

Title	間葉系幹細胞から角膜内皮細胞への分化誘導
Sub Title	Functional corneal endothelium derived from mesenchymal stem cells
Author	小川, 安希子(Ogawa, Akiko)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	間葉系幹細胞は多分化能および自己増殖能力を有し、再生医療への応用が期待されている。近年、骨髓より侵襲の少ない細胞源として臍帯由来間葉系幹細胞(UC-MSC)の研究が注目されている。本研究ではUC-MSC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。in vitroで免疫染色、RT-PCR、qPCR、ウエスタンブロットにて機能的な角膜内皮マーカーの機能解析、in vivoにて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。マーカー発現や細胞形態の改善などは今後の検討が必要と考えられたが、UC-MSCが角膜内皮再生医療における細胞源となりうることが示された。 Mesenchymal stem cells have pluripotency and self-proliferation ability and expected to be applied to regenerative medicine. Currently, research on umbilical cord-derived mesenchymal stem cells(UC-MSC) has attracted attention as a cell source less invasive than bone marrow. In this study, we successfully induced functional corneal endothelial cells using UC-MSC. Analysis of functional corneal endothelial markers by immunostaining, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), quantitative Polymerase Chain Reaction(qPCR), Western blot in vitro, and transplantation experiments of rabbit bullous keratopathy model in vivo confirmed the efficacy. Corneal endothelium marker expression and cell morphology are considered to be necessary for future studies, but UC-MSC can serve as a source of cells in corneal endothelial regeneration.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2015～2016 課題番号：15K20286 研究分野：眼科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K20286seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成29年6月2日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20286

研究課題名（和文）間葉系幹細胞から角膜内皮細胞への分化誘導

研究課題名（英文）Functional corneal endothelium derived from mesenchymal stem cells

研究代表者

小川 安希子 (Ogawa, Akiko)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：20445323

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）：間葉系幹細胞は多分化能および自己増殖能力を有し、再生医療への応用が期待されている。近年、骨髄より侵襲の少ない細胞源として臍帯由来間葉系幹細胞(UC-MSC)の研究が注目されている。本研究ではUC-MSC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。in vitroで免疫染色、RT-PCR、qPCR、ウエスタンプロットにて機能的な角膜内皮マーカーの機能解析、in vivoにて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。マーカー発現や細胞形態の改善などは今後の検討が必要と考えられたが、UC-MSCが角膜内皮再生医療における細胞源となりうることが示された。

研究成果の概要（英文）：Mesenchymal stem cells have pluripotency and self-proliferation ability and expected to be applied to regenerative medicine. Currently, research on umbilical cord-derived mesenchymal stem cells(UC-MSC) has attracted attention as a cell source less invasive than bone marrow. In this study, we successfully induced functional corneal endothelial cells using UC-MSC. Analysis of functional corneal endothelial markers by immunostaining, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), quantitative Polymerase Chain Reaction(qPCR), Western blot in vitro, and transplantation experiments of rabbit bullous keratopathy model in vivo confirmed the efficacy. Corneal endothelium marker expression and cell morphology are considered to be necessary for future studies, but UC-MSC can serve as a source of cells in corneal endothelial regeneration.

研究分野：眼科学

キーワード：間葉系幹細胞 角膜内皮細胞 再生医療 神経堤細胞 水疱性角膜症

1. 研究開始当初の背景

角膜内皮機能不全による水疱性角膜症は失明に至る。生後、ヒト角膜内皮細胞は増殖能に乏しく、フックス角膜内皮ジストロフィのほか外傷や炎症で角膜内皮細胞が著明に減少すると水疱性角膜症をきたす。主な治療法は角膜移植であるが、本邦ではドナー不足の問題および、角膜移植に伴う拒絶反応などの合併症があり、新たな再生医療の研究が望まれている。

