

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09708

研究課題名(和文)角膜オルガノイドにおける上皮幹細胞ニッチの構築と解析

研究課題名(英文)Construction and analysis of limbal niche in the corneal organoids

研究代表者

比嘉 一成(Higa, Kazunari)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60398782

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)：ヒト角膜上皮の幹細胞はこれまでに角膜中央部で幹細胞に匹敵する細胞の存在は報告されておらず、角膜周辺の輪部に限局し、角膜へ上皮を供給していると考えられる。本研究では角膜中央部の上皮でも角膜上皮再生の細胞源として有用であるか検討するため、角膜中央部からオルガノイドを作成し、ウサギ角膜輪部機能不全モデルへ移植を試みた。角膜からでも輪部オルガノイドに類似した未分化性と増殖性を維持したオルガノイドを形成することがわかった。また、角膜中央部から作成したオルガノイドを輪部機能不全モデルへ移植したところ、角膜へ上皮を供給可能であることから、角膜上皮再生の細胞源として有用である可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに申請者が確立してきた角膜輪部オルガノイド培養法は他の上皮細胞分離法に比べ細胞周囲の環境を崩さずに採取可能であり、幹細胞-ニッチの環境を維持しながら長期に培養が可能であることがわかってきた。本研究では、これまで積み重ねてきた我々の培養技術を応用し、分化した角膜上皮細胞から幹細胞-ニッチを新たに構築可能な角膜オルガノイドの作成法を確立することができた。これは、輪部機能不全を伴った難治性の疾患に対する角膜上皮幹細胞の新たな細胞供給源として期待されるだけでなく、輪部機能で重要な幹細胞ニッチの供給源としても期待される。

研究成果の概要(英文)：Human corneal epithelial stem cells are thought to be localized in the limbus around the cornea, forming the corneal epithelium. However, human corneal epithelial stem cells have not been reported to exist in the central cornea. In this study, to investigate the usefulness of the central corneal epithelium as a cell source for corneal epithelial regeneration, we prepared organoids from the central cornea and transplanted them into a rabbit limbal deficiency model. Corneal organoids that maintained undifferentiated and proliferative properties similar to those of limbal organoids were formed. Furthermore, when organoids prepared from the central cornea were transplanted into a limbal dysfunction model, the epithelium of the transplanted organoids were continuously observed from the organoid transplantation site to the cornea. These cells could be supplied to the cornea to form the epithelium, suggesting that they may be useful as a cell source for corneal epithelial regeneration.

研究分野：眼科学

キーワード：オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

直接外界に接する唯一透明な角膜は、外界から網膜へ光を届ける最初の重要な組織であり、角膜の透明性が失われると視力の低下を起こす。スティーブンス・ジョンソン症候群やシェーグレン症候群など角膜上皮障害による疾患は、角膜周辺部の輪部に存在する角膜上皮の幹細胞が障害を受け、角膜への角膜上皮の供給ができなくなることにより発症する。この角膜輪部機能の破綻(輪部機能不全)により、周辺から透明性の低い結膜や線維芽組織などの角膜への侵入によって透明性が失われる。このような輪部機能不全を伴った疾患に対し、角膜上皮の幹細胞が存在する輪部の移植やその培養上皮シートの移植が行われてきたが、これらに使用する組織は片眼性の疾患の場合、正常の反対眼の限られた輪部組織を使うことになり、リスクを伴う。また、両眼性の疾患の場合には、ドナー角膜輪部を用いることも可能であるが、拒絶反応などのリスクを伴うため、角膜上皮の代わりに自己の口腔粘膜を用いた培養上皮シートの移植も行われてきた。このように角膜の難治性疾患に対する様々な研究や移植が行われてきたが、必要な時にすぐに移植が行えるものではなく、患者がこれらの治療を受けられるのは限定的で、新たな角膜の再生法の確立が必要である。

角膜上皮の恒常性を維持するためには角膜上皮幹細胞を維持することが重要である。幹細胞は自己複製能を保ちながら、細胞を特定の組織へ長期にわたり供給し、臓器組織の恒常性を維持している。その幹細胞の周りには幹細胞を維持するための環境(ニッチ)が備わっており(Zhang, Nature 2003; Tumber, Science 2004; Alvarez-Buylla, Neuron 2004)、この幹細胞ニッチの適切な環境維持が幹細胞の未分化の維持に必須であり、外部環境から幹細胞を保護していると考えられている。必要に応じた患者への供給を行うためには、長期にわたる幹細胞並びにそのニッチの維持・培養法や再構築法を確立することが重要である。

