

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791242

研究課題名（和文） 人工万能幹細胞を用いた角膜内皮・上皮細胞創生の研究

研究課題名（英文） Regeneration of corneal endothelium and corneal epithelium from induced pluripotent stem cells.

研究代表者 横倉 俊二 (YOKOKURA SHUNJI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：30400378

研究成果の概要（和文）：iPS細胞をある特殊な培地を用いて培養し、回収して解析したところ、これらの細胞が神経堤細胞に分化していることが判明した。更にこの神経幹細胞をsphere培養したところ、角膜内皮と同様のマーカーを発現している細胞が出現していることが確認された。

一方、iPS細胞を別の特殊な培地で培養し、回収して解析したところ、角膜上皮前駆細胞に分化しており、また創傷治癒能を有していることが確認された。

研究成果の概要（英文）：induced pluripotent stem cells (iPS cells) were cultured with some medium, sorted and analyzed. These cultured cells differentiated to neural crest cells. These neural crest cells were sphere-cultured. There had been cells expressing corneal endothelial marker in these sphere-cultured cells.

On the other hand, iPS cells were cultured with the other medium, sorted and analyzed. These cultured cells differentiated to corneal epithelial progenitor cells and had potency of wound healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科

キーワード：iPS細胞、幹細胞、角膜内皮、角膜上皮

## 1. 研究開始当初の背景

角膜疾患に対する治療として、アイバンク眼を用いた同種角膜移植が施行されてきたが、しばしば拒絶反応を回避できないため、その長期予後は十分でない。また、ドナー角膜の絶対的不足は、従来から世界の眼科医療

の大きな問題点である。このような角膜移植医療の技術的・社会的問題点を抜本的に解決しうるため、再生医療を用いた角膜移植パーツ（大別すると角膜上皮・角膜内皮）の作製とその移植が注目されるに至った。

まず難治性癬痕性上皮障害性疾患（スチーブンス・ジョンソン症候群、眼類天疱瘡、重症熱傷等）に対して、Pelligrini らは世界で初めて、角膜上皮幹細胞を含んだ培養角膜上皮シートを角膜表面に移植する方法を報告した（Pelligrini ら、Lancet 1997.）。その後同様の方法が報告されたが、これらの方法は角膜上皮幹細胞を羊膜などの基質上に培養して、「角膜上皮—基質」シートを作成し、これを移植するものであった。これらの方法はある程度確立されたが、「角膜上皮—基質」シートと宿主角膜実質の接着が恒常的に不良であることが大きな欠点であり、そのために移植された上皮層が永続的に易感染性、易傷害性の状態となり短期間しか維持されない症例も少なくなかった。また、両眼性の患者の場合、角膜上皮幹細胞が存在している角膜輪部が高度に傷害されていて幹細胞の回収が困難であることがしばしばみられる。このような患者では、角膜以外の組織から角膜上皮に誘導する幹細胞を採取する必要がある。我々はこのような点を解決するため、温度応答性培養皿を応用する細胞シート工学を上皮幹細胞培養技術に応用する技術を世界に先駆けて開発し（Nishida K, et al, Transplantation 2004）、更に患者自身の口腔粘膜上皮幹細胞を用いた角膜再生治療法を世界で初めて開発し、すでにヒト患者への臨床応用に成功している（Nishida K et al, N Engl J Med 2005）。本方法では基質を用いず、なおかつ培養細胞シートを回収する際に酵素処理を必要としないため、培養シートの患者組織への十分な接着が得られ、また両眼性の患者の治療も可能となっている。これにより難治性癬痕性上皮障害性疾患の多くが現在では治療可能となっている。

一方で角膜内皮が障害されるために角膜実質内に水が貯留する水疱性角膜症は、角膜移植の対象の第一位の疾患でかつ角膜移植の成績が悪い疾患で、現在の眼疾患の中でも解決すべき重要な疾患の一つと位置づけられている。また、本疾患もしばしば両眼性にみられる。したがって、上皮疾患に対する再生医療と同様に、患者本人の自家細胞を *in vitro* で増殖させてオート移植することができれば、大きな術後成績の向上が期待できる。このような自家培養角膜内皮移植は世界的にもいまだ開発されていないが、我々はこれまでに温度応答性培養皿を使用して培養角膜内皮細胞シートを作製、回収する技術を既に開発しており（Ide T ら、Biomaterials 2005）、動物実験（家兎）においてこの培養角膜内皮細胞シートが生着し、正常な内皮同

様に機能することを報告している（Sumide T ら、FASEB J 2006）。現在我々はこれらの技術を用いてヒトへの臨床応用を進めている段階である。しかしながら本方法では細胞源として正常角膜内皮を用いており、両眼性の患者では内皮幹細胞が回収不能なため角膜内皮シートが作製できない可能性がある。このため、角膜内皮の幹細胞として代用可能な細胞源を確立することは極めて重要であると考えられる。また、進行した水疱性角膜症では角膜上皮・実質も傷害されているために角膜混濁が永続的に残存しており、これを根治するためには角膜全層移植が必要であるが、前述のようにドナー不足の問題があるため、同じ細胞源から角膜全層、ないしは角膜上皮と角膜内皮を同時に再生できれば、より多くの患者の治療が可能になると考えられる。

