

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293376

研究課題名(和文)角膜内皮細胞亜集団間コミュニケーションによる相転移制御の分子実態解明

研究課題名(英文) Paracrine interactions among human cultured corneal endothelial cells regulated the cell state transition in a paracrine fashion

研究代表者

木下 茂 (Kinoshita, Shigeru)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30116024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：分化成熟、幹細胞様増殖性及び老化形質細胞の少なくとも3種が培養ヒト角膜内皮細胞の亜集団として存在し、亜集団間情報交換をSASPやEV(miRNA、エキソゾーム)が関与すること細胞形質の動的可塑性が制御されることを示した。具体的には、成熟HCEC亜集団間のEVを介する相互作用を制御することにより、成熟分化HCECの形質を安定に保持した培養を可能にする技術基盤を確立した。本亜集団間の細胞機能の差異と相互干渉をヒト疾患病態のin vitro疑似モデルとして用い、新たな角膜内皮移植医療創出に革新的な視座を提供するとともに、亜集団間の細胞機能の動的可塑性の分子実態の解析を実施した。

研究成果の概要(英文)：MiRs in culture supernatants of HCECs were different from those selected in chCECs. miR146, 34a, and 378 were the representatives of the latter. CD44 is the key to distinguishing differentiated chCECs from either un-differentiated or chCECs with CST. The miR378 showed the gradual decrease in parallel with decreases of CD44 expression. Of note, CD44 might be repressed by wild-type p53. It is intriguing that the selected secreted miRs by comparison of mature differentiated chCECs versus chCECs with senescent-like CST or versus chCECs with distinct CD44 expression levels were mutually not overlapped, thus implicating the distinct role in the maintenance of culture homeostasis. The observed elevated secretion of exosomes in CST-chCECs might be under the regulation of p53. In regard to the secreted miRs, one of the most relevant issues that remains elusive is whether these secreted miRs are released from, and act on chCECs as inclusion molecules in exosomes.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜内皮細胞 再生医療 エキソゾーム miRNA SASP CD44 フックス角膜ジストロフィー

## 1. 研究開始当初の背景

視覚器官として重要な角膜に生じる機能不全の中で、角膜の透明性維持に必須な角膜内皮細胞 (HCEC) の機能不全の占める割合は 60% を超える。ヒト角膜内皮細胞は霊長類では増殖せず、通常 2,000-3,000 cells/mm<sup>2</sup> の角膜内皮細胞密度 (ECD) が 500 cells/mm<sup>2</sup> 未満に低下すると、角膜浮腫、ひいては、失明に至る。しかしながら、現状では、角膜内皮体性幹細胞の存在は不明確であり、培養過程における易相転移性に関わる課題なども未解決である。これら本質的な課題の解決は角膜内皮機能不全の疾患病態理解と細胞移植を用いる再生医療の基盤技術開発に必須のものとなっている。

研究代表者らは、増殖特性、エネルギー代謝特性の異なる細胞亜集団が培養 HCEC に存在すること、これら亜集団が 6 種以上の表面形質の組み合わせで識別できること、継代培養での相転移の有無で複数の分画が動的可塑性を示すことを確認している。成熟分化 HCEC の維持には特定の miRNA が重要であるとの予備知見も得ている。以上の予備的知見を角膜内皮移植医療のパラダイムシフトに結び付けるべく本研究課題に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

水疱性角膜症を中心とする角膜内皮機能不全の疾患病態の科学的理解の深化を目的とする。具体的には、成熟 HCEC に亜集団が存在することを確定し、その亜集団間の EV を介する相互作用を制御することにより、成熟分化 HCEC の形質を安定に保持した培養を可能にする技術基盤を確立する。

本亜集団間の細胞機能の差異と相互干渉をヒト疾患病態の *in vitro* 疑似モデルとして用い、新たな角膜内皮移植医療創出に革新的な視座を提供する。亜集団間の細胞間相互作用 (サイトカイン、EV を介する) による動的可塑性制御機構の分子実態の解明、レシピエント側の前房内微小環境の移植角膜内皮細胞の相転移に及ぼす作用の解明 (前房内に存在する情報伝達因子 SASP、miRNA の見地からの検討) (注: SASP: 細胞老化関連分泌経路) 5 番目の目的である長期臨床成績に優れる角膜内皮移植医療の臨床評価技術の解明には着手で

