

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592033
 研究課題名（和文） 角膜上皮細胞の特異機能におけるエピジェネティック制御および機能的 RNA の関与
 研究課題名（英文） Involvement of functional RNA and epigenetic regulation in the specific function of corneal epithelium
 研究代表者
 川崎 諭（KAWASAKI SATOSHI）
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：60347458

研究成果の概要：

角膜上皮細胞は角膜組織の無血管性等の特異的な機能に大きく関与していると考えられている。今回この角膜上皮細胞における機能的 RNA、特に miRNA の発現について検討した。また多くのコーディング RNA のゲノムレベルでの制御にゲノムメチル化が関与していることが報告されているが、角膜上皮細胞特異的のマーカであるケラチン 12 遺伝子のゲノムメチル化状態についても検討した。結果として角膜上皮細胞のセルラインでは miR-21 がもっとも多く発現していることが明らかとなった。また正常角膜上皮細胞と比較すると HCE-T 細胞では約 7 倍ほど miR-21 の発現が亢進していることが明らかとなった。また miR-21 をノックダウンすると若干ながら HCE-T の細胞増殖が低下することがわかった。さらに阻害剤をもちいて HCE-T における miR-21 の発現が PI3K および p38 のシグナルによって負に制御されていることがわかった。またリポーターアッセイによって HCE-T における miR-21 の発現制御を検討したところ、HCE-T 細胞の定常状態における miR-21 の転写活性は pri-miR-21 の転写開始点上流 800 塩基から 1000 の間の領域で正に制御され、0 から +500 塩基の領域によって負に制御されていることがわかった。

レーザーマイクロキャプチャーを用いて角膜上皮の各領域からゲノム DNA 10ng を採取して角膜上皮細胞において最も特異的に発現している分子であるケラチン 12 遺伝子のゲノムメチル化状態を検討した。結果として、輪部基底のケラチン 12 陰性の角膜上皮ではケラチン 12 遺伝子のメチル化率は高いことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：miRNA、エピジェネティクス、メチル化、機能的 RNA、角膜上皮細胞、miR-21、PI3K/Akt シグナル

1. 研究開始当初の背景

眼表面は解剖学的位置により角膜と結膜に区別され、その表面は各々固有の細胞系譜に属する角膜上皮細胞と結膜上皮細胞によって覆われている。これらはともに重層扁平上皮に分類され、形態的にも極めて類似しているが、その細胞学的性質は著しく異なるとされている。例えば角膜の無血管性維持には角膜上皮細胞が必須であることが知られており、角膜上皮幹細胞が失われる疾患で結膜上皮細胞が代償的に角膜上に侵入した場合には、血管を引き込み角膜透明性が著しく低下する。この点で角膜上皮細胞の臨床的意義は極めて高いと言える。我々はこれらの細胞の細胞生物学的特徴を分子レベルで把握するため、3'末端cDNAライブラリを作成してその遺伝子発現プロファイルについて解析してきた。成果としてヒト角上皮細胞で特異的に発現するいくつかの遺伝子を新規クローニングし、そのゲノム構造を解析した。その中でも特に角膜上皮細胞特異性の高いケラチン12遺伝子については、その遺伝子変異がMeesmann角膜炎の原因であることを世界に先駆けて証明した。またこれまで角膜上皮細胞は角膜上にだけ存在すると考えられてきたが、輪部を隔てた結膜上皮中にもわずかながらケラチン12陽性細胞が存在することを見だし、網羅的な遺伝子発現解析によってこの細胞が異所性の角膜上皮細胞であることを証明した。

角膜上皮細胞でケラチン12遺伝子が特異的に発現する機序については、転写因子によるものがこれまでに報告されていたが、我々の調べた範囲ではそれらの転写因子は角膜上皮細胞特異的なものではなく、他のメカニズムの存在が考えられた。そこで我々はエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の存在を考え、ケラチン12遺伝子のゲノムメチル化を検討したところ、転写開始点上流約400bpから転写開始点下流450bpまでの領域のCpGサイトは皮膚、結膜、口腔粘膜上皮といった他の重層扁平上皮と比較して角膜上皮細胞では極めて低いメチル化状態にあることを最近見いだした(図1、論文未発表データ)。またケラチン12遺伝子にはエクソン4から6にかけての500bpほどの領域にCpGサイトに富むいわゆるCpGアイランドが存在するが、おもしろいことにこの領域についても角膜上皮細胞とその他の重層扁平上皮ではそのメチル化程度に際だった違いが見いだされた(図1)。一般的に遺伝子内部のexonicないしintronicなCpGサイトはメチル化された場合でもRNAポリメラーゼIIによる転写を阻

