

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20791247
 研究課題名（和文） 再生医療実現に向けた角膜・結膜上皮幹細胞の機能、特性解析と応用に関する研究
 研究課題名（英文） A study on function and characteristic analysis and application of the cornea and the conjunctiva epithelium stem cell for regenerative medicine realization
 研究代表者
 横尾 誠一（YOKOO SEIICHI）
 東京大学・医学部附属病院・特任研究員
 研究者番号：20345052

研究成果の概要（和文）：幹細胞の新しい特性を発見し、極めて安価かつ容易な単離法を開発し、成人角膜輪部より角膜上皮幹細胞を発見した。更に無血清培養法を確立し再生医療に用いることができる角膜上皮細胞シートを開発した。

研究成果の概要（英文）：I discovered the new characteristic of the stem cell and developed the extremely cheap easy isolation method to overcome and discovered a corneal epithelial stem cell than adult human cornea limbus. Furthermore, I developed the corneal epithelium cell sheet which I established the serum-free culture method and could use for regenerative medicine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：再生医療・角膜・上皮・幹細胞・体性幹細胞・幹細胞の単離・無血清培養・無フィーダー

1. 研究開始当初の背景

再生医療の実現化を目指して活発な研究活動が内外で行われている。再生医療の実現には幹細胞など組織や臓器を形成し得る細胞資源が必要である。ES 細胞には倫理的な問題が存在し、組織幹細胞は発見と採取が困難であり、そのため再生医療実現化が視野に入っている分野は少ない。

2. 研究の目的

角膜上皮再生医療を実現化するため角膜上皮幹細胞を発見し特性を解析し無血清培養法や安全性を検討すること。

3. 研究の方法

独自に開発した幹細胞の高付着能を利用した幹細胞単離法を開発し角膜上皮幹細胞を単離する。角膜上皮幹細胞を用いて無血清培養法を確立するほか幹細胞の分化能を評価する。

4. 研究成果

(1) 幹細胞の単離法の開発

幹細胞の新たな特性として高い付着能を見出した。現在の手法では数千万円の高価な分離機器と高価な抗体試薬が必要であるが、一個 100 円未満の通常細胞の付着培養が不可能な培養皿を用いて容易に幹細胞を単離できる。



図 1. 単離された角膜上皮幹細胞

(2) 幹細胞の無血清培養法

幹細胞の特性を詳細に調べるために無血清培養法の開発が不可欠である。鋭意研究の結果、現在の培養法には脂溶性栄養素の検討が成されていなかったため、検討したところレチノールの添加と EGF の組み合わせにより容易に無血清培養が可能であることが判明した。

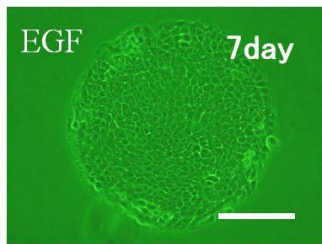


図 2. 無血清培養でコロニーを形成した角膜上皮幹細胞

(3) 角膜上皮幹細胞の分化能の検討

組織幹細胞には一種類の分化能を持つ前駆細胞と複数の分化能を持つ体性幹細胞に分類される。無血清培地中で EGF を用いて細胞を増殖させると角膜上皮細胞へ分化・増殖するが、bFGF の作用のみで角膜上皮幹細胞を培養すると角膜上皮幹細胞は杯細胞へ分化し、角膜上皮幹細胞が体性幹細胞であることが判明した。

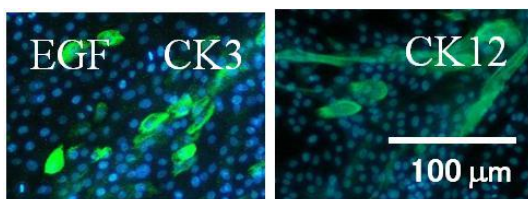


図 3. EGF で角膜上皮細胞へ分化した角膜上皮幹細胞

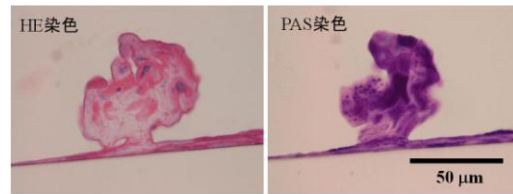


図 4. bFGF で杯細胞へ分化した角膜上皮幹細胞

(4) 無血清・無フィーダー角膜上皮細胞シートの開発

幹細胞の無血清培養法や分化法が明らかになったため、レチノールと EGF を添加した培養液で無血清・無フィーダー角膜上皮シートが作成可能であった。形態的には上皮組織が形成されており、また角膜上皮細胞へ分化していた。動物実験の結果生着することが確認できており、臨床応用に向けたデータがほぼ出そろった。

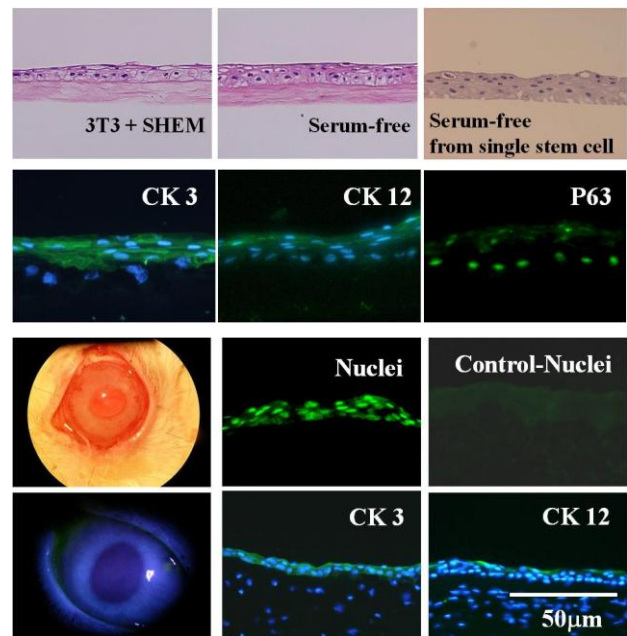


図 5. 幹細胞由来、角膜上皮シート

一個の幹細胞からでも 10 万個の細胞からでも角膜組織を形成できる。形態的に既存の移植に使われている角膜上皮シートとそん色ない。角膜上皮細胞マーカー CK3, 12 を発現する。また動物実験の結果、生着が確認できる。

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 8 件)

- ① Yokoo S, Yamagami S, Shimada T, Usui T, Sato TA, Amano S, Araie M, Hamuro J. A novel isolation technique of progenitor cells in human corneal epithelium using non-tissue culture dishes. *Stem Cells*. 査読有. 26 巻, 2008, 1743-1748
- ② Yokoo S, Yamagami S, Usui T, Amano S, Araie M. Human corneal epithelial equivalents for ocular surface reconstruction in a complete serum-free culture system without unknown factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有. 49 巻, 2008, 2438-43
- ③ Amano S, Shimomura N, Yokoo S, Araki-Sasaki K, Yamagami S. Decellularizing corneal stroma using N₂ gas. *Mol Vis*. 査読有. 14 巻, 2008, 878-82.
- ④ Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, Yokoo S, Usui T, Amano S, Mizuki N. A mouse model of allogeneic corneal endothelial cell transplantation. *Cornea*. 査読有. 27 巻, 2008, 699-705..
- ⑤ Usui T, Sugisaki K, Iriyama A, Yokoo S, Yamagami S, Nagai N, Ishida S, Amano S. Inhibition of corneal neovascularization by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 査読有. 49 巻, 2008, 4370-6.
- ⑥ Mimura T, Amano S, Yokoo S, Uchida S, Yamagami S, Usui T, Kimura Y, Tabata Y. *Mol Vis*. 査読有. 14 巻, 2008, 1819-28.
- ⑦ Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, Yokoo S, Usui T, Amano S, Mizuki N. Immunological mechanisms of corneal allografts reconstituted from cultured allogeneic endothelial cells in an

immune-privileged site.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有. 50 巻, 2009, 3151-8

- ⑧ Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Amano S. Selective Isolation of Young Cells from Human Corneal Endothelium by the Sphere-Forming Assay. *Tissue Eng Part C Methods*, 査読有. online, 2009, online

[学会発表] (計 13 件)

