

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592618

研究課題名(和文) 無血清、無フィーダーによる未分化培養ヒト角膜輪部上皮培養法の確立

研究課題名(英文) Establishment of serum and feeder-free cultured method in human corneal limbal epithelium

研究代表者

山上 聡 (YAMAGAMI, SATORU)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10220245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：培養ヒト角膜上皮細胞シート移植は、治療が禁忌とされた幹細胞疲弊症眼に対する眼表面再建を可能とする再生医療であるが、細胞シートの作製に異種のフィーダー細胞としてマウス3T3線維芽細胞との共培養やウシ血清を用いることが必須であった。基礎培地にB-27とKGF (keratinocyte growth factor)添加し、未分化培養ヒト角膜輪部上皮細胞シートを作製できた。現在本培養を用いた臨床研究を実施中である。

研究成果の概要(英文)：Cultured human corneal epithelial sheet transplantation enable us to treat corneal stem cell deficiency, but this culture technique required bovine serum and mouse 3T3 feeder cells for successful culture. We established culture technique of human corneal limbal sheet with basal medium, B-27 supplement and KGF and are performing clinical study with this undifferentiated culture sheet.

研究分野：眼科学

キーワード：幹細胞疲弊症 無血清 無フィーダー

1. 研究開始当初の背景

培養ヒト角膜上皮細胞シート移植は、治療が禁忌とされた幹細胞疲弊症眼に対する眼表面再建を可能とする再生医療であるが、細胞シートの作製に異種のフィーダー細胞としてマウス 3T3 線維芽細胞との共培養やウシ血清を用いることが必須であった。これに対し、我々は無血清、無フィーダーによる新しい培養法を考案し報告した。しかし我々が開発した培養法では、細胞の未分化性維持という点では未だ不十分であった。細胞の未分化性が不十分ということは、移植した細胞シートが新たな細胞を産生して眼表面で長期に渡り生存できないことを意味するため、更なる改良が必要となり、長期に渡って幹細胞性を維持可能な細胞の培養法を開発する必要が生まれた。

2. 研究の目的

この新しい無血清、無フィーダー培養法を更に改良し、細胞の未分化性維持の可能な培養法に改良し、従来の未知成分による感染リスクおよび施設間で同一の細胞シートの作製が困難という問題点を解決することを目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

アメリカアイバンクから供給される研究用ヒト角膜から輪部組織を採取し、基礎培地に B-27 添加剤を使用することを基本とし、さまざまな増殖因子を用いた培養を行った。検討した増殖因子は、過去の報告から増殖能を高めかつ未分化細胞の性質が維持できる可能性のあるものを選別し、検討した。

細胞の調整および増殖能の検討
輪部上皮シートをコラゲナーゼおよびトリプシン処理し細胞を分離し、WST-1 アッセイ法にて細胞の増殖能を検討した。

細胞シートの作製と各種マーカーでの検討
24 ウェルの培養皿に細胞を播種し、約 3 週間にわたり重層化培養を行った。重層化した細胞シートは、半割しホルマリンに固定し形態学的な検討を行った。残りの半分は OCT コンパウンドで凍結し、クライオスタットにて薄切し約 10 マイクロメートルの切片を作製し、各種マーカーで免疫染色を行った。コントロールとしては、正常人輪部上皮を動揺にホルマリン固定、凍結保存標本を作製し培養された細胞シートをヒト角膜輪部組織と比較した。

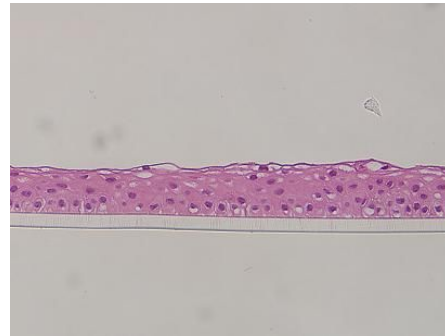
4. 研究成果

検討した多くの増殖因子の中で十分な増殖能を示した増殖因子は、HGF (hepatocyte growth factor), EGF (epidermal growth factor),

KGF (keratinocyte growth factor)であった。HGF は良好な増殖能を示したものの、細胞シートとしての形態に問題があったため除外した。EGF, KGF に関しては未分化マーカーの発現検討を行い、結果として KGF を使用することでフィーダー細胞を用いる培養法と同等の細胞シートを作製できるとの結論に至った。

