

令和 5 年 2 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16968

研究課題名（和文）角膜内皮における転写因子TFAP2Bの発現制御機構と作用機序の解析

研究課題名（英文）Physiological regulation of the transcription factor TFAP2B in corneal endothelial cells

研究代表者

原 進（Hara, Susumu）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00536956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：角膜内皮におけるTFAP2Bの役割は、発生期および細胞増殖の役割を担うことを示してきたが、本研究によって、低分子化合物のスクリーニングからTFAP2Bの発現を制御可能な転写因子としてSTAT3を同定した。角膜内皮においてSTAT3シグナルは、角膜内皮の細胞生存と主要な機能の一つであるバリア機能を制御できうることを明らかにし、TFAP2BはSTAT3と協同的に角膜内皮の恒常性維持に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜内皮はポンプ機能およびバリア機能によって角膜の透明性を維持する上で重要な組織である。本研究において、角膜内皮のバリア機能とTFAP2BおよびSTAT3の関連について示した。角膜内皮の主要なバリア機能における転写制御機構の解明によって、角膜内皮疾患の発症メカニズムの解明や角膜内皮の再生医療分野において有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have previously demonstrated the role played by TFAP2B in the development and proliferation of corneal endothelial cells. In this study, using drug screening, we identified STAT3 as a transcription factor that can regulate the expression of TFAP2B. We found that STAT3 signaling regulates corneal endothelial cell survival and barrier function, a major function of these cells, suggesting that TFAP2B in cooperation with STAT3 regulates corneal endothelial cell homeostasis.

研究分野：眼科学・分子生物学

キーワード：角膜内皮 TFAP2B 転写因子 STAT3 バリア機能

1. 研究開始当初の背景

角膜内皮は、バリア機能とポンプ機能によって角膜実質から水を前房水側へ排出し、角膜の透明性を維持する。角膜内皮が外傷等で障害を受けると角膜内皮密度が減少し、水疱性角膜症を発症する。角膜内皮疾患に対する治療法は角膜移植が主に施術されてきたが、近年、角膜内皮に対する体性幹細胞や多能性幹細胞を用いた再生医療の研究も盛んに行われている。我々は、新規ヒト角膜内皮前駆細胞の培養および同定に成功した(Hara S, *et al.*, *Stem Cells Dev*, 2014)。その中で新規ヒト角膜内皮前駆細胞は角膜内皮の発生学的起源である神経提 (*p75*, *TFAP2B*) および眼周囲間充織 (*PITX2*, *FOXC1*, *FOXC2*) の性質を一部保持し、また、成熟角膜内皮への分化誘導によって角膜内皮様の敷石状の細胞形態を呈すること、角膜内皮機能マーカーの発現の増加することを示した。さらに家兎角膜内皮疾患モデルへの移植実験において角膜浮腫の改善が認められた。以上のことより、新規ヒト角膜内皮前駆細胞は角膜内皮再生治療における一つの細胞源となる可能性を示した。

角膜内皮特異的表面細胞マーカーの探索は、角膜内皮の同定および単離において非常に重要である。一般的な Na,K-ATPase や ZO-1、N-cadherin などの生理機能マーカーは組織特異性に乏しい。そこで、分化誘導した成熟角膜内皮細胞を含む不均一な細胞群から角膜内皮細胞を分取可能な新規細胞表面マーカーとして TAG-2A12、CD166 や CD56 等が報告された (V Ding *et al.*, 2014)。しかしながら、これらのマーカー遺伝子も角膜内皮と比較して他組織においても高発現するため、特異的細胞表面マーカーとしては十分でない。そこで我々は、この問題を解決するために、データベース上に公開されている角膜内皮発現プロファイルと網羅的遺伝子解析のデータベース (FAMTOM5) から角膜内皮特異的な細胞表面マーカー候補を選定した。また、各全身臓器および各眼組織を用いた遺伝子発現解析によって新規細胞表面マーカー 5 種類 (*ZP4*, *CLRN1*, *MRGPRX3*, *HTR1D*, *GRIP1*) の同定に成功した (Yoshihara, Hara *et al.*, *PLOS ONE*, 2015)。これらの新規マーカーは、既に報告されたマーカーと比較して、非常に組織特異性が高く、ヒト角膜内皮細胞の FACS を用いた単離・同定に有用であることを見出した。また、ヒト角膜内皮前駆細胞においても、これらのマーカー遺伝子の一部の発現も認められ、眼周囲間充織から角膜内皮への分化指向性が決定されるマーカーとなりうると考えられた。しかしながら、これらの細胞表面マーカーを含む角膜内皮特異的マーカーの転写制御機構についての報告はなく、これらの解明が必要であることが示唆された。

