

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592644

研究課題名(和文)皮膚由来多能性前駆細胞から角膜内皮細胞への分化誘導

研究課題名(英文)Directed induction of skin derived precursors into corneal endothelium

研究代表者

榛村 重人(Shimmura, Shigeto)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：00235780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経堤細胞は多分化能力を有し、再生医療への応用が期待されている。皮膚由来幹細胞は近年報告された真皮に存在する幹細胞である。本研究では神経堤由来であるマウス頭頸部皮膚由来幹細胞を用いて、機能的な角膜内皮細胞へと誘導することに成功した。Ussing chamberによるin vitroでの機能解析、さらには家兎水疱性角膜症モデルへの移植実験により誘導内皮の有効性が確認された。ヒト皮膚由来幹細胞に関しては高齢者からも分離培養が可能であるが、マーカー発現や細胞形態などは今後の検討が必要と考えられた。概して、本研究により、皮膚由来幹細胞が角膜内皮再生における細胞源となりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：The identification of neural crest stem cells in various tissues opens an entirely new approach to developing autologous cell replacement therapies for use in regenerative medicine. Recently, skin derived precursors (SKPs) were isolated and characterized as a potent precursor cell population from the adult mammalian dermis. In this study, we succeeded in direct differentiation of murine facial SKPs into functional tissue engineered corneal endothelium (TECE). In vitro analysis of pump function by Ussing chamber and in vivo transplantation into a corneal endothelial dysfunction rabbit model, SKP-induced TECE contributed in recovering corneal transparency. Furthermore, we succeeded in isolating and expanding human SKPs from elderly subjects. However, some other factors may be required to induce human SKPs into corneal endothelium. Overall, our findings demonstrate that facial SKPs are an attractive autologous source of progenitor cells for corneal endothelial regeneration.

研究分野：眼科学

キーワード：再生医療 角膜内皮 皮膚幹細胞 神経堤細胞 水疱性角膜症 角膜移植

### 1. 研究開始当初の背景

角膜内皮細胞はポンプ機能とバリア機能により角膜の透明性を維持している重要な細胞である。しかし、角膜内皮細胞は生後増殖能力に乏しく、細胞数が著明に減少すると水疱性角膜症をきたし失明に至る。また既存の治療法である角膜移植も慢性的なドナー不足や拒絶反応などの問題がある。

申請者らの研究グループでは角膜実質より神経堤由来の幹細胞である角膜実質幹細胞を分離し(Yoshida et al, Stem Cells, 2006)、Wnt・カテニンシグナルを用いた結果、機能的な角膜内皮に誘導することに成功した。(Hatou et al, Stem Cell Dev 2013)しかし角膜実質幹細胞はヒトでは増殖能に乏しく、臨床応用を目指した場合技術的な問題が生じる可能性があり、新たな細胞源の探索が必要であった。

皮膚由来幹細胞 (SKPs:skin-derived precursors)はマウス(Toma et al, Nature Cell Biology,2001)およびヒト(Fernandes et al, Nature Cell Biology, 2004)の皮膚真皮から分離が報告された自己複製能および多分化能を有する幹細胞である。なかでも頭頸部の SKPs は角膜内皮細胞と同じ神経堤由来細胞である。もしヒト皮膚由来の SKPs に、神経堤細胞から角膜内皮細胞への分化誘導法を適用することができれば、患者本人の皮膚由来の角膜内皮細胞を移植する自家移植が可能となり、拒絶反応の問題やドナー不足の問題も解決することができる。

### 2. 研究の目的

本研究では神経堤由来細胞である頭頸部皮膚由来幹細胞を用いて機能的な角膜内皮細胞へ誘導できるかどうかの探索を行う。マウスおよびヒト皮膚由来幹細胞の分離および角膜内皮細胞への誘導、In vitroでの機能解析、さらには家兎水疱性角膜症モデルへの移植実験により有効性の評価を行う。

### 3. 研究の方法

(1)神経堤由来細胞を標識するマウスから皮膚由来幹細胞の分離: Wnt1-cre/floxed-EGFP マウスは神経堤由来細胞を GFP で標識できる。神経堤由来の細胞で EGFP の蛍光を発する Wnt1-Cre/floxed EGFP マウス皮膚組織から SKPs を分離する。

(2)マウス皮膚由来幹細胞から角膜内皮細胞への分化誘導:我々の開発した角膜実質幹細胞から角膜内皮細胞への分化誘導法を応用し in vitroでの分化誘導を試みる。角膜内皮マーカーの RT-PCR,qPCR,免疫染色を施行する。

(3)in vitroでの機能評価として ussing chamber を施行し、Na,K-ATPase 活性測定によりポンプ機能を十分に持った細胞に誘導することができたかどうかの解析を行う。さらに、誘導法が確立されれば、家兎水疱性角

膜症モデルへの移植実験を行う。

(4)ヒト皮膚由来幹細胞の分離と角膜内皮細胞への分化誘導

ヒト皮膚由来幹細胞の分離: 慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得て眼瞼皮膚弛緩症の手術時に得られる余剰皮膚を用いて SKPs を分離する。

分離した SKPs を今までの手法を用いて角膜内皮細胞へ誘導する。

### 4. 研究成果

(1) Wnt1-cre/floxed-EGFP マウスから SKPs の分離 神経堤由来の細胞で EGFP の蛍光を発する Wnt1-Cre/floxed EGFP マウスの頭頸部皮膚組織から SKPs を分離し、培養増殖させることに成功した。このマウスから得られた SKPs も EGFP の蛍光を発しており、SKPs が神経堤細胞由来であることが確認された。(図1) SKPs が Twist, p75, Sox9, Slug, Snail などの神経堤細胞マーカーの発現をしていることを RT-PCR で確認した。

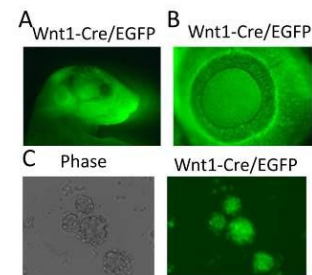


図1 Wnt1-Cre/floxed EGFP マウス  
A:頭頸部  
B:角膜  
C:浮遊培養 (phase,EGFP)

(2)マウス皮膚由来幹細胞から角膜内皮細胞への分化誘導

申請者らの既報に準じて角膜内皮細胞への分化誘導を試みるために誘導因子を最適化した。SKPs は誘導因子を加えず、血清添加のみで培養した場合は fibroblastic な形態を呈するが、誘導因子を加えることで cobble stone 様の角膜内皮様の形態を呈した。

RT-PCR で角膜内皮マーカー群である ATP1a1, CDH2, Pitx2, SLC4A4, Col4a2, Col18a2 の発現を RT-PCR で確認し、それらは誘導後に概ね上昇していることを qPCR で確認した。(図2)

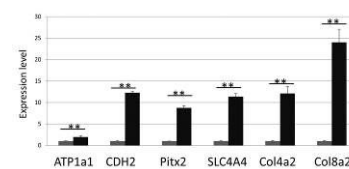


図2 SKPs 誘導内皮における角膜内皮マーカー発現

(左:誘導前 右:誘導後)

また免疫染色によりタイトジャンクションのマーカーである ZO1 の発現(図3), NaK-ATPase 1-subunit を確認した。

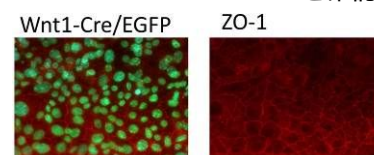


図3 SKPs 誘導内皮の免疫染色 (ZO1)

(3) *in vitro* の機能評価として *ussing chamber* を施行した。マウス培養内皮細胞 (mCE) と NIH-3T3 細胞 (3T3) をコントロールとして用いた。SKPs を誘導因子不含有培地で培養したもの (SKPs) と誘導因子含有培地で培養したもの (sTECE) を比較した。誘導内皮はおよそ 3mV のポンプ機能を有していることが確認された。誘導前および培養マウス角膜内皮細胞と比較しても有意に高い値であった。(図 4) 申請者らの検討により、誘導内皮の品質評価として *ussing chamber* で 1mV 以上のポンプ機能を有した場合に角膜の透明性を担保する効果が期待できるものと報告している。(Hatou et al, *Tissue Eng Part C Methods*, 2013) 以上より、SKPs 誘導内皮は十分なポンプ機能を有していた。

(4) *in vivo* の有効性評価として家兎水疱性角膜症モデルを作成し、誘導内皮移植群とコントロールを比較した。コントロールの角膜内皮剥離眼(図 4: 左)は著明な角膜浮腫を呈し、角膜厚が  $1105.8 \pm 165.9 \mu\text{m}$  に増加するのに対し、SKPs 誘導細胞移植眼(図 4: 右)では角膜透明度が維持され角膜厚は  $544.0 \pm 85.0 \mu\text{m}$  に維持された。(図 4)



図 4  
家兎水疱性角膜症モデルの前眼部写真

(5) ヒト皮膚由来幹細胞の分離  
慶應義塾大学倫理委員会承認のもと、同意の得られた患者の眼瞼皮膚弛緩症の手術時に得られる余剰皮膚を用いて SKPs を分離した。ドナーは 35 歳から 89 歳まで合計 5 ラインの分離・培養に成功した。ヒト SKPs の培養法は既報を minor modify をした。(Joannides A et al, *Lancet*, 2004)  
それらを用いてマウスで得られた条件を用いて角膜内皮誘導を施行したところ、一部のマーカー (ATP1a1, CDH2, Pitx2) は発現を確認したものの、Col4a2, Col18a2 などの基底膜構成因子の発現が不十分であった。しかし、ヒト SKPs 誘導内皮は *In vitro* での機能解析法である *Ussing chamber* によるポンプ機能測定では 2.8mV と高いポンプ機能を有していた。  
SKPs を誘導因子不含有培地で接着培養させた場合にも比較的高いポンプ機能を有しており、誘導因子含有培地を用いることでさらに高いポンプ機能を有することから、細胞源として SKPs は有用性が高い可能性がある。しかし、現在のところ誘導できた細胞は形態が fibroblastic な性質であり、タイトジャンクションの形成も不十分であったことより形態制御因子を中心にさらなる分化誘導の研鑽が課題となっている。

(6) 得られた成果の国内外の位置づけとインパクト/今後の展望

本研究により頭頸部皮膚由来 SKPs から角膜内皮誘導を行うことに成功した。本研究成果は自家移植による角膜内皮再生への道を切り開き、ドナー不足と拒絶反応という二つの角膜移植に伴う問題を解消することに寄与する。眼球提供数が多く角膜移植を行うことが比較的容易な米国に比べ、本邦では慢性的に提供眼が常に不足している状態であり、こうした治療方法の確立は特に本邦では意義が高い。皮膚由来幹細胞は容易に採取が可能であり、自己の細胞源として非常に期待されている。皮膚由来幹細胞がから眼組織への誘導はまだ報告がなく非常に独創的である。また本研究成果による研究結果は皮膚由来幹細胞から他の眼組織への分化誘導の可能性や、iPS 細胞から角膜内皮細胞への分化誘導にも応用できるものである。

#### 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 1 件)

(1) Hatou S, Higa K, Inagaki E, Yoshida S, Kimura E, Hayashi R, Tsujikawa M, Tsubota K, Nishida K, Shimmura S.  
Validation of Na,K-ATPase pump function of corneal endothelial cells for corneal regenerative medicine. *Tissue Eng Part C Methods*. 19(12):901-10. 2013 査読有

[学会発表](計 4 件)

(1) Inagaki E, Hatou S, Higa K, Yoshida S, Miyashita H, Okano H, Tsubota K, Shimmura S. Functional analysis of tissue engineered corneal endothelium from human skin derived precursors.

The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting, Denver, CO, USA, 3-7 May 2015

(2) Inagaki E, Hatou S, Higa K, Yoshida S, Miyashita H, Okano H, Tsubota K, Shimmura S.

Directed Differentiation of Skin Derived Precursors Into Functional Corneal Endothelium.

The International Society of Stem Cell Research (ISSCR) the 12<sup>th</sup> Annual Meeting, Vancouver, Canada, June 18-21, 2014

(3) 稲垣絵海, 羽藤晋, 比嘉一成, 吉田悟, 宮下英之, 川北哲也, 岡野栄之, 坪田一男, 櫻村重人

角膜内皮再生にむけた皮膚由来幹細胞から角膜内皮細胞への分化誘導 第 13 回日本再生医療学会総会. 国立京都国際会館 (京都市) 03,03-06, 2014

(4) 稲垣絵海, 羽藤晋, 比嘉一成, 吉田悟,

宮下英之，川北哲也，岡野栄之，坪田一男，

**榎村重人**

角膜内皮再生にむけた皮膚由来幹細胞から  
角膜内皮細胞への分化誘導 角膜カンファラ  
ンス(第38回日本角膜学会総会 第30回  
日本角膜移植学会) 沖縄コンベンションセ  
ンター(沖縄県宜野湾市)1/31-2/1 2014

〔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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

榎村 重人 (SHIGETO SHIMMURA)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：00235780

### (2)研究分担者

吉田 悟 (YOSHIDA SATORU)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：50398781

### (3)連携研究者

なし