

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07026

研究課題名(和文)ドキシサイクリン誘導性SV40T抗原導入細胞を用いた結膜三次元培養モデルの作製

研究課題名(英文)Development of Doxycycline-Dependent Inducible SV40LT-Immortalized Human Conjunctival Epithelial Cell Line in a three-dimensional culture and Its Characterization

研究代表者

三谷 亜里沙(Mitani, Arisa)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60648096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：結膜上皮は、眼表面のバリア形成、また涙液の安定化において重要な役割を担うと考えられる。しかし、適切な結膜上皮培養細胞が存在しないために、詳細な検討が困難な現状がある。本研究では、ドキシサイクリンの有無でSV40大型T抗原(SV40LT)遺伝子の発現が制御できる誘導性SV40LT導入不死化ヒト結膜上皮細胞を作製し、さらに、上皮細胞と実質細胞を3次元で共培養する3次元培養システムを応用することにより、結膜上皮特有の分化マーカーを保持した重層結膜上皮細胞が確認できた。今後培養条件の精度を上げることで、長期間増殖可能でかつ結膜上皮の特徴・分化能を保持した培養結膜モデルの構築が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Conjunctival epithelium is believed to play an important role in barrier formation and stabilization of tears on the ocular surface. However, due to the absence of suitable conjunctival epithelial cultured cells, detailed examination is difficult. In this study, a human conjunctival epithelial cell line capable of controlling the expression of SV40 large T antigen (SV40LT) gene was prepared according to the presence or absence of doxycycline. In addition, three-dimensional culture was carried out in which epithelial cells and parenchymal cells could be co-cultured in three dimensions, and multilayered conjunctival epithelial cells with markers characteristic of conjunctival epithelium could be confirmed. It is considered that it is possible to construct a culture conjunctival model that can maintain the characteristic differentiation potential of conjunctival epithelium in the long term in the future.

研究分野：眼科学

キーワード：不死化結膜上皮細胞株 三次元培養 ムチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

結膜上皮は、ムチン分泌による粘膜バリア形成、イオンチャネル・ポンプの発現による涙液量コントロールの両面において重要な役割を担うと考えられ、臨床的観点からもその重要性が指摘されている。しかし、適切な結膜上皮培養細胞が存在しないために、詳細な検討が困難な現状がある。今後、長期間増殖可能でかつ結膜上皮の特徴・分化能を保持した細胞株の樹立が可能になれば、結膜上皮細胞の分子細胞レベルでのメカニズムや病態解明、治療薬開発が飛躍的に進むことが期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、ドキシサイクリン (Dox) の有無で SV40 大型 T 抗原 (SV40LT) 遺伝子の発現が制御できる誘導性 SV40LT 導入不死化ヒト結膜上皮細胞の作製を行い、その増殖能について検討した。さらに、上皮細胞と実質細胞を 3 次元で共培養する 3 次元培養システムを結膜上皮の培養に応用し、結膜上皮特有の分化能を保持しているかについて明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト不死化結膜上皮細胞 (iHCjEC)

ヒト結膜上皮細胞は、結膜弛緩症の術中に切除された余剰組織を用い (研究計画は愛媛大学倫理審査委員会にて承認済み)、Dox 誘導性 SV40LT 遺伝子を導入し、不死化を誘導した。Dox 誘導性 SV40LT 遺伝子は、SV40LT の上流にテトラサイクリン応答因子 (TRE) を導入し、Dox 存在下で TRE の転写を誘導するリバーステトラサイクリ

ン制御性トランス活性化因子 (rtTA) を組み込むことによって Dox の有無で SV40LT 遺伝子の発現を制御できるようにしたものを用いた (Tet-On システム)。遺伝子の導入にはレンチウイルスベクターを用い、結膜上皮細胞の不死化を行うために、細胞をウイルス液 ( $1.5 \times 10^6$  TU/100  $\mu$ l) と CnT-Prime 培地 (CELLnTEC) で懸濁し、6 well 培養プレートの 1 well に移し 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> で 3 日間培養、その後 Dox (1  $\mu$ M) を含む培地に交換した。トリプシンへの感受性の違いを利用して繊維芽細胞を除くために、1ml の TrypLE Express (Invitrogen) で 37  $^{\circ}$ C、8 分処理し、接着の剥がれた細胞を取り除いた。プラスチックインキュベーター含有培地を用い、遺伝子導入が成功した細胞を選択した後、Dox を含む CnT-Prime 2D Diff (CELLnTEC) で維持培養を行った。

