

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16930

研究課題名（和文）角膜上皮細胞へのダイレクトリプログラミングが可能な薬剤開発

研究課題名（英文）Development of new drugs for direct reprogramming into corneal epithelial cells

研究代表者

北澤 耕司（Kitazawa, Koji）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：10760803

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：角膜上皮細胞と病的上皮のモデルである表皮角化細胞のマイクロアレイデータを解析し候補薬剤を選択した。CMapを用いて、角膜上皮細胞で高発現している遺伝子を増強させる低分子化合物を8877選択した。そのうち、Scoreが90以上となり角膜上皮細胞で高発現となる候補低分子化合物を13種類、一方で、Scoreが-90以下となり角膜上皮細胞で低発現となる候補低分子化合物を48種類選択した。薬剤の投与期間、投与種類を様々な方法で検討したが、薬剤のみで角膜上皮細胞へリプログラミングできる薬剤を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、網羅的遺伝子発現のデータを用いて、低分子化合物で角膜上皮細胞へのリプログラミングを可能とする薬剤開発を目指したが、結果的に本法では有力な候補薬剤を同定することはできなかった。しかし、本研究から得られたデータによって、化合物スクリーニング方法の改善など、さらなる研究の発展に貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：We firstly, analyzed microarray data of corneal epithelial cells and epidermal keratinocyte, which is a model showing the pathological condition on the severe ocular surface disorders, such as Stevens-Johnson syndrome, ocular cicatricial pemphigoid, and severe thermal/chemical injury, and 8877 of small molecular compounds, which enhanced the corneal related genes, were selected. Using CMap data base, candidate compounds were narrowed down. Among them, 13 candidate were found with more than 90 of score, and 48 candidates were observed with less than 90 of score, indicating the possible induction of corneal-related gene expression profile. However, no small molecule compounds were capable of reprogramming into corneal epithelial cells was found, although the treatment period and the combination of compounds were tested by various conditions,

研究分野：医薬

キーワード：ダイレクトリプログラミング 角膜上皮 転写因子 低分子化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受精卵から各細胞への分化は一方向で、一旦分化した細胞は元の細胞に逆戻りできないと考えられてきた。しかし、2006年のiPS細胞の発見で、細胞の特異的な分化の鍵となる転写因子群(コア転写因子)を導入する事でリプログラミングができることがわかった。さらに最近では細胞特異的なコア転写因子を用いる事で、心筋、神経、肝細胞などの様々な分化細胞を直接誘導できることが報告されている。

2. 研究の目的

角膜上皮は、重層化した角膜上皮細胞によって構成されている透明性と高いバリア機能の特徴とする眼表面の組織である。角膜上皮幹細胞疲弊症では幹細胞疲弊に伴う結膜および血管侵入に加えて眼表面上皮の分化異常が生じる。その結果、正常上皮が角化(皮膚化)して高度の角膜混濁をきたし、著明な視力低下を引き起こす。申請者はこれまでに角膜上皮細胞の細胞特異性を決める6つの転写因子を同定し、皮膚線維芽細胞から角膜上皮細胞へのダイレクトリプログラミングに成功した。本研究では角膜上皮のコア転写因子の相互作用機序を解明し、さらに低分子化合物を用いて角膜上皮細胞へのダイレクトリプログラミングを可能とする薬剤を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 低分子化合物による薬剤スクリーニングを始める前に、申請者がこれまでに同定してきた転写因子のうちの一つである*KLF4*の作用機序について検討した。そのために、CRISPR/Cas9で*KLF4*をノックアウトしたヒト角膜上皮細胞を作成し、遺伝子発現変化に注目し解析を行った。

2)次に、眼のマスター遺伝子である*PAX6*との協調性について遺伝子発現解析を行った。

3) 角膜上皮細胞へのダイレクトリプログラミングが可能な薬剤開発の可能性を探るために、角膜上皮細胞と病的上皮のモデルである表皮角化細胞のマイクロアレイデータを解析し候補薬剤を選択した。

4)選択候補薬剤を皮膚線維芽細胞、および表皮角化細胞に加えて遺伝子発現変化を検討した。

4. 研究成果

1) CRISPR/Cas9で*KLF4*をノックアウトしたヒト角膜上皮細胞では、上皮系遺伝子の発現が低下し、間葉系遺伝子の発現が上昇した。このことは、*KLF4*がヒト角膜上皮細胞において上皮関連遺伝子を制御することで分化を維持している事を示す。また、マイクロアレイによる解析では角膜上皮特異的遺伝子であるケラチン3およびケラチン12を含むケラチン関連の遺伝子発現が大きく低下した。