害しないとされているため、この領域のメチル化程度の違いがどのような生物学的意義を持つかは現時点では説明できない。一方でCpGアイランドがSP1転写因子の結合配列をしばしば含むことはよく知られており、また実際この領域には複数のSp1結合予測サイトが含まれるため、この領域から何らかの転写産物が発現している可能性も考えられる。

近年エピジェネティクスによる遺伝子制御のほか、機能的RNAが多くの遺伝子発現制御を介して細胞増殖、アポトーシス、癌化といった様々な生命現象に関与していることが知られるようになった。ケラチン12遺伝子の転写ないし翻訳レベルでの特異的発現制御に関しても低分子RNA(miRNA)やanti-sense RNAといった機能的RNAが直接あるいは間接的に関与している可能性が大いに考えられる。また角膜上皮細胞の幹細胞が存在する輪部上皮基底細胞はケラチン12遺伝子を発現していないが、通常ゲノムメチル化は時間的に長いスパンの遺伝子制御に関係しているとされ、輪部上皮基底細胞ではケラチン12遺伝子がメチル化されていて、角膜上皮細胞に分化すると脱メチル化されるということは考えにくい。それ故、輪部上皮基底細胞ではケラチン12遺伝子のCpGサイトがメチル化されているためにケラチン12遺伝子が発現しないのか、あるいは機能的RNA、特にmiRNAによってタンパク翻訳が阻害されているのかなど様々な可能性が考えられ興味は尽きない。

本研究計画を遂行するには方法論的にも解決すべき点は多い。例えば上記の問題に対しては、レーザーマイクロキャプチャーないしセルソーティングによって分化段階毎に分離した細胞を材料にしてそのメチル化程度、miRNAの発現を調べることになるが、そのうちメチル化解析については現在のところ微量サンプルから解析する良い方法が確立していない。近年ゲノムDNAを均一に増幅する方法としてPhi29ポリメラーゼによる等温増幅が広く利用されるようになった。そこで我々はゲノムDNAをbisulfite処理後にこの方法を用いて増幅する方法を考案した。この方法では10ng程度のゲノムDNAからある程度の解析が可能であるが、それ以下の量の場合には非特異的な増幅産物の割合が増える結果、その後の解析が困難となる傾向がみられた。最近になって好熱菌である *Thermus thermophilus* の single strand DNA binding protein を改変したタンパク (mutated SSB) が、このPhi29ポリメラーゼによるゲノム等温増幅において非特異的な増幅産物の生成を著しく抑制して増幅結果を大幅に改善することが示された。我々はこの研究グループ

より共同研究としてこの改変 SSB タンパクの供与を受け、微量サンプルからのゲノムメチル化解析法を確立させつつある。確立すれば、角膜上皮細胞の分化段階におけるケラチン 12 遺伝子のゲノムメチル化程度について解析可能であるほか、多くの生命現象についての汎用解析法として他分野でも有用なツールとなるのではないかと期待している。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では角膜上皮細胞の特殊性に関わる分子機構の解明の一端として、角膜上皮細胞における機能的 RNA、特に miRNA の発現を網羅的に検討したいと考えている。また角膜上皮細胞の分化段階におけるケラチン 12 遺伝子のエピジェネティック制御機構および機能的 RNA の関与についても詳細に検討したいと考えている。miRNA は近年その重要性が示されつつあるが、依然として不明な部分が多く、また少なくとも現時点では角膜上皮細胞においては全く報告がないため、極めて意義深くまた興味深い研究テーマであると考えている。

3. 研究の方法

(1) ヒト角膜上皮細胞、結膜上皮細胞、口腔粘膜上皮細胞、皮膚表皮細胞の miRNA プロファイリング

ヒト角膜、結膜、口腔粘膜、皮膚組織より上皮細胞だけを機械的搔爬ないしディスペーゼ処理によって採取し、miRNA抽出用カラムにて低分子RNA分画を抽出し、さらにPAGEで泳動して15~30塩基程度のRNAを採取する。PolyA ポリメラーゼによって3' 端にポリA付加し、5' 端はRNAリンカーをT4 RNAリガーゼにてライゲーションする。Oligo dTプライマーにてcDNA合成して、両端をプライマーとしたPCRで全体を増幅する。PAGEで泳動して100塩基付近のフラクションを抽出してTAクローニングして大腸菌に形質転換し、コロニーを拾ってシーケンスし、miRNAデータベースに対して検索をかけリスト化する。

