

多能性幹細胞を用いた眼オルガノイドの作製

大阪大学大学院医学系研究科

石川 幸, 林 竜平

Yuki ISHIKAWA, Ryuhei HAYASHI



石川 幸



林 竜平

1. はじめに

眼は複数の異なる外胚葉性原基に由来する複雑な組織である。例えば、網膜は神経外胚葉、角結膜上皮は表面外胚葉、水晶体は前プラコード、虹彩実質や角膜内皮は神経堤が起源である。我々は、ヒト多能性幹細胞〔ヒトiPS(induced pluripotent stem)細胞〕を用いて眼球発生を培養皿上で模倣し角膜上皮を分化誘導することで、難治性角膜上皮疾患(角膜上皮幹細胞疲弊症)に対する再生治療法の開発に取り組んできた。角膜上皮の存在する前眼部は、角膜上皮、結膜上皮ならびに涙腺から分泌される涙液により構成される1つのユニットと考えられており、良好な視覚のために重要な部位である(図1a)。本稿においては、ヒトiPS細胞を用いた眼オルガノイドの作製、さらに眼オルガノイドを用いて前眼部の主要組織である、角膜上皮、結膜上皮、涙腺など「人工臓器」の作製とその臨床応用について述べる。

2. ヒトiPS細胞由来眼オルガノイドの作製

我々はこれまでに、足場基質としてラミニン511のE8断片(LN511E8)コーティングした培養皿上でヒトiPS細胞を培養することで、外胚葉系列細胞への自律的分化を促す方法を開発した^{1),2)}。この方法により、iPS細胞は4つの同心円状の多帯状領域(zone 1~4)を有するコロニーへと分化した(図1b)。つまり、コロニー中心部のzone 1には神経系細胞、zone 2は神経堤細胞および網膜細胞(内側に神経網膜、外側に網膜色素上皮)、zone 2とzone 3の境界領域には水晶体上皮細胞、zone 3には眼表面上皮細胞(角

膜・結膜上皮原基)、zone 4には非眼表面上皮細胞の原基細胞が誘導された(図1c)。このコロニーの各領域には、眼組織の原基と考えられる外胚葉由来細胞が規則正しい配向で、自律的に誘導されたことから、このコロニーをSEAM(self-formed ectodermal autonomous multi-zone)と名付け、同時に眼発生を高度に模倣したパターンを示すことから、SEAMは眼オルガノイドであると考えられた(図1d)。そこで我々は、この眼オルガノイドであるSEAMを用いて、iPS細胞を用いた角膜上皮に対する再生治療法の開発に着手した。

3. 角膜上皮の誘導

角膜上皮原基は、SEAMのzone 3に誘導されたことから、3つの細胞表面マーカーの組み合わせを用いたセルソーティングにより、ヒトiPS細胞由来角膜上皮幹・前駆細胞を“CD200陰性、SSEA(stage-specific embryonic antigen)-4陽性、ITGB 4(integrin beta 4)陽性”細胞として単離することに成功した(図2a)^{2),3)}。単離したヒトiPS細胞由来角膜上皮幹細胞・前駆細胞は、重層化培養により、成熟した角膜上皮組織へ分化が可能であった。得られたヒトiPS細胞由来角膜上皮細胞シートを、幹細胞疲弊症モデルウサギ眼へ移植することにより、バリア機能を有し、ケラチン12(K12)やムチン16(MUC16)等を発現する成熟した角膜上皮組織を再建できることが示された(図2b)。造腫瘍性等の安全性に関する非臨床試験を実施し、関連規制当局の審査を経て、2019年に臨床研究を開始した。2022年3月までに予定していた4症例の臨床研究を完了し、ヒトiPS細胞由来角膜上皮が角膜上皮組織を再建可能であることを確認した。以上の結果より、ヒトiPS細胞から眼オルガノイドを経て作製した角膜上皮組織は、生体内においても機能しうる正常な角膜上皮組織であることが確認された。

■ 著者連絡先

大阪大学大学院医学系研究科

(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2)

