

機関番号：16301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592079
 研究課題名（和文） マウス皮膚上皮SP細胞の角膜上皮細胞への分化誘導の検討
 研究課題名（英文） Transdifferentiation induction of murine epidermal SP cells into corneal epithelial cells.
 研究代表者
 白石 敦（SHIRAISHI ATSUSHI）
 愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授
 研究者番号：90314963

研究成果の概要（和文）：本研究において、我々はマウス皮膚上皮細胞の角膜上皮細胞への分化誘導に関して検討を行った。その結果、マウス皮膚上皮細胞は角膜上皮様細胞に分化可能であることが示された。また、分化誘導には角膜輪部の環境が重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated the potential for murine epidermal cells transdifferentiation into corneal epithelial-like cells, and demonstrate that murine epidermal cells have the potential to transdifferentiate into corneal epithelial-like cells. The results indicate that transdifferentiation may require the effect of coculture with corneal epithelial cells, as well as the corneal limbal environment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：眼発生・再生医学

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞培養技術の飛躍的な進歩とともに、培養角膜上皮シート移植という手法が開発、臨床応用されるようになり、かつては難治とされた眼類天疱瘡、スティーブンス・ジョンソン症候群などを代表とする原発性角結膜上皮疾患についても、良好な治療成績が報告されていた。この培養角膜上皮シート移植では、状況によって患者自身の健眼より採取した上皮細胞を用いる auto 移植も可能ではあるが、実際には提供眼の allo 角膜上皮を利用しているのが現状であり、その術後には免疫抑制剤の投与が必要である。その一方で両眼が侵された場合には、患者自身の口腔粘膜上皮を利用した培養口腔粘膜上

皮シートが臨床応用されるようになった。これも確かに優れた方法ではあるが、透明性の維持、角膜上皮細胞としての特異性、幹細胞が確実に含まれているかどうかなどについては現在もまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

角膜のパーツである角膜上皮移植の最終的な目標を、自己の幹細胞を含んだ、角膜上皮（の特徴を持った細胞）を移植することとし、本研究においては、マウス表皮 SP 細胞を試験管内で角膜上皮細胞に分化させ移植可能な培養角膜上皮シートを作製することが目的である。

3. 研究の方法

1) マウス角膜上皮細胞培養法の確立

分離はヒトおよびウサギの角膜上皮細胞の分離に準じておこなう。マウス角膜を摘出し、dispase 処理(4°C, 一晚静置)後、上皮を剥離し trypsin 処理(37°C, 10min)にて単一細胞とし、種々の培地にて 1×10^4 個/cm², 37°C, 5%CO₂ の条件で培養を試みる。

2) 培養マウス角膜上皮細胞シート作成

まず3T3細胞をフィーダーレーヤーとして培養し、MMCにて処理する。ついでカルチャーインサート内に EDTA 処理にて上皮を除去した羊膜上で 7×10^4 個/cm², 37°C, 5%CO₂ の条件で培養する。4 日間 CnT-20 培地/CM 培地(1:1)/1% FBS にて培養後、約1週間 CM 培地/2% FBS 培地にて air lift をおこない重層化をはかる。

3) GFP発現マウス表皮細胞とマウス角膜上皮細胞の混合培養による角膜上皮様細胞誘導の試み

K12-Cre-ZEG マウスより分離したマウス表皮細胞を、無血清培地で培養し、野生型マウスより得た角膜上皮細胞と 1:1 で混和して培養する。その緩和した培養細胞をプラスチック、羊膜上に播種し、Ca を添加した無血清培地で培養を行った後、GFP の発現を蛍光顕微鏡で確認する。

4) GFP 発現マウス表皮細胞の角膜上皮様細胞誘導条件の検討

K12-Cre-ZEG マウスより分離したマウス表皮細胞を、無血清培地で培養し、野生型マウスより得た角膜上皮細胞と混和または単独にて培養する。その混和した培養細胞を野生型マウスより摘出した角膜実質上または、プラスチック、羊膜上に播種し、Ca を添加した無血清培地で培養を行った後、GFP の発現を蛍光顕微鏡で確認する。

4. 研究成果

1) マウス角膜上皮細胞培養法の確立

マウス角膜上皮細胞は通常ヒト角膜上皮細胞培養に用いられるSHEM培地、EpiLife培地では継代培養することはできなかった。そこで我々はCELLnTEC社の角膜上皮培養用培地を用いてマウス角膜上皮細胞の培養を行った。その結果、CnT-50 培地を用いることで少なくとも10継代まで形態的变化を起こさず培養可能であった。また、3継代目で初代培養の60倍に上る細胞数を得ることが可能となった。(図1) この細胞数は実験を行う上で十分な細胞数である。