我々は角膜内皮に発現する転写因子に着目し、データベースで公開されている角膜内皮細胞の網羅的遺伝子発現プロファイルを用いて解析し、角膜内皮に高発現する転写因子の同定を試みた。その結果、AP-2 ファミリーに属する *TFAP2B* を同定した。*TFAP2B* はヒト角膜内皮組織全体に発現し、特に角膜内皮幹・前駆細胞が多く存在する最周辺部の細胞に強く発現した。RNA 干渉法を用いた *TFAP2B* の発現抑制により、既知の角膜内皮関連遺伝子の発現解析を実施した結果、角膜内皮特異的分化マーカーである *COL8A2*、*ZP4* の発現量を顕著に減少させた。*TFAP2B* は、これらのプロモーター領域に直接結合することで転写活性を亢進させた。さらに FACS を用いた発現解析の結果、*TFAP2B* の遺伝子発現量は *ZP4* 陰性細胞群と比較して、*ZP4* 陽性細胞群の方が顕著に高い発現を示した。これらのことから、*TFAP2B* は角膜内皮特異的分化マーカー *COL8A2*、*ZP4* の遺伝子発現を直接的に転写制御することを明らかにした。(Hara *et al.*, *JBC*, 2019)。

最近の研究において、*TFAP2B* 遺伝子改変マウスによる機能解析によって、眼周囲間充織特異的および神経堤特異的に *TFAP2B* を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスの解析から眼発生期以降に前眼部形成不全を呈し、若年性緑内障の表現型を示すことが報告された (VB Martino *et al.*, 2016., L Chen *et al.*, 2016)。さらに *ZP4* 遺伝子の SNPs が緑内障との関連性が報告されており (Y Tokuda *et al.*, 2012) *TFAP2B* と *ZP4* 遺伝子との関連性は非常に興味深い。以上のことから、*TFAP2B* が関与する角膜内皮からのシグナルにより他の眼疾患と関連している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

角膜内皮の再生医療分野において、発生メカニズムおよび組織特異的マーカーの解明は重要である。本研究では、近年注目されつつある角膜内皮細胞に発現する転写因子 *TFAP2B* について分子生物学的手法を用いて解析し、*TFAP2B* が担う生理機能について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ウサギ角膜内皮細胞株 (iRCEC)、ヒト角膜内皮細胞として、培養ヒト角膜内皮細胞 (human corneal endothelial cells, HCEC) および培養ヒト角膜内皮細胞株 (HCEC-B4G12) をそれぞれ用いた。

ヒト *TFAP2B* の転写制御領域をルシフェラーゼベクターにサブクローニングし、iRCEC にト

ランスフェクションし、薬剤選択によって安定発現株を作製した。hTFAP2B-Luc-iRCEC に対して低分子化合物ライブラリーを用いて TFAP2B の発現量を指標にスクリーニングを実施した。HCEC、HCEC-B4G12 細胞に STAT3 阻害剤を添加し、免疫染色、ウエスタンブロットによって評価した。さらに、クロマチン免疫沈降法およびルシフェラーゼアッセイによって STAT3 と ZO-1 の遺伝子である *TJP1* とのプロモーター解析を実施した。

4. 研究成果

hTFAP2B-Luc-iRCEC に対して 264 種の低分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを実施し、*TFAP2B* 遺伝子の発現に関与する複数の低分子化合物を選定した。これらは *TFAP2B* 遺伝子を転写活性化および転写抑制する化合物が得られた (図 1)。

我々は、選定した低分子化合物の中でも *TFAP2B* 遺伝子の発現を制御する STAT3 のリン酸化阻害剤 Stattic に注目した。近年、Liu らは、細胞増殖期の角膜内皮での *TFAP2B* の発現には STAT3 のリン酸化が関与すること (Liu *et al.*, *Cell Cycle*, 2015) さらに *TFAP2B* 遺伝子の発現は角膜内皮の発生期およびバリア機能にも関与することが示唆されている (Hara *et al.*, *Stem Cell Dev*, 2014 and Chen *et al.*, *IOVS*, 2016)。

ヒト強角膜片組織においてリン酸化 STAT3 の発現について検討すると角膜上皮、角膜実質、強膜、線維柱帯ではほとんどリン酸化 STAT3 の発現は認められなかったが、角膜内皮組織では強い発現が認められた (図 2)。さらにマウスの発生期では、E15.5 以降から成体マウスの角膜内皮においてリン酸化 STAT3 の発現が見られた。

次に、*ex vivo* ヒト角膜内皮組織培養および HCEC-B4G12 株に対してリン酸化 STAT3 阻害剤を添加すると、免疫染色およびウエスタンブロット法により角膜内皮のバリア機能分子である ZO-1 の発現を低下させ、ポンプ機能分子 Na,K-ATPase の発現には影響を与えなかった。また、HCEC-B4G12 を用いたバリア機能の解析では、リン酸化 STAT3 阻害剤の濃度依存的および経時的にバリア機能の顕著な低下が認められた (図 3 左)。さらに角膜内皮の細胞密度の低下をもたらした (図 3 中) これらはアポトーシスによって細胞死が惹起させることを明らかにした (図 3 右)。

次に、角膜内皮において STAT3 の短時間におけるリン酸化を活性化させるサイトカインについて検討をすると LIF、IL-6、IFN- γ がその候補と考えられた。次に、角膜内皮細胞にこれらのサイトカインについて長期間暴露し、ウエスタンブロットによって発現解析をすると

ZO-1 の発現を亢進させることが明らかになった。

これまでの解析から、STAT3 を介した STAT3 のリン酸化によって ZO-1 の発現が亢進させることが明らかになった。そこで、ZO-1 をコードする *TJP-1* 遺伝子のプロモーター近傍にリン酸化 STAT3 の結合部位が存在した。この部位に対して、*TJP-1* の STAT3 結合部位を含む転写制御領域に対してルシフェラーゼアッセイによってリン酸化 STAT3 阻害剤の濃度依存的に *TJP-1* 遺伝子の発現が有意に低下し、LIF の添加によって *TJP-1* 遺伝子の発現が増加した。さらに、クロマチン免疫沈降法によっても直接 STAT3 が *TJP-1* 遺伝子のプロモーター部位に結合することが明らかになった。

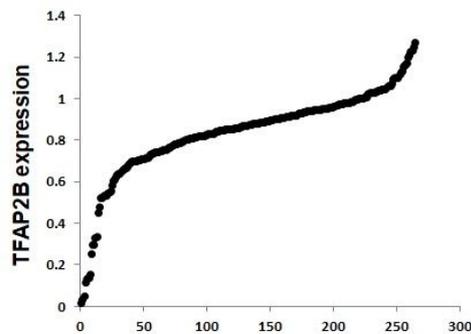


図1. TFAP2Bの低分子化合物のスクリーニング

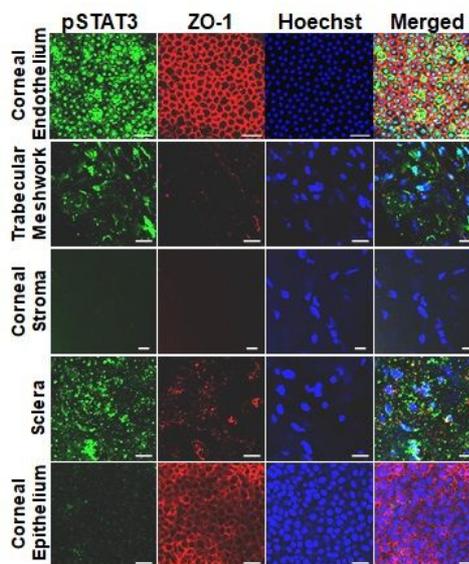


図2.ヒト前眼部組織でのリン酸化STAT3発現

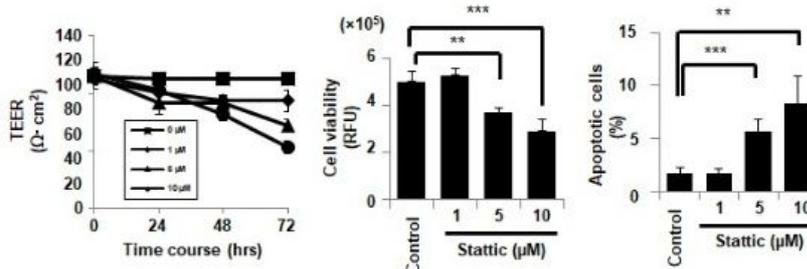


図3.角膜内皮のリン酸化STAT3の阻害効果

次に、ヒト角膜内皮組織における *STAT3* と角膜内皮機能マーカーとの相関について検討するとポンプ機能分子 Na, K-ATPase (*ATP1A1*) の転写量は有意な相関は認められなかったが、バリア機能分子 ZO-1 (*TJP-1*) と *STAT3* の転写量に有意な相関が認められた (図 4)。

以上の結果から、角膜内皮において *STAT3* を介して ZO-1 の発現が調節されることが示唆された。これまでに、我々は、TFAP2B が角膜の発生と細胞増殖に関わることを明らかにしてきた (Hara *et al.*, *Stem Cell Dev.*, 2014)。さらに Chen らは TFAP2B が角膜内皮の発生期において ZO-1 (Chen *et al.*, *IOVS*, 2016) の発現を制御することを報告した。今回の結果から、角膜内皮において TFAP2B は *STAT3* と協同的に角膜内皮のバリア機能分子を制御できうことが示唆された。

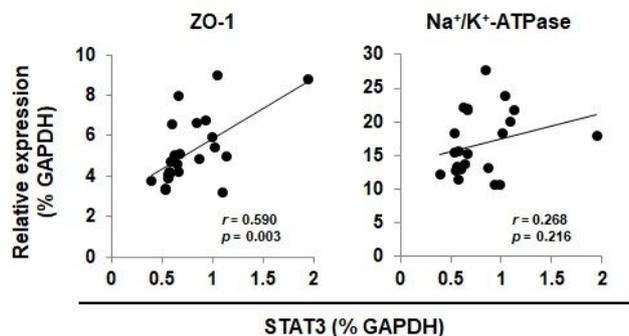


図4.ヒト角膜内皮の *STAT3* と角膜内皮機能マーカーの発現量の相関

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hara Susumu, Tsujikawa Motokazu, Nishida Kohji	4. 巻 514
2. 論文標題 Identification and application of p75 neurotrophin receptor-expressing human trabecular meshwork progenitor cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 580 ~ 585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hara Susumu, Tsujikawa Motokazu, Kawasaki Satoshi, Nishida Kohji	4. 巻 188
2. 論文標題 Homeostasis of SLC4A11 protein is mediated by endoplasmic reticulum-associated degradation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 107782 ~ 107782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2019.107782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujimoto Satoko, Hayashi Ryuhei, Hara Susumu, Sasamoto Yuzuru, Harrington Jodie, Tsujikawa Motokazu, Nishida Kohji	4. 巻 11
2. 論文標題 KLF4 prevents epithelial to mesenchymal transition in human corneal epithelial cells via endogenous TGF- β 2 suppression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 249 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.08.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hara Susumu, Kawasaki Satoshi, Yoshihara Masahito, Winegarner Andrew, Busch Caleb, Tsujikawa Motokazu, Nishida Kohji	4. 巻 294
2. 論文標題 Transcription factor TFAP2B up-regulates human corneal endothelial cell specific genes during corneal development and maintenance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 2460 ~ 2469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara Susumu, Tsujikawa Motokazu, Maruyama Kazuichi, Nishida Kohji	4. 巻 179
2. 論文標題 STAT3 signaling maintains homeostasis through a barrier function and cell survival in corneal endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 132 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2018.11.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihara Masahito, Hara Susumu, Tsujikawa Motokazu, Kawasaki Satoshi, Hayashizaki Yoshihide, Itoh Masayoshi, Kawaji Hideya, Nishida Kohji	4. 巻 25
2. 論文標題 Restricted Presence of POU6F2 in Human Corneal Endothelial Cells Uncovered by Extension of the Promoter-level Expression Atlas	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 175 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2017.10.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Satoko Fujimoto; Ryuhei Hayashi; Yuzuru Sasamoto; Susumu Hara; Jodie Harrington; Motokazu Tsujikawa; Kohji Nishida
2. 発表標題 KLF4 Prevents Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Corneal Epithelia via SMAD2/3 Nuclear Translocation Inhibition of the TGF- Signaling Pathway
3. 学会等名 ARV02019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 進、辻川元一、丸山和一、西田幸二
2. 発表標題 角膜内皮における転写因子STAT3を介したバリア機能の制御
3. 学会等名 角膜カンファランス2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林礼子、上野博夫、小林由紀、佐々本弦、原 進、林竜平、辻川元一、西田幸二
2. 発表標題 In vitroでの発生系譜解析を可能にするiPS細胞ラインの作製
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉原正仁、大宮寛子、原進、川崎諭、林崎良英、伊藤昌可、川路英哉、辻川元一、西田幸二
2. 発表標題 FANTOM5データベースを活用した新規角膜内皮細胞特異的マーカーの同定
3. 学会等名 第6回わかもと先進眼科医療研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 角膜内皮細胞マーカー	発明者 西田幸二、辻川元一、原進、川崎諭、吉原正仁、伊藤昌	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-119518	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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