

令和 2 年 3 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20259

研究課題名(和文)角膜内皮前駆細胞を用いた角膜内皮分化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of corneal endothelial differentiatl mechanism using corneal endothelial progenitor cells.

研究代表者

原 進 (Hara, Susumu)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：00536956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞や体性幹細胞を用いた角膜内皮細胞を用いた再生医療において、その発生および分化メカニズムを明らかにすることは重要である。我々は、新規に同定した角膜内皮前駆細胞を用いて、角膜内皮分化機構の分子メカニズムの解明を試みた。その結果、角膜内皮細胞に高発現する転写因子の一つ TFAP2B がその一因となりうることを分子生物学的に明らかにした。これらのことは角膜内皮の再生医療に重要な知見をもたらすと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、多能性幹細胞を用いた角膜内皮細胞の誘導法において、角膜内皮細胞特異的細胞表面マーカー ZP4 を用いて誘導角膜内皮細胞の単離及び純化が可能であり、さらに、ZP4 は TFAP2B によって転写制御されることが明らかになった。また、これまで、明らかにされていなかった角膜内皮疾患感受性遺伝子である COL8A2 の転写制御機構も明らかにすることができた。これらのことから、多能性幹細胞を用いた角膜内皮の再生医療の分野だけでなく、角膜内皮疾患との関連性について重要な知見が得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated the expression of the AP2-family beginning at E11.5 of mouse development and the subsequent distribution of AP-2beta in vivo and in vitro CECs. AP-2beta was expressed from E11.5 during mouse development. AP-2beta knockdown in HCECs decreased expression of COL8A2 and ZP4, suggesting AP-2beta directly regulates their expression. HCECs highly expressing ZP4 also had high expression of AP-2beta and COL8A2. The results show that AP-2beta is essential for transcriptional activation of the corneal endothelial-specific genes.

研究分野：眼科、再生医療、分子生物学

キーワード：角膜内皮 転写因子 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

角膜内皮は角膜の前房水側に位置し、ポンプ機能とバリア機能によって角膜実質の水分を排出する組織である。通常ヒトの角膜内皮細胞密度は 3000cells/mm<sup>2</sup> 程度であるが、500cells/mm<sup>2</sup> 程度にまで低下すると水疱性角膜症を発症し、角膜混濁が生じる。しかし、ヒト角膜内皮細胞は生体内においては増殖しないため、一度損傷を受けると密度が著しく低下してしまい、その根本的な治療は移植以外に方法がない。従来、水疱性角膜症等の難治性角膜内皮疾患に関しては、全層角膜移植術が行われているが、ドナー不足と移植後の拒絶反応という問題がある。拒絶反応を軽減するために、ヒト輸入アイバンク角膜の角膜内皮を疾患眼に移植する方法 (DSEAK、DMEK 等) も行われているが、ドナー不足の問題を解決には至っていない。我々の研究グループは、高い増殖能を有する新規角膜内皮前駆細胞の単離・培養に成功した (Hara S, et al., Stem Cells and Development, 2014.)。この角膜内皮前駆細胞は無血清培養下で研究用輸入角膜 1 眼より最大 10<sup>8</sup> 細胞まで増殖が可能であった。この細胞は神経堤マーカー (p75, SOX9, AP2b) および眼周囲間充織マーカー (PITX2, FOXC1, FOXC2) を発現した。p75 陽性細胞は角膜内皮組織中に 7.0% 存在し、これらの細胞を FACS を用いて単離・培養により増殖能を有する細胞群が認められた。生体角膜内皮組織から角膜内皮幹・前駆細胞を FACS を用いて分取した報告は本報が初めてであった。さらに角膜内皮分化培地により成熟角膜内皮へと分化誘導すると角膜内皮特有の多角形 (主に六角形) の細胞形態をもつ細胞が認められた。この分化細胞は、角膜内皮機能マーカーである Na,K-ATPase、ZO-1 および N-カドヘリンを発現し、角膜内皮マーカーとして報告のあるタイプ VIII コラーゲンの発現を亢進していることが明らかになった。生理機能解析では、Ussing Chamber を用いた *in vitro* 機能評価において培養角膜内皮細胞と同程度のポンプ機能を有し、さらに家兎角膜内皮欠損モデルへの移植実験において角膜浮腫を抑制する効果が認められた。これらのことより、新規角膜内皮前駆細胞は角膜内皮発生過程の解明に重要なツールであり、さらに角膜内皮再生治療に有用な細胞源の一つとなりうる事が考えられた。

