

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670760

研究課題名(和文) 角膜内皮細胞老化の分子機構の解明と再生医療への応用

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism of cellular-senescence of corneal endothelial cells in association with cell-culture and its application for corneal endothelial tissue engineering

研究代表者

小泉 範子 (Koizumi, Noriko)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：20373087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：角膜内皮再生医療の開発における重要な課題である角膜内皮細胞老化の分子機構を解明し、細胞培養中の老化を制御する基盤技術の開発を目指した。ヒト角膜内皮細胞に発現するラミニンおよびインテグリンアイソフォームを同定し、ラミニン511、521などの特定のラミニン分子と、p38 MAPキナーゼ阻害剤を用いることにより、細胞培養環境における細胞老化関連遺伝子の変化やSASP (senescence-associated secretory phenotype) タンパク質を抑制することによって、高密度で角膜内皮機能を維持したヒト角膜内皮細胞培養が可能になることを示した。

研究成果の概要(英文)：We have recently started a Japanese clinical trial of a cell-based therapy for treating corneal endothelial dysfunction, yet corneal endothelial cell (CEC) senescence during culture associated with cell density (CD) drop is a serious obstacle in obtaining large quantities of cells for clinical use. The aim of this study was to examine the mechanism of cellular-senescence of human CECs in culture and develop a new culture system for the clinical application of cultivated HCEC transplantation. We showed that laminin-511 is expressed in the Descemet's membrane and laminin-511-E8 fragment enhances the adhesion and proliferation of HECE in culture. Our study also revealed that p38MAPK signaling might be activated by culture-condition-related cell stress that induces senescence-associated secretory phenotype, and that p38MAPK inhibition enables CECs culture with maintaining high CD and functional phenotype, thus indicating its usefulness for corneal endothelial regenerative medicine.

研究分野：再生医療、医工学、眼科学

キーワード：角膜内皮細胞 再生医療 細胞老化 p38 MAPキナーゼ ラミニン

1. 研究開始当初の背景

角膜の透明性維持に重要な役割を果たす角膜内皮細胞は、生体内における増殖能が乏しいため、広範囲に障害されると水疱性角膜症となり重症の視力障害をきたす。申請者らは、Rho キナーゼ阻害剤を併用した培養角膜内皮細胞の前房注入治療の有用性を報告し、(Okumura N, et al. Am J Pathol, 2011) 2013 年 12 月には水疱性角膜症に対する First-in-man 臨床試験を開始した。従来、非増殖性のヒト角膜内皮細胞を正常の形態と機能を維持しながら大量に培養することは非常に困難とされており、角膜内皮再生医療の開発における重要な課題とされてきた。

申請者らは内閣府「最先端・次世代研究開発支援プログラム(2010~2013 年度)」に採択され、1) TGF- β シグナル阻害によって角膜内皮細胞の上皮間葉移行を抑制することで、線維化抑制と正常機能維持が得られること(Okumura N, et al. PLoS ONE, 2013: PCT/JP2012/084320)、2) Rho キナーゼ阻害剤が細胞死を抑制すること(Okumura N, et al. IOVS, 2009: PCT/JP2010/073904)、3) ヒト間葉系幹細胞の馴化培地は角膜内皮細胞の増殖を促進すること(Nakahara M, et al. PLoS ONE, 特開 2012-196725)を報告し、臨床応用可能な角膜内皮培養法確立のための基盤技術を開発した。

一方で、ヒト角膜内皮細胞は、*in vitro* で培養すると容易に細胞老化を生じて細胞密度が低下することが知られており、角膜内皮細胞の老化制御は、培養角膜内皮細胞移植によって長期的に良好な視力予後を得るために解決しなくてはならない喫緊の問題である。

2. 研究の目的

本研究は角膜内皮細胞老化の分子機構を解明し、角膜再生医療実現のための基盤技術を提供することを目的とする。

具体的には、ヒト角膜内皮細胞の細胞老化を制御する標的分子を特定し、基底膜構成ラミニン分子がインテグリンを介して細胞老化を制御するメカニズムを解明する。これらの基礎的研究の成果をもとに、細胞培養中に生じる角膜内皮細胞の老化を抑制し、“rejuvenation(若返り)”を実現するための基盤技術を開発し、治療効果が高く安全性が担保されたヒト培養角膜内皮移植の実現を目指す。

3. 研究の方法

(1) 角膜内皮基底膜に発現するラミニンのアイソフォームの発現解析と細胞老化制御

ヒト角膜組織の角膜内皮細胞におけるラミニンの三量体の構成成分である α 、 β 、 γ のそれぞれのサブユニットの発現を PCR 法にて検討した。また、ヒト角膜内皮基底膜および角膜内皮細胞において発現するラミニンのアイソフォームを免疫染色を用

いて同様に検討した。さらに、ラミニンに結合し細胞外の環境を細胞内にシグナル伝達するインテグリンの角膜内皮における発現を解析した。

次に、角膜内皮基底膜あるいは角膜内皮細胞において発現している複数のラミニンのアイソフォームを基質として用いてヒト角膜内皮細胞培養を行い、角膜内皮再生医療に応用可能なラミニンのアイソフォームを決定する。具体的にはシアトルアイバンクより入手した研究用ヒト角膜組織から採取した角膜内皮細胞を用いて、角膜内皮に発現するラミニンのアイソフォームの細胞老化、細胞増殖、細胞接着への影響を検討した。コントロールとして、角膜内皮基底膜に発現していないラミニンのアイソフォームを用いた検討を行った。また、ヒト角膜内皮細胞培養の基質として適していると考えられたラミニンのアイソフォームが細胞老化に与える影響を解析し、細胞環境と細胞老化の分子の機序を明らかにすることを旨とした。

(2) 角膜内皮細胞の細胞老化における制御因子の解析と新規細胞培養法の開発

再生医療において移植細胞の培養中の細胞老化は移植予後の悪化に直結することが予測されるため、ラミニンによる細胞培養時の細胞老化への影響について解析した。近年、細胞老化により遺伝子の発現プロファイルが大きく変化し、炎症性サイトカインをはじめとするタンパク質を分泌する SASP (senescence-associated secretory phenotype) とよばれる現象が注目されている。本研究においてはラミニンを用いた細胞培養における、SASP タンパク質の発現の変化をプロテインアレイを用いて解析した。これらの解析により、ヒト角膜内皮細胞を生体内の環境に近いラミニンを基質として培養することで、細胞老化を回避させることができるかを検証する。さらに、角膜内皮細胞の老化制御を可能とする培養法の開発を試みた。

(3) 細胞老化制御培養法による角膜内皮細胞による非臨床試験

移植細胞における細胞老化が角膜内皮細胞移植の治療効果に及ぼす影響を明らかにするため、細胞密度の異なる培養角膜内皮細胞を用いた動物眼への細胞移植を行い、移植細胞における細胞老化が治療効果に及ぼす影響を検討した。具体的には、角膜内皮障害を作製したウサギ眼の前房内に低密度(約 700 個/mm²)あるいは高密度(約 2500 個/mm²)のウサギ培養角膜内皮細胞を 5×10⁵ 個注入した。経時的に細隙灯顕微鏡、Pentacam[®]による観察を行い、14 日後に Na⁺/K⁺-ATPase、ZO-1、N-cadherin による組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) 角膜内皮基底膜に発現するラミニンのアイソフォームの発現解析と細胞老化制御

ヒト角膜内皮基底膜および角膜内皮に発現するラミニンのアイソフォームの発現を検討し、発現が確認されたアイソフォームを用いて培養基質としての有用性を検討した。ヒト角膜内皮ではラミニン 5、1、2、3、1、2 が発現しており、ヒト角膜内皮細胞の接着は、培養皿をラミニン 511、521 でコーティングすることで、非コーティングのコントロールと比べて、それぞれ $151.3 \pm 3.8\%$ 、 $153.1 \pm 3.1\%$ と有意に促進された。BrdU の取り込み率は、ラミニン 511、521 においてそれぞれ $261.9 \pm 5.1\%$ 、 $324.0 \pm 3.6\%$ と有意に促進された。一方で角膜内皮に発現していないラミニン 211 を用いた場合には、細胞接着、細胞増殖ともに抑制された。さらに、ラミニンに結合するインテグリンの角膜内皮における発現を解析したところ、ヒト角膜内皮細胞にはインテグリン 1、2、3、6、v、1 の発現が確認され、インテグリンを介して特定の細胞外マトリックスと結合することで細胞接着などの細胞現象を制御していることが示唆された。また、ラミニン 511、521 等の特定のラミニン分子を用いることで細胞機能を制御し、効率的な角膜内皮細胞培養が可能であることが示された。

