

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10868

研究課題名(和文) 神経-角膜上皮-角膜実質細胞3者共培養システムの開発及び角膜機能維持機構の解明

研究課題名(英文) Development of coculture system with neuron-corneal epithelial-corneal fibroblast cells.

研究代表者

高 知愛 (Ko, Ji-Ae)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・准教授

研究者番号：70314797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞と角膜上皮細胞の共培養、次は神経細胞と角膜実質細胞との共培養、最終的には神経-角膜上皮-角膜実質細胞の3者共培養を試み成功しています。まずは、神経細胞と角膜上皮細胞との共培養で、ラットの三叉神経細胞と角膜上皮細胞との共培養を確立させました。その時に、コラーゲン膜状での培養法を確立させ、角膜上皮細胞での重要な生理現象、重層化に三叉神経が必須であることを見出しました。その上、その現象に必要な因子を見つけたことも報告しております。さらに、神経細胞と角膜実質細胞との共培養では、培養上清中に炎症系サイトカインであるIL-6の分泌が約4倍にまで増加していることが明らかになりました。

研究成果の概要(英文)：We have previously studied coculture of neural-corneal epithelial cells, and neural-corneal fibroblast cells, finally, neural-corneal epithelial-corneal fibroblast cells. We have used collagen membrane for coculture system, because of the collagen membrane can through soluble factors, between cell-cell interaction.

The soluble factors (released) from neural cell (trigeminal cells) may play an important role in the regulation of intercellular communication between corneal cells as well as in the maintenance of corneal function.

In case of neural-corneal fibroblasts cells, since IL-6 is known to facilitate corneal epithelial cell migration, the known or unknown factors released from neural cells may promote corneal epithelial wound healing via IL-6 secretion from corneal fibroblasts.

研究分野：細胞生理学

キーワード：角膜 共培養

1. 研究開始当初の背景

- (1) 角膜は、生体内でもっとも神経終末の密度の高い組織である。これらの細胞はそれぞれ、発生学的由来が大きく異なるにも関わらず、角膜の最も重要な生理機能であるその透明性の維持、上皮細胞によるバリアー機能などに重要であり、近年、申請者の研究から角膜上皮細胞-実質細胞の相互作用については様々なことが明らかになってきた。そこで、神経細胞(神経線維)の角膜生理機能維持に対する役割は重要であるが、そのメカニズムは未知であるため、解明の必然性が課題になっている。
- (2) 角膜への知覚神経支配は角膜の構造維持や創傷治癒に大きな役割を果たしている。臨床的にも角膜知覚が低下している症例では、角膜上皮の創傷治癒が遅延し、いわゆる神経麻痺性角膜症を発病する。しかし、何らかの神経因子の関与は想定できるが、その究極な治療法などは未だに確立されていない。
- (3) 近年、培養細胞内に生体内環境を付与することを目指して、「コラーゲンビトリゲル膜」が開発され、さまざまな組織において再生医療あるいは創薬研究への応用に向けての *in vitro* での細胞間の情報交換の解明の研究が進められている。
- (4) 実際、申請者の最近の研究で、角膜上皮細胞と実質細胞の相互作用を調べ

るために、コラーゲンビトリ膜を用い共培養を試み、互いの細胞の存在下で角膜上皮細胞ではタイトジャンクション蛋白質の発現、実質細胞では Connexin43, N-cadherin の発現、つまり、接着因子の発現に影響を与えることとその発現の制御に関わっている因子 (IGF-1, EGF など) を明らかにしている。

- (5) さらに、角膜以外の目の組織(網膜)を用いての神経との関連した培養系が成功しており、その応用した培養系での成果も期待出来るものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の究極の目的は、*in vitro* での角膜再生およびその正常構造と機能の維持機構を明確にし、角膜再生の条件を突き止めること、さらに、神経麻痺性角膜症の様な疾患に対して、その病態解明をすることとする。この様な目的を達成する以下の様に平成 27 年度～29 年度に渡り、その成果を成している。

- (1) 神経細胞から角膜上皮細胞に作用する因子の同定; 共培養系において、神経細胞の有無で角膜上皮細胞内で現れる現象を見出して、そこから想定できる、つまり、影響に関わっていると今までの報告から思われる既知の因子に対して、その培養液中に追加、あるいは inhibitor の処理など、conditioning medium を用い、角膜上皮細胞内での分化マーカーなどの蛋白質の発現変化、あるいは生理現象での変化などを

明らかにし、その調節機構を明確にする。

- (2) 共培養における神経細胞と培養環境との関係； 共培養内で動いている因子を同定した上で、その影響に加わって実際に生理現象に近い環境での影響、つまり酸素などが神経細胞と角膜上皮細胞の共存の際に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 今まで難しいとされたプライマリー神経細胞(三叉神経)と角膜上皮細胞の共培養法を用いた解析； 神経細胞との共培養系を確立させながら、さらに、in vivo 状態での神経細胞(三叉神経)を用いて角膜上皮細胞との共培養系も立ち上げた。そこで、その共培養系でも株化神経細胞(PC12)を用いた結果と同様の結果が得られるかどうか解析を行った。その時に三叉神経の有、無で角膜上皮細胞内で起こる様々な因子の発現変化を上記の様に Western Blot 法、蛍光抗体法、また、RT-PCR 法により解析した。
- (2) 共培養系における神経細胞から分泌される角膜上皮細胞への制御因子の同定； 角膜上皮細胞と神経細胞(PC12、または、三叉神経)の共培養の結果から得られた角膜上皮細胞内の生理現象(特に、角膜上皮細胞の重層化など)を元に神経細胞と共培養した際に、角膜上皮細胞だけの単独培養の medium から神経細胞から分泌される因子、あるいはその因子に反応する角膜上皮細胞側の相互作用因子を角膜上皮細胞の今までの報告されているいくつかの

神経栄養因子、神経ペプチドを用いて、培地のサプリメントとして、用い、更に、その抑制剤も投与することで、角膜上皮細胞内の生理現象を抑える因子のスクリーニングを行い、その角膜上皮細胞での重層化に影響を与えている神経ペプチドを同定した。

- (3) 動物モデルを使った in vivo 実験； さらに、上記の様な in vitro 系で明らかになった神経細胞からの分泌される神経ペプチドを成体ラット角膜創傷治癒モデル(上皮剥離、切開)系を使って、in vivo 系での解析も行った。
- (4) 網膜組織などを使った他の神経細胞との共培養システムを応用し、回転培養などを行いながら、実際に生体内での神経の動き、神経軸索の伸長などを解析した。

4. 研究成果

(1) 平成 27 年度

研究初年度は、神経細胞と角膜上皮細胞の共培養における細胞間生理現象の解析の為に、まず、その共培養系の確立を試みた。

1) 前年度の研究の確認、確実なものにする為に、まずは神経細胞として、株化された神経細胞、PC12を用いた。培養条件で、PC12 細胞を神経細胞に分化させ、その上、分化された神経細胞と角膜上皮細胞との共培養をコラーゲン膜を用いて、成功させた。この際に、共培養に必要な、様々な因子の特定と共に、共培養の成功の有無を Western Blot 法、RT-PCR 法、蛍光抗体法などを用いて確認した。

2) 上記の様に、株化神経細胞と角膜上皮細胞との共培養が成功したのを元に、in vivo 状態で

の神経細胞、三叉神経細胞を動物から直接分離し、その神経初代培養と角膜上皮細胞の共培養を試み、成功させた。この際も、株化神経細胞と同様に、共培養の成功の有無をWestern Blot法、RT-PCR法、蛍光抗体法などを用いて確認した。このような研究申請初年度の成果を学会などで報告している。

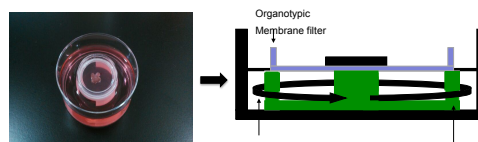
(2) 平成 28 年度

平成 27 年度の共培養では株化神経細胞を用いて、解析を行った。その成果、方法を元に、本来明らかにすべきである生体内の神経、角膜内の三叉神経を用いることに試みた。ラットの三叉神経を分離し、コラーゲン膜状での培養法を確立させ、その上に角膜上皮細胞との共培養を試み、様々な培養条件を突き止めることを見出した。その上、今年度の一番の成果としては、三叉神経と角膜上皮細胞との共培養において、角膜上皮細胞の機能のうち、一番大事とされるバリアー機能には欠かせない角膜上皮細胞での重要な生理現象、重層化に三叉神経が必須であることを見出した。更に、神経細胞の存在下で、重層化の促進と共に、上皮細胞の分化に重要であるアドヘレンス接着タンパク質であるN-cadherinの発現が促進されることが明らかになった。

(3) 平成 29 年度

平成 27, 28 年度の共培養を行いながら、他の目の組織、網膜などを用いた共培養も試みた。網膜組織は、角膜以上に複雑な様々な細胞同士のコロニーであり、何より、神経そのものの組織であるため、その培養の開発はさらなる角膜の共培養系に応用できると考えられる。実際に、生体内で直接に網膜神経節細胞(軸索)と繋がっている主なターゲットである中脳との共培養を試み、中

脳からのシグナルが網膜神経節細胞生存に関わっているのかを解析した。その結果、中脳と共培養することで、ストレスによる網膜神経節細胞のダメージ、細胞死が顕著に減少していることがわかり、中脳から何らかのシグナルが網膜神経節細胞の生存に大きく関与していることが示唆された。今後、このような培養システムを角膜共培養にも応用し、生体内のターゲットに直接アプローチ出来るシステムを開発できると考えられる。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Ko J.-A., Sotani Y., Ibrahim DG., Kiuchi Y.
Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the effects of oxidative stress on human retinal pigment epithelial cells. *Cell and Biochemistry Function*, 査読有, 35, 2017, 426-432.
- 2) Ko J.-A., Minamoto A., Sugimoto Y., Kiuchi Y.
Down-regulation of semaphorin3F in rat retinal ganglion cells in response to optic nerve crush. *Cell and Biochemistry Function*, 査読有, 34, 2016, 378-384.
- 3) Nakamura-Shibasaki M., Latief MA, Ko J.-A., Funaishi K, Takenaka J., Kiuchi Y.
Effects of topical adrenergic agents on prostaglandin E2-induced aqueous flare and

intraocular pressure elevation in pigmented rabbits. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 査読有, 60, 2016, 95-102.

- 4) Latief MA, Chikama T., Ko J.-A., Kiuchi Y., Sakaguchi T., Obana A.
Inactivation of acyclovir-sensitive and -resistant strains of herpes simplex virus type 1 in vitro by photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Molecular Vision*, 査読有, 21, 2015, 532-537
- 5) Ko J.-A., Hirata J., Yamane K., Sonoda KH., Kiuchi Y.
Up-regulation of semaphorin4A expression in human retinal pigment epithelial cells by PACAP released from cocultured neural cells. *Cell Biochemistry & Function*, 査読有, 33, 2015, 29-36

[学会発表] (計 6 件)

- 1) Ko J.-A., Sotani Y., Hirata J., Kiuchi Y.
Functional Analysis of MIF in Human retinal pigment epithelium by Oxidative Sress. The American Society for Cell Biology, 2015, Dec 15th, San Diego, USA
- 2) Ko J.-A., Ohki C., Minamoto Y., Kiuchi Y.
Functional analysis of semaphorin3F in rat retinal ganglion cells after optic nerve crush. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2015, May 6th, Denver, USA
- 3) 高知愛、多木千寛、皆本瑛、杉本洋輔、木内良明
ラット神経挫滅モデルを用いた網膜神経節細胞内でのセマフォリン3F 機能解析 日本

眼科学会総会、2015、4月17日、札幌

- 4) Ko J.-A., Hiraoka C., Okumichi H., Kiuchi Y.
Effects of retino-collicular coculture system on the neuroprotection of retinal ganglion cells. The American Society for Cell Biology, 2016, Dec 5th, San Francisco, USA
- 5) Ko J.-A., Ibrahim DG., Kiuchi Y.
Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on scarring formation after glaucoma filtration surgery. The American Society for Cell Biology, 2017, Dec 5th, Philadelphia, USA
- 6) 高知愛、曾谷育之、木内良明
網膜色素上皮細胞のEMTにおける酸化ストレスの影響に伴うMIFの機能解析 日本眼科学会総会、2017、4月7日、東京国際フォーラム

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高知愛(KO, Ji-Ae)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・講師

研究者番号: 70314797

(2) 研究分担者

近間 泰一郎(CHIKAMA, Tai-ichiro)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・准教授

研究者番号: 00263765

(3) 研究分担者

木内 良明(KIUCHI, Yoshiaki)

広島大学・医学薬保健学研究科(医)・教授

研究者番号: 40214738