

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791839

研究課題名(和文) 幹細胞を用いたドライアイに対する研究手法の開発

研究課題名(英文) Development of research methods for dry eye using stem cells

研究代表者

横尾 誠一 (Yokoo, Seici)

東京大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：20345052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ドライアイに対する治療の選択肢は拡大しているが、ドライアイに対する評価系は少ない。本研究では角膜上皮幹細胞を用いたドライアイ評価系の構築を目的に研究を行った。DMEM-F12, B-27, EGF存在下で幹細胞コロニーが採取でき、これらはPAS染色陽性でありムチンの発現が確認できた。対してERK1,2阻害剤であるFR1800204を用いることで、ムチン発現を抑制でき、かつERK1.2の他にERK5の抑制で細胞増殖が抑制でき、ERK1,2の抑制だけでは細胞増殖に悪影響を及ぼさないことを明らかにし、新たな評価系モデルとして期待できる成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Treatment options for DryEye is expanding. But the evaluation system for dry eye is small. The studies were carried out for the purpose of construction of dry eye evaluation system using the corneal epithelial stem cells in this study. Stem cell colonies can be taken in DMEM-F12, B-27, EGF presence, they were able to confirm expression of mucin is a PAS-positive staining. The use of FR1800204 is ERK1, 2 inhibitors for, it is possible to suppress the expression of mucin. In addition, inhibition of ERK5 in addition to the ERK1.2, it is possible to suppress cell growth. Only inhibition of ERK1, 2 revealed that it does not adversely affect cell growth. To obtain results that can be expected as a new evaluation system model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：幹細胞 角膜 角膜上皮 ドライアイ ムチン 再生医療 無血清

1. 研究開始当初の背景

角膜乾燥症(ドライアイ)は様々な要因による涙液および角結膜上皮の慢性疾患である。患者数は800万人とも言われ非常に多い。涙液の構造だけを見ても表面から油層・水層・粘液層に分かれており、これらの構造のどれかが破綻してもドライアイになり得る。ドライアイに対する治療法として、ヒアルロン酸の点眼などが行われていたが、ムチン増強を目的とした点眼液が相次いで発売された。ジクアホソルナトリウム(商品名:ジクアス)は、結膜上皮及び杯細胞膜上のP2Y2受容体に作用し、細胞内のカルシウム濃度を上昇させることにより、水分及びムチンの分泌を促進させると考えられる。レバミピド(商品名:ムコスタ)はプロスタグランジンE2を増加させ、杯細胞からのムチン放出を促進させると考えられる。

しかしながら、これらの薬理機構には不明な点も多い。これは現在に至るまでドライアイに対して有用な評価系が存在しないことも一因と考えられる。例えばin vitro試験に用いる結膜杯細胞は培養が難しく、有効な評価モデルは存在しない。また実験動物を使ったin vivo試験も涙液構造に影響を与える組織がマイボーム腺、涙腺、瞬目の回数など様々な要因により左右されるため有効なドライアイモデルの実験動物の作成は難しい。涙腺摘出モデルなどでは、不可逆的な組織の破壊を伴うため一般的なドライアイモデルとは言いにくく、治療の評価法として用いるには難しかった。そのためドライアイに対して有効な治療法を確立することは今後のドライアイ研究にとって大切であり、治療効果を評価できる研究手法の開発が求められる。

2. 研究の目的

角膜乾燥症(ドライアイ)の患者数は日本国内だけでも800万人いるとされる。近年新規の点眼薬が投入されるなど治療の選択肢は広がりつつある。しかしながらドライアイに対する基礎的研究は有効な評価系モデルが少ない。我々は角膜上皮再生医療研究において無血清・無フィーダー培養法による角膜上皮シート(無血清角膜上皮シート)を開発し角膜上皮幹細胞を発見した。これら無血清角膜上皮シート、角膜上皮幹細胞はPAS染色陽性でありムチンを分泌する。より詳細な膜型ムチンの同定を行い各種細胞内シグナル阻害剤を用いてムチン非発現系を探索し、ドライアイ研究における有用な評価系モデルを開発する。

3. 研究の方法

サンプルとして研究用輸入角膜のほか、無血清培養で得られる角膜上皮幹細胞、角膜上皮

細胞シートを用いる。これらのサンプル間で発現しているムチンをPAS染色で評価するほか、ムチン量の比較を行う。発現ムチンコア蛋白の同定と比較を免疫抗体法やELISAやリアルタイムPCRなどの手法を用いて行った後に、無血清培地に各種細胞間シグナル経路の阻害剤を添加し、ムチン非発現系の作出を試みる。阻害剤を添加した幹細胞コロニーを用いてPAS染色によるムチン発現量比較でムチン非発現系のスクリーニングを行う。ムチン非発現系の作出の後にこれらの系が可逆的にムチンを発現し得るか阻害剤を除いて、ムチン発現の有無と定量を行い評価する。更にムチン発現を抑制できる阻害剤を見出した後にウサギへ点眼し、ドライアイモデルの実験動物系を構築可能か、組織学的手法の他、ELISAなどの手法を用いて評価する。

4. 研究成果

米国輸入角膜より高付着能をもつ幹細胞を単離し、単一幹細胞由来コロニーを得た。これらはPAS染色の結果、ムチン陽性であり、単一細胞由来でかつ無血清培養条件でもムチンを分泌することが明らかになった。これらの培養系にEGFなどによる増殖経路の一つであるERK1, 2の関与を各種阻害剤を用いて解析したところ、ERK1, 2を阻害することで知られるFR1800204を用いることにより、コントロールと比較して有意にPAS染色像の希薄化を認め、ムチン分泌を抑制できる一方、EGFによる増殖阻害は認められなかった。ERK1, 2とともにERK5をも阻害するU0126を使用することで細胞の増殖も抑えられる。またERK5のみを阻害するBIIXを用いたサンプルでも細胞は増殖しることより、ERK1, 2, 5を同時に抑えることが細胞増殖の活性を阻害し、ERK1, 2のみの阻害では細胞は増殖でき、ムチン分泌を阻害する実験系が構築可能であることが明らかになった。

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2件)

1. Stromal bed quality and endothelial damage after femtosecond laser cuts into the deep corneal stroma.

Kimakura M, Sakai O, Nakagawa S, Yoshida J, Shirakawa R, Toyono T, Yokoo S, Amano S.

Br J Ophthalmol.

2013 Nov;97(11):1404-9.

doi:10.1136/bjophthalmol-2013-303328.

Epub 2013 Sep 5

2. Long-term maintenance of limbal epithelial progenitor cells using rho kinase inhibitor and keratinocyte growth factor.

Miyashita H, **Yokoo S**, Yoshida S, Kawakita T, Yamagami S, Tsubota K, Shimmura S.

Stem Cells Transl Med.

2013 Oct;2(10):758-65.

doi: 10.5966/sctm.2012-0156. Epub 2013 Aug 27.

〔学会発表〕(計 8件)

1. **横尾誠一**

角膜再生医療の組織工学(シンポジウム)

日本再生医療学会

2014年3月4日~3月6日

国立京都国際会館

2. 吉田絢子、**横尾誠一**、山上聡、天野史郎、押方歩、須藤理絵、竹澤俊明
新素材ブタ由来アテロコラーゲンビトリゲル膜を用いた曲面角膜内皮細胞シートの作製と評価
日本再生医療学会
2014年3月4日~3月6日
国立京都国際会館

3. 吉田絢子、**横尾誠一**、山上聡、天野史郎、押方歩、須藤理絵、竹澤俊明
新素材ブタ由来アテロコラーゲンビトリゲル膜を用いた曲面角膜内皮細胞シートの作製と評価(受賞講演)
日本臨床眼科学会
2013年11月1日
パシフィコ横浜

4. Junko Yoshida, **Seichi Yokoo**, Satoru Yamagami, Shiro Amano, Ayumi Oshikata, Chika Okamoto and Toshiaki Takezawa
Evaluation of Novel Porcine Atelocollagen Vitrigel Membrane with Curvature as Corneal Endothelial Cell Carrier
The Association for Research in Vision and Ophthalmology
Seattle, USA

5. 吉田絢子、**横尾誠一**、山上聡、天野史郎、押方歩、岡本愛、竹澤俊明

新素材ブタ由来アテロコラーゲンビトリゲル膜を用いた曲面角膜内皮細胞シートの作製と評価

日本眼科学会総会

平成25年4月5日

東京国際フォーラム

6. 木枕光木子、酒井修、中川卓、吉田絢子、白川理香、豊野哲也、**横尾誠一**、天野史郎

フェムトセカンドレーザーを用いた移植用角膜切片作製の検討

日本眼科学会総会

平成25年4月5日

東京国際フォーラム

7. **横尾誠一**、山上聡、天野史郎

ヒト角膜内皮細胞の無血清培養法

日本眼科学会総会

平成25年4月5日

東京国際フォーラム

8. 中川卓、臼井智彦、上田宏生、永江玄太、山本尚吾、辻真吾、**横尾誠一**、山上聡、油谷浩幸、天野史郎

次世代シーケンサーを用いた網羅的発現解析による角膜内皮のマーカー遺伝子探索

平成25年4月5日

東京国際フォーラム

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：