

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592264

研究課題名（和文） 酸素濃度による角膜幹細胞の分化・増殖制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulation mechanism of corneal stem cell differentiation and proliferation by oxygen concentration

研究代表者

榛村 重人 (SHIMMURA SHIGETO)

慶應義塾大学・医学部・

研究者番号：00235780

研究成果の概要（和文）：

低酸素培養は輪部より分離したヒト角膜上皮幹細胞の増殖を促進する。酸素濃度は Hypoxia inducible factor(HIF)によって感知され、HIF の酸素感受性の alpha サブユニットは3種類知られる。本研究では、ヒト角膜上皮幹細胞における HIF- α の発現と機能を解析した。RT-PCR 解析によれば、初代培養ヒト角膜輪部上皮細胞及びヒト角膜上皮細胞株は HIF-1 α 、2 α 、3 α を発現していた。siRNA を用いた抑制実験によれば、HIF-2 α の抑制により増殖が抑制されたが、HIF-1 α の抑制は細胞増殖に影響を与えなかった。Flow cytometry 解析によれば、HIF-2 α 抑制群では G2 期にある細胞が増加していた。なお、HIF-2 α の過剰発現は増殖に影響を与えなかった。これらの結果は HIF-2 α と角膜輪部上皮細胞の増殖との関連性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：

Hypoxia promotes proliferation of corneal epithelial stem cells isolated from human limbus. Hypoxia is detected by hypoxia inducible factor (HIF). Three HIF- α isoforms are known; HIF-1 α , HIF-2 α , and HIF-3 α . In this study, expression and function of HIF- α in human corneal epithelial cells were investigated. RT-PCR analysis and Western blot analysis confirmed both primary cultured human limbal epithelial cells (LEC) and corneal epithelial cell line HCE-T expressed HIF-1 α , HIF-2 α , and HIF-3 α . Inhibition of HIF-1 α by specific siRNA did not influence on the proliferation of LEC and HCE-T, HIF-2 α siRNA inhibited. Over expressions of HIF-1 α or HIF-2 α did not effect on proliferation. These data suggest the relationship between HIF-2 α and proliferation of corneal epithelial stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：Hypoxia inducible factor (HIF), 幹細胞、低酸素培養、角膜上皮細胞、

1. 研究開始当初の背景

我々は平成 17 年度科学研究費補助金事業において、低酸素培養 (2%O₂) が角膜上皮細胞を未分化に維持したまま増殖を促進することを見出した。しかし、その詳しい分子機構は未知のままだった。低酸素培養を臨床用上皮培養に応用する場合、その分子機構を理解することが、思わぬ副作用を避ける上で重要である。

細胞において、低酸素状態は Hypoxia inducible factor (HIF) によって検知されることが知られている。HIF は酸素感受性の alpha サブユニットと酸素非感受性の beta サブユニットの 2 量体で、低酸素下では alpha サブユニットが分解をうけないために beta サブユニットと結合し、転写因子として働くことで低酸素応答に必要な遺伝子を活性化させる。また、HIF は遺伝子の活性化なしに c-Myc と相互作用し、細胞周期を調整することが知られている。HIF-alpha には 3 種類知られるが、このうちもっとも一般的な HIF-1a は細胞増殖に対して抑制的に働き、一方 HIF-2a/EPAS は細胞増殖に対して促進的に働く。また、HIF-3a/IPAS は転写活性化ドメインを欠くため HIF-1a、HIF-2a の転写活性を競合阻害する。角膜上皮においては HIF-1a と HIF-3a の発現は知られていたが、HIF-2a については解析されていなかった。

2. 研究の目的

HIF-1a、HIF-2a、HIF-3a のヒト角膜上皮細胞における発現と、増殖制御への関与を解析する。

3. 研究の方法

ヒト初代培養角膜輪部上皮細胞およびヒト角膜上皮細胞株における HIF の発現を、RT-PCR および Western blot を用いて確認した。確認できた HIF を siRNA を用いて抑制するか、もしくは過剰発現させ、増殖および細胞周期に与える影響を増殖アッセイおよびフローサイトメトリーを用いて解析した。

ヒト角膜輪部上皮細胞は、海外アイバンク強角膜切片より Dispase II 処理によって剥離

したのち、分散用酵素 (TrypLE express) 処理によって分散させ、無血清低カルシウム培地 (defined keratinocyte SFM) にて培養した。ヒト角膜上皮細胞株 (Araki-Sasaki et al., 1995, Invest Ophthalmol Vis Sci) は血清添加培地 (supplemented hormonal epithelial medium; SHEM; F-12/DMEM, 10% FBS, EGF, insulin, transferrin, hydrocortisone, tri-iodo-thyronine, isoproterenol hydrochloride) を用いて培養した。低酸素培養は、マルチガスインキュベーターを用いて 2%O₂, 5%CO₂, 37°C で行った。

RT-PCR 解析では、60mm dish 上でセミコンフルエントになるまで培養した初代培養ヒト角膜輪部上皮細胞およびヒト角膜上皮細胞株よりキットを用いて RNA を抽出した。RNA はスピンカラムによって精製し、その後逆転写キットを用いて cDNA を合成した。PCR は Taq polymerase および Thermal cycler を用いて 30 サイクルないし 40 サイクル (HIF-3a) で行った。定量的 PCR 解析では、96 ウェルプレート上で siRNA 処理した細胞からキットを用いて RNA を抽出、cDNA 合成し、これを SYBR Green および Step One Plus を用いて real time RT-PCR を行った。

ウェスタンブロット解析では、100 mm dish 上でセミコンフルエントになるまで培養した細胞を氷冷 PBS で 2 回素早く洗浄したのち、核抽出用融解液 (NE-PER, Thermo Fisher) を用いて抽出した。

siRNA 処理は次のように行った。各ヒト HIF-a もしくは negative control siRNA (Ctrl; 1027280, human HIF-1a; S102664053, human HIF-2a; S102663038, Qiagen) を遺伝子導入用培地 (Opti-MEM, Gibco) およびリポフェクション試薬 (HiPerfect, Qiagen) と混合したのち、96 ウェルプレートに分注、ここにヒト角膜輪部上皮細胞は初代培養で 1×10^4 個 (増殖アッセイ)、P1 で 5×10^4 個 (定量的 RT-PCR) を、それぞれの培地で懸濁して播種した。ヒト角膜上皮細胞株は 1×10^3 (増殖アッセイ) 5×10^3 個 (定量的 RT-PCR) を、それぞれの培地で懸濁して播種した。増殖曲線アッセイ及び細胞周期解析においては、 1×10^5 個を 6 well plate に播種し、ここに siRNA リポフェクション試薬混合液を添加した。

siRNA の最終濃度は 25 nM だった。一晩正常酸素濃度で培養したのち、ヒト初代培養角膜上皮細胞については分化を抑制するため培地交換を行い、処理 1 日後より 1 対のうち 1 プレートに対して正常酸素濃度処理、もう 1 プレートに対して低酸素処理を行った。定量的 RT-PCR およびヒト角膜上皮細胞株の増殖アッセイでは処理後 1 日、ヒト初代培養角膜上皮細胞の増殖アッセイでは処理後 9 日で解析を行った。

一過性発現では、6 ウェルプレート上にヒト角膜上皮細胞株を播種し、HA-HIF3a-pcDNA あるいは pcDNA3-EGFP をリポフェクション法 (FuGeneHD) を用いて導入した。HIF レポーターアッセイでは、96 ウェルプレート上に播種したヒト角膜上皮細胞株に、tandem HRE と minimum CMV promoter 下でホタルルシフェラーゼを発現するコンストラクト (Signal HIF reporter assay kit, SA Bioscience) をリポフェクション法で導入したのち、1 日正常酸素濃度培養、その後 1 対のうち 1 プレートに対して低酸素処理を行い、ルシフェラーゼアッセイキット (Dual Luciferase Reporter assay system, Promega) およびルミノメーターを用いて蛍光量を測定した。

増殖アッセイでは、低酸素がミトコンドリアに与える影響を考慮し、WST1 アッセイは行わなかった。代わりに、細胞をホルマリン固定後、DAPI で蛍光核染色し、倒立蛍光顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000, Keyence) で核を撮影したのち、画像解析ソフト (Image J) で細胞数を測定した。死細胞数測定では培地中に PI 添加後、倒立蛍光顕微鏡で測定した。また増殖曲線アッセイでは、6 ウェルプレート上で siRNA 処理したヒト角膜上皮細胞株を毎日酵素処理により回収し、血球計算板を用いて細胞数を測定した。

細胞周期解析では、細胞増殖曲線アッセイで回収した細胞を氷冷 70% エタノールで固定したのち、DAPI で染色してフローサイトメーターで解析した。合わせて M 期にある細胞の割合を解析するため、96 ウェルで培養した細胞をホルマリン固定後 DAPI で核染色し、1 条件 40-80 細胞あたりの分裂中の細胞数を測定した。

4. 研究成果

はじめに RT-PCR 解析を行い、ヒト角膜上皮細胞は HIF-1a, HIF-2a, HIF-3a を発現することを確認した (図 1A)。このうち HIF-3a の発現量は非常に低かったため、さらなる解

析は HIF-1a および HIF-2a に対してのみ行った。Western blot により、それぞれのタンパクの発現も確認できた (図 1B)。

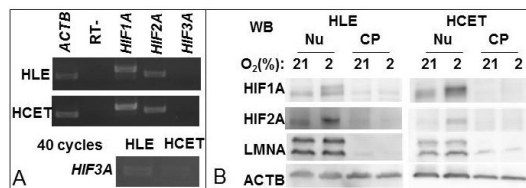


図 1: ヒト角膜上皮細胞における HIF の発現。HLE: ヒト初代培養角膜上皮細胞。HCET: ヒト角膜上皮細胞株。A: RT-PCR。HIF-3a mRNA は 40 サイクルでようやく検出された。B: ウェスタンブロット。Nu: 核抽出物。CP: 細胞質抽出物。LMNA: ラミン A/C (核抽出の陽性対照)。ACTB: アクチン (陽性対照)

引き続いて、HIF-1a および HIF-2a の発現をそれぞれに特異的な siRNA を用いて抑制実験を行った。標的の HIF に対する抑制効果は、qRT-PCR で定量した標的 HIF mRNA の発現量 (図 2A)、及び HIF レポーター遺伝子 (HRE-luciferase) の低酸素下における発現量 (図 2B) が、Negative control siRNA 添加群 (以下対照群) に対してそれぞれ減少していることで確認できた。

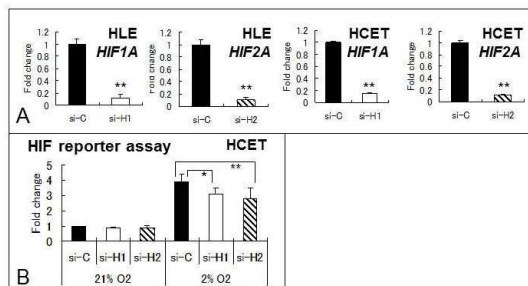


図 2: siRNA による HIF- α の発現減少。A: 定量的 RT-PCR。B: HIF レポーターアッセイ。正常酸素濃度下の発現量で補正。*P<0.05, **P<0.01。A: Student's t test, B: One way ANOVA followed with Sheffe's test.

そこで、HIF- α 抑制が細胞増殖に対する影響を確認したところ、HIF-1a 抑制群は対照群に対して細胞数が変化していなかったものの、HIF-2a 抑制群では対照群に対して有意に細胞数が減少していた (図 3)。また、低酸素群のみならず正常酸素濃度群でも対照群に比して細胞数が減少していた。なお、HIF- α 抑制は死細胞数に対しては影響を与えなかった (図 3D)。

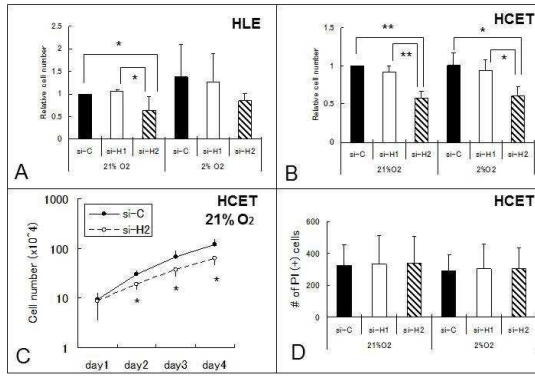


図 3 A: ヒト初代培養角膜輪部上皮細胞、B-D: ヒト角膜上皮細胞株

Flow cytometry を用いて細胞周期を解析したところ、HIF-2a 抑制群では対照群に対して細胞周期が G2/M 期にある細胞が増加していた(図 4A)。細胞を核染色後に M 期にある細胞数を測定したところ、M 期の細胞は減少しており(図 4B)。Flow cytometry 解析の結果と合わせると、HIF-2a siRNA 処理により G2 期にある細胞が増加したことが示された。Western blot により細胞周期に関連するタンパク質を解析したところ、HIF-2a 抑制群では Cyclin B と複合体を形成して細胞周期を制御する CDK1 の抑制的リン酸化型が増加していた(図 4C)。

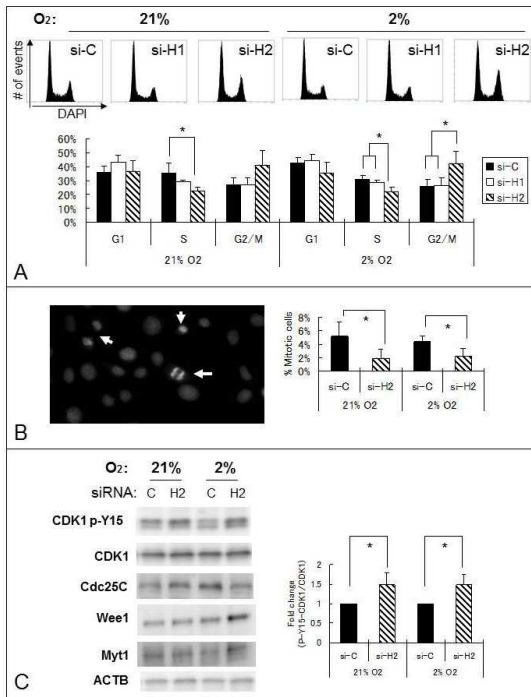


図 4: 細胞周期解析 (A) フローサイトメトリー、(B) M 期細胞率、(C) G2 期制御関連タンパクのウェスタンブロット解析

なお、HIF-2a の一過性過剰発現は細胞数に影響を与えなかった(図 5)。

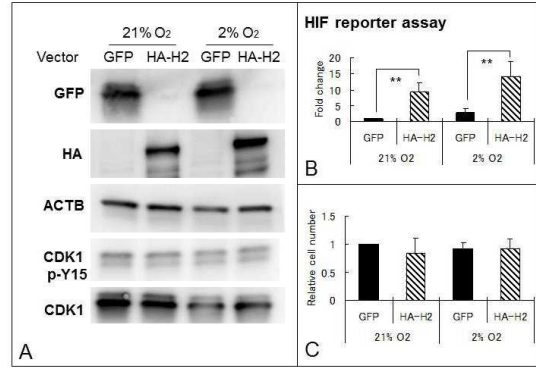


図 5: HIF-2a の一過性発現。(A) ウェスタンブロット解析。ヒト角膜上皮細胞株に GFP あるいは HA-HIF-2A 発現ベクターをリポフェクション法により導入した。(B) HIF レポーターアッセイ。HIF-2A 発現ベクターにより HIF レポーター遺伝子の発現が更新したことから、導入した HIF-2A は機能していることが示された。(C) 増殖アッセイ。HIF-2A の発現は細胞数に影響を与えなかった。

これらの結果は、HIF-2a が正常酸素濃度下でも角膜上皮細胞の増殖の恒常性維持に関与している可能性を示唆する。

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 0 件)

(学会発表)(計 3 件)

Miyashita H, Shimmura S, Kubota M, Tsubota K. Inhibition of hypoxia inducible factor 2 alpha in human corneal epithelial cells delays cell cycle at G2 phase even under normoxia. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort Lauderdale, USA, May/1-5/2011

宮下英之、久保田みゆき、吉田悟、関口友美、坪田一男、榛村重人。角膜上皮前駆細胞における、HIF2A による細胞周期 G2 進行制御、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011/3/1-2

宮下英之、久保田みゆき、吉田悟、関口友美、坪田一男、榛村重人。ヒト角膜上

皮細胞における、HIF-2Aによる細胞周期
制御、第35回角膜カンファランス,東京,
2011/2/17-2/19

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

榛村 重人 (SHIMMURA SHIGETO)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：00235780

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし