再生医療、創薬研究、発生生物学

ヒト iPS 細胞を用いた、杯細胞を含有する機能的結膜上皮の作製

医学系研究科　幹細胞応用医学寄附講座
寄附講座教授 林 竜平 Researchmap https://researchmap.jp/stemed0701
特任研究員 能美 君人 Researchmap https://researchmap.jp/kimi-hito

研究の概要

我々の研究グループは、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。今回、我々はヒト iPS 細胞から誘導した二次元の眼オルガノイドを用い、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）。

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。

研究の背景と結果

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。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が、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。

これまでに我々は、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1）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。そこで本研究では、成長因子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。

我々はまずヒト 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、両者とも分化開始6週目で 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10週の時点では、EGF を添加した場合で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2A-B）。

続いて、EGF 添加 SEAM を3種類の細胞表面マーカー（CD200, SSEA-4, ITGB4）で染色後、FACS で6つの画分に分離し詳細に解析しました（図3A）。その結果、CD200陰性 /SSEA-4弱陽性 /ITGB4陽性の画分（P2）の細胞を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3B-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3D）、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3E-F）。

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。

研究の意義と将来展望

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。

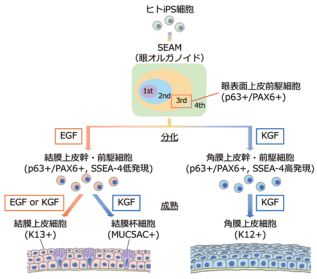

図1. 本研究のまとめ

ヒト iPS 細胞由来の眼様オルガノイド（SEAM）の zone 3に眼表面上皮細胞が存在し、分化培養により EGF により結膜上皮、KGF により角膜上皮が誘導される。

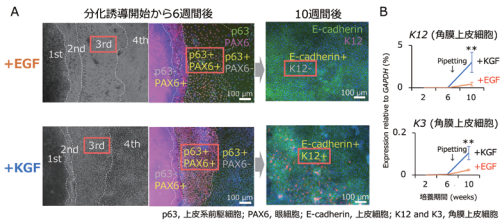

図2. EGF 添加による角膜上皮細胞への分化抑制

（A-B）EGF により角膜上皮細胞マーカー（K12, 3）の発現が抑制された。

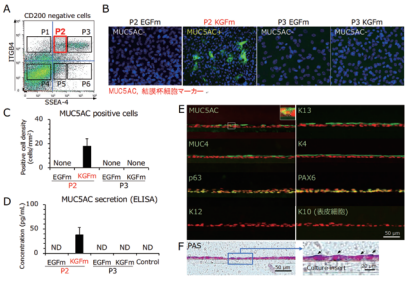

図3. SEAM 由来の結膜上皮組織の作製

（A-B）EGF を添加し培養した SEAM の FACS と単離細胞の MUC5A 免疫染色。
（C-D）各培養条件における MUC5AC 陽性細胞数と MUC5AC 濃度（ELISA）。
（E-F）SEAM 由来結膜上皮組織の免疫染色および PAS 染色。

特　許	特願2018-98954、PCT/JP2019/20364
論　文	Nomi, Kimihito; Hayashi, Ryuhei; Ishikawa, Yuki et al. Generation of functional conjunctival epithelium, including goblet cells, from human iPSCs. Cell Rep. 2021 Feb 2; 34(5): 108715. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108715. Hayashi, Ryuhei; Ishikawa, Yuki; Sasamoto, Yuzuru et al. Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. Nature. 2016 Mar 17; 531(7594): 376-80. doi: 10.1038/nature17000. Epub 2016 Mar 9.
参考 URL	https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2021/20210203_1 https://www.amed.go.jp/news/release_20210203-02.html
キーワード	結膜上皮、杯細胞、EGF、KGF、SEAM