

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592592

研究課題名(和文)口腔粘膜上皮細胞から角膜実質細胞への分化誘導

研究課題名(英文)Differentiation to keratocyte from oral mucosal non-epithelial cells

研究代表者

島崎 潤 (Shimazaki, Jun)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40170930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：神経堤由来細胞の存在が考えられる口腔粘膜組織から口腔粘膜上皮細胞を単離・培養し、角膜実質細胞へ分化誘導法の確立を試みる。口腔粘膜上皮細胞をメチルセルロース法によりシングルセルから培養し神経堤由来因子を含んだクローンを選択し、多分化能を解析した。角膜実質細胞への分化誘導も行った。シングルセルから増殖しCD56, PDGFRαで選んだ細胞群は多分化能を示した。この口腔粘膜上皮細胞は間葉系幹細胞のマーカーを発現する幹細胞であることが示唆された。角膜実質細胞への分化誘導ではケラトカンの発現をわずかではあるが検出することができたことから、角膜実質再生の細胞ソースとして有用であることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：To establish method of differentiation into keratocyte from oral mucosal non-epithelial cells. Oral mucosal non-epithelial cells were isolated from oral mucosal tissues, cultured with methyl cellulose from single cell, and analyzed ability of multi-differentiation to mesenchymal cells, neural cells, or keratocytes. Oral mucosal non-epithelial cells were estimated the expression of mesenchymal stem cell markers. Oral mucosal non-epithelial cells selected neural crest marker, CD56 and PDGFRα, were differentiated into osteoblasts, adipocytes, chondrocytes, or neural cells. Keratocan, a marker of keratocytes, were detected in oral mucosal non-epithelial cells expressed mesenchymal stem cells markers. These data suggested that oral mucosal non-epithelial cells would be expected to a potential cell source for regeneration of corneal stroma.

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：口腔粘膜 間葉系幹細胞 神経堤細胞 角膜実質 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

炎症や外傷により障害された角膜の実質は透明性を失い、これを回復させるのは難しい。角膜実質の再生の研究はコラーゲンをベースにした人工角膜等が報告されるようになったが、現状ではドナー角膜に頼った角膜移植を行っている (Merrett, IOVS, 2008)。また、日本においてはドナーが不足し、海外ドナーに頼ることが多いのも事実である。一方、近年角膜の実質中には多分化能を有した幹細胞の存在することが報告された (Yoshida, Stem cells, 2006)。しかし、日本のドナー角膜は移植以外で使用出来ないこと、両眼性の疾患の場合はもちろんであるが、片眼性の疾患であっても自己の限られた角膜から幹細胞を増やすことは難しい等、課題が多いのも現状であり、新しいアプローチが必要である。そこで我々が注目したのは、再生能力が高いとされる口腔粘膜組織である。口腔粘膜上皮を角膜上皮再生の細胞ソースとした培養上皮シート移植は、我々も含めていくつかの施設で行われてきたが (Nakamura, IOVS, 2003, Nishida, N Engl J Med 2004, Satake, Arch Ophthalmol, 2008)、上皮組織についてはほとんど研究されていなかった。各組織にはその組織に必要な細胞を供給する細胞源となるものが存在し、恒常性を維持するために必須であると考えられる。近年、皮膚、脂肪、歯髄など様々な組織で間葉系幹細胞の存在が明らかになっており (J.G. Toma, Nat Cell Biol, 2001; S. Gronthos, J Cell Physiol, 2001; S. Gronthos, Proc Natl Acad Sci USA, 2000)、口腔粘膜組織にもこの間葉系幹細胞が存在しているものと推測される。

これまでに我々は口腔粘膜上皮組織から間葉系幹細胞に類似した細胞を分離しており、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、への分化誘導も行っている (投稿中)。また、興味深いことにこれらの細胞群には神経堤由来の細胞が含まれている可能性が高い (図1)。これは神経堤由来の細胞を含んでいる角膜実質と

