

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21791665

研究課題名（和文）N-cadherin を介した角膜上皮幹細胞維持機構の解明

研究課題名（英文）N-cadherin-Mediating System for Corneal Epithelial Stem Cell Niche

研究代表者

林 竜平（HAYASHI RYUHEI）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70535278

研究成果の概要（和文）：

本研究では、N-cadherin に着目し、角膜上皮幹細胞の未分化性維持機構の解明を試みた。その結果、N-cadherin は角膜上皮幹細胞に特異的に発現し、分化に伴い速やかに失われることが明らかとなった。また、特定の培養条件において、N-cadherin をより長期間維持することが可能であったが、一方で、角膜上皮分化マーカーの発現も高い傾向を示した。N-cadherin は角膜上皮幹細胞の未分化性のみでなく、角膜上皮特異的分化に寄与している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we have attempted to clarify the mechanism of corneal epithelial stem cell niche. The result showed that N-cadherin was specifically expressed in the intracellular region of the corneal epithelial stem cells and the expression was rapidly lost during the differentiation of corneal epithelial cells. In certain culture condition, N-cadherin expression could be maintained for short period. Interestingly also in that condition, the expression of Keratin 12; differentiation marker for corneal epithelium, was increased. These results indicated that N-cadherin has important roles in not only the maintenance of “stemness” but also the corneal epithelial differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：眼科学・眼発生・再生医学

キーワード：①角膜上皮幹細胞、②幹細胞ニッチ、③N-cadherin、④組織幹細胞、⑤再生医学

1. 研究開始当初の背景

組織（体性）幹細胞は骨髄、表皮、毛包、腸管上皮、脳、精巣、角膜上皮など数多くの成体組織中に存在していることが知られている。これらの組織幹細胞は多分化能および自己複製能を有していることから、障害を受

けた組織に対する再生医療のための細胞源として注目されている。

組織幹細胞の中でも、骨髄の造血幹細胞、さらに表皮、腸管上皮、角膜上皮などの上皮系幹細胞は最も詳細に研究されている幹細胞モデルである。表皮においては、表皮幹細胞

胞は毛包部のバルジと呼ばれる特異的部位に存在していることが知られている。同様に、角膜上皮においても、**角膜上皮幹細胞は角膜と結膜の間にある輪部と呼ばれる組織の上皮基底部に存在することが知られている。**

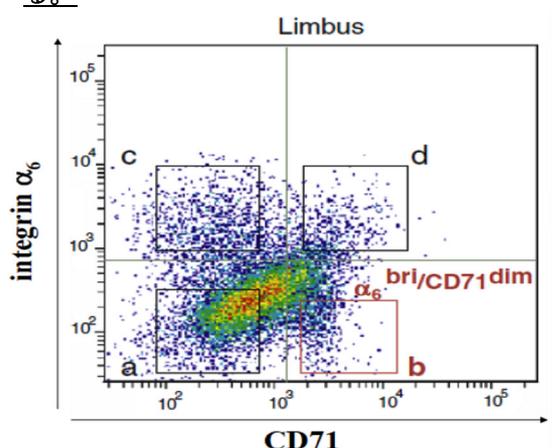


図 1. FACS による角膜上皮幹細胞の単離

角膜上皮幹細胞モデルは、未分化な角膜上皮幹細胞が存在する輪部上皮領域と、より分化した TA 細胞や分化角膜上皮細胞が存在する角膜中央部上皮が空間的に明瞭に分かれて存在していることから、上皮系幹細胞の研究用モデルとして広く利用されている。我々はこれまでに、角膜上皮幹細胞 phenotype として、side population cell (SP 細胞)を見出し、その特性を明らかとした。また、細胞表面抗原の integrin α_6 および CD71(Transferin receptor)を用いて、FACS により容易に角膜上皮幹細胞・前駆細胞を単離する方法を確立している (図 1.R Hayashi, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008)。しかし一方で、**これまでに角膜上皮幹細胞の局在や性質は明らかにされているものの、角膜上皮幹細胞維持機構、つまり「角膜上皮幹細胞ニッチ」についての詳細は明らかではない。**

