

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390451

研究課題名(和文) 細胞老化とエピジェネティック変化の制御による角膜上皮細胞治療法の基盤技術の開発

研究課題名(英文) The development of basic technologies for the cellular therapy of corneal epithelial cells by the regulation of cellular senescence and epigenetic changes

研究代表者

木下 茂 (KINOSHITA SHIGERU)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：30116024

研究成果の概要(和文)：本研究では微量の角膜上皮細胞を培養にて増殖させ移植するという方法を確立するため、角膜上皮細胞の細胞老化とエピジェネティクス変化について検討し、その対応策について検討した。角膜上皮細胞の特異的遺伝子であるケラチン12は角膜上皮細胞を分散後に急速に発現が低下する。このことはMAPKなどのシグナルが活性化することが主因であるが、経代とともにエピジェネティクス変化も伴うことが判明した。また細胞老化についてはp53経路とRb経路を抑制するSV40 large T抗原の遺伝子導入によって抑制が可能であったが、細胞だけを抽出した場合には内因性のhTERT遺伝子活性化が見られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to establish the method to transplant corneal epithelial cells which are amplified ex vivo from the limited number of autologous corneal epithelial cells, we investigated the cellular senescence and epigenetic changes of the cultured corneal epithelial cells as well as the possible countermeasures against these culture-associated drawbacks. We have found that the expression of the keratin 12 gene significantly decreased rapidly after the cell dissociation of the corneal epithelial cells, which was found to be due to the activation of several signaling pathways such as MAPK accompanied with the epigenetic changes of the keratin 12 promoter. The proliferation of the corneal epithelial cell was found to be significantly enhanced by the introduction of SV40 large T antigen which is known to inhibit p53 and Rb tumor-suppressive pathways. Quite interestingly, when corneal epithelial stem cells were transfected with the SV40 large T antigen, the endogenous hTERT gene was found to be activated, which is thought to be the risk to lead the tumorigenic transformation of these cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			

年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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：細胞老化、エピジェネティクス、角膜上皮、眼表面疾患、移植再生医療

1. 研究開始当初の背景

眼表面は角膜上皮と結膜上皮により構成され、角膜上皮は角膜輪部に存在するとされる角膜上皮 stem/progenitor 細胞そして TA 細胞により維持されている。様々な原因からこれら細胞群が疲弊すると、結膜上皮細胞が代償性に角膜上に侵入し著明な視力低下が生じる。このような病態を生じる化学外傷、眼類天疱瘡、スチーブンス・ジョンソン症候群（以下 S-J 症候群）等の重症眼表面疾患に対して、我々は培養角膜上皮細胞移植術の開発というトランスレーショナル研究を遂行してきた。実際、化学外傷等の片眼性眼表面疾患では、健常眼より角膜上皮 stem/progenitor 細胞を少量採取することが可能であり、これを用いた培養自家角膜上皮シート移植術により極めて良好な成績を得ることが出来ている。一方、両眼性眼表面疾患に対しては、アロ培養角膜上皮細胞移植が開発されたが、免疫抑制剤の使用による感染症発生の問題、拒絶反応の問題等を十分には解決出来ていないことから、現在では自家口腔粘膜上皮細胞を用いた培養口腔粘膜上皮シート移植の併用により、一定の成果を得ている。しかしながら、培養口腔粘膜上皮移植は、角膜必須の無血管性や透明性という点で、培養自家角膜上皮移植に遠く及ばないのが現状である。それゆえ、今後より高いレベルの角膜再生外科医療を追求していくには、口腔粘膜上皮細胞シートの改良のみならず、このような重症疾患においても自家角膜上皮細胞を用いる培養角膜上皮移植の可能性を模索していく必要があると思われる。

我々はヒト結膜上皮のなかに僅かではあるが異所性の角膜上皮細胞クラスターが存在すること、さらに移植した培養結膜上皮シートが部分的に角膜上皮の性質を持つことをこれまでに報告してきた。また S-J 症候群で角膜幹細胞完全喪失のため結膜上皮が角膜内侵入している症例でもケラチン 12 陽性の角膜上皮細胞が残存する現象を確認している。これらの事実から、両眼性の重症眼表面疾患の角膜あるいは結膜中に角膜上皮 stem/progenitor あるいは TA 細胞が残存している症例が少なからず存在するものと想像される。このような患者から残存している角膜上皮 stem/progenitor/TA

