

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791711

研究課題名（和文）角膜輪部上皮のニッチェにおけるエヌカドヘリンの役割

研究課題名（英文）Role of N-cadherin in the niche of corneal limbal epithelium

研究代表者

比嘉 一成 (HIGA KAZUNARI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：60398782

研究成果の概要（和文）:

角膜輪部基底層に発現する N-cadherin(N-cad)の役割を明らかにするため、組織学的解析と in vitro における前駆細胞の維持への影響について検討した。AQP1 陽性細胞(+)は上皮直下の実質側で観察され、共焦点顕微鏡においても AQP1+は N-cad+, Keratin(K)15+, p63+の輪部上皮基底層直下で観察された。電子顕微鏡においては実質細胞と上皮細胞の直接的なインターラクシオン像を観察し、N-cad+輪部基底細胞は Ca 依存性に AQP1+細胞に接着した。siRNA により N-cad の発現を減少させたフィーダーを使ったコロニー形成率は減少し、上皮シート中の K15 の発現を減少させた。N-cadherin は輪部上皮細胞の前駆細胞のフェノタイプを維持するのに重要であることが考えられた。N-cad は AQP1+の間葉系のニッチェ様細胞と N-cad+輪部上皮前駆細胞の直接的なインターラクシオンを行なうのに重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）:

To demonstrate the role of N-cadherin (N-cad), we observed the limbal basal epithelial layer by histological analysis and maintaining the progenitor status of primary human limbal epithelial cells in vitro. AQP1 positive cells (AQP1+) were observed as non-epithelial cells in the subepithelial stroma. When we made a thorough search of limbal basal cells by confocal microscopy, AQP1+ were observed in the proximity of N-cad, K15 and p63 positive limbal basal epithelial cells. Electron microscope revealed the stromal cells penetrated the epithelial basal membrane and formed calcium-dependent cellular adhesions with N-cad+ limbal basal epithelial cells. Furthermore, colonies using N-cad^{low} 3T3 cells were significantly smaller than mock-transfected cells. We then used a duplex-feeder model using two layers of either 3T3 or N-cad^{low} 3T3 cells to produce stratified epithelial sheets. Only N-cad+ 3T3 cells produced epithelial sheets with basal K15/ suprabasal K12 expression observed in limbal tissue. AQP1+ cells immediately beneath the epithelial basement membrane may be mesenchymal niche cells that directly interact with N-cad+ limbal basal epithelial progenitor cells. N-cad plays a pivotal role in the maintenance of the progenitor phenotype in cultured limbal epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：N-cadherin、ニッチェ、角膜上皮前駆細胞、siRNA、インターラクシオン

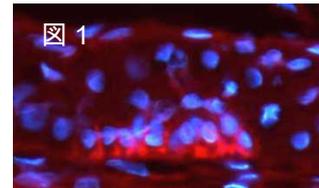
1. 研究開始当初の背景

幹細胞の周りには幹細胞を維持するための環境（ニッチ）が備わっており、最近になって脳や骨髄、皮膚などでこのニッチの研究が報告されるようになった。このニッチを携えた幹細胞は自己複製能を保ちながら、細胞を特定の組織へ長期にわたり供給し、臓器組織の恒常性の維持に機能していると考えられる。体性幹細胞は様々なストレスに耐性ではあるが、幹細胞ニッチの適切な環境維持が幹細胞の未分化の維持に必須であり、外部環境から保護していると考えられる。最近、骨芽細胞のあるポピュレーションが骨髄における造血幹細胞ニッチとして調節に携わっていることが2つのグループによって報告された(Calvi, Nature 2003; Zhang, Nature 2003)。骨髄腔の骨内膜に存在する造血幹細胞は紡錘形の N-cadherin 陽性の骨芽細胞と接着しており、この骨芽細胞が、骨髄幹細胞ニッチの構成要因の一つであることがわかってきた。骨髄幹細胞は N-cadherin 同士の接着を介して骨芽細胞に接着しており、この N-cadherin の発現は Myc とチロシンキナーゼ II によって拮抗的に調節されることも示されている。このように N-cadherin がニッチにおける造血幹細胞の維持に重要な働きをしていることが示唆される。

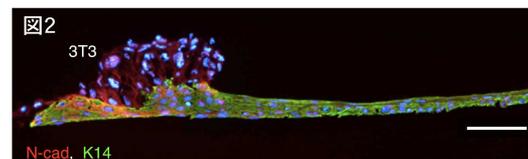
一方、角膜上皮において、実質側に接する角膜輪部基底層の細胞内顆粒が少なく最も小さい細胞（直径約 10um）群が幹細胞の候補であると考えられる(Romano, IOVS 2003)。電子顕微鏡により輪部基底細胞が小さく N/C 比が大きいことも報告されている(Chen, Stem cell 2004)。培養した角膜上皮細胞は大きさが様々で、小さい細胞群では幹細胞関連マーカーによって比較的強く染色され、大きい細胞群では分化マーカーによって強く染色される。また、輪部上皮には骨髄細胞で最も正確に造血幹細胞を現すと言われている side population(SP)細胞を含んでいることが報告された(Watanabe, FASEB Lett 2004)。この SP 細胞は角膜上皮中で最も小さい細胞群であることも分かっている。以上のことから角膜上皮の幹細胞は実質側の基底層の最も小さい細胞群であることが予想される。

我々はスティーブンス・ジョンソン症候群をはじめとする難治性の角膜疾患に対して、角膜再生のために輪部移植や羊膜上培養角膜上皮移植、培養口腔粘膜上皮移植など、さまざまな治療技術の開発を行ってきた(Tsubota, N Engl J Med 1999; Shimazaki, Ophthalmology 2002; Higa, IOVS 2007)。また、深刻なドナー不足による問題を解消すべく、角膜上皮再生のための細胞の供給源として、角膜上皮幹細胞の分離培養や輪部におけるニッチについても研究を行ってきた

(Higa, Exp Eye Res 2005; Shimmura, Mol Vis 2006; Miyashita, IOVS 2007)。また、最近では角膜輪部上皮の N-cadherin の発現についての報告もなされ、輪部における N-cadherin の重要性が示された(Hayashi, Stem cells 2007)。我々においてもこの N-cadherin が角膜輪部上皮基底層でも発現していることをすでに確認しており、ケラチン 14、15 陽性、ケラチン 12 陰性の角膜輪部上皮基底層の細胞で観察された。この N-cadherin の発現は実質側に偏って観察され(図 1 参



照)、これは造血幹細胞とそのニッチ細胞である紡錘形の骨芽細胞との接着で見られた偏った N-cadherin の発現と良く似ている。さらに、invitro のモデルとして N-cadherin が発現している 3T3 feeder を用いた角膜輪部上皮のコロニーでは feeder に接する周辺部の上皮で N-cadherin の発現が認められた



(図 2 参照)。これらのことから、N-cadherin は骨髄と同様に角膜輪部上皮においてもニッチとして重要な役割を果たしている可能性が十分に考えられる。

2. 研究の目的

そこで我々は角膜輪部上皮の幹細胞の維持において N-cadherin が機能的に重要であると仮説を立て、N-cadherin 陽性輪部上皮細胞とインターラクシオンするニッチ細胞を明らかにするとともに、N-cadherin の役割についても明らかにする。N-cadherin を用いたニッチ側からの角膜上皮再生を目指す。

3. 研究の方法

(1) N-cadherin の機能阻害は siRNA を用いて検討する。N-cadherin の siRNA を組み込んだ vector を作成し、リポフェクション法にて 3T3 フィーダーへ導入を行う。導入効率は vector に組み込まれた GFP によって確認するとともに、N-cadherin の発現が抑制されたかウエスタンブロットによっても確認する。安定して導入できた 3T3 フィーダーを用いてコロニー形成への影響を観察する。コントロール siRNA を組み込んだものをコントロールと

して上皮コロニーの形成能と増殖能を観察する。また、免疫染色によってケラチン 12、14、15、p63 等の発現についても比較検討する。安定して導入することが難しい場合は一過性に発現した 3T3 フィーダーを使用し、初期のコロニー形成への影響を検討する。

(2) 最近我々は 3T3 feeder を 2 層使って培養する duplex feeder を使うことによって、角膜輪部上皮の表現系を保ったまま、上皮シートを作成する事に成功した(Miyashita, Tissue Eng Part A 2008)。この方法で、siRNA を導入した 3T3 feeder を使う事で N-cadherin による上皮表現系への影響を検討することが出来る。その比較検討を行うため、それぞれ作成した上皮シートを免疫染色によりケラチン 12、14、15 等の発現を確認する。

(3) N-cadherin を発現したヒト角膜上皮前駆細胞とそのニッシュとの関係を明らかにするため、角膜輪部上皮基底膜直下に存在する細胞に注目し組織学的な解析を行った。組織は角膜移植後の輸入角膜輪部組織を凍結包埋したものを使用した。角膜輪部上皮下の細胞を染色するため、上皮細胞、メラノサイトで発現されないアクアポリン 1 を用いて検討した。角膜上皮の基底層に存在する上皮細胞は N-cadherin、メラノサイトは MART-1 等の抗体を用いて免疫組織染色を行い、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡を用いて組織学的解析を行った。

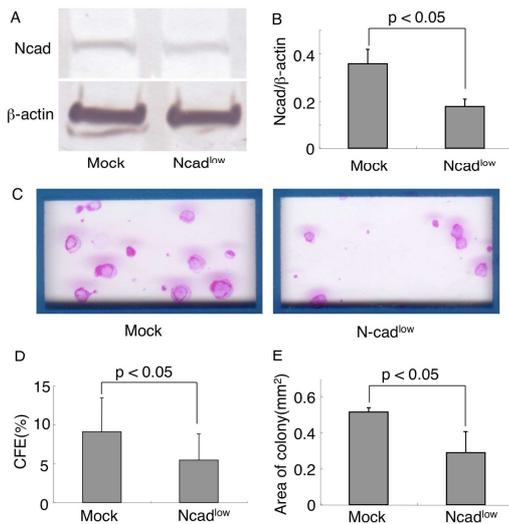
(4) 上皮細胞とその直下に存在する実質の細胞との関係を出来るだけ壊さないようにコラゲナーゼを使って細胞塊を回収した。その細胞塊の容細を調べるため、輪部上皮基底層で発現する N-cadherin と実質側の細胞で発現する AQP1 の二重免疫染色を行って、共焦点レーザー顕微鏡によって 1 μm 中における細胞同士の関係について観察した。

(5) N-cadherin 陽性の角膜上皮基底細胞と直接細胞間のインターアクションを行っていることを証明するために、N-cadherin blocking 抗体、ならびに N-cadherin FC キメラ抗体を用いて角膜輪部上皮基底細胞とその直下に存在するニッシュ様細胞との接着試験への影響を観察するとともに、上皮幹細胞の評価法の一つとしてマイトマイシン処理した 3T3 細胞のフィーダー上皮に播種し、コロニー形成能を観察した。また、フィーダーによる影響を考慮するため、フィーダーフリーの無血清培地におけるコロニー形成能についても観察した。

4. 研究成果

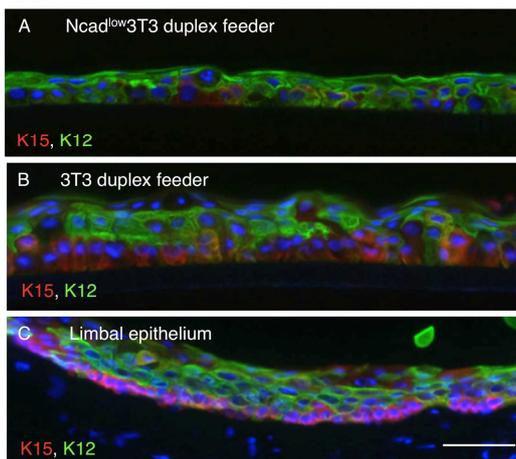
図 3 の A, B の様に N-cadherin の siRNA により発現が減少した N-cadherin^{low} フィーダー上のコロニーはコントロールと比較してコロニー形成率も面積も共に優位に減少し

図 3



た。また、角膜輪部表原型を示す K15 の発現は、N-cadherin^{low} フィーダーを使用した Duplex 培養上皮シートの基底層で減少していた(図 4)。このことから K15 陽性角膜輪部

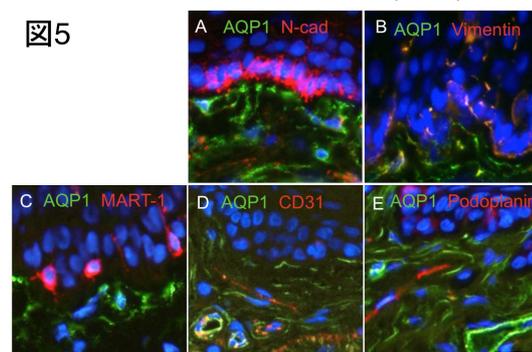
図 4



上皮細胞の未分化の維持に N-cadherin が関与していることが示唆された。

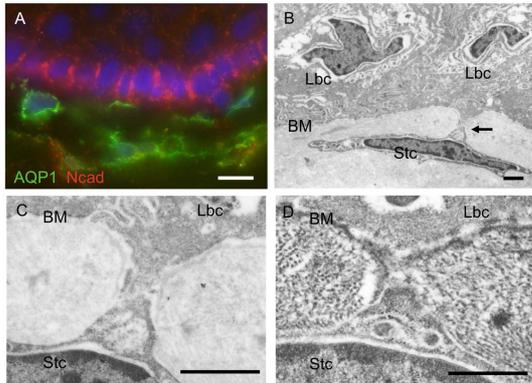
角膜輪部基底層直下には上皮中に観察されないアクアポリン 1 陽性細胞が観察され、その細胞は血管内皮を染色する CD31、リンパ管を染色する Podoplanin、メラノサイトを染色する MART-1 すべて陰性だった(図 5)。電

図 5



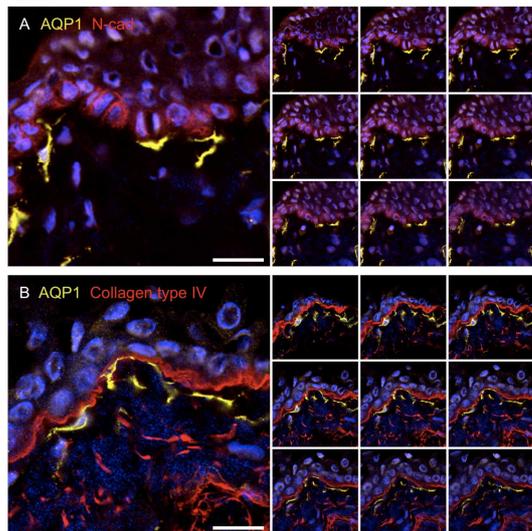
子顕微鏡では基底膜直下の細胞が基底膜を通過して輪部上皮基底細胞と接している像が観察された(図6)。さらに、共焦点レーザー

図6



顕微鏡において基底膜直下のアクアポリン陽性細胞がN-cadherin陽性の輪部上皮基底細胞に密接な状態で存在している像が観察された(図7)。骨髄幹細胞とそのニッシェ

図7



細胞のように、角膜輪部基底膜直下の細胞は、N-cadherin陽性の角膜輪部上皮基底細胞と直接細胞間のインタラクションを行っている可能性が考えられた。このように、N-cadherinは重要な働きをしている可能性が考えられる。

コラゲナーゼ処理によって回収した細胞塊ではN-cadherin陽性の輪部上皮基底細胞に密接した樹状突起をもった約100μm前後の大きなAQP1陽性細胞が存在していた(図8)。共焦点レーザー顕微鏡下で、1μmスキャンにおいて角膜輪部上皮基底細胞でN-cadherinを発現している部分に手を伸ばすかのように共存している像が観察することができた(図8矢印)。接着試験後の細胞塊を観察するとN-cadherin陽性細胞とAQP1陽性細胞との接着率が増加傾向を示していた

図8

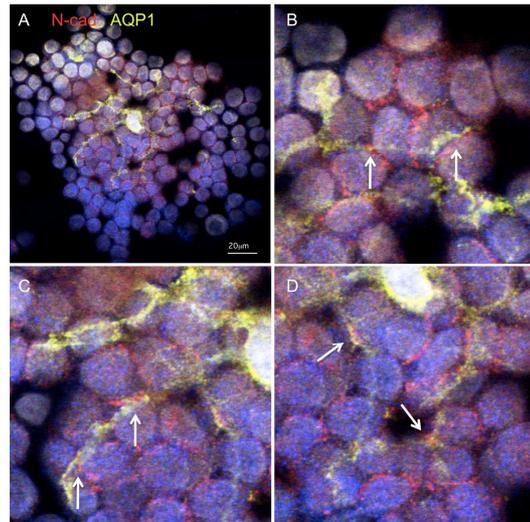
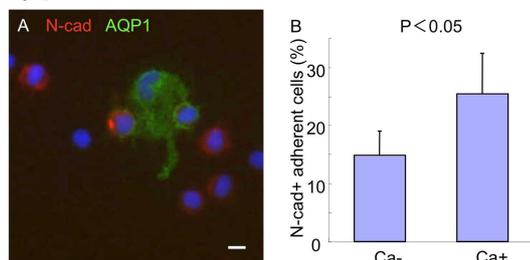
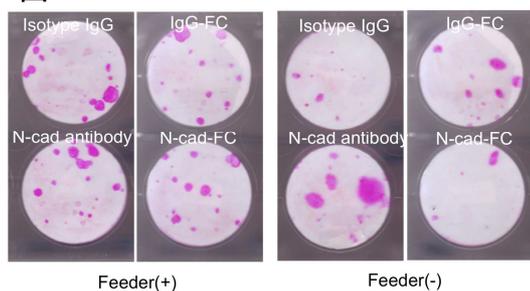


図9



(図9)。接着試験後のコロニー形成能において、フィーダーを使用した方ではN-cadherin blocking抗体ならびにN-cadherin-FCキメラによる影響を観察することは出来なかったが、フィーダーフリーの無血清培地におけるコロニー形成では優位にN-cadherin blocking抗体ならびにN-cadherin-FCキメラによる影響を観察することができた(図10)。これにより、角膜輪部基底細胞におけ

図10



るN-cadherinの発現はAQP1陽性ニッシェ様細胞への接着で重要な役割を担っていることが示唆された。

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 1 件)

Higa K, Shimmura S, Miyashita H, Kato N, Ogawa Y, Kawakita T, Shimazaki J, Tsubota K. N-cadherin in the maintenance of human corneal limbal epithelial progenitor cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 査読有, 2009; 50(10): 4640-5.

[学会発表] (計 3 件)

比嘉一成, 加藤直子, 吉田 悟, 小川葉子, 島崎 潤, 坪田一男, 榛村重人. 角膜輪部ニッチ様細胞と接する角膜輪部上皮 Tiny cells の解析 第 115 回日本眼科学会総会 2011/5/13 東京

Higa K, Kato N, Yoshida S, Ogawa Y, Shimazaki J, Tsubota K, Shimmura S. Aquaporin 1 positive mesenchymal cells imply existence of cornea limbal niche cells. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2011 Annual Meeting 2011/5/4 Fort Lauderdale, Florida, U.S.A.

比嘉一成, 加藤直子, 吉田悟, 小川葉子, 島崎潤, 坪田一男, 榛村重人. N-cadherin 陽性の角膜輪部上皮基底細胞直下に存在するニッチ様細胞. 角膜カンファランス 2011 2011 年 2 月 17 日品川

[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]

ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

比嘉 一成 (HIGA KAZUNARI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号 : 60398782