

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11452

研究課題名(和文) 角膜実質再生を目指した骨髄線維芽細胞移植のバイオイメージング解析

研究課題名(英文) Bone marrow mesenchymal cell transplantation for corneal stroma regeneration

研究代表者

林 康人 (Hayashi, Yasuhito)

愛媛大学・医学部・研究員

研究者番号：70314953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ES細胞にROSA26miRFP670/mTagBFP (ROSA26mR/mB)を遺伝子組換えし、Cre発現で細胞膜の蛍光が深赤から青に変化するROSA26mR/mBノックインマウスを作製した。ROSA26 (CAG-loxP-pgkNeo-loxP-mVenus-hGeminin (1-110) -IRES2-mcherry-hCdt1 (30-120) (ROSA26FUUC12) (Cre発現細胞の核で細胞分裂期を緑蛍光、細胞増殖停止期を赤蛍光に標識)とKeratocan-Cre (ケラトサイトでCre発現)に交配して得られた骨髄培養細胞を角膜実質に細胞を注入し、共焦点顕微鏡で観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

菲薄化した角膜実質は角膜穿孔を招き、失明の危険がある。現時点での治療法は角膜移植しかないが、ドナー角膜は不足しており、移植後の拒絶反応など問題が多い。我々が考案した骨髄線維芽細胞の角膜実質内注入はケラトサイトのマーカーであるケラトカンの発現を得ることができ、角膜移植に代わる治療法である。本研究では、角膜実質に注入された骨髄線維芽細胞がケラトサイトに変化すると細胞膜の蛍光が深赤から青に変化し、さらに細胞分裂期の核を緑蛍光、細胞増殖停止期の細胞を赤に提示することで、細胞の分化で増殖、細胞の形態を同時に捉えることができるバイオイメージングをシステム構築した。

研究成果の概要(英文)：ROSA26miRFP670/mTagBFP (ROSA26mR/mB) knock-in mouse lines were newly developed by gene targeting technique using C57BL/6-derived ES cells for tissue specific cell cycle bio-imaging. ROSA26mR/mB mice were mated with Keratocan-IRES2-nls-Cre (Keratocan-Cre) and ROSA26 (CAG-loxP-pgkNeo-loxP-mVenus-hGeminin (1-110) -IRES2-mcherry-hCdt1 (30-120) (ROSA26FUUC12) to get bone marrow mesenchymal cell culture (BMC). The BMCs were injected into artificial thin cornea stroma. The transplanted BMC proliferation were observed a confocal microscope or a multi-photon microscope in-vivo. Keratocan-Cre / ROSA26FUUC12 / ROSA26mR/mB BMCs get Keratocan-Cre gene expression and cell proliferation in recipient corneal stroma.

研究分野：角膜

キーワード：ケラトサイト バイオイメージング 骨髄線維芽細胞 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

菲薄化した角膜実質は角膜穿孔を招き、失明の危険がある。現時点での治療法は角膜移植しかないが、ドナー角膜は不足しており、移植後の拒絶反応など問題が多い。我々が考案した骨髄線維芽細胞の角膜実質内注入はケラトサイトのマーカーであるケラトカンの発現を得ることができ、角膜移植に代わる治療法である。

2. 研究の目的

角膜実質に注入された骨髄線維芽細胞がケラトサイトに変化すると細胞膜の蛍光が深赤から青に変化し、さらに細胞分裂期の核を緑蛍光、細胞増殖停止期の細胞を赤に提示することで、細胞の分化で増殖、細胞の形態を同時に捉えることができるバイオイメーキングをシステム構築すること。

3. 研究の方法

理化学研究所の支援のもとで C57BL6 由来 ES 細胞に ROSA26miRFP670/mTagBFP (ROSA26mR/mB) 遺伝子標的法で遺伝子組換えを行い、得られたキメラマウスから Cre 発現で、細胞膜の蛍光が深赤から、青に変化する ROSA26mR/mB ノックインマウスを作製した。さらに ROSA26 (CAG -loxP -pgkNeo -loxP -mVenus -hGeminin (1-110) -IRES2 -mcherry -hCdt1 (30-120) (ROSA26FUUCI 2) も遺伝子標的法で遺伝子組換えを行い、得られたキメラマウスから Cre 発現細胞の核で細胞分裂期を緑蛍光 (mVenus)、細胞増殖停止期を赤蛍光 (mcherry) に標識できるマウスも作製した。これらのマウスを以前作製した Keratocan-IRES2-nls-Cre (Keratocan-Cre: ケラトサイトに発現する Keratocan 発現細胞に Cre recombinase も発現する) ノックインマウスと交配して Keratocan-Cre / ROSA26FUUCI2 / ROSA26mR/mB マウスを得た。Keratocan-Cre / ROSA26FUUCI2 / ROSA26mR/mB マウス角膜実質を共焦点顕微鏡で観察した。Keratocan-Cre / ROSA26FUUCI2 / ROSA26mR/mB マウス 6 週齢雄より脛骨および大腿骨より骨髄細胞を採取した。Keratocan-Cre / ROSA26FUUCI2 / ROSA26mR/mB 骨髄細胞を 10%FCS DMEM-F12 で 4 継代培養したのち、C57BL6 バックグラウンドの Keratocan-Cre / ROSA26mT/mG (6 週齢雄) の角膜実質に細胞を注入してから、角膜実質を継時的に共焦点顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