細胞を採取し、これらを用いて培養自家角膜上皮移植を行うことが出来れば、片眼性眼表面疾患における培養自家角膜上皮移植と同等の効果を得られる可能性がある。

2. 研究の目的

上記のような新しい角膜上皮細胞治療法を開発することを最終目的として考えると、少なくとも二つの基盤技術の確立が必須となってくる。一つは角膜上皮細胞における細胞老化の機序解明とその抑制法の開発である。このような重症疾患で採取できる細胞はごく少数となるため、移植術に必要な程度の細胞数まで増殖させる必要があるが、その際の培養過程で細胞老化が進行する可能性があるからである。また S-J 症候群患者では慢性的に眼表面上皮細胞の増殖が亢進していることを我々は報告しており、細胞を採取した時点で既にある程度の細胞老化が生じている可能性も十分に考えられる。老化した細胞は一般に細胞分裂能が低く、また遺伝子発現パターンも大きく変化するとされていることから、このような細胞を移植しても角膜上皮細胞の機能を十分に発揮できない可能性が高いと考えられる。

さらに今ひとつ考慮すべき問題点としてゲノムメチル化等のエピジェネティック変化がある。我々は角膜上皮細胞の培養過程で特異的遺伝子であるケラチン 12 の発現量が著明に減少することを発見し、このことがこの遺伝子のゲノムメチル化と相関することを見出した。ケラチン 12 遺伝子はノックアウトマウスの解析から角膜上皮層における重層構造の維持に必須であるとされており、それゆえケラチン 12 を発現しない角膜上皮シートを移植した場合、瞬目によるズリ応力で移植細胞が剥離するなどの問題が生じる可能性がある。またケラチン 12 の他にも培養過程で発現が変化する角膜上皮特異的遺伝子は多数見つかっており、このような遺伝子発現変化が無血管性や透明性維持といった角膜必須の機能に大きな影響を与える可能性がある。

本研究では我々がこれまで続けてきた角膜上皮細胞に関する基礎医学的研究と臨床応用研究の経験を集約して、これらの問題を解明すると同時に関連基盤技術を開発

し、最終的には、現在でも難治である両眼性の重症型眼表面疾患に対する根治的治療法を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

● 角膜上皮細胞培養過程におけるケラチン12遺伝子発現の変化の検討

ウサギ角膜上皮より酵素処理にて角膜上皮細胞を分散し、経代培養した。細胞よりゲノムDNAを抽出し、Bisulfite Sequencing法にてケラチン12遺伝子プロモーターのメチル化の変化を調べた。またシグナル阻害剤存在下で角膜上皮細胞を分散してケラチン12遺伝子の発現を定量RT-PCRにて検討した。

● 角膜上皮細胞への遺伝子導入効率の検討

いくつかの遺伝子導入試薬を用いて、ヒト角膜上皮に対する遺伝子導入効率を検討した。遺伝子導入はGFP発現プラスミドを用い、遺伝子導入効率の定量化にはフルオロメーターを用いた。

● 角膜上皮幹細胞の単離と角膜上皮細胞へのSV40 large T抗原遺伝子およびhTERT遺伝子の遺伝子導入

角膜上皮幹細胞を単離するため、既報に従いN-cadherinに対する抗体を用いた。細胞単離にはマグネットソーティング法を用いた。角膜上皮細胞の細胞老化の原因としてp53経路とRb経路、そしてテロメア経路を想定し、これらの阻害ないし活性化のためにSV40 large T抗原遺伝子とhTERT遺伝子をクローニングした。SV40 large T抗原遺伝子は不活化ヒト角膜上皮細胞(HCE-T)よりPCR法を用いてクローニングした。hTERT遺伝子は不活化細胞からのRT-PCRによるクローニングを試みたが困難であったためopen biosystems社より購入したプラスミドを用いてPCRで増幅してレンチウイルスにクローニングした。

● ヘルペスチミジンキナーゼによる細胞除去の可能性についての検討

ヘルペスチミジンキナーゼ自殺遺伝子を組み込んだプラスミドをHCE-T細胞に遺伝子導入し、ガンシクロビルを投薬した。

4. 研究成果

● 角膜上皮細胞培養過程におけるケラチン12遺伝子発現の変化の検討

ウサギ角膜上皮細胞を無血清培地(k-SFM, Invitrogen社)にて経代培養した。各経代毎にDNAを抽出し、キットを用いてCT conversionしたのちケラチン12遺伝子プロモーターに対するプライマーを用いてPCRを行い、TAクローニングして各アンプリコンに対して16コロニーをシーケンシングした。結果としてウサギケラチン12遺伝子プロモーターは培養過程において徐々にメチル化される傾向を示した。一方でウサギケラチン

12遺伝子の発現を培養過程でモニターすると、ウサギケラチン12遺伝子はウサギ角膜より酵素処理による細胞分散後に急速に発現量が減少し、12時間後にはIn vivoにおける発現量の8%、24時間後には2%、48時間後には0.05%となった。コンフルエント状態を保ったままで培養を継続すると、検討した培地の一部においてはケラチン12遺伝子の発現量がIn vivo角膜上皮細胞の20%程度まで回復した。ウサギケラチン12遺伝子の急速な発現低下にどのようなシグナルが関与するかを検討するため、いくつかのシグナル阻害剤をもちいてケラチン12遺伝子の発現を調べた。結果として細胞分散後のケラチン12遺伝子の発現低下はEGFR kinase阻害剤であるPD153035、MAPK阻害剤であるPD98059、ROCK阻害剤であるY27632によってある程度の改善がみられた。一方でPI3K阻害剤であるLY294002では逆に細胞分散後のケラチン

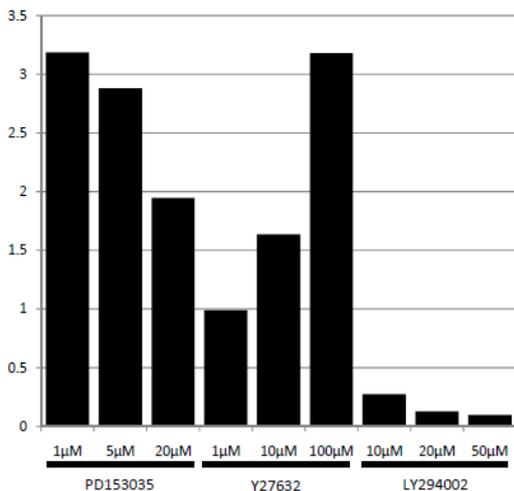
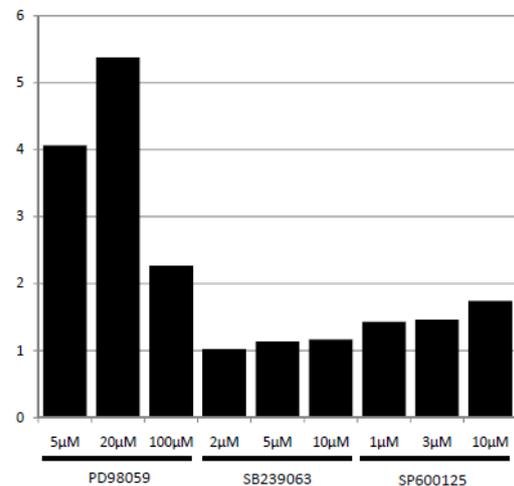


図1(上)、図2(下) 各種阻害剤による細胞分散後のケラチン12遺伝子発現レベル低下に対する影響。縦軸は阻害剤なしにおける発現レベルを1としたときの相対遺伝子発現レベル。

12 遺伝子の発現低下が促進された。(図 1) これらの結果によって、ウサギ角膜上皮細胞では培養過程でケラチン 12 遺伝子の発現が急速に減少するが、その主な原因となるのは EGF シグナルや MAPK シグナル、Rho-ROCK シグナルの活性化であり、逆に生存シグナルとして知られる PI3K-Akt シグナルはこれに対して抑制的に働いていることが示唆された。ケラチン 12 遺伝子プロモーターのゲノムメチル化は時間的にはこれより後に生じていることから、上記シグナル活性化によるケラチン 12 遺伝子の転写レベルの低下がまず最初におこり、次いでケラチン 12 遺伝子プロモーターのゲノムメチル化が生じている可能性が高いと考えられた。よって細胞培養過程の様に増殖シグナルや Rho-ROCK シグナルの亢進する状況ではケラチン 12 遺伝子の転写が抑制され、さらにこのような状況が長期間継続した場合には二次的にゲノムのメチル化が生じてエピジェネティックなレベルでも転写がサイレンシングされてしまう可能性が示唆された。これらの結果より臨床使用を目的として細胞培養を行う際には、長期間の培養は細胞特異的な機能を低下させる可能性があり避けることが望ましいと考えられた。培養直後に遺伝子発現が急速に低下する現象は他の角膜上皮特異的遺伝子 (ALDH3A1 や TGFBI 遺伝子) でも観察されており、同じようなメカニズムによって制御されている可能性が推測される。

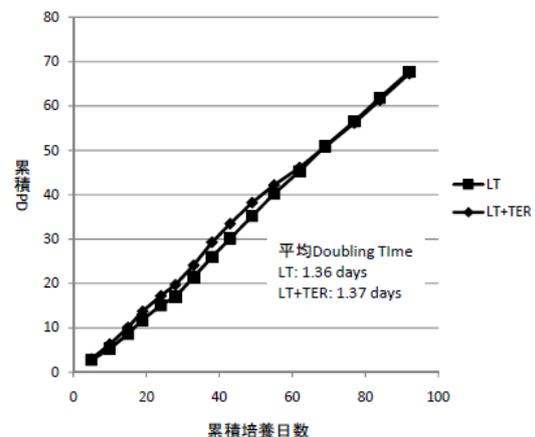
● 角膜上皮細胞への遺伝子導入効率の検討

ヒト不死化角膜上皮細胞 (HCE-T) を用いて、いくつかの遺伝子導入試薬を様々な条件下で用いて遺伝子導入効率を検討した。またトリプシン処理を遺伝子導入直前に行い、遺伝子導入効率への影響を調べた。その結果、HCE-T 細胞では Roche 社の Fugene HD で最も良い結果が得られ、細胞数 50000 個に対し Fugene HD を $1.875 \mu\text{l}$ にプラスミド DNA750ng にて複合体を形成させた場合に最も遺伝子導入効率を高めることが可能であった。興味深いことには、トリプシン処理を HCE-T 細胞に対し 1 分だけ行い、30 分インキュベーションしたのち遺伝子導入を行うと、行わないものに比べ約 3 倍程度の効率の上昇が見られた。これは HeLa 細胞のような上皮-間葉移行を起こした細胞では認められないため、E-cadherin を発現する上皮細胞でのみ認められる現象と考えられる。またウサギ角膜上皮細胞を酵素処理にて分散し P0 細胞を用いて遺伝子導入効率を検討したところ、Invitrogen 社の Lipofectamine LTX にて比較的効率良く遺伝子導入が可能であることが分かった。これらのことから一般的なりポフェクション法にトリプシンの短時間処理を組み合わせた方法により比較的効率良く角

膜上皮細胞にプラスミドを遺伝子導入することが可能であると考えられた。

● 角膜上皮幹細胞の単離と角膜上皮細胞への SV40 large T 抗原遺伝子および hTERT 遺伝子の遺伝子導入

角膜上皮細胞を酵素処理して分散し、抗 N-cadherin 抗体 (マウスモノクローナル抗体、DAKO 社製) を用いてマグネティックソーティング法にてソーティングしたポジティブソーティング法とネガティブソーティング法にて N-cadherin 陽性および陰性細胞を採取し、コロニー形成アッセイを行った。結果として N-cadherin 陽性細胞では陰性細胞に比べてコロニー形成能が高く、マグネティックソーティング法にて効率的に角膜上皮幹細胞が抽出できることが確認された。ヒト角膜上皮細胞を酵素処理にて分散したものに SV40 large T 抗原遺伝子をレンチウイルスにて遺伝子導入して細胞増殖について Population Doubling 解析を行った。また上記方法で幹細胞抽出したのものについて SV40 large T 抗原遺伝子と hTERT 遺伝子の遺伝子導入をレンチウイルスにて行った。結果として、SV40 large T 抗原遺伝子の遺伝子導入によって角膜上皮細胞の増殖能は遺伝子導入しないものと比べて著明に亢進した。しかしながら hTERT 遺伝子の発現を見たところ、発現量は不死化している HCE-T 細胞の 100 分の 1 程度であり、経代可能回数は遺伝子導入しないものが 5 回に対して遺伝子導入しているものでも 10 回程度であり最終的には老化形質を示して増殖停止した。一方で幹細胞抽出したのものについては、hTERT 遺伝子単独の遺伝子導入では遺伝子導入しないものとほぼ同じ経代可能回数であったが、SV40 large T 抗原遺伝子を導入したものと SV40 large T 抗原遺伝子と hTERT 遺伝子を共導入したものでは 20 経代を超えても細胞増殖が旺盛に継



続していた。(図 2) hTERT 遺伝子の発現およ

図 2 角膜上皮細胞に SV40 large T 抗原遺伝子を導入した細胞 (LT) とさらに hTERT 遺伝子を共導入した細胞 (LT+TER) Population Doubling 解析結果

びテロメラーゼ活性を見たところ、興味深いことに SV40 large T 抗原遺伝子のみ遺伝子導入したのもでも共導入したものと同程度に hTERT 遺伝子の発現しており、同程度のテロメラーゼ活性が見られた。(図 3) クロス

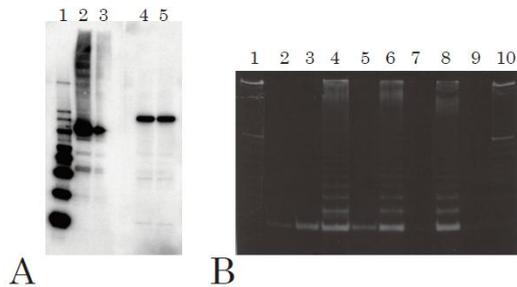


図 3

A: 角膜上皮細胞に SV40 large T 抗原遺伝子を導入した細胞 (LT, 2, 4) とさらに hTERT 遺伝子を共導入した細胞 (LT+TER, 3, 5) における SV40 large T 抗原タンパク (2, 3) と hTERT タンパク (4, 5) の発現

B: 角膜上皮細胞に SV40 large T 抗原遺伝子を導入した細胞 (LT) とさらに hTERT 遺伝子を共導入した細胞 (LT+TER) におけるテロメラーゼ活性を TRAP アッセイにて検出した。(1, 10: サイズマーカー、2: Dw、3, 5, 7: heat denatured samples、4: LT、6: LT+TER、8: HaCaT 細胞(ポジティブコントロール))

コンタミネーションによる可能性を考慮し、発現している hTERT 遺伝子が導入した hTERT 遺伝子由来か内因性の hTERT 遺伝子由来であるかを PCR 法で調べたところ、SV40 large T 抗原遺伝子のみ遺伝子導入したものでは内因性の hTERT 遺伝子が発現していた。これらの結果より、角膜上皮細胞は無血清培地であっても数経代程度で細胞老化 (Premature Senescence) を来すことが分かった。これは p53 と Rb 遺伝子を不活化する SV40 large T 抗原遺伝子の遺伝子導入によってキャンセルされることから、角膜上皮の細胞老化には p53 と Rb 遺伝子が極めて重要でありこれらを抑制することで Premature Senescence を回避できることが分かった。また幹細胞のフラクションを採取しない場合には SV40 large T 抗原遺伝子の導入だけでは内因性の hTERT 遺伝子は発現しないが、幹細胞フラクションに対して遺伝子導入した場合には SV40 large T 抗原遺伝子だけを導入した場合でも内因性の hTERT 遺伝子が発現する可能性があることが分かった。このことは細胞老化抑制の目的で一時的に p53 や Rb 遺伝子を抑制することが癌化の危険性を潜在的にもっている可能性を示唆している。一方で幹細胞フラクションを抽出しない場合、内因性の hTERT 遺伝子の発現が起こりにくくなるため安全性は高くなるうえ幹細胞抽出しない分だけ培養スタート時点の細胞数を増やせる利点があり、臨床目的にはより望ましい方法と言える。hTERT 遺伝子はヒトにおいてはかなり厳密に

抑制的に制御されていることが知られており、SV40 large T 抗原の遺伝子導入による内因性 hTERT 遺伝子の発現誘導は幹細胞における hTERT 遺伝子の発現制御が幹細胞以外の細胞と比べて異なっている可能性が考えられる。

● ヘルペスチミジンキナーゼによる細胞除去の可能性についての検討

ヘルペスチミジンキナーゼ自殺遺伝子を組み込んだプラスミドを HCE-T 細胞に遺伝子導入した後にガンシクロビルを投薬しても完全には死なないクローンが認められた。これはプラスミド全部が組み込まれずに一部だけが組み込まれた可能性や、リン酸化ガンシクロビルに対する閾値の存在の可能性、ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子の不活化の可能性が考えられた。このことから移植細胞が癌化した場合に自殺遺伝子によって移植細胞を除去することは完全には困難であると考えられた。

以上の結果から細胞培養時の発現変化やエピジェネティック変化を抑えるため、経代回数ではできるだけ少なくすることが望ましく、また幹細胞を抽出することは癌化の危険性や細胞数の確保の観点からも望ましくないと考えられた。また移植細胞が癌化した際の安全策としての自殺遺伝子を用いた細胞除去は完全には難しいことから、用いる細胞数と遺伝子導入効率を厳密にタイタリングして安全域を設定する必要性が考えられた。

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 11 件)

1. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S. Current progress and challenges in ocular surface reconstruction using cultivated epithelial sheet transplantation. *Med J Malaysia*. 2008;63 Suppl A:42.
2. Nakamura T, Ohtsuka T, Sekiyama E, Cooper LJ, Kokubu H, Fullwood NJ, Barrandon Y, Kageyama R, Kinoshita S. Hes1 regulates corneal development and the function of corneal epithelial stem/progenitor cells. *Stem Cells*. 2008;26:1265-1274.
3. Kinoshita S. 2009 ARVO-JOS Symposium. *Jpn J Ophthalmol*. 2009;54:179-181.
4. Nakano M, Ikeda Y, Taniguchi T, Yagi T, Fuwa M, Omi N, Tokuda Y, Tanaka M, Yoshii K, Kageyama M, Naruse S, Matsuda A, Mori K, Kinoshita S, Tashiro K. Three susceptible loci associated with primary open-angle glaucoma identified by

genome-wide association study in a Japanese population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:12838-12842.

5. Sotozono C, Ueta M, Koizumi N, Inatomi T, Shirakata Y, Ikezawa Z, Hashimoto K, Kinoshita S. Diagnosis and treatment of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis with ocular complications. *Ophthalmology*. 2009;116:685-690.

6. Takaoka M, Nakamura T, Sugai H, Bentley AJ, Nakajima N, Yokoi N, Fullwood NJ, Hyon SH, Kinoshita S. Novel sutureless keratoplasty with a chemically defined bioadhesive. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:2679-2685.

7. Yamasaki K, Kawasaki S, Young RD, Fukuoka H, Tanioka H, Nakatsukasa M, Quantock AJ, Kinoshita S. Genomic aberrations and cellular heterogeneity in SV40-immortalized human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:604-613.

8. Fukuoka H, Kawasaki S, Yamasaki K, Matsuda A, Fukumoto A, Murakami A, Kinoshita S. Lattice corneal dystrophy type IV (p.Leu527Arg) is caused by a founder mutation of the TGFBI gene in a single Japanese ancestor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:4523-4530.

9. Kinoshita S. [Research and development for treating devastating corneal diseases]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2010;114:161-199; discussion 200-161.

10. Nakatsukasa M, Kawasaki S, Yamasaki K, Fukuoka H, Matsuda A, Tsujikawa M, Tanioka H, Nagata-Takaoka M, Hamuro J, Kinoshita S. Tumor-associated calcium signal transducer 2 is required for the proper subcellular localization of claudin 1 and 7: implications in the pathogenesis of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Am J Pathol*. 2010;177:1344-1355.

11. Kawasaki S, Kinoshita S. Clinical and basic aspects of gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Dev Ophthalmol*. 2011;48:97-115.

[学会発表] (計5件)

1. Kinoshita S: Ocular surface inflammation modulated by innate immunity, Biology and Pathobiology of the Cornea, Gordon Research Conferences, Ventura, USA, March 10, 2010.

2. Kinoshita S: The pathogenesis and treatment of Stevens-Johnson syndrome. In Challenging Corneal Conditions. The

25th APAO Congress, Beijing, China, September 18, 2010.

3. Kinoshita S: Disordered innate immunity in Stevens-Johnson syndrome. In Advances on the biological investigations of external eye complications. The 25th APAO Congress, Beijing, China, September 18, 2010.

4. Kinoshita S: The Ocular Surface in Health and Disease. Claes H. Dohlman Conference Address. 6th International Conference on the Tear Film & Ocular Surface: Basic Science and Clinical Relevance, Florence, Italy, September 23, 2010.

5. Kinoshita S: Cultivated mucosal epithelial transplantation for severe ocular surface disorders. In Section V, Rescue of the Ocular Surface, XVI Curso Internacional de Cornea y Cirugia Refractiva, Cancun, Mexico, October 30, 2010.

[図書] (計2件)

1. 木下茂(編集)、スリット所見で診る角膜疾患 80、メジカルビュー社、東京、2008

2. Kawasaki S, Kinoshita S: Corneal Dystrophies, Karger, Basel (Switzerland), 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 茂 (KINOSHITA SHIGERU)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：30116024

(2) 研究分担者

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

稲富 勉 (INATOMI TSUTOMU)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：00305583

松田 彰 (MATSUDA AKIRA)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00312348

(3) 連携研究者

()

研究者番号：