

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 9 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592646

研究課題名(和文)角膜輪部ニッチ様細胞と接する角膜輪部上皮タイニーセルの解析

研究課題名(英文)Analysis of limbal epithelial tiny cells contact with limbal niche like cells

研究代表者

比嘉 一成(Higa, Kazunari)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60398782

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)：角膜上皮幹細胞は角膜周辺の輪部に存在していると考えられているが、はっきりとした幹細胞の同定には至っていない。そこで、角膜輪部組織から輪部上皮基底細胞周辺の細胞塊(Tiny cells)を分離し、組織学的ならびに細胞生物学的解析を行った。また、角膜上皮幹細胞とニッチのメカニズムを解明するため、Tiny cellsの維持培養法について検討し、Tiny cellsから上皮シートの作成を試みた。Tiny cellsにはニッチ様細胞が存在し、1ヶ月以上培養することに成功した。また、Tiny cells1つから上皮シートを作成することにも成功した。低酸素培養ではN-cadherinの発現も確認した。

研究成果の概要(英文)：Stem cells have a specialized microenvironment for maintaining self-renewal and multipotent capacities. It is believed that a cornea epithelial stem cell niche exists in the limbus. We presented that aquaporin 1 positive (AQP1+) cells immediately beneath epithelial basement membrane may be mesenchymal niche cells that directly interact with N-cadherin positive (N-cad+) limbal basal epithelial cells. To establish a cultivation method the limbal epithelial stem cells niche in vitro, we performed spheroidal cultivation of Tiny cells from the human limbus using Matrigel. Keratin (K) 15 and p63 were expressed in the spheroid after 1-month cultivation, as well as in epithelial sheets engineered from a single spheroid. K15 and p63 were expressed in the edge of spheroids after 1-month cultivation under hypoxia. In addition, N-cadherin was expressed in epithelial spheroid under hypoxia.

研究分野：眼科学

キーワード：角膜上皮幹細胞

1. 研究開始当初の背景

角膜上皮の恒常性を維持するためには、角膜周辺部(輪部)に存在する角膜上皮幹細胞の機能を維持することが重要である。角膜上皮幹細胞に関する研究では Label retaining cells、p63、side-population(SP)細胞や N-cadherin(N-cad)など様々な報告がなされているが、造血幹細胞や皮膚の幹細胞の様にはっきりとした幹細胞の同定にまでは至っていない(Lehrer, J Cell Sci 1998; Pellegrini, PNAS 2001; DePaiva, Stem cells 2005; Hayashi, Stem cells 2006)。角膜上皮の幹細胞は角膜輪部の POV (Pariside of Vogt)の上皮基底層に存在すると考えられており、その基底層には細胞の大きさが小さく、N/C 比の大きい細胞が存在することも報告されている(Chen, Stem cell 2004)。また、実質側に接する角膜輪部基底細胞の中で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も考えられている(Romano, IOVS 2003)。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されている 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。

一方、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、最近では脳や骨髄、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(Zhang, Nature 2003; Tumber, Science 2004; Alvarez-Buylla, Neuron 2004)。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。近年、我々は角膜上皮の幹細胞/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)。角膜上皮の幹細胞/前駆細胞の維持機構に上記のような様々な環境因子が複雑に関与していることが想定される。また、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輪部機能不全をともなった角膜疾患に対して、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や移植を行ってきた(Tsubota, N Engl J Med 1999; Shimazaki, Ophthalmology 2002; Higa, IOVS 2007; Satake Ophthalmology 2011)。

このように再生された患者の角膜では移植した角膜上皮の幹細胞もしくはニッチが正常に機能していることが示唆されるが、そのメカニズムについてはよくわかっていない。

2. 研究の目的

角膜上皮の幹細胞-ニッチのメカニズムを明らかにするためにはその環境を再現できるモデルが必要である。我々は以前から角膜輪部の POV に存在する小さい細胞(我々はこれを Tiny cells とする)に注目しその分離法の開発を行ってきた(図1)。

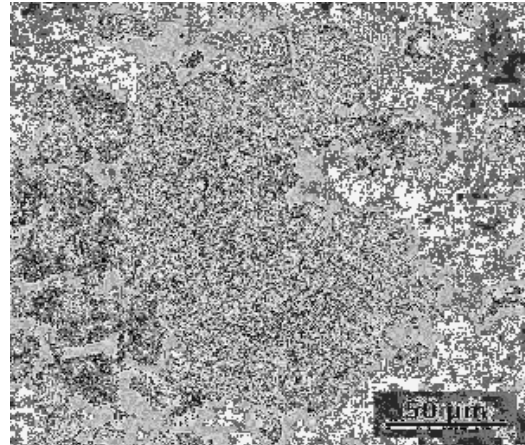


図1. ヒト角膜輪部上皮から採取した細胞塊(Tiny cells)

この Tiny cells はその周辺の細胞と一緒に細胞塊として採取し培養を開始することが可能であり、通常の培養方法で培養を行うと、増殖し角膜上皮細胞へ分化していくことが解っている。そこで、本研究ではヒトドナー角膜輪部組織から採取した Tiny cells の組織学的ならびに細胞生物学的な解析を行うとともに、ヒト角膜上皮幹細胞-ニッチのモデルとして使用し、そのメカニズムの解明を検討する。

3. 研究の方法

角膜輪部上皮基底細胞周辺から分離した細胞塊(Tiny cells)が幹細胞-ニッチのモデルとして有用であるか解析するため、Tiny cells の3次元的な観察も含めて組織学的ならびに細胞生物学的な解析を行う。また、Tiny cells の分化または維持培養を行うため、Tiny cells に影響を与える可能性のある N-cad、低酸素といった環境因子による影響についても観察する。さらに、Tiny cells の長期間培養を行い、角膜上皮細胞への分化誘導を行うとともに、Tiny cells が培養上皮シートの細胞源として有用であるか確認するため、Tiny cells から培養上皮シートの作製についても検討する。

4. 研究成果

角膜上皮幹細胞/前駆細胞で発現すると考えられる N-cad、p63、ケラチン(K)15 などの

発現について免疫染色を用いて検討した。N-cad 陽性(+)Tiny cells は K15 陽性、p63 陽性の比較的未分化な細胞であることが分かった(図 2)。

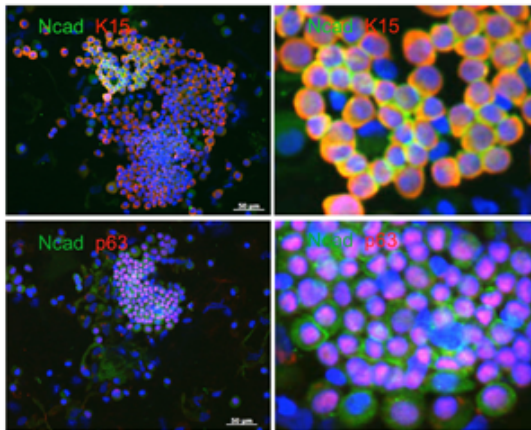


図 2. N-cad+Tiny cells の未分化マーカーの発現。

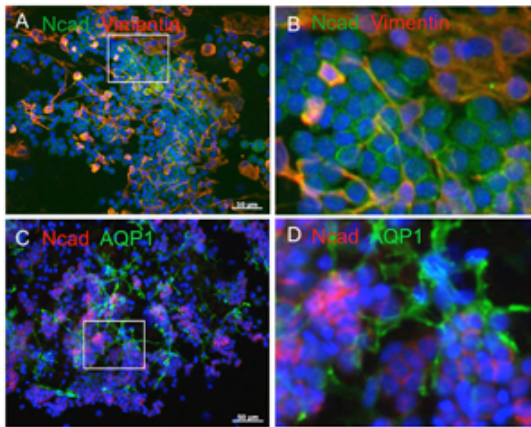


図 3. N-cad+Tiny cells の実質 Vimentin 陽性細胞。

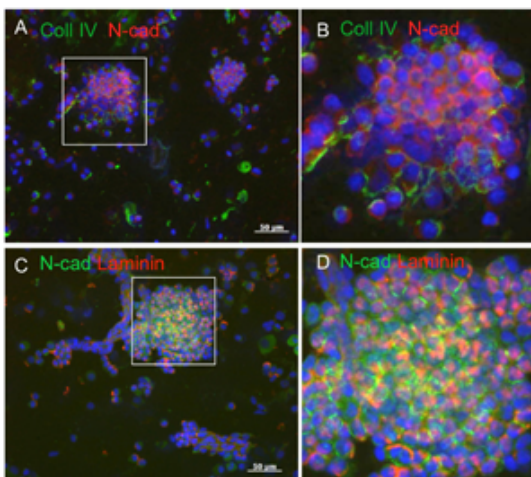


図 4. N-cad+ Tiny cells の基底膜成分の発現。

また、Tiny cells 中に実質の細胞やメラノサイトも含まれている可能性も考えられるため、Vimentin、Aquaporin(AQP)1、MART-1、Melan A 等の抗体を用いて免疫染色を行ったところ、N-cad+ Tiny cells には Vimentin 陽性、AQP1 陽性の実質側の細胞も存在していた(図 3)。

