

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20324

研究課題名(和文)角膜上皮細胞の特異性を規定している転写因子の機能解析と相互作用の解明

研究課題名(英文)Functional analysis in the transcriptional network in human corneal epithelial cell

研究代表者

北澤 耕司 (Kitazawa, Koji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：10760803

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)：角膜上皮細胞のコア転写因子の機能解析を行った。角膜上皮細胞にてOVOL2をノックダウンすると上皮細胞の形態から線維芽細胞様の形態に変化し、E-カドヘリンを含む上皮系遺伝子の発現が低下し、バリア機能も大きく低下した。次に眼の発生に重要な転写因子であるPAX6をCRISPR/Cas9でノックアウトすると、角膜上皮特異的タンパクであるケラチン12(K12)を含む角膜関連遺伝子の発現が低下し、ケラチン1(K1)やケラチン10(K10)といった皮膚関連遺伝子の発現の上昇を認めた。これらの一連の研究結果から、角膜上皮細胞の最終分化に必要な転写因子ネットワークを解明できた。

研究成果の概要(英文)：Functional analysis of core transcription factor in human corneal epithelial cells (CECs) revealed that CECs with OVOL2 knockdown became fibroblast-like cells, and OVOL2 knockdown reduced the expression of CEC-specific genes including keratin (K) 12 and E-cadherin, and the barrier function of CECs as measured by transepithelial electrical resistance. Next, when PAX6, which is an important transcription factor for eye development, was depleted by CRISPR/Cas9 targeted for PAX6 in human CECs, CEC-related gene including K12 and K3, was down-regulated, while K1 and K10, which were skin-related genes were up-regulated. These results suggest that PAX6 and OVOL2 were required for the terminal differentiation of CECs and, maintained the CEC identity.

研究分野：眼科

キーワード：OVOL2 PAX6 角膜上皮 転写因子 リプログラミング 分化 細胞運命

### 1. 研究開始当初の背景

近年、iPS 細胞の発見のように、転写因子、特に " コア転写因子 " が細胞の特異性の確立において重要であることがわかった。コア転写因子は多くの下流遺伝子の発現を制御する事で細胞特異的な機能を発現しかつ維持しており、角膜上皮細胞の透明性やバリア機能メカニズムの解明においてもその同定が必要とされる。

### 2. 研究の目的

角膜上皮は、重層化した角膜上皮細胞によって構成されている透明性と高いバリア機能を特徴とする眼表面の組織である。申請者はこれまでに角膜上皮細胞の細胞特異性を決める6つの転写因子を同定し、皮膚線維芽細胞から角膜上皮細胞へのダイレクトリプログラミングに成功した。本研究では、これらの転写因子の角膜上皮細胞における機能と相互作用について明らかにし、最終的には角膜上皮の透明性やバリア機能のメカニズムを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

1) コア転写因子の機能解析を行うために、まず6つの転写因子のうち、新規転写因子である OVOL2 を siRNA を用いてヒト角膜上皮細胞においてノックダウンさせて、細胞形態、遺伝子発現、バリア機能の解析を行う。

2) OVOL2 ノックダウンしたヒト角膜上皮細胞における網羅的な遺伝子発現解析を行う。

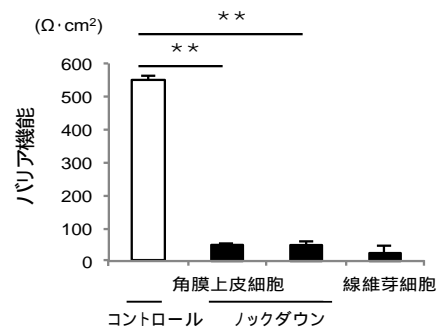
3) OVOL2 のターゲットなる結合領域および遺伝子を網羅的に解析するために、Chromatin immunoprecipitation-sequence (ChIP-seq) および ATAC-seq ( Assay for transposase-accessible chromatin using sequencing ) 法によるオープンクロマチン領域の網羅的解析を行った。

4) 次に眼の発生に重要な転写因子である PAX6 の sgRNA を CRISPR/Cas9 一体型であるレンチウイルスベクターにクローニングしてウイルスを作成し、角膜上皮細胞に遺伝子導入して、CRISPR/Cas9 でノックアウトしたヒト角膜上皮細胞を作成した。

5) PAX6 をノックアウトしたヒト角膜上皮細胞を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

### 4. 研究成果

1) ヒト角膜上皮細胞に siRNA を作用させて OVOL2 のノックダウンを行った。オフターゲットの可能性も考え、4つの siRNA を用いたが、すべての siRNA において同様に OVOL2 のノックダウンを確認できた。OVOL2 をノックダウンさせたヒト角膜上皮細胞では細胞形態が大きく変化し、線維芽細胞様の形態を呈した。また、角膜上皮特異的なタンパク質であるケラチン 12 および E-カドヘリンの発現の低下を認めた。さらに角膜上皮バリア機能が、顕著に低下した(下図)。このことは、遺伝子発現レベルだけでなく機能的にも角膜上皮細胞の分化維持に寄与していることを示す。



