

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890157

研究課題名(和文) 角膜標的細胞誘導条件・培養法の検討と臨床応用

研究課題名(英文) Investigation and clinical application of corneal target cell-induced culture

研究代表者

井上 智之 (Tomoyuki, Inoue)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50432539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：角膜上皮幹細胞メンテナンスにおける異なる特性を調べるため、角膜輪部由来の細胞(LNC)と角膜輪部の角膜実質由来細胞(LSC)との特性を比較した。両者をフィーダーとして用いた場合、角膜上皮前駆細胞のコロニー形成率、および培養角膜上皮シートの形成は、LNCにおいて有意に高かった。また、ヒト由来皮膚細胞に遺伝子導入を行い、十分数の確保・マーキングによる細胞の混入の確認ならびに選択薬剤による除去を可能にするヒト皮膚細胞由来遺伝子導入フィーダー細胞を開発した。本フィーダー上で培養した角膜上皮細胞シートは良好な増殖・分化を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the differing characteristics of putative limbal niche cells (LNCs) and limbal stromal cells (LSCs) in the maintenance of limbal epithelial stem cells in the cornea. The colony-forming efficiency of limbal epithelial progenitor cells and the epithelial cell sheets in LNCs group was significantly better than that in the LSCs group. We developed a genetically modified line of human dermal fibroblast cells, which maintained immortalization, visualization, and eliminable characteristics. All corneal epithelial cell sheets were well stratified.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：角膜 角膜上皮 移植 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

角膜上皮幹細胞疲弊症(角膜上皮障害)や水疱性角膜症(角膜内皮傷害)をはじめとする自己角膜細胞が消失する難治性眼疾患は重症の視力障害を引き起こす。これらに対する治療方法は、薬剤を使用した内科的治療は不可能であり、角膜移植術などの外科的治療しか存在しないが、ドナー不足や同種移植による拒絶反応などの大きな問題が存在し、近年自己の細胞を用いた培養角膜細胞移植の研究が注目を集めている。

皮膚表皮、角膜上皮ならびに口腔粘膜上皮細胞などの培養細胞シートに関しては、細胞培養時にフィーダー細胞と共培養することでより生体に近い細胞シートを作製することが可能である。我々のグループにおいても、効果的な角膜上皮培養条件の検討を目的として、コラーゲンゲルに角膜または皮膚線維芽細胞を混和したゲル上にて角膜上皮細胞シートを作成する三次元角膜上皮培養の系を用いて、角膜上皮シート培養過程における増殖因子の発現パターンの解析を施行し、培養細胞とフィーダーである実質細胞との相互関係を示すことで、上皮細胞培養における実質細胞フィーダーの重要性を見出してきた。細胞シートの作製方法は、一般的にはマウス由来の線維芽細胞(3T3細胞)をフィーダー細胞として羊膜やコラーゲンなどの基質上あるいは温度応答性培養皿上で培養する方法がある。しかしながら、フィーダー細胞として利用されている細胞はマウスなどの動物由来の細胞であり、臨床応用を想定した場合、異種生物からの感染や異種生物由来の細胞の培養細胞シートへの混入の危険性が存在する。そこで、我々はこれまでの研究にて、角膜上皮と解剖学的に隣接するヒト角膜実質由来の細胞を用いて、上述した危険性を回避可能な標的細胞誘導用フィーダー細胞を開発した。培養により得られたヒト角膜実質細胞は数代しか継代できず、移植を想定

した際に使用が制限される。そこで、本細胞に不死化遺伝子(テロメラーゼ遺伝子)を導入し、長期継代培養を可能にした。さらに細胞の混入の危険性を考慮して、マーカー遺伝子(EGFP 遺伝子)ならびに自殺遺伝子(ヒトヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子)を導入した。フィーダー細胞が不要になれば選択薬剤(ガンシクロビル)により細胞を死滅することが可能になり、さらにマーカー遺伝子により細胞が混入した際に確認することも可能である。移植目的の細胞シートが完成し、フィーダー細胞が不要になれば自由に死滅させることができるので、角膜上皮細胞のフィーダー細胞上での接着培養も可能となった。これらの背景から、本フィーダー細胞と培養技術を改善させるべく研究をすすめた。

## 2. 研究の目的

目的とする標的細胞を自由に誘導し組織シートとして回収するために、異生物種細胞混入の回避・十分数の確保・マーキングによる細胞の混入の確認ならびに選択薬剤による除去を可能にするヒト由来フィーダー細胞開発した。本フィーダー細胞には、不死化遺伝子、マーカー遺伝子および自殺遺伝子が導入されており、長期継代培養による細胞のストック、細胞の混入の確認ならびに選択薬剤による除去が可能で、本フィーダー細胞を用いればフィーダー細胞を混入させずに目的標的細胞シートのみの回収が可能になる。本研究にて、遺伝子工学的な仕組みから、標的細胞に刺激を与えた後、フィーダー細胞自体は自殺遺伝子による除去によって取り除くことができるため、遺伝子導入自体も問題にならない。本研究では、フィーダー細胞のもとになる細胞の選択および標的細胞の最適な培養条件を検討して、本フィーダー細胞を用いて目的細胞のみを回収して、角膜細胞シートによる眼組織再生医療に応用することを目的とした。

### 3. 研究の方法

USA アイバンクより購入するヒト眼から、角膜上皮幹細胞を単離し、マイトマイシン C により増殖抑制を行った遺伝子導入ヒト角膜実質フィーダー細胞上で培養する。角膜上皮細胞がコンフルエントになった状態で選択薬剤（ガンシクロビル）を用いてフィーダー細胞を死滅させ除去し、ヒト角膜上皮細胞シートを作製する。なお、同様の方法にてヒト口腔粘膜組織から口腔粘膜シートを作製する。細胞培養方法に関しては、申請者がすでに習得しており、これまでの検討により作製したヒト角膜上皮細胞シートは容易に回収できた。また組織学的検討結果から、HE 染色により角膜上皮細胞において特徴的な多層構造を形成していることが確認でき、さらに、角膜上皮細胞の分化マーカーであるサイトケラチン 3 の発現を免疫染色法を用いて検討した結果、その発現を確認できた。以上の方法論から遺伝子導入ヒト角膜実質フィーダー細胞上においてヒト角膜上皮細胞の培養が可能であることを示してきた。さらに、より効果の高いフィーダーの細胞起源の選択のため、角膜中央の実質細胞と角膜輪部の実質細胞の特性の比較を検討した。手技としては、RT-PCR による遺伝子発現比較、発育コロニー産生実験、シート培養実験などを施行した。さらに、蛋白のレベルでの検討として、詳細な生体における角膜上皮細胞との比較検討を免疫染色法を用いて検討した。さらに、角膜実質由来フィーダー細胞に加えて、由来の異なる皮膚由来フィーダー細胞を作製した。方法は、角膜実質細胞由来フィーダー細胞を作製した手順に従った、簡単には、継代回数の限られている培養ヒト皮膚実質細胞に、不死化遺伝子（テロメララーゼ遺伝子）を導入し、長期継代培養を可能にした。さらに細胞の混入の危険性を考慮して、マーカー遺伝子（EGFP 遺伝子）ならびに自殺遺伝子（ヒトヘルペスウイルス由来チミジンキナ

ーゼ遺伝子）を導入した。この新しく作製した皮膚由来フィーダー細胞の特性を上述の実験系を使用して検討した。

### 4. 研究成果

移植源の細胞は、目的の細胞への分化能力を豊富に維持できることが理想的であるため、角膜上皮幹細胞が存在する環境であるニッチェの特性を調べるため、角膜輪部実質由来細胞(LSC; limbal stromal cells)と角膜上皮幹細胞が存在する部位である角膜輪部由来細胞(LNC; limbal niche cells)を分けて培養した。細胞培養下での外観に差は認めなかった。LSC および LNC の培養細胞をフィーダーとして用いた場合、角膜上皮前駆細胞のコロニー形成率を検討した結果、LNC 群における上皮細胞コロニー形成 ( $6.57 \pm 1.54\%$ ) は、LSC 群における形成率 ( $1.43 \pm 0.47\%$ ) より有意に高かった。さらに、両細胞群における重層培養角膜上皮シートの形成を比較すると、LNC 群上での重層上皮細胞シートは 4 - 5 層を呈していたのと比較して、LSC 群上での重層上皮細胞シートは 2 - 3 層と、LNC 群上において、より良好な培養シートの形成が確認された。さらに、この 2 グループの上皮シートの分化レベルを検討するため、分化マーカーを用いた免疫組織染色をおこなった。LNC フィーダー細胞から得られた上皮細胞シートにおいては、LSC フィーダー細胞を用いた場合に比較して、輪部角膜上皮幹細胞マーカーである Np63 は有意に高く発現しており、角膜上皮分化マーカーであるケラチン 3 は有意に低く発現を認めた。さらに、RT-PCR を用いた RNA レベルでの発現解析によって、LNC および LSC 両群において、EGF, FGF2, EPR, HGF, KGF, NGF, GDNF, BDNF, N-cadherin, imporin13 は共通の発現を認めた。一方、LSC 群に比較して、LNC 群においては、E-cadherin が高く発現し、NT3 が低く発現していた。この LNC 細胞のフィー

ダーとしての有用性を ” Differences between niche cells and limbal stromal cells in maintenance of corneal limbal stem cells.” として Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014;55:1453-62 に発表した。

さらに、角膜上皮細胞のためのフィーダー細胞の起源として、角膜皮膚細胞に着目して、ヒト由来皮膚細胞に不死化遺伝子、自殺遺伝子ならびにマーカー遺伝子を導入して、皮膚細胞由来遺伝子導入フィーダー細胞を樹立した。本細胞は、6か月以上の長期継代培養が可能で、その間に形質の変化などは認めず安定していた。ガンシクロビルを用いた薬剤選択も良好に機能しており、薬剤投与後、速やかにフィーダー細胞は死滅した。皮膚由来フィーダー細胞上にて、角膜上皮前駆細胞のコロニー形成率を検討した結果、上皮細胞コロニー形成

( $11.77 \pm 0.21\%$ ) は、従来使用されてきた3T3 おける形成率( $12.8 \pm 1.61\%$ ) と同等であった。皮膚由来フィーダー細胞上での重層上皮細胞シートは4 - 5層を呈していた。

また、フィーダー細胞自体に遺伝子導入を行うものの、遺伝子工学的な仕組みから、標的細胞に刺激を与えた後、フィーダー細胞自体は自殺遺伝子による除去によって取り除くことができ、目的角膜上皮細胞シートにおいては、遺伝子導入のベクター配列は、PCR にて同定されず、遺伝子導入自体も問題にならないと考えられた。このヒト皮膚細胞由来遺伝子導入フィーダー細胞の有用性を ” Development of genetically modified human dermal fibroblast feeder cells for ocular surface regeneration medicine.” として Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54:7522-31 に発表した。

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)  
Li Y, Inoue T, Takamatsu F, Kobayashi T, Shiraiishi A, Maeda N, Ohashi Y, Nishida K. Differences between niche cells and limbal stromal cells in maintenance of corneal limbal stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014 Mar 10;55(3):1453-62. 査読あり。  
Li Y, Inoue T, Takamatsu F, Maeda N, Ohashi Y, Nishida. Development of genetically modified human dermal fibroblast feeder cells for ocular surface regeneration medicine. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54:7522-31. 査読あり。

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 智之 (Inoue Tomoyuki)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：50432539

(2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：