

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20308

研究課題名(和文) ヒト角膜上皮細胞の特異性維持に関わる転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Transcriptional landscape of corneal epithelial cell identity

研究代表者

中川 卓 (Nakagawa, Suguru)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：60772035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト角膜輪部上皮細胞に対して次世代シーケンサー HiSeq2500 (イルミナ社)を用いたトランスクリプトーム解析とエピゲノム解析を行った。エンハンサー領域と眼に重要とされている転写因子の結合領域をゲノムワイドに同定した。角膜上皮細胞において、眼に重要とされている転写因子と重層上皮の分化・維持に関わる転写因子等が角膜に特徴的なエンハンサー領域に結合していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

角膜は無血管・透明であり、高いバリア機能を持つ一方、隣接する結膜は、血管に富んだ不透明な組織である。角膜上皮幹細胞が障害される角膜輪部機能不全は、周囲より結膜血管組織の侵入により失明する予後の不良の疾患であり、難治である。しかし、角膜上皮細胞の特異性維持に関与する転写制御ネットワークはこれまで不明であった。

本研究において、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドなエピゲノム解析により角膜上皮細胞の特異性維持に関与する転写制御プログラムの全体像が明らかとなった。角膜輪部機能不全の新たな治療法を創出する基盤になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed transcriptome and epigenome analysis using next generation sequencer (Illumina HiSeq 2500). We identified genome-wide active enhancers and eye-related transcription factor binding sites. Eye-related transcription factor and stratified epithelium-related transcription factors act together to maintain cornea-specific phenotype around corneal selective enhancers.

研究分野：角膜

キーワード：角膜 エピゲノム 次世代シーケンサー 転写因子 細胞運命制御 リプログラミング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

角膜は眼球の最前面に位置し、無血管で透明である。角膜上皮、角膜実質、角膜内皮の三層から成る。角膜上皮は、非角化重層扁平上皮であり、角膜輪部に位置する角膜上皮幹細胞が障害されると、結膜上皮が角膜表面を覆い角膜の透明性は失われ失明に至る(角膜輪部機能不全)。

角膜輪部機能不全に対する再生医療は問題点が多く、依然として難治である。角膜上皮細胞は、特異的なマーカーとしてケラチン 12 とケラチン 3 が報告されているが、このような角膜上皮細胞の特異性維持に関わる転写制御機構はよく分かっていない。

## 2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドなトランスクリプトーム/ エピゲノム解析によりヒト角膜上皮細胞の特異性維持に関する転写制御プログラムの全体像を明らかにすること。

## 3. 研究の方法

ヒト角膜輪部上皮細胞に対して次世代シーケンサー HiSeq2500 (イルミナ社)を用い、活性化エンハンサーマーカーである H3K27ac の抗体を用いた chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-seq 法)と、ヌクレオソームフリー領域を同定する Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements-sequencing (FAIRE-seq 法)により、ゲノムワイドにエンハンサー領域を同定した。

次に、眼関連転写因子の抗体を用いた ChIP-seq 法により結合領域をゲノムワイドに同定した。

## 4. 研究成果

角膜遺伝子の近傍には角膜特異的なエンハンサー領域を認めた。

エンハンサー領域に濃縮している特徴的な転写因子の結合配列(モチーフ)探索では、眼関連転写因子や重層上皮の分化・維持に関わる転写因子の濃縮が認められた。

角膜遺伝子の近傍には眼関連転写因子の結合を認め、特に角膜特異的なケラチン 12 やケラチン 3 の近傍では角膜特異的な眼関連転写因子の結合を認めた。

眼関連転写因子の結合領域に濃縮している特徴的な転写因子の結合配列(モチーフ)探索では、重層上皮の分化・維持に関わる転写因子の濃縮が認められた。

角膜上皮細胞において、眼関連転写因子は重層上皮の分化・維持に関わる転写因子と共に角膜に特徴的な制御領域に結合し、角膜遺伝子の発現を制御していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計5件)

1. [Suguru Nakagawa](#), Atsushi Okabe, Shuichi Tsutsumi, Ryo Nakaki, Satoru Yamagami, Tomohiko Usui, Hiroyuki Aburatani. Interactions between KRT12 TSS and other genomic loci in corneal limbal epithelial stem cells. Annual meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, Vancouver, BC, Canada, April 2019

2. [Nakagawa Suguru](#), Nakaki Ryo, Yamagami Satoru, Usui Tomohiko, Aburatani Hiroyuki. Regulatory networks defining human corneal limbal epithelial cells identity through

epigenomes. Annual meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology, Honolulu, HI, USA, April 2018

3.中川 卓、仲木 竜、山上 聡、臼井 智彦、油谷 浩幸  
PAX6 は角膜に特徴的な制御領域に結合し 角膜遺伝子の発現を制御する. 第 122 回日本眼科学会総会、大阪、2018 年 4 月

4.中川 卓. 次世代シーケンサーを用いた角膜のトランスクリプトーム・エピゲノム研究、埼玉県眼科医会・さいたま赤十字病院眼科合同懇話会、埼玉、2018 年 4 月

5.中川卓、仲木竜、永江玄太、関元昭、岡部篤史、山本尚吾、堤修一、臼井智彦、山上聡、相原一、油谷浩幸、ヒト角膜上皮細胞の特異性維持に関するエピゲノムプロファイル、第 120 回日本眼科学会総会、仙台、2016 年 4 月

〔図書〕(計 1 件)

中川卓 次世代シーケンサーとエピゲノム解析 あたらしい眼科 (0910-1810)34 巻 8 号 Page1155(2017.08)

〔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：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

## (2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。