図1 a

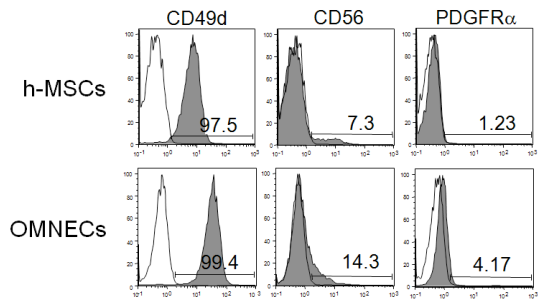


図1 b

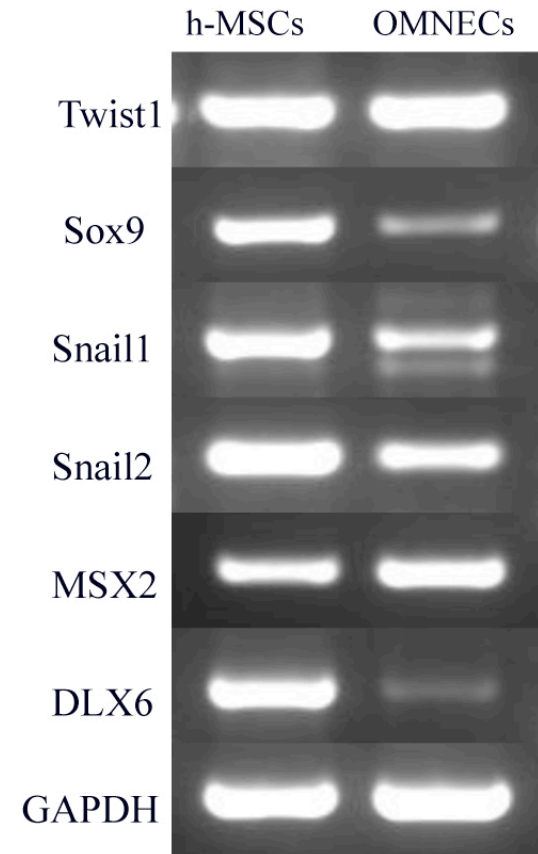
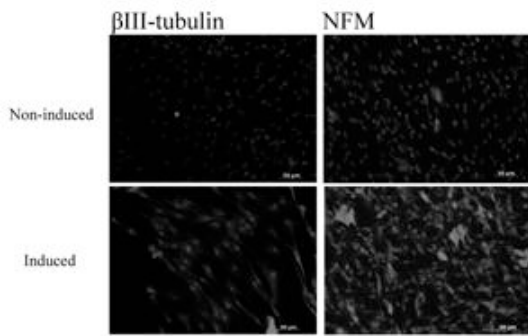


図1 神経堤由来細胞で発現する分子の発現 (a:FCM データ(%), b:RT-PCR)、h-MSCs (骨髄由来間葉系幹細胞)、OMNECs (口腔粘膜上皮細胞)神経堤由来細胞で発現する分子 (CD49d、CD56、PDGFRα、Twist1、Sox9、Snail1、Snail2)外胚葉系間様組織で発現する分子 (MSX2、DLX6)、内因性コントロール (GAPDH)

類似していることが解ってきた。また、神経細胞への分化誘導を行ったところ、βIII-tubulin やNeurofilament の発現が観察された (図2)。さらに、角膜実質細胞維持培



地で口腔粘膜上皮由来の細胞を培養するとケラトカンの発現が見られた（図3）。

図2 神経細胞で発現する分子。  
Non-induced (分化誘導前)、  
Induced (分化誘導後)

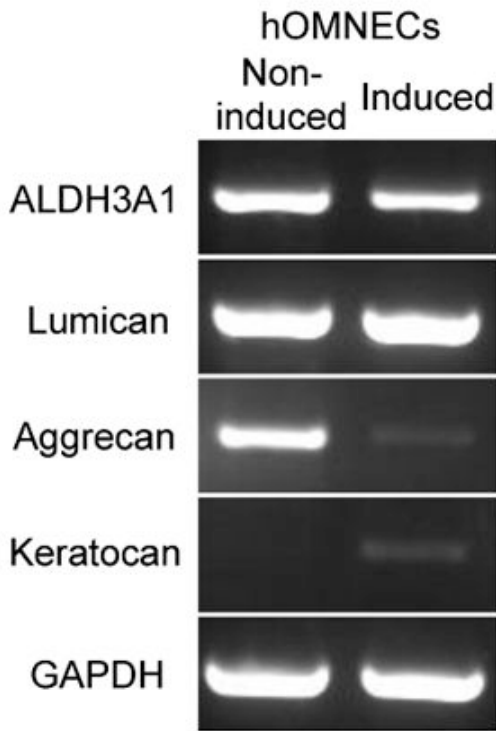


図3 角膜実質細胞で発現する分子の発現。Non-induced(分化誘導前)、  
Induced(角膜実質細胞維持培地培養後)