2) 培養マウス角膜上皮細胞シート作成

マウス角膜上皮細胞をプラスチックディッシュ上で培養した場合は角膜上皮特異的に発現する

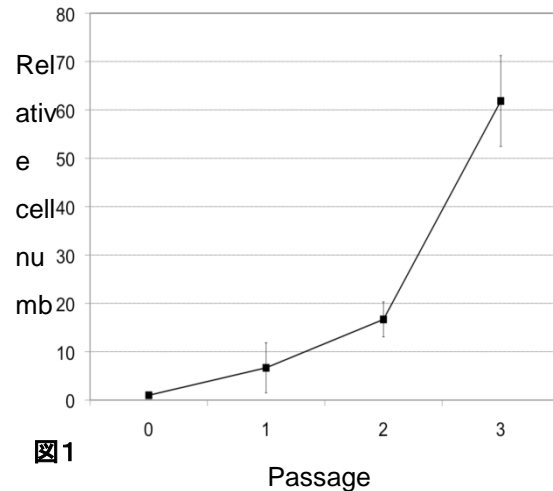
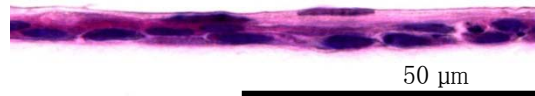


図1

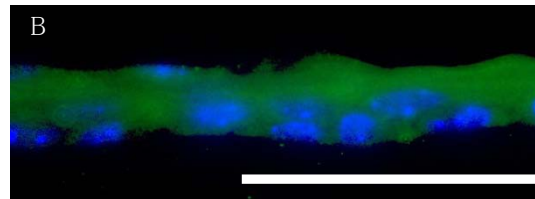
ケラチン12(K12)の発現は認めない。そこで、我々は、CnT-30 培地を用いて羊膜上でマウス角膜上皮細胞を培養し、Confluent 後に Ca を添加することによりマウス角膜上皮細胞を重層化することに成功した。この重層化させたマウス角膜上皮細胞はK12を発現することが確認され(図2)、その後の、皮膚上皮細胞の角膜上皮細胞への形質転換への実験の道筋が整った。

図2

A



B



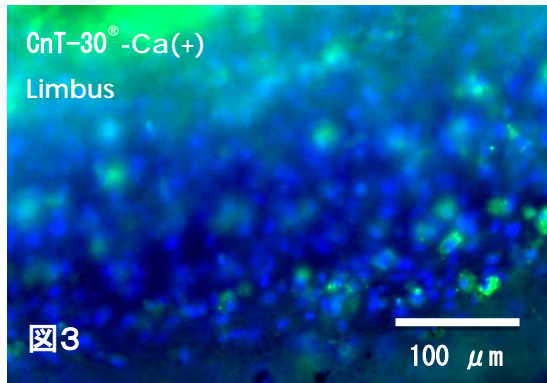
3) GFP発現マウス表皮細胞とマウス角膜上皮細胞の混合培養による角膜上皮様細胞誘導の試み

我々は、皮膚上皮細胞を角膜上皮細胞に形質転換させるには角膜上皮細胞との相互間作用が重要であると推測していた。そこで、**K12-Cre-ZEG** マウスより分離したマウス表皮細胞と野生型マウス角膜上皮細胞と 1:1 で混和して培養する。その緩和した培養細胞をプラスチック、羊膜上に播種し、Ca を添加した無血清培地で培養を行った。しかしながら、この条件では GFP の発現は認めなかった。

4) GFP 発現マウス表皮細胞の角膜上皮様細胞誘導条件の検討

そこで我々は、角膜実質(細胞)との相互作用が角膜上皮細胞に形質転換するのに重要を考え、

K12-Cre-ZEG マウス表皮細胞と野生型マウス角膜上皮細胞の混和または単独培養細胞を野生型マウスより摘出した角膜実質上にて培養を行った。その結果、GFPの発現を確認することができ、マウス皮膚上皮細胞が角膜上皮様細胞に形質転換したことが証明された。また、形質転換した細胞は角膜輪部付近において顕著に認められた。(図3)



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 9 件)

- ① Yoshioka R, Shiraishi A, Kobayashi T, Morita S, Hayashi Y, Higashiyama S, Ohashi Y. Corneal epithelial wound healing impaired in keratinocyte-specific HB-EGF-deficient mice in vivo and in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Nov;51(11):5630-9.
- ② Hayashi Y, Call MK, Liu CY, Hayashi M, Babcock G, Ohashi Y, Kao WW. Monoallelic expression of Krt12 gene during corneal-type epithelium differentiation of limbal stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Sep;51(9):4562-8.
- ③ Hayashi Y, Call MK, Chikama T, Liu H, Carlson EC, Sun Y, Pearlman E, Funderburgh JL, Babcock G, Liu CY, Ohashi Y, Kao WW. Lumican is required for neutrophil extravasation following corneal injury and wound healing. J Cell Sci. 2010 Sep 1;123(Pt 17):2987-95.
- ④ Hatou S, Yamada M, Akune Y, Mochizuki H, Shiraishi A, Joko T, Nishida T, Tsubota K. Role of insulin in regulation of Na⁺/K⁺-dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Aug;51(8):3935-42.
- ⑤ Hara Y, Shiraishi A, Ohashi Y. Hypoxia-altered signaling pathways of toll-like receptor 4 (TLR4) in human corneal epithelial cells. Mol Vis. 2009 Dec 2;15:2515-20.
- ⑥ Kobayashi T, Yoshioka R, Shiraishi A, Ohashi Y. New technique for culturing corneal epithelial cells of normal mice. Mol Vis. 2009 Aug 14;15:1589-93.
- ⑦ Hara Y, Shiraishi A, Kobayashi T, Kadota Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Ohashi Y. Alteration of TLR3 pathways by glucocorticoids may be responsible for immunosusceptibility of human corneal epithelial cells to viral infections. Mol Vis. 2009 May 8;15:937-48.
- ⑧ Hatou S, Yamada M, Mochizuki H, Shiraishi A, Joko T, Nishida T. The effects of dexamethasone on the Na,K-ATPase activity and pump function of corneal endothelial cells. Curr Eye Res. 2009 May;34(5):347-54.
- ⑨ Weng DY, Zhang Y, Hayashi Y, Kuan CY, Liu CY, Babcock G, Weng WL, Schwemberger S, Kao WW. Promiscuous recombination of LoxP alleles during gametogenesis in cornea Cre driver mice. Mol Vis. 2008 Mar 20;14:562-71.

