

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462681

研究課題名(和文) 杯細胞分化のシグナル伝達の解明と治療応用

研究課題名(英文) Signal transduction of goblet cells differentiation and clinical application

研究代表者

山上 聡 (YAMAGAMI, Satoru)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：10220245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト結膜上皮細胞由来の細胞の幹細胞性の検討、細胞外、細胞内のシグナル伝達の機構の解析を試みた。研究用ドナー強角膜から採取した結膜から細胞を単離したところ、採取された細胞は結膜特異的な分化マーカーを発現し、自己複製能は限られていたことなどから結膜由来の前駆細胞と考えられた。杯細胞分化促進増殖因子の機能的受容体を遺伝子増幅、蛋白発現の検討、ブロッキング抗体で検討したところ、一つの受容体が機能していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We tried to investigate the stemness of isolated cells derived from human conjunctival epithelium and intra-and extracellular signal transduction system. Isolated single cells from human donor conjunctival epithelium express conjunctival epithelium-specific markers and show limited self-renewality, suggesting that isolated single cells are precursors derived from human conjunctival epithelium. FGFR is a functional receptor based on the findings of PCR, western blotting, and blocking experiments with monoclonal antibody.

研究分野：眼科学

キーワード：杯細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト結膜の杯細胞の培養は、ウシ血清存在下に epidermal growth factor を添加することで可能とされてきた。しかし約 2000 種類と言われる未知成分を含んだウシ血清を用いる従来の培養法では、厳密な意味での増殖因子による分化能を決定することは難しい。我々は、培養ヒト角膜上皮細胞シート移植に用いる細胞シートの作製に必須であった異種のフィーダー細胞、マウス 3T3 線維芽細胞やウシ血清を用いない無血清、無フィーダーによる新しい培養法を考案し報告した。(Human corneal epithelial equivalents for ocular surface reconstruction in a complete serum-free culture system without unknown factors. Yokoo S, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008. A novel isolation technique of progenitor cells in human corneal epithelium using non-tissue culture dishes. Yokoo S, et al. Stem Cells. 2008) しかしこれらの培養法では細胞の未分化性維持という点では未だ不十分であった。そこで前回の科研費補助により我々は、keratinocyte growth factor がこの無血清培養に重要であり、角膜輪部上皮の未分化マーカーを維持した細胞シートを構築できることを報告した (Long-Term Maintenance of Limbal Epithelial Progenitor Cells Using Rho Kinase Inhibitor and Keratinocyte Growth Factor. Miyashita H, et al. Stem Cells Transl Med. 2013)。本研究を進める経過で培養ヒト角膜上皮、培養ヒト結膜上皮の培養を各種増殖因子の存在下で検討したところ、以下の知見を得た。すなわちアメリカアイバンクから研究用に提供を受けたヒト強角膜片からヒト結膜上皮を採取後 single cell に分散し、無血清環境で基礎培地に B-27 (ギブコ) 添加剤のみを添加した場合、全く増殖しないヒト結膜上皮細胞は (図左) B-27 に epidermal growth factor の添加で敷石状の結膜上皮コロニーを形成し、B-27 に fibroblast growth factor 2 を添加したところコロニー中央部から PAS 染色陽性の杯細胞様細胞を得た。更にこの杯細胞様細胞を垂直に薄切し、HE 染色を行ったところ形態学的に杯細胞と考えられる特徴的な形態を示した。

2. 研究の目的

無血清・無フィーダー培養により得られる非常にクリアな細胞分化システムの長所を生かして今回は、4 つ存在する fibroblast growth factor 2 のレセプターの active な反応経路および分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK)、具体的には、p42/p44 MAPK (ERK1/2)、JNK、p38MAPK など MAPK ファミリ

の細胞内外のシグナル伝達機構を明らかにし、MUC5AC 陽性のヒト結膜由来の分泌型杯細胞の分化・活性化を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

ヒト結膜上皮細胞由来の細胞の幹細胞性の検討、細胞外、細胞内のシグナル伝達の機構を中心に解析した。

(1) single cell として採取したヒト結膜上皮細胞の幹細胞性の検討

研究用ドナー強角膜から結膜を採取し、コラゲナーゼ処理後 non-tissue culture dish を用いて細胞を単離。細胞を血清無添加 B-27 添加剤、EGF と共に培養し、基底細胞マーカーの染色、BrdU 取り込み検査、p63 染色、分化後の細胞シートの cytokeratin4, cytokeratin13 による染色を実施

継代培養の反復による自己複製能の検討などにより分離された single cell が結膜上皮細胞の幹細胞か否かの確認を行った。

未分化な細胞培養を誘導する増殖因子で上皮系培養させることで未分化細胞増幅。サブコンフルエントの状態から杯細胞培養分化条件に移行し、杯細胞の増幅培養が可能か否かを検討した。