さらに、この Tiny cells は角膜輪部基底膜周辺の細胞であると考えられることから、角膜輪部上皮基底膜で発現する、Collagen type IV ならびに Laminin についても染色を行った。Tiny cells における Collagen Type IV ならびに Laminin の発現は N-cad+細胞に近接して発現が認められ(図 4)、AQP1+細胞に接して発現が認められた(図 5)。

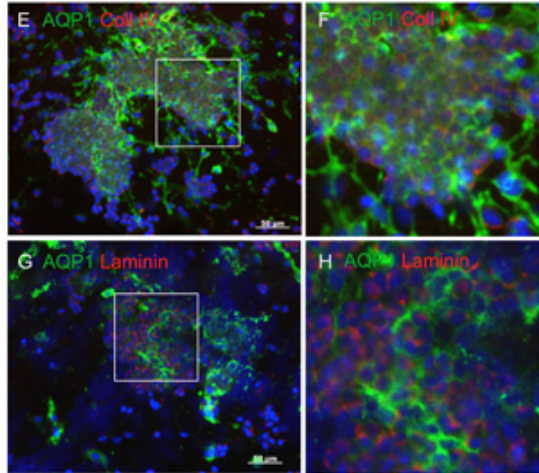


図 5. AQP1 陽性実質細胞の基底膜成分の発現。

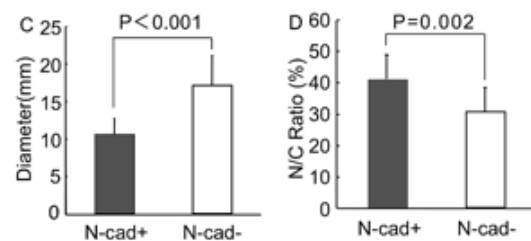
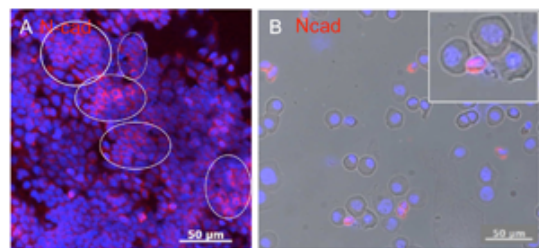


図 6. N-cad+Tiny cells の大きさと N/C 比。

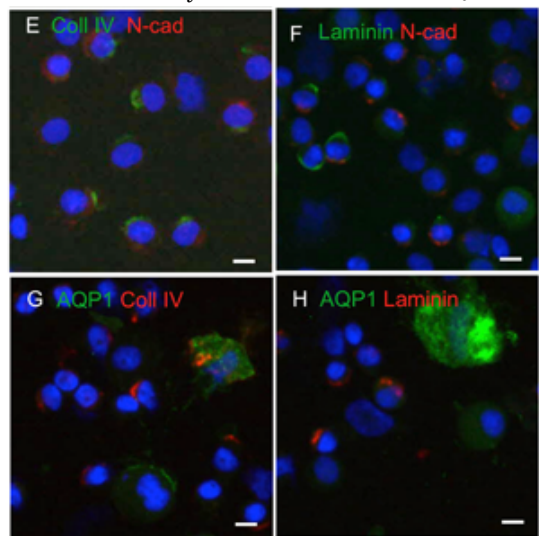


図 7. N-cad+ Tiny cells ならびに AQP1+ cells における基底膜成分の発現。

次に、輪部基底層に存在する小さい細胞が Tiny cells であることを確かめるため、上記で検出した細胞の大きさ(細胞の直径)、N/C 比についても測定したところ、N-cad+細胞は N-cad-細胞よりも細胞直径が小さく、N/C 比が大きいことが分かった(図 6)。さらに、N-cad+ 細胞ならびに AQP1+細胞が実際に基底膜に接している細胞であるかについても観察するため、Tiny cells を single cells へバラバラに処理を行って N-cad もしくは AQP1 と Collagen Type IV もしくは Laminin との 2 重染色を行った。N-cad+細胞ならびに AQP1+細胞には Collagen Type IV もしくは Laminin 陽性細胞が存在していることが確認できた(図 7)。

