

iPS 細胞から結膜上皮の作製法を確立—眼疾患への創薬・再生医療研究を加速させる新技術

大阪大学大学院医学系研究科の林竜平寄付講座教授(幹細胞応用医学)、西田幸二教授(眼科学、先導的学際研究機構生命医科学融合フロンティア研究部門)、能美君人特任研究員(眼科学、幹細胞応用医学)らの研究グループは日本医療研究開発機構(AMED)の支援を受け、ヒト iPS 細胞からムチン分泌能を有する機能的な結膜上皮を作製する方法を新たに確立しました。

眼球の表面は角膜と結膜からなり、結膜は涙液層の維持を担っていますが、その機能が低下すると眼の表面が乾燥し、ドライアイなどの疾患になります。研究グループではこれまでにヒト iPS 細胞から角膜上皮を誘導することに成功していましたが、結膜上皮の誘導方法は不明でした。

今回、研究グループは、ヒト iPS 細胞から誘導した二次元の眼オルガノイド用い、EGF 受容体シグナルを活性化することで結膜細胞を選択的に誘導できることを見出しました。さらに、セルソーターを用いて単離した iPS 細胞由来の結膜上皮前駆細胞のさらなる成熟培養を行った結果、結膜上皮および杯細胞への分化には KGF が必要であることを明らかにしました(図 1)。

