

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 6月 4日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659310

研究課題名（和文） 組織幹細胞と癌との類似性に関する研究

研究課題名（英文） A research about the similarity with an organization stem cell and the cancer

研究代表者

横尾 誠一（YOKOO SEIICHI）

東京大学 医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：20345052

研究成果の概要（和文）：

眼表面原発性の腫瘍の入手が困難であった。そのため細胞株の検索を行ったが、細胞株も無い。そのため将来コントロールデータとなる正常角膜上皮幹細胞のデータを蓄積すべき種々の検討を行った。

角膜上皮に増殖効果が報告されている増殖因子を検討したところ、EGFの他に、腫瘍増殖因子 α (TGF α)、肝細胞増殖因子(HGF)、ケラチノサイト増殖因子(KGF)が角膜上皮の増殖に効果が位著しいことが判明した。特にEGF, KGF, TGF α においては三週間の培養で角膜上皮組織の作製まで可能であった。これらの増殖因子のうち、EGFのみの添加で角膜上皮様組織を作製した場合、角膜輪部上皮に発現が認められる未分化マーカー候補、サイトケラチン15(CK15)などの発現が見られないことが判明した。

増殖した角膜上皮形態はEGFではやや扁平化しているが、KGF添加のみで作製した角膜上皮様組織は基底細胞が円柱状である。そこで未分化マーカーCK15の検討を行ったところ、KGFのみを添加した培養液で作製した角膜上皮様細胞シートは、角膜輪部に発現している未分化マーカーCK15の発現が見られるようになった。他の未分化マーカー候補も検討したところ、EGF添加が培養した幹細胞由来角膜上皮シートでは、一切発現が見られず、KGFの添加によってp63, p75NTR, N-Cadをはじめ、様々な未分化マーカーの発現が見られた。これらの結果より、上皮幹細胞の未分化性の維持や発揮にKGFが強く関与していることが考えられる。またこれらのマーカー発現の事実より、無血清・無フィーダー培養条件でKGFの添加により、角膜上皮細胞シートではなく、より移植に適した角膜輪部上皮細胞シートが作製可能となった。

研究成果の概要（英文）：

It was difficult to obtain the cancer which broke out on the surface of eyes. Therefore I searched the cell line, but there is not the cell line derived from the surface of eyes. Therefore I performed various kinds of examination that should have accumulated data of the normal corneal epithelial stem cell which would become Control Data in the future. I examined the growth factor which an increase effect was reported in to a corneal epithelium. The increase of the corneal epithelium understood (TGF α), (HGF), (KGF) other than EGF that an effect was high. When I used EGF, KGF, TGF α , the manufacture of the corneal epithelium tissue was possible when it for three weeks.

When I make a corneal epithelium-like organization using EGF, there were not undifferentiated candidate marker, cytokeratin 15(CK15) expressed to a cornea limbus epithelium. The corneal epithelium form that multiplied becomes flatness a little in EGF, but, in the corneal epithelium-like organization which manufactured it only by KGF addition, a basal cell is columnar. Therefore expression of undifferentiated marker CK15 which developed in cornea limbus came to be seen in the corneal epithelium-like cell sheet which I made in the culture fluid which added only KGF when I examined undifferentiated marker CK15. The other undifferentiated marker candidates examined, too. As for the corneal epithelium sheet derived from a stem cell

cultured using EGF, expression is not seen in them at all. The expression of various undifferentiated markers was seen by addition of KGF including p63, p75NTR, N-Cad. KGF strongly participating in property maintenance of the epithelium stem cell than these results is thought about. Again than a fact of these marker expression, It is thought that I could make a cornea limbus epithelium cell sheet by addition of KGF and am suitable for transplant more.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010	1,700,000	0	1,700,000
2011	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,900,000	360,000	3,260,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：眼細胞生物学

キーワード：幹細胞、組織幹細胞、未分化性、角膜輪部シート、無血清、癌

1. 研究開始当初の背景

再生医療実現化のための研究において本研究者は成人角膜上皮幹細胞を発見・単離することに成功した。角膜上皮幹細胞は一個の細胞から角膜上皮組織を形成するほどの組織形成能や旺盛な増殖能を持っている。この角膜上皮幹細胞を比較的短期間の培養の後、病理診断医による細胞診を実施したところ、クラスⅢの癌疑陽性であった。正常な上皮系幹細胞が現在まで簡便な単離法が不明であったために癌と幹細胞との関わりは一切不明である。