角膜内皮細胞の細胞源の候補としては虹彩色素上皮、血管内皮等の他に ES 細胞が挙げられる。ES 細胞は、多能性幹細胞の 1 つであり、神経細胞、ドパミン産生細胞、心筋細胞、膵島細胞、血管内皮細胞等に分化誘導できることが報告されており、再生医療分野での応用が期待され、大きな注目を集めてきた。しかしながら、ES 細胞を用いることは、ヒト胚を壊すという倫理的問題や分化誘導の効率の問題、更に組織を再生出来たとしても他者の受精卵に由来するため拒絶反応が避けられないこと等、多くの問題がある。そこで近年、患者自身の細胞から ES 細胞様の細胞を樹立する試みが行われている。これまでに、体性幹細胞や分化した体細胞を培養することにより、体性幹細胞の形質転換や分化細胞の再プログラム化が起こり、ES 細胞や EG 細胞に近い多能性幹細胞が樹立されることが報告されている。このことは、未受精卵や ES 細胞の中には体細胞に分化多能性を誘導する因子が存在することを示唆している。そこで Yamanaka らの研究グループは体細胞において多能性を誘導する因子群は ES 細胞において多能性を維持している因子群と共通点が多く、かつ ES 細胞で特異的に発現しているとの考えに基づき、多能性誘導因子の候補として 24 因子を選出した。その結果、Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4 の 4 因子を体細胞に導入することで ES 細胞類似の多能性幹細胞、すなわち iPS 細胞（induced pluripotent stem cell、人工万能幹細胞）を樹立することに成功した（Takahashi ら Cell 2006. Okita ら Nature 2007）。本細胞は ES 細胞同様の分化多能性を有しているため、ES 細胞から各種組織への分化誘導と同様の培

養条件でこれら組織への分化誘導が可能と考えられた。

## 2. 研究の目的

そこで今回我々は、ES細胞から角膜内皮細胞の前駆細胞である神経堤細胞への分化誘導を行っている既報の実験(Motohashiら Stem Cells 2007.)を参考に、iPS細胞から神経堤細胞の分化誘導実験を行い、iPS細胞が角膜内皮細胞の細胞源として利用可能か検討することとした。また同じ細胞源から角膜上皮細胞も分化誘導できれば、将来的な角膜全層の再生技術の開発につながることを期待されるため、ES細胞から角膜上皮前駆細胞への分化誘導を行っている既報の実験(Hommaら Invest Ophthalmol Vis Sci 2004.)を参考にして、同様にiPS細胞が上皮細胞の細胞源としても利用可能か検討することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) : iPS細胞から角膜内皮前駆細胞への分化誘導実験

既報の論文(Takahashiら Cell 2006. Okitaら Nature 2007)に従ってiPS細胞の培養をまず行う。次にES細胞から神経堤細胞への分化誘導実験を行っている既報の論文

(Motohashiら Stem Cells 2007.)に基づき、iPS細胞から角膜内皮前駆細胞(神経堤細胞)への分化誘導が可能であるか検討する。神経堤細胞への分化誘導実験では、ST2M細胞をフィーダーとし、専用の培地を用いる。ある一定期間培養した後に回収した細胞をFACSにかけて、神経堤細胞のマーカが陽性かつ造血系細胞のマーカが陰性の細胞を分離する。眼の分化マーカと神経堤細胞のマーカを用いて、この細胞から抽出されたRNAを用いたreal-time RT-PCRを行い、分離された細胞が神経堤細胞に分化しているか検討する。また、更に回収された細胞を同じ培地・フィーダーで再度培養し、ニューロンのマーカ、グリアのマーカ、メラノサイトのマーカで免疫染色を行うことで神経堤細胞が多能性を有するか否か確認する。また神経堤細胞の分化が確認された場合、これらの手法を用いて最も適切な培養日数についても検討する。

### (2) : iPS細胞から角膜上皮前駆細胞への分化誘導実験

既報の論文(Takahashiら Cell 2006. Okitaら Nature 2007)に従ってiPS細胞の培養をまず行う。次にES細胞から角膜上皮前駆細胞の分化誘導実験を行っている既報の論文