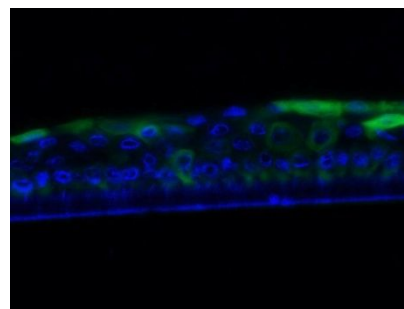
以下に B-27 と KGF で培養した角膜上皮細胞シートの HE 染色、およびサイトケラチンなどの免疫組織化学的検討の組織像を示す。

B27 + KGF で培養した角膜上皮シート



HE 染色で 5-6 層に重層化した培養角膜輪部上皮細胞シートが作製された。基底層の細胞は円形、円柱状の形態で表層の細胞は翼状の横長な形態が観察された。これらの特徴は、ヒト輪部上皮細胞組織と形態学的に類似の構造であった。

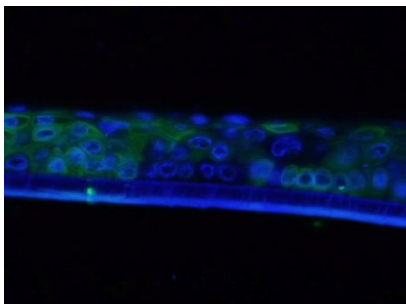
サイトケラチン 3 での免疫染色



角膜の分化細胞マーカーとして代表的なマーカーは、サイトケラチン 3 であるので、抗サイトケラチン 3 抗体により B27 + KGF で培養して作製した細胞シートの免疫染色を試みた。輪部組織では、基底層の細胞はサイトケラチン 3 陰性で上層の細胞のみがサイトケラチン 3 陽性となる。B27 + KGF で培養して作製した細胞シートも輪部組織と同様に表層の細胞は分化マーカーのサイトケラチン 3 陽性であり、その染色パターンがヒト角膜

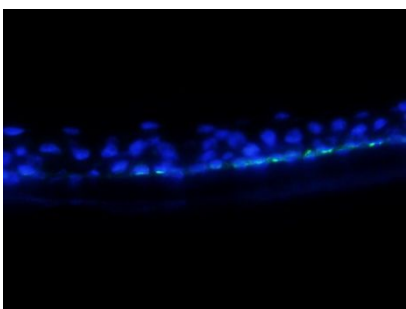
輪部組織と類似していた。

サイトケラチン 12 での免疫染色



サイトケラチン 12 も角膜の分化細胞マーカーとして知られているので、抗サイトケラチン 12 抗体により B27 + KGF で培養して作製した細胞シートの免疫染色を行った。輪部組織では、基底層の細胞はサイトケラチン 12 陰性で上層の細胞のみがサイトケラチン 12 陽性となる。B27 + KGF で培養して作製した細胞シートも輪部組織と同様に表層の細胞は分化マーカーのサイトケラチン 12 陽性であり、その染色パターンがヒト角膜輪部組織と類似していた。

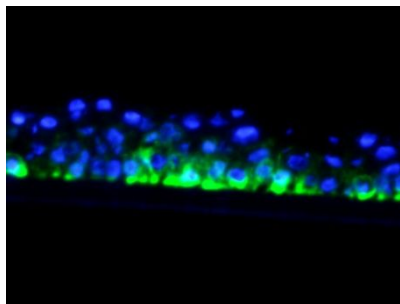
N-cadherin での免疫染色



ヒト角膜輪部組織には N-cadherin という蛋白が基底細胞層に存在し、nich としての役割を果たしている可能性が示唆されている。本マーカーの役割は必ずしも明らかになってはいないが、ヒト輪部基底細胞のマーカーであるので、培養ヒト角膜輪部上皮細胞シートにおける発現を検討した。結果として図に示すように角膜周辺部の基底細胞マーカーの N-cadherin 陽性細胞が培養ヒト角膜輪部

上皮細胞シートの基底層にも認められた。

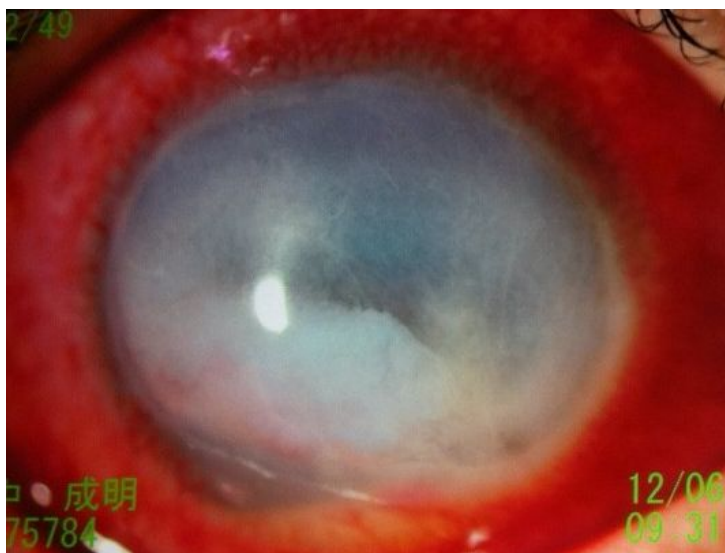
サイトケラチン 15 の免疫染色



ヒト角膜輪部組織は角膜上皮の幹細胞が存在する場所として知られている。これまで角膜上皮の幹細胞特異的マーカーの同定はなされていないが、幹細胞マーカーの可能性のある蛋白としてサイトケラチン 15 が指摘されてきた。そこで抗サイトケラチン 15 抗体を用いた免疫染色を行った。B27+KGF の組み合わせの細胞シートでのみ上図に示すような細胞シートの基底層のサイトケラチン 15 陽性所見をえることができた。未分化マーカーと考えられるサイトケラチン 15 陽性細胞が基底層に認められた。

以上のように KGF を添加して得られた上皮細胞シートはヒト角膜輪部上皮と極めて類似構造をしていることが免疫組織化学的に示された。

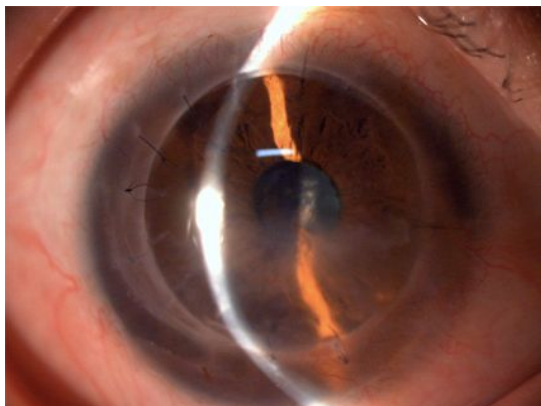
以上の結果を踏まえて現在臨床研究を実施中である。
症例はアルカリ外傷眼で術前の前眼部写真を示す。



アルカリ性の薬品により角膜は混濁し、角膜輪部組織は高度に障害されている。ただし反対眼の輪部上皮は正常であった。そこで新しく開発した無血清・無フィーダー培養法で作

製した羊膜上培養自己輪部上皮細胞シートを移植と角膜実質の混濁に対し、角膜移植を同時に行った。

術後（1年5ヶ月）の前眼部写真



角膜輪部組織は移植された培養自己輪部上皮シートにより修復され、角膜中央部に移植された角膜も透明性を維持している。視力は矯正で0.6を得ている。まだ症例数は十分ではないが臨床症例でもその有効性が証明された。今後は症例数を増やしてさらにその有効性、安全性についての検討を行って行く予定である。

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1件）

Miyashita H, Yokoo S, Yoshida S, Kawakita T, Yamagami S, Tsubota K, Shimmura S. Long-term maintenance of limbal epithelial progenitor cells using rho kinase inhibitor and keratinocyte growth factor. Stem Cells Translational Medicine 2013 2:758-765.

〔学会発表〕（計3件）

(1) 山上 聡 ゼノフリー培養法による角膜上皮の再生医療 角膜再生医療の幕開け 2014.4.4 第118回日本眼科学会総会 東京

(2) Yamagami S. Reconstitution of human corneal epithelium with a serum- and feeder-free culture system. 2014.8.24 The 57th Corneal Disease Symposium, Busan, Korea

(3) Yamagami S. Tissue engineering and regenerative medicine. Reconstitution of human corneal epithelium with a serum- and feeder-free culture system. 2014.4.4 World congress of Ophthalmology, Tokyo.

〔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
<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/patient/depts/kakumaku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山上 聡 (YAMAGAMI SATORU)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10220245

(2) 連携研究者

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