

平成21年 5月 28日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18791302

研究課題名 (和文) 角膜実質幹細胞による実質細胞外マトリックスの再生

研究課題名 (英文) Regeneration of extracellular matrix of corneal stroma using corneal stroma-derived progenitor cells

研究代表者

吉田 悟 (YOSHIDA SATORU)

東京歯科大学・歯学部・客員講師

研究者番号：50398781

研究成果の概要：

生体組織に近い人工角膜構築のためには、組織にもともと存在する細胞を用いることが望ましく、また、恒常的に安定な細胞の供給のためには組織幹細胞の分離・培養法の確立が必要である。我々は実験動物（マウス）を用いて、角膜実質内に組織間細胞が存在している事を明らかにし、また、その培養法を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

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：角膜実質、ケラトサイト、体性幹細胞、神経堤幹細胞、人工角膜、角膜内皮。

1. 研究開始当初の背景

角膜は視覚を構成する光学系の入り口に辺り、高い透明性を持つだけでなく、そのバリアー機能により病原菌など外界の物理的・生理的刺激から眼球を保護する役割をも有する重要な組織である。角膜組織は、上皮・実質・内皮の3層からなり、各層の相互作用によりその透明性・恒常性が維持されているが、何れかの細胞層に不可逆性の混濁が生じて本来の透明性が失われることで高度の視力低下をきたす。そうした場合、従来は全層を置換する全層角膜移植術が施されてきたが、従来の角膜移植術ではドナーの絶対的不足や拒絶反応が大きな問題となってきた。

た。最近では、侵襲を少なくするために障害を受けた層のみを移植する角膜パーツ移植術が開発されている。

3層のうち角膜上皮に関しては、*in vitro*で羊膜やフィブリン等の基質上、あるいは温度感受性培養皿上に上皮幹細胞をシート状に培養したものを移植する培養上皮移植術が既に確立されている。これに対して、角膜実質・内皮の再生に関しては臨床応用可能な再生医療学的アプローチは未だ多くない。合成・天然ポリマーを用いた研究・開発はなされているが、炎症・感染・脱落などの危険も高く、その適応には議論の余地が残っている。こうした問題を克服するためにもより生体

組織に近い、生体本来の細胞や細胞外成分をベースにしたマテリアルの開発が望まれている。我々は角膜実質から角膜実質細胞（ケラトサイト）の幹細胞を分離し、長期に渡って *in vitro* で培養することに成功しており、培養した細胞を用いて傷害を受けた角膜実質を治療するための開発につなげられる。

2. 研究の目的

in vitro で組織を適切に再構築するには、細胞がその性質を保ちつつ増殖・分化出来るように細胞外成分を含めた正常な（適切な）基質が必須である。生体組織に似せた3次元構造を持つものを、*in vitro* で構築しようとする試みでは、コラーゲンやゲラチン等の細胞外マトリクスからなる基質中で角膜実質細胞であるケラトサイトを培養し、実質を再構築しようとする研究も行われている。そうしたスキャフォールドを用いた場合、その3次元形態は長期に渡って保持されるが、角膜実質本来の細胞外基質とは異なるため、炎症が起きたり、強度や透明性の維持、感覚神経再生など組織本来の機能が十分に反映されない可能性が高い。他方で、温度感受性ポリマーでコートした培養皿やフィブリンを用いることで、スキャフォールドを含まない細胞シートの作成法が開発されている。これらの方法では、酵素を用いて細胞を剥がして回収する方法に比べて細胞および細胞外基質へのダメージが少なく、細胞間接着を保ったまま、スキャフォールドなしで3次元の人工組織を構築できる。フィブリンを用いたスキャフォールドフリーの細胞シートの有効性は、心筋の再生研究において既に示されている。角膜実質細胞（ケラトサイト）の重要な役割の1つは、ケラトカンをはじめとするケラタン硫酸プロテオグリカン等の角膜特異的な細胞外基質の分泌にあるが、この性質は非常に不安定で、*in vitro* で血清存在下での培養では速やかにファイブロblast化し、この分泌が無くなることを解っている。我々が分離・培養に成功しているケラトサイトの幹細胞は、無血清培地で長期に渡って培養可能であり、分離された細胞は長期培養後も本来の細胞外基質の分泌能を保持している。そこで、本研究ではマウスおよびヒト角膜実質から分離・培養した実質幹細胞をフィブリンゲル上で培養し、角膜実質本来の細胞外マトリクスを持ち生体内での細胞機能を維持した実質層の再構築を開発することを目的とし、できあがった実質層を細胞形態とともに各ケラタン硫酸プロテオグリカン等の細胞外基質の生成を免疫染色法、*in situ* 染色やウェスタン法によって解析する。また、実際に実験動物に移植して有効性を同様の方法によって検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養実質シートの作製

