

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670736

研究課題名(和文) 幼児期に機能するRNA干渉に依拠するヒト角膜内皮細胞の相転移制御技術の創出

研究課題名(英文) The development of a new way to regulate the cell state transition of cultured human corneal endothelial cells in regards to the possible RNA interference in infant corneas

研究代表者

戸田 宗豊 (Toda, Munetoyo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教(特任講座)

研究者番号：30550727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：培養角膜内皮細胞中に認められる細胞亜集団を世界で初めて明確にし、その選別法と純化法を確立した。亜集団毎の細胞特性解析を行い、各亜集団で増殖特性、サイトカイン産生能、エネルギー代謝が異なることを明らかにした。培養上清中に分泌される miRNA に差異があることを認めた。相転移をしない亜集団の分泌する miRNA 分子種が新生児角膜内皮組織でも更新が認められることを確認し、幼児期に機能する RNA 干渉の本体を明らかにした。これらの知見をもとに、相転移を示さない高品質ヒト角膜内皮細胞の培養に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have defined the subpopulations (SPs) existing in the cultured human corneal endothelial cells (chCECs) and identified the surface markers characteristic for each chCEC SP, thereby have succeeded to establish the culture method to gain efficiently the high quality of chCECs without cell state transition (CST). These SPs exhibited the distinctive proliferation propensity and features for energy metabolisms. The miRNA and the cytokines secreted to the culture supernatant (CS) were significantly different among these SPs. The CS of chCECs without CST contained elevated levels of the selected species of miRNA, identical with those observed in CS of chCECs of new born donors under one age old, indicating the relevance of miRNA interference present in infant HCECs. All these findings altogether contribute to the elaboration to produce reproducibly the high quality of chCECs without CST.

研究分野：医歯薬学

キーワード：角膜内皮細胞 再生医療 miRNA 細胞相転移

1. 研究開始当初の背景

霊長類ではヒト角膜内皮細胞 (HCEC) は生体内では増殖しないとされる。外傷や疾病、手術侵襲などによって角膜内皮組織が障害されると角膜が浮腫と混濁を生じ (水疱性角膜症)、視覚障害の主要原因疾患となる。現在、水疱性角膜症に対する唯一の治療法は角膜移植術である。近年、従来の角膜移植に代わり、培養 HCEC を用いた再生医療が進みつつある。一方で、HCEC は培養条件下で頻度高く相転移 (細胞老化、線維化、上皮間葉系移行 [EMT] など) するため、均質な細胞を得るのが困難であった。相転移の原因が何であるのか、また、細胞集団が不均一で特定亜集団に限局して非対称性の相転移を起こすのかは全く不明であった。

研究代表者は、HCEC には増殖特性、エネルギー代謝特性の異なる亜集団が存在すること、継代培養での細胞老化、線維化などの相転移の有無で細胞表面抗原の 10~15 個に著明な差異が見られること、遺伝子発現 signature が培養により変動することを応募時点で既に見出していた。従来、憶測の域を出なかった HCEC の幹細胞特性・増殖特性、細胞老化、線維化、上皮間葉系移行 [EMT] など、細胞の相転移事象に対する分子的解析の礎を開拓することに成功し、本研究を立案した。

2. 研究の目的

RNA 干渉によるヒト角膜内皮幹細胞 (HCEC) の相転移制御に係わる分子を遺伝子、miRNA 発現レベルで網羅的に解析し、相転移制御機構に係わる遺伝子・分子 signature との乖離を詳らかにする。新生児・幼児期細胞において機能する RNA 干渉を模倣することで、従前、困難とされてきた HCEC の *in vitro* 増殖のための基盤情報を提供し、幹細胞を用いる再生医療の革新的発展に繋げる。

HCEC の幹細胞は未だ同定されていない。成人角膜内皮組織が幹細胞様細胞を含有する不均一な細胞集団からなるのか否か、

HCEC は培養条件下で線維芽細胞様形態転換や細胞老化など細胞が高頻度に相転移する。均一な細胞集団が同調的に相転移を起こすのか、特定亜集団に限局して非対称性の相転移を起こすのか、また、相転移の原因が何であるのか、