これらのことから、口腔粘膜上皮組織には角膜実質再生への細胞供給源となりうる細胞が存在する可能性が考えられる。そこで自己口腔粘膜を用いた角膜実質再生への応用の可能性を探るため、口腔粘膜上皮細胞から神経堤由来の細胞を抽出し角膜実質細胞への分化誘導法を確立することを立案した。

## 2. 研究の目的

角膜実質細胞は神経堤由来の細胞であることから、神経堤由来の細胞から角膜実質細胞へ分化させることが好ましいと考えられる。また、口腔粘膜周辺組織には神経堤由来組織が多く存在しており、口腔粘膜上皮組織にも神経堤由来の細胞が存在している可能性が考えられる。そこで、本研究ではまず、口腔粘膜上皮細胞から神経堤由来の細胞を分離し、多分化能を有する細胞の培養を試みる。次に、口腔粘膜上皮細胞から角膜実質細胞へ分化誘導を行って、最終的には角膜実質細胞の代替となりうる細胞への分化誘導法を確立したい。

## 3. 研究の方法

### 口腔粘膜上皮細胞の分離培養

ヒト口腔粘膜採取には、当院眼科に来院し、口腔粘膜培養シート移植治療が必要と判断された患者の中で、当院倫理委員会の規定に基づき同意を得たものを使用する。ヒト口腔粘膜の採取は局所麻酔下、頬粘膜から8mmパンチを用いて採取し、酵素処理により上皮と上皮組織に分離する。上皮組織より細胞を抽出する（図4）。

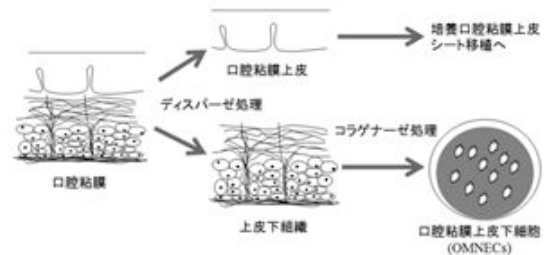


図4.口腔粘膜上皮組織から細胞の分離方法。

間葉系幹細胞はストレス条件下において耐性で、濃縮することで効率良く分離出来ることが報告されている(Kuroda, PNAS, 2010)。我々も口腔粘膜上皮組織から細胞を抽出する際、より高率に幹細胞を分離するため、酵素的ストレス、低酸素的ストレス、不栄養性ストレ

ス等を組み合わせて多分化能を持った間葉系幹細胞の分離を行う。

#### 神経堤由来細胞の分離・培養

間葉系幹細胞のなかでも高い多分化能を持った幹細胞は皮膚のバルジ領域や乳歯の歯髄に存在する幹細胞のように神経堤由来の要素を持っている (Sieber-Blum, Dev Dyn, 2004; Degistirici, Tissue Eng Part A, 2008)。そこで、我々は口腔粘膜上皮下組織から分離した細胞から神経堤由来の細胞の分離を行う。まず、上記で分離してきた口腔粘膜上皮下細胞を限界希釈法を用いてSingle cell 培養を行う。クローン増殖してきた細胞をランダムに選び、神経堤由来細胞の解析のために増殖培養を行う。もし、分離が難しい場合にはFACS 解析にてCD49d、CD56 Double positive のポピュレーションの分離を試みる。

