

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670731

研究課題名(和文)角膜上皮バリア機能の詳細な解析とその再生医療への応用

研究課題名(英文)Study of conceal burrier function and application for regenerative medicine

研究代表者

辻川 元一 (Tsujikawa, Motokazu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座教授

研究者番号：70419472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：角膜は外界から眼組織を守る重要な組織であり、その上皮はバリア機能、透明性を維持することが必要である。膠様滴状角膜ジストロフィ(GDLD)においてはその二つが阻害され失明にいたる。我々はGDLDの原因遺伝子TACSTD2を単離したが、今回そのin vivoモデルであるノックアウトマウスを作成し、表現型の再現に成功した。TACSTD2ノックアウトにおいては老齢において、明らかに重篤な角膜混濁が多く発生していた。また、この上皮の培養にも成功しており、これに遺伝子改変を行って、患者に戻す、再生医療と遺伝子治療を組み合わせた、新しい疾患治療法の開発を開始した。

研究成果の概要(英文)：Cornea is important tissue which function is burrier function and it must keep transparency. Gelatinous drop-like corneal dystrophy (GDLD) is severe corneal dystrophy in which burrier function is disrupted and patients are suffered from corneal opacity. We have successfully identified the responsible gene for GDLD, TACSTD2. We made knock out mouse line of TACSTD2 and obtained corneal opacity phenotype like in human. Aged mouse (over 1 year) showed significant increased frequency of sever corneal opacity in TACSTD2 knock out. We have successfully cultured the corneal epithelium cells from the mouse and try to develop the new therapy that is the combination therapy of regenerative medicine and gene therapy.

研究分野：再生医療

キーワード：膠様滴状角膜ジストロフィ TACSTD2 再生医療 遺伝子治療 モデル動物

1. 研究開始当初の背景

角膜は眼球組織において外界と接する部分を構成し、透明性を維持するとともに、精巧なレンズとしての光学的特性を持つ。この恒常性を維持するため、角膜上皮はその細胞間で強い細胞接着装置を有し、外界に対してバリア機能を有する。このバリア機能を喪失する遺伝性角膜ジストロフィが膠様滴状角膜ジストロフィ (GDL) であり、この疾患においてはバリア機能の破綻から上皮下に強い沈着物を生じ、上皮の恒常性を破壊し、失明に至る。

この GDL の発症機序は長い間不明であった。私は以前、家系をもとにした位置的遺伝子検索により、この原因遺伝子が第一番染色体にある TACSTD2 であることを示した。(Am J Hum Genet 1998, Nature Genet 1999) TACSTD2 は元来、消化管癌関連抗原として同定されていたものだが、その機能は不明であった。我々はさらにこの分子がクロロゲン分子の安定性を制御しており、Vitro ではこの分子の欠損によりクロロゲン分子の発現は正常であるものの、その分解が促進されていることを示した (Am J Pathol 2010)。これは、病態解明に至る重要な進歩であるが、病態のすべてを説明しているとは言い難い。このような角膜上皮におけるバリア機能に TACSTD2 遺伝子がかかわることから、この *in vivo* での解析を行い、バリア機能が不十分な口腔粘膜上皮細胞シート (臨床に使用されている) の改善を目指す。

2. 研究の目的

今回、TACSTD2 のノックアウトマウスを複製し、モデル動物を作出することにより、さらなる病態解析を行い、より有効な治療につなげる。まず、TACSTD2 ノックアウトマウスの表現型解析を行ったのち、細胞増殖能やアポトーシスに対する反応を検討する。さらに *vitro* にて機能マッピングやパートナー分子検索など TACSTD2 の機能解析と膠様滴状角膜ジストロフィの病態解析を行う。一方、角膜上皮は人に対して最も早く組織幹細胞移植 (細胞シート移植) が行われた組織であり、難治性疾患に対して我々の教室が開発した口腔粘膜細胞シート移植は臨床的にも一定の効果をあげ、現在も行われている。しかしながら、臨床的には移植上皮のバリア機能はやや不良で血管の侵入を許す症例を認める。これは膠様滴状角膜ジストロフィの表現型とよく似ている。さらに、プレリミナリな実験においては口腔粘膜上皮シートではマーカーのムチン等の発現は正常であるものの TACSTD2 の発現は弱いという結果を得ている。このことより、上記の膠様滴状角膜ジストロフィの発症期序と細胞上皮シートのバリア機能不全との間には共通の機構が働いていることが予想され、TACSTD2 および、その下流のシグナルを調節することで、より