[学会発表] (計 11 件)

- ① SHIRAISHI A, KOBAYASHI T, YANG L,

- SHIRAKATA Y, HASHIMOTO K, OHASHI Y. Epithelial sheets produced from cryopreserved human corneal epithelial cells using dermal fibroblast-embedded collagen gel. The 25th APAO Congress - A Joint Meeting of APAO/AAO, (北京、中国) 9/16-9/20, 2010.
- ② 小林剛、林康人、白石敦、大橋裕一. 培養マウス表皮細胞から角膜上皮様細胞への形質転換の検討. 第 114 回日本眼科学会総会, (名古屋)4/15-4/18, 2010.
- ③ 小林剛、白石敦、楊旅軍、白方裕司、橋本公二、大橋裕一. 凍結保存細胞によるヒト培養角膜上皮シートの作製. 第 34 回角膜カンファレンス・第 25 回日本角膜移植学会 (仙台)2/11-13, 2010.
- ④ R. Yoshioka, S. Morita, Y. Hayashi, T. Kobayashi, A. Shiraishi, S. Higashiyama, Y. Ohashi. Role of HB-EGF in Corneal Epithelial Wound healing. Korea Japan Joint Cornea Conference 2009 (京都)10/17-18, 2009.
- ⑤ 吉岡龍治, 白石 敦, 小林 剛, 森田真一, 林 康人, 東山繁樹, 大橋裕一. HB-EGF はマウス角膜上皮細胞の遊走と接着を促進する. 第 33 回角膜カンファレンス・第 25 回日本角膜移植学会, (大阪) 2/19-21, 2009.
- ⑥ 小林 剛, 白石 敦, 楊 旅軍, 白方裕司, 橋本公二, 大橋裕一. コラーゲンをを用いた三次元上皮培養におけるゲル内実質細胞の増殖因子発現パターン. 第 33 回角膜カンファレンス・第 25 回日本角膜移植学会, (大阪) 2/19-21, 2009.
- ⑦ 小林 剛, 白石 敦, 原 祐子, 門田裕子, 楊 旅軍, 白方裕司, 橋本公二, 大橋裕一. 眼科再生医療研究会ーコラーゲンをを用いた培養ヒト角膜上皮シートの作製とその評価. 第 62 回日本臨床眼科学会, (東京) 10/23-26, 2008.
- ⑧ R. Yoshioka, A. Shiraishi, T. Kobayashi, S. Morita, Y. Hayashi, S. Higashiyama, Y. Ohashi. Role of HB-EGF in corneal epithelial wound healing *in vivo* and *in vitro*. The Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting (Fort Lauderdale, USA) 4/27-5/1, 2008.
- ⑨ A. Shiraishi, T. Kobayashi, Y. Kadota, Y. Hara, Y. Shirakata, K. Hashimoto, Y. Ohashi. Cultivation of cornea epithelial cells on the collagen gel containing human dermal fibroblasts. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting (Fort Lauderdale, USA) 4/27-5/1, 2008.
- ⑩ 吉岡龍治, 白石 敦, 森田真一, 小林 剛, 林 康人, 東山繁樹, 大橋裕一. 角膜上皮創傷治癒機転における HB-EGF の役割ー *in vitro* での検討. 第 32 回角膜カンファレンス・第 24 回日本角膜移植学会, (東京) 2/28-3/1, 2008.
- ⑪ 林 康人, カオウインストン, リウチャイアン, 大橋裕一. 角膜上皮における幹細胞スイッチの可能性. 第 32 回角膜カンファレンス・第 24 回日本角膜移植学会, (東京) 2/28-3/1, 2008.
- [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◇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

白石 敦 (SHIRAIISHI ATSUSHI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座
准教授
研究者番号：90314963

(2) 研究分担者

小林 剛 (KOBAYASHI TAKESHI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号：70380285

(3) 連携研究者

大橋 裕一 (OHASHI YUICHI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00116005

白方 裕司 (SHIRAKATA YUJI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：50226320