

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3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791665

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関わる因子の検討

研究課題名（英文） Examination of factors involved in transdifferentiation from mouse epidermal cells to corneal epithelial-like cells

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：自己の表皮細胞から角膜上皮細胞への形質転換が可能となれば角膜再生医療は飛躍的に進歩すると考えられる。我々は、角膜特異的分化マーカーであるサイトケラチン 12 (K12) の発現により緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する Tg マウス (*K12Cre/ZEG* マウス) 由来の表皮細胞と野生型マウスの強角膜片を用いた器官培養を行い、マウス表皮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を示した。さらに免疫組織学的検討を行い、角膜周辺部（輪部）の細胞外基質または輪部由来液性因子が K12 の発現誘導または上皮細胞の分化運命決定に重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The corneal epithelial cells that transdifferentiated from auto-epidermal cells should be useful for the corneal regeneration. By using the epidermal cells from *K12Cre/ZEG* mouse, in which the GFP expression is occurred by *krt12* gene expression, we determined the differentiation potential of the mouse epidermal cells into corneal epithelial-like cells on the epithelial-denuded cornea/sclera graft. The cultured tissue was examined by immunofluorescence. Our results suggested that the mouse epidermal cells could transdifferentiated into the corneal epithelial-like cells specifically on the peripheral region of cornea, where the extracellular matrix or stromal-derived soluble factors might have a key role in the induction of K12 expression or cell fate determination of the corneal epithelia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：角膜上皮再生医療、表皮前駆細胞、角膜上皮細胞、形質転換、ケラチン 12、角膜実質、角膜輪部

1. 研究開始当初の背景

近年、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。一方で、利用できる細胞源が極めて限られていることが本法の問題点

の一つである。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、表皮由来幹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であると考えられる。

2. 研究の目的

角膜上皮細胞の特異的分化マーカーであるサイトケラチン 12 (K12) の発現により緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する Tg マウス (*K12Cre/ZEG* マウス) 由来の細胞を用いてマウス表皮細胞から角膜上皮様細胞への形質転換が可能であるかどうかを明らかにし、形質転換が可能な培養モデルを作製することを目的とした。さらに本培養系を用い、形質転換に関わる因子について検討を試みた。

3. 研究の方法

(1) マウス表皮細胞の培養

角膜上皮細胞の特異的分化マーカーである K12 の発現により GFP を発現する *K12Cre/ZEG* マウスを用いた。*K12Cre/ZEG* マウスでは *K12-IRES-Cre* (*K12Cre*) 遺伝子と loxP 因子で stop codon を挟んだ配列の下流に EGFP タンパクをコードする *ZEG* 遺伝子の組み合わせにより、*K12Cre* 遺伝子発現細胞に GFP を発現する。*K12Cre* 遺伝子、*ZEG* 遺伝子の両方を持つ *K12Cre/ZEG* マウスは角膜上皮で GFP を発現するが、*ZEG* 遺伝子だけを持つ *ZEG* マウスでは GFP の発現は見られない。生直後の *K12Cre/ZEG* マウスまたはマウスの背部より採取した皮膚からディスペルゼ処理およびトリプシン処理にて表皮細胞を回収した。表皮細胞は、I 型コラーゲンコート培養皿にて、表皮前駆細胞用無血清培地 (CnT-07, CELLnTEC) を用いて培養した。本法で培養した表皮細胞の K12、K10、K14、p63 mRNA の発現を RT-PCR により確認した。

(2) プラスチック上または羊膜上での形質転換の試み

K12Cre/ZEG マウスまたは *ZEG* マウスより単離培養した表皮細胞 (1st passage) を、野生型 (WT) マウスの角膜上皮細胞と 1 : 1 で混和した後、プラスチック上または上皮を除去した羊膜上に播種し (1x10⁵/cm²)、supplemented hormone epithelial medium (SHEM, 5%FBS) または Ca⁺⁺ を添加した角膜上皮用無血清培地 (CnT-30, 0.4 mM Ca⁺⁺, CELLnTEC) で 7 日間培養を行った。蛍光顕微鏡下で表皮由来細胞における GFP 発現の有無を確認した。