臨床に適した口腔粘膜上皮細胞シートを調整できるかどうかを検討する。また、我々は現在、山中博士が開発した iPS 細胞からの角膜上皮細胞への分化と細胞上皮シートの開発を行っており、すでに、上皮シートを作成している。我々は、この上皮シートにおける TACSTD2 の発現を検討し、品質評価に使用すべきか否かを検討するとともに、iPS 細胞誘導角膜上皮シートにおいても口腔粘膜上皮シートと同様に改良を施すことを目的とする。

3. 研究の方法

vivo での検討のため TACSTD2 のノックアウトマウスを作製し、現在まで膠様滴状角膜ジストロフィ患者と *vitro* で認められた表現型を確認する。角膜の混濁の有無やその病理組織的解析、発症条件の検討をおこなう。

患者 TACSTD2 の新規変異に関して機能解析と膠様滴状角膜ジストロフィの病態解析を行う。

TACSTD2 ノックアウトと野生型の角膜上皮を培養し、角膜上皮細胞シートを作成し、その特性解析を行う。

将来的には、iPS 細胞より角膜上皮細胞シートを誘導し、同様の検討を行ったうえで、iPS 細胞に対し TACSTD2 強制発現もしくは shRNA 発現ベクターを導入し誘導的に TACSTD2 の発現を亢進、または抑制するようにしたうえで、上皮シートバリア機能への効果を検討する。さらに、口腔粘膜上皮細胞シートにおける TACSTD2 の発現の揺らぎを測定し、臨床での品質管理項目での使用を目指す

4. 研究成果

TACSTD2 欠損マウスの作出：

今回の検討では *vivo* での検討のためモデルマウスが必要であり、我々は TACSTD2 の Conventional ノックダウンの作出をおこなった。25 年度 5 月にヘテロマウスの作成に成功したが、ヘテロマウス同士の交配が不調で、ラインが途切れる懸念があったため、新たにキメラマウスからヘテロマウスの作成を行うこととした。この作出とほぼ同時期に 1 系統においてヘテロマウスの維持に成功したため、この相互交配によるホモマウスの作出を行い、PCR をもちいたジェノタイプの結果からはホモマウスの TACSTD2 のノックアウトマウスを得た。

TACSTD2 欠損マウスの表現型解析：

上記の TACSTD2 ノックアウトマウスは現在 2 か月齢であるが、外観はほぼ正常の表現型を示しており、角膜の混濁や血管侵入も認めない。ただし、ヘテロマウスも含め、体毛が局所的に抜ける状態を多く認めたため、長期間にわたって検討を行ったが、検討の結果、これ

はリッターメートと有意な差を認めなかった。

また、角膜混濁については特に老齢のマウスにおいて重度の角膜混濁が認められた。しかし、この混濁は野生型でも認められたため、統計学的に検討したところ、やはり、明らかに TACSTD2 ノックアウトマウスにおいて混濁を認める割合が高かった。

TACSTD2 新規変異の同定：上記の動物モデルでの解析と並行して、新たに、GDLD と診断された患者から、TACSTD2 の新規のミスセンス変異とフレームシフト変異を同定した。

これらの変異の病原性を証明するために、これら変異 TACSTD2 と野生型 TACSTD2 の発現コンストラクトを作成し、それぞれ、クローディング分子 CLDN1 および CLDN7 と同時に HeLa 細胞に強制発現させた。すると、二つの変異 TACSTD2 を導入した細胞においては、CLDN1、CLDN7 とともに蛋白の発現レベルが低下しており（ウエスタンブロットにより確認）特にミスセンス変異においても病原性があることが確認できた。

マウスからの角膜および口腔粘膜上皮シートの作成：マウスにおいては角膜上皮細胞を培養することに困難が存在していたが、現在、教室の上杉はこの困難を克服し、培養に成功している。我々はこの方法を用いて、TACSTD2 ノックアウト、および野生型のマウスより、角膜口腔粘膜上皮細胞シートの作成に成功した。

創傷治癒細胞増殖能の検討：TACSTD2 null マウスと野生型マウスの角膜上皮をアルコールにて一定面積脱落させ、その後の治癒の速度の差を観察する方法で行った。現在までの検討では創傷治癒に優位な差は認めなかった。また、In vitro での細胞増殖能にも差を認めなかった。

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 25 件)

1. Huang L, Zhang H, Cheng CY, Wen F, Tam PO, Zhao P, Chen H, Li Z, Chen L, Tai Z, Yamashiro K, Deng S, Zhu X, Chen W, Cai L, Lu F, Li Y, Cheung CM, Shi Y, Miyake M, Lin Y, Gong B, Liu X, Sim KS, Yang J, Mori K, Zhang X, Cackett PD, Tsujikawa M, Nishida K, Hao F, Ma S, Lin H, Cheng J, Fei P, Lai TY, Tang S, Laude A, Inoue S, Yeo IY, Sakurada Y, Zhou Y, Iijima H, Honda S, Lei C, Zhang L, Zheng H, Jiang D, Zhu X, Wong TY, Khor CC, Pang CP, Yoshimura N, Yang Z. A missense variant in FGD6 confers

increased risk of polypoidal choroidal vasculopathy. *Nat Genet.* 2016 48:640-7.

2. Hayashi R, Ishikawa Y, Sasamoto Y, Katori R, Nomura N, Ichikawa T, Araki S, Soma T, Kawasaki S, Sekiguchi K, Quantock AJ, Tsujikawa M, Nishida K. Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature.* 2016 17;531:376-80.

3. Sasamoto Y, Hayashi R, Park SJ, Saito-Adachi M, Suzuki Y, Kawasaki S, Quantock AJ, Nakai K, Tsujikawa M, Nishida K. PAX6 Isoforms, along with Reprogramming Factors, Differentially Regulate the Induction of Cornea-specific Genes. *Sci Rep.* 2016 Feb 22;6:20807.

4. Watanabe S, Oie Y, Fujimoto H, Soma T, Koh S, Tsujikawa M, Maeda N, Nishida K. Relationship between Corneal Guttatae and Quality of Vision in Patients with Mild Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Ophthalmology (IF 6.135).* 122:2103-9. 2015

5. Yoshihara M, Ohmiya H, Hara S, Kawasaki S; FANTOM consortium, Hayashizaki Y, Itoh M, Kawaji H, Tsujikawa M, Nishida K. Discovery of molecular markers to discriminate corneal endothelial cells in the human body. *PLoS One (IF 3.234).* 10:e0129412. 2015

6. Soma T, Hayashi R, Sugiyama H, Tsujikawa M, Kanayama S, Oie Y, Nishida K. Maintenance and distribution of epithelial stem/progenitor cells after corneal reconstruction using oral mucosal epithelial cell sheets. *PLoS One (IF 3.234).* 9:e110987. 2014

7. Koh S, Maeda N, Ikeda C, Asonuma S, Mitamura H, Oie Y, Soma T, Tsujikawa M, Kawasaki S, Nishida K. Ocular forward light scattering and corneal backward light scattering in patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci (IF 3.404).* 55:6601-6. 2014

8. Fujimoto H, Maeda N, Soma T, Oie Y, Koh S, Tsujikawa M, Nishida K. Quantitative regional differences in corneal endothelial abnormalities in the central and peripheral zones in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci (IF 3.404).* 55:5090-8 2014

9. Hara S, Hayashi R, Soma T, Kageyama T, Duncan T, Tsujikawa M, Nishida K. Identification and potential application of human corneal endothelial progenitor cells. *Stem Cells Dev (IF 3.727).* 23:2190-201. 2014

10. Oie Y, Kamei M, Matsumura N, Fujimoto H, Soma T, Koh S, Tsujikawa M,

- Maeda N, Nishida K. Rigid gas-permeable contact lens-assisted cataract surgery in patients with severe keratoconus. *J Cataract Refract Surg* (IF 2.722). 40:345-8. 2014
11. Oie Y, Nozaki T, Takayanagi H, Hara S, Hayashi R, Takeda S, Mori K, Moriya N, Soma T, Tsujikawa M, Saito K, Nishida K. Development of a cell sheet transportation technique for regenerative medicine. *Tissue Eng Part C Methods* (IF 4.448). 20:373-82. 2014
12. Koh S, Maeda N, Ikeda C, Oie Y, Soma T, Tsujikawa M, Watanabe H, Nishida K. Effect of diquafosol ophthalmic solution on the optical quality of the eyes in patients with aqueous-deficient dry eye. *Acta Ophthalmol* (IF 2.844). 92:e671-5. 2014
13. Koh S, Maeda N, Ikeda C, Takai Y, Fujimoto H, Oie Y, Soma T, Tsujikawa M, Nishida K. Effect of instillation of eyedrops for dry eye on optical quality. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (IF 3.404). 54:4927-33. 2013
14. Hayashi R, Himori N, Taguchi K, Ishikawa Y, Uesugi K, Ito M, Duncan T, Tsujikawa M, Nakazawa T, Yamamoto M, Nishida K. The role of the Nrf2-mediated defense system in corneal epithelial wound healing. *Free Radic Biol Med* (IF 5.736). 12:333-342. 2013
15. Hatou S, Higa K, Inagaki E, Yoshida S, Kimura E, Hayashi R, Tsujikawa M, Tsubota K, Nishida K, Shimmura S. Validation of Na,K-ATPase Pump Function of Corneal Endothelial Cells for Corneal Regenerative Medicine. *Tissue Eng Part C Methods* (IF 4.448). 19:901-10. 2013
16. Goto S, Oshima Y, Tsujikawa M, Nishida K. Massive exudative retinal detachment after photodynamic therapy for peripheral retinal capillary hemangioma. *Retina* (IF 3.243). 7:86-8. 2013
17. Kuroda S, Ikuno Y, Yasuno Y, Nakai K, Usui S, Sawa M, Tsujikawa M, Gomi F, Nishida K. Choroidal Thickness in Central Serious Choroidopathy. *Retina* (IF 3.243). 33:302-8, 2013.
18. Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, Kageyama T, Takashiba K, Fujioka T, Tsujikawa M, Miyoshi H, Yamato M, Nakamura Y, Nishida K. Generation of Corneal Epithelial Cells from Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Human Dermal Fibroblast and Corneal Limbal Epithelium *PLoS One* (IF 3.234). 7, e45435, 2012
19. Nakao T, Tsujikawa M, Notomi S, Ikeda Y, Nishida K. The role of mislocalized phototransduction in photoreceptor cell death of retinitis pigmentosa. *PLoS One* (IF 3.234). 7, e32472, 2012
20. Koh S, Maeda N, Soma T, Hori Y, Tsujikawa M, Watanabe H, Nishida K. Development of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis in a dry eye patient with a therapeutic contact lens. *Eye Contact Lens* (IF 1.446). 238, 200-202, 2012.
21. Suzuki M, Tsujikawa M, Itabe H, Du ZJ, Xie P, Matsumura N, Fu X, Zhang R, Sonoda KH, Egashira K, Hazen SL, Kamei M. Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration. *J Cell Sci* (IF 5.432). 125, 2407-2415, 2012
22. Gomi F, Sawa M, Tsujikawa M, Nishida K. Topical Bromfenac as an Adjunctive Treatment with Intravitreal Ranibizumab for Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Retina* (IF 3.243). 32, 1804-1810, 2012
23. Nakao T, Tsujikawa M, Gomi F, Sawa M, Nishida K. Foveal sparing in patients with Japanese Stargardt's disease and good visual acuity *Jpn J Ophthalmol* (IF 1.676). 56, 584-588, 2012
24. Matsumura N, Kamei M, Tsujikawa M, Suzuki M, Xie P, Nishida K. Low-dose lipopolysaccharide pretreatment suppresses choroidal neovascularization via IL-10 induction. *PLoS One* (IF 3.234). 7, e39890, 2012
25. Ikuno Y, Sawa M, Tsujikawa M, Gomi F, Maeda N, Nishida K. Effectiveness of 1.25 % povidone-iodine combined with topical levofloxacin against conjunctival flora in intravitreal injection. *Jpn J Ophthalmol* (IF 1.676). 56, 497-501, 2012
- 〔学会発表〕(計 4件)
- Tsujikawa M. Corneal Dystrophies in Japan APAO2016 2016・3・14 Taiwan Taipei
- Tsujikawa M Corneal Dystrophies in Japan WOC2016 2016・2・6 Mexico Guadrahara
- 辻川元一 角膜再生医療の夜明け 日本眼科学会総会 東京 2014・4・4
- Tsujikawa M Stem Cell Research in corneal endothelium WOC2014 東京 2014・4・3

〔図書〕(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

辻川 元一 (Motokazu
Tsujikawa) 大阪大学大学院医学系研究科
寄付講座教授

研究者番号 : 70419472

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号 :

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号 :