(Hommaら Invest Ophthalmol Vis Sci 2004.)に基づき、iPS細胞から角膜上皮前駆細胞への分化誘導が可能であるか検討する。具体的には、iPS細胞がコンフルエントとなった段階でこれをIMDM培地で希釈し、浮遊培養する。これにより得られた細胞塊(胚様体)をコラーゲンコーティングチェンバーに播種し、専用の培地で培養を行う。培養した細胞はKCM培地での培養5日目・15日目・27日目の時点で回収し、眼の分化マーカ・上皮前駆細胞のマーカ・角膜上皮細胞の特異的マーカ・扁平上皮基底細胞のマーカの各プライマーを用いてreal-time RT-PCRを行い、角膜上皮前駆細胞へ分化しているか否か検討する。角膜上皮前駆細胞への分化が確認された場合、培養日毎のこれらの遺伝子の発現量を定量することで、適切な培養日数についても検討する。また、回収された細胞が角膜上皮創傷治癒時に発現されるマーカをどの程度発現しているかをフローサイトメトリー、及びウエスタンブロッティングによって測定し、創傷治癒能を有しているかを検討する。

### (3) : iPS細胞から分化誘導した各前駆細胞から成熟細胞への分化誘導実験

iPS細胞から分化誘導した角膜上皮前駆細胞、及び神経堤細胞を用いて、前者から角膜上皮、後者から角膜内皮への分化誘導実験を引き続いて行い、更にそれぞれの系から角膜上皮細胞・角膜内皮細胞が得られた場合、これらをそれぞれ温度応答性培養皿で培養し、得られた細胞シートが移植可能であるかにつき動物モデルを用いた移植実験で検討する。

## 4. 研究成果

ES細胞から神経堤細胞への分化誘導実験を行っている既報の論文(Motohashiら Stem Cells 2007.)に基づき、iPS細胞から神経堤細胞への分化誘導が可能か検討を行った。iPS細胞をまず専用の培地(DiM-M培地)を用いて培養し、その途中でATRAを培地中に加えて更に培養し、最終的に回収した細胞をFACSにかけて、神経堤細胞のマーカ陽性かつ造血系細胞のマーカ陰性の細胞を分離した。この細胞からmRNAを抽出し、眼の分化マーカ・神経堤細胞のマーカを用いてreal-time RT-PCRを行ったところ、分離された細胞が神経堤細胞と同程度にこれらのマーカを発現しており、神経堤細胞に分化していることが判明した。更に条件検討を行うことにより、最適な培養温度・日数を確定させた。この神経堤細胞を同じ組成の培地・フィ

ーダーで再度培養し、ニューロンのマーカー、グリアのマーカー、メラノサイトのマーカーで免疫染色を行ったところ、この細胞がこれらのマーカーを発現していた。これにより、分化誘導された神経幹細胞が多能性を有することが確認された。更にこの神経幹細胞をsphere培養したところ、角膜内皮と同様のマーカーを発現している細胞が低い頻度ながら出現していることが確認された。現在は効率よく角膜内皮細胞への分化を促すための条件（培養日数・培地組成など）について検討を行っている段階である。

一方、既報の論文(Homma ら Invest Ophthalmol Vis Sci 2004.)に基づき、iPS細胞から角膜上皮前駆細胞への分化誘導が可能か検討を行った。iPS細胞を培養し、コンフルエントとなった段階でこれをIMDM培地で希釈し、浮遊培養した。これにより得られた細胞塊（胚様体）をコラーゲンコーティングチェンバーに播種し、専用の培地で培養を行った。一定の期間後細胞を回収し、眼の分化マーカー・上皮前駆細胞のマーカー・角膜上皮細胞の特異的マーカー・扁平上皮基底細胞のマーカーの各プライマーを用いてreal-time RT-PCRを行ったところ、角膜上皮前駆細胞と同程度にこれらのマーカーを発現しており、角膜上皮前駆細胞に分化していることが判明した。このため更に条件検討を行うことで、最適な培養温度・日数を確定させることができた。また、この細胞が角膜上皮創傷治癒時に発現されるマーカーを発現していることが免疫染色とウエスタンブロットリングで確認され、創傷治癒能を有していることが確認された。現在は角膜上皮細胞への効率的な分化を促すための条件（角膜内皮と同様）について検討を行っている段階である。

#### 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)

[学会発表] (計3件)

1. 横倉 俊二 DSAEK(角膜内皮移植術)視力不良例の原因解析 第63回日本臨床眼科学会 2009年10月10日 福岡
2. 横倉 俊二 東北大学におけるアcantアメラバ角膜炎 第33回角膜カンファランス・第25回日本角膜移植学会 2009年2月21日 大阪
3. 横倉 俊二 角膜上皮異型性を伴った角膜上皮基底膜ジストロフィの1例 第62回日本臨床眼科学会 2008年10月24日 東京

[図書] (計2件)

1. 横倉 俊二 メディカル葵出版 新しい眼科「角膜内皮疾患を理解する」 2009年159-162

2. 横倉 俊二 文光堂 眼科プラクティス「眼科レーザー治療」 2009年 327

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

横倉 俊二 (YOKOKURA SHUNJI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：30400378

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし