

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11484

研究課題名(和文) マウス表皮細胞から角膜上皮細胞への形質転換における上皮-実質間相互作用の検討

研究課題名(英文) Epithelial-mesenchymal interaction in the trans-differentiation from mouse epidermal cells to corneal epithelial cells

研究代表者

白石 敦 (Shiraishi, Atsushi)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90314963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス表皮sp細胞から角膜上皮様細胞への形質転換の比較検討に利用可能な三次元培養モデルを用いて、表皮sp細胞での角膜上皮分化マーカー遺伝子の発現を定量的に解析出来ることを明らかにした。さらにWnt関連因子を始めとする輪部実質細胞由来因子が角膜上皮細胞への形質転換に及ぼす影響について明らかにするため、輪部実質由来因子のトランスクリプトーム解析を行い、上皮細胞の分化誘導に関与する可能性のある角膜輪部特異的因子の候補遺伝子について解析を進めた結果、候補遺伝子は分泌タンパク質のコード遺伝子(21種)、細胞外マトリクスの構成タンパク質のコード遺伝子(15種)であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、形質転換および角膜上皮の分化誘導における分子機構の解明を促進し、表皮幹細胞を用いた角膜上皮再生医療の実現に貢献できると考えられる。さらに、人工多能性幹細胞(iPS細胞)等を用いた次世代の再生医療の実現に向けても、本研究で得られる知見が利用可能であり、当分野において多大な貢献ができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we employed three-dimensional culture model including mouse epidermal sp cells, human corneal stromal fibroblasts, and human corneal limbal stromal fibroblasts and demonstrated the quantitative analysis of corneal epithelial differentiation markers expressed in the mouse epidermal sp cells. Furthermore, to elucidate the effect of corneal limbal stromal factors including Wnt related factors for trans-differentiation from mouse epidermal cells to corneal epithelial cells, we performed trans-cryptome analysis of corneal limbal stromal fibroblasts. We analyzed candidate factors that can be related to trans-differentiation to the corneal epithelial cells, and found 21 secreted proteins and 15 extracellular matrices genes.

研究分野：角膜

キーワード：角膜上皮 表皮細胞 形質転換 角膜輪部

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

培養角膜上皮移植が開発、臨床応用されるようになり、かつて難治とされた瘢痕性角結膜疾患においても、良好な治療成績が報告されている。一方、組織幹細胞の多分化能または可塑性 (plasticity) に関する研究が盛んに報告されるようになり、角膜分野においても、表皮に含まれる幹細胞 (毛包幹細胞) から角膜上皮様細胞への形質転換が可能であることが示されている。皮膚はヒトの持つ最大の器官であり、細胞の採取も比較的容易であることから、表皮由来細胞から形質転換した角膜上皮様細胞を用いることが可能となれば、限られた細胞源しかない角膜上皮の再生治療に非常に有用となると考えられる。

## 2. 研究の目的

角膜上皮細胞の分化誘導、恒常性の維持に上皮-実質間相互作用が重要な働きをしていると考えられており、角膜再生医療の分野においても、上皮細胞の分化制御機構における実質の働きを解明することは重要課題の一つである。申請者等は、表皮細胞からの角膜上皮細胞への形質転換についての研究を行ってきており、マウス表皮細胞から角膜上皮様細胞 (K12 陽性細胞) への形質転換が可能であること、さらに形質転換には輪部実質細胞の存在が必要であることを明らかにしてきた。本研究では、マウス表皮 side population (sp) 細胞と角膜実質線維芽細胞または輪部実質線維芽細胞を含むコラーゲンゲルを用いた三次元培養モデルを用いて、輪部実質細胞由来因子が形質転換に及ぼす影響について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス表皮 sp 細胞、HCF、HLF、HDF、RCE の調製

生直後の C57BL/6 マウスより表皮 sp 細胞の分離、輸入角膜の角膜よりヒト角膜実質線維芽細胞 (HCF) または輪部実質線維芽細胞 (HLF) の分離、ウサギ角膜よりウサギ角膜上皮細胞 (RCE) の分離、皮膚科手術による余剰皮膚よりヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) の分離を行った。

### (2) 三次元培養

形質転換モデルは表皮 実質は相互作用が重要な働きをしていると考えられていることより、HCF または HDF をコラーゲン中で培養し、コラーゲンゲル上に RCE を播種して三次元培養を行い 3 日、5 日、または 9 日間の培養後、実質内の線維芽細胞を回収して各種サイトカインの発現についてリアルタイム PCR および免疫組織化学的検討を行った。すでに作成してある角膜上皮特異的因子であるケラチン 12 が発言すると蛍光色素を発する *Krt12<sup>Cre/+</sup>/ZEG* マウスより分離した表皮 sp 細胞を表皮をすべて剥離したマウス角膜上皮に播種し、各種ケラチンの発現について免疫組織化学的検討を行った。

### (3) 輪部実質由来因子の解析

マウス角膜輪部および角膜中心部実質より回収した細胞をサブコンフルエントまで培養後 total RNA を抽出した。Agilent Expression Array (SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray Kit) にてトランスクリプトーム解析を行い、39,430 遺伝子および 16,251 lincRNAs について角膜輪部実質由来線維芽細胞 (MLSF) と角膜中心部実質由来線維芽細胞 (MCSF) の比較を行った。

### (4) 輪部細胞由来因子の絞り込み

輪部線維芽細胞で高発現を認めた複数の候補因子について、三次元培養モデルにおける輪部

実質線維芽細胞での発現をリアルタイム PCR により調べる。HLF を含むコラーゲル上で表皮 sp 細胞を培養することで K12 遺伝子の発現が認められることが既に明らかになっていることから、本培養モデルを用いて、形質転換に関連する因子をさらに絞り込むことが可能であると考えられる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 三次元培養モデルによる表皮 実質は相互作用の検討

上皮細胞の形質転換には実質細胞からの液性因子が重要な働きをしていると考えられる。そこで、角膜実質細胞 (HCF)、皮膚実質細胞 (HDF) から分泌される増殖因子 (EGF, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3, SCF, NGF, HGF, FGF7) の発現について、培養皿での培養、三次元培養 (上皮細胞との共培養あり、なし) 3, 5, 9 日後に採取して real-time PCR にて発現を検討した、その結果、HDF と HCF の増殖因子発現は培養皿上では全く異なる発現プロファイルを示し、コラーゲン内 (上皮細胞との共培養なし) でもその発現は同様の傾向であった。しかしながらコラーゲン上に上皮細胞を培養した三次元培養を行うと、HDF と HCF の増殖因子発現プロファイルはほぼ一致した傾向を示し、培養皿上での発現プロファイルからは大きく変化していた。この結果は、角膜表皮 実質間に重要な相互作用があることを示していた。(図1)

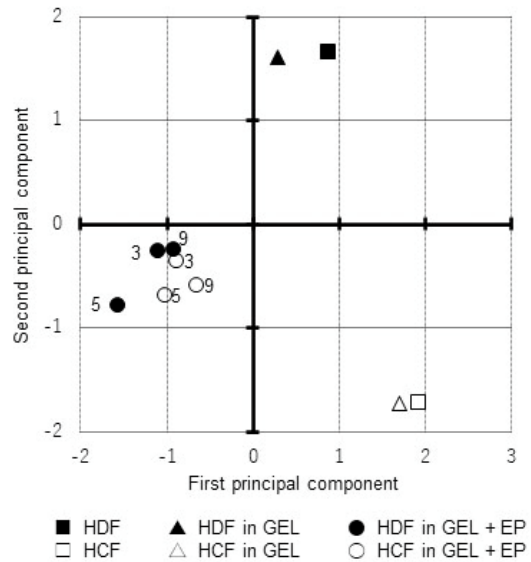


図1 HDFとHCFの増殖因子発現プロファイル

##### (2) 器官培養による表皮 実質は相互作用の検討

我々は、角膜輪部が皮膚 角膜上皮の形質転換に重要な働きをしていると考えているが、*Krt12<sup>Cre/+</sup>/ZEG* マウスより分離した表皮 sp 細胞を用いて、角膜輪部を含めた実質上で培養した時のケラチンの発現について検討した。その結果7日間培養したところ AE1/AE3, K10 の発現は輪部、角膜中央のどちらでも認められたが、角膜輪部上でのみ K12 の発現を認め、輪部実質細胞の液性因子が皮膚 角膜上皮形質転換に作用している可能性が示唆された。(図2)

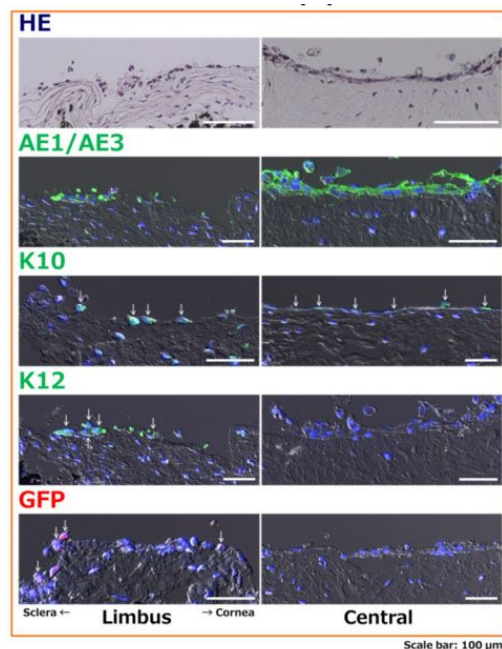


図2 器官培養によるケラチンの発現

### (3) 輪部実質由来因子の解析

マウス角膜輪部および角膜中心部実質細胞のトランスクリプトーム解析を行い、39,430 遺伝子および 16,251 lincRNAs について比較を行った。結果、分泌タンパク質のコード遺伝子が 21 種、細胞外マトリクスの構成タンパク質をコードする遺伝子が 15 種含まれていることが明らかとなった。また、分泌タンパク質のコード遺伝子の内、5 種類は Wnt シグナルに関連する因子であった。(図3)

### (4) 輪部細胞由来因子の絞り込み

輪部線維芽細胞で高発現を認めた複数の候補因子について、三次元培養モデルにおける輪部実質線維芽細胞での発現をリアルタイム PCR により検討中であるが、現在のところ角膜輪部で特に高発現を認めた Wnt 関連因子である secreted frizzled-related protein 2 (sFRP2) または dickkopf homolog 3 (DKK3) 添加後のマウス表皮細胞における K12 遺伝子および PAX6 遺伝子の発現について検討した。その結果、sFRP2 添加群ではコントロールに比べ、K12 遺伝子発現量が 1.5 倍、PAX6 遺伝子発現量が 1.6 倍であり、両遺伝子ともに発現量増加の傾向を示し、角膜輪部における形質転換に Wnt シグナルが関与する可能性が考えられた。

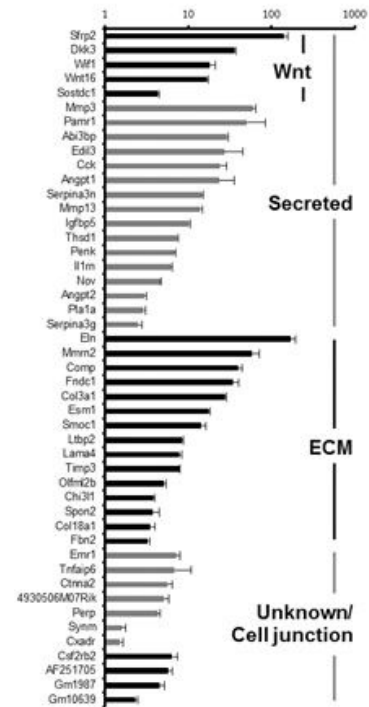


図3 角膜輪部実質特異的因子の解析

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikegawa Y, Shiraishi A, Hayashi Y, Ogimoto A, Ohashi Y	4. 巻 20
2. 論文標題 In Vivo Confocal Microscopic Observations of Vortex Keratopathy in Patients with Amiodarone-Induced Keratopathy and Fabry Disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 5315137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/5315137.	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 Namiguchi K, Mizoue S, Ohta K, Shiraishi A.	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Effect of Botulinum Toxin A Treatment on Eyelid Pressure in Eyes with Blepharospasm.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Eye Res.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02713683.2018.1464191.	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 Zhang Y, Kao WW, Hayashi Y, Zhang L, Call M, Dong F, Yuan Y, Zhang J, Wang YC, Yuka O, Shiraishi A, Liu CY.	4. 巻 58
2. 論文標題 Generation and Characterization of a Novel Mouse Line, Keratocan-rtTA (KeraRT), for Corneal Stroma and Tendon Research.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 4800-4808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.17-22661.	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 該当する
1. 著者名 Joko T, Shiraishi A, Kobayashi T, Ohashi Y, Higashiyama S.	4. 巻 Suppl
2. 論文標題 Mechanism of Proliferation of Cultured Human Corneal Endothelial Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cornea.	6. 最初と最後の頁 S41-S45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IC0.0000000000001337.	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 Y, Shiraishi A, Sakane Y, Takezawa Y, Kamao T, Ohashi Y, Yasunaga S, Sugahara T.	4. 巻 58
2. 論文標題 Effect of Mandarin Orange Yogurt on Allergic Conjunctivitis Induced by Conjunctival Allergen Challenge.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 2922-2929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.16-21206.	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 Takezawa Y, Suzuki T, Shiraishi A.	4. 巻 36
2. 論文標題 Observation of Retrocorneal Plaques in Patients With Infectious Keratitis Using Anterior Segment Optical Coherence Tomography.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cornea.	6. 最初と最後の頁 1237-1242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ICO.0000000000001286.	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 -

〔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	小林 剛  (Kobayashi Takeshi)  (70380285)	愛媛大学・医学系研究科・寄附講座講師   (16301)	
研究分担者	三谷 亜里沙  (Mitani Arisa)  (60648096)	愛媛大学・医学部附属病院・医員   (16301)	