## 2. 研究の目的

角膜内皮は、神経堤に由来する眼周囲間充織より発生すると考えられているが、ヒト角膜内皮の最終分化に必要な因子は明らかではない。本研究では新規に単離した角膜内皮前駆細胞を用いて成熟角膜内皮細胞への成熟分化に必須な因子の同定を目的とした。(1) 角膜内皮前駆細胞の分化指向性に関する転写因子の解析、(2) 角膜内皮前駆細胞から成熟角膜内皮細胞への分化誘導に必

要な細胞外シグナルの同定を試みた角膜内皮への分化機構を明らかにすることは角膜内皮発生において重要な知見をもたらすと考えられる。

## 3. 研究の方法

新規角膜内皮前駆細胞から角膜内皮細胞への分化機構を転写因子及び分化誘導因子の探索を目的とする。

(1) 角膜内皮前駆細胞から成熟角膜内皮細胞への分化誘導に必要な因子の同定

角膜内皮前駆細胞がマウス角膜内皮発生においてどのステップに相当するのか確認し、分化指向性に寄与する転写因子の標的遺伝子及び調節機構を探る。

(2) 角膜内皮前駆細胞の分化指向性に関する転写因子の解析

角膜内皮前駆細胞に発現する転写因子の発現抑制を行い、分化誘導に関するかどうか検討する。

角膜内皮発生に必要といわれているシグナルに注目して、角膜内皮分化マーカーを指標として角膜内皮分化に必要な候補化合物を選出し、その分化誘導機構を検証する。

## 4. 研究成果

(1) 角膜内皮前駆細胞から成熟角膜内皮細胞への分化誘導に必要なシグナルの同定

角膜内皮前駆細胞を用いて成熟角膜内皮にどのような液性因子が必要なのか検討するために分化誘導開始時から、各細胞内シグナルに対する低分子化合物 (LOPAC1280) を添加し、分化マーカー (SLC4A11、COL8A2 および ZP4) を指標とした。しかしながら、これらの角膜内皮分化マーカーの発現に対して有意な差は認められず、他のライブラリーを用いる必要性が考えられた。

(2) 角膜内皮前駆細胞の分化指向性に関する転写因子の解析

角膜内皮細胞において発現する転写因子を網羅的発現データより抽出し (Chen et al., Hum Mol Genet, 2012) それらの遺伝子に対する siRNA を用いて標的遺伝子を発現抑制し、角膜内皮分化マーカー (SLC4A11、COL8A2 および ZP4) を指標として検討した。その結果、AP-2b を発現抑制すると COL8A2 および ZP4 の発現低下が mRNA レベル・タンパク質レベルで認められた (図 1)。ZP4 は本研究において角膜内皮特異的細胞表面マーカーとして同定した (Yoshihara M, Hara S et al., PLoS ONE, 2014)。

角膜内皮に発現する AP-2 ファミリーの発現プロファイルを検討するために RT-PCR 法によって確認すると AP-2b のみが発現することがわかった (図 2)。

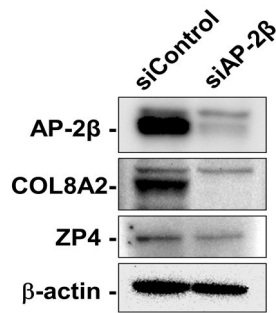


図 1. RNA 干渉法による AP-2b 発現抑制

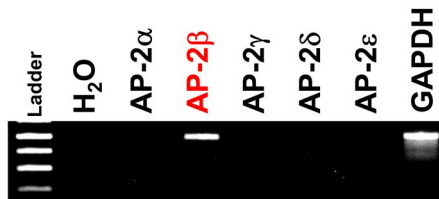


図 2. AP-2 ファミリーの発現プロファイル

AP-2b の角膜内皮組織での発現を whole-mount 免疫染色法によって検討した。その結果、AP-2b は角膜内皮組織のほとんどの細胞に発現し、角膜内皮周辺部(特に transition zone との近接部分)により強い発現が認められた(図 3)。

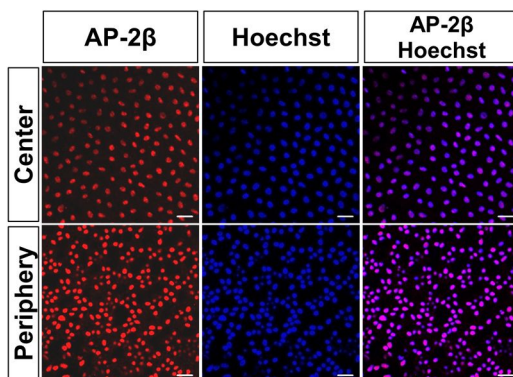


図 3. ヒト角膜内皮細胞での AP-2b 発現

マウス胎児を用いて AP-2b の各発生段階での発現を検討すると AP-2b は E10.5-11.5 に最も強く発現し、それ以降も成体マウスの角膜内皮に至るまで発現することが分かった。

