

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592072

研究課題名(和文) 上皮系幹細胞採取法に基づくヒト角膜輪部幹細胞マーカーの同定および分離法の確立

研究課題名(英文) Identification of human corneal limbal stem cell markers based on the method of epithelial cell-lineaged stem cell isolation

研究代表者

山上 聡 (YAMAGAMI SATORU)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10220245

研究成果の概要(和文)：細胞外基質であるラミニン5を高発現する高付着能細胞を単離することを利用した幹細胞単離法により扁平上皮である結膜上皮幹細胞の単離を試みた。結果としてヒト結膜から、組織形成能がある結膜上皮幹・前駆細胞の単離が可能であり、我々は、この細胞を増殖因子の影響下に上皮系細胞と杯細胞という全く異なった細胞に分化誘導できた。今後この結膜上皮幹細胞と角膜輪部幹細胞の比較から分離マーカーが同定される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We tried to isolate human conjunctival epithelial progenitor cells using laminin-5 expressing highly adherent cells isolation method. As a result, we have isolated conjunctival epithelial progenitor cells, which could differentiate into epithelial cells and goblet cells. Our data suggest that we can identify isolation marker by comparing character between conjunctival and corneal limbal stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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：角膜上皮細胞、幹細胞、ラミニン5、結膜上皮細胞、杯細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は、non-tissue culture dish、つまり通常は付着培養を行うためにもちられない浮遊培養用の培養皿を用いて単一細胞化した角膜輪部上皮細胞を培養すると非常に増殖能のよい細胞だけが付着することを見いだした。また同じ方法で角膜中央部の増殖能の弱い細

胞を培養しても全く細胞は培養皿に付着しなかった。そこでこの新しいヒト角膜輪部幹細胞分離法により細胞が濃縮されるメカニズムに着目した。

この分離法の原因蛋白の候補としてマスペクトロメーターによる解析を行ったところラミニン5が見いだされた。それは角膜上皮

基底層に多く発現し、また高い接着能を示す角膜輪部上皮幹細胞の特徴とよく一致するからである。実際にラミニン5は上皮細胞基底部にその蛋白が発現していた。また抗ラミニン5抗体を予め反応した後に、この新しいヒト角膜輪部幹細胞分離法を試みたところ、増殖能のたかい細胞は採取されず、コントロール抗体を反応させた群では通常通り幹細胞様細胞が分離された。

以上の結果からラミニン5を理論的支柱とする角膜輪部上皮幹細胞採取法が確立したが、角膜輪部上皮幹細胞の特異マーカーは依然として同定されていなかった。

2. 研究の目的

ヒト角膜輪部上皮幹細胞のマーカーを同定すること。

3. 研究の方法

角膜上皮と結膜上皮は分化した段階では発現する細胞分化マーカーが大きく異なり異なった性質を有している。そこで、幹細胞レベルでの輪部上皮細胞との違いを明らかにすることで細胞特異的マーカーが見つかるのではとの仮説のもと、まず結膜上皮の幹細胞の分離、同定を試みた。方法は、研究用ドナー角膜から結膜上皮を採取し、輪部上皮幹細胞採取と同様の方法で結膜上皮の幹細胞採取を行った。

4. 研究成果

ヒト結膜から、組織形成能がある結膜上皮幹・前駆細胞の単離が可能であった。我々は、この細胞を増殖因子を換えることで上皮系細胞と杯細胞という全く異なった細胞に分化誘導できた。今後角膜輪部上皮幹細胞と結膜上皮幹細胞を未分化な状態で比較することで特異マーカーの同定を試みる予定である。

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12件)

- ①. Yamaguchi M, Ebihara N, Shima N, Kimoto M, Funaki T, Yokoo S, Murakami A, Yamagami S. Adhesion, migration, and proliferation of cultured human corneal endothelial cells by laminin-5. *Investigative*