(2) 杯細胞分化促進増殖因子の機能的受容体の検討

FGF2 の機能的受容体の決定するため FGF2 で刺激された single cell 由来細胞を回収し、以下の検討を実施

FGF2 の受容体 FGFR1-4 の遺伝子発現解析

遺伝子が検出された FGFR に関するウエスタンブロッティングによる蛋白発現解析

遺伝子、蛋白共に発現のみられた受容体の機能解析のため、ブロッキング抗体を添加し、杯細胞の発現の有無を検討した。

以上より細胞外の機能的受容体を決定した。

(3) 杯細胞分化促進細胞内シグナル伝達の解析

FGF2 刺激し、杯細胞に分化させたコロニーを用いて以下の検討を行った。

コリン作動薬のカルバコールが FGF2 刺激ヒト結膜コロニーにおいて、p42/p44 MAPK を有意にリン酸化 p42/p44 MAPK に活性化するか否かをウエスタンブロッティングにて定量

FGF2 刺激がヒト結膜コロニーにおいてリン酸化 p42/p44 MAPK を増加させるか否かをウエスタンブロッティングにて定量

FGF tyrosine kinase inhibitor の AZD4547 でブレインキュベートしたのち、

FGF2 刺激を行いリン酸化 p42/p44 MAPK を増加させるか否かを検討

FGF tyrosine kinase inhibitor の AZD4547 でプレインキュベートしたのち、コリン作動薬のカルバコールリン酸化 p42/p44 MAPK を定量し、FGF2 の関与を確認

FGF2 刺激で培養したヒト杯細胞をトリプシン処理後播種し、B-27 添加培地で培養。ERK が pERK となり核内移行するか否かを免疫組織学的に解析

p42/p44 MAPK の inhibitor FR180204, p42/p44 MAPK と ERK5 の inhibitor U0126 を用いて、ERK5 のシグナル伝達の関与の検討

4. 研究成果

(1) single cell として採取したヒト結膜上皮細胞の幹細胞性の検討

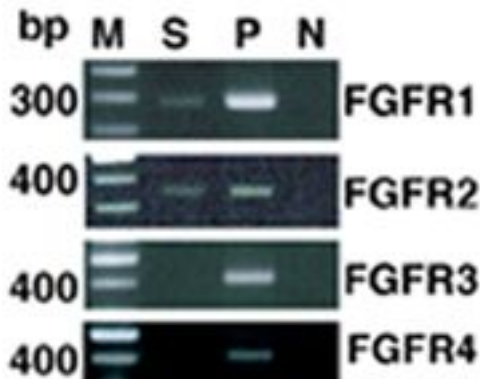
研究用ドナー強角膜から採取した結膜から細胞を単離し、細胞を血清無添加 B-27 と EGF で培養したところ、p63 基底細胞マーカーに陽性、BrdU を取り込むなど積極的に増殖していることが明らかとなった。分化後の細胞シートを分化した結膜細胞特異的な cytokeratin4 および cytokeratin13 で染色したところ共に陽性所見が得られ、結膜の分化した細胞であることが確認された。

つぎに継代培養の反復による自己複製能の検討を行ったところ、自己複製能は十分ではなく分離された single cell が結膜上皮細胞の前駆細胞であることが明らかとなった。

サブコンフルエントの状態から杯細胞培養分化条件に移行し、杯細胞の増幅培養が可能か否かを検討したが、すでに結膜上皮細胞に分化している細胞に杯細胞分化用の増殖因子を反応させても胚細胞への分化は困難であった。

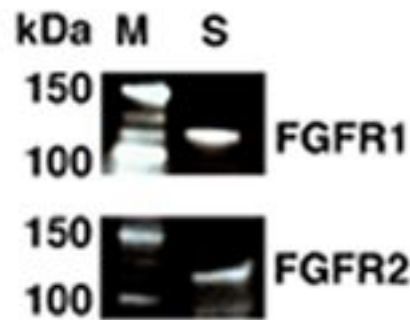
(2) 杯細胞分化促進増殖因子の機能的受容体の検討

培養結膜上皮細胞から FGF2 の受容体 FGFR1-4 の遺伝子発現解析を PCR 法で行った。結果として FGFR1 及び FGFR2 の発現が確認されたが、FGFR3 及び FGFR4 の発現は認められなかった。

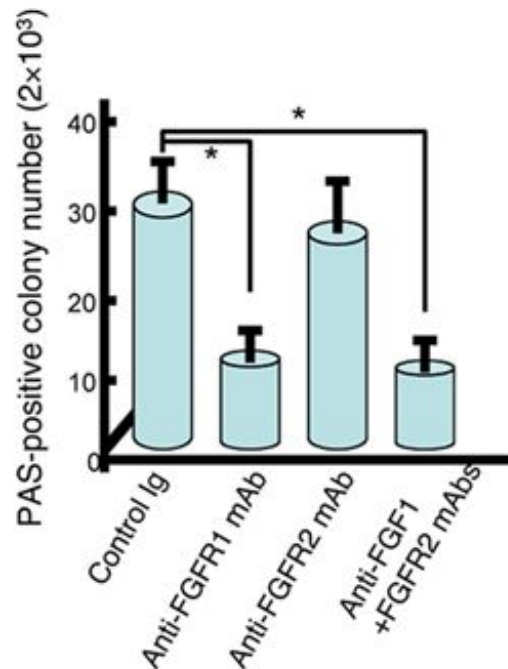


次に PCR 法で遺伝子が検出された FGFR1 および FGFR2 に関するウエスタンブロッティング

による蛋白発現解析を行ったところ、FGFR1 および FGFR2 はともにその発現が認められた。



そこで遺伝子、蛋白共に発現のみられた FGFR1 および FGFR2 の機能解析のため、ブロッティング抗体を添加し、杯細胞の発現の有無を検討した。ヒト結膜から採取された前駆細胞に対し、杯細胞培養の増殖因子を添加し、抗 FGFR1 抗体単独投与、抗 FGFR2 抗体単独投与、抗 FGFR1 抗体 + 抗 FGFR2 抗体併用投与を行い杯細胞のコロニー形成数を検討したところ、抗 FGFR1 抗体単独投与および抗 FGFR1 抗体 + 抗 FGFR2 抗体併用投与において有意に杯



細胞のコロニー形成数が抑制された。

以上より杯細胞のコロニー形成には、FGFR1 が関与していることが示された。

(3) 杯細胞分化促進細胞内シグナル伝達の解析

ERK1/2 がシグナル伝達に関与していることは、ウエスタンブロッティング、リン酸化の過程を明らかにする免疫染色、インヒビターを用いたブロッティング実験などから明らかになった。しかしその抑制機構は完全でなく、不完全であることから別の経路の関与も示唆された。更にインヒビターを用いた検討を

おこなったところ ERK5 と ERK1/2 の両方をブロックすることでシグナル伝達経路をほぼ完全にブロックすることができた。以上から ERK5 と ERK1/2 の両方両方の経路を用いて分泌型ムチンの分化が起こっている可能性が考えられた。しかしデータの一部がまだ不完全であり、今後この結果の信頼性を高めるために補完的な検討を実施している。

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 6 件)

Development of functional human oral mucosal epithelial stem/progenitor cell sheets using a feeder-free and serum-free culture system for ocular surface reconstruction.

Nakamura T, Yokoo S, Bentley AJ, Nagata M, Fullwood NJ, Inatomi T, Sotozono C, Yamagami S, Kinoshita S. Sci Rep. 2016;6:37173.

査読あり

Optimization of Cultured Human Corneal Endothelial Cell Sheet Transplantation and Post-Operative Sheet Evaluation in a Rabbit Model. Yamaguchi M, Shima N, Kimoto M, Ebihara N, Murakami A, Yamagami S.

Curr Eye Res. 2016;41:1178-84.

査読あり

Repair of the TGFBI gene in human corneal keratocytes derived from a granular corneal dystrophy patient via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair.

Taketani Y, Kitamoto K, Sakisaka T, Kimakura M, Toyono T, Yamagami S, Amano S, Kuroda M, Moore T, Usui T, Ouchi Y. Sci Rep. 2017;7:16713. doi:

10.1038/s41598-017-16308-2.

査読有り

Transplantation of Human Corneal Endothelial Cells Cultured on Bio-Engineered Collagen Vitrigel in a Rabbit Model of Corneal Endothelial Dysfunction.

Yoshida J, Yokoo S, Oshikata-Miyazaki A, Amano S, Takezawa T, Yamagami S.

Curr Eye Res. 2017;42:1420-1425. doi:

10.1080/02713683.2017.1351568.

査読あり

Corneal endothelial cells activate innate and acquired arm of anti-viral

responses after cytomegalovirus infection.

Miyazaki D, Uotani R, Inoue M, Haruki T, Shimizu Y, Yakura K, Yamagami S, Suzutani T, Hosogai M, Isomura H, Inoue Y.

Exp Eye Res. 2017;161:143-152.

doi: 10.1016/j.exer.2017.06.017.

査読あり

Suppression of Allograft Rejection with Soluble VEGF Receptor 2 Chimeric Protein in a Mouse Model of Corneal Transplantation.

Hayashi T, Usui T, Yamagami S.

Tohoku J Exp Med. 2016;239:81-8.

doi: 10.1620/tjem.239.81.

査読あり

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山上 聡 (YAMAGAMI, Satoru)

日本大学・医学部・教授

研究者番号: 10220245

(2)研究協力者

横尾 誠一 (YOKOO, Seiichi)