AP-2b が COL8A2 および ZP4 遺伝子に対してどのように転写調節するか検討するために、プロモーター解析を実施した。その結果、COL8A2 および ZP4 遺伝子の転写開始点の上流に AP-2b の結合予測配列を抽出した。その結合予測部位に対して変異を導入したベクターを構築し、ルシフェラーゼアッセイを行うと野生型よりも活性が低下した。次に、クロマチン免疫沈降法によって AP-2b がその予測部位に結合することを半定量 PCR によって確認した(図 4)。

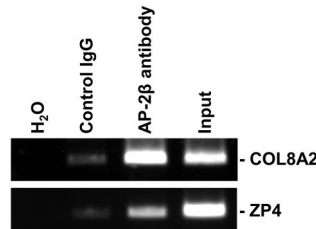


図 4. AP-2b に対するクロマチン免疫沈降

次に角膜内皮特異的のマーカ-ZP4 が細胞表面マーカーであることを利用して FACS によって培養角膜内皮細胞に対して抗 ZP4 抗体を用いた FACS を試みた。その結果、培養角膜内皮細胞は、ZP4 陽性細胞群および ZP4 陰性細胞群に分別可能であり、ZP4 陽性細胞群は、AP-2b および COL8A2 を高く発現することが明らかになった(図 5)。

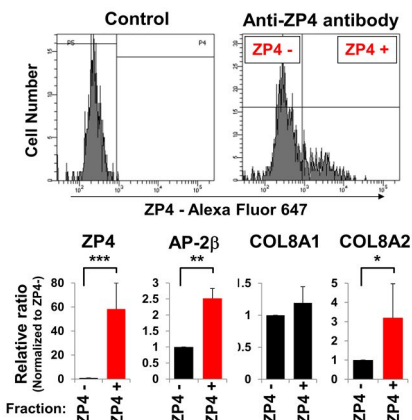


図 5. 抗 ZP4 抗体を用いた FACS 解析

これらのことから、転写因子 AP-2b は、角膜内皮分化マーカーである COL8A2 および ZP4 の遺伝子を転写調節できることが明らかになった。また、最近の報告では、AP-2b の遺伝子改変マウスを用いた解析において、AP-2b が角膜内皮の正常な発生に必須であることが報告された(Chen et al., IOVS, 2016 and Vanessa et al., Dis Model Mech., 2016)。

本研究課題によって、角膜内皮に対する細胞を用いた再生医療において、角膜内皮特異的細胞表面マーカーを転写促進可能な転写因子が同定されたことにより、より純度が高い培養角膜内皮細胞を供給できることが示唆された。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 原 進、川崎 諭、吉原 正仁、辻川元

一、西田幸二、転写因子 **AP-2beta** における角膜内皮マーカーの発現制御、第 **16** 回日本再生医療学会総会、**2017** 年 **3** 月 **7** 日、仙台国際会議場（宮城・仙台市）

2. 原 進、川崎 諭、吉原 正仁、辻川元一、西田幸二、角膜内皮における転写因子 **AP-2beta** の解析、第 **41** 回日本角膜学会総会・第 **33** 回日本角膜移植学会、**2017** 年 **2** 月 **16** 日、アクロス福岡（福岡・福岡市）

3. 吉原 正仁、大宮 寛子 原 進 川崎 諭、林崎 良英、伊藤 昌可、川路 英哉、辻川 元一、西田 幸二、**FANTOM5** データベースを活用した新規角膜内皮細胞特異的マーカーの同定、第 **15** 回日本再生医療学会総会、**2016** 年 **3** 月 **17** 日、大阪国際会議場（大阪・大阪市）

4. 木村 恵利香、原 進、川崎 諭、林 竜平、谷脇 勇輝、高田 裕香、辻川 元一、西田 幸二、角膜内皮・角膜内皮前駆細胞の表面マーカーの探索、第 **15** 回日本再生医療学会総会、**2016** 年 **3** 月 **18** 日、大阪国際会議場（大阪・大阪市）

5. 原 進、新規角膜内皮前駆細胞の解析、第 **69** 回日本臨床眼科学会、**2015** 年 **10** 月 **22** 日、名古屋国際会議場（愛知・名古屋市）

〔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

原 進 (HARA, Susumu)  
大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教  
研究者番号：00536956