申請者らの研究グループは過去にマウスおよびヒト角膜実質幹細胞^{1,2}、マウスおよびヒト皮膚由来幹細胞³を分離し、機能的角膜内皮細胞へと誘導することに成功した。しかし、これらの幹細胞はヒトでは増殖能が乏しく、敷石状の細胞形態として不十分であった。そこで、申請者は新たな細胞源として多分化能をもち自己増殖能をもつ間葉系幹細胞⁴に着目した。過去の角膜内皮誘導法を適応することで機能的角膜内皮細胞の誘導が可能であれば、遺伝子操作がなく倫理的な問題からも臨床応用の実現性が高い。

2. 研究の目的

本研究ではヒト骨髓由来間葉系幹細胞(BM-MSC)およびヒト臍帯由来間葉系幹細胞(UC-MSC)を用いて、機能的な角膜内皮細胞の誘導を検証する。間葉系幹細胞としてのcharacterization、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評価を行う。

3. 研究の方法

(1) BM-MSC, UC-MSC の characterization として骨、脂肪、軟骨への分化能、フローサイトメトリーによる表面抗原解析を行う。

(2) UC-MSC から角膜内皮細胞への分化誘導：過去に我々の研究グループが開発した角膜内皮細胞への分化誘導方法を応用し、in vitro で分化誘導を試みる。角膜内機能マーカーの免疫染色、RT-PCR、qPCR、ウエスタンプロットで評価を行う。

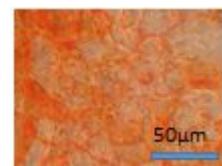
(3) in vivo で角膜内皮細胞へ分化誘導後の UC-MSC を家兎水疱性角膜症モデルへ移植実験を行い、角膜厚、眼圧、角膜透明性を評価し、有効性を検証する。

4. 研究成果

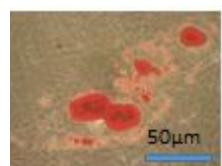
(1) BM-MSC、UC-MSC はともに骨、脂肪、軟骨への分化能を示した。

BM-MSC の分化能を図 1 に示す。

図 1



アリザリンレッド S 染色にて骨への分化能を示した



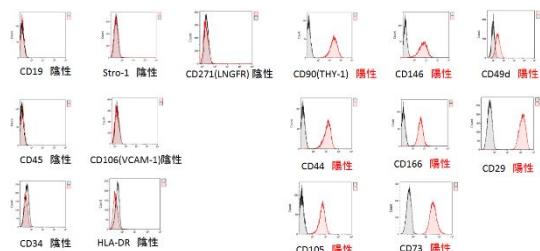
オイルレッド O 染色にて脂肪への分化能を示した



トルイジンブルー染色にて軟骨への分化能を示した

UC-MSC も同様に骨、脂肪、軟骨への分化能を示した。

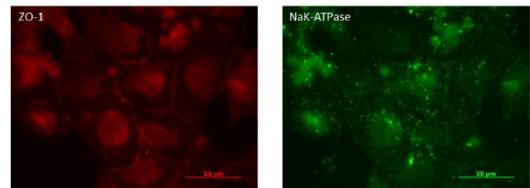
図 2



UC-MSC はフローサイトメトリーにて CD19, 34, 45, 106, 171, Stro-1, HLA-DR 隆性、CD29, 44, 49d, 73, 90, 105, 146, 166 隆性を示した(図 2)。

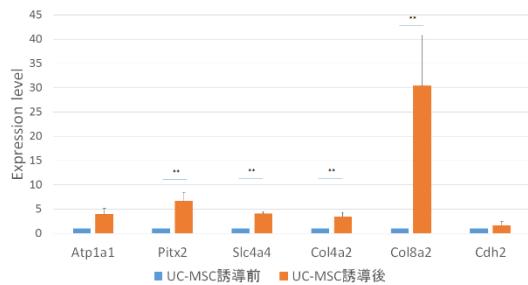
(2) UC-MSC から角膜内皮細胞への分化誘導後に、免疫染色で tight junction のマーカーである ZO-1 の発現および NaK-ATPase 1-subunit の発現を示した。(図 3)

図 3



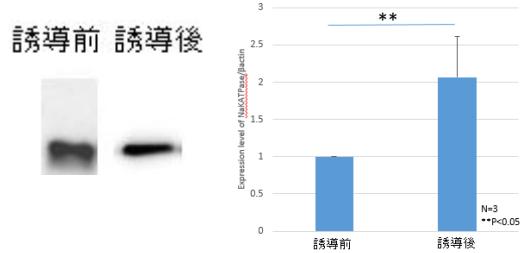
角膜内皮誘導後の UC-MSC は RT-PCR で角膜内皮機能的マーカーである Atp1a1, CDH2, Pitx2, Slc4a4, Col4a2, Col18a2 の発現を示した。それらは qPCR で誘導後に概ね上昇していた。(図 4)

図 4 UC-MSC 角膜内皮誘導後の角膜内皮機能的マーカー発現(左：誘導前、右：誘導後)



角膜内皮誘導後の UC-MSC はウエスタンプロットで Atp1a1 の発現を認め、誘導後に発現レベルが上昇した。(図 5)

図 5 UC-MSC 角膜内皮誘導後のウエスタンプロット(Atp1a1)

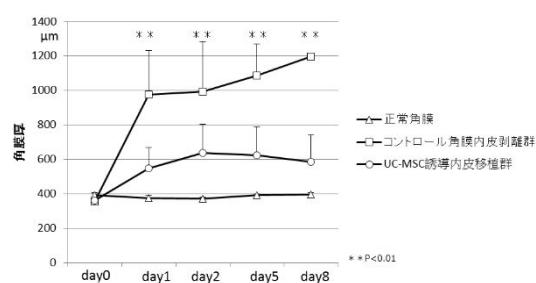


(3)
 in vivo の有効性評価として角膜内皮細胞へ分化誘導後の UC-MSC を家兎水疱性角膜症モデルへ移植し、角膜厚、眼圧、角膜透明性を移植後 day1, 2, 5, 8 で評価した。コントロールの角膜内皮剥離眼は著明な角膜浮腫を呈し、角膜内皮分化誘導後 UC-MSC 移植群は角膜透明度が維持され、角膜厚は有意に減少していた。眼圧は両群ともに有意な差を認めなかった。(図 5、6)

図5 家兎水疱性角膜症モデル移植1日後の前眼部写真
 コントロール UC-MSC 誘導内皮移植群



図6 家兎水疱性角膜症モデル移植後、角膜厚の推移(n=5)



(4) 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

本研究では BM-MSC および UC-MSC で間葉系幹細胞の characterization を確認し、UC-MSC から機能的角膜内皮細胞の誘導を行うことに成功した。UC-MSC から角膜内皮細胞への分化誘導を行った報告はなく、我々の研究実績を応用した本研究は非常に独創的である。MSC には組織障害部位に集積し、免疫抑制能を有する特徴があるため、各臓器で再生医療への臨床応用がすすんでいる。角膜内皮の分野では、水疱性角膜症に対する新規細胞移植治療として有望であり、現在、手術適応にならない初期の角膜内皮機能不全の潜在的患者への適応も期待できる。近年、UC-MSC は臍帯バンクとして研究機関への細胞提供が行われている。今後、各臓器にて他家移植の細胞移植治療の細胞源として期待される。他臓器に比べ、眼科領域では前房関連免疫偏位という免疫特権があり、他家移植の実現性が期待できる。水疱性角膜症患者の多くは視力障害が高度で就学や就労に障害をきたしている。本研究の成果をもとに臨床応用への研究がすすみ、これらの患者が視力を回復し、社会活動に積極的に参加できるようになれば、日本社会の文化および経済的発展へ貢献できる。

<引用文献>

- 1 Hatou, S. et al. Functional corneal endothelium derived from corneal stroma stem cells of neural crest origin by retinoic acid and Wnt/beta-catenin signaling. *Stem Cells Dev* 22, 828-839, (2013).
- 2 Yoshida, S. et al. Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells* 24, 2714-2722, (2006).
- 3 Inagaki, E. et al. Skin-Derived Precursors as a Source of Progenitors for Corneal Endothelial Regeneration. *Stem Cells Transl Med* 6, 788-798, (2017).
- 4 Pittenger, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147 (1999).

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 0 件)
 - 〔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]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
小川 安希子 (OGAWA, Akiko)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 20445323