#### 神経堤由来細胞の選定

増殖したそれぞれの細胞は神経堤由来細胞を選定するため、フローサイトメーターを用いて神経堤由来細胞マーカーとしてCD49d、CD56、PDGFR $\alpha$ の発現を解析する。さらに、多分化能を調べるため、それぞれの分化培地を用いて骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞ならびに神経細胞への分化誘導を行う。分化誘導後、それぞれ、Oil Red O 染色 (脂肪細胞)、Safranin O 染色 (軟骨細胞)、 $\beta$ III-tubulin, Neurofilament Medium (NFM)の免疫染色 (神経細胞) を行い評価する。遺伝子発現についてもそれぞれのマーカーでRT-PCR を用いて評価する。

#### 角膜実質細胞への分化誘導

始めは今までに報告されている角膜実質細胞維持培地を利用し培養を試みる (Du, Stem cells, 2005; Builles, Biomed Mater Eng, 2006, Yoshida, IOVS, 2005)。より角膜実質細胞に近い分化をする培養条件を選定するため、様々な培養条件を行って、分化誘導を試みる。もし、分化誘導が難しい場合には、角膜実質から分離した角膜実質細胞のフェノタイプを

維持している細胞と共培養するなどについても検討する。

#### 分化誘導後の解析

口腔粘膜上皮下細胞から角膜実質細胞への最適な分化誘導条件を確立するため、上記で様々な条件で分化誘導を行った細胞を解析する。解析は角膜で発現するケラトカン、ALDH3A1、ルミガン等の発現を免疫染色ならびにRT-PCR によって行う。コントロールとして角膜実質から分離培養した細胞を用いて比較検討する。

#### 4. 研究成果

分離した口腔粘膜上皮下細胞を酵素的ストレス下 (0.25%トリプシン、37°C、17時間) で培養し、0.8%メチルセルロースで単離培養を行ったところ、図1のように7~10日でClusterを形成することが解った。Cluster

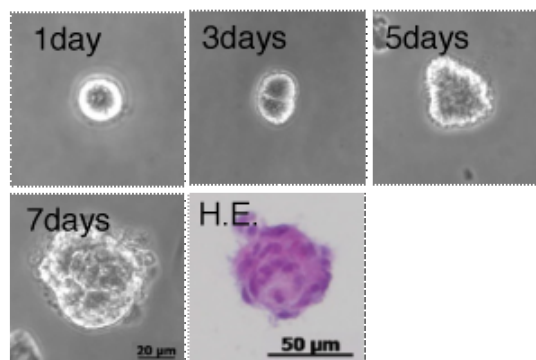


図5. メチルセルロース培養①、3、5、7日目のClusterの培養中の写真とH.E.

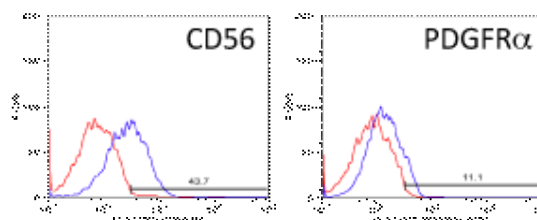


図6. Single cellsから増殖したCD56、PDGFR $\alpha$ の発現が比較的高い細胞群のフローサイトメトリー。

を増殖培養したそれぞれのPDGFR $\alpha$ 、CD56の発現が高いものを選び(図5)、骨芽細胞、軟

骨細胞脂肪細胞それぞれへの分化誘導を行った。それぞれの分化誘導において、骨芽細胞様のアルカリフォスファターゼとアリザリンレッド陽性像、脂肪細胞で観察されるオイルレッド陽性の脂肪滴、軟骨細胞で観察されるサフラニンOの軟骨ムチンとコラーゲンタイプIIを観察することができた(図6)。

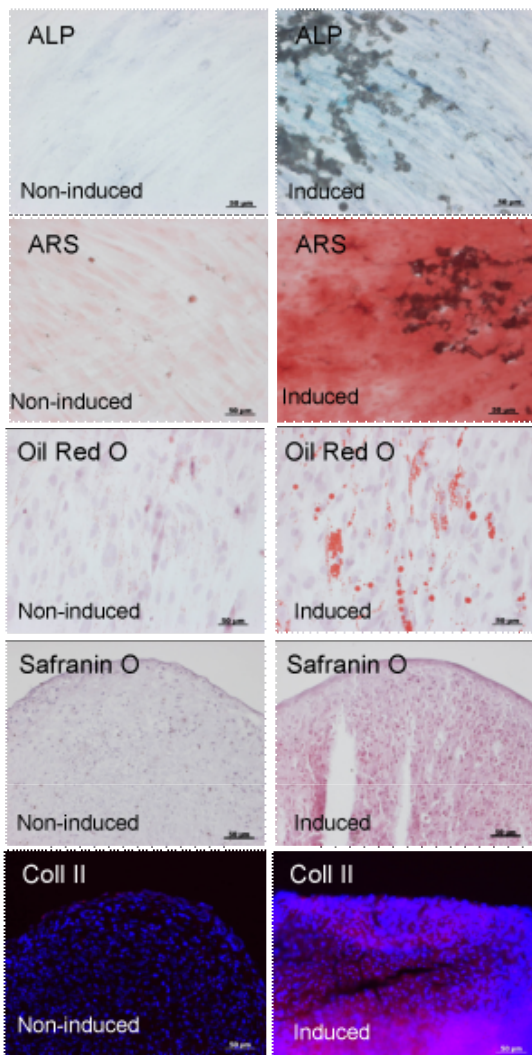


図6. 骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導後のそれぞれの染色像。

また、mRNA レベルにおいても、骨芽細胞ではアルカリフォスファターゼ、脂肪細胞ではPPAR- $\gamma$ 2 と Leptin、軟骨細胞では AMP-6 と Aggrecan の発現を検出することができた(図7)。これらのことから今回単離・増殖した口腔粘膜上皮細胞は多分化能を備えた細胞であることが示唆された。

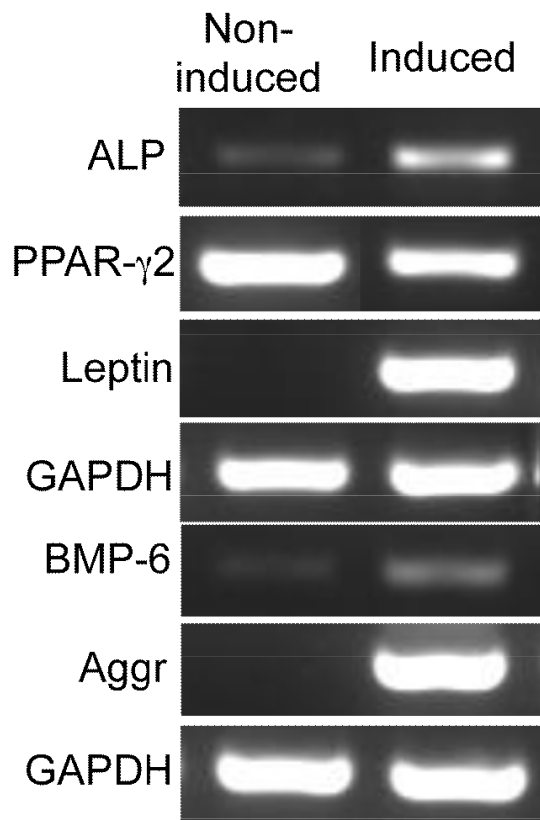


図7. 骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導後の RT-PCR における mRNA レベルの検出。

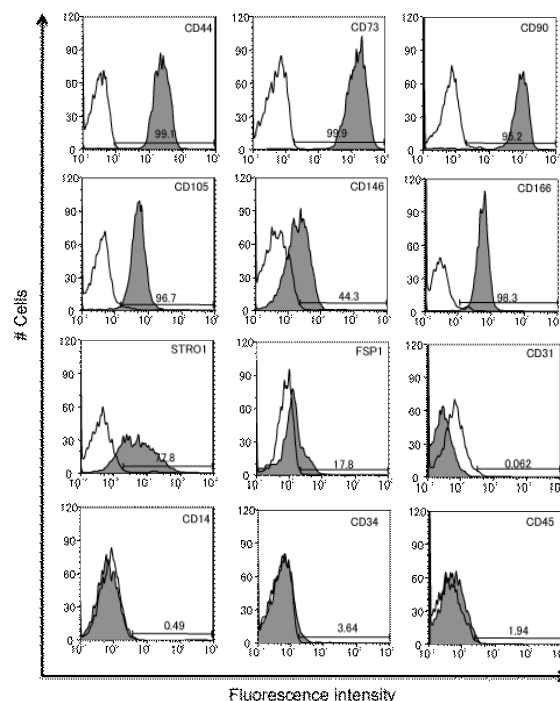
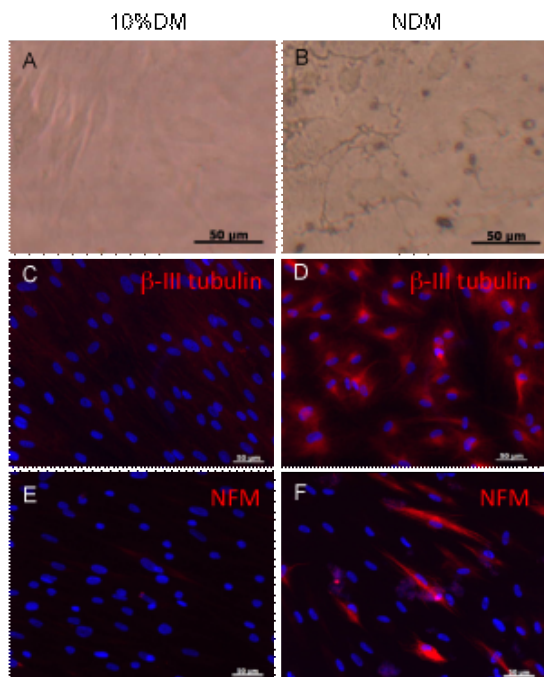


図8. フローサイトメトリーによる口腔粘膜上皮細胞の間葉系幹細胞マーカーの発現。

今回単離・増殖した口腔粘膜上皮細胞をさらに解析するため、間葉系幹細胞で発現するマーカーの発現をフローサイトメトリーで

観察したところ、CD44 CD73, CD90, CD105,



CD146, CD166, STRO-1 の発現が高いことが解った。また、繊維芽細胞で発現する FSP-1 や、造血系で発現する、CD14 CD34 CD45 は低い値を示した(図8)。これらのことから間葉系幹細胞である可能性も示唆された。

図9. 口腔粘膜上皮細胞の神経細胞への分化誘導。

CD56 ならびに PDGFR $\alpha$  は神経堤因子として知られていることから、口腔粘膜上皮細胞の神経細胞への分化誘導を試みた。分化誘導後の細胞は神経様の突起が観察され、神経細胞で発現する  $\beta$ III-tubulin と NFM の発現を確認することができた(図9)。これらのことは口腔粘膜上皮細胞から神経様の細胞へ分化可能であることが示唆された。

最後に口腔粘膜上皮細胞を角膜実質細胞へ分化誘導を試みたところ、免疫染色においては Keratocan の陽性像を観察することが出来たが(図10)、RT-PCR における mRNA レベルでの検出は出来なかった。このことから口腔粘膜上皮細胞から角膜実質細胞への分化誘導は一部可能である可能性が考えられた。

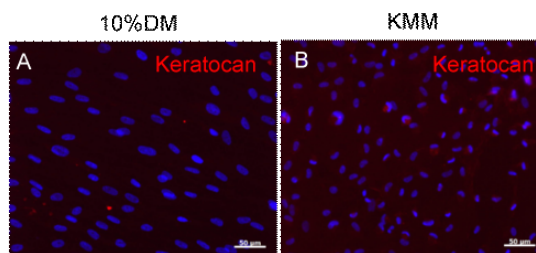


図10. 角膜実質細胞への分化誘導後における Keratocan の免疫染色。

以上をまとめると、口腔粘膜上皮細胞を single cell から培養し、CD56、PDGFR $\alpha$  陽性の細胞は多分化能を示し、神経細胞へも分化可能であることが示唆された。また、角膜実質細胞への分化誘導も可能である可能性が考えられた。今後、口腔粘膜上皮細胞の角膜再生の細胞ソースとして期待される。

#### 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 0件)

[学会発表] (計 1件)

- ① 比嘉一成, 佐竹良之, 島崎潤. 口腔粘膜上皮組織の Single cell から増殖した細胞の解析とその応用. 第12回 日本再生医療学会 2013/3/22 横浜

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

島崎 潤 (SHIMAZAKI JUN)

研究者番号: 40170930