#### (2) 細胞の評価

Dox 存在下と非存在下における SV40LT の発現をウエスタンブロット法で調べた。抗 SV40LT 抗体 (Pab108, Santa Cruz) または抗  $\beta$ -actin 抗体 (AC-15, Sigma-Aldrich) を使用し、2 次抗体 (HRP 標識抗マウス IgG 抗体、VECTOR) を反応させた。発光には Amersham ECL plus (GE Healthcare) を用い、Molecular Imager<sup>®</sup> ChemiDoc<sup>™</sup> XRS System (Bio-RAD) で解析した。

細胞の増殖能を調べるため、iHCjEC を 6 well 培養プレートに  $1 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> の密度で播種し、Dox を含む CnT-Prime 2D Diff 培地で培養、サブコンフルエントで継

代を行った。細胞数は血球計算板で計測し、増殖曲線を作製した。

iHCjEC をサブコンフルエント (12 継代目) で Dox 不含有無血清培地 (Dox<sup>-</sup>) または血清 (5%) 入り培地 (Dox<sup>+</sup> / FBS<sup>+</sup>) に交換し、5 日間培養した。結膜上皮特異的マーカー (サイトケラチン 13) および結膜上皮分化マーカーとなるムチン (MUC1、MUC4、MUC16) の発現をリアルタイム PCR により検討した。

### (3) 三次元培養

ヒト不死化結膜上皮細胞 (iHCjEC) から培養結膜上皮モデルの構築を行うため、コラーゲンをを用いた結膜線維芽細胞との三次元共培養を施行した。三次元培養にあたっては、ウサギ結膜実質由来線維芽細胞をコラーゲンゲル内で培養し、ゲル上にて上皮細胞を培養した。線維芽細胞はウサギ結膜実質のコラーゲナーゼ処理により回収したプライマリーカルチャーを用い、 $1 \times 10^5/\text{ml}$  の密度でコラーゲン (終濃度 0.8 mg/ml、新田ゼラチン) と混和し、コラーゲンゲルを作製。コラーゲンゲル上に iHCjEC を播種し、上皮の分化促進を試みた。三次元培養で 5 日間の培養後、パラホルムアルデヒド (PFA) にて固定を行った。コラーゲンは I 型または IV 型、また両者を混合して用い、培養液は、角膜上皮三次元培養にて使用している分化培地 (Kobayashi, et al. *Exp Eye Res.* 2015. 135:109-17.) を基礎として、血清添加の違いによる影響について比較検討した。PFA 固定サンプルを用いて CK13 の発現に対する免疫組織化学的検討を行うと共に、ム

チンの分化を KL-6 の免疫染色により検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

1. ヒト不死化結膜上皮細胞 (iHCjEC) における Dox 有無での SV40LT 発現変化  
Western Blotting 法にて、iHCjEC の Dox 有無による発現変化を検討したところ、Dox 存在下では SV40LT の発現が認められ、Dox 非存在下では SV40LT の発現が経時的に減少した。(図 1)

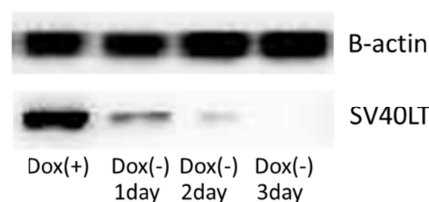


図 1. Western Blotting 法を用いた iHCjEC の Dox 有無による発現変化

### 2. iHCjEC の増殖能

Dox 存在下では iHCjEC は高い増殖能を長期間維持できることが確認でき、現時点で少なくとも 25 継代以上の培養が可能であった。細胞増殖曲線を図 2 に示す。