2. 研究の目的

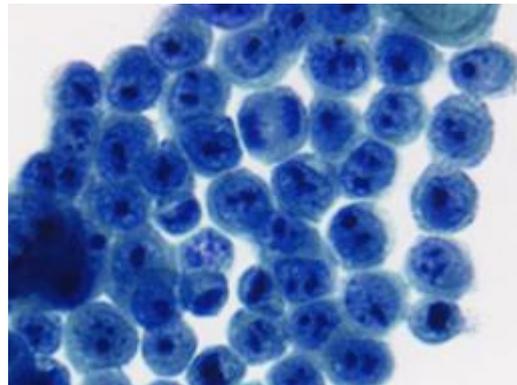
本研究では幹細胞と癌細胞との類似性を明らかにし、癌治療や再生医療実施の際の安全性について議論するための有益な知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

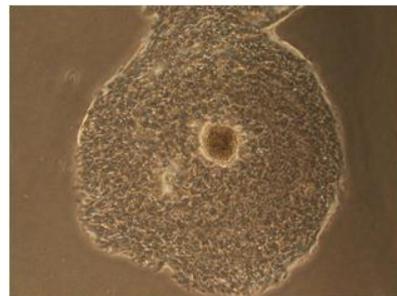
平成22年度に、正常ヒト角膜より、角膜上皮・結膜上皮幹細胞を単離し、同様の方法で既に樹立された扁平上皮癌由来細胞株を用いて比較検討を行なう。細胞株から癌幹細胞様コロニーが採取できるか検討する。これらの試料を用いて細胞診など形態的な特徴のほか、発現蛋白質、増殖速度などについて比較・検討を進める。また正常角膜・結膜幹細胞の増殖因子による応答も比較し、分化能を含めて詳細を解析する。希少な角膜・結膜由来の扁平上皮癌が得られた場合には、株化細胞の樹立を試み、詳細を比較する。細胞診には経験豊富な病理診断医の協力が必要であり、組織科学研究所と協力する。癌組織の採取には癌研究会の協力を得る。

4. 研究成果

眼表面原発性の腫瘍の入手が困難であった。癌検討のため正常角膜上皮幹細胞の形態写真を示す。



一例結膜由来腫瘍が手に入り、幹細胞様コロニーの単離と培養に成功し、ヌードマウスに移植したが、後日この腫瘍は良性と判明し、ヌードマウスでの造腫瘍性も確認できなかった。



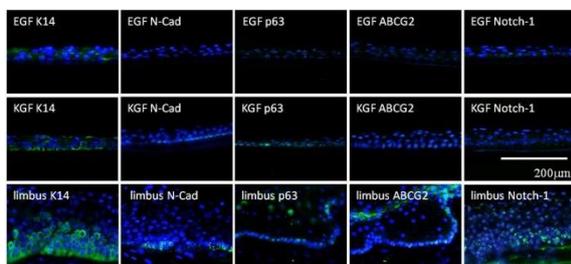
咽頭癌も試してみたが、コロニーの採取は可能であるが、組織が違いすぎて眼表面由来ほどには育たないことが判明した。咽頭癌由来幹細胞コロニーで研究を継続するには咽頭由来上皮の生育培地増殖因子のコンビネーションを策定しなければならないと判明。尚癌由来コロニーは中心部に写真のような真珠様隆起物が出現する。

眼表面由来の細胞株の検索を行ったが、細胞株も無い。そのため将来コントロールデータとなる正常角膜上皮幹細胞のデータを蓄積すべき種々の検討を行った。

角膜上皮に増殖効果が報告されている増殖因子を検討したところ、EGF の他に、腫瘍増殖因子 α (TGF α)、肝細胞増殖因子 (HGF)、ケラチノサイト増殖因子 (KGF) が角膜上皮の増殖に効果が位著しいことが判明した。特に EGF, KGF, TGF α においては三週間の培養で角膜上皮組織の作製まで可能であった。これらの増殖因子のうち、EGF のみの添加で角膜上皮様組織を作製した場合、角膜輪部上皮に発現が認められる未分化マーカー候補、サイトケラチン 15 (CK15) などの発現が見られないことが判明した。