幹細胞ニッチとは“幹細胞維持に必要な特異的微細環境”であり、その概念は、1978 年に Schofield らにより初めて提唱された。幹細胞ニッチ内においては、幹細胞は未分化性を維持することが可能であるが一度、ニッチから離れると、幹細胞は分化に向かい未分化性は失われると考えられる。幹細胞ニッチの構成要素としては、液性因子、細胞外基質、細胞間接着分子などの因子が関わっており、これらが複合的に作用することで、幹細胞の未分化性が維持されると考えられる。

近年、マウス造血幹細胞ニッチ形成には、造血幹細胞と骨芽細胞との N-cadherin を介した細胞接着が重要な役割を果たしていることが示された (J. Zhang, et al. *Nature.* 2003)。N-cadherin は細胞間接着を担う classical cadherin family のひとつである。この

N-cadherin による細胞間接着が、angiopoietin-1/Tie-2 シグナルの構築を介して、幹細胞の未分化性維持機構に深く関与しているとされている。これらの報告から、**造血幹細胞のニッチ形成には、N-cadherin を介した「骨芽細胞-造血幹細胞」の細胞間接着が大きな役割を果たしている**と推測された。

さらに、N-cadherin が細胞間接着分子であることから、上皮幹細胞・前駆細胞と接着して存在する細胞 (ニッチ細胞) の探索を行なったところ、メラノサイトが N-cadherin を介して角膜上皮幹細胞・前駆細胞と接着して存在していることを見出した。この事実は、N-cadherin を介したメラノサイトと上皮幹細胞との接着が、上皮幹細胞の未分化性維持に関与していることを強く示唆している。我々の報告は角膜上皮幹細胞ニッチにおいても N-cadherin が発現していることを初めて示すと同時に、**ヒト組織幹細胞モデルにおける N-cadherin の関与を初めて示した点においても大きな意義がある。**すなわちこの報告により、N-cadherin を介した細胞間接着は造血幹細胞のみでなく、角膜上皮幹細胞を初め他のヒト組織幹細胞ニッチ形成に共通する因子である可能性が示唆される。しかしながら現時点では、角膜上皮幹細胞の未分化性維持に寄与する因子や詳細な分子メカニズムについては不明である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、**N-cadherin を介した細胞間接着が幹細胞ニッチ形成に必須な因子であるという仮説に基づき、N-cadherin の関与する角膜上皮幹細胞の未分化性維持機構を解明し、in vitro における幹細胞ニッチの再構築を目的とする。**つまり、幹細胞ニッチを構成する因子のうち、特に「細胞間接着」に着目し、その有力候補としての「N-cadherin を介した細胞間接着」について特に詳細に検討する。

3. 研究の方法

a) N-cadherin 発現の確認

in vivo および in vitro の角膜輪部上皮細胞における N-cadherin の詳細な局在について、免疫染色による検討を行う。

b) 角膜上皮細胞のフィーダー培養における N-cadherin 接着阻害の効果

角膜輪部上皮は、3T3 細胞や脂肪由来間葉系幹細胞 (MSC) などをフィーダー細胞に用いて共培養することで、未分化上皮細胞を増殖させることが可能であることが知られている (Sugiyama H, et al. 2008)。これまでの我々の検討により、これらフィーダー細胞の多くが N-cadherin を発現していることを明らかとなっている。そこでまず、フィーダー細胞の

N-cadherin 発現が角膜上皮の未分化性に及ぼす影響について検証するため、フィーダー細胞の N-cadherin を siRNA もしくは中和抗体で阻害することによる輪部上皮細胞のコロニー形成能に対する効果について検討を行う。

c) 輪部上皮由来メラノサイトの単離、培養法の確立および特性解析

方法としては、ヒト研究用輸入角膜の輪部上皮をディスペラーゼおよびトリプシン処理により、上皮層を回収する。回収した細胞について、メラノサイト用培養用培地 (Kurabo: 無血清) に懸濁し、コラーゲンタイプ I でコーティングした培養皿上に播種し初代培養を行う。メラノサイト用無血清培地では上皮細胞は殆ど増殖出来ないため、継代を 2-3 回繰り返すことで輪部メラノサイトを純化する。培養輪部上皮メラノサイトの性質について、*in vivo* 輪部上皮メラノサイトとの差異を確認するために、N-cadherin 発現やメラノサイトマーカー発現などを RT-PCR および免疫染色法により検討する。

d) 表皮および輪部上皮由来メラノサイトと角膜上皮幹細胞の共培養

メラノサイトは細胞接着により幹細胞の未分化性維持を担っていると考えられるが、メラノサイトが産出するサイトカイン等の液性因子も関わっていると考えられる。そこで、**culture insert (6 well)**を用いた共培養系もしくは **conditioned medium** を用いて、メラノサイトの接着と液性因子を分けて評価する。

e) *in vitro* 角膜上皮幹細胞ニッチ機能の検証

ここまでの研究結果により明らかとされた、*in vitro* 環境で角膜上皮未分化性維持に参与すると考えられる因子を用いて、*in vitro* の幹細胞ニッチの再構築を行う。再現した *in vitro* ニッチ機能が *in vivo* と同等であるか否かを検証するために、角膜上皮幹細胞・前駆細胞あるいは既に未分化性が失われている輪部上皮 N-cadherin 陰性細胞を培養し、未分化性の維持もしくは回復が可能か否かを指標としてニッチ機能の検証を行う。

4. 研究成果

本研究では、N-cadherin に着目し、角膜上皮幹細胞の未分化性維持機構の解明を目指している。まず N-cadherin の詳細な局在の検討を免疫染色で行った。その結果、N-cadherin は上皮幹細胞マーカーの K15 と発現が一致しており、N-cadherin は K15 陽性角膜上皮幹細胞間に局在していることが示された (図 2)。

次に、N-cadherin 抗体を用いた N-cadherin 結合阻害実験を行った。その結果、中和抗体による角膜上皮幹細胞コロニーの生育に顕著な差異は認められなかった。これは、N-cadherin 抗体の濃度が十分でない、または、N-cadherin 抗体が中和抗体として機能して

いない可能性が考えられた。そこで、フィーダー細胞 (3T3細胞) 側の N-cadherin 発現を

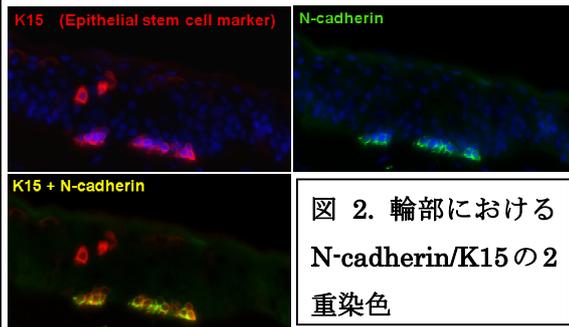


図 2. 輪部における N-cadherin/K15 の 2 重染色

siRNAにて knock down することによる、角膜上皮前駆細胞の生育への影響を検討した。その結果、N-cadherin 発現を低下させた 3T3 フィーダー上では、上皮前駆細胞のコロニー数が減少した。また、培養中における N-cadherin 発現の経時変化を検討したところ N-cadherin は他の幹細胞マーカーに先駆けて、培養後速やかに発現は失われ、Day 3 以降においてほぼ消失することが明らかとなった (図 3)。

