様　式　C－19、F－19、Z－19　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 27 年　 5 月 26 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：25861650

研究課題名（和文）角膜上皮幹細胞ニッチにおけるメラノサイト幹細胞の役割

研究課題名（英文）Melanocyte stem cells as a niche for corneal epithelial stem cells

研究代表者
宮下　英之（Miyashita, Hideyuki）

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：60424173

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）：我々は初代培養ヒト角膜輪部上皮シートにメラノサイトを見出したことから、メラノサイトまたはメラノサイト幹細胞が上皮細胞のニッチとして働いているとの仮説を立て、これを検証した。しかしながら培養系の結果から、メラノサイトは確かに長期培養維持した上皮シート内の上皮幹細胞マーカー陽性細胞と共局在しているものの、メラノサイトが上皮幹細胞を維持しているというよりは、上皮幹細胞がメラノサイトを維持していることが示唆された。今後はまずメラノサイトの局在も含めた長期初代培養上皮を論文発表するとともに、後者について検証する予定である。

研究成果の概要（英文）：Based on the localization of melanocytes in primary human limbal epithelial cell sheets, we hypothesized that melanocytes or melanocyte stem cells act as a limbal epithelial stem cell niche, even in vitro. However, our results suggested that although melanocytes in vitro supplied melanosome to the epithelial cells, melanocytes seemed to not have the additional effects on epithelial stem cells in vitro. Rather, limbal epithelial stem/progenitor cells seemed to maintain melanocytes in vitro. We intend to report our data including melanocyte localization in epithelial sheets by paper.

研究分野：角膜

キーワード：上皮幹細胞　メラノサイト　培養上皮シート　角膜輪部上皮　幹細胞ニッチ

１．研究開始当初の背景

体組織を維持する体性（成体）幹細胞は、ニッチと呼ばれる組織内の特殊な微小環境において維持されていると考えられている。角膜上皮の幹細胞は角膜と結膜の移行部である輪部に位置するとされ、ニッチを構成する因子の研究が進められている。我々の研究グループの Higa らは以前、メラノサイトが輪部に局在し、K19 陽性の輪部上皮基底細胞に対してメラニン顆粒を供給していることを示した（Higa K, et al. Exp eye res. 2005;81:218-223.）。Hayashi らは、神経堤由来であるメラノサイトが CDH2 を発現すること、CDH2 が血液系幹細胞では細胞・細胞間接着を介したニッチ因子であること、加えて輪部上皮基底細胞の一部が CDH2 を発現することなどから、輪部でも CDH2 がニッチ因子ではないか、またメラノサイトがニッチ細胞ではないかと提唱した（Hayashi R, et al. Stem Cells. 2007;25:289-296.）。一方 Higa らは、CDH2 が輪部上皮のニッチ因子として重要であるものの、免疫電子顕微鏡像において CDH2 を介したメラノサイトと輪部上皮基底細胞との接着が見られないことから、異なる見解を示していた（Higa K, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50:4640-4645.）。

我々のグループは申請当時、臨床移植用培養ヒト角膜輪部上皮シートの改良を行っており、申請の時点で 3 カ月以上に渡って生体輪部上皮に酷似した形質を維持する培養系を確立していた（Miyashita H, et al., Stem Cells Transl Med. 2013 Oct;2(10):758-65.）。この培養シートは培養 3 カ月の時点においても、未分化上皮細胞の指標であるサイトケラチン 15（K15：Yoshida S et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47:4780-4786.）、p63 陽性細胞を基底層に含み、高いコロニー形成能を示すため、上皮幹細胞が維持されていると考えられた。この研究を進める中で、偶然メラニン色素の濃い海外ドナー角膜輪部を細胞源に用いた際、メラノサイトおよびメラニン供給を受ける上皮基底細胞を見出した。

毛包においてメラノサイトはメラノサイト幹細胞によって維持されることが知られるが（Nishimura EK. Pigment Cell Melanoma Res. 2011;24:401-410.）、我々の培養系において少なくとも数か月メラノサイトが維持されている以上、この培養系においてもメラノサイト幹細胞が存在する可能性があった。また毛包において上皮幹細胞とメラノサイト幹細胞が同一部位に局在することから、輪部およびこの培養系においても上皮幹細胞とメラノサイト幹細胞が同一部位に局在すると予想された。以前我々はフィーダーとの直接接触が上皮幹細胞維持に働くことを示したが（Miyashita H, et al. Tissue Eng Part A. 2008;14:1275-1282.）、メラノサイトあるいはメラノサイト幹細胞が代替的な働きをしている可能性も考えられた。また逆に、上皮幹細胞がメラノサイト幹細胞を維持していることも考えられた。

そこで本研究では、輪部におけるメラノサイト幹細胞の存在と、上皮幹細胞とのニッチとしての相互作用を仮定し、この仮説を主に培養系を用いて検証を試みた。

２．研究の目的

第一に、生体角膜輪部および培養上皮系におけるメラノサイト幹細胞の局在と上皮幹細胞の局在との関連性について明らかにする。第二に、培養系を用いて上皮幹細胞とメラノサイトあるいはメラノサイト幹細胞との関係を解析する。

３．研究の方法

まず、生体角膜輪部および培養上皮系におけるメラノサイト幹細胞の局在と上皮幹細胞の局在との関連性について明らかにするため、免疫染色を行った。ヒト毛包において、メラノサイト幹細胞はメラノサイトと同様 PMEL(別名 Silv/gp100)陽性であるが、MelanA(MART-1) 及び Tryrosinase 陰性であるとされる（前掲 Nishimura EK, et al., 2011）。また、MITF はメラノサイトの細胞系譜で発現する重要なマスター転写因子である。そこで、ヒト角膜輪部の凍結切片、培養上皮の凍結切片及び Whole mount sheet に対して免疫染色を行った。ヒト輪部上皮は、海外アイバンクドナーの残存輪部を、以前より我々が用いている長期初代培養法を用いて培養した（前掲 Miyashita H, et al, 2013）。凍結切片に関しては、未固定サンプルを包埋剤中で液体窒素に浮かべて急速凍結し、切片を氷冷 4%PFA で後固定して免疫染色した。Whole mount staining に関しては、氷冷 4% PFA で固定した Sheets を用い、界面活性剤による透徹（0.5%TritonX、室温、20 分）、及び抗体液（TritonX を 0.1%含む）の反応時間を長め（室温、2 時間ずつ）にとって行った。また、一部の初代培養実験において、上皮がコンフルエントに達する 6 日目より 3 日間チミジンアナログである EdU を添加して増殖細胞を標識し、その後 6 か月目まで EdU を添加せずに培養することで、細胞周期をゆっくり回る細胞を Label retaining cells (LRC) として検出した（Bickenbach, J R, J Dent Res. 1981 Aug;60 Spec No C:1611-20., Cotsarelis, G. et al., Cell. 1989 Apr 21;57(2):201-9. ）。

培養系におけるメラノサイトの有無の影響については、まずメラノサイトの添加実験

を行った。メラノサイトの培養法は、既報に従い、MCDB153 培地をベースとした M254 培地に、SCF 及び ET3 を添加して行った(Hsu MY, Li L, Herlyn M. Methods Mol Med. 2005;107:13-28.)。海外ドナー角膜残存輪部より調整した上皮をメラノサイト培地を用いて培養し、継代により純化して使用した。なお、平成 26 年度よりメラノサイト培養法を Dziasko らの方法に切り替えて行った（Dziasko MA, et al., PLoS One. 2014 Apr 8;9(4):e94283.)。3 等分した新鮮輪部上皮細胞と、細胞数を振った培養メラノサイト（Passage 2）を混合し、マイトマイシン C 処理したヒト間葉系幹細胞（米国 SanBio 社 McGrogan 博士より供与）をフィーダー細胞として共培養して上皮の状態を免疫染色、およびコロニー形成率により評価した。後者のアッセイは、上皮シートを市販のトリプシン EDTA 類似酵素液（TrypLE Express, Gibco）で 37 度、30 分処理し、40μm セルストレイナーで集塊を除去したのち、NIH/3T3 フィーダーを用意した 100 ミリディッシュに 1000 細胞ずつ播種して行った。コロニー形成率は播種細胞に対する形成コロニーの百分率で求めた。また、新鮮メラノサイトの効果を見るため、メラノサイトで発現する c-kit を指標とし、新鮮ヒト輪部上皮から FACS を用いて上皮細胞とメラノサイトを分離、これをメラノサイト含有群と非含有群にそれぞれ再構築して長期培養を行った。

４．研究成果

ヒト角膜輪部組織におけるメラノサイト系細胞及び未分化上皮の局在

ヒト角膜輪部上皮組織においては、K15 陽性細胞の直下に MITF 陽性（図 1A)、MELANA 陽性（図 1B)、PMEL 陽性のメラノサイトが局在した。PMEL と MELANA の発現は一致したものの、一部に MITF 陽性かつ MELANA 陰性の細胞を認めた（図 1B、矢印)。このことは、輪部におけるメラノサイト幹細胞の存在を示唆する。

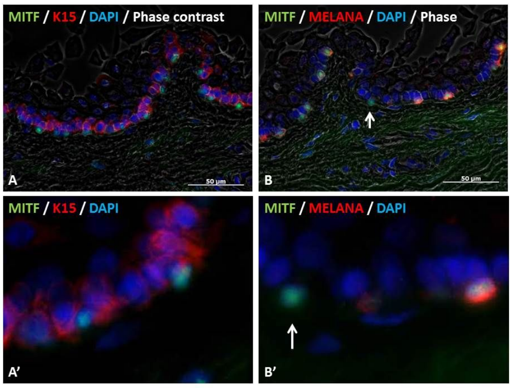

図 1：ヒト角膜輪部上皮組織におけるメラノサイト系細胞。

引き続いて、ヒト輪部上皮の長期初代培養系におけるメラノサイトの局在を確認した。驚くべきことに、初代培養はサンプル回収するまで少なくとも 1 年にわたり継続できた。また、背景で述べた通り、色素の濃い海外ドナー角膜由来の初代培養上皮では、メラノサイト及び周囲の上皮に色素沈着がみられたことから、メラノサイトが培養下でもメラノソームを上皮に受け渡しているものと考えられた（図 2A)。上皮未分化マーカーのうち p63 は一様に発現するものの、K15 は培養 1 か月目の時点までは基底層に広く発現が認められるものの、培養 3 カ月以降は一部の細胞に限局し、かつ K15 陽性細胞はクラスターを形成するようになった（図 2B)。培養 3 カ月目以降の初代培養においては、メラノサイトは K15 陽性細胞と共局在を示した。ただし、メラノサイトはほぼ確実に K15 陽性細胞塊と共局在していたものの、K15 陽性細胞塊はしばしばメラノサイトを欠いた。生体組織とは異なり、メラノサイトの細胞体は基底細胞直下ではなく、基底細胞直上に局在した(図 2C)。また MITF 陽性細胞はすべてが MELANA 陽性だったものの（図 2D)、メラノサイトの一部が EdU 標識を 6 か月維持する LRC だった(図 2E。矢印)。メラノサイトの LRC は周囲の上皮の LRC よりもより強い EdU 標識を示したことから、よりゆっくりと細胞周期を回っているものと考えられた。

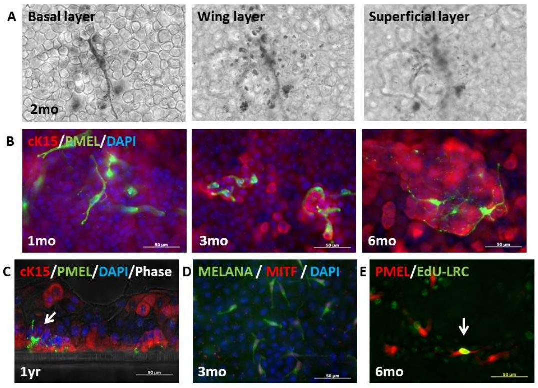

図 2：ヒト長期初代培養上皮におけるメラノサイト系細胞

培養系を用いた上皮幹細胞とメラノサイトの解析

次に、培養メラノサイトの添加が初代培養上皮に与える影響について確認した。平成 25 年度においては M254 培地に SCF と ET3 を用いて培養、継代したヒト輪部由来メラノサイトを用いたが、期待通りの結果を得られなかった。そこで、国際学会において類似の研究を行っていた Diasko 氏よりメラノサイト培養法を教示いただき、平成 26 年度にその方法を用いて継代したメラノサイトと、上皮との共培養実験を行った（図 3)。しかし、メラノサイト添加によって K15 陽性細胞の増加は

見られず、むしろメラノサイトが多い場合はメラノサイトに上皮が層状に重なり合い、組織化が不十分になるような形態を示した。また、おそらくメラノサイトの相対的な細胞数が増えるため、上皮コロニー形成率もメラノサイト数に応じて減少した。

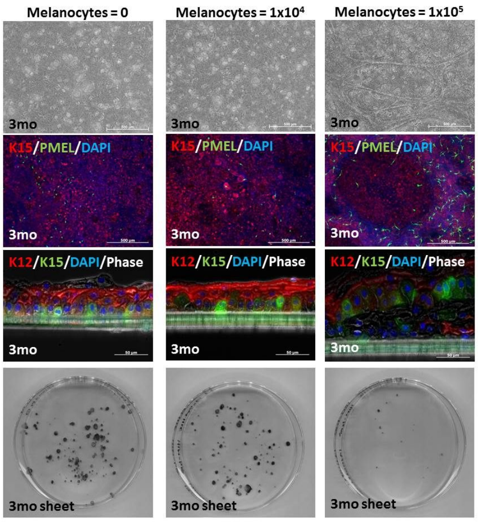

図 3：培養メラノサイト添加が初代培養上皮に与える影響

培養メラノサイト添加実験では、初代培養にもとから存在するメラノサイトが排除できず、加えて培養メラノサイトが培養の過程において新鮮なメラノサイトから性質が変化している可能性もあるため、新鮮メラノサイトを用いてメラノサイト添加/除去実験を行った（図 4）。FACS を用いてソーティングし、メラノサイトの細胞表面抗原としてc-kit(CD117)を用いた。免疫組織化学により、CD117陽性細胞の一部はMELANA陽性であることを確認した。海外ドナー角膜輪部上皮から分散した細胞には、CD117 陽性細胞が約 2%含まれた。しかし、FACS ソートの限界から、採取できたCD117陽性細胞は1000 events程度、CD117陰性細胞は7x10^4個にとどまった。次に、CD117陰性細胞を等分し、片方にCD117陽性細胞を添加、どちらもフィーダー細胞と共に3カ月間培養した。しかしながら、両者の間に差は認められなかった。

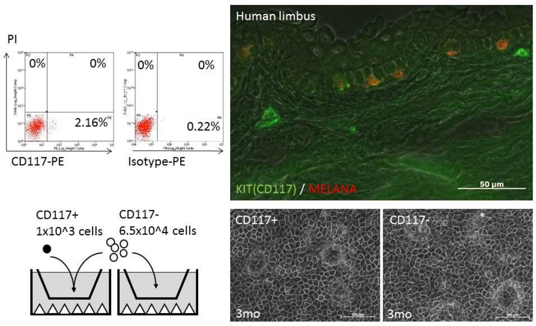

図 4： FACS を用いてメラノサイトを除去及び再添加した初代培養上皮の形態

まとめると、本研究ではメラノサイトあるいはメラノサイト幹細胞が培養下でも上皮幹細胞のニッチとして働いているという仮説のもと、一連の検証を行った。ポジティブな結果としては、輪部にメラノサイトのマスター転写因子 MITF 陽性で、メラノサイトがメラノソームを産生するときに用いられるタンパク群（PMEL, MELANA）陰性の細胞を上皮基底細胞下に観察することができた。このことは、輪部におけるメラノサイト幹細胞の存在を示唆する。また、初代培養ヒト輪部上皮が１年にわたり培養できること、この時上皮幹細胞マーカー候補K15が一部の細胞塊に限局すること、このK15陽性細胞塊とメラノサイトが共局在することを見出した。しかしながら、メラノサイト除去あるいは添加実験ではメラノサイトが上皮幹細胞を積極的に維持しているような結果は得られなかった。長期培養下においてほとんどのメラノサイトはK15陽性細胞塊と共局在する一方、メラノサイトを持たないK15陽性細胞塊がしばしば観察されることから、メラノサイトが K15陽性細胞を維持しているというよりは、むしろ毛包のようにK15陽性細胞がメラノサイトを維持している可能性が考えられた。仮説通りの結果にはならなかったものの、メラノサイトが上皮と共に１年以上培養下で存在し続けるのはこれまで類がなく、またK15陽性細胞のパターン変化も新たな知見である。特に初代培養で広く発現するK15が一部の細胞塊に限局していく再現性の高い現象は、そのままニッチ形成の過程を知るうえで有用なツールとなると思われる。何回か学会発表は行ってはいるが、研究者コミュニティにてさらなる情報共有を図るため、現在本研究内容のポジティブなデータをまとめた論文を執筆中である。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　0　件）

〔学会発表〕（計　4　件）

(1)<u>宮下英之</u>, 坪田一男, 榛村重人. 培養上皮における秩序： K15 陽性細胞、label retaining cells と rapidly proliferating cells. 第 14 回再生医療学会総会, パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）, 2015/3/19-3/21

(2)<u>Miyashita H</u>, Tsubota K, Shimmura S. Localization of label retaining cells and rapidly proliferating cells in 6-month cultured primary human limbal epithelial cell sheets. 2015 Asia-ARVO, Yokohama(Japan), Feb 16-19, 2015

(3)<u>宮下英之</u>, 坪田一男, 榛村重人. 培養上皮シートにおける Label retaining cells. 角膜カンファランス 2015, 高知市文化プラザかるぽーと（高知県高知市）, 2015/2/11-2/13

(4)Miyashita H, Tsubota K, Shimmura S. Structure and turnover rate of long-term cultured human limbal epithelial cell sheets. 2014 Annual Meeting. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Orlando(FL、USA), May 04-08, 2014

〔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〕
なし

６．研究組織

(1)研究代表者
宮下　英之（MIYASHITA, Hideyuki）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教
研究者番号：60424173

(2)研究協力者
棒村　重人（SHIMMURA, Shigeto）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授
研究者番号：00235780

庭野　博子（NIWANO, Hiroko）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・研究員
研究者番号：90748518