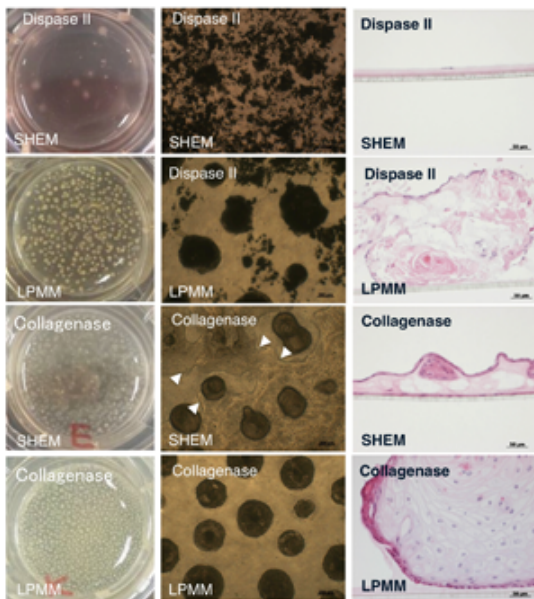


図 8. 培養条件におけるスフェロイド形成の比較。

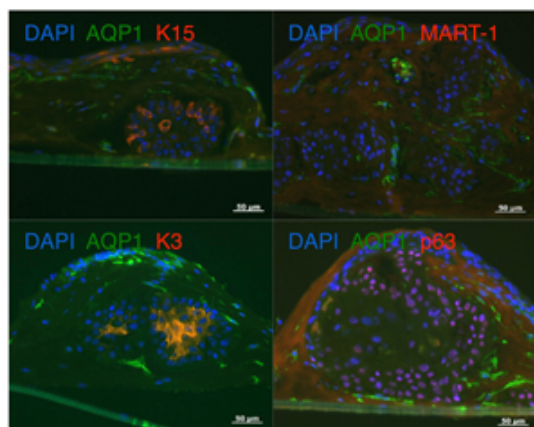


図 9. スフェロイドにおける角膜輪部フェノタイプの発現。

次に基底膜成分を多く含んだマトリゲル上において、Tiny cells だけでなくその直下に存在するニッチ細胞も回収できるコラゲナーゼ処理では従来のディスペルゼ処理よりも均一で球状のスフェロイドを形成することが解ってきた。さらに、通常の EGF 添加培地に比べて角膜輪部フェノタイプ維持

培地 (KGF+Rock Inhibitor) で培養すると上皮の進展もなく 1 ヶ月以上シフェロイドを形成したまま培養できることが解ってきた。一つの輪部組織からはおよそ 800 個以上のスフェロイドを作成できることが解ってきた(図 8)。

