

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791271  
 研究課題名 (和文) 分化形質を維持した角膜上皮細胞株の樹立及び角膜上皮分化機構の解明  
 研究課題名 (英文) The establishment of well-differentiated corneal epithelial cell line and the analysis of mechanism for corneal epithelial differentiation  
 研究代表者  
 木村 和博 (KIMURA KAZUHIRO)  
 山口大学・医学部・助教  
 研究者番号：60335255

## 研究成果の概要：

角膜上皮は、角膜表層でバリアーとして重要な働きをしている。これまで継代可能な角膜上皮細胞には正常な Gap Junction (GJ) が存在せず、細胞-細胞間での分子の交換がなされていない。つまり、統合的な分化形質を保持した培養角膜上皮細胞は、未だ存在しないことを示唆している。そこで、GJ 構成分子の一つであるコネクシン 43 に着目し、正常な GJ 機能を有し、角膜上皮分子マーカーの発現を維持した Human コネクシン 43 安定発現角膜上皮細胞株の樹立に成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	0	2,000,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

## 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：細胞組織、シグナル伝達、遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

角膜上皮は、基底膜上の基底細胞、中層の翼細胞、表層の表層細胞からなる非角化上皮である。正常角膜において、上皮細胞はラミニン、コラーゲンタイプ IV などのいくつかの細胞外基質を含む基底膜上に重層化し、それぞれの細胞がタイトジャンクション、アドヘレスジャンクションを介して接合している。さらに、細胞間では、ギャップジャンクションを介してイオンなどの分子交換が積極的に行われている。実際、角膜上皮細胞の分化、増殖およびその形質維持には、細胞

接着つまり細胞-細胞間接着や細胞-細胞外基質間接着機構が非常に重要な働きをしていると考えられる。これらの破綻が、上皮細胞の恒常性に維持に重大な支障をきたす。

epithelial biology は、上皮細胞の正常な分化、増殖機構を解明し、上皮疾患の発症のメカニズムを解析し明らかにするため発展してきた。ウサギ、ウシをはじめとして種々の動物の眼から角膜上皮細胞を単離し、初期培養を行うことは可能であるが、初期培養の角膜上皮は継代が困難であり、生物学的あるいは分子生

物学的解析を行うことができない。さらに、初期培養の角膜上皮細胞は、培養方法や条件などの影響を非常に受けやすいため、アッセイ系として用いるのは困難である。初期培養系に対して、荒木らは、SV40 で形質転換させ不死化した Human corneal epithelial cells (HCE 細胞) を作出した。HCE 細胞は、フィブロネクチンなどの細胞外基質への接着性、運動性の亢進や上皮バリアー機能に関与する細胞—細胞間接着機構などは *in vivo* における上皮細胞と同様な機能を保持していると思われる。しかしながら、申請者らは、HCE 細胞には正常なギャップジャンクションが存在せず、細胞—細胞間での分子の交換がなされていないことをイムノプロット法ならびに dye coupling 法を用いて明らかにした。これらのことから統合的な分化形質を保持した培養角膜上皮細胞は、未だ存在しないことを示唆している。

## 2. 研究の目的

統合的な分化形質を保持した培養角膜上皮細胞を作出するため、ギャップジャンクション構成分子の一つであるコネキシン 4 3 に着目し、Human コネキシン 4 3 安定発現角膜上皮細胞株の樹立を行う。

## 3. 研究の方法

ヒト角膜線維芽細胞より mRNA を抽出し cDNA 作成後、Human コネキシン 4 3 特異的なプライマーを用いて、Human コネキシン 4 3 の翻訳領域を含む cDNA をクローニングし、真核生物発現ベクターに組み込んだ。さらに、SV40 で形質転換させ不死化した HCE 細胞にトランスフェクションし、イムノプロット法にて一過性の human コネキシン 4 3 の発現を検討した。さらに、コネキシン 4 3 を一過性発現させた HCE 細胞の免疫染色にて、コネキシン 4 3 が細胞—細胞間に局在すること検討。コネキシン 4 3 発現ベクターを HCE 細胞に遺伝子導入し、G418 (800ug/ml) を用いて薬剤耐性による選別を行い、コネキシン 4 3 安定発現 HCE 細胞を単離する。Lucifer yellow を用いて Dye coupling 法にて、ギャップジャンクション機能を検討した。さらに、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション構成分子の ZO-1, Occludin, E-Cadherin、 $\beta$ -Catenin、角膜上皮分化マーカーであるケラチン-3 およびケラチン-12 の発現をイムノプロット法で検討した。細胞の増殖性を細胞数のカウントにより検討した。

## 4. 研究成果

Human コネキシン 4 3 (hCx43) の発現ベクター (hCx43-EGFP) の作製後、シークエンスにてその遺伝子配列を確認。hCx43-EGFP 発現プラスミドを角膜上皮細胞にトランスフェクション法にて遺伝子導入し、hCx43-EGFP の一過性発現をイムノプロット法にて確認した。つづいて、G418 を用いて恒常的に hCx43-EGFP を発現する細胞株を単離した。まず、実際に hCx43-EGFP の安定発現株でのその発現をイムノプロット法にて検討し、実際に安定細胞株での hCx43-EGFP の蛋白質発現を確認した。さらに実際に、この細胞株において機能的な細胞間のギャップジャンクションが形成されているか Lucifer yellow を用いて Dye coupling 法にて解析した。その結果、コントロールである EGFP 安定発現株がまったく GJ 機能を有さないのに対して、hCx43-EGFP 安定発現細胞株では、優位に細胞間における機能的なギャップジャンクションが形成されていることが明らかとなった。また、免疫組織学的にこの安定発現細胞株における hCx43-EGFP の局在を免疫染色法にて検討した結果、hCx43-EGFP は細胞—細胞間結合部位に有意に局在することが明らかとなった。hCx43-EGFP 安定発現株の角膜上皮特性に関する検討のため、角膜上皮分化マーカーであるケラチン-3/12 の発現をイムノプロット法にて解析した結果、親株である角膜上皮細胞と同様にそれら分子の発現が確認された。また、それらの分子の発現の差は認めませんでした。さらに、角膜上皮細胞の細胞間接着維持に重要な働きをする ZO-1、Occludin、E-Cadherin などの細胞間接着装置の分子発現も同様にイムノプロット法にて検討した結果、これら分子の発現も親株の発現と比べ差異なく維持されていることが明らかとなった。最後に、hCx43-EGFP 安定発現細胞株とそのコントロールである EGFP 安定発現細胞株の細胞増殖性について細胞カウントを行うことにより検討した。その結果、hCx43-EGFP 安定発現細胞株は、EGFP 安定発現細胞株に比べ優位に細胞増殖性が抑制されていることが明らかとなった。以上のことから我々は機能的なギャップジャンクションを有する hCx43-EGFP 安定発現角膜上皮細胞株の樹立を達成した。この細胞株を用いることで角膜上皮における細胞機能の分子メカニズムさらには角膜上皮幹細胞の特性や幹細胞としての形質維持に必要なシグナル伝達経路の解明が可能となり、未解決である角膜上皮異常の発症機序あるいは角膜上皮分化、成熟機構の解明に大きく寄与すると思われる。

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 8 件)

- ① Teranishi S, Kimura K, Nishida T: (2009) Role of Formation of an ERK-FAK-Paxillin Complex in Migration of Human Corneal Epithelial Cells During Wound Closure in Vitro. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* in press 査読
- ② Kimura K, Teranishi S, Nishida T (2009) Interleukin-1 $\beta$ -Induced Disruption of Barrier Function in Cultured Human Corneal Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 50(2): 597-603 査読
- ③ Liu Y, Kimura K (2008) Cytokine, Chemokine, and Adhesion Molecule Expression Mediated by Mitogen-Activated Protein Kinases in Human Corneal Fibroblasts Exposed to Poly(I:C). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 3336-3344 査読有
- ④ Teranishi S, Kimura K (その他 2 名, 2 番目) (2008) Protection of human corneal epithelial cells from hypoxia-induced disruption of barrier function by keratinocyte growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 2432-2437 査読有
- ⑤ Liu Y, Ji-Ae Ko, Yanai R, Kimura K (その他 3 名, 4 番目) (2008) Induction by Latanoprost of Collagen Gel Contraction Mediated by Human Tenon Fibroblasts: Role of Intracellular Signaling Molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 1429-1436 査読有
- ⑥ Kimura K (その他 3 名, 1 番目) (2008) Delayed Disruption of Barrier Function in Cultured Human Corneal Epithelial Cells Induced by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in a Manner Dependent on NF- $\kappa$ B. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 565-571 査読有
- ⑦ Kimura K (その他 3 名, 1 番目) (2008) Role of JNK-Dependent Serine Phosphorylation of Paxillin in Migration of Corneal Epithelial Cells During Wound

Closure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 : 125-132 査読有

- ⑧ Kimura K(その他 8 名, 1 番目) (2007) Stimulation of corneal epithelial migration by a synthetic peptide (PHSRN) corresponding to the second cell binding site of fibronectin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 1110-1118 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 木村和博, 寺西慎一郎, 折田朋子, 西田輝夫: IL-1 $\beta$  による角膜上皮細胞間接着構造への作用. 第 33 回角膜カンファレンス・第 25 回日本角膜移植学会, 大阪府, 2009/02/19
- ② 木村和博, 劉 洋, 柳井亮二, 近間泰一郎, 西田輝夫: 角膜線維芽細胞での Poly(I:C) によるサイトカイン産生への作用. 第 45 回日本眼感染症学会, 福岡県, 2008/7/5
- ③ 木村和博, 寺西慎一郎, 福田憲, 川本晃司, 西田輝夫: 炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B 依存性角膜上皮バリアー機能の障害. 第 42 回日本眼炎症学会, 福岡県, 2008/7/4
- ④ 鈴木克佳, 近藤由樹子, 木村和博, 柳井亮二, 石田康仁, 能美典正, 相良 健, 西田輝夫: 強膜線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮に対するラタノプロストの促進作用. 第 112 回日本眼科学会総会, 神奈川県, 2008/04/19
- ⑤ 能美典正, 鈴木克佳, 近藤由樹子, 木村和博, 柳井亮二, 石田康仁, 相良 健, 西田輝夫: 強膜線維芽細胞によるコラーゲンゲルの収縮に対する TGF- $\beta$  1 の促進作用. 第 112 回日本眼科学会総会, 神奈川県, 2008/04/19
- ⑥ 木村和博, 寺西慎一郎, 西田輝夫: ギャップ結合構成蛋白質 connexin43 安定発現角膜上皮細胞の樹立. 第 32 回角膜カンファレンス・第 24 回日本角膜移植学会, 千葉県, 2008/2/29

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 和博 (KIMURA KAZUHIRO)

山口大学・医学部・助教

研究者番号：60335255

(2) 研究分担者   なし

(3) 連携研究者   なし