増殖した角膜上皮形態は EGF ではやや扁平化しているが、KGF 添加のみで作製した角膜上皮様組織は基底細胞が円柱状である。そこで未分化マーカー CK15 の検討を行ったところ、KGF のみを添加した培養液で作製した角膜上皮様細胞シートは、角膜輪部に発現している未分化マーカー CK15 の発現が見られるようになった。他の未分化マーカー候補も検討したところ、EGF 添加が培養した幹細胞由来角膜上皮シートでは、一切発現が見られず、KGF の添加によって p63, p75NTR, N-Cad をはじめ、様々な未分化マーカーの発現が見られた。これらの結果より、Control データの蓄積は大幅に進捗した。今後、癌由来コロニーの癌幹細胞証明と比較試験を予定する。

尚、研究の副産物として、上皮幹細胞の未分化性の維持や発揮に KGF が強く関与していることが考えられることが判明した。更にこれらのマーカー発現の事実より、無血清・無フィーダー培養条件で KGF の添加により、角膜上皮細胞シートではなく、より移植に適した角膜輪部上皮細胞シートが作製可能となった。



は下線)

〔雑誌論文〕 (計 5 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.

Invest Ophthalmol Vis Sci.

Feb 3;52(2)

2011 679-84

査読 有

- ② Yokoo S

Regenerative medicine and stem cells of corneal epithelium

Nippon Ganka Gakkai Zasshi.

Nov;114(11)

2010 968-75.

査読 有 ※日本眼科学会学術奨励賞受賞総説

- 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.

Mol Vis

Aug 24;16:17

2010 12-9

査読 有

- ④ Usui T, Nakagawa S, Yokoo S, Mimura T, Yamagami S, Amano S.

Bilateral limbal stem cell deficiency with chromosomal translocation of 3p and 9p.

Jpn J Ophthalmol.

Jul;54(4)

2010 357-8

査読 有

- ⑤ 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 Eng Part C Methods.

Aug;16(4)

2010 803-12.

査読 有

〔学会発表〕 (計 24 件)

- ① 横尾誠一、高田哲生、山上聡、原口和敏、天野史郎

無血清・無フィーダー培養に対応した新規温度応答性培養皿による角膜上皮シート

第 36 回日本角膜学会総会、第 28 回日本角膜移植学会

2012 年 2 月 24 日

- ホテルニューオータニ 東京
- ② 豊野哲也、白井智彦、横尾誠一、山上聡、天野史郎
in vitro 角膜血管新生モデルの作製
第36回日本角膜学会総会、第28回日本角膜移植学会
2012年2月23日
ホテルニューオータニ 東京
- ③ 横尾誠一、山上聡、白井智彦、天野史郎
角膜上皮幹細胞と角膜上皮シートでのムチン分泌
日本組織培養学会第84回大会
2011年5月28日
国立成育医療研究センター 東京
- ④ 中川卓、横尾誠一、他
ヒト培養角膜上皮シートを用いた塩化ベンザルコニウムと抗緑内障薬の点眼毒性の評価
日本組織培養学会第84回大会
2011年5月28日
国立成育医療研究センター 東京
- ⑤ 横尾誠一、山上聡、天野史郎
KGFを用いた無フィーダー・無血清培養角膜上皮シートのp75NTRの発現
第115回日本眼科学会総会
2011年5月13日
東京国際フォーラム 東京
- ⑥ 中川卓、白井智彦、横尾誠一、他
ヒト培養角膜上皮シートを用いた DuoTrav、Xalacom の点眼毒性の評価
第115回日本眼科学会総会
2011年5月12日
東京国際フォーラム 東京
- ⑦ 豊野哲也、白井智彦、横尾誠一、他
角膜血管新生、リンパ管新生における Angptl2 の役割
第115回日本眼科学会総会
2011年5月12日
東京国際フォーラム 東京
- ⑧ T Usui, T Toyono, S Yokoo, S Amano.
Role of Angptl2 in Corneal Angiogenesis and Lymphangiogenesis
ARVO 2011 Annual Meeting
Thursday, May 05, 2011
Florida, USA
- ⑨ T Toyono, T Usui, S Yokoo, S Amano.
Expression Of Semaphorin3e In Cornea
ARVO 2011 Annual Meeting
Wednesday, May 04, 2011
Florida, USA
- ⑩ S Nakagawa, T Usui, S Yokoo, S Omichi, Y Mori, K Miyata, M Aihara, S Amano, M Araie.
Evaluation Of Toxicity Of Anti-glaucoma Drugs Using Stratified Human Cultivated Corneal Epithelial Sheets
ARVO 2011 Annual Meeting
Tuesday, May 03, 2011
Florida, USA
- ⑪ S. Yamagami, S. Yokoo
Fibroblast Growth Factor 2 Promotes Differentiation of Human Keratinocyte Progenitor Cells to Goblet Cells
ARVO 2010 Annual Meeting
Monday, May 3, 2010
Florida, USA
- ⑫ 豊野哲也、白井智彦、横尾誠一、天野史郎
前眼部におけるセマフォリン3Eの発現
角膜カンファランス
2月17日 2011
品川プリンスホテル 東京
- ⑬ 横尾誠一、山上聡、天野史郎
角膜上皮幹細胞の増殖と組織化に作用する増殖因子の探索
角膜カンファランス
2月17日 2011
品川プリンスホテル 東京
- ⑭ 中川卓、白井智彦、横尾誠一、大道幸子、森洋斉、宮田和典、相原一、天野史郎、新家真
ヒト培養角膜上皮シートを用いた抗緑内障薬の点眼毒性の評価
角膜カンファランス
2月17日 2011
品川プリンスホテル 東京
- ⑮ 横尾誠一、天野史郎、新家真、山上聡
EGF、KGF添加による角膜上皮シートの増殖と分化への影響
日本組織培養学会 第83回大会
5月21日 2010
岡山大学 創立五十周年記念館ホール
- ⑯ T. Usui, S. Yokoo, S. Amano, Y. Oike
Roles of Angiopoietin Like Protein-2 in Corneal Neovascularization
ARVO 2010 Annual Meeting
Thursday, May 6, 2010
Florida, USA
- ⑰ K. Sugisaki, T. Usui, N. Honda, S. Yokoo, S. Amano