2) マイクロアレイを用いた、OVOL2 ノックダウンしたヒト角膜上皮細胞の網羅的解析を行った結果、上皮系遺伝子の発現が低下し、間葉系遺伝子の発現が上昇した。このことは、OVOL2 がヒト角膜上皮細胞において上皮関連

遺伝子を制御することで分化を維持している事を示す。

3) ChiP-seq の解析によって、*OVOL2* は直接 *ZEB1* と *ZEB2* に結合していることが示された。次に ATAC-seq 法によるオープンクロマチン領域の網羅的解析を行ったところ、*OVOL2* のモチーフはヒト線維芽細胞からヒト角膜上皮細胞にダイレクトリプログラミングされた細胞において、クロマチン領域が閉じた遺伝子領域に有意にモチーフ出現率が高かった。このことは、*OVOL2* が結合することで遺伝子の転写活性が抑制されたことを示唆しており、ChiP-seq のデータと合わせると *OVOL2* は *ZEB1* および *ZEB2* を含む間葉系遺伝子を抑制的に制御することで角膜上皮細胞の上皮性を維持していることが示された。

4) オフターゲットの可能性も考え、PAX6 に対する 2 種類の sgRNA を作成し、CRISPR/Cas9 一体型であるレンチウイルスベクターにクローニングし、ウイルス作成後、PAX6 ノックアウトヒト角膜上皮細胞を樹立し、PAX6 タンパクの発現が消失していることを確認した。

5) マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現の解析の結果、角膜上皮特異的タンパクであるケラチン 12 (K12)、K3 を含む角膜関連遺伝子の発現が低下し、ケラチン 1(K1) やケラチン 10(K10) といった皮膚関連遺伝子の発現の上昇を認めた。またこの遺伝子発現変化はタンパク発現においても同様の変化を認めた。この事は、PAX6 が角膜上皮細胞の特異性を規定する重要な因子であることを示し、かつ非角化粘膜上皮と粘膜上皮の特徴をきめる重要な転写因子であることを示した。

#### 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 12 件)

1. Kitazawa K, Jongkhajornpong P, Inatomi T<sup>†</sup>, Koizumi N, Kayukawa K, Wakimasu K, Sotozono C, Kinoshita S. Topical Ganciclovir Treatment post Descemet 's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty For Patients with Bullous Keratopathy Induced by Cytomegalovirus. *Br J Ophthalmol* 査読あり *in press* doi: 10.1136/bjophthalmol-2017-311145.
2. Kitazawa K, Wakimasu K, Kayukawa K, Sugimoto M, Nakai J, Weiss J, Ueno M, Sotozono C, Kinoshita S<sup>†</sup>. Long-Term Outcome Post Penetrating Keratoplasty in a Pedigree with the G177E Mutation in the *UBIAD1* Gene for Schnyder Corneal Dystrophy. *Cornea* 査読あり 37(5) 2018、554-55. doi: 10.1097/ICO.0000000000001511.
3. Kitazawa K, Inatomi T, Tanioka H, Kawasaki S, Nakagawa H, Hieda O, Fukuoka H, Okumura N, Koizumi N, Bernie I, Sotozono C, Kinoshita S<sup>†</sup>. The existence of dead cells in donor corneal endothelium preserved with storage media. *Br J Ophthalmol*. 査読あり 2017, 101(12):1725-1730 doi: 10.1136/bjophthalmol-2017-310913.
4. Kitazawa K, Kayukawa K, Wakimasu K, Yokota I, Inatomi T, Hieda O, Mori K, Sotozono C, Kinoshita S<sup>†</sup>. Predictive clinical factors of cystoid macular edema in patients with Descemet 's stripping automated endothelial keratoplasty. *Sci Rep*. 査読あり 2017.7(1):7412. doi: 10.1038/s41598-017-07079-x.
5. White TL, Lewis PN, Young RD, Kitazawa

- K, Inatomi T, Kinoshita S, Meek KM<sup>†</sup>. Elastic microfibril distribution in the cornea: differences between normal and keratoconic stroma. *Exp Eye Res*. 査読あり 2017 159(6):40-48, doi: 10.1016/j.exer.2017.03.002.
6. Kitazawa K, Wakimasu K, Yoneda K, Iliakis B, Sotozono C, Kinoshita S<sup>†</sup>. A case of fungal keratitis and endophthalmitis post penetrating keratoplasty that Resulted from Fungal Contamination of the Donor Cornea. *Am J Ophthalmol Case Rep*. 査読あり 2017,5:103-106, doi: 10.1016/j.ajoc.2016.12.015.
  7. Kitazawa K, Sotozono C, Koizumi N, Nagata K, Inatomi T, Sasaki H, Kinoshita S<sup>†</sup>. Safety of Anterior chamber paracentesis using a 30-gauge needle integrated with new disposable pipet. *Br J Ophthalmol*, 査読あり 2017, 101(5):548-550. doi: 10.1136/bjophthalmol-2016-309650.
  8. Kitazawa K, Kayukawa K, Wakimasu K, Yokota I, Inatomi T, Hieda O, Mori K, Sotozono C, Kinoshita S<sup>†</sup>. Cystoid macular edema after Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty. *Ophthalmology*. 2017. 査読あり 124(4):572-573. doi: 10.1016/j.ophtha.2016.11.001.
  9. Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, Sotozono C, Kinoshita S<sup>†</sup>, Masui S<sup>†</sup>. PAX6 regulates human corneal epithelium cell identity. *Exp Eye Res*. 査読あり 2017, 154(1):30-38. doi: 10.1016/j.exer.2016.11.005.
  10. Kitazawa K, Yokota I, Sotozono C, Kinoshita S<sup>†</sup>. Measurement of corneal endothelial surface area via anterior segment optical coherence tomography in normal subjects. *Cornea*. 査読あり 2016.35(9):1229-1233, doi: 10.1097/IC0.0000000000000963.
  11. Kitazawa K<sup>†</sup>, Sotozono C, Sakamoto M, Sasaki M, Hieda O, Yamasaki T, Kinoshita S. Nasal and conjunctival screening prior to refractive surgery: An observational and cross-sectional study. *BMJ Open*. 査読あり 2016. 6(5):e010733, doi: 10.1136/bmjopen-2015-010733.
  12. Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, Mitsunaga K, Tanaka A, Nakamura M, Yamakawa T, Furukawa S, Takasaka M, Goshima N, Watanabe A, Okita K, Kawasaki S, Ueno M, Kinoshita S<sup>†</sup>, Masui S<sup>†</sup>. OVOL2 maintains the transcriptional program of human corneal epithelium by suppressing epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Rep*. 査読あり 2016. 15(6):1359-68, doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.020.
- [学会発表](計 15 件)
1. Kitazawa K: Direct Reprogramming of Human Fibroblasts into Corneal Epithelial Cells. Stem cells & the Eye, Cardiff, UK, 2017.11.2.
  2. Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, Sotozono C, Kinoshita S, Masui S: OVOL2 maintains a transcriptional program in human corneal epithelial cells. ARVO2017, Baltimore, USA, 2017.5.8.
  3. Kitazawa K: Direct Reprogramming of Human Corneal Epithelial Cells Using Six Transcription Factors. TERMIS-AP 2016, Taipei, Taiwan, 2016.9.5.
  4. Kitazawa K: A future corneal therapy with direct reprogramming. 2nd

- Chulalongkorn Eye Center-Kyoto Prefectural University Medicine joint meeting, Bangkok, Thai, 2016.8.23
5. **Kitazawa K**, Hikichi T, Nakamura T, Sotozono C, Kinoshita S, Masui S: PAX6-depleted corneal epithelial cells using the CRISPR/Cas9 system exhibited loss of corneal identity. Gordon Research Conference, Ventura, USA, 2016.2.29.
  6. **Kitazawa K**: Gene knock-in and Gene knock-out in iPS cells and primary corneal epithelial cells with CRISPR-Cas9 system. Applications of Genome Editing Techniques in Biology of Anterior Segment, SIG, ARVO2016, Seattle, USA, 2016.5.3.
  7. **Kitazawa K**, Hikichi T, Nakamura T, Sotozono C, Kinoshita S, Masui S: Loss of human corneal epithelial cell identity exhibited by deletion of PAX6 using the CRISPR/Cas9 system. ARVO2016, Seattle, USA, 2016.5.3.
  8. **Kitazawa K**, Hikichi T, Nakamura T, Ueno M, Kawasaki S, Sotozono C, Kinoshita S, Masui S: Master transcription factors in human corneal epithelial cells. 1<sup>st</sup> international Stevens-Johnson Syndrome Symposium, Kyoto, Japan, 2016.1.24.
  9. **北澤耕司**:「細胞分化について」日本眼科学会共同企画 理化学研究所眼科特別レクチャー, 京都, 2017.08.02
  10. **北澤耕司**:「次世代の角膜再生医療を目指して」田畑研究室セミナー, 京都, 2017.06.03.
  11. **北澤耕司**, 引地貴亮, 中村隆宏, 外園千恵, 木下茂, 升井伸治: OVOL2 はヒト角膜上皮細胞の生物学的特徴を制御している. 第 121 回日本眼科学会総会, 東京,

2017.4.7.

12. **北澤耕司**: 角膜上皮細胞へのダイレクトリプログラミング. 第 21 回眼科分子生物学研究会, 山口, 2017.03.12.
13. **北澤耕司**:「角膜上皮細胞分化を維持する転写因子ネットワークの解明」角膜カンファランス 2017, 福岡, 2017.2.16
14. **北澤耕司**:「角膜上皮分化と転写因子」. 第 9 回角膜 Eye の会, 東京, 2016. 6.17.
15. **北澤耕司**:「次世代の角膜再生治療をめざして」第 120 回日本眼科学会総会, 仙台, 2016.4.7.

〔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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北澤耕司 (KITAZAWA Koji)

京都府立医科大学・医学科・助教

研究者番号: 10760803