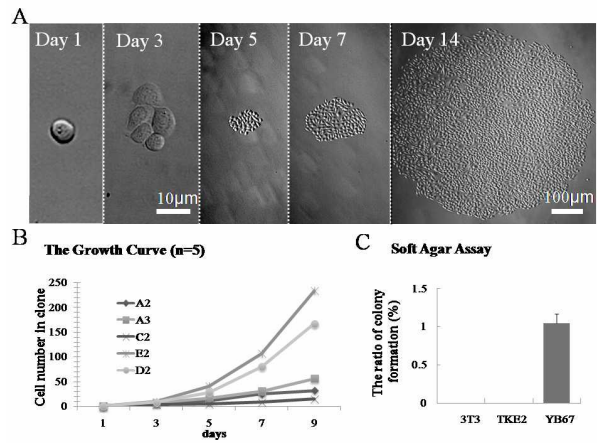
マウス角膜正常上皮と比較し、Keratin 14 の発現が強く、重層化した上層にまで強発現していた。その他 p63、ABCG 2 の発現もタンパクレベルで強く認めた。しかし Keratin12 の発現は RNA、タンパク両レベルで認めなかった。(図 2) 上皮シートを細胞レベルにばらしたあとのコロニー形成能は、正常上皮よりも有意に多かった。

(2), (3)マウス上皮シートをウサギ角膜へ移植と上皮シート移植後の組織学的評価

ウサギの角膜上皮を、輪部を含め、大きく擦過除去する。フルオレセイン染色で上皮完全欠損を確認し、さらに結膜上皮を輪部で全周に渡り切除することにより、角膜輪部機能不全モデルを作成した。ウサギへの *in vivo* 上皮シート移植術後 7 日目において、組織切片では移植上皮は認められない、またはまばらに名呈しない状態で存在した。この原因としては、培養上皮シートを構成する細胞が正常角膜様分化をしきれておらず、細胞間接着が弱いために移植後安定性が得られなかった、ウサギモデルの炎症が強く上皮の安定性に影響した、ウサギ角膜上皮欠損モデルに同様の手技で上皮剥離、結膜切除を行っても、その後できる癒痕のばらつきが大きいこと、などが考えられた。

そのため、生体外のリコンビナントモデルで接着、安定性が得られるかの確認のため、マウス実質、及びウサギの輪部角膜実質とのリコンビナントモデルを、Airlift 下で器官培養を行った。7 日目の組織切片では接着、重層化の維持ができており、上皮基底膜タンパクである Collagen type4 発現も認めたことから、眼表面の安定性などの条件を整えば、移植は可能であると考えられた。しかし、Keratin12 の発現が再度認められることはなく、角膜輪部実質からのニッチシグナルのみでは上皮における Keratin12 の発現が制御できないと考えられた。

図 1

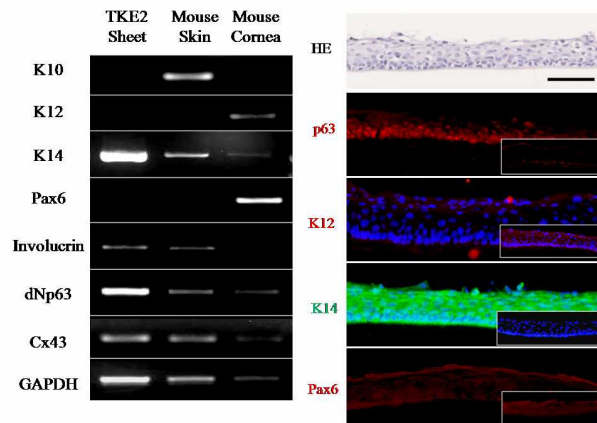


A; 20 継代目でクローニングした増殖性の高い角膜上皮由来細胞は培養皿上に、無血清低カルシウム培地、フィーダー細胞無しの条件下で、正円形のコロニーを形成した。

B; クローニングの結果、そういった増殖性が高いもの、低いものに二分された。

C; Soft Agar での非接触培地ではコロニーを形成しなかった。

図 2



Kawakita T, Shimmura S et. al. J Cell Mol Med. 2008 Aug;12(4):1303-16.より引用

通常の臨床応用されている方法をもちいて、重層化角膜上皮シートは作成可能であった。その上皮シートでは、皮膚特異的な Keratin10 の発現は認めなかったが、pax6, Keratin12 といった

眼、角膜に特異的なマーカーの発現も認めなかった。

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)

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 Aug;12(4):1303-1316. Epub 2008 Mar 4.

〔学会発表〕(計2件)

Kawakita T, Phenotypic analysis before and after cultivated corneal epithelial transplantation Turkish Ophthalmology Society, 41st Turkish National Congress October 30-November 2 2007, Antalya, Turkey,

Kawakita, T, Shimmura S, Tsubota K, Shimazaki J, Tseng SC, Cellular Senescence due to epithelial mesenchymal transition during clonal expansion of murine limbal epithelial cells. The American Society for Research in Vision and Ophthalmology, Annual meeting May5-9 2007, Florida, USA

〔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〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川北 哲也 (KAWAKITA TETSUYA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50408308

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし