

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03842

研究課題名（和文）多能性幹細胞を用いた足場環境の調節による眼発生機構の解明と生理的眼発生の再現

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of whole eye development and its reproduction in vitro by regulating scaffold environment using pluripotent stem cells

研究代表者

林 竜平（Hayashi, Ryuhei）

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：70535278

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では多能性幹細胞由来のオルガノイドを用いて、眼発生におけるサイトカインや足場ECM等の周辺環境の影響を解明することを目的とした。多能性幹細胞由来眼オルガノイドを用いた検討を行ったところ、眼表面外胚葉の誘導にはYAP活性化が必要であると同時に、BMPシグナルと神経外胚葉から分泌されるWNT阻害因子が必要であることを明らかとした。一方で網膜等の神経外胚葉の分化にはYAP不活性化が重要なプロセスであることが示唆された。また多能性幹細胞から涙腺オルガノイドが誘導可能であることを初めて示し、その初期には転写因子のBARX2、足場環境としてのマトリゲルおよびEGFRシグナルが重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりこれまで詳細に理解されていなかったヒト眼発生とくに角膜や結膜上皮の発生機構を明らかにすることができた。さらにはこれまで報告のなかった、3次元のヒト涙腺オルガノイドを世界で初めて作製することに成功した（Hayashi R et al. Nature 2022）。本研究成果によりヒトの眼発生機構が明らかになっただけでなく、サイトカインや足場環境を調整することにより、多能性幹細胞から効率よく目的の眼細胞を誘導することが可能になり、再生医療や薬剤スクリーニング分野の発展に貢献できると考えられる。

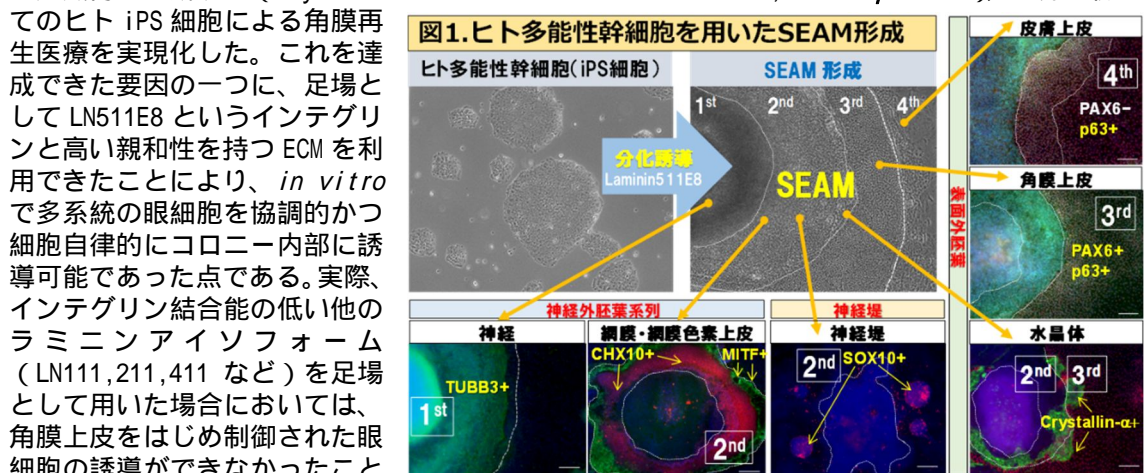
研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the effects of cytokines, scaffolds and the surrounding environment on ocular development using pluripotent stem cell-derived organoids. Using pluripotent stem cell-derived ocular organoids, we found that the activation of YAP/TAZ signalling is required for the induction of ocular surface ectoderm such as corneal epithelium, and that BMP signalling and WNT inhibitory factors secreted from the neuroectoderm are also required. On the other hand, the inactivation of YAP/TAZ signalling was suggested to be an important process for the differentiation of neural ectoderm such as the retina. We also demonstrated for the first time that lacrimal gland organoids can be generated from human pluripotent stem cells, and that the transcription factor BARX2, Matrigel as a scaffold, and EGFR signalling are important in the early stage of lacrimal gland organoids generation.

研究分野：再生医学、幹細胞生物学

キーワード：多能性幹細胞 オルガノイド 角膜 YAP 涙腺 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

我々はヒト多能性幹細胞を用いて、角膜上皮や網膜などの眼細胞が、細胞自律的に規則正しい配向で誘導される外胚葉性多帯状コロニー (SEAM; Self-formed Ectodermal Autonomous Multi-zone) を世界で初めて報告した (図1) (Hayashi R. *et al. Nature* 2016)。SEAM はヒトの眼発生を広範囲かつ高度に模倣した *in vitro* 培養系である。特に角膜上皮についてはその単離および組織再生に成功し (Hayashi R. *et al. Nature Protoc.* 2017, *Sci Rep.* 2018) 世界で初めてのヒト iPS 細胞による角膜再生医療を実現化した。これを達成できた要因の一つに、足場として LN511E8 というインテグリンと高い親和性を持つ ECM を利用できたことにより、*in vitro* で多系統の眼細胞を協調的かつ細胞自律的にコロニー内部に誘導可能であった点である。実際、インテグリン結合能の低い他のラミニンアイソフォーム (LN111, 211, 411 など) を足場として用いた場合においては、角膜上皮をはじめ制御された眼細胞の誘導ができなかったこと



から、我々は少なくとも角膜上皮などの眼表面外胚葉や網膜などの神経外胚葉の発生には細胞-ECM 間の比較的強い結合が必要であると考えた。LN511E8 と比較してやや弱いインテグリン結合能を有するラミニン LN332E8 においては、角膜上皮分化がむしろ促進され、非常に弱いインテグリン結合能しか持たない LN211E8 の場合は、角膜、網膜ともに誘導されず神経堤が選択的に誘導された。さらに、この分化指向性は主に足場を介して伝達される YAP/TAZ シグナリングが関与していることを見出した (Shibata S, Hayashi R *et al. Cell Rep.* 2018)。一方、広範囲な誘導が可能な LN511E8 を用いた SEAM 法であっても、眼神経堤に由来する角膜実質、強膜や、眼表面外胚葉に由来する結膜上皮、結膜杯細胞や腺組織は明確に誘導されず、完全な眼発生を達成できていない。これは SEAM 法が細胞自律的な分化を基盤とした培養法であるがために、各眼細胞の発生に必要なサイトカインやシグナル伝達が不明なままであることも一因である。また、SEAM において誘導が困難な眼組織の特徴としては、角膜上皮などと比較して柔らかい足場上で発生する組織 (結膜など) や、足場依存性の低い立体的な組織 (涙腺組織、神経堤由来組織等) が挙げられた。これらのことから、各眼組織の発生には、様々なサイトカイン等のシグナルに加えて、適切な足場環境からの機械的刺激が関与しており、その刺激は YAP/TAZ シグナリング等を介して種々の分化シグナル伝達に変換され、それにより組織発生の指向性が変化するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト多能性幹細胞由来 SEAM をヒト眼球発生モデルとして用いて発生とサイトカイン、足場 ECM の関係、特に足場を介して伝わる機械的刺激 (YAP/TAZ シグナリング等) 等に注目し、それらが眼発生に及ぼす影響を明らかにして、様々な眼細胞系列の発生を *in vitro* で再現することを目的とする (図2)。

3. 研究の方法

・レポーターノックイン iPS 細胞を用いた解析

多能性幹細胞 (ヒト iPS 細胞) 由来 SEAM を用いた実験において、特定に細胞系譜を観察、単離、解析を容易にするために、上皮系細胞 (TP63) や眼神経堤細胞 (PITX2) 系譜を標識可能なレポーターノックイン iPS 細胞の樹立と解析を行った。SEAM 法に基づく眼表面上皮、神経堤系列への分化培養を行い、蛍光顕微鏡による観察ならびに FACS による目的細胞の単離、解析を行った。

・SEAM の RNA-seq 解析

SEAM に出現する各細胞領域を顕微鏡下で物理的に分離し (中央、中間、周辺部) 回収した total RNA を用いて RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。各眼細胞領域における分化マーカー、サイトカインならびに YAP/TAZ シグナルや ECM に関連する遺伝子発現について調

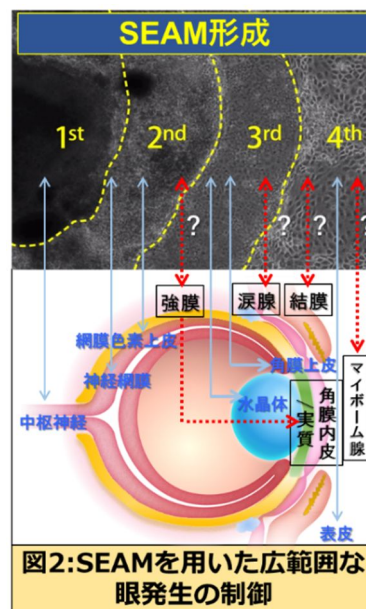


図2: SEAMを用いた広範囲な眼発生の制御

査する

べた。

・SEAM を用いた眼細胞分化の誘導

上述のレポーター iPS 細胞を用いた解析や RNA-seq の結果に基づき、これまでに誘導が困難であった細胞種について培養条件を最適化しその誘導を試みた。特に結膜上皮、涙腺、眼神経堤等を中心に検討を行った。

4. 研究成果

・レポーターノックイン iPS 細胞を用いた解析

初めに、以前に作製した上皮細胞系譜のマーカーである TP63 に対して EGFP レポーター遺伝子をノックインした iPS 細胞株 (TP63-EGFP KI iPS 細胞株) を用いた解析を行った (Kobayashi Y, Hayashi R, *et al. Stem Cell Res* 2020)。本レポーターノックイン iPS 細胞株を用いた SEAM 培養を行い、様々な培養条件において初期眼表面上皮発生について調べたところ、BMP4 の添加および WNT 阻害によりその誘導効

率が有意に増加し、BMP 阻害、TGFB 阻害、WNT 活性化、レチノイン酸により有意に減少することが明らかとなった (図 3)。レチノイン酸は上皮細胞の分化自体は促進するものの、眼表面上皮の誘導においてはむしろ抑制因子として寄与することも明らかとなった。さらに、BMP 活性化と WNT 阻害により相乗的に眼表面上皮細胞の誘導が促進されることを明らかとした。そこで WNT 阻害分子の遺伝子発現について SEAM 内の各領域における発現を調べたところ、SFRP2 および DKK1 が主要な WNT 阻害分子として主に神経や網膜領域 (コロニー中央から中間部) において高発現していた。実際にこれらの分子が眼表面上皮発生に寄与するかについてそれぞれの分子に対する中和抗体を用いた SEAM 誘導実験を行ったところ、各中和抗体の添加により、上皮系細胞の誘導が有意に抑制されることを明らかとした (図 4)。またこの初期 SEAM においてインテグリン結合に寄与するラミニン鎖のアイソフォーム発現 (1-5) を調べたところ、全てのアイソフォームは上皮細胞が誘導される周辺部で高く、中央部で低い発現を示した。以上のヒト眼発生のモデル SEAM を用いた実験結果より、ヒト眼発生においては、神経外胚葉より分泌される SFRP2/DKK1 等の WNT 阻害分子ならびに表皮外胚葉より分泌される BMP やラミニンにより上皮/神経分化が調節されていることが示された。

次に眼発生における神経堤分化を調べるために同様に眼神経堤マーカーである PITX2 にレポーター遺伝子をノックインした iPS 細胞株 (PITX2-EGFP KI iPS 細胞株) の樹立を試みた (Okubo T, Hayashi R *et al. J. Biol. Chem.* 2020)。スクリーニングの結果、PITX2 遺伝子に正確な部位に 2A ペプチドを介して EGFP が導入されたレポーター iPS 細胞株 (クローン 8-2) を得ることに成功した。樹立したヒト iPS 細胞株は正常な多能性幹細胞同様に多能性マーカーの発現と多分化能を有していることを確

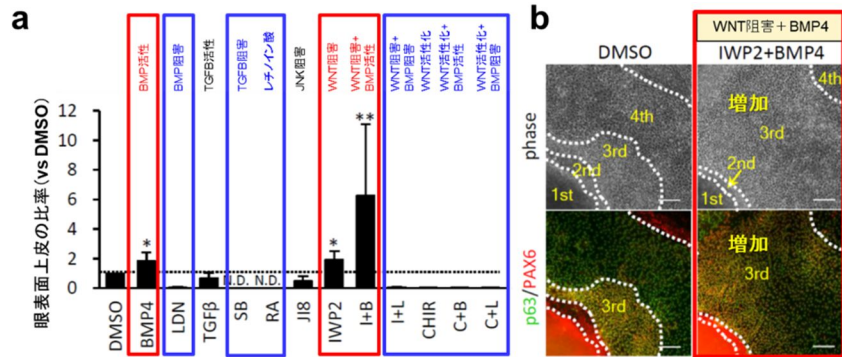


図 3. SEAM 誘導における阻害剤等の眼表面上皮発生に対する影響
a: 各種阻害剤を添加し、眼表面上皮の誘導比率 (LDN(L):BMP 阻害, SB: TGFB 阻害, RA: レチノイン酸, Ji8: JNK 阻害, IWP2(I): WNT 阻害, CHIR: WNT 活性化)
b: WNT 阻害剤 (IWP2) と BMP4 を添加した SEAM における眼表面上皮 (PAX6+/TP63+)

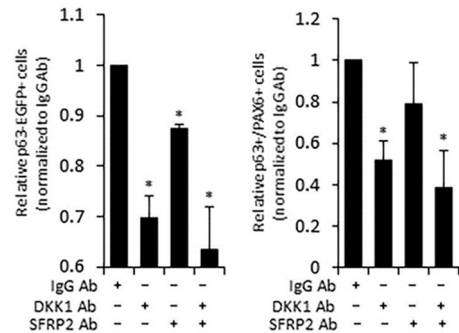


図 4. DKK1, SFRP2 中和抗体による眼表面上皮分化の抑制

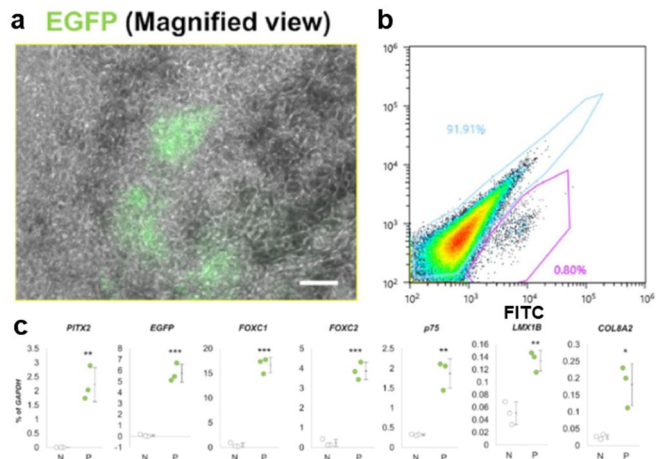


図 5. SEAM 法による眼神経堤細胞の分化誘導
a, b: 分化誘導後のレポーター遺伝子ノックイン iPS 細胞の顕微鏡観察と FACS 解析
c: FACS で単離した EGFP 陽性細胞の眼周囲神経堤マーカーの遺伝子発現

認した。次に眼神経堤細胞の誘導について検討を行ったところ、既存の神経堤分化で 사용되는 BMP と WNT 活性化による誘導法により P1XT2 陽性細胞が誘導され、FACS により EGFP 陽性細胞として単離することが可能であった。しかし FACS により単離した P1XT2 陽性細胞の遺伝子発現を調べたところ、P1TX2, EGFP の発現は見られたものの、眼周囲神経堤マーカーである FOXC2, p75, LMX2 の発現は認められなかった。一方で、SEAM 法をベースとした分化誘導法を実施した場合においては、約 2 週間で SEAM の 2 番目の領域 (zone-2) に EGFP 陽性細胞が出現し、それらを FACS で単離し、遺伝子発現マーカーを調べたところ、EGFP 陽性細胞において P1TX2, EGFP, FOXC1 に加えて、FOXC2, p75, LMX2, TFAP2B が発現していた。さらに興味深いことに、この細胞集団には角膜内皮等の眼周囲神経堤由来組織の分化マーカーである COL8A1, COL8A2 も発現していた (図 5)。以上の結果より、ヒト眼神経堤発生を可視化可能なノックイン iPS 細胞の樹立に成功し、眼神経堤の発生は一般的な神経堤の誘導因子である WNT や BMP 活性とは異なる機序が関与していることが示唆された。

・結膜上皮細胞の誘導

上述のように初期眼表面上皮の誘導機構を明らかにしてきたが、発生学的には眼表面上皮はさらに分岐し、角膜上皮、結膜上皮、涙腺に分化すると考えられている。しかし、これらの発生分岐機構は不明であった。我々は SEAM を用いた培養系を用いることで、KGF (FGF7) が濃度依存的に眼表面上皮から角膜上皮分化を促進することを見出した。一方で、この KGF 添加により分化誘導系においては実質的に結膜上皮細胞が誘導されなかったことから、我々は結膜上皮分化に寄与する因子について探索を行った。その結果、結膜上皮 (前駆) 細胞の誘導においては、EGF や TGFA など EGFR シグナルの活性化因子が重要であることを見出した (Nomi K, Hayashi R *et al. Cell Rep.* 2021)。

SEAM において角結膜上皮の分岐が発生しうると考えられる分化 4 週の時点で KGF の代わりに EGF を添加することで、KRT12 陽性の角膜上皮細胞の分化が抑制され、推定結膜上皮前駆細胞画分 (SSEA4 弱陽性, ITGB4 陽性) においてコロニー形成細胞が認められた。これらの細胞を単離し、EGF もしくは KGF を用いて成熟分化培養を行ったところ、KGF を添加した場合

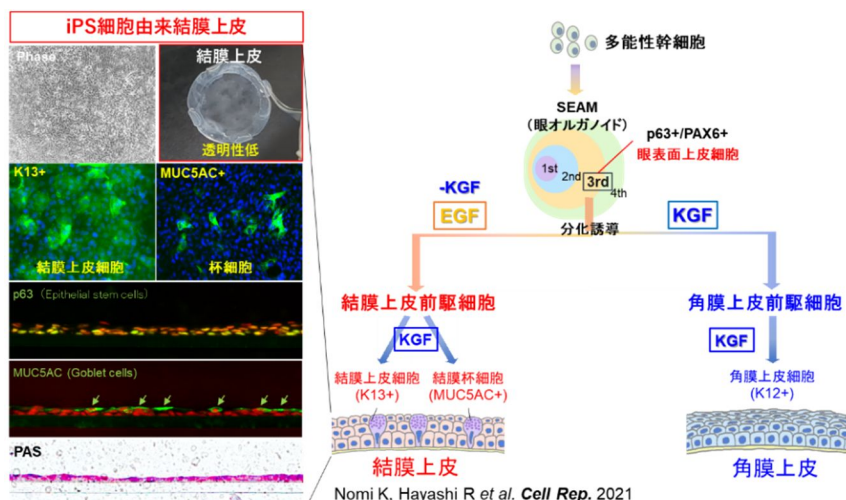


図 6. ヒト多能性幹細胞からの結膜上皮, 結膜杯細胞への分化誘導

のみ結膜上皮細胞に加えて MUC5AC 陽性の結膜杯細胞が誘導された。つまり、眼表面上皮からの結膜上皮前駆細胞誘導に EGF が、前駆細胞から分化細胞である杯細胞への分化には KGF が必要であることが初めて示された (図 6)。以上の結果より、ヒト眼発生モデルにおいて、眼表面上皮からの角膜と結膜系列への分岐に KGF/EGF シグナルが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

・涙腺オルガノイドの分化誘導

涙腺は角結膜と同様に眼表面上皮に由来すると考えられているが、その分岐機構についての詳細は不明である。しかし組織学的には結膜上皮の派生物とみることが出来ることから、上述の SEAM による結膜上皮分化誘導を検討したところ、涙腺やその原基の発生を確認することが出来なかった。そこで、涙腺分化誘導について検討を行ったところ、角膜上皮の分化に使用する KGF を添加した場合に、SEAM の眼表面上皮領域 (zone-3) において腺様の細胞クラスターが出現することを確認した (Hayashi R *et al. Nature* 2022, 図 7)。この腺様細胞クラスターを免疫染色したところ、涙腺マーカーである PAX6, SOX9 を発現しており、さらにこれらの細胞クラスターを顕微鏡下で単



図 7. ヒト iPS 細胞からの涙腺原基の単離とマトリゲル内 3D 培養

離し、マトリゲル内において EGF, Y-27632 存在下で 3 次元培養することで budding, branching を生じ、涙腺様組織の形態を示すことが分かった。作製した腺様組織について免疫染色を行ったところ、PAX6, SOX9, AQP5 等の涙腺マーカーを発現し、フォスコリン刺激

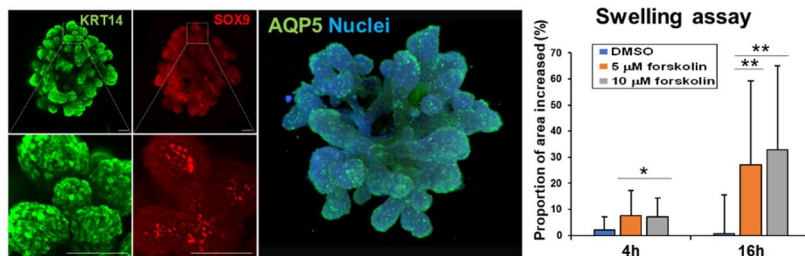


図 8. ヒト iPS 細胞由来涙腺オルガノイドの特性解析
 左：KRT14, SOX9, AQP5 の免疫染色 LightSheet 顕微鏡観察
 右：フォスコリン刺激による swelling assay

による swelling assay の結果、swelling が生じたことから、このオルガノイドは一定の機能を有する“涙腺オルガノイド”であると考えられた(図 8)。次にこの SEAM 内の涙腺前駆細胞の特定のために FACS を行ったところ、角膜上皮前駆細胞と同じ画分(CD200 陰性, ITGB4 陽性, SSEA4 陽性)に存在することが

明らかとなった。さらに単離した前駆細胞を低密度で培養したところ、形態的に大別してドーム型とフラット型の 2 種類のコロニーが形成され、培養時間の経過とともにフラット型に移行していくが、ドーム型コロニーでのみ涙腺オルガノイドを誘導可能で、フラット型は角膜上皮細胞へ分化することが明らかとなった。さらにそれぞれのコロニーについて RNA-seq を行ったところ、フラット型では CTGF, CYR61 等の YAP 下流遺伝子が高発現しており、ドーム型では BARX2 や SOX9 などの腺発生に関する転写因子を高発現していた。BARX2 については、その遺伝子発現のノックダウンにより涙腺オルガノイド形成能

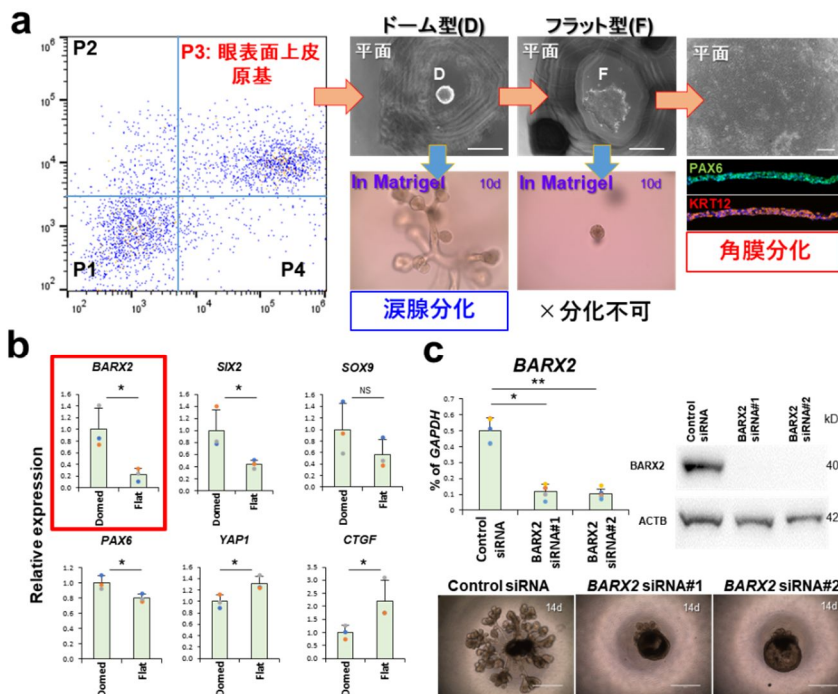


図 9. クローナルアッセイによる眼表面上皮原基の特性解析
 a: FACS で単離した眼表面上皮原基の低密度クローナル培養によるドーム, フラット型コロニーの形成と角膜, 涙腺への分化誘導
 b: ドーム, フラット型コロニーの RNA-seq 解析
 c: BARX2 の siRNA によるノックダウンと涙腺分化への影響

が著しく低下することを明らかにした(図 9)。このことから、FACS 単離時においては、BARX2 陽性で角膜上皮、涙腺への多分化能を有する角膜涙腺原基(ドーム型)が存在しているが、平面培養の継続により涙腺分化能は失われ角膜上皮前駆細胞(フラット型)へと分化していくと考えられた。以上の結果より、涙腺は眼表面上皮系列の中でも角膜上皮と同じ原基より発生すると考えられ、その分岐においては足場依存的な平面環境による YAP 活性化が角膜上皮方向に、足場依存性が低下する 3 次元環境においては YAP シグナルの活性が低下し、涙腺への分化が促進されると考えられた。このことは、実際の *in vivo* 眼発生において涙腺発生が角膜周辺部における陥入により開始されること、角膜上皮は角膜実質上の平面環境に維持されることと良く関連していると推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Shiraki N, Maruyama K, Hayashi R, Oguchi A, Murakawa Y, Katayama T, Takigawa T, Sakimoto S, Quantock AJ, Tsujikawa M, Nishida K.	4. 巻 17(2)
2. 論文標題 PAX6-positive microglia evolve locally in hiPSC-derived ocular organoids.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 221-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.12.009.	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 該当する
1. 著者名 Watanabe S, Hayashi R, Sasamoto Y, Tsujikawa M, Ksander BR, Frank MH, Quantock AJ, Frank NY, Nishida K.	4. 巻 24(6)
2. 論文標題 Human iPSC cells engender corneal epithelial stem cells with holoclone-forming capabilities.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102688	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 該当する
1. 著者名 Nomi K, Hayashi R, Ishikawa Y, Kobayashi Y, Katayama T, Quantock AJ, and Nishida K	4. 巻 34
2. 論文標題 Generation of functional conjunctival epithelium, including goblet cells, from human iPSCs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 108715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108715	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 該当する
1. 著者名 Ashworth S, Harrington J, Hammond G.M., Bains K.K, Koudouna E, Hayes A. J., Ralphs J.R., Regini J.W., Young R.D, Hayashi R, Nishida K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Chondroitin Sulfate as a Potential Modulator of the Stem Cell Niche in Cornea.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.567358	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 該当する