Keratocan-Cre / ROSA26FUUCI2 / ROSA26mR/mB マウス角膜実質では、細胞膜が青蛍光、核が赤蛍光のケラトサイトが観察され、バイオイメーキングでケラトサイトに分化したかを確認できる ROSA26mR/mB の遺伝子が働いていることが確認できた。但し、従来使用してい

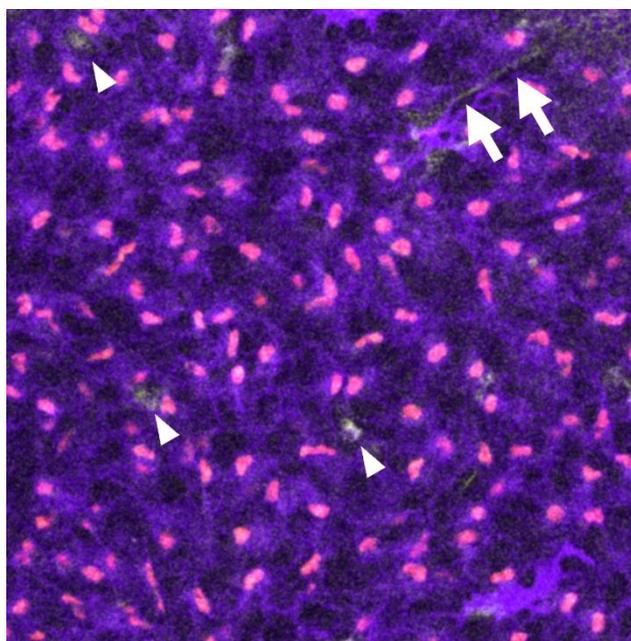


図1 .Keratocan-Cre / ROSA26FUUCI2 / ROSA26mR/mB マウスの角膜実質

ケラトカン発現細胞 (mTagBFP) を紫、それ以外の細胞膜を黄色 (iRFP670)、増殖期の細胞核が緑 (mVenus、矢頭)、増殖停止期の細胞核が赤 (mcherry) で表現。矢印は角膜実質を走る神経線維。Keratocan-Cre / ROSA26mT/mG と比較すると細かいケラトサイトの突起は描出されていない。

た Cre レポーターマウス ROSA26mT/mG (Liqun Luo 等が作製し、Cre 発現細胞膜を緑蛍光、それ以外の細胞膜を赤蛍光にする)と比較して青蛍光、深赤蛍光ともに蛍光強度が低く、ケラトサイトの細胞膜の微細な観察は我々の使用している機材(NikonA1R)では難しいことが解った(図1)。

Keratocan-Cre / ROSA26FUUC12 / ROSA26mR/mB ケラトサイト及び骨髄培養細胞では、タイムラプス撮影の結果、緑蛍光が強くなり、核が丸く大きくなった直後に細胞が分裂し、弱い赤蛍光の核が徐々に赤蛍光が強くなったあとに橙から緑に変化して細胞分裂を繰り返す状態が観察された。Keratocan-Cre / ROSA26FUUC12 / ROSA26mR/mB 骨髄細胞を 10%FCS DMEM-F12 で 4 継代培養したのち、C57BL6 バックグラウンドの Keratocan-Cre / ROSA26mT/mG (6 週齢雄)の角膜実質に細胞を注入してから、角膜実質を継時的に共焦点顕微鏡で観察すると、移植した骨髄細胞がケラトカンを発現していること、周りに存在するホストのケラトサイトと細胞膜で接していること、移植した骨髄細胞が増殖していることが観察できたが、注入した細胞が混濁の原因になっていることも観察され、今後さらなる検討が必要であると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	白石 敦 (Shiraishi Atsushi) (90314963)	愛媛大学・医学系研究科・教授 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関