Involvement of Leukemia Inhibitory Factor (lif) in Corneal Neovascularization
ARVO 2010 Annual Meeting
Thursday, May 6, 2010
Florida, USA

- ⑱ M. Yamaguchi, N. Ebihara, N. Shima, M. Kimoto, T. Funaki, S. Yokoo, A. Murakami, S. Yamagami
Laminin-5 Enhances Adhesion, Migration, and Proliferation Capacity of Cultured Human Corneal Endothelial Cells
ARVO 2010 Annual Meeting
Thursday, May 6, 2010
Florida, USA

- ⑲ 横尾誠一
浮遊細胞用培養皿を用いたヒト角膜輪部上皮幹細胞の新規単離法
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
4月17日 2010
名古屋国際会議場 名古屋

- ⑳ 大道幸子、白井智彦、横尾誠一、新家真、天野史郎
第114回日本眼科学会総会
4月16日 2010
名古屋国際会議場 名古屋

- 21 横尾誠一、山上聡、天野史郎、新家真
第114回日本眼科学会総会
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
4月16日 2010
名古屋国際会議場 名古屋

- 22 白井智彦、本田紀彦、杉崎顕史、横尾誠一、天野史郎、尾池雄一。
角膜血管新生における Angptl2 の機能
4月15日 2010
名古屋国際会議場 名古屋

- 23 野村陽子、横尾誠一、柳靖雄、玉置泰裕
新規温度応答性培養皿とPVD F膜を用いた培養網膜色素上皮シートの作成、操作法の検討
4月15日 2010
名古屋国際会議場 名古屋

- 24 杉崎顕史、白井智彦、本田紀彦、横尾誠一、天野史郎
角膜血管新生における白血病抑制因子の関与
第114回日本眼科学会総会
4月15日 2010
名古屋国際会議場 名古屋

〔図書〕(計1件)

- ① 横尾 誠一・山上 聡
メディカル葵出版
あたらしい眼科/眼科医のための先端医療
128. 眼表面再生医療と幹細胞
2011 1137-1139p

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 角膜細胞の培養方法及び培養角膜細胞
発明者: 横尾誠一、原口和敏、高田哲生
権利者: 財団法人川村理化学研究所
種類: 特許
番号: 特願 2010-196658
出願年月日 平成22年9月2日
国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横尾誠一 (YOKOO SEIICHI)
東京大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号: 20345052

(2) 研究分担者

辻 英貴 (TSUJI HIDEKI)
癌研究会・有明病院・眼科部長
研究者番号: 50282554

(3) 連携研究者

山上聡 (YAMAGAMISATORU)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 10220245