(2) 角膜内皮細胞の細胞老化における制御因子の解析と新規細胞培養法の開発
ラミニン 511-E8 フラグメントを基質とした細胞培養系を用いて、培養ヒト角膜内皮細胞の細胞老化における p38 MAP キナーゼ阻害剤の有用性を検討した。その結果、p38 MAP キナーゼ阻害剤を添加した群では、非添加群と比較して、培養ヒト角膜内皮細胞の細胞老化様態変化が抑制され、細胞密度も有意に高値となった(添加群 2623.2 ± 657.3 個/mm²、非添加群 1751.8 ± 627.5 個/mm²、 $p < 0.01$)。また、添加群では角膜内皮細胞の機能関連マーカーがすべての細胞に発現しており、非添加群に比べて核細胞質比が有意に高値を示した。タンパクアレイおよび定量 PCR による炎症性サイトカインの発現検討では、p38 MAP キナーゼ阻害剤の添加により IL-6、IL-8、GRO α 、MCP-1 など炎症や細胞老化に関与する因子の発現がタンパクレベルおよび遺伝子レベルで抑制された。以上の結果より、p38 MAP キナーゼ阻害剤は、細胞培養環境における細胞老化に関連する遺伝子変化、SASP タンパク質を抑制することによって、高密度で角膜内皮機能を維持したヒト角膜内皮細胞培養を可能にすることが示された。

(3) 細胞老化制御培養法による角膜内皮細胞による非臨床試験
角膜内皮障害を作製したウサギ眼に、低密度、高密度のウサギ培養角膜内皮細胞を移植した。2週間後には、低密度群、高密度群ともに角膜の透明性が回復したが、低密度群では角膜厚が $839.8 \pm 108.2 \mu\text{m}$ であったのに対し、高密度群では $418.5 \pm 36.0 \mu\text{m}$ と有意に

低値であった ($p < 0.01$)。再生された角膜内皮の細胞密度は、低密度群では 1137.0 ± 140.2 個/mm² であったのに対し、高密度群では 2630.0 ± 312.2 個/mm² と有意に高値であった ($p < 0.01$)。組織学的検討において、高密度群では機能関連マーカーの発現を伴う角膜内皮細胞の再生を認めしたが、低密度群では発現が認められない部分があった。以上の結果より、高密度の角膜内皮細胞を移植することにより、より早期に角膜浮腫が改善し、高密度の角膜内皮細胞が再建されることを示した。上記の結果より、角膜内皮再生医療では、高密度の培養角膜内皮細胞を移植することによって、より優れた治療効果が得られる可能性が示された。

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. Okumura N, Kusakabe A, Hirano H, Inoue R, Okazaki Y, Nakano S, Kinoshita S, Koizumi N: Density-gradient centrifugation enables the purification of cultured corneal endothelial cells for cell therapy by eliminating senescent cells. *Sci Rep*, 2015 Oct 7;5:15005. doi: 10.1038/srep15005.
2. Okumura N, Kakutani K, Numata R, Nakahara M, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse F, Kinoshita S, Koizumi N: Laminin-511 and 521 enable efficient in vitro expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56(5): 2933-2942, 2015.

[学会発表](計20件)

1. Koizumi N: Cell-Based Therapy for Corneal Endothelial Regeneration. the 31st Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress (APAO 2016), Taipei(Taiwan), 2016.3.27.
2. 小泉範子: 水疱性角膜症に対する培養角膜内皮細胞移植の開発. 第15回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場(大阪), 2016.3.18.
3. 本郷茜, 奥村直毅, 中原マキ子, 小泉範子: p38 MAP キナーゼ阻害剤のヒト角膜内皮細胞培養における有用性の検討. 第15回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場(大阪), 2016.3.17.
4. 本郷茜, 奥村直毅, 中原マキ子, 小泉範子: p38 MAP キナーゼ阻害剤のヒト角膜内皮細胞培養における有用性の検討.

角膜カンファランス 2016 第 40 回日本角膜学会総会 第 32 回日本角膜移植学会, 軽井沢プリンスホテル ウエスト(長野), 2016.2.18.

5. 日下部綾香, 奥村直毅, 平野浩惇, 井上亮太, 岡崎友吾, 角谷和哉, 木下茂, 小泉範子: 培養角膜内皮細胞移植の治療効果に対する細胞密度の影響. 角膜カンファランス 2016 第 40 回日本角膜学会総会 第 32 回日本角膜移植学会, 軽井沢プリンスホテル ウエスト(長野), 2016.2.18.
6. 小泉範子: 培養細胞を用いた角膜内皮再生医療. 角膜カンファランス 2016 第 40 回日本角膜学会総会 第 32 回日本角膜移植学会, 軽井沢プリンスホテル ウエスト(長野), 2016.2.18.
7. 小泉範子: 角膜内皮再生医療. 第 39 回日本眼科手術学会学術総会, 福岡国際会議場(福岡), 2016.1.31.
8. 角谷和哉, 奥村直毅, 井上亮太, 岡崎友吾, 中野新一郎, 小泉範子: 培養角膜内皮細胞移植におけるラミニン 511-E8 フラグメントの有用性. 第 37 回日本バイオマテリアル学会, 京都テルサ(京都), 2015.11.10.
9. 奥村直毅, 中野新一郎, 日下部綾香, 井上亮太, 岡崎友吾, 角谷和哉, 木下茂, 小泉範子: 培養角膜内皮細胞移植における移植細胞の細胞老化が治療効果に与える影響. 第 37 回日本バイオマテリアル学会, 京都テルサ(京都), 2015.11.10.
10. Okumura N, Nakano S, Kusakabe A, Inoue R, Okazaki Y, Kakutani K, Kinoshita S, Koizumi N: Effect of the cell density of cultivated corneal endothelial cells on tissue engineering for the treatment of corneal endothelial dysfunction. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology 2015, Colorado(USA), 2015.5.3.
11. Kusakabe A, Okumura N, Hirano H, Koizumi N, Kinoshita S: Purification of high cell density cultured corneal endothelial cell by density-gradient centrifugation. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology 2015, Colorado(USA), 2015.5.3.
12. Kakutani K, Okumura N, Schlotzer-

Schrehardt U, Kruse FE, Kinoshita S, Koizumi N: The feasibility of recombinant human laminin-511 E8 fragments for human corneal endothelial cell cultivation. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology 2015, Colorado(USA), 2015.5.3.

13. 奥村直毅, 中野新一郎, 日下部綾香, 井上亮太, 岡崎友吾, 角谷和哉, 木下茂, 小泉範子: 培養角膜内皮細胞移植における移植細胞の細胞密度が治療効果に与える影響. 第 119 回日本眼科学会総会, ロイトン札幌(札幌), 2015.4.16.
14. 角谷和哉, 奥村直毅, 沼田諒平, Ursula Schlötzer-Schrehardt, Friedrich E. Kruse, 木下茂, 小泉範子: ラミニン 511-E8 フラグメントの角膜内皮細胞の基質接着性に対する影響. 角膜カンファランス 2015 第 39 回日本角膜学会総会・第 31 回日本角膜移植学会, 高知市文化プラザかるぽーと(高知), 2015.2.12.

〔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
<http://tissue-engineering-doshisha.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 範子 (KOIZUMI, Noriko)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号: 20373087

(2) 研究分担者

奥村 直毅 (OKUMURA, Naoki)
同志社大学・生命医科学部・准教授
研究者番号: 10581499