Ophthalmology & Visual

Science;52:679-84, 2011 査読有

- ②. 山上 聡. 羊膜を使った角膜再生. 治療 92: 176-180, 2010. 査読無
- ③. Mimura T, Yamagami S, Uchida S, Yokoo S, Ono K, Usui T, Amano S. Isolation of adult progenitor cells with neuronal potential from rabbit corneal epithelial cells in serum- and feeder layer-free culture conditions. *Molecular Vision* 24;16:1712-1719, 2010. 査読有
- ④. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Amano S. Selective isolation of young cells from human corneal endothelium by the sphere-forming assay. *Tissue Engineering Part C Methods*. 16:803-812, 2010. 査読有
- ⑤. 山上 聡. スティーブンス・ジョンソン症候群. 全身疾患と眼所見 *Current Therapy* 27: 50-52, 2009. 査読無
- ⑥. Sugita S, Usui Y, Horie S, Futagami Y, Yamada Y, Ma J, Kezuka T, Hamada H, Usui T, Mochizuki M, Yamagami S. Human corneal endothelial cells expressing programmed death-ligand 1 (PD-L1) suppress PD-1⁺ T helper 1 cells by a contact-dependent mechanism. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50: 263-272, 2009. 査読有
- ⑦. Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, Yokoo S, Usui T, Amano S, Mizuki N. Immunologic mechanisms of corneal allografts reconstituted from cultured allogeneic endothelial cells in an immune-privileged site. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50: 3151-3158, 2009. 査読有

- ⑧. 山上 聡 拒絶反応の無い理想的な角膜移植手術を目指して -全層角膜移植から内皮細胞移植へ- 日本眼科学会雑誌 112:266-278, 2008. 査読有
- ⑨. Mimura T, Amano S, Yokoo S, Uchida S, Usui T, Yamagami S. Isolation and distribution of rabbit keratocyte precursors. **Molecular Vision** 14: 197-203, 2008. 査読有
- ⑩. Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, Yokoo S, Usui T, Amano S, Mizuki N. A mouse model of allogeneic corneal endothelial cell transplantation. **Cornea** 27: 699-705, 2008. 査読有
- ⑪. Yokoo S, Yamagami S, Usui T, Amano S, Araie M. Human corneal epithelial equivalents for ocular surface reconstruction in complete serum free culture system without unknown factors. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 49: 2438-2443, 2008. 査読有
- ⑫. Yokoo S, Yamagami S, Shimada T, Usui T, Sato T, Amano S, Araie M, Hamuro J. A novel isolation technique of progenitor cells in human corneal epithelium using non-tissue culture dishes. **Stem Cells** 26: 1743-1748, 2008. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ①. Yamagami S, Yokoo S. Fibroblast growth factor 2 promotes differentiation of human keratinocyte progenitor cells to goblet cells. ARVO (The Association for Research in Vision and

Ophthalmology) Fort Lauderdale, USA, 2010年5月3日.

- ②. 横尾誠一 浮遊細胞用培養皿を用いたヒト角膜輪部上皮前駆細胞の新規単離法” 第114回日本眼科学会総会 日本眼科学会学術奨励賞記念講演. 2010年4月17日
- ③. 横尾誠一、山上聡、天野史郎、新家真” EGF刺激による角膜輪部上皮前駆細胞の細胞内シグナル伝達経路” 第114回日本眼科学会総会 2010年4月15日
- ④. 横尾誠一、山上聡、天野史郎、新家真” KGF添加無フィーダー細胞・無血清角膜上皮細胞シートのサイトケラチン15の発現 第34回角膜カンファランス・第26回日本角膜移植学会 2010年2月11日
- ⑤. 山上聡 角膜内皮細胞の免疫学的特徴と再生医療への期待 第 63 回日本臨床眼科学会 福岡市、2009年10月9日
- ⑥. 横尾誠一、臼井智彦、三村達哉、杉崎顕史、天野史郎、山上聡 ヒト角膜輪部上皮前駆細胞の分化能の検討” 第113回日本眼科学会総会 2009年4月17日
- ⑦. Yamagami S, Yokoo S, Usui T, Amano S. A novel isolation technique of limbal epithelial progenitor cells using uncoated dishes. ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Fort Lauderdale, USA, 2008年5月1日.
- ⑧. 山上聡 眼科幹細胞研究の現状. 角膜の幹細胞研究. 第112回日本眼科学会総会シンポジウム、横浜市、2008年4月17日.
- ⑨. 横尾誠一 ヒト角結膜の組織幹細胞・前駆細胞の特徴 シンポジウム 眼科幹細胞研究の現状 第112回日本眼科学会総

会 2008年4月17日

〔図書〕（計1件）

横尾誠一、山上 聡

ヒト角膜の前駆細胞・組織幹細胞の分離
細胞分離・操作技術の最前線 278-286, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者 山上 聡

(YAMAGAMI SATORU)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10220245

(2) 研究分担者 横尾 誠一

(YOKOO SEIICHI)

東京大学・医学部・特任研究員

研究者番号：20345052