2)次に、*PAX6*と*KLF4*を同時にCRISPR/Cas9でノックアウトしたヒト角膜上皮細胞を作成した。*PAX6*単独のノックアウトでは、角膜上皮関連遺伝子であるケラチン1およびケラチン10の発現が上昇したのに対し、*PAX6*および*KLF4*同時のノックアウトではこれらの発現がすべて低下した。つまり、*KLF4*が*PAX6*の上流にあり、ケラチンを含む角膜上皮関連遺伝子の発現を広く制御していることを示唆する。このことは、非角化上皮細胞である角膜上皮細胞と、角化上皮細胞である表皮細胞との制御にはこれらの転写因子の発現が重要であることがわかった。

3) 次に薬剤スクリーニングを行うために、角膜上皮細胞と病的上皮のモデルである表皮角化細胞のマイクロアレイデータを解析し候補薬剤を選択した。CMapを用いて、角膜上皮細胞で高発現している遺伝子を増強させる低分子化合物を8877選択した。そのうち、Scoreが90以上となり角膜上皮細胞で高発現となる候補低分子化合物を13種類、一方で、Scoreが-90以下となり角膜上皮細胞で低発現となる候補低分子化合物を48種類選択した。

4) 皮膚繊維芽細胞、および表皮角化細胞に候補薬剤を加えて遺伝子発現変化を検討した。角膜上皮細胞の様々な培地、および様々な細胞外マトリックスも併用して検討を行った。また薬剤の投与期間、複数の化合物の混合についても検討したが、薬剤のみで角膜上皮細胞へリプログラミングできる薬剤を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kitazawa Koji, Itoi Motohiro, Yokota Isao, Wakimasu Koichi, Cho Yuko, Nakamura Yo, Hieda Osamu, Kinoshita Shigeru, Sotozono Chie	4. 巻 8
2. 論文標題 Involvement of anterior and posterior corneal surface area imbalance in the pathological change of keratoconus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-33490-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kitazawa Koji, Kayukawa Kanae, Wakimasu Koichi, Inatomi Tsutomu, Hieda Osamu, Mori Kazuhiko, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru	4. 巻 62
2. 論文標題 Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of cystoid macular edema post Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 615 ~ 620
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10384-018-0621-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Deguchi Hideto, Kitazawa Koji, Kayukawa Kanae, Kondoh Eri, Fukumoto Akiko, Yamasaki Toshihide, Kinoshita Shigeru, Sotozono Chie	4. 巻 13
2. 論文標題 The trend of resistance to antibiotics for ocular infection of Staphylococcus aureus, coagulase-negative staphylococci, and Corynebacterium compared with 10-years previous: A retrospective observational study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0203705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0203705	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kitazawa Koji, Wakimasu Koichi, Kayukawa Kanae, Yokota Isao, Inatomi Tsutomu, Hieda Osamu, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru	4. 巻 37
2. 論文標題 Moderately Long-Term Safety and Efficacy of Repeat Penetrating Keratoplasty	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 1255 ~ 1259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/IC0.0000000000001694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okumura Naoki, Inoue Ryota, Nakano Shinichiro, Imai Hirofumi, Matsumoto Daiki, Kayukawa Kanae, Wakimasu Koichi, Kitazawa Koji, Koizumi Noriko, Kinoshita Shigeru	4. 巻 37
2. 論文標題 Immune Cells on the Donor Corneal Endothelium After Corneal Transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 1081 ~ 1086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IC0.0000000000001678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitazawa Koji, Jongkhajornpong Passara, Inatomi Tsutomu, Koizumi Noriko, Kayukawa Kanae, Wakimasu Koichi, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru	4. 巻 102
2. 論文標題 Topical ganciclovir treatment post-Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty for patients with bullous keratopathy induced by cytomegalovirus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1293 ~ 1297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bjophthalmol-2017-311145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitazawa Koji, Wakimasu Koichi, Kayukawa Kanae, Sugimoto Manabu, Nakai Junko, Weiss Jayne S., Ueno Morio, Sotozono Chie, Kinoshita Shigeru	4. 巻 37
2. 論文標題 Long-Term Outcome After Penetrating Keratoplasty in a Pedigree With the G177E Mutation in the UBIAD1 Gene for Schnyder Corneal Dystrophy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 554 ~ 559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/IC0.0000000000001511	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitazawa K, Fukuoka H, Inatomi T, Azia Y, Kinoshita S, Sotozono C.	4. 巻 64