(2) ヒト角膜上皮細胞、結膜上皮細胞、口腔粘膜上皮細胞、皮膚表皮細胞における miRNA プロファイルの検討

① miRNA マイクロアレイによる相対的発現解析

上で調整したmiRNAをPolyAポリメラーゼにてPolyA付加し、その際rATPにアミン標識rATPを混合しておく。標識したアミンを介してさらにCy5あるいはCy3蛍光を標識し、精製の後miRNA解析用のマイクロアレイにハイブリダイゼーションする。洗浄後スキャナーで解析し結果をクラスター解析して、角膜上皮細胞特異的な発現を示すmiRNAを同定する。

② RT-PCR, real-time RT-PCR による

validation study

上で調整したmiRNAの5' 端リン酸を脱リン酸化し、5' 端をリン酸化、3' 端をアミノ化して保護したRNAリンカーを、T4 RNAリガーゼにてライゲーションし逆転写酵素にてcDNA合成を行う。miRNA特異的プライマーとリンカーに対するプライマーでPCRを行い電気泳動して検出する。またreal-time PCRはABIのキットの手順に従い、miRNAの3' 端にアニールするヘアピン構造をもつ特殊なプライマー(Loop RT primer)でcDNA合成を行った後、ヘアピン領域に対するプライマーとmiRNAに対するプライマー、およびその間に位置する内部プローブ(5' 端と3' 端をリポーターとクエンチャーで標識してある)を加え、real-time PCRマシンにてPCRを行う。

③ RNase protection assay による validation study

上で調整したmiRNAにRI標識したRNAプローブを混合し、RNaseにて消化後、変性条件でPAGEで電気泳動してイメージングアナライザー(BAS5000)にて解析する。

(3) 微量サンプルからのゲノムメチル化解析法の確立

微量ゲノムDNAサンプルをbisulfite処理して、mutated SSBの存在下でPhi29ポリメラーゼ、ピロフォスファターゼ、dNTP、5' 端の2塩基間をホスホロチオエト結合(S化)したランダムヘキサマー(HpHpHpHsHsHおよびDpDpDpDsDsD; bisulfite処理するとほとんどのCがTに変換されるためセンス鎖はDpDpDpDsDsD、アンチセンス鎖にはHpHpHpHsHsHの方がNpNpNpNsNsNのランダムヘキサマーよりも効率よくアニーリングすると思われる。)にて等温増幅する。カラム精製後に目的のゲノム領域を増幅するプライマーにてPCRを行う。PCR産物は以下の方法で解析する。

① Bisulfite sequencing法

PCR産物をアガロースゲルにて泳動して切り出し、カラム精製してTAクローニングする。大腸菌に形質転換後、コロニーを拾ってPCRを行う。PCR産物をexonuclease I、shrimp alkaline phosphataseにて処理してシーケンスし、結果をSeqscape、BiQ analyserソフトにて解析する。

② 一塩基伸長法

PCR産物をexonuclease Iとshrimp alkaline phosphataseにて精製後、それぞれのCpGサイトに特異的なプライマーを加え、ABI社の一塩基伸長キット(SnapShot)にて反応させる。反応液をshrimp alkaline phosphataseにて処理した後、シーケンサーで泳動し、Genemapperソフトで解析する。

(4) 新規miRNAの機能解析

データベースにない新規のmiRNAのうち、角

膜上皮細胞に特異的なものは特に注目すべきものとなる。以下の手順で解析を進める。

①ターゲット配列の推定

miRNAのターゲット配列予測データベース (miRBase、miRMAPなど複数で検索する) にてターゲット遺伝子を検索する。この検索はあくまで予測であるので、以下の検証実験にて確認する。

②miRNAの強制導入とノックダウンによるターゲット遺伝子の翻訳抑制の検討

対象とするmiRNAを発現するプラスミドベクターを構築する。またノックダウンの目的には対象とするmiRNAの相補鎖のRNAを合成する。さらにmiRNAによる翻訳抑制を定量化するため、miRNAの予測ターゲット遺伝子の3' UTR配列をルシフェラーゼ遺伝子の3' 端に挿入したプラスミドベクターを構築する。miRNA転写ベクターないしノックダウン用の合成miRNAとともにルシフェラーゼベクターを培養細胞に遺伝子導入し、発光基質を用いてmiRNAによる特定の遺伝子の翻訳抑制活性を定量化する。培養細胞としては内因性にターゲット遺伝子を発現しているものを用いる。またターゲット遺伝子の3' UTRのどの領域が翻訳抑制に関わっているかを確認するためにdeletion mutantを作成して同様の実験を行う。