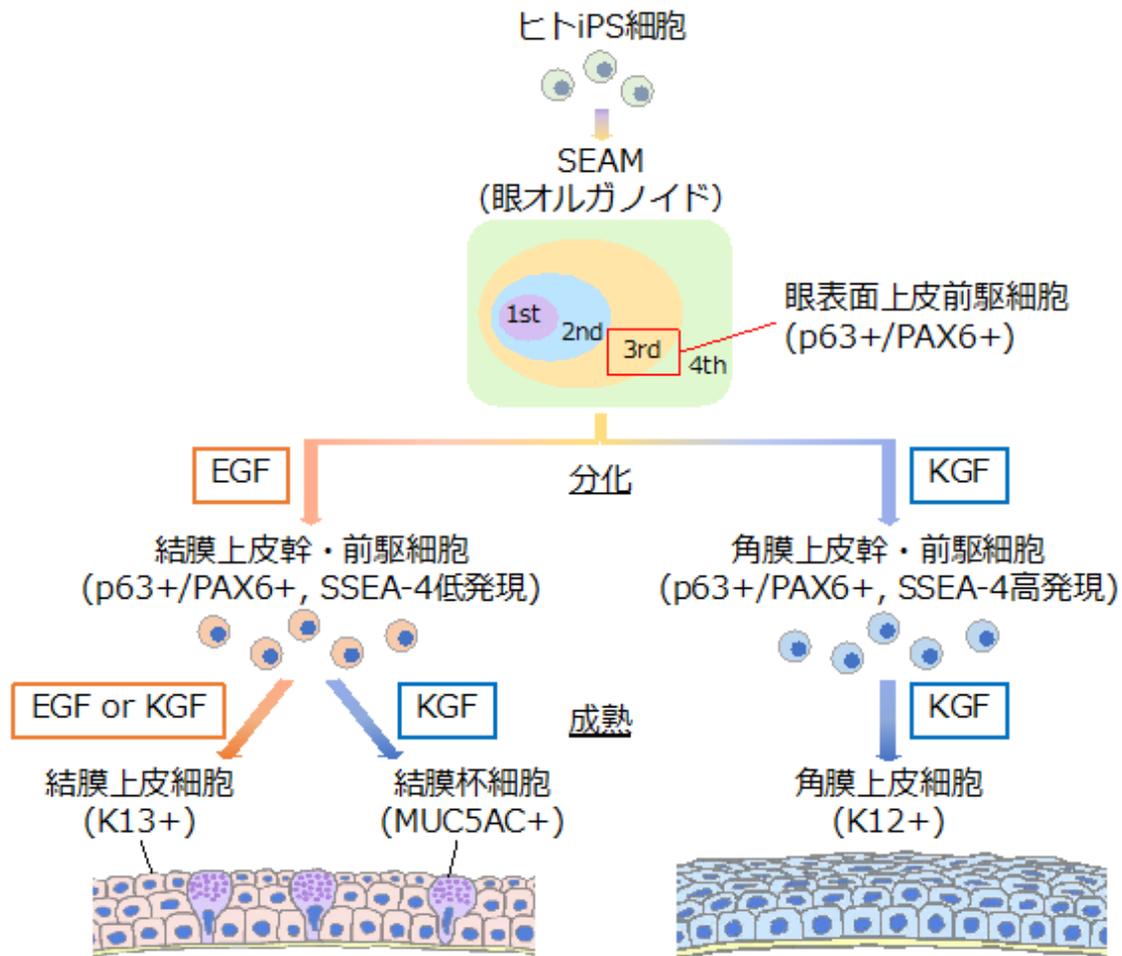


図 1. 本研究のまとめ

ヒト iPS 細胞から誘導した様々な眼の細胞を含むオルガノイドである多帯状コロニー (SEAM) の zone 3 には眼表面上皮前駆細胞が存在する。分化培養において、EGF は結膜上皮前駆細胞、KGF は角膜上皮前駆細胞への分化を促進する。一方、結膜上皮前駆細胞からの結膜上皮および杯細胞への成熟分化には KGF が必要であった。

本研究成果により、これまで困難であったヒト結膜細胞の大量入手が可能となり、ドライアイなどに対する創薬研究や再生医療研究において大きな進捗が期待されます。

研究の背景

眼の表面は主に結膜上皮と角膜上皮からなり、角膜は黒目の部分を、結膜はまぶたの裏側と眼球の表面から黒目の周囲までを覆っています。良好な視力を得るために

はこれらが相互に関連しあって機能することが必須となります。結膜上皮の重要な役割として涙液中にムチン(MUC5AC など)を分泌することで、眼の表面を保護しています。疾患や炎症などにより結膜からのムチン分泌機能が低下すると、眼の表面が乾燥し、ドライアイとなります。しかし、結膜上皮については角膜上皮に比べ研究が進んでおらず、その理由として、ヒト結膜細胞の入手が非常に困難であること、結膜細胞の培養法が確立されていないことが挙げられます。

これまでに研究グループは、ヒト iPS 細胞を用いた様々な眼の細胞を含むオルガノイドである多帯状コロニー(Self-formed Ectoderm Autonomous Multi-zone; SEAM、図 2)の誘導法を確立し、SEAM を用いて角膜上皮組織の作製に成功しています。一方で、同じ眼表面上皮である結膜上皮の分化誘導法は不明でした。また、過去の報告で、EGF は結膜上皮、KGF は角膜上皮の表現系維持や増殖に関与することが示唆されていますが、これらの成長因子が発生過程に与える詳細な影響については明らかにされていませんでした。

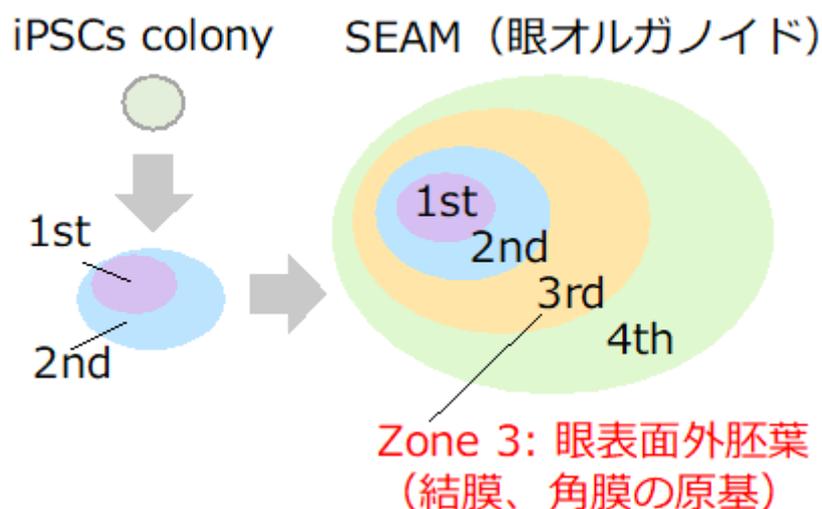


図 2. SEAM の模式図

SEAM は同心円状の 4 層構造を形成し、zone 3 に角結膜上皮原基である眼表面外胚葉が発生する。

そこで、本研究では、EGF と KGF を適切な条件下で使い分けることで SEAM からの結膜細胞の誘導、単離、成熟を目指しました。

本研究の成果

研究グループはまずヒト iPS 細胞から SEAM 形成後に EGF もしくは KGF を添加した際の変化を比較検討しました。EGF 添加 SEAM(+EGF)と KGF 添加 SEAM(+KGF)では、分化誘導開始 6 週時点において、両者とも SEAM の zone 3 に p63+/PAX6+ の眼表面上皮原基(角結膜上皮の原基)が誘導されました。一方、分化誘導後 10 週の時点では、KGF 添加時にはこれまでの報告通り角膜上皮が誘導されましたが、EGF を添加した場合には、角膜上皮細胞への分化が強く抑制されることがわかりました(図 3A-B)。これらの結果から EGF の添加により、SEAM 中の角膜上皮分化が抑制され、結膜上皮細胞が誘導されることが示唆されました。