以上の課題に係る細胞生物学的、分子・遺伝子学的素因の本質を明らかにすることを目的とする。本申請課題で得られる成果は、相転移を起こすことなく *in vitro* で増殖培養する技術の開発とその相転移制御機構に critical に作用する要素の分子・遺伝子学的素因の解明にあり、一つに再生医療の革新的発展に、また、内皮変性を随伴する水疱性角膜症の病態に係る分子標的を明確化し、創薬基盤技術として新分野の開拓に資する。

3. 研究の方法

(1). **培養 HCEC 亜集団の明確化**: 新生児期・幼児期ドナー由来の HCEC と高齢ドナー由来のものを比較して両者の遺伝子発現、miRNA 発現特性を網羅的検索のためのアレイを用いて比較する。同時に、細胞表面抗原 (266 種) の差異も FACS で解析する。予備試験で得ている培養により EMT、線維化を起こした HCEC での発現プロファイルと比較し、異同を判定し、新生児期・幼児期ドナー由来の HCEC に固有と推定される増殖・相転移制御に係わる標的分子候補を選択する。得られた選択候補を用いて、培養 HCEC 亜集団の明確化を行う

(2). **培養 HCEC 亜集団の純化法の確立。顕化亜集団の特性解析**: (1) の成果に基づき、セルソーター、MACS を活用した培養 HCEC 亜集団の純化精製法を確立する。得られた純化亜集団について、増殖特性、代謝エネルギー要求性などの特性を相互比較する。同亜集団の機能検定を実施し、上述同様にドナー差による異同を明確化する。また、Glu 欠損乳酸添加培地などで細胞亜集団間の代謝要求性の違いにもとづく選別も試みる。

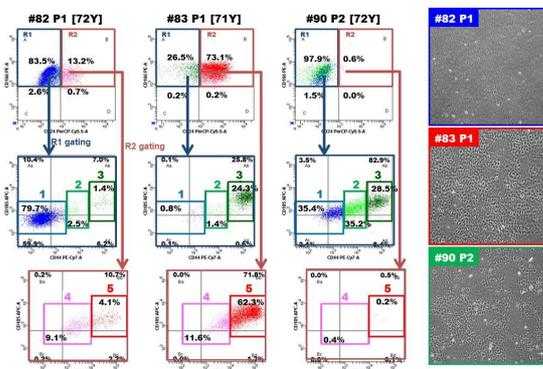
(3). **gene signature の乖離に基づく相転移制御破綻機序の推定**: HCEC 細胞内、同培養上清に遊離型もしくはエキソソーム顆粒として分泌される型の miRNA を比較検討し、これらの標的遺伝子プロファイルから成人と新生児期・幼児期由来 HCEC 間の gene signature の乖離を明らかにし、相転移制御破綻機序を推定する。選択された miRNA を比較対象の HCEC に交叉的に導入することで機能が相互転換されることを検証する。また、新鮮 HCEC (成人由来、高齢者、Guttata 病変を有する患者由来) の細胞表面抗原、遺伝子発現プロファイルを比較することで、HCEC の相転移制御の分子機序を明らかにする。

(4). **相転移抑制増殖培養技術の開発**: (2)、(3) の成果をもとに、非相転移 HCEC を高効率で増殖培養する技術を開発する。

4. 研究成果

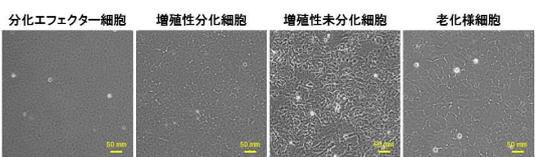
(1). 網羅的アレイ、クラスター解析により、培養角膜内皮細胞において細胞老化、線維化、上皮間葉移行などの相転移の有無で 10~15 個の細胞表面抗原に著明な差異が見られることから、このうちの複数種の細胞表面マーカーを指標として培養条件下で相転移を起こした細胞と起こさなかった細胞をフローサイトメーターにより定量化をする系を確立した (図 1)。この系を用いて、継代回数、ドナー年齢間で細胞表面抗原プロファイルを比較した。その結果、継代を経るごとに相転移を起こした細胞が増加していくことが