きなかった。

## 3. 研究の方法

紙面の都合で概要のみ記す。分化成熟細胞、幹細胞様増殖性細胞、および、老化形質細胞の少なくとも 3 種が培養 HCEC に亜集団として存在し、亜集団間に情報交換がなされ、SASP や miRNA、エキソゾームを介する亜集団間相互作用により細胞形質の動的可塑性が維持されることを示す。

角膜ドナー差による亜集団構成割合の解析、亜集団の細胞形質と機能的変化の対応付け、ヒト角膜内皮細胞の培養における形質の均質性の評価技術の確立、亜集団間動的可塑性の人為的制御技術の開発、レシピエント側の前房内微小環境が移植角膜内皮細胞の相転移に及ぼす作用の解明などを通じて、長期機能維持の可能な角膜内皮移植術の基盤技術を確立する。角膜内皮細胞密度の異なるヒト角膜内皮組織および培養ヒト角膜内皮細胞から total RNA を抽出、3D-Gene マイクロアレイ (東レ) を用い mRNA、miRNA の網羅的解析を行った。細胞の相転移特異的に発現に特徴的な消長を示す miRNA として幾つかの候補を選択した。選択された miRNA の mimic を相転移細胞へ導入し、81 種の機能遺伝子変動を PCR-Array を用い評価した。

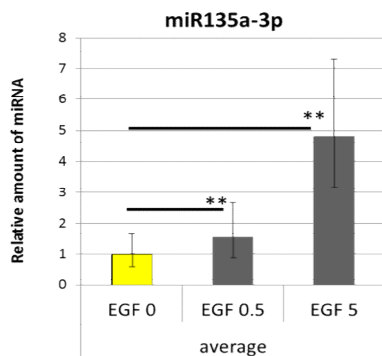
## 4. 研究成果

品質の恒常性を担保し、臨床における再生医療法の安全性と有効性との関係の照合できる安定品質を保有する製品の最終製法確定への取り組みに関連しては、移植すべき目的細胞の最終高品質規格に準拠して、最終製造法を決定した。工程管理法の候補についても選定した。最終工程の検証は TGF-β 阻害剤の有無、MAPK 阻害剤の有無、Rock 阻害剤の添加時期、MSC 馴化液の添加の必要性、最終培養工程における無血清培地の適用の可否、添加 EGF 濃度と時期に就いて実施した。工程管理法には培養上清中の SASP のモニタリングに並行して、Exosome に包含される miRNA のうち 2 種について、細胞表面抗原 CD44 の発現の高低でモニターされる細胞の成熟分化度と相関があることを確認し、現在、実用化を目指している。同時に、製法変更によりこれ

ら miRNA の増減が認められることより、目的の成熟分化 HCEC の形質を安定に保持した培養を可能にする技術基盤を確立のために Exosome に含まれる miRNA の確定は大いに有用であった (図 1 参照)。

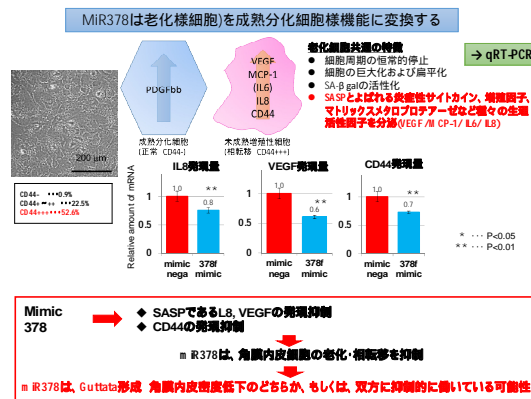
の目的に関連しては、フックス角膜内皮ジストロフィ (FECD) 患者の角膜組織や gutatta が高発現している角膜組織および *in vivo* での相転移細胞で選択的に発現する miRNA を指標とする *in vivo* 評価系を構築した。