- ① 横尾誠一, ヒト角結膜の組織幹細胞・前駆細胞の特徴 (シンポジウム), 日本眼科学会, 平成 21 年 4 月 17 日, パシフィコ横浜 (横浜市)
- ② 横尾誠一, 臼井智彦, 本田紀彦, 天野史郎, 山上聡, 無フィーダー細胞・無血清培養法による移植用上皮シートの作成と評価 (口演), 日本眼科学会, 平成 21 年 4 月 17 日, パシフィコ横浜 (横浜市)
- ③ 横尾誠一, 臼井智彦, 天野史郎, 山上聡 成人角膜上皮幹細胞を用いた移植用無血清角膜上皮シートの開発 (口演) 日本組織培養学会, 平成 20 年 5 月 20 日, 文部科学省研究交流センター (つくば市)
- ④ 横尾誠一, 臼井智彦, 小野恭子, 天野史郎, 山上聡, 成人角膜上皮幹細胞を用いた無血清角膜上皮シートの開発 (眼科再生医療研究会), 日本臨床眼科学会, 平成 20 年 10 月 23 日, 東京国際フォーラム (東京)
- ⑤ 臼井智彦, 本田紀彦, 横尾誠一, 三村達哉, 天野史郎, 尾池雄一, マウス角膜血管新生モデルにおけるアンジオポエチン様因子 2 の発現 (学術展示), 角膜カンファランス・日本角膜移植学会, 平成 21 年 2 月 20 日, ザ・リッツ・カールトン 大阪 (大阪市)
- ⑥ 林孝彦, 臼井智彦, 横尾誠一, Romulo Albuquerque, Jayakrishna Ambati, Balamurali Ambati, 天野史郎, 水木信久, 山上聡, 可溶性 VEGFR2 を用いた角膜移植後感作の抑制 (学術展示), 角膜カンファランス・日本角膜移植学会, 平成 21 年 2 月 20 日, ザ・リッツ・カールトン 大阪 (大阪市)

- ⑦ 横尾誠一、臼井智彦、三村達哉、杉崎顕史、天野史郎、山上聡、ヒト角膜輪部上皮前駆細胞の分化能の検討，日本眼科学会，平成 21 年，4 月 17 日，東京国際フォーラム(東京)
- ⑧ 林孝彦、臼井智彦、横尾誠一、Romulo Albuquerque, Jayakrishna Ambati, Balamurali Ambati, 天野史郎、水木信久、山上聡，可溶性 VEGFR2 による角膜移植後の炎症細胞の浸潤抑制・リンパ管新生阻害効果，日本眼科学会，平成 21 年，4 月 17 日，東京国際フォーラム(東京)
- ⑨ 横尾誠一、臼井智彦、天野史郎、山上聡，成人結膜上皮からの組織幹細胞の探索(ワークショップ)，日本組織培養学会，平成 21 年，5 月 19 日，獨協医科大学(栃木県下都賀郡)
- ⑩ 大道幸子、臼井智彦、横尾誠一、新家眞、天野史郎，ヒト培養角膜上皮細胞シートにおける塩化ベンザルコニウムの影響，角膜カンファランス，平成 22 年，2 月 11 日，仙台国際センター(仙台市)
- ⑪ 横尾誠一、山上聡、天野史郎、新家眞，KGF 添加無フィーダー細胞・無血清角膜上皮シートのサイトケラチン 15 の発現，角膜カンファランス，2 月 11 日，仙台国際センター(仙台市)
- ⑫ 臼井智彦、本田紀彦、横尾誠一、新家眞、天野史郎、林石化、関常司，NBC1 W516X ホモノックインマウスにおける角膜所見，角膜カンファランス，2 月 11 日，仙台国際センター(仙台市)
- ⑬ 杉崎顕史、臼井智彦、本田紀彦、横尾誠一、天野史郎，角膜血管新生における白血球抑制因子の関与，角膜カンファランス，2 月 11 日，仙台国際センター(仙台市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：生細胞分離用遠心分離管
 発明者：横尾 誠一、小野 恭子、山上 聡、田中 速雄
 権利者：横尾 誠一、住友ベークライト株式会社
 種類：特許
 番号：特開 2007-166977 (P2007-166977A)
 出願年月日：平成 17 年 12 月 22 日
 国内外の別：国内

名称：METHOD FOR ISOLATION OF CELL, SERUM-FREE CULTURE MEDIUM FOR CELL, AND METHOD FOR CULTURE OF CELL
 (細胞の単離方法、細胞用無血清培養培地および細胞の培養方法)
 発明者：YOKOO, Seiichi、YAMAGAMI, Satoru、
 権利者：MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION, YOKOO, Seiichi、YAMAGAMI, Satoru
 種類：特許
 番号：WO/2009/011139
 出願年月日：13.07.2007
 国内外の別：外国

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
 無し(作成中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横尾 誠一 (YOKOO SEIICHI)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：20345052

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山上 聡 (YAMAGAMI SATORU)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10220245