

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592607

研究課題名(和文) マウス角膜上皮幹細胞マーカー同定の試み

研究課題名(英文) Identification of stem cell marker of mouse corneal epithelial cell

研究代表者

白石 敦 (Shiraishi, Atsushi)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90314963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：Keratin 12プロモーターによりGFPの発現するK12-Cre-ZEGマウスを用いた皮膚上皮から角膜上皮細胞への形質転換モデルにおける免疫染色では、角膜中央部ではK10を、角膜輪部ではK10、K12両方の発現が認められた。表皮Side population(Sp)細胞と角膜輪部実質細胞との共培養においてGFP陽性細胞が認められ、RT-PCRによりK12遺伝子の発現が確かめられた。マウス角膜中心部と輪部実質の線維芽細胞に対するトランスクリプトーム解析の結果、輪部実質細胞において、Wntシグナル関連因子mRNAの高発現が認められた。

研究成果の概要(英文)：We have established the mouse model for trans-differentiation from epidermal cell to corneal epithelial cell using K12-Cre-Zeg mouse in which green fluorescent protein (GFP) is expressed driven by Keratin 12 promoter. We first examined immunohistochemical staining, and results showed that K10 was expressed in the center of the cornea and K10 and K12 were expressed in the limbus of the cornea in the trans-differentiation model. When side population cells (Sp cells) isolated from epidermis were co-cultured with corneal keratocyte isolated from corneal limbus, GFP positive cells were detected. RT-PCR results also showed positive for K12. We then employed transcriptome analysis between the keratocytes isolated from central and limbal cornea. The results showed high expression of Wnt signal related mRNA were detected.

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：再生医療 角膜上皮 形質転換

1. 研究開始当初の背景

1) 再生医療の進歩は著しく iPS 細胞を使った臨床応用に向けての研究が盛んに進められている。角膜上皮細胞の再生医療は他分野に先駆けて臨床応用が行われ良好な臨床成績が報告されているにもかかわらず、角膜上皮細胞の幹細胞の特異的マーカーの同定はいまだなされていない。今後、iPS 細胞又は、他臓器の幹細胞を角膜上皮細胞に形質転換させ、臨床応用するうえで角膜上皮幹細胞マーカーの同定は必須である。

2) 我々は、マウス角膜上皮細胞の分離培養、角膜上皮細胞特異的マーカーである Keratin12 の発現、さらに、Keratin12 プロモーターにより GFP の発現する K12-Cre-ZEG マウスを作製している。そして、マウス皮膚上皮細胞の角膜上皮細胞への誘導実験において、角膜輪部上で特異的に形質転換が行われるという結果を得ている。

2. 研究の目的

K12-Cre-ZEG マウスを用いたマウス皮膚上皮細胞の角膜上皮細胞への形質転換モデルを用いて角膜上皮幹細胞マーカーの同定を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

1)免疫組織学的形質転換モデルの検討
皮膚および角膜に発現する各種ケラチンについて免疫組織学的に検討をとおこなった。
2)マウス表皮 Side population (sp) 細胞の単離
生直後の K12-Cre-ZEG マウスより採取した皮膚 dispase および, trypsin 処理にて単一細胞とし、Hoechst 33342 にて染色後、cell sorter (Beckman Coulter)により分離を行った。
3)表皮 sp 細胞と角膜輪部実質由来線維芽細胞との共培養による検討
K12Cre/ZEG マウスより表皮 sp 細胞を単離し、角膜輪部実質由来線維芽細胞との共培養にて角膜上皮様細胞への形質転換を試みた。
4)角膜中心部実質と輪部実質由来の線維芽細胞のトランスクリプトーム解析
マウス角膜中心部実質と輪部実質由来の線維芽細胞に対してトランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

1)免疫組織学的形質転換モデルの検討
角膜周辺から中央部にかけて上皮様細胞層を認め、これらの細胞はサイトケラチン (AE12/AE3)陽性であった。また、表皮特異的ケラチン K10 と角膜上皮特異的ケラチン K12 の免疫染色結果では、角膜中央部では K10 の発現を認めたが K12 の発現は認めず、角膜輪部では K10, K12 両方の発現が認められた。
2)マウス表皮 Side population (sp) 細胞の

単離

マウス (P0) の表皮細胞を CnT-07 (CELLnTEC)にてコンフルエントまで培養後トリプシン処置にて回収し、Hoechst 33342 で染色、FACSにより sp を分取した。また、この細胞群は ABC トランスポーター阻害剤 (ベラパミル) の添加により消失した。FACS で得られた sp 細胞の培養によりコロニーの形成が認められた。

3)表皮 sp 細胞と角膜輪部実質由来線維芽細胞との共培養による検討

表皮 sp 細胞と輪部線維芽細胞の共培養において GFP 陽性細胞が認められ、RT-PCR により K12 遺伝子の発現が確かめられた。

4)角膜中心部実質と輪部実質由来の線維芽細胞のトランスクリプトーム解析

輪部実質由来の線維芽細胞において、Sfrp2 を始めとする複数の Wnt シグナル関連因子 mRNA の高発現が認められることが分かった。Wnt シグナルは、種々の遺伝子発現を調節することが知られるシグナル伝達経路であり、輪部における上皮細胞の分化制御に関与している可能性がある。

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 14 件)

すべて査読あり

1. Hara Y, Shiraishi A, Yamaguchi M, Kawasaki S, Uno T, Ohashi Y. Evaluation of allergic conjunctivitis by thermography. *Ophthalmic Res.* 2014;51(3):161-6.
2. Joko T, Suzuki T, Inoue T, Kikuchi M, Hara Y, Shiraishi A, Ohashi Y. Coincidence of Varicella-Zoster Virus Anterior Uveitis in a Patient with Chandler's Syndrome. *Case Rep Ophthalmol.* 2013 Nov 28;4(3):274-8.
3. Tasaka Y, Minami N, Suzuki T, Kawasaki S, Zheng X, Shiraishi A, Uno T, Miyake K, Ohashi Y. New side-view imaging technique for observing posterior chamber structures during cataract surgery in porcine eyes. *BMC Ophthalmol.* 2013 Sep 23;13:47.
4. Zheng X, Goto T, Shiraishi A, Ohashi Y. In vitro efficacy of ocular surface lubricants against dehydration. *Cornea.* 2013 Sep;32(9):1260-4.
5. Joko T, Shiraishi A, Akune Y, Tokumaru S, Kobayashi T, Miyata K, Ohashi Y. Involvement of P38MAPK in human corneal endothelial cell migration induced by TGF-β(2). *Exp Eye Res.* 2013 Mar;108:23-32.
6. Mito T, Suzuki T, Kobayashi T,

- Zheng X, Hayashi Y, Shiraishi A, Ohashi Y. Effect of photodynamic therapy with methylene blue on Acanthamoeba in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Sep 19;53(10):6305-13.
7. Sakai E, Shiraishi A, Yamaguchi M, Ohta K, Ohashi Y. Blepharo-tensiometer: new eyelid pressure measurement system using tactile pressure sensor. Eye Contact Lens. 2012 Sep;38(5):326-30.
 8. Takano Y, Shi D, Shimizu A, Funayama T, Mashima Y, Yasuda N, Fukuchi T, Abe H, Ideta H, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nishida K, Nakazawa T, Fuse N. Association of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in Japanese subjects with primary open-angle, normal-tension, and exfoliation glaucoma. Am J Ophthalmol. 2012 Nov;154(5):825-832.e1.
 9. Miyamoto K, Kobayashi T, Hayashi Y, Zhang Y, Hara Y, Higashine M, Shiraishi A, Ohashi Y. Involvement of stem cell factor and c-kit in corneal wound healing in mice. Mol Vis. 2012;18:1505-15.
 10. 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. 2012 Apr 30;53(4):2414-23.
 11. Ikeda Y, Miyazaki D, Yakura K, Kawaguchi A, Ishikura R, Inoue Y, Mito T, Shiraishi A, Ohashi Y, Higaki S, Itahashi M, Fukuda M, Shimomura Y, Yagita K. Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of Acanthamoeba and prognosis determinants of Acanthamoeba keratitis. Ophthalmology. 2012 Jun;119(6):1111-9.
 12. Kobayashi T, Mito T, Watanabe N, Suzuki T, Shiraishi A, Ohashi Y. Use of 5-cyano-2,3-ditolyl-tetrazolium chloride staining as an indicator of biocidal activity in a rapid assay for anti-Acanthamoeba agents. J Clin Microbiol. 2012 May;50(5):1606-12.
 13. Ohta K, Shimamura I, Shiraishi A, Ohashi Y. Confocal microscopic observations of stromal keratocytes in soft and rigid contact lens wearers. Cornea. 2012 Jan;31(1):66-73.
 14. Hatou S, Shimmura S, Shimazaki J, Usui T, Amano S, Yokogawa H, Kobayashi A, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Inatomi T, Tsubota K. Mathematical projection model of visual loss due to fuchs corneal dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Oct 7;52(11):7888-93.
- 〔学会発表〕(計8件)
- 1) 池川泰民, 白石 敦, 大木元明義, 大橋裕一 渦状角膜症における生体共焦点顕微鏡所見の検討 第67回日本臨床眼科学会(横浜)10/31-11/3, 2013.
 - 2) 井上智之, 鈴木 崇, 原 祐子, 鄭 暁東, 林 康人, 山口昌彦, 白石 敦, 大橋裕一 エアオペイクス EX アクア治療的使用の実際フォーサム2013(大阪)7/12-14, 2013.
 - 3) 原 祐子, 鳥山浩二, 坂根由梨, 鈴木 崇, 鄭 暁東, 宇野敏彦, 白石 敦, 大橋裕一 高張食塩水を用いたポートレス・ドレナージ DSAEK の術後成績第66回日本臨床眼科学会(京都)10/25-28, 2012.
 - 4) 鄭 暁東, 布施昇男, 西田幸二, 井上幸次, 宮田和典, 木下 茂, 天野史郎, 大橋裕一 水疱性角膜症に対する角膜移植の多施設サーベランス: 病因と術式の検討 角膜カンファランス 2012(東京) 2/23-25, 2012.
 - 5) 小林 剛, 林 康人, 渡部成美, 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様細胞の免疫組織学的検討 角膜カンファランス 2012(東京) 2/23-25, 2012.
 - 6) 張 媛, 林 康人, 小林 剛, 吉岡龍治, 白石 敦, 大橋裕一 角膜上皮創傷治癒過程における epiregulin の役割 角膜カンファランス 2012(東京) 2/23-25, 2012.
 - 7) 渡部成美, 小林 剛, 白石 敦, 大橋裕一 プロスタグランジン系点眼液の培養眼表面細胞毒性の比較試験 角膜カンファランス 2012(東京) 2/23-25, 2012.
 - 8) Oka N, Shiraishi A, Joko T, Ohashi Y.

In vivo confocal microscopic evaluation of corneal subbasal nerves in patients with diabetic retinopathy. European Society of Ophthalmology (Geneva, Switzerland) 6/4-6/7, 2011.

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

白石 敦 (Shiraishi, Atsushi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・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

白方 裕司 (Shirakata, Yuji)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：50226320

(3)連携研究者

なし