

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861651

研究課題名(和文) iPS細胞由来神経堤細胞による無瘢痕創傷治癒

研究課題名(英文) iPSC-derived Neural Crest Cells Promotes Scarless Wound Healing

研究代表者

安田 実幸 (Yasuda, Miyuki)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：80574912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は胎生期の無瘢痕創傷治癒に注目し、iPS細胞由来神経堤細胞の瘢痕抑制能を検討した。マウス角膜瘢痕モデルを用意し、神経堤細胞を角膜実質内に投与したところ、線維芽細胞やPBSを投与した群と比較し瘢痕形成が抑制された。GFP標識神経堤細胞をマウス角膜実質に投与したところ投与3日後には消失した。液性因子が瘢痕抑制に関与していると考え、神経堤細胞の培養上清を投与したところ、線維芽細胞の培養上清や培地だけの群と比較し瘢痕形成が抑制された。サイトカインアレイで培養上清を比較したところ、神経堤細胞の培養上清ではIL6、IL8等の抗炎症性サイトカインの値が高く、胎生期の創傷治癒と同様の傾向がみられた。

研究成果の概要(英文)：Neural crest cells (NCCs) have the ability to differentiate into various types of cells and contribute various tissues. We took notice of the multipotency of NCCs and considered the possibility that NCCs are involved in scarless fetal wound healing. To address the role of NCCs in scarless wound healing, we employed iPSC-derived NCCs and a mouse corneal scarring model. We found that iPSC-derived NCCs injection into injured mouse cornea significantly reduced the scar formation due to injury compared with fibroblast injection. Cytokine array analysis revealed that the expression patterns of cytokines in iPSC-derived NCCs correspond to that in fetal wound healing. In particular, low expression levels of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 were found. These results suggest that scarless wound healing by iPSC-derived NCCs was caused by anti-inflammatory cytokines.

研究分野：細胞生物学、角膜の再生医療

キーワード：iPS細胞 神経堤細胞 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚や角膜は強く損傷すると癒痕を残して治癒し、決して元の状態には再生されない。しかし、胎生期のある時期までは、たとえどのような深い傷を追っても癒痕を全く形成することなく完全に元の状態に再生され、この機構は胎仔創傷治癒機構 (scarless wound healing) といわれる。TGF などのサイトカイン、ヒアルロン酸などの多糖、プロテオグリカンなどの糖タンパク質や各種ホメオボックス遺伝子が機構を制御する重要な因子と考えられているが、その機構の詳細は解明されていない。最近の研究で、胎生期と成人期の創傷治癒における成長因子やサイトカインの発現の違いが明らかとなっており、胎生期における創傷治癒過程において、TGF 3 や VEGF、IL-10 の発現が高く、TGF 1 や TGF 2、PDGF、FGF2、IL-6、IL-8 の発現が低いと報告されている。また、皮膚や粘膜において TGF 3 や FGF2 の癒痕抑制効果が報告されている。各種サイトカインが重要な働きを担っていることが示唆されるが、いずれの因子が重要なのか、どのような組み合わせで働くのかは解明されておらず、scarless wound healing を再現するには至っていない。

(2) 我々は、scarless wound healing に関与する可能性がある因子として神経堤細胞に注目した。神経堤細胞は発生過程において表皮外肺葉と神経板との相互作用によって両者の境界部に誘導され、その後広範囲に胚体内を移動して様々な細胞種に分化する。角膜においては、実質細胞と内皮細胞の起源となる。我々は Scarless wound healing が起こる胎生期の環境に、幼弱な神経堤細胞が関与しているのではないかと考え、神経堤細胞が角膜における癒痕化を抑制するかを検討するため本研究計画を立案した。

(3) 今回、我々はわずかな癒痕形成も容易に視認できる角膜を観察対象として創傷治癒過程の評価を行う。角膜における scarless wound healing の機構解明は、皮膚や他臓器の粘膜等にも広く応用できると考えられる。外傷や外科手術後の癒痕形成は機能的な面だけでなく整容的な面でも大きな問題となるが、その解決法は確立されていない。神経堤細胞の癒痕抑制能とその活性の本体となる因子を明らかにすることができれば、scarless wound healing の機構の解明、癒痕を全く残さない創傷治癒の実現につながり、その意義は大きい。また、角膜においても外傷や角膜潰瘍後の創傷治癒過程で癒痕化が生じ、強い混濁は視機能障害を来す。現在、視機能障害を呈する強い角膜混濁例に対する治療として角膜移植が行われているが、ドナー不足や術後の拒絶反応といった問題に

加え、術後の視機能や外力に対する強度の面も十分ではない。また、強い角膜混濁に対する治療法として角膜移植以外の方法は現在確立されていない。scarless wound healing の機構の解明は、このような角膜混濁による視機能障害に対する新たな治療法開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

我々は、胎生期にみられる癒痕を形成しない創傷治癒機構 (scarless wound healing) に注目し、角膜実質細胞の由来となる神経堤細胞が角膜創傷後の癒痕化を抑制すると仮説をたてた。本研究は以下を検討し、scarless wound healing の機構解明を目的とする。

(1) iPS 細胞から誘導した神経堤細胞をマウス角膜創傷モデルに投与し、癒痕抑制能を確認する。

(2) 癒痕化抑制が確認された際、誘導した神経堤細胞に発現しているサイトカインを確認する。候補因子をマウス角膜創傷モデルに投与して癒痕抑制能を確認することで scarless wound healing の作用因子の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導
Nanog-GFP 陽性のマウス iPS 細胞から神経堤細胞を誘導するため SDIA 法に BMP 刺激と血清刺激を加える方法を採用する。マイトマイシン C 処理した PA6 細胞をフィーダー細胞として用い、KSR 培地で一定期間培養後、さらに FBS 培地で培養する。ヒト iPS 細胞からも同様に神経堤細胞へ誘導する。

(2) 誘導した神経堤細胞の角膜実質投与
マウス及びヒト iPS 細胞から神経堤細胞を誘導し、表面抗原マーカーを用いた FACS (fluorescence activated cell sorting) により目的細胞を分離する。誘導された細胞 10000cells/ μ l を全身麻酔下のマウス角膜実質に 5 μ l 注入する。細胞注入後、感染及び乾燥予防目的でタリビッド眼軟膏を注入眼に塗布する。また、同様の方法で対称群 (PBS、線維芽細胞) に注入し、比較評価する。

(3) 創傷作成モデル

細胞注入 12 時間後、全身麻酔下のマウスに角膜ドリル (algerbrush) を用いて角膜上皮を剥離後、実質浅層を擦過することにより創傷を作製する。

(4) 癒痕の評価

顕微鏡下での混濁の程度をグレード分類して評価し、比較検討を行う。また、生体共焦点顕微鏡を用いた角膜実質混濁の客観的評価や免疫染色法によっても同様に比較検討

する。

(5) サイトカインの発現評価

サイトカインアレイを用いて iPS 細胞から分化誘導させた神経堤細胞に発現が強い因子を確認や線維芽細胞との発現の比較により、癒痕抑制に関与する候補因子を同定する。

(6) 候補因子の癒痕抑制への影響を評価

発現しているサイトカインの投与、阻害薬と神経堤細胞同時投与により癒痕化抑制を上記の角膜癒痕モデルで検討し、癒痕抑制因子解明を目指す

4. 研究成果

(1) 癒痕モデル作成

癒痕モデルとして、角膜ドリルを用いたマウス角膜創傷モデル及び水酸化ナトリウムを用いたマウス角膜アルカリ外相モデルを用意した。前モデルは、7-10 週齢の C57BL/6J マウスを全身麻酔化で角膜ドリルを用いて角膜上皮及び実質浅層を剥離除去して作成し、創傷作成後 4 週には角膜実質の混濁が形成されることを確認した。後モデルは、7-10 週齢の C57BL/6J マウスを全身麻酔化で 0.5-1N の NaOH を 30-60 秒間角膜上に作用させることで作成した。1 週間後には角膜混濁が形成されることを確認した。混濁の評価には、顕微鏡下で撮影した前眼部写真を用いて混濁の程度をグレード分類した。混濁のないグレード 0 から瞳孔縁が確認できないグレード 3 まで 4 つのグレードに分けて半定量的に評価した。また、生体共焦点顕微鏡を用いて角膜実質を深さ 2um 毎に撮影し、その輝度を数値化して実質内の値を加算して値を Haze score として評価に用いた。

(2) iPS 細胞由来神経堤細胞の癒痕抑制効果
ヒト iPS 細胞から誘導した神経堤細胞をマウスの角膜実質内に投与した群では、ヒト線維芽細胞を投与した群や PBS のみを投与した群と比較して癒痕形成を抑制することができた。各 10 例のうち、iPS 細胞由来神経堤細胞を投与した群では 6 例がグレード 0、4 例がグレード 1 であった。線維芽細胞を投与した群では 2 例がグレード 0、4 例がグレード 1、2 例がグレード 2、2 例がグレード 2 であった。PBS のみを投与した群では 1 例がグレード 0、4 例がグレード 1、3 例がグレード 2、2 例がグレード 2 であり、iPS 細胞由来神経堤細胞投与群では線維芽細胞投与群や PBS 群と比較して有意に癒痕形成を抑制することができた。また、Haze score に関しても同様に iPS 細胞由来神経堤細胞投与群では線維芽細胞投与群や PBS 群と比較して有意に低値であった。

(3) GFP 標識神経堤細胞をマウスへ投与
角膜実質内に投与した iPS 細胞由来神経堤細胞の生着状態を確認するため、GFP で標識し

たヒト iPS 細胞由来神経堤細胞をマウス角膜実質内投与し経過観察した。投与翌日には蛍光実態顕微鏡で角膜実質内に標識細胞が確認できたが、投与 3 日後には標識細胞が確認できなかった。細胞として生着していないにも関わらず癒痕抑制効果が見られたことから iPS 細胞由来神経堤細胞から分泌される液性因子が作用に関与している可能性が考えられた。

(4) 培養上清の投与

液性因子の効果を調べるため角膜創傷治癒モデルを用いて液性因子を含むと考えられる培養上清による癒痕抑制効果を確認した。iPS 細胞由来神経堤細胞の培養上清投与群、線維芽細胞の培養上清投与群、培地のみ群を用意し(培地はすべて同じ)、創傷作成後に点眼投与し癒痕形成を確認した。iPS 細胞由来神経堤細胞の培養上清投与群では 13 例がグレード 0、8 例がグレード 1 であった。線維芽細胞の培養上清投与群では、6 例がグレード 0、13 例がグレード 1、1 例がグレード 3 であった。培地のみ群では、6 例がグレード 0、14 例がグレード 1、1 例がグレード 2 であり、iPS 細胞由来神経堤細胞の培養上清投与群では線維芽細胞の培養上清投与群や培地のみ群と比較して有意に癒痕形成を抑制することができた。このことから癒痕抑制には iPS 細胞由来神経堤細胞から分泌される液性因子が関与していると考えられた。

(5) サイトカインアレイ

iPS 細胞由来神経堤細胞から分泌されている液性因子を調べるため 3 日間培養後の培養上清をサイトカインアレイを用いて解析した。線維芽細胞を同培地で 3 日間培養の培養上清を対照として比較検討したところ、iPS 細胞由来神経堤細胞の培養上清には IL6、IL8 といった炎症性サイトカイン値が著明に低く、抗炎症性サイトカインである IL10 は同程度であった。また、TGFB1 や TGFB2 が比較的低値で、TGFB3 が比較的高値であった。これらのサイトカインの傾向は成人期と比較した胎生期の創傷治癒時の傾向と同様であった。ことから iPS 細胞由来神経堤細胞は胎生期の創傷治癒と同様の過程で癒痕を抑制する可能性が示唆された。また、iPS 細胞由来神経堤細胞の培養上清において MIF や FGF4 が比較的高値であった。

(6) 癒痕抑制因子の同定

サイトカインアレイの結果から癒痕抑制に関与する候補因子として TGFB3、IL10、MIF、FGF4 を考えた。創傷治癒モデルやアルカリ外傷モデルを用いて各々単独投与を行い効果を評価したがいずれの因子も有意に癒痕を抑制することはできなかった。線維芽細胞の培養上清に対する相対値が特に高かった MIF、FGF4 を組み合わせたの投与も行ったが有意

に癒痕を抑制することはできなかった。

(6) 今後の展望

今回の我々の検討において、iPS 細胞から誘導した幼弱な神経堤細胞が胎児期にみられる scarless wound healing のように癒痕形成を抑制することが確認された。また、その作用機序として液性因子が関与し、分泌されているサイトカインは胎児期の創傷治癒時と同様の傾向がみられたことから、胎児期の創傷治癒の環境が一部再現できている可能性がある。今回の検討では単一あるいは複数の組み合わせの癒痕抑制因子を同定することができなかったが、今後候補因子の濃度別投与や組み合わせ投与、また今回測定していないサイトカインの測定による新たな候補因子の同定等により scarless wound healing の機構解明を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

1. 吉田 悟、安田実幸、山添克弥、坪田一男、榛村重人、iPSC-derived neural crest cells accerelate scarless wound healing、Gordon Research Conference、2016年2月28日~3月4日、ベンチュラ(アメリカ合衆国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 実幸 (YASUDA Miyuki)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：80574912