

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16962

研究課題名(和文) 角膜内皮細胞分化における環境適応戦略としての代謝リプログラミングの階層性

研究課題名(英文) Hierarchical nature of metabolic reprogramming to regulate differentiation of human corneal endothelial cells

研究代表者

丸山 悠子 (Yuko, Maruyama)

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：60516003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：培養ヒト角膜内皮細胞注入療法に適した成熟分化細胞と設定規格を充足しない相転移細胞の最も大きな機能的差異が細胞の呼吸能、就中ミトコンドリア機能にあることを細胞外Flux Analyzerと免疫染色を用いて確認した。両細胞間におけるTCA回路の中間産物の産生に係る機構つまり代謝リプログラミングの差違も明らかとなった。さらに両細胞間における細胞呼吸の基質特異性の差違も判明した。この培養細胞における分化成熟細胞と相転移細胞の差違と同様のミトコンドリア呼吸能の差違が正常角膜内皮組織と病態角膜内皮組織にも存在していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者の所属するグループは世界に先がけて培養ヒト角膜内皮細胞を用いた細胞注入再生医療を開発し、その臨床成績はNew Engl J Medに掲載された。本研究において明らかになった培養ヒト角膜内皮細胞における成熟分化細胞と相転移細胞の間のミトコンドリア機能の差違はミトコンドリア機能評価を細胞の本質的機能の指標として確立できる可能性があることを示唆している。本研究で得た培養ヒト角膜内皮細胞のエネルギー代謝の階層的変動に関する知見は培養ヒト角膜内皮細胞注入療法の最適化に貢献する。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that a major functional difference between mature differentiated cells which are suitable for cell injection therapy and phase transitioned cells which do not meet the established criteria lies in the respiratory capacity of the cell, especially in mitochondrial function, by extracellular flux analysis and immunostaining. The differences in the mechanism of the production of metabolic intermediates of the TCA cycle and metabolic reprogramming between the two types of cells were also confirmed. The substrate specificity of cellular respiration was different between these cellular subpopulations. These differences in mitochondrial respiratory capacity similar to the differences between differentiated mature cells and phase transitioned cells in cultivated cells was also found between healthy and pathological corneal endothelial tissues.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜内皮細胞 エネルギー代謝 細胞分化 ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「ヒト角膜内皮細胞分化における環境適応戦略としての代謝リプログラミングの階層性の解明」なる課題を設定し、角膜内皮機能不全の細胞分子病態解明を目的とした。分化度の異なるヒト角膜内皮細胞亜集団の環境適応戦略としての代謝リプログラミングの階層性を軸に、分化機能破綻修復に繋がる創薬分子標的を代謝経路に求める世界初の試みであった。細胞外 Flux Analyzer による OCR(酸素消費速度) / ECAR(細胞外液酸性化速度) 測定による代謝表現型の評価を培養ヒト角膜内皮細胞の分化度を異にする亜集団や疾患病態を異にする角膜内皮組織に就いて実施した。相転移 (cell state transition: CST) 細胞 (SPs with CST) と成熟分化細胞 (Mature SPs) の間にエネルギー代謝経路に乖離のあることとの申請者らの 28—29 年に亘る若手研究の成果を受けての発展型研究であった。

### 2. 研究の目的

培養角膜内皮細胞に存在する成熟分化非増殖性細胞、中間分化低増殖性細胞、幹細胞様未分化増殖性細胞、老化休止期細胞等少なくとも 4 種以上の細胞亜集団 (SPs) をモデル対象とし、培養環境適応戦略の軸に位置するエネルギー代謝の階層の変動を明確にする。さらに、角膜機能不全患者の前房水環境の代謝産物や miRNA (miR) を含む環境因子と照合することで、ヒト角膜内皮細胞分化機能破綻修復の創薬分子標的を代謝経路に求める世界初の試みに挑戦した。

### 3. 研究の方法

(1) 上述の亜集団に関して細胞外 Flux Analyzer による OCR や ECAR の測定や免疫染色などにより代謝表現型を評価した。細胞外 Flux Analyzer による下記解析法を駆使して代謝スイッチング、基質選択性などを解析した。