1. 著者名 Hashikawa Y, Hayashi R, Tajima M, Okubo T, Azuma S, Kuwamura M, Takai N, Osada Y, Kunihiro Y, Mashimo T, Nishida K.	4. 巻 19;10(1)
2. 論文標題 Generation of knockout rabbits with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using CRISPR/Cas9.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 9957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66780-6.	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 -

1. 著者名 Kobayashi Y, Hayashi R, Shibata S, Quantock AJ, Nishida K.	4. 巻 46
2. 論文標題 Ocular Surface Ectoderm Instigated by WNT inhibition and BMP4.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Res.	6. 最初と最後の頁 101868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101868.	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 該当する

1. 著者名 Shibata S, Hayashi R, Kudo Y, Okubo T, Imaizumi T, Katayama T, Ishikawa Y, Kobayashi Y, Toga J, Taniguchi Y, Honma Y, Sekiguchi K, Nishida K.	4. 巻 14;14(4)
2. 論文標題 Cell-Type-Specific Adhesiveness and Proliferation Propensity on Laminin Isoforms Enable Purification of iPSC-Derived Corneal Epithelium.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 663-676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.02.008.	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 該当する

1. 著者名 Toru Okubo, Hayashi R, Yuji Kudo, Ishikawa Y, and Quantock A.	4. 巻 NA
2. 論文標題 Fabrication of three-dimensional lacrimal gland-like tissue organoids from human pluripotent stem cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Procol exchange	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21203/rs.3.pex-1821/v1	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Hayashi R, Okubo T, Kudo Y, Ishikawa Y, Imaizumi T, Suzuki K, Shibata S, Katayama T, Park SJ, Young RD, Quantock AJ, Nishida K.	4. 巻 605(7908)
2. 論文標題 Generation of 3D lacrimal gland organoids from human pluripotent stem cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 126-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-04613-4.	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 該当する

1. 著者名 Yoshinaga Y, Soma T, Azuma S, Maruyama K, Hashikawa Y, Katayama T, Sasamoto Y, Takayanagi H, Hosen N, Shiina T, Ogasawara K, Hayashi R, Nishida K.	4. 巻 12;17(7)
2. 論文標題 Long-term survival in non-human primates of stem cell-derived, MHC-unmatched corneal epithelial cell sheets.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 1714-1729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2022.05.018.	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 -

1. 著者名 Kitao M, Hayashi R, Nomi K, Kobayashi R, Katayama T, Takayanagi H, Oguchi A, Murakawa Y, Nishida K.	4. 巻 5;26(7)
2. 論文標題 Identification of BST2 as a conjunctival epithelial stem/progenitor cell marker.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.107016.	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 -

1. 著者名 Imaizumi T, Hayashi R, Kudo Y, Li X, Yamaguchi K, Shibata S, Okubo T, Ishii T, Honma Y, Nishida K	4. 巻 11;13(1)
2. 論文標題 Ocular instillation of conditioned medium from mesenchymal stem cells is effective for dry eye syndrome by improving corneal barrier function.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-40136-2	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27件（うち招待講演 26件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 iPS細胞とオルガノイド技術を用いた眼の再生医療研究
3. 学会等名 東北眼疾患病態研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞由来オルガノイドを用いた眼再生医療技術の開発
3. 学会等名 浜松医科大学先端医学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryuhei Hayashi
2. 発表標題 Effect of substrate properties on stem cell differentiation for ocular regeneration
3. 学会等名 The 3rd Monash University Osaka University Joint Symposium on Advanced Biomedical Sciences（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた眼オルガノイドの作製と再生医療への応用
3. 学会等名 日本病理学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuhei Hayashi
2. 発表標題 Co-ordinated generation of multiple ocular cells from human PSCs and its application to corneal regenerative medicine
3. 学会等名 The European Society of Cataract and Refractive Surgeons (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 能美君人, 林 竜平ら
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からの杯細胞を含有する機能的結膜上皮の作製
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた角結膜細胞の分化誘導
3. 学会等名 日本眼科学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 眼オルガノイドを用いた前眼部再生医療技術の開発
3. 学会等名 日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 iPS 細胞からの眼オルガノイド誘導と角膜再生医療への利用
3. 学会等名 眼薬理学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuhei Hayashi
2. 発表標題 Co-ordinated generation of multiple ocular cell lineages from pluripotent stem cells and its application to cornea regenerative medicine
3. 学会等名 Monash University and Osaka University Joint Symposium on Advanced Biomedical Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞を用いた眼発生モデルの確立と再生医療への応用
3. 学会等名 東北大学医学部眼科同窓会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 ラミニンA1ソフォームを用いた眼細胞分化制御と再生医療への応用
3. 学会等名 日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞由来オルガノイドを用いた眼再生医療技術の開発
3. 学会等名 幹細胞シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞由来オルガノイドによる眼の再生医療
3. 学会等名 関西ライフサイエンス・リーディングサイエンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 iPS細胞を用いた3次元涙腺オルガノイドの作製
3. 学会等名 日本臨床眼科学会イブニングセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞由来オルガノイドを用いた眼表面の再生医療
3. 学会等名 日本臨床眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた涙腺オルガノイドの作製
3. 学会等名 ドライアイ研究会主催講習会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来オルガノイドを用いた眼の再生医療
3. 学会等名 自己抗体と自己免疫疾患シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 iPS細胞を用いた角膜の再生医療
3. 学会等名 日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 iPS細胞を用いた角膜再生治療法の開発
3. 学会等名 日本医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 iPS細胞由来オルガノイドを用いた眼の再生医療
3. 学会等名 長崎障害者支援再生医療研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 眼科領域における多能性幹細胞の分化誘導技術とその応用～iPS細胞由来オルガノイドを用いた眼の再生医療～
3. 学会等名 日本消化器学会 第4回再生医療研究推進委員会セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞由来オルガノイド作製と眼の再生医療への利用
3. 学会等名 第11回わかもと先進眼科医療研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 多能性幹細胞由来オルガノイドを用いた眼の再生治療法の開発
3. 学会等名 Emergence Conference 神戸大学ディカルトランスフォーメーション研究センターワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 林 竜平
2. 発表標題 オルガノイドを用いた前眼部再生医療技術の開発
3. 学会等名 日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計10件

1. 著者名 林 竜平	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本再生医療学会	5. 総ページ数 6
3. 書名 再生医療	

1. 著者名 林 竜平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本眼薬理学会	5. 総ページ数 6
3. 書名 眼薬理	

1. 著者名 林 竜平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 4
3. 書名 角膜クリニック 第3版	

1. 著者名 林 竜平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本医学出版	5. 総ページ数 4
3. 書名 先進医療NAVIGATER再生医療・細胞医療研究の新展開	

1. 著者名 林 竜平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 5
3. 書名 Bio Clinica	

1. 著者名 林 竜平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 4
3. 書名 再生医療	

1. 著者名 Ryuhei HAYASHI	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本薬学会	5. 総ページ数 6
3. 書名 YAKUGAKU ZASSI	

1. 著者名 大久保徹、石川幸、林 竜平	4. 発行年 2023年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科	

1. 著者名 林 竜平	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 実験医学	

1. 著者名 大久保徹、石川幸、林 竜平	4. 発行年 2023年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 Medical Science Digest	

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学医学系研究科幹細胞応用医学HP
<http://www.stemed.med.osaka-u.ac.jp/>

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
研究分担者	関口 清俊 (Sekiguchi Kiyotoshi) (50187845)	大阪大学・蛋白質研究所・寄附研究部門教授 (14401)	

	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	小林 由紀 (Kobayashi Yuki)	大阪大学 (14401)	
研究協力者	石川 幸 (Ishikawa Yuki)	大阪大学 (14401)	
研究協力者	大久保 徹 (Okubo Toru)	大阪大学 (14401)	
研究協力者	能美 君人 (Nomi Kimihito)	大阪大学 (14401)	
研究協力者	柴田 峻 (Shibata Shun)	大阪大学 (14401)	
研究協力者	片山 朋彦 (Katayama Tomohiko)	大阪大学 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------