明らかとなった。また、ドナー年齢間でも差異が認められた（論文投稿中）。



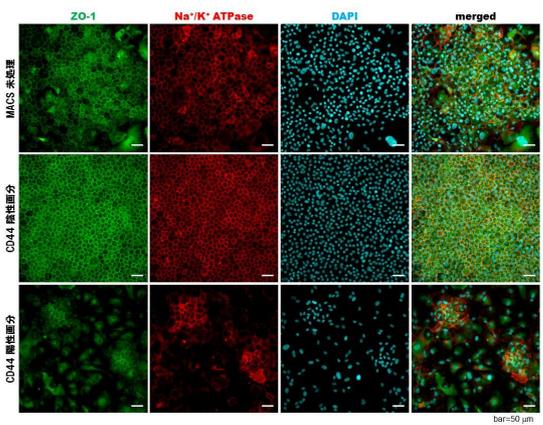
(図1) 表面抗原による培養 HCEC 亜集団の定量化

相転移を起こしている細胞には、複数の亜集団が検出され、非相転移細胞（分化成熟細胞）を含め、培養 HCEC 亜集団を図2のように分類した。



(図2) 培養 HCEC に見られる亜集団

(2). 図1の定量化法に用いた細胞表面マーカーのうちの1つ CD44 をターゲット分子とした磁気細胞分離 (MACS) により成熟分化角膜内皮細胞亜集団を純化する系を確立した(図3)。



(図3) MACS による非相転移亜集団(成熟分化 HCEC 亜集団)の純化

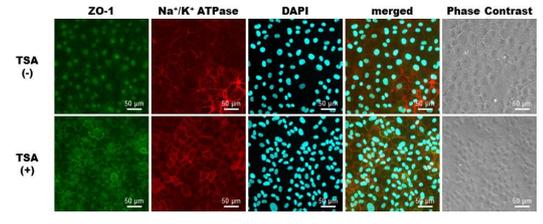
以上のように、相転移細胞亜集団で CD44 の発現が亢進することが明らかとなった。CD44 は、後述の miR-34 と関連していることが知られている。

得られた亜集団間の比較解析により、非相転移細胞は生体内に存在する HCEC に最も類似していること(よってこの亜集団を分化成熟細胞とした) HLA I の発現が他の亜集団に比べて低く免疫拒絶に対して優位であ

ること、染色体異常がないこと、小型で培養条件下でも細胞密度が 2000 細胞/mm² 以上に達することなどが明らかとなった(論文投稿中)。

(3). 角膜内皮組織について遺伝子発現の網羅的遺伝子発現検索や miRNA プロファイルを解析した結果、新生児角膜内皮組織由来細胞において miR-184, miR-1246, miR-4732 の発現が特異的に上昇していた。新生児の角膜内皮組織由来細胞における miR-184 の発現は成人組織のその 10 倍以上に達する(論文投稿中)。本 miRNA が新生児・幼児期細胞において RNA 干渉を担う代表的 miRNA ではないかと考えるに至った。成人角膜内皮細胞の培養に際しても相転移や老化細胞で発現が成熟分化細胞の 5% 水準に低下することが判明した。この miR-184 はグリオーマおよび乳がん細胞において CD44 の発現を抑制することが報告されている (Feng, R. and Dong, L. (2015) Int. J. Exp. Pathol. 8 9376)。成熟分化培養角膜内皮細胞は分化と共に CD44 の発現が低下することを考えると本 RNA 干渉がヒト角膜内皮細胞の増殖、分化に大きな影響を持つことが想定される。この分子機構には、c-Myc、HDAC 経路の関与の可能性が想定されている。miR-34 は培養角膜内皮細胞亜集団のうち成熟分化した角膜内皮細胞亜集団のみに特異的に細胞内に発現することを明らかにした。miR-34 は、EMT や細胞増殖を抑制したり、分化を促進したりすることが知られている。

(4) HCEC のコラーゲンゲル中での三次元培養でスフェアの形成が見られたことから、幹細胞または前駆細胞の存在が示唆された。そこで幹細胞用無血清培地と組換えラミニンフラグメントを組み合わせた培養法を用いることで、高増殖性の幹細胞様(または前駆細胞様)未分化細胞と思われる細胞を得ることができた。分化成熟方法が課題であったが、(3)の成果より HDAC 阻害剤として知られるトリコスタチン (TSA) を培養液に添加して分化誘導を試みた。その結果、未だ効率に問題があるものの幹細胞様(前駆細胞様)未分化細胞を成熟角膜内皮細胞に分化誘導することに成功した(図4)。



(図4) TSA による分化誘導

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0件)

〔学会発表〕(計19件)

1. M. Toda, M. Ueno, A. Hiraga, K. Asada, M. Montoya, C. Sotozono, J. Hamuro, S. Kinoshita. The cell homogeneity is indispensable for regenerative medicine by cultivated human corneal endothelial cells. ARVO 2016 Annual Meeting. 2016年5月1日~5日. Seattle, WA, U.S.A.
2. S. Kinoshita, M. Ueno, K. Asada, M. Toda, K. Nagata, C. Sotozono, N. Kosaka, T. Ochiya, J. Hamuro. Regulation of Mitochondrial respiration under cell culture stress in human corneal endothelial cells. ARVO 2016 Annual Meeting. 2016年5月1日~5日. Seattle, WA, U.S.A.
3. M. Ueno, M. Toda, A. Hiraga, K. Wakimasu, N. Koizumi, N. Okumura, K. Asada, C. Sotozono, J. Hamuro, S. Kinoshita. Profiles of cytokines in the aqueous humor and serum of bullous keratopathy patients. ARVO 2016 Annual Meeting. 2016年5月1日~5日. Seattle, WA, U.S.A.
4. J. Yamada, M. Ueno, M. Toda, K. Shinomiya, C. Sotozono, S. Kinoshita, J. Hamuro. Allogeneic sensitization and tolerance induction post corneal endothelial cell injection into the anterior chamber. ARVO 2016 Annual Meeting. 2016年5月1日~5日. Seattle, WA, U.S.A.
5. K. Asada, M. Ueno, M. Toda, A. Hiraga, M. Montoya, C. Sotozono, S. Kinoshita, J. Hamuro. The role of dysregulated expression of miRs in the pathogenesis of bullous keratopathy and Fuchs' endothelial corneal dystrophy. ARVO 2016 Annual Meeting. 2016年5月1日~5日. Seattle, WA, U.S.A.
6. J. Hamuro, M. Ueno, K. Asada, M. Toda, M. Montoya, C. Sotozono, S. Kinoshita. Metabolic plasticity in the cell-state homeostasis and differentiation of cultured human corneal endothelial cells. ARVO 2016 Annual Meeting. 2016年5月1日~5日. Seattle, WA, U.S.A.
7. H. Tanaka, A. Yamamoto, M. Toda, J. Hamuro, C. Sotozono, S. Kinoshita, M. Ueno, M. Tanaka. Quantifying the adhesion strength of human corneal endothelial cells in an in vitro model. 2016年5月1日~5日. Seattle, WA, U.S.A.
8. 戸田宗豊、上野盛夫、平賀朝子、浅田和子、外園千恵、木下茂、羽室淳爾. 培養ヒト角膜内皮細胞亜集団の特性解析. 第120回日本眼科学会総会. 2016年4月7日~10日. 仙台国際センター・東北大学百周年記念会館(宮城県仙台市)
9. 上野盛夫、戸田宗豊、平賀朝子、小泉範子、奥村直毅、浅田和子、外園千恵、羽室淳爾、木下茂. 水疱性角膜症患者の血清中および前房水中サイトカインプロファイルの検討. 第120回日本眼科学会総会. 2016年4月7日~10日. 仙台国際センター・東北大学百周年記念会館(宮城県仙台市)
10. 浅田和子、上野盛夫、戸田宗豊、平賀朝子、落谷孝広、外園千恵、木下茂、羽室淳爾. 角膜内皮細胞機能不全におけるepigeneticな細胞機能制御. 第120回日本眼科学会総会. 2016年4月7日~10日. 仙台国際センター・東北大学百周年記念会館(宮城県仙台市)
11. 羽室淳爾、上野盛夫、浅田和子、戸田宗豊、外園千恵、木下茂. MiRNA profiles qualify epigenetic features of human corneal endothelial cells. 第120回日本眼科学会総会. 2016年4月7日~10日. 仙台国際センター・東北大学百周年記念会館(宮城県仙台市)
12. M. Toda, M. Ueno, A. Hiraga, T. Nakamura, M. Hagiya, N. Okumura, N. Koizumi, J. Hamuro, S. Kinoshita. The different binding properties of cultured human corneal endothelial cell subpopulations to Descemet's membrane components. ARVO 2015 Annual Meeting. 2015年5月3日~7日. Denver, CO, U.S.A.
13. H. Tanaka, M. Ueno, M. Toda, J. Hamuro, K. Yoshii, N. Koizumi, N. Okumura, S. Kinoshita, M. Montoya, B. Iliakis. Investigation of the donor tissue information on the phenotypes of cultivated human corneal endothelium. ARVO 2015 Annual Meeting. 2015年5月3日~7日. Denver, CO, U.S.A.
14. M. Ueno, M. Toda, A. Hiraga, N. Tobita, H. Nakagawa, C. Sotozono, N. Koizumi, K. Asada, J. Hamuro, S. Kinoshita. Analysis of cytokines in serum and aqueous humor in patients with bullous keratopathy. ARVO 2015 Annual Meeting. 2015年5月3日~7日. Denver, CO, U.S.A.
15. M. Toda, M. Ueno, K. Ujihara, K. Asada, T. Nakamura, M. Hagiya, N. Okumura, N. Koizumi, J. Hamuro, S. Kinoshita. Identification of differentiated mature cultured human corneal endothelial cells and their distinct cell propensity from other immature subpopulations. ARVO 2014 Annual Meeting. 2014年5月4日~8日. Orlando, FL, U.S.A.
16. M. Ueno, K. Asada, M. Toda, M. Hagiya, N. Okumura, N. Koizumi, J. Hamuro, S. Kinoshita. The integral analysis of senescence-associated secretory pathway