このスフェロイドの組織を見てみると、角膜輪部上皮基底層で発現が認められるクラチン 15、p63 の発現を維持していることが解ってきた(図 9)。

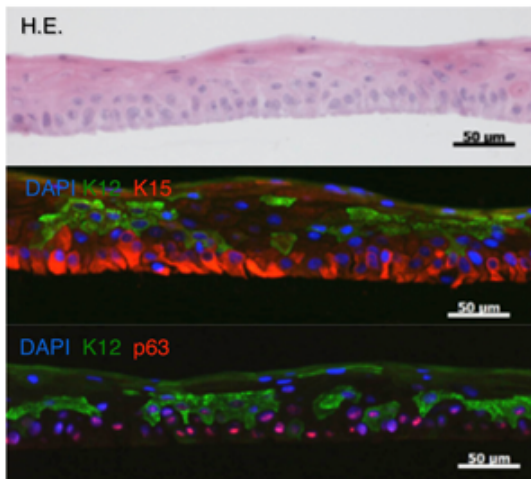


図 10. 1 個のスフェロイドから作成した輪部フェノタイプを発現する上皮シート。

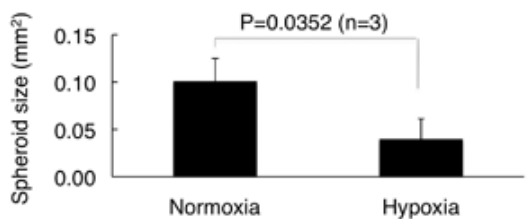
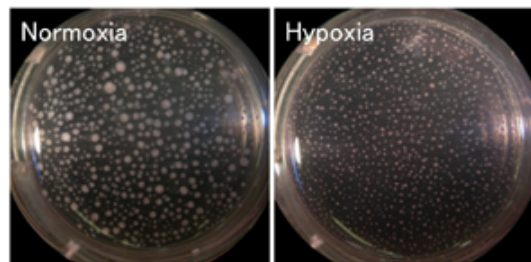


図 11. 低酸素培養におけるスフェロイド形成の比較。

また、このスフェロイド 1 個から培養上皮シートの作成を試みたところ、重層化した従来の上皮シートと同様の培養上皮シートを作成することができた(図 10)。

このスフェロイドにおいて低酸素培養を行なったところ、培養 1 ヶ月後において、通常培養よりも小さいスフェロイドを形成することが分かった(図 11)。

また、低酸素培養において、輪部フェノタイプを示す K15 や p63 の発現はスフェロイドの辺縁部で認められ、さらに角膜輪部基底層で発現する N-cadherin の発現も認められた(図 12)。BrdU 陽性細胞も低酸素培養で多く

観察され、細胞周期の G0/G1 期の細胞も多く観察された(図 13)。

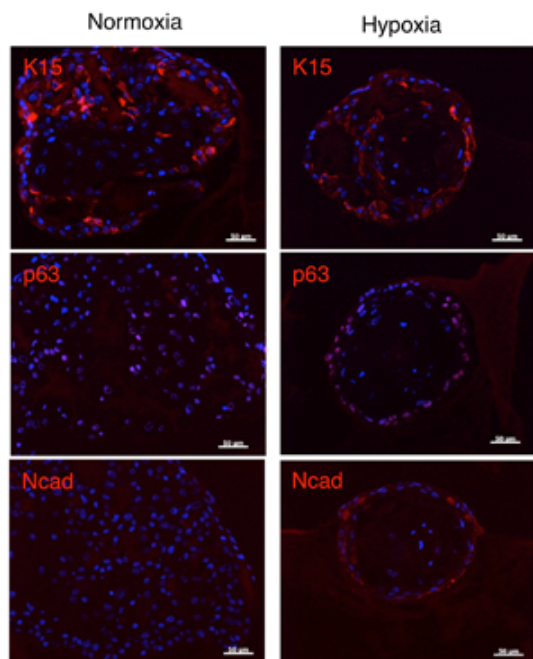


図 12. 低酸素培養における角膜輪部フェノタイプの発現。

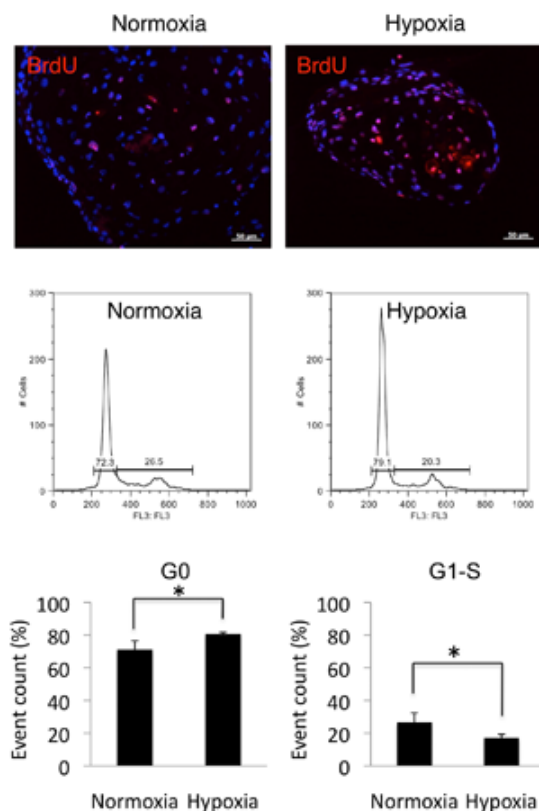


図 13. 低酸素培養における BrdU の発現と細胞周期解析。

以上のことから、マトリゲルと KGF+Rock Inhibitor 添加培地と低酸素条件を組み合わせることで、培養一ヶ月後においても N-cadherin 陽性のスフェロイドが認められたことから、Slow cycling を維持するニッチ様構造が保たれた優れた培養条件であることが示唆された。

<引用文献>

Alvarez-Buylla A and Lim DA (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**: 683-6.