③ウエスタンブロットティング、免疫染色による発現解析

上記イにて作成したmiRNA発現プラスミドとノックダウン用の合成miRNAをそれぞれ別個に培養細胞に遺伝子導入する。導入して24~48時間後に培養細胞をそのまま免疫染色するか、溶解液にて可溶化してウエスタンブロットティングにて発現解析する。

(5)ケラチン12遺伝子内部より転写される機能的RNAの解析

ケラチン12遺伝子の内部、特にエクソン4から6にかけてのCpG islandより転写されるRNA(senseあるいはanti-sense)があるかどうかRT-PCR、ノーザンブロットにて解析する。

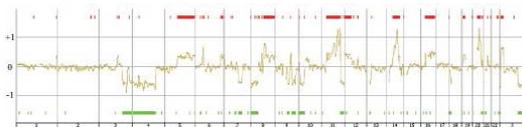
(6)角膜上皮細胞の分化段階におけるゲノムメチル化解析

角膜上皮細胞、輪部上皮細胞の基底層、中間層、表層の細胞をレーザーマイクロキャプチャーにて選択的に採取する。採取量としては細胞1000個を目安とする。ゲノムDNAを抽出し、bisulfite処理の後、初年度に確立した増幅法にて等温増幅する。カラム精製の後、解析領域をPCRしてbisulfite sequencing法、一塩基伸長法にて各CpGサイトのメチル化程度について検討する。

4. 研究成果

in vivo 角膜上皮細胞のmiRNAはごく微量であるためクローニング手法による遺伝

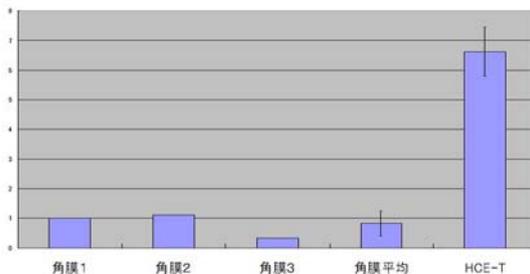
子発現解析には向かないことが初期の段階で明らかとなった。そこで角膜上皮細胞の不死化細胞であるHCE-T細胞を用いて解析を行った。まずHCE-T細胞よりtotal RNAを抽出し、そこからさらにPAGE精製によってmiRNAフラクションを回収した。これをcDNAとし、さらにPCRで増幅の後コンカテメリゼーションしてプラスミドに組み込みシーケンスを行いさらに独自に作成した解析ソフトで解析した。シーケンスした1536クローンのうち1498クローンが有効クローンであり、そこから10044タグが得られた。その中にmiRNA候補タグが3959個存在し、そのうち56個が既知miRNAに一致していたが、新規miRNAは見出せなかった。この56個のmiRNAのうち48個がmiR-21であり、このmiRNAがHCE-Tにて圧倒的に発現量が多いことがわかった。そこでこのmiR-21の発現増加がどのような意味をもつのかを検討した。まずmiR-21は17番染色体q23.1に位置しているが、この領域がゲノムコピー数変化を起こしているかどうかをarray CGHにて検討した。結果としてこの領域はコピー数変化を起こしていないことが明らかとなり、コピー数の増加によって発現



量が増加しているわけではないことが明らかとなった。(図1)

図1 array CGHによるHCE-T細胞ゲノムのコピー数変化

miR-21は多くの癌組織で発現亢進していることがこれまでに報告されている。我々の使用した角膜上皮細胞のin vitroモデルであるHCE-TもSV40 large T抗原の発現によって不死化したものである。そこでまずmiR-21の発現が培養ヒト角膜上皮細胞とHCE-T細胞でどうなっているかを検討した。結果としてmiR-21は正常角膜よりもHCE-Tで有意に発現が高いことが明らかと



なった。(図2)

図2 正常角膜上皮細胞およびHCE-T細胞におけるmiR-21の発現量

次に miR-21 を siRNA にてノックダウンして細胞増殖がどうなるかを検討した。結果として miR-21 を siRNA にて阻害すると細胞増殖能が若干ながら低下することが明らかとなった。(図 3)

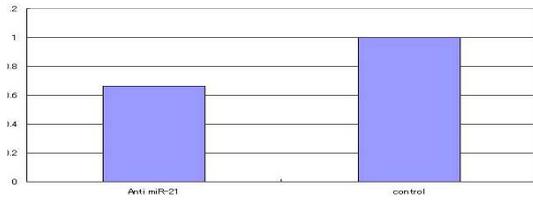


図 3 miR-21 の阻害による細胞増殖変化
次に miR-21 が細胞内シグナルによってどのように制御されているかを検討した。細胞内シグナルとして PI3K, ERK, JNK, p38 を検討した。結果、PI3K 阻害剤である wortmanine および LY294002 によって濃度依存的に miR-21 の発現は増強した。(図 4, 5)

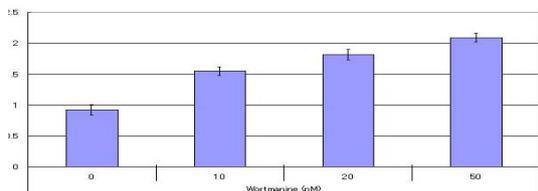


図 4 wortmanine による miR-21 の発現変化

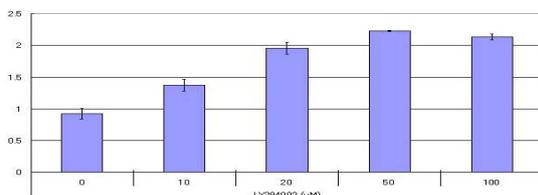


図 5 LY294002 による miR-21 の発現変化

また p38 阻害剤である SB203580 によって濃度依存的に miR-21 の発現は増強した。(図 6)

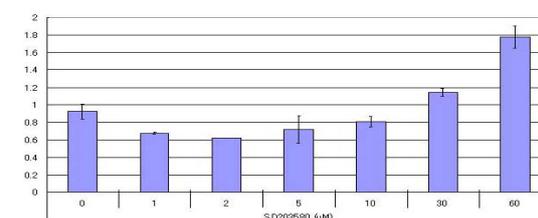


図 6 SB203580 による miR-21 の発現変化

次に miR-21 のプロモーター領域がどこにあるかを検討した。miR-21 の上流プロモーターをルシフェラーゼベクターに組み込みリポーター活性を調べた。結果として HCE-T 細胞の定常状態における miR-21 の転写活性は pri-miR-21 の転写開始点上流 800 塩基から 1000 の間の領域で正に制御され、0 から +500 塩基の領域によって負に制御されてい

ることがわかった。(図 7, 8)

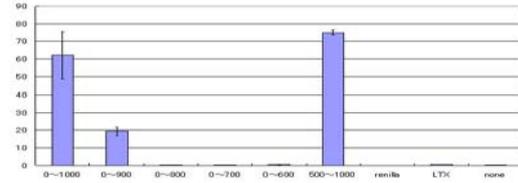


図 7 リポーターアッセイによる pri-miR-21 の転写制御領域の解析

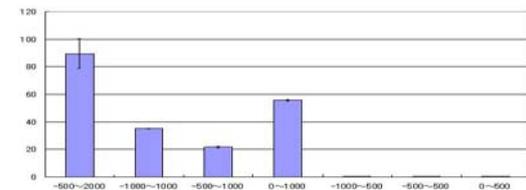


図 8 リポーターアッセイによる pri-miR-21 の転写制御領域の解析

以上より、HCE-T の定常状態における miR-21 の発現亢進状態は PI3K-Akt および p38 のシグナル系によって負に制御され、また転写開始点上流 800 塩基から 1000 塩基の間で正に、0 から +500 塩基の間で負に制御されていることが明らかとなった。

微量サンプルからのゲノムメチル化解析法の確立についてはさまざまな条件を検討したものの、ゲノム DNA1ng からの解析はかなり困難であることがわかった。そこでレーザーマイクロキャプチャーを用いて角膜上皮の各領域からゲノム DNA10ng を採取してケラチン 12 遺伝子のゲノムメチル化状態を検討した。結果として、輪部基底のケラチン 12 陰性の角膜上皮ではケラチン 12 遺伝子のメチル化率は高いことが明らかとなった。(図 9)

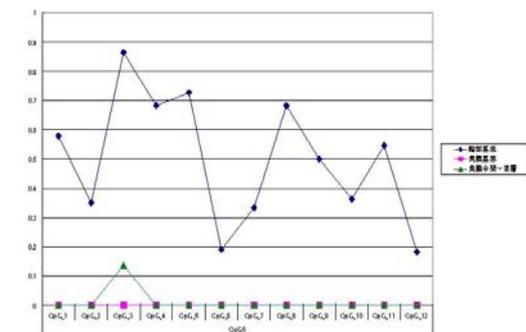


図 9 輪部基底、角膜基底および角膜中間層～表層におけるケラチン 12 遺伝子のメチル化状態

このことは過去の我々に我々が見出した角膜上皮細胞においてケラチン 12 遺伝子の

メチル化率が極めて低い事実とあわせて考えると、ケラチン12遺伝子は角膜上皮細胞の分化とともに脱メチル化されることを意味すると考えられた。

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7件)

- ① Ban, Y., Yoshida, Y., Kawasaki, S., and Mochida, C. (2007) *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245, 1581-1583
- ② Koizumi, N., Rigby, H., Fullwood, N. J., Kawasaki, S., Tanioka, H., Koizumi, K., Kociok, N., Jousseaume, A. M., and Kinoshita, S. (2007) *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245, 123-134
- ③ Tanioka, H., Hieda, O., Kawasaki, S., Nakai, Y., and Kinoshita, S. (2007) *J Cataract Refract Surg* 33, 1195-1200
- ④ Koizumi, N., Suzuki, T., Uno, T., Chihara, H., Shiraishi, A., Hara, Y., Inatomi, T., Sotozono, C., Kawasaki, S., Yamasaki, K., Mochida, C., Ohashi, Y., and Kinoshita, S. (2008) *Ophthalmology* 115, 292-297 e293
- ⑤ Kojima, K., Ueta, M., Hamuro, J., Hozono, Y., Kawasaki, S., Yokoi, N., and Kinoshita, S. (2008) *Br J Ophthalmol* 92, 411-416
- ⑥ Pratoomsoot, C., Tanioka, H., Hori, K., Kawasaki, S., Kinoshita, S., Tighe, P. J., Dua, H., Shakesheff, K. M., and Rose, F. R. (2008) *Biomaterials* 29, 272-281
- ⑦ Yamasaki, K., Kawasaki, S., Young, R. D., Fukuoka, H., Tanioka, H., Nakatsukasa, M., Quantock, A. J., and Kinoshita, S. (2008) *Invest Ophthalmol Vis Sci*

[学会発表] (計7件)

- ① The effects of tenascin-C for beta-catenin signals in corneal epithelial cells. Matsuda A, Kusakabe M, Kawasaki S, Sekiyama E, Hamuro J, Kinoshita S 2007 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, Florida, U. S. A.) (2007)
- ② Epigenetic Regulation of Keratin 12 Gene Expression. Kawasaki S, Yamasaki K, Tanioka H, Nakamura T, Fukuoka H, Araki B, Yokoi N, Kinoshita S 2007 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, Florida, U. S.

A.) (2007)

- ③ Novel Mutations in the MIS1 Gene Associated With Gelatinous Drop-like Corneal Dystrophy in Japan hursday. Nakatsukasa M, Kawasaki S, Yamasaki K, Ogita R, Mochida C, Takaoka M, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S 2007 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, Florida, U. S. A.) (2007)
- ④ Cytokeratin Expression Pattern of Limbal Dermoid. Fukuoka H, Kawasaki S, Tanioka H, Yamasaki K, Inatomi T, Sotozono C, Araki B, Yokoi N, Kinoshita S. 2007 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, Florida, U. S. A.) (2007)
- ⑤ Assessment of Epithelial Integrity and Cell Viability in Epithelial Flaps Prepared With Epi-Keratomes. Tanioka H, Hieda O, Kawasaki S, Nakai Y, Nakatsukasa M, Kinoshita S. 2007 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, Florida, U. S. A.) (2007)
- ⑥ Depth-Dependant Collagen Fibrillar Architecture in Human Eye Bank Corneas Ascertained by Microfocus Synchrotron X-Ray Diffraction. Quantock A. J., Boote C., Young R. D., Hayes S., Tanioka H, Kawasaki S, Ohta N, Yagi N, Kinoshita S, Meek K. M. 2007 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, Florida, U. S. A.) (2007)
- ⑦ Involvement of epigenetic regulation in keratin 12 gene expression. Kawasaki S. 1st Korea-Japan Cornea Joint Conference. (Kyoto, Japan) (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 諭 (KAWASAKI SATOSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：60347458

(2) 研究分担者

松田 彰 (MATSUDA AKIRA)

京都府立医科大学・医学研究科・助教 (研究

申請時、現順天堂大学・医学部・医学学研

科・准教授)

研究者番号：00312348