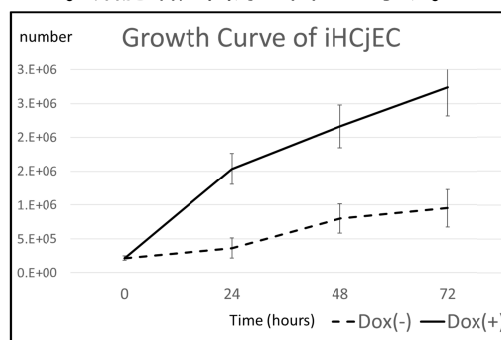


図 2. iHCjEC の増殖曲線

### 3. リアルタイム PCR

Dox<sup>-</sup> 群では Dox<sup>+</sup> 群に比べ、CK13、MUC4、MUC16 の発現が亢進し、Dox<sup>+</sup> /

FBS + 群では、CK13、MUC1、MUC 4、MUC16 の発現亢進が認められた。( 図 3 )

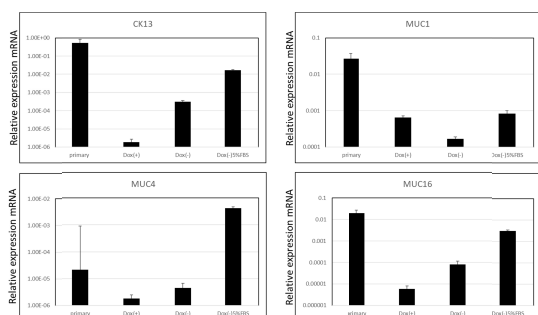


図 3. リアルタイム PCR によるサイトケラチン 13 および膜型ムチン(MUC1、MUC4、MUC16)の発現変化

#### 4 . 三次元培養

全ての培養条件において iHCjEC の重層化が確認できた。Dox + 群では CK13 の発現が認められなかったのに対して、Dox 群および Dox / FBS + 群では発現が確認された。KL-6 は Dox の有無に関わらず発現を認めた。( 図 4 )

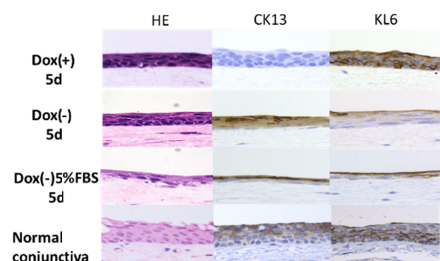


図 4. 三次元培養での iHCjEC のサイトケラチン 13、KL-6 発現変化

( 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

ドライアイは、涙液の減少や質的变化によって涙液層が不安定になり、眼精疲労や実用視力の低下など生活の質を著しく低下させる。このインターネット社会のなか、VDT(Visual Display Terminals) 作業時間

は増える一方であり、ドライアイ患者数は年々増加、有病者は 2200 万人程度存在すると推定され、決して軽視できない疾患となっている。近年、ムチンによる粘膜バリアの役割が明らかにされつつあり、ドライアイの臨床的観点からもその重要性が指摘されている( 稲 富. あたらしい眼科. 2015. 32:251-2. )。眼表面における膜型ムチンは MUC1、MUC4、MUC16、MUC20 が知られ、結膜杯細胞は分泌型ムチンである MUC5AC を産生、分泌する。近年、胃腸薬として市販されていたレバミピドがドライアイ点眼薬として市販され、一定の効果を示しているものの、そのメカニズムについては不明な点が多い。その問題点として、結膜の分子細胞レベルでのメカニズムを検討するための適切な培養細胞が存在しないために、詳細な検討が不可能であった点があげられる。一般に、正常結膜上皮細胞の培養は困難であり( Rivas, et al. Arch Soc Esp Ophthalmol. 2014. 89:10-6. )、これまでヒトまたはラット結膜上皮細胞の不死化が試みられ、これら不死化細胞株を用いた研究成果が報告されてきた( Gipson, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003. 44:2496-506., O ' Sullivan, et al. Exp Eye Res. 2007. 84:323-31. )。細胞の不死化には Simian virus 40-大型 T 抗原(SV40LT) 遺伝子等の導入による腫瘍抑制因子 p53 や retinoblastoma (Rb) 遺伝子の抑制による細胞増殖活性化が用いられてきたが、SV40LT を導入した細胞は、高い増殖活性を長期間維持することが出来る一方、細胞が本来有している分化形質を消失することが認められている( 村田. 2006. 薬学雑誌. 126:265-72 )。本研究では Tet-On システ

ムを応用し、ドキシサイクリン(Dox)の有無で simian virus 40 大型 T 抗原(SV40LT) 遺伝子の発現が制御できる誘導性 SV40LT 導入不死化ヒト結膜上皮細胞を作製に成功した。この不死化培養細胞では、Dox 存在下で SV40LT が誘導され長期間の培養が可能となる一方、Dox 非存在下ではその発現が抑制され、正常結膜上皮と同様の分化形質を発現することが期待できる。本細胞は、Dox 存在下で少なくとも 25 継代以上培養可能であり、Dox 非存在下で SV40LT の発現が抑制されることが確認された。また我々の教室では角膜上皮の基礎研究において 3 次元培養システムを用いており、上皮細胞と実質細胞を 3 次元で共培養することで、それぞれの細胞が生体と類似した挙動を示すことを証明してきた。(Kobayashi, et al. Exp Eye Res. 2015. 135:109-17.) この技術を結膜上皮の培養に応用することにより正常結膜に類似した環境で分化誘導を行ったところ、重層化した結膜上皮細胞が得られ、また Dox 非存在下では、結膜上皮細胞の分化マーカーであるサイトケラチン(CK)13 の発現が亢進し、SV40LT 発現抑制下において、成熟した結膜上皮細胞への分化が促進されると推測された。さらに、ムチン(KL-6)の発現も確認でき、誘導性 SV40LT 導入不死化結膜上皮細胞は、高い増殖能と共に分化能を有することから、機能的に分化した結膜上皮細胞を安定して用いる実験が可能になると考えられる。

### (3) 今後の展望

本研究では、ドキシサイクリン誘導性 SV40LT 遺伝子の導入による細胞の不死

化を行った。これにより、一般的な不死化細胞株ではしばしば分化形質の消失を認めるのに対し、SV40LT の発現を抑制出来るようにすることで分化誘導が可能になり得ること示した。さらに、三次元培養を結膜上皮細胞の培養に応用し、正常結膜に類似した環境で分化誘導を行い、必要な因子についての更なる検討を加えることで、杯細胞を含む培養結膜上皮モデルの構築を試みたい。過去に報告された不死化結膜上皮細胞株において、安定的な杯細胞の培養または杯細胞への分化が可能であった例はないことから、本研究で作製する不死化細胞および培養法は、結膜の基礎研究を発展させると考えられ、ドライアイにとどまらず、結膜疾患の病態解明、新規治療薬の開発に大きく貢献することが期待できる。

### 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0件)

[学会発表](計2件)

三谷 亜里沙 小林剛 林康人 高平尚子  
白石敦 大橋裕一  
ドキシサイクリン誘導性 SV40 大型 T 抗原導入ヒト結膜上皮細胞の作製と評価  
第 41 回日本角膜学会総会(アクロス福岡、福岡県福岡市)一般講演 2017 年 2 月 16 日 - 2017 年 2 月 18 日

三谷 亜里沙 小林剛 林康人 高平尚子  
白石敦 大橋裕一  
誘導性不死化ヒト結膜上皮細胞の三次元培

養での検討

第 42 回日本角膜学会総会( グランドプリンスホテル広島、広島県広島市 ) 一般講演

2017 年 2 月 15 日 - 2017 年 2 月 17 日

〔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 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

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

三谷 亜里沙(Mitani, Arisa)

愛媛大学・医学部附属病院

医員

研究者番号 : 6 0 6 4 8 0 9 6

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし