

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09461

研究課題名（和文）メチルセルロースを用いた角膜輪部上皮オルガノイドの長期培養法の確立

研究課題名（英文）Establishment of long-term culture method of limbal organoids using methylcellulose.

研究代表者

比嘉 一成（Higa, Kazunari）

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60398782

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：化粧品や医薬としても利用されているメチルセルロースを用いて、角膜輪部組織から分離したオルガノイドの維持培養法を構築し、角膜再生への応用が可能な移植方法について検討した。培養1ヶ月後においてメチルセルロースを用いても比較的小さいが、オルガノイドを形成した。輪部機能不全モデルのウサギ輪部上皮下にポケットを作成し、移植したところ、移植1週間後において移植部位から角膜に向かって抗ヒト核抗体陽性のkeratin12陽性上皮の進展が観察された。このことから、輪部機能不全モデルのウサギへ移植したオルガノイドは輪部に生着し、角膜に上皮を供給できる可能性が考えられ、移植法としても有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で申請者が確立してきたオルガノイド作成法は他の上皮細胞の分離法に比べ細胞周囲の環境を崩さずに採取できるため、幹細胞ニッチの環境を維持していると考えられる。また、異種由来成分が含まれるマトリゲルに変わりすでに化粧品や医薬としても利用されているメチルセルロースを用いてオルガノイド培養法を確立できたことは大きな進歩であり、再生医療新法下で角膜再生への応用が可能な移植法を確立することができたことから、今後、輪部機能不全を伴った難治性の疾患に対する上皮細胞供給の拡大が期待される。

研究成果の概要（英文）：To establish a cultivation method with the limbal epithelial stem cells niche, we performed spheroidal cultivation using methylcellulose, and to investigate whether limbal organoids were engrafted to the limbus, we transplanted human limbal organoids in a rabbit limbal deficiency model. Limbal organoids with a limbal phenotype can be maintained for up to 1 month using methylcellulose. Limbal organoids were successfully engrafted in a rabbit limbal deficiency model. Immunohistochemistry against human nuclei confirmed the presence of organoid-derived cells migrating on to host corneas. Our data suggested that limbal organoids are engrafted to the limbus of a rabbit limbal deficiency model and supply corneal epithelial cells, and that organoids may be an efficient cell source for clinical use.

研究分野：眼科学

キーワード：オルガノイド 角膜上皮幹細胞 細胞治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

角膜は体内にある臓器と異なり、直接外界に接する透明な組織である。「見る」という行程において、角膜は外界から網膜へ光を届ける重要な最初の組織であり、角膜の透明性が失われると視力低下をきたす。角膜の疾患において、スティーブンス・ジョンソン症候群やシェーグレン症候群など角膜上皮の障害によるものが存在する。これらは角膜周辺部の輪部に存在する角膜上皮の幹細胞が障害を受け、角膜への角膜上皮の供給ができなくなることが原因となっている。この角膜輪部機能の破綻(輪部機能不全)により、周辺から透明性の低い結膜や線維芽組織などの侵入によって透明性が失われる。このような輪部機能不全を伴った疾患に対し、角膜上皮の幹細胞が存在する輪部やその培養上皮シートの移植が行われてきたが、これらに使用する組織は片眼性の疾患の場合、反対眼の正常な限られた輪部を使うことになり、リスクを伴う。また、両眼性の疾患の場合には、ドナー角膜輪部を用いることも可能であるが、拒絶反応などのリスクを伴うため、角膜上皮の代わりに自己の口腔粘膜を用いた培養上皮シートの移植も行われてきた。このように角膜の難治性疾患に対する様々な研究や移植が行われてきたが、必要な時にすぐに移植が行えるものではなく、患者がこれらの治療を受けられるのは限定的で、新たな角膜の再生法の確立が期待されている。

角膜上皮の恒常性を維持するためには角膜上皮幹細胞を維持することが重要である。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、臓器組織の恒常性を維持している。その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(Zhang, Nature 2003; Tumber, Science 2004; Alvarez-Buylla, Neuron 2004)、この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、外部環境から幹細胞を保護していると考えられている。必要に応じた患者への供給を行うためには、長期にわたる幹細胞並びにそのニッチの維持・培養法を確立することが重要である。

我々はこれまで、角膜上皮の幹細胞/前駆細胞を維持するようなニッチの環境因子として、N-cad、Melanocyte、SPARC や低酸素などに注目して研究をおこなってきた(Higa, Exp Eye Res 2005; Shimmura, Mol Vis 2006; Miyashita, IOVS 2007; Higa, IOVS 2009; Higa)。その中で、平成 21 年度からの科研費研究によって、我々は N-cad 陽性の角膜輪部上皮直下で直接上皮と相互作用するニッチ様の実質側の細胞(Aquaporin-1 陽性細胞)が存在することを見出した(Higa, Stem Cell Res 2013)。この結果をもとに平成 24 年度より行った科研費研究により、角膜上皮幹細胞とニッチを保ったまま培養可能なモデルとして、角膜輪部組織から分離した輪部上皮基底細胞周辺の細胞塊(オルガノイド)の維持培養法を確立した。この培養法では上皮未分化マーカーを維持するオルガノイドを 1 つの輪部組織から約 800 個作成することが可能であり、そのまま少なくとも 1 カ月以上維持でき、かつ 1 個のオルガノイドから角膜輪部上皮と同様のフェノタイプを示す上皮シートを作成することができた。しかし、臨床応用、特に今後の再生医療新法下で再生医療を行う上では自己組織の使用が望ましく、この場合細胞源の組織がごく少量となることが予想される。そこで、平成 27 年度より行った科研費研究により、ごく少量の輪部組織からでも角膜輪部上皮のフェノタイプを維持したオルガノイドが作成できることを明らかにしてきた(Higa, Stem Cell Res 2020)。これまでのオルガノイド作成には基底膜成分を多く含んだマトリゲルを使用している。しかし、このマトリゲルは異種由来成分も含んでいるため、再生医療新法下で再生医療を行う上ではハードルが高いことも想定される。

2. 研究の目的

これまでに申請者が確立してきたオルガノイド作成法は他の上皮細胞の分離法に比べ細胞周囲の環境を崩さずに採取できるため、幹細胞-ニッチェの環境を維持していると考えられる。本研究では、我々がこれまで積み重ねてきた培養技術を駆使し、マトリゲルに変わりすでに化粧品や医薬としても利用されているメチルセルロースを用いて、角膜輪部組織から分離したオルガノイドの維持培養法を構築し、再生医療新法下で角膜再生への応用が可能な移植法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) メチルセルロースを用いたオルガノイドの維持培養条件の検討

培養条件は連携協力者（宮下）と協力して行った。輸入角膜の輪部組織をコラゲナーゼ処理し、上皮とその直下周辺組織を回収し、角膜輪部フェノタイプを維持する KGF+Y27632 添加培地を用いてメチルセルロース中で培養した。

(2) オルガノイドの組織学的解析

作成したオルガノイドを回収し、組織切片を作成した。組織学的解析はヘマトキシリン・エオジン（H.E.）染色ならびに免疫染色にておこなった。免疫染色は角膜輪部基底層で発現する N-cadherin、角膜輪部上皮のフェノタイプを示す Keratin15 ならびに p63、基底膜で発現する Laminin ならびに Collagen type IV、角膜上皮の分化マーカーとして Keratin12 の抗体を用いて行った。

(3) オルガノイドの増殖能の解析

作成したオルガノイドを回収し、増殖能について解析した。増殖能の解析は回収したオルガノイドをシングルセルに分離し、コロニー形成能で観察する。コロニー形成能は Rhodamine B 染色にておこなった。

(4) 移植法についての検討

オルガノイドの移植条件を検討するため、ウサギに輪部機能不全モデルを作成し、オルガノイドの眼表面への移植を行った。移植法はこれまですでに臨床で行われている角膜輪部移植を参考にした。また、オルガノイドを生着させるために、組織接着剤等を使用し、移植後の安定を図る工夫を行った。

(5) 移植後の経過観察

移植後はスリットランプ、フルオレセイン染色等を用いて角膜上皮の経過を観察した。

(6) 移植後の組織学的解析

移植後の組織学的解析を行うため、H.E. 染色ならびに角膜上皮のフェノタイプであるケラチン 3 / 12 の免疫染色を行った。また、移植したオルガノイドから上皮が作られたものか判断するためにヒト核に対する抗体等で確認した。

4. 研究成果

培養 1 ヶ月後においてメチルセルロースを用いても比較的小さいが、オルガノイドを形成することがわかった。このオルガノイドを回収し mRNA レベル並びにタンパクレベルでの発現を確認するため、免疫染色並びに RT-PCR を行ったところ、角膜輪部上皮のフェノタイプである K15 並びに p63 の発現を維持していることがわかってきた。また、角膜上皮の幹細胞マーカーの一つとして考えられている N-cadherin においても、mRNA レベル並びにタンパクレベルで発現を確認することができた。さらに、形成したオルガノイドの増殖能を調べるため、コロニー形成能についても検討したところ、増殖能を示すコロニーを形成することがわかった（図 1）。

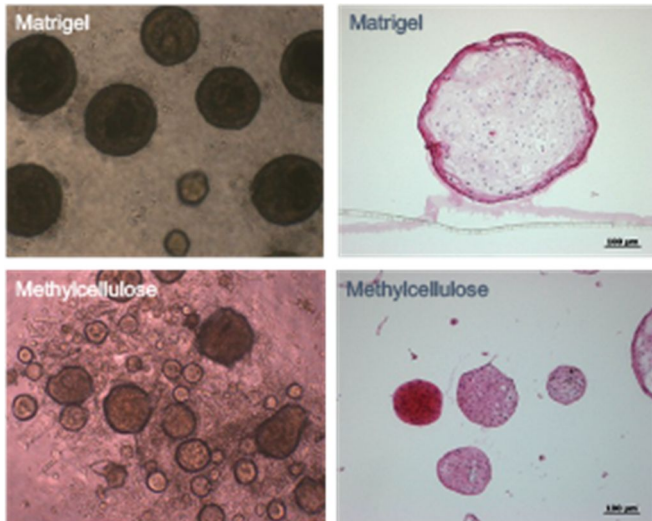


図1) 培養1ヶ月後のオルガノイドの比較。上段：マトリゲルを用いて作成したオルガノイド。下段：メチルセルロースを用いて作成したオルガノイド。左側：培養中のオルガノイド。右側：H.E.染色。

メチルセルロースはオルガノイドを形成するが、比較的小さかったため、メチルセルロースにコラーゲン並びにES細胞等を培養時に効果的なラミニン511を添加することによるオルガノイド形成の培養条件の改善を試みた。コラーゲン添加することにより、上皮シート化する現象が観察されたが、コラーゲン添加の割合を変化させることにより、オルガノイドが形成され、さらにコラーゲンの添加具合を変化させることでオルガノイド形成にも影響することがわかった。また、ラミニン511の添加を試みたところ、こちらもオルガノイド形成に影響があることがわかった。しかし、それ以上の効果は観察されなかったため、現在別条件での効果について観察中である。

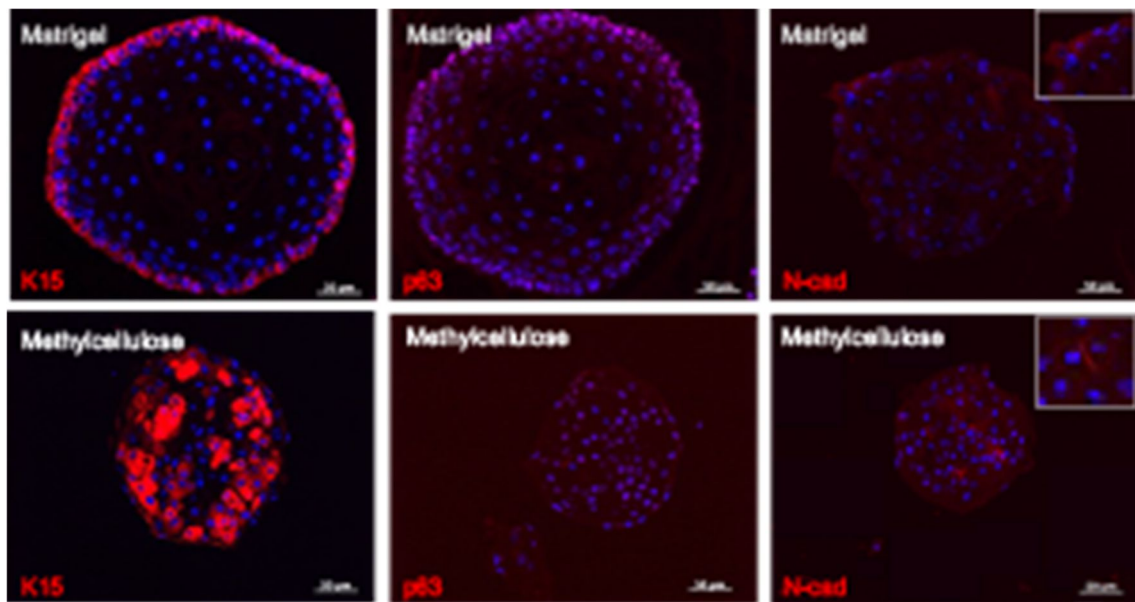


図2) 免疫染色(左側: keratin15, 中央: p63、右側: N-cadherin)におけるオルガノイド(上段: マトリゲル、下段: メチルセルロース)の比較。

メチルセルロースにおいて作成したオルガノイドはマトリゲルにおいて作成したオルガノイドと比較して構造的に異なっていることがわかってきた。マトリゲルで作成したオルガノイドでは周辺部に基底膜を作成しその周辺部に比較的未分化な細胞が存在していたのに対し、メチルセルロースで作成したオルガノイドでは中央付近で基底膜を作成しその中央付近で比較的未分化な細胞が存在していることがわかった(図2、3)

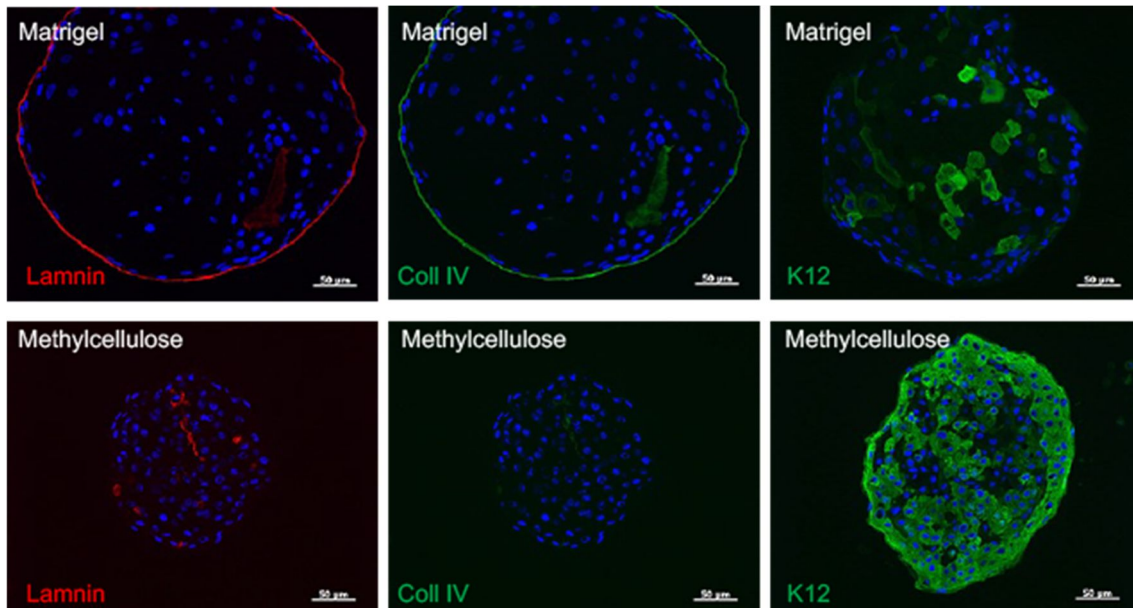


図3) 免疫染色(左側:Laminin, 中央:Collagen type IV、右側:Keratin12)におけるオルガノイド(上段:マトリゲル、下段:メチルセルロース)の比較。

これにより、幹細胞を維持するニッチはメチルセルロースで作成すると比較的中央部分に存在して維持されている可能性が考えられた。

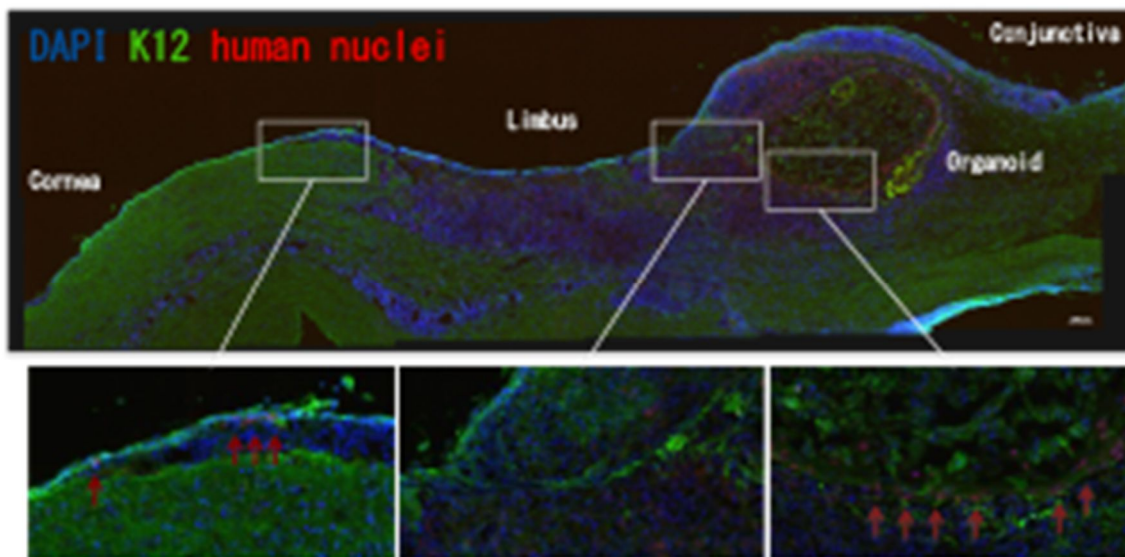


図4) 輪部機能不全モデルにおけるオルガノイド移植1週間後の輪部組織の免疫染色(緑:keratin12、赤:ヒト核、青:核染色)下段左側:角膜側の拡大写真、下段中央:オルガノイド移植開口部、下段右側:移植したオルガノイド。赤矢印:抗ヒト核陽性細胞。

培養1ヶ月後、輪部機能不全モデルのウサギ輪部上皮下にポケットを作成し、生体組織接着剤を用いてオルガノイドを移植した。移植1週間後において移植部位から角膜に向かって抗ヒト核抗体陽性のkeratin12陽性上皮の進展が観察された(図4)。このことから、輪部機能不全モデルのウサギへ移植したオルガノイドは輪部に生着し、角膜に上皮を供給できる可能性が考えられ、移植法としても有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Higa Kazunari, Higuchi Junko, Kimoto Reona, Miyashita Hideyuki, Shimazaki Jun, Tsubota Kazuo, Shimmura Shigeto	4. 巻 49
2. 論文標題 Human corneal limbal organoids maintaining limbal stem cell niche function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102012 ~ 102012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2020.102012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Higa, K; Higuchi, J; Kimoto, R; Miyashita, H; Shimazaki, J; Tsubota, K; Shimmura, S
2. 発表標題 Human limbal organoid transplantation in a rabbit limbal deficiency model.
3. 学会等名 The Association for Research in Vision and Ophthalmology- Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 比嘉一成、樋口順子、木本玲緒奈、宮下英之、島崎潤、坪田一男、榛村重人
2. 発表標題 輪部機能不全モデルウサギへの角膜輪部オルガノイド移植
3. 学会等名 角膜間ファラクス2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 比嘉一成、樋口順子、木本玲緒奈、宮下英之、島崎潤、坪田一男、榛村重人
2. 発表標題 角膜輪部オルガノイドの輪部機能不全モデルへの移植
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 比嘉一成、樋口順子、木本玲緒奈、宮下英之、島崎潤、坪田一男、榛村重人
2. 発表標題 メチルセルロースを用いたヒト角膜輪部オルガノイドの培養
3. 学会等名 角膜間ファラクス2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 比嘉一成、樋口順子、木本玲緒奈、宮下英之、島崎潤、坪田一男、榛村重人
2. 発表標題 ヒト角膜輪部オルガノイド培養におけるメチルセルロースの応用
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	榛村 重人 (Shimmura Shigeto) (00235780)	慶應義塾大学・医学部・准教授 (32612)	
連携研究者	宮下 英之 (Miyashita Hideyuki) (60424173)	慶應義塾大学・医学部・助教 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------