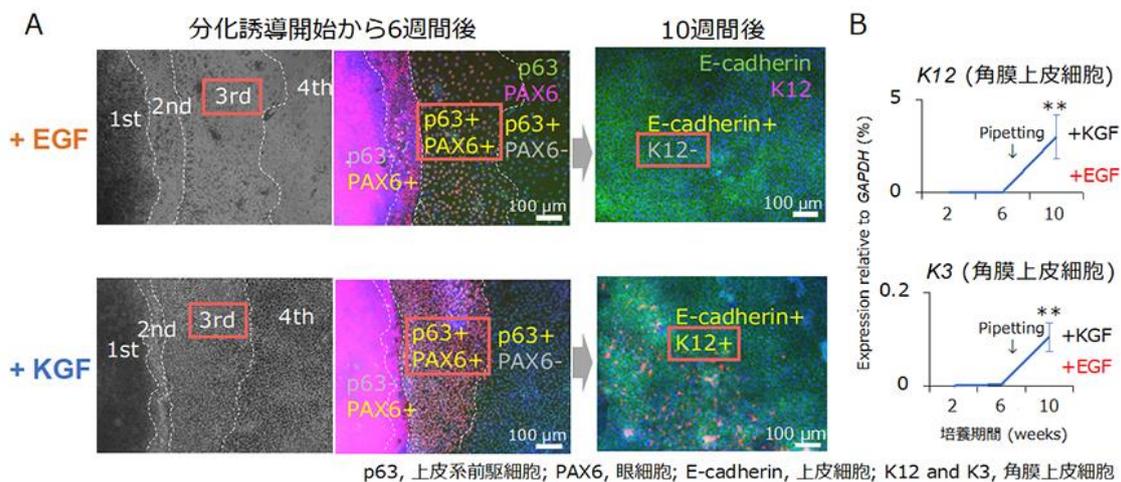


図 3. EGF 添加 SEAM では角膜上皮細胞への分化が抑制

A. EGF 添加 SEAM(+EGF)と KGF 添加 SEAM(+KGF)の免疫染色。EGF 添加 SEAM では分化誘導開始から 10 週時点で角膜上皮細胞マーカーである K12 の発現が抑制されていた。

B. EGF 添加 SEAM と KGF 添加 SEAM の遺伝子発現解析。免疫染色結果と同様に EGF 添加 SEAM では角膜上皮細胞マーカー(K12、K3)発現が有意に低下していた($p < 0.01$)。

続いて、EGF 添加 SEAM を、眼表面上皮細胞の単離・解析で使用する 3 種類の細胞表面マーカー(CD200、SSEA-4、ITGB4)で染色後、蛍光活性化セルソーティング(FACS)で 6 つの画分に分離し詳細に解析しました(図 4A)。その結果、CD200 陰性/SSEA-4 弱陽性/ITGB4 陽性の画分(P2)の細胞は単離した直後では、結膜分化マ

一カーの発現は認められませんでした。重層化培養することで結膜杯細胞を含む成熟した結膜上皮に分化することが明らかとなりました。興味深いことに、この成熟培養の際には、EGF ではなく KGF を添加した条件で、結膜杯細胞マーカー MUC5AC の発現上昇が認められました(図 4B-C)。さらに、本研究で作製したヒト iPS 細胞由来結膜上皮シートは MUC5AC 分泌能も確認され(図 4D)、結膜マーカーの免疫染色やムチン染色でも正常な結膜上皮と同じ特徴が確認されました(図 4E-F)。

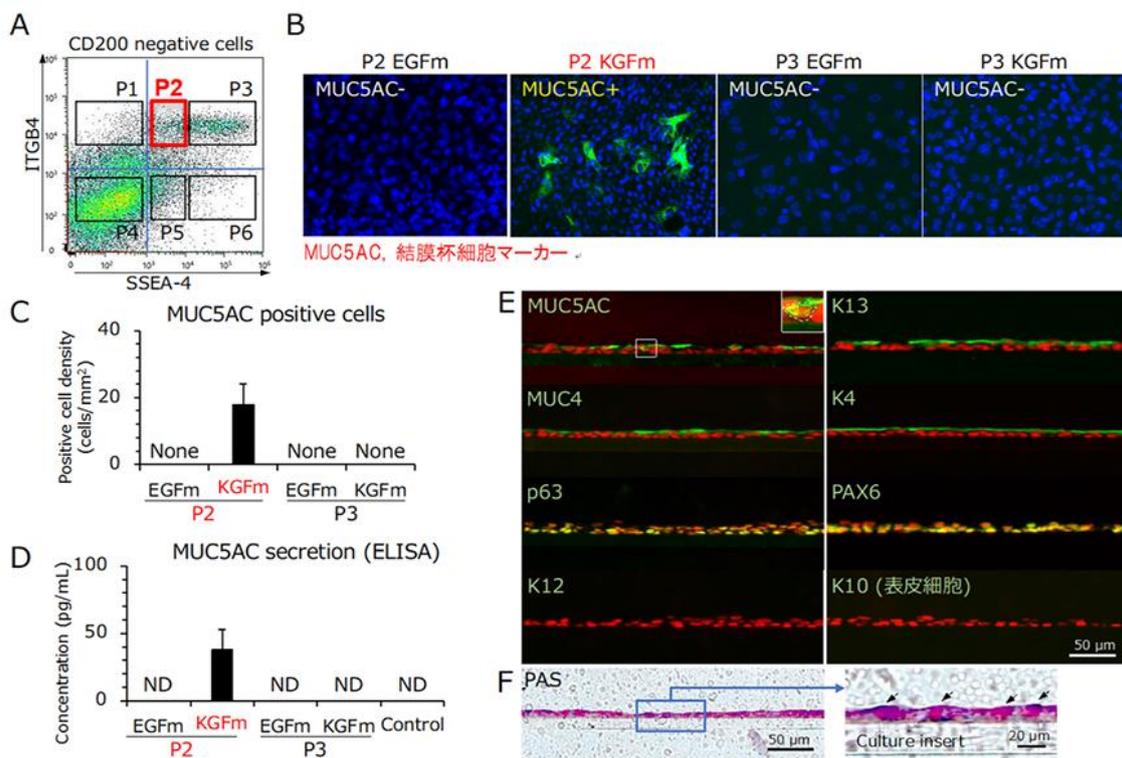


図 4. EGF 添加 SEAM 由来の結膜上皮前駆細胞画分(P2)を単離し、KGF を用いた成熟培養により結膜上皮組織を作製

A. EGF を添加し培養した SEAM (10~12 週間) の FACS 解析および各細胞集団の単離。

B. P2 および P3 画分由来上皮細胞を培養後の MUC5A 免疫染色。

C. 各培養条件における MUC5AC 陽性細胞数。

D. ELISA による培養液中の MUC5AC 濃度測定。Control, 培地のみ; ND, not detected。

E. ヒト iPS 細胞由来結膜上皮組織の免疫染色。

F. PAS 染色(ムチンの染色)。

また、EGF だけでなく他の EGF 受容体リガンドである TGF- α や Amphiregulin でも同様に結膜上皮前駆細胞を分化誘導出来ることが分かりました。

上記のように、本研究では EGF などによる EGF 受容体を介したシグナルがヒト iPS 細胞から結膜上皮系細胞(結膜上皮細胞、杯細胞、前駆細胞)の分化に重要であることを示し、SEAM 法と組み合わせて結膜上皮細胞を誘導することに成功しました。さらに、KGF を用いることで、これまで困難であった杯細胞を有した機能的な結膜上皮の培養に成功しました。本研究により眼表面上皮細胞から結膜上皮前駆細胞への分化には EGF などの EGF 受容体リガンド、結膜上皮前駆細胞から結膜上皮への成熟には KGF が重要であることが示唆されました。

本研究成果により、これまで入手が困難であったヒト結膜細胞を iPS 細胞から分化誘導し、結膜や角膜を含む、眼表面上皮の機能解析や発生過程を解明するための研究ツールとして利用することが可能となりました。さらには、結膜細胞をターゲットとしたドライアイなどの眼疾患に対する創薬研究への利用や、眼表面の再生治療法開発のための研究ツールとして提供できることも期待されます。

論文情報

タイトル “Generation of functional conjunctival epithelium, including goblet cells, from human iPSCs”

雑誌 Cell Reports

DOI <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108715>

日本語発表

https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2021/20210203_1