Chen Z, de Paiva CS, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC and Li DQ (2004). Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells* **22**: 355-66.

De Paiva CS, Pflugfelder SC and Li DQ (2006). Cell size correlates with phenotype and proliferative capacity in human corneal epithelial cells. *Stem Cells* **24**: 368-75.

Hayashi R, Yamato M, Sugiyama H, Sumide T, Yang J, Okano T, Tano Y and Nishida K (2007). N-Cadherin is expressed by putative stem/progenitor cells and melanocytes in the human limbal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* **25**: 289-96.

Higa K, Shimmura S, Kato N, Kawakita T, Miyashita H, Itabashi Y, Fukuda K, Shimazaki J and Tsubota K (2007). Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**: 597-604.

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

Higa K, Shimmura S, Miyashita H, Shimazaki J and Tsubota K (2005). Melanocytes in the corneal limbus interact with K19-positive basal epithelial cells. *Exp Eye Res* **81**: 218-23.

Lehrer MS, Sun TT and Lavker RM (1998). Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci* **111** (Pt 19): 2867-75.

Miyashita H, Higa K, Kato N, Kawakita T, Yoshida S, Tsubota K and Shimmura S (2007). Hypoxia enhances the expansion of human limbal epithelial progenitor cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**:

3586-93.

Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F and De Luca M (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 3156-61.

Romano AC, Espana EM, Yoo SH, Budak MT, Wolosin JM and Tseng SC (2003). Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 5125-9.

Satake Y, Higa K, Tsubota K and Shimazaki J (2011). Long-term outcome of cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation in treatment of total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* **118**: 1524-30.

Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S and Tsubota K (2002). Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* **109**: 1285-90.

Shimmura S, Miyashita H, Higa K, Yoshida S, Shimazaki J and Tsubota K (2006). Proteomic analysis of soluble factors secreted by limbal fibroblasts. *Mol Vis* **12**: 478-84.

Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H and Shimazaki J (1999). Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* **340**: 1697-703.

Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M and Fuchs E (2004). Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* **303**: 359-63.

Watanabe K, Nishida K, Yamato M, Umemoto T, Sumide T, Yamamoto K, Maeda N, Watanabe H, Okano T and Tano Y (2004). Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett* **565**: 6-10.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S,

Wiedemann LM, Mishina Y and Li L (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**: 836-41.

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, Kato N, Yoshida S, Ogawa Y, Shimazaki J, Tsubota K and Shimmura S (2013). Aquaporin 1-positive stromal niche-like cells directly interact with N-cadherin-positive clusters in the basal limbal epithelium. *Stem Cell Res* **10**: 147-55.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kazunari Higa, Hideyuki Miyashita, Jun Shimazaki, Kazuo Tsubota, Shigeto Shimmura. N-cadherin expression in hypoxic spheroidal cultivation of human limbal epithelial cells. Asia-ARVO 2015年2月16日～2015年2月19日 横浜パシフィコ (神奈川県・横浜市)
- ② 比嘉一成、宮下英之、島崎潤、坪田一男、榛村重人. 低酸素培養した角膜輪部由来 spheroid における N-cadherin の発現. 角膜カンファレンス 2015. 2015年2月11日～2015年2月13日 高知市分化プラザかるぼーと (高知県・高知市)
- ③ 比嘉一成、宮下英之、島崎潤、坪田一男、榛村重人. 角膜輪部ニッチ培養法の検討. 第35回日本炎症・再生医学会. 2014年7月1日～2014年7月4日 万国津梁館 (沖縄県・名護市)
- ④ 比嘉一成、宮下英之、島崎潤、坪田一男、榛村重人. Matrigel で形成した角膜輪部由来 spheroid の解析. 角膜カンファレンス 2014 2014年1月30日～2014年2月1日 沖縄コンベンションセンター (沖縄県・宜野湾市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

比嘉一成 (HIGA Kazunari)

東京歯科大学 市川総合病院

角膜センター・助教

研究者番号 : 60398782