2. 論文標題 Safety of retrocorneal plaques aspiration for managing fungal keratitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 228-233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-020-00718-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wakimasu K, Kitazawa K, Kayukawa K, Yokota I, Inatomi T, Hieda O, Sotozono C, Kinoshita S	4. 巻 5
2. 論文標題 Five-year follow-up outcomes post Descemet 's stripping automated endothelial keratoplasty.Five-year follow-up outcomes post Descemet 's stripping automated endothelial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Ophthal	6. 最初と最後の頁 e000354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjophth-2019-000354.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aoki T, Kitazawa K, Inatomi T, Kusada N, Horiuchi N, Takeda K, Yokoi N, Kinoshita S, Sotozono C	4. 巻 10
2. 論文標題 Risk Factors for Corneal Endothelial Cell Loss in Patients with Pseudoexfoliation Syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 7260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64126-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitazawa Koji, Hikichi Takafusa, Nakamura Takahiro, Nakamura Masahiro, Sotozono Chie, Masui Shinji, Kinoshita Shigeru	4. 巻 38
2. 論文標題 Direct Reprogramming Into Corneal Epithelial Cells Using a Transcriptional Network Comprising PAX6, OVOL2, and KLF4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cornea	6. 最初と最後の頁 S34 ~ S41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/ICO.0000000000002074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Kitazawa Koji
2. 発表標題 PAX6, OVOL2 and KLF4 co-ordinately contribute to the cellular reprogramming of corneal epithelial cells.
3. 学会等名 BBSRC Japan Partnering Award Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kitazawa Koji
2. 発表標題 Direct Reprogramming to Corneal Epithelial Cells. ~ the concept of transcriptional network~
3. 学会等名 Kyoto Cornea Club (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kitazawa Koji, Masuda Kosuke, Murakami Rei, Nakamura Takahiro, Kinoshita Shigeru, Sotozono Chie
2. 発表標題 KLF4-depleted-human corneal epithelial cells using CRISPR/Cas9 system lost the epithelial phenotype
3. 学会等名 ARVO2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kitazawa Koji, Hikichi Takafusa, Nakamura Takahiro, Sotozono Chie, Masui Shinji, Kinoshita Shigeru
2. 発表標題 OVOL2 suppressed mesenchymal genes in human corneal epithelial cells
3. 学会等名 Gordon Research Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kitazawa Koji, Hikichi Takafusa, Nakamura Takahiro, Kinoshita Shigeru, Masui Shinji, Sotozono Chie
2. 発表標題 OVOL2 maintains a transcriptional program of human corneal epithelial cells
3. 学会等名 Stevens-Johnson Syndrome Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Kitazawa K, Toda M, Ueno M, Uehara A, Sotozono C, Hamuro J, Kinoshita S.
2 . 発表標題 The association between maturity of corneal endothelial cells and endothelial cell density after corneal transplantation.
3 . 学会等名 AAO2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Numa K, Tanaka H, Ueno M, Imai K, Kitazawa K, Wakimasu K, Inatomi T, Okumura N, Koizumi N, Teramukai S, Sotozono C, Kinoshita S
2 . 発表標題 Four-Year Follow-up After Injection of Cultured Corneal Endothelial Cells with a ROCK Inhibitor for Bullous Keratopathy.
3 . 学会等名 AAO2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ishida G, Kitazawa K, Itoi M, Inatomi T, Kinoshita S, Sotozono C
2 . 発表標題 The change in corneal anterior-posterior area ratio after penetrating keratoplasty with keratoconus by using anterior segment optical coherence tomography.
3 . 学会等名 ARVO2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Toda M, Kitazawa K, Ueno M, Maruyama Y, Uehara A, Sotozono C, Hamuro J, Kinoshita S
2 . 発表標題 Factors influencing the health and longevity of donor corneal endothelial cells.
3 . 学会等名 ARVO2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 北澤耕司
2. 発表標題 角膜上皮再生医療の未来 ~幹細胞から分化細胞~
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----