(3) マウス強角膜片を用いた器官培養での

形質転換

K12Cre/ZEG マウスまたは *ZEG* マウスより単離培養した表皮細胞 (1st passage) を、ディスペルゼ処理にて上皮を除去した野生型マウスの強角膜片上に播種し (1x10⁵/cm²)、supplemented hormone epithelial medium (SHEM, 5%FBS) または Ca⁺⁺ を添加した角膜上皮用無血清培地 (CnT-30, 0.4 mM Ca⁺⁺, CELLnTEC) で 7 日間培養を行った。蛍光顕微鏡下で表皮由来細胞における GFP 発現を確認した後、マウス強角膜片を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) にて固定し、組織学的、免疫組織学的検討を行った。

(4) 免疫組織学的検討

PFA 固定試料よりパラフィン切片 (5 μm) スライドを作製し、脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色または免疫染色を行った。免疫染色に用いる試料は、クエン酸緩衝液を用いてマイクロウェーブ (20 分間) にて抗原賦活化を行った。サイトケラチン (Multi) の染色には AE1/AE3 (mouse-monoclonal IgG, Vector)、K10 の染色には DE-K10 (mouse-monoclonal IgG, LabVision)、K12 の染色には mK12 (420-436) (抗マウス K12 ウサギ抗血清)、GFP の染色には DyLightTM549 標識抗 GFP 抗体 (goat-polyclonal IgG, ROCKLAND) を、それぞれ一次抗体に用いた。一次抗体反応後 (4oC, o/n)、サイトケラチン、K10、K12 の染色には FITC 標識二次抗体を反応させた。DAPI による核染色を行った後、蛍光顕微鏡にて蛍光および微分干渉像を取得し重ね合わせ画像を作成した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① *K12Cre/ZEG* マウスからの表皮前駆細胞の培養

CnT-07 培地で培養したマウス表皮細胞は、少なくとも 5 継代目まで継代培養が可能であり、上皮細胞様の形態を維持していた。また、*K12Cre/ZEG* マウス由来の表皮細胞と、コントロールとして用いた *ZEG* マウス由来の表皮細胞に形態的な差異は認めなかった。本法で培養した表皮細胞は K12 陰性、K10 陰性、K14 陽性、p63 陽性であり、重層扁平上皮の基底細胞と同等またはより未分化な細胞であることが示唆された。また、*K12Cre/ZEG* マウス由来の細胞において GFP の発現は認められなかった。

② プラスチック上または羊膜上での形質転換の試み

形質転換の最初の試みとして、正常角膜上皮細胞由来の刺激により表皮由来前駆細胞から角膜上皮様細胞への形質転換 (または分化

誘導)が起こる可能性を考え、培養表皮細胞と正常角膜上皮細胞との共培養を行った。分化を促進するため培地を、血清入り培地 (SHEM) または Ca 添加無血清培地 (CnT-30-Ca+) に変え、プラスチック上または羊膜上にて培養を行った。培養後、蛍光顕微鏡下での観察を行ったが、*K12Cre/ZEG* マウス表皮由来細胞における GFP の発現は認められなかった。このことから、角膜上皮細胞との共培養だけでは、角膜上皮様細胞への形質転換が起こらないことが示された。

③ マウス強角膜片を用いた器官培養での形質転換

K12Cre/ZEG マウス由来の表皮細胞を、上皮を除去したマウス (WT) 強角膜片上に播種し、血清入り培地 (SHEM) または Ca 添加無血清培地 (CnT-30-Ca+) で培養を行い、蛍光顕微鏡下での観察を行ったところ、いずれの培地を用いた場合にも *K12Cre/ZEG* マウス表皮由来の GFP 陽性細胞が認められた。一方で、*ZEG* マウス由来の表皮細胞を用いて同様に培養を行ったところ GFP の発現は認められなかったことから、*K12Cre/ZEG* マウス由来細胞で見られた GFP の発現は K12 の発現を示していると考えられた。また、この GFP の発現は角膜周辺部 (輪部) に集中して見られることが分かった (図 1)。

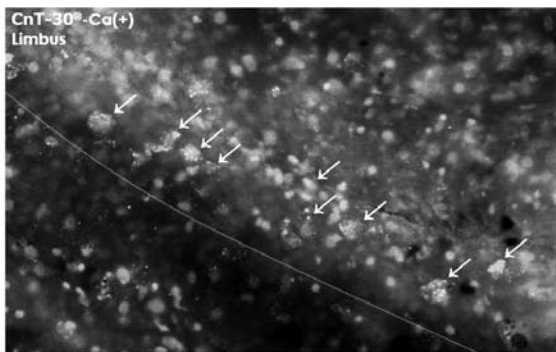


図1. マウス表皮細胞から角膜上皮様細胞への形質転換 *K12Cre/ZEG* マウス細胞の GFP 発現 (K12 発現) が角膜輪部上で認められる

④ 免疫組織学的検討

K12Cre/ZEG マウス由来表皮細胞とマウス (WT) 強角膜片を用いた培養組織に対し、免疫組織学的検討を行った結果、血清入り培地 (SHEM) または Ca 添加無血清培地 (CnT-30-Ca+) のいずれの培地を用いた場合にも、角膜周辺部から角膜中心部にかけてサイトケラチン (AE1/AE3) 陽性の上皮様細胞層が認められた。角膜中心部においては、表皮細胞の分化マーカーである K10 陽性細胞を認めたが、角膜上皮細胞の分化マーカーである K12 陽性細胞は見られなかった。一方で、角膜輪部上では K10 陽性細胞および K12 陽性細胞の両方が認められ、GFP 陽性細胞もまた

角膜輪部上に見られることが示された。以上の結果から、角膜周辺部 (輪部) には表皮未分化細胞を角膜上皮様細胞に形質転換 (または分化誘導) する因子が存在することが推測された。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

iPS 細胞を代表に再生医療の進歩には目覚ましいものがある。中でも角膜上皮の再生医療は他分野に先駆け臨床応用が行われ、良好な成績が報告されている。しかしながら、現状では allo の角膜上皮または自家口腔粘膜上皮を用いた培養上皮細胞移植にとどまり、臨床的効果は限定的である。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、自己の表皮細胞から形質転換させた角膜上皮細胞 (auto) を用いることが可能となれば、臨床的効果は飛躍的に改善されると推測される。

本研究では、表皮細胞から角膜上皮細胞への形質転換が可能であることを示すため、マウスモデルを用いた検討を行った。我々は、角膜上皮細胞の特異的分化マーカーであるサイトケラチン 12 (K12) の発現により緑色蛍光蛋白質 (GFP) が発現するマウス (*K12Cre/ZEG* マウス) を用いることで、マウス表皮細胞が、プラスチックディッシュ上、羊膜上の培養では形質転換せず、上皮を除去したマウス角膜実質上で培養した場合にのみ、角膜周辺部において特異的に角膜上皮様細胞への形質転換が行われることを見出した。また、形質転換細胞からの角膜上皮再建には、クリアーしなければならない幾つかの課題 (形質転換効率の向上、培養条件の最適化等) が存在するが、我々の *K12Cre/ZEG* マウスモデルは、real time に形質転換効率を確認することができるため、今後のさらなる検討に利用可能な非常に効率の良い動物モデルといえる。本モデルにより得られる知見は、形質転換細胞からの角膜上皮再建の実現のみならず、将来的な人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 等を用いた次世代の再生医療の実現に向けても有用であると考えられ、当分野において多大な貢献ができると期待できる。

サイトケラチン 12 (K12) は分化・成熟した角膜上皮細胞において特異的に発現することが知られ、角膜上皮細胞特有の分化マーカーとして広く用いられている。また、角膜周辺部 (角膜と結膜の境界部) は輪部と呼ばれ、角膜上皮の幹細胞が存在すると考えられており、正常角膜においては輪部基底層の細胞 (幹細胞および前駆細胞) に K12 の発現が認められないことが報告されている。このため、角膜輪部には幹細胞の未分化性の維持に関与する因子が存在すると考えられ、その因子

の同定が試みられてきた。一方で、本研究の成果は角膜輪部の細胞外基質または実質細胞由来の液性因子が細胞の分化運命決定に関与することを示唆するものである。本研究で示された形質転換または分化運命決定における角膜輪部の役割については、①上皮細胞が接着する基質が角膜輪部と中央部で異なり、細胞外基質により上皮細胞の分化が制御されている可能性；②角膜周辺部の実質細胞由来の液性因子（分泌タンパク質）が、上皮細胞のK12遺伝子の転写を開始させるシグナルの起点となる可能性；③角膜輪部の実質細胞と上皮細胞のクロストークが上皮細胞の形質転換（角膜上皮様細胞への分化）を促し、結果としてK12遺伝子の転写を開始させる可能性が考えられる。

我々は、実質由来分泌タンパク質の重要性について知るための予備的検討として、マウス強角膜片中の実質細胞をX線照射により不活化後、表皮細胞を播種する器官培養を試みた。本予備実験の結果、X線照射群において非照射群と同様に、角膜周辺部でK12の発現が認められた。しかしながら一方で、本実験で用いたX線量では実質細胞を完全に不活化できないことが他の予備実験により示された。従って、表皮由来細胞におけるK12の発現に実質細胞由来分泌タンパク質の関与が必要かどうかについて現時点で明確な答えは示されていない。

(3) 今後の展望

本研究において、マウス表皮細胞が角膜上皮様細胞へ形質転換し得ること、さらに角膜輪部の環境がK12の発現誘導に関与する可能性が示された。今後、臨床応用を目的として形質転換細胞から角膜上皮再建するには、形質転換の効率を高め、角膜上皮に類似した組織を構築する必要がある。そのため、より未分化な細胞群（表皮 side-population (sp) 細胞または幹細胞の特徴を持つ細胞等）をFACS等により分取し、形質転換が高率で行われる細胞源を選択する必要があると考えられる。また、同時に形質転換に関与する分泌タンパク質または細胞外基質について詳細な検討を行い、最終的には器官培養を必要としない培養法の確立が求められる。我々の目標は、重症角膜輪部機能不全症候群への臨床応用であるが、臨床においては詳細な組織学的検証は困難であり、動物モデルの確立は臨床応用を成功させるために欠かせない。本研究の成果により、ヒト臨床応用の基礎となる動物モデルを作製出来たことで、今後の角膜上皮再生医療の発展に大きく貢献するものと考えられる。

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4件）

1) Zhang Y, Kobayashi T, Hayashi Y, Yoshioka R, Shiraishi A, Shirasawa S, Higashiyama S, Ohashi Y.

Important Role of Epiregulin in Inflammatory Responses During Corneal Epithelial Wound Healing.

Invest Ophthalmol Vis Sci. in press (査読あり) 2012

2) Kobayashi T, Mito T, Watanabe N, Suzuki T, Shiraishi A, Ohashi Y.

Use of 5-cyano-2,3-ditoly-tetrazolium chloride (CTC) staining as Indicator of Biocidal Activity in Rapid Assay for Anti-Acanthamoeba Agents.

J Clin Microbiol. in press (査読あり) 2012

3) Kobayashi T, Gibbon L, Mito T, Shiraishi A, Uno T, Ohashi, Y.

Efficacy of commercial soft contact lens disinfectant solutions against Acanthamoeba.

Jpn J Ophthalmol. 55:547-557. 2011年9月 (査読あり)

4) 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. 51:5630-5639. 2010年11月 (査読あり)

〔学会発表〕（計6件）

1) 小林剛、林康人、渡辺成美、白石敦、大橋裕一

マウス表皮細胞から形質転換した角膜上皮細胞の免疫組織学的検討

第36回日本角膜学会総会（角膜カンファレンス2012）（東京）一般口演 2012年2月23日～25日

2) Zhang Y, Shiraishi A, Kobayashi T, Yoshioka R, Hayashi Y, Ohashi .

Role of epiregulin in corneal epithelial wound healing.

The 25th Asia-Pacific Association of Ophthalmology Meeting. (Beijing, China) 一般口演 2010年9月16日～20日

3) Kobayashi T, Shiraishi A, Yang L, Shirakata Y, Hashimoto K, Ohashi Y.

Epithelial sheets produced from cryopreserved human corneal epithelial cells using human dermal

fibroblast-embedded collagen gel.

XIX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (ISER 2010) (Montreal, QC, Canada) 一般口演 2010年7月18日～23日

4) Shiraishi A, Kobayashi T, Hayashi Y, Ohashi Y.

Murine Epidermal Cells Can be Transdifferentiated Into Corneal Epithelial-Like Cells in the Corneal Epithelial Environment.

The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2010 Annual Meeting.

(Fort Lauderdale, Florida, U.S.A.) 一般口演 2010年5月2日～6日

5) Yoshioka R, Shiraishi A, Kobayashi T, Noda E, Hayashi Y, Ohashi Y.

HB-EGF is Essential for Promotion of Cell Attachment and Proliferation in Corneal Wound Healing

The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2010 Annual Meeting.

(Fort Lauderdale, Florida, U.S.A.) 一般口演 2010年5月2日～6日

6) 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) 一般口演 2010年4月15日～18日

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし