

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20275

研究課題名(和文) 角膜内皮分化課程解明とそれに基づくヒトES/iPS細胞から角膜内皮細胞の分化誘導

研究課題名(英文) Induction of corneal endothelial like cells from human pluripotent stem cells through derived neural crest cells.

研究代表者

中井 義典 (Nakai, Yoshinori)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：10727910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞から、神経冠細胞をへて、角膜内皮細胞に分化を誘導する手法について研究した。様々な化学分子の中から同定されたある一定の環境で、角膜内皮に似た細胞への分化誘導を確認した。ヒトES細胞・iPS細胞から角膜内皮細胞を分化誘導する事が可能になれば、移植治療に十分な細胞数を得ることができると考えられる。

またこの手法から、ヒトが生まれる際における、角膜の正常な発達、分化を再現、想像することができるため、その過程を解明することが重要である。

研究成果の概要(英文)：Results of this study suggested that the human neural crest cells induced from human ES/iPS cells. Possessed the characteristics of cranial neural crest cells, which exhibit the potential to differentiate into corneal endothelial cells. This simple, robust, and chemically defined induction protocol enables to generate neural crest cells as an intermediate material producing terminally differentiate cells for cell-based innovative medicine.

In the future, this study will provide a highly practical system for inducing corneal endothelium from human ES/iPS cells.

研究分野：多能性幹細胞を用いた分化誘導研究

キーワード：多能性幹細胞 神経冠細胞 角膜内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

正常視機能を維持するためには、前眼部及び中間透光体が透明であることが不可欠である。特に角膜は最も前面に存在する組織であり、レンズとしての役割も果たしている。

角膜内皮細胞は角膜後面に単層分布し、角膜実質の水分を排出するポンプ機能を有しており、角膜の透明性維持に必要な細胞である。しかし体内ではほとんど増殖することができず、年齢とともに減少してゆく。これらが加齢のほか変性症や、内眼手術を含む眼外傷により障害されると、角膜が浮腫を生じて高度の視機能障害の原因となる。

現在の治療法は、角膜全層移植および角膜内皮移植のみであり、現在培養角膜内皮細胞の注入療法について開発途中である。我々の所属するグループでは、選択的 Rho キナーゼ阻害剤を応用したヒト角膜内皮細胞培養の高効率化・高品質化に成功しており (Okumura N, Ueno M et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2009; 50: 3680-7)、これらの培養細胞を用いた、前房内への角膜内皮細胞移植治療を開発中である。

しかしこれらの移植治療ではドナーの供給に限界があるのが現状であり、また他家移植であるため拒絶反応の可能性が排除できない。よって正常角膜内皮細胞を、大量にかつ非侵襲的に培養する方法が望まれる。一方で胚性幹細胞 (ES 細胞) および人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) といったヒト多能性幹細胞は、多分化能を維持しながら無限に増殖が可能な細胞である。このことから、ヒト ES 細胞・iPS 細胞から角膜内皮細胞を分化誘導する事が可能になれば、移植治療に十分な細胞数を得ることができると考えた。

2. 研究の目的

角膜内皮細胞は、角膜後面に存在し角膜を透明に維持する機能を持つ。外傷や内眼手術および変性症などによりこれらが障害されると、角膜浮腫により混濁を生じ高度の視機能障害の原因となる。治療は角膜全層移植手術や内皮移植、内皮細胞注入療法などが考えられるがその供給には限りがある。

培養ヒト角膜内皮細胞治療の細胞ソースとして、ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞・iPS 細胞) から創出された分化誘導細胞を用いることができれば、新しい再生医療の開発につながると思われる。我々は本研究において、角膜内皮細胞移植治療のためのヒト角膜内皮細胞への分化誘導方法の確立と培養の最適化を行いたいと考えた。

我々は現在まで、これらヒト多能性幹細胞から効率的に、かつ短期間で、動物由来成分不含の条件において、神経冠細胞へと分化誘導する方法を開発している。神経冠細胞とは、間葉系幹細胞や末梢神経系、および骨・軟

骨・筋肉細胞など幅広い分化能を持つ細胞集団である。

この神経冠細胞は、眼の発生においても重要で、特に前眼部では、角膜実質および内皮細胞、線維柱体細胞などが、中脳領域の神経冠細胞を発生起源とするとされている。すなわちヒト多能性幹細胞から、神経冠細胞を経て眼組織細胞を創出できる可能性が高く、これが実現すれば、新しい再生医療の開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

はじめに、次の基本手法を用いて神経冠細胞、特に中脳前方領域の細胞への高効率な分化誘導を行った。ヒト多能性幹細胞から、共培養しているマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) を除去する。MEF 除去後 2 日目に、血清不含の化学合成培地 (誘導培地) に培地交換し誘導開始する。誘導開始後 7 日目に神経冠細胞マーカー (p75) を用いて FACS により細胞を分離する。

共同研究者らとのこれまでの結果から、上記の方法によってヒト多能性幹細胞から神経冠細胞への分化誘導は高効率 (50~80%程度) に行える事が分かっている。本研究では神経冠細胞の中でも特に前眼部の発生起源となる、中脳領域の細胞群を高効率に得るべく、添加する低分子化合物の種類や濃度を変える、あるいは添加期間を変える、等により検討した。

次に、得られた分化細胞群の性質を解析した。まず FACS セルソーターによって細胞表面抗原を用いた細胞の分離を行い、各群の遺伝子発現を、RNA 遺伝子精査、免疫染色を行い確認した。

同時に中脳領域で効率に発現する遺伝子を GFP 蛍光発現するノックイン iPS 細胞を作製し、研究の効率化を図った。

またこれらの細胞群を、同性質のまま継代培養する方法を検討した。これにより迅速にかつ継続的に本研究を行うことが可能となる。

次にこれらの誘導神経冠細胞から、次の分化誘導を試みた。角膜内皮細胞への分化誘導を開始した。間葉系実質細胞や、末梢神経細胞、グリア細胞、そして角膜内皮細胞である。各内皮細胞遺伝子の発現を、RNA 遺伝子精査で確認し、さらに培養後の誘導内皮細胞を動物の前眼部に注入し、免疫染色による角膜裏面への生着を確認した。

4. 研究成果

はじめにこれまでと同様の手法で、ヒト多能性幹細胞より神経冠細胞を分化誘導した。いくつかのか低分子化合物を使用することでさらに高効率に、PAX6 陽性神経幹細胞の細

胞塊から、TFAP2A や p75 を強く発現する神経冠細胞が増殖する様子が、免疫染色法にて確認された。続いてFACS セルソーターを用い、神経冠細胞の細胞表面マーカーである p75 の発現が高値の群と低値の群とに分離し、それぞれ SOX10、TFAP2A、NGFR、および SOX1、PAX6 などの遺伝子発現を確認した。またこれらの細胞が、発生時の中脳領域に高発現する因子（中脳前方として OTX2/DLX1）（後方として HOXA2/HOXA3）を有意に発現していることを確認した。

またこれらの分化誘導細胞を、神経冠細胞の性質を維持したままで継代培養可能であるか検討した。培養におけるコーティングやいくつかの成長因子を組み合わせることで、少なくとも 10-20 回の継代培養が可能となり、さらにこれらの細胞の性質が一定であることを遺伝子発現にて確認した。このことは、今後の研究、さらに将来的な移植試料に使用するために重要で不可欠であると考えられる。

さらに中脳領域の遺伝子発現を GFP 蛍光発現する、ノックインヒト iPS 細胞の作製に成功した。これも研究の効率化に有意義である。

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）

Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media.

Makoto Fukuta, Yoshinori Nakai, Kosuke Kirino, Masato Nakagawa, Kazuya Sekiguchi, Sanae Nagata, Yoshihisa Matsumoto, Takuya Yamamoto, Katsutsugu Umeda, Toshio Heike, Naoki Okumura, Noriko Koizumi, Takahiko Sato, Tatsutoshi Nakahata, Megumu Saito, Takanobu Otsuka, Shigeru Kinoshita, Morio Ueno, Makoto Ikeya, and Junya Toguchida. PROS ONE 9(12) December 2 2104

査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0112291

オープンアクセス

〔学会発表〕（計 2 件）

1) Asia-ARV02015

Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media.

Yoshinori Nakai¹, Morio Ueno¹, Makoto Fukuta², Makoto Ikeya², Naoki Okumura³, Noriko Koizumi³, Junya Toguchida²,

Shigeru Kinoshita¹

¹Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan, ²Department of Cell Growth and Differentiation, Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University, Kyoto, Japan, ³Department of Biomedical Engineering, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyotanabe, Japan

2015.2.18

国際会議場 横浜

2) 武田薬品工業合同シンポジウム

Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media.

Makoto Fukuta^{1,2}, Yoshinori Nakai³, Kosuke Kirino⁴, Morio Ueno³, Makoto Ikeya¹, Takanobu Otsuka², Junya Toguchida¹

1.Department of Cell Growth and Differentiation, Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Japan

2.Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University, Japan

3.Department of Ophthalmology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Japan

4.Department of Clinical Application, Center for iPS Cell Research and Application, Japan

2015.12.4

京都大学芝蘭会館 京都

〔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

中井 義典 (Yoshinori Nakai)
京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医
研究者番号：10727910

(2)研究分担者

(3)研究協力者

田中 寛 (Hiroshi Tanaka)

上野 盛夫 (Morio Ueno)
京都府立医科大学・医学部附属病院・講師

佐藤 貴彦 (Takahiko Sato)
京都府立医科大学・眼科・特任助教

池谷 真 (Makoto Ikeya)
京都大学・iPS細胞研究所・准教授