E-mail: ryuhei.hayashi@ophthal.med.osaka-u.ac.jp

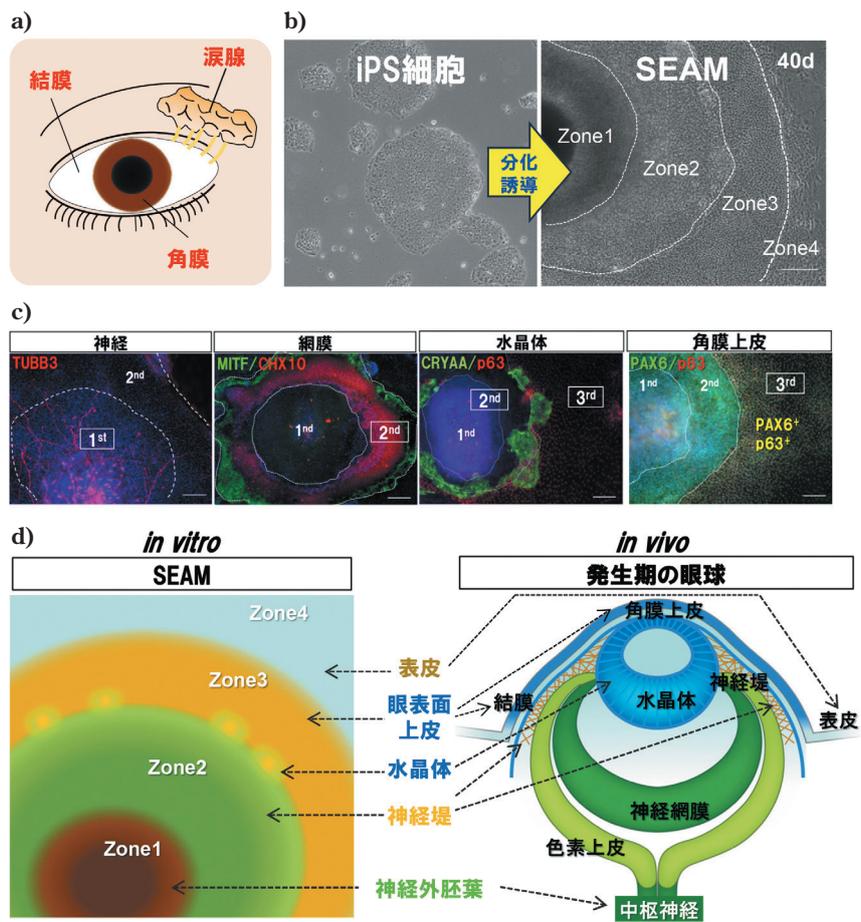


図1 ヒト iPS細胞からの眼オルガノイドの作製 (文献1より改変引用)

- a) : 角膜, 結膜, 涙腺の局在
 b) : ヒト iPS細胞から眼オルガノイド (SEAM) への誘導 (scale bar = 200 μ m)
 c) : SEAMにおける眼関連細胞マーカーの免疫染色 (scale bars = 100 μ m (神経, 水晶体, 角膜上皮), 200 μ m (網膜))
 d) : SEAMの構造と対応する眼関連細胞
 iPS, induced pluripotent stem; SEAM, self-formed ectodermal autonomous multi-zone.

4. 結膜上皮組織の作製

結膜上皮は角膜上皮周辺部に隣接する眼表面上皮であり, 発生学的には角膜上皮や涙腺上皮と同じく眼表面上皮 (眼表面外胚葉) に由来している。角膜上皮への分化誘導では, KGF (keratinocyte growth factor) を添加することで角膜上皮分化が促進されたが, 結膜上皮は誘導されなかった。そこで, 結膜上皮への分化を促進するために KGF の代わりに EGF (epidermal growth factor) を用いたところ, 角膜上皮への分化が抑制され, 結膜上皮前駆細胞が誘導された (図 3a)⁴⁾。セルソーティングによる細胞分離の結果, 結膜上皮前駆細胞を ITGB4 陽性, BST (bone marrow stromal antigen) 2 陽性細胞として単離が可能であった⁵⁾。また, 得られた結膜上皮様前駆細胞を成熟化培養すること

によって杯細胞への分化を試みたところ, 結膜上皮細胞および MUC5AC 陽性の杯細胞を含む結膜上皮組織の再構築が可能であった (図 3b)。

5. 涙腺オルガノイドの作製

涙腺は上眼瞼耳側に存在する外分泌腺であり, 腺房細胞, 導管細胞, 筋上皮細胞など複数種の細胞で構成される (図 1a, 図 4a)。前述の通り, 涙腺も発生学的には角膜や結膜上皮と同じ眼表面上皮に由来すると考えられるため, 我々は SEAM においても角膜上皮が誘導される眼表面上皮領域 (zone 3) に, 涙腺原基が存在すると思った。そこで涙腺原基が zone 3 に存在するかについて調べたところ, zone 3 中には涙腺様構造を有する立体的な細胞クラスターが点在しており, これらの細胞クラスターの多くは涙腺細胞マーカーである PAX6 および SOX9 を共発現していること

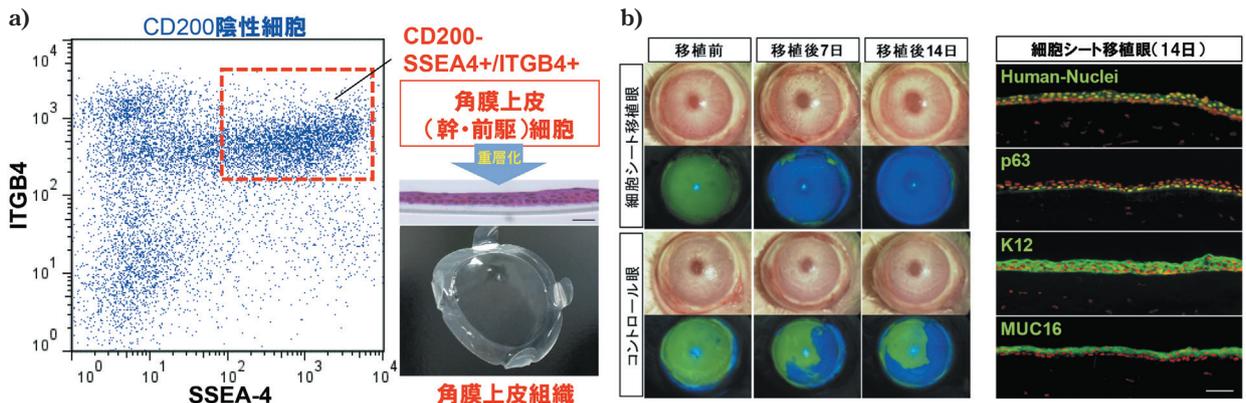


図2 SEAMからの角膜上皮組織作製と移植(文献1, 3より改変引用)

a) : SEAMからのセルソーティングによる角膜上皮幹・前駆細胞の単離と組織作製 (scale bar = 50 μm)
 b) : ヒトiPS細胞由来角膜上皮組織(シート)の疾患モデルウサギへの移植(左図:フルオレセイン染色, 右図:シート移植後のウサギ眼組織切片における角膜上皮関連マーカーの免疫染色) (scale bar = 50 μm)
 iPS, induced pluripotent stem; ITGB, integrin beta; SEAM, self-formed ectodermal autonomous multi-zone; SSEA, stage-specific embryonic antigen.