フィブリンシートを用いて培養実質シートを作製する。培養する細胞は、マウス角膜および研究用角膜（アメリカ・アイバンクから入手）から分離・培養した実質細胞を用いる。細胞シートは、最終的に細胞自身から分泌される分解酵素によってフィブリンシートから分離する。培養実質シートは、単層のものと重ね合わせて数層にしたものも作製し、それぞれについて検討を行う。また、皮膚真皮層から分離される類似の幹細胞を用いたケラトサイト（角膜実質細胞）への分化誘導・細胞シートの作製についても検討する。

(2) 培養実質シートの作製

ケラトカンをはじめ、各種マーカー遺伝子の発現について、RT-PCR法やウェスタン法によって評価する。

(3) 実質シートの組織学的評価

HE染色により形態的な評価を行う他、上記細胞外基質の他、種類のマーカーについて、免疫染色法によって培養実質シートを組織学的に評価する。

4. 研究成果

① 研究の主な成果

実験動物（マウス）を用いて検討を行った結果、角膜実質細胞の分離と長期培養に成功した。更に、この細胞を角膜実質幹細胞とし

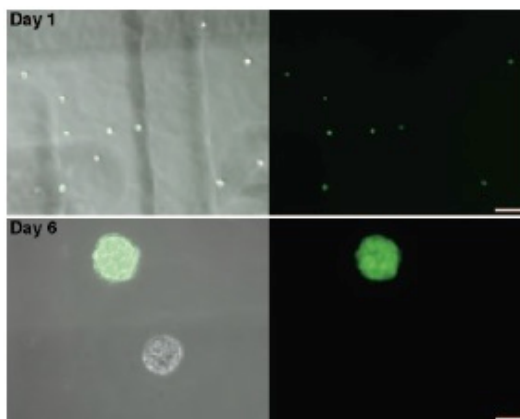


図1 角膜実質から分離培養した組織幹細胞

てキャラクタライゼーションを行った結果、角膜実質が本来由来している神経堤細胞の性質も持っていることを明らかとなった（図1-6）。この結果は、「Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea」として、英文科学誌「Stem Cells」に発表した。

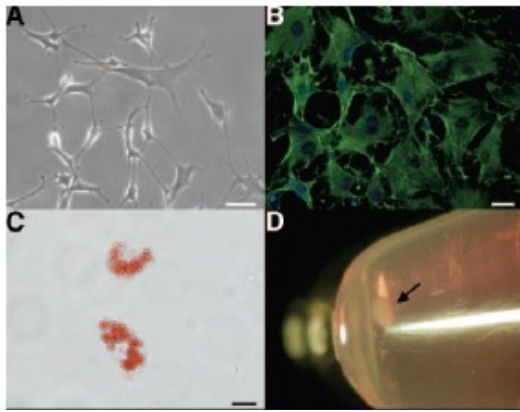


図 2 分離培養した組織幹細胞から分化誘導した(A, B) 繊維芽細胞 (C) 脂肪細胞 (軟骨細胞)。

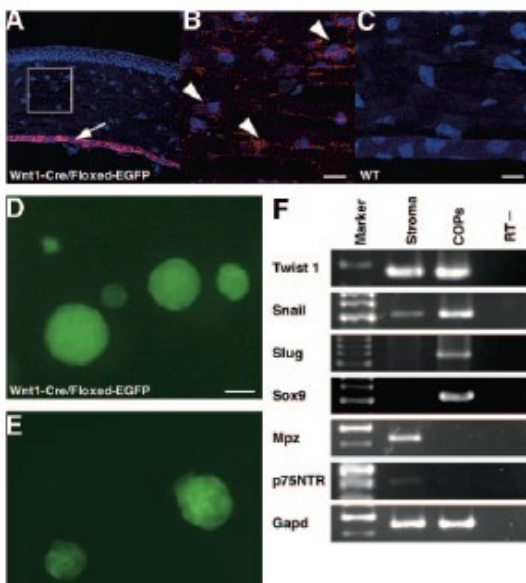


図 3 角膜実質および内皮細胞が神経堤細胞由来であること (A-C) と、分離した組織幹細胞 (D, E) が、神経堤細胞マーカーを発現していることを示す (F)。

②得られた成果の位置づけと今後の展望

角膜実質細胞にも組織幹細胞が存在することは、角膜の細胞生物学を進める上で、また、角膜の再生、人工角膜構築を目指す上でも大きな意義がある。我々の発表と前後して、ヒト角膜実質の組織幹細胞に関する報告もあり、また、我々の報告は既にいくつもの論文で引用されるに至っている。

現在、この細胞を用い、本来の目的である人工角膜実質の構築の研究を行っているが、期待する強度と透明性、またマーカー遺伝子の発現を保持した状態での構築に至っていないのが現状で、細胞を用いた角膜実質構築のためには更なる研究が必要である。フィブ

リングル中での細胞培養を様々な培養条件下で検討したところ、フィブリングルを用いた培養では、3次元の培養は困難であった。そこで、角膜実質本来の構成成分でもあるコラーゲンを用いた3次元培養を検討した。その結果、コラーゲンゲル中で良好な生育を認めた。免疫染色法によりマーカーの発現を調べたところ、ガレクチンなど本来の角膜実質で発現している細胞外基質の一部の発現は認められたが、もっとも角膜実質特異的なケラトカンの発現は失われていた。また発現している細胞外基質も細胞の周囲にとどまっておらず、全体に拡散して存在するところまで至っていない。今後、ケラトカンの発現を保ったまま3次元培養できる系を確立するためさらなる研究が必要である。実質細胞の性質を表すためには上皮からの誘導も重要である可能性を考え、現在、当研究室で既に作成法が確立している培養上皮シートとの共培養を行い、検討中であるが、この系ではコラーゲンの溶解が激しく、やはり目的の状態に至っていない。現在は、架橋剤やUVを用いた架橋により、コラーゲンゲルの融解を抑えることができるか検討中である。また、マウス角膜実質内に得られた組織間細胞を直接注入し、その有用性を確認するための検討も行っている。さらに、本来の目的とは異なるが、角膜実質細胞と同じ神経堤細胞由来である角膜内皮細胞をCOPSから誘導できそうであるため、詳細に検討を行っているところである。

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6件)

① Omoto M, Miyashita H, Shimmura S, Higa K, Kawakita T, Yoshida S, McGrogan M, Shimazaki J, Tsubota K. The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 May;50(5):2109-15. Epub 2009 Jan 10. Peer-reviewed.

② Igarashi T, Shimmura S, Yoshida S, Tonogi M, Shinozaki N, Yamane GY. Isolation of oral epithelial progenitors using collagen IV. Oral Dis. 2008 Jul;14(5):413-8. Peer-reviewed.

③ Miyashita H, Shimmura S, Higa K, Yoshida S, Kawakita T, Shimazaki J, Tsubota K. A novel NIH/3T3 duplex feeder system to engineer corneal epithelial

sheets with enhanced cytokeratin 15-positive progenitor populations. Tissue Eng Part A. 2008 Jul;14(7):1275-82. Peer-reviewed.

④ Yoshida S, Shimmura S, Kawakita T, Miyashita H, Den S, Shimazaki J, Tsubota K. Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 Nov;47(11):4780-6. Peer-reviewed.

⑤ Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Fukuda K, Matsuzaki Y, Okano H, Tsubota K. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. Stem Cells. 2006 Dec;24(12):2714-22. Epub 2006 Aug 3. Peer-reviewed

⑥ Shimmura S, Miyashita H, Higa K, Yoshida S, Shimazaki J, Tsubota K. Proteomic analysis of soluble factors secreted by limbal fibroblasts. Mol Vis. 2006 May 11;12:478-84. Peer-reviewed.

[学会発表] (計7件)

①吉田 悟、マウス角膜実質からの神経堤由来の多分可能を有した幹細胞の分離、第23回内藤コンファレンス、2008年11月13日、湘南国際村センター

②吉田 悟、角膜実質に存在する神経堤由来幹細胞、第31回日本神経科学大会、2008年7月13日、東京国際フォーラム

③Yoshida S, Expression patterns of Nucleostemin (Gn13) in mouse and human cornea, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, 2008/4/29, Florida, U.S.A.,

④吉田 悟、マウス及びヒト角膜における Nucleostemin (Gn13) の発現、第32回角膜カンファレンス 2008年2月29日、東京ベイホテル東急

⑤吉田 悟、輪部基底細胞におけるサイトケラチン 15 の発現、第31回角膜カンファレンス、2007年2月9日、ワールドコンベンションセンターサミット (宮崎市)

⑥吉田 悟、マウス角膜実質からの神経堤由来の多分可能を有した幹細胞の分離、第6回日本再生医療学会、2007年3月13日、

パシフィコ横浜

⑦Yoshida S, Multipotent cornea stromal precursors are of neural crest origin and not the bone marrow, The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, 2006/4/30, Florida, U.S.A.

[図書] (計1件)

①吉田悟、榛村重人、羊土社、実験医学増刊、角膜に存在する神経堤幹細胞、2008年、113-117頁

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 悟 (YOSHIDA SATORU)
東京歯科大学・歯学部・客員講師
研究者番号：50398781

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：