様式C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年6月21日現在

研究種目：若手研究Ｂ
研究期間：2008～2009
課題番号：20791288
研究課題名（和文）角膜内皮特異的分化マーカーの同定とそれに基づくヒトＥＳ細胞から角膜内皮細胞の創出
研究課題名（英文）Induction of corneal endothelial cells from human embryonic stem cells based on the analysis of molecular markers during corneal endothelial development
研究代表者
上野　盛夫（UENO MORIO）
独立行政法人理化学研究所・細胞分化器官発生研究グループ・客員研究員
研究者番号：40426531

研究成果の概要（和文）：
個体内のほぼ全ての中脳神経堤由来組織にGFPを発現するノックインマウスを作成し、中脳神経堤細胞から角膜内皮前駆細胞にいたる各段階の分子マーカー同定を試みた．その分子マーカーを指標にin vitroでマウス胚性幹細胞（ES細胞）から中脳神経堤細胞～角膜内皮細胞への分化誘導研究を行った.さらにはヒトES細胞を用いた角膜内皮細胞分化誘導研究への応用も行った.本研究はヒトES細胞を用いた角膜内皮細胞移植ソース作成に寄与する研究であったと考える.

研究成果の概要（英文）：
We generated the knock-in mice expressing a green fluorescent protein (GFP) in mesencephalic neural crest cells and their derivatives. The analysis of molecular markers during corneal endothelial development was performed using the knock-in mice. The in vitro induction of corneal endothelium from mouse embryonic stem cells was developed based on the molecular markers to mimic the mouse corneal endothelial development. The protocol to produce corneal endothelium from mouse embryonic stem cells was applied to in vitro induction of corneal endothelium from human embryonic stem cell. This research shed light on the production of the cellular source for the corneal endothelial transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
2009年度	1,700,000円	510,000円	2,210,000円
総　計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

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：眼発生・再生医学

１．研究開始当初の背景
近年，水疱性角膜症をはじめとする重度の角膜内皮障害に対する次世代の治療法として角膜内皮細胞移植が注目を浴びている．しかし我が国で

はドナー角膜が慢性的に不足しており，角膜内皮細胞自体を用いた移植治療には限界がある．そこでヒト胚性幹細胞（ES 細胞）から角膜内皮細胞を分化誘導し角膜内皮細胞移植の移植材料として用いることが有力な解決策であると考えられた．

２．研究の目的

研究代表者はすでに角膜内皮前駆細胞である中脳神経堤細胞特異的に GFP を発現している転写因子を見出していた．本研究の目的はこの転写因子活性をてがかりに，in vivo における角膜内皮細胞の分化過程を詳細に検討し角膜内皮細胞分化マーカーを同定することと，それらのマーカーを指標に in vitro でマウス・ヒト ES 細胞から角膜内皮細胞を分化誘導して将来的な角膜内皮細胞移植へつなげることであった．

３．研究の方法

（１）　中脳神経堤細胞特異的に GFP を発現するノックイン ES 細胞の作成とその解析

研究代表者は角膜内皮前駆細胞と考えられる中脳領域の神経堤細胞にごく早期に発現している転写因子を明らかにし，その転写因子の活性を GFP の活性に置き換えたノックイン ES 細胞を作成した．この細胞は in vitro で神経堤細胞へ分化誘導すると GFP を発現することも確認している．この GFP の発現が，真に in vivo での中脳神経堤細胞でのこの転写因子の活性と一致することを確認するため，このノックイン ES 細胞からキメラマウスを作成した．

（２）　中脳神経堤細胞由来組織を不可逆的に蛍光標識する遺伝子改変マウスの Cre-loxP 法を用いた作成

研究代表者らが見出した中脳神経堤領域にごく早期に発現している転写因子の活性を Cre recombinase の活性に置き換えたノックインマウスと，Cre recombinase により GFP を発現するトランスジェニックマウスを交配して得る複合ヘテロ体マウスは中脳神経堤由来組織を不可逆的に蛍光標識した．具体的には Cre recombinase の活性に置き換えたノックインマウスの作成に際し，ターゲッティングベクターは研究代表者らの開発した，Multisite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit を用いた作成法（Int J Dev Biol. 2005; 49: 807-23）で作成した． ES クローンの樹立は型どおりにエレクトロポレーション法と薬剤耐性セレクションで行い，サザンハイブリダイゼーション法で相同組み換え体を同定した．胚盤胞へのマイクロインジェクション法によりキメラマウスの作成を行い，続いてヘテロ組み換えマウスを作成した．このヘテロ接合体と Cre による組み換えを受けると GFP 遺伝子が発現するレポーターマウスを交配して複合ヘテロ体マウスを得た．

（３）　（２）で作成した遺伝子改変マウスを用いた角膜内皮細胞およびその前駆細胞に発現している分子マーカーの同定

（２）で作成した複合ヘテロ体マウスの胎生 8.5 日目から 14.5 日目まで 24 時間ごとのステージの胚を摘出した．中脳領域から眼にかけての組織をトリプシン処理で細胞レベルに分離した後に flowcytmetry を用いて GFP 陽性分画を集積することにより角膜内皮細胞へ分化途上の細胞を得た．さらに野生型マウス成体より角膜内皮細胞を摘出する．角膜内皮細胞はデスメ膜ごとシート状に摘出可能なため他の細胞成分の混入はない．それぞれの細胞より型どおりに RNA 抽出，cDNA 作成を行い，DNA マイクロアレイを用いて中脳神経堤細胞から角膜内皮細胞にいたるまでの分化過程における遺伝子発現プロファイルを解析した．

（４）　（３）の分子マーカーの発現をもとにした in vitro でのマウス ES 細胞から角膜内皮細胞へ分化誘導法の樹立

中脳神経堤細胞特異的に GFP を発現するマウス ES 細胞を用いて研究を行った．研究代表者が所属する研究グループが 2002 年に開発した ES 細胞から中脳神経堤細胞の分化誘導系（Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99: 1580-85）と，申請者が開発した無血清かつフィーダー細胞に依存しない分化誘導系（Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103: 9554-9）の ES 細胞に対する活性がほぼ同等であることを利用し，研究代表者が開発した無血清かつフィーダー細胞に依存しない分化誘導系を用いて in vitro でマウス ES 細胞から中脳神経堤細胞の分化誘導研究を行った．Flowcytemetry を用いて GFP 陽性細胞の検出およびソーティングを行い ES 細胞由来中脳神経堤細胞を得た.（３）で得た遺伝子発現情報をもとに分子マーカーを選び，ES 細胞由来中脳神経堤細胞をそれらの分子マーカーが発現するように角膜内皮細胞へ最終分化させる条件をスクリーニングした．

（５）　（４）で開発したマウス ES 細胞から角膜内皮細胞へ分化誘導法をヒト ES 細胞へ応用した in vitro でのヒト ES 細胞由来角膜内皮細胞の産生

研究代表者らが開発した ROCK inhibitor を用いた新規のヒト ES 細胞培養法（Nat Biotechnol. 2007; 25: 681-6）は，従来は困難であった，マウス ES 細胞で開発した分化誘導系のヒト ES 細胞への応用を可能にした．本研究においても，（４）で確立したマウス ES 細胞から角膜内皮細胞を分化誘導する条件をヒト ES 細胞に応用し，ヒト ES 細胞由来角膜内皮細胞の産生を試みた．

４．研究成果

研究代表者はすでに角膜内皮前駆細胞と考えられる中脳領域の神経堤細胞にごく早期に発現してい

る転写因子の活性をGFPの活性に置き換えたノックイン ES 細胞を作成していた．まずこのノックイン ES 細胞からキメラマウスを作成することに成功した．作成したキメラマウスの胎生8.5日胚で中脳神経堤細胞特異的にGFPの発現を認め，ノックインES細胞が角膜内皮前駆細胞である中脳神経堤細胞を特異的にマーキング出来ていることを確認できた．また，個体内のほぼ全ての中脳神経堤由来組織にGFPを発現するノックインマウスの作成にも成功した．このノックインマウスを用いた角膜内皮細胞およびその前駆細胞に発現している分子マーカーの同定に関しては，マウス個体発生の段階毎の角膜内皮前駆細胞から作成した cDNA を用いて，角膜内皮細胞およびその前駆細胞に発現している分子マーカーを試みた．そこで得た角膜内皮細胞分化の分子マーカーを指標に研究代表者が開発した無血清かつフィーダー細胞に依存しない分化誘導系を用いて in vitro でマウス ES 細胞から中脳神経堤細胞～角膜内皮細胞への分化誘導研究を行った．さらにはノックインマウス由来 cDNA から得た分子マーカーのヒトへの相同性を検証した上で，ヒト ES 細胞を用いた角膜内皮細胞分化誘導研究への応用も行った．以上をまとめると，本研究課題において研究代表者は角膜内皮特異的分化マーカーの同定を試み，ヒト ES 細胞から角膜内皮細胞の in vitro での創出への応用研究を行った．角膜内皮細胞の発生過程の解明及び角膜内皮細胞移植治療のためのヒト ES 細胞を用いた細胞移植ソース作成に寄与する研究であったと考える．

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２件）

1) Nagase T, Ueno M, Matsumura M, Muguruma K, Ohgushi M, Kondo N, Kanematsu D, Kanemura Y, Sasai Y: Pericellular matrix of decidua-derived mesenchymal cells: a potent human-derived substrate for the maintenance culture of human ES cells. Dev Dyn. 238(5):1118-130, 2009（査読有）
2) Okumura N, Ueno M, Koizumi N, Sakamoto Y, Hirata K, Hamuro J, Kinoshita S: Enhancement on primate corneal endothelial cell survival in vitro by a ROCK inhibitor. Invest Ophthalmol Vis Sci. 50(8):3680-3687, 2009.（査読有）

〔学会発表〕（計26件）

1) 上野盛夫，森和彦，池田陽子，今井浩二郎，木下茂：抗緑内障薬上市前後における線維柱帯切開術適応症例の臨床背景と眼圧経過の検討．第33回日本眼科手術学会総会，東京，2010年1月22日
2) 小泉範子，奥村直毅，高橋浩昭，上野盛夫，坂本雄二，平田香菜，羽室淳爾，木下茂：水泡性角膜症に対するRhoキナーゼ阻害剤を用いた角膜内皮細胞前房注入の試み．第34回角膜カンファレンス・第26回日本角膜移植学会，仙台，2010年2月12日
3) 奥村直毅，小泉範子，上野盛夫，坂本雄二，高橋浩昭，平田香菜，羽室淳爾，木下茂：臨床応用を目指した角膜内皮機能不全に対する水泡性角膜症に対するRhoキナーゼ阻害剤点眼治療法の開発．第34回角膜カンファレンス・第26回日本角膜移植学会，仙台，2010年2月12日
4) 山本真弓，奥村直毅，高橋浩昭，上野盛夫，坂本雄二，平田香菜，木下茂，小泉範子：選択的Rhoキナーゼ阻害剤による角膜実質細胞の筋線維芽細胞への形質転換への影響．第34回角膜カンファレンス・第26回日本角膜移植学会，仙台，2010年2月12日
5) 高橋浩昭，小泉範子，奥村直毅，上野盛夫，坂本雄二，平田香菜，羽室淳爾，木下茂：ウサギ角膜内皮障害眼における選択的Rhoキナーゼ阻害剤による創傷治癒効果の検討．第34回角膜カンファレンス・第26回日本角膜移植学会，仙台，2010年2月12日
6) 池田陽子，森和彦，上野盛夫，今井浩二郎，近藤衣里，木下茂：線維柱帯切除術後早期の眼圧季節変動の検討．第33回日本眼科手術学会総会，東京，2010年1月22日
7) 上野盛夫，池田陽子，今井浩二郎，森和彦，木下茂：京滋地区における過去3年間の緑内障薬物処方パターンの変化の検討．第20回日本緑内障学会，那覇，2009年11月13日
8) 池田陽子，森和彦，上野盛夫，今井浩二郎，八木知人，大見奈津江，徳田雄市，不破正博，田代啓，木下茂：原発開放隅角緑内障の疾患マーカーＳＮＰｓ解析．第20回日本緑内障学会，那覇，2009年11月13日
9) 今井浩二郎，森和彦，池田陽子，上野盛夫，木村健一，木下茂：血液生化学データによる落屑緑内障と全身疾患との関連性の検討．第20回日本緑内障学会，那覇，2009年11月13日
10) 高橋佳奈子，池田陽子，森和彦，上野盛夫，今井浩二郎，近藤衣里，吉村彰紘，木下茂：網膜神経線維層厚解析装置による原発開放隅角緑内障の長期経過観察．第20回日本緑内障学会，那覇，2009年11月13日
11) 吉村彰紘，池田陽子，森和彦，上野盛夫，今井浩二郎，近藤衣里，高橋佳奈子，木下茂：原発開放隅角緑内障の視神経乳頭形状解析装置による長期経過観察例の検討．第20回日本緑内障学会，那覇，2009年11月13日
12) 田中寛，森和彦，古泉英貴，池田陽子，上野盛夫，今井浩二郎，木下茂：スペクトラムドメインＯＣＴ深部強調画像法による眼圧変動に伴う脈絡膜厚変化の検討．第20回日本緑内障学会，那覇，2009年11月13日

13) 丸山悠子，森和彦，池田陽子，上野盛夫，今井浩二郎，木下茂：前眼部ＯＣＴによる前房隅角形状の定量的加齢変化の検討. 第20回日本緑内障学会，那覇，2009年11月13日
14) 吉川晴菜，池田陽子，外園千恵，森和彦，上野盛夫，今井浩二郎，木下茂：小児先天角膜混濁症例の眼圧，臨床所見とＵＢＭ所見の関係. 第20回日本緑内障学会，那覇，2009年11月13日
15) 近藤衣里，森和彦，池田陽子，上野盛夫，今井浩二郎，木下茂：緑内障患者に対するプロスタグランジン製剤単独療法とチモロール／ドルゾラミド併用療法の比較検討. 第20回日本緑内障学会，那覇，2009年11月13日
16) 上野盛夫，佐々木美帆，丸山和一，池田陽子，森和彦，木下茂：高眼圧により上方視神経部分低形成（ＳＳＯＨ）様の視神経乳頭変化をきたした一例. 第63回日本臨床眼科学会，福岡，2009年10月11日
17) 池田陽子，高橋純子，森和彦，上野盛夫，斎田孝彦，木下茂：多発性硬化症の病型別網膜神経線維厚減少量の検討. 第63回日本臨床眼科学会，福岡，2009年10月11日
18) 上野盛夫，佐々木美帆，丸山和一，池田陽子，森和彦，木下茂：高眼圧により上方視神経部分低形成（ＳＳＯＨ）様の視神経乳頭変化をきたした一例. 第115回京都眼科学会，京都，2009年9月7日
19) 池田陽子，森和彦，上野盛夫，木下茂，八木知人，中野正和，大見奈津江，田中雅美，徳田雄市，不破正博，大橋沙矢佳，斉藤直子，吉井健吾，田代啓：緑内障早期診断・早期治療のための疾患マーカーSNPs解析. 第115回京都眼科学会，京都，2009年9月7日
20) 長瀬朋子，上野盛夫，松村みちる，六車恵子，大串雅俊，近藤直実，兼松大介，金村米博，笹井芳樹：ヒト脱落膜由来細胞の細胞外マトリクスを用いたヒトES細胞の維持培養法. 第 82 回日本組織培養学会. シンポジウム. 東京. 2009 年 5 月 18 日
21) N. Okumura, N. Koizumi, M. Ueno, Y. Sakamoto, H. Takahashi, K. Hirata, J. Hamuro, S. Kinoshita：A ROCK Inhibitor Enhances Corneal Endothelial Wound Healing in Both an i*n vitro* and *in vivo* Model, 2009 Annual Meeting of the ARVO (The Asociation for Research in Vision and Ophthalmology), Fort Lauderdale, Florida, U.S.A., 2009. 5. 4
22) 奥村直毅，小泉範子，上野盛夫，坂本雄二，高橋浩昭，平田香菜，羽室淳爾，木下茂：Rhoキナーゼ阻害剤添加強角膜片保存液の角膜内皮細胞保存に対する有用性. 第 113 回日本眼科学会総会，東京，2009 年 4 月 17 日
23) 上野盛夫：臨床応用を目指したヒトES細胞研究の最前線と臨床研究者がヒトES細胞を使うこつ. 第 112 回日本眼科学会総会，スキルトランスファー，神奈川，2008 年 4 月 17 日
24) 奥村直毅，小泉範子，上野盛夫，坂本雄二，高橋浩昭，平田香菜，羽室淳爾，木下茂：選択的Rhoキナーゼ阻害剤の角膜内皮細胞の創傷治癒に対する影響：第 33 回角膜カンファレンス・第 25 回日本角膜移植学会，大阪，2009 年 2 月 21 日
25) 奥村直毅，上野盛夫，小泉範子，坂本雄二，高橋浩昭，平田香菜，羽室淳爾，木下茂：Rhoキナーゼ阻害剤を用いた霊長類角膜内皮培養法の開発. 眼科再生医療研究会，東京，2008 年 10 月 23 日
26) N. Okumura, M. Ueno, N. Koizumi, H. Hitora, S. Kinoshita： A ROCK Inhibitor Enhances Primate Corneal Endothelial Cells Culture *In Vitro*. 2008 Annual Meeting of the ARVO (The Asociation for Research in Vision and Ophthalmology), Fort Lauderdale, Florida, U.S.A., 2008. 5. 1

〔図書〕（計 2 件）
1) 上野盛夫：視力低下，実地医家のための高齢者診療ガイド（大内尉義編著）pp44-45，同人社，東京，2008
2) 上野盛夫：選択的ROCK阻害薬を用いた画期的なヒトES細胞培養法－ヒトES細胞から大脳神経前駆細胞の創出，医学のあゆみ，医歯薬出版，227 巻 4 号，pp254-258，2008

〔産業財産権〕
○出願状況（計 3 件）

1) 名称：ヒト卵膜由来細胞の細胞外マトリクスを用いたヒト多能性幹細胞の培養法
発明者：笹井芳樹・長瀬朋子・上野盛夫・金村米博
権利者：独立行政法人理化学研究所
種類：特許
番号：2008-328339
出願年月日：2008 年 12 月 24 日
国内外の別：国内

2) 名称：卵膜由来細胞の細胞外マトリクスを用いた多能性幹細胞の培養方法
発明者：笹井芳樹・長瀬朋子・上野盛夫・金村米博
権利者：独立行政法人理化学研究所
種類：特許
番号：No.12/646,156
国内外の別：アメリカ合衆国

3) 名称：角膜内皮細胞接着促進剤
発明者：小泉範子，木下茂，上野盛夫
権利者：千寿製薬株式会社，木下茂
種類：特許

番号：2008-65459
出願年月日：2008 年 8 月 28 日
国内外の別：国内

６．研究組織
(1)研究代表者
上野　盛夫 (UENO MORIO)
独立行政法人理化学研究所・細胞分化器官発生研究グループ・客員研究員
研究者番号：40426531