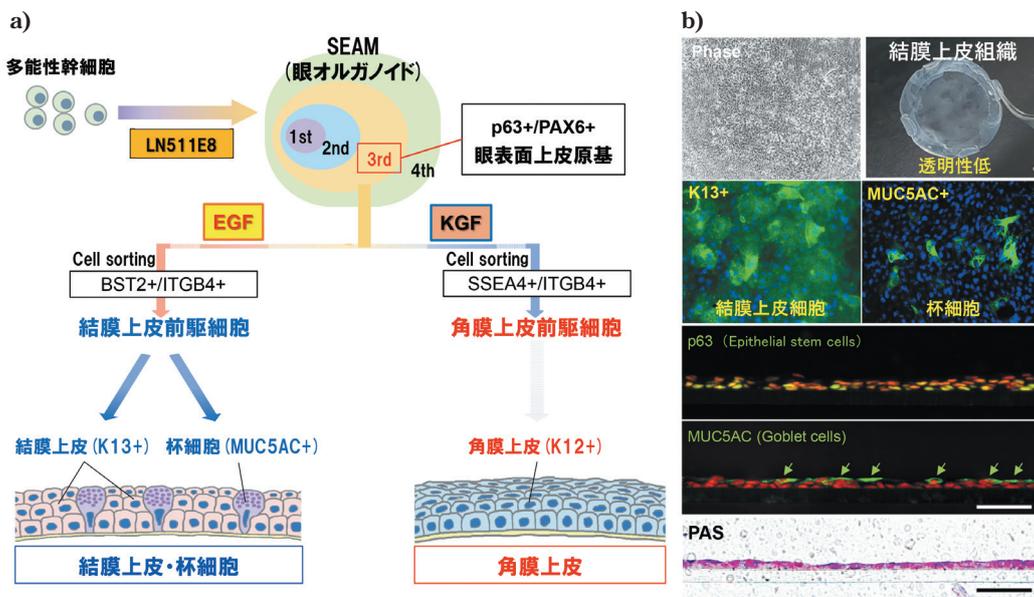


図3 SEAMからの結膜上皮組織の作製(文献4より改変引用)

a) : SEAMからの結膜上皮および角膜上皮誘導法の比較
 b) : SEAMより誘導したヒトiPS細胞由来結膜上皮組織における結膜上皮関連マーカーの免疫染色とPAS (periodic acid schiff) 染色 (scale bars = 50 μm)
 BST, bone marrow stromal antigen; EGF, epidermal growth factor; ITGB, integrin beta; KGF, keratinocyte growth factor; PAS, periodic acid schiff; SEAM, self-formed ectodermal autonomous multi-zone; SSEA, stage-specific embryonic antigen.

が示された⁶⁾。この細胞クラスターを顕微鏡下で回収し、マトリゲル中で3次元的に培養したところ、まず複数の細胞突出部が認められ、さらに伸展した導管部先端が分岐し、腺様構造を有する涙腺様オルガノイドを形成した(図4b)。
 そこで次に、SEAM中に存在する涙腺原基(前駆細胞)のセルソーティングによる単離を試みた。角膜上皮前駆細胞の単離で使用した表面抗原抗体(ITGB4, SSEA-4, CD200)を用いて各細胞集団を単離し、マトリゲル中で3次元培養を行ったところ、CD200陰性/ITGB4陽性/SSEA-4陽性画

分でのみオルガノイド形成能が認められた(図4c, 左図)。興味深いことに、この細胞集団は角膜上皮前駆細胞と同じ細胞集団であったことから、角膜上皮と涙腺は共通の原基細胞に由来していることが示唆された。また、3次元培養条件の最適化を行ったところ、EGFとROCK(Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase)阻害剤(Y-27632)存在下で、効率よく涙腺オルガノイドの形成が可能であることが明らかとなった(図4c, 右図)。得られたオルガノイドは、涙腺マーカーであるPAX6, SOX9, AQP5等

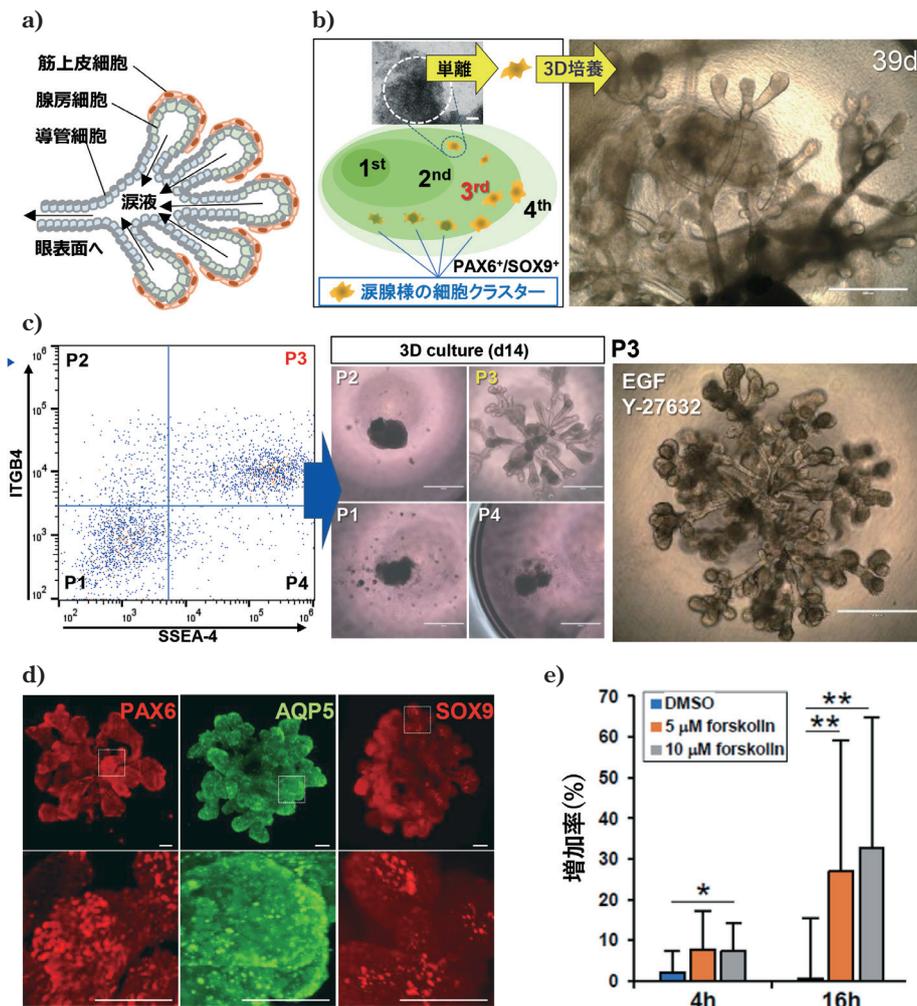


図4 SEAMからの涙腺オルガノイドの作製(文献6より改変引用)

- a) : 涙腺の構造
b) : 涙腺様細胞クラスターの単離とマトリゲル内3次元培養 [scale bars = 200 μ m (左図内挿入図), 1,000 μ m (右図)]
c) : 涙腺原基(前駆)細胞のセルソーティングによる単離とマトリゲル内3次元培養(左図)およびEGFとY-27632を用いた涙腺オルガノイドの培養(右図, scale bars = 1,000 μ m)
d) : 涙腺オルガノイドにおける涙腺細胞マーカーの免疫染色(ライトシート顕微鏡, scale bars = 200 μ m)
e) : 涙腺オルガノイドのswelling活性(フォルスコリン刺激), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)
DMSO, dimethylsulfoxide; EGF, epidermal growth factor; ITGB, integrin beta; SEAM, self-formed ectodermal autonomous multi-zone; SSEA, stage-specific embryonic antigen.

を発現し、フォルスコリン刺激により涙液分泌能の指標となるswelling活性を示したことから、機能的な涙腺オルガノイドであることが確認された(図4d~e)。

6. おわりに

これら一連の研究により、ヒトiPS細胞から角膜上皮や結膜上皮、涙腺の「人工臓器」を作製することに成功した。角膜上皮については既に臨床研究を完了し、その安全性や機能性について一定の結果を得ることができた。また結膜上皮や涙腺を作製可能となったことで、これまで根治的な治療法がなかったシェーグレン症候群等による、重症ドライアイに対する再生治療法の開発も可能になると考えられ

る。さらには本技術と疾患iPS細胞技術を用いることにより、これまで困難であった患者由来の涙腺組織を作製することが可能となり、それらを利用することでシェーグレン症候群等による涙腺障害機構の解明、治療薬スクリーニング、涙腺発生・再生研究のためのツールとしての応用も期待される。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文献

- Hayashi R, Ishikawa Y, Sasamoto Y, et al: Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature* **531**: 376-80, 2016

- 2) Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, et al: Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. *Nat Protoc* **12**: 683-96, 2017
- 3) Hayashi R, Ishikawa Y, Katayama T, et al: CD200 facilitates the isolation of corneal epithelial cells derived from human pluripotent stem cells. *Sci Rep* **8**: 16550, 2018
- 4) Nomi K, Hayashi R, Ishikawa Y, et al: Generation of functional conjunctival epithelium, including goblet cells, from human iPSCs. *Cell Rep* **34**: 108715, 2021
- 5) Kitao M, Hayashi R, Nomi K, et al: Identification of BST2 as a conjunctival epithelial stem/progenitor cell marker. *iScience* **26**: 107016, 2023
- 6) Hayashi R, Okubo T, Kudo Y, et al: Generation of 3D lacrimal gland organoids from human pluripotent stem cells. *Nature* **605**: 126-31, 2022