図 1



細胞注入などにより機能検証し、細胞変性に係る候補 miRNA 分子を 2 種に絞り込んだ (図 2、3 参照)。

図 2



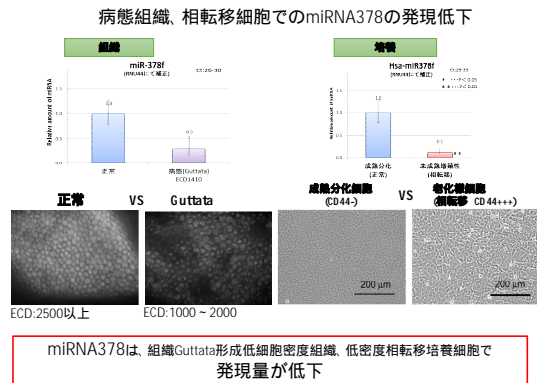
**病態の理解と病態モデルへの活用**

培養角膜内皮細胞の品質並びに FECD を含む水疱性角膜症の *in vitro* 病態モデルの作成を目的とし、細胞老化を中心とする培養内皮細胞の epigenetic な相転移変化を miRNA の視軸より解析した。組織 vs 培養細胞における mRNA の相関係数 0.7-0.8 に対し miRNA は 0.3-0.6 と低値を示し、epigenetic な遺伝子発現制御が培養角膜内皮細胞の相転移を制御していることが示唆された。相転移培養細胞亜集団間では成熟分化培養細胞内において miR-378 family 発

現が特徴的に高く、相転移や未成熟度に対応して発現量減少が確認された。

Guttata 形成低内皮細胞密度角膜内皮組織では miR-146 の発現増加に対し miR-378 family 発現は劇的に減少した。Mir-378 mimic 導入により想定された形質転換が認められるとともに TCF4 の発現変動が確認された (図 3 参照)。

図 3



非分泌型 miRNA は、細胞老化制御に重要な役割を果たすが、細胞内の miRs も種々の標的遺伝子の発現制御を介し、細胞機能を制御する、miR378は角膜内皮細胞の老化 (相転移) を抑制、Guttata 形成・内皮細胞密度低下に抑制的に働いている、miR146は培養中の細胞 ER ストレス応答に対し防御応答として機能する、細胞内老化は、分泌型 miRNA によるパラクリン細胞間情報伝達によって拡大することなどが判明した。

また、細胞移植患者の血清や前房水など臨床検体を駆使して、患者の多様性を明確にし、病態に Critical な因子を明らかにすることで、適用患者の層別化につなげ、臨床効果と照合できるようにする試みを続行中である。細胞注入効果の長期予後効果が判定される 29 年には、本研究は医師主導治験を支援するものとして本格化する。細胞移植患者 31 例に加え、角膜組織移植患者検体を 60 例、対照白内障患者 20 例の検体のサイトカインプロファイル、miRNA 解析が終了し、報文投稿のためのデータ解析中である。

目的に関連しては、正常ヒト角膜内皮細胞並びに疾患ヒト角膜内皮細胞の有する細胞特性と設定規格との整合性検証や移植細胞のロット間の同等性を担保できる機

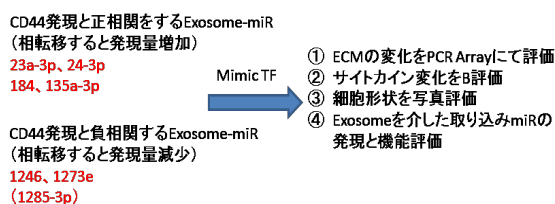
能的試験法の組み合わせを確定したがその中に可溶性 miRNA の評価試験法が含まれた。

#### 先端科学としてのエネルギー代謝視点

高品質規格の設定と先端科学に裏打ちされた細胞品質の標準化について、目的細胞のエネルギー代謝特性を指標に最終確定した。移植細胞の最終確定と最終規格化と国際標準化に向けての検討である。

目的 亜集団間の細胞間相互作用(サイトカイン、EV を介する)による動的可塑性制御機構の解明に関しては、現在佳境の研究中である。受け皿細胞側からの評価としては Exosome に暴露される細胞の CD44 発現量の低い成熟分化細胞ほど、Exosome の細胞内取り込みが少ないこと、一方、暴露される Exosome 側の評価としては、成熟分化した即ち CD44<sup>+</sup>細胞が分泌する Exosome は未熟な CD44<sup>+</sup>細胞が分泌する Exosome より取り込まれ難い傾向がみられた。このことは、受け手側の細胞が Exosome を取り込む何らかの信号を有することを示唆するとともに、Exosome 側にもパラクリン作用に係る制御因子の存在する可能性を示唆する。

現在、細胞亜集団間動的可塑性の制御に係る EV を介する細胞間相互作用を担う可能性のあるエキソソーム包含 miRNA を分化指標の一つである CD44 発現との相関の基づき、下記のように絞り込みが終了した。標的細胞への取り込みの確認、標的細胞の形質の可塑的変換を検証中である。



#### 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 11 件) 抜粋

1. Cell Homogeneity Indispensable for Regenerative Medicine by Cultured Human Corneal Endothelial Cells. Hamuro J, Toda M, Asada K, Hiraga A, Schlötzer-Schrehardt U, Montoya M,

Sotozono C, Ueno M, Kinoshita S. Invest Ophthalmol Vis Sci, 57, 11, 4749-61, 2016 (査読有)

2. Allogeneic Sensitization and Tolerance Induction After Corneal Endothelial Cell Transplantation in Mice. Yamada J, Ueno M, Toda M, Shinomiya K, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J. Invest Ophthalmol Vis Sci, 57, 11, 4572-80, 2016 (査読有)
3. Cultured Human Corneal Endothelial Cell Aneuploidy Dependence on the Presence of Heterogeneous Subpopulations With Distinct Differentiation Phenotypes. Hamuro J, Ueno M, Toda M, Sotozono C, Montoya M, Kinoshita S Invest Ophthalmol Vis Sci, 57, 10, 4385-92, 2016 (査読有)
4. MicroRNA Profiles Qualify Phenotypic Features of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. Ueno M, Asada K, Toda M, Hiraga A, Montoya M, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J. Invest Ophthalmol Vis Sci, 57, 13, 5509-5517, 2016 (査読有)
5. Metabolic Plasticity in Cell State Homeostasis and Differentiation of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. Hamuro J, Ueno M, Asada K, Toda M, Montoya M, Sotozono C, Kinoshita S. Invest Ophthalmol Vis Sci, 57, 10, 4452-4463, 2016 (査読有)
6. Concomitant Evaluation of a Panel of Exosome Proteins and MiRs for Qualification of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. Invest Ophthalmol Vis Sci, 57, 10, 4393-4402, 2016 (査読有)

[国際学会発表](計 6 件, 受賞講演 2 件) 抜粋

1. Profiles of cytokines in the aqueous humor and serum of bullous keratopathy patients. Ueno M, Toda M, Hiraga A, Wakimasu K, Koizumi N, Okumura N, Kazuko A, Sotozono C, Hamuro J, Kinoshita S. ARVO 2016 Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 2016-05-042.
2. Concomitant evaluation of a panel of

exosome proteins and miRs for qualification of cultured human corneal endothelial cells. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. ISEV2016 Annual Meeting, Rotterdam, Netherlands, 2016-05-05

〔国内学会〕(計6件)省略

〔図書〕(計1件)

1. 羽室淳爾. 培養細胞の均質性検査. 再生医療・細胞治療のための細胞加工物評価技術(佐藤陽治監修). 63-73. シーエムシー出版, 東京, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計4件)

JP2016-26423号, 培養細胞

JP2016-26424号, 再生医療技術

JP2016-26425号, 培養細胞製法

JP2016-26426号, 工程・品質管理法

以上全て

出願人: 京都府立医科大学

出願日: 28年2月15日

発明者: 木下茂、外園千恵、上野盛夫、羽室淳爾

PCT/JP2017/5386, 上記4特許

出願人: 京都府立医科大学

出願日: 29年2月14日

発明者: 木下茂、外園千恵、上野盛夫、羽室淳爾

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

木下 茂 (KINOSHITA SHIGERU)

京都府立医科大学・大学院医学研究科  
・教授

研究者番号: 30116024

### (2)研究分担者

羽室 淳爾 (HAMURO JUNJI)

京都府立医科大学・大学院医学研究科  
・特任教授

研究者番号: 80536095

上野 盛夫 (UENO MORIO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科  
・助教

研究者番号: 40426531

奥村 直毅 (OKUMURA NAOKI)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号: 10581499