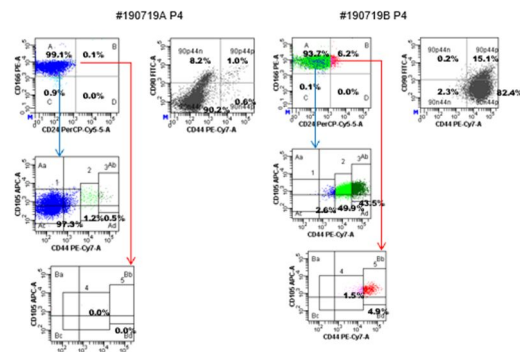
XF Mito stress Test : オリゴマイシン、FCCP などを用いてミトコンドリア呼吸量の変化を評価

XF Mito Fuel Flex Test : ミトコンドリア呼吸におけるグルコース、脂肪酸、グルタミンそれぞれに依存する割合を評価

(2) ドナーヒト角膜組織における角膜内皮組織の呼吸能を測定し、年齢や角膜内皮疾患罹患などによるミトコンドリア機能への影響を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 培養ヒト角膜内皮細胞は培養環境や培養方法によって異なった細胞特性を有する亜集団が産生されるため、その品質はまちまちで不安定である。我々は細胞注入療法のための培養ヒト角膜内皮細胞を安定生産するために細胞の呼吸能、特にミトコンドリア機能に視点を置いて研究を進めた。同一ドナーのヒト角膜内皮細胞を培養した結果、典型的な 2 種類の細胞亜集団を得た。A と B は我々が品質規格に定めている CD44<sup>+</sup>細胞をそれぞれ 97.3%、2.6%含んでおり、A を Mature SPs、B を SPs with CST ということができる (上図)。両者を培養開始して 35 日経過した培養上清を解析したところ代表的な代謝産物濃度に差違を認めた。



(2) Mature SPs の培養における分化成熟過程で培養上清の代謝産物が (1) のように異なるのであれば、培養過程でミトコンドリア呼吸能もなんらかの変化を起こすのではないかと仮説のもと、研究を実施した。具体的には培養期間が進むにつれて CD44<sup>+</sup>細胞の割合が増加し 35 日経過すると CD44<sup>+</sup>細胞が 92.6%となった Mature SPs を使用し、XF Mito stress test によってミトコンドリア呼吸能を OCR としてその培養過程で測定した。

(3) 細胞注入再生医療で用いる培養ヒト角膜内皮細胞の培養生成過程で使用する培地には血清が含まれている。この血清がミトコンドリア呼吸能に及ぼす影響の有無を細胞外 Flux Analyzer を用いて検討した。

(4) Mature SPs と SPs with CST におけるミトコンドリア機能を免疫染色で検討した。細胞が内含する全てのミトコンドリアを染色する MTG 染色と膜電位を維持したミトコンドリアのみを染色する TMRM 染色を比較した。実験には CD44<sup>+</sup>細胞割合 85.1%の Mature

SPs と、CD44<sup>+</sup>細胞割合 17.4%と CD44<sup>+</sup>細胞割合 28.6%の SPs with CST を用いた。

- (5) 培養ヒト角膜内皮細胞の呼吸における基質特異性すなわち、特にグルコース、アミノ酸、脂肪酸なる三大代謝基質による代謝依存性を検討した。
- (6) (1)～(5)では培養ヒト角膜内皮細胞について検討してきたが、次いでドナーヒト角膜組織における角膜内皮組織のミトコンドリア呼吸能を評価した。異なる年齢のドナー由来のヒト角膜組織を用いて角膜内皮組織のミトコンドリア呼吸能に年齢による影響があるかをみた。25歳と55歳、8歳と65歳で比較した。さらに、53歳の正常角膜内皮組織と guttata を認める Corneal endothelial cell decompensation に罹患した 43歳の角膜内皮組織 (guttata 組織) を比較した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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） 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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kohsaku Numa, Morio Ueno, Tomoko Fujita, Munetoyo Toda, Koji Ueda, Yuichi Tokuda, Atushi Mukai, Masakazu Nakano, Shigeru Kinoshita, Chie Sotozono, Junji Hamuro
2. 発表標題 Skewing of Mitochondrial Energy Metabolism Among Subpopulations of Cultured Human Corneal Endothelial Cells for Cell Therapy
3. 学会等名 ARVO 2020 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020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

〔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	上野 盛夫  (Ueno Morio)  (40426531)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教    (24303)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	外園 千恵 (Sotozono Chie) (30216585)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  (24303)	
研究協力者	木下 茂 (Kinoshita Shigeru) (30116024)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  (24303)	