and microRNA secretion of cultured human corneal endothelial cells relating to their function, cell senescence, and epithelial-mesenchymal transition. ARVO 2014 Annual Meeting. 2014年5月4日～8日. Orlando, FL, U.S.A.

17. K. Asada, M. Toda, M. Ueno, K. Ujihara, A. Mukai, M. Hagiya, N. Okumura, N. Koizumi, J. Hamuro, S. Kinoshita. Distinct energy metabolism between cultured mature human corneal endothelial cells and their phenotype transitioned cells. ARVO 2014 Annual Meeting. 2014年5月4日～8日. Orlando, FL, U.S.A.
18. M. Toda, K. Nakata, K. Asada, M. Hagiya, M. Ueno, N. Okumura, N. Koizumi, J. Hamuro, S. Kinoshita. Proliferation propensity of cultured human corneal endothelial cells and their plasticity dictated by culture microenvironments. ARVO 2013 Annual Meeting. 2013年5月5日～9日. Seattle, WA, U.S.A.
19. K. Asada, M. Toda, M. Hagiya, K. Nakata, M. Ueno, N. Okumura, N. Koizumi, J. Hamuro, S. Kinoshita. The integral analysis of gene signatures and miRNA expression of cultured human corneal endothelial cells relating to their functions, cell senescence, epithelial mesenchymal transition and fibrosis. ARVO 2013 Annual Meeting. 2013年5月5日～9日. Seattle, WA, U.S.A.

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：ヒト角膜内皮機能性細胞の品質評価または工程管理

発明者：木下茂、羽室淳爾、外園千恵、上野盛夫

権利者：京都府公立大学法人

種類：特願

番号：2016-026426

出願年月日：平成28年2月15日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸田 宗豊 (TODA MUNETOYO)

京都府立医科大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30550727

(2) 研究分担者

なし()

研究者番号：

(3) 連携研究者

羽室 淳爾 (HAMURO JUNJI)

京都府立医科大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80536095