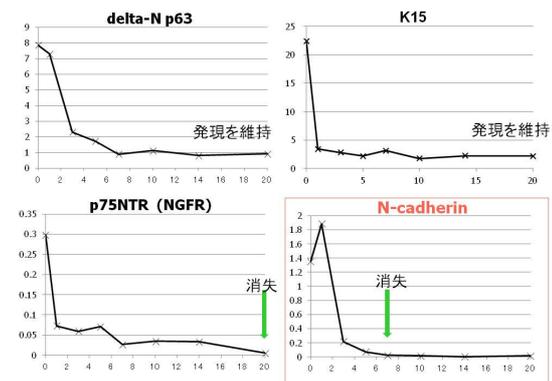


図 3. 角膜輪部上皮細胞の培養期間中における幹細胞マーカー発現の推移

以上のことから、角膜上皮前駆細胞の生育阻害は、培養初期の N-cadherin 接着阻害に起因している可能性が示唆された。さらに N-cadherin 発現を指標として、培養条件の検討を行ったところ、特定の条件において、N-cadherin の発現を維持することが可能な培養系が存在した。さらに興味深いことに、N-cadherin を維持可能な培養条件においては、同時に角膜上皮特異的マーカー K12 発現の維持も認められた (図 4)。

メラノサイトに関しては、皮膚上皮および輪部上皮に由来するメラノサイトについて、連続継代を行うことにより単離・培養することに成功した。さらに、これらの培養メラノサイトの大部分において、N-cadherin を発現していることを明らかとした。そこで培養し

たメラノサイトをフィーダーに用いた場合の角膜上皮幹細胞・前駆細胞の生育についてコ

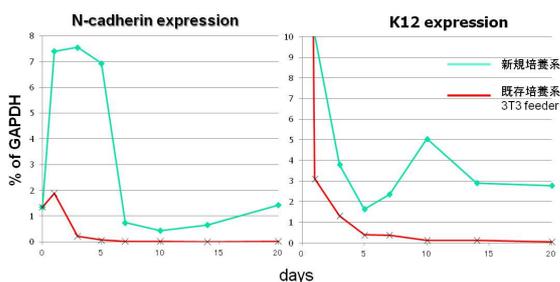


図 4. N-cadherin 維持培養系における K12 発現の推移

ロニーアッセイによる検証を行った。その結果、メラノサイトフィーダー上において角膜上皮前駆細胞はコロニーを形成しないのに対し、一方でメラノサイトの培養上清を角膜上皮前駆細胞培養系 (3T3フィーダー) に添加することで、コロニー数およびコロニーサイズの有意な増加が認められた(図5)

以上の結果から、N-cadherin を介した細胞接着 (3T3-上皮)、メラノサイトとの細胞間接着および液性因子が角膜上皮幹細胞・前駆細胞の維持・増殖に寄与している可能性を示し

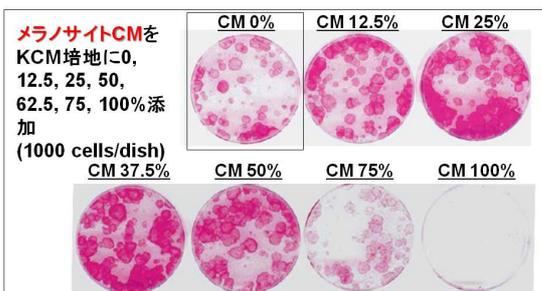


図 5. メラノサイト由来液性因子の角膜上皮幹細胞の増殖に及ぼす影響

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6件)

- ①Watanabe R, Hayashi R, Kimura Y, Kageyama T, Tanaka Y, Hara S, Tabata Y, Nishida K A novel gelatin hydrogel carrier sheet for corneal endothelial transplantation. *Tissue Engineering part A*. 2011 Sep;17(17-18):2213-9 査読有
- ②Sakurai M, Hayashi R, Kageyama T, Yamato M, Nishida K, Induction of epithelial progenitor

cells in vitro from induced pluripotent stem cells.

J Artif Organs. 2011 Mar;14(1):58-66. Epub

2011 Feb 5. 査読有

- ③Kikuchi M, Hayashi R, Kanakubo S, Ogasawara Y, Yamato M, Osumi N, Nishida K, Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma *Genes to Cells* 2011 Mar;16(3):273-81 査読有

- ④Oie Y, Hayashi R, Takagi R, Yamato M, Takayanagi H, Tano Y, Nishida K. A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol*. 2010

94:1244-1250. 査読有

- ⑤Hayashi R, Yamato M, Takayanagi H, Oie Y, Kubota A, Hori Y, Okano T, Nishida K, Validation system of tissue engineered epithelial cell sheets for corneal regenerative medicine, *Tissue Engineering Part C*, 2010 Aug;16(4):553-60. 査読有

- ⑥Soma T, Nishida K, Yamato M, Kosaka S, Yang J, Hayashi R, Sugiyama H, Maeda N, Okano T and Tano Y. Histologic evaluation of mechanical epithelial separation with an epi-LASIK procedure using the Epi-K Epikeratom, *Journal of cataract and refractive surgery*. 2009 Jul;35(7):1251-9. 査読有

[学会発表] (計10件)

- ①第2回東西角膜セミナー、invited speaker 林 竜平 2012年2月25日 東京「角膜上皮の幹細胞・前駆細胞」
- ②角膜カンファレンス 一般口演 2012年2月18日、東京「細胞シート移植後の上皮幹細胞の局在」相馬剛至、林 竜平ら
- ③第31日本炎症・再生医学会 シンポジスト 東京「角膜上皮再生医療」2011年8月5

日 林竜平、西田幸二

④第1回わかもと先進眼科医療研究会、一般口演、2011年7月29日、東京、「角膜上皮幹細胞ニッチ」、林竜平、西田幸二

⑤日本再生医療学会 シンポジスト 2011年3月1日、東京「角膜上皮再生医療」 林竜平

⑥宮崎サイエンスキャンプ ポスター発表 2011年2月25日、宮崎「角膜上皮幹細胞ニッチにおける N-cadherin 発現」 林竜平、西田幸二

⑦第34回角膜カンファレンス シンポジスト 仙台「角膜上皮幹細胞と幹細胞ニッチ」 2010年2月12日 林竜平

⑧第1回CS 特区講演会 シンポジスト 東京 「細胞シートによる角膜再生医療」 2009年10月29日 林竜平

⑨第25回日本医工学治療学会 シンポジスト 大阪「角膜幹細胞と再生医療」 2009年4月10-12日 林竜平、西田幸二

〔図書〕(計7件)

①「上皮幹細胞」MSD(メディカル・サイエンス・ダイジェスト) ニューサイエンス社 2011年 Vol.37, No8, p8-11, 林竜平

②「幹細胞を用いた角膜再生医療」ー再生医療ー日本再生医療学会誌 メディカルレビュー社 2011年 Vol10, No.2 5 p12-16, 林竜平、西田幸二

③「角膜移植の現状と再生医療への展望」 p65-p69 日本再生医療学会雑誌 再生医療 2010 2 vol.9 No.1 メディカルレビュー社 林竜平 西田幸二

④「角膜内皮・角膜上皮の再生治療」 治療学 6 特集 再生医療 ライフサイエンス出版 vol.43 no.6 2009年 p625-630 林竜平 西田幸二

⑤「角膜再生医療」 医学のあゆみ 医療細胞 Update 医歯薬出版株式会社 2009年、

Vol.229 No.9 p816-23 林竜平 西田幸二

⑥「角膜の幹細胞移植」「病理と臨床」文光堂 2009年27巻4号 p354-58、林竜平 西田幸二

⑦「角膜上皮幹細胞・前駆細胞」 遺伝子医学 MOCK 再生誘導治療・バイオマテリアル、生体シグナル因子、細胞を利用した患者のための再生治療の実際 メディカルデゥ 2009年13号 p217-220 林竜平 西田幸二

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 竜平 (HAYASHI RYUHEI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70535278

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：