我々はこれまでに、三次元的に自己組織化により形成されるオルガノイドに注目して研究を行ってきた。このオルガノイドは生体内で観察される構造に類似して形成される細胞塊であり、in vitro で観察可能なミニ臓器として近年、創薬や難病研究で研究が進められている。我々は角膜上皮幹細胞とニッチの培養モデルとして、角膜上皮幹細胞が限局して存在する角膜輪部組織の輪部上皮基底層周辺からオルガノイドを作成し、その維持・培養法を確立してきた(Higa, Stem Cell Res 2020)。これにより、輪部機能不全を伴った難治性の疾患に対する上皮細胞供給の拡大が期待されるが、依然としてドナーの角膜上皮幹細胞に依存した供給源であり、さらなる供給拡大を目指すためには幹細胞に依存しない幹細胞-ニッチの構築法を確立する必要がある。最近の我々の実験で、ヒト角膜中央の上皮から輪部オルガノイドに類似した構造を作成できることが分かってきた(図1D,F,I,J)。ヒトの角膜上皮幹細胞とニッチは輪部に限局し角膜上にはほとんど存在しないと考えられているため(図1A-C, 1F-H)、オルガノイド培養環境によって分化した角膜上皮細胞から幹細胞とニッチが新たに作成できている可能性も考えられる。角膜上から作成された角膜オルガノイドの解析が必要である。

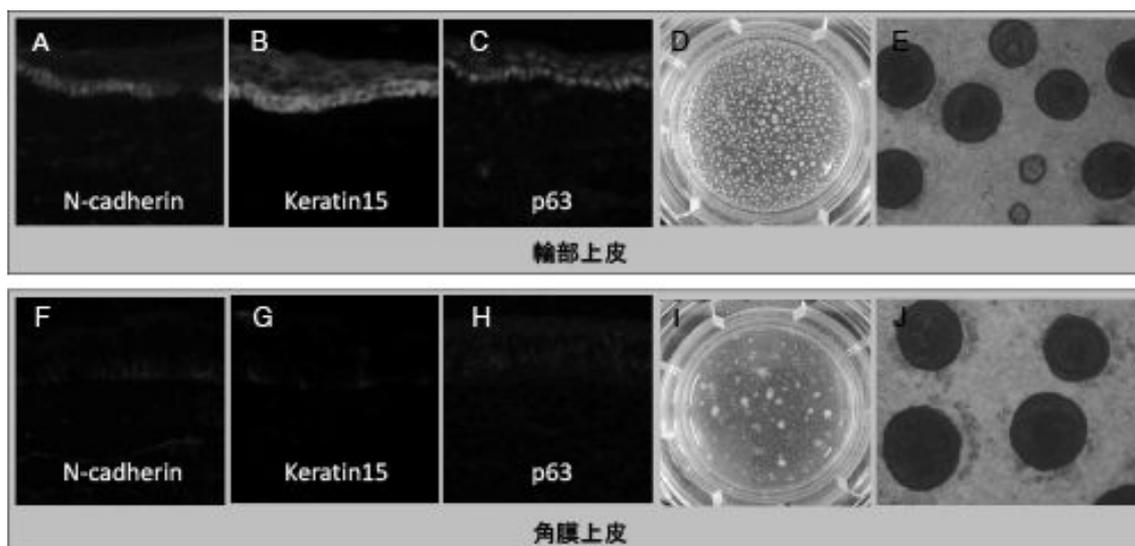


図1 角膜上皮ならびに角膜輪部上皮のフェノタイプとそれぞれのオルガノイドの作成

A-C) 角膜輪部上皮の幹細胞/前駆細胞マーカー(A:N-cadherin, B:Keratin15, C:p63)の免疫染色。特に角膜輪部上皮の基底細胞で強くそれぞれ染色されている。F-H)角膜上皮の N-cadherin(F), Keratin15(G), p63(H) の免疫染色。角膜上皮ではどれも染色されない。D)輪部由来オルガノイドの培養1ヶ月の様子。E)D の顕微鏡写真。I)角膜由来のオルガノイドの培養1ヶ月の様子。J)D の顕微鏡写真。角膜からも輪部に類似した球状のオルガノイドが形成された。

2. 研究の目的

これまでに申請者が確立してきた角膜輪部オルガノイド培養法は他の上皮細胞分離法に比べ細胞周囲の環境を崩さずに採取可能であり、幹細胞-ニッチの環境を維持しながら長期に培養が可能であることを報告してきた。本研究では、これまで積み重ねてきた我々の培養技術を応用し、分化した角膜上皮細胞から幹細胞-ニッチを新たに構築可能な角膜オルガノイドの作成法を確立する。角膜オルガノイドの幹細胞-ニッチのメカニズムを解明できれば、輪部機能不全を伴った難治性の疾患に対する角膜上皮幹細胞の供給源として期待されるだけでなく、輪部機能で重要な幹細胞ニッチの供給源としても期待される。

3. 研究の方法

本研究では、輪部オルガノイド培養環境を参考にして角膜オルガノイドを作成し、その機能解析を行った。

(1) 角膜上の分化した上皮を用いたオルガノイドの維持培養条件の検討

培養条件は輪部オルガノイド培養環境を参考にして角膜オルガノイド培養を行った(図 1A)。

(2) オルガノイドの組織学的解析

作成したオルガノイドを回収し、組織切片を作成する。組織学的解析はヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色ならびに免疫染色にておこなう。免疫染色は角膜輪部基底層で発現する N-cadherin、角膜輪部上皮のフェノタイプを示すケラチン 15 ならびに p63 の抗体を用いて行った。

(3) オルガノイドの増殖能の解析

作成したオルガノイドを経日的に回収し、増殖能について解析する。増殖能の解析は組織学的な解析として培養中に予め取り込ませた BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) の免疫染色で観察する。また、回収したオルガノイドをシングルセルに分離し、コロニー形成能と細胞周期を観察する。コロニー形成能は Rhodamine B 染色にて、細胞周期はフローサイトメトリーを用いた DNA 細胞周期解析をおこなう。

(4) 移植法についての検討

作成したオルガノイドが細胞供給源として適しているか vivo で評価するため、ウサギに輪部機能不全モデルを作成し、オルガノイドの眼表面への移植を行った。培養最終日に、造影剤として使われているフェルカルボトランを用いてラベルを行った。移植はすでに輪部オルガノイドで行っている移植法を参考にした。また、オルガノイドを生着させるために、生体組織接着剤を使用し、移植後の安定を図る工夫を行った。

(5) 移植後の経過観察

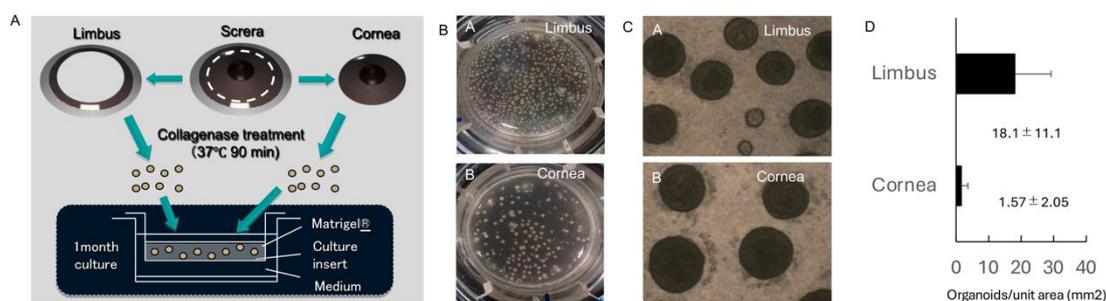
移植後はスリットランプ、フルオレセイン染色等を用いて角膜上皮の経過を観察した。

(6) 移植後の組織学的解析

移植後の組織学的解析を行うため、H.E. 染色ならびに角膜上皮のフェノタイプであるケラチン 12 の免疫染色を行った。また、移植したオルガノイドから上皮が作られたものか判断するためにヒト核に対する抗体で確認した。さらに上皮の基底膜で発現するコラーゲンタイプ IV 並びにラミニンの免疫染色を行った。

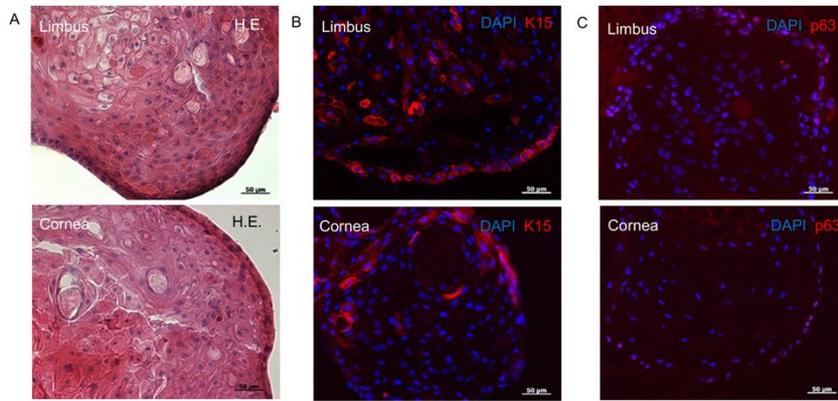
4. 研究成果

培養 1 ヶ月後において、形成数は周辺部に比べかなり少ないが、中央部からでも輪部オルガノイドに類似した細胞塊を形成した(図 1B-D)。



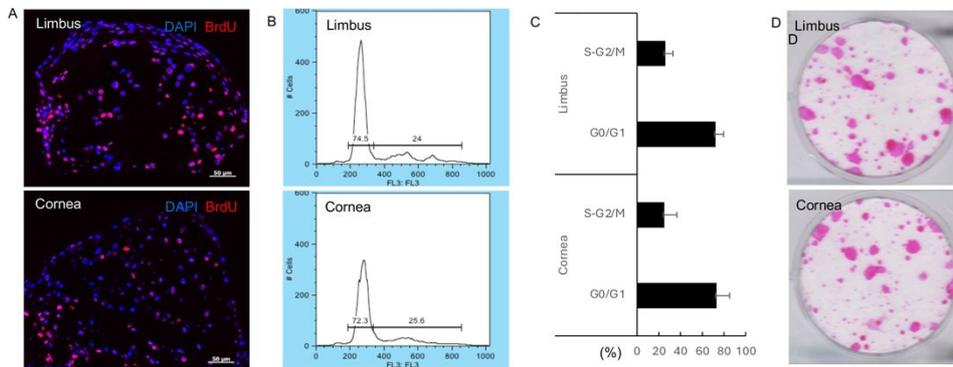
(図 1)オルガノイド培養方法と培養 1 ヶ月後の観察。A)同一の強角膜切片から周辺部(Limbus)と角膜中央部(Cornea)に分けてからコラーゲナーゼ処理を行って、マトリゲル(Matrigel)と角膜輪部上皮維持培地(Medium)で 1 ヶ月間培養した。B)培養 1 ヶ月後の培養写真。C)B)の顕微鏡写真。D)単位面積あたりのオルガノイド形成数。

オルガノイドの組織学的解析において、周辺部の輪部オルガノイドに類似して、角膜中央部でも角膜輪部上皮のフェノタイプを示す K15 並びに p63 の発現が認められた(図 2)。



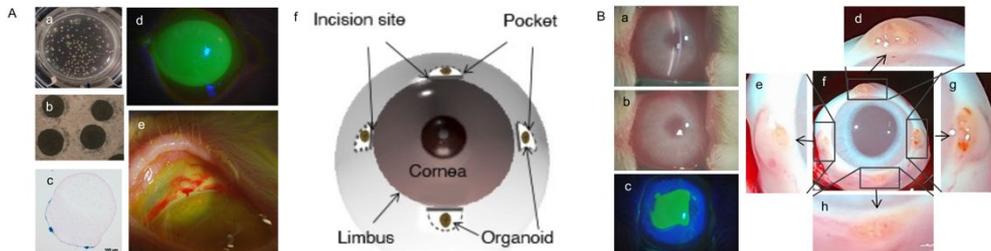
(図 2) 培養 1 ヶ月後のオルガノイドの組織学的解析。A)ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色。B)ケラチン 15 (K15) の免疫染色。C) p63 の免疫染色。B, C) において核染色を DAPI にて行った。上段が角膜周辺部(Limbus)由来オルガノイド。下段が角膜中央部由来(Cornea)由来オルガノイド。

細胞周期において違いは見られず、周辺部の輪部オルガノイドに類似して角膜中央部でも slow cycling cell を示す BrdU 陽性細胞が認められた(図 3 A-C)。また、増殖可能な未分化細胞の一つの指標としてコロニー形成能を観察したところ、周辺部由来と同様に角膜中央部由来からでも同様のコロニー形成能を示した(図 3 D)。



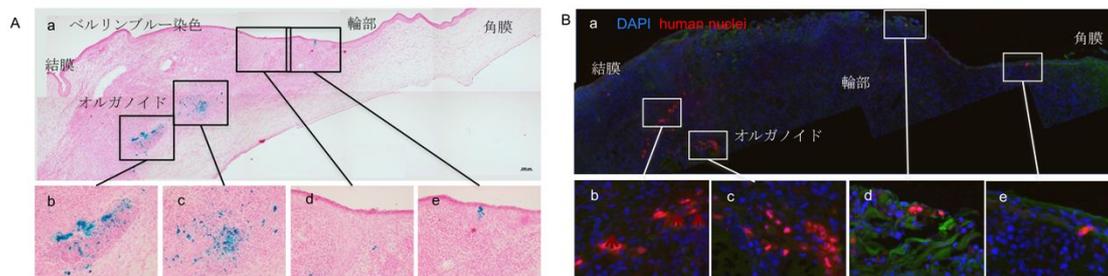
(図 3) オルガノイドにおける未分化性と増殖能の比較。A) Slow-cycling cell を示す BrdU の免疫染色。核染色を DAPI にて行った。B) DNA 細胞周期解析 (左ゲート: G0/G1、右ゲート: S-G2/M)。C) B) をグラフ化したもの (n=5)。D) Rhodamine B 染色によるコロニー形成の比較。

角膜中央部組織から作成した培養 1 ヶ月後のオルガノイド(図 4A-a, b)を輪部機能不全モデルのウサギへ移植を行ったところ(図 4A-d, e, f)、移植 1 週間後においても容易に移植部位を確認することが出来た(図 4B)。



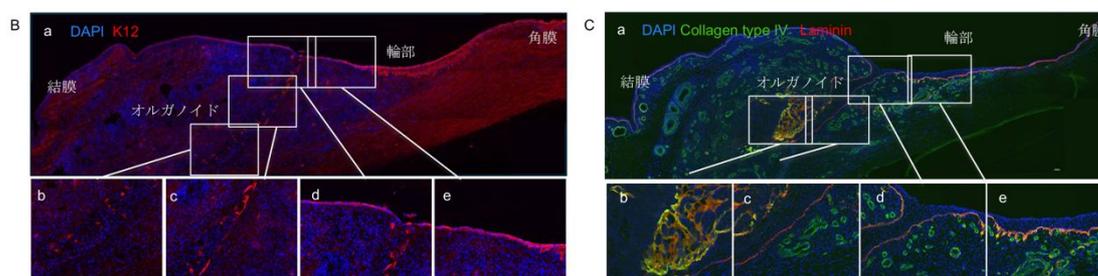
(図 4) ウサギ角膜輪部機能不全モデルへのオルガノイド移植と 1 週間後の観察。A-a, b) 移植前の培養 1 ヶ月後のオルガノイド。A-c) フェルカルボトランをラベルしたオルガノイドのベルリンブルー染色。A-d) ウサギ角膜輪部機能不全モデル作成後のフルオレセイン染色による上皮欠損の確認。A-e) 結膜下に作成したポケットに移植したオルガノイドの写真。A-f) ウサギ角膜表面における移植部位のシエマ。B-a, b, c) オルガノイド移植 1 週間後の眼表面の写真とフルオレセイン染色像。B-d, e, f, g, h) オルガノイド移植 1 週間後の移植部位の写真。

移植1週間後の組織において、移植部位でフェルカルボトランを染色するベルリンブルー陽性の細胞が観察された(図5A)。また、移植部位から連続して上皮が観察され、表層の上皮でもベルリンブルー陽性細胞が観察された(図5A-a,b,c,d,e)。さらに、オルガノイド移植部位から角膜へ上皮が伸展し、オルガノイドならびに表層の上皮で抗ヒト核抗体陽性像(human nuclei)が観察された(図5B)。



(図5)オルガノイド移植1週間後の組織解析。A-a)オルガノイドを移植した周辺部のベルリンブルー染色。A-b,c,d,e)ベルリンブルー陽性部位の拡大写真。B-a)オルガノイドを移植した周辺部の抗ヒト核抗体(human nuclei)の免疫染色。B-b,c,d,e)抗ヒト核抗体(human nuclei)陽性部位の拡大写真。核染色をDAPIにて行った。

角膜上皮で認められる Keratin12 (K12)の発現ならびに上皮の基底膜である Collagen type IVならびに Laminin の発現においてもオルガノイド移植部位から角膜へ連続して観察された(図6A,B)。



(図6)オルガノイド移植1週間後の組織解析。A-a)オルガノイドを移植した周辺部のケラチン12(K12)の免疫染色。A-b,c,d,e)K12陽性部位の拡大写真。B-a)オルガノイドを移植した周辺部のコラーゲンタイプIV(Collagen type IV)とラミニン(Laminin)の免疫染色。B-b,c,d,e)コラーゲンタイプIV(Collagen type IV)とラミニン(Laminin)陽性部位の拡大写真。核染色をDAPIにて行った。

本研究において、ヒト角膜上皮の幹細胞が存在しないと考えられている角膜中央部から、周辺部オルガノイドに類似した細胞塊を形成することができた。これはおそらく、角膜中央部にもオルガノイドを形成できる未分化な細胞が存在している可能性が考えられる。もしくは、培養環境によって角膜中央部の分化した細胞が未分化性を獲得しオルガノイドを形成した可能性も考えられる。これらについて明らかにするためには更なる研究が必要であるが、角膜中央部からでも前駆細胞マーカーを発現する輪部オルガノイド様の細胞塊を作成でき、角膜中央部から作成したオルガノイドは角膜へ上皮を供給可能であることから、角膜上皮再生の細胞源として有用である可能性が考えられた。

<参考文献>

1. Tumber, T.; Guasch, G.; Greco, V.; Blanpain, C.; Lowry, W.E.; Rendl, M.; Fuchs, E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 2004, *303*, 359-363.
2. Alvarez-Buylla, A.; Lim, D.A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 2004, *41*, 683-686.
3. Zhang, J.; Niu, C.; Ye, L.; Huang, H.; He, X.; Tong, W.G.; Ross, J.; Haug, J.; Johnson, T.; Feng, J.Q.; et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003, *425*, 836-841.
4. Higa, K.; Higuchi, J.; Kimoto, R.; Miyashita, H.; Shimazaki, J.; Tsubota, K.; Shimmura, S. Human corneal limbal organoids maintaining limbal stem cell niche function. *Stem Cell Res* 2020, *49*, 102012, doi:10.1016/j.scr.2020.102012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 比嘉一成、木本玲緒奈、樋口順子、西迫宗大、平山雅敏、島崎 潤、榛村重人
2. 発表標題 ヒト角膜由来オルガノイド培養における前駆細胞マーカーの発現
3. 学会等名 角膜カンファランス2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 比嘉一成、木本玲緒奈、樋口順子、西迫宗大、平山雅敏、島崎 潤、榛村重人
2. 発表標題 ヒト角膜中央部分から作成した前駆細胞マーカーを発現する由来オルガノイド
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 比嘉一成、石渡三冬、平山雅敏、山口剛史、榛村重人
2. 発表標題 ウサギ角膜輪部機能不全モデルへのヒト角膜由来オルガノイドの移植
3. 学会等名 角膜カンファランス2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 比嘉一成、石渡三冬、平山雅敏、山口剛史、榛村重人
2. 発表標題 ヒト角膜由来オルガノイドのウサギ角膜輪部機能不全モデルへの移植
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会
4. 発表年 2024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	宮下 英之 (Miyashita Hideyuki)	慶應義塾大学・医学部	
研究協力者	榛村 重人 (Shimmura Shigeto)	慶應義塾大学・医学部	

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
---------	---------